



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**Βιομόρια από απόβλητα ελαιουργίας: Μελέτη
δομής και *in vitro* και *in vivo* δράσεις αυτών**

**ΓΕΩΡΓΙΟΣ Μ. ΣΤΑΜΑΤΑΚΗΣ
ΧΗΜΙΚΟΣ**

ΑΘΗΝΑ

ΑΠΡΙΛΙΟΣ 2014

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Βιομόρια από απόβλητα ελαιουργίας: Μελέτη δομής και *in vitro* και *in vivo* δράσεις αυτών

ΓΕΩΡΓΙΟΣ Μ. ΣΤΑΜΑΤΑΚΗΣ

A.M.: 62638

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: Κ.Α. ΔΗΜΟΠΟΥΛΟΣ, Καθηγητής ΕΚΠΑ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ ΠΑΡΑΚΟΛΟΥΘΗΣΗΣ

Κ.Α. ΔΗΜΟΠΟΥΛΟΣ, Καθηγητής Τμήματος Χημείας, ΕΚΠΑ
Σ. ΑΝΤΩΝΟΠΟΥΛΟΥ, Καθηγήτρια Τμήματος Επιστήμης Διαιτολογίας-
Διατροφής, Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο
Δ. ΠΕΡΡΕΑ, Καθηγήτρια Ιατρικής Σχολής, ΕΚΠΑ

ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Κ.Α. ΔΗΜΟΠΟΥΛΟΣ, Καθηγητής Τμήματος Χημείας, ΕΚΠΑ
Σ. ΑΝΤΩΝΟΠΟΥΛΟΥ, Καθηγήτρια Τμήματος Επιστήμης Διαιτολογίας-
Διατροφής, Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο
Δ. ΠΕΡΡΕΑ, Καθηγήτρια Ιατρικής Σχολής, ΕΚΠΑ
Μ. ΜΑΡΚΑΚΗ, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Τμήματος Χημείας, ΕΚΠΑ
Ε. ΦΡΑΓΚΟΠΟΥΛΟΥ, Επίκουρη Καθηγήτρια Τμήματος Επιστήμης
Διαιτολογίας-Διατροφής, Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο
Ι. ΖΑΜΠΕΤΑΚΗΣ, Επίκουρος Καθηγητής Τμήματος Χημείας, ΕΚΠΑ
Χ. ΠΡΟΕΣΤΟΣ, Λέκτορας Τμήματος Χημείας, ΕΚΠΑ

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΕΞΕΤΑΣΗΣ 07/04/2014

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι διττός και αφορά αρχικά τη διερεύνηση της ύπαρξης και της δομής βιολογικώς δραστικών λιποειδών στα Υγρά Απόβλητα Ελαιουργίας (ΥΑΕ), και στη συνέχεια τη μελέτη των πιθανών αντιαθηρογόνων δράσεων ενός νέου λειτουργικού τροφίμου το οποίο είναι γιαούρτι 2% σε λιπαρά, εμπλουτισμένο με το αιθανολικό εκχύλισμα από τα ΥΑΕ σε πειραματόζωα. Τα βιολογικώς δραστικά λιποειδή αρχικά εκχυλίστηκαν από τα ΥΑΕ με χρήση καταλλήλων διαλυτών, στη συνέχεια διαχωρίστηκαν/αναλύθηκαν με τη χρήση HPLC. Τα κλάσματα που συλλέχθηκαν δοκιμάστηκαν σε πλυμένα αιμοπετάλια κουνελιού και το δραστικότερο από αυτά χαρακτηρίστηκε με φασματομετρία μάζας. Το εκχύλισμα των ΥΑΕ προστέθηκε σε γιαούρτι 2% και μελετήθηκε η αλληλεπίδραση των ΥΑΕ με τους μικροοργανισμούς του γιαουρτιού, όπου διαπιστώθηκε ότι δεν υπήρχε μεταβολή ούτε στο γιαούρτι ούτε στα βιολογικώς δραστικά λιποειδή. Για την *in vivo* μελέτη της αναστολής των αθηρωματικών πλακών χρησιμοποιήθηκαν 30 κουνέλια Νέας Ζηλανδίας τα οποία χωρίστηκαν σε 3 ομάδες και οι οποίες τράφηκαν για 48 ημέρες με αθηρογόνο δίαιτα, ενώ σε μία συγχωρηγήθηκε γιαούρτι 2% εμπλουτισμένο με 500mg ΒΔΛ/120g γιαουρτιού και στην τρίτη συγχωρηγήθηκε γιαούρτι εμπορίου 2%. Για την υποστροφή των αθηρωματικών πλακών τα πειραματόζωα τράφηκαν με αθηρογόνο δίαιτα για 45 ημέρες και χωρίστηκαν σε 3 ομάδες που η μια τράφηκε με τυπική κουνελοτροφή TK, η δεύτερη με TK και γιαούρτι εμπλουτισμένο με ΥΑΕ και η Τρίτη με TK και γιαούρτι εμπορίου 2%. Μετά το τέλος της παρέμβασης τα πειραματόζωα ευθανατώθηκαν και έγινε μορφομετρική αξιολόγηση των αθηρωματικών βλαβών στα αγγεία τους ύστερα από μονιμοποίηση σε παραφίνη. Επιπλέον μετρήθηκαν τα λιποειδή αίματος, κυτταροκίνες και τα μεταβολικά ένζυμα του PAF πριν και μετά την παρέμβαση. Τα πειραματόζωα δεν εμφάνισαν πρόβλημα στην πρόσληψη της τροφής ενισχυμένη με γιαούρτι είτε εμπορίου ή ενισχυμένο με ΥΑΕ και αναπτύχθηκαν κανονικά. Στις ομάδες της αναστολής τα πειραματόζωα της Ομάδας που τράφηκαν με γιαούρτι και ΥΑΕ εμφάνισαν μείωση του πάχους των αθηρωματικών πλακών σε σύγκριση με την Ομάδα ελέγχου, ενώ το απλό γιαούρτι έδειξε μόνο μια τάση μείωσης τους αλλά όχι στατιστικώς σημαντική. Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν με τη μείωση της IL-1b στην ομάδα Β. Τα μεταβολικά ένζυμα του PAF στα κύτταρα και τους ιστούς διαφοροποιούνται με τέτοιο τρόπο που συμφωνούν με τα ευνοϊκά αποτελέσματα από τη χρήση του γιαουρτιού απλού ή ενισχυμένου. Όσον αφορά την παρέμβαση της υποστροφής των αθηρωματικών πλακών, η χορήγηση γιαουρτιού απλού ή ενισχυμένου μείωσε τα λιποειδή αίματος σε πολλές περιπτώσεις στα βασικά επίπεδα πριν τη χορήγηση χοληστερόλης. Στην περίπτωση της ολικής και της LDL χοληστερόλης, το εμπλουτισμένο γιαούρτι μείωσε τις τιμές στα βασικά επίπεδα, ενώ και τα δύο γιαούρτια μείωσαν τα επίπεδα των τριακυλογλυκερολών χαμηλότερα και από τις αρχικές τιμές. Οι αθηρωματικές πλάκες μειώθηκαν σημαντικά στην ομάδα που τράφηκε με εμπλουτισμένο γιαούρτι, που συμφωνεί με τη μείωση της IL-1b κάτω και από τα αρχικά της επίπεδα σε σχέση με την ομάδα ελέγχου αλλά και την Ομάδα που τράφηκε με απλό γιαούρτι. Ως προς τα ένζυμα μεταβολισμού του PAF η Lp-PLA2 αυξάνεται σε όλες τις Ομάδες με την πρόσληψη της αθηρογόνου διαίτας, αλλά μειώνεται κάτω και από τα βασικά της επίπεδα στο χρόνο 0 μετά την πρόσληψη των γιαουρτιών. Όπως και στην περίπτωση της αναστολής στα κύτταρα και τους ιστούς τα μεταβολικά ένζυμα του PAF διαφοροποιούνται με τέτοιο τρόπο που συμφωνούν με τα ευνοϊκά αποτελέσματα από τη χρήση του γιαουρτιού απλού ή ενισχυμένου.

ΘΕΜΑΤΙΚΗ ΠΕΡΙΟΧΗ: Βιοχημεία φυσικών προϊόντων

ΛΕΞΕΙΣ ΚΛΕΙΔΙΑ: αθηροσκλήρωση, PAF, υγρά απόβλητα ελαιουργίας, γιαούρτι

ABSTRACT

The purpose of this thesis is two-fold and concerns initially the investigation of the existence and structure of biologically active lipids in Olive Mill Wastes (OMW), and their potential as anti-atherogenic compounds when added to a new functional food which is yogurt 2 % fat, enriched with the OMW ethanolic extract. The biologically active lipids originally extracted from the OMW using suitable solvents, were separated/analyzed using HPLC. The collected fractions were tested in washed rabbit platelets and the most potent molecule was characterized by mass spectrometry. The OMW extract was added to yogurt 2% for the study of the interaction of microorganisms with the OMW extract, where it was found that there was no effect in either yogurt or biologically active lipids. For the *in vivo* study of atherosclerotic plaques inhibition by OMW 30 New Zealand rabbits were used, which were divided into 3 groups fed for 48 days with atherogenic diet. One of them was also co-administered with yogurt 2% fortified with 500mg OMW extract/120g yogurt and the third was co administered with commercial yoghurt 2%. For the study of atherosclerotic plaques regression animals were fed the atherogenic diet for 45 days and then divided into three groups: one fed standard rabbit food (SF), the second with SF and yogurt fortified with OMW extracts and the third with SF and commercial yogurt 2%. After the intervention the animals were euthanized and the atherosclerotic lesions in blood vessels were morphometrically assessed, after fixation in paraffin. Moreover blood lipids, cytokines and PAF metabolic enzymes were measured before and after the intervention. The animals showed no problem in food intake with either of the yoghurt enriched diets and grew normally. In the inhibition study the test animals fed with yoghurt fortified with OMW extracts showed a reduction in the thickness of atherosclerotic lesions in comparison with the control group , while the plain yogurt only showed a declining trend, but not statistically significant. These results are consistent with the reduction of IL-1b in enriched yoghurt fed animals. The PAF metabolic enzymes in cells and tissues vary in a way consistent with the favorable results from the use of plain or fortified yogurt. In regard of the atherosclerotic lesions regression study, administration of yogurt either plain or fortified lowered blood lipids in many cases to baseline levels prior to cholesterol administration. More specifically total and LDL cholesterol levels in enriched yogurt fed animals slashed prices to baseline levels, while both yoghurt diets reduced triacylglycerol levels to lower concentrations than the baseline values. Atherosclerotic lesions were significantly reduced in the group fed with enriched yogurt, correlating agrees with the IL-1b reduction in the group below the baseline levels compared with the control group and the group fed with plain yogurt. Lp-PLA2 increased in all groups due to the cholesterol uptake, but dropped below the basal levels of time 0 after the yoghurt diet intake. As in the case of lesion inhibition protocol cells and tissues PAF metabolic enzymes differ in ways that are consistent with the favorable results from the use of yogurt plain or fortified.

SUBJECT AREA: Natural products biochemistry

KEYWORDS: Atherosclerosis, PAF, Olive mill wastes, yogurt

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η εργασία αυτή εκπονήθηκε την περίοδο 2009-2014 στο Εργαστήριο Βιοχημείας του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Αθηνών. Την επίβλεψη της εργασίας είχε ο Καθηγητής κ. Κωνσταντίνος Α. Δημόπουλος, τον οποίο ευχαριστώ πρώτο και κύρια για τις πολύτιμες επιστημονικές συμβουλές του αλλά κυρίως για την εμπιστοσύνη και τη στήριξη που μου παρείχε όλα αυτά τα χρόνια.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες θα ήθελα να εκφράσω στα άλλα δύο μέλη της τριμελούς μου επιτροπής, κα. Δ. Περρέα, καθηγήτρια της Ιατρικής Σχολής του ΕΚΠΑ και την κα. Σ. Αντωνοπούλου καθηγήτρια του τμήματος Επιστήμης της Διαιτολογίας και Διατροφής του Χαροκόπειου Πανεπιστημίου. Την καθηγήτρια κα. Δ. Περρέα για τη συνεχή υποστήριξή της, αλλά και της διάθεσης των χώρων και των οργάνων του Εργαστηρίου Πειραματικής Χειρουργικής και Χειρουργικής Ερεύνης "Ν.Σ. Χρηστέας" της Ιατρικής Σχολής του ΕΚΠΑ, για τη πραγματοποίηση της *in vivo* διατροφικής παρέμβασης της εργασίας. Την καθηγήτρια κα. Σ. Αντωνοπούλου για τη συνεχή υποστήριξή της, αλλά και της διάθεσης των χώρων και των οργάνων του Εργαστηρίου Βιοχημείας του Χαροκοπέιου Πανεπιστημίου, για τη μέτρηση των κυτταροκινών, της πρωτεΐνης των δειγμάτων και τη λυοφιλοποίηση του εκχυλίσματος των ΥΑΕ.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τα μέλη του προσωπικού των εργαστηρίων:

Πειραματικής Χειρουργικής και Χειρουργικής Ερεύνης "Ν.Σ. Χρηστέας" κ. Π. Ράππο για τη βοήθεια που μου παρείχε στην καθαριότητα των χώρων και τη διαχείριση των πειραματόζωων, την Δρ. Α. Παντοπούλου, τον κ. Π. Τσακιρόπουλο και την κα. Ε. Ντούση για τις ευθανασίες και νεκροτομές των πειραματόζωων και τον κ. Ν.Τσακιρόπουλο για τις βιοχημικές αναλύσεις τους.

Βιοχημείας του Χαροκοπέιου Πανεπιστημίου, κα. Ε. Φραγκοπούλου Επίκουρο Καθηγήτρια για τις πολύτιμες συμβουλές της πάνω στην μεθοδολογία των πειραμάτων που πραγματοποιήθηκαν και την κα. Ι Βλαχογιάννη για τη βοήθειά της στην εκτέλεση των αναλύσεων.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω επίσης τον κ. Χ. Καραντώνη, Επίκουρο Καθηγητή του Τμήματος Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής του Πανεπιστημίου Αιγαίου για τις πολύτιμες συμβουλές του πάνω στη μεθοδολογία των πειραμάτων που πραγματοποιήθηκαν, αλλά και τη θεωρητική ενημέρωση για την επίδραση των βιολογικά δραστικών λιποειδών από τρόφιμα της Μεσογειακής Δίαιτας στην αθηροσκλήρωση.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Σ. Θεοχάρη, Αναπληρωτή Καθηγητή της Ιατρικής Σχολής του ΕΚΠΑ, για τη βοήθεια του στη μέτρηση των αθηρωματικών πλακών στα πειραματόζωα.

Ακόμα, θα ήθελα να ευχαριστήσω την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια κα. Π. Μαρκάκη, τους Επίκουρους Καθηγητές κ. Ι. Ζαμπετάκη, κα Ε. Φραγκοπούλου και τον Λέκτορα κ. Χ. Προεστό για τη συμμετοχή τους στην 7μελή Εξεταστική Επιτροπή, καθώς και το ΔΕΠ και τους μεταπτυχιακούς φοιτητές των Εργαστηρίων Βιοχημείας και Χημείας Τροφίμων για τη φιλική ατμόσφαιρα και την αγαστή συνεργασία που είχαμε καθ' όλη τη διάρκεια εκπόνησης του παρόντος διδακτορικού. Ξεχωριστά θα ήθελα να ευχαριστήσω τη μεταπτυχιακή φοιτήτρια κα. Β. Παπακωνσταντίνου για την εξαιρετική συνεργασία που είχαμε όλα αυτά τα χρόνια αλλά και τη βοήθεια που μου προσέφερε στις αναλύσεις που αφορούν τον PAF.

Τέλος θερμές ευχαριστίες εκφράζονται προς την εταιρεία ΜΕΒΓΑΛ. ΑΕ για την μακρά και σταθερή συνεργασία της στο θέμα.

Η παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκε στο πλαίσιο ερευνητικού προγράμματος, το οποίο συγχρηματοδοτείται από την Ευρωπαϊκή Ένωση και μέσω του Επιχειρησιακού Προγράμματος "Ανταγωνιστικότητα και Επιχειρηματικότητα" του Εθνικού Στρατηγικού Πλαισίου Αναφοράς (ΕΣΠΑ).Ερευνητικό Πρόγραμμα Χρηματοδότησης: Συνεργασία 2011-11ΣΥΝ-2-652.



