ΧΑΡΟΚΟΠΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ

ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ

ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΧΟΡΗΓΗΣΗΣ ΒΙΟΔΡΑΣΤΙΚΩΝ ΚΛΑΣΜΑΤΩΝ ΕΛΑΙΟΛΑΔΟΥ ΣΕ ΔΕΙΚΤΕΣ ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟΥ ΣΤΡΕΣ ΥΠΕΡΧΟΛΗΣΤΕΡΟΛΑΙΜΙΚΩΝ ΚΟΥΝΕΛΙΩΝ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΕΠΙΜΕΛΕΙΑ: ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΙΔΗΣ ΜΙΧΑΗΛ

ΑΘΗΝΑ 2012

ΧΑΡΟΚΟΠΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ

Επίδραση χορήγησης βιοδραστικών κλασμάτων ελαιολάδου σε δείκτες οξειδωτικού στρες υπερχοληστερολαιμικών κουνελιών

<u>Τριμελής Επιτροπή:</u>

Αντωνοπούλου Σμαραγδή, Επιβλέπουσα Καθηγήτρια

Φραγκοπούλου Ελισάβετ

Νομικός Τζώρτζης

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την Καθηγήτρια **κ. Αντωνοπούλου Σμαραγδή** για την πολύτιμη βοήθεια, καθοδήγηση, στήριξη και υπομονή της καθ' όλη τη διάρκεια εκπόνησης της πτυχιακής μου εργασίας. Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω θερμά τα μέλη της επιτροπής μου, την Επίκουρη καθηγήτρια **κ. Φραγκοπούλου Ελισάβετ** για την πολύτιμη βοήθεια και καθοδήγησή της κατά τη διεξαγωγή του πειραματικού μέρους της πτυχιακής μου εργασίας, αλλά και για τις γνώσεις που μου μετέδωσε πάνω στο συγκεκριμένο αντικείμενο, καθώς και τον Επίκουρο Καθηγητή **κ. Νομικό Τζώρτζη,** ο οποίος ως μέλος του Εργαστηρίου Βιοχημείας του Χαροκοπείου Πανεπιστημίου ήταν στο πλευρό μου για οτιδήποτε και εάν χρειαζόμουν.

Επιπλέον, δε θα μπορούσα να μην ευχαριστήσω και την υποψήφια διδάκτορα **Βλαχογιάννη Ιωάννα**, καθώς και την επιστημονική συνεργάτιδα του Εργαστηρίου Βιοχημείας **Ξανθοπούλου Μαριάννα** για την άψογη συνεργασία και την πολύτιμη βοήθειά τους καθ' όλη τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας. Πολύτιμη βοήθεια ως προς τη διαχείριση και την προετοιμασία των δειγμάτων μου, μού προσέφερε και ο υποψήφιος διδάκτορας **κ. Σταματάκης Γεώργιος** του τμήματος Χημείας του ΕΚΠΑ, στον οποίο ανήκει και το πρωτόκολλο της πτυχιακής μου εργασίας.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά όλους μου τους καθηγητές στο Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο, για τις πολύτιμες γνώσεις και εμπειρίες που μου μετέδωσαν στην πορεία των τεσσάρων αυτών ετών.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ 8
SUMMARY 10
ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ 12
Α) ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ 19
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1^{Ο} ΑΘΗΡΟΣΚΛΗΡΩΣΗ 19
1.1 Εισαγωγή 19
1.2 Επιδημιολογία αθηροσκλήρωσης 20
1.3 Παράγοντες κινδύνου αθηροσκλήρωσης 21
1.4 Ιστοπαθολογικά ευρήματα και κλινική συμπτωματολογία αθηροσκλήρωσης 29
1.5 Παθοφυσιολογία αθηροσκλήρωσης 34
1.5.1 Στάδια αθηροσκλήρωσης 39
1.6 Υπερχοληστερολαιμία και αθηροσκλήρωση 47
1.6.1 Υπερχοληστερολαιμία και ενδοθηλιακή δυσλειτουργία 47
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2^{Ο} ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟ ΣΤΡΕΣ ΚΑΙ ΑΘΗΡΟΣΚΛΗΡΩΣΗ 49
2.1 Εισαγωγή-Ορισμός 49
2.2 Ελεύθερες ρίζες (ROS και RNS) 50
2.2.1 Αντιδράσεις ελεύθερων ριζών 53
2.2.2 Πηγές ROS 57
2.2.3 Βιολογικές δράσεις ελεύθερων ριζών (ROS και RNS) 64
2.3 Αμυντικά συστήματα του οργανισμού 71
2.3.1 Ενζυμικά συστήματα 72
2.3.2 Μη ενζυμικά αντιοξειδωτικά 76
2.4 Δείκτες οξειδωτικού στρες 79
2.5 Υπερχοληστερολαιμία και οξειδωτικό στρες 86
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3^{Ο} ΕΛΑΙΟΛΑΔΟ ΚΑΙ ΑΘΗΡΟΣΚΛΗΡΩΣΗ 88
3.1 Εισαγωγή 88
3.2 Ελαιόλαδο 88
3.2.1 Παραλαβή ελαιολάδου 88
3.2.2 Σύσταση ελαιολάδου 89
3.3 Ελαιόλαδο και αθηροσκλήρωση 91
3.3.1 Επιδημιολογικές μελέτες 91

3.3.2 Κλινικές μελέτες 96

3.3.3 Μελέτες σε πειραματόζωα 102

3.3.4 Μελέτες in vitro 108

3.4 Υδατικά απόβλητα ελαιουργίας 113

ΣΚΟΠΟΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ 119

Β) <u>ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ</u> 120

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4^{Ο} ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ 120

4.1 Απλό γιαούρτι του εμπορίου 2% λιπαρών και εμπλουτισμένο με εκχύλισμα OMWW πλούσιο σε BAL γιαούρτι του εμπορίου, ως πηγή τροφής για τα κουνέλια των πειραματικών ομάδων. 120

4.2 Μελέτη επίδρασης γιαουρτιού του εμπορίου με 2% λιπαρά το οποίο έχει εμπλουτιστεί με εκχύλισμα OMWW πλούσιο σε BAL, στην ανάπτυξη αθηροσκλήρωσης σε πειραματικό μοντέλο αθηροσκλήρωσης κουνελιού. 120

4.3 Προσδιορισμός πρωτεΐνης με τη μέθοδο Bradford 124

4.4 Προσδιορισμός αντιδραστικών ουσιών θειοβαρβιτουρικού οξέος (TBARS) 126

4.5 Στατιστική ανάλυση 128

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5^{Ο} ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ 129

5.1 Μελέτη της επίδρασης γιαουρτιού εμπορίου 2% λιπαρών το οποίο έχει εμπλουτιστεί με εκχύλισμα OMWW πλούσιο σε BAL στην αναστολή της ανάπτυξης αθηρωματικών πλακών, σε in vivo πειραματικό μοντέλο αθηροσκλήρωσης κουνελιού 129

5.1.1 Ανθρωπομετρικά και βιοχημικά χαρακτηριστικά των κουνελιών πριν την έναρξη της παρέμβασης (t=0 ημέρες) 130

5.1.2 Ανθρωπομετρικά και βιοχημικά χαρακτηριστικά των κουνελιών στο τέλος της παρέμβασης (t=45 ημέρες) 131

5.1.3 Σύγκριση ανθρωπομετρικών και βιοχημικών χαρακτηριστικών των κουνελιών μεταξύ του χρόνου t=0 ημέρες και του χρόνου t=45 ημέρες 132

5.1.4 Η επίδραση του πειράματος αναστολής στην εξέλιξη των αθηρωματικών πλακών 134

5.1.5 Η επίδραση της πειραματικής παρέμβασης στους δείκτες λιποειδικής υπεροξείδωσης TBARS 135

5.2 Μελέτη της επίδρασης γιαουρτιού εμπορίου 2% λιπαρών το οποίο έχει εμπλουτιστεί με εκχύλισμα OMWW πλούσιο σε BAL, στην υποστροφή της ανάπτυξης αθηρωματικών πλακών, σε in vivo πειραματικό μοντέλο αθηροσκλήρωσης κουνελιού 138

5.2.1 Ανθρωπομετρικά και βιοχημικά χαρακτηριστικά των κουνελιών πριν την έναρξη της παρέμβασης (t=0 ημέρες) 139

5.2.2 Ανθρωπομετρικά και βιοχημικά χαρακτηριστικά των κουνελιών στο χρόνο t=45 ημέρες 140

5.2.3 Ανθρωπομετρικά και βιοχημικά χαρακτηριστικά των κουνελιών στο τέλος της παρέμβασης (t=90 ημέρες)..... 141

5.2.4 Σύγκριση ανθρωπομετρικών και βιοχημικών χαρακτηριστικών των κουνελιών του πειράματος αναστολής μεταξύ του χρόνου t=0 ημέρες, του χρόνου t=45 ημέρες και του χρόνου t=90 ημέρες 142

5.1.4 Η επίδραση του πειράματος υποστροφής στην εξέλιξη των αθηρωματικών πλακών 145

5.1.5 Η επίδραση της πειραματικής παρέμβασης στους δείκτες λιποειδικής υπεροξείδωσης TBARS 147

5.3 Συσχέτιση τιμών TBARS στον ορό και στους ιστούς των κουνελιών με το μέγιστο και το μέσο πάχος της αθηρωματικής βλάβης.....150

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6^{Ο} ΣΥΖΗΤΗΣΗ 151

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ……162

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η αθηροσκλήρωση είναι μία χρόνια φλεγμονώδης νόσος η οποία προσβάλλει όλα τα αγγεία του σώματος και κυρίως τις μεσαίου και μεγάλου μεγέθους ελαστικές αρτηρίες. Τα καρδιαγγειακά νοσήματα, τα οποία αποτελούν την κλινική έκφραση της προχωρημένης αθηροσκλήρωσης, αποτελούν μία από τις κυρίαρχες αιτίες νοσηρότητας και θνησιμότητας παγκοσμίως. Το οξειδωτικό στρες μαζί με τη φλεγμονή και τη θρόμβωση, αποτελούν τους τρεις κεντρικούς παθοφυσιολογικούς μηχανισμούς της αθηροσκλήρωσης.

Βασιζόμενοι σε πλήθος επιδημιολογικών, κλινικών και in vitro μελετών σχετικά με τις ευεργετικές συνέπειες του ελαιολάδου στην κλινική βελτίωση των καρδιαγγειακών νοσημάτων μέσω αναστολής ή/και υποστροφής της εξέλιξης της αθηροσκλήρωσης, δημιουργήσαμε ένα λειτουργικό τρόφιμο, το οποίο αποτελεί απλό γιαούρτι του εμπορίου 2% λιπαρών εμπλουτισμένο με εκχύλισμα υδατικών αποβλήτων ελαιουργίας (OMWW) πλούσιο σε βιολογικώς δραστικά λιποειδή (BAL) και εξετάσαμε την ικανότητα του να αναστέλλει και να υποστρέφει την ανάπτυξη των αθηρωματικών πλακών σε μοντέλο αθηροσκλήρωσης κουνελιών. Προκειμένου να διαπιστώσουμε εάν το οξειδωτικό στρες είναι ένας από τους μηχανισμούς μέσω των οποίων το συγκεκριμένο τρόφιμο ασκεί τη βιολογική του δράση του, προσδιορίσαμε στον ορό και στους ιστούς των κουνελιών τους δείκτες λιποειδικής υπεροξείδωσης TBARS.

Για τη διεξαγωγή του πειράματος αναστολής χρησιμοποιήθηκαν τρεις ομάδες κουνελιών (Α, Β και Γ) με κάθε ομάδα να αποτελείται από 6 κουνέλια. Η ομάδα Α κατανάλωνε αθηρογονική δίαιτα με χοληστερόλη 1% w/w, η ομάδα Β κατανάλωνε αθηρογονική δίαιτα με απλό γιαούρτι του εμπορίου 2% λιπαρών και η ομάδα Γ κατανάλωνε αθηρογονική δίαιτα με γιαούρτι του εμπορίου 2% λιπαρών εμπλουτισμένο με BAL. Η παρέμβαση διήρκησε συνολικά 45 ημέρες. Για τη διεξαγωγή του πειράματος υποστροφής χρησιμοποιήθηκαν τρεις ομάδες κουνελιών (Δ, Ε και Ζ) με την πρώτη ομάδα να αποτελείται από πέντε κουνέλια και τις άλλες δύο από έξι η καθεμία. Για χρονικό διάστημα 45 ημερών και οι τρεις ομάδες κατανάλωναν αθηρογονική δίαιτα με χοληστερόλη 1% w/w. Από τις 45 έως τις 90 ημέρες η ομάδα Δ κατανάλωνε πρότυπη κουνελοτροφή, η ομάδα Ε πρότυπη κουνελοτροφή με απλό γιαούρτι του εμπορίου 2 % λιπαρών και η ομάδα Ζ απλό γιαούρτι του εμπορίου 2% λιπαρών εμπλουτισμένο με BAL. Στις 0, 45 και 90 μέρες αντίστοιχα (μόνο πείραμα υποστροφής) προσδιορίστηκαν ανθρωπομετρικά και βιοχημικά χαρακτηριστικά καθώς και οι τιμές TBARS στον ορό των κουνελιών. Στο τέλος των παρεμβάσεων, πραγματοποιήθηκε ευθανασία και προσδιορίστηκαν επιπλέον οι τιμές TBARS στο ήπαρ και στους νεφρούς των κουνελιών καθώς και το μέγιστο και μέσο πάχος των αθηρωματικών πλακών με κατάλληλη χρώση με εοσίνη και αιματοξυλίνη. Για την κανονικοποίηση της πρωτεΐνης των ιστών χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος Bradford.

Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων για το πείραμα της αναστολής αποκάλυψε ότι το λειτουργικό τρόφιμο που χρησιμοποιήσαμε είχε ως αποτέλεσμα μικρότερες τιμές TBARS στους νεφρούς και στο ήπαρ των κουνελιών που το κατανάλωναν σε σχέση με εκείνα που κατανάλωναν την αθηρογονική δίαιτα, κατά 61,4% και 24,3% αντίστοιχα. Επιπλέον, στην ομάδα αυτή παρατηρήθηκε μειωμένο μέγιστο πάχος αθηρωματικών πλακών κατά 54,3% σε σχέση με την ομάδα Α. Στο πείραμα της υποστροφής, η κατανάλωση του απλού γιαουρτιού οδήγησε σε μειωμένες τιμές TBARS στο ορό στο τέλος της παρέμβασης κατά 49,7% σε σχέση με την ομάδα που κατανάλωνε την κουνελοτροφή. Τέλος, η κατανάλωση του εμπλουτισμένου με

BAL γιαουρτιού οδήγησε σε μικρότερο μέσο πάχος αθηρωματικών πλακών κατά 31,9% σε σύγκριση με την κατανάλωση του απλού γιαουρτιού.

Το εμπλουτισμένο με BAL γιαούρτι φαίνεται να αναστέλλει την εξέλιξη της αθηροσκλήρωσης σε υπερχοληστερολαιμικά κουνέλια και πιθανόν αυτή η βιολογική δράση να επιτυγχάνεται μέσω της μείωσης του οξειδωτικού στρες στους ιστούς των ζώων. Παρόλα αυτά, η βιολογική του δράση στην υποστροφή της εξέλιξης της αθηροσκλήρωσης απαιτεί περαιτέρω έρευνα με μεγαλύτερο αριθμό πειραματοζώων ώστε να αποσαφηνιστεί οποιαδήποτε ευνοϊκή επίδραση του λειτουργικού αυτού τροφίμου. Σε περίπτωση που όντως επιβεβαιωθεί ικανότητα υποστροφής, πιθανόν αυτή να μην επιτυγχάνεται μέσω υποστροφής της οξειδωτικής καταστροφής των βιομορίων αν και ένα τέτοιο συμπέρασμα χρήζει επίσης περαιτέρω έρευνας.

SUMMARY

Atherosclerosis is a chronic inflammatory disease which offends all the vessels of the body and especially the medium and the large sized elastic arteries. Cardiovascular diseases, which consist the clinical expression of the advanced atherosclerosis, are one of the primary reasons of morbidity and mortality worldwide. Oxidative stress with inflammation and thrombosis, consist the three basic pathophysiological mechanisms of atherosclerosis.

Based on a great number of epidemiological, clinical and in vitro data as far as the beneficial effects of olive oil consumption on the clinical improvement of cardiovascular diseases through inhibition and/or regression of atherosclerosis progress is concerned, we designed a new functional food which is commercial yogurt 2% fat enriched with olive mill wastewater extract rich in biologically active lipids (BAL) and we tested its ability to inhibit and to regress the development of atherosclerotic lesions in an atherosclerosis rabbit model. In order to detect whether oxidative stress is implicated in the biological action of the enriched yogurt, we determined the TBARS markers, which are markers of the lipid peroxidation, in the tissues and the serum of the rabbits.

For the transaction of the inhibition experiment we used three different groups of rabbits (A, B and C) and each of them consisted of six rabbits. Group A consumed atherogenic diet with cholesterol 1% w/w, group B consumed atherogenic diet plus commercial yogurt 2% fat and group C was fed atherogenic diet mixed with the enriched with BAL yogurt. The intervention endured 45 days. For the attainment of the regression experiment we used three different groups of rabbits (D, E and F). The first one involved five rabbits and the other two six rabbits each of them. For 45 days, all the groups consumed atherogenic diet with cholesterol 1% w/w. From day 45 till the 90th day when was the end of the intervention, group D consumed standard chow, group E was fed with standard chow with commercial yogurt 2% fat and group F with the enriched yogurt. In days 0, 45 and 90 (only for the regression experiment) we received blood samples from the rabbits and we determined their biochemical characteristics and their TBARS values. Additionally, at the end of each experiment we weighed the animals and then we euthanatized them in order to determine the maximum and average thickness of their lesions as well as the TBARS values in the liver and kidney tissues. The normalization of the tissue protein was achieved with the Bradford method.

The statistical analysis of the results of the inhibition experiment, showed that the enriched with BAL yogurt resulted in lower TBARS values in the liver and kidney tissue of the rabbits at about 61,4% and 24,3% respectively, compared to group A. In addition, group C had lower maximum atherosclerotic lesion thickness at about 54,3%, compared to group A. At the end of the regression experiment, we observed lower serum TBARS values at about 49,7% in group E compared to group D. In the group with the enriched yogurt, we noted a 31,9% smaller average thickness, compared to group E.

The enriched with BAL yogurt seems to inhibit the progression of atherosclerosis in hypercholesterolemic rabbits and this biological action might be achieved through the oxidative stress reduction in the animal's tissues. Nevertheless, its biological effectiveness in the regression of atherosclerosis requires further investigation with a greater number of animals so as to be clarified any probability of atherosclerosis regression ability. Our experiment, showed that such a biological action in case it does exists, might not be achieved through the oxidative damage regression of the biomolecules. Such an inference would require further investigation though.

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ

AAPH: 2,2'-azobis-(2-amidinopropane) dihydrochloride, 2,2'-αζομπις-(2-αμιδινοπροπάνιο) διϋδροχλωρίδιο

ACh: acetylcholine, ακετυλοχολίνη

ACS: acute coronary syndromes, οξέα στεφανιαία σύνδρομα

AHA: American Heart Association, Αμερικάνικη Καρδιολογική Ένωση

AGEs: advanced glycation end products, προϊόντα προχωρημένης μη ενζυμικής γλυκοζυλίωσης

ALA: alpha-linolenic acid, άλφα-λινολενικό οξύ

AOPPs: advanced oxidation protein products, πρωτεϊνικά προϊόντα προχωρημένης οξείδωσης

AP: apigenin, απιγκενίνη

apo-B: apolipoprotein-B, απολιποπρωτεΐνη-Β

ATDC-5: AT805 teratocarcinoma-derived cells, AT805 κύτταρα τερατοκαρκινώματος

α-TOH: α-tocopherol, α-τοκοφερόλη

ATP: adenosine triphosphate, τριφωσφορική αδενοσίνη

BAL: biologically active lipids, βιολογικά δραστικά λιποειδή

BCAA: branch chain amino acids, αμινοξέα διακλαδισμένης αλύσου

BH_4: tetrahydrobiopterin, τετραϋδροβιοπτερίνη

BHT: butylated hydroxytoluene, βουτυλιωμένο υδροξυ-τολουόλιο

BSA: bovine serum albumin, βόεια αλβουμίνη ορού

Ca: calcium, ασβέστιο

cAMP-PDE: cyclic adenosine monophosphate-phosphodiesterase, κυκλική μονοφωσφορική αδενοσίνη-φωσφοδιεστεράση

CAT: catalase, καταλάση

CB: cerebroside, κερεβροζίτης

CD40L: CD40 ligand, υποκαταστάτης υποδοχέα CD40

CEPT: cholesteryl ester transfer protein, πρωτεΐνη μεταφοράς εστέρων χοληστερόλης

CHD: coronary heart disease, στεφανιαία νόσος

CHO: carbohydrates, υδατάνθρακες

CKD: chronic kidney failure, χρόνια νεφρική ανεπάρκεια

CO_2: carbon dioxide, διοξείδιο του άνθρακα

Co-Q_{10}: coenzyme-Q_{10}, συνένζυμο-Q_{10}

COX: cyclooxygenase, κυκλοοξυγονάση

CRP: C-reactive protein, C-αντιδρώσα πρωτεΐνη

CSF: colony stimulating factor, παράγοντας διέγερσης αποικιών

Cu: copper, χαλκός

CVD: cardiovascular disease, καρδιαγγειακή νόσος

DAG: diacylglycerol, διακυλογλυκερόλη

DBP: diastolic blood pressure, διαστολική αρτηριακή πίεση

DGDG: digalactosyl diglyceride, διγαλακτοζυλ-διγλυκερίδιο

DHPEA-EA: dihydroxyphenylethanol-elenolic acid, διϋδροξυφαινυλαιθανολ-ελενολικό οξύ

DHPEA-EDA: dialdeyde dihydroxyphenylethanol-elenolic acid, διϋδροξυφαινυλαιθανολ-ελενολικό οξύ

DHPG: dihydroxyphenylethylenglycol, διϋδροξυ-φαινυλ-αιθυλενογλυκόλη

DM: diabetes mellitus, σακχαρώδης διαβήτης

DNPH: dinitrophenylhydrazine, δινιτροφαινυλ-υδραζίνη

Dos: dioxygenases, διοξυγονάσες

DHPEA-EA: dihydroxyphenylethanol-elenolic acid, διϋδροξυφαινυλαιθανολ-ελενολικό οξύ

EC_{50}: half maximal effective concentration, συγκέντρωση ουσίας που επάγει τη συσσώρευση ενός μορίου κατά 50% της μέγιστης ικανότητας συσσώρευσης του μορίου

EC: endothelial cells, ενδοθηλιακά κύτταρα

EC-GPx: extracellular glutathione peroxidase, εξωκυττάρια υπεροξειδάση γλουταθειόνης

ECM: extracellular matrix, εξωκυττάρια θεμέλια ουσία

EGF: epidermal growth factor, επιδερμικός αυξητικός παράγοντας

EIA: environment impact assessment, αξιολόγηση επίδρασης περιβάλλοντος

ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay, ανοσοενζυμική μέθοδος προσρόφησης

ELSTAT: Hellenic Statistical Authority, Ελληνική Στατιστική Υπηρεσία

eNOS: endothelial nitric oxide synthase, ενδοθηλιακή συνθάση οξειδίου του αζώτου

ET: endothelin, ενδοθηλίνη

EU: European Union, Ευρωπαϊκή Ένωση

FA: fatty acid, λιπαρό οξύ

FAD: flavin adenine dinucleotide, φλαβινο-αδένινο δινουκλεοτίδιο

Fe: ferric, σίδηρος

FMN: flavin mononucleotide, φλαβινο-μονονουκλεοτίδιο

FRAP: ferric reducing antioxidant power, αναγωγική αντιοξειδωτική ισχύς σιδήρου

$FVII_c$: factor VII coagulant activity, δραστικότητα παράγοντα πήξης VII

GANG: ganglioside, γαγγλιοζίτης

GCERM: galactocerebroside, γαλακτοκερεβροζίτης

GC/MS: gas chromatography/mass spectrometry, αέρια χρωματογραφία/φασματοσκοπία μαζών

GL: glycolipids, γλυκολιποειδή

GLRXs: glutaredoxins, γλουταρεδοξίνες

GPx: glutathione peroxidase, υπεροξειδάση γλουταθειόνης

GSH: glutathione, γλουταθειόνη

G(S)R: glutathione reductase, αναγωγάση γλουταθειόνης

GSSG: glutathione disulfide, δισουλφίδιο γλουταθειόνης

GST: glutathione S-transferases, S-τρανσφεράσες γλουταθειόνης

HCl: hydrochloric acid, υδροχλωρικό οξύ

HDL-C: high density lipoprotein cholesterol, χοληστερόλη λιποπρωτεΐνης υψηλής πυκνότητας

HETE: monohydroxy-eicosatetraenoic acid, μονοϋδροξυ-εικοσατετραενοϊκό οξύ

HNE: hydroxynonenal, υδροξυνεανάλη

H_2O: water, νερό

HPLC: high performance liquid chromatography, υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης

HPLC/EC: high performance liquid chromatography/electrochemical detection, υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης/ηλεκτροχημικού εντοπισμού

HRT: hormone replacement therapy, θεραπεία ορμονικής υποκατάστασης

HT: hydroxytyrosol, υδροξυτυροσόλη

HTN: hypertension, υπέρταση

HVA: homovanillyl alcohol, ομοβανιλλυλική αλκοόλη

IC_{50}: half maximal inhibitory concentration, συγκέντρωση ουσίας που προκαλεί αναστολή συσσώρευσης ενός μορίου κατά 50% της μέγιστης ικανότητας αναστολής της ουσίας

ICAM: intercellular adhesion molecule, μόριο διακυτταρικής προσκόλλησης

IFN: interferon, ιντερφερόνη

IL: interleukin, ιντερλευκίνη

IL-1 (ra): IL-1 receptor antagonist, ανταγωνιστής υποδοχέα ιντερλευκίνης-1

iNOS: inducive nitric oxide synthase, επαγόμενη συνθάση οξειδίου του αζώτου

IR: insulin resistance, ινσουλινοαντίσταση

iso-PGF$_{2a}$: iso-prostaglandinF$_{2a}$, ισο-προσταγλανδίνηF$_{2a}$

LA: linoleic acid, λινελαϊκό οξύ

LDH: lactate dehydrogonase, γαλακτική αφυδρογονάση

LDL: low density lipoprotein, λιποπρωτεΐνη χαμηλής πυκνότητας

LDL-C: low density lipoprotein cholesterol, χοληστερόλη της λιποπρωτεΐνης χαμηλής πυκνότητας

LO: lipoxygenase, λιποξυγονάση

Lp(a): alpha lipoprotein, λιποπρωτεΐνη άλφα

LPC: lysophosphatidylcholine, λυσο-φωσφατιδυλο-χολίνη

LPS: lipopolysaccharides, λιποπολυσακχαρίδια

LTs: leucotrienes, λευκοτριένια

LU: luteolin, λουτεολίνη

Mac: macrophage adhesion molecule, μόριο προσκόλλησης των μακροφάγων

MAG: monoacylglycerols, μονοακυλογλυκερόλες

MCP: monocyte chemoattractant protein, χημειοτακτική πρωτεΐνη των μονοκυττάρων

M-CSF: macrophage-colony stimulating factor, παράγοντας διέγερσης αποικιών των μακροφάγων

MDA: malondialdehyde, μηλονυλοδιαλδεΰδη

MI: myocardial infarction, έμφραγμα του μυοκαρδίου

MMP: matrix metalloproteinase, μεταλλοπρωτεϊνάση της θεμέλιας ουσίας

Mo: molybdenum, μολυβδένιο

MPO: myeloperoxidase, μυελοπεροξειδάση

MS/MS: tandem mass spectrometry, παράλληλη φασματοσκοπία μαζών

MUFA: monounsaturated fatty acid, μονοακόρεστο λιπαρό οξύ

NAD(P)H: nicotinamide-adenine (phosphate) dinucleotide, νικοτιναμιδο-αδενινο (φωσφορικό) δινουκλεοτίδιο

NaOH: sodium hydroxide, υδροξείδιο του νατρίου

NF-kB: nuclear factor-kB, πυρηνικός μεταγραφικός παράγοντας-kB

NK: natural killer cells, λεμφοκύτταρα φυσικοί φονείς

NL: neutral lipids, ουδέτερα λιποειδή

nNOS: neuronal nitric oxide synthase, νευρωνική συνθάση οξειδίου του αζώτου

NOS: nitric oxide synthase, συνθάση οξειδίου του αζώτου

Nox: nicotinamide-adenine (phosphate) dinucleotide oxidase, οξειδάση νικοτιναμιδο-αδενινο (φωσφορικό) δινουκλεοτίδιο

O_2: molecular oxygen, μοριακό οξυγόνο

OHdG: hydroxydeoxyguanosine, υδροξυ-δεοξυγουανοσίνη

OLAB: oxidized low density lipoprotein autoantibodies, αυτό-αντισώματα κατά των οξειδωμένων λιποπρωτεϊνών χαμηλής πυκνότητας

OLC: oleocanthal, ολεοκανθάλη

OleA: oleuropein aglycone, άγλυκη μορφή ολευρωπαΐνης

Ole: oleuropein, ολευρωπαΐνη

OMWW: olive mill wastewater, υδατικά απόβλητα ελαιουργίας

OONLE: olive oil neutral lipid extract, εκχύλισμα ουδέτερων λιποειδών ελαιολάδου

OOPLE: olive oil polar lipid extract, εκχύλισμα πολικών λιποειδών ελαιολάδου

OOPL: olive oil polar lipids, πολικά λιποειδή ελαιολάδου

ORAC: oxygen radical absorbance capacity, ικανότητας απορρόφησης ελεύθερων ριζών οξυγόνου

OxLDL: oxidized low density lipoprotein, οξειδωμένη χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνη

OxLp(a): oxidized alpha lipoprotein, οξειδωμένη λιποπρωτεΐνη άλφα

oxoG: oxoguanosine, οξο-γουανοσίνη

oxoGua: oxoguanine, οξο-γουανίνη

PAF: platelet activating factor, παράγοντας ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων

PAF-AH: platelet activating factor acetylhydrolase, ακετυλοϋδρολάση παράγοντα ενεργοποίησης αιμοπεταλίων

PAF-R: platelet activating factor receptor, υποδοχέας παράγοντα ενεργοποίησης αιμοπεταλίων

PAI: plasminogen activator inhibitor, αναστολέας ενεργοποιητή πλασμινογόνου

PC: phosphatidylcholine, φωσφατιδυλοχολίνη

PDGF: platelet-derived growth factor, αυξητικός παράγοντας των αιμοπεταλίων

PDIs: protein disulfide isomerases, πρωτεϊνικές δισουλφιδικές ισομεράσες

PE: phosphatidylethanolamine, φωσφατιδυλοαιθανολαμίνη

PHGPx: phospholipid hydroperoxides glutathione peroxidase, υπεροξειδάση γλουταθειόνης υδροϋπεροξειδίων φωσφολιποειδών

PI: phosphatidylinositol, φωσφατιδυλοϊνοσιτόλη

PG: prostaglandin, προσταγλανδίνη

PL: polar lipids, πολικά λιποειδή

PLP: phospholipids, φωσφολιποειδή

PMA: phorbol myristate acetate, μυριστικό οξικό φορβολικό άλας

PMRS: plasma membrane redox system, ενζυμικό οξειδοαναγωγικό σύστημα της πλασματικής μεμβράνης

PPL: pomace polar lipids, πολικά λιποειδή πυρηνελαίου

PRP: platelet rich plasma, πλάσμα πλούσιο σε αιμοπετάλια

Prxs: peroxiredoxins, υπεροξυρεδοξίνες

PS: phosphatidylserine, φωσφατιδυλοσερίνη

PSGL: P-selectin glycoprotein ligand, γλυκοπρωτεϊνικός προσδέτης της P-σελεκτίνης

PUFA: polyunsaturated fatty acid, πολυακόρεστο λιπαρό οξύ

PVD: peripheral vascular disease, περιφερική αγγειακή νόσος

QU: quercetin, κερκετίνη

RAGEs: advanced glycation end products receptor, υποδοχέας προϊόντων προχωρημένης μη ενζυμικής γλυκοζυλίωσης

RANTES: regulated upon activation, Normal T-cell expressed and secreted, πρωτεΐνη που εκφράζεται και εκκρίνεται από φυσιολογικά ενεργοποιημένα Τ-λεμφοκύτταρα

RBC: red blood cells, ερυθρά αιμοσφαίρια

RH: hydrogen carbonate, υδρογονάνθρακες

RNS: reactive nitrogen species, δραστικές μορφές αζώτου

RONS: reactive oxygen and nitrogen species, δραστικές μορφές οξυγόνου και αζώτου

ROS: reactive oxygen species, δραστικές μορφές οξυγόνου

RPO: resistance plasma oxidation, αντίσταση του πλάσματος στην οξείδωση

S: sulfur, θείο

SBP: systolic blood pressure, συστολική αρτηριακή πίεση

Se: selenium, σελήνιο

SFA: saturated fatty acids, κορεσμένο λιπαρό οξύ

SLS: sphingolipids, σφιγγολιποειδή

SM: sphingomyelin, σφιγγομυελίνη

SMC: smooth muscle cells, λεία μυϊκά κύτταρα

SOD: superoxide dismutase, υπεροξειδική δισμουτάση

SULF: sulfatide, σουλφατίδιο

T: tyrosol, τυροσόλη

TAC: total antioxidant capacity, ολική αντιοξειδωτική ικανότητα

TAG: triacylglycerol, τριακυλογλυκερόλη

TBA: thiobarbituric acid, θειοβαρβιτουρικό οξύ

TBARS: thiobarbituric acid reactive substances, αντιδραστικές ουσίες θειοβαρβιτουρικού οξέος

t-BOOH: tert-butyl hydroperoxides, τερτ-βουτυλο-υδροϋπεροξείδια

TC: total cholesterol, ολική χοληστερόλη

TF: tissue factor, ιστικός παράγοντας

TGF: transforming growth factor, μετασχηματιστικός αυξητικός παράγοντας

THP: human acute monocytic leukemia cell line, κυτταρική σειρά ανθρώπινων μονοκυττάρων οξείας λευχαιμίας

TL: total lipids, ολικά λιποειδή

TMP: tetramethoxypropane, τετραμεθοξυ-προπάνιο

TNF: tumor necrosis factor, παράγοντας νέκρωσης των όγκων

TNL: total neutral lipids, ολικά ουδέτερα λιποειδή

t-PA: tissue plasminogen activator, ιστικός ενεργοποιητής πλασμινογόνου

TPL: total polar lipids, ολικά πολικά λιποειδή

TRAP: thrombin receptor activating peptide, πεπτίδιο ενεργοποίησης υποδοχέα θρομβίνης

Trx: thioredoxin, θειορεδοξίνη

TrxR: thioredoxin receptor, υποδοχέας θειορεδοξίνης

TX: thromboxane, θρομβοξάνη

VCAM: vascular adhesion molecule, μόριο αγγειακής κυτταρικής προσκόλλησης

VLDL: very low density lipoproteins, λιποπρωτεΐνες πολύ χαμηλής πυκνότητας

XDH: xanthine dehydrogonase, αφυδρογονάση ξανθίνης

XO: xanthine oxidase, οξειδάση ξανθίνης

XOR: xanthine oxidoreductase, οξειδοαναγωγάση ξανθίνης

Α) ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1^{Ο}

ΑΘΗΡΟΣΚΛΗΡΩΣΗ

1.1 Εισαγωγή

Ο όρος αθηροσκλήρωση, ετυμολογικά, προέρχεται από τις λέξεις άθηρο-στα Ελληνικά σημαίνει πλιγούρι-και σκλήρυνση[1]. Η αθηροσκλήρωση στην πραγματικότητα είναι μια προοδευτική ασθένεια[2]. Το γεγονός που την πυροδοτεί είναι πιθανόν μια φλεγμονώδης προσβολή, η οποία συμβαίνει δεκαετίες προτού η ασθένεια γίνει κλινικά εμφανής. Αφότου ξεκινήσει, εξελίσσεται ως αποτέλεσμα μιας σειράς αλλαγών στην κυτταρική σύσταση του αγγειακού τοιχώματος[3]. Χαρακτηρίζεται από ανομοιόμορφη πάχυνση του υποενδοθηλιακού χώρου, ο οποίος καταπατά τον αρτηριακό αυλό.

Κάθε αγγειακό τμήμα πιθανόν να επηρεαστεί από αυτή τη διαδικασία[2,4]. Η αιτιολογία, η θεραπεία και η κλινική επίπτωση της αθηροσκλήρωσης ποικίλει από το ένα αγγειακό τμήμα στο άλλο[4]. Η αθηροσκλήρωση επηρεάζει όλων των μεγεθών τα αιμοφόρα αγγεία, συμπεριλαμβανομένων των μεσαίου και μεγάλου μεγέθους ελαστικών αρτηριών[1,4,5]. Οι κύριες αρτηρίες που επηρεάζονται είναι η αορτή, η στεφανιαία, η εγκεφαλική και η ιγνυακή αρτηρία.

Η αθηροσκλήρωση είναι μία εξελικτική ασθένεια, η οποία ξεκινά στην παιδική ηλικία και εκδηλώνεται κλινικά στη μέση έως όψιμη ηλικία. Σε ένα γενικό πλαίσιο, συμβαίνει ως αποτέλεσμα τριών θεμελιωδών διαδικασιών. Αυτές οι διαδικασίες είναι: α) η συσσώρευση SMC (λεία μυϊκά κύτταρα) στο ενδοθήλιο, μαζί με ποικίλο αριθμό

φλεγμονωδών κυττάρων, όπως μακροφάγων και Τ-λεμφοκυττάρων, β) η συσσώρευση λιποειδών κυρίως με τη μορφή εστέρων χοληστερόλης και ελεύθερης χοληστερόλης, τόσο μέσα στα κύτταρα όσο και στον περιβάλλοντα εξωκυττάριο χώρο και γ) ο σχηματισμός μεγάλων ποσοτήτων ECM (εξωκυττάρια θεμέλια ουσία), η οποία συντίθεται από τα SMC και αποτελείται κυρίως από κολλαγόνο, ίνες ελαστίνης και πρωτεογλυκάνες[1].

Η αθηροσκλήρωση αποτελεί την υποκείμενη αιτία της CVD (καρδιαγγειακή νόσος)[6]. Συγκεκριμένα, η CVD αποτελεί την κλινική έκφραση της προχωρημένης αθηροσκλήρωσης και εκδηλώνεται κυρίως με μία από τις ακόλουθες κλινικές μορφές: την CHD (στεφανιαία νόσος), το εγκεφαλικό και την PVD (περιφερική αγγειακή νόσος). Τα CVDs, με επικρατέστερα την CHD και το εγκεφαλικό, αποτελούν μία από τις κυριότερες αιτίες νοσηρότητας και θνησιμότητας παγκοσμίως[7] και τη σημαντικότερη αιτία νοσηρότητας και θνησιμότητας στις χώρες του Δυτικού κόσμου[8,9].

1.2 Επιδημιολογία αθηροσκλήρωσης

Σύμφωνα με τα πιο πρόσφατα (2009/2010) στατιστικά στοιχεία της AHA (Αμερικάνικη Καρδιολογική Ένωση), ο συνολικός αριθμός θανάτων από CVDs για το έτος 2005 ήταν 278,9 θάνατοι ανά 100.000 άτομα. Από το 1995 έως το 2005, οι θάνατοι από CVDs μειώθηκαν κατά 26,4%. Εάν επικεντρωθούμε σε καθεμία από τις διαφορετικές κλινικές εκδηλώσεις της αθηροσκλήρωσης λαμβάνουμε τα εξής στοιχεία· η CHD το 2005 προκάλεσε περίπου έναν στους πέντε θανάτους των Αμερικανών. Συγκεκριμένα, η θνησιμότητα από CHD το 2005 υπολογίστηκε στα 445.687 άτομα. Υπολογίζεται ότι μέσα στο έτος 2009, 785.000 Αμερικανοί υπέστησαν νέο στεφανιαίο επεισόδιο και περίπου 470.000 νοσηλεύτηκαν εξαιτίας επαναλαμβανόμενου στεφανιαίου επεισοδίου. Κάνοντας αυτά τα στατιστικά στοιχεία ακόμα πιο δραματικά, θα μπορούσαμε να αναφέρουμε ότι περίπου κάθε 25 δευτερόλεπτα ένας Αμερικανός θα υφίσταται στεφανιαίο επεισόδιο και περίπου κάθε λεπτό ένας θα πεθαίνει από αυτό.

Ως προς την επίπτωση του εγκεφαλικού, υπολογίζεται ότι περίπου 795.000 άτομα στην Αμερική προσβάλλονται κάθε χρόνο από νέο ή επαναλαμβανόμενο εγκεφαλικό επεισόδιο. Για τα 610.000 από τα άτομα αυτά, το εγκεφαλικό είναι πρωτοεκδηλωθέν, ενώ τα υπόλοιπα 185.000 άτομα έχουν υποστεί εγκεφαλικό επεισόδιο και στο παρελθόν. Παρόλα αυτά, ελπιδοφόρο είναι το γεγονός ότι από το 1995 έως το 2005, το ποσοστό θνησιμότητας από εγκεφαλικά έχει μειωθεί κατά 29,7%, ενώ ο πραγματικός αριθμός θανάτων κατά 13,5%[10].

Αναφορικά με την Ελλάδα, η CVD είναι μία από τις πρωταρχικές αιτίες θανάτου, τόσο στους άνδρες όσο και στις γυναίκες. Δεδομένα από την ELSTAT (Ελληνική Στατιστική Υπηρεσία) προτείνουν ότι ο αριθμός θανάτων από CVDs αυξήθηκε από 14.603 ανά 100.000 άτομα το 1973, σε 31.797 ανά 100.000 άτομα το 2001. Επιπλέον, κατά τη διάρκεια της περιόδου 1970-1990, η Ελλάδα ήταν η μόνη χώρα της EU (Ευρωπαϊκή Ένωση) στην οποία το ποσοστό θνησιμότητας από CHD αυξήθηκε.

Ο 5-ετής επανέλεγχος (2001-2006) της μελέτης ATTICA, έδειξε ότι η ετήσια επίπτωση-προσαρμοσμένης της ηλικίας-της CVD ήταν 2,2% στους άνδρες και 1,2% στις γυναίκες, γεγονός που σημαίνει ότι περίπου 550.000 άτομα ανέπτυξαν κάποιας μορφής CVD κατά την πάροδο των πέντε αυτών ετών στην Ελλάδα[8].

1.3 Παράγοντες κινδύνου αθηροσκλήρωσης

Οι παράγοντες κινδύνου της αθηροσκλήρωσης διακρίνονται σε τροποποιήσιμους και μη τροποποιήσιμους. Στους μη τροποποιήσιμους παράγοντες κινδύνου ανήκουν η ηλικία, το φύλο, η γενετική προδιάθεση καθώς και το ατομικό και οικογενειακό ιστορικό CVD. Οι τροποποιήσιμοι παράγοντες κινδύνου διακρίνονται περαιτέρω σε εκείνους που σχετίζονται με συνήθειες του τρόπου ζωής και επομένως τροποποιούνται μέσω αλλαγών στον τρόπο ζωής, και σε εκείνους που τροποποιούνται τόσο μέσω αλλαγών του τρόπου ζωής όσο και μέσω φαρμακοθεραπείας. Στην πρώτη κατηγορία ανήκουν το κάπνισμα, η παχυσαρκία, οι διαιτητικές συνήθειες και η έλλειψη φυσικής δραστηριότητας, ενώ στη δεύτερη κατηγορία ανήκουν η δευτεροπαθής υπερχοληστερολαιμία, η HTN (υπέρταση), η IR (ινσουλινοαντίσταση), ο DM (σακχαρώδης διαβήτης) και το μεταβολικό σύνδρομο, γνωστό και ως σύνδρομο X[1,3,11].

Όλοι οι γνωστοί τροποποιήσιμοι παράγοντες κινδύνου επάγουν τη διατάραξη της ενδοθηλιακής λειτουργίας και του μεταβολισμού του αγγειακού τοιχώματος γενικότερα, προκαλώντας με αυτό τον τρόπο και τις δυσάρεστες συνέπειες της αθηροσκλήρωσης[2].

- **Ηλικία**

Η ηλικία αποτελεί ανεξάρτητο παράγοντα κινδύνου εκδήλωσης CHD. Περίπου το 85% των ατόμων που πεθαίνουν από CHD είναι άνω των 65 ετών, γεγονός που οφείλεται στην

επιδείνωση της αθηροσκλήρωσης με την πάροδο των ετών. Το κατώφλι ηλικίας για την εμφάνιση καρδιαγγειακών επεισοδίων είναι τα 45 έτη για τους άνδρες και τα 55 έτη για τις γυναίκες[12].

- **Φύλο**

Σε άτομα μέσης ηλικίας, η CHD εμφανίζεται δύο έως πέντε φορές συχνότερα στους άνδρες σε σχέση με τις γυναίκες, αναλόγως φυσικά και με τον υπό μελέτη πληθυσμό. Οι γυναίκες τυπικά εκδηλώνουν τη νόσο μία δεκαετία αργότερα από τους άνδρες, όπως αναφέρθηκε και παραπάνω[13].

- **Ατομικό και οικογενειακό ιστορικό**

Πλήθος επιδημιολογικών μελετών έχουν αναδείξει τη σημασία του οικογενειακού ιστορικού πρώιμης CHD ή άλλης αγγειακής νόσου, καθώς και το ατομικό ιστορικό CHD ή άλλης αθηρωματικής αγγειακής νόσου ως ανεξάρτητους παράγοντες κινδύνου εμφάνισης CVDs. Συγκεκριμένα, το βεβαρυμμένο οικογενειακό ιστορικό ως προς τα CVDs (εμφάνιση καρδιαγγειακού επεισοδίου σε πρώτου βαθμού συγγενείς ηλικίας <55 ετών για άνδρες και < 65 ετών για γυναίκες), συνδέεται με ΣΚ (σχετικός κίνδυνος) 1,5-1,7 για εκδήλωση CVD[14].

- **Γενετικοί παράγοντες**

Η οικογενής ή πρωτοπαθής υπερχοληστερολαιμία, μία αυτοσωματική επικρατής γενετική ανωμαλία που προκαλείται είτε από παντελή έλλειψη, είτε από ελλειμματική λειτουργία του υποδοχέα των LDL (χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνες), προκαλεί πρώιμη CHD. Περίπου το 5% όλων των ασθενών που εμφανίζουν οξύ MI (έμφραγμα του μυοκαρδίου) πριν την ηλικία των 60 ετών έχουν ετερόζυγη οικογενή υπερχοληστερολαιμία. Οι ασθενείς που είναι ομόζυγοι για το γονίδιο της οικογενούς υπερχοληστερολαιμίας, αναπτύσσουν πολύ σοβαρή CHD πριν την ηλικία των 20 ετών[3].

- **Παχυσαρκία**

Έχει επανειλημμένως αναφερθεί, ότι η αυξημένου βαθμού παχυσαρκία συνοδεύεται από υψηλότερα ποσοστά CVD. Η παχυσαρκία αποτελεί ανεξάρτητο παράγοντα κινδύνου σοβαρών στεφανιαίων επεισοδίων, αν και η δυσλιπιδαιμία, η HTN και ο DB-αναγνωρισμένοι παράγοντες κινδύνου αθηροσκλήρωσης-συχνά συνυπάρχουν και επιβαρύνουν την παθολογική κατάσταση.

Τυπικά, τα παχύσαρκα άτομα βρίσκονται σε μία προ-φλεγμονώδη κατάσταση, που πιθανόν να προδιαθέτει για ACS (οξέα στεφανιαία σύνδρομα). Η κατάσταση αυτή χαρακτηρίζεται από αυξημένα επίπεδα CRP (C-αντιδρώσα πρωτεΐνη) ορού, τα οποία αντανακλούν υψηλά επίπεδα κυτταροκινών[11]. Όντως, ο υπερβολικά αυξημένος λιπώδης ιστός εκφράζει αυξημένες ποσότητες πολλών προ-φλεγμονωδών κυτταροκινών, όπως ο TNF-a (παράγοντας νέκρωσης των όγκων) και η IL-6 (ιντερλευκίνη). Από την άλλη μεριά, η απώλεια βάρους αποδεδειγμένα προκαλεί μείωση των επιπέδων CRP και των συγκεντρώσεων IL-6 και IL-18 ορού. Κάτι τέτοιο δείχνει ότι η παχυσαρκία μπορεί από μόνη της να προάγει τη φλεγμονή και επομένως την εξέλιξη της αθηροσκλήρωσης ανεξαρτήτως των επιδράσεων της IR, του DM ή της δυσλιπιδαιμίας, παθολογικών δηλαδή καταστάσεων που επάγονται ή/και ενισχύονται από την ύπαρξη παχυσαρκίας[15].

Τέλος, η υπερβολική αύξηση του λιπώδους ιστού οδηγεί σε απελευθέρωση αυξημένων ποσοτήτων PAI-1 (αναστολέας ενεργοποιητή πλασμινογόνου), μόριο που οδηγεί την ισορροπία του ινωδολυτικού μηχανισμού προς μία προ-θρομβωτική κατάσταση[11].

- **Κάπνισμα**

Το κάπνισμα αποτελεί βασικό παράγοντα κινδύνου για την ανάπτυξη CHD, προκαλώντας σοβαρή μείωση στην ενδοθηλιο-εξαρτώμενη αγγειακή απόκριση. Προκαλεί ενδοθηλιακή δυσλειτουργία πιθανόν μέσω αυξημένου οξειδωτικού στρες. Το ίδιο ισχύει και για το παθητικό κάπνισμα. Το κάπνισμα έχει καταστροφικές επιδράσεις στην ενδοθηλιο-εξαρτώμενη αγγειοδιαστολή και στο βιοσυνθετικό μονοπάτι του $NO^{\cdot}$ (οξείδιο του αζώτου). Σε καπνιστές έχουν παρατηρηθεί σημαντικές αυξήσεις του VCAM-1 (μόριο αγγειακής κυτταρικής προσκόλλησης) και του ICAM-1 (μόριο διακυτταρικής προσκόλλησης), με παράλληλη μείωση μεταβολιτών του $NO^{\cdot}$.

Η επαγόμενη από το κάπνισμα ενδοθηλιακή δυσλειτουργία των περιφερικών αγγείων, αντιστρέφεται άμεσα με την από του στόματος χορήγηση αλλοπουρινόλης, η οποία αποτελεί αναστολέα του ενζύμου ΧΟ (οξειδάση της ξανθίνης). Τα δεδομένα αυτά, προτείνουν ότι η ΧΟ συμβάλλει σημαντικά στην ενδοθηλιακή δυσλειτουργία που προκαλείται από το κάπνισμα[11].

- **Διαιτητικές συνήθειες**

Η δίαιτα διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην εμφάνιση CVD καθώς επηρεάζει άλλους γνωστούς παράγοντες κινδύνου όπως η αρτηριακή πίεση, τα επίπεδα των λιποειδών και το σωματικό βάρος.

- **Φυσική δραστηριότητα**

Πολλές επιδημιολογικές μελέτες έχουν αναδείξει την έλλειψη φυσικής δραστηριότητας ως σημαντικό παράγοντα κινδύνου πρώιμης αθηροσκληρωτικής νόσου. Συγκεκριμένα, έχει φανεί ότι ο καθιστικός τρόπος ζωής αυξάνει την καρδιαγγειακή θνησιμότητα, ενώ αντίθετα η μέτρια σωματική δραστηριότητα, όπως το περπάτημα, μειώνει σημαντικά την επίπτωση της πρώιμης CVD[16]. Η μείωση αυτή οφείλεται κυρίως στην επίδραση της σωματικής δραστηριότητας σε ορισμένους κλασικούς παράγοντες κινδύνου της αθηροσκλήρωσης και συγκεκριμένα στην παχυσαρκία, στα επίπεδα των λιποειδών καθώς και στα επίπεδα της αρτηριακής πίεσης[17].

- **IR/DM**

Ο DM είναι ακόμα ένας σημαντικός παράγοντας κινδύνου της αθηροσκλήρωσης[15]. Παρόλο που αποτελεί κυρίως μεταβολική διαταραχή, αποτελεί και αγγειακή νόσο. Μάλιστα, η πιο σημαντική αιτία θανάτου μεταξύ διαβητικών ασθενών είναι οι καρδιαγγειακές επιπλοκές.

Παρόλο που ο DM αποτελεί κατάσταση αυξημένης πηκτικότητας του αίματος είναι ξεκάθαρο ότι η ενδοθηλιακή δυσλειτουργία που προκαλεί αποτελεί τον πιο σημαντικό παράγοντα θρομβωτικών επιπλοκών. Η υπεργλυκαιμία και η επακόλουθη παραγωγή AGEs (προϊόντα προχωρημένης μη ενζυμικής γλυκοζυλίωσης) είναι πιθανόν οι σημαντικότεροι παράγοντες, αν και όχι και οι μοναδικοί, της ενδοθηλιακής δυσλειτουργίας που παρατηρείται σε

διαβητικά άτομα[11]. Τα AGEs δεσμευόμενα στους RAGEs (υποδοχείς προϊόντων προχωρημένης μη ενζυμικής γλυκοζυλίωσης) μπορούν να αυξήσουν την παραγωγή προ-φλεγμονωδών κυτταροκινών και άλλων φλεγμονωδών οδών στα αγγειακά EC (ενδοθηλιακά κύτταρα), συμβάλλοντας με αυτό τον τρόπο στην ανάπτυξη αθηρο-φλεγμονωδών επιπλοκών.

Πέρα από την υπεργλυκαιμία, ο DM επάγει και τη δημιουργία οξειδωτικού στρες[15]. Οι διαβητικοί ασθενείς εμφανίζουν διαταραγμένη ενδοθηλιο-εξαρτώμενη αγγειοδιαστολή, αυξημένη ικανότητα συσσώρευσης και προσκόλλησης των αιμοπεταλίων, αυξημένα επίπεδα PAI-1 στο αρτηριακό τοίχωμα και συνεπώς διαταραγμένη ινωδόλυση, μείωση της έκφρασης της eNOS (ενδοθηλιακή συνθάση οξειδίου του αζώτου) και αύξηση της ET-1 (ενδοθηλίνη)[11].

- **Μεταβολικό σύνδρομο**

Το μεταβολικό σύνδρομο αποτελεί παθολογική κατάσταση στην οποία συνυπάρχουν διαταραγμένος μεταβολισμός γλυκόζης και ινσουλίνης, υπέρβαρο, κεντρική κατανομή λίπους, δυσλιπιδαιμία και HTN. Εξαιτίας του γεγονότος ότι συνδυάζει πολλούς από τους γνωστούς παράγοντες κινδύνου της αθηροσκλήρωσης είναι υπεύθυνο για την ανάπτυξη αυτής. Ένας από τους μηχανισμούς μέσω του οποίου μεσολαβείται η τελευταία, είναι και η άμεση επίδραση του μεταβολικού συνδρόμου στην αγγειακή ενδοθηλιακή δυσλειτουργία[11].

- **HTN**

Η HTN αποτελεί κλασικό παράγοντα κινδύνου για αθηροσκλήρωση[15]. Συγκεκριμένα, από τη μελέτη Framingham έχει φανεί ότι τιμές αρτηριακής πίεσης μεταξύ 130-139mmHg για την SBP (συστολική αρτηριακή πίεση) και 85-89mmHg για την DBP (διαστολική αρτηριακή πίεση), σχετίζονται με >διπλάσιο ΣΚ εμφάνισης CVDs σε σχέση με τις αντίστοιχες φυσιολογικές τιμές (120/80mmHg)[18].

Η επίδραση της παθολογικής αυτής κατάστασης στο αγγειακό σύστημα επιτελείται μέσω του συστήματος ρενίνης-αγγειοτενσίνης[11,15]. Η αγγειοτενσίνη πέρα από τις αγγειοσυσπαστικές της δράσεις, μπορεί να υποκινήσει και τη φλεγμονή του αγγειακού τοιχώματος. Συγκεκριμένα, προκαλεί την παραγωγή $O_2^{\cdot -}$ (ρίζα ανιόντος υπεροξειδίου) από τα αγγειακά EC και τα SMC. Μπορεί επίσης να αυξήσει την έκφραση προ-φλεγμονωδών κυτταροκινών από τα EC, όπως η IL-6 και η MCP-1 (χημειοτακτική πρωτεΐνη των μονοκυττάρων), καθώς και μορίων

προσκόλλησης των λευκοκυττάρων, όπως το VCAM-1[15]. Τέλος, αποτελεί ρυθμιστή του NF-kB (πυρηνικός μεταγραφικός παράγοντας-kB), ο οποίος συμμετέχει στα περισσότερα από τα σηματοδοτικά μονοπάτια που εμπλέκονται στη φλεγμονή[11].

- **Υπερχοληστερολαιμία**

Αποτελέσματα πειραματικών, επιδημιολογικών και κλινικών μελετών, αποδεικνύουν την ισχυρή συσχέτιση μεταξύ υπερχοληστερολαιμίας και αθηροσκλήρωσης. Πλήθος τυχαιοποιημένων κλινικών μελετών αναφέρουν αναστολή ή ακόμα και υποστροφή της εξέλιξης της αθηροσκλήρωσης μειώνοντας τα επίπεδα χοληστερόλης ορού, είτε με υπολιπιδαιμικά φάρμακα, είτε με αλλαγές του τρόπου ζωής, είτε με συνδυασμό αυτών. Επιπλέον, έχει φανεί ότι η επιθετική μείωση των επιπέδων χοληστερόλης ορού σε ασθενείς με πρόσφατο MI έχει ως αποτέλεσμα ραγδαία μείωση στον κίνδυνο επακόλουθων ισχαιμικών καρδιαγγειακών επιπλοκών.

Τα επίπεδα χοληστερόλης πλάσματος και η επίδρασή τους στην εξέλιξη της αθηροσκλήρωσης καθορίζονται από γενετικούς παράγοντες, από τον τύπο και την ποσότητα του λίπους της δίαιτας και από άλλους παράγοντες όπως η παχυσαρκία, η έλλειψη φυσικής δραστηριότητας και διάφορες άλλες παθολογικές καταστάσεις[3].

Φαίνεται ότι η ιδιότητα της χοληστερόλης να εμπλέκεται στη διαδικασία της αθηροσκλήρωσης σχετίζεται με την ενδοθηλιακή δυσλειτουργία που αυτή προκαλεί. Όντως, η υπερχοληστερολαιμία είναι ένας από τους παράγοντες που μπορεί να προκαλέσει ενδοθηλιακή δυσλειτουργία. Πειραματικές μελέτες υποστηρίζουν την άποψη ότι η μείωση των επιπέδων των λιποειδών μπορεί να μειώσει τη φλεγμονή, το οξειδωτικό στρες και την παραγωγή πρωτεασών, όπως οι MMPs (μεταλλοπρωτεϊνάσες της θεμέλιας ουσίας), που διασπούν την ECM. Κλινικά δεδομένα πιστοποιούν την εγκυρότητα αυτού του ευρήματος στους ανθρώπους.

Η μείωση αυτή στα επίπεδα των λιποειδών έχει ως αποτέλεσμα και τη μείωση της πιθανότητας για θρόμβωση της αθηροσκληρωτικής βλάβης. Η μείωση των θρομβωτικών επιπλοκών της πλάκας, μεσολαβείται και από τη μείωση των επιπέδων TF (ιστικός παράγοντας) που παρατηρείται ύστερα από τη μείωση των επιπέδων των λιποειδών.

Δεδομένα από τυχαιοποιημένες κλινικές μελέτες έχουν αποκαλύψει ότι η μείωση των επιπέδων των λιποειδών, οδηγεί σε μείωση δεικτών ενδοθηλιακής ενεργοποίησης όπως του VCAM-1. Επιπλέον, πειραματόζωα που υπόκεινται σε μείωση των επιπέδων των λιποειδών

πλάσματος, εμφανίζουν μειωμένο πλέγμα υπεράριθμων μικροαγγείων στον έσω χιτώνα του αγγειακού τοιχώματος. Αυτά το εύρημα είναι ιδιαίτερα σημαντικό, καθώς τα μικροαγγεία εντός των πλακών εξυπηρετούν ως πύλες διακίνησης λευκοκυττάρων, ενώ επίσης είναι ιδιαίτερα εύθραυστα και ευάλωτα σε διαρροές και αιμορραγίες. Επομένως αυτή η μειωμένη νεοαγγείωση, πιθανόν να συμβάλλει στη σταθεροποίηση των αθηροσκληρωτικών πλακών και επομένως στη μείωση του κινδύνου ρήξης και θρομβωτικών επιπλοκών[19].

Εκτός από τους λεγόμενους κλασικούς παράγοντες κινδύνου οι οποίοι αναφέρθηκαν παραπάνω, τα τελευταία χρόνια στη διεθνή βιβλιογραφία έχουν αναδυθεί και κάποιοι καινούριοι παράγοντες κινδύνου οι οποίοι ονομάζονται νεώτεροι παράγοντες κινδύνου της αθηροσκλήρωσης. Οι νεώτεροι παράγοντες κινδύνου, οι οποίοι σύμφωνα με ορισμένες μελέτες φαίνεται να επιδρούν ανεξάρτητα στον κίνδυνο ανάπτυξης αθηροσκλήρωσης και επομένως και CVDs, είναι οι εξής: η a-υπερλιποπρωτεΐναιμία, η υπερομοκυστεΐναιμία, η υπερτριακυλογλυκερολαιμία, η υπερινωδογοναιμία και το οξειδωτικό στρες[15].

- **Lp(a) (Λιποπρωτεΐνη άλφα)**

Η Lp(a) έχει τα τελευταία χρόνια αναγνωριστεί ως ανεξάρτητος παράγοντας κινδύνου για CHD. Οι μηχανισμοί που εμπλέκονται στην αθηρογονικότητα της Lp(a) περιλαμβάνουν: α) την τάση της να σχηματίζει ιζηματώδεις μάζες και ακολούθως να κατακρημνίζεται, β) την αυξημένη ικανότητα πρόσδεσης στις γλυκοζαμινογλυκάνες και σε άλλες δομές του αγγειακού τοιχώματος, γ) τη διαταραγμένη ινωδόλυση που προκαλεί, εξαιτίας της δομικής της ομολογίας με το πλασμινογόνο και της ρύθμισης της σύνθεσης του PAI-1 με αποτέλεσμα τη δημιουργία προ-θρομβωτικού περιβάλλοντος και δ) της ικανότητάς της να επάγει τον πολλαπλασιασμό των SMC. Επιπλέον, έχει αναφερθεί, ότι η OxLp(a) (οξειδωμένη λιποπρωτεΐνη άλφα) είναι δέκα φορές πιο αθηρογόνα από την OxLDL (οξειδωμένη χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνη)[1].

- **Ομοκυστεΐνη**

Ο ρόλος της ομοκυστεΐνης στην παθογένεια της αθηροσκλήρωσης αναφέρθηκε για πρώτη φορά από τον Wilcken και τον συνεργάτη του το 1976[20]. Η ομοκυστεΐνη αποτελεί προϊόν μεταβολισμού της μεθειονίνης. Τα αυξημένα επίπεδα ομοκυστεΐνης πλάσματος

αποτελούν παράγοντα κινδύνου για αποφρακτική νόσο στα στεφανιαία, εγκεφαλικά και περιφερικά αγγεία και παράγοντα πρόβλεψης της επιβίωσης ασθενών με CHD. Παρόλα αυτά δεν έχει αποδειχτεί κάποια αιτιολογική συσχέτιση[11]. Ο Nurk και οι συνεργάτες του ανέφεραν ότι τα υψηλά επίπεδα ομοκυστεΐνης πλάσματος είναι ισχυρός προγνωστικός παράγοντας CVD μόνο στους ηλικιωμένους και ειδικά μεταξύ εκείνων με προϋπάρχουσα CVD[21].

Η συσχέτιση μεταξύ ομοκυστεΐνης και CHD πιθανόν να μεσολαβείται από την ενεργοποίηση της πήξης και την τροποποίηση της ρύθμισης της απόκρισης και των αντιπηκτικών ιδιοτήτων των EC. Ο διαταραγμένος μεταβολισμός της ομοκυστεΐνης πιθανόν να οδηγεί και σε οξειδωτικό στρες, το οποίο ενδέχεται να έχει κεντρικό ρόλο στις αγγειακές διαταραχές που μεσολαβούνται από την υπερομοκυστεϊναιμία. Η ομοκυστεΐνη, ενισχύει επίσης την έκφραση TNF-a, ο οποίος επάγει μία προ-φλεγμονώδη κατάσταση που πιθανόν να συμβάλλει στην ανάπτυξη αθηροσκλήρωσης.

Το φυλλικό οξύ, η βιταμίνη B_6 και η βιταμίνη B_{12} μειώνουν σημαντικά τα επίπεδα ομοκυστεΐνης πλάσματος[11].

- **Ινωδογόνο**

Επιδημιολογικά δεδομένα υποστηρίζουν μία ανεξάρτητη συσχέτιση μεταξύ των αυξημένων επιπέδων ινωδογόνου και της καρδιαγγειακής νοσηρότητας και θνησιμότητας. Το ινωδογόνο είναι μία γλυκοπρωτεΐνη που δραστηριοποιείται στο τελευταίο βήμα του καταρράκτη της πήξης, ο οποίος ενεργοποιείται ως απόκριση στον αγγειακό ή ιστικό τραυματισμό.

Πέρα από την εμπλοκή του στη διαδικασία της θρόμβωσης το ινωδογόνο διαθέτει πλήθος άλλων λειτουργιών που το καθιστούν πιθανό παράγοντα συμμετοχής στην αγγειακή νόσο. Οι λειτουργίες αυτές είναι οι εξής: α) ρύθμιση της διαδικασίας της κυτταρικής προσκόλλησης, της χημειοταξίας και του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, β) αγγειοσύσπαση σε σημεία τραυματισμού του αγγειακού τοιχώματος, γ) διέγερση της διαδικασίας συσσώρευσης των αιμοπεταλίων και δ) καθορισμός του ιξώδους του αίματος.

Το ινωδογόνο όπως και η CRP είναι ένα αντιδρών μόριο οξείας φάσης. Η ηπατική σύνθεση ινωδογόνου μπορεί να τετραπλασιαστεί ως απάντηση σε μηχανισμούς φλεγμονής ή μόλυνσης[22].

- **TAG (τριακυλογλυκερόλες)**

Οι TAG ενεργοποιούν την αγγειακή έκφραση NF-kB. Αυτός είναι και ένας από τους λόγους για τον οποίο η μεταγευματική υπερτριακυλογλυκερολαιμία θεωρείται παράγοντας κινδύνου για CVD. Επίσης, έχει προταθεί ότι η μεταγευματική υπερτριακυλογλυκερολαιμία επάγει την ενδοθηλιακή δυσλειτουργία μέσω της δημιουργίας οξειδωτικού στρες[11].

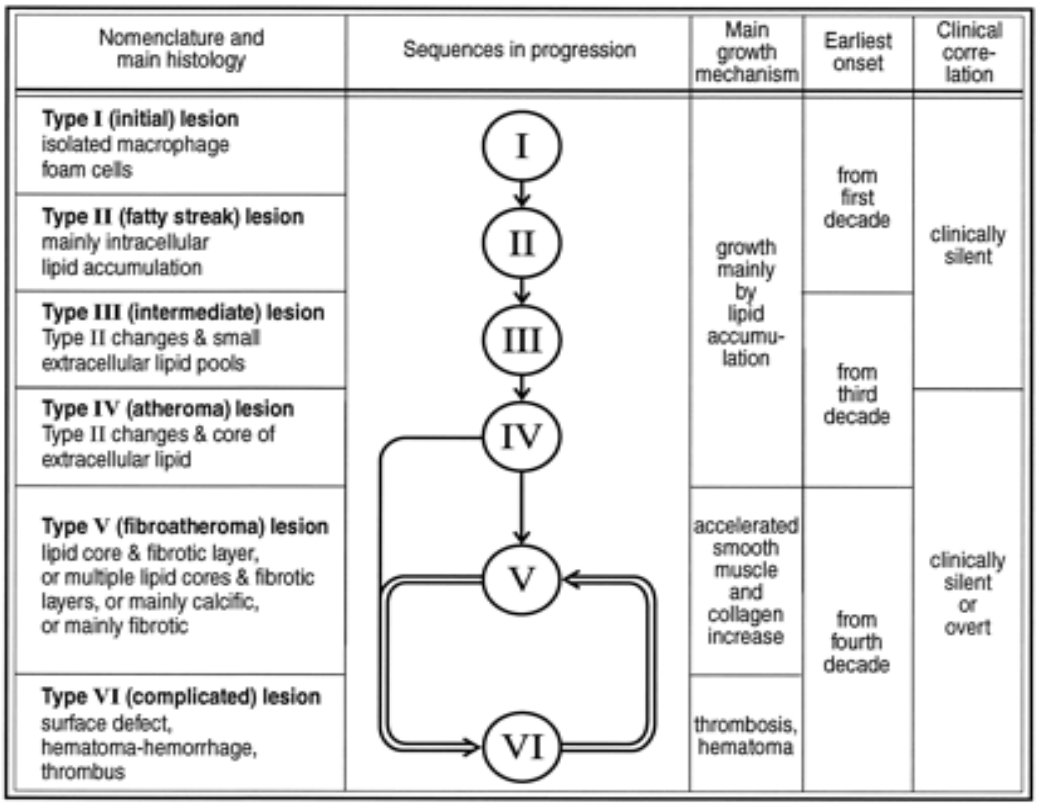
- **Οξειδωτικό στρες**

Το οξειδωτικό στρες πιστεύεται ότι κατέχει σημαντικό ρόλο στην εκκίνηση και στην εξέλιξη της αθηροσκλήρωσης. Υποστηρίζεται ότι η συσχέτιση του οξειδωτικού στρες με τη διαδικασία της αθηροσκλήρωσης μεσολαβείται κυρίως μέσα από την οξείδωση της LDL-C (χοληστερόλη της λιποπρωτεΐνης χαμηλής πυκνότητας), ενώ και άλλα μακρομόρια (πρωτεΐνες, DNA) φαίνεται επίσης να εμπλέκονται. Γιαυτό το λόγο οι OxLDL πιστεύεται ότι παίζουν σημαντικό ρόλο στη διαδικασία της αθηροσκλήρωσης. Συγκεκριμένα, οι LDL που διαπερνούν το δυσλειτουργικό ενδοθήλιο, οξειδώνονται στον υποενδοθηλιακό χώρο από ποικίλους παράγοντες οι οποίοι βρίσκονται εκεί, μεταξύ των οποίων τα ένζυμα MPO (μυελοπεροξειδάση) και 15-LO (λιποξυγονάση) και τα οξειδωτικά μόρια $O_2^{\cdot -}$ και $ONOO^-$ (υπεροξυνιτρώδες), ενισχύοντας τη δημιουργία οξειδωτικού στρες.