Ε. Π. Ανταγωνιστικότητα και Επιχειρηματικότητα (ΕΠΑΝ ΙΙ), ΠΕΠ Μακεδονίας – Θράκης, ΠΕΠ Κρήτης και Νήσων Αιγαίου, ΠΕΠ Θεσσαλίας – Στερεάς Ελλάδας – Ηπείρου, ΠΕΠ Αττικής

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: Αθηροσκλήρωση και Παράγοντας Ενεργοποίησης Αιμοπεταλίων (PAF).....	16
1.1 Θεωρία της απόκρισης σε τραυματισμό.....	16
1.2 Θεωρία της Κατακράτησης	18
1.3 Θεωρία της Οξειδωτικής Τροποποίησης	18
1.4 Η Θεωρία αθηροσκλήρωσης με εμπλοκή του Παράγοντα Ενεργοποίησης Αιμοπεταλίων (PAF).....	20
1.5 Δράσεις του PAF στα κύτταρα που εμπλέκονται στην αθηροσκλήρωση.....	23
2. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: Αναστολείς του PAF.....	29
2.1 Γενικά στοιχεία για αναστολείς/αγωνιστές του PAF	29
2.2 Ανταγωνιστές-μη δομικά ανάλογα του PAF	32
2.3 Αναστολείς του PAF και ανάπτυξη αθηρωματικών πλακών	36
2.3.1 BN 52021	36
2.3.2 Διγλυκοζίτης της σεκοίσολαρισιρεζινόλης (SDG)	37
2.3.3 WEB 2086	39
2.3.4 Αναστολείς του PAF προερχόμενοι από τρόφιμα της Μεσογειακής διαίτας	39
2.3.5 Ελαιόλαδο	40
2.3.6 Ψάρια	41
2.3.7 Αναστολείς του PAF από τα συμπαράγωγα της ελαιουργίας	42
3. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: Βιοχημικοί δείκτες της αθηροσκλήρωσης	46
3.1 Εισαγωγή.....	46
3.2 C αντιδρώσα πρωτεΐνη (C-reactive protein, CRP)	47
3.3 Ιντερλευκίνη-1 (Interleukin-1, IL-1).....	50
3.4 Ογκονεκρωτικός Παράγοντας α (Tumor Necrosis factor-α, TNF-α) ..	51
3.5 PAF-AH (EC 3.1.1.47)	52
3.6 Ιντερλευκίνη-6 (Interleukin-6, IL-6).....	60
3.7 Ινωδογόνο (Fibrinogen)	61
3.8 Αναστολέας του ενεργοποιητή του πλασμινογόνου 1(Plasminogen activator inhibitor 1, PAI-1)	61
3.9 Διαλυτός προσδέτης CD40 (Soluble CD40 Ligand).....	62
3.10 Πρωτεΐνη σχετιζόμενη με το μυελοειδές 8/14 (Myeloid-related protein 8/14, MRP 8/14).....	63
3.11 Αδιπονεκτίνη (Adiponectin).....	63
3.12 Ιντερλευκίνη 18 (Interleukin 18, IL-18).....	65
3.13 Μεταλοπρωτεάση μήτρας 9 (Matrix metalloprotease 9, MMP9)....	66
3.14 Υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (Glutathione peroxidase, GPx).67	
3.15 Μυελουπεροξειδάση (Myeloperoxidase, MPO)	68
3.16 Χημειοτακτική πρωτεΐνη-1 των μονοκυττάρων (Monocyte chemotactic protein 1, MCP-1)	69
3.17 Αυξητικός παράγοντας πλακούντα (Placental Growth Factor, PIGF)	70
4. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: Μέθοδοι	72
4.1 Εκχύλιση λιποειδών κατά Blich-Dyer	72
4.2 Κατανομή κατ' αντιρροή.....	73
4.3 Εκχύλιση πολικών συστατικών από τα ΥΑΕ	74

4.4	Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (HPLC) λιποειδών.....	75
4.5	Φασματοσκοπία Μάζας (MS).....	76
4.6	Βιολογική δοκιμασία συσσώρευσης πλυμένων αιμοπεταλίων κουνελιού.....	77
4.7	Προσδιορισμός ολικής χοληστερόλης ορού.....	83
4.8	Προσδιορισμός HDL χοληστερόλης (HDL-C) ορού.....	83
4.9	Προσδιορισμός τριγλυκεριδίων ορού.....	84
4.10	Προσδιορισμός LDL χοληστερόλης (LDL-C) ορού.....	85
4.11	Παραλαβή ορού, πλάσματος και διαχωρισμός έμμορφων συστατικών του αίματος.....	85
4.11.1	Παραλαβή ορού αίματος.....	86
4.11.2	Παραλαβή και διαχωρισμός πλάσματος και έμμορφων συστατικών αίματος.....	86
4.11.3	Παραλαβή/διαχωρισμός αιμοπεταλίων και πλάσματος.....	86
4.11.4	Παραλαβή και διαχωρισμός λευκών και ερυθρών αιμοσφαιρίων.....	87
4.11.5	Λευκά αιμοσφαίρια.....	87
4.11.6	Ερυθρά αιμοσφαίρια.....	87
4.12	Παραλαβή και Ομογενοποίηση Ιστών.....	88
4.13	Προσδιορισμός πρωτεΐνης με τη μέθοδο Bradford.....	90
4.14	Προσδιορισμός δραστικότητας ενδοκυτταρικής PAF ακετυλοϋδρολάσης (PAF-AH) και πλάσματος (Lp-PLA2).....	91
4.15	Προσδιορισμός δραστικότητας της ανεξάρτητης διθειοθρεϊτόλης φωσφοχολινο-τρανσφεράσης του PAF (PAF-CPT).....	93
4.16	Προσδιορισμός δραστικότητας της 1-O-αλκυλο-2-lyso-sn-γλυκερο- 3-φωσφοχολίνη: ακετυλο-CoA ακετυλοτρανσφεράσης (lyso-PAF AT).....	97
4.17	Μέτρηση ραδιενέργειας με μετρητή σπινθηρισμού υγρών.....	100
4.18	<i>In vitro</i> οξειδωση πλάσματος με ιόντα Cu ²⁺	101
4.19	Πρωτόκολλο μελέτης της επίδρασης των ΥΑΕ σε <i>in vivo</i> μοντέλο αθηροσκλήρωσης κουνελιών Νέας Ζηλανδίας.....	103
4.20	Ευθανασία κουνελιών και παραλαβή αορτής.....	106
4.21	Μονιμοποίηση των αορτικών παρασκευασμάτων.....	106
4.22	Επεξεργασία μονιμοποιημένων αορτικών παρασκευασμάτων για μικροσκοπικές τομές παραφίνης.....	107
4.23	Χρώση με αιματοξυλίνη-ηωσίνη.....	108
4.24	Μικροσκοπική μορφομετρική ανάλυση των χρωματισμένων ιστολογικών τομών.....	109
4.25	Προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής ικανότητας των δειγμάτων με τη μέθοδο του DPPH.....	110
4.26	Προσδιορισμός των κυτταροκινών στα βιολογικά δείγματα των κουνελιών.....	111
4.27	Προσδιορισμός σακχάρων στα λιποειδή.....	114
4.28	Προσδιορισμός φαινολικών στα λιποειδή.....	115
4.29	Προσδιορισμός ο-διφαινολικών συστατικών στα λιποειδή.....	116
4.30	Προσδιορισμός των διαφόρων βιοφαινολικών συστατικών στα λιποειδή.....	117
4.31	Στατιστική ανάλυση.....	118
5.	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	120
5.1	Βιολογική δοκιμασία των ΥΑΕ σε πλυμένα αιμοπετάλια κουνελιού.....	122
5.2	Ανάλυση των ΥΑΕ με HPLC.....	123

5.3	Φασματομετρία μάζας.....	124
5.3.1	Ανάλυση θετικού φάσματος.....	125
5.3.2	Ανάλυση αρνητικού φάσματος	128
5.4	Εισαγωγή των ΥΑΕ σε γιαούρτια	131
5.5	Κινητική μελέτη των μεταβολικών ενζύμων του PAF	132
5.5.1	Αιμοπετάλια.....	132
5.5.2	Λευκά αιμοσφαίρια	134
5.5.3	Ερυθρά αιμοσφαίρια	135
5.5.4	Ηπατικά κύτταρα	136
5.5.5	Νεφρικά κύτταρα	138
5.5.6	Κύτταρα σπλήνας.....	139
5.6	Αναστολή αθηρωματικών πλακών.....	141
5.6.1	Αιματολογικές αναλύσεις πειραματόζων.....	142
5.6.2	Αθηρωματική βλάβη.....	149
5.6.3	Αναλύσεις έμμορφων συστατικών αίματος.....	152
5.7	Υποστροφή αθηρωματικών πλακών.....	172
5.7.1	Αιματολογικές αναλύσεις πειραματόζων.....	173
5.7.2	Αθηρωματική βλάβη.....	180
5.7.3	Αναλύσεις έμμορφων συστατικών του αίματος	183
6.	ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	204
7.	ΠΙΝΑΚΑΣ ΟΡΟΛΟΓΙΑΣ.....	209
8.	ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ-ΑΡΚΤΙΚΟΛΕΞΑ-ΑΚΡΩΝΥΜΙΑ	211
9.	ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι.....	213
10.	ΑΝΑΦΟΡΕΣ	217

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

Σχήμα 1: Ποσοστιαία αναστολή της ρίζας DPPH.....	121
Σχήμα 2: Ανασταλτική δράση των ΥΑΕ στην οξειδωση πλάσματος από ιόντα χαλκού.....	121
Σχήμα 3: Δοσοεξαρτώμενη ανασταλτική δράση των ΥΑΕ στην οξειδωση πλάσματος από ιόντα χαλκού.....	122
Σχήμα 4: Διαγραμματική αναπαράσταση των δραστηριοτήτων και ειδικών δραστηριοτήτων για τα μεταβολικά ένζυμα του PAF στα αιμοπετάλια.....	133
Σχήμα 5: Διαγραμματική αναπαράσταση των δραστηριοτήτων και ειδικών δραστηριοτήτων για τα μεταβολικά ένζυμα του PAF στα λευκά αιμοσφαίρια.....	134
Σχήμα 6: Διαγραμματική αναπαράσταση των δραστηριοτήτων και ειδικών δραστηριοτήτων για τα μεταβολικά ένζυμα του PAF στα ερυθρά αιμοσφαίρια.....	135
Σχήμα 7: Διαγραμματική αναπαράσταση των δραστηριοτήτων και ειδικών δραστηριοτήτων για τα μεταβολικά ένζυμα του PAF στα ηπατικά κύτταρα.....	137
Σχήμα 8: Διαγραμματική αναπαράσταση των δραστηριοτήτων και ειδικών δραστηριοτήτων για τα μεταβολικά ένζυμα του PAF στα νεφρικά κύτταρα.....	138
Σχήμα 9: Διαγραμματική αναπαράσταση των δραστηριοτήτων και ειδικών δραστηριοτήτων για τα μεταβολικά ένζυμα του PAF στα κύτταρα σπλήνας.....	139
Σχήμα 10: Η ημερήσια κατανάλωση τροφής από τα πειραματόζωα που ανήκαν στις ομάδες αναστολής των αθηρωματικών πλακών.....	141
Σχήμα 11: Το βάρος των πειραματόζωων που ανήκαν στις ομάδες αναστολής των αθηρωματικών πλακών.....	142
Σχήμα 12: Η γλυκόζη ορού των πειραματόζωων που ανήκαν στις ομάδες αναστολής των αθηρωματικών πλακών.....	143
Σχήμα 13: Η συγκέντρωση τριακυλογλυκερολών ορού των πειραματόζωων που ανήκαν στις ομάδες αναστολής των αθηρωματικών.....	144
Σχήμα 14: Η συγκέντρωση ολικής χοληστερόλης των πειραματόζωων που ανήκαν στις ομάδες αναστολής των αθηρωματικών πλακών.....	144
Σχήμα 15: Η συγκέντρωση HDL-χοληστερόλης ορού των πειραματόζωων που ανήκαν στις ομάδες αναστολής των αθηρωματικών.....	145
Σχήμα 16: Η συγκέντρωση της LDL-χοληστερόλης ορού των πειραματόζωων που ανήκαν στις ομάδες αναστολής των αθηρωματικών πλακών.....	146
Σχήμα 17: Ειδική δραστηριότητα της Lp-PLA2 στο πλάσμα των πειραματόζωων που ανήκαν στις ομάδες αναστολής της αθηρωμάτωσης.....	147
Σχήμα 18: Η συγκέντρωση του CRP στον ορό των πειραματόζωων που ανήκαν στις ομάδες αναστολής της αθηρωμάτωσης.....	148
Σχήμα 19: Η συγκέντρωση της IL-1b στον ορό των πειραματόζωων που ανήκαν στις ομάδες αναστολής της αθηρωμάτωσης.....	149
Σχήμα 20: Το μέγιστο πάχος των αθηρωματικών πλακών των πειραματόζωων που ανήκαν στις ομάδες αναστολής της αθηρωμάτωσης.....	151
Σχήμα 21: Το μέσο πάχος (βλάβη) των αθηρωματικών πλακών των πειραματόζωων που ανήκαν στις ομάδες αναστολής της αθηρωμάτωσης.....	151
Σχήμα 22: Ειδική δραστηριότητα της ενδοκυτταρικής PAF-AH στα λευκά αιμοσφαίρια των πειραματόζωων που ανήκαν στις ομάδες αναστολής της αθηρωμάτωσης.....	152
Σχήμα 23: Ειδική δραστηριότητα της lyso-PAF AT στα λευκά αιμοσφαίρια των πειραματόζωων που ανήκαν στις ομάδες αναστολής της αθηρωμάτωσης.....	153
Σχήμα 24: Ειδική δραστηριότητα της PAF-CPT στα λευκά αιμοσφαίρια των πειραματόζωων που ανήκαν στις ομάδες αναστολής της αθηρωμάτωσης.....	154
Σχήμα 25: Ειδική δραστηριότητα της ενδοκυτταρικής PAF-AH στα αιμοπετάλια των πειραματόζωων που ανήκαν στις ομάδες αναστολής της αθηρωμάτωσης.....	155
Σχήμα 26: Ειδική δραστηριότητα της lyso-PAF AT στα αιμοπετάλια των πειραματόζωων που ανήκαν στις ομάδες αναστολής της αθηρωμάτωσης.....	156
Σχήμα 27: Ειδική δραστηριότητα της PAF-CPT στα αιμοπετάλια των πειραματόζωων που ανήκαν στις ομάδες αναστολής της αθηρωμάτωσης.....	157

Σχήμα 28: Ειδική δραστικότητα της PAF-AH στα ερυθρά αιμοσφαίρια των πειραματόζων που ανήκαν στις ομάδες αναστολής της αθηρωμάτωσης.	158
Σχήμα 29: Ειδική δραστικότητα της lyso-PAF AT στα ερυθρά αιμοσφαίρια των πειραματόζων που ανήκαν στις ομάδες αναστολής της αθηρωμάτωσης.	159
Σχήμα 30: Ειδική δραστικότητα της PAF-CPT στα ερυθρά αιμοσφαίρια των πειραματόζων που ανήκαν στις ομάδες αναστολής της αθηρωμάτωσης.	160
Σχήμα 31: Ειδική δραστικότητα της PAF-AH στα ηπατοκύτταρα των πειραματόζων που ανήκαν στις ομάδες αναστολής της αθηρωμάτωσης.	161
Σχήμα 32: Ειδική δραστικότητα της lyso-PAF AT στα ηπατοκύτταρα των πειραματόζων που ανήκαν στις ομάδες αναστολής της αθηρωμάτωσης.	161
Σχήμα 33: Ειδική δραστικότητα της PAF-CPT στα ηπατοκύτταρα των πειραματόζων που ανήκαν στις ομάδες αναστολής της αθηρωμάτωσης.	162
Σχήμα 34: Συγκέντρωση του TNF-a στα ηπατοκύτταρα των πειραματόζων που ανήκαν στις ομάδες αναστολής της αθηρωμάτωσης.	163
Σχήμα 35: Συγκέντρωση του CRP στα ηπατοκύτταρα των πειραματόζων που ανήκαν στις ομάδες αναστολής της αθηρωμάτωσης.	163
Σχήμα 36: Συγκέντρωση της IL-1β στα ηπατοκύτταρα των πειραματόζων που ανήκαν στις ομάδες αναστολής της αθηρωμάτωσης.	164
Σχήμα 37: Ειδική δραστικότητα της PAF-AH στα νεφροκύτταρα των πειραματόζων που ανήκαν στις ομάδες αναστολής της αθηρωμάτωσης.	165
Σχήμα 38: Ειδική δραστικότητα της lyso-PAF AT στα νεφροκύτταρα των πειραματόζων που ανήκαν στις ομάδες αναστολής της αθηρωμάτωσης.	166
Σχήμα 39: Ειδική δραστικότητα της PAF CPT στα νεφροκύτταρα των πειραματόζων που ανήκαν στις ομάδες αναστολής της αθηρωμάτωσης.	167
Σχήμα 40: Συγκέντρωση του TNF-a στα νεφροκύτταρα των πειραματόζων που ανήκαν στις ομάδες αναστολής της αθηρωμάτωσης.	168
Σχήμα 41: Συγκέντρωση του CRP στα νεφροκύτταρα των πειραματόζων που ανήκαν στις ομάδες αναστολής της αθηρωμάτωσης.	168
Σχήμα 42: Συγκέντρωση της IL-1b στα νεφροκύτταρα των πειραματόζων που ανήκαν στις ομάδες αναστολής της αθηρωμάτωσης.	169
Σχήμα 43: Ειδική δραστικότητα της PAF-AH στα κύτταρα σπλήνας των πειραματόζων που ανήκαν στις ομάδες αναστολής της αθηρωμάτωσης.	170
Σχήμα 44: Ειδική δραστικότητα της lyso-PAF AT στα κύτταρα σπλήνας των πειραματόζων που ανήκαν στις ομάδες αναστολής της αθηρωμάτωσης.	171
Σχήμα 45: Ειδική δραστικότητα της PAF-CPT στα κύτταρα σπλήνας των πειραματόζων που ανήκαν στις ομάδες αναστολής της αθηρωμάτωσης.	171
Σχήμα 46: Η ημερήσια κατανάλωση τροφής από τα πειραματόζωα που ανήκαν στις ομάδες υποστροφής των αθηρωματικών πλακών.	172
Σχήμα 47: Το βάρος των πειραματόζων που ανήκαν στις ομάδες υποστροφής των αθηρωματικών πλακών.	173
Σχήμα 48: Η γλυκόζη ορού των πειραματόζων που ανήκαν στις ομάδες υποστροφής των αθηρωματικών πλακών.	174
Σχήμα 49: Η συγκέντρωση τριακυλογλυκερολών ορού των πειραματόζων που ανήκαν στις ομάδες υποστροφής των αθηρωματικών πλακών.	174
Σχήμα 50: Η συγκέντρωση ολικής χοληστερόλης ορού των πειραματόζων που ανήκαν στις ομάδες υποστροφής των αθηρωματικών πλακών.	175
Σχήμα 51: Η συγκέντρωση HDL-χοληστερόλης ορού των πειραματόζων που ανήκαν στις ομάδες υποστροφής των αθηρωματικών πλακών.	176
Σχήμα 52: Η συγκέντρωση της LDL-χοληστερόλης ορού των πειραματόζων που ανήκαν στις ομάδες υποστροφής των αθηρωματικών πλακών.	177
Σχήμα 53: Ειδική δραστικότητα της Lp-PLA2 στο πλάσμα των πειραματόζων που ανήκαν στις ομάδες υποστροφής των αθηρωματικών.	178
Σχήμα 54: Η συγκέντρωση του CRP στον ορό των πειραματόζων που ανήκαν στις ομάδες υποστροφής των αθηρωματικών πλακών.	179