Με αυτό τον τρόπο σχηματίζονται οι OxLDL οι οποίες είναι πλούσιες σε οξειδωμένα PLP (φωσφολιποειδή). Η φαγοκυττάρωσή τους από τα μακροφάγα, τα οποία επίσης έχουν εισέλθει στον υποενδοθηλιακό χώρο, έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό αφρωδών κυττάρων. Τα τελευταία επάγουν μέσω διάφορων φλεγμονωδών μηχανισμών την εξέλιξη της αθηροσκλήρωσης καθώς και την επέκταση της αθηροσκληρωτικής πλάκας[23].

1.4 Ιστοπαθολογικά ευρήματα και κλινική συμπτωματολογία αθηροσκλήρωσης

Σύμφωνα με την AHA, οι ιστολογικές βλάβες της αθηροσκλήρωσης διακρίνονται σε έξι κατηγορίες, ανάλογα με τα ιστοπαθολογικά χαρακτηριστικά της αθηροσκληρωτικής πλάκας[24].



Σχήμα 1.1: Διαγραμματική απεικόνιση των σταδίων εξέλιξης της αθηροσκλήρωσης

Η μετανάστευση των μονοκυττάρων στον υποενδοθηλιακό χώρο και η δημιουργία λιποειδικών γραμμώσεων χαρακτηρίζουν τις βλάβες τύπου I και II αντίστοιχα[25]. Ιστολογικά, οι βλάβες τύπου I δεν έχουν κάποιο ιδιαίτερο γνώρισμα. Η πάχυνση όμως του έσω χιτώνα, που είναι μία από τις πρωιμότερες ιστολογικές αλλαγές που παρατηρούνται στην αθηροσκλήρωση, προκαλείται σε πρώτη φάση από τα μακροφάγα τα οποία συσσωρεύουν λίπος. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να μετατρέπονται σε αφρώδη κύτταρα γεμάτα με λιποειδικά συστατικά, διαμορφώνοντας έτσι τις βλάβες τύπου II της αθηροσκλήρωσης, οι οποίες οριοθετούνται από αυτές ακριβώς τις περιοχές εναπόθεσης λίπους στον υποενδοθηλιακό χώρο, γνωστές και ως λιποειδικές γραμμώσεις.

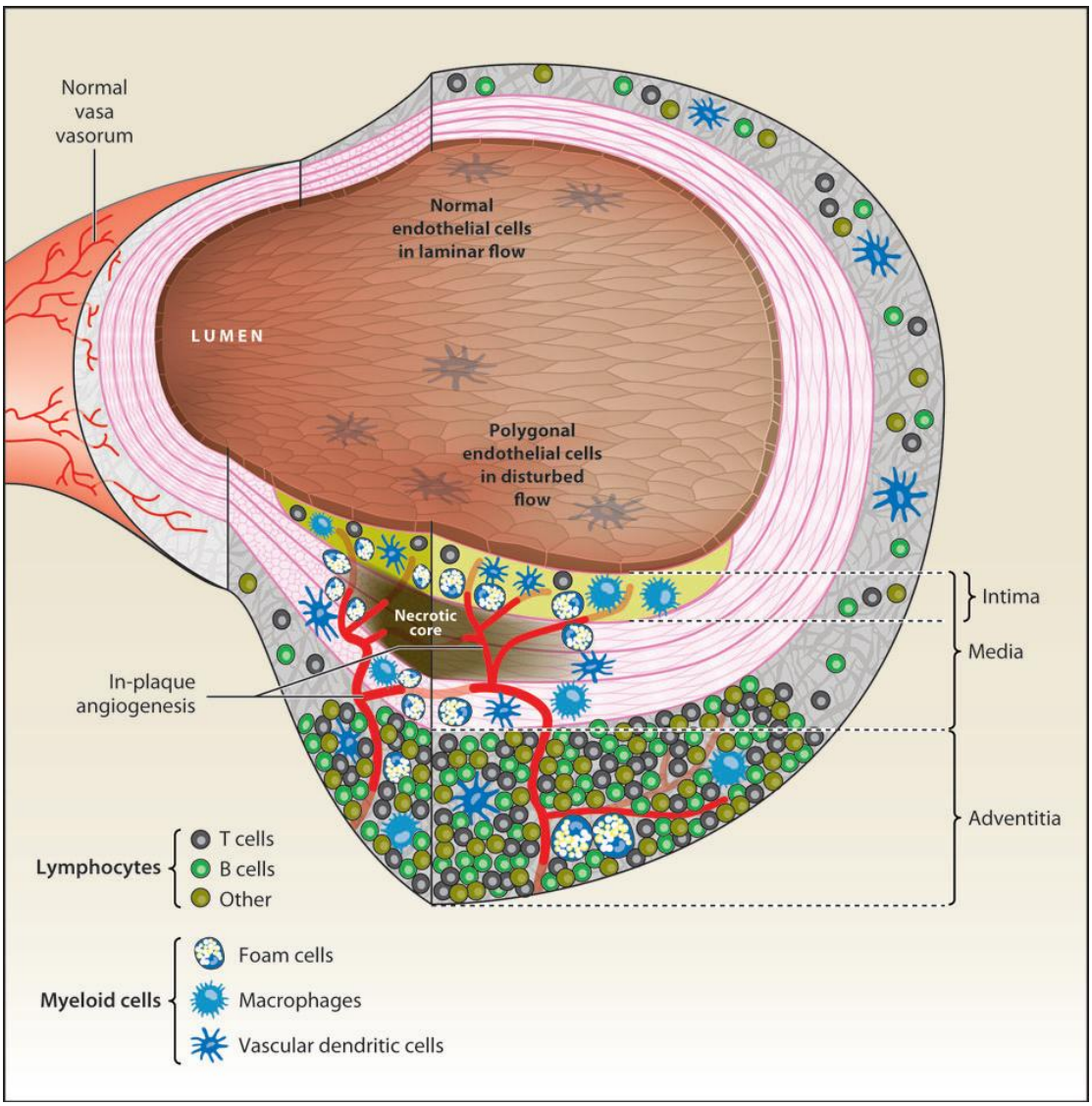
Ο συνεχιζόμενος σχηματισμός αφρωδών κυττάρων και η νέκρωση των μακροφάγων αποτελούν ιστολογικά τις βλάβες τύπου III, οι οποίες χαρακτηρίζονται επιπλέον από μικρές εξωκυττάριες συσσωρεύσεις λίπους[2]. Αυτές οι εναποθέσεις λίπους συνενώνονται στη συνέχεια για να σχηματίσουν έναν μεγάλο ή περισσότερους μικρούς πυρήνες λιποειδών[25].

Στις βλάβες τύπου IV, η αποδιοργάνωση της δομής του έσω χιτώνα προκαλείται σχεδόν αποκλειστικά από την υπερβολική συσσώρευση εξωκυττάριων λιποειδών, τα οποία εδραιώνονται στον υποενδοθηλιακό χώρο, όπου ήδη έχουν σχηματιστεί πυρήνες λίπους[24]. Στη

συνέχεια η μετανάστευση και ο πολλαπλασιασμός των SMC, έχει ως αποτέλεσμα την περίφραξη του πυρήνα λιποειδών με κολλαγόνο (το γνωστό ινώδες κάλυμμα), με αποτέλεσμα τη δημιουργία των βλαβών τύπου V[25]. Οι βλάβες αυτές διακρίνονται σε τρεις υποκατηγορίες· η παρουσία ινωδών στιβάδων συνδετικού ιστού, μαζί με έναν ή περισσότερους πυρήνες λίπους κατηγοριοποιείται ως βλάβη τύπου V_a (ινωδο-αθήρωμα), η ασβεστοποίηση της ινώδους πλέον πλάκας είναι γνωστή ως βλάβη τύπου V_b (ασβεστώδες ινωδο-αθήρωμα) και τέλος η βλάβη τύπου V_c αναφέρεται σε αθηροσκληρωτική πλάκα που περιβάλλεται από ινώδεις στιβάδες, χωρίς ή με ελάχιστα λιποειδή και χωρίς ή με ελάχιστο ασβέστιο.

Απώλειες του ινώδους καλύμματος, αιματώματα και εναποθέσεις θρόμβων οριοθετούν ουσιαστικά τις βλάβες τύπου VI, οι οποίες έχουν και την πιο περίπλοκη αρχιτεκτονική δομή, οδηγώντας σε περαιτέρω καταστροφή, αποδιοργάνωση και επιτάχυνση της μετατροπής της νόσου από κλινικά σιωπηλή σε κλινικά έκδηλη νόσο[24].

Η ρήξη της πλάκας και η επακόλουθη θρόμβωση συνήθως προκαλεί τις πιο επικίνδυνες, οξείες επιπλοκές της αθηροσκλήρωσης. Έχει φανεί ότι η ενεργοποίηση της φλεγμονώδους διαδικασίας, παρά ο βαθμός της στένωσης, καθιστά την πλάκα ευάλωτη στη διάσπαση και επισπεύδει τη θρόμβωση με τελικό αποτέλεσμα την ισχαιμία του ιστού. Αθηρώματα προηγμένης επιπλοκής παρουσιάζουν μικρή ποσότητα SMC στα σημεία όπου η πλάκα έχει υποστεί ρήξη και μεγάλο αριθμό μακροφάγων, εκ των οποίων και τα δύο αποτελούν χαρακτηριστικά αθηρωματικών πλακών που έχουν διαρρηχθεί και επομένως προκαλέσει θανατηφόρα οξεία θρόμβωση[26].



Σχήμα 1.2: Εξέλιξη της αθηροσκλήρωσης στον υποενδοθηλιακό χώρο

Σε ένα γενικό πλαίσιο, οι βλάβες τύπου I και II, οι οποίες μερικές φορές αναφέρονται με τον όρο πρώιμες βλάβες, είναι οι μόνες που εμφανίζονται σε βρέφη και παιδιά, παρόλο που συναντώνται και σε ενήλικες. Οι βλάβες τύπου III, εξελίσσονται αμέσως μετά την εφηβεία και στη σύνθεσή τους αποτελούν τη γέφυρα μεταξύ των πρόωρων και των εξελιγμένων βλαβών. Οι βλάβες τύπου IV είναι συχνές από την τρίτη δεκαετία της ζωής και μετά. Επίσης, μετά την τρίτη δεκαετία της ζωής ξεκινούν να εμφανίζονται οι βλάβες τύπου V και VI που αποτελούν και τις πιο επιπλεγμένες βλάβες. Σε μεσήλικες και ηλικιωμένους οι δύο αυτοί τύποι βλαβών τείνουν να είναι οι κυρίαρχοι.

Στις μεσαίου μεγέθους αρτηρίες, οι βλάβες τύπου IV είναι συχνά ελάχιστα αποφρακτικές και συνεπώς γενικά κλινικά σιωπηλές, ενώ οι βλάβες τύπου VI είναι συχνά

αποφρακτικές και συμπτωματικές. Οι βλάβες τύπου V μπορεί να είναι έκδηλες ή σιωπηλές ανάλογα με το βαθμό απόφραξης που προκαλούν[24].

Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, η αθηροσκλήρωση συχνά δεν προκαλεί κλινικά συμπτώματα μέχρι να προκαλέσει σοβαρή στένωση ή πλήρη απόφραξη μιας αρτηρίας. Τα συμπτώματα της νόσου εξαρτώνται από το ποιές αρτηρίες προσβάλλονται.

- **Στεφανιαίες αρτηρίες**

Οι στεφανιαίες αρτηρίες τροφοδοτούν με αίμα πλούσιο σε O_2 (μοριακό οξυγόνο) την καρδιά. Εάν μία πλάκα προκαλέσει στένωση ή απόφραξη σε αυτές τις αρτηρίες, τότε προκαλείται CHD. Κοινό σύμπτωμα της νόσου αποτελεί η στηθάγχη (σταθερή ή ασταθής), η οποία βιώνεται ως πίεση ή σφίξιμο στην καρδιά. Παρόμοιος πόνος μπορεί να εμφανιστεί και στα χέρια, στους ώμους, στο λαιμό, στην πλάτη ή στο σαγόνι. Ο στηθαγχικός πόνος μπορεί να βιωθεί και ως δυσπεψία. Ο πόνος αυτός χειροτερεύει με την σωματική άσκηση και συνήθως απομακρύνεται με την ξεκούραση. Καταστάσεις συναισθηματικού στρες μπορεί επίσης να πυροδοτήσουν τον πόνο. Άλλα κλινικά συμπτώματα CHD είναι οι αρρυθμίες και η βράχυνση της αναπνοής. Στην περίπτωση που η πλάκα σχηματιστεί σε μικρότερες αρτηρίες της καρδιάς (στεφανιαία μικροαγγειακή νόσος), τότε τα κλινικά συμπτώματα είναι και πάλι η στηθάγχη, η βράχυνση της αναπνοής, η σωματική εξάντληση και η υπνική άπνοια.

- **Καρωτιδικές αρτηρίες**

Οι καρωτιδικές αρτηρίες τροφοδοτούν με αίμα πλούσιο σε O_2 τον εγκέφαλο. Εάν μία πλάκα προκαλέσει στένωση ή πλήρη απόφραξη σε αυτές τις αρτηρίες, τότε πιθανόν να εμφανιστούν συμπτώματα εγκεφαλικού επεισοδίου. Τα συμπτώματα αυτά είναι μούδιασμα προσώπου/χεριών/ποδιών ιδιαίτερα στη μία πλευρά του σώματος, σύγχυση, παράλυση ή ανικανότητα κίνησης, ζαλάδα, έλλειψη ισορροπίας ή συντονισμού, έλλειψη συνείδησης, προβλήματα ομιλίας/όρασης/αναπνοής και ξαφνική αδυναμία.

- **Περιφερικές αρτηρίες**

Η αθηρωματική πλάκα μπορεί επίσης να σχηματιστεί στις κύριες αρτηρίες που τροφοδοτούν με αίμα πλούσιο σε O_2 περιφερικά σημεία του σώματος όπως τα πόδια, τα χέρια και η λεκάνη. Στην περίπτωση αυτή μπορεί να προκληθεί περιφερική αρτηριοπάθεια. Εάν αυτές οι αρτηρίες υποστούν σημαντική στένωση ή απόφραξη, τότε υπάρχει μεγάλη πιθανότητα εμφάνισης συμπτωμάτων πόνου και εξαιρετικά σοβαρών μολύνσεων.

- **Νεφρικές αρτηρίες**

Εάν σχηματιστεί αθηρωματική πλάκα στις αρτηρίες που τροφοδοτούν με αίμα το νεφρικό παρέγχυμα, τότε προοδευτικά αναπτύσσεται CKD (χρόνια νεφρική ανεπάρκεια). Σε προχωρημένα στάδια έκπτωσης της νεφρικής λειτουργίας, εξαιτίας αυτής της διαδικασίας, εμφανίζονται συμπτώματα όπως διαταραχές στην αποβολή των ούρων, έλλειψη όρεξης, δυσχέρεια συγκέντρωσης, οίδημα, ναυτία/έμετος και κνησμός στα χέρια και στα πόδια[27].

1.5 Παθοφυσιολογία αθηροσκλήρωσης

Η τρέχουσα βιβλιογραφία έχει αναδείξει τρεις διαφορετικούς παθοφυσιολογικούς μηχανισμούς οι οποίοι φαίνεται να εμπλέκονται στην παθογένεια της αθηροσκλήρωσης. Οι μηχανισμοί αυτοί είναι η **θρόμβωση**[6,19,25,28,29], η **οξείδωση**[2,7,23,30] και η **φλεγμονή**[6,11,15,28,30]. Έχει φανεί μάλιστα ότι οι μηχανισμοί αυτοί αλληλεπιδρούν σε μεγάλο βαθμό μεταξύ τους, προάγοντας την εξέλιξη της νόσου[2,15,19,26,28-31].

Η θρόμβωση αποτελεί μία φυσιολογική διαδικασία του οργανισμού η οποία αναπτύσσεται σε περιπτώσεις τραυματισμού του ενδοθηλίου. Το αίμα που κυκλοφορεί στον ανθρώπινο οργανισμό μέσω του αγγειακού δικτύου, σε φυσιολογικές περιπτώσεις όπου το ενδοθήλιο έχει πλήρη συνοχή, δεν έρχεται σε επαφή με τον υποενδοθηλιακό χώρο. Σε περιπτώσεις όμως τραυματισμού του ενδοθηλίου, ο χώρος αυτός έρχεται σε άμεση επαφή με το αίμα και με τα διάφορα στοιχεία που αυτό περιέχει (πχ κύτταρα, πρωτεΐνες). Ο οργανισμός στην προσπάθειά του να επουλώσει τον τραυματισμό και να περιορίσει τη διαρροή αίματος, δημιουργεί ένα ινώδες κάλυμμα το οποίο ονομάζεται θρόμβος. Ο θρόμβος αυτός αποτελείται από αιμοπετάλια και πρωτεΐνες πήξης του αίματος (ινώδες, διάφοροι παράγοντες πήξης). Κεντρικό ρόλο στη διαδικασία της θρόμβωσης έχει μία πρωτεΐνη που ονομάζεται θρομβίνη και

η οποία προκαλεί την έναρξη εναπόθεσης ινώδους στο σχηματιζόμενο θρόμβο, προάγοντας τη σταθεροποίησή του[32].

Η θρόμβωση αποτελεί όχι μόνο έναν από τους μηχανισμούς που επάγουν τη νόσο της αθηροσκλήρωσης, αλλά σχετίζεται και με τις οξείες επιπλοκές αυτής. Συγκεκριμένα, ο σχηματισμός θρόμβων σε διερρηγμένες αθηροσκληρωτικές βλάβες παίζει θεμελιώδη ρόλο στην εμφάνιση ACS[6].

Ο όρος οξείδωση, ή καλύτερα οξειδωτικό στρες, αναφέρεται στη μετατόπιση της ισορροπίας μεταξύ αντιοξειδωτικών και προ-οξειδωτικών παραγόντων του οργανισμού, εις βάρος των πρώτων. Τα προ-οξειδωτικά μόρια σχηματίζονται ως προϊόντα του αερόβιου κυτταρικού μεταβολισμού και παράγονται κυρίως από τη διαρροή ηλεκτρονίων, είτε από μιτοχονδριακούς μεταφορείς αυτών, είτε από ένζυμα κατά την διαδικασία της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης. Επιπλέον, άλλα ένζυμα ή συστήματα ενζύμων που βρίσκονται ή σχετίζονται με τις κυτταρικές μεμβράνες ή τα κυτταρικά οργανίδια μπορούν να συμβάλλουν στην παραγωγή προ-οξειδωτικών μορίων. Τα μόρια αυτά, αναφέρονται στη βιβλιογραφία με το γενικό όρο ελεύθερες ρίζες. Τα αντιοξειδωτικά από την άλλη, είναι φυσικά ή συνθετικά μόρια που εμποδίζουν τον υπερβολικό σχηματισμό ελεύθερων ριζών ή που αναστέλλουν τις αντιδράσεις αυτών με βιολογικές δομές και μόρια[33].

Τελικά, το οξειδωτικό στρες ως ένας από τους βασικούς παθοφυσιολογικούς μηχανισμούς της αθηροσκλήρωσης φαίνεται να κατέχει κεντρικό ρόλο στην εμφάνιση της αθηροσκλήρωσης και κατά συνέπεια και των CVDs.[2,30].

Ο τρίτος και πιθανόν και σημαντικότερος παθογενετικός μηχανισμός της αθηροσκλήρωσης είναι η φλεγμονή. Ειδικότερα, έχει διατυπωθεί ότι η αθηροσκλήρωση αποτελεί τυπικό παράδειγμα χρόνιας φλεγμονώδους νόσου[29].

Η φλεγμονή αποτελεί μία πολύπλοκη τοπική διεργασία του οργανισμού, η οποία μπορεί να εμφανιστεί σε οποιονδήποτε ιστό ως απόκριση στον τραυματισμό, στη μόλυνση, σε ισχαιμία και σε οποιοδήποτε άλλο τοξικό ή ανοσολογικό τραυματισμό[28]. Αποτελεί δηλαδή μια φυσιολογική απόκριση του οργανισμού στη βλάβη που περιλαμβάνει έναν καταρράκτη πολύπλοκων διεργασιών, οι οποίοι στο σύνολό τους ονομάζονται φλεγμονώδης απόκριση. Η απόκριση αυτή σκοπό έχει να καταστρέψει ή να απομακρύνει τόσο τους παράγοντες που προκάλεσαν τη βλάβη του ιστού, όσο και τον ίδιο τον τραυματισμένο ιστό.

Μικροσκοπικά, η φλεγμονή χαρακτηρίζεται από: α) διαστολή αρτηριολίων, τριχοειδών και φλεβιδίων με αυξημένη ροή αίματος, β) έκκριση μεγάλων ποσοτήτων υγρών και αγγειακή διαπερατότητα και γ) μετακίνηση των κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος (λευκοκύτταρα) στην περιοχή της βλάβης.

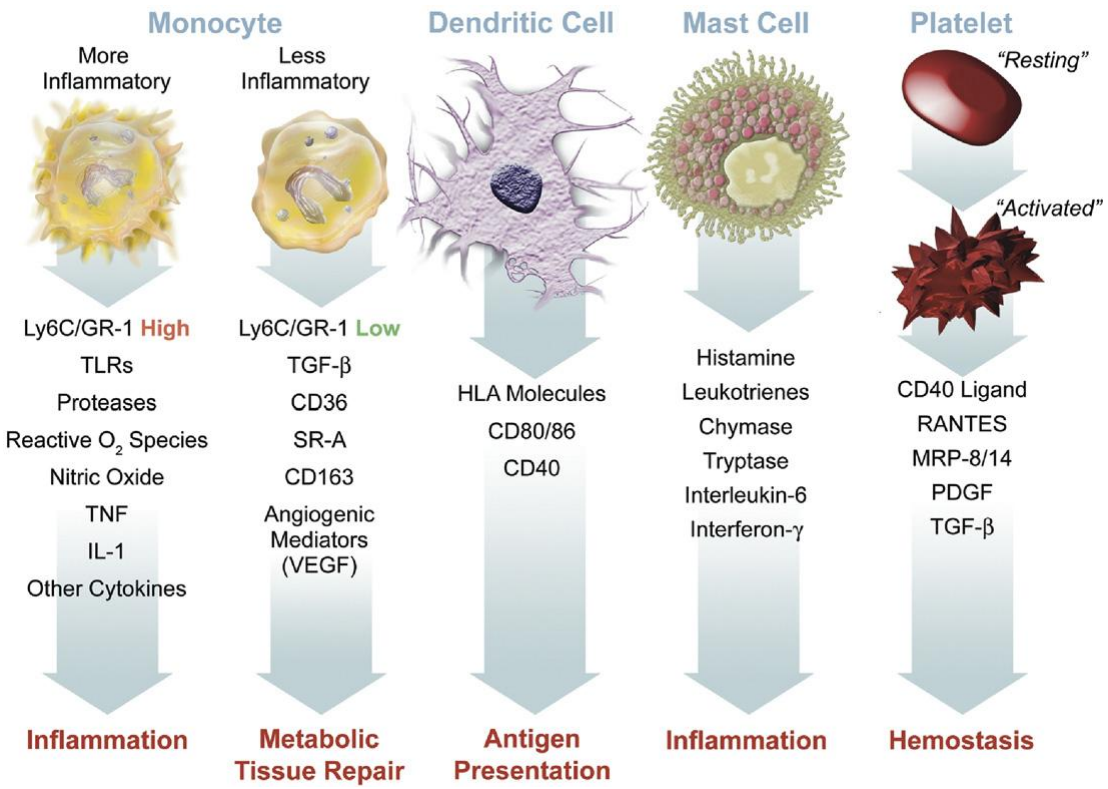
Η φλεγμονή διακρίνεται σε οξεία, χρόνια και συστηματική. Η οξεία φλεγμονή, η οποία χαρακτηρίζεται από κλινικά συμπτώματα πόνου, οιδήματος, αυξημένης θερμοκρασίας της περιοχής και ερυθρότητας, σε περίπτωση που δε ρυθμίζεται σωστά και συντονισμένα μπορεί να οδηγήσει σε υπερβολική φλεγμονώδη απόκριση και τελικά σε χρόνια φλεγμονή, η οποία πλέον δεν αποτελεί προστατευτικό μηχανισμό του οργανισμού, αλλά αντίθετα επάγει μερικές από τις σοβαρότερες παθολογικές καταστάσεις[34]. Ο ορισμός και η σημασία της συστηματικής φλεγμονής δεν αποτελούν αντικείμενο της παρούσας εργασίας γιαυτό και δεν πραγματοποιείται εκτενέστερη αναφορά.

Η φλεγμονή κατέχει κεντρικό ρόλο σε όλα τα στάδια της αθηροσκλήρωσης, από την έναρξη της βλάβης μέχρι την εξέλιξη και τελικά την αποσταθεροποίηση της αθηρωματικής πλάκας και τις επακόλουθες θρομβωτικές επιπλοκές που εκδηλώνονται με τη μορφή των CVDs[15,19,26].

Στη διαδικασία της φλεγμονής, συμμετέχουν κατά κύριο λόγο κύτταρα και μόρια-μεσολαβητές της φλεγμονής.

- **Φλεγμονώδη κύτταρα**

Τα κύτταρα που εμπλέκονται στη φλεγμονώδη απόκριση και κατ' επέκταση στην αθηροσκληρωτική διαδικασία είναι: τα αγγειακά κύτταρα (EC και SMC), τα μονοκύτταρα/μακροφάγα, τα αιμοπετάλια, τα ουδετερόφιλα, τα Τ-λεμφοκύτταρα, τα Β-λεμφοκύτταρα, τα NK κύτταρα (λεμφοκύτταρα φυσικοί φονείς) , τα δενδριτικά και τέλος τα μαστικά κύτταρα[5,28]. Τα κύτταρα με τον πιο αναγνωρισμένο και ξεκάθαρο ρόλο στην αθηροσκλήρωση είναι ουσιαστικά οι πέντε πρώτες ομάδες, γιαυτό και στην πορεία που θα γίνει εκτενέστερη αναφορά στην παθογένεια της αθηροσκλήρωσης θα επικεντρωθούμε βασικά σε αυτά.



Σχήμα 1.3: Τα φλεγμονώδη κύτταρα και η βιολογική τους δράση

- **Μόρια-μεσολαβητές της φλεγμονής**

Ως προς τους μεσολαβητές της φλεγμονής, διακρίνονται σε πρωτεϊνικούς και λιποειδικούς.

- <u>Πρωτεϊνικοί μεσολαβητές</u>

Οι πρωτεϊνικοί μεσολαβητές της φλεγμονής είναι οι επονομαζόμενες κυτταροκίνες. Οι κυτταροκίνες παράγονται από τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος (πχ μονοκύτταρα, ουδετερόφιλα, Τ-λεμφοκύτταρα) ως απόκριση στη μικροβιακή μόλυνση, σε τοξικά αντιδραστήρια, στο τραύμα και σε αντισώματα/ανοσοσυμπλέγματα. Παρόλα αυτά, τα μακροφάγα αποτελούν την κύρια πηγή κυτταροκινών στην αθηροσκληρωτική πλάκα.

Οι κυτταροκίνες αποτελούν δευτερογενείς μεσολαβητές της φλεγμονής και όχι τα πρωταρχικά μόρια πυροδότησής της. Αποτελούν μία ομάδα περισσότερων από 50 εκκριτικών παραγόντων που εμπλέκονται στη διακυτταρική επικοινωνία και ρυθμίζουν θεμελιώδεις βιολογικές διαδικασίες, όπως η σωματική ανάπτυξη, η αιμοποίηση και η λιπογένεση. Οι κυτταροκίνες ομαδοποιούνται σε διάφορες κατηγορίες· IL (έχουν αναγνωριστεί 33 μέχρι

σήμερα), TNF, IFN (ιντερφερόνες), CSF (παράγοντες διέγερσης αποικιών), TGF (μετασχηματιστικοί αυξητικοί παράγοντες) και χειμοκίνες. Είναι ιδιαίτερα σημαντικές στη ρύθμιση φλεγμονωδών και ανοσολογικών αποκρίσεων και έχουν σημαντικές λειτουργίες στον έλεγχο τόσο της εγγενούς όσο και της επίκτητης άμυνας.

Οι κυτταροκίνες, ανάλογα με τον παθοφυσιολογικό τους ρόλο στην αθηροσκλήρωση, διακρίνονται σε προ-αθηρογόνες και αντι-αθηρογόνες. Προ-αθηρογόνες κυτταροκίνες είναι οι: TNF-a, CD40L (υποκαταστάτης υποδοχέα CD40), IL-1, IL-18, IL-2, IL-4, IL-6, IL-12, IFN-γ, M-CSF (παράγοντας διέγερσης αποικιών των μακροφάγων), MCP-1, TGF-β, RANTES (πρωτεΐνη που εκφράζεται και εκκρίνεται από φυσιολογικά ενεργοποιημένα Τ-λεμφοκύτταρα). Από την άλλη, αντι-αθηρογόνες κυτταροκίνες είναι οι: IL-1ra (ανταγωνιστής υποδοχέα IL-1), IL-9 και IL-10[28].

- Λιποειδικοί μεσολαβητές

Από την άλλη πλευρά υπάρχει μία μεγάλη ποικιλία λιποειδικών μεσολαβητών της φλεγμονής. Συγκεκριμένα, οι λιποειδικοί μεσολαβητές που συμμετέχουν στις φλεγμονώδεις διεργασίες ανήκουν στις εξής παρακάτω μεγάλες ομάδες μορίων: εικοσανοειδή, παράγωγα των ω-3 λιπαρών οξέων, PLP, παράγωγα SLS (σφιγγολιποειδή) και οξειδωμένα λιποειδή[28,31].

Καθώς σκοπός της παρούσας πτυχιακής δεν είναι να κάνει εκτενή αναφορά των βιολογικών δράσεων καθεμίας από αυτές τις ομάδες μορίων, θα επικεντρωθούμε στα PLP και στα οξειδωμένα λιποειδή, τα οποία αναφέρονται επανειλημμένως στη βιβλιογραφία ως βασικοί ρυθμιστές της φλεγμονώδους απάντησης οι οποίοι προάγουν την εξέλιξη της αθηροσκλήρωσης.

Από τα PLP σημαντικότερο ρόλο στην αθηροσκλήρωση φαίνεται να έχει ο PAF (παράγοντας ενεργοποίησης αιμοπεταλίων) και τα PAF λιποειδικά ανάλογα[32,35], ενώ από τα οξειδωμένα λιποειδή η οξειδωμένη χοληστερόλη των LDL[28,32].

Ο PAF είναι ένας από τους ισχυρότερους ενδογενείς μεσολαβητές της φλεγμονής και βασική του δράση είναι η συσσώρευση των αιμοπεταλίων[31]. Από πολλούς ερευνητές μάλιστα έχει προταθεί ως ο ισχυρότερος λιποειδικός μεσολαβητής της φλεγμονής[36], καθώς επάγει πολλές προ-αθηρογόνες δράσεις, όπως αυξημένη διαπερατότητα στο ενδοθήλιο και αυξημένη παραγωγή ROS (δραστικές μορφές οξυγόνου), συμβάλλει στην οξείδωση της LDL και διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στις θρομβωτικές επιπλοκές της αθηροσκλήρωσης[35]. Συντίθεται από πολλούς διαφορετικούς τύπους κυττάρων, συμπεριλαμβανομένων των EC, των

λευκοκυττάρων, των αιμοπεταλίων και των αφρωδών κυττάρων[31,35], ενώ επίσης έχει αναγνωριστεί και ως ένα από τα συστατικά της αθηρωματικής πλάκας[37]. Οι δράσεις του PAF μεσολαβούνται κυρίως μέσω διακυτταρικών αλληλεπιδράσεων[31].

Τα επίπεδα του PAF και των PAF λιποειδικών αναλόγων μπορεί να αυξηθούν κατά την οξείδωση της LDL και των PLP της κυτταρικής μεμβράνης, γεγονότων δηλαδή που λαμβάνουν χώρα σε χρόνιες φλεγμονώδεις νόσους όπως η αθηροσκλήρωση. Αυτό οφείλεται, είτε σε μειωμένη δράση της PAF-AH, (ακετυλοϋδρολάση του παράγοντα ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων)-ένζυμο που υδρολύει με αποτέλεσμα τελικά να απενεργοποιεί τον PAF και τα PAF λιποειδικά ανάλογα-η οποία είναι γνωστό ότι απενεργοποιείται κατά την οξείδωση της LDL, είτε στη μειωμένη πρόσληψη εξωγενών αντιοξειδωτικών, είτε τέλος στη μειωμένη βιοσύνθεση ενδογενών αντιοξειδωτικών[35].

Οι OxLDL οι οποίες παράγονται στον υποενδοθηλιακό χώρο λόγω αύξησης του οξειδωτικού στρες από διάφορους παράγοντες, συμπεριφέρονται ως ισχυρός φλεγμονώδης παράγοντας[28,31].Έχει προταθεί, ότι οι OxLDL έχουν μια πληθώρα προ-αθηρογονικών επιδράσεων που οφείλονται κατά κύριο λόγο στα λιποειδικά τους συστατικά[32]

Η συμμετοχή αυτών και άλλων μορίων θα περιγραφεί εκτενώς στην αναλυτική παρουσίαση των παθογενετικών διαδικασιών που εμπλέκονται στην εκκίνηση και εξέλιξη της αθηροσκλήρωσης.

1.5.1 Στάδια αθηροσκλήρωσης

I. Ενδοθηλιακή δυσλειτουργία

Στην αρχική φάση ανάπτυξης της αθηρωματικής πλάκας, τα EC ενεργοποιούνται από ποικίλους παράγοντες οι οποίοι πιθανόν να προκαλούν άμεση φυσική καταστροφή της ενδοθηλιακής στιβάδας[3,6,35]. Στους παράγοντες αυτούς συμπεριλαμβάνονται το αιμοδυναμικό στρες[3], το κάπνισμα, τα υψηλά επίπεδα χοληστερόλης αίματος[3,11], η παχυσαρκία, ο DM, η HTN[11], ένζυμα που απελευθερώνονται από τα αιμοπετάλια και τα λευκοκύτταρα[3] καθώς και ο PAF και τα PAF λιποειδικά ανάλογα[35]. Με αυτό τον τρόπο τα EC γίνονται διαπερατά από μεγάλα μόρια όπως είναι οι LDL και τα κύτταρα του αίματος[3] και εκτίθενται σε κυτταροκίνες όπως η IL-1και ο TNF-a[6,11].

Ενώ το φυσιολογικό ενδοθήλιο, δηλαδή αυτό που δεν έχει υποστεί ενεργοποίηση και βλάβη, εκκρίνει αντιθρομβωτικούς και αγγειοδιασταλτικούς παράγοντες όπως το $NO^{\cdot}$ και η ACh (ακετυλοχολίνη), η διαδικασία ενεργοποίησης αυτού οδηγεί σε διαταραγμένη παραγωγή $NO^{\cdot}$[11] και αυξημένη παραγωγή αγγειοσυσταλτικών παραγόντων, όπως η TXA_2 (θρομβοξάνη) και οι PGs (προσταγλανδίνες). Επιπλέον, έχει ως αποτέλεσμα την ανάπτυξη μη φυσιολογικών μηχανισμών ενδοκυττάριας σηματοδότησης, οι οποίοι προκαλούν αύξηση στο ενδοκυττάριο Ca^{+2} (ασβέστιο) και επιπλέον παραγωγή αγγειοσυσπαστικών παραγόντων[1].

Η διαδικασία ενεργοποίησης του ενδοθηλίου συνοδεύεται από αύξηση της έκφρασης συγκεκριμένων προ-φλεγμονωδών κυτταροκινών όπως η IL-6 και μορίων προσκόλλησης όπως η P- και η E-σελεκτίνη[38]. Τα μόρια αυτά λειτουργούν ως χημειοτακτικοί παράγοντες των αιμοπεταλίων και των λευκοκυττάρων[6], ενώ φαίνεται να αποτελούν και έναν από τους παράγοντες που διευκολύνουν τη μετανάστευση των τελευταίων στον υποενδοθηλιακό χώρο μέσω αύξησης της έκφρασης μορίων προσκόλλησης στην επιφάνειά τους, όπως ο VCAM-1[1].

Έτσι, η ενδοθηλιακή δυσλειτουργία η οποία μεσολαβείται από όλους εκείνους τους παράγοντες που αναφέρθηκαν, αποτελεί το πρώτο και καθοριστικό βήμα στην εκκίνηση της διαδικασίας της αθηρογένεσης[3,35].

II. Μετανάστευση κυττάρων/λιποπρωτεϊνών στον υποενδοθηλιακό χώρο

Όπως προαναφέρθηκε, οι κυτταροκίνες που εκκρίνονται κατά τη φάση της ενδοθηλιακής ενεργοποίησης λειτουργούν ως χημειοτακτικά μόρια των φλεγμονωδών κυττάρων.

Ξεκινώντας από τα αιμοπετάλια, η επίδραση ποικίλων κυτταροκινών καθώς και του PAF και των PAF λιποειδικών αναλόγων σε αυτά οδηγεί στην ενεργοποίησή και επακολούθως στην προσκόλλησή τους στο ενεργοποιημένο ενδοθήλιο[3]. Αυτή η διαδικασία μεσολαβείται από την μέσα προς τα έξω σηματοδότηση της αIIbβ3 ιντεγκρίνης και της επακόλουθης πρόσδεσης του ινωδογόνου στις αIIbβ3 ιντεγκρίνες της επιφάνειας των αιμοπεταλίων. Αυτή η δέσμευση, μπορεί να μεσολαβήσει στη συνέχεια την από έξω προς τα μέσα σηματοδότηση αυτών των ιντεγκρινών, με αποτέλεσμα την ενίσχυση των κυτταρικών αποκρίσεων[35].

Τα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια προάγουν την έκφραση TF και προ-φλεγμονωδών κυτταροκινών όπως ο TNF-a[3] και η IL-1(β)[35], εκκρίνουν PDGF (αυξητικός

παράγοντας των αιμοπεταλίων) και TGF-β[3]-και οι δύο αποτελούν πολύ ισχυρές μιτογόνες κυτταροκίνες-υπόκεινται σε αλλαγή σχήματος, συσσωρεύονται και εκκρίνουν το περιεχόμενο των κοκκίων τους[3,32,35]. Τα κοκκία των αιμοπεταλίων περιέχουν προ-φλεγμονώδεις κυτταροκίνες όπως ο CD40L[1,26] (θεωρείται ως κυτταροκίνη-κλειδί στην εξέλιξη της αθηρωματικής πλάκας), συσσωρεύοντας έτσι ακόμα περισσότερα αιμοπετάλια τα οποία μεταναστεύουν στον υποενδοθηλιακό χώρο[3].

Ορισμένα από τα φλεγμονώδη μόρια τα οποία εκκρίνονται από τα αιμοπετάλια, λειτουργούν ως χημειοτακτικά μόρια προσκόλλησης των ουδετερόφιλων, των μονοκυττάρων και των Τ-λεμφοκυττάρων στο δυσλειτουργικό πλέον ενδοθήλιο[25]. Συγκεκριμένα, η θρομβίνη επάγει την έκφραση Ε-σελεκτίνης, ICAM-1, VCAM-1, IL-6, IL-8 και MCP-1 από τα EC οδηγώντας έτσι σε αυξημένη προσκόλληση ουδετερόφιλων και μονοκυττάρων στο ενδοθήλιο[28], ενώ η IL-1(β) προκαλεί την προσκόλληση ουδετερόφιλων σε αυτό[35].

Η προσκόλληση και κατόπιν η μετανάστευση των λευκοκυττάρων αυτών στο ενδοθήλιο μεσολαβείται μέσω ειδικών μορίων στην επιφάνεια των EC[29]. Συγκεκριμένα, η Ρ-σελεκτίνη μεσολαβεί την αρχική ασταθή προσκόλληση των λευκοκυττάρων στο ενδοθήλιο και την επακόλουθη κυλιόμενη κίνηση αυτών πάνω στην ενδοθηλιακή στιβάδα, ενώ οι β2 ιντεγκρίνες μεσολαβούν τη σταθερή και ισχυρή προσκόλλησή τους πάνω στο ενδοθήλιο, διευκολύνοντας τελικά τη μετανάστευση των κυττάρων αυτών στον υποενδοθηλιακό χώρο[34,35].

Ως προς τα ουδετερόφιλα, η ενεργοποίησή τους από πολλά διαφορετικά φλεγμονώδη μόρια επάγει την από μέσα προς τα έξω σηματοδότηση των β2 ιντεγκρινών, με αποτέλεσμα την προσκόλληση και μετανάστευσή τους στον υποενδοθηλιακό χώρο. Στα κύτταρα αυτά, η κυλιόμενη κίνησή τους πάνω στο ενδοθήλιο μεσολαβείται εκτός από την Ρ-σελεκτίνη και μέσω ενός εναλλακτικού μηχανισμού ο οποίος σηματοδοτείται από τον PAF. Ο μηχανισμός αυτός περιλαμβάνει την αλληλεπίδραση του μορίου Mac-1 (μόριο προσκόλλησης των μακροφάγων) με το ινωδογόνο, το οποίο βρίσκεται δεσμευμένο στην αIIbβ3 ιντεγκρίνη. Όλη αυτή η διαδικασία επάγει ενισχυμένες φλεγμονώδεις αποκρίσεις στο ενδοθήλιο, άμεση μετανάστευση των κυττάρων αυτών στον υποενδοθηλιακό χώρο και απελευθέρωση ακόμα περισσότερων φλεγμονωδών μεσολαβητών και ROS.

Από την άλλη, η ενεργοποίηση των μονοκυττάρων από ποικίλους φλεγμονώδεις μεσολαβητές, μεταξύ των οποίων ο PAF[35], η MCP-1 και η RANTES[29], επάγει την έκφραση PSGL-1 (γλυκοπρωτεϊνικός προσδέτης της Ρ-σελεκτίνης) σε αυτά. Με αυτό τον τρόπο, τα ανθρώπινα μονοκύτταρα του αίματος, προσκολλώνται άμεσα στα αιμοπετάλια και στα EC τα οποία παρουσιάζουν την Ρ-σελεκτίνη στην επιφάνεια τους[29,35]. Η επακόλουθη μετανάστευση

των μονοκυττάρων στον υποενδοθηλιακό χώρο, συνοδεύεται από τη σύνθεση και απελευθέρωση προ-φλεγμονωδών κυτταροκινών (MCP-1,IL-8,M-CSF, IL-1, TNF-a), μορίων προσκόλλησης (ICAM-1 και VCAM-1) και TF.

Η μετανάστευση των μονοκυττάρων ενισχύει ακόμα περισσότερο τη συσσώρευση και άλλων φλεγμονωδών κυττάρων στο ενδοθήλιο, μεταξύ των οποίων και τα Τ-λεμφοκύτταρα τα οποία προσκολλώνται στο ενδοθήλιο και στη συνέχεια διαπηδούν στον υποενδοθηλιακό χώρο[15,26]. Τα κύτταρα αυτά με τη σειρά τους συμμετέχουν στην ενίσχυση και διάδοση της διαδικασίας της αθηροσκλήρωσης, μέσω των φλεγμονωδών μορίων που παράγουν[6,26].

Τέλος, εκτός από τα διάφορα φλεγμονώδη κύτταρα τα οποία μεταναστεύουν στον υποενδοθηλιακό χώρο, το δυσλειτουργικό ενδοθήλιο αποτελεί δίοδο και για μεγάλα μόρια που κυκλοφορούν στο αίμα, όπως η LDL που υπό φυσιολογικές συνθήκες δε μπορεί να εισέλθει στον υποενδοθηλιακό χώρο[3,35].

III. Οξείδωση των LDL λιποπρωτεϊνών

Το αυξημένο οξειδωτικό στρες που δημιουργείται στον υποενδοθηλιακό χώρο υπό την επίδραση του PAF, των PAF λιποειδικών αναλόγων και των φλεγμονωδών κυττάρων, έχει ως αποτέλεσμα την οξείδωση των LDL, οι οποίες έχουν πλέον εισχωρήσει στον υποενδοθηλιακό χώρο λόγω της δυσλειτουργίας του ενδοθηλίου[3,35]. Η οξείδωση των LDL με τη σειρά της συμβάλλει σημαντικά στην αύξηση των επιπέδων του PAF, του οποίου οι αθηρογόνες δράσεις ενισχύονται ακόμα περισσότερο[35].

Αυτή η διαδικασία θεωρείται καθοριστικό βήμα στην εξέλιξη της αθηροσκλήρωσης καθώς οι OxLDL ασκούν ποικίλες αθηρογονικές δράσεις. Συγκεκριμένα, διεγείρουν την έκφραση VCAM-1 και ICAM-1 στα EC, ενώ παράλληλα ασκούν και χημειοτακτική δράση στα Τ-λεμφοκύτταρα και στα μονοκύτταρα. Τελικά, προάγουν τη διαφοροποίησή των τελευταίων σε μακροφάγα ενώ επίσης αναστέλλουν και την κινητικότητά τους, με αποτέλεσμα την ολοένα και μεγαλύτερη συσσώρευσή τους. Όλη αυτή η διαδικασία οδηγεί σε περαιτέρω οξείδωση της LDL, συσσώρευση ακόμα περισσότερων μονοκυττάρων και συνεπώς περαιτέρω δυσλειτουργία του ενδοθηλίου[3,28].

IV. Διαφοροποίηση μονοκυττάρων και σχηματισμός αφρωδών κυττάρων

Τα μονοκύτταρα, τα οποία έχουν πλέον εισχωρήσει στον έσω χιτώνα, διαφοροποιούνται σε μακροφάγα υπό την επίδραση ποικίλων μεσολαβητών, μεταξύ των οποίων και διάφορες κυτταροκίνες, όπως η MCP-1 και ο M-CSF[15,26]. Τα μακροφάγα που δημιουργούνται διαθέτουν τους λεγόμενους εκκαθαριστές υποδοχείς (CD36), οι οποίοι αρχίζουν και προσλαμβάνουν τις OxLDL που βρίσκονται στον υποενδοθηλιακό χώρο[6,35]. Είναι σημαντικό να επισημανθεί ότι αυτοί οι εκκαθαριστές υποδοχείς των μακροφάγων προσλαμβάνουν μόνο OxLDL και όχι φυσιολογικές[3]. Η πρόσδεση των OxLDL στον CD36 εκκαθαριστή υποδοχέα των μακροφάγων, πυροδοτεί την απελευθέρωση προ-φλεγμονωδών κυτταροκινών από αυτά[6].

Η υπερβολική και ανεξέλεγκτη συσσώρευση λίπους μέσα στα μακροφάγα οδηγεί στο σχηματισμό των αφρωδών κυττάρων[6,35]. Τα αφρώδη κύτταρα που δημιουργούνται διατηρούν τη μεταβολική τους δραστηριότητα και εκκρίνουν μεγάλες ποσότητες φλεγμονωδών μεσολαβητών, μεταξύ των οποίων κυτταροκίνες[3,6] και μιτογόνοι παράγοντες, επιταχύνοντας με αυτό τον τρόπο την ανάπτυξη της πλάκας, συσσωρεύοντας επιπλέον μακροφάγα μέσα στον υποενδοθηλιακό χώρο[6] και επάγοντας περαιτέρω την οξειδωτική τροποποίηση των LDL[3]. Έχει διαπιστωθεί ότι τα μακροφάγα και τα αφρώδη κύτταρα που ασκούν αυτή τη φαγοκυτταρική δραστηριότητα στις LDL έχουν τη δυνατότητα να παράγουν τον PAF, ενισχύοντας ακόμα περισσότερο τη διάδοση της αθηροσκλήρωσης[35].

Καθώς λοιπόν τα αφρώδη κύτταρα συσσωρεύονται μέσα στον έσω χιτώνα των αρτηριών, το αγγειακό τοίχωμα αρχίζει να διατείνεται. Αυτή η διαδικασία είναι ουσιαστικά το πρώτο βήμα που οδηγεί στη στένωση του αρτηριακού αυλού, η οποία κατόπιν συνεχίζεται από τις εξελισσόμενες αθηροσκληρωτικές διεργασίες που λαμβάνουν χώρα[26]. Η συσσώρευση των αφρωδών κυττάρων μαζί και με τα υπόλοιπα φλεγμονώδη κύτταρα μέσα στον αρτηριακό αυλό, ιστοπαθολογικά αντιστοιχεί στη δημιουργία της λιποειδικής γράμμωσης[25].

V. Μετανάστευση και πολλαπλασιασμός SMC

Τα αιμοπετάλια εκκρίνουν αυξητικούς παράγοντες (PDGF, TGF-β) οι οποίοι ενεργοποιούν τον πολλαπλασιασμό των SMC και επάγουν τη σύνθεση κολλαγόνου από αυτά[29]. Εκτός όμως από τα αιμοπετάλια, και τα υπόλοιπα φλεγμονώδη κύτταρα συμμετέχουν στην διαδικασία επαγωγής του πολλαπλασιασμού των SMC, μέσω των προ-φλεγμονωδών κυτταροκινών που εκκρίνουν στον υποενδοθηλιακό χώρο[6,15].

Η μετανάστευση των SMC από το διάμεσο χιτώνα όπου βρίσκονται τα περισσότερα από αυτά στον έσω χιτώνα όπου πραγματοποιείται η όλη φλεγμονώδης διεργασία, πραγματοποιείται βασικά μέσω της αλληλεπίδρασης των μονοκυττάρων με τα EC. Συγκεκριμένα, η αλληλεπίδραση αυτή αυξάνει την παραγωγή της MMP-9 και άλλων μεταλλοπρωτεΐνασών στα μονοκύτταρα. Τα ένζυμα αυτά έχουν την ικανότητα να διασπούν τα συστατικά της ECM, η οποία διαχωρίζει τον έσω από το μέσω χιτώνα του αγγειακού τοιχώματος. Ως αποτέλεσμα, αυτός ο συνδετικός ιστός διαρρηγνύεται, επιτρέποντας έτσι τη διήθηση και τελικά την εγκατάσταση των SMC στον υποενδοθηλιακό χώρο. Αυτή η διαδικασία οδηγεί σε διάρρηξη της υποενδοθηλιακής δομής[26].

Ο πολλαπλασιασμός και η ακόλουθη μετανάστευση των SMC μεσολαβείται και από τους λιποειδικούς μεσολαβητές της αθηροσκλήρωσης. Συγκεκριμένα, ο PAF εμπλέκεται σε αυτή τη διαδικασία διεγείροντας τη μεταγραφή EGF (επιδερμικός αυξητικός παράγοντας) στα μονοκύτταρα, με αποτέλεσμα να ενισχύεται η παραπάνω διαδικασία. Επιπλέον, οι OxLDL που εκτός από τα οξειδωμένα PLP περιέχουν και μεγάλες ποσότητες PAF και PAF λιποειδικών αναλόγων, ενισχύουν τη συσσώρευση SMC στον έσω χιτώνα[35]. Όπως γίνεται αντιληπτό, η επαγωγή της έλευσης των SMC στην περιοχή της βλάβης μεσολαβείται από όλα τα διαφορετικά στοιχεία που συμμετέχουν στη φλεγμονώδη διεργασία[15].

Τα SMC εκκρίνουν στον υποενδοθηλιακό χώρο με τη σειρά τους διάφορες κυτταροκίνες (IL-1(β), TNF-a, TNF-β, IL-6, M-CSF, MCP-1, IL-18 και CD40L) οι οποίες μεσολαβούν τη μιτογένεση, τον πολλαπλασιασμό των στοιχείων της ECM, την αγγειογένεση και την ανάπτυξη αφρωδών κυττάρων[3]. Ειδικά, ο CD40L θεωρείται πολύ σημαντικό μόριο στην εκκίνηση των θρομβωτικών επιπλοκών της αθηροσκλήρωσης καθώς η πρόσδεση στον υποδοχέα του, πυροδοτεί την έκφραση του ισχυρού προ-θρομβωτικού TF στα EC, στα μακροφάγα και στα SMC[26].

Μορφολογικά, ο πολλαπλασιασμός των SMC σχηματίζει ένα ινώδες κάλυμμα στην άκρη της λιποειδικής γράμμωσης το οποίο αποτελείται κυρίως από κολλαγόνο[25]. Τα SMC μεταναστεύουν μέσα στις λιποειδικές γραμμώσεις και καθώς ολοένα και περισσότερα φλεγμονώδη κύτταρα προσκολλώνται και μεταναστεύουν στον υποενδοθηλιακό χώρο, η βλάβη αυξάνεται σε μέγεθος. Παράλληλα τα SMC συνεχίζουν να πολλαπλασιάζονται και να σχηματίζουν αυτό το ινώδες κάλυμμα πάνω από την περιοχή της βλάβης.

Μέσα σε αυτή την εντοπισμένη βλάβη, η συνεχιζόμενη φλεγμονή μπορεί να οδηγήσει σε κυτταρική νέκρωση και περαιτέρω συσσώρευση μονοκυττάρων και λεμφοκυττάρων, με ταυτόχρονη απελευθέρωση κυτταροκινών, αυξητικών παραγόντων και

πρωτεολυτικών ενζύμων. Αυτή η διαδικασία μπορεί να θέσει τη βάση για εστιακή νέκρωση εντός της βλάβης[35] και παράλληλα διάσπαση των συστατικών του ινώδους καλύμματος που έχει δημιουργηθεί από τα SMC, αυξάνοντας τις πιθανότητες για ρήξη της πλάκας και σχηματισμό θρόμβου[25].

VI. Θρόμβωση της βλάβης και ρήξη της αθηρωματικής πλάκας

Καθώς η βλάβη αυξάνεται ολοένα και περισσότερο σε μέγεθος, η αρτηρία δε μπορεί πλέον να αντισταθμίσει τη βλάβη του αυλού και ως ένα σημείο η ροή του αίματος διαταράσσεται. Τα αφρώδη κύτταρα στο κέντρο της βλάβης πεθαίνουν, οδηγώντας στη δημιουργία ενός νεκρωτικού πυρήνα όπου κρύσταλλοι χοληστερόλης είναι δυνατόν να βρεθούν. Σε προχωρημένες ινώδεις πλάκες το ενδοθήλιο πιθανόν να υποστεί ρήξη, ειδικά στα περιθώρια του ινώδους καλύμματος, οδηγώντας σε αιμορραγία, θρόμβωση και τελικά οξεία απόφραξη του αρτηριακού αυλού[35].

Όταν η πλάκα υποστεί τελικά ρήξη, ο TF που έχει παραχθεί από τα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια στον υποενδοθηλιακό χώρο, ως αποτέλεσμα της έντονης φλεγμονώδους διεργασίας, πυροδοτεί τη διαδικασία της θρόμβωσης, η οποία μπορεί να οδηγήσει σε οξεία επιπλοκή της αθηροσκλήρωσης με σοβαρό κλινικό καρδιαγγειακό επεισόδιο (MI, εγκεφαλικό)[15,19]. Παρόλα αυτά, στην περίπτωση που ο σχηματιζόμενος θρόμβος δεν είναι αποφρακτικός και απορροφηθεί από τη βλάβη, τότε τα προϊόντα που σχετίζονται με τη διαδικασία της θρόμβωσης, όπως είναι ο TF και διάφοροι μεσολαβητές που απελευθερώνονται από τα κοκκία των αιμοπεταλίων (PDFG, TGF-β), μπορεί να προκαλέσουν θεραπευτική απόκριση, οδηγώντας σε αυξημένη συσσώρευση κολλαγόνου και ανάπτυξη SMC. Με αυτό τον τρόπο όμως, η βλάβη είναι δυνατόν να εξελιχθεί σε προχωρημένη ινώδη και συχνά ασβεστοποιημένη πλάκα, η οποία προκαλεί μεγάλου βαθμού στένωση, συμπτώματα σταθερής στηθάγχης και αυξημένες πιθανότητες για νέα θρομβωτική επιπλοκή[19].

Στην πραγματικότητα ο TF αποτελεί το σημαντικότερο μόριο στην εκκίνηση της διαδικασίας σχηματισμού θρόμβου στην περιοχή της βλάβης, καθώς ενεργοποιεί την παραγωγή θρομβίνης και ινώδους από τα αιμοπετάλια, παράγοντες οι οποίοι συμβάλλουν καθοριστικά στη δημιουργία και στη σταθεροποίηση του θρόμβου[25]. Επιπλέον, ο TF ευθύνεται για τη διάσπαση του ινώδους καλύμματος[11].

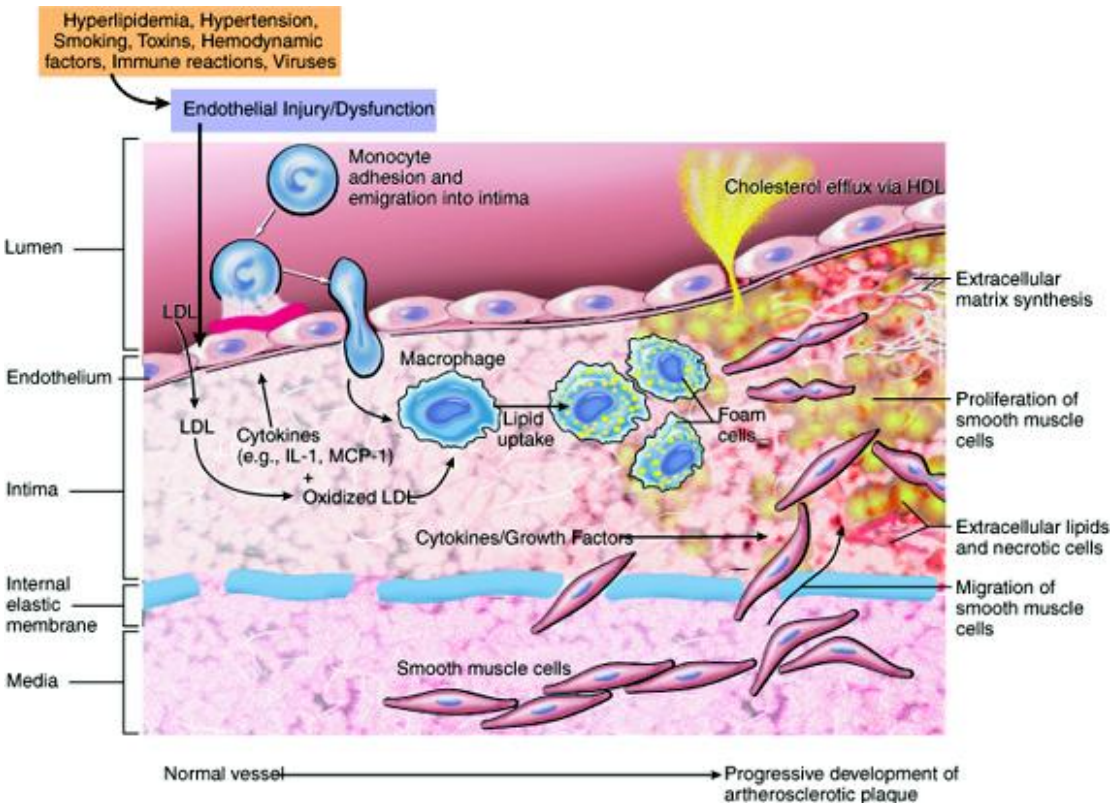
Τα ενεργοποιημένα μονοκύτταρα της αθηρωματικής πλάκας, φαίνεται επίσης να διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στις θρομβωτικές επιπλοκές της αθηροσκλήρωσης, παράγοντας

MMPs[1] και άλλα πρωτεολυτικά ένζυμα, όπως κολλαγονάσες και ζελατινάσες[6,19].Τα ένζυμα αυτά διασπούν συστατικά της ECM, όπως το κολλαγόνο, τα οποία στηρίζουν και σταθεροποιούν το ινώδες κάλυμμα που έχει δημιουργηθεί από τα SMC της βλάβης, καθιστώντας το με αυτό τον τρόπο λεπτό και εύθρυπτο[1,15].

Αυτή η διαδικασία σε συνδυασμό με την παραγωγή IFN-γ από τα ενεργοποιημένα Τ-λεμφοκύτταρα της βλάβης, η οποία έχει την ικανότητα να εμποδίζει την ικανότητα σύνθεσης και ανανέωσης του κατεστραμμένου κολλαγόνου από τα SMC[15,19], είναι δυνατόν να οδηγήσει σε αποσταθεροποίηση της πλάκας και επομένως θρόμβωση[6,15]. Φαίνεται ότι στην αποσταθεροποίηση της πλάκας συμβάλλει και η διήθηση ουδετερόφιλων στις φλεγμονώδεις περιοχές του υποενδοθηλιακού χώρου, καθώς τα κύτταρα αυτά απελευθερώνουν ROS, προκαλώντας περαιτέρω οξειδωτική τροποποίηση στις LDL και αύξηση των παραγόμενων πρωτεολυτικών ενζύμων[6].

Κάτω από αυτές τις συνθήκες, το ενδοθήλιο, χάνει τις αντιπηκτικές και αντιθρομβωτικές του ιδιότητες και γίνεται προ-θρομβωτικό[11]. Παράδειγμα αυτού του προ-θρομβωτικού περιβάλλοντος που δημιουργείται στο ενδοθήλιο είναι η έκκριση PAI-1 από αυτό. Το συγκεκριμένο μόριο διαταράσσει το μηχανισμό της ινωδόλυσης και ενισχύει τη θρομβογένεση[3].

Μια τυπική διερρηγμένη πλάκα, η οποία σηματοδοτεί ουσιαστικά και το τέλος της χρόνιας αθηροσκληρωτικής διαδικασίας στην συγκεκριμένη περιοχή όπου η πλάκα έχει διαρρηχθεί, περιέχει συνδετικό ιστό (κολλαγόνο, πρωτεογλυκάνες, ινώδεις ελαστικές ίνες), λιποειδή (PLP, εστέρες και κρυστάλλους χοληστερόλης), SMC, φλεγμονώδη κύτταρα (μακροφάγα, Τ-λεμφοκύτταρα, ουδετερόφιλα), ασβέστιο και εναποθέσεις θρόμβων[6].



Σχήμα 1.4: Παθοφυσιολογία αθηροσκλήρωσης

1.6 Υπερχοληστερολαιμία και αθηροσκλήρωση

Όπως έχει ήδη αναφερθεί σε προηγούμενο σημείο της εργασίας (παράγοντες κινδύνου αθηροσκλήρωσης), η υπερχοληστερολαιμία αποτελεί έναν από τους κλασικούς τροποποιήσιμους παράγοντες κινδύνου της αθηροσκλήρωσης. Καθώς η διαδικασία της αθηροσκλήρωσης εκκινείται από τη δυσλειτουργία που εμφανίζεται στο ενδοθήλιο, στο συγκεκριμένο κεφάλαιο θα διερευνήσουμε την επίδραση της υπερχοληστερολαιμίας στην επαγωγή της ενδοθηλιακής δυσλειτουργίας.

1.6.1 Υπερχοληστερολαιμία και ενδοθηλιακή δυσλειτουργία

Πειραματικά δεδομένα φανερώνουν ότι η αγγειοδιαστολή που προκαλεί η απελευθέρωση $NO^{\cdot}$ από το ενδοθήλιο είναι μετρίως διαταραγμένη σε υπερχοληστερολαιμικά ποντίκια, σε σχέση με τα αντίστοιχα νορμοχοληστερολαιμικά. Αυτή η διαταραχή δε φαίνεται να οφείλεται σε ανικανότητα του αγγειακού κυττάρου να αποκριθεί φυσιολογικά στην

απελευθέρωση $NO^{\cdot}$, αλλά αντίθετα φαίνεται να προκαλείται λόγω μείωσης της βιοδιαθεσιμότητας του $NO^{\cdot}$ στο ενδοθήλιο. Ο αγγειοδιασταλτικός αυτός παράγοντας φαίνεται να αποτελεί και τον συνδετικό κρίκο μεταξύ υπερχοληστερολαιμίας και ενδοθηλιακής δυσλειτουργίας[39].

Πιο συγκεκριμένα, η υπερχοληστερολαιμία σχετίζεται με αυξημένη παραγωγή $O_2^{\cdot -}$ στο αγγειακό τοίχωμα. Αυτή η οξειδωτική ρίζα αντιδρά άμεσα με το $NO^{\cdot}$, σχηματίζοντας $ONOO^{-}$. Με αυτό τον τρόπο το $NO^{\cdot}$ απενεργοποιείται, με αποτέλεσμα η λειτουργία του ενδοθηλίου να διαταράσσεται. Η $O_2^{\cdot -}$ μπορεί να αντιδράσει επίσης με τα PUFA (πολυακόρεστα λιπαρά οξέα) των LDL, οι οποίες βρίσκονται στο αγγειακό τοίχωμα, εκκινώντας με αυτό τον τρόπο την αντίδραση της υπεροξείδωσης λιποειδών. Τα ROOH (υδροϋπεροξείδια) που σχηματίζονται μέσω αυτής της διαδικασίας, μπορούν με τη σειρά τους να αντιδράσουν επίσης με το $NO^{\cdot}$, επάγοντας με αυτό τον τρόπο την απενεργοποίησή του και τελικά την ενδοθηλιακή δυσλειτουργία[40].

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2^{Ο}

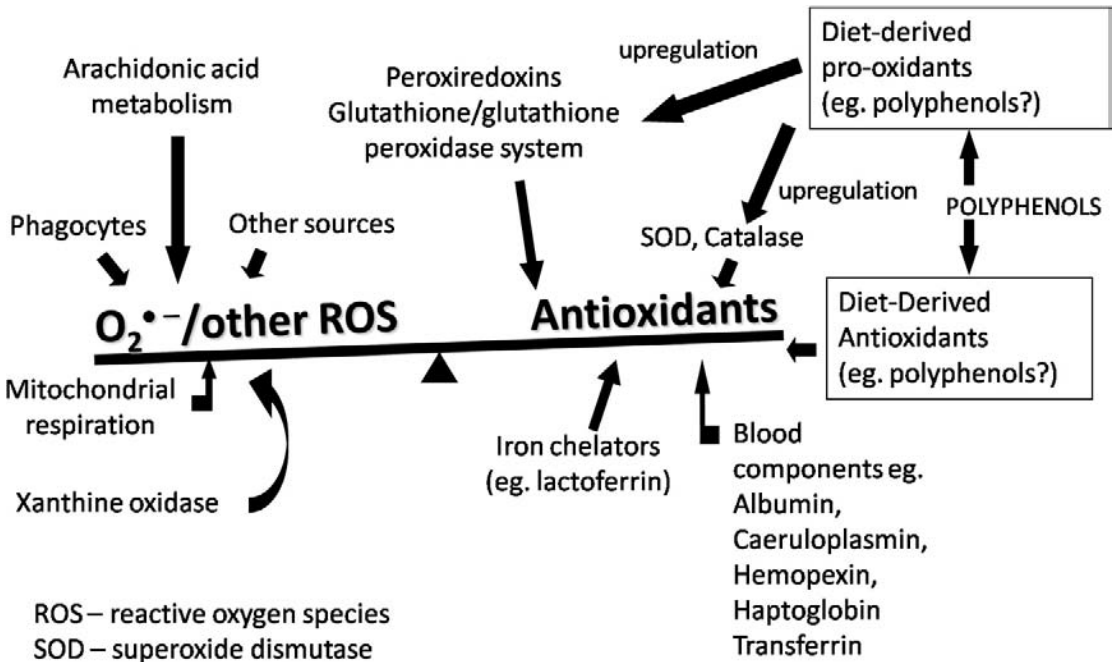
ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟ ΣΤΡΕΣ ΚΑΙ ΑΘΗΡΟΣΚΛΗΡΩΣΗ

2.1 Εισαγωγή-Ορισμός

Όπως αναφέρθηκε και στο πρώτο μέρος της εργασίας το οξειδωτικό στρες αποτελεί έναν από τους κύριους παθοφυσιολογικούς μηχανισμούς της αθηροσκλήρωσης. Εκτός από την αθηροσκλήρωση εμπλέκεται στην παθογένεια πολλών άλλων ασθενειών[41]. Πιο συγκεκριμένα, το αυξημένο οξειδωτικό στρες σχετίζεται με ασθένειες όπως ο DM, η υπερχοληστερολαιμία και η HTN, οι οποίες αποτελούν παράγοντες κινδύνου της αθηροσκλήρωσης[42]. Τα τελευταία χρόνια μάλιστα πιστεύεται ότι το οξειδωτικό στρες εμπλέκεται σε όλες τις φλεγμονώδεις παθήσεις (αρθρίτιδα, αγγειΐτιδα, σπειραματονεφρίτιδα, αυτοάνοσα νοσήματα, νευροεκφυλιστικές νόσοι και πολλές άλλες)[43], στον καρκίνο και στη γήρανση[44,45].