Σχήμα 55: Η συγκέντρωση της IL-1b στον ορό των πειραματόζων που ανήκαν στις ομάδες υποστροφής των αθηρωματικών.....	180
Σχήμα 56: Το μέγιστο πάχος των αθηρωματικών πλακών των πειραματόζων που ανήκαν στις ομάδες υποστροφής των αθηρωματικών πλακών.....	182
Σχήμα 57: Το μέσο πάχος (βλάβη) των αθηρωματικών πλακών των πειραματόζων που ανήκαν στις ομάδες υποστροφής των αθηρωματικών πλακών.	182
Σχήμα 58: Ειδική δραστικότητα της ενδοκυτταρικής PAF-AH στα λευκά αιμοσφαίρια των πειραματόζων που ανήκαν στις ομάδες υποστροφής των αθηρωματικών πλακών.....	183
Σχήμα 59: Ειδική δραστικότητα της lyso-PAF AT στα λευκά αιμοσφαίρια των πειραματόζων που ανήκαν στις ομάδες υποστροφής των αθηρωματικών πλακών.....	184
Σχήμα 60: Ειδική δραστικότητα της PAF-CPT στα λευκά αιμοσφαίρια των πειραματόζων που ανήκαν στις ομάδες υποστροφής των αθηρωματικών πλακών.....	185
Σχήμα 61: Ειδική δραστικότητα της ενδοκυτταρικής PAF-AH στα αιμοπετάλια των πειραματόζων που ανήκαν στις ομάδες υποστροφής των αθηρωματικών πλακών.....	186
Σχήμα 62: Ειδική δραστικότητα της lyso-PAF AT στα αιμοπετάλια των πειραματόζων που ανήκαν στις ομάδες υποστροφής των αθηρωματικών πλακών.....	187
Σχήμα 63: Ειδική δραστικότητα της PAF-CPT στα αιμοπετάλια των πειραματόζων που ανήκαν στις ομάδες υποστροφής των αθηρωματικών.....	188
Σχήμα 64: Ειδική δραστικότητα της PAF-AH στα ερυθρά αιμοσφαίρια των πειραματόζων που ανήκαν στις ομάδες υποστροφής των αθηρωματικών.....	189
Σχήμα 65: Ειδική δραστικότητα της lyso-PAF AT στα ερυθρά αιμοσφαίρια των πειραματόζων που ανήκαν στις ομάδες υποστροφής των αθηρωματικών.....	190
Σχήμα 66: Ειδική δραστικότητα της PAF-CPT στα ερυθρά αιμοσφαίρια των πειραματόζων που ανήκαν στις ομάδες υποστροφής των αθηρωματικών πλακών.....	191
Σχήμα 67: Ειδική δραστικότητα της PAF-AH στα ηπατοκύτταρα των πειραματόζων που ανήκαν στις ομάδες υποστροφής των αθηρωματικών πλακών.....	192
Σχήμα 68: Ειδική δραστικότητα της lyso-PAF AT στα ηπατοκύτταρα των πειραματόζων που ανήκαν στις ομάδες υποστροφής των αθηρωματικών πλακών.....	193
Σχήμα 69: Ειδική δραστικότητα της PAF-CPT στα ηπατοκύτταρα των πειραματόζων που ανήκαν στις ομάδες υποστροφής των αθηρωματικών πλακών.....	193
Σχήμα 70: Συγκέντρωση του TNF-a στα ηπατοκύτταρα των πειραματόζων που ανήκαν στις ομάδες υποστροφής των αθηρωματικών πλακών.....	194
Σχήμα 71: Συγκέντρωση του CRP στα ηπατοκύτταρα των πειραματόζων που ανήκαν στις ομάδες υποστροφής των αθηρωματικών πλακών.....	195
Σχήμα 72: Συγκέντρωση της IL-1β στα ηπατοκύτταρα των πειραματόζων που ανήκαν στις ομάδες υποστροφής των αθηρωματικών πλακών.....	195
Σχήμα 73: Ειδική δραστικότητα της PAF-AH στα νεφροκύτταρα των πειραματόζων που ανήκαν στις ομάδες υποστροφής των αθηρωματικών πλακών.....	196
Σχήμα 74: Ειδική δραστικότητα της lyso-PAF AT στα νεφροκύτταρα των πειραματόζων που ανήκαν στις ομάδες υποστροφής των αθηρωματικών πλακών.....	197
Σχήμα 75: Ειδική δραστικότητα της PAF CPT στα νεφροκύτταρα των πειραματόζων που ανήκαν στις ομάδες υποστροφής των αθηρωματικών πλακών.....	198
Σχήμα 76: Συγκέντρωση του TNF-a στα νεφροκύτταρα των πειραματόζων που ανήκαν στις ομάδες υποστροφής των αθηρωματικών πλακών.....	199

Σχήμα 77: Συγκέντρωση του CRP στα νεφροκύτταρα των πειραματόζων που ανήκαν στις ομάδες υποστροφής των αθηρωματικών πλακών.....	200
Σχήμα 78: Συγκέντρωση της IL-1b στα νεφροκύτταρα των πειραματόζων που ανήκαν στις ομάδες αναστολής της αθηρωμάτωσης.....	201
Σχήμα 79: Ειδική δραστικότητα της PAF-AH στα κύτταρα σπλήνας των πειραματόζων που ανήκαν στις ομάδες υποστροφής των αθηρωματικών πλακών.	201
Σχήμα 80: Ειδική δραστικότητα της lyso-PAF AT στα κύτταρα σπλήνας των πειραματόζων που ανήκαν στις ομάδες υποστροφής των αθηρωματικών πλακών.	202
Σχήμα 81: Ειδική δραστικότητα της PAF-CPT στα κύτταρα σπλήνας των πειραματόζων που ανήκαν στις ομάδες υποστροφής των αθηρωματικών πλακών.	203

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1: Συνοπτική σχηματική αναπαράσταση του μηχανισμού αθηρωμάτωσης με εμπλοκή του PAF	23
Εικόνα 2: Χαρακτηρισμένοι αναστολείς του PAF, δομικά ανάλογα του ανοιχτής αλύσου	33
Εικόνα 3: Οι δομές χαρακτηρισμένων αναστολέων και αγωνιστών του PAF.....	44
Εικόνα 4: Διαγραμματική αναπαράσταση της πορείας παραλαβής ορού, πλάσματος και έμμορφων συστατικών του αίματος	88
Εικόνα 5: Σχηματική αναπαράσταση του πρωτόκολλου που ακολουθήθηκε για την παρούσα μελέτη.....	106
Εικόνα 6: Ενδεικτικό χρωματογράφημα από την ανάλυση των ΥΑΕ σε στήλη πυριτικού οξέως με προσδεσμένες αμινομάδες.	123
Εικόνα 7: Ενδεικτικό χρωματογράφημα ανάστροφης φάσης του κλάσματος που συλλέχθηκε από τη στήλη κανονικής φάσης.....	124
Εικόνα 8: Ανάλυση των δομών από τα παρατηρούμενα θετικά θραύσματα του μορίου.	126
Εικόνα 9: Φάσματα μάζας θετικών ιόντων του μορίου.	127
Εικόνα 10: Ανάλυση των δομών από τα παρατηρούμενα αρνητικά θραύσματα του μορίου.	129
Εικόνα 11: Φάσματα μάζας αρνητικών ιόντων του μορίου.....	130
Εικόνα 12: Χαρακτηριστικές φωτογραφίες αγγείων από οπτικό μικροσκόπιο ύστερα από χρώση των πειραματοζώων που ανήκουν στις ομάδες αναστολής των αθηρωματικών πλακών.....	150
Εικόνα 13: Χαρακτηριστικές φωτογραφίες αγγείων από οπτικό μικροσκόπιο ύστερα από χρώση των πειραματοζώων που ανήκουν στις ομάδες υποστροφής των αθηρωματικών πλακών.....	181

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1: Χρόνοι ενζυμικής αντίδρασης και περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη που χρησιμοποιήθηκε για τον ενζυμικό προσδιορισμό της PAF-AH	93
Πίνακας 2: Χρόνοι ενζυμικής αντίδρασης και περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη που χρησιμοποιήθηκε για κάθε είδος κυττάρου για τον ενζυμικό προσδιορισμό της ανεξάρτητης διθειοθρεϊτόλης φωσφοχολινο-τρανσφεράσης του PAF (PAF-CPT)....	96
Πίνακας 3: Χρόνοι ενζυμικής αντίδρασης και περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη που χρησιμοποιήθηκε για κάθε είδος κυττάρου για τον ενζυμικό προσδιορισμό της ακετυλο-CoA ακετυλοτρανσφεράσης (lyso-PAF AT).....	99
Πίνακας 4: Η πορεία κατεργασίας των αορτικών δειγμάτων με αιθανόλη.	107
Πίνακας 5: Αποτελέσματα χημικών αναλύσεων σε λυοφιλοποιημένα ΥΑΕ	120
Πίνακας 6: Βιολογική δραστηριότητα των 3 δραστικότερων κλασμάτων από την χρωματογραφία κανονικής φάσης των ΥΑΕ.	123
Πίνακας 7: Συνθήκες ενζυμικής αντίδρασης για τα μεταβολικά ένζυμα του PAF στα αιμοπετάλια.....	133
Πίνακας 8: Συνθήκες ενζυμικής αντίδρασης για τα μεταβολικά ένζυμα του PAF στα λευκά αιμοσφαίρια.....	135
Πίνακας 9: Συνθήκες ενζυμικής αντίδρασης για τα μεταβολικά ένζυμα του PAF στα ερυθρά αιμοσφαίρια.	136
Πίνακας 10: Συνθήκες ενζυμικής αντίδρασης για τα μεταβολικά ένζυμα του PAF στα ηπατικά κύτταρα.....	137
Πίνακας 11: Συνθήκες ενζυμικής αντίδρασης για τα μεταβολικά ένζυμα του PAF στα νεφρικά κύτταρα.....	139
Πίνακας 12: Συνθήκες ενζυμικής αντίδρασης για τα μεταβολικά ένζυμα του PAF στα κύτταρα σπλήνας.	140
Πίνακας 13: Πίνακας ορολογίας με τις αντιστοιχίσεις των ελληνικών και ξενόγλωσσων όρων	209
Πίνακας 14: Ακρωνύμια και ανάπτυξή τους	211
Πίνακας 15: Μέσοι όροι και τυπικές αποκλίσεις των βιοχημικών παραμέτρων των πειραματόζωων που ανήκαν στις Ομάδες αναστολής των αθηρωματικών πλακών	213
Πίνακας 16: Μέσοι όροι και τυπικές αποκλίσεις των βιοχημικών παραμέτρων των πειραματόζωων που ανήκαν στις Ομάδες υποστροφής των αθηρωματικών πλακών	215

1. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: Αθηροσκλήρωση και Παράγοντας Ενεργοποίησης Αιμοπεταλίων (PAF)

1.1 Θεωρία της απόκρισης σε τραυματισμό

Από τις πρώτες θεωρίες αθηροσκλήρωσης ήταν η «θεωρία της επικάλυψης» [1, 2] που πρότεινε ότι η πάχυνση του έσω χιτώνα ήταν αποτέλεσμα της απόθεσης ινώδους στο αρτηριακό τοίχωμα και η θεωρία «λιποειδικής διαπίδωσης» [3-6] βάσει της οποίας σύμπλοκα λιποειδών με βλενο(μυκο)πολυσακχαρίτες προκαλούσαν την αθηροσκλήρωση. Ένα κοινό θέμα στις πρώτες αυτές θεωρίες ήταν ότι βασίζονταν στην παθητική εναπόθεση από όχι στα ενεργά κυτταρικά συστατικά. Οι Ross και Glomset πρόσφεραν μια ριζοσπαστική απομάκρυνση από αυτή τη φιλοσοφία με το να προτείνουν τη θεωρία της «απόκρισης στον τραυματισμό» (response-to-injury) [7]. Σε αυτήν την υπόθεση το προτεινόμενο αρχικό στάδιο της αθηρογένεσης είναι η απογύμνωση του ενδοθηλίου που οδηγεί σε διάφορες αντισταθμιστικές αποκρίσεις οι οποίες αλλάζουν τη φυσιολογική ομοιοστασία των αγγείων. Ο τραυματισμός αυξάνει τη συγκολλητικότητα των ενδοθηλιακών κυττάρων με τα λευκοκύτταρα και τα αιμοπετάλια, και μεταβάλλει το τοπικό περιβάλλον από αντιθρομβωτικό σε προθρομβωτικό. Τα προσκολλημένα λευκοκύτταρα και αιμοπετάλια απελευθερώνουν στη συνέχεια πλήθος από κυτταροκίνες, διάφορους αγγειοδραστικούς και αυξητικούς παράγοντες οι οποίοι προάγουν μια φλεγμονώδη απόκριση που τη χαρακτηρίζει η μετανάστευση των λείων μυϊκών κυττάρων (smooth muscle cells, SMC) στον μέσω χιτώνα (intima) και τον πολλαπλασιασμό τους οπότε σχηματίζουν μια πρωταρχική βλάβη. Ένα άλλο συστατικό της φλεγμονώδους απόκρισης είναι η προσέλκυση των μακροφάγων στο αρτηριακό τοίχωμα, όπου προσλαμβάνουν τα λιποειδή των LDL που έχουν εναποτεθεί εκεί και σχηματίζουν αφρώδη κύτταρα (foam cells), που είναι το χαρακτηριστικό γνώρισμα μιας πρώιμης αρτηριοσκληρωτικής βλάβης. Η διαδικασία της συσσώρευσης λιποειδών και του σχηματισμού αφρωδών κυττάρων διαιωνίζει μια φλεγμονώδη απόκριση η οποία οδηγεί σε μια εντοπισμένη συσσώρευση κυττάρων στο αρτηριακό τοίχωμα που ομοιάζει με ένα απόστημα που θα παρατηρούνταν σε άλλους ιστούς. Οι κύριοι κυτταρικοί μεσολαβητές αυτής της πρώιμης φλεγμονώδους απόκρισης είναι τα αιμοπετάλια [8], τα

μακροφάγα, τα Τ-λεμφοκύτταρα και τα λεία μυϊκά κύτταρα [9]. Μέσα στο εντοπισμένο αυτό τραύμα η συνεχιζόμενη φλεγμονή, μπορεί να οδηγήσει στη νέκρωση των κυττάρων και την περαιτέρω προσκόλληση των μονοκυττάρων και των λεμφοκυττάρων με μια συνακόλουθη απελευθέρωση κυτταροκινών (cytokine), αυξητικών παραγόντων και πρωτεολυτικών ενζύμων. Αυτό μπορεί να αποτελέσει την έναρξη για νέκρωση μέσα στο τραύμα, και μπορεί να προκαλέσει την αυτοκαταλυτική επέκταση του τραύματος. Καθώς το τραύμα διευρύνεται δεν μπορεί πλέον να αντισταθμιστεί η εισβολή των στοιχείων που απαρτίζουν τη βλάβη στον αρτηριακό αυλό, με αποτέλεσμα η ροή του αίματος να μειώνεται [2]. Παρά το ότι η θεωρία της απόκρισης στον τραυματισμό βασίστηκε αρχικά στην απογύμνωση του ενδοθηλίου ως κύριο στάδιο για την έναρξη της αθηροσκλήρωσης [10, 11], πιο πρόσφατα, έγινε σαφές ότι αναπτυσσόμενες αρτηριοσκληρωτικές βλάβες, είναι δυνατόν να καλύπτονται από ένα άθικτο στρώμα ενδοθηλιακών κυττάρων, και ότι η απογύμνωση του ενδοθηλίου αποτελεί την εξαίρεση παρά τον κανόνα. Αυτά τα στοιχεία, μεταξύ άλλων, προώθησαν την βελτίωση της αρχικής υπόθεσής έτσι ώστε η δυσλειτουργία των ενδοθηλιακών κυττάρων είναι επαρκής για την έναρξη της αθηρογένεσης μέσω της αυξημένης διαπερατότητας του ενδοθηλίου από τις αθηρογόνες λιποπρωτεΐνες [12]. Αυτός όμως ο ισχυρισμός έχει τις ελλείψεις του καθώς τα φυσιολογικά αρτηριακά τμήματα επιδεικνύουν ρυθμούς εισαγωγής των Λιποπρωτεϊνών Χαμηλής Πυκνότητας (Low Density Lipoproteins, LDL) που υπερβαίνουν τον ρυθμό συσσώρευσης των LDL [13]. Αυτό υποδεικνύει ότι η είσοδος των αθηρογόνων λιποπρωτεϊνών στο αρτηριακό τοίχωμα μπορεί να μην εξαρτάται από την δυσλειτουργία του ενδοθηλίου. Στην πραγματικότητα, ο ρυθμός εισόδου των LDL μέσα στο αρτηριακό τοίχωμα είναι μάλλον ομοιόμορφος, αλλά η συσσώρευση των αθηρογόνων λιποπρωτεϊνών είναι εντοπισμένη σε περιοχές που έχουν τη τάση για δημιουργία μελλοντικών αλλοιώσεων [14, 15]. Τέτοια σημεία με τάση προς αλλοίωση τείνουν να επιδεικνύουν μια ενισχυμένη κατακράτηση αθηρογόνων λιποπρωτεϊνών που περιέχουν απολιποπρωτεΐνη Β (apolipoprotein B, apoB) [14-16]. Αυτές οι παρατηρήσεις έδωσαν το έναυσμα για την ανάπτυξη εναλλακτικών θεωριών για την έναρξη της αθηροσκλήρωσης, όπως η θεωρία της κατακράτησης.