Ο λόγος για τον οποίο το οξειδωτικό στρες είναι χαρακτηριστικό τόσο ευρέως φάσματος ασθενειών, προκύπτει από το γεγονός ότι ο οξειδωτικός μεταβολισμός αποτελεί απαραίτητο και αναπόσπαστο κομμάτι του μεταβολισμού όλων των κυττάρων ανεξαιρέτως[43].

Τι είναι όμως το οξειδωτικό στρες ; Οξειδωτικό στρες ορίζεται ως η μετατόπιση της ισορροπίας μεταξύ αντιοξειδωτικών και προ-οξειδωτικών παραγόντων εις βάρος των πρώτων, οδηγώντας με αυτό τον τρόπο στην υπερβολική παραγωγή ελεύθερων ριζών και στην επακόλουθη οξειδωτική καταστροφή βιολογικών δομών[2,46]. Αυτή η έλλειψη ισορροπίας μπορεί να επηρεάσει την κυτταρική ομοιόσταση μέσω άμεσης οξειδωτικής και συχνά μη αναστρέψιμης καταστροφής βασικών κυτταρικών στοιχείων (λιποειδή, πρωτεΐνες, νουκλεϊκά οξέα), οδηγώντας σε προβληματική κυτταρική λειτουργία, απόπτωση, ιστική καταστροφή και τελικά αγγειοπάθεια[47].



Σχήμα 2.1: Ισορροπία προ-οξειδωτικών-αντιοξειδωτικών παραγόντων

Παρόλα αυτά είναι σημαντικό να διευκρινίσουμε ότι μία αύξηση στην παραγωγή προ-οξειδωτικών μορίων ή μία απώλεια αντιοξειδωτικών αντίστοιχα από μόνη της δεν αποτελεί οξειδωτικό στρες. Εάν παρόλα αυτά ο αυξημένος σχηματισμός προ-οξειδωτικών μορίων ακολουθείται από απώλεια αντιοξειδωτικών ή/και συσσώρευση οξειδωμένων μορφών αντιοξειδωτικών, τότε μπορούμε να μιλάμε για μία δυνητική κατάσταση οξειδωτικού στρες.

Στη βιβλιογραφία έχει χρησιμοποιηθεί και ο όρος αναγωγικό στρες για να περιγράψει την κατάσταση στην οποία παρατηρείται υπερβολική αύξηση αναγωγικών μορίων. Για παράδειγμα, η υπερπαραγωγή αναγωγικών ισοδυνάμων όπως είναι το NAD(P)H (νικοτιναμιδο-αδενινο-(φωσφο)-δινουκλεοτίδιο), πιθανόν να οδηγήσει σε αυξημένη οξειδοαναγωγική ανακύκλωση μορίων, τα οποία υπόκεινται επαναλαμβανόμενους κύκλους οξείδωσης/αναγωγής, οδηγώντας τελικά σε αυξημένη παραγωγή $O_2^{\cdot -}$ και άλλων δευτερογενών προ-οξειδωτικών[46]. Παρόλα αυτά, η συγκεκριμένη κατάσταση δε θα μας απασχολήσει στο πλαίσιο της παρούσας εργασίας.

2.2 Ελεύθερες ρίζες (ROS και RNS)

Ελεύθερη ρίζα ορίζεται ως οποιαδήποτε ένωση με ένα ή περισσότερα ασύζευκτα ηλεκτρόνια, έχει τη δυνατότητα να υφίσταται ανεξάρτητα μέσα σε έναν βιολογικό οργανισμό.

Στα βιολογικά συστήματα είναι δυνατόν να παραχθεί μια ποικιλία ελεύθερων ριζών, η δραστικότητα των οποίων εξαρτάται από τη φύση τους και από τα μόρια με τα οποία αντιδρούν[2,46].

Ο όρος που χρησιμοποιείται στη βιβλιογραφία για την περιγραφή του συνόλου των ελεύθερων ριζών οι οποίες επάγουν τη δημιουργία οξειδωτικού στρες είναι ο όρος ROS. Παρόλα αυτά, στα βιολογικά συστήματα υπάρχουν και ισχυρά προ-οξειδωτικά μόρια τα οποία δεν είναι ρίζες[46,47]. Τέτοια μόρια μη-ρίζες που προέρχονται από το O_2 δεν αναφέρονται με κάποιο ξεχωριστό όρο, γιαυτό και στη συγκεκριμένη πτυχιακή εργασία όταν αναφέρεται ο όρος ROS θα εννοούνται όλα τα πιθανά προ-οξειδωτικά μόρια, είτε είναι ρίζες οξυγόνου, είτε μη-ρίζες. Όλα αυτά τα μόρια αυτά έχουν υψηλή δραστικότητα, με αποτέλεσμα να συμμετέχουν σε πλήθος οξειδοαναγωγικών αντιδράσεων και να αντιδρούν πολύ εύκολα με άλλα βιομόρια[2,47].

Στην κατηγορία των ROS, ανήκουν: η $O_2^{\cdot -}$, η $RO^{\cdot}$, η $HO^{\cdot}$, η $LO^{\cdot}$, η $ROO^{\cdot}$, η $HOO^{\cdot}$, η $LOO^{\cdot}$, το ^1O, το O_3, το H_2O_2, τα ROOH, τα LOOH και το HOCl [42,46-48].

Πίνακας 2.1: Δραστικές μορφές οξυγόνου

$O_2^{\cdot -}$	ρίζα ανιόντος υπεροξειδίου
$RO^{\cdot}$	ρίζα αλκοξειδίου
$HO^{\cdot}$	ρίζα υδροξυλίου
$LO^{\cdot}$	ρίζα λιποξυλίου
$ROO^{\cdot}$	υπεροξειδική ρίζα
$HOO^{\cdot}$	υδροϋπεροξειδική ρίζα
$LOO^{\cdot}$	λιποειδική υπεροξειδική ρίζα
^1O	μονήρες οξυγόνο
O_3	όζον
H_2O_2	υπεροξείδιο του υδρογόνου
ROOH	υδροϋπεροξείδια
LOOH	λιποειδικά υδροϋπεροξείδια
HOCl	υποχλωριώδες οξύ

Εκτός από το οξειδωτικό στρες, στη βιβλιογραφία αναφέρεται και ο όρος νιτρωσικό στρες. Συνολικά, νιτρωσικό στρες ορίζεται ως η αύξηση των S-νιτρωμένων ενώσεων, η οποία ακολουθείται από μείωση των ενδοκυττάριων θειολών (-SH) και πιθανόν να συσχετίζεται με έναν αριθμό βιολογικών αποκρίσεων οι οποίες συσχετίζονται με την αγγειακή φυσιολογία και παθοφυσιολογία[49].

Αντίστοιχα με τις ελεύθερες ρίζες οι οποίες δημιουργούν το οξειδωτικό στρες, υπάρχουν και οι ελεύθερες οι οποίες επάγουν το νιτρωσικό στρες[47]. Τα μόρια αυτά, αναφέρονται στη βιβλιογραφία ως RNS (δραστικές μορφές αζώτου) και όπως και στην περίπτωση των ROS περιέχουν και μόρια τα οποία δεν είναι ρίζες. Στις RNS περιλαμβάνονται ενώσεις όπως το $NO^{\cdot}$, το NO_2^-, το $NO_2^{\cdot}$, το NO_2^+, το $ONOO^-$ κ.α[47,49] (πίνακας 2.2).

Πίνακας 2.2: Δραστικές μορφές αζώτου

$NO^{\cdot}$	οξείδιο του αζώτου
NO_2^-	ανιόν νιτρώδους
$NO_2^{\cdot}$	διοξείδιο του αζώτου
NO_2^+	κατιόν νιτρονίου
NO^+	κατιόν νιτροσονίου
$ONOO^-$	υπεροξυνιτρώδες
$ONOOCO_2^-$	νιτροσοϋπεροξυκαρβονικό ανιόν
N_2O_3	τριοξείδιο του αζώτου
HNO	νιτροξύλιο
$Cl\text{-}NO_2$	χλωρίδιο νιτρυλίου
RSNOs	S-νιτροσοθειόλες

Η νίτρωση διάφορων βιολογιών μορίων, όπως είναι το DNA και οι πρωτεΐνες, θεωρείται ως μία εκλεκτική, αντιστρεπτή, φυσιολογική διαδικασία η οποία έχει τόσο ωφέλιμες όσο και καταστροφικές επιδράσεις. Χημικά, πρόκειται για μία ομοιοπολική τροποποίηση των μορίων-στόχων η οποία είναι δυνατόν να οδηγήσει είτε σε ενίσχυση είτε σε απώλεια της λειτουργικότητας αυτών.

Χαρακτηριστικό είναι το γεγονός ότι μέσα σε κάθε κύτταρο πολλές πρωτεΐνες, συμπεριλαμβανομένων κυτοσολικών, διαμεμβρανικών, μιτοχονδριακών και δομικών πρωτεϊνών, είναι νιτρωμένες. Υπάρχει περίπτωση να μην νιτρώνονται όλα τα κατάλοιπα τυροσίνης (αποτελούν τους πιο κοινούς στόχους της νίτρωσης πρωτεϊνών) μιας πρωτεΐνης ή όλες οι πρωτεΐνες ενός κυττάρου και αυτό φαίνεται να εξαρτάται από την κυτταρική θέση της πρωτεΐνης, τη συγκέντρωση δραστικών μορίων αζώτου και την αλληλεπίδρασή τους με άλλα μόρια[50].

Τελικά, η συσχέτιση μεταξύ των ROS και RNS, μέσω χημικής αντίδρασης ή λειτουργικής αλληλεπίδρασης ή και των δύο, είναι πιθανή και μπορεί να επιδεινώσει τις ήδη καταστροφικές επιδράσεις που επάγονται έτσι κι αλλιώς από τις δύο αυτές ομάδες ενώσεων

ξεχωριστά. Λέμε λοιπόν ότι το οξειδωτικό στρες συσχετίζεται στενά με το νιτρωσικό στρες. Αυτή η αλληλεπίδραση μεταξύ οξειδωτικού και νιτρωσικού στρες έχει οδηγήσει στην υιοθέτηση ενός ενιαίου όρου για την περιγραφή των ROS και των RNS, σε περιπτώσεις που επιδρούν ταυτόχρονα στις λειτουργίες διάφορων βιολογικών μορίων. Έτσι λοιπόν, στη βιβλιογραφία για αυτές τις περιπτώσεις συνηθίζεται η χρήση του όρου RONS[45,49].

Καθώς ο κύριος όγκος της βιβλιογραφίας εξαίρει τις επιδράσεις των ROS στη νόσο και γενικά σε διάφορες φυσιολογικές και παθοφυσιολογικές λειτουργίες του οργανισμού, περιέχοντας αντίστοιχα πολύ λιγότερες αναφορές για τη συμμετοχή των RNS (ο ρόλος αυτών σε διάφορες φυσιολογικές και παθοφυσιολογικές λειτουργίες του οργανισμού δεν έχει σε μεγάλο βαθμό αποσαφηνιστεί)[49], οι ενότητες που ακολουθούν είναι κυρίως επικεντρωμένες στη συμμετοχή των ROS στις διάφορες λειτουργίες ενός βιολογικού συστήματος.

2.2.1 Αντιδράσεις ελεύθερων ριζών

Ας ξεκινήσουμε με το ερώτημα ποιές είναι αυτές οι αντιδράσεις που λαμβάνουν χώρα σε ένα βιολογικό σύστημα, όπως ο ανθρώπινος οργανισμός, ώστε να προκύψουν οι ROS. Όλα ξεκινούν από το ^1O το οποίο από μόνο του είναι μία διπλή ρίζα καθώς περιέχει δύο ασύζευκτα ηλεκτρόνια. Θερμοδυναμικά, θέλει να αποκτήσει δύο επιπλέον ηλεκτρόνια ή τέσσερα επιπλέον ηλεκτρόνια (αν πρόκειται για το O_2), προκειμένου να σχηματίσει μόρια H_2O (νερό), τα οποία έχουν πολύ χαμηλότερη ελεύθερη ενέργεια. Περιστασιακά, καταφέρνει να "κλέψει" ηλεκτρόνια από άλλα μόρια μέσω μη ενζυμικών αυτό-οξειδώσεων, ακόμα και υπό φυσιολογικές βιολογικές συνθήκες. Επειδή όμως δεν είναι δυνατή η απόσπαση ζεύγους ηλεκτρονίων, αναγκαστικά κάθε φορά αφαιρείται ένα ηλεκτρόνιο από το μόριο το οποίο αποτελεί το δότη αυτού του ηλεκτρονίου για το O_2. Αυτή η διαδικασία απόσπασης ηλεκτρονίων, οδηγεί στη δημιουργία των ελεύθερων ριζών.

Πιο συγκεκριμένα, η μεταφορά ενός ηλεκτρονίου στο O_2 προκαλεί το σχηματισμό $O_2^{\cdot -}$ [43], το οποίο έχει οριστεί ως το κυρίαρχο προ-οξειδωτικό μόριο[47]. Αν τώρα το τελευταίο αποσπάσει ένα επιπλέον ηλεκτρόνιο από κάποιο άλλο μόριο δημιουργείται το H_2O_2, το οποίο όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως παρόλο που δεν αποτελεί ρίζα συνεχίζει και έχει οξειδωτική δράση, αν και σε σχέση με άλλα οξειδωτικά μόρια είναι πιο ασθενές[43,46]. Η διαδικασία αυτή είναι γνωστή ως αντίδραση αυτο-οξειδοαναγωγής της $O_2^{\cdot -}$.

$$2O_2^{\cdot -} + 2H^+ \longrightarrow H_2O_2 + O_2$$ [46]

Συγκεκριμένες χηλικές ενώσεις του Fe (σίδηρος) και του Cu (χαλκός) έχουν τη δυνατότητα να μεταφέρουν ένα τρίτο ηλεκτρόνιο στο σχηματισμένο πλέον H_2O_2, προκαλώντας λύση του δεσμού O-O. Με αυτό τον τρόπο παράγεται το $HO^{\cdot}$ το οποίο αποτελεί ένα από τα ισχυρότερα προ-οξειδωτικά μόρια[43].

Εάν τώρα συναντηθούν δύο ελεύθερες ρίζες, είναι δυνατόν να ενώσουν τα ασύζευκτα ηλεκτρόνιά τους σχηματίζοντας έναν ομοιοπολικό δεσμό. Οι αντιδράσεις αυτές μεταξύ ριζών είναι συνήθως γρήγορες κινητικά και οδηγούν στην παραγωγή προ-οξειδωτικών μορίων που δεν είναι πλέον ρίζες. Ένα τέτοιο παράδειγμα, σχετικό και με το αγγειακό τοίχωμα, είναι η πολύ γρήγορη αντίδραση της $O_2^{\cdot -}$ με το $NO^{\cdot}$ προς σχηματισμό $ONOO^-$.

$O_2^{\cdot -} + NO^{\cdot} \longrightarrow ONOO^-$ [46]

Το $NO^{\cdot}$ που μεσολαβεί τη φυσιολογική ενδοθηλιακή λειτουργία, μπορεί με αυτό τον τρόπο να απενεργοποιηθεί από την $O_2^{\cdot -}$ [44].

Εναλλακτικά ως προς την αντίδραση δύο ελεύθερων ριζών που αναφέρθηκε παραπάνω, μία ρίζα πιθανόν να προστεθεί σε ένα μόριο που δεν είναι ρίζα ή να αποσπάσει ένα άτομο υδρογόνου από έναν δεσμό C-H, O-H ή S-H τέτοιου μορίου. Στην περίπτωση μιας τέτοιας αντίδρασης μία νέα ρίζα παράγεται, η οποία μπορεί στη συνέχεια να ξεκινήσει μια αλυσιδωτή αντίδραση[46].

Ένα τυπικό παράδειγμα τέτοιας αλυσιδωτής αντίδρασης είναι και η διαδικασία της υπεροξείδωσης των λιποειδών, η οποία συνήθως ξεκινάει από τη $HO^{\cdot}$. Η ισχυρή αυτή προ-οξειδωτική ρίζα αφαιρεί ένα άτομο υδρογόνου από μία πλευρική αλυσίδα λιπαρού οξέος (LH) που περιέχει άτομα C με δισαλλυλικά H (*αντίδραση 1*). Η ρίζα που προκύπτει ($L^{\cdot}$), προστίθεται άμεσα στο O_2, παράγοντας με τη σειρά της $LOO^{\cdot}$ (*αντίδραση 2*). Η τελευταία μπορεί να διαιωνίσει την αλυσιδωτή αντίδραση, αντιδρώντας με ένα γειτονικό μόριο λιπαρού οξέος για να παράγει μία άλλη $L^{\cdot}$ και LOOH (*αντίδραση 3*).

$LH + HO^{\cdot} \longrightarrow L^{\cdot} + H_2O$ (*Αντίδραση 1*)

$L^{\cdot} + O_2 \longrightarrow LOO^{\cdot}$ (*Αντίδραση 2*)

$LOO^{\cdot} + LH \longrightarrow L^{\cdot} + LOOH$ (*Αντίδραση 3*)

Με αυτό τον τρόπο πολλά μόρια LOOH είναι δυνατόν να παράγονται από κάθε $HO^{\cdot}$ που εκκινεί μια αλυσιδωτή αντίδραση.

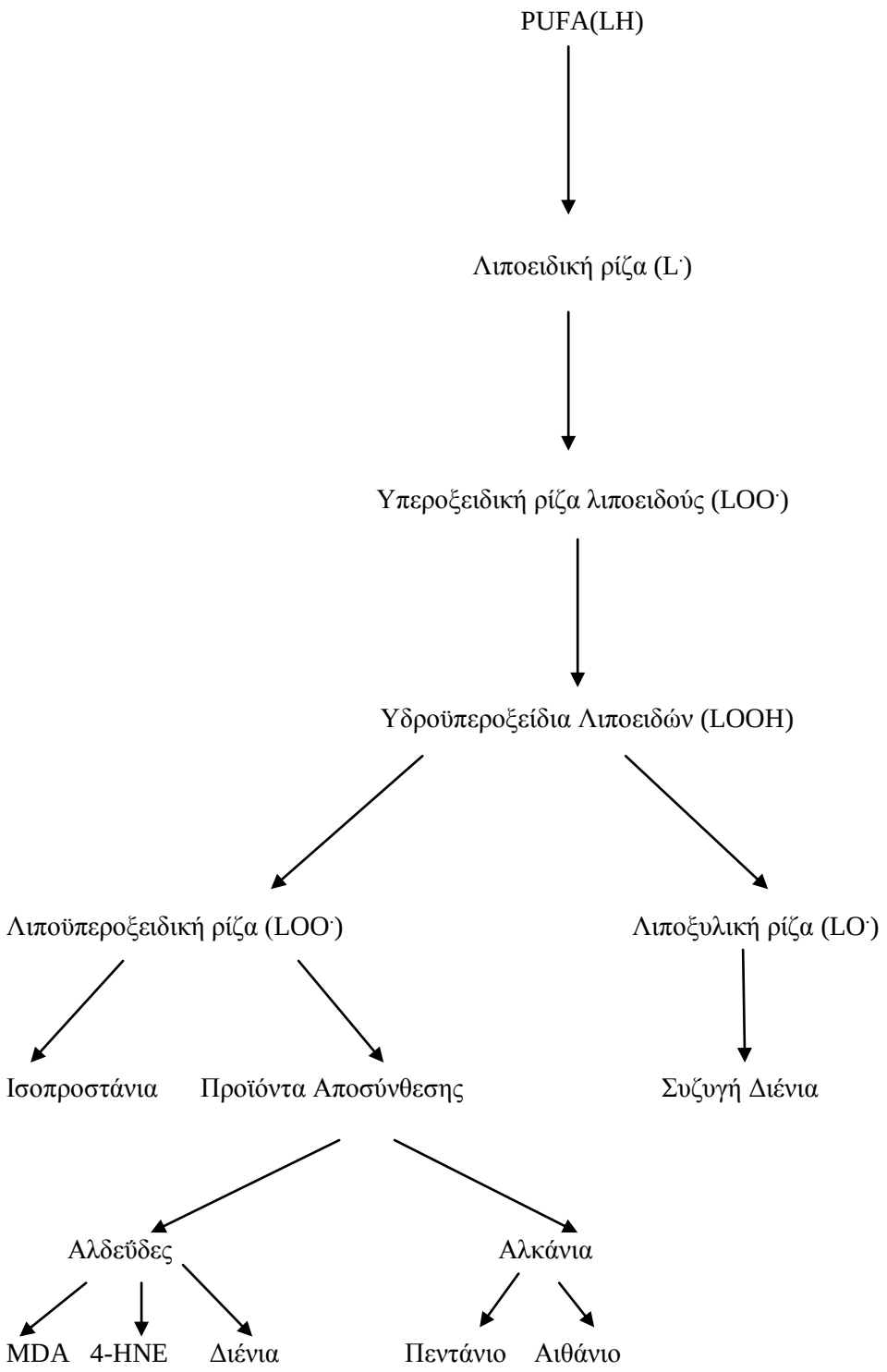
Ενώ το έντονα αντιδρών $HO^{\cdot}$ αποσπά άτομα Η σχεδόν χωρίς καμία διάκριση από τα διάφορα βιολογικά μόρια, λιγότερο δραστικές ρίζες όπως η $LOO^{\cdot}$, που παράγεται από αυτή τη διαδικασία, αποσπούν κατά προτίμηση υδρογόνα από ασθενέστερους δεσμούς, όπως ο δεσμός Ο-Η του χρωμανολικού δακτυλίου που περιέχεται στην α-ΤΟΗ (α-τοκοφερόλη). Σε αυτή την περίπτωση, παράγεται $\alpha\text{-TOH}^{\cdot}$ και ένα μόριο LOOH.

$$LOO^{\cdot} + \alpha\text{-TOH} \longrightarrow LOOH + \alpha\text{-TO}^{\cdot}$$

Οι $LOO^{\cdot}$ θεωρούνται ως οι κύριοι μεσολαβητές της μη ενζυμικής υπεροξείδωσης των λιποειδών καθώς και οι τελικοί πρόδρομοι των LOOH. Επομένως, η παρουσία LOOH σε ανθρώπινες αθηροσκληρωτικές βλάβες υπονοεί το σχηματισμό $LOO^{\cdot}$ ως ενδιάμεσο προϊόν. Η υπεροξείδωση των λιποειδών των LDL στις ανθρώπινες αθηροσκληρωτικές βλάβες από τέτοια οξειδωτικά μόρια, φαίνεται να συμβαίνει κυρίως παρουσία α-ΤΟΗ μέσω της παραπάνω αντίδρασης. Η συσσώρευση LOOH μαζί με τις αντίστοιχες λιποειδικές αλκοόλες που προκύπτουν από την αναγωγή των LOOH, πιθανόν να αντιπροσωπεύει έναν αξιόπιστο δείκτη της έκτασης της οξείδωσης των LDL στο αρτηριακό τοίχωμα.

Χαρακτηριστικό παράδειγμα αλυσιδωτής αντίδρασης λιποειδικής υπεροξείδωσης είναι και η υπεροξείδωση των PUFA που συμβαίνει κυρίως στα PLP των μεμβρανών. Η αντίδραση αυτή μπορεί να συνεχίζεται μέχρι το υπόστρωμα, δηλαδή τα PUFA, να καταναλωθεί πλήρως, ή μέχρι να σταματήσει η αντίδραση λόγω της δράσης αντιοξειδωτικών παραγόντων. Τα δευτερογενή προϊόντα μιας τέτοιας αντίδρασης υπεροξείδωσης είναι είτε τμήματα των αρχικών μορίων, είτε σε περίπτωση που εμπλέκεται το ΑΑ (αραχιδονικό οξύ) ισοπροστάνια.

Η λιποειδική υπεροξείδωση εκτός από την παραγωγή πρωτογενών λιποειδικών μορίων οδηγεί και στη δημιουργία δευτερογενών ενώσεων. Αυτές οι ενώσεις αποτελούν προϊόντα αποσύνθεσης των αρχικών μορίων και μπορεί να είναι είτε αλδεΰδες όπως η MDA (μηλονυλοδιαλδεΰδη) και η 4-HNE (4-υδροξυενεανάλη), είτε συζυγή διένια, είτε αλκάνια όπως το πεντάνιο και το αιθάνιο[51]. Σχηματικά η πορεία της λιποειδικής υπεροξείδωσης μπορεί να αποδοθεί ως εξής:



Σχήμα 2.2: Προϊόντα λιποειδικής υπεροξείδωσης

Τα LOOH που σχηματίζονται μέσω αυτής της διαδικασίας έχουν τοξικές επιδράσεις στα κύτταρα τόσο άμεσα, αλλά και μέσω της διάσπασής τους σε υψηλής δραστικότητας οξειδωτικές ρίζες όπως η HO·. Επίσης, πιθανόν να αντιδρούν με μεταβατικά μέταλλα, όπως ο Fe και ο Cu σχηματίζοντας αλδεΰδες όπως η MDA και η 4-HNE. Με αυτό τον

τρόπο, τα LOOH διαδίδουν περαιτέρω τις αντιδράσεις λιποειδικής υπεροξείδωσης προκαλώντας καταστροφές στις κυτταρικές μεμβράνες[52].

Ένα ιδιαίτερο χαρακτηριστικό της διαδικασίας της λιποειδικής υπεροξείδωσης είναι το γεγονός ότι ROS όπως η $O_2^{\cdot -}$ και το H_2O_2 δεν έχουν την ικανότητα να την εκκινήσουν, αλλά παρόλα αυτά μπορούν να τη διεγείρουν όταν προστίθενται σε λιποειδή παρουσία πολύ μικρών ποσοτήτων Fe [53].

Ως προς τις αντιδράσεις των RNS, το $NO^{\cdot}$ αναδεικνύεται από τη βιβλιογραφία ως η κυριότερη RNS που παράγεται από τα κύτταρα καθώς και η κυριότερη πηγή των υπόλοιπων RNS[49]. Το μόριο αυτό όπως έχει ήδη αναφερθεί σε προηγούμενο τμήμα της εργασίας, είναι ιδιαίτερα σημαντικό στη μεσολάβηση της φυσιολογικής λειτουργίας του ενδοθηλίου αλλά και στη ρύθμιση πολλών άλλων βιολογικών λειτουργιών. Παρόλα αυτά, σε παθολογικές καταστάσεις μπορεί να γίνει καταστροφικό, εξαιτίας της υψηλής δραστικότητας του ως προς άλλες ελεύθερες ρίζες[49,54]. Παράγεται από τη NOS η οποία καταλύει την οξείδωση της L-αργινίνης σε L-κιτρουλλίνη, σχηματίζοντας ταυτόχρονα $NO^{\cdot}$ [55].

Το $NO^{\cdot}$ διαχέεται ταχύτατα μέσα στα κύτταρα και μέσω των κυτταρικών μεμβρανών, ενώ λειτουργεί και ως δευτερογενές αγγελιαφόρο μόριο. Ως ελεύθερη ρίζα έχει πολύ υψηλή δραστικότητα ως προς την $O_2^{\cdot -}$. Οι δύο αυτές ρίζες, αντιδρούν μέσω ενός μη ενζυμικού μηχανισμού σχηματίζοντας $ONOO^-$. Το $ONOO^-$, το οποίο αποτελεί την ισχυρότερη RNS, αντιδρά με τα περισσότερα βιολογικά μόρια προκαλώντας κυτταρική καταστροφή. Επιπλέον, σε ένα βιολογικό σύστημα αντιδρά γρήγορα με CO_2 (διοξείδιο του άνθρακα), οδηγώντας στο σχηματισμό CO_3^- και $NO_2^{\cdot}$, τα οποία με τη σειρά τους προκαλούν περαιτέρω βιολογικές καταστροφές[49]. Η αντίδραση $ONOO^-$ με CO_2 μπορεί επίσης να αποδώσει $ONOOCO_2^-$, το οποίο είναι ένα ασταθές μόριο που εξυπηρετεί ως πηγή διάφορων δραστικών ενδιαμέσων, όπως το NO^{+2} και το CO_3^- [2,46,49]

2.2.2 Πηγές ROS

Οι ROS μπορεί να προέρχονται από πολλές διαφορετικές πηγές μέσα στον οργανισμό[30,47]. Οι πηγές αυτές μπορεί να είναι εξωκυττάριες ή ενδοκυττάριες και ενζυμικές ή μη ενζυμικές[2]. Μερικές από τις σημαντικότερες πηγές είναι η μιτοχονδριακή αναπνευστική

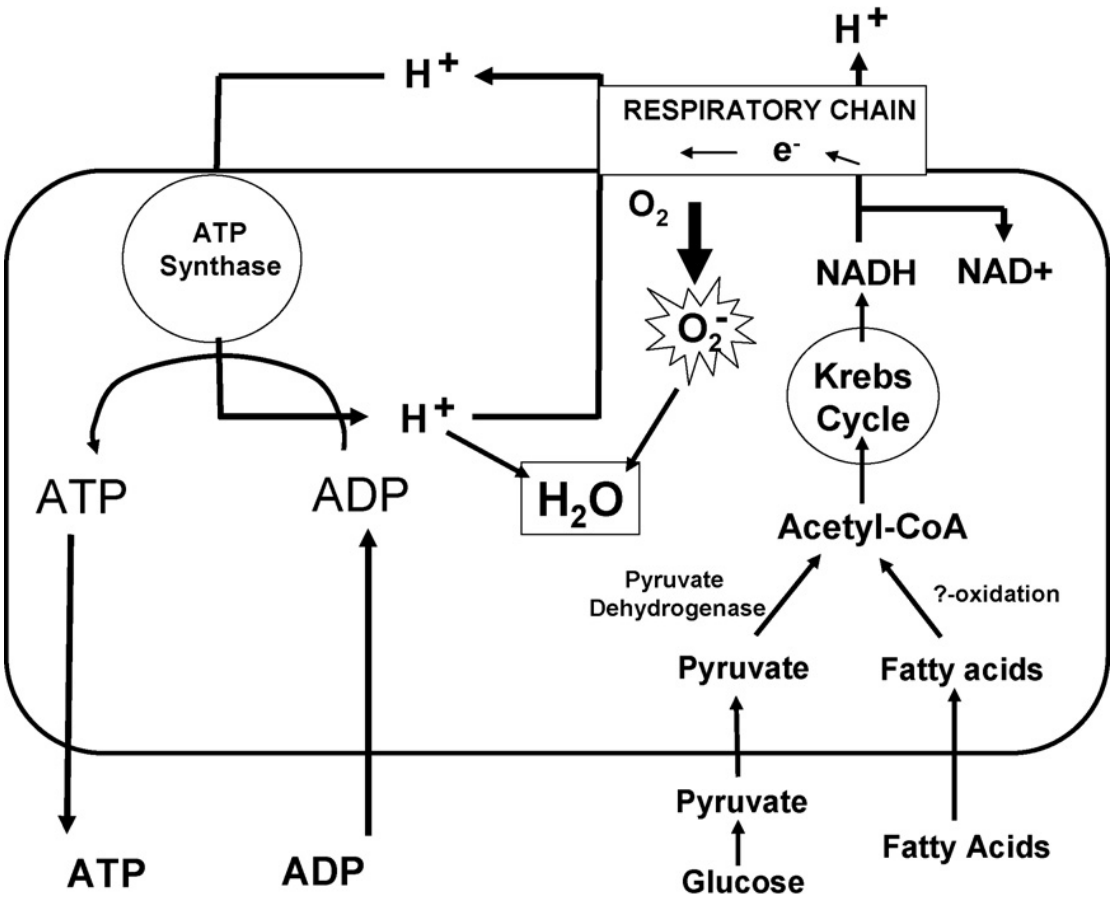
αλυσίδα, τα μικροσωμιακά ένζυμα του κυτοχρώματος P450 καθώς και τα ένζυμα eNOS, OX, LO (λιποξυγονάση) και Nox (NADPH οξειδάση)[54-56].

- **Μιτοχόνδρια**

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, οι ROS παράγονται ως αποτέλεσμα του φυσιολογικού μεταβολισμού των κυττάρων. Όντως, έχει αποδειχθεί ότι οι ROS αποτελούν παραπροϊόντα του φυσιολογικού κυτταρικού μεταβολισμού των μιτοχονδρίων[55,57]. Συγκεκριμένα, αναφέρεται ότι περίπου 1-3% του O_2 που καταναλώνεται από τα μιτοχόνδρια για την παραγωγή ενέργειας με τη μορφή ATP (τριφωσφορική αδενοσίνη) δεν ανάγεται σε H_2O αλλά μετατρέπεται σε ROS και συγκεκριμένα σε $O_2^{\cdot -}$ [44].

Τα σημεία διαρροής ηλεκτρονίων που έχουν αναγνωριστεί στη μήτρα του μιτοχονδρίου και τα οποία ουσιαστικά ευθύνονται για την παραγωγή $O_2^{\cdot -}$ είναι τα σύμπλοκα I και III της αναπνευστικής αλυσίδας[47]. Το σύμπλοκο I αντιπροσωπεύει το ένζυμο NADH δεϋδρογονάση και το σύμπλοκο III αντιπροσωπεύει το σύμπλεγμα ουβικινόνη-κυτόχρωμαb-κυτόχρωμαc_1[2,46]. Επομένως τα μιτοχόνδρια έχουν αναδειχθεί ως μία από τις βασικές πηγές ROS[2,55].

Η μιτοχονδριακή παραγωγή ROS έχει συνδεθεί με την ανάπτυξη πρώιμων αθηροσκληρωτικών βλαβών, ενώ αναδυόμενα επιστημονικά δεδομένα φανερώνουν ότι πολλά καρδιαγγειακά σύνδρομα συσχετίζονται με μιτοχονδριακή δυσλειτουργία[2,46], αν και in vivo δεν έχει αποσαφηνιστεί ακόμα συγκεκριμένη αιτιώδης σχέση[2].



Σχήμα 2.3: Η διαρροή ηλεκτρονίων κατά την αναπνευστική αλυσίδα στα μιτοχονδρίου οδηγεί στην παραγωγή ROS

- **Nox**

Οι Nox αποτελούν μια οικογένεια πολυενζυμικών συστημάτων που παράγουν $O_2^{\cdot -}$ μέσω της αναγωγής του O_2, χρησιμοποιώντας NAD(P)H ως πηγή ηλεκτρονίων[47,55]. Έχει μάλιστα προταθεί ότι η $O_2^{\cdot -}$ προέρχεται κυρίως από τη δράση των ενζύμων αυτών[47].Η αντίδραση που καταλύουν οι Nox είναι η ακόλουθη:

$$\mathbf{NAD(P)H + 2O_2 \longrightarrow NAD(P)^- + H^+ + 2O_2^{\cdot -}}$$ [2]

Τα φαγοκύτταρα, συμπεριλαμβανομένων των ουδετερόφιλων, των μονοκυττάρων και των μακροφάγων, είναι οι βασικοί κυτταρικοί τύποι που συνθέτουν τα ένζυμα αυτά[46]. Συνολικά, υπάρχουν επτά ισομορφές του ενζύμου που εκφράζονται και σε μη φαγοκύτταρα, όπως τα EC, τα SMC και οι ινοβλάστες[46,55]. Οι ROS που παράγονται σε αυτά τα κύτταρα μέσω της δράσης των Nox και κυρίως της Nox-2 ισομορφής, είναι απαραίτητες στην άμυνα του ξενιστή καθώς συμβάλλουν στην καταστροφή παθογόνων μικροοργανισμών[55].

Παρόλα αυτά, για να ενεργοποιηθούν τα ένζυμα αυτά απαιτείται πρώτα μια αντίδραση φωσφορυλίωσης, κατόπιν της οποίας παράγονται μεγάλες ποσότητες $O_2^{\cdot -}$ από τα

φαγοκύτταρα για σχετικά μικρές χρονικές περιόδους, συμβάλλοντας έτσι στην αποτελεσματική ανοσολογική απάντηση[46]. Πέρα από τη συμμετοχή τους στην ανοσολογική απάντηση οι Nox ρυθμίζουν επίσης τη δράση άλλων οξειδασών οι οποίες εμπλέκονται στην παραγωγή ROS, όπως η OX και η eNOS[47].

Σύμφωνα και με τα παραπάνω, υπάρχουν εμφανείς αποδείξεις ότι η δραστηριότητα των Nox αντιπροσωπεύει μία από τις κύριες πηγές ROS μέσα στο αγγείο[2] και ότι αυτές οι ROS συμμετέχουν στην τροποποίηση της αγγειακής φυσιολογίας και παθοφυσιολογίας[55].

- **OX**

Μία άλλη σημαντική πηγή ενδοκυττάριων ROS είναι το ένζυμο XOR (οξειδοαναγωγάση της ξανθίνης)[47]. Η OX και η XDH (αφυδρογονάση της ξανθίνης) αποτελούν δύο διαφορετικές ισομορφές αυτού του ενζύμου. Και οι δύο καταλύουν τα δύο τελευταία βήματα της αποσύνθεσης των πουρινών, δηλαδή τη μετατροπή της υποξανθίνης σε ξανθίνη και της ξανθίνης σε ουρικό οξύ[47,55].

Συγκεκριμένα η OX είναι μια φλαβοπρωτεΐνη που περιέχει Fe, S (θείο) και Mo (μολυβδένιο) ως καταλυτικά μέταλλα στο ενεργό της κέντρο[46]. Βασικός ρόλος του ενζύμου είναι η μεταφορά ηλεκτρονίων στο O_2, προς το σχηματισμό $O_2^{\cdot -}$ και H_2O_2[47,55]. Από την άλλη η XOR είναι ευρέως κατανεμημένη σε όλους τους ιστούς[55] και στο πλάσμα[2], με ιδιαίτερα υψηλά επίπεδα έκφρασης στα EC των τριχοειδών[46,55]. Συνεπώς, όταν εκφράζεται και κατανέμεται σε κρίσιμα σημεία του αγγειακού δικτύου[47] ενισχύει τη δημιουργία οξειδωτικού στρες[2], τροποποιώντας έτσι την αγγειακή λειτουργία[47]. Έχει αναφερθεί μάλιστα, ότι αυτή η ισομορφή του ενζύμου συμβάλλει σε μεγάλο βαθμό στο οξειδωτικό στρες του οργανισμού, ύστερα από επαναιμάτωση ισχαιμικών ιστών[55].

- **NOS**

Το ένζυμο αυτό ουσιαστικά αποτελεί μια οικογένεια ενζύμων, τα οποία καταλύουν την οξείδωση της L-αργινίνης σε L-κιτρουλλίνη με ταυτόχρονη παραγωγή $NO^{\cdot}$. Έχουν αναγνωριστεί τρεις διαφορετικές ισομορφές του ενζύμου· η nNOS (νευρωνική NOS), η eNOS και η iNOS (επαγόμενη NOS)[2,55].

Στο πλαίσιο του αγγειακού συστήματος και της αθηροσκλήρωσης, οι πιο σημαντικές ισομορφές είναι οι eNOS και iNOS[2,46]. Συγκεκριμένα, η eNOS παίζει σημαντικό ρόλο στην προστασία του αγγειακού τοιχώματος από την αθηροσκλήρωση, ενώ ο ρόλος της

iNOS δεν έχει οριστεί σε ικανοποιητικό βαθμό ως προς την αθηροσκλήρωση[2]. Η iNOS σε φυσιολογικές συνθήκες δε συναντάται στους ιστούς του σώματος και επάγεται κυρίως από προ-φλεγμονώδεις μεσολαβητές.

Τα περισσότερα επιστημονικά δεδομένα αποδίδουν την παραγωγή ROS κυρίως στην eNOS ισομορφή[55]. Η eNOS είναι ένα ομοδιμερές μόριο, με κάθε μονομερές να αποτελείται από μία περιοχή αναγωγάσης (με θέσεις πρόσδεσης για NAD(P)H, FAD και FMN) και μία περιοχή οξειδάσης (με θέσεις πρόσδεσης για Zn (ψευδάργυρο), αίμη, L-αργινίνη και BH_4)[46]. Η παραγωγή $NO^{\cdot}$ μέσω της eNOS περιλαμβάνει τη μεταφορά ηλεκτρονίων από το NAD(P)H στο FAD (φλαβινο-αδένινο δινουκλεοτίδιο) και από το FMN (φλαβινο-μονονουκλεοτίδιο) στην αίμη. Μέσω αυτής της διαδικασίας επιτυγχάνεται η οξείδωση της L-αργινίνης σε $NO^{\cdot}$ και L-κιτρουλλίνη, με συμπαράγοντα της ενζυμικής αντίδρασης την BH_4 (τετραϋδροβιοπτερίνη). Η στενή σύζευξη της ροής ηλεκτρονίων μέσω της eNOS στην L-αργινίνη εξαρτάται από το εάν υπάρχουν επαρκή επίπεδα συμπαραγόντων του ενζύμου[55]. Έτσι, απουσία L-αργινίνης ή BH_4 η eNOS μπορεί να παράγει $O_2^{\cdot -}$ και H_2O_2[2].

- **MPO**

Η MPO είναι μέλος της οικογένειας των ενζύμων υπεροξειδασών[55]. Η οικογένεια αυτή περιλαμβάνει ένζυμα στο ενεργό κέντρο των οποίων υπάρχει το μόριο της αίμης[2,55]. Καταλύει τη μετατροπή του Cl^- σε HOCl, σύμφωνα με την παρακάτω αντίδραση:

$H_2O_2 + Cl^- + H^+ \longrightarrow HOCl + H_2O$[46]

Ο καταλυτικός κύκλος της MPO τυπικά περιλαμβάνει την κατανάλωση H_2O_2 προς παραγωγή μιας ποικιλίας οξειδωμένων προϊόντων εκτός του HOCl, το οποίο παρόλα αυτά αποτελεί το σημαντικότερο και πιο άφθονο οξειδωτικό που προέρχεται από το ένζυμο[55]. Συγκεκριμένα, το σύστημα MPO/H_2O_2/Cl^- μπορεί να οδηγήσει στην παραγωγή 3-χλωροτυροσίνης, χλωρυδρινών όπως εκείνων της χοληστερόλης και των λιπαρών οξέων, καθώς και ριζών τυροσόλης προσδεμένων σε ελεύθερα αμινοξέα ή πρωτεΐνες. Τα μόρια αυτά, έχουν την ικανότητα να συμμετέχουν στην παραγωγή οξειδωμένων βιομορίων και κυρίως OxLDL[46].

Η MPO φαίνεται να παίζει ρόλο σε διαφορετικούς μηχανισμούς που καταστρέφουν το ανθρώπινο αρτηριακό τοίχωμα. Ένας από αυτούς, είναι και η οξειδωτική τροποποίηση της LDL που προκαλείται από το HOCl. Η οξείδωση της LDL από την MPO οδηγεί κυρίως σε τροποποιήσεις των απολιποπρωτεϊνών με το σχηματισμό χλωροτυροσίνης, διτυροσίνης και νιτροτυροσίνης[2]. Το HOCl εκτός από την οξείδωση λιποειδών όπως η LDL, οξειδώνει και πρωτεΐνες[55]. Η MPO και οι HOCl-τροποποιημένες πρωτεΐνες και λιποπρωτεΐνες

βρίσκονται στις ανθρώπινες αθηροσκληρωτικές βλάβες[2], καθιστώντας τις πιο ευάλωτες στη διάσπαση και στη ρήξη.

Η MPO, η οποία εκφράζεται και αποθηκεύεται στα μονοκύτταρα και στα κοκκία των ουδετερόφιλων[55], είναι το μόνο γνωστό ένζυμο στον άνθρωπο που παράγει HOCl. Συνεπώς, τα χλωριωμένα βιομόρια θεωρούνται ειδικοί δείκτες αντιδράσεων οξείδωσης που καταλύονται από το ένζυμο αυτό. Πρόσφατα δεδομένα, υποδεικνύουν ότι η MPO παίζει επίσης βασικό ρόλο στην παραγωγή RNS in vivo. Συγκεκριμένα, έχει φανεί ότι το σύστημα $MPO/H_2O_2/Cl^-$ οξειδώνει το HNO_2 σε NO_2Cl και $NO_2^{\cdot}$, και τα δύο εκ των οποίων προάγουν αντιδράσεις νίτρωσης και μπορούν να μετατρέψουν την τυροσίνη σε 3-νιτροτυροσίνη[46]. Τέλος, η MPO καταλύει την οξείδωση του $NO^{\cdot}$ στο πλάσμα, μειώνοντας με αυτό τον τρόπο τη βιοδιαθεσιμότητα του[55].

- **LO**

Μία ακόμα σημαντική πηγή ROS στον ανθρώπινο οργανισμό αποτελεί το ενζυμικό σύστημα της LO. Οι LOs είναι ένζυμα τα οποία ανήκουν στην οικογένεια των Dos (διοξυγονάσες)[2]. Τα ένζυμα αυτά, στο ενεργό κέντρο των οποίων περιέχεται μη αιμικός Fe, καταλύουν τη στερεοειδική ενσωμάτωση του O_2 σε PUFA[2,55]. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα, την παραγωγή μιας οικογένειας σύνθετων βιολογικά δραστικών λιποειδών, των επονομαζόμενων εικοσανοειδών[46]. Τα εικοσανοειδή περιλαμβάνουν ενώσεις μεταξύ των οποίων οι PGs, τα LTs (λευκοτριένια) και οι TXs[2,46]. Τα μόρια αυτά συμμετέχουν σε φλεγμονώδεις αντιδράσεις, αυξάνοντας με αυτό τον τρόπο την αγγειακή διαπερατότητα[2]. Έχει μάλιστα αποδειχθεί, ότι τα εικοσανοειδή αλληλεπιδρούν μεταξύ τους ως προς τις φλεγμονώδεις επιδράσεις που ασκούν. Ένα παράδειγμα αποτελεί η συνθάση των TX η οποία διασπά την PGH_2 σε 12-υδροξυ-5,8,10-επταδεκαενοϊκό οξύ και MDA[46].

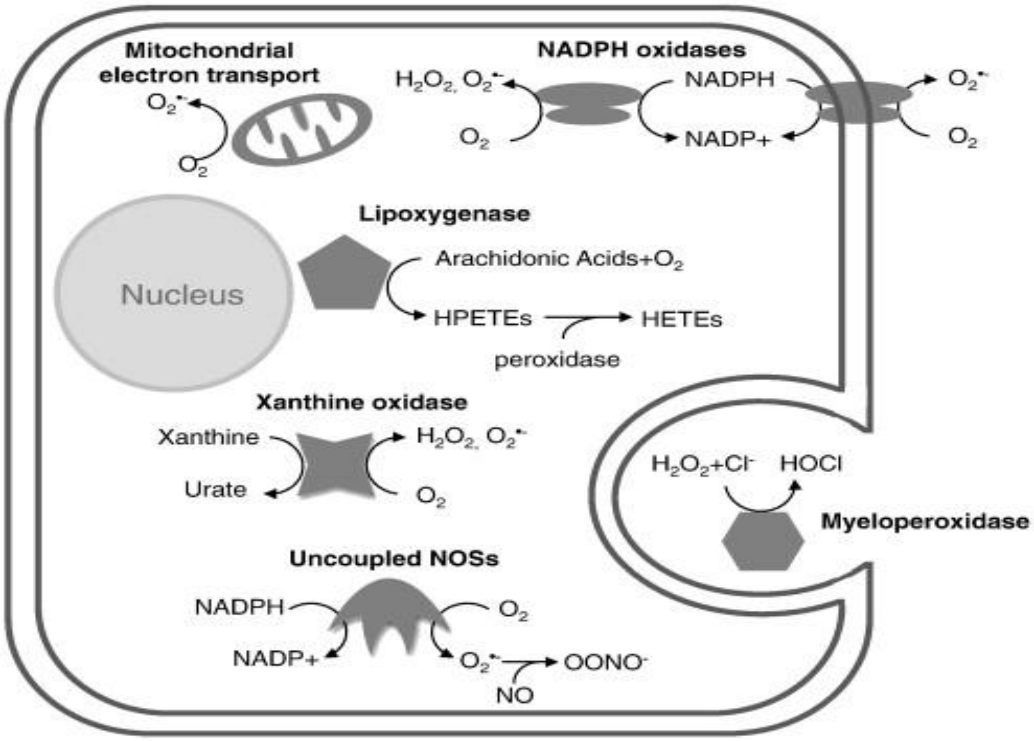
Οι LOs θεωρείται γενικά ότι προωθούν την αθηροσκλήρωση, παράγοντας ROS και επακολούθως οξειδωτικά τροποποιημένα λιποειδή, μεταξύ των οποίων και OxLDL. Ειδικότερα, τα ένζυμα αυτά οξειδώνουν συγκεκριμένα FA (λιπαρά οξέα), σε συγκεκριμένες θέσεις της ανθρακικής αλυσίδας, στα αντίστοιχα ROOH, τα οποία πιθανόν να συμμετέχουν σε επακόλουθες αντιδράσεις μη ενζυμικής υπεροξείδωσης λιποειδών[55]. Τέλος, εκτός από την οξείδωση των FA, η 12/15-LO, μια συγκεκριμένη δηλαδή ισομορφή του ενζύμου, έχει αναφερθεί ότι οξειδώνει σύνθετα εστεροποιημένα λιπαρά οξέα, όπως αυτά των εστέρων χοληστερόλης και των PL[46].

- **Στοιχεία μετάπτωσης**

Εκτός από τον καταλυτικό ρόλο των μιτοχονδρίων και των ενζύμων που αναφέρθηκαν στην παραγωγή ROS, υπάρχουν και κάποια ιόντα μετάλλων τα οποία φαίνεται να εμπλέκονται στις οξειδωτικές τροποποιήσεις του αγγειακού τοιχώματος. Όντως, από διάφορα επιστημονικά δεδομένα έχει προταθεί ότι ελεύθερα ιόντα μετάλλων, κυρίως αυτά του Fe και του Cu, αποτελούν ισχυρούς καταλύτες οξειδωτικών αντιδράσεων παρουσία LOOH.

Συγκεκριμένα, τα μέταλλα αυτά εμπλέκονται σε αντιδράσεις μεταφοράς μονήρων ηλεκτρονίων οι οποίες οδηγούν σε αντιδράσεις αυτο-οξείδωσης ή αποσύνθεσης των LOOH, σε δραστικές ρίζες όπως οι $HO^{\cdot}$, $RO^{\cdot}$ και $RO_2^{\cdot}$[46] και άλλα δευτερογενή προϊόντα οξείδωσης, όπως η MDA[41]. Μέσω παρόμοιων αντιδράσεων τα μέταλλα αυτά μπορούν να επάγουν την οξειδωτική καταστροφή των LDL. Η δράση τους αυτή αποδεικνύεται και από τη χρήση του Cu^{+2} ως ένα από τα συνήθη μόρια οξείδωσης της LDL in vitro[46].

Ο Fe^{+3} έχει κυρίως συσχετιστεί με τη μετατροπή λιγότερο δραστικών ελεύθερων ριζών όπως το H_2O_2 ή τα LOOH, σε πιο δραστικές όπως τα $HO^{\cdot}$, $RO^{\cdot}$ και $RO_2^{\cdot}$. Γενικά, τα επίπεδα Fe^{+3} in vivo πιθανόν να σχετίζονται με αύξηση του ρυθμού της οξειδωτικής καταστροφής[58]. Εκτός από τον ελεύθερο Fe, βιολογικές μορφές αυτού όπως η αίμη, η αιμοσφαιρίνη και η μυοσφαιρίνη, έχουν επίσης την ικανότητα να καταλύουν οξειδωτικές αντιδράσεις στο αρτηριακό τοίχωμα και να προκαλούν in vitro οξείδωση απομονωμένων μορίων LDL. Παρόλα αυτά, καθώς η συγκέντρωση τέτοιων ιόντων in vivo είναι πολύ μικρή, δεν υπάρχουν επαρκή δεδομένα που να αποδεικνύουν ότι οι οξειδωτικές αντιδράσεις που αυτά επάγουν σχετίζονται με την αθηροσκλήρωση[46].



Σχήμα 2.4: Οι διάφορες πηγές ROS μέσα στο κύτταρο

2.2.3 Βιολογικές δράσεις ελεύθερων ριζών (ROS και RNS)

Ξεκινώντας, έχει υποστηριχθεί και ξεκάθαρα αποδειχθεί από μελέτες για την οξειδοαναγωγική ρύθμιση της έκφρασης των γονιδίων, ότι τα προ-οξειδωτικά μόρια είναι βασικοί ρυθμιστές της έκφρασης των τελευταίων και επομένως η εμπλοκή τους σε διάφορους φυσιολογικούς και παθοφυσιολογικούς μηχανισμούς των βιολογικών συστημάτων είναι αδιαμφισβήτητη[43].

Πιο συγκεκριμένα, έχει φανεί ότι οι RONS συμβάλλουν στην εξέλιξη του καρκίνου αλλά επίσης ότι βοηθούν στον έλεγχο της εξάπλωσης και στην καταστροφή των καρκινικών κυττάρων. Τελικά, η διαταραγμένη ρύθμιση των επιπέδων RONS φαίνεται να προάγει την καρκινογένεση. Έχει επίσης φανεί ότι οι ROS ενεργοποιούν την κυτταρική τελομεράση στα EC, επιταχύνοντας έτσι τη διαδικασία της γήρανσης[44].

Ως προς τη συμμετοχή των ROS στην αθηροσκλήρωση, έχει αποδειχθεί ότι η υπερβολική παραγωγή τους οδηγεί σε ενδοθηλιακή δυσλειτουργία[56] εξαιτίας του γεγονότος ότι ο σχηματισμός ROS πυροδοτεί έναν καταρράκτη γεγονότων, όπως η οξειδωτική τροποποίηση των LDL, η φλεγμονή, ο ενδοθηλιακός τραυματισμός και τελικά η ρήξη της ενδοθηλιακής στιβάδας μέσω απόπτωσης[54]. Οι ROS επάγουν όλες αυτές τις αθηρογονικές διαδικασίες μέσω της ικανότητάς τους να λειτουργούν ως δευτερογενείς αγγελιαφόροι, ενεργοποιώντας με αυτό τον

τρόπο μονοπάτια μεταγωγής σήματος τα οποία εμπλέκονται στη μεταγραφή γονιδίων προφλεγμονωδών κυτταροκινών. Το τελικό αποτέλεσμα είναι η αύξηση της σύνθεσης αυτών των κυτταροκινών, μεταξύ των οποίων ο TNF-a, η IL-6, η IL-1(β) και η IL-8.

Επιπλέον, γεγονότα όπως η αύξηση της έκφρασης μορίων προσκόλλησης των λευκοκυττάρων (VCAM-1 και ICAM-1) και η ενεργοποίηση των MMPs της ECM, επηρεάζονται από την ενδοκυττάρια παραγωγή ROS[44]. Εκτός όμως από την ενεργοποίηση των MMPs, οι ROS εμπλέκονται και με τις θρομβωτικές επιπλοκές της αθηροσκλήρωσης. Συγκεκριμένα, έχουν τη δυνατότητα να τροποποιούν την έκφραση ή/και τη δραστηριότητα σημαντικών συστατικών του καταρράκτη της πήξης και να ενεργοποιούν τα αιμοπετάλια. Για παράδειγμα, το οξειδωτικά τροποποιημένο ινωδογόνο σχηματίζει ινώδες με αυξανόμενο ρυθμό, ενώ επίσης παρουσιάζει μειωμένη ικανότητα διέγερσης της παραγωγής t-PA (ιστικός ενεργοποιητής πλασμινογόνου) σε σχέση με το μη οξειδωτικά τροποποιημένο ινωδογόνο. Σε συνδυασμό και με την αυξημένη μεταγραφή PAI-1 που παρατηρείται στα EC, στα SMC και σε άλλα κύτταρα παρουσία ROS, καθίσταται σαφές ότι οι ελεύθερες ρίζες αναστέλλουν τους ινωδολυτικούς μηχανισμούς.

Ως προς τα αιμοπετάλια, τα οποία και τα ίδια αποτελούν σημαντικές πηγές ROS και κυρίως $O_2^{\cdot -}$, $HO^{\cdot}$ και H_2O_2, φαίνεται ότι η επίδραση των ελεύθερων ριζών σε αυτά αποδίδεται κυρίως στην απενεργοποίηση του $NO^{\cdot}$. Παρόλα αυτά, έχει επίσης προταθεί ότι η $O_2^{\cdot -}$ πιθανόν να προάγει έμμεσα τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων μέσω της απενεργοποίησης της PAF-AH[56].

Συνολικά, φαίνεται ότι η κυτταρική καταστροφή που προκαλείται από τις RONS και συνεπώς η εμφάνιση ασθενειών οι οποίες συνοδεύουν την παραγωγή τους, σχετίζονται με το ποια ακριβώς μακρομόρια (πρωτεΐνες, λιποειδή, νουκλεϊκά οξέα) στοχοποιούνται από αυτές, τη συχνότητα, τη διάρκεια της προσβολής καθώς και την αντιοξειδωτική άμυνα του εκάστοτε ιστού που προσβάλλεται[45]. Γενικά, από πλήθος επιστημονικών μελετών έχει αποδειχθεί ότι τα αυξημένα επίπεδα RONS προκαλούν καταστροφές σε πρωτεΐνες, λιποειδή, νουκλεϊκά οξέα[44-46,52,54,59], ακόμα και σε σάκχαρα[46,54,59], συμβάλλοντας με αυτό τον τρόπο σε κυτταρική δυσλειτουργία (τροποποιούν τη ρευστότητα των βιολογικών μεμβρανών, τη μεταφορά ιόντων, την ενζυμική δραστικότητα, τις διασυνδέσεις πρωτεϊνών, τη σύνθεση πρωτεϊνών, τη λειτουργία του DNA) και τελικά σε απόπτωση, με αποτέλεσμα την εμφάνιση χρόνιων ασθενειών[44,54].

- **Οξείδωση λιποειδών**

Ενώ όλα τα βιολογικά μόρια αποτελούν δυνητικούς στόχους δραστικών προ-οξειδωτικών μορίων, τα λιποειδή και ιδιαίτερα τα PUFA αποτελούν έναν από τους βασικότερους και συχνότερους στόχους αυτών[42]. Αυτό συμβαίνει εξαιτίας της διάχυτης κατανομής τους σε διάφορα τμήματα του κυττάρου[42] αλλά και της παρουσίας σε αυτά διπλών δεσμών, οι οποίοι αποδυναμώνουν τους δεσμούς C-H που είναι παρακείμενοι σε αυτούς[41,53]. Με αυτό τον τρόπο, η μετακίνηση ενός H που θα οδηγήσει τελικά στο σχηματισμό δραστικής ρίζας, καθίσταται πιο εύκολη[41].

Έτσι λοιπόν, η επίθεση ελεύθερων ριζών σε λιποειδή, διαδικασία γνωστή ως λιποειδική υπεροξείδωση, έχει αναδειχθεί ως βασικός μηχανισμός κυτταρικού τραυματισμού και καταστροφής στον ανθρώπινο οργανισμό. Καθώς οι κυτταρικές μεμβράνες αποτελούνται από διπλοστιβάδες PL πλούσιες σε PUFA, αποτελούν τις σημαντικότερες βιολογικές δομές που πλήττονται από τις αντιδράσεις της λιποειδικής υπεροξείδωσης[45]. Η διαδικασία αυτή μπορεί να τροποποιήσει τις ιδιότητες των μεμβρανών και να οδηγήσει τελικά σε δομική και λειτουργική καταστροφή τους[41,51]. Συγκεκριμένα, προκαλεί αλλαγές στη ρευστότητα, στην ακεραιότητα και στη διαπερατότητα των κυτταρικών μεμβρανών, διαταράσσοντας με αυτό τον τρόπο τη δράση των διαμεμβρανικών πρωτεϊνών και κυρίως ενζύμων και υποδοχέων[51,59], την πρόσδεση διαφόρων μορίων στους υποδοχείς τους, κυτταρικές αλληλεπιδράσεις, τη μεταφορά θρεπτικών συστατικών καθώς και τη λειτουργία μορίων που δρουν ως δευτερογενείς αγγελιαφόροι[51]. Όλες αυτές οι τροποποιήσεις οδηγούν τελικά στη ρήξη των μεμβρανών με αποτέλεσμα την απελευθέρωση του κυτταρικού τους περιεχομένου[41].

Εκτός όμως από τα PUFA των βιολογικών μεμβρανών, ιδιαίτερα ευάλωτη στην οξείδωση είναι και η χοληστερόλη των LDL. Αυτή μπορεί να οξειδωθεί σε οξυστερόλες, όπως η 7-κετοστερόλη, σε λινελαϊκό υδροξείδιο χοληστερόλης και σε 7β-υδροξυπεροξυ-χοληστερόλη. Τέλος, φαίνεται ότι μικρές, πυκνές και γλυκοζυλιωμένες LDL είναι ιδιαίτερα ευάλωτες στην οξειδωτική προσβολή, ενώ αντίθετα LDL πλούσιες σε MUFA (μονοακόρεστα λιπαρά οξέα) είναι περισσότερο ανθεκτικές στην οξειδωτική τροποποίηση[53].

- **Οξείδωση νουκλεϊκών οξέων**

Το DNA αποτελεί ακόμη ένα βιολογικό μόριο πολύ ευάλωτο στην οξειδωτική καταστροφή από τις ελεύθερες ρίζες. Η καταστροφή του DNA μπορεί να προκληθεί από απευθείας αλληλεπίδραση των ROS με τις νουκλεϊνικές βάσεις ή με την αλυσίδα του DNA.

Επίσης, μπορεί να προέλθει και από δευτερογενή οξειδωτικά μόρια τα οποία προέρχονται από δραστικές προ-οξειδωτικές ρίζες[44].

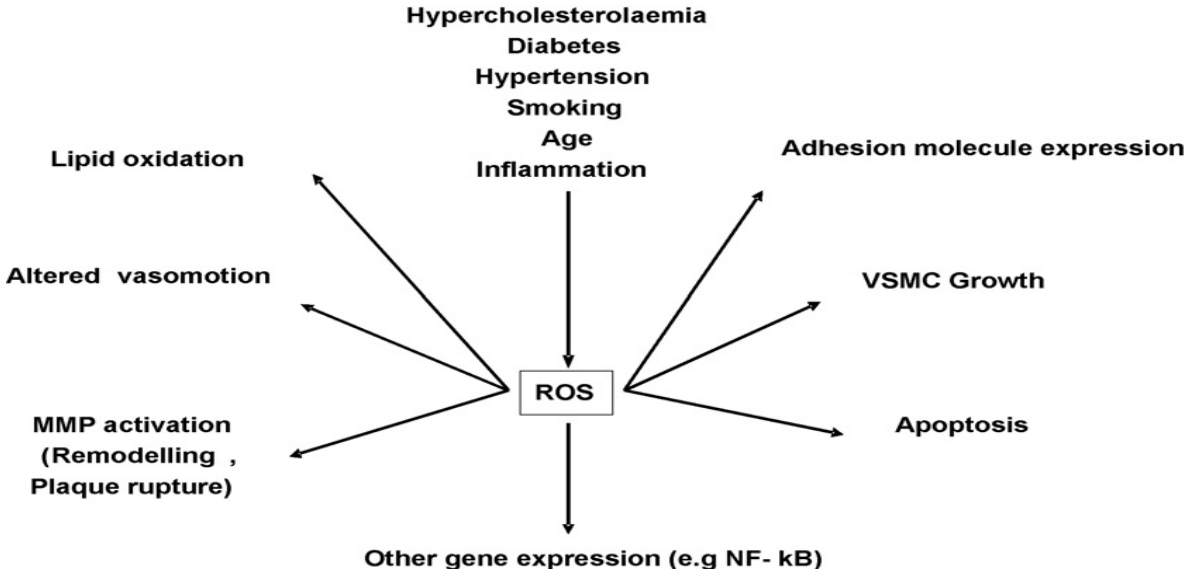
Μία από τις ελεύθερες ρίζες που σχετίζεται σε μεγάλο βαθμό με την καταστροφή αυτού του μορίου, αποδεικνύοντας την πολύ ισχυρή οξειδωτική της δράση, είναι η $HO^{\cdot}$[41,58]. Συγκεκριμένα, η $HO^{\cdot}$ προστίθεται στις νουκλεοτιδικές βάσεις, με αποτέλεσμα το σχηματισμό οξειδωτικά τροποποιημένων βάσεων DNA, το σχηματισμό διασταυρώσεων μεταξύ αυτών, τη σύζευξή τους με πρωτεΐνες καθώς και εκτεταμένη αποσύνθεση της αλυσίδας του DNA[41,45]. Το τελικό αποτέλεσμα αυτών των διαδικασιών είναι η οξειδωτική καταστροφή των βάσεων του DNA και η παραγωγή οξειδωμένων προϊόντων. Λιγότερο δραστικές ρίζες όπως το ^1O, στοχεύουν συνηθέστερα τη γουανίνη, δηλαδή την πιο εύκολα οξειδώσιμη από τις βάσεις του DNA. Το H_2O_2 από την άλλη, δεν προκαλεί καμία οξειδωτική καταστροφή στο DNA. Παρόλα αυτά, μετατρέπεται σε $HO^{\cdot}$ από μεταλλικά ιόντα (κυρίως Fe^{+3} και σπανιότερα Cu^{+2}), που μπορεί να οξειδώσει το DNA και άλλα βιομόρια[58].

Οι δομικές αλλαγές στο DNA μπορεί να προκαλέσουν κυτταροτοξικότητα, επηρεάζοντας την αντιγραφή του μορίου in vivo. Ειδικότερα, μπορεί να εμφανιστεί λανθασμένος τρόπος ανάγνωσης των οξειδωτικά τροποποιημένων σημείων στο DNA από τις DNA πολυμεράσες. Οι φυσιολογικοί κυτταρικοί μηχανισμοί επιδιόρθωσης παρόμοιων λαθών πιθανόν να εξουδετερώνουν αυτές τις αλλαγές. Παρόλα αυτά, κατά τη διάρκεια της μίτωσης πιθανόν αυτοί οι μηχανισμοί επιδιόρθωσης να μην είναι αρκετοί για να αποτρέψουν την εσφαλμένη διαδικασία αντιγραφής του οξειδωτικά τροποποιημένου μορίου του DNA[41]. Κάτι τέτοιο θα μπορούσε να σημαίνει τη δημιουργία μεταλλάξεων και τελικά την εκδήλωση χρόνιων ασθενειών με το πέρας του χρόνου[45].

- **Οξείδωση πρωτεϊνών**

Οι πρωτεΐνες αποτελούν έναν από τους βασικούς στόχους της οξειδωτικής καταστροφής, καθώς βρίσκονται σε αφθονία στα κύτταρα (συγκεκριμένα αποτελούν περίπου το 70% της ξηρής μάζας των περισσότερων κυττάρων), στο πλάσμα και στους ιστούς. Οι ROS μπορούν να προκαλέσουν οξείδωση σε κατάλοιπα αμινοξέων πλευρικών αλυσίδων, οδηγώντας στο σχηματισμό διασυνδέσεων πρωτεϊνών και στον κατακερματισμό ακόμα και ολόκληρων πρωτεϊνών. Η οξείδωση αυτή των πρωτεϊνών οδηγεί σε μία ποικιλία διαφοροποιημένων αμινοξέων[59]. Ιδιαίτερα, έχει υποστηριχθεί ότι οι ομάδες θειόλης των πρωτεϊνών αποτελούν έναν από τους βασικούς στόχους των ROS[46].

Οι ROS που προκαλούν οξειδωτική βλάβη των πρωτεϊνών είναι: η $O_2^{\cdot -}$, η $HO^{\cdot}$, η $RO^{\cdot}$, η $RO_2^{\cdot}$, η $HO_2^{\cdot}$, το H_2O_2, το ^1O και το HOCl[57]. Πιο αναλυτικά, το H_2O_2 αν και γενικά είναι ένα αδύναμο οξειδωτικό, μπορεί να οξειδώνει άμεσα ομάδες θειόλης στο ενεργό κέντρο ενζύμων όπως η αφυδρογονάση της 3-φωσφο-γλυκεριναλδεΰδης. Μπορεί επίσης να αντιδρά με συγκεκριμένες πρωτεΐνες που περιέχουν αίμη (πχ μυοσφαιρίνη και κυτόχρωμα c), με αποτέλεσμα την απελευθέρωση Fe ή/και το σχηματισμό αιμοσιδηρίνης μαζί με ρίζες αμινοξέων, οι οποίες μπορούν να διαδώσουν τις αντιδράσεις οξείδωσης. Επιπλέον, προ-οξειδωτικά μόρια τα οποία δεν είναι ρίζες όπως το HOCl, φαίνεται να οξειδώνουν κυρίως πρωτεϊνικούς στόχους. Τα κατάλοιπα λυσίνης, κυστεΐνης και μεθειονίνης είναι οι προτιμότεροι στόχοι, ενώ ακολουθούν τα κατάλοιπα τυροσίνης, τρυπτοφάνης και φαινυλαλανίνης[46].



Σχήμα 2.5: Αιτίες δημιουργίας και συνέπειες του οξειδωτικού στρες

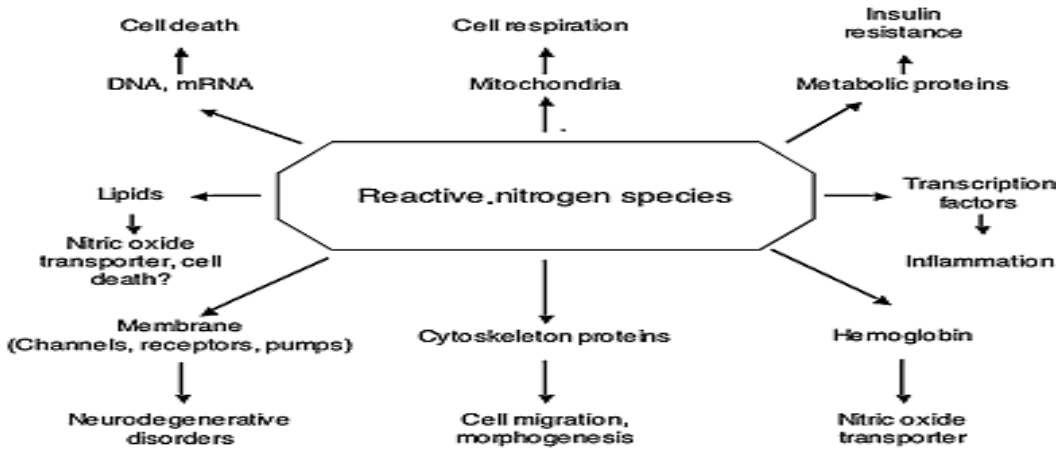
Σχετικά με τις βιολογικές δράσεις των RNS στα βιολογικά συστήματα, έχει αποδειχθεί ότι και αυτές επάγουν αντιδράσεις που σχετίζονται με την καταστροφή βιολογικών δομών, μεταξύ των οποίων σημαντικότερες είναι η S-νιτροσυλίωση ομάδων θειόλης ή μετάλλων, η γλουταθειονυλίωση σουλφυδρυλικών (-SH) καταλοίπων κυστεΐνης στις πρωτεΐνες και η νίτρωση καταλοίπων τυροσίνης[49]. Από αυτές τις διαδικασίες, η πιο συχνή φαίνεται να είναι η νίτρωση καταλοίπων τυροσίνης, διαδικασία η οποία επηρεάζει τη λειτουργία και τη δομή πρωτεϊνών και αλλάζει το ρυθμό πρωτεολυτικής διάσπασης. Συχνά μάλιστα οδηγεί και σε πλήρη απώλεια της πρωτεϊνικής δραστικότητας και λειτουργικότητας[60].

Το νιτρωσικό στρες που προκαλείται από τα μόρια αυτά επιδρά κυρίως στην αγγειακή λειτουργία. Συγκεκριμένα, καταστρέφει την eNOS και τη συνθάση της PGI_2,

διαταράσσοντας με αυτό τον τρόπο την αγγειοδιαστολή και την ικανότητα του ενδοθηλίου να συνθέτει τα μόρια αυτά[47].

Ένα από τα κυριότερα βιολογικά μόρια-στόχους των RNS είναι το DNA. Η καταστροφή του DNA που επάγεται από RNS πιθανόν να συμβάλλει σε αυξημένους ρυθμούς μεταλλάξεων, απόπτωση, κυτταρικό πολλαπλασιασμό και αστάθεια του γονιδιώματος, διαδικασίες δηλαδή οι οποίες μπορούν να οδηγήσουν σε καρκινογένεση[49]. Εκτός από το DNA, οι RNS μπορούν επίσης να αντιδρούν με λιποειδή, RNA και πρωτεΐνες[61]. Ως προς τα λιποειδή, επιστημονικά δεδομένα προτείνουν ότι οι RNS σχετίζονται κυρίως με τη ρύθμιση του μεταβολισμού των σφιγγολιποειδών μέσω της ρύθμισης ενζύμων όπως η σφιγγομυελινάση και η κηραμιδάση, τα οποία είναι υπεύθυνα για το μεταβολισμό των τελευταίων. Από την άλλη, ένας μεγάλος αριθμός πρωτεϊνών αποτελούν κυτταρικούς στόχους των RNS. Κανάλια ιόντων, πρωτεΐνες του κυτταροσκελετού, μεταλλοπρωτεΐνες της ECM, πρωτεΐνες του πλάσματος όπως η αλβουμίνη και πρωτεΐνες που συμμετέχουν στον κυτταρικό μεταβολισμό/πολλαπλασιασμό/θάνατο, αποτελούν από τους βασικότερους πρωτεϊνικούς στόχους.

Συνολικά, προτείνεται ότι οι αντιδράσεις που σχετίζονται με RNS είναι πιο περίπλοκες από εκείνες που σχετίζονται με ROS[49].



Σχήμα 2.6: Βιολογικές δράσεις των RNS

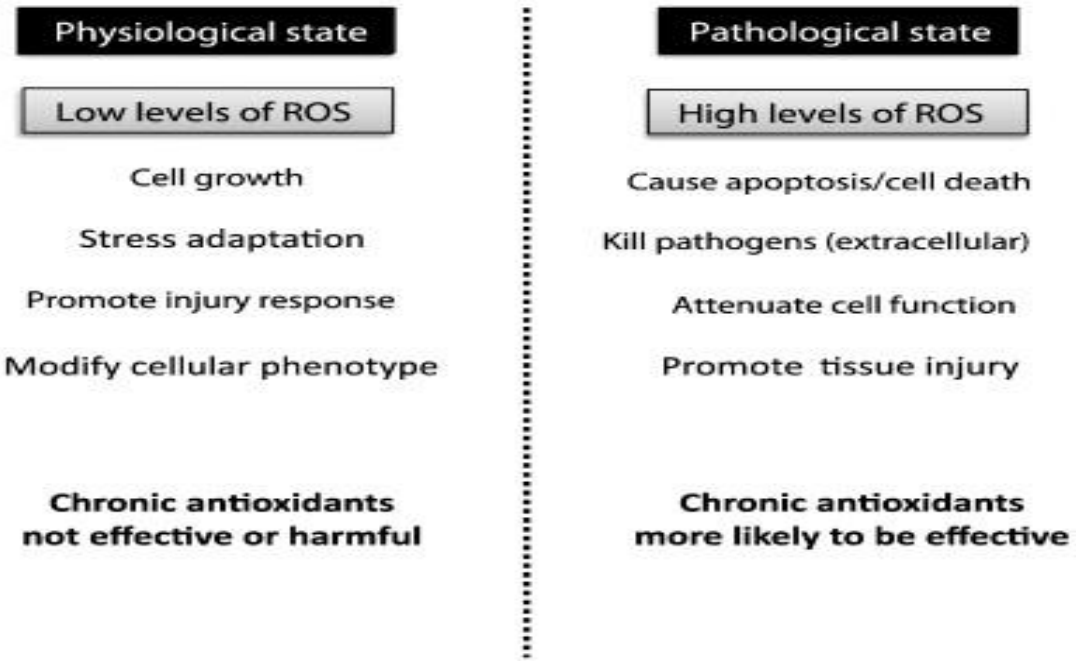
Παρά τις καταστροφικές επιδράσεις των RONS στα βιολογικά συστήματα, η επιστημονική έρευνα έχει αποκαλύψει ότι η παραγωγή τους είναι μια φυσιολογική διαδικασία, ιδιαίτερα σημαντική για τη σωστή λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος και για το

συντονισμό και την ενεργοποίηση πολυάριθμων μονοπατιών μεταγωγής σήματος. Ειδικότερα, ο σχηματισμός ROS είναι αποτέλεσμα του φυσιολογικού αερόβιου μεταβολισμού των βιολογικών συστημάτων και απαραίτητη διαδικασία για τη διατήρηση της ομοιόστασης του οξυγόνου των ιστών, που επιτυγχάνεται μέσω μιας σειράς αντιδράσεων οξειδοαναγωγής[44,45]

Έχει επίσης αποδειχθεί ότι οι ROS έχουν σημαντικό ρόλο στη σωστή λειτουργία τόσο της εγγενούς όσο και της επίκτητης ανοσολογικής απάντησης. Συγκεκριμένα, η παραγωγή ROS από τα φαγοκύτταρα αποτελεί κρίσιμο γεγονός της εκκίνησης της διαδικασίας της μικροβιακής φαγοκυττάρωσης και της επακόλουθης καταστροφής αυτών των μικροβίων. Η ακριβής ρύθμιση της παραγωγής και της δραστηριότητας των ROS αποτελεί διαδικασία-κλειδί στη μείωση της ανοσολογικής απάντησης. Η αποτυχία μείωσης αυτής της δραστηριότητας είναι που οδηγεί τελικά σε παρατεταμένη φλεγμονή και στις περαιτέρω επιπλοκές της αθηροσκλήρωσης και των άλλων φλεγμονωδών νόσων.

Εκτός όμως από τη συμμετοχή των ελεύθερων ριζών στην αντιμικροβιακή άμυνα, η παραγωγή τους σχετίζεται επιπλέον με πολλαπλά μονοπάτια ενδοκυτταρικής σηματοδότησης. Συγκεκριμένα, η οξειδοαναγωγική σηματοδότηση στην οποία συμμετέχουν ενεργά, θεωρείται ως φυσιολογική βιολογική απόκριση του οργανισμού, που οδηγεί σε σημαντικές κυτταρικές λειτουργίες[44]. Πολυάριθμες δραστικές αποκρίσεις που προέρχονται από την οξειδοαναγωγική σηματοδότηση, περιλαμβάνουν κυτταρική διαφοροποίηση, πολλαπλασιασμό, μετανάστευση, απόπτωση και έκφραση αντιοξειδωτικών γονιδίων[47].

Τελικά, όταν οι RONS βρίσκονται στο κατάλληλο μέρος και στις κατάλληλες συγκεντρώσεις, λειτουργούν ως δευτερογενείς αγγελιαφόροι, ενεργοποιώντας πολλαπλά μονοπάτια μεταγωγής σήματος μέσα στο κύτταρο[30,47,54]. Με αυτό τον τρόπο διευκολύνουν τη δράση αυξητικών παραγόντων όπως ο PDGF[30,47], κυτταροκινών και του Ca^{+2} μέσω κοινών ή διαφορετικών οδών[47].



Σχήμα 2.7: Αντιπαραβολή των βιολογικών δράσεων των ROS όταν βρίσκονται σε υψηλές και χαμηλές συγκεντρώσεις αντίστοιχα

2.3 Αμυντικά συστήματα του οργανισμού

Οι οξειδωτικές τροποποιήσεις στο αρτηριακό τοίχωμα, οι οποίες συμβάλλουν στην αθηρογένεση, συντελούνται όπως έχει ήδη διευκρινιστεί όταν η ισορροπία μεταξύ προ-οξειδωτικών και αντιοξειδωτικών μετατοπίζεται προς την πλευρά των πρώτων[2,51]. Παρόλα αυτά, σε καταστάσεις οξειδωτικού στρες ο ανθρώπινος οργανισμός έχει την ικανότητα να συνθέτει και να συσσωρεύει εξειδικευμένα μόρια τα οποία είναι ιδιαίτερα αποτελεσματικά στην καταπολέμηση των προ-οξειδωτικών παραγόντων. Τα μόρια αυτά είναι τα αντιοξειδωτικά τα οποία μπορούν να αντιδράσουν και να εξολοθρεύσουν τις ROS πριν αυτές προλάβουν να προκαλέσουν οξειδωτική καταστροφή σε σημαντικά βιολογικά μόρια[43].

Ως αντιοξειδωτικό ορίζεται οποιοδήποτε μόριο είναι αποτελεσματικό στο να καθυστερεί ή να εμποδίζει σε σημαντικό βαθμό την οξείδωση διάφορων υποστρωμάτων (πχ πρωτεΐνες, λιποειδή κλπ)[2]. Για να θεωρηθεί μία ένωση ως αποτελεσματικό αντιοξειδωτικό θα πρέπει να ασκεί την προστατευτική της δράση ενώ βρίσκεται σε πολύ μικρότερη συγκέντρωση από το υπόστρωμα το οποίο προστατεύει[46]. Συνολικά, τα αντιοξειδωτικά μέσα στα κύτταρα, στις κυτταρικές μεμβράνες και στα εξωκυττάρια υγρά κινητοποιούνται προκειμένου να εξουδετερώσουν τον υπερβολικό σχηματισμό ROS. Στο πλαίσιο της διατήρησης της οξειδοαναγωγικής ισορροπίας έναντι οξειδωτικών καταστάσεων (πχ κάπνισμα, χρόνια

φλεγμονή), το αίμα έχει κεντρικό ρόλο καθώς μεταφέρει και ανακατανέμει τα αντιοξειδωτικά στα διάφορα σωματικά διαμερίσματα[42].

Μερικοί από τους μηχανισμούς μέσω των οποίων δρουν τα αντιοξειδωτικά περιλαμβάνουν: την απομάκρυνση του O_2, την απομάκρυνση καταλυτικών ιόντων μετάλλων, την εκκαθάριση ROS όπως η $O_2^{\cdot -}$ και το H_2O_2, την εκκαθάριση ελεύθερων ριζών που λειτουργούν ως μόρια εκκινητές αλυσιδωτών αντιδράσεων οξείδωσης όπως οι $HO^{\cdot}$, $RO^{\cdot}$ και $RO_2^{\cdot}$, την εξουδετέρωση ή την εκκαθάριση του ^1O, την ενίσχυση των ενδογενών αντιοξειδωτικών αμυνών μέσω της αύξησης της έκφρασης γονιδίων που κωδικοποιούν αντιοξειδωτικά ένζυμα καθώς και την επιδιόρθωση της οξειδωτικής καταστροφής που προκαλείται από ROS. Τα πιο αποτελεσματικά είναι εκείνα που ασκούν μία ή παραπάνω από αυτές τις δράσεις χωρίς να παράγουν τοξικά ή δραστικά τελικά προϊόντα[41].

Τα αντιοξειδωτικά διακρίνονται σε ενζυμικά και μη ενζυμικά, ενώ τα μη ενζυμικά με τη σειρά τους διακρίνονται σε ενδογενή και εξωγενή[45,59].

2.3.1 Ενζυμικά συστήματα

Πολλά ένζυμα εμπλέκονται στην αντιοξειδωτική προστασία έναντι των ROS οι οποίες παράγονται στο πλαίσιο των βιολογικών διεργασιών. Τα ένζυμα αυτά είναι απαραίτητα για τη διατήρηση της οξειδοαναγωγικής ισορροπίας σε καταστάσεις αυξημένου οξειδωτικού στρες και συνολικά καλούνται ενδογενή αντιοξειδωτικά ένζυμα[59]. Περιλαμβάνουν την SOD (υπεροξειδική δισμουτάση), την GPx (υπεροξειδάση γλουταθειόνης), την CAT (καταλάση), την GR (αναγωγάση γλουταθειόνης), τις GST (S-τρανσφεράσες γλουταθειόνης), τις Prxs (υπεροξυρεδοξίνες) και τις PDIs (πρωτεϊνικές δισουλφιδικές ισομεράσες)[2,30]. Τα περισσότερα από αυτά βρίσκονται στις αρτηρίες, πιθανότερα μέσα στα κύτταρα του αγγειακού τοιχώματος καθώς το εξωκυττάριο υγρό στερείται κατά κύριο λόγο ενζυμικών αντιοξειδωτικών[46].

- **SOD**

Οι SOD αποτελούν ένα βασικό κυτταρικό αμυντικό σύστημα έναντι της $O_2^{\cdot -}$ σε όλα τα αγγειακά κύτταρα[2]. Θεωρείται μάλιστα ότι αυτά τα ένζυμα είναι μεταξύ των κυριότερων ενδογενών αντιοξειδωτικών ενζύμων που προστατεύουν τα κύτταρα από τις ROS[59]. Είναι μεταλλοένζυμα (περιέχουν δηλαδή κάποιο οξειδοαναγωγικό μέταλλο στο ενεργό τους κέντρο)[2,49] και καταλύουν την αυτο-οξειδοαναγωγή της $O_2^{\cdot -}$ σε O_2 και H_2O_2 σύμφωνα με την παρακάτω αντίδραση:

$O_2^{\cdot -} + O_2^{\cdot -} + 2H^+ \longrightarrow H_2O_2 + O_2$[46,59]

Στα θηλαστικά κύτταρα έχουν αναγνωριστεί τρεις διαφορετικές μορφές SOD· η Cu,Zn-SOD (SOD1), η Mn-SOD (SOD2) και η εξωκυτταρική (EC)-SOD (SOD3)[2,51]. Η SOD1 περιέχει Cu και Zn ως καταλυτικά μέταλλα ενώ η SOD2 περιέχει Mn[59]. Η πρώτη βρίσκεται κυρίως σε κυτοσολικά και λυσοσωμικά τμήματα αλλά και στον μιτοχονδριακό διαμεμβρανικό χώρο[46,51] ενώ η δεύτερη βρίσκεται κυρίως στη μιτοχονδριακή μήτρα[51,59]. Η SOD2 είναι υπεύθυνη για τη μετατροπή της $O_2^{\cdot -}$ που παράγεται από ένζυμα όπως οι Nox και η OX, σε H_2O_2[42]. Επιπλέον, αυτή η ισομορφή του ενζύμου ρυθμίζει τη φυσιολογική παραγωγή H_2O_2 που προέρχεται από την ενδομιτοχονδριακή $O_2^{\cdot -}$ κατά την αναπνευστική αλυσίδα. Με άλλα λόγια μετατρέπει την ενδομιτοχονδριακή $O_2^{\cdot -}$ σε H_2O_2[47].

Τέλος, η EC-SOD όπως υποδηλώνει και το όνομά της, συναντάται στον εξωκυττάριο χώρο αποτελώντας την εξαίρεση μεταξύ των αντιοξειδωτικών ενζύμων που ναι μεν βρίσκονται στο αρτηριακό τοίχωμα αλλά έξω από τα κύτταρα. Βρίσκεται κυρίως συνδεδεμένη σε πρωτεογλυκάνες του γλυκοκάλυκα διάφορων κυττάρων, μεταξύ των οποίων και τα EC, και στην ECM του συνδετικού ιστού. Στην ανθρώπινη αορτή το ένζυμο εντοπίζεται κυρίως στην ECM του συνδετικού ιστού και παράγεται βασικά από τα SMC. Η σύνθεση της EC-SOD από τα SMC τροποποιείται από κυτταροκίνες, αυξητικούς παράγοντες, αγγειοδραστικές ουσίες και προ-οξειδωτικά μόρια προτείνοντας ότι τέτοιες μεταβολές ρύθμισης του ενζύμου πιθανόν να σχετίζονται με αγγειακές νόσους, όπως η αθηροσκλήρωση[46]. Αυτή η ισομορφή του ενζύμου πιστεύεται ότι συνεισφέρει στην αντιοξειδωτική άμυνα εναντίον της $O_2^{\cdot -}$ στον εξωκυττάριο χώρο[51].

- **GPx**

Οι GPx αποτελούν ακόμα ένα πολύ σημαντικό ενδογενές αντιοξειδωτικό του ανθρώπινου οργανισμού. Μάλιστα, το συγκεκριμένο ενδογενές αμυντικό σύστημα θεωρείται η βασική αντιοξειδωτική άμυνα σε χαμηλά επίπεδα οξειδωτικού στρες[2,49]. Οι GPx αντιπροσωπεύουν μία οικογένεια τεσσάρων τουλάχιστον διαφορετικών ισομορφών ενζύμων. Πρόκειται για τετραμερή ένζυμα τα οποία περιέχουν Se (σελήνιο) και επομένως επαρκή επίπεδα αυτού του μετάλλου είναι απαραίτητα προκειμένου να δράσουν[46].

Η βασική αντιοξειδωτική προστασία αυτής της οικογένειας ενζύμων είναι η απομάκρυνση του H_2O_2 που προέρχεται από την αυτοοξειδοαναγωγή της $O_2^{\cdot -}$ (αντίδραση SOD) ή από ενζυμικές πηγές όπως η OX[42,46,59]. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιούν H_2O_2 ως μόριο οξείδωσης άλλων υποστρωμάτων και συγκεκριμένα της GSH (γλουταθειόνης). Ειδικότερα, οι

GPx χρησιμοποιούν ανηγμένη GSH ως δότη H^+ για να ανάγουν το H_2O_2 σε H_2O παράγοντας ταυτόχρονα GSSG (δισουλφιδική γλουταθειόνη) σύμφωνα με την παρακάτω αντίδραση:

$$GSH + H_2O_2 \longrightarrow GSSG + 2H_2O$$ [46,52]

Οι GPx ως προς την παραπάνω αντίδραση δρουν σε συνδυασμό με την GR, η οποία ανακυκλώνει την GSSG σε ανηγμένη GSH χρησιμοποιώντας ως συμπαράγοντα (δότη ηλεκτρονίων) το NAD(P)H που προέρχεται από τον κύκλο των φωσφοπεντοζών. Η αντίδραση που λαμβάνει χώρα είναι η εξής:

$$GSSG + NAD(P)H + H^+ \longrightarrow 2GSH + NAD(P)^+$$

Τα δύο αυτά ένζυμα, είναι ευρέως κατανεμημένα στους ζωικούς ιστούς και βρίσκονται κυρίως στο κυτταρόπλασμα, στα μιτοχόνδρια και στον πυρήνα[52].

Εκτός όμως από την GR, οι GPx συνεργάζονται και με την CAT για την απομάκρυνση και αποσύνθεση του H_2O_2 in vivo. Η συνεργιστική δράση των δύο αυτών ενζύμων στοχεύει εκτός από το H_2O_2 και άλλα υπεροξείδια[46]. Πιο συγκεκριμένα, καταλύουν την GSH-εξαρτώμενη αναγωγή LOOH στην αντίστοιχη αλκοόλη (LOH) σύμφωνα με την παρακάτω αντίδραση:

$$LOOH + 2GSH \longrightarrow LOH + 2H_2O + GSSG$$ [2]

Έτσι, η κλασική μορφή του ενζύμου δρα τόσο στο H_2O_2 όσο και στα ROOH των λιπαρών οξέων και της χοληστερόλης αλλά όχι στα εστεροποιημένα λιποειδή των λιποπρωτεϊνών. Από την άλλη, η ισομορφή της GPx που δρα σε LOOH των PLP (PHGPx) συνεντοπίζεται με την SOD3, αποτελώντας τα μόνο γνωστά αντιοξειδωτικά ένζυμα τα οποία ανάγουν LOOH στις λιποπρωτεΐνες. Η PHGPx (υπεροξειδάση της γλουταθειόνης υδροϋπεροξειδίων φωσφολιποειδών) μπορεί να χρησιμοποιήσει έναν αριθμό διαφορετικών χαμηλού μοριακού βάρους ομάδων θειόλης ως αναγωγικούς παράγοντες. Το ένζυμο βρίσκεται προσδεδεμένο στην πλασματική μεμβράνη ενώ δεν υπάρχει καθόλου σε εξωκυττάρια υγρά. Η ισομορφή της GPx η οποία συναντάται στα κύτταρα του γαστρεντερικού σωλήνα είναι πιο πιθανόν να εμπλέκεται στην αποτοξίνωση των διαιτητικών $ROO^{\cdot}$. Τέλος, το ανθρώπινο πλάσμα περιέχει μικρές συγκεντρώσεις γλυκοζυλιωμένης GPx η οποία είναι γνωστή και ως EC-GPx (εξωκυταρρική υπεροξειδάση της γλουταθειόνης)[46].

- **CAT**

Η CAT είναι ένα ενδοκυττάριο τετραμερές αντιοξειδωτικό ένζυμο το οποίο περιέχει αίμη[59]. Εντοπίζεται κυρίως στα υπεροξυσώματα των κυττάρων, όπου εδρεύουν πολλά από τα ένζυμα που παράγουν H_2O_2, και σε κάποιο βαθμό και στο κυτοσόλιο[2]. Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, το ένζυμο αυτό συνεργιστικά με τις GPx μεταβολίζει το H_2O_2 που

προέρχεται από την αυτοοξειδοαναγωγή της $O_2^{\cdot -}$ ή/και από ενζυμικές πηγές όπως η OX[52]. Η διαφορά μεταξύ των δύο ενζύμων είναι ότι η CAT δεν απομακρύνει το H_2O_2 όπως οι GPx, αλλά το διασπά απευθείας σε H_2O και O_2 σύμφωνα με την αντίδραση:

$2H_2O_2 \longrightarrow 2H_2O + O_2$[46]

Με αυτό τον τρόπο το εξουδετερώνει πριν προλάβει να διαχυθεί σε άλλα μέρη του κυττάρου. Έχει μάλιστα προταθεί ότι η CAT πιθανόν να εξυπηρετεί αποκλειστικά στη ρύθμιση της ομοιόστασης του H_2O_2 των κυττάρων[59].

Η CAT είναι αποτελεσματική σε υψηλά επίπεδα οξειδωτικού στρες και ιδιαίτερα σημαντική στην περίπτωση περιορισμένου κυτταρικού περιεχομένου σε GSH ή σε περίπτωση μειωμένης δραστικότητας των GPx[2]. Μια ιδιότητα που κάνει την CAT ένα από τα σημαντικότερα αντιοξειδωτικά ένζυμα στην εξουδετέρωση του H_2O_2, είναι ότι ασκεί τη δράση της χωρίς να καταναλώνει κυτταρικά αναγωγικά ισοδύναμα[59].

- **Prxs**

Οι Prxs αποτελούν μία οικογένεια διαφορετικών αντιοξειδωτικών ενζύμων τα οποία εντοπίζονται στο κυτοσόλιο, στα μιτοχόνδρια, στα υπεροξυσώματα, στις πλασματικές μεμβράνες των κυττάρων και στο πλάσμα. Υπάρχουν αυξανόμενα επιστημονικά στοιχεία ότι τα ένζυμα αυτά παίζουν σημαντικό ρόλο ως in vivo αντιοξειδωτικά. Τυπικά παρουσιάζουν δραστικότητα υπεροξειδάσης και η δράση τους εξαρτάται από την ανηγμένη μορφή της οξειδοαναγωγικής πρωτεΐνης Trx (θειορεδοξίνη) και της GSH. Εκτός από το ρόλο τους ως υπεροξειδάσες, συγκεκριμένα μέλη της οικογένειας των Prxs, συσχετίζονται και με άλλες βιολογικές διαδικασίες όπως ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός, η κυτταρική διαφοροποίηση και η γονιδιακή έκφραση[2].

- **PDIs**

Ο λόγος GSH/GSSG ρυθμίζει τη δράση συγκεκριμένων ενζύμων τα οποία είναι απαραίτητα για την ορθή αναδίπλωση των πρωτεϊνών κατά τη διάρκεια της σύνθεσής τους. Τα ένζυμα αυτά είναι οι PDIs. Βρίσκονται κυρίως στις επιφάνειες των κυττάρων και έχει υποστηριχθεί ότι από αυτή τη θέση συμμετέχουν στον έλεγχο της οξειδοαναγωγικής κατάστασης των ομάδων θειόλης των πρωτεϊνών και των δραστικών –S-S-- (δισουλφιδικών) δεσμών. Έχει επίσης προταθεί ότι συμμετέχουν και σε αντιδράσεις νίτρωσης (πχ μεταφέροντας $NO^{\cdot}$ από το ένα μόριο στο άλλο).

Δύο από τα σημαντικότερα μέλη αυτής της κατηγορίας αντιοξειδωτικών ενζύμων είναι η TrxR (αναγωγάση θειορεδοξίνης) και οι GLRXs (γλουταρεδοξίνες). Η πρώτη εμπλέκεται στην αναγωγή της Trx ενώ για τη δεύτερη δεν έχει βρεθεί μέχρι στιγμής βιολογικό μόριο που να εμπλέκεται στην ανακύκλωση της ανηγμένης της μορφής. Αντιθέτως, ανάγεται εμμέσως μέσω της οξείδωσης της GSH.

Οι PDIs οι οποίες ανήκουν ουσιαστικά στην ευρύτερη κατηγορία των οξειδοαναγωγασών, δρουν ως τρανσφεράσες θειολικών ομάδων σε πρωτεΐνες. Επιπλέον, συμμετέχουν στη συνολική αντιοξειδωτική άμυνα του οργανισμού με ποικίλους τρόπους και πιθανόν να διαδραματίζουν και βασικό ρόλο στην οξειδοαναγωγική σηματοδότηση. Για παράδειγμα οι GLRXs και η TrxR συμμετέχουν στη διατήρηση της ανηγμένης μορφής του ασκορβικού οξέος στο κύτταρο και επιπλέον έχουν την ικανότητα να ανάγουν LOOH[46]. Παρόλα αυτά είναι άγνωστο ακόμα το εάν μπορούν να μεσολαβήσουν την αναγωγή LOOH στις λιποπρωτεΐνες[2].

Τέλος, οι πλασματικές μεμβράνες των κυττάρων περιέχουν ένα οξειδοαναγωγικό σύστημα γνωστό ως PMRS (οξειδοαναγωγικό σύστημα πλασματικής μεμβράνης), το οποίο αποτελείται από μία ομάδα πολυάριθμων οξειδοαναγωγικών ενζύμων. Αυτό το σύστημα μεταφέρει ηλεκτρόνια από ενδοκυττάριους δότες όπως το NAD(P)H ή/και το ασκορβικό οξύ, σε εξωκυττάριους αποδέκτες. Μερικές από τις προτεινόμενες λειτουργίες του PMRS είναι: η διατήρηση της οξειδοαναγωγικής κατάστασης των σουλφυδρυλικών καταλοίπων στις διαμεμβρανικές πρωτεΐνες, η εξουδετέρωση προ-οξειδωτικών μορίων έξω από τα κύτταρα, η ανακύκλωση της α-TOH, η αναγωγή των LOOH, η διατήρηση της εξωκυττάριας συγκέντρωσης του ασκορβικού οξέος και η αναγωγή του Fe^{+3} [59].

2.3.2 Μη ενζυμικά αντιοξειδωτικά

Εκτός από τα ενδογενή ενζυμικά αντιοξειδωτικά ο ανθρώπινος οργανισμός συνθέτει και μη ενζυμικά αντιοξειδωτικά. Πρόκειται για συστατικά του πλάσματος τα οποία δρουν είτε εκκαθαρίζοντας ROS, είτε απομακρύνοντας δραστικά μεταλλικά ιόντα (Fe^{+3} και Cu^{+2}) τα οποία θα μπορούσαν να ενισχύσουν αντιδράσεις οξείδωσης[42]. Μεταξύ των πιο γνωστών μη ενζυμικών ενδογενών αντιοξειδωτικών είναι το ουρικό οξύ, η χολερυθρίνη, η GSH και πρωτεΐνες του πλάσματος, όπως η αλβουμίνη[30,59], η σερουλοπλασμίνη και η λακτοφερρίνη[41].

Παρόλα αυτά, η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα του βιολογικού συστήματος του ανθρώπου διαμορφώνεται και από εξωγενή αντιοξειδωτικά τα οποία καταναλώνονται μέσω της δίαιτας και κυρίως μέσα από την κατανάλωση φρούτων και λαχανικών[45]. Σε αυτά ανήκουν η βιταμίνη C (ασκορβικό οξύ), η βιταμίνη E (α-TOH), η βιταμίνη A (ρετινόλη), τα καροτενοειδή (προβιταμίνη A), οι ουβικινόνες (Co-Q10) και μια ποικιλία φαινολικών ενώσεων[45,46,51].

Η περιγραφή των εξωγενών αντιοξειδωτικών δεν ανήκει στους σκοπούς αυτού του κεφαλαίου και επομένως δε θα πραγματοποιηθεί περαιτέρω ανάλυση των ιδιοτήτων και επιδράσεών τους.

➢ <u>Ενδογενή αντιοξειδωτικά</u>

- **GSH**

Η GSH είναι μία σημαντική ενδοκυτταρική, μη πρωτεϊνική θειολική ένωση και έχει αναγνωριστεί ως το σημαντικότερο ενδοκυττάριο υδρόφιλο αντιοξειδωτικό. Σε οξειδωτικό περιβάλλον, η ανηγμένη GSH οξειδώνεται αντιστρεπτά σε GSSG[59]. Εμφανίζει ποικιλία βιολογικών λειτουργιών, μεταξύ των οποίων ο μεταβολισμός θρεπτικών συστατικών, η ρύθμιση κυτταρικών δράσεων όπως (πχ γονιδιακή έκφραση, σύνθεση DNA και πρωτεϊνών), ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός και η απόπτωση, η μεσολάβηση οδών μεταγωγής σήματος, η παραγωγή κυτταροκινών και η ανοσολογική απόκριση. Επιπλέον, συμμετέχει στη διατήρηση των ομάδων θειόλης των διαμεμβρανικών πρωτεϊνών στην ανηγμένη τους μορφή, η οξείδωση των οποίων μπορεί να τροποποιήσει την κυτταρική δομή και λειτουργία[2,59]. Όλες αυτές οι βιολογικές δράσεις της GSH εμφανίζονται υπό την προϋπόθεση ότι αυτή βρίσκεται στην ανηγμένη της μορφή. Έτσι, σε ένα γενικό πλαίσιο μπορούμε να πούμε ότι η ανηγμένη GSH παίζει βασικό ρόλο στη ρύθμιση της ενδοκυττάριας οξειδοαναγωγικής κατάστασης όλων των κυττάρων, συμπεριλαμβανομένων των αγγειακών κυττάρων[2].

Το σημαντικότερο όφελος της GSH ως μόριο που συμμετέχει στη ρύθμιση της ενδοκυττάριας οξειδοαναγωγικής κατάστασης, έγκειται στην προστασία των κυττάρων από τις ROS[2]. Συγκεκριμένα, λειτουργεί ως εκκαθαριστής ROS όπως η $HO^{\cdot}$, ενώ παράλληλα συμμετέχει και στην αποκατάσταση οξειδωτικών βλαβών που έχουν προκληθεί από αυτές[52]. Έχει προταθεί μάλιστα ότι η ανοχή πολλών κυττάρων στο οξειδωτικό στρες συνδέεται με υψηλά ενδοκυτταρικά επίπεδα GSH[2]. Επιπλέον, αποτελεί υπόστρωμα ή/και συμπαράγοντα αντιοξειδωτικών ενζύμων όπως η GPx και η GST[52].

- **Ουρικό οξύ**

Το ουρικό οξύ παράγεται ως τελικό προϊόν του μεταβολισμού των πουρινών στους ανθρώπους[62]. Ενώ στα περισσότερα είδη μεταβολίζεται αποτελεσματικά από την ουρικάση, οι άνθρωποι δε διαθέτουν το ένζυμο αυτό με αποτέλεσμα το ουρικό οξύ να συσσωρεύεται σε υψηλές συγκεντρώσεις στο αίμα. Παρόλα αυτά, μέσα στα κύτταρα βρίσκεται σε πολύ χαμηλότερες συγκεντρώσεις. Μπορεί να εκκαθαρίσει απευθείας ROS όπως το ^1O, τη $RO_2^{\cdot}$ και τη $HO^{\cdot}$ καθώς και τα CO_3^{-2} και NO_2^- που προέρχονται από το $ONOO^-$. Το ουρικό οξύ δεσμεύει επίσης ιόντα μετάλλων τα οποία σχετίζονται με την υπεροξείδωση λιποειδών της LDL στο αγγειακό τοίχωμα[46].

- **Χολερυθρίνη**

Η χολερυθρίνη αποτελεί το τελικό προϊόν διάσπασης της αίμης στους ανθρώπους. Είναι ένας ισχυρά αναγωγικός παράγοντας και θεωρείται ως ένα από τα ενδογενή αντιοξειδωτικά του ανθρώπινου οργανισμού. Στα εξωκυττάρια υγρά κατά το μεγαλύτερο μέρος της είναι δεσμευμένη στην αλβουμίνη. Τόσο η ελεύθερη όσο και η συζευγμένη όπως λέγεται χολερυθρίνη, έχουν την ικανότητα να ανάγουν την α-$TO^{\cdot}$ και να αναστέλλουν την υπεροξείδωση των λιποειδών στις LDL. Η χολερυθρίνη μπορεί επίσης να προστατέψει τις πρωτεΐνες έναντι της οξειδωτικής καταστροφής in vitro και όταν δεσμεύεται στην αλβουμίνη μπορεί να προστατέψει τα κύτταρα από την οξειδωτική καταστροφή. Αν και χαμηλές ενδοκυττάριες συγκεντρώσεις χολερυθρίνης συμβάλλουν στην αντιοξειδωτική προστασία του κυττάρου, υψηλότερες συγκεντρώσεις είναι κυτταροτοξικές[46].

- **Αλβουμίνη**

Η πρόσδεση καταλυτικών μετάλλων τα οποία επάγουν οξειδωτικές αντιδράσεις, όπως οι Fe και Cu, σε πρωτεΐνες του πλάσματος όπως η αλβουμίνη, θεωρείται μέρος της αντιοξειδωτικής άμυνας του οργανισμού. Η αλβουμίνη συγκεκριμένα μεταφέρει το διαιτητικό Cu στο ήπαρ, από όπου μέσω της σερουλοπλασμίνης κατανέμεται σε διάφορους ιστούς. Έχει γενικά προταθεί ότι παίζει ιδιαίτερα σημαντικό ρόλο στην αντιοξειδωτική άμυνα εναντίον ROS που δεν αποτελούν ρίζες, όπως το HOCl.

Εκτός από την αλβουμίνη, πρωτεΐνες του πλάσματος όπως η φερριτίνη, η τρανσφερίνη, η απτοσφαιρίνη και η σερουλοπλασμίνη που εμπλέκονται στην απομάκρυνση και μεταφορά οξειδωτικών μετάλλων, επίσης θεωρούνται μέρος της αντιοξειδωτικής άμυνας του ανθρώπινου οργανισμού[46].

2.4 Δείκτες οξειδωτικού στρες

Καθώς το οξειδωτικό στρες αποτελεί όχι μόνον έναν από τους βασικούς παθοφυσιολογικούς μηχανισμούς της αθηροσκλήρωσης αλλά και βασικό παράγοντα επιδείνωσης των φλεγμονωδών και θρομβωτικών επιπλοκών αυτής, έχει δημιουργηθεί η ανάγκη για ανάπτυξη συγκεκριμένων βιοδεικτών οξειδωτικού στρες οι οποίοι θα παρέχουν πληροφορίες για την εξέλιξη και την πρόγνωση των CVDs στον κλινικό πληθυσμό[55].

Επειδή οι ROS ως εξαιρετικά δραστικά μόρια είναι πολύ δύσκολο να προσδιοριστούν σε οποιοδήποτε βιολογικό δείγμα[42], έχει αναπτυχθεί μια ποικιλία βιοδεικτών και μεθόδων μέτρησης αυτών οι οποίοι παρέχουν στοιχεία για τη δράση των προ-οξειδωτικών και επομένως την εξέλιξη του οξειδωτικού στρες σε ασθενείς με σοβαρές φλεγμονώδεις νόσους, όπως η αθηροσκλήρωση[55].

Οι βιοδείκτες οξειδωτικού στρες χωρίζονται σε άμεσους και έμμεσους. Στους άμεσους δείκτες περιλαμβάνονται ο προσδιορισμός της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας του πλάσματος, μέσω διάφορων δοκιμασιών (πχ ORAC (απορροφητική ικανότητα ριζών οξυγόνου, FRAP (αναγωγική αντιοξειδωτική δύναμη σιδήρου) κα), η μέτρηση μεμονωμένων αντιοξειδωτικών του πλάσματος (πχ ασκορβικό οξύ, καροτενοειδή) και τέλος ο προσδιορισμός ορισμένων ενδογενών αντιοξειδωτικών ενζύμων (CAT, SOD, GPx). Από την άλλη πλευρά, στους έμμεσους βιοδείκτες κατατάσσονται διάφορα μόρια τα οποία ουσιαστικά αποτελούν παράγωγα της οξειδωτικής καταστροφής των λιποειδών, των πρωτεϊνών και του DNA[41].

- <u>Άμεσοι δείκτες οξειδωτικού στρες</u>

Αν και τα τελευταία χρόνια φαίνεται ότι το επίκεντρο της επιστημονικής προσοχής έχει μετατοπιστεί κυρίως στην ανάπτυξη μεθόδων για τον προσδιορισμό έμμεσων βιοδεικτών οξειδωτικού στρες, η μέτρηση άμεσων δεικτών οξειδωτικού στρες αποτελεί εξίσου σημαντικό εργαλείο ως προς την παροχή χρήσιμων πληροφοριών για την αντιοξειδωτική ικανότητα του οργανισμού.

Ξεκινώντας από τα ενδογενή αντιοξειδωτικά ένζυμα, έχει αναφερθεί από πολλές επιστημονικές μελέτες ότι η GPx, η SOD, η CAT και η MPO αποτελούν σημαντικούς άμεσους δείκτες οξειδωτικού στρες[41,59]. Η μέτρησή τους γίνεται συνήθως μέσω φασματοφωτομετρικής ανάλυσης για την οποία είναι διαθέσιμα kit αντιδραστηρίων. Επιπλέον, η ανηγμένη GSH και οι θειολικές ομάδες των κυτταρικών μεμβρανών αποτελούν σημαντικούς δείκτες οξειδωτικού

στρες[59]. Τα επίπεδα τόσο της ανηγμένης όσο και της οξειδωμένης μορφής της GSH μπορούν να μετρηθούν είτε με HPLC, είτε με φασματοφωτομετρική ανάλυση[41]. Υπάρχουν επίσης μελέτες που δείχνουν ότι τα επίπεδα βιοπυρρινών ούρων (οξειδωμένοι μεταβολίτες της χολερυθρίνης), πιθανόν να είναι χρήσιμα στην πρόβλεψη επακόλουθων καρδιαγγειακών επεισοδίων ύστερα από επαναιμάτωση σε ασθενείς με οξύ ΜΙ[55].

Τέλος, η μέτρηση πρωτεϊνών του πλάσματος με αντιοξειδωτικές ιδιότητες όπως η αλβουμίνη, συνεισφέρει στην εκτίμηση καταστάσεων οξειδωτικού στρες. Ο προσδιορισμός τους γίνεται συχνά με μεθόδους HPLC (υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης). Ενζυμικές μέθοδοι, είναι επίσης διαθέσιμες για τις περισσότερες από τις πρωτεΐνες, συμπεριλαμβανομένης της αλβουμίνης, οι οποίες κάνουν την ανάλυση πιο εύκολη[41].

Καθίσταται λοιπόν σαφές ότι καθώς υπό συνθήκες αυξημένου οξειδωτικού στρες στους ανθρώπους, μη ενζυμικά και ενζυμικά ενδογενή αντιοξειδωτικά καταναλώνονται προκειμένου να αντιμετωπίσουν δραστικά προ-οξειδωτικά μόρια, τα περιφερικά τους επίπεδα πιθανόν να μειώνονται με αποτέλεσμα να αποτελούν δυνητικά χρήσιμο εργαλείο για την αποκάλυψη καταστάσεων οξειδωτικού στρες. Παρόλα αυτά, η περιφερική μέτρηση ενός μεμονωμένου ενδογενούς αντιοξειδωτικού, είτε είναι ενζυμικό είτε μη ενζυμικό, από μόνη της δε μπορεί να θεωρηθεί ως έγκυρο εργαλείο για τη διερεύνηση ενός πολύπλευρου βιοχημικού φαινομένου όπως είναι το οξειδωτικό στρες. Επιπλέον, η περιφερική μέτρηση ενός μεμονωμένου αντιοξειδωτικού φαίνεται να είναι αναξιόπιστη δεδομένων και των σύνθετων αλληλεπιδράσεων μεταξύ των διάφορων αντιοξειδωτικών[41,51].

Γιαυτό το λόγο υπάρχουν αρκετές διαθέσιμες δοκιμασίες οι οποίες έχουν σχεδιαστεί για να μετράνε την ολική αντιοξειδωτική κατάσταση, ως δείκτη της ολικής ικανότητας του οργανισμού να αντιμετωπίζει το οξειδωτικό στρες[41]. Από αυτές ο προσδιορισμός της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας του πλάσματος (TAOS/TAS) αποτελεί τη σημαντικότερη και πιο κοινά χρησιμοποιούμενη μέθοδο[42,59]. Φανερώνει ουσιαστικά την καθαρή επίδραση πολλών διαφορετικών αντιοξειδωτικών στα διάφορα βιολογικά συστήματα του οργανισμού καθώς και τις συστηματικές μεταξύ τους αλληλεπιδράσεις.

Τελικά, το ολικό αντιοξειδωτικό προφίλ του πλάσματος, όπως αλλιώς ονομάζεται αυτός ο προσδιορισμός, έχει ευρέως χρησιμοποιηθεί στην κλινική πρακτική για την αξιολόγηση της μείωσης των αντιοξειδωτικών του πλάσματος και της εξέλιξης του οξειδωτικού στρες και έχει φανεί ότι συσχετίζεται καλά και με έμμεσους δείκτες όπως τα F_2-ισοπροστάνια[42].

- Έμμεσοι δείκτες οξειδωτικού στρες

Τα προϊόντα οξείδωσης των λιποειδών, των πρωτεϊνών και του DNA, μπορούν να μετρηθούν με σκοπό τον έλεγχο των επιπέδων οξειδωτικού στρες, παρέχοντας έτσι ένα έμμεσο μέτρο της αντιοξειδωτικής ικανότητας του ανθρώπινου οργανισμού[41].

ΒΙΟΔΕΙΚΤΕΣ ΥΠΕΡΟΞΕΙΔΩΣΗΣ ΛΙΠΟΕΙΔΩΝ

Η οξειδωτική καταστροφή των λιποειδών, διαδικασία γνωστή ως λιποειδική υπεροξείδωση, οδηγεί στο σχηματισμό πολυάριθμων προϊόντων λιποειδικής υπεροξείδωσης μερικά από τα οποία, όπως τα F_2-ισοπροστάνια, η 4-HNE, η MDA και τα LOOH[41] μπορούν να μετρηθούν ως βιοδείκτες οξειδωτικού στρες. Από αυτούς τα F_2-ισοπροστάνια θεωρούνται οι καλύτεροι βιοδείκτες λιποειδικής υπεροξείδωσης[42,62].

- **F_2-ισοπροστάνια**

Τα F_2-ισοπροστάνια παράγονται μέσω μη ενζυμικής υπεροξείδωσης-επαγόμενης από ελεύθερες ρίζες-του AA το οποίο βρίσκεται εστεροποιημένο κυρίως στα PL των μεμβρανών ή στις LDL που κυκλοφορούν ελεύθερες στο πλάσμα[51,55]. Μόλις σχηματιστούν, κυκλοφορούν είτε σε ελεύθερη μορφή στο πλάσμα, είτε παραμένουν εστεροποιημένα στα PL και τελικά εκκρίνονται στα ούρα[42]. Οι ενώσεις αυτές είναι δομικά σταθερές και βρίσκονται σε σχετικά υψηλές συγκεντρώσεις στα διάφορα βιολογικά υγρά, εξού και αποτελούν αξιόπιστους δείκτες οξειδωτικού στρες. Έχει μάλιστα προταθεί ότι τα αυξημένα επίπεδά τους στα ούρα είναι ευαίσθητος και ανεξάρτητος δείκτης κινδύνου CHD. Εκτός όμως από τα βιολογικά υγρά, εντοπίζονται επιπλέον μέσα στα αφρώδη κύτταρα και στις αθηροσκληρωτικές πλάκες[55]. Το πιο υπεράριθμο και επομένως το πιο συχνά προσδιοριζόμενο από αυτά είναι η 8-isoPGF2a (8-ισο-προσταγλανδίνη F_{2a})[51].

Οι πιο κοινές και με υψηλή ακρίβεια μέθοδοι ποσοτικοποίησης F_2-ισοπροστανίων είναι η GC/MS (αέρια χρωματογραφία/φασματοσκοπία μαζών), η HPLC MS/MS και η EIA (αξιολόγηση της επίδρασης του περιβάλλοντος). Η τελευταία, έχει το πλεονέκτημα να ανιχνεύει όλες τις δυνατές ισομορφές των ισοπροστανίων[41,42]. Kit αντιδραστηρίων είναι επίσης διαθέσιμα για τον ποσοτικό προσδιορισμό ισοπροστανίων αλλά η ανάλυση με τη μέθοδο αυτή χάνει την υψηλή ευαισθησία που παρέχει η GC/MS[42].

Ένα από τα βασικά πλεονεκτήματα του προσδιορισμού ισοπροστανίων είναι το γεγονός ότι το διαιτητικό λίπος δεν παρεμβαίνει στη μέτρησή τους. Συνεπώς, η αξιοπιστία των ισοπροστανίων ως δείκτες της λιποειδικής υπεροξείδωσης in vivo, τα καθιστά ένα υπερβολικά χρήσιμο εργαλείο για τον καθορισμό της ισχύος των αντιοξειδωτικών παραγόντων. Επομένως,

δικαιολογημένα έχουν αναδειχθεί ως η πιο αποτελεσματική μέθοδος ποσοτικοποίησης της ικανότητας των αντιοξειδωτικών να αναστέλλουν την υπεροξείδωση των λιποειδών[41].

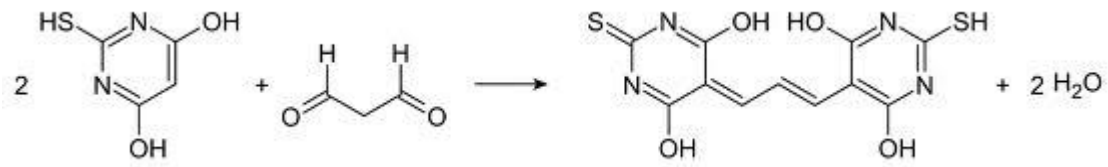
Αν και η μέτρηση των F_2-ισοπροστανών θεωρείται η πρότυπη μέθοδος για τη μέτρηση της in vivo οξειδωτικής καταστροφής λιποειδών παρόλα αυτά σαν μέθοδος είναι δύσκολη τεχνικά και έχει και ορισμένα σημαντικά μειονεκτήματα[42]. Το βασικό μειονέκτημα στη μέτρηση F_2-ισοπροστανίων σε ανθρώπινα δείγματα είναι η πιθανότητα της τεχνητής παραγωγής αυτών, εξαιτίας της αυτο-οξείδωσης του AA, που μπορεί να συμβεί σε περίπτωση μη κατάλληλης διαχείρισης και αποθήκευσης του δείγματος[51]. Επιπλέον, η μέτρηση απαιτεί έναν σχετικά μεγάλο όγκο πλάσματος (0,5-1ml) και είναι μία πολύπλοκη διαδικασία με πολλά βήματα, αυξάνοντας έτσι την πιθανότητα λαθών σε πολλά σημεία[42]. Τέλος, έχει προταθεί ότι η 8-isoPGF_{2a} πιθανόν να παράγεται και ενζυμικά in vitro από τη δράση της COX σε μερικά κύτταρα και ιστούς, γεγονός το οποίο εγείρει ερωτηματικά ως προς την εγκυρότητα των ισοπροστανίων ως βιοδείκτες οξειδωτικού στρες. Παρόλα αυτά, αυτή η ενζυμική παραγωγή δε φαίνεται να συμβαίνει στους ανθρώπους[41].

- **Άλλα παράγωγα AA**

Εκτός από τα ισοπροστάνια, το AA μπορεί να οξειδωθεί επίσης από ένζυμα και ROS σε HETEs (μονοϋδροξυ-εικοσατετραενοϊκά οξέα). Πολλά HETE-ισομερή (5-, 12-, 15- και 20-HETE) έχουν βρεθεί στο πλάσμα, στα ούρα ακόμα και στο σάλιο καπνιστών, υποδεικνύοντας ότι πιθανόν και αυτά να λειτουργούν ως βιοδείκτες οξειδωτικού στρες. Τα περισσότερα θεωρείται ότι συσχετίζονται με φλεγμονώδεις διαταραχές και ότι έχουν αγγειοδραστικές επιδράσεις[62].

- **TBARS/MDA**

Ο πιο συχνά χρησιμοποιούμενος βιοδείκτης της οξειδωτικής καταστροφής των λιποειδών είναι η μέτρηση των TBARS (δραστικές ουσίες του θειοβαρβιτουρικού οξέος)[53,59]. Η MDA, η οποία αποτελεί ένα από τα δευτερογενή προϊόντα υπεροξείδωσης λιποειδών, αντιδρά με την ένωση TBA (θειοβαρβιτουρικό οξύ), σχηματίζοντας ένα χρωμοφόρο σύμπλοκο[42,51]. Αυτό ποσοτικοποιείται είτε με φασματοφωτομερικό (συχνότερα), είτε με φθοριομετρικό προσδιορισμό[42,53]. Η αύξηση της MDA συνδέεται σημαντικά με τη μείωση της αντιοξειδωτικής ικανότητας του πλάσματος[59].



Σχήμα 2.8: Αντίδραση MDA με TBA

Αν και η μέθοδος των TBARS είναι εξαιρετικά εύκολη στην εφαρμογή, διάφοροι προβληματισμοί έχουν προκύψει σχετικά με την ειδικότητα και την εγκυρότητά της[41]. Συγκεκριμένα, η μέθοδος αυτή έχει αποδειχθεί ότι δεν είναι ειδική της υπεροξείδωσης των λιποειδών καθώς η MDA μπορεί να προέλθει και από μόρια μη υπεροξειδικής προέλευσης, όπως από τη διάσπαση των ενδοϋπεροξειδίων[51]. Επιπλέον, εκτός από την MDA πολλές ενώσεις που βρίσκονται στα βιολογικά υγρά μπορούν να αντιδράσουν με TBA, όπως η αιμοσφαιρίνη και η χολοπρασίνη[41]. Επίσης, οι σκληρές συνθήκες της αντίδρασης (επώαση σε 90^0C), είναι δυνατόν να προκαλέσουν την καταστροφή άλλων μορίων στο δείγμα, αυξάνοντας την ποσότητα της MDA που είναι διαθέσιμη για την αντίδραση με TBA[51]. Το περιεχόμενο του ρυθμιστικού διαλύματος καθώς και των άλλων αντιδραστηρίων που χρησιμοποιούνται στη μέθοδο, σε Fe φαίνεται επίσης να επηρεάζει την ικανότητα αντίδρασης MDA με TBA[42]. Τέλος, ο γρήγορος μεταβολισμός της MDA και το γεγονός ότι αυτή αντιπροσωπεύει λιγότερο από το 1% της συνολικής λιποειδικής υπεροξείδωσης, οδηγούν συνήθως σε υπερεκτίμηση της οξειδωτικής καταστροφής από ROS, με αποτέλεσμα η μέθοδος των TBARS να μη συστήνεται ως μοναδικός βιοδείκτης υπεροξείδωσης λιποειδών. Παρόλα αυτά, η MDA μπορεί να μετρηθεί απευθείας με τη χρήση HPLC, αυξάνοντας έτσι την ειδικότητα του ποσοτικού προσδιορισμού[41].

- **4-HNE**

Εκτός από την MDA υπάρχουν και άλλα δευτερογενή προϊόντα υπεροξείδωσης λιποειδών τα οποία χρησιμοποιούνται ως βιοδείκτες οξειδωτικού στρες. Ένα από αυτά είναι η 4-HNE η οποία παράγεται από το AA, το LA (λινελαϊκό οξύ) ή από τα LOOH άλλων FA, σε καταστάσεις υψηλού οξειδωτικού στρες. Μπορεί να μετρηθεί αξιόπιστα μέσω HPLC καθώς και με ELISA (ανοσοενζυμική μέθοδος προσρόφησης). Έχει υποστηριχθεί ότι πιθανόν να ενεργοποιεί τη σύνθεση GSH μέσω της λιγάσης της γ-γλουταμυλοκυστεΐνης, ενισχύοντας έτσι παράλληλα την αντιοξειδωτική άμυνα. Αυτό σημαίνει ότι αυξημένα επίπεδα 4-HNE πιθανόν να αντανακλούν και αυξημένη αντιοξειδωτική προστασία, μέσω αυξημένων επιπέδων GSH[41].

- **LOOH**

Εκτός από δευτερογενή προϊόντα χρησιμοποιούνται και πρωτογενή προϊόντα υπεροξείδωσης λιποειδών ως βιοδείκτες οξειδωτικού στρες και συγκεκριμένα τα LOOH. Μπορούν να ανιχνευθούν στο πλάσμα μέσω HPLC ή μέσω GC-MS. Ευρέως διαθέσιμες χρωματομετρικές μέθοδοι επιτρέπουν μια πιο ευρεία προσέγγιση, ποσοτικοποιώντας όλα τα LOOH στο δείγμα. Η αστάθειά τους μπορεί να κάνει δύσκολη τη μέτρηση καθώς διασπώνται γρήγορα σε αλκένια και αλδεΰδες[41,42].

- **OxLDL**

Τελευταία, έχουν επιπλέον αναπτυχθεί μέθοδοι ποσοτικού προσδιορισμού της OxLDL, παρέχοντας ακόμη έναν χρήσιμο δείκτη της οξειδωτικής καταστροφής των λιποειδών.[42]. Συγκεκριμένα, η μέτρηση αυτοαντισωμάτων που κατευθύνονται εναντίον των OxLDL στο πλάσμα είναι μία πρόσφατα ανεπτυγμένη τεχνική, η οποία παρέχει έναν βιοδείκτη λιποειδικής ή/και πρωτεϊνικής οξείδωσης, ανάλογα με το ποιο από τα συστατικά τηςLDL οξειδώνεται[41,55]. Στο εμπόριο υπάρχουν διαθέσιμα kit αντιδραστηρίων, παρέχοντας μια γρήγορη και απλή μέθοδο για τον ποσοτικό προσδιορισμό αυτών τον αυτοαντισωμάτων[41].

Η μέτρηση θα αποτελούσε ιδιαίτερα χρήσιμο εργαλείο για την εξειδικευμένη εκτίμηση της οξειδωτικής τροποποίησης στο μόριο της LDL αποκλειστικά. Βέβαια στο σώμα, η συνεισφορά της OxLDL στο συνολικό οξειδωτικό προφίλ του πλάσματος δεν είναι ξεκάθαρη καθώς οι LDL αποτελούν ένα μικρό μόνο κλάσμα του ολικού πλάσματος και επομένως η χρήση της ως βιοδείκτης απαιτεί περαιτέρω διερεύνηση[42]. Παρόλα αυτά, πολλές κλινικές μελέτες έχουν αποκαλύψει ότι τα αυξημένα επίπεδα αυτοαντισωμάτων εναντίον των OxLDL συσχετίζονται ισχυρά με την αθηροσκλήρωση και τη CHD. Ορισμένοι μάλιστα έχουν προτείνει τα επίπεδα OxLDL ως αξιόπιστο βιοδείκτη του κινδύνου εκδήλωσης CVD, ανεξαρτήτως της συγκέντρωσης της LDL[55].

ΒΙΟΔΕΙΚΤΕΣ ΠΡΩΤΕΙΝΙΚΗΣ ΟΞΕΙΔΩΣΗΣ

Παρόλο που τα πρωτεολυτικά συστήματα απομακρύνουν αρκετά αποτελεσματικά τις οξειδωμένες πρωτεΐνες, η οξειδωτική καταστροφή των πρωτεϊνών αποτελεί εξαιρετικό δείκτη οξειδωτικού στρες, εξαιτίας του σχετικά μεγάλου χρόνου ημιζωής τέτοιων οξειδωμένων προϊόντων[59]. Η οξείδωση των πρωτεϊνών οδηγεί σε μία ποικιλία διαφοροποιημένων αμινοξέων[59]. Ειδικότερα, οι ROS μπορούν να τροποποιήσουν τις πλευρικές αλυσίδες αμινοξέων, με τα κατάλοιπα λυσίνης, αργινίνης, προλίνης, ιστιδίνης και κυστεΐνης να είναι τα πιο ευάλωτα

σε οξειδωτικές τροποποιήσεις[41,57]. Το αποτέλεσμα αυτών των οξειδωτικών τροποποιήσεων είναι η παραγωγή καρβονυλικών ομάδων (CO) στις πλευρικές αλυσίδες των πρωτεϊνών[57]. Αυτές οι ομάδες, οι οποίες είναι χημικά σταθερές, έχουν αναγνωριστεί ως πρώιμος δείκτης της οξείδωσης πρωτεϊνών και συνεπώς χρησιμοποιούνται ως ποσοτικό μέτρο εκτίμησης της οξειδωτικής τους καταστροφής[59] αλλά και του συνολικού οξειδωτικού στρες στον οργανισμό[50].

Ενώ ορισμένες από τις οξειδωτικές τροποποιήσεις των πρωτεϊνών είναι αναστρέψιμες, η οξείδωση των πλευρικών αλυσίδων των πρωτεϊνών σε καρβονυλικές ομάδες αποτελεί μη αναστρέψιμη διαδικασία και η πρωτεΐνη καταστρέφεται τελείως. Οι καρβονυλικές ομάδες πιθανόν επίσης να εισέρχονται στις πρωτεΐνες μέσω αντιδράσεων με αλδεΰδες (4-HNE, MDA) ή με καρβονυλικά παράγωγα (κετο-αμίνες, κετο-αλδεΰδες, δεοξυοσόνες) που παράγονται ως συνέπεια της αντίδρασης των ανηγμένων σακχάρων ή των προϊόντων οξείδωσης αυτών με κατάλοιπα λυσίνης[59]. Τα καρβονύλια πρωτεϊνών αποτελούν τον πιο συχνά χρησιμοποιούμενο δείκτη πρωτεϊνικής οξείδωσης[57]. Οι συγκεντρώσεις των καρβονυλικών ομάδων, μπορούν άμεσα να μετρηθούν μέσω φασματοσκοπίας ατομικής μάζας, φασματοσκοπίας φθορισμού ή HPLC ακολουθώντας την αντίδραση με 2,4-DNPH (2,4-δινιτροφαίνυλο-υδραζίνη)[41].

Εκτός από τα καρβονύλια πρωτεϊνών, τα BCAA (αμινοξέα διακλαδισμένης αλύσου) και η λιποφουσκίνη αποτελούν επιπρόσθετους δείκτες της οξειδωτικής καταστροφής των πρωτεϊνών. Επιπλέον, διάφορες τεχνικές χρησιμοποιούνται για τη μέτρηση της οξειδωτικής καταστροφής συγκεκριμένων καταλοίπων αμινοξέων στις πρωτεΐνες. Για παράδειγμα, η επίθεση RONS στην τυροσίνη παράγει 3-νιτροτυροσίνη, η οποία μπορεί να μετρηθεί ανοσολογικά, μέσω GC-MS ή μέσω HPLC. Παρόμοια, η επίθεση HOCl στην τυροσίνη παράγει χλωροτυροσίνη η οποία μετράται με ακρίβεια μέσω GC-MS[41].

Τέλος, η δράση των χλωριωμένων οξειδωτικών και κυρίως των χλωραμινών και του HOCl που προέρχονται από την MPO, σχηματίζει συμπλέγματα πρωτεϊνικών παραγώγων που περιέχουν διτυροσίνη, γνωστά ως πρωτεϊνικά AOPPs (πρωτεϊνικά προϊόντα προχωρημένης οξείδωσης), τα οποία επίσης χρησιμοποιούνται ως βιοδείκτες της οξειδωτικής τροποποίησης των πρωτεϊνών. Παρόλα αυτά, η μέτρηση των καρβονυλίων έχει ορισμένα πλεονεκτήματα σε σύγκριση με τη μέτρηση άλλων προϊόντων πρωτεϊνικής οξείδωσης, λόγω του σχετικά πρώιμου σχηματισμού τους και της σχετικής σταθερότητας των καρβονυλιωμένων πρωτεϊνών[59].

ΒΙΟΔΕΙΚΤΕΣ ΟΞΕΙΔΩΣΗΣ ΤΟΥ DNA

Η επίθεση ROS στο DNA οδηγεί στην 8-υδροξυλίωση των βάσεων γουανίνης. Το οξειδωτικό προϊόν που σχηματίζεται (8-OHdG) είναι ο πιο κοινά μελετώμενος βιοδείκτης οξειδωτικής καταστροφής του DNA[41,51,55]. Η 8-OHdG (8-υδροξυ-δεοξυγουανοσίνη) έχει εντοπιστεί σε ούρα ανθρώπων καθώς και σε συστήματα με αυξημένο οξειδωτικό στρες, όπως είναι τα περιφερικά λευκοκύτταρα του αίματος καπνιστών[41]. Γενικά, προτιμάται ο προσδιορισμός της ως βιοδείκτης οξειδωτικής καταστροφής του DNA, χάρη στην υψηλή συγκέντρωσή της στα ούρα καθώς και στην ειδικότητα της ως προς το συγκεκριμένο βιομόριο[51].

Διάφορες μέθοδοι έχουν αναπτυχθεί για την ποσοτικοποίησή της 8-OHdG. Οι πιο κοινά χρησιμοποιούμενες είναι η HPLC-EC (υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης με ηλεκτροχημικό εντοπισμό), η GC/MS, η HPLC-MS/MS και η δοκιμασία Comet. Παρόλα αυτά είναι αρκετά χρονοβόρες, καθιστώντας την εφαρμογή τους στην κλινική πρακτική ιδιαίτερα δύσκολη[41,51]. Αν και οι μέθοδοι ποσοτικού προσδιορισμού της 8-OHdG χρησιμοποιούνται ευρέως, η εγκυρότητα της μέτρησης χρειάζεται να επιβεβαιωθεί καθώς τα επίπεδά της υδροξυλιωμένης βάσης φαίνεται να αλλάζουν ύστερα από τον κατακερματισμό γονιδίων, που πιθανόν να συμβαίνει ως αποτέλεσμα διαδικασιών εκτός της οξειδωτικής καταστροφής. Η ανάπτυξη kit αντιδραστηρίων θα μπορούσε να βοηθήσει προς αυτή την κατεύθυνση[41].

2.5 Υπερχοληστερολαιμία και οξειδωτικό στρες

Η αθηροσκλήρωση συσχετίζεται άμεσα και ισχυρά με το οξειδωτικό στρες και μάλιστα το τελευταίο αποτελεί έναν από τους τρεις κύριους παθοφυσιολογικούς μηχανισμούς της μαζί με τη φλεγμονή και τη θρόμβωση. Επιπλέον, η υπερχοληστερολαιμία έχει εδραιωθεί ως ένας από τους βασικούς παράγοντες κινδύνου για αθηροσκλήρωση, ενώ γνωρίζουμε επίσης ότι η οξείδωση των LDL αποτελεί καθοριστικό βήμα στην εξέλιξη και στις επακόλουθες επιπλοκές της νόσου. Παρόλα αυτά, ελάχιστες μελέτες στη βιβλιογραφία συσχετίζουν ευθέως την υπερχοληστερολαιμία με το οξειδωτικό στρες προκειμένου να διαπιστωθεί εάν όντως υφίσταται μια δοσοεξαρτώμενη και αιτιολογική σχέση μεταξύ τους. Έχει προταθεί ότι η υπερχοληστερολαιμία διεγείρει την παραγωγή $O_2^{\cdot -}$ από τα SMC των αγγείων[63] και ότι γενικά οδηγεί σε ένα προ-οξειδωτικό περιβάλλον[64].

Σε μία πολύ πρόσφατη μελέτη που έγινε σε C57BL/6 wild-type αρσενικά ποντίκια φάνηκε ότι η υπερχοληστερολαιμία συσχετίζεται με αυξημένο οξειδωτικό στρες.

Συγκεκριμένα, ποντίκια τα οποία ταΐστηκαν με υπερχοληστερολαιμική δίαιτα (21% λίπος γάλακτος και χοληστερόλη 0,2%w/w) είχαν στατιστικά σημαντικά υψηλότερες τιμές TBARS σε σύγκριση με τα ποντίκια της ομάδας ελέγχου που ταΐζονταν με πρότυπη κουνελοτροφή (0,62 ± 0,04 μmol MDA/L vs 0,36 ± 0,02 μmol MDA/L, $p<0,05$). Επίσης, το σκορ OxLDL των υπερχοληστερολαιμικών ποντικιών ήταν στατιστικά σημαντικά υψηλότερο από αυτό των νορμοχοληστερολαιμικών (1,4 ± 0,2 vs 2,2 ± 0,2, $p<0,05$)[65].