1.2 Θεωρία της Κατακράτησης

Πολλά χαρακτηριστικά της αθηροσκλήρωσης μπορούν να αποδοθούν στην ενισχυμένη κατακράτηση των LDL μέσα στο αρτηριακό τοίχωμα και στη σύνδεσή τους με τις πρωτεογλυκάνες. Σύμφωνα με αυτή τη θεωρία η κατακράτηση των λιποπρωτεϊνών είναι το εναρκτήριο βιοχημικό φαινόμενο για την αθηροσκλήρωση. Η απολιποπρωτεΐνη B-100, η μόνη πρωτεΐνη που σχετίζεται με την LDL, κατακρατείται μέσα στο αρτηριακό τοίχωμα σε στενή ένωση με αρτηριακές πρωτεογλυκάνες [17, 18]. Αυτή η αλληλεπίδραση είναι μεσολαβούμενη από ειδικά αμινοξέα [19] τα οποία όταν μεταλλαχθούν, προστατεύουν τα πειραματόζωα από τη δημιουργία αθηροσκλήρωσης [19, 20]. Η απολιποπρωτεΐνη B-48, που φαίνεται να είναι τόσο αθηρογόνος όσο και η απολιποπρωτεΐνη B-100 σε ποντίκια [21], που επίσης προσδένεται ισχυρά σε πρωτεογλυκάνες [22]. Με την πρόσδεση στις πρωτεογλυκάνες αρχίζουν να επιδρούν λιπολυτικά και λυσοσωμικά ένζυμα της εξωκυττάριας ύλης. Συγκεκριμένα η λιποπρωτεϊνική λιπάση ενισχύει την προσκόλληση των LDL *in vitro* [23], και αυτή η δράση είναι ανεξάρτητη από την ενζυμική δραστηριότητα [24]. Από τη στιγμή που κατακρατηθεί στο αρτηριακό τοίχωμα η LDL μπορεί να σχηματίσει μικροσυσσωματώματα [25, 26], ίσως μέσω της δράσης της εκκρινόμενης σφιγγομυελινάσης [27], ενός ενζύμου το οποίο επίσης παράγει κηραμίδια τα οποία προάγουν την απόπτωση και την μιτογένεση [28, 29], καθώς επίσης των λυσοσωμικών ενζύμων, όπως η καθεψίνη D και η όξινη λυσοσωμική λιπάση (lysosomal acid lipase, LAL) [30]. Το κυριότερο χαρακτηριστικό είναι ότι η συσσωρευμένη LDL προσλαμβάνεται ισχυρά από τα μακροφάγα και τα λεία μυϊκά κύτταρα [31] σχηματίζοντας αφρώδη κύτταρα [32].

1.3 Θεωρία της Οξειδωτικής Τροποποίησης

Η οξειδωτική τροποποίηση εστιάζει στην αντίληψη ότι η LDL στη φυσική της μορφή δεν είναι αθηρογόνος, ενώ η χημικώς τροποποιημένη LDL φαγοκυτώνεται εύκολα από τα μακροφάγα μέσω εκκαθαριστών υποδοχέων [33]. Πλέον είναι ξεκάθαρο ότι τα κύτταρα *in vitro* καθιστούν την LDL προσδεδεμένο μόριο στον εκκαθαριστή υποδοχέα μέσω της οξειδωσης των λιπιδίων της LDL που έχει ως αποτέλεσμα την τροποποίηση της

απολιποπρωτεΐνης B-100 [34]. Αυτές οι παρατηρήσεις θεωρούνται η βάση για τη θεωρία της οξειδωτικής τροποποίησης στην οποία η LDL διεισδύει στον υποενδοθηλιακό χώρο των αρτηριακών σημείων και καθίσταται ευπρόσβλητη σε αλλοιώσεις. Κατά τη διάρκεια αυτής της διαδικασίας, τα λιποειδή της LDL οξειδώνονται και, ως αποτέλεσμα, οι ομάδες λυσίνης της απολιποπρωτεΐνης B-100 τροποποιούνται έτσι ώστε το καθαρό αρνητικό φορτίο των λιποπρωτεϊνικών σωματιδίων να αυξάνεται [35]. Αυτή η τροποποίηση των απολιποπρωτεϊνών B-100 καθιστά την LDL «στόχο» για την πρόσληψη από τα μακροφάγα μέσω εκκαθαριστών υποδοχέων, δημιουργώντας αφρώδη κύτταρα «φορτωμένα» με εστέρες χοληστερόλης [36]. Η συσσώρευση αφρωδών κυττάρων αποτελεί την εστία της αναπτυσσόμενης αθηροσκληρωτικής βλάβης. Η διαδικασία της οξείδωσης της LDL σχετίζεται με ένα μεγάλο αριθμό άλλων πιθανώς προαθηρογόνων γεγονότων. Για παράδειγμα, κατά τη διάρκεια των αρχικών σταδίων της *in vitro* οξείδωσης της LDL, η τροποποίηση των λιποειδών της LDL μπορεί να συμβεί απουσία οποιασδήποτε αλλαγής στην απολιποπρωτεΐνη B-100. Τέτοια τροποποιημένη LDL έχει οριστεί ως «μηδαμινώς τροποποιημένη LDL (Minimally modified LDL, mmLDL)» και *in vitro* επάγει τη σύνθεση της χημειοτακτικής πρωτεΐνης-1 των μονοκυττάρων (Monocyte chemotactic protein-1, MCP-1) και στα λεία μυϊκά και στα ενδοθηλιακά κύτταρα [37, 38], με αποτέλεσμα την κινητοποίηση των φλεγμονωδών κυττάρων [39]. Αυτό το συγκεκριμένο βήμα φαίνεται να είναι κρίσιμο καθώς τα ποντίκια, που τους λείπει ο υποδοχέας της MCP-1, είναι ανθεκτικά στην αθηροσκλήρωση [40, 41]. Η περισσότερο οξειδωμένη LDL, που έχει οριστεί ως «ox-LDL», είναι χημειοτακτική για τα μονοκύτταρα [42] και τα T λεμφοκύτταρα [43], πιθανά μέσω της λυσοφωσφατιδυλοχολίνης (lyso-phosphatidyl choline, lyso-PC) που δημιουργείται κατά τη διάρκεια της οξείδωσης [34]. Η οξειδωμένη LDL επίσης διεγείρει τον πολλαπλασιασμό των λείων μυϊκών κυττάρων [44] και είναι ανοσογόνος καθώς προάγει την παραγωγή αντισωμάτων [45, 46] και την ανάπτυξη ανοσο-συμπλεγμάτων που επίσης βοηθούν τη φαγοκύτωση της LDL από τα μακροφάγα [47, 48]. Η στρατολόγηση των φλεγμονωδών κυττάρων μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα τη συνεχόμενη οξείδωση της LDL, βάζοντας τις βάσεις για την καταλυτική εξάπλωση των αθηροσκληρωτικών βλαβών και της εξέλιξης του πλήρους φάσματος της αθηροσκλήρωσης [2].

Συνοψίζοντας, οι ανωτέρω θεωρίες αθηροσκλήρωσης προσπαθούν η κάθε μία ξεχωριστά να εξηγήσουν τα πολύπλοκα κυτταρικά γεγονότα της αθηροσκλήρωσης με ένα κοινό θέμα. Η θεωρία απόκρισης στον τραυματισμό εστιάζει στον αγγειακό τραυματισμό ως το εναρκτήριο γεγονός στην αθηροσκλήρωση, με ολόκληρο το φάσμα της ασθένειας να αντιπροσωπεύει μια προσπάθεια να επουλωθεί μια αγγειακή προσβολή που είναι σε εξέλιξη. Σε αντίθεση η θεωρία κατακράτησης χρησιμοποιεί τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ λιποπρωτεϊνών και μήτρας (matrix) ως το κρίσιμο γεγονός στην πρόωμη αθηροσκλήρωση, ενώ η θεωρία οξειδωτικής τροποποίησης έχει ως απαραίτητο στοιχείο την οξείδωση των λιποειδών της LDL. Παρότι η κάθε θεωρία δίνει έμφαση στο δικό της κρίσιμο εναρκτήριο γεγονός, υπάρχουν πολλά κοινά στοιχεία ανάμεσα σε αυτές τις ανταγωνιστικές θεωρίες. Το κυριότερο είναι ότι και στις δύο θεωρίες περιλαμβάνεται σαν σημαντικό στοιχείο της νόσου η φλεγμονή, που είναι γνωστό χαρακτηριστικό της αθηροσκλήρωσης [49]. Η κάθε θεωρία επίσης περιλαμβάνει την LDL ως κεντρικό στοιχείο, που είναι σημαντικό σημείο εφόσον η μείωση της LDL χοληστερόλης είναι ανάμεσα στους πιο αποτελεσματικούς τρόπους για την αντιμετώπιση της αθηροσκλήρωσης [2], καθώς επίσης, την οξείδωση της LDL και το σχηματισμό των αφρωδών κυττάρων. Η ενοποίηση των μηχανισμών που προτείνουν οι τρεις θεωρίες μπορεί να καταστεί δυνατή με την παραδοχή του PAF ως το γενεσιουργό αίτιο και κεντρικό μόριο στην εμφάνιση και εξέλιξη της αθηρωματικής νόσου [50].

1.4 Η Θεωρία αθηροσκλήρωσης με εμπλοκή του Παράγοντα Ενεργοποίησης Αιμοπεταλίων (PAF)

Ο PAF είναι ο δραστηκότερος μέχρι σήμερα γνωστός φλεγμονώδης παράγοντας εμφανίζοντας τις παθοφυσιολογικές δράσεις του σε συγκεντρώσεις της τάξης των 10^{-9} M ενώ σε ορισμένα συστήματα μπορεί να φτάσει ακόμα και στο 10^{-12} M [51, 52]. Ο PAF παράγεται από πληθώρα κυττάρων όπως τα αιμοπετάλια, τα μονοκύτταρα, τα μακροφάγα, τα αφρώδη και τα ενδοθηλιακά κύτταρα τόσο σε φυσιολογικές συνθήκες όσο και μετά από διέγερση [53-56], ενώ υποδοχείς του υπάρχουν εκτός από τα παραπάνω και σε κύτταρα της καρδιάς, της σπλήνας, των νεφρών, του εγκεφάλου και του ήπατος [57, 58]. Σαν PAF ονομάστηκε το μόριο 1-O-αλκυλ-2-ακετυλ-sn-

γλυκερο-3-φωσφοχολίνη, του οποίου η δομή διαλευκάνθηκε το 1979 [59]. Οι συνεχείς έρευνες γύρω από το μόριο ανέδειξαν την ύπαρξη και άλλων μορίων με παρόμοια δομή και βιοχημικές δράσεις με τον PAF, την οικογένεια των «PAF-like» μορίων [60]. Τα μόρια αυτά διαφέρουν στο μήκος της αλυσίδας στις θέσεις *sn-1* και *sn-2* ή στο είδος του δεσμού σε αυτές τις θέσεις (εστερικός, αιθερικός ή βινυλαιθερικός) ενώ η προέλευσή τους μπορεί να είναι είτε από μεταβολισμό των φωσφολιπιδίων ή από την μη ενζυμική οξειδωσή τους [61]. Εκτός όμως από τα δομικά ανάλογα του PAF υπάρχει πληθώρα μορίων τα οποία προσδένονται στον επταδιαμεμβρανικό υποδοχέα του PAF χωρίς να έχουν καμία δομική ομοιότητα με τον PAF. Σε αυτή την ομάδα μορίων ανήκουν οι γνωστότεροι αναστολείς του PAF όπως το BN 52021 το WEB 2086, η ρουπαταδίνη αλλά και τα μικροσυστατικά της Μεσογειακής Δίαιτας.

Το πρώτο και κυριότερο στάδιο του προτεινόμενου μηχανισμού είναι η αύξηση των επιπέδων PAF στο αίμα, πράγμα το οποίο μπορεί να συμβεί σε περιπτώσεις παθοφυσιολογικών φλεγμονωδών καταστάσεων, όπως επίσης και κατά τη διάρκεια του οξειδωτικού στρες μέσω της οξειδωσης των LDL και της υπεροξειδωσης των φωσφολιπιδίων των κυτταρικών μεμβρανών. Τα ανωτέρω μπορεί να είναι το αποτέλεσμα: 1) της ανεπάρκειας, ενδογενών ή προερχομένων από την τροφή, αντιοξειδωτικών και 2) της μειωμένης δραστηριότητας της PAF ακετυλο-υδρολάση (PAF-AH). Επιπλέον, είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι η δράση του PAF μπορεί να μειωθεί από την ύπαρξη, ενδογενών ή προερχομένων από την τροφή, ανταγωνιστών του PAF. Η απουσία τέτοιων ανταγωνιστών του PAF μπορεί να τον αφήσει να εκδηλώσει πλήρως και ανεμπόδιστα τη βιολογική του δράση [50]. Τα επίπεδα του PAF στον οργανισμό αυξάνονται σε διάφορες παθοφυσιολογικές καταστάσεις όπως η φλεγμονή [62], η αλλεργία [63], το άσθμα [64], ο διαβήτης [65, 66] και το κάπνισμα [67], που ταυτόχρονα αποτελούν παράγοντες κινδύνου για την εξέλιξη της αθηρωματικής νόσου.

Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι τα PAF-like είναι σε θέση να προκαλέσουν περαιτέρω τη βιοσύνθεση του PAF [68]. Ο PAF και τα PAF-like, προκαλούν από κοινού την ελευθέρωση δραστικών μορφών οξυγόνου [69-73], που οδηγούν στην οξειδωση των LDL [74], οι οποίες με τη σειρά τους

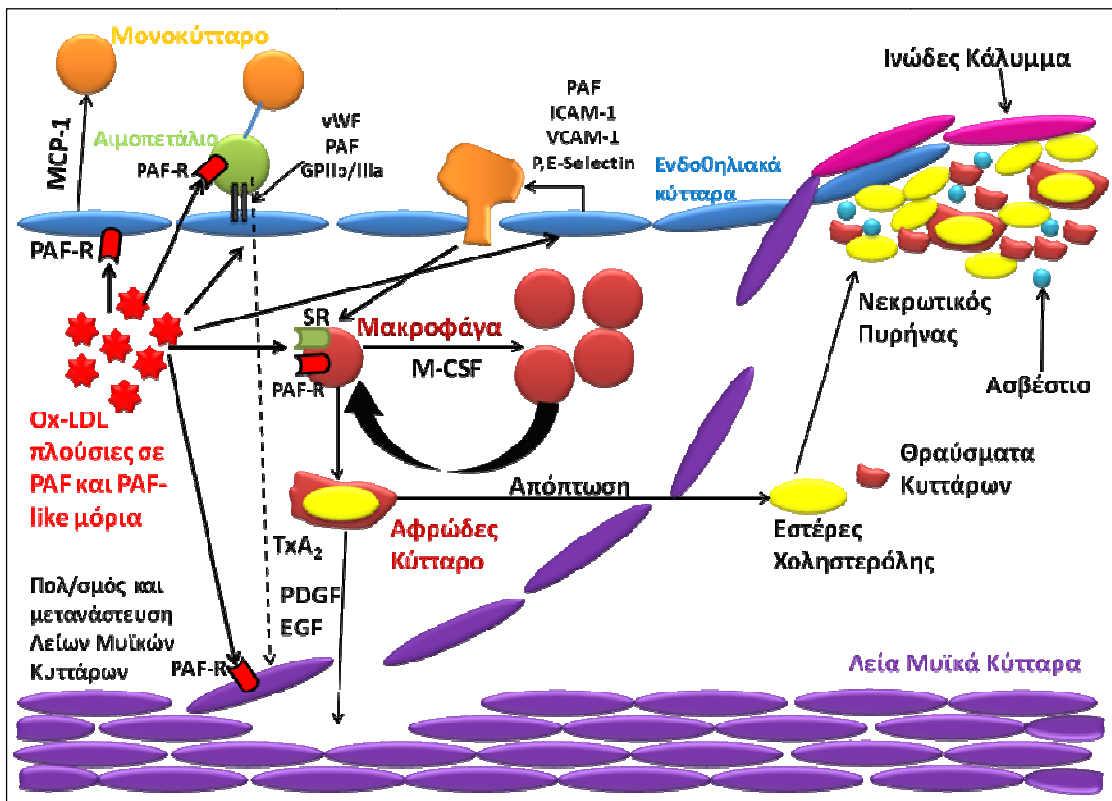
παράγουν PAF και PAF-like μόρια δημιουργώντας έτσι ένα ατέρμονα κύκλο ανατροφοδότησης της διαδικασίας [75-78].

Προστατευτική δράση σε αυτό το φαινόμενο παρέχει το βασικό καταβολικό ένζυμο του PAF η PAF-AH [79] η οποία βρίσκεται τόσο στις LDL όσο και στις, Υψηλής Πυκνότητας Λιποπρωτεΐνες (High Density Lipoproteins, HDL), η ισομορφή των οποίων στο αίμα αναφέρεται συνήθως με το όνομα Λιποπρωτεϊνική Φωσφολιπάση A2 (Lipoprotein-associated Phospholipase A2, LpPLA₂). Η PAF-AH εκτός από την υδρόλυση της ακετυλομάδας στην *sn*-2 θέση του μορίου του PAF έχει την ικανότητα να υδρολύει και τα οξειδωμένα PAF-like λιποειδή με έως 8 άτομα άνθρακα στην ανθρακική αλυσίδα της *sn*-2 θέσης, ανεξάρτητα από την αλυσίδα της *sn*-1 θέσης [80]. Έτσι η PAF-AH μπορεί να καταστείλει τη φλεγμονή και την ενεργοποίηση των λευκοκυττάρων που προκαλεί η οξειδωτικά τροποποιημένη ox-LDL [81]. Η ενζυμική δράση της PAF-AH μειώνεται σταδιακά όσο οξειδώνεται η LDL χάνοντας έτσι την προστατευτική της δράση έναντι του PAF και των ανάλογών του [75, 82]. Επιπλέον η δράση της PAF-AH στο πλάσμα εθελοντών αναστέλλεται από τις ελεύθερες ρίζες οξυγόνου [83]. Η χορήγηση ειδικών ανταγωνιστών του υποδοχέα του PAF, όπως το WEB 2086 και το CV-6209, προκαλεί πλήρη αναστολή της παραγωγής O²⁻ που επάγεται από τον PAF [72, 84], ενώ έρευνες δείχνουν ότι η δισμουτάση του υπεροξειδίου (Superoxide dismutase, SOD), που αποτελεί ένα ενδογενές αντιοξειδωτικό, μειώνει τις βιολογικές δράσεις του PAF [85].