Σε μία άλλη μελέτη, σε ανθρώπους αυτή τη φορά, μετρήθηκαν διάφοροι δείκτες μεταξύ υπερχοληστερολαιμικών και φυσιολογικών ατόμων και βρέθηκε ότι στα υπερχοληστερολαιμικά άτομα οι τιμές των TBARS (MDA/ml ορού), των πρωτεϊνικών καρβονυλίων (nmol/mg πρωτεΐνης) και των θειολών (μmol/ml πλάσματος) ήταν στατιστικά σημαντικά υψηλότερες στα άτομα με υπερχοληστερολαιμία[66].

Τέλος, σε μελέτη που έγινε μεταξύ ομόζυγων και ετερόζυγων για οικογενή υπερχοληστερολαιμία ασθενών και της ομάδας ελέγχου, βρέθηκε ότι τα επίπεδα MDA (nmol MDA/ml ορού) ήταν στατιστικά σημαντικά υψηλότερα στους ομόζυγους ασθενείς, σε σχέση τόσο με την ομάδα ελέγχου (14,66 ± 2,09 vs 6,32 ± 1,09, $p<0,001$) όσο και με τα ετερόζυγα άτομα (14,66 ± 2,09 vs 10,44 ± 1,22, $p<0,001$). Το ίδιο ακριβώς παρατηρήθηκε και για τα επίπεδα καρβονυλίων ορού (nmol MDA/mg πρωτεΐνης). Συγκεκριμένα, τα ομόζυγα άτομα είχαν στατιστικά σημαντικά υψηλότερες τιμές καρβονυλίων ορού, τόσο από την ομάδα ελέγχου (2,86 ± 0,48 vs 1,52 ± 0,28, $p<0,001$) όσο και από τα ετερόζυγα άτομα (2,86 ± 0,48 vs 2,12 ± 0,26, $p<0,001$)[67].

Είναι φανερό ότι από τόσο μικρό αριθμό επιστημονικών δεδομένων δε μπορεί να προκύψει σαφής αιτιολογική συσχέτιση μεταξύ υπερχοληστερολαιμίας και οξειδωτικού στρες. Προκειμένου να έχουμε μια πιο σαφή εικόνα θα πρέπει αυτή η συσχέτιση να διερευνηθεί περισσότερο στο μέλλον. Παρόλα αυτά, από τα μέχρι τώρα διαθέσιμα βιβλιογραφικά στοιχεία φαίνεται ότι η υπερχοληστερολαιμία επάγει ή/και ενισχύει το οξειδωτικό στρες.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3^{Ο}

ΕΛΑΙΟΛΑΔΟ ΚΑΙ ΑΘΗΡΟΣΚΛΗΡΩΣΗ

3.1 Εισαγωγή

Το ελαιόλαδο αποτελεί ένα από τα τρόφιμα στα οποία έχουν αποδοθεί από ένα τεράστιο φάσμα επιστημονικών δεδομένων, σημαντικές ευεργετικές επιδράσεις στην υγεία των ανθρώπων. Αποτελεί ένα από τα κύρια στοιχεία της διατροφής του πληθυσμού της Μεσογειακής λεκάνης και βασική πηγή λίπους της διατροφής αυτής. Η πλούσια σύστασή του σε MUFA και σε πλήθος μικροθρεπτικών συστατικών, καθιστούν το ελαιόλαδο ένα πολύτιμο διατροφικό στοιχείο μιας ισορροπημένης διατροφής που προωθεί τη συνολική υγεία του ανθρώπινου πληθυσμού[68,69].

3.2 Ελαιόλαδο

3.2.1 Παραλαβή ελαιολάδου

Το ελαιόλαδο προέρχεται από το φρούτα-καρπούς του δέντρου Olea Europaea L. Ανάλογα με τις χημικές του ιδιότητες και το βαθμό οξύτητάς του ταξινομείται σε διάφορες κατηγορίες που λειτουργούν ταυτόχρονα και ως κατευθυντήριες γραμμές για τον καταναλωτή, ως προς την επιλογή του προτιμώμενου είδους ελαιολάδου[70]. Έτσι λοιπόν, στο εμπόριο υπάρχουν διαθέσιμοι διαφορετικοί τύποι ελαιολάδου: το EVOO (έξτρα παρθένο ελαιόλαδο), το VOO (παρθένο ελαιόλαδο), το OO (απλό ελαιόλαδο) και το ROO (ραφιναρισμένο ελαιόλαδο). Το EVOO είναι αυτό που προκύπτει από την πρώτη φυσική μηχανική πίεση της ελαιόπαστας, η οποία έχει παραχθεί ύστερα από διαδικασία έκθλιψης του φρούτου της ελιάς. Το VOO είναι αυτό που προκύπτει από τη δεύτερη φυσική μηχανική πίεση της ελαιόπαστας[71]. Ο τρόπος παραγωγής και των δύο αυτών τύπων ελαιόλαδου δεν οδηγεί σε αλλαγή της σύστασης των πολύτιμων θρεπτικών συστατικών της ελιάς καθώς προέρχονται μέσω φυσικών διεργασιών παραγωγής, χωρίς την προσθήκη συγκεκριμένων χημικών μέσων[70].

Το απλό ελαιόλαδο προκύπτει ύστερα από ανάμιξη ROO με VOO σε συγκεκριμένη αναλογία (συνήθως 5:1) και τέλος το ROO είναι αυτό που παράγεται ύστερα από διεργασία σε υψηλές θερμοκρασίες και με την προσθήκη κατάλληλων χημικών διαλυτών, με αποτέλεσμα την απώλεια σημαντικών μικροσυστατικών του ελαιολάδου, όπως είναι οι φαινολικές ενώσεις[69].

3.2.2 Σύσταση ελαιολάδου

Τα βασικά συστατικά του ελαιολάδου είναι τα FA, εκ των οποίων τα MUFA και συγκεκριμένα το ελαϊκό οξύ (cis18:1 ω-9), αντιπροσωπεύει το 55-83% του συνόλου των FA, τα PUFA και συγκεκριμένα το LA (18:2 ω-6) το 4-20% αυτών και τα SFA (κορεσμένα λιπαρά οξέα) το 8-14% αυτών. Εκτός από FA το ελαιόλαδο περιέχει και πλήθος μικροθρεπτικών συστατικών τα οποία αποτελούν το 1-2% της σύστασής του και ταξινομούνται σε δύο κατηγορίες: το γλυκερινούχο (πολικό) κλάσμα το οποίο αποτελεί το 90-99% των μικροσυστατικών του ελαιολάδου και το μη πολικό, ασαπωνοποίητο κλάσμα το οποίο αποτελεί το 0.4-5% αυτών[72]. Το περιεχόμενο του ελαιολάδου σε αυτά τα μικροσυστατικά διαφοροποιείται ανάλογα με τις ποικιλίες της ελιάς, το βαθμό ωρίμανσης, πιθανές παρασιτώσεις, το κλίμα, καθώς και τα μέσα επεξεργασίας, παραγωγής και αποθήκευσης του ελαιολάδου[73].

Το ασαπωνοποίητο κλάσμα του ελαιολάδου περιλαμβάνει: α) RH (υδρογονάνθρακες) όπως το σκουαλένιο, το β-καροτένιο, πολυκυκλικούς αρωματικούς RH, β) στερόλες όπως η β-σιτοστερόλη, η καμπεστερόλη, η Δ-7 στιγμαστερόλη, η μπρασσικαστερόλη, γ) τριτερπενικές δι-αλκοόλες όπως η ερυθροδιόλη και η ουβαόλη, δ) τοκοφερόλες όπως η α-, β-, γ-, και δ-TOH, ε) NL (ουδέτερα λιποειδή) όπως οι εστέρες χοληστερόλης, οι MAG (μονοακυλογλυκερόλες), οι DAG (διακυλογλυκερόλες), οι TAG, μεθυλεστέρες FA και λιπαρές αλκοόλες και ε) διάφορες χρωστικές ουσίες. Μεταξύ των RH ο πιο σημαντικός είναι το σκουαλένιο που αποτελεί και το 60-75% του συνολικού ασαπωνοποίητου κλάσματος, μεταξύ των στερολών η β-σιτοστερόλη και μεταξύ των τοκοφερολών η α-TOH.

Το πολικό κλάσμα του ελαιολάδου περιλαμβάνει: α) φαινολικές ενώσεις και β) PL (πολικά λιποειδή) [40].

- **Φαινολικές ενώσεις**

Υπάρχουν τουλάχιστον 36 δομικά διακριτές φαινολικές ενώσεις που έχουν αναγνωριστεί στο VOO. Αυτές μπορούν να ομαδοποιηθούν ανάλογα με τη χημική τους δομή στις ακόλουθες ομάδες:

- Φαινολικά οξέα. Οι ενώσεις αυτές μπορούν να χωριστούν περαιτέρω σε τρεις υποομάδες· παράγωγα βενζοϊκού οξέος, παράγωγα κιναμικού οξέος και άλλα φαινολικά οξέα και παράγωγα. Χαρακτηριστικά παραδείγματα αποτελούν το προτοκατεχουϊκό οξύ, το συριγγικό οξύ και το καφεϊκό οξύ.

- Φαινολικές αλκοόλες. Χαρακτηριστικά παραδείγματα αποτελούν η T (τυροσόλη) και η HT (υδροξυτυροσόλη).

- Σεκοϊριδοειδή. Οι ενώσεις αυτές χαρακτηρίζονται από την παρουσία ελενολικού οξέος στη μοριακή τους δομή. Χαρακτηριστικά παραδείγματα αποτελούν η Ole (ολευρωπαΐνη) και η OleA (το άγλυκο μέρος αυτής), η OLC (ολεοκανθάλη) και η άγλυκη μορφή της λιγκστροσίδης.

- Υδροξυ-ισοκρομάνες.

- Φλαβονοειδή. Οι ενώσεις αυτές χωρίζονται περαιτέρω σε φλαβόνες και φλαβανόλες. Χαρακτηριστικά παραδείγματα φλαβονών είναι η LU (λουτεολίνη) και η AP (απιγκενίνη) και φλαβανολών η ταξιφολίνη.

- Λιγνάνες. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η πινορεσινόλη καθώς και η ακετόξυ- και υδρόξυ- μορφή της[74].

- **PL**

Τα PL του ελαιολάδου περιέχουν κυρίως PLP και ορισμένα GL (γλυκολιποειδή). Στα PLP του ελαιολάδου ανήκουν τα DGDG (διγαλακτοζυλ-διγλυκερίδια), η PC (φωσφατιδυλοχολίνη), η LPC (λυσο-φωσφατιδυλοχολίνη), ο PAF, η SM (σφιγγομυελίνη), η PE (φωσφατιδυλοαιθανολαμίνη), η SM (σφιγγομυελίνη) και οι CB (κερεβροζίτες). Στα γλυκολιποειδή ανήκουν η PC, η PI (φωσφατιδυλοϊνοσιτόλη), η PE, η PS (φωσφατίδυλοσερίνη), τα SULF (σουλφατίδια), οι GANG (γαγγλιοζίτες), οι GCERM (γαλακτοκερεβροζίτες) και DGDG[75].

3.3 Ελαιόλαδο και αθηροσκλήρωση

3.3.1 Επιδημιολογικές μελέτες

Ένας πολύ μεγάλος αριθμός επιδημιολογικών μελετών-αναδρομικών και προοπτικών-αποτελεί αξιόπιστη επιστημονική βάση που υποστηρίζει τις ωφέλιμες επιδράσεις από την κατανάλωση μιας Μεσογειακού τύπου διατροφής[40]. Συγκεκριμένα, η προσκόλληση στη Μεσογειακή διατροφή έχει συσχετιστεί με χαμηλή ολική, καρδιαγγειακή και καρκινική θνησιμότητα σε πολλές μεγάλες προοπτικές μελέτες[71]. Επιπλέον, πλήθος επιδημιολογικών δεδομένων φανερώνουν ότι οι χώρες της Μεσογειακής λεκάνης έχουν χαμηλή επίπτωση CHD, γεγονός που οφείλεται σε μεγάλο βαθμό στη Μεσογειακή διατροφή και ιδιαίτερα στην κατανάλωση ενός αναπόσπαστου διατροφικού συστατικού αυτής που είναι το ελαιόλαδο[69].

Η μελέτη των 7 Χωρών που ξεκίνησε από τον Keys και τους συνεργάτες του το 1970, ήταν η πρώτη μεγάλη επιδημιολογική μελέτη που ανέδειξε τη σχέση μεταξύ της Μεσογειακής διατροφής και της CHD καθώς τα αποτελέσματά της έδειξαν ότι ο πληθυσμός του Μεσογειακού νησιού της Κρήτης είχε τα χαμηλότερα ποσοστά CHD, μεταξύ πολλών διαφορετικών πληθυσμών που μελετήθηκαν παγκοσμίως. Η μελέτη αυτή, όπως και πολλές άλλες επιδημιολογικές μελέτες που ακολούθησαν στη συνέχεια, κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι η αιτία μιας τέτοιας προστατευτικής επίδρασης από την κατανάλωση μιας Μεσογειακού τύπου δίαιτας, πιθανόν να είναι η υψηλή πρόσληψη MUFA και συγκεκριμένα ελαϊκού οξέος το οποίο αποτελεί το βασικότερο συστατικό του ελαιολάδου[40,73].

Παρόλα αυτά, τα τελευταία χρόνια το ενδιαφέρον τον ερευνητών έχει στραφεί περισσότερο προς τα μικροσυστατικά του ελαιολάδου και ιδιαίτερα προς τις φαινολικές ενώσεις που φαίνεται να μεσολαβούν σε πολύ μεγάλο βαθμό τέτοιες καρδιοπροστατευτικές δράσεις[71]. Στον παρακάτω πίνακα παρατίθενται ορισμένες από τις σημαντικότερες τελευταίες προοπτικές επιδημιολογικές μελέτες σχετικά με τις ωφέλιμες επιδράσεις της υιοθέτησης μιας Μεσογειακού τύπου δίαιτας.

Πίνακας 3.1: Προοπτικές επιδημιολογικές μελέτες σχετικά με τις ωφέλιμες επιδράσεις της κατανάλωσης ελαιολάδου

Συγγραφέας Έτος	Χώρα	Follow-up	Ηλικία κατά την έναρξη	Φύλο	Συστατικά Μεσογειακού σκορ	Προσαρμογές	Αποτέλεσμα
Trichopoulou et al., 2003 (EPIC)[76]	Ελλάδα	3.7 χρόνια	20-86	Γυναίκες Άνδρες	Υψηλή κατανάλωση: 1.Οσπρίων 2.Δημητριακών 3.Φρούτων/Καρπών 4.Λαχανικών 5.Ψαριών 6.Λόγου MUFA:SFA Μέτρια κατανάλωση: 1.Αλκοόλ Χαμηλή κατανάλωση: 1.Κρέατος και πουλερικών 2.Γαλακτοκομικών προϊόντων	Φύλο, ηλικία, κάπνισμα, χρόνια εκπαίδευσης, BMI, λόγος περιφέρεια μέσης/περιφέρεια ισχίων, σκορ ενεργειακής δαπάνης, ενεργειακή πρόσληψη, κατανάλωση πατάτας και αυγών	↑2 βαθμοί στο Μεσογειακό σκορ → ↓ θνησιμότητας από CHD
Knoops et al., 2004 (HALE project: SENECA and FINE[77]	Βέλγιο, Δανία, Γαλλία, Φινλανδία, Ιταλία, Ελλάδα, Ουγγαρία, Ολλανδία, Ισπανία, Ελβετία, Πορτογαλία	10 χρόνια	70-90	Γυναίκες Άνδρες	Υψηλή κατανάλωση: 1.Οσπρίων/Καρπών/Σπόρων 2.Δημητριακών 3.Φρούτων 4.Λαχανικών/Πατάτας 5.Ψαριών 6.Λόγου MUFA:SFA Χαμηλή κατανάλωση: 1.Κρέατος και πουλερικών 2.Γαλακτοκομικών προϊόντων	Φύλο, ηλικία, κάπνισμα, φυσική δραστηριότητα, διαιτητικές συνήθειες, χρόνια εκπαίδευσης, BMI, αλκοόλ	↑2 βαθμοί στο Μεσογειακό σκορ → ↓ θνησιμότητας από CHD
Mitrou et al., 2007 (National Institutes of Health diet and health study)[78]	Αμερική	10 χρόνια	50-71	Γυναίκες Άνδρες	Υψηλή κατανάλωση: 1.Οσπρίων 2.Προϊόντων Ολικής Άλεσης 3.Φρούτων 4.Καρπών 5.Λαχανικών 6.Ψαριού 7.Λόγου MUFA/SFA Μέτρια κατανάλωση: 1.Αλκοόλ Χαμηλή κατανάλωση: 1.Κόκκινου και κατεργασμένου κρέατος	Ηλικία, φυλή, κάπνισμα, φυσική δραστηριότητα, ενεργειακή πρόσληψη, εκπαίδευση, BMI, HRT	↑2 βαθμοί στο Μεσογειακό σκορ → ↓ θνησιμότητας από CVDs

Panagiotakos et al., 2008 (ATTICA Study)[9]	Ελλάδα	5 χρόνια	18-89	Γυναίκες Άνδρες	Υψηλή κατανάλωση: 1.Μη επεξεργασμένων δημητριακών 2.Φρούτων 3.Λαχανικών 4.Ελαιολάδου 5.Ψαριού 6.Οσπρίων 7.Πατάτας Μέτρια κατανάλωση: 1.Αλκοόλ Χαμηλή κατανάλωση: 1.Κρέατος και πουλερικών 2.Πλήρων γαλακτοκομικών προϊόντων	Φύλο, φυσική δραστηριότητα, κάπνισμα, BMI, HTN, υπερχοληστερολαιμία, DM, CRP, οικογενειακό ιστορικό CVD	↑1 βαθμός στο Μεσογειακό σκορ → ↓ 5-ετής επίπτωση CVDs
Buckland et al., 2009 (EPIC Spain)[79]	Ισπανία	10.4 χρόνια	29-69	Γυναίκες Άνδρες	Υψηλή κατανάλωση: 1.Οσπρίων 2.Δημητριακών 3.Φρούτων/Καρπών 4.Λαχανικών 5.Ψαριού 6. Λόγου MUFA/SFA Μέτρια κατανάλωση: 1.Αλκοόλ Χαμηλή κατανάλωση: 1.Κρέατος και πουλερικών 2.Γαλακτοκομικών προϊόντων	Ηλικία, BMI, εκπαίδευση, κάπνισμα, φυσική δραστηριότητα, ενεργειακή πρόσληψη, DM, HTN	↑2 βαθμοί στο Μεσογειακό σκορ → ↓ θνησιμότητας από CHD
Fung et al., 2009 (Nurses' Health Study)[80]	Αμερική	20 χρόνια	38-63	Γυναίκες	Υψηλή κατανάλωση: 1.Οσπρίων 2.Προϊόντων Ολικής Άλεσης 3.Φρούτων 4.Λαχανικών 5.Ψαριού 6.Καρπών 7.Λόγου MUFA/SFA Μέτρια κατανάλωση: 1.Αλκοόλ Χαμηλή κατανάλωση: 1.Κόκκινου και κατεργασμένου κρέατος	Ηλικία, BMI, κατάσταση εμμηνόπαυσης, χρήση ορμονών, φυσική δραστηριότητα, ενεργειακή πρόσληψη, οικογενειακό ιστορικό, αλκοόλ, πρόσληψη πολυβιταμινούχου συμπληρώματος	↑2 βαθμοί στο Μεσογειακό σκορ → ↓ θνησιμότητας από CHD και εγκεφαλικό
Bendinelli et al., 2010 (EPICOR Study Italy)[81]	Ιταλία	7.85 χρόνια	50 (Μ.Ο)	Γυναίκες	Αυξημένη κατανάλωση ελαιολάδου	Μορφωτικό επίπεδο, κάπνισμα, αλκοόλ, ύψος, βάρος, περιφέρεια μέσης, ενεργειακή πρόσληψη, υπέρταση, φυσική	↑Αυξημένη κατανάλωση ελαιολάδου → ↓ θνησιμότητας από CHD

						δραστηριότητα, κατανάλωση κρέατος και λαχανικών, κατάσταση εμμηνόπαυσης	
Martínez-González et al., 2011 (SUN Study)[82]	Ισπανία	4.9 χρόνια	38 (M.O)	Γυναίκες Άνδρες	Υψηλή κατανάλωση: 1.Οσπρίων 2.Δημητριακών 3.Φρούτων/Καρπών 4.Λαχανικών 5.Ψαριού 6. Λόγου MUFA/SFA Μέτρια κατανάλωση: 1.Αλκοόλ Χαμηλή κατανάλωση: 1.Κρέατος και πουλερικών 2.Γαλακτοκομικών προϊόντων	Ηλικία, φύλο,BMI, οικογενειακό ιστορικό CVD, κάπνισμα, φυσική δραστηριότητα, ενεργειακή πρόσληψη, DM, HTN, υπερχοληστερολαιμία, χρήση ασπιρίνης	↑ 2 βαθμοί στο Μεσογειακό σκορ → ↓ θνησιμότητας από CVDs

*HRT: θεραπεία ορμονικής υποκατάστασης

Η επιδημιολογική προοπτική μελέτη ATTICA (πίνακας 3.1) πραγματοποιήθηκε στην περιοχή της Αττικής (78% αστικές και 22% περιφερειακές περιοχές), μεταξύ του 2001 και 2002. Συμμετείχαν συνολικά 3042 άτομα, 1514 εκ των οποίων ήταν άνδρες (18-87 ετών) και 1528 γυναίκες (18-89 ετών). Η μελέτη σχεδιάστηκε προκειμένου να συσχετίσει διάφορα κλινικά και μη χαρακτηριστικά των ατόμων αυτών με την επίπτωση CVD. Μεταξύ των χαρακτηριστικών που μελετήθηκαν ήταν και η προσκόλληση στη Μεσογειακή διατροφή. Αρχικά, η εκτίμηση των διατροφικών συνηθειών βασίστηκε σε επικυρωμένο ημι-ποσοτικό ερωτηματολόγιο συχνότητας κατανάλωσης τροφίμων (το ελληνικό ερωτηματολόγιο της EPIC). Το ερωτηματολόγιο περιείχε 156 τρόφιμα και ποτά με επτά μη αλληλοεπικαλυπτόμενες μεταξύ τους κατηγορίες απαντήσεων.

Βάσει λοιπόν της διατροφικής πληροφορίας αναπτύχθηκε ένα ειδικό Μεσογειακό σκορ διατροφής κλίμακας από 0-55[9]. Για τη δημιουργία του σκορ, χρησιμοποιήθηκαν 11 βασικά συστατικά της Μεσογειακής διατροφής (μη επεξεργασμένα δημητριακά, φρούτα, λαχανικά, πατάτες, όσπρια, ελαιόλαδο, ψάρι, κόκκινο κρέας, πουλερικά, αλκοόλ και πλήρη γαλακτοκομικά προϊόντα). Για τις συχνότητες κατανάλωσης των τροφίμων αυτών στο πλαίσιο ενός Μεσογειακού διαιτητικού προτύπου αποδόθηκαν οι βαθμοί 0, 1, 2, 3, 4 και 5 για καθόλου έως και καθημερινή κατανάλωση αντίστοιχα. Για την κατανάλωση τροφίμων που θεωρούνται εκτός των συνηθειών μιας Μεσογειακής διατροφής χρησιμοποιήθηκαν σκορ αντίστροφης κλίμακας, δηλαδή το 5 αντιστοιχούσε στην καθόλου κατανάλωση και το 0 στην πολύ συχνή κατανάλωση (πχ αλκοόλ<300ml/d → σκορ 5 και >700ml/d → σκορ 0)[83].

Η στατιστική ανάλυση των δεδομένων, ύστερα από τις κατάλληλες προσαρμογές για διάφορες μεταβλητές που φαίνονται στον πίνακα 3.1, έδειξε ότι το Μεσογειακό σκορ διατροφής συσχετίζεται αντίστροφα με την ανάπτυξη CVD (ΣΚ=0.92, 95%CI=0.89-0.94). Πιο συγκεκριμένα, στα άτομα ηλικίας 35-65 ετών η υψηλότερη προσκόλληση στη Μεσογειακή διατροφή (υψηλότερο σκορ), συσχετίστηκε με μειωμένη 5-ετή επίπτωση CVD (ΣΚ=0.94, 95%CI=0.90-0.97), ενώ στις μικρότερες ή μεγαλύτερες ηλικίες η συσχέτιση ήταν μη στατιστικά σημαντική[9].

Η προοπτική επιδημιολογική μελέτη SUN (πίνακας 3.1) σχεδιάστηκε προκειμένου να εκτιμήσει τη συσχέτιση μεταξύ της προσκόλλησης στη Μεσογειακή δίαιτα και της επίπτωσης θανατηφόρων ή μη καρδιαγγειακών επεισοδίων, μεταξύ υγιών κατά την έναρξη της μελέτης μεσηλίκων της Ισπανίας. Συμμετείχαν συνολικά 13.609 άτομα (60% γυναίκες, μέση ηλικία 38 ετών) χωρίς κάποιο γνωστό καρδιαγγειακό επεισόδιο κατά την εισαγωγή τους στη μελέτη και μελετήθηκαν προοπτικά για 4.9 χρόνια. Οι συμμετέχοντες ήταν απόφοιτοι πανεπιστημίων από όλες τις περιοχές της Ισπανίας. Η δίαιτά τους αξιολογήθηκε βάσει επικυρωμένου ερωτηματολογίου συχνότητας κατανάλωσης τροφίμων το οποίο περιείχε 136 διαφορετικά τρόφιμα. Χρησιμοποιήθηκε σκορ εύρους κλίμακας 9 βαθμών προκειμένου να εκτιμήσει την προσκόλληση στη Μεσογειακή διατροφή. Στον επανέλεγχο διαπιστώθηκαν καρδιαγγειακά επεισόδια σε 100 από τα άτομα της μελέτης.

Η στατιστική ανάλυση φανέρωσε ότι η υψηλότερη προσκόλληση στη Μεσογειακή διατροφή (σκορ>6) συσχετίζεται με χαμηλότερο καρδιαγγειακό κίνδυνο σε σύγκριση με ένα χαμηλό σκορ της τάξης των τριών βαθμών (ΣΚ=0.41, 95%CI=0.18-0.95). Συγκεκριμένα, για κάθε δύο βαθμούς αύξηση στο σκορ Μεσογειακής διατροφής, οι προσαρμοσμένοι για διάφορους συγχυτικούς παράγοντες ΣΚ ήταν 0.80 (95%CI=0.62-1.02) για CVDs και 0.74 (95%CI=0.55-0.99) για CHD[82].

Όπως φαίνεται από τα παραπάνω δεδομένα προοπτικών μελετών, στο χώρο της επιδημιολογικής ανάλυσης το ερευνητικό ενδιαφέρον έχει τα τελευταία χρόνια μετατοπιστεί στην εκτίμηση της υιοθέτησης και της ωφέλιμης επίδρασης προτύπων διατροφής, όπως η Μεσογειακή παρά στην ανάλυση μεμονωμένων συστατικών της δίαιτας[84,85]. Παρόλα αυτά, υπάρχουν και μελέτες που συσχετίζουν μεμονωμένα θρεπτικά συστατικά ή τρόφιμα με την επίπτωση διάφορων κλινικών γεγονότων όπως η μελέτη EPICOR που αναφέρεται και στον πίνακα 3.1

Όπως είναι γνωστό, στις επιδημιολογικές μελέτες ανήκουν εκτός από τις προοπτικές και οι αναδρομικές, παραδείγματα των οποίων δεν αναφέρονται εκτενώς παραπάνω

καθώς σε σχέση με τις προοπτικές παρέχουν λιγότερο σημαντική πληροφορία σχετικά με τη μελέτη ενός κλινικού φαινομένου. Παρόλα αυτά, έχουν πραγματοποιηθεί αρκετές αναδρομικές μελέτες σχετικά με τη μελέτη των συστατικών της Μεσογειακής διατροφής στον καρδιαγγειακό κίνδυνο.

Μία από τις πιο γνωστές μελέτες στο χώρο αυτό είναι η Ελληνική μελέτη CARDIO. Σκοπός της μελέτης ήταν να εκτιμήσει τη συσχέτιση μεταξύ του διαιτητικού προτύπου κατανάλωσης εδώδιμων ελαίων και λιπών και τον επιπολασμό ενός πρωτοεκδηλωθέντος, μη θανατηφόρου οξέος στεφανιαίου επεισοδίου σε Ελληνικό δείγμα. Συμμετείχαν συνολικά 700 άνδρες και 148 γυναίκες που μόλις είχαν εκδηλώσει για πρώτη φορά στη ζωή τους οξύ στεφανιαίο επεισόδιο (MI ή ασταθής στηθάγχη) καθώς και 1078 υγιή άτομα, καθένα από τα οποία αντιστοιχούσε στην ίδια ηλικία και φύλο με κάποιο άτομο από τους ασθενείς. Καταγράφηκαν λεπτομερώς πληροφορίες σχετικά με το ιατρικό ιστορικό, την πρόσληψη αλκοόλ, τη φυσική δραστηριότητα και τις καπνιστικές συνήθειες. Οι διαιτητικές συνήθειες εκτιμήθηκαν με ημι-ποσοτικό ερωτηματολόγιο συχνότητας κατανάλωσης τροφίμων ενώ επίσης καταγράφηκε η χρήση των διαφορετικού τύπου ελαίων στο καθημερινό μαγείρεμα ή στην προετοιμασία του φαγητού.

Η αποκλειστική χρήση ελαιολάδου συσχετίστηκε με 47% μικρότερη πιθανότητα εμφάνισης οξέος στεφανιαίου επεισοδίου (95%CI=0.4-0.71) σε σύγκριση με την καθόλου χρήση ελαιολάδου, προσαρμόζοντας για τις μεταβλητές BMI, κάπνισμα, επίπεδο φυσικής δραστηριότητας, επίπεδο εκπαίδευσης, οικογενειακό ιστορικό CHD, HTN, υπερχοληστερολαιμία και DM. Η κατανάλωση ελαιολάδου σε συνδυασμό με άλλα έλαια ή λίπη δε συσχετίστηκε στατιστικά σημαντικά με χαμηλότερη πιθανότητα εμφάνισης ACS σε σύγκριση με την καθόλου κατανάλωση ελαιολάδου (p=0.14). Η μελέτη κατέληξε ότι η αποκλειστική χρήση ελαιολάδου κατά την παρασκευή των καθημερινών γευμάτων φαίνεται να προσφέρει σημαντική προστασία έναντι της CHD, ανεξαρτήτως άλλων κλινικών και μη χαρακτηριστικών (πχ τρόπος ζωής) των συμμετεχόντων[86].

3.3.2 Κλινικές μελέτες

Η Lyon Diet Heart Study ήταν η πρώτη κλινική απόδειξη των ωφέλιμων επιδράσεων μιας Μεσογειακού τύπου δίαιτας σε κλινικό πληθυσμό. Η μελέτη αυτή πραγματοποιήθηκε σε άτομα τα οποία είχαν υποστεί για πρώτη φορά στη ζωή τους MI αποκαλύπτοντας την αποτελεσματικότητα της Μεσογειακής διατροφής στη δευτερογενή

πρόληψη της CHD[40]. Συγκεκριμένα, ανέφερε πρωτοφανή μείωση (70%) του κινδύνου εμφάνισης ενός νέου στεφανιαίου επεισοδίου, μεταξύ των ατόμων τα οποία μετά το πρώτο MI κατανάλωναν Μεσογειακού τύπου δίαιτα[73]. Το ελαιόλαδο προτάθηκε ως ένα από τα διατροφικά στοιχεία που συνέβαλλε σε καθοριστικό βαθμό στην καρδιοπροστατευτική δράση μιας τέτοιου τύπου διατροφής[69]. Μετά από την Lyon Diet Heart Study, ακολούθησε πλήθος κλινικών μελετών οι οποίες μελέτησαν εστιασμένα πλέον τις δυνητικές ωφέλιμες επιδράσεις από τη χορήγηση ελαιολάδου, είτε σε υγιή είτε σε άτομα με CVD.

Σε ένα γενικό πλαίσιο, οι κλινικές μελέτες που εξετάζουν τις ωφέλιμες επιδράσεις του ελαιολάδου μπορεί να μελετούν είτε διατροφικά πρότυπα των οποίων βασικό συστατικό αποτελεί το ελαιόλαδο (όπως η Lyon Diet Heart Study), είτε το ελαιόλαδο ως σύνολο θρεπτικών συστατικών, είτε να μελετούν την επίδραση μεμονωμένων θρεπτικών συστατικών αυτού (πχ φαινολικές ενώσεις). Επιπλέον, οι κλινικές μελέτες διακρίνονται σε μεταγευματικές οι οποίες μελετούν άμεσα (χρονικό διάστημα ωρών) τις επιδράσεις της χορήγησης ελαιολάδου σε διάφορα κλινικά χαρακτηριστικά και σε μακροχρόνιες οι οποίες μελετούν τις επιδράσεις της μακροχρόνιας χορήγησης (εβδομάδες, μήνες, κλπ.) ελαιολάδου σε διάφορους κλινικούς δείκτες. Στον πίνακα που ακολουθεί παρατίθενται ορισμένες από τις σημαντικότερες μεταγευματικές και μακροχρόνιες κλινικές μελέτες σχετικά με τις οι οποίες έχουν αναφερθεί στις ωφέλιμες επιδράσεις της κατανάλωσης ελαιολάδου.

Πίνακας 3.2: Μεταγευματικές κλινικές μελέτες ως προς τις ωφέλιμες επιδράσεις του ελαιολάδου

Συγγραφέας Έτος	Άτομα	Σχεδιασμός	Παρέμβαση	Βιοδείκτης	Αποτέλεσμα
Covas et al., 2006a[87]	12 υγιείς άνδρες	τυχαιοποιημένη διασταυρούμενη	Πλούσιο σε φαινόλες (366mg/kg) vs μέτριο σε φαινόλες (164mg/kg) vs φτωχό σε φαινόλες ελαιόλαδο(2.7mg/kg)	F_2-ισοπροστάνια OxLDL	↓ OxLDL και τα 3 ↑F_2-ισοπροστάνια vs χρόνου t=0
Bogani et al., 2007[88]	12 υγιείς άνδρες	τυχαιοποιημένη, διασταυρούμενη	Πλούσιο σε φαινόλες (607mg/kg) vs φτωχό σε φαινόλες ελαιόλαδο(16mg/kg) vs καλαμποκέλαιο (2.7mg/kg)	TXB_2 LTB_4 TAC	↓TXB_2 και LTB_4 ↑TAC
Pacheco et al. 2007[89]	14 υγιείς άνδρες	τυχαιοποιημένη, διασταυρούμενη	EVOO vs ROO	Ινωδογόνο t-PA PAI-1 TAG	↓ ινωδογόνου, t-PA και PAI-1, καμία διαφορά μεταξύ των 2 στα μεταγευματικά επίπεδα των TAG

Delgado-Lista et al., 2008[9]	20 υγιείς άνδρες	τυχαιοποιημένη, διασταυρούμενη	Λιπαρό γεύμα με βάση το EVOO (38%MUFA) vs λιπαρό γεύμα με βάση το βούτυρο (35%SFA) vs λιπαρό γεύμα με βάση τα καρύδια (16%PUFA, 4%ALA)	$FVII_C$ PAI-1 t-PA TXB_2 D-dimer	Μεταγευματική ↑TXB_2 και D-dimer και ↓ t-PA ανεξαρτήτως σύστασης γεύματος, το βούτυρο ↑ PAI-1vs EVOO και καρυδιών, η μεταγευματική $FVII_C$ ↓ με EVOO και καρύδια EVOO → ισχυρότερη βιολογική δράση
Fuentes et al., 2008[91]	20 υγιείς άνδρες	τυχαιοποιημένη, διασταυρούμενη	Λιπαρό γεύμα με βάση το EVOO (38% MUFA) vs λιπαρό γεύμα με βάση το βούτυρο (35%SFA) vs λιπαρό γεύμα με βάση τα καρύδια (16%PUFA, 4% ALA)	Ενδοθηλιακή λειτουργία, sVCAM-1 βιοδιαθεσιμότητα $NO^{\cdot}$	Η ενδοθήλιο-εξαρτώμενη αγγειοδιασταλτική απόκριση ↑ 4h μετά την κατανάλωση EVOO vs SFA και PUFA, τα μεταγευματικά επίπεδα sVCAM-1 ↓ μετά την κατανάλωση EVOO vs PUFA , η μεταγευματική βιοδιαθεσιμότητα $NO^{\cdot}$ ↑ μετά την κατανάλωση EVOO vs SFA και PUFA

*EVOO: έξτρα παρθένο ελαιόλαδο, ROO: ραφιναρισμένο ελαιόλαδο, ALA: α-λινολενικό οξύ, $FVII_C$: δραστικότητα του παράγοντα πήξης VII.

Πίνακας 3.3: Μακροχρόνιες κλινικές μελέτες ως προς τις ωφέλιμες επιδράσεις του ελαιολάδου

Συγγραφέας Έτος	Άτομα	Σχεδιασμός	Παρέμβαση	Βιοδείκτης	Αποτέλεσμα
Visioli et al., 2005 (VOLOS Study)[92]	28 άτομα με ήπια δυσλιπιδαιμία	τυχαιοποιημένη, διασταυρούμενη 7 εβδομάδων	Πλούσιο σε φαινόλες (166mg/kg) vs φτωχό σε φαινόλες ελαιόλαδο(2mg/kg)	Λιποειδή, TXB_2, TAC F_2-ισοπροστάνια	↓TXB_2 ↑TAC, καμία επίδραση στα λιποειδή και στα F_2-ισοπροστάνια

Covas et al. , 2006b[93]	200 υγιείς άνδρες	τυχαιοποιημένη, διασταυρούμενη 3 εβδομάδων	Πλούσιο σε φαινόλες (366mg/kg) vs μέτριο σε φαινόλες (164mg/kg) vs φτωχό σε φαινόλες ελαιόλαδο	OxLDL, λιποειδή, F_2-ισοπροστάνια, GSH, GSSG	↑HDL-C και TC/HDL-C, ↓OxLDL, GSH και GSSG, ↑TAG και στα 3
Estruch et al., 2006[94]	772 άτομα με αυξημένο κίνδυνο για CVD	τυχαιοποιημένη, 3 μηνών	Μεσογειακή διατροφή εμπλουτισμένη με VOO (143ml/d) vs Μεσογειακή διατροφή εμπλουτισμένη με διάφορους καρπούς (15g/d καρύδια, 7.5g/d φουντούκια, 7.5g/d αμύγδαλα) vs χαμηλή σε λίπος δίαιτα	HDL-C/TC, HDL-C, SBP, DBP, CRP, IL-6, sVCAM-1, sICAM-1	↑HDL-C/TC και HDL-C, ↓SBP και DBP vs χαμηλού λίπους δίαιτα, ↓IL-6, sVCAM-1 και sICAM-1 vs χρόνου t=0, ενώ η χαμηλού λίπους δίαιτα προκάλεσε ↑, μόνο το VOO ↓CRP
Machowetz et al., 2007[95]	182 υγιείς άνδρες	τυχαιοποιημένη διασταυρούμενη 3 εβδομάδων	Πλούσιο σε φαινόλες (366mg/kg) vs μέτριο σε φαινόλες (164mg/kg) vs φτωχό σε φαινόλες ελαιόλαδο(2.7mg/kg)	8-oxoGua 8-oxoG 8-oxodG	και οι 3 παρεμβάσεις ↓ 8-oxodG ανεξαρτήτως φαινολικού περιεχομένου
Pérez-Martínez et al., 2007[96]	16 υγιείς άνδρες	τυχαιοποιημένη, διασταυρούμενη 4 εβδομάδων	Πλούσια σε SFA (22%) Δυτικού τύπου δίαιτα vs πλούσια σε MUFA (24%) Μεσογειακή δίαιτα vs χαμηλού λίπους δίαιτα εμπλουτισμένη με ALA (2%)	NF-kB, VCAM-1	↑NF-kB 5.4x vs Μεσογειακή διατροφή και 3.58x vs χαμηλού λίπους δίαιτα, ↑VCAM-1 vs χρόνου t=0
Fitó et al., 2008[97]	28 ασθενείς με σταθερή CHD	τυχαιοποιημένη, διασταυρούμενη 3 εβδομάδων	Πλούσιο σε φαινόλες (161mg/kg) vs φτωχό σε φαινόλες ελαιόλαδο (14.7mg/kg)	IL-6, sICAM-1, sVCAM-1, CRP	↓IL-6 και CRP, καμία διαφορά στα sICAM-1 και sVCAM-1
Castañer et al., 2011[98]	200 υγιείς άνδρες	τυχαιοποιημένη διασταυρούμενη 3 εβδομάδων	Πλούσιο σε φαινόλες (366mg/kg) vs μέτριο σε φαινόλες (164mg/kg) vs φτωχό σε φαινόλες ελαιόλαδο(2.7mg/kg)	OLAB	↑OLAB

*TAC: ολική αντιοξειδωτική ικανότητα, OLAB: αυτοαντισώματα οξειδωμένων LDL, SBP: συστολική αρτηριακή πίεση, DBP: διαστολική αρτηριακή πίεση, VOO: παρθένο ελαιόλαδο, ALA: α-λινολενικό οξύ, 8-oxoGua: 8-οξογουανίνη, 8-oxoG: 8-οξογουανοσίνη, 8-oxodG: 8-οξοδεοξυγουανοσίνη

Η τελευταία μακροχρόνια κλινική μελέτη που φαίνεται στον πίνακα 3.3 αποτελεί πολύ πρόσφατη δημοσίευση (2011) της γνωστής μελέτης EUROLIVE. Η μελέτη EUROLIVE

είναι μία πολυκεντρική (6 Ευρωπαϊκές χώρες), τυχαιοποιημένη, διασταυρούμενη κλινική μελέτη παρέμβασης η οποία σχεδιάστηκε προκειμένου να αξιολογήσει την επίδραση συγκεκριμένων δόσεων ελαιολάδου, με διαφορετικό περιεχόμενο φαινολικών ενώσεων, στο λιπιδαιμικό προφίλ, στα επίπεδα της LDL-C και στην οξειδωτική καταστροφή των λιποειδών. Για τη μελέτη αυτή στρατολογήθηκαν 200 υγιείς άνδρες, με ηλικίες 20-60 ετών. Κάθε ξεχωριστή παρέμβαση διαρκούσε 3 εβδομάδες και πριν την έναρξη κάθε νέας παρέμβασης στους συμμετέχοντες μεσολαβούσε μια washout περίοδος δύο εβδομάδων, κατά την οποία ζητούνταν από τους συμμετέχοντες να αποφεύγουν την κατανάλωση ελιάς και ελαιολάδου.

Χρησιμοποιήθηκαν τρία διαφορετικά ελαιόλαδα με υψηλό (366mg/kg), μέτριο (164mg/kg) και χαμηλό (2.7mg/kg) φαινολικό περιεχόμενο αντίστοιχα. Αξίζει να σημειωθεί ότι τα ελαιόλαδα διέφεραν μόνο ως προς το φαινολικό περιεχόμενο ενώ η σύσταση τους σε FA, τριτερπένια, βιταμίνη Ε και β-σιτοστερόλη ήταν παρόμοια. Καθημερινά οι συμμετέχοντες λάμβαναν 25ml ελαιολάδου. Στη συγκεκριμένη δημοσίευση μελετήθηκε η επίδραση των φαινολικών ενώσεων των τριών αυτών διαφορετικών ελαιολάδων στην παραγωγή OLAB (αυτοαντισωμάτων των OxLDL). Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της μελέτης, οι συγκεντρώσεις OLAB-προσαρμοσμένες για τις τιμές των OxLDL-αυξάνονται με δοσοεξαρτώμενο τρόπο, ανάλογα με το φαινολικό περιεχόμενο του ελαιολάδου που χορηγούνταν. Δηλαδή, όσο μεγαλύτερη η συγκέντρωση των φαινολικών ενώσεων στο ελαιόλαδο τόσο μεγαλύτερη και η παραγωγή OLAB ($p=0.02$). Η επίδραση αυτή μάλιστα φάνηκε να είναι ισχυρότερη σε υψηλότερες συγκεντρώσεις OxLDL. Επιπλέον, η συγκέντρωση OLAB συσχετίστηκε αντίστροφα με τη συγκέντρωση OxLDL πλάσματος ($p<0.001$)[98].

Εκτός όμως από τις αντιοξειδωτικές επιδράσεις των συστατικών του ελαιολάδου έχουν πραγματοποιηθεί και μελέτες οι οποίες αξιολογούν τις αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες αυτών, όπως αυτή που πραγματοποίησε η Fito και οι συνεργάτες της (πίνακας 3.3). Σκοπός της συγκεκριμένης μελέτης ήταν να αξιολογήσει την επίδραση δύο διαφορετικών τύπων ελαιολάδων, ενός VOO και ενός ROO, σε φλεγμονώδεις δείκτες 28 ασθενών με σταθερή CHD. Η μελέτη ήταν τυχαιοποιημένη, διασταυρούμενη, διπλά-τυφλή και με ομάδα ελέγχου. Η δόση που χορηγούνταν καθημερινά στους συμμετέχοντες ήταν 50 ml ελαιολάδου. Στη συγκεκριμένη δόση η σύσταση του VOO ήταν 77%MUFA, 15%SFA, 9%PUFA, 0.15mg β-καροτένιου, 8.73mg α-TOH και 6.53mg φαινολικών ενώσεων (εκφρασμένα σε ισοδύναμα καφεϊκού οξέος) και του ROO ήταν 74%MUFA, 16%SFA, 11%PUFA, 0mg β-καροτένιου, 5.99mg α-TOH και 0.62mg φαινολικών ενώσεων. Τελικά, το VOO είχε συγκέντρωση φαινολικών ενώσεων 161mg/kg και το ROO 14.67mg/kg.

Τα δύο ελαιόλαδα χορηγούνταν στους συμμετέχοντες διαδοχικά κατά τη διάρκεια δύο χρονικών περιόδων διάρκειας τριών εβδομάδων η καθεμία, με μεσολάβηση washout περιόδου δύο εβδομάδων μεταξύ των διαφορετικών παρεμβάσεων. Τα αποτελέσματα της μελέτης έδειξαν ότι η κατανάλωση VOO μειώνει τα επίπεδα IL-6 ($p<0.002$) και CRP ($p=0.024$) πλάσματος συγκριτικά με την κατανάλωση ROO. Παρόλα αυτά, μεταξύ των δύο διαφορετικών ελαιολάδων δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στο λιπιδαιμικό προφίλ καθώς και στα επίπεδα sVCAM-1 και sICAM-1. Η μελέτη κατέληξε ότι η κατανάλωση VOO θα μπορούσε να έχει ωφέλιμες επιδράσεις σε αυτούς τους ασθενείς ως επιπρόσθετη παρέμβαση της φαρμακολογικής θεραπείας[97].

Τέλος μέσα από μελέτες παρέμβασης έχουν εξεταστεί και οι αντιθρομβωτικές ιδιότητες του ελαιολάδου. Στο χώρο αυτό έγινε σχετικά πρόσφατα (2008) μία μεταγευματική κλινική μελέτη από τον Delgado-Lista και τους συνεργάτες του (πίνακας 3.2) με ιδιαίτερα σημαντικά και ενδιαφέροντα ευρήματα. Σκοπός της μελέτης ήταν να συγκρίνει τις επιδράσεις της χρόνιας πρόσληψης διαφορετικών διαιτητικών μοντέλων σε μεταγευματικούς δείκτες αιμόστασης. Για το σκοπό αυτό στρατολογήθηκαν και τυχαιοποιήθηκαν σε τρεις διαφορετικές ομάδες 20 υγιείς άνδρες. Σε καθεμία από τις ομάδες χορηγούνταν για 4 εβδομάδες διαφορετικό διαιτητικό πρότυπο. Συγκεκριμένα, η μία ομάδα κατανάλωνε δίαιτα πλούσια σε MUFA, η άλλη πλούσια σε SFA και η τελευταία πλούσια σε CHO (υδατάνθρακες)+ω-3 PUFA.

Τα πειραματικά γεύματα για τις μεταγευματικές μετρήσεις βασίζονταν στο VOO για τη δίαιτα υψηλή σε MUFA, στο βούτυρο για τη δίαιτα υψηλή σε SFA και στα καρύδια για τη δίαιτα υψηλή σε CHO+ω-3 PUFA. Η μελέτη ήταν διασταυρούμενη. Οι αιμοστατικοί παράγοντες που μετρήθηκαν και αξιολογήθηκαν σε φάση νηστείας και μεταγευματικά ήταν η $FVII_c$ (δραστικότητα παράγοντα πήξης VII), ο PAI-1, ο t-PA, η TXB_2 και το D-dimer (προϊόν διάσπασης ινώδους). Στις μεταβλητές νηστείας δεν υπήρχαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των τριών διαφορετικών μακροχρόνιων διαιτητικών παρεμβάσεων. Παρόλα αυτά, μετά την κατανάλωση των τριών λιπαρών γευμάτων με βάση το VOO, το βούτυρο και τα καρύδια αντίστοιχα, παρατηρήθηκε αύξηση στη συγκέντρωση TXB_2 και D-dimer και μείωση στον t-PA, συγκριτικά με τη φάση νηστείας και ανεξαρτήτως σύστασης λιπαρού γεύματος ($p<0.05$). Επιπλέον, παρατηρήθηκε μείωση των μεταγευματικών συγκεντρώσεων $FVII_c$ συγκριτικά με τη φάση νηστείας αλλά μόνο για τα γεύματα πλούσια σε MUFA ($p=0.003$) και ω-3 PUFA ($p=0.05$). Η μείωση αυτή ήταν μεγαλύτερη για την ομάδα του VOO. Τέλος, η συγκέντρωση PAI-1 πλάσματος ήταν μεγαλύτερη μετά την κατανάλωση του γεύματος πλούσιου σε SFA συγκριτικά με την κατανάλωση του γεύματος πλούσιου σε MUFA ($p=0.042$) και την κατανάλωση του γεύματος πλούσιου σε ω-3 PUFA ($p=0.013$).

Συμπέρασμα της μελέτης ήταν ότι η κατανάλωση λιπαρών γευμάτων επάγει τη δημιουργία ενός γενικά προ-θρομβωτικού περιβάλλοντος μεταγευματικά, ανεξαρτήτως της σύστασης του λιπαρού γεύματος. Φαίνεται όμως ότι σε περίπτωση που το λιπαρό γεύμα είναι ιδιαίτερα πλούσιο σε SFA η επίδραση αυτή είναι εντονότερη ενώ εάν το λιπαρό γεύμα είναι πλούσιο σε MUFA είναι δυνατόν να μετριαστεί[90].

3.3.3 Μελέτες σε πειραματόζωα

Εκτός από τις μεγάλες επιδημιολογικές και κλινικές μελέτες παρέμβασης σε ανθρώπους για τη διερεύνηση των ωφέλιμων επιδράσεων της κατανάλωσης ελαιολάδου, έχουν κατά καιρούς διεξαχθεί και μελέτες σε διαφορετικά είδη πειραματοζώων. Στις μελέτες αυτές συνήθως χορηγούνται διαφορετικά είδη ελαιολάδου ή εκχυλίσματα αυτού προκειμένου να διαπιστωθεί εάν μπορούν να ανασταλούν ή ακόμα και να υποστραφούν οι δυσμενείς για την υγεία επιπτώσεις της αθηροσκλήρωσης. Συνήθως, τέτοιες μελέτες διεξάγονται πριν τις κλινικές μελέτες παρέμβασης ώστε να φανεί εάν όντως κάποιο υποτιθέμενο βιολογικά δραστικό συστατικό έχει ωφέλιμες επιδράσεις σε επίπεδο ζωικών μοντέλων. Στην παρούσα εργασία θα επικεντρωθούμε στο ζωικό μοντέλο του κουνελιού καθώς είναι το πειραματόζωο στο οποίο κι εμείς ως ερευνητική ομάδα μελετάμε τις επιδράσεις του ελαιολάδου.

Πίνακας 3.4: Μελέτες σε πειραματόζωα, ως προς τις ευεργετικές επιδράσεις του ελαιολάδου

Συγγραφέας Έτος	Πειραματόζωα	Παρέμβαση	Διάρκεια παρέμβασης	Μετρούμενο χαρακτηριστικό	Αποτέλεσμα
De La Cruz et al., 2000a[99]	40 αρσενικά κουνέλια N. Ζηλανδίας	Κουνελοτροφή vs αθηρογονική δίαιτα (1%w/w χοληστερόλη) vs κουνελοτροφή+ 10% ελαιόλαδο vs αθηρογονική δίαιτα+10% VOO	6 εβδομάδες (n=10 κουνέλια σε καθεμία από τις ομάδες)	Υπεροξείδωση λιποειδών, περιεχόμενο σε GSH GPx, GSR και GST σε διάφορους ιστούς	Το ελαιόλαδο ↓ τη λιποειδική υπεροξείδωση, ↑ ολική GSH/GSSG και τη δραστικότητα GPx και GST σε ήπαρ, εγκέφαλο, αορτή, καρδιά, αιμοπετάλια

De La Cruz et al., 2000b[100]	40 αρσενικά κουνέλια Ν. Ζηλανδίας	νορμολιπαιμική δίαιτα (34%SFA) vs αθηρογονική δίαιτα (1%w/w χοληστερόλη και 48% SFA) vs νορμολιπαιμική δίαιτα+15% VOO vs αθηρογονική δίαιτα+ 15%VOO	6 εβδομάδες (n=10 κουνέλια σε καθεμία από τις ομάδες)	Λιπιδαιμικό προφίλ συσσώρευση αιμοπεταλίων, TXB_2, PGI_2, παθολογοανατομία αθηροσκληρωτικών βλαβών	Η αθηρογονική δίαιτα ↑ συσσώρευση των αιμοπεταλίων και TXB_2, το ελαιόλαδο βελτίωσε το λιπιδαιμικό προφίλ, ↓συσσώρευση των αιμοπεταλίων, ↑ TXB_2 και PGI_2 vs αθηρογονικής δίαιτας
Ochoa-Herrera et al., 2001[101]	32 αρσενικά κουνέλια Ν. Ζηλανδίας	Picual VOO vs Picual VOO που έχει υποστεί εξαντλητική διαδικασία πλυσίματος vs Arbequina VOO vs ηλιέλαιο υψηλό σε ελαϊκό οξύ	8 εβδομάδες (n=8 κουνέλια σε καθεμία από τις 4 ομάδες)	Προφίλ λιπαρών οξέων, TBARS, α-TOH, Co-Q_{10}, ρετινόλη, ROOH	Παρόμοια επίπεδα TBARS και αντιοξειδωτικών πλάσματος, το ηλιέλαιο ↓ ελαϊκό οξύ πλάσματος vs των VOO, το Picual VOO ↑ α-TOH, Co-Q_{10} και ↓ ROOH vs των υπόλοιπων ελαίων.
Aguilera et al., 2002[102]	24 αρσενικά κουνέλια Ν. Ζηλανδίας	Αθηρογονική δίαιτα (3%w/w λαρδί και 1.3%w/w χοληστερόλη) vs κουνελοτροφή+ ηλιέλαιο (1.75g/d) vs κουνελοτροφή+ VOO (1.75g/d) vs κουνελοτροφή+ ιχθυέλαιο (1.75g/d)	50 ημέρες η αθηρογονική δίαιτα (n=24) + 30 ημέρες οι 3 δίαιτες με τα έλαια (n=6 κουνέλια σε καθεμία από τις 3 ομάδες)	Παθολογοανατομία και εξέλιξη αορτικών αθηροσκληρωτικών βλαβών	αθηρογονική δίαιτα → ↑ χοληστερόλης στις LDL και στο αορτικό τοίχωμα, ↑ εστέρων χοληστερόλης στο αορτικό τοίχωμα και με τα 3 έλαια, ↑ επέκτασης της βλάβης μόνο με την κατανάλωση ηλιέλαιου

González-Santiago et al., 2006[103]	64 αρσενικά κουνέλια Ν. Ζηλανδίας	Αθηρογονική δίαιτα (3%w/w λαρδί και 1.3%w/w χοληστερόλη) (ομάδα Α) vs κουνελοτροφή+ ηλιέλαιο (3%) (ομάδα C) vs δίαιτα ομάδας C+HT (4mg/kg) (ομάδα Η) vs ομάδα CC vs ομάδα AA vs ομάδα AC vs δίαιτα ομάδας A+EVOO (3%) (ομάδα AO) vs ομάδα AH	30 ημέρες οι ομάδες A, C, H και επιπλέον 30 ημέρες οι ομάδες CC (2 μήνες δίαιτα ομάδας C) AA (2 μήνες δίαιτα ομάδας A) AC (1 μήνα δίαιτα ομάδας A και 1 μήνα δίαιτα ομάδας C) AO (1 μήνα δίαιτα ομάδας A και 1 μήνα δίαιτας ομάδας A+EVOO) AH (1 μήνα δίαιτα ομάδας A και 1 μήνα δίαιτα ομάδας H)	Λιποειδή του αίματος, αντιοξειδωτικό προφίλ, εξέλιξη αορτικών αθηροσκληρωτικών βλαβών	Η δίαιτα της ομάδας AH ↓TC, TAG και ↑HDL-C vs της ομάδας C, η δίαιτα της ομάδας Η δεν είχε καμία επίδραση στα λιποειδή vs της ομάδας C, οι ομάδες που λάμβαναν HT (H, AH) βελτίωσαν το αντιοξειδωτικό τους προφίλ και ↓ το μέγεθος των βλαβών vs της ομάδας C
Karantonis et al., 2006	40 αρσενικά κουνέλια Ν. Ζηλανδίας	Αθηρογονική δίαιτα (1%w/w χοληστερόλη) (ομάδα Α) vs αθηρογονική δίαιτα + OO (15%w/w) (ομάδα B) vs αθηρογονική δίαιτα + OOPLE (15%w/w) (ομάδα C) vs αθηρογονική δίαιτα + OONLE (15%w/w) (ομάδα D)	45 ημέρες (n=10 κουνέλια σε κάθε ομάδα)	Λιποπρωτεϊνικό προφίλ, in vitro οξείδωση πλάσματος, PAF PAF-EC_{50}, PAF-AH, εξέλιξη αορτικών αθηροσκληρωτικών βλαβών, ελαστικότητα αορτικού τοιχώματος	↑PAF στην ομάδα A και ↓PAF στην ομάδα D vs χρόνου t=0, αθηρογονική δίαιτα ↑ PAF και PAF-AH, ↓ελαστικότητα αορτικού τοιχώματος και προκάλεσε αθηροσκληρωτικές βλάβες vs t=0, ομάδες B,C → ↑ PAF-EC_{50}, lag time και PAF-AH vs χρόνου t=0, ↓πάχους βλαβών vs ομάδα A, παρόμοια ελαστικότητα αορτικού τοιχώματος με ομάδα ελέγχου

Tsantila et al., 2007[105]	18 αρσενικά κουνέλια N. Ζηλανδίας	Αθηρογονική δίαιτα (1%w/w χοληστερόλη) (ομάδα A) vs αθηρογονική δίαιτα + OOPL (0.16%w/w) (ομάδα B) vs αθηρογονική δίαιτα + PPL (0.13%w/w) (ομάδα C)	22 ημέρες (n=6 κουνέλια σε κάθε ομάδα	PAF-IC_{50} PAF-IC_{50} (πρόσδεση σε PAF-R) PAF PAF-AH ιστοπαθολογικές αθηροσκληρωτικές βλάβες	OOPL και PPL ↓ PAF-IC_{50} και PAF-IC_{50} πρόσδεσης vs χρόνου t=0 → ισχυρότερη βιολογική δράση των PPL, ↑ PAF, PAF-AH, λιποειδή vs χρόνου t=0, ↑ PAF-EC_{50} και αναστολή ανάπτυξης βλαβών vs ομάδα A → ισχυρότερη αναστολή των PPL
Tsantila et al., 2010[106]	24 αρσενικά κουνέλια N. Ζηλανδίας	Αθηρογονική δίαιτα (1%w/w χοληστερόλη) (δίαιτα A) vs κουνελοτροφή (δίαιτα N) vs κουνελοτροφή+ PPL (0.34mg/g κουνελοτροφής) (δίαιτα P) vs κουνελοτροφή+ σιμβαστατίνη (0.13mg/g κουνελοτροφής) (δίαιτα S)	42 ημέρες τη δίαιτα A (n=24 κουνέλια) 21 ημέρες (μετά το τέλος της δίαιτας A) τις δίαιτες N (n=6 κουνέλια) P (n=6 κουνέλια και S (n=6 κουνέλια)	Λιπιδαιμικό προφίλ, PAF-AH, RPO εξέλιξη αορτικών αθηροσκληρωτικών βλαβών	↑ δυσλιπιδαιμίας και δραστικότητας PAF-AH → δίαιτα A, ↓ δυσλιπιδαιμίας και δραστικότητας PAF-AH → δίαιτες P, S vs A, ↓ RPO μόνο με δίαιτα N, παρόμοια αναστολή της εξέλιξης της αθηροσκλήρωσ ης → δίαιτες P και S

*VOO: παρθένο ελαιόλαδο, EVOO: έξτρα παρθένο ελαιόλαδο, GSR: αναγωγάση γλουταθειόνης, GST: S-τρανσφεράση γλουταθειόνης, Picual VOO: ποικιλία παρθένου ελαιολάδου της Ισπανίας, Arbequina VOO: ποικιλία παρθένου ελαιολάδου της Ισπανίας, Co-Q_{10}: συνένζυμο-Q_{10}, ROOH: υδροϋπεροξείδια, HT: υδροξυτυροσόλη, OO: ελαιόλαδο, OOPLE: εκχύλισμα πολικών λιποειδών ελαιολάδου, OONLE: εκχύλισμα ουδέτερων λιποειδών ελαιολάδου, PAF-EC_{50}: η συγκέντρωση ουσίας που επάγει συσσώρευση του PAF κατά 50% της μέγιστης ικανότητας συσσώρευσής του, PAF-IC_{50}: η συγκέντρωση ουσίας που προκαλεί αναστολή της συσσώρευσης του PAF κατά 50% της μέγιστης ικανότητας αναστολής της ουσίας, PAF-R: υποδοχέας του PAF, OOPL: πολικά λιποειδή ελαιολάδου, PPL: πολικά λιποειδή πυρηνελαίου, RPO: αντίσταση πλάσματος στην οξείδωση

Σε μία μελέτη του 2006 ο Καραντώνης και οι συνεργάτες του (πίνακας 3.4) μελέτησαν την επίδραση της συμπληρωματικής χορήγησης ελαιόλαδου, OOPLE (εκχυλίσματος πολικών λιποειδών ελαιολάδου) και OONLE (εκχυλίσματος ουδέτερων λιποειδών ελαιολάδου) σε κουνέλια τα οποία ταΐζονταν με δίαιτα πλούσια σε χοληστερόλη. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκαν 40 αρσενικά άσπρα κουνέλια N. Ζηλανδίας τα οποία χωρίστηκαν σε τέσσερις ομάδες. Η ομάδα A κατανάλωνε αθηρογονική δίαιτα (χοληστερόλη 1%w/w), η ομάδα B αθηρογονική δίαιτα μαζί με ελαιόλαδο (15%w/w), η ομάδα C αθηρογονική δίαιτα μαζί με OOPLE (15%w/w) και τέλος η ομάδα D αθηρογονική δίαιτα μαζί με OONLE (15%w/w). Η πειραματική παρέμβαση διήρκησε 45 ημέρες. Δείγματα αίματος λήφθηκαν σε χρόνο t=0 ημέρες και σε χρόνο t=45 ημέρες.

Η στατιστική ανάλυση έδειξε ότι και οι τέσσερις δίαιτες οδήγησαν σε στατιστικά σημαντική ($p<0.05$) αύξηση των επιπέδων TC (ολική χοληστερόλη), LDL-C και TAG συγκριτικά με τον χρόνο t=0. Τα επίπεδα της HDL-C (χοληστερόλη λιποπρωτεΐνης χαμηλής πυκνότητας) πλάσματος αυξήθηκαν στατιστικά σημαντικά ($p<0.05$) μόνο μετά την κατανάλωση ελαιολάδου και OONLE αλλά όχι OOPLE, σε σχέση με τον χρόνο t=0. Επιπλέον, στις ομάδες B και C οι τιμές PAF-EC_{50} (η συγκέντρωση ουσίας που επάγει συσσώρευση του PAF κατά 50% της μέγιστης ικανότητας συσσώρευσής του) αυξήθηκαν στατιστικά σημαντικά ($p<0.05$) συγκριτικά με τον χρόνο t=0 (υψηλότερες συγκεντρώσεις PAF απαιτούνταν για να επάγουν τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων), ενώ στις ομάδες A και D μειώθηκαν στατιστικά σημαντικά ($p<0.05$). Τα επίπεδα PAF στο αίμα αυξήθηκαν στατιστικά σημαντικά στην ομάδα A ($p<0.05$), δε διαφοροποιήθηκαν στις ομάδες B και C και μειώθηκαν στατιστικά σημαντικά στην ομάδα D ($p<0.05$) συγκριτικά με τον χρόνο t=0. Τα επίπεδα PAF-AH πλάσματος αυξήθηκαν στατιστικά σημαντικά στις ομάδες A, B και D ($p<0.05$) συγκριτικά με τον χρόνο t=0 ενώ δεν άλλαξαν στην ομάδα C. Τέλος, το πάχος των αθηρωματικών βλαβών ήταν στατιστικά σημαντικά μειωμένο ($p<0.05$) στην αορτή των ζώων των ομάδων B και C συγκριτικά με την αορτή των ζώων της ομάδας A, ενώ δεν υπήρχε στατιστικά σημαντική διαφορά με τα ζώα της ομάδας D. Βασικό συμπέρασμα της μελέτης ήταν ότι μόνο το OOPLE και όχι το OONLE διαθέτει σημαντικές αντι-αθηρογονικές δράσεις[104].

Σε μία πολύ πρόσφατη μελέτη (2009) η Τσαντίλα και οι συνεργάτες της (πίνακας 3.4) μελέτησαν την επίδραση PPL (πολικών λιποειδών πυρηνελαίου), τα οποία σε προηγούμενη μελέτη της ίδιας ομάδας (Tsantila et al., 2007) είχε φανεί ότι είχαν παρόμοιες βιολογικές δράσεις με τα OOPL (πολικά λιποειδή ελαιολάδου), σε μοντέλο αθηροσκλήρωσης κουνελιών. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκαν 24 αρσενικά κουνέλια N. Ζηλανδίας τα οποία κατανάλωναν αθηρογονική δίαιτα (χοληστερόλη 1%w/w) για 6 εβδομάδες προκειμένου να αναπτύξουν

πρώιμη αθηροσκληρωτική νόσο (ομάδα Α). Την έκτη εβδομάδα έξι από αυτά τα κουνέλια θανατώθηκαν και τα υπόλοιπα 18 τυχαιοποιήθηκαν για τρεις εβδομάδες σε τρεις διαφορετικές πειραματικές ομάδες. Η ομάδα Β κατανάλωνε πρότυπη κουνελοτροφή (δίαιτα Ν), η ομάδα C κατανάλωνε πρότυπη κουνελοτροφή με PPL (δίαιτα P) και τέλος η ομάδα D κατανάλωνε πρότυπη κουνελοτροφή με σιμβαστατίνη (δίαιτα S). Αναφορικά με τις δίαιτες P και S κάθε κουνέλι των ομάδων αυτών κατανάλωνε καθημερινά 56±8 mg/d PPL και 7±1mg/d σιμβαστατίνης. Αίμα συλλέχθηκε για t_1=0 εβδομάδες, για t_2=6 εβδομάδες και για t_3=9 εβδομάδες, προκειμένου να προσδιορισθούν τα επίπεδα λιποειδών πλάσματος, η δραστικότητα PAF-AH πλάσματος, η RPO (αντίσταση του πλάσματος στην οξείδωση) και η έκταση των αθηρωματικών βλαβών στην αορτή.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της μελέτης, η αθηρογονική δίαιτα αύξησε στατιστικά σημαντικά ($p<0.05$) όλες τις λιποειδικές παραμέτρους του πλάσματος που σχετίζονται με την αθηροσκλήρωση (TC, LDL-C, HDL-C, LDL/HDL και TAG) συγκριτικά με τον χρόνο t_1=0. Η αθηρογονική δίαιτα είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση της δραστικότητας της PAF-AH πλάσματος ($p<0.05$) ενώ η μορφομετρική ανάλυση τμημάτων της αορτής αποκάλυψε την ανάπτυξη πρώιμων αθηροσκληρωτικών βλαβών. Η αντικατάσταση της αθηρογονικής δίαιτας με πρότυπη κουνελοτροφή μείωσε στατιστικά σημαντικά τα επίπεδα HDL-C και TAG πλάσματος καθώς και την RPO ($p<0.05$), συγκριτικά με την αθηρογονική δίαιτα. Η κατανάλωση της κουνελοτροφής ενέτεινε την ανάπτυξη των αθηροσκληρωτικών βλαβών (πάχος και επιφάνεια) σε σχέση με την ομάδα Α, παρόλο που η χορήγηση αθηρογονικής δίαιτας διακόπηκε.

Η αντικατάσταση της αθηρογονικής δίαιτας τόσο με κουνελοτροφή μαζί με PPL, όσο και με κουνελοτροφή μαζί με σιμβαστατίνη, είχε ως αποτέλεσμα τη στατιστικά σημαντική μείωση ($p<0.05$) των επιπέδων TC, LDL-C, HDL-C και TAG πλάσματος, συγκριτικά με τη δίαιτα Α. Η δραστικότητα PAF-AH μειώθηκε και στις δύο ομάδες ενώ η PAF-EC_{50} μόνο στην ομάδα C. Η RPO στις ομάδες αυτές παρέμεινε αυξημένη, κοντά στα επίπεδα της ομάδας ελέγχου. Τέλος, συγκριτικά με την ομάδα Β οι αθηρωματικές βλάβες των ζώων στις ομάδες αυτές ήταν λιγότερο έκδηλες στο πλαίσιο του πάχους και της επιφάνειας. Παρόλα αυτά, δεν υπήρχε στατιστικά σημαντική διαφορά στην έκταση των βλαβών μεταξύ των ομάδων A, C και D.

Η μελέτη κατέληξε στο συμπέρασμα ότι τα PPL έχουν συγκρίσιμη αποτελεσματικότητα με τη σιμβαστατίνη τουλάχιστον ως προς την αναστολή της εξέλιξης της αθηροσκλήρωσης, γεγονός ιδιαίτερα σημαντικό από άποψη κόστους-αποτελεσματικότητας δεδομένου ότι ο πυρήνας της ελιάς κατά την επεξεργασία της ελαιόπαστας συνήθως

απορρίπτεται (συμπεριλαμβάνεται στα απόβλητα ελαιουργίας) ή επεξεργάζεται περαιτέρω προς παραγωγή πυρηνελαίου, το οποίο είναι από τα φθηνότερα και λιγότερο δημοφιλή έλαια λόγω του ότι θεωρείται πως δε διαθέτει κάποια ιδιαίτερη διατροφική αξία[106].

3.3.4 Μελέτες in vitro

Αυτού του τύπου οι μελέτες διεξάγονται στο εργαστήριο σε επίπεδο κυττάρων τα οποία επωάζουμε με διάφορα βιοδραστικά συστατικά και μελετούμε τις επιδράσεις τους. Οι μελέτες in vitro παρέχουν την πολύ σημαντική δυνατότητα αναζήτησης και ανακάλυψης παθοφυσιολογικών μηχανισμών οι οποίοι μπορεί να εμπλέκονται σε διάφορα παθολογικά και μη φαινόμενα.

Στο χώρο των in vitro μελετών έχουν πραγματοποιηθεί πολλά πειράματα τα οποία μελετούν τις αντιφλεγμονώδεις, αντιοξειδωτικές και αντιθρομβωτικές δράσεις βιοδραστικών συστατικών του ελαιολάδου. Επειδή τα ευρήματα των in vitro μελετών είναι αρκετά περίπλοκα, θα μελετήσουμε κάποιες συγκεκριμένες μελέτες ξεχωριστά, ομαδοποιώντας τις ανάλογα με το εάν εξετάζουν τις αντιφλεγμονώδεις, τις αντιοξειδωτικές ή τις αντιθρομβωτικές δράσεις του ελαιολάδου.

- **Αντιφλεγμονώδεις δράσεις**

Ο Iacono και οι συνεργάτες του σε μία μελέτη που δημοσιεύθηκε μόλις το 2010, εκτίμησαν την επίδραση της OLC και παραγώγων αυτής στην επαγόμενη από LPS (λιποπολυσακχαρίδια) φλεγμονώδη απόκριση, σε κύτταρα ποντικού. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκαν ATDC-5 χονδροκύτταρα (AT805 κυτταρική σειρά τερατοκαρκινώματος) ποντικού, τα οποία προ-επωάστηκαν για 12 ώρες με OLC ή συνθετικά παράγωγα αυτής (αυξανόμενες συγκεντρώσεις 1, 5, 10 και 25μM) και στη συνέχεια επωάστηκαν για 24 ή 48 ώρες με 250ng/ml LPS προερχόμενη από E.coli.

Σε σύγκριση με τα κύτταρα ελέγχου, τα ATDC-5 χονδροκύτταρα που διεγέρθηκαν με LPS, απουσία OLC ή συνθετικών παραγώγων αυτής, εμφάνισαν υψηλότερη συσσώρευση $NO^{\cdot}$ ($p<0.001$). Η προ-επώαση των κυττάρων με OLC ανέστειλε στατιστικά σημαντικά ($p<0.05$) την επαγόμενη από LPS παραγωγή $NO^{\cdot}$ με δοσοεξαρτώμενο τρόπο. Επιπλέον, η προ-επώαση με OLC οδήγησε και σε δοσοεξαρτώμενη αναστολή της έκφρασης iNOS[107].

Σε μία επίσης πολύ πρόσφατα δημοσιευμένη in vitro μελέτη, ο Dell'Agli και οι συνεργάτες του εξέτασαν τη βιολογική δράση φαινολικού εκχυλίσματος και μεμονωμένων φαινολικών ενώσεων VOO, στην έκφραση MMP-9 σε THP-1 μονοκύτταρα (κυτταρική σειρά ανθρώπινων μονοκυττάρων οξείας λευχαιμίας) . Τα THP-1 κύτταρα εκτέθηκαν σε 10ng/ml TNF-a για έξι ώρες απουσία ή παρουσία αυξανόμενων συγκεντρώσεων ολικών φαινολών (0.1, 2.5, 5, 7.5 μg/ml) ή μεμονωμένων φαινολικών ενώσεων (2.5, 5, 10, 25, 50μM) VOO.

Απουσία βιοδραστικών συστατικών του VOO, ο TNF-a αύξησε στατιστικά σημαντικά ($p<0.05$) την έκφραση και έκκριση MMP-9 συγκριτικά με τα κύτταρα αναφοράς. Η προ-επώαση με φαινολικό εκχύλισμα VOO ανέστειλε την επίδραση του TNF-a στην έκκριση MMP-9 με τρόπο ανάλογο της συγκέντρωσης. Η προ-επώαση με 7.5 μg/ml φαινολικού εκχυλίσματος VOO κατάργησε τελείως την επίδραση του TNF-a στην έκφραση MMP-9. Όταν αξιολογήθηκαν μεμονωμένες φαινολικές ενώσεις του VOO βρέθηκε ότι η Ole, η AP και η LU είναι δραστικές σε μικρομοριακές συγκεντρώσεις, στην εξουδετέρωση της επίδρασης του TNF-a. Παρόλα αυτά, η AP και η LU ήταν δραστικές σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις από την Ole καθώς στα 10μM και τα δύο φλαβονοειδή μείωσαν την έκκριση MMP-9 κατά 80%, ενώ η Ole μόνο κατά 25%. Αντίθετα, η T, η HT και η HVA (ομοβανιλλυλική αλκοόλη) μέχρι τη συγκέντρωση των 50μM δεν είχαν καμία επίδραση στην έκκριση MMP-9.

Προχωρώντας σε επίπεδο παθοφυσιολογικού μηχανισμού, οι ερευνητές ανακάλυψαν ότι η ικανότητα του φαινολικού εκχυλίσματος και των μεμονωμένων φαινολικών ενώσεων του VOO να εμποδίζουν την επαγόμενη από TNF-a έκφραση και έκκριση MMP-9, μπορεί να αποδοθεί στη δυσλειτουργία του συστήματος NF-kB και συγκεκριμένα στην αναστολή της σηματοδότησης του μορίου που προκαλείται από τα βιοδραστικά αυτά συστατικά[108].

Τέλος, σε μία μελέτη που δημοσιεύθηκε από τον Zhang και τους συνεργάτες του το 2009 για τις αντιφλεγμονώδεις επιδράσεις της HT, βρέθηκε ότι αυτές πιθανόν να αποδίδονται στην καταστολή της έκφρασης COX-2 (κυκλοξυγονάσης-2) και iNOS. Πιο συγκεκριμένα, σκοπός της μελέτης ήταν να εξετάσει τον αντιφλεγμονώδη μηχανισμό της HT, μέσω προσδιορισμού της έκφρασης iNOS και COX-2, του σχηματισμού TNF-a και της απελευθέρωσης $NO^{\cdot}$, σε ανθρώπινα μονοκύτταρα σειράς THP-1 τα οποία διεγείρονται με LPS.

Η διέγερση των THP-1 κυττάρων με 1μg/ml LPS για 12 ώρες αύξησε στατιστικά σημαντικά ($p<0.05$) την παραγωγή $NO^{\cdot}$ από την iNOS και την έκφραση COX-2, σε σύγκριση με τα κύτταρα αναφοράς. Η προ-επώαση των κυττάρων με HT κατέστειλε την απελευθέρωση $NO^{\cdot}$ που επάγεται από 1μg/ml LPS. Μείωσε επίσης στατιστικά σημαντικά ($p<0.05$) την επαγόμενη

από LPS μεταγραφή TNF-a, iNOS και COX-2 με δοσοεξαρτώμενο τρόπο. Τέλος, η προ-επώαση των κυττάρων με HT (50 και 100μM) μείωσε στατιστικά σημαντικά ($p<0.05$) την έκφραση iNOS, COX-2 και TNF-a με δοσοεξαρτώμενο τρόπο[109].

- **Αντιοξειδωτικές δράσεις**

Μία από τις πιο συχνά μελετώμενες και ξεκάθαρες in vitro αντιοξειδωτικές δράσεις βιοδραστικών συστατικών του ελαιολάδου είναι η αναστολή της οξείδωσης της LDL.

Ο Leenen και οι συνεργάτες του εξέτασε την επίδραση μεμονωμένων φαινολικών ενώσεων VOO και εκχυλισμάτων VOO με διαφορετική σύνθεση φαινολικών συστατικών, στην αντίσταση της LDL στην οξείδωση. Τα πλούσια σε φαινολικά συστατικά εκχυλίσματα VOO ανέστειλαν την από Cu^{+2} in vitro οξείδωση της LDL. Ως προς την επίδραση μεμονωμένων φαινολικών ενώσεων, η HT και η OleA φάνηκε ότι ήταν πιο αποτελεσματικές από τα μονο-υδρόξυ ανάλογά τους (T και άγλυκη μορφή λιγκστροσίδης αντίστοιχα) στην αύξηση της αντίστασης της LDL στην οξείδωση[110].

Μία από τις πιο πρόσφατες in vitro μελέτες σχετικά με τις αντιοξειδωτικές δράσεις του ελαιολάδου δημοσιεύθηκε το 2011 από τον Nakbi και τους συνεργάτες του. Σκοπός της μελέτης ήταν να αξιολογήσει την ικανότητα της T και της HT του VOO να εμποδίζουν την έκκριση $O_2^{\cdot -}$ σε κυτταρική σειρά ανθρώπινων THP-1 μονοκυττάρων. Τα κύτταρα αφού πρώτα διαφοροποιήθηκαν σε μακροφάγα, προ-επωάστηκαν σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις T (0.05, 0.15, 0.5, 2 mM) και HT (1, 5, 10, 50μM) για 4, 15 και 24 ώρες και κατόπιν διεγέρθηκαν με PMA (μυριστικό οξικό φορβολικό άλας). Το PMA προκάλεσε στατιστικά σημαντική αύξηση ($p<0.05$) των επιπέδων $O_2^{\cdot}$, σε σχέση με τα κύτταρα αναφοράς. Τα κύτταρα που προ-επωάστηκαν με HT, στις 15 ώρες εμφάνισαν μειωμένη παραγωγή $O_2^{\cdot}$ κατά 50% σε σύγκριση με αυτά που δεν προ-επωάστηκαν. Παρόμοια επίδραση εμφάνισε και η T αλλά σε υψηλότερες συγκεντρώσεις και μόνο στις 24 ώρες προ-επώασης[111].

Η επίδραση της HT στο οξειδωτικό στρες έχει μελετηθεί και σε προηγούμενες in vitro μελέτες και συγκεκριμένα από τον Goya και τους συνεργάτες του σε μία δημοσίευση του 2007. Σκοπός της μελέτης ήταν η εκτίμηση της επίδρασης της HT στην οξειδοαναγωγική κατάσταση και στην κυτταρική βιωσιμότητα ανθρώπινων ηπατικών G_2 κυττάρων ($HepG_2$ cells) καθώς και η επίδραση αυτής έναντι του οξειδωτικού στρες που επάγεται από t-BOOH (τερτ-βουτυλο-υδροϋπεροξείδιο). Για την εξαγωγή συμπερασμάτων ως προς την κυτταρική βιωσιμότητα, προσδιορίστηκε η δραστικότητα LDH (γαλακτικής αφυδρογονάσης) και ως προς

την οξειδοαναγωγική κατάσταση και το οξειδωτικό στρες προσδιορίστηκαν η GSH, η δραστικότητα GP_X, η παραγωγή ROS και η MDA.

Η κυτταρική ακεραιότητα και το αντιοξειδωτικό προφίλ των κυττάρων δεν επηρεάστηκαν από την προσθήκη διαφορετικών συγκεντρώσεων HT (10, 20, 30, 40μM). Η προ-επώαση των $HepG_2$ κυττάρων με 10-40 μM HT για 2 ή 20 ώρες, εμπόδισε πλήρως την κυτταρική καταστροφή καθώς επίσης τη μείωση της συγκέντρωσης GSH και την αύξηση της συγκέντρωσης MDA, επιδράσεις που προκαλεί η επώαση των κυττάρων με t-BOOH. Επιπλέον, η παραγωγή ROS και η αύξηση της δραστικότητας GPx, που επάγονται από την επώαση των κυττάρων με t-BOOH, μειώθηκαν στατιστικά σημαντικά ($p<0.05$) σε εκείνα τα κύτταρα που προ-επωάστηκαν με αυξανόμενες συγκεντρώσεις HT.

Τα αποτελέσματα της μελέτης ξεκάθαρα αποκαλύπτουν ότι η επώαση THP-1 μονοκυττάρων με HT επηρεάζει θετικά το αμυντικό αντιοξειδωτικό τους σύστημα, ευνοώντας την κυτταρική ακεραιότητα και την ανοχή των κυττάρων σε στρεσσογόνες καταστάσεις, όπως το οξειδωτικό στρες[112].

Τέλος, εκτός από τις ευρέως μελετώμενες φαινολικές ενώσεις του ελαιολάδου (Ole, HT) υπάρχουν και μελέτες οι οποίες έχουν ασχοληθεί με τις αντιοξειδωτικές επιδράσεις λιγότερο γνωστών φαινολικών ενώσεων στο ελαιόλαδο. Μία τέτοια μελέτη είναι αυτή που δημοσιεύθηκε το 2009 από την Paiva-Martins και τους συνεργάτες της οι οποίοι διερεύνησαν τις αντιοξειδωτικές δράσεις των 3,4-DHPEA-EA (3,4-διϋδροξυ-φαινυλ-αιθανολ-ελενολικό οξύ) και 3,4-DHPEA-EDA (διαλδεΰδη 3,4- διϋδροξυ-φαινυλ-αιθανολ-ελενολικού οξέος), που αποτελούν άγλυκες μορφές της Ole. Επιπλέον, οι ερευνητές συνέκριναν τις επιδράσεις αυτών με τις αντίστοιχες της Ole και της HT στην in vitro, επαγόμενη από AAPH (2,2΄-αζο-μπις(2-αμιδινοπροπάνιο) διϋδροχλωρικό άλας), οξείδωση RBC (ερυθροκυττάρων).

Τα RBC προ-επωάστηκαν με αυξανόμενες συγκεντρώσεις (3, 6, 10, 20, 40, 80μM) των τεσσάρων αυτών φαινολικών ενώσεων πριν την προσθήκη AAPH. Και οι τέσσερις φαινολικές ενώσεις φάνηκε να προστατεύουν στατιστικά σημαντικά ($p<0.05$) τα RBC από την οξειδωτική καταστροφή με δοσοεξαρτώμενο τρόπο. Παρόλα αυτά, στη μικρότερη συγκέντρωση προ-επώασης (3μM) μόνο η 3,4-DHPEA-EDA και η HT εξακολουθούσαν να προστατεύουν τα RBC από την αιμόλυση ενώ στα 20μM η κατάταξη των τεσσάρων φαινολικών ενώσεων, αναφορικά με την αντιοξειδωτική τους ικανότητα, είχε την εξής ακολουθία: 3,4-DHPEA-EDA>HT>OE. Το 3,4-DHPEA-EA δε φάνηκε να έχει καμία προστασία. Μόνο στη μέγιστη συγκέντρωση προ-επώασης (80μM) και οι τέσσερις φαινολικές ενώσεις ήταν αποτελεσματικές στην προστασία των RBC από την οξειδωτική καταστροφή. Τα αποτελέσματα της μελέτης

έδειξαν ότι η 3,4-DHPEA-EDA είναι το πιο βιολογικά δραστικό φαινολικό συστατικό του ελαιολάδου στην προστασία των RBC από την in vitro οξειδωτική καταστροφή[113].

- **Αντιθρομβωτικές επιδράσεις**

Τα μικροσυστατικά που υπάρχουν στο ελαιόλαδο εκτός από πολύ σημαντικές αντιφλεγμονώδεις και αντιοξειδωτικές δράσεις διαθέτουν και αντιθρομβωτικές ιδιότητες.

Σε μία in vitro μελέτη που πραγματοποιήθηκε από τον Καραντώνη και τους συνεργάτες του μελετήθηκαν τα TL (ολικά λιποειδή), τα TPL (ολικά πολικά λιποειδή), τα TNL (ολικά ουδέτερα λιποειδή) καθώς και λιποειδικά κλάσματα αυτών από ελαιόλαδο, σπορέλαιο, σογιέλαιο, ηλιέλαιο, καλαμποκέλαιο και σησαμέλαιο, ως προς την ικανότητά τους να επάγουν ή να αναστέλλουν την in vitro συσσώρευση πλυμένων αιμοπεταλίων κουνελιών. Τα TL και TNL όλων των ελαίων προκάλεσαν αναστολή της επαγόμενης από PAF συσσώρευσης των αιμοπεταλίων με δοσοεξαρτώμενο τρόπο. Τα TPL από όλα τα δείγματα ελαιολάδου (12 διαφορετικά) εμφάνισαν ανασταλτική δράση έναντι της δράσης του PAF με δοσοεξαρτώμενο τρόπο. Παρόλο που όλα τα διαφορετικά έλαια προκάλεσαν αναστολή της δράσης του PAF, φάνηκε ότι τα δείγματα ελαιολάδου ήταν πιο βιοδραστικά από τα διάφορα είδη σπορέλαιων, με εξαίρεση το σησαμέλαιο το οποίο είχε παρόμοια βιολογική ισχύ με το ελαιόλαδο. Μάλιστα, η αντι-αιμοπεταλιακή δράση του ελαιολάδου αποδόθηκε κυρίως στα TPL στα οποία ύστερα από διαχωρισμό με HPLC βρέθηκαν ανταγωνιστές του PAF.[75].

Μία μελέτη που δημοσιεύθηκε από τον Dell'Agli και τους συνεργάτες του το 2008 ανέφερε ότι το πλούσιο σε φαινολικές ενώσεις ελαιόλαδο αναστέλλει την in vitro συσσώρευση των αιμοπεταλίων, αναστέλλοντας τη δράση της cAMP-PDE (κυκλικής αδενόσινο μονοφωσφορικής-φωσφοδιεστεράσης). Συγκεριμένα, εξετάστηκαν τέσσερα εκχυλίσματα από διαφορετικά ελαιόλαδα, με υψηλό και χαμηλό περιεχόμενο φαινολικών ενώσεων, ως προς την ικανότητά τους να αναστέλλουν την in vitro επαγόμενη από θρομβίνη, συσσώρευση αιμοπεταλίων. Τα εκχυλίσματα με υψηλό φαινολικό περιεχόμενο περιείχαν 200-500mg/kg φαινολικών ενώσεων και εκείνα με χαμηλό φαινολικό περιεχόμενο 46mg/kg φαινολικών ενώσεων. Οι φαινόλες που αναγνωρίστηκαν στα εκχυλίσματα αυτά ήταν η HT, η T, η OleA και τα φλαβονοειδή QU (κερκετίνη), LU και AP.

Όλα τα εκχυλίσματα ελαιολάδου ανέστειλαν τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων. Στα 10μM η ανασταλτική επίδραση των μεμονωμένων φαινολών, συμπεριλαμβανομένης της HVA, ακολούθησε την εξής σειρά: OleA>LU>HT=T=QU=HVA. Επιπλέον, όλα τα εκχυλίσματα ελαιολάδου ανέστειλαν την

cAMP-PDE. Η μελέτη συμπέρανε ότι η αναστολή της δράσης της cAMP-PDE αποτελεί έναν από τους μηχανισμούς μέσω των οποίων οι φαινολικές ενώσεις του ελαιολάδου αναστέλλουν τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων[114].

Τέλος, ο De Roos και οι συνεργάτες του σε μία μελέτη που δημοσιεύθηκε το 2011 μελέτησαν τις επιδράσεις εκχυλίσματος ελαιολάδου πλούσιου σε συγκεκριμένες φαινολικές ενώσεις [HT και 3,4-DHPG (3,4-διϋδροξυφαινυλογλυκόλη)], στην in vitro ενεργοποίηση και συσσώρευση ανθρώπινων αιμοπεταλίων. Για τον προσδιορισμό της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων επωάστηκε PRP (πλάσμα πλούσιο σε αιμοπετάλια) με διαφορετικές συγκεντρώσεις εκχυλίσματος ελαιολάδου (100, 200 και 500mg/L), HT και 3,4-DHPG. Ως αγωνιστές της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων χρησιμοποιήθηκαν το κολλαγόνο και το TRAP (πεπτίδιο ενεργοποίησης υποδοχέα θρομβίνης).

Το εκχύλισμα ελαιολάδου οδήγησε σε στατιστικά σημαντική ($p<0.05$) αναστολή της επαγόμενης τόσο από κολλαγόνο όσο και από TRAP συσσώρευσης των αιμοπεταλίων κατά 5, 7, 28% και 5, 8 και 16% αντίστοιχα. Η επώαση με HT δεν οδήγησε σε στατιστικά σημαντική αναστολή της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων ενώ η επώαση με 3,4-DHPG ανέστειλε στατιστικά σημαντικά μόνο την επαγόμενη από κολλαγόνο συσσώρευση των αιμοπεταλίων. Παρόλα αυτά, όταν αναμίχθηκαν οι δύο αυτές φαινολικές ενώσεις η συσχέτιση έγινε στατιστικά σημαντική. Οι ερευνητές κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι το εκχύλισμα ελαιολάδου λόγω του συνδυασμού στη σύστασή του συγκεκριμένων φαινολικών ενώσεων έχει την ικανότητα να αναστέλλει την in vitro επαγόμενη από διάφορους αγωνιστές ενεργοποίηση και συσσώρευση των αιμοπεταλίων[115].

3.4 Υδατικά απόβλητα ελαιουργίας

Η παραλαβή του VOO μέσω μηχανικής πίεσης του φρούτου της ελιάς οδηγεί σε δύο βασικά απόβλητα: τον ελαιοπυρήνα και τα OMWW (υδατικά απόβλητα ελαιουργίας)[105]. Καθώς το πειραματικό κομμάτι της παρούσης πτυχιακής εργασίας περιλαμβάνει τη χορήγηση βιοδραστικών συστατικών εκχυλίσματος OMWW, θα επικεντρωθούμε στη μελέτη του συγκεκριμένου αποβλήτου.

Κατά την παραγωγή του ελαιολάδου, πριν τη διαδικασία διαχωρισμού του ελαίου από την πάστα της ελιάς, χρησιμοποιείται μια σημαντική ποσότητα νερού για το συνεχές

ξέπλυμα της ελαιόπαστας (διαδικασία μάλαξης). Το νερό που χρησιμοποιείται σε αυτή τη διαδικασία αποτελεί αυτό που ονομάζουμε OMWW, που μαζί με το νερό που περιέχεται ενδογενώς στην ελαιόπαστα απαρτίζει περίπου το 50% της συνολικής της απόδοσης.

Παρόλα αυτά, εξαιτίας της αποτυχίας ανάπτυξης της κατάλληλης τεχνολογίας για την αποτελεσματική αξιοποίηση των OMWW, τα τελευταία απορρίπτονται από τις βιομηχανίες ελαιουργίας, αντιπροσωπεύοντας ένα σημαντικό οικονομικό βάρος στο χώρο της ελαιοπαραγωγής, πόσο μάλλον εάν υπολογίσουμε ότι παράγονται τεράστιες ποσότητες αυτού του αποβλήτου κάθε χρόνο (περίπου 800.000 τόννοι μόνο στην Ιταλία)[116].

Ξέχωρα όμως από το οικονομικό ζήτημα, καθώς συνήθως τα OMWW καταλήγουν στα υδάτινα οικοσυστήματα, προκύπτουν σημαντικά οικολογικά θέματα που αφορούν στην ισορροπία και στη βιωσιμότητα των οικοσυστημάτων αυτών, δεδομένου ότι τα OMWW περιέχουν υψηλό περιεχόμενο οργανικών μορίων, ιδιαίτερα μιγμάτων φαινολών. Οι ενώσεις αυτές είναι ιδιαίτερα τοξικές για τους υδρόβιους οργανισμούς και είναι δύσκολο να αποσυντεθούν[74]. Σε ορισμένες Ευρωπαϊκές χώρες, προκειμένου να αποφεύγεται όσο το δυνατόν η απόρριψη τους στα υδάτινα οικοσυστήματα έχει νομιμοποιηθεί η λίπανση με αυτά των αγρών και των γεωργικών εκτάσεων. Παρόλα αυτά, ακόμα και στην περίπτωση αυτή, το οικολογικό πρόβλημα δε λύνεται καθώς το μεγάλο οργανικό φορτίο αυτών των αποβλήτων είναι ιδιαίτερα φυτοτοξικό με αποτέλεσμα να απειλούνται δυνητικά οι γεωργικές καλλιέργειες[117].

Για τους παραπάνω λόγους, έχει ξεκινήσει μια προσπάθεια αποτελεσματικής αξιοποίησης των OMWW. Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, αποτελούν σημαντική πηγή φαινολικών ενώσεων. Από μελέτες έχει φανεί ότι περιέχουν 200 φορές μεγαλύτερη ποσότητα φαινολικών ενώσεων από το ελαιόλαδο, με την HT να αποτελεί το πιο άφθονο φαινολικό συστατικό[118]. Εκτός από την HT περιέχονται και άλλες χαμηλού μοριακού βάρους (καφεϊκό οξύ, τυροσόλη, π-κουμαρικό οξύ, φερουλικό οξύ, συριγγικό οξύ, προτοκατεχουϊκό οξύ) και υψηλού μοριακού βάρους (ταννίνες, ανθοκυανίνες) φαινολικές ενώσεις[119].

Συνεπώς, τα OMWW θα μπορούσαν δυνητικά να αποτελούν μια πολύ φθηνή πηγή βιοδραστικών ουσιών, μεταξύ των οποίων και οι φαινολικές ενώσεις, στις οποίες έχουν κατά καιρούς αποδοθεί σημαντικές βιολογικές δράσεις (αντιοξειδωτικές, αντιθρομβωτικές, αντιφλεγμονώδεις). Όντως, τα τελευταία χρόνια υπάρχει αυξανόμενο επιστημονικό ενδιαφέρον για την εκχύλιση φαινολικών ενώσεων και άλλων βιοδραστικών συστατικών από τα OMWW, προκειμένου να εκτιμηθούν οι επιδράσεις τους στην υγεία[74].

- **Μελέτες in vitro**

Από τους πρώτους ερευνητές που ασχολήθηκαν με τη μελέτη των βιολογικών δράσεων των OMWW ήταν ο Visioli και οι συνεργάτες του[120]. Σε μία από τις πρώτες του δημοσιεύσεις πάνω στο θέμα, εξέτασε τις in vitro αντιοξειδωτικές και αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες διαφορετικών εκχυλισμάτων OMWW. Ανακάλυψε ότι τα εκχυλίσματα OMWW με τα βιολογικά δραστικά συστατικά που περιέχουν, είναι ικανά να αναστείλουν την οξείδωση της LDL και να επάγουν την εκκαθάριση προ-οξειδωτικών μορίων όπως η $O_2^{\cdot -}$ και το HOCl. Επιπλέον, τα δύο από τα τρία συνολικά εκχυλίσματα που χρησιμοποίησε, ανέστειλαν την παραγωγή LTs (λευκοτριένια) από ανθρώπινα ουδετερόφιλα. Ανέφερε τελικά ότι η βιολογική ισχύς των εκχυλισμάτων εξαρτάται από το βαθμό της χημικής τους επεξεργασίας (ραφινάρισμα) και ότι τα εκχυλίσματα που περιείχαν χαμηλού μοριακού βάρους φαινολικές ενώσεις ήταν τα περισσότερο αποτελεσματικά[116].

Επιπλέον, η μελέτη του Léger και των συνεργατών του είχε ως στόχο να εξετάσει εάν τα ανθρώπινα THP-1 κύτταρα είναι ικανά να παράγουν μικρότερες ποσότητες $O_2^{\cdot -}$ παρουσία εκχυλισμάτων OMWW, πλούσιων σε φαινολικές ενώσεις. Φάνηκε ξεκάθαρα ότι τα εκχυλίσματα αυτά μείωσαν την παραγωγή $O_2^{\cdot -}$ από τα κύτταρα, καταλήγοντας στο συμπέρασμα ότι είναι ικανά να εκκαθαρίζουν και να καταστέλλουν την παραγωγή $O_2^{\cdot -}$ στα κύτταρα[121].

Τέλος, σε μία σχετικά πρόσφατη μελέτη που δημοσιεύτηκε το 2007 από τον Schaffer και τους συνεργάτες του, αναφέρθηκαν για πρώτη φορά στη βιβλιογραφία οι αντιοξειδωτικές επιδράσεις εκχυλίσματος OMWW σε εγκεφαλικά κύτταρα. Συγκεκριμένα, διερευνήθηκε η αποτελεσματικότητα ενός εκχυλίσματος OMWW πλούσιου σε HT, στην αναστολή της επαγόμενης από Fe^{+2} και $NO^{\cdot}$ κυτταροτοξικότητας, σε εγκεφαλικά κύτταρα ποντικού. Η προ-επώαση των εγκεφαλικών κυττάρων με HT μείωσε στατιστικά σημαντικά ($p<0.05$) την κυτταροτοξική επίδραση και των δύο αυτών προ-οξειδωτικών. Η επιστημονική ομάδα πραγματοποίησε και επιπλέον πειράματα προκειμένου να αξιολογηθεί η βιοδραστικότητα της HT στον εγκέφαλο ex vivo, όπου φάνηκε ότι η υποχρόνια (12 ημέρες) αλλά όχι η οξεία χορήγηση 100mg υδροξυτυροσόλης/kg Σ.Β, βελτιώνει την αντίσταση των εγκεφαλικών κυττάρων ποντικού στο οξειδωτικό στρες, όπως αυτή αξιολογήθηκε από τη μειωμένη υπεροξείδωση των λιποειδών[122].

- **Μελέτες in vivo**

Εξίσου ενδιαφέροντα είναι τα ευρήματα in vivo μελετών για τις βιολογικές δράσεις εκχυλισμάτων OMWW και των βιοδραστικών τους συστατικών. Συγκεκριμένα, ο

Visioli και οι συνεργάτες του έχουν μελετήσει εκτενώς τις βιολογικές επιδράσεις εκχυλισμάτων OMWW σε πειραματόζωα.

Σε μία από αυτές τις μελέτες εξέτασαν τις επιδράσεις χαμηλής δόσης (5mg/kg) εκχυλίσματος OMWW με HT (414μg/kg), στο οξειδωτικό στρες που επάγεται σε αρουραίους ύστερα από έκθεση σε παθητικό κάπνισμα, προσδιορίζοντας ως δείκτη οξειδωτικού στρες την έκκριση 8-iso-PGF_{2a} στα ούρα. Η έκθεση των ζώων σε παθητικό κάπνισμα αύξησε την έκκριση 8-iso-PGF_{2a} στα ούρα κατά 44% στις 48 ώρες και κατά 55% στις 96 ώρες σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου. Η χορήγηση του εκχυλίσματος OMWW αποδείχτηκε ικανή να εμποδίζει πλήρως την αύξηση της έκκρισης 8-iso-PGF_{2a} στα ούρα στις 48 ώρες και να προκαλεί χαμηλότερες αυξήσεις αυτού στις 96 ώρες. Τελικά, φάνηκε ότι χαμηλή δόση HT χορηγούμενη ως εκχύλισμα OMWW σε αρουραίους, μειώνει τις συνέπειες του επαγόμενου από παθητικό κάπνισμα οξειδωτικού στρες[123].

Σε άλλη δημοσίευση της ίδια επιστημονικής ομάδας μελετήθηκε η επίδραση εκχυλίσματος OMWW με HT στην αντιοξειδωτική ικανότητα του πλάσματος αρουραίων. Συγκεκριμένα, τρεις ομάδες αρσενικών Sprague-Dawley αρουραίων έλαβαν 1, 5 ή 10mg/kg εκχυλίσματος OMWW, καθένα από τα οποία περιείχε 41.4, 207 και 414μg/kg HT αντίστοιχα. Μόνο η χορήγηση εκχυλίσματος OMWW πλούσιου σε HT (10mg/kg) συσχετίστηκε στατιστικά σημαντικά ($p<0.05$) με αύξηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας του πλάσματος[124].

Σε μία πιο πρόσφατη δημοσίευση (2007) ο Fki και οι συνεργάτες του εξέτασαν τις υποχοληστερολαιμικές επιδράσεις εκχυλίσματος OMWW και καθαρής HT, σε αρουραίους οι οποίοι κατανάλωναν υπερχοληστερολαιμική δίαιτα. Χρησιμοποιήθηκαν 48 Wistar αρουραίοι οι οποίοι τυχαιοποιήθηκαν σε έξι ομάδες (n=8 αρουραίοι σε κάθε ομάδα). Η πρώτη ομάδα λάμβανε πρότυπη δίαιτα ελέγχου. Η δεύτερη ομάδα λάμβανε δίαιτα υψηλή σε χοληστερόλη (πρότυπη δίαιτα + χοληστερόλη 1%w/w + χολικά άλατα 0.25%w/w), η τρίτη και τέταρτη ομάδα λάμβαναν τη δίαιτα της δεύτερης ομάδας μαζί με καθαρή HT (2.5 και 5mg/kg αντίστοιχα) και τέλος η πέμπτη και έκτη ομάδα λάμβαναν τη δίαιτα της δεύτερης ομάδας μαζί με εκχύλισμα OMWW (5 και 10mg/kg αντίστοιχα).

Ύστερα από 36 εβδομάδες παρέμβασης προσδιορίστηκαν τα επίπεδα λιποειδών ορού, τα TBARS σε διάφορους ιστούς και οι δράσεις των ενζύμων SOD και CAT στο ήπαρ. Η υπερχοληστερολαιμική δίαιτα αύξησε στατιστικά σημαντικά ($p<0.05$) τα επίπεδα TC και LDL-C ορού. Η χορήγηση χαμηλής δόσης (2.5mg/kg) καθαρής HT και υψηλής δόσης (10mg/kg) εκχυλίσματος OMWW μείωσε στατιστικά σημαντικά τα επίπεδα TC και LDL-C ορού και αύξησε τα επίπεδα HDL-C ορού ($p<0.05$), συγκριτικά με την πρώτη ομάδα. Επιπλέον, τα

TBARS στο ήπαρ, στην καρδιά, στους νεφρούς και στην αορτή μειώθηκαν στατιστικά σημαντικά ($p<0.05$) ύστερα από τη χορήγηση καθαρής HT και εκχυλίσματος OMWW σε σύγκριση με τις τιμές των αρουραίων της υπερχοληστερολαιμικής δίαιτας. Τέλος, το εκχύλισμα OMWW αύξησε στατιστικά σημαντικά ($p<0.05$) τη δραστικότητα των SOD και CAT στο ήπαρ συγκριτικά με την υπερχοληστερολαιμική δίαιτα.

Ερμηνεύοντας τα αποτελέσματα, οι ερευνητές πρότειναν ότι η υποχοληστερολαιμική επίδραση τόσο της καθαρής HT όσο και του εκχυλίσματος OMWW πιθανόν να οφείλεται στην ικανότητα τους α) να μειώνουν τα επίπεδα TC και LDL-C στον ορό β) να επιβραδύνουν τη διαδικασία της λιποειδικής υπεροξείδωσης και γ) να βελτιώνουν την αντιοξειδωτική δράση ενδογενών αντιοξειδωτικών ενζύμων[125].

Μεταβαίνοντας από τις μελέτες σε πειραματόζωα στις μελέτες σε ανθρώπους, χαρακτηριστικό παράδειγμα κλινικής μελέτης που μελέτησε τις επιδράσεις εκχυλίσματος OMWW, είναι αυτή που δημοσιεύθηκε το 2005 από τον Léger και τους συνεργάτες του, οι οποίοι αξιολόγησαν τις επιδράσεις φαινολικού εκχυλίσματος OMWW πλούσιου σε HT σε ασθενείς με διαβήτη τύπου I. Πέντε διαβητικοί ασθενείς λάμβαναν 2.5ml εκχυλίσματος (25mg HT) κατά την πρώτη ημέρα της μελέτης και τις επόμενες τρεις ημέρες 1.25ml (12.5mg HT). Το εκχύλισμα χορηγούνταν μαζί με το πρωινό, ως μίγμα μέσα σε γιαούρτι. Δείγμα αίματος λήφθηκε σε χρόνο t_0=0 ημέρες, σε χρόνους t_1=1 ώρα, t_2= 2 ώρες, t_3=3 ώρες και t_4=4 ώρες μετά το χρόνο t_0 καθώς και σε χρόνο t_5=4 ημέρες. Επίσης, κατά τη διάρκεια της παρέμβασης συλλέχθηκαν ούρα 24-ώρου.

Η παραγωγή TXB_2 μειώθηκε κατά 46% σε σύγκριση με το χρόνο t_0. Τα επίπεδα των αντιοξειδωτικών βιταμινών του πλάσματος (A, E, C και β-καροτένιο) και ορισμένων ενδογενών αντιοξειδωτικών ουσιών (αλβουμίνη, χολερυθρίνη, ουρικό οξύ) παρέμειναν αμετάβλητα ενώ η αντιοξειδωτική ικανότητα του πλάσματος βελτιώθηκε μόνο στη 1ώρα μετά το χρόνο t_0. Τέλος, τα επίπεδα 8-iso-PGF_{2a} στα ούρα εμφάνισαν υψηλή μεταβλητότητα και δε φάνηκε να επηρεάζονται στατιστικά σημαντικά από τη χορήγηση HT. Οι ερευνητές κατέληξαν ότι η κύρια επίδραση του εκχυλίσματος ήταν η αναστολή της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων, με αποτέλεσμα την πιθανή πρόληψη θρομβωτικών και μικροθρομβωτικών επιπλοκών[126].

Τέλος, η επιστημονική ομάδα του Visioli για ακόμη μία φορά, δημοσίευσε μόλις το 2009 τα αποτελέσματα μιας μεταγευματικής κλινικής μελέτης που πραγματοποιήθηκε σε 98 υγιείς εθελοντές, προκειμένου να διερευνήσει εάν τα OMWW θα μπορούσαν να επηρεάσουν ορισμένες παραμέτρους του οξειδωτικού προφίλ αυτών. Στα άτομα χορηγήθηκαν 2ml OMWW (περίπου 50mg HT και 8mg Ole) και έγινε αιμοληψία μία ώρα μετά. Προσδιορίστηκαν η

αντιοξειδωτική ικανότητα του πλάσματος και η ολική και ανηγμένη GSH. Δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στην αντιοξειδωτική ικανότητα του πλάσματος μεταγευματικά σε σύγκριση με το χρόνο t=0. Αντιθέτως, διαπιστώθηκε στατιστικά σημαντική αύξηση ($p<0.05$) στη συγκέντρωση ολικής GSH (οξειδωμένη και ανηγμένη)[127].

ΣΚΟΠΟΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Ο σκοπός της παρούσας πτυχιακής εργασίας είναι η μελέτη της ικανότητας εκχυλίσματος υδατικών αποβλήτων ελαιουργίας πλούσιου σε βιολογικώς δραστικά λιποειδή, το οποίο προστίθεται σε ημίπαχο γιαούρτι του εμπορίου, να αναστέλλει και να υποστρέφει την ανάπτυξη αθηρωματικών πλακών σε πειραματικό μοντέλο υπερχοληστερολαιμικών κουνελιών, τα οποία έχουν αναπτύξει πρώιμη αθηρωματική νόσο ύστερα από τη χρόνια κατανάλωση αθηρογονικής δίαιτας με χοληστερόλη 1% w/w. Προκειμένου να καθοριστεί η βιολογική δράση του τροφίμου που χορηγήθηκε στην εξέλιξη της αθηροσκλήρωσης, προσδιορίστηκε η παραγωγή συγκεκριμένων προϊόντων λιποειδικής υπεροξείδωσης στον ορό και στους ιστούς των πειραματοζώων.

.

Β) ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4^{Ο}

ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

4.1 Απλό γιαούρτι του εμπορίου 2% λιπαρών και εμπλουτισμένο με εκχύλισμα OMWW πλούσιο σε BAL γιαούρτι του εμπορίου, ως πηγή τροφής για τα κουνέλια των πειραματικών ομάδων

Το απλό γιαούρτι αποτελεί προϊόν της Ελληνικής εταιρείας γάλακτος ΜΕΒΓΑΛ. Το εκχύλισμα OMWW πλούσιο σε BAL, με το οποίο εμπλουτίζεται το απλό γιαούρτι, προέρχεται από το ελαιοτριβείο της οικογένειας "Νικολάου" (Μέγαρα Αττικής, Ελλάδα) το οποίο χρησιμοποιεί διφασικό σύστημα φυγοκέντρησης για την παραλαβή του ελαιολάδου.

4.2 Μελέτη της επίδρασης γιαουρτιού του εμπορίου με 2% λιπαρά το οποίο έχει εμπλουτιστεί με εκχύλισμα OMWW πλούσιο σε BAL, σε πειραματικό μοντέλο αθηροσκλήρωσης κουνελιού

Ζωικά πρότυπα

Στη μελέτη χρησιμοποιήθηκαν 35 υγιή λευκά αρσενικά κουνέλια Νέας Ζηλανδίας. Τα ζώα είχαν σωματικό βάρος 2-3kg. Οι συνθήκες διαβίωσης και χειρισμού των πειραματοζώων ήταν σύμφωνα με τις προδιαγραφές του Π.Δ. 160/91, με το οποίο εναρμονίστηκε η Ελλάδα στην Κοινοτική οδηγία 609/86. Κατά τη διάρκεια του πειράματος, τα ζώα στεγάστηκαν στον οίκο ζωικών προτύπων του Εργαστηρίου Πειραματικής Χειρουργικής και Χειρουργικής Έρευνας "Ν.S Χρηστέας", σε ατομικούς ανοξείδωτους μεταλλικούς κλωβούς και σε σταθερές συνθήκες θερμοκρασίας (19 ± 1°C), σχετικής υγρασίας (55 ± 5%) και αερισμού

(12 πλήρεις εναλλαγές αέρα ανά ώρα) καθώς και σε σταθερό πηλίκο φωτός/σκότους (12 ώρες/12 ώρες). Ο χώρος είναι εγκεκριμένος από την Κτηνιατρική Διεύθυνση της Νομαρχίας Αθηνών και Πειραιά για τέτοιου είδους πειράματα. Πριν την έναρξη του πειράματος, τα ζώα παρέμειναν επτά ημέρες στον εργαστηριακό χώρο προκειμένου να εγκλιματιστούν.

Μοντέλο αθηροσκλήρωσης

Το ζωικό πρότυπο του λευκού κουνελιού Νέας Ζηλανδίας είναι πολύ επιδεκτικό στην πρόκληση αθηροσκλήρωσης μέσω της διατροφής. Έτσι, τα ζώα αυτά αναπτύσσουν πρώιμες αθηροσκληρωτικές βλάβες σε διάστημα ενάμιση μήνα, όταν τους χορηγηθεί πρότυπη κουνελοτροφή του εμπορίου μαζί με χοληστερόλη 1% w/w. Διάφορα άλλα χαρακτηριστικά όσον αφορά στο ζωικό αυτό πρότυπο το καθιστούν από τα πλέον κατάλληλα για τη μελέτη του φαινομένου της αθηροσκλήρωσης. Συγκεκριμένα, υπάρχουν πολλές ομοιότητες με τον άνθρωπο όσον αφορά στο μεταβολισμό των λιποπρωτεϊνών. Για παράδειγμα, οι λιποπρωτεΐνες που περιέχουν την apo-B (απολιποπρωτεΐνη B) είναι παρόμοιες με αυτές του ανθρώπου όσον αφορά στη χημική τους σύσταση και στην περιεκτικότητά τους σε apo-B. Επιπλέον, το ήπαρ του κουνελιού όπως και του ανθρώπου παράγει VLDL (λιποπρωτεΐνες πολύ χαμηλής πυκνότητας) που περιέχουν apo-B100. Τέλος, τόσο στο κουνέλι όσο και στον άνθρωπο αφθονούν οι πρωτεΐνες CETP (πρωτεΐνη μεταφοράς εστέρων χοληστερόλης).

Αντιδραστήρια-Όργανα

- ✓ Χοληστερόλη καθαρότητας USP (Sigma, St Louis, MO, USA)
- ✓ Πρότυπη κουνελοτροφή εμπορίου (Viozokat SA, Κατερίνη, Ελλάδα)
- ✓ Γιαούρτι 2% λιπαρών (ΜΕΒΓΑΛ, SA), εμπλουτισμένο με εκχύλισμα OMWW πλούσιο σε BAL (ελαιοτριβείο οικογένειας “Νικολάου”, Μέγαρα Αττικής, Ελλάδα)
- ✓ Γιαούρτι 2% λιπαρών (ΜΕΒΓΑΛ, SA)
- ✓ Διαιθυλαιθέρας
- ✓ Αναλυτικός ζυγός
- ✓ Ανοξείδωτο μεταλλικό δοχείο
- ✓ Ανοξείδωτες μεταλλικές επιφάνειες

Παρασκευή τροφής

Ζυγίζεται κατάλληλη ποσότητα χοληστερόλης (30g) και διαλύεται σε κατάλληλη ποσότητα διαιθυλαιθέρα (600ml). Ακολούθως, το ανωτέρο διάλυμα χοληστερόλης προστίθεται σε μεταλλικό ανοξείδωτο δοχείο με κατάλληλη ποσότητα πρότυπης κουνελοτροφής του εμπορίου (3000g), ώστε να προκύψει τελικά τροφή εμπλουτισμένη με χοληστερόλη 1% w/w. Ακολούθως, το φαγητό ανακατεύεται συνεχώς μέχρι να απορροφηθεί ολόκληρη η ποσότητα του διαλύματος χοληστερόλης από την κουνελοτροφή. Στη συνέχεια, το μίγμα απλώνεται σε μεταλλική ανοξείδωτη επιφάνεια υπό συνεχή ροή αέρα, προκειμένου να εξατμιστεί ο διαιθυλαιθέρας.

Στην περίπτωση που η τροφή εμπλουτίζεται με απλό γιαούρτι 2% λιπαρών, αναμιγνύεται κατάλληλη ποσότητα του τελευταίου με το μίγμα της κουνελοτροφής με τη χοληστερόλη, ώστε να προκύψει λόγος 120g απλού γιαουρτιού (1 φλιτζάνι) ανά 1kg μίγματος κουνελοτροφής με χοληστερόλη.

Στην περίπτωση που η τροφή εμπλουτίζεται με απλό γιαούρτι 2% το οποίο περιέχει BAL, αναμιγνύεται ακριβώς η ίδια ποσότητα εμπλουτισμένου αυτή τη φορά γιαουρτιού με το μίγμα της κουνελοτροφής με τη χοληστερόλη, ώστε ο τελικός λόγος να είναι 50mg BAL/100g τροφής. Σημειώνεται, ότι τα BAL αναμιγνύονται με το γάλα 2% λιπαρών προτού γίνει η ζύμωση του τελευταίου σε γιαούρτι.

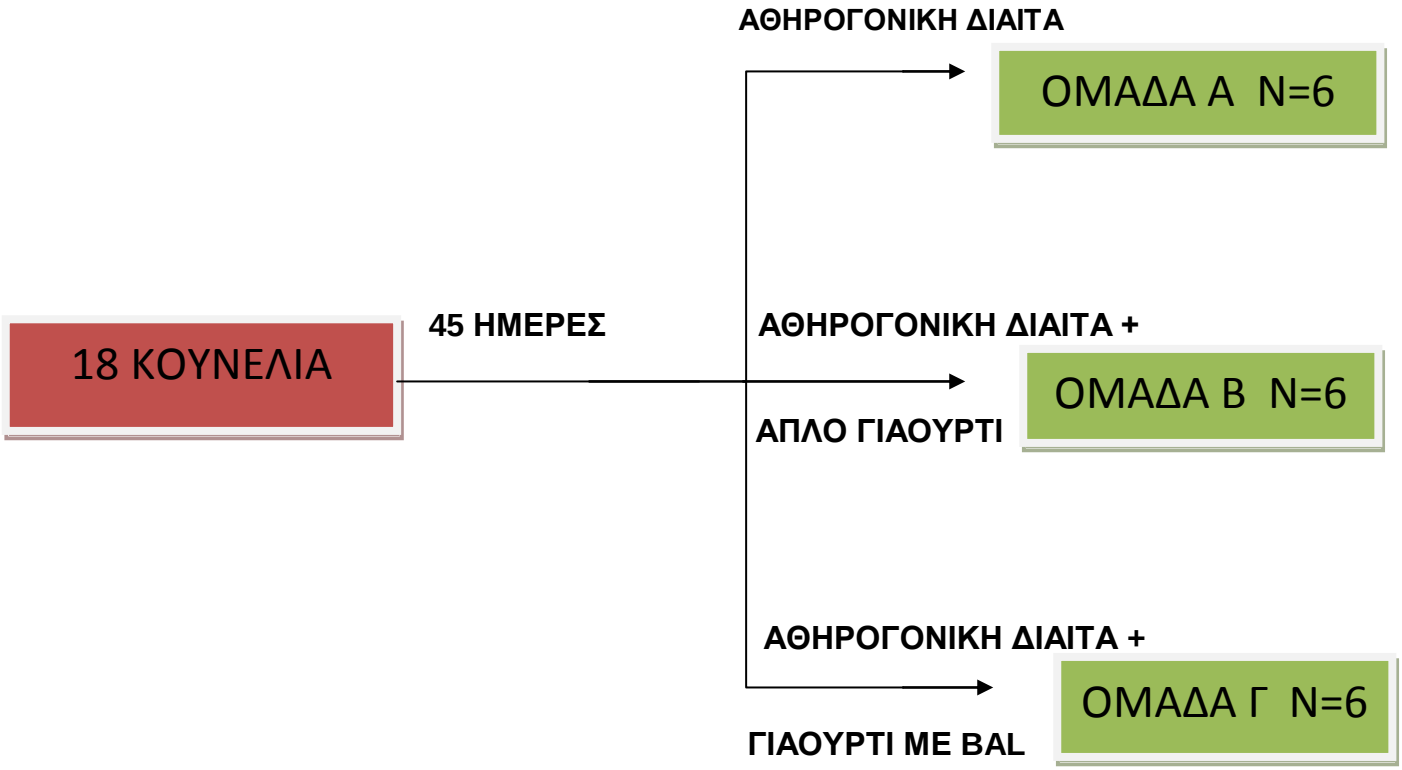
Φρέσκια τροφή παρασκευαζόταν κάθε τρεις ημέρες και παράλληλα καταγραφόταν το ποσό της τροφής (g) που κατανάλωναν τα πειραματόζωα. Η τροφή και το νερό χορηγούνταν στα πειραματόζωα απεριόριστα.

Αναλυτική περιγραφή

Ο σχεδιασμός της μελέτης περιλαμβάνει δύο διαφορετικά πειραματικά πρωτόκολλα. Στο πρώτο, το πείραμα της αναστολής, εξετάζεται η ικανότητα των BAL, με τα οποία έχει εμπλουτιστεί το γιαούρτι, να αναστέλλουν τη διαδικασία ανάπτυξης αθηρωματικών πλακών που αναπτύσσονται στα κουνέλια εξαιτίας της χρόνιας κατανάλωσης (45 ημέρες) αθηρογονικής δίαιτας και στο δεύτερο, το πείραμα της υποστροφής, εξετάζεται η ικανότητα των BAL του γιαουρτιού να υποστρέφουν τη διαδικασία ανάπτυξης αθηρωματικών πλακών, ύστερα από τη χρόνια χορήγηση (45 ημέρες) αθηρογονικής δίαιτας.

- **Πείραμα αναστολής**

Τα πειραματόζωα που χρησιμοποιήθηκαν στο πείραμα της αναστολής τυχαιοποιήθηκαν σε τρεις διαφορετικές πειραματικές ομάδες: Α (ομάδα ελέγχου), Β και Γ. Οι τρεις ομάδες αποτελούνταν από έξι πειραματόζωα η καθεμία. Τα κουνέλια της ομάδας Α (n=6) ακολούθησαν για χρονικό διάστημα 45 ημερών αθηρογονική δίαιτα, η οποία αποτελεί την πρότυπη κουνελοτροφή του εμπορίου μαζί με χοληστερόλη 1% w/w. Τα κουνέλια της ομάδας Β (n=6) ακολούθησαν για χρονικό διάστημα 45 ημερών αθηρογονική δίαιτα μαζί με απλό γιαούρτι του εμπορίου 2% λιπαρών (12% w/w). Τέλος, τα κουνέλια της ομάδας Γ ακολούθησαν για χρονικό διάστημα 45 ημερών αθηρογονική δίαιτα με απλό γιαούρτι του εμπορίου 2% λιπαρών, το οποίο έχει εμπλουτιστεί με εκχύλισμα OMWW πλούσιο σε BAL (50mg BAL/100g τροφής, 0,05% w/w).



- **Πείραμα υποστροφής**

Τα πειραματόζωα που χρησιμοποιήθηκαν στο πείραμα της υποστροφής τυχαιοποιήθηκαν σε τρεις διαφορετικές πειραματικές ομάδες: Δ (ομάδα ελέγχου), Ε και Ζ. Οι ομάδες Ε και Ζ αποτελούνταν από έξι κουνέλια η καθεμία και η ομάδα Δ από 5 κουνέλια. Τα κουνέλια της ομάδας Δ (n=5) κατανάλωναν για χρονικό διάστημα 45 ημερών σκέτη

αθηρογονική δίαιτα και για ακόμα 45 ημέρες πρότυπη κουνελοτροφή του εμπορίου. Τα κουνέλια της ομάδας Ε (n=6) κατανάλωναν για χρονικό διάστημα 45 ημερών σκέτη αθηρογονική δίαιτα και για χρονικό διάστημα άλλων 45 ημερών πρότυπη κουνελοτροφή του εμπορίου μαζί με απλό γιαούρτι 2% λιπαρών (12% w/w). Τέλος, τα κουνέλια της ομάδας Ζ (n=6) κατανάλωναν για χρονικό διάστημα 45 ημερών σκέτη αθηρογονική δίαιτα και για τις επόμενες 45 ημέρες πρότυπη κουνελοτροφή του εμπορίου μαζί με γιαούρτι του εμπορίου 2% λιπαρών, εμπλουτισμένο με εκχύλισμα OMWW πλούσιο σε BAL (50mg BAL/100g τροφής, 0,05% w/w).

4.3 Προσδιορισμός πρωτεΐνης με τη μέθοδο Bradford

<u>Αντιδραστήρια-Όργανα</u>

- ✓ Φωσφορικό οξύ (H_3PO_4), 85%
- ✓ Μεθανόλη
- ✓ Πιπέτες 1-10, 10-100

- ✓ Κίτρινα και άσπρα tips
- ✓ Eppendorfs
- ✓ ELISA

Διαλύματα

- ✓ Βόεια αλβουμίνη ορού (BSA) 100μg/ml: Διαλύονται 100μg BSA σε 1ml νερό.
- ✓ Προκατασκευασμένο αντιδραστήριο Bradford (Sigma), το οποίο είναι διάλυμα Coomasie Brilliant Blue G 250 και φωσφορικού οξέος σε μεθανόλη.

Αρχή μεθόδου

Η χρωστική που περιέχεται στο αντιδραστήριο Bradford δημιουργεί σύμπλοκο με τις πρωτεΐνες του εκάστοτε δείγματος, προκαλώντας μία μετατόπιση της μέγιστης απορρόφησης της χρωστικής από τα 465 στα 595nm. Η απορρόφηση σύμφωνα με το νόμο του Lambert-Beer είναι ανάλογη της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης. Η γραμμικότητα της ανάλυσης κυμαίνεται από 1μg έως 10μg πρωτεΐνης (ως προς BSA).

Αναλυτική περιγραφή

Παρασκευάζονται πρότυπα διαλύματα BSA των οποίων οι συγκεντρώσεις κυμαίνονται από 0,625 έως 15μg/ml. Στα δείγματα πραγματοποιείται αραίωση 1/100 (εάν πρόκειται για δείγμα νεφρικού ιστού) ή 1/1000 (εάν πρόκειται για δείγμα ηπατικού ιστού) με νερό. Τα διαλύματα των προτύπων και των αγνώστων διαλυμάτων πρέπει να έχουν τελικό όγκο 200μL. Στα διαλύματα προστίθενται 50μL αντιδραστηρίου Bradford. Ύστερα από την πάροδο δέκα λεπτών προσδιορίζεται η απορρόφηση των προτύπων και των δειγμάτων. Το σύμπλοκο πρωτεΐνης-χρωστικής είναι σταθερό για 60 λεπτά. Ο υπολογισμός της περιεκτικότητας των δειγμάτων σε πρωτεΐνη γίνεται με βάση την πρότυπη καμπύλη αναφοράς που προκύπτει από τις τιμές απορρόφησης των πρότυπων διαλυμάτων.

4.4 Προσδιορισμός αντιδραστικών ουσιών θειοβαρβιτουρικού οξέος (TBARS)

Αντιδραστήρια-Όργανα

- ✓ 1,1,3,3-Τετραμεθοξυ-προπάνιο (TMP)
- ✓ Βουτυλιωμένο υδροξυ-τολουόλιο (BHT)
- ✓ Θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBA)
- ✓ Φωσφορικό οξύ (H_3PO_4), 85%
- ✓ Βουτανόλη
- ✓ Κίτρινα, μπλε και άσπρα tips
- ✓ Eppendorfs
- ✓ Πιπέτες 1-10, 10-100, 100-1000 μL
- ✓ Φυγόκεντρος
- ✓ Θερμοστατούμενο υδατόλουτρο
- ✓ ELISA

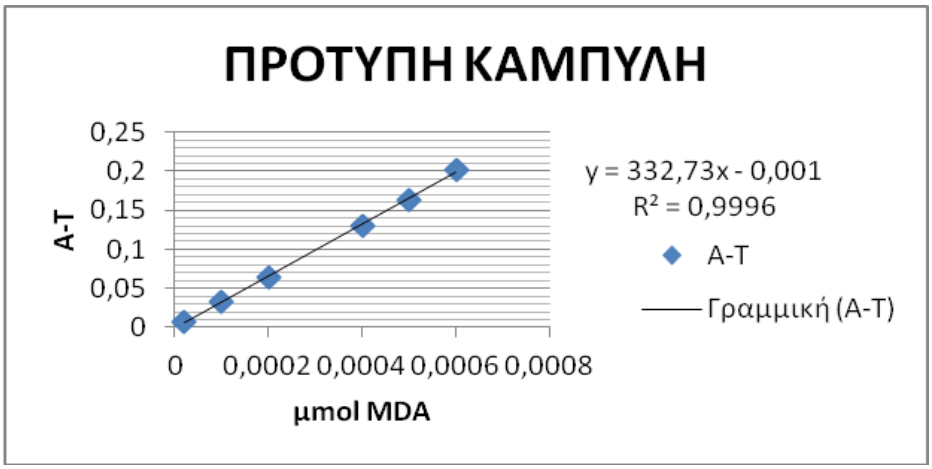
Διαλύματα

- ✓ Υδροχλωρικό οξύ (HCl) 0,01M : 250 μL πυκνό HCl σε 250ml απιονισμένο νερό.
- ✓ Υδροξείδιο του νατρίου (NaOH) 0,1N
- ✓ BHT 5μM : 0,0055g σε 5ml μεθανόλη.
- ✓ Φωσφορικό οξύ 0,2M
- ✓ TBA 0,11M : 0,0793g TBA σε 5ml NaOH 0,1N.
- ✓ Πρότυπο διάλυμα MDA 200μM : Υδρολύονται 0,672μL TMP σε 20ml HCl 0,01M για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Το διάλυμα MDA που προκύπτει έχει συγκέντρωση 200μM.

Αρχή μεθόδου

Κατά τη διαδικασία του οξειδωτικού στρες παράγονται λιποειδικά υπεροξείδια τα οποία είναι ασταθή και διασπώνται κυρίως σε αλδεΰδες (κυρίως MDA και 4-HNE) και σε συζευγμένα διένια. Οι ενώσεις αυτές αντιδρούν με το TBA και σχηματίζουν τα TBARS που μπορούν να ανιχνευθούν φωτομετρικά. Για την ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων

χρησιμοποιείται πρότυπη καμπύλη MDA. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως mol MDA/ml ορού. Η πρότυπη καμπύλη που δημιουργείται, έχει την παρακάτω μορφή:



Σχήμα 4.1: Πρότυπη καμπύλη πειράματος TBARS

Όσο περισσότερα μmol MDA υπάρχουν στο δείγμα του ορού, τόσο περισσότερα προϊόντα οξειδωτικού στρες υπάρχουν στο δείγμα.

Αναλυτική πορεία

Σε eppendorfs σωλήνες προστίθενται:

- 200μL φωσφορικό οξύ 0,2M
- 25μL BHT 5μM
- 100μL ορού ή 200μL πρότυπο διάλυμα MDA ή 200μL απεσταγμένο νερό (τυφλό διάλυμα)
- 25μL TBA 0,11M

Ακολουθεί έντονη ανάδευση του διαλύματος της αντίδρασης και παραμονή του στους 90°C για 60 λεπτά. Αμέσως μετά τη θέρμανση, οι σωλήνες τοποθετούνται στο ψυγείο (4°C) για 10 λεπτά. Μετά την ψύξη, προστίθενται 500μL βουτανόλης και ακολουθεί έντονη ανάδευση και φυγοκέντρηση του διαλύματος υπό ψύξη σε 12000rpm για 10 λεπτά ώστε να διαχωριστούν οι δύο φάσεις. Στη συνέχεια παραλαμβάνεται η βουτανολική φάση (πάνω φάση, 450μL) προστίθεται σε νέα eppendorfs και το διάλυμα της βουτανολικής φάσης φυγοκεντρείται εκ νέου σε 12000rpm για 10 λεπτά υπό ψύξη. Τέλος, μεταφέρονται 200μL σε plate και μετράται η απορρόφηση του διαλύματος στα 535nm. Να σημειωθεί ότι τόσο τα πρότυπα διαλύματα όσο και τα άγνωστα δείγματα παρασκευάζονταν και μετρούνταν εις διπλούν.

4.5 Στατιστική ανάλυση

Καθώς η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια μη παραμετρικών στατιστικών κριτηρίων (μέγεθος δείγματος < 30 κουνέλια), όλες οι μεταβλητές παρουσιάζονται ως διάμεσος (25° τεταρτημόριο-75° τεταρτημόριο). Εξαίρεση αποτελούν οι μεταβλητές κατανάλωση τροφής και βάρος των ζώων (στις διάφορες χρονικές στιγμές), στις οποίες αν και η ερμηνεία της στατιστικής σημαντικότητας των αποτελεσμάτων έχει προκύψει από τη μη παραμετρική στατιστική, θεωρήσαμε πιο ρεαλιστικό τα περιγραφικά τους χαρακτηριστικά να αποδοθούν ως ΜΟ ± SD. Οι συσχετίσεις των μεταβλητών μεταξύ των ομάδων πραγματοποιήθηκαν με την εφαρμογή του στατιστικού κριτηρίου Kruskal-Wallis για k>2 ανεξάρτητα δείγματα. Οι συσχετίσεις μίας μεταβλητής μέσα στην ίδια ομάδα για διαδοχικές χρονικές στιγμές πραγματοποιήθηκαν με τα μη παραμετρικά στατιστικά κριτήρια Wilcoxon Signed Rank Test και Friedman test ανάλογα με το εάν η σύγκριση αφορούσε δύο ή τρεις χρονικές στιγμές αντίστοιχα. Τέλος, οι συσχετίσεις μεταξύ των ποσοτικών μεταβλητών πραγματοποιήθηκαν με το συντελεστή συσχέτισης του Spearman (rho). Όλες οι αναφερόμενες τιμές πιθανοτήτων p συγκρίνονται σε επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας α=5%. Για όλους τους στατιστικούς υπολογισμούς χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα SPSS έκδοση 18.0 (Statistical Package for Social Sciences, SPSS Inc., Chicago, Illinois, U.S.A.)

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5^{Ο}

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

5.1 Μελέτη της επίδρασης γιαουρτιού του εμπορίου 2% λιπαρών το οποίο έχει εμπλουτιστεί με εκχύλισμα OMWW πλούσιο σε BAL στην αναστολή της ανάπτυξης αθηρωματικών πλακών, σε in vivo πειραματικό μοντέλο αθηροσκλήρωσης κουνελιού

Προκειμένου να μελετηθεί η επίδραση εκχυλίσματος OMWW πλούσιου σε BAL το οποίο έχει αναμιχθεί με γιαούρτι του εμπορίου 2% λιπαρών, σε πειραματικό μοντέλο αναστολής της ανάπτυξης αθηρωματικών πλακών στα κουνέλια, χρησιμοποιήθηκαν συνολικά 18 υγιή λευκά αρσενικά κουνέλια Νέας Ζηλανδίας.

Τα πειραματόζωα του πειράματος αναστολής τυχαιοποιήθηκαν σε τρεις διαφορετικές ομάδες: Α, Β και Γ. Η καθεμία από τις ομάδες αυτές αποτελούνταν από 6 κουνέλια. Τα ζώα της ομάδας Α (ομάδα ελέγχου) κατανάλωναν για χρονικό διάστημα 45 ημερών πρότυπη κουνελοτροφή του εμπορίου με χοληστερόλη 1% w/w (αθηρογονική δίαιτα), τα ζώα της ομάδας Β κατανάλωναν για χρονικό διάστημα 45 ημερών αθηρογονική δίαιτα με απλό γιαούρτι του εμπορίου 2% λιπαρών και τα ζώα της ομάδας Γ κατανάλωναν για χρονικό διάστημα 45 ημερών αθηρογονική δίαιτα σε συνδυασμό με γιαούρτι του εμπορίου 2% λιπαρών εμπλουτισμένο με BAL εκχυλίσματος OMWW.

Στο χρονικό διάστημα των 0 και 45 ημερών λήφθηκε αίμα για να γίνουν μετρήσεις στον ορό που αφορούν διάφορα βιοχημικά χαρακτηριστικά των κουνελιών και καταγράφηκε το βάρος τους. Στην αρχή της παρέμβασης καταγράφηκε επίσης η ποσότητα της τροφής που κατανάλωναν τα κουνέλια στις διαφορετικές ομάδες. Στο τέλος του πειράματος πραγματοποιήθηκε ευθανασία προκειμένου να ληφθεί η αορτή των κουνελιών, από την αορτική βαλβίδα έως την αορτική διακλάδωση, στην οποία με κατάλληλη χρώση με αιματοξυλίνη και εοσίνη προσδιορίστηκε το μέγιστο πάχος και το μέσο πάχος των αθηρωματικών πλακών. Η μέτρησή τους πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του λογισμικού προγράμματος Image J v.1.46

(National Institutes of Health). Το μέγιστο πάχος της βλάβης ορίζεται ως το μέγιστο δυνατό μήκος της καθέτου από το υγιές τμήμα του αγγείου (ενδοθήλιο) έως τα ακρότατα αφρώδη κύτταρα τα οποία έρχονται σε επαφή με τον αυλό ενώ το μέσο πάχος ορίζεται ως το εμβαδόν των αφρωδών κυττάρων (βλάβη του αγγείου) διά το μήκος της τομής που μετράται. Μονάδα μέτρησης των μεταβλητών είναι τα nm. Παράλληλα λήφθηκαν και δείγματα ιστών από το ήπαρ, τους νεφρούς και το σπλήνα των κουνελιών.