Εκτός από την υδρολυτική της ικανότητα η PAF-AH εμφανίζει και δράσεις τρανσακετυλλάσης, μεταφέροντας την ακετυλομάδα της από το μόριο του PAF σε μόρια λυσο-φωσφατιδύλο χολίνης [86], ενώ σε πιο πρόσφατη έρευνα η δραστηριότητά της στη μαστική αρτηρία οδήγησε τους ερευνητές να διατυπώσουν τη θεωρία ότι η PAF-AH σε φυσιολογικά αγγεία δεν επιτρέπει την αύξηση των επιπέδων του PAF, ενώ στα αθηρωματικά αγγεία παρατηρείται μικτή δράση του ενζύμου (λειτουργεί τόσο ως υδρολάση όσο και ως τρανσακετυλλάση) που οδηγεί σε αύξηση των επιπέδων του PAF [87].

Οι ox-LDL οι οποίες είναι πλούσιες σε PAF και PAF-like μόρια (Εικόνα 1) ενεργοποιούν τα ενδοθηλιακά κύτταρα μέσω του PAF-R αυξάνοντας τη βιοσύνθεση κυτταροκινών και συγκολλητικών παραγόντων με ταυτόχρονη αύξηση της διακυτταρικής απόστασης επιφέροντας αύξηση της

διαπερατότητας του ενδοθηλίου [88]. Οι συγκολλητικοί παράγοντες δεσμεύουν αιμοπετάλια και μονοκύτταρα τα οποία σε φυσιολογικές συνθήκες κυλούν πάνω στον αρτηριακό αυλό. Στη συνέχεια τα μονοκύτταρα εισέρχονται στον υποενδοθηλιακό χώρο όπου διαφοροποιούνται σε μακροφάγα. Τα μακροφάγα προσλαμβάνουν ανεξέλεγκτα τις ox-LDL σχηματίζοντας τα αφρώδη κύτταρα τα οποία τελικά οδηγούνται σε απόπτωση απελευθερώνοντας το περιεχόμενό τους σχηματίζοντας το νεκρωτικό πυρήνα. Ταυτόχρονα η έκκριση κυτταροκινών και αυξητικών παραγόντων από τα αφρώδη και τα αιμοπετάλια οδηγεί στο πολλαπλασιασμό και τη μετανάστευση των λείων μυϊκών κυττάρων προς το ενδοθήλιο σχηματίζοντας το ινώδες κάλυμμα.



Εικόνα 1: Συνοπτική σχηματική αναπαράσταση του μηχανισμού αθηρωμάτωσης με εμπλοκή του PAF

1.5 Δράσεις του PAF στα κύτταρα που εμπλέκονται στην αθηροσκλήρωση

Ο PAF έχει την ικανότητα να ενεργοποιεί και να συσσωρεύει τα αιμοπετάλια πολλών διαφορετικών ειδών [89, 90], επιβεβαιώνοντας τη θεωρία ότι ο PAF είναι ένα αρχέγονο μόριο που έχει διατηρηθεί στους οργανισμούς μέχρι σήμερα [91]. Η συσσώρευση των αιμοπεταλίων γίνεται μέσω σηματοδότησης

από το εσωτερικό προς το εξωτερικό του κυττάρου, από την ιντεγκρίνη αIIbβ3, την οποία ακολουθεί σύνδεση του ινωδογόνου (Εικόνα 1). Η δέσμευση της ιντεγκρίνης αIIbβ3 μπορεί, στη συνέχεια, να σηματοδοτήσει από το εξωτερικό προς το εσωτερικό του κυττάρου με αποτέλεσμα πρόσθετες ενισχυτικές δράσεις [92]. Μετά την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων απελευθερώνεται αραχιδονικό οξύ από τα μεμβρανικά φωσφολιποειδή το οποίο οδηγεί στη σύνθεση εικοσανοειδών [93], με την ταυτόχρονη αποκοκκίωση των αιμοπεταλίων και την απελευθέρωση των περιεχομένων σε αυτά κυτταροκινών [94], ενισχύοντας περαιτέρω το φαινόμενο της φλεγμονής και της αθηροσκλήρωσης. Στα αιμοπετάλια περιέχονται επίσης αρκετά μόρια m-RNA τα οποία με το κατάλληλο σήμα μεταφράζονται κάτω από αυστηρά ρυθμισμένες συνθήκες [95, 96]. Με αυτό το μηχανισμό ρυθμίζεται η παραγωγή της Ιντερλευκίνης-1β (IL-1β) η οποία απελευθερώνεται από τα διεγερμένα αιμοπετάλια και προκαλεί την προσκόλληση των πολυμορφοπύρηνων λευκοκυττάρων στα ενδοθηλιακά κύτταρα, αναδεικνύοντας τη σύνδεση μεταξύ φλεγμονής και αθηροσκλήρωσης [97], με διαμεσολαβητή τον PAF [98].

Συγχρόνως, τα ουδετερόφιλα ενεργοποιούνται από τον PAF μέσω του υποδοχέα του. Η ενεργοποίηση αυτή προκαλεί σηματοδότηση, από το εσωτερικό προς το εξωτερικό του κυττάρου, μέσω των β2 (CD11/CD18) ιντεγκρινών, με συνακόλουθα την προσκόλληση και τη συσσώρευσή τους, που ενισχύουν τη φλεγμονώδη απόκριση, την πόλωση, τη μετανάστευση, την αποκοκκίωση, και την παραγωγή ριζών οξυγόνου [99]. Ο PAF ενεργοποιεί την αυξημένη ελευθέρωση παραγόντων από τα κοκκία, όπως την ελαστάση, η οποία εμπλέκεται στον φλεγμονώδη τραυματισμό των ιστών και έχει επίσης την ικανότητα να προκαλέσει πήξη αίματος όταν ελευθερώνεται τοπικά [98, 100]. Αποκρίσεις της ενεργοποίησης των ουδετερόφιλων που για πολύ καιρό δεν είχαν αναγνωριστεί, αναγνωρίζονται στις μέρες μας, ενώ μερικές από αυτές προκαλούνται από τον PAF. Αυτό είναι σύμφωνο με το γεγονός ότι ο PAF ενεργοποιεί τη μετάφραση, η οποία εξαρτάται από τη σηματοδότηση ενός υποσυνόλου mRNAs σε ανθρώπινα ουδετερόφιλα [99].

Όπως έχει ήδη αναφερθεί τα μονοκύτταρα περιέχουν στη μεμβράνη τους τον υποδοχέα του PAF, δηλαδή μπορούν να ενεργοποιηθούν από αυτόν [99]. Αυτή η ενεργοποίηση οδηγεί στην έκφραση του γλυκοπρωτεϊνικού προσδέτη

της P-σελεκτίνης (P-selectin glycoprotein ligand-1, PSGL-1) [98]. Τα ανθρώπινα μονοκύτταρα προσκολλώνται ταχύτατα στα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια ή ενδοθηλιακά κύτταρα τα οποία έχουν εμφανίσει στη μεμβράνη τους τη P-σελεκτίνη με αποτέλεσμα τη σύνθεση χημοκινών, κυτταροκινών και ιστικών παραγόντων. Συγκεκριμένα ο PAF κινητοποιεί τον πυρηνικό παράγοντα κB (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells, NF-κB) στον πυρήνα των μονοκυττάρων που είναι προσδεδεμένα στη P-σελεκτίνη, αυξάνοντας δραματικά τη βιοσύνθεση της MCP-1, της Ιντερλευκίνης-8 (Interleukin-8, IL-8, του παράγοντα νέκρωσης όγκων-α (Tumor Necrosis Factor, TNF-α), και άλλων προϊόντων γονιδίων που σχετίζονται με τη φλεγμονή [101].

Η σηματοδότηση στον πυρήνα των κυττάρων αυτών και οι αλλαγές στην έκφραση των γονιδίων είναι κυρίαρχα φαινόμενα στα μονοκύτταρα, τα οποία είναι σταθερά προσκολλημένα με ενεργοποιημένα αιμοπετάλια [102]. Αυτή η αλληλεπίδραση κυττάρου-κυττάρου μεταξύ των προσκολλημένων μονοκυττάρων στα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια και των ενεργοποιημένων αιμοπεταλίων είναι πολύ συχνή σε θρομβωτικά φαινόμενα και ποικίλα αγγειακά σύνδρομα [103].

Τα ανθρώπινα ενδοθηλιακά κύτταρα της αορτικής κοιλότητας, επίσης, ενεργοποιούνται από τον PAF μέσω δέσμευσης του στον ειδικό υποδοχέα του, οδηγώντας σε αυξημένη διαπερατότητα του ενδοθηλίου [104] (Εικόνα 1), φαινόμενο που αποτελεί ένα κρίσιμο γεγονός για την έναρξη της αθηροσκλήρωσης σύμφωνα με τη θεωρία της απόκρισης σε τραυματισμό. Τα ενεργοποιημένα ενδοθηλιακά κύτταρα βιοσυνθέτουν γρήγορα και εκθέτουν τον PAF στην επιφάνεια των πλασματικών τους μεμβρανών. Στη συνέχεια, ο PAF διαδραματίζει έναν ακόμα σημαντικό ρόλο, για την έναρξη της αθηροσκλήρωσης, με τη δράση του ως συνδετοκρινές σήμα για την ενεργοποίηση και την προσκόλληση στο ενδοθήλιο, των ουδετερόφιλων και των μονοκυττάρων [100, 105]. Τα ανωτέρω λαμβάνουν χώρα μέσω βιοσύνθεσης και τοπικής έκφρασης μηνυματοφόρων μορίων για τα λευκοκύτταρα, όπως η P-σελεκτίνη, η οποία ταχέως μεταφέρεται, από τα ενδοκυτταρικά αποθηκευτικά κοκκία της στην επιφάνεια των ενδοθηλιακών κυττάρων που έχουν υποστεί διατάραξη [98]. Σε αυτή τη δράση, ο PAF ενεργεί συνεργιστικά με την P-σελεκτίνη [51].

Οι ανωτέρω βιοχημικές και κυτταρικές διεργασίες οδηγούν στην ελευθέρωση πολλών άλλων λιποειδικών μεσολαβητών, κυτταροκινών και ενζύμων, καθώς επίσης και στην έκφραση μορίων προσκόλλησης, όπως οι σελεκτίνες και οι ιντεγκρίνες, μόρια τα οποία συμβάλλουν στην ανάπτυξη της αθηροσκλήρωσης [106]. Σε ένα τέτοιο περιβάλλον, τα ανθρώπινα ενδοθηλιακά κύτταρα της αορτικής κοιλότητας είναι ήδη ενεργοποιημένα, όπως περιγράφηκε προηγουμένως. Η διαπερατότητα του ενδοθηλίου έχει ήδη αυξηθεί, με αποτέλεσμα να προκύψει ένα δυσλειτουργικό ενδοθήλιο [104]. Η οικογένεια των μορίων των σελεκτινών και τα μόρια που προσδέονται σε αυτές, μεσολαβούν στην αρχική αλληλεπίδραση των αιμοπεταλίων και των λευκοκυττάρων με το ενδοθήλιο. Αυτό επιτρέπει στα λευκοκύτταρα και τα αιμοπετάλια να εκτελούν μια κυλιόμενη κίνηση κατά μήκος του αγγειακού ενδοθηλίου. Στη συνέχεια, τα μόρια των ιντεγκρινών ενεργοποιούνται, μέσω της δέσμευσης του PAF από τον ειδικό υποδοχέα του, και σταματούν την κυλιόμενη κίνηση των λευκοκυττάρων και των αιμοπεταλίων, επιφέροντας καθήλωση των κυττάρων αυτών στο ενδοθήλιο. Η μοριακή βάση για τη προσέλκυση των λευκοκυττάρων στο αγγειακό τοίχωμα έχει περιγραφεί παρουσιάζοντας έναν ακόμα σημαντικό ρόλο που παίζει ο PAF στην ανάπτυξη αυτή τη φορά της αθηροσκλήρωσης [107]. Τα ενεργοποιημένα ενδοθηλιακά κύτταρα εκφράζουν την P-σελεκτίνη στην επιφάνειά τους, οδηγώντας σε μια χαλαρή σύνδεση των λευκοκυττάρων με το ενδοθήλιο μέσω (PSGL-1). Τα λευκοκύτταρα ενεργοποιούνται μόνο όταν ο PAF, που έχει συντεθεί από τα ενδοθηλιακά κύτταρα και βρίσκεται στην επιφάνεια της πλασματικής τους μεμβράνης, συνδεθεί στον υποδοχέα του PAF που φέρουν τα λευκοκύτταρα, πράγμα που οδηγεί στην αλλαγή του σχήματος των κυττάρων αυτών, σε αύξηση της συγκέντρωσης του ασβεστίου και σε θετική ρύθμιση των β_2 ιντεγκρινών, που οδηγούν σε μια σταθερή προσκόλληση [107]. Μετά από την ισχυρή σύνδεση, τα λευκοκύτταρα μεταναστεύουν μέσα από του κυτταρικούς συνδέσμους των ενδοθηλιακών κυττάρων στον υποενδοθηλιακό χώρο [108], με αποτέλεσμα την ακανόνιστη συσσώρευση των μονοκυττάρων, τα οποία διαφοροποιούνται προς μακροφάγα. Η αυξημένη διαπερατότητα του δυσλειτουργικού ενδοθηλίου [104] επιτρέπει, πέρα από τα κύτταρα του αίματος και σε μεγάλα σωματίδια, όπως είναι οι O_x-LDLs, να μεταναστεύουν στον υποενδοθηλιακό χώρο μέσω

των συνδέσεων των ενδοθηλιακών κυττάρων. Οι Ox-LDLs προσλαμβάνονται χωρίς έλεγχο από τους εκκαθαριστές υποδοχείς των μακροφάγων, πράγμα που οδηγεί στο σχηματισμό των χαρακτηριστικών αφρωδών κυττάρων [109]. Η φαγοκυτταρική ενεργοποίηση των μακροφάγων και των παραγόμενων αφρωδών κυττάρων έχει αναφερθεί ως σημαντικό χαρακτηριστικό γνώρισμα στην πρόοδο της αρτηριοσκληρωτικής πλάκας [110]. Αυτό είναι σύμφωνο με το γεγονός ότι τα ανθρώπινα μακροφάγα και τα παραγόμενα αφρώδη κύτταρα βιοσυνθέτουν τον μεσολαβητή της φλεγμονής, PAF, κατά την ενεργοποίηση της φαγοκυτταρικής δραστηριότητάς τους [55]. Τέτοια βιοσύνθεση λαμβάνει χώρα μέσω της οδού ανασχηματισμού (remodeling), όπου ο λυσο-PAF ακετυλιώνεται άμεσα προς PAF σε μια αντίδραση, που καταλύεται από την ακετυλο-CoA ακετυλοτρανσφεράση (PAF-AT). Η δραστηριότητα της PAF-AT είναι αυξημένη, συγκρινόμενη με την ενζυμική δραστηριότητα που ανιχνεύεται σε άλλα κύτταρα, όπως τα μονοκύτταρα και ουδετερόφιλα [55, 111], λόγω της μόνιμης ενεργοποίησης του ενζύμου στα ανθρώπινα μακροφάγα και αφρώδη κύτταρα.

Καθώς τα αφρώδη κύτταρα συσσωρεύονται, το πάχος του έσω χιτώνα αυξάνεται, ενώ τα λεία μυϊκά κύτταρα (SMC) πολλαπλασιάζονται και μεταναστεύουν προκαλώντας αλλοιώσεις στη δομή του υποενδοθηλίου [112]. Έχει αποδειχθεί ότι ο PAF ενεργοποιεί τη μεταγραφή του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (Epidermal growth factor, EGF) στα μονοκύτταρα, μέσω ενίσχυσης της δραστηριότητας του NF-κB, και επομένως ο PAF εμπλέκεται άμεσα στον πολλαπλασιασμό των SMC [113]. Στη συνέχεια, το αρχικό σήμα από τον PAF ενισχύεται, δεδομένου ότι τα μακροφάγα και αφρώδη κύτταρα βιοσυνθέτουν PAF [55]. Η συσσώρευση των λευκοκυττάρων και των αφρωδών κυττάρων μέσα στον έσω χιτώνα, οδηγεί στο σχηματισμό των χαρακτηριστικών «λιπαρών ραβδώσεων», που αποτελεί αρχικό στάδιο της αθηροσκλήρωσης ορατό με γυμνό μάτι [114]. Η φαγοκυτταρική ενεργοποίηση των αφρωδών κυττάρων οδηγεί στην παραγωγή του PAF στις περιοχές των «λιπαρών ραβδώσεων» και των προχωρημένων αθηροσκληρωτικών βλαβών [55, 115]. Επιπλέον, ο πολλαπλασιασμός των SMC αυξάνεται σημαντικά από τον PAF [113], την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων και των λευκοκυττάρων, καθώς επίσης και από τις Ox-LDLs που είναι πλούσιες σε PAF-ανάλογα. Αυτή η επίδραση αναστέλλεται από τους αναστολείς/αγωνιστές του PAF ή

εξαλείφεται από τη δράση της PAF-AH [116, 117]. Αυτά τα στοιχεία, φανερώνουν ότι ο PAF έχει έναν σημαντικό ρόλο για την πρόοδο αυτής της ασθένειας.

Οι παραπάνω μοριακοί μηχανισμοί, έχουν ως αποτέλεσμα μορφολογικές αλλαγές. Ο πολλαπλασιασμός και η μετανάστευση των SMC οδηγεί στο σχηματισμό του ινώδους καλύμματος στην άκρη των λιπαρών ραβδώσεων. Τα SMC μεταναστεύουν μέσα στις λιπαρές ραβδώσεις και συγχρόνως τα μονοκύτταρα εξακολουθούν να προσκολλώνται στο ενδοθήλιο και μεταναστεύουν στον υποενδοθηλιακό χώρο με αποτέλεσμα να αυξάνεται σε μέγεθος η αθηροσκληρωτική βλάβη. Τα SMC συνεχίζουν να πολλαπλασιάζονται και σχηματίζουν ένα κάλυμμα που καλύπτει τη βλάβη [114]. Μέσα σε αυτή την εντοπισμένη βλάβη, η συνεχής φλεγμονώδης απόκριση μπορεί να οδηγήσει στην κυτταρική νέκρωση και την περαιτέρω προσέλκυση των μονοκυττάρων και των λεμφοκυττάρων με μια συνακόλουθη απελευθέρωση των κυτταροκινών, αυξητικών παραγόντων, και πρωτεολυτικών ενζύμων. Οι διεργασίες αυτές αποτελούν το έναυσμα για εστιακή νέκρωση μέσα στη βλάβη, που μπορεί να προκαλέσει την αυτοκαταλυτική επέκταση της βλάβης. Καθώς η αθηρωματική πλάκα διευρύνεται, η αρτηρία δεν μπορεί πλέον να αντισταθμίσει τις μορφολογικές αλλαγές καθώς η βλάβη αρχίζει να εισβάλει στον αρτηριακό αυλό παρεμποδίζοντας τη ροή του αίματος [118]. Ο PAF προκαλεί την έκκριση ελαστάσης [119], η οποία αποικοδομεί τα συστατικά της εξωκυττάριας ύλης του έσω και μέσω χιτώνα, πράγμα το οποίο αποτελεί ένα σημαντικό χαρακτηριστικό γνώρισμα της αθηροσκλήρωσης [118]. Τα αφρώδη κύτταρα στον πυρήνα της βλάβης νεκρώνονται, σχηματίζοντας έναν νεκρωτικό πυρήνα, ο οποίος είναι πλούσιος σε κρυστάλλους χοληστερόλης [120], ενεργοποιημένα λεμφοκύτταρα και αποθέσεις ασβεστίου, δημιουργώντας την ινώδη πλάκα. Στις «ινώδεις πλάκες» προχωρημένων αρτηριοσκληρυντικών βλαβών, το ενδοθήλιο μπορεί να σχίσει, ιδιαίτερα στα λεπτά άκρα του ινώδους καλύμματος, με συνέπεια την αιμορραγία, τη θρόμβωση και τελικά την απόφραξη του αρτηριακού αυλού. Η ισχαιμία που προκαλείται είναι το πρώτο συμβάν που οδηγεί στην κλινική διαπίστωση μιας διαδικασίας που έχει εξελιχθεί κατά τη διάρκεια δεκαετιών.

2. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: Αναστολείς του PAF

2.1 Γενικά στοιχεία για αναστολείς/αγωνιστές του PAF

Μια μεγάλη γκάμα αναλόγων του PAF έχει συντεθεί ή απομονωθεί από φυσικές πηγές. Η σύνθεσή τους βοήθησε στην κατανόηση των μηχανισμών σύνδεσης του PAF στον υποδοχέα του (PAF-R), την ακόλουθη μετάδοση σήματος από τον PAF-R αλλά και την εμπλοκή του PAF σε διάφορες παθοφυσιολογικές καταστάσεις. Επιπλέον κατέστη δυνατό να προσδιοριστεί : α) η απαραίτητη δομή των μορίων για να εμφανίζουν ιδιότητες αγωνιστή του PAF, β) για το διαχωρισμό των βιολογικών δράσεων, όπως τη δράση τους σαν αντι-υπερτασικά, είτε αναστέλλοντας τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων ή την αγγειοσυστολή και γ) να βρεθούν τα δομικά χαρακτηριστικά του μορίου, τα οποία το καθιστούν αγωνιστή ή ανταγωνιστή του PAF. Οι φαρμακολογικές ιδιότητες των αναστολέων του PAF συνήθως προσδιορίζονται *in vitro* σε κυτταρικά συστήματα (συσσώρευση αιμοπεταλίων, αποκοκκίωση ουδετερόφιλων, χημειοταξία) και σε πειραματόζωα (PAF προκαλούμενο shock, αγγειοσυστολή και υπόταση). Παρότι η προκαλούμενη από τον PAF συσσώρευση των αιμοπεταλίων ανθρώπου ή κουνελιού είναι μια μέθοδος που αναπτύχθηκε στις αρχές της δεκαετίας του '60 η εύκολη μεθοδολογία της την έχει καθιερώσει σαν την κύρια εργαστηριακή μέθοδο αξιολόγησης πιθανών αναστολέων του PAF. Κλινικές μελέτες τέλος έχουν πραγματοποιηθεί μόνο με τους αναστολείς που εμφανίζουν ισχυρή αντι-PAF δράση και έχουν κριθεί ασφαλείς [52, 121-123].

Οι αναστολείς του PAF μπορούν να χωριστούν αρχικά σε 2 κατηγορίες, τους ειδικούς και τους μη ειδικούς αναστολείς. Ο διαχωρισμός των δύο ομάδων γίνεται με βάση την ικανότητα των μορίων να απομακρύνουν από τον PAF-R ή να ανταγωνίζονται τη σύνδεση σε αυτόν επισημασμένου [H_3]PAF. Οι μη ειδικοί αναστολείς είναι μόρια που δρουν με τελείως διαφορετικό μεταξύ τους τρόπο, αναστέλλοντας, σε διαφορετικά σημεία ο καθένας, το μηχανισμό μετάδοσης σήματος του PAF κυρίως μέσω του PAF-R. Στην κατηγορία συμπεριλαμβάνονται παρεμποδιστές των καναλιών ασβεστίου (verapamil), ενδοκυτταρικούς χηλικούς υποκαταστάτες του ασβεστίου (BAPTA/AM), αναστολείς των G-πρωτεϊνών (τοξίνη της χολέρας), αναστολείς των PKC

(σταυροσπορίνη), αναστολείς της τυροσινικής κινάσης (γενιστεΐνη) και αναστολείς των φωσφολιπασών, κυκλοξυγενασών και λιποξυγενασών. Η ευρεία αυτή δράση τους, μειώνει την ειδικότητά τους και συνεπώς την πιθανή χρήση τους σαν φαρμακευτικά σκευάσματα ή πρόσθετα τροφίμων, καθώς μπορεί να επιφέρουν απρόβλεπτες παρενέργειες στον οργανισμό [57, 58, 124, 125].

2.1. Ανταγωνιστές-δομικά ανάλογα του PAF

Τα δομικά ανάλογα του PAF (ειδικά τα συνθετικά) μπορεί να διαθέτουν ένα θετικό φορτίο είτε απεντοπισμένο ή σαν τετρα-υποκατεστημένη δραστική ομάδα ή σαν μια ετεροκυκλική ομάδα. Οι ανταγωνιστές που είναι δομικά ανάλογα του PAF και μπορούν να χωριστούν σε α) ανοιχτής αλύσου ανάλογα και β) κυκλικά ανάλογα του PAF.

2.1.1. Ανοιχτής αλύσου δομικά ανάλογα του PAF

Τα πιο δραστικά ανάλογα ανοιχτής αλύσου διαθέτουν σκελετό γλυκερόλης και είτε ένα θετικά φορτισμένο άτομο αζώτου ή ένα τετρα-υποκατεστημένο αλκύλιο. Στην sn-1 θέση είναι υποκατεστημένοι είτε με αιθερικό, εστερικό ή καρβαμιδικό δεσμό με κορεσμένο ή ακόρεστο λιπαρό οξύ 16 ή 18 ατόμων άνθρακα. Στην sn-2 θέση το οξικό οξύ του PAF μπορεί να έχει αντικατασταθεί με υδροξύλιο, μεθυλ- και αιθυλαιθέρα, καρβοξυλικό ή αμιδικό υποκαταστάτη. Η φωσφορική ομάδα διατηρείται σε κάποιους ανταγωνιστές, ενώ σε άλλους αντικαθίσταται από αλκύνια ή εστέρες.

Ο πρώτος φωσφολιποειδικός αναστολέας που αναφέρθηκε ήταν το CV 3988, μια ένωση που συντέθηκε για την αξιολόγηση της αντιμικροβιακής και κυτοτοξικής της δράσης. Οι τιμές K_i του CV 3988 έναντι της ειδικής σύνδεσης του $[H^3]PAF$ στον υποδοχέα του σε αιμοπετάλια ανθρώπου, κουνελιού και χοίρου είναι $1,6 \times 10^{-7}$, $1,2 \times 10^{-7}$, $1,8 \times 10^{-7}$ αντίστοιχα [126]. Σε πολύ υψηλότερες δόσεις εμφάνισε ανταγωνιστική δράση έναντι του αραχιδονικού οξέως, του ADP και του κολλαγόνου [127, 128]. Ο CV 3988 αναστέλλει δόσοεξαρτώμενα την υπόταση σε αρουραίους και το θάνατο σε κουνέλια που προκαλείται όταν δοθεί στα πειραματόζωα PAF [129, 130]. Η ενδοφλέβια χορήγηση CV 3988 σε εθελοντές σε δόσεις των 750-2000 $\mu g/Kg$ προκάλεσε απευαισθητοποίηση των αιμοπεταλίων τους έναντι στη δράση του PAF [131].

Όταν ο αναστολέας δόθηκε σε χοίρους, στους οποίους πραγματοποιήθηκε μεταμόσχευση καρδιάς, βελτίωσε τη λειτουργία τόσο της καρδιάς όσο και των πνευμόνων, ενώ ανέδειξε την εμπλοκή του PAF στον τραυματισμό στην κατάσταση ισχαιμίας-επαναιμάτωσης [132].

Η αντικατάσταση της φωσφορικής ομάδας του CV 3988 από COCH₃ και τροποποίηση της πλευρικής αιθερικής του ομάδας οδήγησε στη σύνθεση των ισχυρών ανταγωνιστών Ro 18-7953, Ro 19-1400, Ro 18-8736, οι οποίοι είχαν τιμές IC₅₀ σε αιμοπετάλια ανθρώπου 0,5, 0,4 και 0,07 μM αντίστοιχα [133]. Το μόριο CV 6209, το οποίο είναι ανάλογο του CV 3988 εμφανίζει 80 φορές μεγαλύτερη δραστικότητα, αναστέλλει ή και υποστρέφει την υπόταση που προκαλεί ο PAF σε αρουραίους, ενώ απέτρεψε το θάνατο των ποντικιών, από θανατηφόρα δόση PAF, όταν σε αυτά δόθηκαν μόλις 9μg CV 6209/Kg βάρους [134]. Τόσο το CV 3988 όσο CV 6209 απέτρεψαν τη ρήξη στομάχου δοσοεξαρτώμενα σε αρουραίους, υποδεικνύοντας τη συμμετοχή του PAF στο φαινόμενο [135].

Εκτός όμως από τους συνθετικούς αναστολείς του PAF που προαναφέρθηκαν υπάρχουν και αναστολείς που απομονώθηκαν από φυτικές πηγές και ήταν δομικά ανάλογα του PAF με δομή παρόμοια με αυτή του CV 6209. Οι αναστολείς αυτοί βρέθηκαν και χαρακτηρίστηκαν πλήρως με προκαλούμενη από τον PAF συσσώρευση των αιμοπεταλίων, χημικούς προσδιορισμούς και φασματομετρία μάζας (MS) στο ελαιόλαδο, το κρασί, τον ελαιοπυρήνα και τα υγρά απόβλητα ελαιουργίας [136-138], ενώ αυτοί που απομονώθηκαν από το φυτό *Kalimeris indica* χαρακτηρίστηκαν περαιτέρω με πυρηνικό μαγνητικό συντονισμό (NMR) [139]. Στους αναστολείς αυτούς η φωσφορική ομάδα στη *sn*-3 θέση της γλυκερόλης είτε έχει αντικατασταθεί ή έχει υποκατασταθεί από γλυκοζυτικό δεσμό με υποκατεστημένους πολυσακχαρίτες, ενώ στη *sn*-2 θέση παραμένει το οξικό οξύ, όπως στο μόριο του PAF. Τα *in vivo* πειράματα σε κουνέλια Νέας Ζηλανδίας έδειξαν ότι το κλάσμα των πολικών λιποειδών ελαιολάδου και ελαιοπυρήνα (τα οποία περιέχουν τους εν λόγω αναστολείς του PAF) είχαν την ικανότητα να αναστέλλουν, στατιστικώς σημαντικά, το σχηματισμό αθηρωματικών πλακών, ενώ ειδικά τα πολικά λιποειδή του ελαιοπυρήνα είχαν τη δυνατότητα και να υποστρέψουν (θεραπεύσουν) τις ήδη σχηματισμένες αθηρωματικές πλάκες [140, 141]. Τέλος φωσφολιποειδείς αναστολείς του PAF ανοιχτής αλύσου βρέθηκαν και στα κυανοφύκη

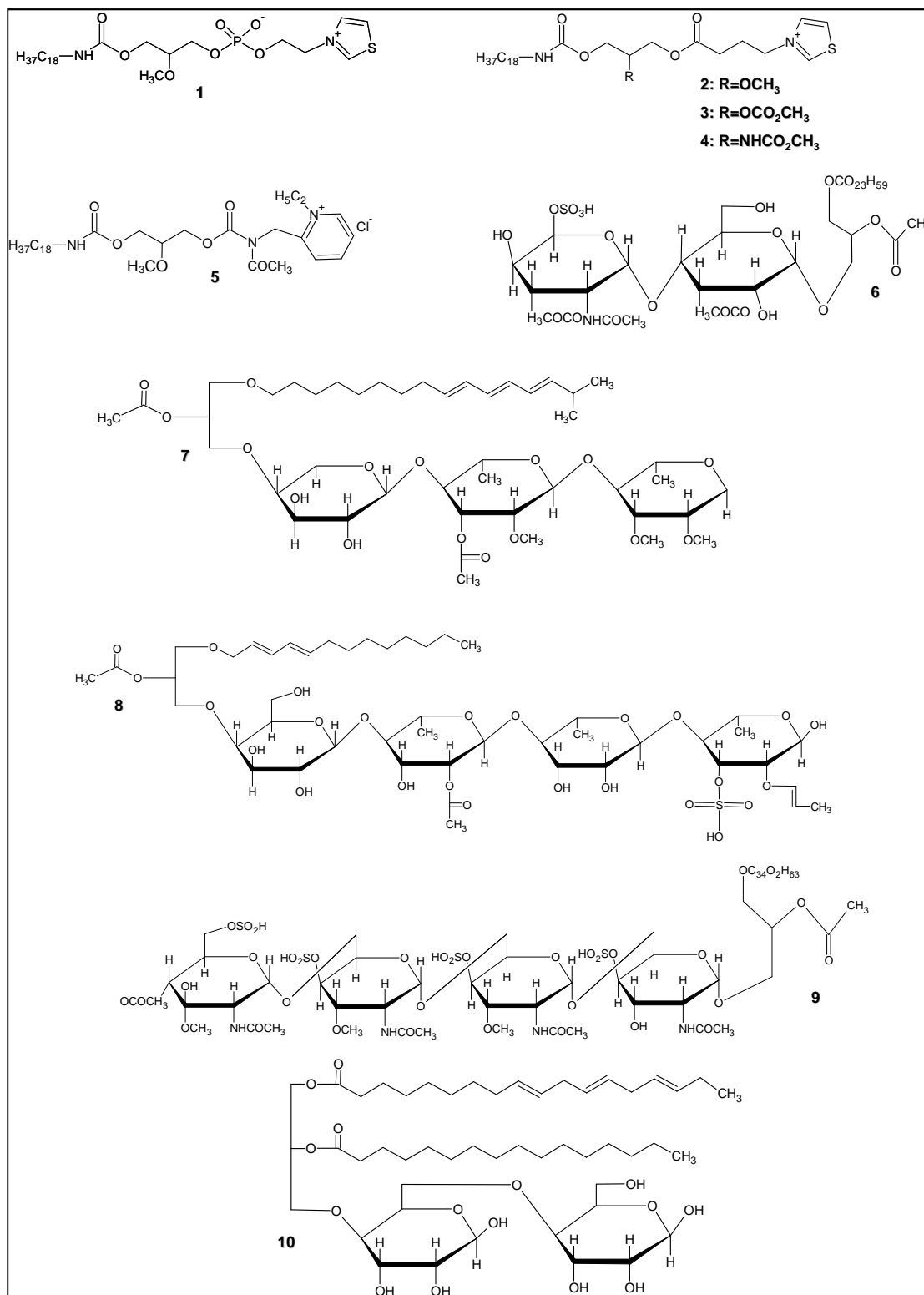
Chroococcidiopsis sp. Ο διαχωρισμός τους με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC), διαχώρισε 3 μόρια με ανασταλτική δράση έναντι του PAF. Η ανάλυσή τους με MS έδειξε ότι το ένα μόριο ήταν γλυκοζυλιωμένο ανάλογο της φωσφορικής ομάδας στην sn-3 της γλυκερόλης, ενώ τα άλλα δύο ήταν γλυκοζίτες σφιγγοσίνης [142].