5.1.1 Ανθρωπομετρικά και βιοχημικά χαρακτηριστικά των κουνελιών πριν την έναρξη της παρέμβασης (t=0 ημέρες)

Τα κουνέλια δεν εμφάνισαν κάποια δυσμενή για την υγεία τους επίδραση (διάρροια, έμετος) από την κατανάλωση των διαιτών που περιείχαν το γιαούρτι αλλά αντιθέτως υπήρχε μία τάση προτίμησης προς τις δίαιτες με το γιαούρτι όπως φαίνεται από την ποσότητα της τροφής που καταναλωνόταν καθημερινά. Συγκεκριμένα, τα κουνέλια της ομάδας Α κατανάλωναν 156,9 ± 11,6g τροφής/ημέρα, της ομάδας Β κατανάλωναν 185,7 ± 2,3g τροφής/ημέρα, και της ομάδας Γ 173,7 ± 10,7g τροφής/ημέρα, ποσότητα που αντιστοιχεί σε 86,85 ± 5,35mg BAL/ημέρα. Παρόλα αυτά, μόνο στην ομάδα Β η αύξηση στη διαιτητική πρόσληψη ήταν στατιστικά σημαντική σε σχέση με την ομάδα Α (p=0,005).

Πριν την έναρξη της παρέμβασης το σωματικό βάρος των κουνελιών της ομάδας Α ήταν 3105 ± 488,3g, της ομάδας Β 2542 ± 138,8g και της ομάδας Γ 2566,7 ± 150,6g. Επομένως, στην αρχή της πειραματικής παρέμβασης τόσο η ομάδα Β όσο και η ομάδα Γ είχαν στατιστικά σημαντικά (p=0,007 και p=0,01 αντίστοιχα) μικρότερο σωματικό βάρος από την ομάδα Α.

Τα βιοχημικά χαρακτηριστικά που μετρήθηκαν στα κουνέλια στο χρόνο t=0 ημέρες είναι: η TC, οι TAG, η HDL-C, η LDL-C και η γλυκόζη. Η LDL-C δε διέφερε στατιστικά σημαντικά μεταξύ των τριών διαφορετικών ομάδων (p=0,1). Τα κουνέλια των ομάδων Β και Γ είχαν στατιστικά σημαντικά ($p<0,05$) μικρότερες τιμές γλυκόζης και μεγαλύτερες τιμές TC και TAG σε σχέση με τα κουνέλια της ομάδας Α. Τέλος, τα κουνέλια της ομάδας Γ είχαν στατιστικά σημαντικά (p=0,04) υψηλότερες τιμές HDL-C από τα κουνέλια της ομάδας Α. Τα αποτελέσματα φαίνονται αναλυτικά στον πίνακα που ακολουθεί.

Πίνακας 5.1: Ανθρωπομετρικά και βιοχημικά χαρακτηριστικά των κουνελιών του πειράματος της αναστολής πριν την έναρξη της παρέμβασης

	Ομάδα Α	Ομάδα Β	Ομάδα Γ	p$
Σωματικό βάρος (g)	3105 ± 488,3	2542 ± 138,8*	2566,7 ± 150,6*	0,003
Γλυκόζη (mg/dl)	124 (119,5-133,5)	142,5 (133,8-156)*	149,5 (139,3-158)*	0,006
TC (mg/dl)	45,5 (35,8-55,3)	63,5 (55-70,5)*	63,5 (59,8-67,3)*	0,01
LDL-C (mg/dl)	12,7 (8,9-22,8)	22,7 (14,1-30,2)	22,7 (17,5-28)	0,1
TAG (mg/dl)	50 (43-54,8)	70,5 (60-91,5)*	78,5 (61,3-83,8)*	0,01
HDL-C (mg/dl)	21 (19,5-23,3)	24,7 (23,8-27,6)	28,5 (21-30,3)*	0,02

$p<0,05 μεταξύ των τριών ομάδων, Kruskal-Wallis test

*p<0,05 vs ομάδα Α, Kruskal-Wallis test

#Επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας α=5%

5.1.2 Ανθρωπομετρικά και βιοχημικά χαρακτηριστικά των κουνελιών στο τέλος της παρέμβασης (t=45 ημέρες)

Στο τέλος του πειράματος αναστολής κανένα από τα βιοχημικά χαρακτηριστικά που μετρήθηκαν στον ορό των πειραματοζώων δε διέφερε στατιστικά σημαντικά μεταξύ των τριών διαφορετικών ομάδων. Αντιθέτως, το σωματικό βάρος των κουνελιών της ομάδας Γ ήταν στατιστικά σημαντικά μικρότερο (p=0,02) συγκριτικά με το σωματικό βάρος των κουνελιών της ομάδας Α και στατιστικά σημαντικά μεγαλύτερο (p=0,03) σε σχέση με εκείνο της ομάδας Β. Τα αποτελέσματα φαίνονται αναλυτικά στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 5.2: Ανθρωπομετρικά και βιοχημικά χαρακτηριστικά των κουνελιών του πειράματος της αναστολής στο τέλος της παρέμβασης

	Ομάδα Α	Ομάδα Β	Ομάδα Γ	p$
Σωματικό βάρος (g)	3316,3 ± 183,8	3625 ± 221,1	3386,7 ± 223,4*,#	0,004
Γλυκόζη (mg/dl)	115 (109,3-119,8)	109 (102-126,3)	117 (113,3-122,3)	0,5
TC (mg/dl)	2812,5 (2026,3-2487,5)	2050 (1432,5-2270)	1935 (1826,3-2386,3)	0,3
LDL-C (mg/dl)	2114,4 (1974,2-2408,1)	1946,3 (1386,5-2182,7)	1880 (1752,5-2298,6)	0,3
TAG (mg/dl)	127 (110,3-154)	150 (109-180,8)	152 (97-194,3)	0,9
HDL-C (mg/dl)	41,5 (24,5-54)	57 (24,3-72,5)	44,5 (35,3-67,5)	0,6

$p<0,05 μεταξύ των τριών ομάδων, Kruskal-Wallis test

*p<0,05 vs ομάδα Α, Kruskal-Wallis test

#p<0,05 vs ομάδα Β, Kruskal-Wallis test

ł Επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας α=5%

5.1.3 Σύγκριση ανθρωπομετρικών και βιοχημικών χαρακτηριστικών των κουνελιών μεταξύ του χρόνου t=0 ημέρες και του χρόνου t=45 ημέρες

- Ομάδα Α

Στην ομάδα Α η κατανάλωση της αθηρογονικής δίαιτας αύξησε στατιστικά σημαντικά ($p<0,05$) όλες τις λιποειδικές παραμέτρους (TC, LDL-C, TAG, HDL-C), μείωσε στατιστικά σημαντικά ($p=0,04$) τη γλυκόζη ορού ενώ το σωματικό βάρος δε μεταβλήθηκε στατιστικά σημαντικά σε σχέση με το χρόνο t=0 ημέρες ($p=0,9$).

Πίνακας 5.3: Ανθρωπομετρικά και βιοχημικά χαρακτηριστικά των κουνελιών της ομάδας Α του πειράματος αναστολής, μεταξύ του χρόνου t=0 ημέρες και t=45 ημέρες

	Ομάδα Α	
	t=0	t=45
Σωματικό βάρος (g)	3105 ± 488,3	3316,3 ± 183,8
Γλυκόζη (mg/dl)	124 (119,5-133,5)	115 (109,3-119,8)*
TC (mg/dl)	45,5 (35,8-55,3)	2812,5 (2026,3-2487,5)*
LDL-C (mg/dl)	12,7 (8,9-22,8)	2114,4 (1974,2-2408,1)*
HDL-C (mg/dl)	21 (19,5-23,3)	41,5 (24,5-54)*
TAG (mg/dl)	50 (43-54,8)	127 (110,3-154)*

*$p<0,05$ vs χρόνου t=45 ημέρες, Wilcoxon signed rank test

- Ομάδα Β

Στην ομάδα Β η κατανάλωση της αθηρογονικής δίαιτας μαζί με το απλό γιαούρτι του εμπορίου 2% λιπαρών αύξησε στατιστικά σημαντικά ($p<0,05$) το σωματικό βάρος και όλες τις επιμέρους βιοχημικές παραμέτρους που σχετίζονται με την αθηροσκλήρωση (TC, LDL-C, TAG), με εξαίρεση την HDL-C η οποία αυξήθηκε ως τιμή αλλά όχι στατιστικά σημαντικά ($p=0,116$). Επιπλέον, μείωσε στατιστικά σημαντικά ($p=0,02$) τη γλυκόζη ορού.

Πίνακας 5.4: Ανθρωπομετρικά και βιοχημικά χαρακτηριστικά των κουνελιών της ομάδας Β του πειράματος αναστολής, μεταξύ του χρόνου t=0 ημέρες και t=45 ημέρες

	Ομάδα Β	
	t=0	t=45
Σωματικό βάρος (g)	2542 ± 138,8	3625 ± 221,1*
Γλυκόζη (mg/dl)	142,5 (133,8-156)	109 (102-126,3)*
TC (mg/dl)	63,5 (55-70,5)	2050 (1432,5-2270)*
LDL-C (mg/dl)	22,7 (14,1-30,2)	1946,3 (1386,5-2182,7)*
HDL-C (mg/dl)	24,7 (23,8-27,6)	57 (24,3-72,5)
TAG (mg/dl)	70,5 (60-91,5)	150 (109-180,8)*

*p<0,05 vs χρόνου t=0, Wilcoxon signed rank test

- Ομάδα Γ

Στην ομάδα Γ η κατανάλωση της αθηρογονικής δίαιτας μαζί με το εμπλουτισμένο με BAL γιαούρτι του εμπορίου 2% λιπαρών αύξησε στατιστικά σημαντικά (p<0,05) το σωματικό βάρος των ζώων καθώς και όλες τις βιοχημικές παραμέτρους που σχετίζονται με την αθηροσκλήρωση (TC, LDL-C, TAG, HDL-C) και μείωσε στατιστικά σημαντικά (p=0,02) τη γλυκόζη ορού.

Πίνακας 5.5: Ανθρωπομετρικά και βιοχημικά χαρακτηριστικά των κουνελιών της ομάδας Γ του πειράματος αναστολής, μεταξύ του χρόνου t=0 ημέρες και t=45 ημέρες

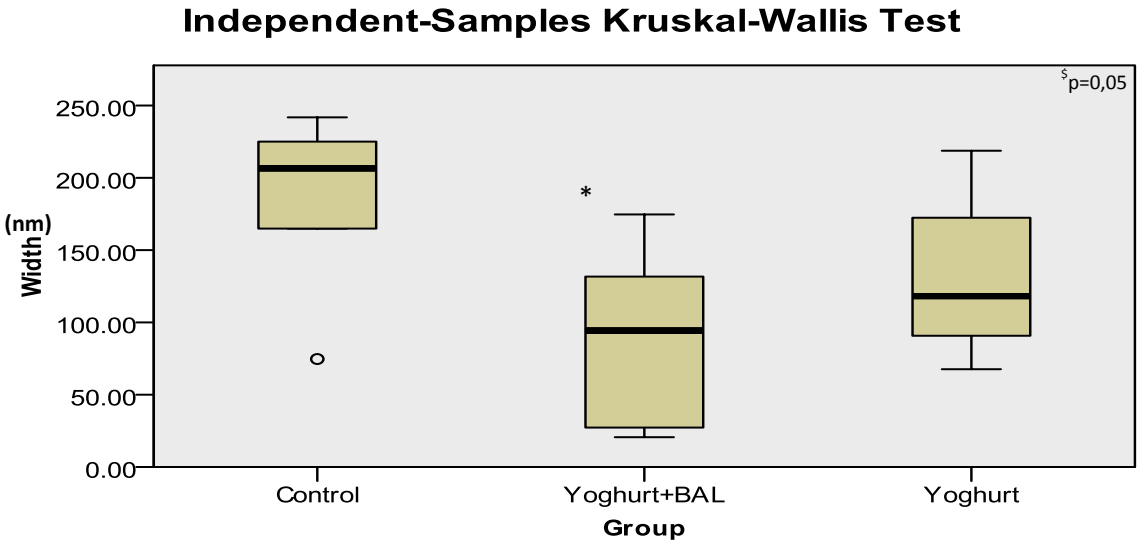
	Ομάδα Γ	
	t=0	t=45
Σωματικό βάρος (g)	2566,7 ± 150,6	3386,7 ± 223,4*
Γλυκόζη (mg/dl)	149,5 (139,3-158)	117 (113,3-122,3)*
TC (mg/dl)	63,5 (59,8-67,3)	1935 (1826,3-2386,3)*
LDL-C (mg/dl)	22,7 (17,5-28)	1880 (1752,5-2298,6)*
HDL-C (mg/dl)	28,5 (21-30,3)	44,5 (35,3-67,5)*
TAG (mg/dl)	78,5 (61,3-83,8)	152 (97-194,3)*

*p<0,05 vs χρόνου t=0, Wilcoxon signed rank test

5.1.4 Η επίδραση του πειράματος της αναστολής στην εξέλιξη των αθηρωματικών πλακών

Στο τέλος της παρέμβασης του πειράματος της αναστολής προσδιορίστηκε με κατάλληλη μορφομετρική ανάλυση το μέγιστο πάχος και το μέσο πάχος της αθηρωματικής βλάβης προκειμένου να αξιολογηθεί εάν όντως το εμπλουτισμένο με BAL γιαούρτι έχει την ικανότητα να αναστέλλει τη διαδικασία της αθηροσκλήρωσης.

Η ομάδα που κατανάλωνε το εμπλουτισμένο με BAL γιαούρτι (ομάδα Γ) είχε στατιστικά σημαντικά (p=0,04) μικρότερο μέγιστο πάχος αθηρωματικής βλάβης σε σχέση με την ομάδα ελέγχου (ομάδα Α). Συγκεκριμένα, στην ομάδα Α που κατανάλωνε την αθηρογονική δίαιτα το 50% των ζώων είχαν μέσο πάχος βλάβης 206,5 (164,9-225) nm ενώ στην ομάδα με το εμπλουτισμένο γιαούρτι το 50% των κουνελιών είχαν μέσο πάχος βλάβης 94,4 (27,3-131,7) nm. Συνεπώς, η κατανάλωση του εμπλουτισμένου με BAL γιαουρτιού οδήγησε σε κατά 54,3% μικρότερο μέγιστο πάχος αθηρωματικών πλακών σε σχέση με την κατανάλωση της αθηρογονικής δίαιτας. Στην ομάδα των κουνελιών που κατανάλωναν το γιαούρτι φάνηκε να υπάρχει μία τάση μείωσης του πάχους της βλάβης σε σχέση με την ομάδα ελέγχου (p=0,433). Τα αποτελέσματα αποτυπώνονται γραφικά στο παρακάτω θηκόγραμμα.

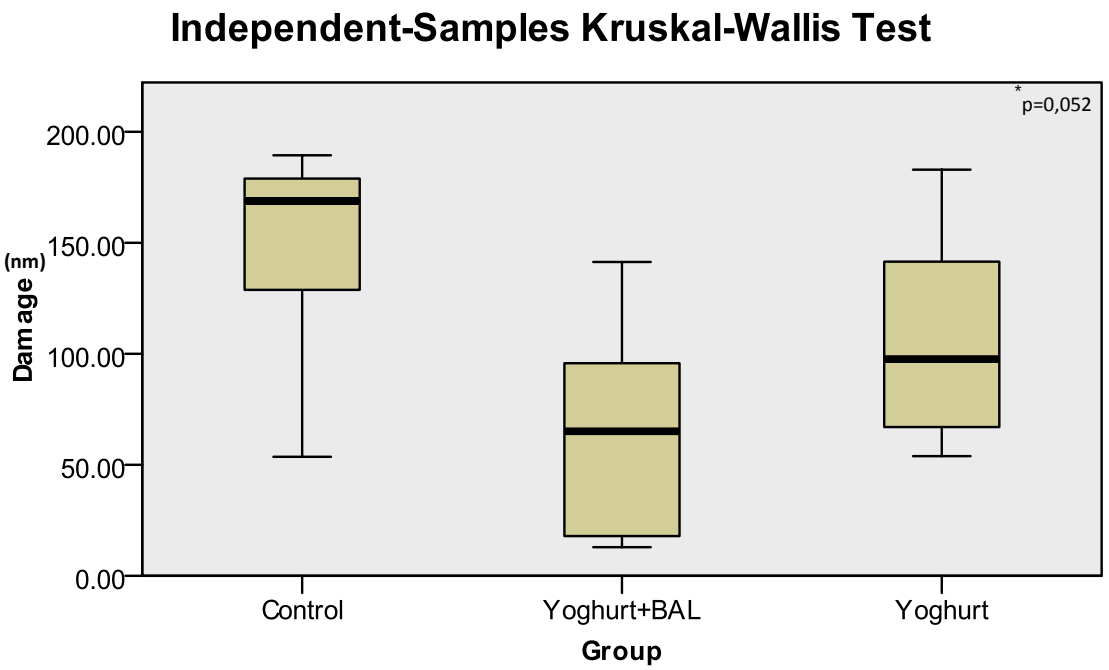


*p<0,05 vs control

$p=0,05 μεταξύ των τριών ομάδων

Σχήμα 5.1: Μέγιστο πάχος αθηρωματικής βλάβης μεταξύ των κουνελιών του πειράματος αναστολής

Ως προς το μέσο πάχος της αθηρωματικής βλάβης αντιθέτως δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των τριών ομάδων. Αξίζει να σημειωθεί ότι τόσο στην ομάδα που κατανάλωνε το απλό γιαούρτι όσο και σε αυτήν που κατανάλωνε το εμπλουτισμένο με BAL γιαούρτι, οι τιμές των διαμέσων ήταν μικρότερες σε σχέση με την τιμή της ομάδας ελέγχου αλλά η διαφορά μεταξύ των τριών ομάδων ήταν οριακά μη στατιστικά σημαντική (p=0,052). Με άλλα λόγια υπήρχε ισχυρή τάση μείωσης του μέσου πάχους της βλάβης στις ομάδες που κατανάλωναν το γιαούρτι και ειδικά στην ομάδα που κατανάλωνε το εμπλουτισμένο με BAL γιαούρτι [97,5 (67-141,5) vs 65,1 (17,9-95,8)] σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Το παρακάτω θηκόγραμμα του SPSS αναπαριστά γραφικά τα παραπάνω αποτελέσματα.



*p=0,052 μεταξύ των τριών ομάδων

Σχήμα 5.2: Μέσο πάχος αθηρωματικών πλακών μεταξύ των κουνελιών του πειράματος αναστολής

5.1.5 Η επίδραση της πειραματικής παρέμβασης στους δείκτες λιποειδικής υπεροξείδωσης TBARS

Βασικός στόχος του πειραματικού πρωτοκόλλου για τη μελέτη της αναστολής στην ανάπτυξη αθηρωματικών πλακών ήταν ο προσδιορισμός των TBARS στον ορό και στους

ιστούς (νεφροί, ήπαρ) των κουνελιών, ως δείκτες της λιποειδικής υπεροξείδωσης, που πιθανόν να συμβαίνει σε μεγάλο βαθμό κατά την εξέλιξη της αθηροσκληρωτικής νόσου στο συγκεκριμένο ζωικό πρότυπο.

Στην έναρξη του πειράματος, τα κουνέλια της ομάδας Β είχαν στατιστικά σημαντικά (p=0,004) υψηλότερες τιμές TBARS ορού από τις αντίστοιχες τιμές των κουνελιών της ομάδας Α. Στο τέλος της παρέμβασης, οι τιμές TBARS στον ορό των κουνελιών μεταξύ των διαφορετικών ομάδων δε διέφεραν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους (p=0,9). Αντίθετα, τα κουνέλια της ομάδας Γ είχαν στατιστικά σημαντικά (p=0,002) χαμηλότερες τιμές TBARS στο νεφρικό τους ιστό σε σχέση με τα κουνέλια της ομάδας Α. Στον ηπατικό ιστό, τα κουνέλια της ομάδας Γ είχαν στατιστικά σημαντικά μικρότερες τιμές TBARS τόσο σε σχέση με την Α (p=0,02) όσο και με την ομάδα Β (p=0,03). Η ομάδα Β δεν εμφάνισε καμία στατιστικά σημαντική διαφορά με την ομάδα Α ούτε ως προς τις τιμές TBARS στους νεφρούς (p=0,2) ούτε ως προς τις τιμές TBARS στο ήπαρ (p=1,0). Στον πίνακα και στα διαγράμματα που ακολουθούν τα αποτελέσματα φαίνονται αναλυτικά.

Πίνακας 5.6: Τιμές TBARS στον ορό (χρόνοι t=0 ημέρες και t=45 ημέρες), στους νεφρούς και στο ήπαρ των κουνελιών του πειράματος αναστολής μεταξύ των τριών ομάδων παρέμβασης

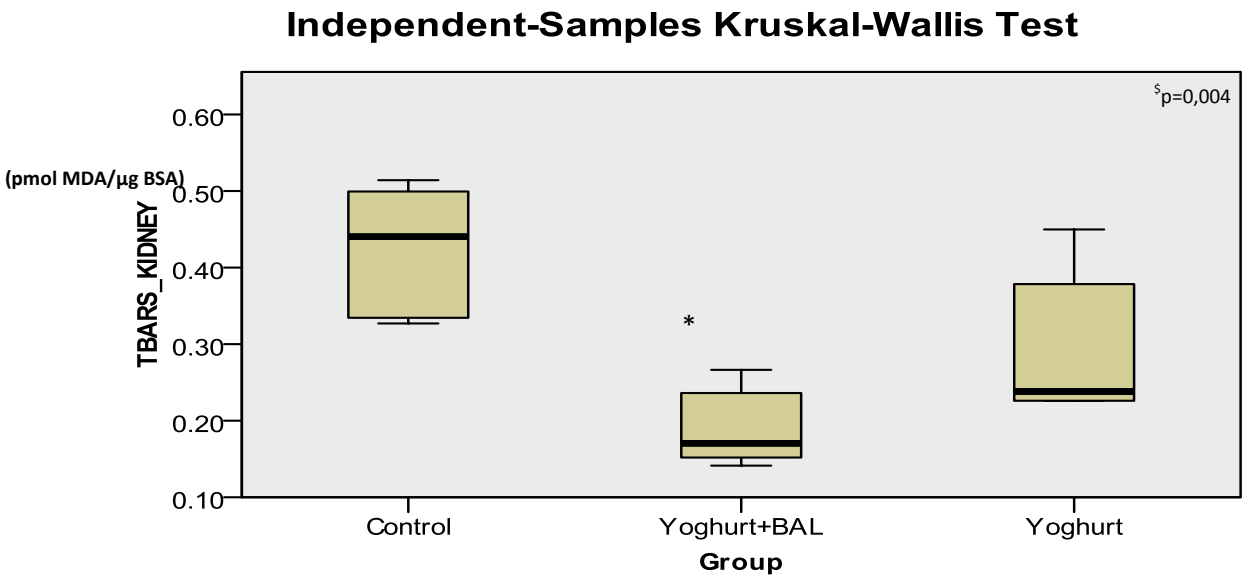
	Ομάδα Α	Ομάδα Β	Ομάδα Γ	p
$TBARS_{t=0\ ημέρες}$ ορού (μM MDA)	0,68 (0,64-0,76)	1,14 (0,98-1,62)$^{\$}$	0,89 (0,79-1,32)	0,005*
$TBARS_{t=45\ ημέρες}$ ορού (μM MDA)	2,6 (2,1-4,7)	3,04 (1,72-3,42)	2,67 (2,35-3,19)	0,9
TBARS νεφρών (pmol MDA/μg BSA)	0,44 (0,33-0,5)	0,24 (0,23-0,38)	0,17 (0,15-0,24)$^{\$}$	0,004*
TBARS ήπατος (pmol MDA/μg BSA)	0,37 (0,33-0,44)	0,42 (0,31-0,51)	0,28 (0,23-0,3)$^{\$,\#}$	0,01*

*p<0,05 μεταξύ των τριών ομάδων, Kruskal-Wallis test

$^{\$}$p<0,05 vs ομάδα Α, Kruskal-Wallis test

$^{\#}$p<0,05 vs ομάδα Β, Kruskal-Wallis test

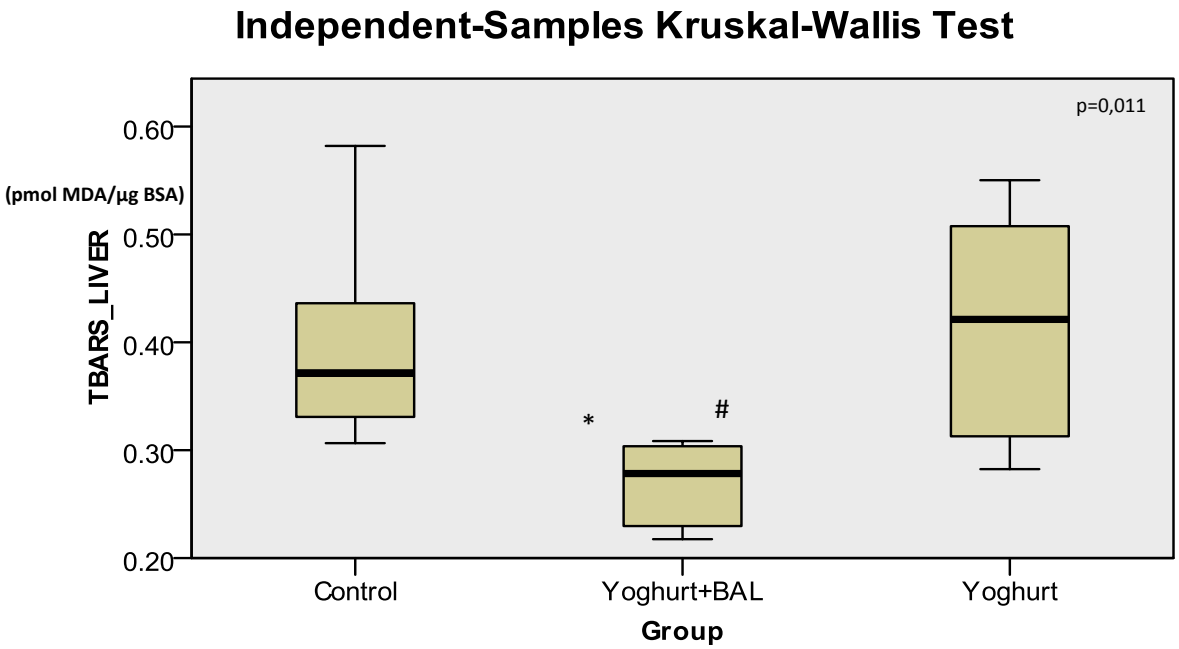
^{ł} Επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας α=5%



*p<0,05 vs control

$p<0,04 μεταξύ των τριών ομάδων

Σχήμα 5.3: Οι τιμές TBARS στο νεφρικό ιστό μεταξύ των κουνελιών του πειράματος αναστολής



*p<0,05 vs control

#p<0,05 vs yoghurt

ŧp=0,011 μεταξύ των τριών ομάδων

Σχήμα 5.4: Οι τιμές TBARS στον ηπατικό ιστό μεταξύ των κουνελιών του πειράματος αναστολής

Οι συγκρίσεις των τιμών TBARS ορού για την ίδια ομάδα κουνελιών στις δύο διαφορετικές χρονικές στιγμές (t=0 και t=45 ημέρες) φανέρωσαν ότι η κατανάλωση οποιασδήποτε από τις τρεις διαφορετικές πειραματικές δίαιτες είχε ως αποτέλεσμα στατιστικά σημαντική αύξηση αυτών. Συγκεκριμένα, η κατανάλωση της αθηρογονικής δίαιτας (ομάδα Α) αύξησε στατιστικά σημαντικά (p=0,02) τα TBARS από 0,68 (0,64-0,76) τη χρονική στιγμή t=0 ημέρες σε 2,6 (2,1-4,7) τη χρονική στιγμή t=45 ημέρες, η κατανάλωση της αθηρογονικής δίαιτας σε συνδυασμό με το γιαούρτι (ομάδα Β) αύξησε στατιστικά σημαντικά (p=0,04) τα TBARS από 1,14 (0,98-1,62) σε 3,04 (1,72-3,42) και η κατανάλωση της αθηρογονικής δίαιτας σε συνδυασμό με το εμπλουτισμένο με BAL γιαούρτι αύξησε στατιστικά σημαντικά (p=0,02) τα TBARS από 0,89 (0,79-1,32) σε 2,67 (2,35-3,19).

5.2 Μελέτη της επίδρασης γιαουρτιού του εμπορίου 2% λιπαρών το οποίο έχει εμπλουτιστεί με εκχύλισμα OMWW πλούσιο σε BAL στην υποστροφή της ανάπτυξης αθηρωματικών πλακών, σε in vivo πειραματικό μοντέλο αθηροσκλήρωσης κουνελιού

Για τη μελέτη της επίδρασης εκχυλίσματος OMWW πλούσιου σε BAL το οποίο έχει αναμιχθεί με απλό γιαούρτι του εμπορίου 2% λιπαρών στην υποστροφή της ανάπτυξης αθηρωματικών πλακών σε πειραματικό μοντέλο αθηροσκλήρωσης κουνελιών, χρησιμοποιήθηκαν συνολικά 17 υγιή λευκά αρσενικά κουνέλια Νέας Ζηλανδίας.

Τα κουνέλια του πειράματος της υποστροφής τυχαιοποιήθηκαν σε τρεις διαφορετικές ομάδες: Δ, Ε και Ζ. Η ομάδα Δ (ομάδα ελέγχου) αποτελούνταν από πέντε κουνέλια και οι ομάδες Ε και Ζ από 6 κουνέλια η καθεμία. Τα ζώα της ομάδας Δ κατανάλωναν για χρονικό διάστημα 45 ημερών πρότυπη κουνελοτροφή του εμπορίου με χοληστερόλη 1% w/w (αθηρογονική δίαιτα) και για ακόμα 45 ημέρες σκέτη κουνελοτροφή του εμπορίου, τα ζώα της ομάδας Ε κατανάλωναν για χρονικό διάστημα 45 ημερών αθηρογονική δίαιτα και για άλλες 45 ημέρες πρότυπη κουνελοτροφή του εμπορίου αναμεμιγμένη με απλό γιαούρτι του εμπορίου 2% λιπαρών και τέλος τα ζώα της ομάδας Ζ κατανάλωναν για χρονικό διάστημα 45 ημερών αθηρογονική δίαιτα και για τις επόμενες 45 ημέρες πρότυπη κουνελοτροφή του εμπορίου αναμεμιγμένη με απλό γιαούρτι του εμπορίου 2% λιπαρών, εμπλουτισμένο με εκχύλισμα OMWW πλούσιο σε BAL.

Στο χρονικό διάστημα των 0, 45 και 90 ημερών λήφθηκε αίμα προκειμένου να προσδιοριστούν στον ορό των κουνελιών διάφορα βιοχημικά χαρακτηριστικά και καταγράφηκε το βάρος τους. Στις 0 και 45 ημέρες καταγράφηκε επίσης η ποσότητα της τροφής που κατανάλωναν τα κουνέλια των διαφορετικών ομάδων. Στο τέλος του πειράματος έγινε ευθανασία προκειμένου να ληφθεί η αορτή τους, από την αορτική βαλβίδα έως την αορτική διακλάδωση, στην οποία με κατάλληλη χρώση με αιματοξυλίνη και εοσίνη προσδιορίστηκε το μέγιστο και το μέσο πάχος των αθηρωματικών τους πλακών. Οι μετρήσεις του πάχους και της έκτασης της βλάβης των αθηρωματικών πλακών πραγματοποιήθηκαν με τον ίδιο ακριβώς τρόπο που περιγράφηκε στο πείραμα της αναστολής. Παράλληλα λήφθηκαν και δείγματα από τους ιστούς του ήπατος, των νεφρών και του σπλήνα.

5.2.1 Ανθρωπομετρικά και βιοχημικά χαρακτηριστικά των κουνελιών πριν την έναρξη της παρέμβασης (t=0 ημέρες)

Τα κουνέλια και των τριών ομάδων του πειράματος υποστροφής για τις πρώτες 45 ημέρες κατανάλωναν την ίδια ακριβώς αθηρογονική δίαιτα. Τα κουνέλια της ομάδας Δ κατανάλωναν 149,3 ± 12 g αθηρογονικής δίαιτας, τα κουνέλια της ομάδας Ε κατανάλωναν 160,5 ± 16,3 g και τέλος τα κουνέλια της ομάδας Ζ κατανάλωναν 145,3 ± 7,3 g. Οι παρατηρούμενες διαφορές στην ποσότητα της κατανάλωσης τροφής δεν είναι στατιστικά σημαντικές (p=0,1).

Στην αρχή της παρέμβασης, τα κουνέλια της ομάδας Ε είχαν στατιστικά σημαντικά μικρότερο σωματικό βάρος τόσο από τα κουνέλια της ομάδας Δ (p=0,01) όσο και από τα κουνέλια της ομάδας Ζ (p=0,04). Τα βιοχημικά χαρακτηριστικά που προσδιορίστηκαν κατά την έναρξη της παρέμβασης στον ορό των κουνελιών ήταν η γλυκόζη, η TC, η LDL-C, η HDL-C και οι TAG. Η ομάδα Ε είχε στατιστικά σημαντικά υψηλότερες τιμές TC (p=0,01) και γλυκόζης (p=0,006) συγκριτικά με τις τιμές της ομάδας Ζ. Τέλος, οι τιμές TAG ορού ήταν στατιστικά σημαντικά υψηλότερες στην ομάδα Ζ σε σχέση με τις τιμές της ομάδας Δ. Για τα υπόλοιπα βιοχημικά χαρακτηριστικά (LDL-C και HDL-C) δεν παρατηρήθηκε καμία στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των διαφορετικών ομάδων του πειράματος υποστροφής στο χρόνο t=0 ημέρες. Τα αποτελέσματα φαίνονται αναλυτικά στον πίνακα που ακολουθεί.

Πίνακας 5.7: Ανθρωπομετρικά και βιοχημικά χαρακτηριστικά των κουνελιών του πειράματος υποστροφής πριν την έναρξη της παρέμβασης (t=0 ημέρες)

	Ομάδα Δ	Ομάδα Ε	Ομάδα Ζ	p[$]
Σωματικό βάρος (g)	3353 ± 270,1	2372,5 ± 348,3[*]	2451,7 ± 172,1[#]	0,008
Γλυκόζη (mg/dl)	130 (124-134,5)	146,5 (136,3-154,5)[*]	134 (132,8-137)	0,008
TC (mg/dl)	44 (34-60)	79 (68-268,3)[*]	63 (51,8-75,5)	0,02
LDL-C (mg/dl)	15,2 (10,4-33,3)	37,2 (13,1-236,8)	21,3 (15,8-26,7)	0,4
HDL-C (mg/dl)	21 (16,5-23,5)	20,6 (16,7-23,3)	26,2 (21,1-32,7)	0,1
TAG (mg/dl)	39 (36-57,5)	60,5 (48-158,8)	78 (71,5-88,3)[*]	0,02

[$]p<0,05 μεταξύ των τριών ομάδων, Kruskal-Wallis test

[*]p<0,05 vs ομάδα Δ, Kruskal-Wallis test

[#]p<0,05 vs ομάδα Ε, Kruskal-Wallis test

[ł] Επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας α=5%

5.2.2 Ανθρωπομετρικά και βιοχημικά χαρακτηριστικά των κουνελιών στο χρόνο t=45 ημέρες

Από τις 45 και έως τις 90 ημέρες χορηγήθηκαν στα κουνέλια των τριών ομάδων διαφορετικού τύπου δίαιτες προκειμένου να διερευνηθεί εάν και κατά πόσο ο εμπλουτισμός της πρότυπης κουνελοτροφής του εμπορίου με εμπλουτισμένο με BAL γιαούρτι θα μπορούσε να υποστρέψει την ανάπτυξη των αθηρωματικών πλακών που προκάλεσε η κατανάλωση της αθηρογονικής δίαιτας τις προηγούμενες 45 ημέρες. Η κατανάλωση είτε του απλού γιαουρτιού του εμπορίου 2% λιπαρών του είτε του εμπλουτισμένου με BAL γιαουρτιού του εμπορίου 2% λιπαρών ήταν καλά ανεκτά και δε δημιούργησε κάποιο πρόβλημα στα κουνέλια. Δεν παρατηρήθηκε κάποια στατιστικά σημαντική διαφορά στην κατανάλωση τροφής μεταξύ των τριών διαιτών (p=0,3).

Ως προς τα ανθρωπομετρικά και βιοχημικά χαρακτηριστικά που μετρήθηκαν στο χρόνο t=45 ημέρες δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των τριών ομάδων με εξαίρεση τις τιμές HDL-C ορού, όπου τα κουνέλια της ομάδας Ε είχαν στατιστικά σημαντικά υψηλότερες τιμές από την ομάδα Δ και τα επίπεδα γλυκόζης ορού όπου τα κουνέλια της ομάδας Ε είχαν στατιστικά σημαντικά χαμηλότερες τιμές τόσο από την ομάδα Δ (p=0,008) όσο και από την ομάδα Ζ (p=0,03) από τα κουνέλια της ομάδας Δ. Τα αποτελέσματα φαίνονται αναλυτικά στον πίνακα που ακολουθεί.

Πίνακας 5.8: Ανθρωπομετρικά και βιοχημικά χαρακτηριστικά των κουνελιών του πειράματος υποστροφής στο μέσο της παρέμβασης (t=45 ημέρες)

	Ομάδα Δ	Ομάδα Ε	Ομάδα Ζ	p[$]
Σωματικό βάρος (g)	3386 ± 264,8	3518,3 ± 310	3313,3 ± 175,5	0,4
Γλυκόζη (mg/dl)	145 (132-150)	114,5 (105,3-119,5)[*]	115 (110,8-122,8)[#]	0,006
TC (mg/dl)	2765 (1785-3160)	2337,5 (1887,5-2745)	2302,5 (2012,5-2746,3)	0,9
LDL-C (mg/dl)	2733 (1750-3104)	2274,6 (1827-2646,4)	2231,6 (1964-2644,3)	0,8
HDL-C (mg/dl)	21 (16,5-23,5)	44,5 (32,5-69)[*]	26 (24,5-60,3)[*]	0,01
TAG (mg/dl)	80 (57,5-185)	123 (105-161,5)	132 (114,8-166)	0,6

[$]p<0,05 μεταξύ των τριών ομάδων, Kruskal-Wallis test

[*]p<0,05 vs ομάδα Δ, Kruskal-Wallis test

[#]p<0,05 vs ομάδα Ε, Kruskal-Wallis test

[ł] Επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας α=5%

5.2.3 Ανθρωπομετρικά και βιοχημικά χαρακτηριστικά των κουνελιών στο τέλος της παρέμβασης (t=90 ημέρες)

Στο τέλος της παρέμβασης, το σωματικό βάρος των κουνελιών δε διέφερε στατιστικά σημαντικά μεταξύ των τριών διαφορετικών ομάδων (p=0,4), γεγονός που αντανακλά και τη φυσιολογική ανάπτυξη των κουνελιών που αντί για την κουνελοτροφή κατανάλωναν το γιαούρτι (ομάδες Ε και Ζ). Ως προς τα βιοχημικά χαρακτηριστικά, τα κουνέλια της ομάδας Δ είχαν στατιστικά σημαντικά υψηλότερες τιμές LDL-C (p=0,002), υψηλότερες τιμές TC (p=0,002) και χαμηλότερες τιμές HDL-C (p=0,02) σε σχέση με τα κουνέλια της ομάδας Ζ, ενώ τα κουνέλια της ομάδας Ε είχαν στατιστικά σημαντικά (p=0,007) υψηλότερες τιμές TAG από τα κουνέλια της ομάδας Δ. Τα αποτελέσματα φαίνονται αναλυτικά στον πίνακα που ακολουθεί:

Πίνακας 5.9: Ανθρωπομετρικά και βιοχημικά χαρακτηριστικά των κουνελιών του πειράματος υποστροφής στο τέλος της παρέμβασης (t=90 ημέρες)

	Ομάδα Δ	Ομάδα Ε	Ομάδα Ζ	p$
Σωματικό βάρος (g)	4242,4 ± 208,9	4103,3 ± 433	4060 ± 273	0,4
Γλυκόζη (mg/dl)	116 (110-124)	119 (107-128,5)	119,4 (116,6-122,3)	0,6
TC (mg/dl)	475 (349-645)	182 (100,8-289)	94,8 (83,5-110)*	0,004
LDL-C (mg/dl)	438,6 (317,9-611,1)	142,7 (74,5-247,5)	52,6 (45,9-61,7)*	0,004
HDL-C (mg/dl)	21 (19,5-24)	30 (21,8-43,5)	36,3 (33,3-38,6)*	0,02
TAG (mg/dl)	54 (38-81)	23,5 (18-35,3)*	29,3 (26,8-31)	0,09

$p<0,05 μεταξύ των τριών ομάδων, Kruskal-Wallis test

*p<0,05 vs ομάδα Δ, Kruskal-Wallis test

Επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας α=5%

5.2.4 Σύγκριση ανθρωπομετρικών και βιοχημικών χαρακτηριστικών των κουνελιών του πειράματος αναστολής μεταξύ του χρόνου t=0 ημέρες, του χρόνου t=45 ημέρες και του χρόνου t=90 ημέρες

- Ομάδα Δ

Στην ομάδα Δ η κατανάλωση της αθηρογονικής δίαιτας δεν μετέβαλε στατιστικά σημαντικά το σωματικό βάρος των κουνελιών (p=1), αύξησε στατιστικά σημαντικά την LDL-C (p=0,005), την TC (p=0,002) ενώ παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στις TAG, στην HDL-C και στη γλυκόζη. Από την άλλη, η κατανάλωση της σκέτης κουνελοτροφής αύξησε στατιστικά σημαντικά το σωματικό βάρος των κουνελιών (p=0,03) και μείωσε στατιστικά σημαντικά (p=0,03) τη γλυκόζη ενώ όλα τα υπόλοιπα βιοχημικά χαρακτηριστικά δε διέφεραν στατιστικά σημαντικά σε σχέση με το χρόνο t=45 ημέρες. Τα ανθρωπομετρικά και βιοχημικά χαρακτηριστικά των κουνελιών της ομάδας Δ το χρόνο t=90 ημέρες δε διέφεραν στατιστικά σημαντικά σε σχέση με το χρόνο t=0 ημέρες.

Πίνακας 5.10: Ανθρωπομετρικά και βιοχημικά χαρακτηριστικά των κουνελιών της ομάδας Δ του πειράματος αναστολής, μεταξύ του χρόνου t=0 ημέρες, t=45 ημέρες και t=90 ημέρες

	Ομάδα Δ		
	t=0	t=45	t=90
Σωματικό βάρος (g)	3353 ± 270,1	3386 ± 264,8	4242,4 ± 208,9[#]
Γλυκόζη (mg/dl)	130 (124-134,5)	145 (132-150)	116 (110-124)[#]
TC (mg/dl)	44 (34-60)	2765 (1785-3160)[*]	475 (349-645)
LDL-C (mg/dl)	15,2 (10,4-33,3)	2733 (1750-3104)[*]	438,6 (317,9-611,1)
HDL-C (mg/dl)	21 (16,5-23,5)	21 (16,5-23,5)	21 (19,5-24)
TAG (mg/dl)	39 (36-57,5)	80 (57,5-185)	54 (38-81)

[*]$p<0,05$ vs t=0, Friedman test

[#]$p<0,05$ vs t=45, Friedman test

- Ομάδα Ε

Στην ομάδα Ε, η κατανάλωση της αθηρογονικής δίαιτας δε διαφοροποίησε στατιστικά σημαντικά το σωματικό βάρος των ζώων (p=0,2), αύξησε στατιστικά σημαντικά την LDL-C (p=0,004), την TC (p=0,01) και την HDL-C (p=0,02), μείωσε στατιστικά σημαντικά τη γλυκόζη (p=0,01) ενώ δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στις TAG (p=1). Από την άλλη, η κατανάλωση της πρότυπης κουνελοτροφής μαζί με το απλό γιαούρτι του εμπορίου 2% λιπαρών μείωσε στατιστικά σημαντικά (p=0,01) τις TAG ορού ενώ τα υπόλοιπα βιοχημικά και ανθρωπομετρικά χαρακτηριστικά δε διέφεραν στατιστικά σημαντικά μεταξύ του χρόνου t=45 ημέρες και t=90 ημέρες. Τα βιοχημικά χαρακτηριστικά των κουνελιών στην ομάδα Ε το χρόνο t=90 ημέρες δε διέφεραν στατιστικά σημαντικά σε σχέση με το χρόνο t=0 ημέρες ενώ το σωματικό βάρος των κουνελιών αυξήθηκε στατιστικά σημαντικά (p=0,002) σε σχέση με το χρόνο t=0 ημέρες.

Πίνακας 5.11: Ανθρωπομετρικά και βιοχημικά χαρακτηριστικά των κουνελιών της ομάδας Ε του πειράματος αναστολής, μεταξύ του χρόνου t=0 ημέρες, t=45 ημέρες και t=90 ημέρες

	Ομάδα Ε		
	t=0	t=45	t=90
Σωματικό βάρος (g)	2372,5 ± 348,3	3518,3 ± 310	4103,3 ± 433*
Γλυκόζη (mg/dl)	146,5 (136,3-154,5)	114,5 (105,3-119,5)*	119 (107-128,5)
TC (mg/dl)	79 (68-268,3)	2337,5 (1887,5-2745)*	182 (100,8-289)
LDL-C (mg/dl)	37,2 (13,1-236,8)	2274,6 (1827-2646,4)*	142,7 (74,5-247,5)
HDL-C (mg/dl)	20,6 (16,7-23,3)	44,5 (32,5-69)*	30 (21,8-43,5)
TAG (mg/dl)	60,5 (48-158,8)	123 (105-161,5)	23,5 (18-35,3)#

*$p<0,05$ vs t=0, Friedman test

#$p<0,05$ vs t=45, Friedman test

- Ομάδα Ζ

Στην ομάδα Ζ, η κατανάλωση της αθηρογονικής δίαιτας δεν διαφοροποίησε στατιστικά σημαντικά το σωματικό βάρος των ζώων (p=0,2), αύξησε στατιστικά σημαντικά την LDL-C (p=0,002) και την TC (p=0,002), μείωσε στατιστικά σημαντικά τη γλυκόζη (p=0,01) ενώ δεν άλλαξε στατιστικά σημαντικά τα υπόλοιπα βιοχημικά χαρακτηριστικά. Η κατανάλωση της πρότυπης κουνελοτροφής μαζί με το εμπλουτισμένο γιαούρτι 2% λιπαρών μείωσε στατιστικά σημαντικά (p=0,002) τις TAG ορού ενώ τα υπόλοιπα βιοχημικά και ανθρωπομετρικά χαρακτηριστικά δε διέφεραν στατιστικά σημαντικά μεταξύ του χρόνου t=45 ημέρες και t=90 ημέρες. Τα βιοχημικά και ανθρωπομετρικά χαρακτηριστικά των κουνελιών στην ομάδα Ζ το χρόνο t=90 ημέρες δε διέφεραν στατιστικά σημαντικά σε σχέση με το χρόνο t=0 ημέρες, με εξαίρεση την HDL-C (p=0,02) και το σωματικό βάρος (p=0,002) που αυξήθηκαν στατιστικά σημαντικά (p=0,02) σε σχέση με το χρόνο t=0 ημέρες.

Πίνακας 5.12: Ανθρωπομετρικά και βιοχημικά χαρακτηριστικά των κουνελιών της ομάδας Ζ του πειράματος αναστολής, μεταξύ του χρόνου t=0 ημέρες, t=45 ημέρες και t=90 ημέρες

	Ομάδα Z		
	t=0	t=45	t=90
Σωματικό βάρος (g)	2372,5 ± 348,3	3518,3 ± 310	4103,3 ± 433*
Γλυκόζη (mg/dl)	134 (132,8-137)	115 (110,8-122,8)*	119,4 (116,6-122,3)
TC (mg/dl)	63 (51,8-75,5)	2302,5 (2012,5-2746,3)*	94,8 (83,5-110)
LDL-C (mg/dl)	21,3 (15,8-26,7)	2231,6 (1964-2644,3)*	52,6 (45,9-61,7)
HDL-C (mg/dl)	26,2 (21,1-32,7)	26 (24,5-60,3)	36,3 (33,3-38,6)*
TAG (mg/dl)	78 (71,5-88,3)	132 (114,8-166)	29,3 (26,8-31)#

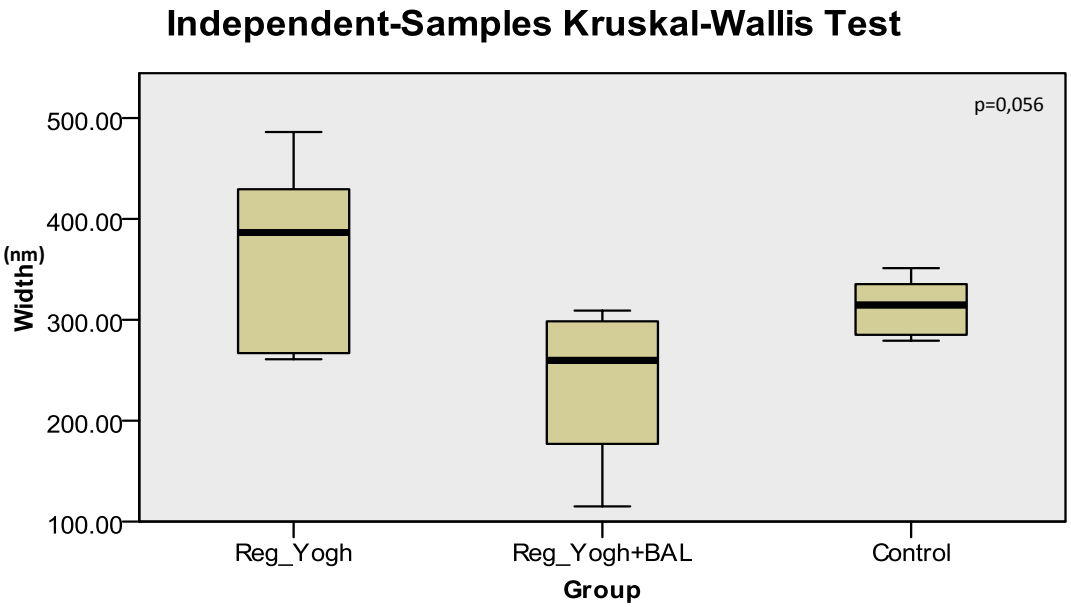
*$p<0,05$ vs t=0, Friedman test

#$p<0,05$ vs t=45, Friedman test

5.1.4 Η επίδραση του πειράματος υποστροφής στην εξέλιξη των αθηρωματικών πλακών

Στο τέλος της παρέμβασης του πειράματος της υποστροφής με κατάλληλη μορφομετρική ανάλυση προσδιορίστηκαν το μέγιστο και το μέσο πάχος των αθηρωματικών πλακών προκειμένου να αξιολογηθεί εάν και κατά πόσο το εμπλουτισμένο με BAL γιαούρτι έχει την ικανότητα να υποστρέφει τη διαδικασία της αθηροσκλήρωσης.

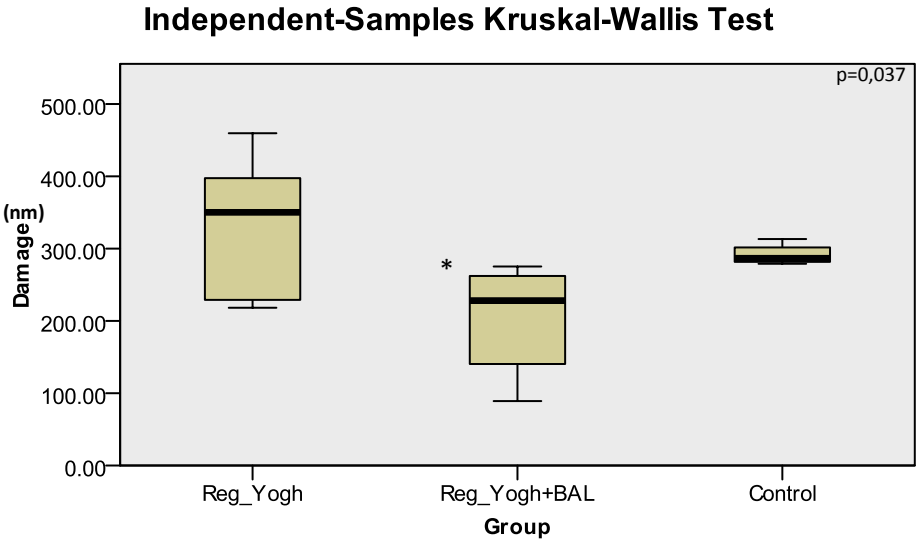
Ως προς το μέγιστο πάχος των αθηρωματικών πλακών, τα κουνέλια της ομάδας Z είχαν μικρότερη τιμή διαμέσου [273,9 (208-333,3)] σε σχέση με τα κουνέλια της ομάδας Δ [314,7 (285,1-335,4)] και της ομάδας Ε [386,5 (267-429,4)] αν και αυτή η διαφορά μεταξύ των ομάδων ήταν οριακά μη στατιστικά σημαντική (p=0,056). Τα αποτελέσματα αυτά αποτυπώνονται και γραφικά στο παρακάτω θηκόγραμμα.



*p=0,056 μεταξύ των τριών ομάδων

Σχήμα 5.5: Μέγιστο πάχος αθηρωματικών πλακών μεταξύ των κουνελιών του πειράματος υποστροφής

Ως προς την μέσο πάχος της αθηροσκληρωτικής βλάβης, το 50% των κουνελιών της ομάδας Ζ είχαν μέσο πάχος βλάβης 238,6 (166,1-301,2) nm, το 50% των κουνελιών της ομάδας Δ είχαν μέσο πάχος βλάβης 287,1 (281,7-301,6) nm και το 50% των κουνελιών της ομάδας Ε είχαν μέσο πάχος βλάβης 350,2 (229,1-397,5) nm. Παρόλα αυτά, το μικρότερο μέσο πάχος βλάβης που παρατηρήθηκε στην ομάδα που κατανάλωνε το εμπλουτισμένο γιαούρτι (ομάδα Ζ) δε βρέθηκε να είναι στατιστικά σημαντικό (p=0,1) σε σχέση με την ομάδα ελέγχου (ομάδα Δ). Αντίθετα, η σχέση αυτή ήταν στατιστικά σημαντική για τα κουνέλια της ομάδας Ζ σε σχέση με τα κουνέλια της ομάδας Ε (p=0,04). Τελικά, σε σχέση με την πρότυπη κουνελοτροφή η κατανάλωση του απλού γιαουρτιού αύξησε κατά 18% το μέσο πάχος της αθηροσκληρωτικής βλάβης. Τα αποτελέσματα αποτυπώνονται γραφικά στο θηκόγραμμα που ακολουθεί.



*p<0,05 vs yoghurt

$p=0,037 μεταξύ των τριών ομάδων

Σχήμα 5.6: Μέσο πάχος βλάβης αθηρωματικών πλακών μεταξύ των κουνελιών του πειράματος υποστροφής

5.1.5 Η επίδραση της πειραματικής παρέμβασης στους δείκτες λιποειδικής υπεροξείδωσης TBARS

Βασικός στόχος του πειραματικού πρωτοκόλλου για τη μελέτη του φαινομένου της υποστροφής στην ανάπτυξη αθηρωματικών πλακών ήταν ο προσδιορισμός των TBARS στον ορό και στους ιστούς (νεφροί, ήπαρ) των κουνελιών, ως δείκτες της λιποειδικής υπεροξείδωσης που πιθανόν να λαμβάνει σε μεγάλο βαθμό χώρα κατά την εξέλιξη της αθηροσκληρωτικής νόσου στο συγκεκριμένο ζωικό πρότυπο.

Στην έναρξη του πειράματος, τα κουνέλια της ομάδας Ζ είχαν στατιστικά σημαντικά (p=0,006) υψηλότερες τιμές TBARS ορού σε σχέση με τα κουνέλια της ομάδας Δ. Στο μέσο της παρέμβασης, οι τιμές TBARS στον ορό των κουνελιών μεταξύ των διαφορετικών ομάδων δε διέφεραν στατιστικά σημαντικά (p=0,08). Αντίθετα, στο τέλος της παρέμβασης τα κουνέλια της ομάδας Ε είχαν στατιστικά σημαντικά (p=0,02) χαμηλότερες τιμές TBARS ορού σε σχέση με τα κουνέλια της ομάδας Δ.

Οι τιμές TBARS στον ηπατικό ιστό δε διέφεραν στατιστικά σημαντικά (p=0,2) μεταξύ των τριών διαφορετικών ομάδων. Ως προς το νεφρικό ιστό, στις ομάδων Ε και Ζ υπήρχε μια ισχυρή τάση αύξησης των τιμών TBARS να σε σύγκριση με την ομάδα Δ (p=0,0051). Στον πίνακα και στα διαγράμματα που ακολουθούν τα αποτελέσματα φαίνονται αναλυτικά.

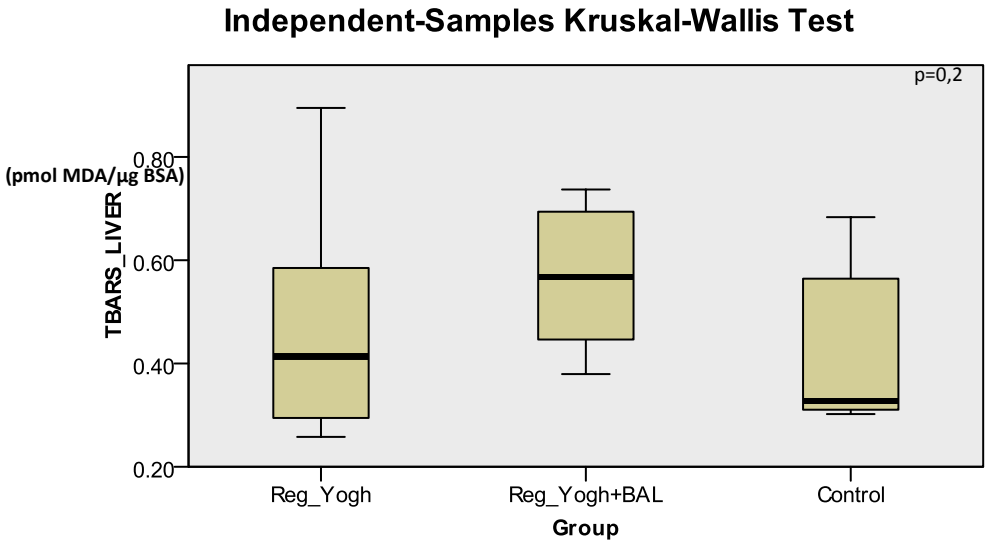
Πίνακας 5.13: Τιμές TBARS στον ορό (χρόνοι t=0 ημέρες, t=45 ημέρες και t=90 ημέρες), στους νεφρούς και στο ήπαρ των κουνελιών του πειράματος υποστροφής, μεταξύ των τριών ομάδων παρέμβασης

	Ομάδα Δ	Ομάδα Ε	Ομάδα Ζ	p*
$TBARS_{t=0\ ημέρες}$ ορού (μM MDA)	0,79 (0,72-0,94)	0,91 (0,86-1,01)	1,37 (1,07-1,95)$	0,006
$TBARS_{t=45\ ημέρες}$ ορού (μM MDA)	2,39 (2,19-3,25)	3,42 (2,92-3,92)	2,8 (2,39-3,2)	0,08
$TBARS_{t=90\ ημέρες}$ ορού (μM MDA)	1,55 (1,11-2,3)	0,78 (0,6-1,05)$	1,01 (0,7-1,21)	0,02
TBARS νεφρών (pmol MDA/μg BSA)	0,25 (0,22-0,27)	0,34 (0,26-0,49)	0,33 (0,29-0,35)	0,0051
TBARS ήπατος (pmol MDA/μg BSA)	0,33 (0,31-0,56)	0,41 (0,29-0,59)	0,57 (0,45-0,69)	0,2

*p<0,05 μεταξύ των τριών ομάδων, Kruskal-Wallis test

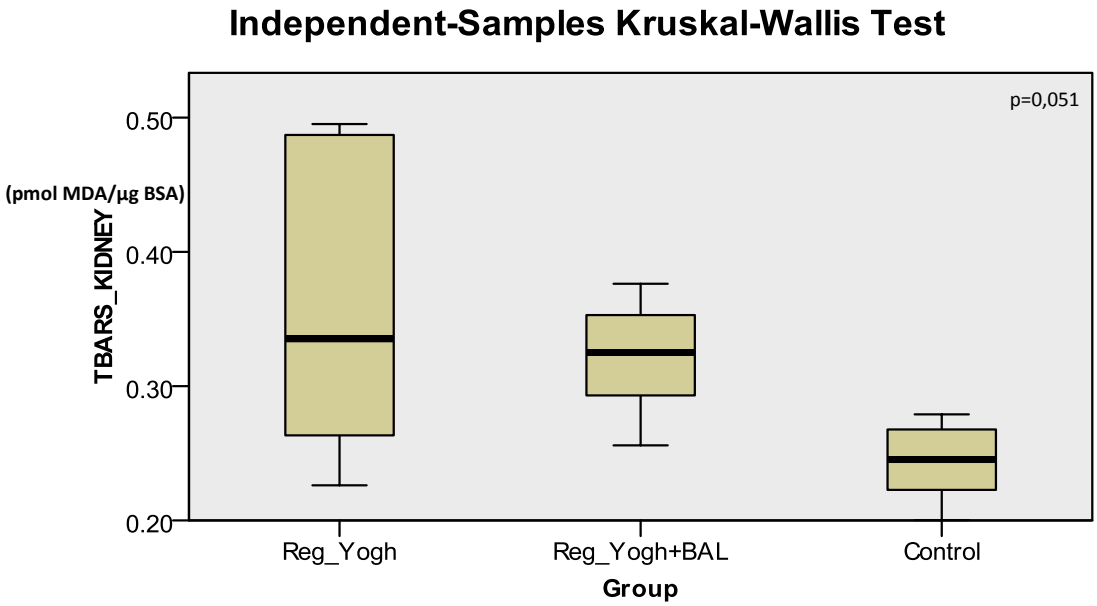
$p<0,05 vs ομάδα Δ, Kruskal-Wallis test

Επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας α=5%



*p=0,2 μεταξύ των τριών ομάδων

Σχήμα 5.7: Τιμές TBARS στον ηπατικό ιστό μεταξύ των κουνελιών του πειράματος υποστροφής



*p=0,051 μεταξύ των τριών ομάδων

Σχήμα 5.8: Τιμές TBARS στον νεφρικό ιστό μεταξύ των κουνελιών του πειράματος υποστροφής

Οι συγκρίσεις των τιμών TBARS ορού μεταξύ των τριών διαφορετικών χρονικών στιγμών (t=0, t=45, και t=90 ημέρες) μέσα στην ίδια ομάδα έδειξαν ότι η κατανάλωση της αθηρογονικής δίαιτας αύξησε στατιστικά σημαντικά (p=0,005) τις τιμές TBARS ορού μόνο στην ομάδα Δ. Στις ομάδες Ε και Ζ, η αντικατάσταση της αθηρογονικής δίαιτας είτε με την κουνελοτροφή σε συνδυασμό με το απλό γιαούρτι του εμπορίου 2% λιπαρών, είτε σε συνδυασμό με το εμπλουτισμένο με BAL γιαούρτι του εμπορίου 2% λιπαρών αντίστοιχα, οδήγησε σε στατιστικά σημαντικά μειωμένες τιμές TBARS ορού σε σχέση με το χρόνο t=0 ημέρες. Συγκεκριμένα, στα κουνέλια της ομάδας Δ οι τιμές TBARS ορού αυξήθηκαν από 0,79 (0,72-0,94) στην αρχή του πειράματος σε 2,39 (2,19-3,25) τη χρονική στιγμή t=45 ημέρες, στα κουνέλια της ομάδας Ε οι τιμές TBARS ορού μειώθηκαν από 3,42 (2,92-3,92) το χρόνο t=45 ημέρες σε 0,78 (0,6-1,05) το χρόνο t=90 ημέρες (p=0,03) και τέλος στα κουνέλια της ομάδας Ζ οι τιμές TBARS ορού μειώθηκαν από 2,8 (2,39-3,2) το χρόνο t=45 ημέρες σε 1,01 (0,7-1,21) το χρόνο t=90 ημέρες (p=0,004).

5.3 Συσχέτιση τιμών TBARS στον ορό και στους ιστούς των κουνελιών με το μέγιστο και το μέσο πάχος της αθηρωματικής βλάβης

Στην ομάδα Ε του πειράματος υποστροφής βρέθηκε στατιστικά σημαντική ισχυρή θετική συσχέτιση (rho=0,829, p=0,04) των TBARS του ορού τη χρονική στιγμή t=90 ημέρες τόσο με το μέγιστο όσο και με το μέσο πάχος της αθηρωματικής βλάβης. Στην ίδια ομάδα παρατηρήθηκε επίσης στατιστικά σημαντική ισχυρή θετική συσχέτιση (rho=0,886, p=0,01) των TBARS στο νεφρικό ιστό με το μέγιστο και το μέσο πάχος της αθηρωματικής βλάβης.

Στην ομάδα Ζ του πειράματος υποστροφής βρέθηκε στατιστικά σημαντική ισχυρή θετική συσχέτιση (rho=0,941, p=0,005) ανάμεσα στα TBARS του ορού τη χρονική στιγμή t=90 ημέρες και στα TBARS των ιστών (νεφροί, ήπαρ). Τέλος, στην ομάδα Β του πειράματος αναστολής βρέθηκε στατιστικά σημαντική ισχυρή αρνητική συσχέτιση (rho=-0,943, p=0,005) των τιμών TBARS στο ήπαρ τόσο με το μέγιστο όσο και με το μέσο πάχος της αθηρωματικής βλάβης.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6^{Ο}

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η αθηροσκλήρωση είναι μία χρόνια εξελικτική ασθένεια[2] η οποία επηρεάζει ανεξαιρέτως όλων των ειδών τα αιμοφόρα αγγεία της ανθρώπινης φυσιολογίας[4]. Η αθηροσκλήρωση αποτελεί την κλινική έκφραση της CVD και κλινικά εκδηλώνεται με μία από τις τρεις κύριες μορφές αυτής: την CHD, το εγκεφαλικό και την PVD[7]. Τα CVDs με επικρατέστερα την CHD και το εγκεφαλικό αποτελούν μία από τις κυριότερες αιτίες νοσηρότητας και θνησιμότητας παγκοσμίως και τη σημαντικότερη αιτία νοσηρότητας και θνησιμότητας στις χώρες του Δυτικού κόσμου[8,9]. Στην παθοφυσιολογία της αθηροσκλήρωσης εμπλέκονται τρεις βασικοί παθογενετικοί μηχανισμοί: η φλεγμονή, το οξειδωτικό στρες και η θρόμβωση[6,15,19].

Το οξειδωτικό στρες, το οποίο ορίζεται ως η μετατόπιση της ισορροπίας μεταξύ αντιοξειδωτικών και προ-οξειδωτικών παραγόντων του οργανισμού εις βάρος των πρώτων, σχετίζεται με υπερβολικά αυξημένη παραγωγή ελεύθερων ριζών[46] οι οποίες επιτίθενται και καταστρέφουν θεμελιώδη βιολογικά μόρια (πρωτεΐνες, λιποειδή, νουκλεϊκά οξέα), οδηγώντας σε δυσλειτουργία της ομοιόστασης του ενδοθηλίου και τελικά αγγειοπάθεια[47]. Μία από τις σημαντικότερες οξειδωτικές καταστροφές που προκαλείται από τις ελεύθερες ρίζες είναι η υπεροξείδωση των λιποειδών η οποία βλάπτει ιδιαίτερα τις βιολογικές μεμβράνες των κυττάρων καθώς είναι πλούσιες σε PUFA[51]. Η υπεροξείδωση των λιποειδών οδηγεί στην παραγωγή ενδιάμεσων οξειδωτικών προϊόντων όπως η MDA, που διαδίδουν περαιτέρω τις οξειδωτικές καταστροφές[52].

Ένα από τα βασικά τρόφιμα το οποίο έχει μελετηθεί εκτενώς ως προς τις επιδράσεις του στις καρδιαγγειακές παθήσεις είναι το ελαιόλαδο. Ένας τεράστιος όγκος δεδομένων από επιδημιολογικές και κλινικές μελέτες συσχετίζει την υψηλή κατανάλωση ελαιολάδου με τη μείωση της επίπτωσης CVDs καθώς και συγκεκριμένων κλινικών δεικτών που σχετίζονται με την αθηροσκλήρωση[40]. Οι ευεργετικές επιδράσεις του ελαιολάδου αποδίδονται στο πλήθος μικροθρεπτικών συστατικών που περιέχει, όπως οι φαινολικές ενώσεις, και στην

υψηλή περιεκτικότητα του σε MUFA[68,69]. Στα συστατικά αυτά έχουν αποδοθεί μέσα από την πραγματοποίηση ενός μεγάλου αριθμού in vitro μελετών συγκεκριμένες αντιφλεγμονώδεις[107], αντιοξειδωτικές[110] και αντιθρομβωτικές ιδιότητες[115].

Σκοπός της παρούσας πτυχιακής μελέτης ήταν να μελετήσει τις βιολογικές δράσεις εκχυλίσματος OMWW πλούσιου σε BAL το οποίο προστίθεται σε γιαούρτι 2% του εμπορίου, σε μοντέλο αθηροσκλήρωσης κουνελιών. Συγκεκριμένα, θέλαμε να εξετάσουμε εάν αυτό το λειτουργικό τρόφιμο, το οποίο χρησιμοποιείται για πρώτη φορά στη βιβλιογραφία, θα μπορούσε να αναστείλει την ανάπτυξη αθηρωματικών πλακών σε κουνέλια που τρέφονται με αθηρογονική δίαιτα και επιπλέον αν θα μπορούσε να υποστρέψει την αθηροσκληρωτική διαδικασία σε κουνέλια που έχουν ήδη αναπτύξει αθηρωματικές πλάκες λόγω της χρόνιας κατανάλωσης (45 ημέρες) αθηρογονικής δίαιτας. Και στις δύο περιπτώσεις ερευνήθηκε η επίδραση του τροφίμου στο οξειδωτικό στρες το οποίο εμπλέκεται στην εξέλιξη της αθηροσκλήρωσης.

Χρησιμοποιήθηκε εκχύλισμα OMWW καθώς έχει αναφερθεί από πολλές μελέτες παρέμβασης σε ανθρώπους και πειραματόζωα ότι το OMWW λόγω της υψηλής συγκέντρωσής του σε βιοδραστικά συστατικά και ιδιαίτερα σε φαινολικές ενώσεις εμφανίζει πολύ σημαντικές αντιοξειδωτικές δράσεις ειδικότερα[116] αλλά και υποχοληστερολαιμικές επιδράσεις γενικότερα[125]. Απ' όσο γνωρίζουμε είναι η πρώτη φορά που χρησιμοποιείται εκχύλισμα OMWW πλούσιο σε βιοδραστικά πολικά λιποειδή (BAL). Χορηγήθηκε το συγκεκριμένο εκχύλισμα καθώς από μία πολύ πρόσφατη μελέτη της Τσαντίλα και των συνεργατών της βρέθηκε ότι τα πολικά λιποειδή του πυρηνελαίου, το οποίο επίσης αποτελεί παραπροϊόν της παραγωγής του ελαιολάδου, αναστέλλουν την ανάπτυξη της αθηρογένεσης σε υπερχοληστερολαιμικά κουνέλια το ίδιο αποτελεσματικά με το VOO[106].

Εκτός από την αναστολή της αθηροσκληρωτικής διαδικασίας η οποία έχει αποδειχθεί ως βιολογική δράση συστατικών του ελαιολάδου και του πυρηνελαίου, προχωρήσαμε και στη διερεύνηση της επίδρασης του εκχυλίσματος OMWW στην υποστροφή της αθηροσκληρωτικής διαδικασίας, καθώς οι επιδράσεις των συστατικών του ελαιολάδου-πόσο μάλλον των παραπροϊόντων αυτού-σε αυτή τη διαδικασία είναι ελάχιστα μελετημένες και επομένως δεν είναι ακόμα ξεκάθαρες[106].

Καθώς σκοπός των μελετών στα πειραματόζωα είναι στη συνέχεια να εφαρμοστούν τα αποτελέσματά τους σε ανθρώπους, σκεφτήκαμε να χορηγήσουμε το εκχύλισμα αυτό ως συστατικό ενός γιαουρτιού του εμπορίου 2% λιπαρών το οποίο έτσι κι αλλιώς καταναλώνεται ευρέως από τον ανθρώπινο πληθυσμό και όχι απλώς να το αναμίξουμε με την

κουνελοτροφή. Επιπλέον, είναι γνωστό από προηγούμενες μελέτες ότι τρόφιμα της Μεσογειακής διατροφής, όπως το γιαούρτι, περιέχουν ανταγωνιστές του PAF[105,128] επομένως τα συστατικά του γιαουρτιού θα μπορούσαν δυνητικά να ενισχύουν τις βιολογικές δράσεις του εκχυλίσματος OMWW. Η χορήγηση παρόμοιου λειτουργικού τροφίμου σε μοντέλο αθηροσκλήρωσης κουνελιών γίνεται για πρώτη φορά από τη δική μας επιστημονική ομάδα, η οποία πρόκειται σύντομα να δημοσιεύσει άρθρο στην Ελληνική Εταιρεία Αθηροσκλήρωσης, ως προς την επίδραση του τροφίμου αυτού στην εξέλιξη των αθηρωματικών πλακών υπερχοληστερολαιμικών κουνελιών[130]. Παρόλα αυτά, στη βιβλιογραφία υπάρχουν δύο μελέτες που έχουν χρησιμοποιήσει γιαούρτι εμπλουτισμένο με βιοδραστικά συστατικά. Στη μία μελέτη ο Visioli με τους συνεργάτες του μελέτησαν τη βιοδιαθεσιμότητα της HT όταν χορηγείται ως συστατικό VOO, ROO ή γιαουρτιού σε αρουραίους και ανθρώπους[129] και στην άλλη ο Léger με τους συνεργάτες του μελέτησαν τις βιολογικές δράσεις εμπλουτισμένου γιαουρτιού του εμπορίου με φαινολικού εκχύλισμα OMWW πλούσιο σε HT σε ασθενείς με διαβήτη τύπου I, το οποίο φάνηκε να έχει αντιθρομβωτικές δράσεις (αναστολή της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων) και ασθενείς αντιοξειδωτικές δράσεις[126].

Για να μελετήσουμε την αναστολή της αθηροσκλήρωσης, χρησιμοποιήσαμε μια ομάδα ελέγχου (ομάδα Α) η οποία κατανάλωνε για 45 ημέρες αθηρογονική δίαιτα, μία ομάδα η οποία για 45 ημέρες κατανάλωνε αθηρογονική δίαιτα με απλό γιαούρτι του εμπορίου 2% λιπαρών (ομάδα Β) και μία ομάδα η οποία κατανάλωνε αθηρογονική δίαιτα με γιαούρτι του εμπορίου 2% λιπαρών εμπλουτισμένο με εκχύλισμα OMWW πλούσιο σε BAL.

Η κατανάλωση και των τριών διαιτών προκάλεσε στατιστικά σημαντική μείωση της γλυκόζης στον ορό των κουνελιών και στατιστικά σημαντική αύξηση σε όλες τις λιποειδικές παραμέτρους που σχετίζονται με την αθηροσκλήρωση (LDL-C, HDL-C, TAG, TC), με εξαίρεση την ομάδα Β στην οποία η HDL-C αυξήθηκε αλλά όχι στατιστικά σημαντικά πιθανόν λόγω του μεγάλου ενδοτεταρτημοριακού εύρους στις τιμές των έξι ζώων. Η αύξηση στις λιποειδικές παραμέτρους δικαιολογείται λόγω της χρόνιας κατανάλωσης της αθηρογονικής δίαιτας ενώ η μείωση της γλυκόζης η οποία εκτός από στατιστικά σημαντική ήταν και κλινικά σημαντική (παρατηρήθηκε μείωση της τάξης του 20% στις ομάδες Β και Γ σε σχέση με το χρόνο t=0 ημέρες), αποτελεί εύρημα υπό διερεύνηση καθώς πρώτον τα αδημοσίευτα δεδομένα του Σταματάκη δεν έδειξαν στατιστικά σημαντική μείωση της γλυκόζης σε καμία από τις ομάδες και δεύτερον λόγω του ότι δεν υπάρχουν άλλες μελέτες στη βιβλιογραφία που να έχουν προσδιορίσει τιμές γλυκόζης σε παρόμοια μοντέλα αθηροσκλήρωσης κουνελιών. Επιπλέον, η κατανάλωση της αθηρογονικής δίαιτας εξαιτίας της ινσουλινοαντίστασης και της διαταραγμένης ανοχής στη γλυκόζη που προκαλεί, θα περιμέναμε φαινομενικά τουλάχιστον να οδηγήσει σε

αύξηση των τιμών της γλυκόζης. Η επίδραση των τριών διαφορετικών διαιτών στις βιοχημικές παραμέτρους ήταν παρόμοια (μη στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των τριών παρεμβάσεων στο χρόνο t=45 ημέρες).

Τα κουνέλια της ομάδας Γ ήταν τα μόνα που εμφάνισαν μείωση στο μέγιστο πάχος της αθηρωματικής πλάκας σε σχέση με την ομάδα ελέγχου και μάλιστα κατά 54,3%, γεγονός που αποδεικνύει την αποτελεσματικότητα του εμπλουτισμένου με BAL γιαουρτιού στην αναστολή της αθηροσκλήρωσης. Αντίθετα, το μέσο πάχος της αθηρωματικής πλάκας δε μειώθηκε στατιστικά σημαντικά σε σχέση με την ομάδα Α σε καμία από τις δύο ομάδες (Β και Γ) αλλά παρόλα αυτά μειώθηκε κλινικά σημαντικά (κατά 42,2% στην ομάδα Β και κατά 61,4% στην ομάδα Γ), γεγονός που υποδεικνύει ότι πιθανόν το μέγεθος του δείγματος στο πείραμα της αναστολής δεν ήταν επαρκές ώστε να προκύψει η στατιστική σημαντικότητα των ευρημάτων. Αυτή η πρόταση ενισχύεται και από το γεγονός ότι στα αδημοσίευτα αποτελέσματα του Σταματάκη, ο οποίος χορηγούσε ακριβώς το ίδιο τρόφιμο στα κουνέλια, παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική μείωση από το εμπλουτισμένο γιαούρτι και στο μέσο πάχος της αθηρωματικής βλάβης σε σχέση με την ομάδα που κατανάλωνε μόνο αθηρογονική δίαιτα[130]. Ο De La Cruz και οι συνεργάτες του ανέφεραν ότι η προσθήκη 15% ελαιολάδου σε αθηρογονική δίαιτα μειώνει το πάχος της αθηρωματικής βλάβης[100]. Επιπλέον, ο Καραντώνης και οι συνεργάτες του πρότειναν μείωση του πάχους της αθηρωματικής βλάβης σε περίπτωση που η αθηρογονική δίαιτα καταναλώνεται σε συνδυασμό με ελαιόλαδο ή εκχύλισμα πολικών λιποειδών ελαιολάδου (OOPLE)[104]. Κάνοντας αυτές τις συγκρίσεις συμπεραίνουμε πως τα BAL από εκχύλισμα OMWW είναι εξίσου αποτελεσματικά στην αναστολή της αθηροσκλήρωσης, τουλάχιστον ως προς το μέγιστο πάχος αυτής.

Προκειμένου να διερευνήσουμε εάν και κατά πόσο το οξειδωτικό στρες συνδέεται με την αθηροσκλήρωση που αναπτύσσεται εξαιτίας της κατανάλωσης της αθηρογονικής δίαιτας στα κουνέλια και εάν το εμπλουτισμένο με BAL γιαούρτι ασκεί την ανασταλτική του επίδραση στην εξέλιξη της αθηροσκλήρωσης μέσω της αναστολής του οξειδωτικού στρες, μετρήσαμε τα TBARS στον ορό, στον νεφρικό και στον ηπατικό ιστό των κουνελιών. Η κατανάλωση και των τριών διαιτών αύξησε στατιστικά σημαντικά τις τιμές των TBARS στον ορό σε σχέση με το χρόνο t=0 ημέρες. Ο De La Cruz και οι συνεργάτες ανέφεραν μεγαλύτερες τιμές MDA στα αιμοπετάλια και στην αορτή υπερχοληστερολαιμικών κουνελιών[100]. Δε φάνηκε κάποια από τις δίαιτες με το γιαούρτι να αυξάνει λιγότερο τις τιμές TBARS ορού σε σχέση με την ομάδα Α (μη στατιστικά σημαντικά αποτελέσματα μεταξύ των τριών ομάδων το χρόνο t=45 ημέρες). Με άλλα λόγια, στον ορό των κουνελιών δεν παρατηρήθηκε ικανότητα αναστολής του οξειδωτικού στρες λόγω της κατανάλωσης του

εμπλουτισμένου με BAL γιαουρτιού. Καθώς το κλάσμα των BAL που χρησιμοποιήσαμε περιέχει σημαντική ποσότητα φαινολικών ενώσεων και ιδιαίτερα HT αφού προέρχεται από OMWW, τα αποτελέσματά μας μπορούν να συγκριθούν με τα αποτελέσματα μιας μελέτης στην οποία φάνηκε ότι η χορήγηση HT ως συστατικό της αθηρογονικής δίαιτας δε μείωσε στατιστικά σημαντικά τα επίπεδα MDA στο πλάσμα σε σχέση με την αθηρογονική δίαιτα αλλά παρόλα αυτά αύξησε την ολική αντιοξειδωτική ικανότητα. Όταν η HT προστέθηκε σε ηλιέλαιο μείωσε την MDA κατά 25% σε σχέση με την κατανάλωση της αθηρογονικής δίαιτας ενώ παράλληλα αύξησε και την TAC[103]. Επιπλέον, στη μελέτη του Léger η χορήγηση εκχυλίσματος OMWW πλούσιου σε HT ως συστατικό γιαουρτιού σε εθελοντές με σακχαρώδη διαβήτη τύπου I δε φάνηκε να βελτιώνει την αντιοξειδωτική ικανότητα του πλάσματος ούτε να αυξάνει βασικά αντιοξειδωτικά του πλάσματος όπως το ουρικό οξύ και η χολερυθρίνη σε σχέση με την ομάδα ελέγχου[126] αν και το χρονικό διάστημα χορήγησης ήταν πολύ μικρότερο (τρεις ημέρες). Τέλος, ο Καραντώνης και οι συνεργάτες του παρατήρησαν αύξηση του lag time όταν στην αθηρογονική δίαιτα προστέθηκε ελαιόλαδο ή εκχύλισμα πολικών λιποειδών ελαιολάδου[104]. Φαίνεται επομένως ότι η χορήγηση βιοδραστικών συστατικών ελαιολάδου δεν είναι ιδιαίτερα αποτελεσματική στην αναστολή του οξειδωτικού στρες στον ορό ή στο πλάσμα και εξαρτάται πιθανόν από πολλούς παράγοντες όπως ο δείκτης που θα προσδιοριστεί, το συστατικό του ελαιολάδου που θα μελετηθεί, ο τρόπος χορήγησής του και το χρονικό διάστημα που θα διαρκέσει η παρέμβαση. Παρόλα αυτά, in vitro πειράματα έχουν δείξει ότι η επώαση δειγμάτων LDL με εκχύλισμα OMWW πλούσιο σε HT οδηγεί σε σημαντική αναστολή της λιποειδικής υπεροξείδωσης όπως αυτή προσδιορίζεται μέσω των TBARS[116].

Τα ευρήματα επομένως πάνω σε αυτό το θέμα εν μέρει είναι αντικρουόμενα καθώς ενώ φαίνεται ότι τα συστατικά που περιέχονται σε ελαιόλαδο ή OMWW έχουν in vitro αντιοξειδωτικές δράσεις ωστόσο όταν προστίθενται σε τρόφιμα και χορηγούνται σε πειραματόζωα και ανθρώπους φαίνεται να χάνουν μέρος της δραστικότητάς τους. Πιθανόν, τα υπόλοιπα συστατικά του πλάσματος να αλληλεπιδρούν με αυτά τα βιοδραστικά συστατικά και να τροποποιούν τη βιολογική τους δράση. Επιπλέον, η προσθήκη τους σε τρόφιμα όπως το γιαούρτι ή το ηλιέλαιο, πιθανόν να μειώνει τη βιοδιαθεσιμότητά τους και επομένως και την επακόλουθη δραστικότητά τους στον εκάστοτε οργανισμό. Η τελευταία επεξήγηση έχει δοθεί και από τον Visioli ο οποίος παρατήρησε ότι η οδός χορήγησης HT σε αρουραίους και ανθρώπους επηρεάζει την έκκριση αυτής στα ούρα και συνεπώς επιδρά διαφορετικά στη βιοδιαθεσιμότητά της. Συγκεκριμένα ανέφερε ότι η βιοδιαθεσιμότητα της HT όταν χορηγήθηκε ως φυσικό συστατικό του ελαιολάδου ήταν πολύ μεγαλύτερη από ότι όταν χορηγήθηκε ως προστιθέμενο συστατικό σε ραφιναρισμένο ελαιόλαδο ή γιαούρτι[129].

Στους ιστούς τα ευρήματα ήταν τελείως διαφορετικά. Συγκεκριμένα, οι τιμές TBARS στον νεφρικό ιστό των κουνελιών της ομάδας Γ ήταν στατιστικά σημαντικά (p=0,004) μικρότερες σε σχέση με τις τιμές TBARS στον νεφρικό ιστό των κουνελιών της ομάδας Α. Η συσχέτιση αυτή αποκτά ιδιαίτερη κλινική σημαντικότητα λαμβάνοντας υπόψη ότι οι τιμές των TBARS στον νεφρικό ιστό της ομάδας Γ ήταν κατά 61% λιγότερες σε σχέση με τις τιμές της ομάδας Α. Με άλλα λόγια, φαίνεται πως το εμπλουτισμένο με BAL γιαούρτι είναι πολύ αποτελεσματικό στην αναστολή του οξειδωτικού στρες στον νεφρικό ιστό υπερχοληστερολαιμικών κουνελιών.

Από την άλλη μεριά, οι τιμές TBARS στον ηπατικό ιστό των κουνελιών της ομάδας Γ ήταν στατιστικά σημαντικά χαμηλότερες τόσο σε σχέση με εκείνες της ομάδας Α όσο σε σχέση και με εκείνες της ομάδας Β. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι ενώ η ομάδα Γ είχε κατά 24,3% λιγότερα TBARS στον ηπατικό ιστό σε σχέση με την ομάδα Α, σε σύγκριση με την ομάδα Β είχε 33,3% λιγότερα TBARS. Και στην περίπτωση αυτή επομένως, το εμπλουτισμένο με BAL γιαούρτι ήταν εξαιρετικά αποτελεσματικό στην αναστολή του οξειδωτικού στρες. Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν με εκείνα του Fki και των συνεργατών του που έδειξαν ότι η χορήγηση OMWW σε αρουραίους μείωσε στατιστικά σημαντικά τα επίπεδα των TBARS στο ήπαρ και στους νεφρούς σε σύγκριση με τη χορήγηση αθηρογονικής δίαιτας[125]. Επιπλέον, η χορήγηση ελαιολάδου μαζί με αθηρογονική δίαιτα που περιείχε 1% w/w χοληστερόλη και υψηλή περιεκτικότητα σε SFA, MUFA και PUFA σε υπερχοληστερολαιμικά κουνέλια μείωσε τα TBARS στο ήπαρ κατά 71,6% σε σχέση με την κατανάλωση της αθηρογονικής δίαιτας, σε μελέτη που πραγματοποίησε ο De La Cruz με τους συνεργάτες του. Η εξαιρετικά μεγάλη μείωση στις τιμές των TBARS του ηπατικού ιστού που παρατηρήθηκαν μπορεί να οφείλονται στη συνεργιστική δράση των MUFA και PUFA με τα υπόλοιπα βιοδραστικά συστατικά του ελαιολάδου. Τα δικά μας αποτελέσματα, προτείνουν ότι ένα μεγάλο μέρος της αναστολής του οξειδωτικού στρες που παρατηρείται στον ηπατικό ιστό αποδίδεται αποκλειστικά σε αυτά τα κλάσματα λιποειδών και πιθανόν και σε ορισμένα συστατικά του γιαουρτιού.

Προχωρώντας σε ορισμένες συσχετίσεις μεταξύ των ποσοτικών μας μεταβλητών προκειμένου να λάβουμε μια πιο σαφή εικόνα για τη σχέση οξειδωτικού στρες και αθηρωματικής βλάβης, βρήκαμε ότι οι τιμές TBARS στο ήπαρ συσχετίζονται αρνητικά τόσο με το μέγιστο όσο και με το μέσο πάχος της αθηρωματικής πλάκας (rho=-0,943, p=0,005). Το εύρημά μας απαιτεί περαιτέρω διερεύνηση καθώς θα αναμέναμε μια ισχυρά θετική συσχέτιση. Στην παρούσα φάση δε μπορεί να ερμηνευθεί περαιτέρω καθώς δεν υπάρχουν μελέτες στη βιβλιογραφία που να έχουν πραγματοποιήσει ανάλογη συσχέτιση. Το μικρό μέγεθος του

δείγματος παρόλα αυτά θα μπορούσε να αποτελεί μία ένδειξη αναξιοπιστίας του συγκεκριμένου ευρήματος.

Όσον αφορά στο πείραμα της υποστροφής της ανάπτυξης αθηρωματικών πλακών αποτελεί φαινόμενο που ελάχιστα έχει διερευνηθεί στη βιβλιογραφία. Για να μελετήσουμε την ικανότητα του εμπλουτισμένου με BAL γιαουρτιού να υποστρέφει τη διαδικασία ανάπτυξης αθηρωματικών πλακών χωρίσαμε τα κουνέλια σε τρεις διαφορετικές ομάδες (Δ, Ε, Ζ). Και οι τρεις ομάδες για χρονικό διάστημα 45 ημερών κατανάλωναν αθηρογονική δίαιτα. Για τις επόμενες 45 ημέρες της παρέμβασης η ομάδα Δ (ομάδα ελέγχου) κατανάλωνε πρότυπη κουνελοτροφή του εμπορίου, η ομάδα Ε απλό γιαούρτι του εμπορίου 2% λιπαρών μαζί με πρότυπη κουνελοτροφή και η ομάδα Δ εμπλουτισμένο με BAL γιαούρτι του εμπορίου 2% λιπαρών με πρότυπη κουνελοτροφή.

Όπως ήταν αναμενόμενο και σε αυτή την περίπτωση, η κατανάλωση της αθηρογονικής δίαιτας αύξησε στατιστικά σημαντικά την TC και την LDL-C σε όλες τις ομάδες ενώ σε καμία από τις ομάδες δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική αύξηση των TAG. Η HDL-C αυξήθηκε στατιστικά σημαντικά μόνο στην ομάδα Ε. Αυτό το εύρημα έρχεται σε αντίθεση με τα ευρήματα της Τσαντίλα και των συνεργατών της, σύμφωνα με τα οποία η χορήγηση αθηρογονικής δίαιτας σε μοντέλο υποστροφής της αθηροσκλήρωσης σε κουνέλια αυξάνει στατιστικά σημαντικά όλες τις λιποειδικές παραμέτρους που σχετίζονται με την αθηροσκλήρωση συμπεριλαμβανομένων των TAG και της HDL-C[106]. Αυτή η ασυμφωνία μάλλον δε μπορεί να αποδοθεί στο μικρό δείγμα του πειραματικού μας πρωτοκόλλου καθώς και η αναφερόμενη μελέτη χρησιμοποίησε περίπου το ίδιο μέγεθος δείγματος. Για τις TAG θα μπορούσαμε να υποθέσουμε ότι ένας από τους λόγους της μη στατιστικά σημαντικής αύξησης είναι το μεγάλο εύρος στα τεταρτημόρια μεταξύ των κουνελιών της παρέμβασης. Για την HDL-C δε μπορεί να υποστηριχθεί κάτι παρόμοιο καθώς στις ομάδες Δ και Ζ του πειράματός μας η HDL-C δε διαφοροποιήθηκε ούτε σαν τιμή σε σχέση με τον χρόνο t=0 ημέρες. Το εύρημα αυτό τίθεται υπό αμφισβήτηση καθώς οι διαθέσιμες βιβλιογραφικές μελέτες που χορηγούν αθηρογονική δίαιτα σε κουνέλια αναφέρουν είτε αύξηση[104,106] είτε μείωση της HDL-C[99,100]. Τέλος, η κατανάλωση της αθηρογονικής δίαιτας μείωσε στατιστικά σημαντικά τη γλυκόζη ορού στις ομάδες Ε και Ζ, εύρημα που συμφωνεί με το πείραμα της αναστολής που σχολιάσθηκε προηγουμένως.

Η αντικατάσταση της αθηρογονικής δίαιτας είτε με το απλό γιαούρτι είτε με το εμπλουτισμένο με BAL γιαούρτι μείωσε στατιστικά σημαντικά τις TAG ορού χωρίς να φαίνεται κάποια από τις δύο δίαιτες να υπερτερεί σε σχέση με την άλλη (μη στατιστικά σημαντικές

διαφορές μεταξύ των ομάδων στους χρόνους t=45 και t=90 ημέρες) αλλά σε καμία από τις ομάδες δεν παρατηρήθηκε καμία στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των υπόλοιπων λιποειδικών παραμέτρων. Η ομάδα της Τσαντίλα ανέφερε μείωση σε όλες τις λιποειδικές παραμέτρους ύστερα από την αντικατάσταση της αθηρογονικής δίαιτας με κουνελοτροφή εμπλουτισμένη με PPL[106]. Στο δικό μας πείραμα αν και οι τιμές όλων των υπόλοιπων (εκτός των TAG) λιποειδικών παραμέτρων ήταν μειωμένες κλινικά σημαντικά κα σε μεγάλο βαθμό μάλιστα σε σχέση με το χρόνο t=45 ημέρες, πιθανόν να μην βρέθηκαν και στατιστικά σημαντικά λόγω αυξημένου εύρους τεταρτημορίων σε αυτές τις μεταβλητές.

Στα κουνέλια της ομάδας Ζ παρατηρήθηκε ισχυρή τάση μείωσης του μέγιστου πάχους της αθηρωματικής βλάβης σε σχέση τόσο με την ομάδα Δ (13% μείωση) όσο και με την ομάδα Ε (29,1% μείωση). Παρόλα αυτά, καθώς το p μεταξύ των ομάδων ήταν οριακά μη στατιστικά σημαντικό (p=0,056), δε μπορούμε να αναφέρουμε πως παρατηρήθηκε υποστροφή της αθηροσκληρωτικής διαδικασίας. Θα μπορούσε πιθανόν να παρατηρηθεί σε περίπτωση που είχαμε μεγαλύτερο μέγεθος δείγματος. Από το θηκόγραμμα του μέγιστου πάχους βλάβης παρατηρούμε ότι λόγω ενδοτεταρτημοριακού εύρους είναι πολύ πιο πιθανόν να προέκυπτε στατιστικά σημαντικό αποτέλεσμα μεταξύ της ομάδας Δ και Ζ. Επομένως ισχυριζόμαστε πως το εμπλουτισμένο με BAL γιαούρτι παρουσιάζει ισχυρή τάση υποστροφής του μέσου πάχους της βλάβης, γεγονός που μπορεί καταληκτικά να επιβεβαιωθεί από κάποιο επόμενη πειραματική παρέμβαση με μεγαλύτερο μέγεθος δείγματος. Τα ευρήματα μας φαίνεται να συμφωνούν με τα αντίστοιχα της Τσαντίλα η οποία ανέφερε μείωση του πάχους της αθηρωματικής βλάβης στην ομάδα που κατανάλωνε την κουνελοτροφή μαζί με τα PPL, σε σχέση με την απλή κατανάλωση κουνελοτροφής[106]. Επιπλέον, στην ομάδα Ε παρατηρήθηκε κατά 18% αύξηση του μέσου πάχους της βλάβης σε σχέση με την ομάδα Δ. Επειδή και στην περίπτωση του μέγιστου πάχους της βλάβης τα κουνέλια της ομάδας Ε είχαν αν και μη στατιστικά σημαντικά μεγαλύτερες τιμές διαμέσου από τα κουνέλια της ομάδας Δ, θα μπορούσαμε να υποθέσουμε ότι η κατανάλωση του απλού γιαουρτιού δε συμβάλλει στην υποστροφή της εξέλιξης της αθηροσκλήρωσης. Στην ομάδα Ζ από την άλλη παρατηρήθηκε 16,9% μείωση του μέσου πάχους της βλάβης σε σχέση με την ομάδα Δ, σχέση που παρόλα αυτά δε βρέθηκε στατιστικά σημαντική.

Η κατανάλωση της αθηρογονικής δίαιτας αύξησε στατιστικά σημαντικά τις τιμές TBARS ορού μόνο στην ομάδα Δ. Στην ομάδα Ε και Ζ οι τιμές των TBARS αυξήθηκαν αλλά όχι στατιστικά σημαντικά. Η ανασκόπηση μελετών της βιβλιογραφίας μας οδήγησε στο συμπέρασμα ότι τελικά η κατανάλωση αθηρογονικής δίαιτας αυξάνει τις τιμές TBARS στον ορό[65,103] κάτι που φάνηκε και από το δικό μας πείραμα της αναστολής. Η αύξηση αυτή μπορεί να αποδοθεί στην αύξηση του προς οξείδωση υποστρώματος (TAG, LDL-C). Εάν στο πείραμα

της υποστροφής διαθέταμε μεγαλύτερο μέγεθος δείγματος, πιθανόν να παρατηρούνταν στατιστικά σημαντική αύξηση στα TBARS ορού όλων των ομάδων σε σχέση με το χρόνο t=0 ημέρες.

Η αντικατάσταση της αθηρογονικής δίαιτας είτε με απλό γιαούρτι είτε με εμπλουτισμένο με BAL γιαούρτι οδήγησε σε στατιστικά σημαντική μείωση των TBARS ορού κατά 77,2% και κατά 63,9% αντίστοιχα. Αν και τα BAL φαίνεται να επιδρούν ευνοϊκά στο οξειδωτικό στρες που σχετίζεται με την εγκατεστημένη αθηροσκλήρωση, στη μελέτη της Τσαντίλα τα PPL οδήγησαν σε στατιστικά σημαντική μείωση του lag time[106]. Παρόλα αυτά, καθώς ο lag time ακολουθεί την πορεία μείωσης των λιποειδών που παρατηρείται από την παύση της κατανάλωσης αθηρογονικής δίαιτας, η μείωση που παρατηρήθηκε στο ανωτέρω πείραμα δε μπορεί απαραίτητα να ερμηνευθεί ως μείωση της αντίστασης του ορού στην οξείδωση. Τελικά, οποιαδήποτε άμεση σύγκριση και να γίνεται μεταξύ TBARS και lag time δε θα πρέπει να παραβλέπουμε το γεγονός ότι πρόκειται για δύο διαφορετικούς δείκτες οξειδωτικού στρες με αποτέλεσμα μία άμεση σύγκριση μεταξύ τους θα μπορούσε δυνητικά να οδηγήσει σε λάθος συμπεράσματα.

Παρόλα αυτά το χρόνο t=90 ημέρες, μόνο στην ομάδα Ε τα TBARS ορού ήταν μειωμένα στατιστικά σημαντικά σε σχέση με τα TBARS της ομάδας Δ. Αυτό σημαίνει πως πιθανόν το απλό γιαούρτι να είναι πιο αποτελεσματικό στην υποστροφή του οξειδωτικού στρες από το εμπλουτισμένο γιαούρτι. Αν συνδυάσουμε αυτό το εύρημα με τα παραπάνω αποτελέσματα μπορούμε να υποθέσουμε ότι η υποστροφή στο οξειδωτικό στρες που προκαλείται από την αντικατάσταση της αθηρογονικής δίαιτας με απλό γιαούρτι είναι ανεξάρτητη της εξέλιξης των αθηρωματικών βλαβών και αντίστοιχα η ισχυρή τάση υποστροφής της ανάπτυξης αθηρωματικών πλακών που παρατηρείται με το εμπλουτισμένο γιαούρτι είναι ανεξάρτητη του οξειδωτικού στρες.

Στις τιμές TBARS των ιστών δεν παρατηρήθηκε καμία στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των ομάδων αν και στους νεφρούς παρατηρήθηκε ισχυρή τάση (p=0,051) αύξησης των τιμών TBARS στις ομάδες που κατανάλωναν τα δύο ειδών γιαούρτια σε σχέση με την ομάδα που κατανάλωνε την κουνελοτροφή. Τα αποτελέσματά μας δεν είναι δυνατόν να συγκριθούν με μελέτες της βιβλιογραφίας καθώς δεν έχει πραγματοποιηθεί κάτι παρόμοιο. Από τα δικά μας αποτελέσματα μπορούμε να παρόλα αυτά να συμπεράνουμε ότι οποιαδήποτε υπόνοια υποστροφής της αθηροσκλήρωσης από την κατανάλωση του εμπλουτισμένου γιαουρτιού δε φαίνεται να εμπλέκει το μηχανισμό του οξειδωτικού στρες.

Τελικά, προχωρήσαμε σε ορισμένες συσχετίσεις μεταξύ των ποσοτικών μεταβλητών ώστε να έχουμε μια πιο σαφή εικόνα για τη συσχέτιση μεταξύ του οξειδωτικού στρες και της αθηρωματικής βλάβης. Στην ομάδα Ε οι τιμές TBARS ορού τη χρονική στιγμή t=90 ημέρες συσχετίστηκαν θετικά τόσο με το μέγιστο όσο και με το μέσο πάχος της βλάβης (rho=0,829, p=0,004) και το ίδιο παρατηρήθηκε και για τις τιμές TBARS στο ήπαρ και στους νεφρούς (rho=0,886). Στην ομάδα Ζ από την άλλη, οι τιμές TBARS ορού τη χρονική στιγμή t=90 ημέρες συσχετίστηκαν θετικά με τις τιμές TBARS στους νεφρούς. Οι συσχετίσεις αυτές δεν οδηγούν σε κάποιο βέβαιο συμπέρασμα αν και αποτελούν μία πολύ αβέβαιη και πρώιμη ένδειξη ότι πιθανόν το αυξημένο οξειδωτικό στρες στον ορό και στους ιστούς να συσχετίζεται θετικά με το μέγεθος της βλάβης και ότι πιθανόν οι τιμές TBARS στον ορό να αντανακλούν και υψηλές τιμές TBARS στους ιστούς ή το αντίστροφο. Το πειραματικό πρωτόκολλο υποστροφής της αθηροσκλήρωσης της Τσαντίλα και των συνεργατών της έρχεται εν μέρει να επιβεβαιώσει το δικό μας εύρημα καθώς προσδιορίστηκε μία μέτρια αρνητική συσχέτιση μεταξύ του lag time και του πάχους της αθηρωματικής βλάβης. Αυτό υποδηλώνει ότι όσο μεγαλύτερη είναι η αντίσταση του ορού στην οξείδωση τόσο μικρότερο είναι και το πάχος της βλάβης[106].

Το σημαντικότερο μειονέκτημα της πειραματικής μας παρέμβασης είναι ο προσδιορισμός του οξειδωτικό στρες με τη μέθοδο των TBARS η οποία αν και αποτελεί πολύ εύκολο τρόπο προσδιορισμού της υπεροξείδωσης των λιποειδών και επομένως του οξειδωτικού στρες συνολικά έχει αναφερθεί ότι δεν είναι ιδιαίτερα αξιόπιστος δείκτης του οξειδωτικού στρες και οδηγεί γενικά σε μία υπερεκτίμηση του τελευταίου. Ακόμα ένα μειονέκτημα της μελέτης μας είναι ο μικρός αριθμός κουνελιών που είχαμε σε κάθε ομάδα καθώς περιορίζει τη δυνατότητα να προκύψουν στατιστικά σημαντικά αποτελέσματα σε οριακά μη στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις. Τέλος, το γεγονός ότι λόγω του μικρού αριθμού δείγματος χρησιμοποιήσαμε μη παραμετρική στατιστική για την ανάλυση των αποτελεσμάτων μας έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση της στατιστικής ισχύς. Το σημαντικότερα πλεονεκτήματα της μελέτης μας είναι ότι δημιουργήσαμε ένα λειτουργικό τρόφιμο έτοιμο προς κατανάλωση και ότι χρησιμοποιήσαμε βιοδραστικά συστατικά από εκχύλισμα OMWW το οποίο λόγω του ότι αποτελεί παραπροϊόν του ελαιολάδου έχει πολύ χαμηλό κόστος. Συνδυάζοντας τα επιμέρους μειονεκτήματα και πλεονεκτήματα της παρέμβασης που πραγματοποιήσαμε ανακαλύψαμε τελικά ότι το νέο αυτό λειτουργικό τρόφιμο που σχεδιάσαμε είναι αποτελεσματικό στην αναστολή της αθηροσκλήρωσης και πιθανόν να είναι και αποτελεσματικό στην υποστροφή της. Εάν αυτή του η βιολογική δράση ασκείται μέσω αναστολής ή υποστροφής του οξειδωτικού στρες είναι κάτι το οποίο απαιτεί περαιτέρω έρευνες προκειμένου να εξαχθεί ένα βέβαιο συμπέρασμα.

Θα προτείναμε στο μέλλον να σχεδιαστούν μεγαλύτερες μελέτες οι οποίες θα χρησιμοποιήσουν αυτό το εμπλουτισμένο γιαούρτι, ίσως και με κάποια προσθήκη επιπλέον βιοδραστικών συστατικών OMWW, σε μεγαλύτερο αριθμό πειραματοζώων ή ακόμα και σε ανθρώπους, δεδομένου ότι αναφερόμαστε σε τρόφιμα που καταναλώνονται έτσι κι αλλιώς από τον ευρύτερο πληθυσμό επομένως δεν τίθεται θέμα τοξικότητας ή άλλων δυνητικών παρενεργειών. Οι αντιοξειδωτικές δράσεις του τροφίμου θα προτείναμε να μετρηθούν με πιο αξιόπιστους δείκτες οξειδωτικού στρες όπως τα F_2-ισοπροστάνια ή με συνδυασμό διαφορετικών μεθόδων ώστε να εξαχθούν πιο βέβαια συμπεράσματα σχετικά με την ακριβή βιολογική δράση του τροφίμου. Θεωρούμε πως η δική μας μελέτη λόγω των πολύ θετικών ευρημάτων της άνοιξε έναν πολύ σημαντικό δρόμο προς αυτή την κατεύθυνση.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Mallika V., Goswami B., Rajappa M. Atherosclerosis pathophysiology and the role of novel risk factors: a clinicobiochemical perspective. Angiology 2007;58(5):513-22.
2. Bonomini F., Tengattini S., Fabiano A., Bianchi R., Rezzani R. Atherosclerosis and oxidative stress. Histol Histopathol 2008;23(3):381-90.
3. Crowther MA. Pathogenesis of atherosclerosis. ASH Education Book 2005;1:436-441.
4. Faxon DP., Fuster V., Libby P., Beckman JA., Hiatt WR., Thompson RW., Topper JN., Annex BH., Rundback JH., Fabunmi RP., Robertson RM., Loscalzo J. Atherosclerotic Vascular Disease Conference. Writing Group III: Pathophysiology. Circulation 2004;109(21):2617-2.
5. Galkina E., Ley K. Immune and inflammatory mechanisms of atherosclerosis. Annu Rev Immunol 2009;27:165-197.
6. Mizuno Y., Jacob RF., Mason RP. Inflammation and the development of atherosclerosis-Effects of lipid-lowering therapy. J Atheroscler Thromb 2011;18(5):351-8.
7. Schwenke DC. Antioxidants and atherogenesis. J Nutr Biochem 1998;9:424-445.
8. Panagiotakos DB., Pitsavos C., Chrysohoou C., Skoumas I., Stefanadis C. Prevalence and five-year incidence (2001-2006) of cardiovascular disease risk factors in a Greek sample: The ATTICA Study. Hellenic J Cardiol 2009;50:388-395.
9. Panagiotakos DB., Pitsavos C., Chrysohoou C., Skoumas I., Stefanadis C. Five-year incidence of cardiovascular disease and its predictors in Greece: the ATTICA Study. Vasc Med 2008;13:113.
10. Lloyd-Jones D., Adams RJ., Carnethon M., De Simone G., Ferguson TB., Flegal K., Ford E., Furie K., Go A., Greenlund K., Haase N., Hailpern S., Ho M., Howard V., Kissela B., Kittner S., Lackland D., Lisabeth L., Marelli A., McDermott M., Meigs J., Mozaffarian D., Nichol G., O'Donnell C., Roger VL., Rosamond W., Sacco R., Sorlie P., Stafford R., Steinberger J., Thom T., Wasserthiel-Smoller S., Wong ND., Wylie-Rosett J., Hong Y. Heart disease and stroke statistics-2009 update: A report from the American Heart Association statistics committee and stroke statistics subcommittee. Circulation 2009;119:480-486.
11. Altman R. Risk factors in coronary atherosclerosis athero-inflammation: the meeting point. Thrombosis J 2003;1:4.
12. Gordon T., Castelli WP., Hjortland MC., Kannel WB., Dawber TR. Predicting coronary heart disease in middle-aged and older persons. The Framington Study. JAMA 1977;238(6):497-499.

13. Stramba-Badiale M., Fox KM., Priori SG., Collins P., Daly C., Graham I., Jonsson B., Schenck-Gustafsson K., Tendera M. Cardiovascular diseases in women: a statement from the policy conference of the European society of Cardiology. Eur Heart J 2006;27(8):994-1005.
14. Myers RH., Kiely DK., Cupples LA., Kannel WB. Parental history is an independent risk factor for coronary artery disease: the Framingham Study. Am Heart J 1990;120(4):963-9.
15. Libby P., Ridker PM., Maseri A. Inflammation and atherosclerosis. Circulation 2002;105:1135-1143.
16. Lloyd-Jones D., Adams RJ., Brown TM., Carnethon M., Dai S., De Simone G., Ferguson TB., Ford E., Furie K., Gillespie C., Go A., Greenlund K., Haase N., Hailpern S., Ho M., Howard V., Kissela B., Kittner S., Lackland D., Lisabeth L., Marelli A., McDermott M., Meigs J., Mozaffarian D., Mussolino M., Nichol G., Roger VL., Rosamond W., Sacco R., Sorlie P., Stafford R., Steinberger J., Thom T., Wasserthiel-Smoller S., Wong ND., Wylie-Rosett J., Hong Y. Heart disease and stroke statistics-2010 update: A report from the American Heart Association. Circulation 2010;121:46-215.
17. Kraus WE., Hournard JA., Duscha BD., Knetzger KJ., Wharton MB., McCartney JS., Bales CW., Henes S., Samsa GP., Otvos JD., Kulkarni KR., Slentz CA. Effects of the amount and intensity of exercise on plasma lipoproteins. N Engl J Med 2002;347:1483-1492.
18. Vasan RS., Larson MG., Leip EP., Kannel WB., Levy D. Assessment of frequency of progression to hypertension in non-hypertensive participants in the Framingham Heart Study: a cohort study. Lancet 2001;358(9294):1682-1686.
19. Libby P. Current concepts of the pathogenesis of the acute coronary syndromes. Circulation 2001;104:365-372.
20. Wilcken DE., Wilcken B. The pathogenesis of coronary artery disease. A possible role for methionine metabolism. J Clin Invest 1976;57(4):1079-1082.
21. Nurk E., Tell GS., Vollset SE., Nygard O., Refsum H., Ueland PM. Plasma total homokysteine and hospitalizations for cardiovascular disease. The Hordaland homokysteine Study. Arch Intern Med 2002;162(12):1374-1381.
22. Hackman DG., Anand SS. Emerging risk factors for atherosclerotic vascular disease: a critical review of the evidence. JAMA 2003;290(7):932-940.
23. Strobel NA., Fassett RG., Marsh SA., Coombes JS. Oxidative stress biomarkers as predictors of cardiovascular disease. Int J Cardiol 2011;147(2):191-201.

24. Stary HC., Chandler AB., Dinsmore RE., Fuster V., Glagov S., Insull W., Rosenfeld ME., Schwartz CJ., Wagner WD., Wissler RW. A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis. Circulation 1995;92:1355:1374.
25. Marutsuka K., Hatakeyama K., Yamashita A., Asada Y. Role of thrombogenic factors in the development of atherosclerosis. J Atheroscler Thromb 2005;12(1):1-8.
26. Packard RR., Libby P. Inflammation in atherosclerosis: from vascular biology to biomarker discovery and risk prediction. Clin Chem 2008;54(1):24-38.
27. National Heart Lung and Blood Institute.
28. Tedgui A., Mallat Z. Cytokines in atherosclerosis: pathogenic and regulatory pathways. Physiol Rev 2006;86:515-581.
29. Wagner DD., Burger PC. Platelets in inflammation and thrombosis. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2003;23:2131-2137.
30. Kondo T., Hirose M., Kageyama K. Roles of oxidative stress and redox regulation in atherosclerosis. J Atheroscler Thromb 2009;16:532-538.
31. Nomikos T., Fragopoulou E., Antonopoulou S. Food ingredients and lipid mediators. Current Nutrition & Food Science 2007;3(22):255-276.
32. Karantonis HC., Fragopoulou E., Antonopoulou S., Rementzis J., Phenekos C., Demopoulos CA. Effect of fast-food Mediterranean-type diet on type 2 diabetics and healthy human subjects' platelet aggregation. Diabetes Res Clin Pract 2006;72(1):33-41.
33. Giustarini D., Dalle-Donne I., Tsikas D., Rossi R. Oxidative stress and human diseases: origin, link, measurement, mechanisms, and biomarkers. Crit Rev Clin Lab Sci 2009;46(5-6):241-281.
34. Michiels C. Endothelial cells function. J Cell Physiol 2003;196(3):430-443.
35. Demopoulos CA., Karantonis HC., Antonopoulou S. Platelet activating factor-a molecular link between atherosclerosis theories. Eur J Lipid Sci Technol 2003;105(11):705-716.
36. Prescott SM., Zimmerman GA., Stafforini DM., Mclntyre TM. Platelet-activating factor and lipid mediators. Annu Rev Biochem 2000;69:419-445.
37. Mueller HW., Haught CA., McNatt JM., Cui K., Gaskell SJ., Johnston DA., Willerson JT. Measurement of platelet-activating factor in a canine model of coronary thrombosis and in endarterectomy samples from patients with advanced coronary artery disease. Circ Res 1995;77:54-63.

38. Antonopoulou S., Karantonis HC., Nomikos T. Olive oil minor constituents and health (CRC Press Taylor & Francis Group). Chapter 8: Antithrombotic and Antiatherogenic lipid minor constituents from olive oil 2008:173-192.
39. Stapleton PA., Goodwill AG., James ME., Brock RW., Frisbee JC. Hypercholesterolemia and Microvascular dysfunction: interventional strategies. Journal Inflamm 2010;7(1):54.
40. Perona JS., Cabello-Moruno R., Ruiz-Gutierrez V. The role of virgin olive oil components in the modulation of endothelial function. J Nutr Biochem 2006;17(7):429-445.
41. Wood LG., Gibson PG., Garg ML. A review of the methodology for assessing in vivo antioxidant capacity. J Sci Food Agric 2006;86(13):2057-2066.
42. Stephens JW., Khanolkar MP., Bain SC. The biological relevance and measurement of plasma markers of oxidative stress in diabetes and cardiovascular disease. Atherosclerosis 2009;202(2):321-329.
43. McCord JM. The evolution of free radicals and oxidative stress. Am J Med 2000;108(8):652-659.
44. Seifried HE., Anderson DE., Fisher EI., Milner JA. A review of the interaction among dietary antioxidants and reactive oxygen species. J Nutr Biochem 2007;18(9):567-579.
45. Bloomer RJ., Fisher-Wellman KH. Blood oxidative stress biomarkers: influence of sex, exercise training status, and dietary intake. Gend Med 2008;5(3):218-228.
46. Stocker R., Keaney Jr. JF. Role of oxidative modifications in atherosclerosis. Physiol Rev 2004;84:1381-1478.
47. Tabima DM., Frizzell S., Gladwin MT. Reactive oxygen and nitrogen species in pulmonary hypertension. Free Radic Biol Med 2012;52(9):1970-1986.
48. Dhalla NS., Temsah RM., Netticadan T. Role of oxidative stress in cardiovascular diseases. J Hypertens 2000;18(6):655-673.
49. Martínez MC., Andriantsitohaina R. Reactive nitrogen species: molecular mechanisms and potential significance in health and disease. Antioxid Redox Signal 2009;11(3):669-702.
50. Myatt L. Review: Reactive oxygen and nitrogen species and functional adaptation of the placenta. Placenta 2010;31:66-69.
51. Cherubini A., Ruggiero C., Polidori MC., Mecocci P. Potential markers of oxidative stress in stroke. Free Radic Biol Med 2005;39(7)841-852.
52. Maritim AC., Sanders RA., Watkins JB 3rd. Diabetes, oxidative stress, and antioxidants: a review. J Biochem Mol Toxicol 2003;17(1):24-38.

53. Oranje WA., Wolffenbuttel BH. Lipid peroxidation and atherosclerosis in type II diabetes. J Lab Clin Med 1999;134(1):19-32.
54. Chang JC., Kou SJ., Lin WT., Liu CS. Regulatory role of mitochondria in oxidative stress and atherosclerosis. World J Cardiol 2010;2(6):150-159.
55. Sugamura K., Keaney Jr. JF. Reactive oxygen species in cardiovascular disease. Free Radic Biol Med 2011;51(5):978-992.
56. Kvietys PR., Granger DN. Role of reactive oxygen and nitrogen species in the vascular responses to inflammation. Free Radic Biol Med 2012;52(3):556-592.
57. Dalle-Donne I., Rossi R., Giustarini D., Milzani A., Colombo R. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. Clin Chim Acta 2003;329(1-2):23-38.
58. Halliwell B. The wanderings of a free radical. Free Radic Biol Med 2009;46:531-542.
59. Pandey KB., Rizvi SI. Markers of oxidative stress in erythrocytes and plasma during aging in humans. Oxid Med Cell Longev 2010;3(1):2-12.
60. Lee JR., Kim JK., Lee SJ., Kim KP. Role of protein tyrosine nitration in neurodegenerative diseases and atherosclerosis. Arch Pharm Res 2009;32(8):1109-1118.
61. Guzik TJ., West NEJ., Pillai R., Taggart DP., Channon KM. Nitric oxide modulates superoxide release and peroxynitrite formation in human blood vessels. J Hypertens 2002;39:1088-1094.
62. Seet RC., Lee CY., Loke WM., Huang SH., Huang H., Looi WF., Chew ES., Quek AM., Lim EC., Halliwell B. Biomarkers of oxidative damage in cigarette smokers: which biomarkers might reflect acute versus chronic oxidative stress? Free Radic Biol Med 2011;50(12):1787-1793.
63. Vogiatzi G., Tousoulis D., Stefanadis C. The role of oxidative stress in atherosclerosis. Hellenic J Cardiol 2009;50:402-409.
64. Duarte MM., Rocha JB., Moresco RN., Duarte T., Da Cruz IB., Loro VL., Schetinger MR. Association between ischemia-modified albumin, lipids and inflammation biomarkers in patients with hypercholesterolemia. Clinic Biochem 2009;42(7-8):666-671.
65. Rosenbaum MA., Miyazaki K., Graham LM. Hypercholesterolemia and oxidative stress inhibit endothelial cell healing after arterial injury. J Vasc Surg 2012;55(2):489-496.
66. Duarte MM., Moresco RN., Duarte T., Santi A., Bagatini MD., Da Cruz IB., Schetinger MR., Loro VL. Oxidative stress in hypercholesterolemia and its association with Ala16Val superoxide dismutase gene polymorphism. Clinic Biochem 2010;43(13-14):1118-1123.

67. Pirinccioglou AG., Gökalp D. Pirinccioglou M., Kizil G., Kizil M. Malondialdeyde (MDA) and protein carbonyl (CO) levels as biomarkers of oxidative stress in subjects with familial hypercholesterolemia. Clinic Biochem 2010;43(15):1220-1224.
68. Owen RW., Giacosa A., Hull WE., Haubner R., Würtele G., Spiegelhalder B., Bartsch H. Olive oil consumption and health: the possible role of antioxidants. Lancet Oncol 2011;1:107-112.
69. Stark AH., Madar Z. Olive oil as a functional food: epidemiology and nutritional approaches. Nutr Rev 2002;60(6):170-176.
70. Visioli F., Poli A., Gall C. Antioxidant and other biological activities of phenols from olives and olive oil. Med Res Rev 2002;22(1):65-75.
71. Fitó M., de la Torre R., Covas MI. Olive oil and oxidative stress. Mol Nutr Food Res 2007;51(10):1215-1224.
72. Covas MI., Konstantinidou V., Fitó M. Olive oil and cardiovascular health. J Cardiovasc Pharmacol 2009;54(6):477-482.
73. Carluccio MA., Massaro M., Scodditti E., De Caterina R. Vasculoprotective potential of olive oil components. Mol Nutr Food Res 2007;51(10):1225-1234.
74. Cicerale S., Conlan XA., Sinclair AJ., Keast RS. Chemistry and health of olive oil phenolics. Crit Rev Food Sci Nutr 2009;49(3):218-236.
75. Karantonis HC., Antonopoulou S., Demopoulos CA. Antithrombotic lipid minor constituents from vegetable oils. Comparison between olive oils and others. J Agric Food Chem 2002;50(5):1150-1160.
76. 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(26):2599-2608.
77. Knoops KT., de Groot LC., Kromhout D., Perrin AE., Moreiras-Varela O., Menotti A., van Staveren WA. Mediterranean diet, lifestyle factors, and 10-year mortality in elderly European men and women: the HALE project. JAMA 2004;292(12):1433-1439.
78. Mitrou PN., Kipnis V., Thiébaut AC., Reedy J., Subar AF., Wirfält E., Flood A., Mouw T., Hollenbeck AR., Leitzmann MF., Schatzkin A. Mediterranean dietary pattern and prediction of all-cause mortality in a US population: results from the NIH-AARP Diet and Health Study. Arch Intern Med 2007;167(22):2461-2468.
79. Buckland G., González CA., Agudo A., Vilardell M., Berenguer A., Amiano P., Ardanaz E., Arriola L., Barricarte A., Basterretxea M., Chirlaque MD., Cirera L., Dorronsoro M., Egües N., Huerta JM., Larrañaga N., Marin P., Martínez C., Molina E., Navarro C., Quirós JR., Rodriguez L., Sanchez MJ., Tormo MJ., Moreno-Iribas C. Adherence to the

Mediterranean diet and risk of coronary heart disease in the Spanish EPIC cohort study. Am J Epidemiol 2009;170(12):1518-1529.

80. Fung TT., Rexrode KM., Mantzoros CS., Manson JE., Willett WC., Hu FB. Mediterranean diet and incidence and mortality of coronary heart disease and stroke in women. Circulation 2009;119(8):1093-1100.
81. Bendinelli B., Masala G., Saieva C., Salvini S., Calonico C., Sacerdote C., Agnoli C., Grioni S., Frasca G., Mattiello A., Chiodini P., Tumino R., Vineis P., Palli D., Panico S. Fruit, vegetables, and olive oil and risk of coronary heart disease in Italian women: the EPICOR study. Am J Clin Nutr 2010;10(3):39-45.
82. Martínez-González MA., García-López M., Bes-Rastrollo M., Toledo E., Martínez-Lapiscina EH., Delgado-Rodriguez M., Vasquez Z., Benito S., Beunza JJ. Mediterranean diet and the incidence of cardiovascular disease: a Spanish cohort. Nutr Metab Cardiovasc Dis 2011;21(4):237-244.
83. Panagiotakos DB. Pitsavos C., Stefanadis C. Dietary patterns: a Mediterranean diet score and its relation to clinical and biological markers of cardiovascular disease risk. Nutr Metab Cardiovasc Dis 2006;16(8):559-568.
84. Sofi F., Cesari F., Abbate R., Gensini GF., Casini A. Adherence to Mediterranean diet and health status: meta-analysis. BMJ 2008;337:a1344.
85. Sofi F., Abbate R., Gensini GF., Casini A. Accruing evidence on benefits of adherence to the Mediterranean diet on health: an updated systematic review and meta-analysis. Am J Clin Nutr 2010;92(5):1189-1196.
86. Kontogianni MD., Panagiotakos DB., Chrysohoou C., Pitsavos C., Zampelas A., Stefanadis C. The impact of olive oil consumption pattern on the risk of acute coronary syndromes: The CARDIO2000 case-control study. Clin Cardiol 2007;30(3):125-129.
87. Covas MI., de la Torre K., Farré-Albaladejo M., Kaikkonen J., Fitó M., López-Sabater C., Pujadas-Bastardes MA., Joglar J., Weinbrenner T., Lamuela-Raventós RM., de la Torre R. Postprandial LDL phenolic content and LDL oxidation are modulated by olive oil phenolic compounds in humans. Free Radic Biol Med 2006a;40(4):608-616.
88. Bogani P., Galli C., Villa M., Visioli F. Postprandial anti-inflammatory and antioxidant effects of extra virgin olive oil. Atherosclerosis 2007;190(1):181-186.
89. Pacheco YM., Bemúdez B., López S., Abia R., Villar J., Muriana FJ. Minor compounds of olive oil have postprandial anti-inflammatory effects. Br J Nutr 2007;98(2):260-263.
90. Delgado-Lista J., López-Miranda J., Cortés B., Pérez-Martínez P., Lozano A., Gomez-Luna R., Gomez P., Gomez MJ., Criado J., Fuentes F., Perez- Jiménez F. Chronic dietary

fat intake modifies the postprandial response of hemostatic markers to a single fatty test meal. Am J Clin Nutr 2008;87(2):317-322.

91. Fuentes F., López-Miranda J., Pérez-Martínez P., Jiménez Y., Marín C., Gómez P., Fernández JM., Caballero J., Delgado-Lista J., Perez- Jiménez F. Chronic effects of a high-fat diet enriched with virgin olive oil and a low-fat diet enriched with alpha-linolenic acid on postprandial endothelial function in healthy men. Br J Nutr 2008;100(1):159-165.
92. Visioli F., Caruso D., Grande S., Bosisio R., Villa M., Galli G., Sirtori C., Galli C. Virgin Olive Oil Study (VOLOS): vasoprotective potential of extra virgin olive oil in mildly dyslipidemic patients. Eur J Nutr 2005;44(2):121-127.
93. Covas MI., Nyyssönen K., Poulsen HE., Kaikkonen J., Zunft HJF., Kiesewetter H., Gaddi A., de la Torre R., Mursu J., Bäumler H., Nascetti S., Salonen JT., Fitó M., Virtanen J., Marrugat J. The effect of polyphenols in olive oil on heart disease risk factors. A randomized trial. Ann Intern Med 2006b;145:333-341.
94. Estruch R., Martínez-González MA., Corella D., Salas-Salvadó J., Ruiz-Gutiérrez V., Covas MI., Fiol M., Gómez-Gracia E., López-Sabater MC., Vinyoles E., Arós F., Conde M., Lahoz C., Lapetra J., Sáez G., Ros E. Effects of a Mediterranean-style diet on cardiovascular risk factors. A randomized trial. Ann Intern Med 2006;145:1-11.
95. Machowetz A., Poulsen HE., Gruendel S., Weimann A., Fitó M., Marrugat J., de la Torre R., Salonen JT., Nyyssönen K., Mursu J., Nascetti S., Gaddi A., Kiesewetter H., Bäumler H., Selmi H., Kaikkonen J., Zunft HJF., Covas MI., Koebnick C. Effects of olive oils on biomarkers of oxidative DNA stress in Northern and Southern Europeans. FASEB J 2007;21(1):45-52.
96. Pérez-Martínez P., López-Miranda J., Blanco-Colio L., Bellido C., Jiménez Y., Moreno JA, Delgado-Lista J., Egido J., Perez- Jiménez F. The chronic intake of a Mediterranean diet enriched in virgin olive oil, decreases nuclear transcription factor kappaB activation in peripheral blood mononuclear cells from healthy men. Atherosclerosis 2007;194(2):141-146.
97. Fitó M., Cladellas M., de la Torre R., Martí J., Muñoz D., Schröder H., Alcántara M., Pujadas-Bastardes M., Marrugat J., López-Sabater MC., Bruguera J., Covas MI. Anti-inflammatory effect of virgin olive oil in stable coronary disease patients: a randomized, crossover, controlled trial. Eur J Clin Nutr 2008;62(4):570-574.
98. Castañer O., Fitó M., López-Sabater MC., Poulsen HE., Nyyssönen K., Schröder H., Salonen JT., de la Torre-Carbot K., Zunft HJF., de la Torre R., Bäumler H., Gaddi AV.,

Saez GT., Tomás M., Covas MI. The effect of olive oil polyphenols on antibodies against oxidized LDL. A randomized clinical trial. Clin Nutr 2011;30(4):490-493.

99. De La Cruz JP., Quintero L., Villalobos MA., Sánchez de la Cuesta FS. Lipid peroxidation and glutathione system in hyperlipemic rabbits: influence of olive oil administration. Biochim Biophys Acta 2000a;1485(1):34-44.
100. De La Cruz JP., De La Cruz JP., Villalobos MA., Carmona JA., Martín-Romero M., Smith-Agreda JM., de la Cuesta FS. Antithrombotic potential of olive oil administration in rabbits with elevated cholesterol. Thromb Res 2000b;100(4):305-315.
101. Ochoa-Herrera JJ., Huertas RJ., Quiles JL., Mataix J. Dietary oils high in oleic acid, but with different non-glyceride contents, have different effects on lipid profiles and peroxidation in rabbit hepatic mitochondria. J Nutr Biochem 2001;12(6):357-364.
102. Aguilera CM., Ramírez-Tortosa MC., Mesa MD., Ramírez-Tortosa CL., Gil A. Sunflower, virgin-olive and fish oils differentially affect the progression of aortic lesions in rabbits with experimental atherosclerosis. Atherosclerosis 2002;162(2):335-344.
103. González-Santiago M., Martín-Bautista E., Carrero JJ., Fonollá J., Baró L., Bartolomé MV., Gil-Loyzaga P., López-Huertas E. One-month administration of hydroxytyrosol, a phenolic antioxidants present in olive oil, to hyperlipemic rabbits improves blood lipid profile, antioxidant status and reduces atherosclerosis development. Atherosclerosis 2006;188(1):35-42.
104. Karantonis HC., Antonopoulou S., Perrea DN., Sokolis DP., Theocharis SE., Kavantzas N., Iliopoulos DG., Demopoulos CA. In vivo antiatherogenic properties of olive oil and its constituent lipid classes in hyperlipidemic rabbits. Nutr Metab Cardiovasc Dis 2006;16(3):174-185.
105. Tsantila N., Karantonis HC., Perrea DN., Theocharis SE., Iliopoulos DG., Antonopoulou S., Demopoulos CA. Antithrombotic and antiatherosclerotic properties of olive oil and olive pomace polar extracts in rabbits. Mediators Inflamm 2007;
106. Tsantila N., Karantonis HC., Perrea DN., Theocharis SE., Iliopoulos DG., Iatrou C., Antonopoulou S., Demopoulos CA. Atherosclerosis regression study in rabbits upon olive pomace polar lipid extract administration. Nutr Metab Cardiovasc Dis 2010;20(10);740-747.
107. Iacono A., Gómez R., Sperry J., Conde J., Bianco G., Meli R., Gómez-Reino JJ., Smith AB 3rd., Gualillo O. Effect of oleocanthal and its derivatives on inflammatory response induced by lipopolysaccharide in a murine Chondrocyte cell line. Arthritis Rheum 2010;62(6):1675-1682.

108. Dell' Agli M., Fagnani R., Galli GV., Maschi O., Gilardi F., Bellosta S., Crestani M., Bosisiot E., De Fabiani E., Caruso D. Olive oil phenols modulate the expression of metalloproteinase 9 in THP-1 cells by acting on nuclear factor-kB signaling. J Agric Food Chem 2010;58(4):2246-2252.

109. Zhang X., Cao J., Zhong L. Hydroxytyrosol inhibits pro-inflammatory cytokines, iNOS, and COX-2 expression in human Monocytic cells. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol 2009;379(6):581-586.

110. Leenen R., Roodenburg AJ., Vissers MN., Schuurbiers JA., van Putte KP., Wiseman SA., van de Put FH. Supplementation of plasma with olive oil phenols and extracts: influence on LDL oxidation. J Agric Food Chem 2002;50(5):1290-1297.

111. Nakbi A., Dabbou S., Champion S., Fouchier F., Mehri S., Attia N., Leger C., Hammami M. Modulation of the superoxide anion production and MMP-9 expression in PMA stimulated THP-1 cells by olive oil minor components: Tyrosol and Hydroxytyrosol. Food Res Intern 2011;44(2):575-581.

112. Goya L., Mateos R., Bravo L. Effect of the olive oil phenol hydroxytyrosol on human Hepatoma HepG2 cells. Protection against oxidative stress induced by tert-butylhydroperoxide. Eur J Nutr 2007;46(2):70-78.

113. Paiva-Martins F., Fernandes J., Rocha S., Nascimento H., Vitorino R., Amado F., Borges F., Belo L., Santos-Silva A. Effects of olive oil polyphenols on erythrocyte oxidative damage. Mol Nutr Food Res 2009;53(5):609-616.

114. Dell' Agli M., Maschi O., Galli GV., Fagnani R., Dal Cero E., Caruso D., Bosisio E. Inhibition of platelet aggregation by olive oil phenols via cAMP-phosphodiesterase. Br J Nutr 2008;99(5):945-951.

115. de Roos B., Zhang X., Rodriguez-Gutiérrez G., Wood S., Rucklidge GJ., Reid MD., Duncan GJ., Cantlay LL., Duthie GG., O' Kennedy N. Anti-platelet effects of olive oil extract: in vitro functional and proteomic studies. Eur J Nutr 2011;50(7):553-562.

116. Visioli F., Romani A., Mulinacci N., Zarini S., Conte D., Vincieri FF., Galli C. Antioxidant and other biological activities of olive mill waste waters. J Agric Food Chem 1999;47(8):3397-3401.

117. Casa R., D' Annibale A., Pieruccetti F., Stazi SR., Giovannozzi Sermanni G., Lo Cascio B. Reduction of the phenolic components in olive-mill wastewater by an enzymatic treatment and its impact on durum wheat (Triticum Durum Desf.) germinability. Chemosphere 2003;50(8):959-966.

118. Lesage-Meessen L., Navarro D., Maunier S., Sigoillot J-C., Lorquin J., Delattre M., Simon J-L., Asther M., Labat M. Simple phenolic content in olive oil residues as a function of extraction systems. Food Chem 2001;75(4):501-507.
119. Davies LC., Vilhena AM., Novais JM., Martins-Dias S. Olive mill wastewater characteristics: modelling and statistical analysis. Grasas y Aceites 2004;55(3):233-241.
120. Visioli F., Bellomo G., Galli C. Free radical-scavenging properties of olive oil polyphenols. Biochem Biophys Res Commun 1998;247(1):60-64.
121. Léger CL., Kadiri-Hassani N., Descomps B. Decreased superoxide anion production in cultured human promonocyte cells (THP-1) due to polyphenol mixtures from olive oil processing wastewaters. J Agric Food Chem 2000;48(10):5061-5067.
122. Schaffer S., Podstawa M., Visioli F., Bogani P., Müller WE., Eckert GP. Hydroxytyrosol-rich olive mill wastewater extract protects brain cells in vitro and ex vivo. J Agric Food Chem 2007;55(13):5043-5049.
123. Visioli F., Galli C., Plasmati E., Viappiani S., Hernanez A., Colombo C., Sala A. Olive phenol hydroxytyrosol prevents passive smoking-induced oxidative stress. Circulation 2000;102(18):2169-2171.
124. Visioli F., Caruso D., Plasmati E., Patelli R., Mulinacci N., Romani A., Galli G., Galli C. Hydroxytyrosol, as a component of olive mill waste water, is dose-dependently absorbed and increases the antioxidant capacity of rat plasma. Free Radic Res 2001;34(3):301-305.
125. Fki I., Sahnoun Z., Sayadi S. Hypocholesterolemic effects of phenolic extracts and purified hydroxytyrosol recovered from olive mill wastewater in rats fed a cholesterol-rich diet. J Agric Food Chem 2007;55(3):624-631.
126. Léger CL., Carbonneau MA., Michel F., Mas E., Monnier L., Cristol JP., Descomps B. A thromboxane effect of a hydroxytyrosol-rich olive oil wastewater extract in patients with uncomplicated type I diabetes. Eur J Clin Nutr 2005;59(5):727-730.
127. Visioli F., Wolfram R., Richard D., Abdullah MI., Crea R. Olive phenolics increase glutathione levels in healthy volunteers. J Agric Food Chem 2009;57(5):1793-1796.
128. Antonopoulou S., Semidalas E., Koussissis S., Demopoulos CA. Platelet activating factor (PAF) antagonists in foods: a study of lipids with PAF or anti-PAF-like activity in cow's milk and yogurt. J Agric Food Chem 1996;44(10):3047-3051.
129. Visioli F., Galli C., Grande S., Colonnelli K., Patelli C., Galli G., Caruso D. Hydroxytyrosol excretion differs between rats and humans and depends on the vehicle of administration. J Nutr 2003;133:2612-2615.

130. Stamatakis GM., Karantonis HC., Nasopoulou C., Gkogkaki V., Antonopoulou S., Perrea D., Theocharis SE., Demopoulos CA. Inhibition of atherogenesis in rabbits by yogurt enriched with olive mill by-product extracts. Hellenic J Cardiol 2012 (unpublished data).