2.1.2. Κυκλικά δομικά ανάλογα του PAF

Η αντικατάσταση του σκελετού γλυκερόλης του CV 3988 με υδροφουράνιο άνοιξε το δρόμο για νέα δομικά ανάλογα του PAF. Το πρώτο μόριο που συντέθηκε ήταν το SRI 63-072, το οποίο είναι ένα 2,2 δι-υποκατεστημένο υδροφουράνιο. Το SRI 63-441 είναι το δραστικότερο *cis* 2,5 δι-υποκατεστημένο ανάλογο του SRI 63-072. Το SRI 63-441 ανέστειλε την υπόταση που προκάλεσε ο PAF σε αρουραίους, αύξησε τον αιματοκρίτη όταν δόθηκε σε σκύλους, πρωτεύοντα και χοίρους. Ανέστειλε την υπόταση που προκάλεσε η ενδοτοξίνη της *E.coli* σε αρουραίους και σκύλους, ενώ προσέφερε απόλυτη προστασία, όταν δόθηκε ενδοφλέβια σε αρουραίους, έναντι στη PAF προκαλούμενη ρήξη στομάχου. Τέλος ανέστειλε την αντίδραση του αναπνευστικού συστήματος πιθήκων ρέζους όταν τους δόθηκε αερόλυμα PAF [143-145].

2.2 Ανταγωνιστές-μη δομικά ανάλογα του PAF

Οι ανταγωνιστές του PAF χωρίς δομική ομοιότητα με αυτόν, διαχωρίζονται σε κατηγορίες, ανάλογα με τον αριθμό κυκλικών και ετεροκυκλικών υδρογονανθράκων που περιλαμβάνονται στο μόριό τους. Μεγάλος αριθμός τέτοιων ανταγωνιστών του PAF έχει απομονωθεί από διάφορα φυτά και συντεθεί από φαρμακευτικές εταιρίες [146]. Η αναφορά της δομής και της επαγόμενης βιολογικής δραστηριότητας όλων των μέχρι στιγμής εμπορικά διαθέσιμων αναστολέων ξεφεύγει από το σκοπό αυτού του κειμένου, έτσι θα αναφερθούν μόνο οι γνωστότεροι και δραστικότεροι εξ' αυτών. Στην κατηγορία αυτή των αναστολέων ανήκουν και τα φαινολικά/πολυφαινολικά μόρια.



Εικόνα 2: Χαρακτηρισμένοι αναστολείς του PAF, δομικά ανάλογα του ανοιχτής αλυσού
1: CV 3988, **2:** Ro 18-7953, **3:** Ro 19-1400, **4:** Ro 18-8736, **5:** CV 6209, **6:** Αναστολέας απομονωμένος από ελαιοπυρήνα, **7:** Αναστολέας απομονωμένος από λευκό κρασί, **8:** Αναστολέας απομονωμένος από υγρά απόβλητα ελαιουργίας, **9:** Αναστολέας απομονωμένος από ελαιόλαδο, **10:** Αναστολέας απομονωμένος από *Kalimeris indica*.

Η καδσουρενόνη είναι ένα νεολιγνάνιο (διμερές πρόπυλο-βενζολίου) που απομονώθηκε από το εκχύλισμα του Κινέζικου φαρμακευτικού φυτού *Piper futokadsurae*, το οποίο χρησιμοποιείται για την καταπράυνση του βρογχοάσματος και των ρευματικών. Η καδσουρενόνη είναι ένας ισχυρός ανταγωνιστής του PAF στη σύνδεσή του με τον PAF-R με IC_{50} 0,1 μ M. Η χορήγηση της σε αρουραίους (8-42 mg/kg) ανέστειλε την προκαλούμενη από τον PAF διαπερατότητα των αγγείων και την υπόταση ύστερα από έκθεση σε ενδοτοξίνη [147, 148]. Η διϋδροκαδσουρενόνη είναι εξίσου δραστικός αναστολέας του PAF με IC_{50} 0,07 μ M, ενώ το οπτικό της ανάλογο είχε τη μισή δραστηριότητα [149, 150]. Η μοναδικότητα της καδσουρενόνης αναδείχθηκε όταν απομονώθηκαν από το ίδιο φυτό τα πολύ όμοια της δομικά ανάλογα πιπερενόνη και καδσουρίνη A και B, τα οποία όμως είναι πολύ ασθενείς αναστολείς του PAF. Αυτό οδήγησε σε μελέτη της τρισδιάστατης δομής της καδσουρενόνης και σύγκρισή της με άλλους αναστολείς του PAF ενώ ταυτόχρονα έδωσε πληροφορίες για τη δομή του PAF-R και αποτέλεσε μοντέλο για τη σύνθεση νέων αναστολέων του [151-153].

Το επόμενο συνθετικό μόριο που εμφάνισε ισχυρή ανασταλτική δράση έναντι του PAF ήταν το WEB 2086. Το WEB 2086 ανέστειλε τη συσσώρευση ανθρωπίνων αιμοπεταλίων και ουδετερόφιλων με IC_{50} 0,17 μ M και 0,36 μ M αντίστοιχα, ενώ αναστέλλει και την ειδική σύνδεση του [3 H]PAF με τον υποδοχέα του με $K_D = 1,5 \times 10^{-8}$. Επιπλέον πειράματα με ράδιο-σημασμένο [3 H]WEB προσδεδεμένο στον PAFR ανθρωπίνων αιμοπεταλίων, έδειξαν ότι ο PAF το απομακρύνει από τον υποδοχέα, υποδεικνύοντας την πιθανή κοινή αλληλεπίδραση των δύο μορίων με τον ίδιο επίτοπο του PAFR [154].

Ο WEB 2086 ανέστειλε σε ινδικά χοιρίδια την προκαλούμενη από τον PAF: α) βρογχοσπασση (IC_{50} : 0,07mg/Kg στόμα, 0,017mg/Kg ενδοφλέβια), β) υπόταση (IC_{50} : 0,066mg/Kg στόμα, 0,015mg/Kg ενδοφλέβια), γ) θρομβοκυτταροπενία και ουδετεροπενία [155, 156]. Σε αρουραίους ανέστειλε την υπόταση προκαλούμενη τόσο από τον PAF όσο και από την ενδοτοξίνη της *E.Coli*, ενώ προστάτευσε τα πειραματόζωα από γαστρικές αλλοιώσεις και το θάνατο [157, 158].

Οι πιο ευρέως μελετημένοι αναστολείς του PAF είναι τα γκινγκολίδια, τα οποία είναι φυσικά μόρια τα οποία απαντώνται στα φύλλα του Κινεζικού δέντρου

Ginkgo biloba L. Τα γκινγκολίδια είναι μια οικογένεια τερπενίων (συγκεκριμένα τριτερπενίων) στην οποία ανήκουν τα γκινγκολίδια A (BN 52020), B (BN 52021) και C (BN 52022), με κυριότερο εκπρόσωπό τους το μόριο BN 52021. Το ολικό εκχύλισμα των φύλλων του δέντρου, γνωστό και ως EGb 761, το οποίο εκτός από τα προαναφερθέντα γκινγκολίδια περιέχει και φλαβονοειδείς γλυκοζίτες. Το εκχύλισμα είναι ευρύτατα διαδεδομένο καθώς θεωρείται ενισχυτικό μνήμης και ότι γενικότερα διαθέτει νευροπροστατευτική δράση, έτσι χρησιμοποιείται για τη βελτίωση ασθενών με άνοια και κατάθλιψη, ενώ καθυστερεί την εμφάνιση της νόσου Alzheimer αν δοθεί σαν συμπλήρωμα διατροφής στα αρχικά στάδια της [159]. Οι ανωτέρω ισχυρισμοί είναι πλέον υπό αμφισβήτηση μετά τη δημοσίευση μιας οκταετούς κλινικής μελέτης στην οποία χορηγούσαν σε 1545 εθελοντές δύο φορές τη μέρα 120 mg EGb 761 και σε 1525 ψευδοφάρμακο. Η μελέτη δεν έδειξε διαφορά στην πιθανότητα εμφάνισης άνοιας μεταξύ των δύο ομάδων [160]. Η ύπαρξη στο εκχύλισμα αναστολέων του PAF και αντιοξειδωτικών μορίων προσδίδουν στο EGb 761 μια πιθανή αντιαθηρογόνο, καρδιοπροστατευτική δράση καθώς τα προαναφερθέντα βιολογικά δραστικά μόρια εμπλέκονται στο μηχανισμό της αθηρογένεσης αναστέλλοντάς τον σε διάφορα στάδιά του, κάτι που μένει να πιστοποιηθεί από επιδημιολογικές μελέτες-διατροφικές παρεμβάσεις [50, 161].

Παλαιότερες φυσικοχημικές μελέτες απέδειξαν τη δομή των γκινγκολιδίων [162-164]. Οι βιολογικές δοκιμασίες έδειξαν ότι τα γκινγκολίδια A, B, C αναστέλλουν την πρόσδεση του PAF στον υποδοχέα του στα αιμοπετάλια με IC_{50} : 0,94, 0,51 και 5,8 μ M αντίστοιχα, ενώ ανέστειλαν τη συσσώρευση των ανθρωπίνων αιμοπεταλίων με τα αντίστοιχα IC_{50} : 6,24 $\times 10^{-6}$, 2,22 $\times 10^{-6}$ και 1,83 $\times 10^{-6}$ M [165, 166]. Σε αντίστοιχα πειράματα η προκαλούμενη από τα γκινγκολίδια αναστολή της μετατροπής του ραδιοσημασμένου [3 H]PAF στο [3 H]2-ακυλο ανάλογο ήταν η πρώτη ένδειξη ότι ο μεταβολισμός του PAF απαιτεί αρχικά την πρόσδεσή του στον PAFR [167].

Ο BN 52021 κατάφερε να αναστείλει όλες σχεδόν τις βιολογικές δράσεις του PAF, δηλαδή τη συσσώρευση των ουδετερόφιλων, την παραγωγή ελευθέρων ριζών, το χημειοτακτισμό, τη σύνθεση λευκοτριενίων από εοσινόφιλα, μακροφάγα κ.α [165, 168-170].

Ακόμα ο BN 52021 ανέστειλε τις δράσεις διαφόρων βακτηρίων και τοξινών, με χαρακτηριστικά παραδείγματα: α) ανέστειλε σε ινδικά χοιρίδια την υπόταση και τη θρομβοκυτταροπενία (1-6mg/Kg) προκαλούμενη από την ενδοτοξίνη του *Salmonella typhimurium* και στους αρουραίους από την ενδοτοξίνη του *Salmonella enteritidis*, ενώ παρέτεινε τη διάρκεια ζωής των πειραματόζωων (αρουραίων) όταν προσβλήθηκαν από T-2 μυκοτοξίνη, η οποία απαντάται σε τρόφιμα [171-173].

Παρά την ισχυρότατη βιολογική δράση των ανταγωνιστών του PAF τόσο *in vivo* σε πειραματόζωα όσο και *ex vivo* σε ανθρώπινα κύτταρα, οι κλινικές μελέτες που πραγματοποιήθηκαν με αναστολείς του PAF δεν κατάφεραν να επιδείξουν αποτελεσματική δράση έναντι του άσθματος, της αλλεργίας, της σήψης αλλά και άλλων φλεγμονωδών ασθενειών, καταδεικνύοντας την πολυπλοκότητα της φλεγμονώδους απόκρισης. Έτσι οι έρευνες προχώρησαν σε μελέτη μορίων τα οποία εμφανίζουν διπλή δράση τόσο ως αναστολείς του PAF αλλά και ενός άλλου φλεγμονώδους μεσολαβητή. Συντέθηκαν και μελετήθηκαν μόρια τα οποία εκτός από την αντι-PAF δράση τους είναι και αναστολείς της 5-λιποξυγενάσης (LDP-392), της συνθάσης των θρομβοξανίων (παράγωγα της ριδογρέλης) και της συνθάσης του οξειδίου του αζώτου [174-176]. Ο μόνος μέχρι σήμερα αναστολέας του PAF με κλινικά αποδεδειγμένη βιολογική δράση είναι η ρουπαταδίνη. Η ρουπαταδίνη είναι ανταγωνιστής του PAF και του H(1) υποδοχέα της ισταμίνης και χορηγείται από το στόμα για την αντιμετώπιση της χρόνιας αλλεργικής ρινίτιδας και χρόνιων αλλεργικών νόσων [177].

2.3 Αναστολείς του PAF και ανάπτυξη αθηρωματικών πλακών

Στη διεθνή βιβλιογραφία υπάρχουν αρκετές μελέτες που αφορούν τη δράση αναστολέων/αγωνιστών του υποδοχέα του PAF στην εμφάνιση και την εξέλιξη της αθηρωματικής νόσου.

2.3.1 BN 52021

Όπως ήταν φυσικό ένα από τα πρώτα μόρια που δοκιμάστηκαν ήταν το BN 52021 (Gingolide B) το οποίο παραλαμβάνεται από το δέντρο *Ginkgo biloba* και είναι ειδικός ανταγωνιστής του υποδοχέα PAF. Το BN ανταγωνίζεται τον PAF στην πρόσδεση στον υποδοχέα του [165], αναστέλλει την προκαλούμενη

από τον PAF συσώρευση των αιμοπεταλίων [166], μειώνει την κινητοποίηση του ασβεστίου στα αιμοπετάλια [178] και την παραγωγή υπεροξειδίου του υδρογόνου από τα λευκά αιμοσφαίρια ύστερα από επίδραση με PAF [179]. Όσον αφορά την αθηρωματική νόσο όταν το BN 52021 συγχωρήθηκε (20mg/Kg σωματικού βάρους τη μέρα) με αθηρογόνο δίαιτα σε αρσενικά κουνέλια Νέας Ζηλανδίας μείωσε την περιεκτικότητα των αθηρωματικών πλακών σε χοληστερόλη κατά 36%, χωρίς να μειώσει τη χοληστερόλη του αίματος, ενώ η μορφολογική ανάλυση των αγγείων έδειξε ότι το BN απέτρεψε την ασβεστοποίηση των άκρων των αρτηριών σε αντίθεση με την ομάδα ελέγχου [180]. Τα αποτελέσματα είναι παρόμοια με αυτά που λαμβάνονται από τους ανταγωνιστές ασβεστίου [181] και τα αντι-υπερτασικά φάρμακα [182].

2.3.2 Διγλυκοζίτης της σεκοΐσολαρισιρεζινόλης (SDG)

Ένας άλλος αναστολέας του PAF που έχει δοκιμαστεί με εξαιρετικά αποτελέσματα είναι το λιγνάνιο διγλυκοζίτης της σεκοΐσολαρισιρεζινόλης (secoisolariciresinol diglucoside-SDG) [183, 184]. Η πλουσιότερη πηγή του SDG είναι ο λιναρόσπορος με συγκεντρώσεις που φτάνουν το 1,8g/100g καρπού [185], ποσοστό το οποίο εκτοξεύεται στο 38% στο εκχύλισμα των λιγνανίων του καρπού [186]. Ο SDG μεταβολίζεται στον οργανισμό από βακτήρια του κόλον στο άγλυκο παράγωγό του, σε εντεροδιόλη και εντερολακτόνη [187]. Όλα τα παραπάνω μόρια συμπεριλαμβανομένου του SDG είναι αντιοξειδωτικά μόρια [188, 189]. Πληθώρα πειραμάτων, στα οποία σε πειραματόζωα έγιναν παρεμβάσεις με λιναρόσπορο και λινέλαιο (κανονικό και με μικρή συγκέντρωση α-λινολενικού οξέος), έδειξαν ότι οι ευεργετικές δράσεις έναντι της αθηρωματικής νόσου δεν οφείλονται στο α-λινολενικό οξύ και το λινολενικό οξύ, στα οποία και τα δύο τρόφιμα είναι πλούσια (έως και 50% της μάζας τους), αλλά μάλλον στο SDG [185, 190, 191]. Η χορήγηση 15 mg/kg σωματικού βάρους την ημέρα για 8 εβδομάδες σε κουνέλια που τρέφονταν με αθηρογόνο δίαιτα, ανέστειλε το σχηματισμό αθηρωματικών πλακών κατά 73%. Όσον αφορά το λιπιδαιμικό προφίλ των πειραματόζωων παρατηρήθηκε μείωση της TC του ορού κατά 33%, της LDL-C κατά 35% και του λόγου TC/HDL-C κατά 64% σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Η HDL-C αυξήθηκε τις 4 πρώτες εβδομάδες κατά 140% αλλά παρέμεινε σταθερή μέχρι

τη λήξη του πειράματος. Τα TG παρέμειναν τα ίδια μεταξύ των δύο ομάδων, ενώ η VLDL-C μειώθηκε στην ομάδα που τρεφόταν με SDG. Η χορήγηση του SDG σε κουνέλια με φυσιολογικό λιπιδαιμικό προφίλ μείωσε τη συγκέντρωση των TG και της VLDL-C ενώ τα επίπεδα των TC, LDL-C, HDL-C παρέμειναν σταθερά [192]. Εκτός από τα κουνέλια η δράση του αναστολέα του PAF δοκιμάστηκε και σε άλλα πειραματόζωα, έτσι η συγχορήγηση SDG (1% στη τροφή) σε ποντίκια τρεφόμενα με δίαιτα πλούσια σε λίπος μείωσε τα TG του ορού κατά 38% και την TC κατά 15% [193], ενώ σε υπερλιπιδαιμικούς αρουραίους 20 mg SDG/kg σωματικού βάρους την ημέρα για 8 εβδομάδες μείωσαν την TC κατά 33%, τα TG κατά 39% και την LDL-C κατά 45% και αύξησαν την HDL-C κατά 22% [194].

Τα θετικά αποτελέσματα των μελετών αναστολής του σχηματισμού αθηρωματικών πλακών οδήγησαν τους ερευνητές να μελετήσουν την πιθανή ικανότητα του μορίου να υποστρέφει τις ήδη σχηματισμένες πλάκες. Για το σκοπό αυτό σε κουνέλια τα οποία τρέφονταν για 60 ημέρες με αθηρογόνο δίαιτα δόθηκε τυπική δίαιτα εμπλουτισμένη με 20mg/Kg σωματικού βάρους την ημέρα, ενώ στην ομάδα ελέγχου δόθηκε μόνο τυπική τροφή. Μετά από 60 ημέρες η ομάδα ελέγχου εμφάνισε αύξηση του σχηματισμού των αθηρωματικών πλακών κάτι που δεν παρατηρήθηκε στην ομάδα που γινόταν παρέμβαση με SDG, το οποίο μηδένισε το ρυθμό αύξησής τους, ενώ παρατηρήθηκε ακόμα και μείωση των αθηρωματικών πλακών, στις 120 ημέρες, σε ποσοστό 17,5%, χωρίς όμως στατιστική σημαντικότητα [195]. Η ευεργετικές δράσεις του αναστολέα όμως δεν σταματούν στη βελτίωση του λιπιδαιμικού προφίλ και της μορφολογίας των αθηρωματικών πλακών αλλά επεκτείνεται και σε ένα ακόμα παράγοντα της πολύ-παραγοντικής αθηρωματικής νόσου, την υπέρταση. Δοκιμάστηκαν διάφορες δόσεις ενδοφλέβιας χορήγησης SDG σε αναίσθητους αρουραίους (3, 5, 10,15,20mg/Kg σωματικού βάρους) στους οποίους παρατηρήθηκε δόσοεξαρτώμενη μείωση στη συστολική, διαστολική και μέση αρτηριακή πίεση μέχρι τη δόση των 10mg/Kg, καθώς οι μεγαλύτερες δόσεις των 15 και 20mg/Kg είχαν την ίδια δράση με αυτή των 10mg/Kg. Οι πιέσεις άρχιζαν να επανέρχονται μετά από 15min αλλά ακόμα και μετά από 4h υπήρχαν μεγάλες ποσοστιαίες μειώσεις στη μέση αρτηριακή πίεση. Η υποτασική δράση του μορίου φαίνεται να εμπλέκει το ένζυμο της γουανιλικής κυκλάσης, καθώς η

οξαδιάζολο κουινοξαλίνη που είναι ειδικός αναστολέας του ενζύμου, ανέστειλε τη δράση του SDG [196]. Τέλος το SDG φαίνεται ως ένας δραστικότητατος αγγειογενετικός και αντιαποπρωτικός παράγοντας καθώς αυξάνει την έκφραση παραγόντων όπως ο Αγγειακός-Ενδοθηλιακός Αυξητικός Παράγοντας (Vascular endothelial growth factor, VEGF), της αγγειοποιητίνης-1, και της Φωσφορυλιωμένης Ενδοθηλιακής Συνθάσης του Νιτρικού Οξέος (p-eNOS). Η μελέτη έγινε σε ένα *ex vivo* μοντέλο ισχαιμίας/επαναιμάτωσης καρδιών που προέρχονταν από αρουραίους που τους παρεχόταν 20mg/Kg σωματικού βάρους την ημέρα για 2 εβδομάδες, πείραμα στο οποίο παρατηρήθηκε μείωση του εμφράγματος του μυοκαρδίου αλλά και μείωση της απόπτωσης των κυττάρων του μυοκαρδίου [197].

2.3.3 WEB 2086

Ο WEB 2086, ο οποίος είναι ένας συνθετικός ανταγωνιστής του υποδοχέα του PAF [154] όταν δόθηκε διαλυμένος στο νερό (σε συγκέντρωση 4,3mg/mL) LDL R-/- ποντικών που τρέφονταν με δυτικού τύπου δίαιτα μείωσε κατά 62% το σχηματισμό αθηρωματικών πλακών στη βαλβίδα της αορτής ενώ δεν επέδρασαν στα επίπεδα των λιποπρωτεϊνών. Ο WEB 2170 που είναι δομικό ανάλογο του 2086, ανέστειλε ισχυρά την ολίσθηση και την προσκόλληση των λευκοκυττάρων στα ενδοθηλιακά κύτταρα των αγγείων σε χάμστερ [198].

2.3.4 Αναστολείς του PAF προερχόμενοι από τρόφιμα της Μεσογειακής διαίτας

Τα τρόφιμα της Μεσογειακής Δίαιτας είναι πλούσια σε βιολογικώς δραστικά μικροσυστατικά. Έρευνες που έχουν πραγματοποιηθεί στο εργαστήριο Βιοχημείας του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Αθηνών έχουν αποδείξει ότι τα λιπιδή από το ελαιόλαδο [199], το κρασί [138, 200, 201], τα ψάρια [202, 203], το μέλι [204], το γάλα και το γιαούρτι [205], τα οποία αποτελούν βασικά παραδοσιακά τρόφιμα της Μεσογειακής διαίτας στην Ελλάδα, περιέχουν ισχυρούς αναστολείς/αγωνιστές του PAF καθώς έχουν την ικανότητα να αναστέλλουν τις δράσεις του σε πλυμένα αιμοπετάλια κουνελιού, ενώ άλλοι ερευνητές έχουν αποδείξει αντίστοιχες αντι-PAF δράσεις για το σκόρδο και το κρεμμύδι που επίσης ανήκουν στα Μεσογειακά τρόφιμα [206, 207]. Επιπλέον οι τάξεις των ουδετέρων και των πολικών λιπιδών αυτών

των τροφίμων, μετά από εκχύλιση, εκδηλώνουν παρόμοια δράση. Ένας μεγάλος αριθμός ανταγωνιστών του PAF έχει απομονωθεί με κατάλληλες τεχνικές HPLC [208, 209]. Επιπλέον, ενδογενείς αναστολείς του PAF έχουν προσδιοριστεί σε αρουραίο [210] και σε ανθρώπους [211] έχουν απομονωθεί καρδιολιπίνες από αίμα εθελοντών, οι οποίες αναγνωρίστηκαν ως αναστολείς του PAF που πιθανόν να ρυθμίζουν την εκδήλωση της *in vivo* δράσης του PAF [77, 212]. Τα στοιχεία δείχνουν ότι η απουσία, ενδογενών ή προερχομένων από την τροφή, αναστολέων του PAF θα μπορούσε να οδηγήσει σε πλήρη εκδήλωση της δραστηριότητας του PAF.

2.3.5 Ελαιόλαδο

Ένα από τα πρώτα τρόφιμα που δοκιμάστηκαν για την αντιαθηρογόνο δράση τους ήταν το ελαιόλαδο. Το ελαιόλαδο θεωρείται η βάση της Μεσογειακής Δίαιτας και είναι η κυριότερη πηγή λίπους της. Αρχικά μελετήθηκε *in vitro* η ικανότητα των συστατικών του ελαιολάδου να αναστέλλουν τη συσσωρευτική δράση του PAF σε πλυμένα αιμοπετάλια κουνελιών. Δοκιμάστηκαν τόσο τα ολικά λιποειδή του ελαιόλαδο όσο και τα κλάσματα των πολικών και ουδέτερων λιποειδών του. Το κλάσμα των πολικών λιποειδών ήταν αυτό που εμφάνισε τη μεγαλύτερη βιολογική δραστηριότητα, έτσι διαχωρίστηκε περαιτέρω με HPLC και τα κλάσματα που συλλέχθηκαν από αυτή δοκιμάστηκαν ξεχωριστά πάλι σε βιολογική δοκιμασία με πλυμένα αιμοπετάλια κουνελιών. Τα δραστικότερα εξ' αυτών αναλύθηκαν δομικά με χημικούς προσδιορισμούς και φασματομετρία μάζας, προσδιορίζοντας τη δομή τους ως γλυκεριναιθερικά γλυκολιποειδή [136].

Στη συνέχεια τα ίδια κλάσματα (ολικό ελαιόλαδο, πολικά και ουδέτερα λιποειδή) δοκιμάστηκαν σαν συμπληρώματα διατροφής σε κουνέλια που τρέφονταν με αθηρογόνο δίαιτα. Τα κουνέλια χωρίστηκαν σε τέσσερις ομάδες όπου η πρώτη τράφηκε με αθηρογόνο δίαιτα και αποτελούσε την ομάδα ελέγχου, η δεύτερη τράφηκε με αθηρογόνο δίαιτα εμπλουτισμένη κατά 15% σε ελαιόλαδο, η τρίτη και η τέταρτη τράφηκαν με αθηρογόνο δίαιτα εμπλουτισμένη από τα πολικά λιποειδή και ουδέτερα λιποειδή αντίστοιχα που περιέχονται στο 15% του ελαιολάδου. Μετά το πέρας του πειράματος την 45^η μέρα μετρήθηκε το πάχος των αθηρωματικών πλακών το οποίο βρέθηκε στατιστικώς σημαντικά μειωμένο στην ομάδα που τράφηκε με ελαιόλαδο και

την ομάδα που τράφηκε με τα πολικά λιποειδή του ελαιολάδου [140]. Επίσης μετρήθηκαν οι βιοχημικοί δείκτες TC, HDL-C, LDL-C και TG των πειραματόζων, οι οποίοι βρέθηκαν αυξημένοι σε όλα τα πειραματόζωα εκτός από την ομάδα που τρεφόταν με τα πολικά λιποειδή του ελαιολάδου στην οποία υπήρξε μείωση της HDL-C, παρατηρήσεις όμως που συμφωνούν με άλλες έρευνες [213]. Όλες οι ομάδες εμφάνισαν αύξηση του χρόνου της λανθάνουσας φάσης κατά την οξειδωση των λιποειδών του πλάσματος των πειραματόζων με ιόντα Cu^{2+} . Η δραστικότητα της PAF-AH ήταν σημαντικά αυξημένη σε όλες τις ομάδες εκτός από την ομάδα που τράφηκε με τα πολικά λιποειδή, καταδεικνύοντας τα αντιφατικά δεδομένα που υπάρχουν για το ρόλο της στην αθηρωματική νόσο [214].

2.3.6 Ψάρια

Τα εκχυλισμένα λιποειδή των ψαριών επίσης έχουν δοκιμαστεί για την ανασταλτική τους ικανότητα έναντι της εμφάνισης της αθηρωματικής νόσου καθώς και τα ψάρια είναι ένα από τα βασικά τρόφιμα της Μεσογειακής Δίαιτας. Πολλές μελέτες έχουν αποδείξει την ύπαρξη ισχυρών αγωνιστών του PAF σε διάφορα είδη ψαριών όπως σκουμπρί (*Scomber scombrus*), πέστροφα (*Oncorhynchus mykiss* και *Onchorhynchus aguabonita*), λαβράκι ανοιχτής θάλασσας και ιχθυοτροφείου (*Dicentrarchus labrax*), μπακαλιάρος (*Melanogrammus aeglefinus*), κολιός (*Pollachius virens*) και γλώσσα (*pleuronectes platessa*), τα οποία διατηρούσαν τη βιολογική δραστικότητά τους ακόμα και μετά από το μαγείρεμα [202, 203, 215, 216].

Σε *in vivo* πείραμα με κουνέλια δοκιμάστηκαν τα πολικά λιποειδή από τσιπούρες (*Sparus aurata*) τα οποία όπως και στην περίπτωση του ελαιολάδου περιείχαν τα βιολογικώς δραστικότερα μόρια εν συγκρίσει με το αντίστοιχο κλάσμα των ουδετέρων λιποειδών, ως προς την αναστολή του PAF. Τα πολικά λιποειδή δόθηκαν σαν συμπληρώματα διατροφής (0,06% στην τροφή) σε κουνέλια που τρέφονταν με αθηρογόνο δίαιτα (1% χοληστερόλη σε τυπική τροφή κουνελιών). Τα κουνέλια που τράφηκαν με το εκχύλισμα των πολικών λιποειδών των τσιπούρων εμφάνισαν στατιστικώς σημαντική μείωση τόσο του πάχους όσο και της επιφάνειας των αθηρωματικών πλακών, συγκεκριμένα είχαν πάχος $0,11 \pm 0,08 \text{mm}$ και επιφάνεια $0,12 \pm 0,09 \text{ (mm}^2/\text{mm)} \times 1000$ ενώ οι αντίστοιχες τιμές της ομάδας

ελέγχου ήταν $0,44 \pm 0,15 \mu\text{m}$ και $0,45 \pm 0,16 (\mu\text{m}^2/\mu\text{m}) \times 1000$. Η μέτρηση των λιποειδών του αίματος έδειξαν μια αύξηση στην HDL-C των κουνελιών που τρέφονταν με τα εκχυλίσματα τσιπούρας, τα οποία είχαν και αυξημένη δραστηριότητα της PAF-AH εν συγκρίσει με τα αντίστοιχα της ομάδας ελέγχου. Δεν παρατηρήθηκε καμία διαφορά στο χρόνο της λανθάνουσας φάσης της οξειδώσεως των λιποειδών του πλάσματος με ιόντα Cu^{2+} [217].

2.3.7 Αναστολείς του PAF από τα συμπαράγωγα της ελαιουργίας

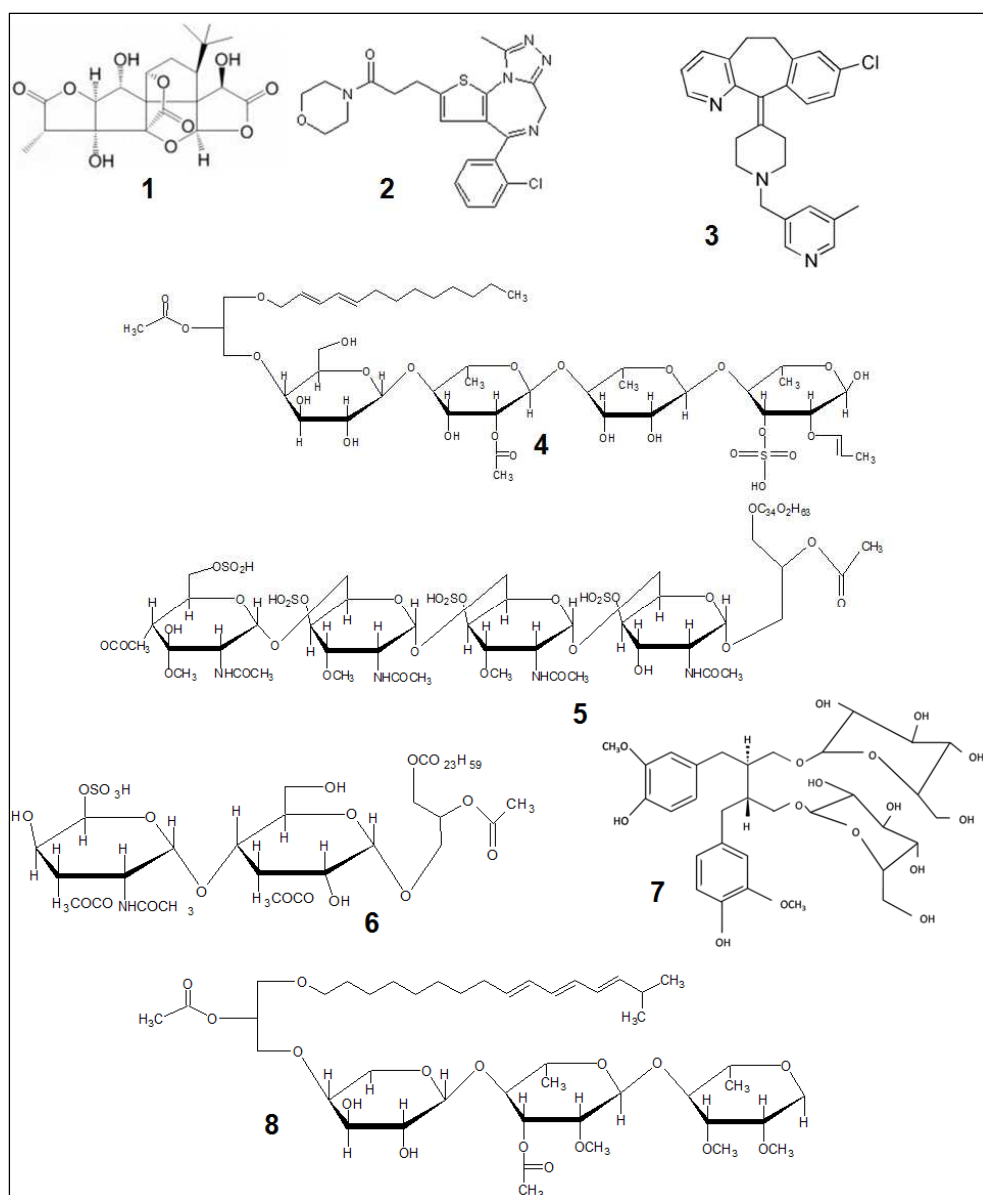
Τα θετικά αποτελέσματα της δοκιμής με το ελαιόλαδο και τα κλάσματα των λιποειδών του, οδήγησαν τους ερευνητές να αναζητήσουν αναστολείς/αγωνιστές του PAF στα διάφορα στάδια της ελαιοπαραγωγής [137]. Το πρώτο συμπαράγωγο που δοκιμάστηκε ήταν ο ελαιοπυρήνας, του οποίου επίσης τα πολικά λιποειδή (ΠΛΠ) ήταν αυτά με τη μεγαλύτερη βιολογική δραστηριότητα (Εικόνα 3), Ένα από τα πρώτα στάδια της έρευνας ήταν η μελέτη της συγγένειας των αναστολέων/αγωνιστών του PAF για τον υποδοχέα του. Τα πειράματα πρόσδεσης έδειξαν ότι για δέσμευση στο 50% των υποδοχέων του PAF χρειάστηκαν $0,42 \pm 0,11 \times 10^{-7} \text{M}$ των ΠΛΠ εκφρασμένα σε ανάλογα σακχάρου ενώ για το ελαιόλαδο χρειάστηκαν $1,5 \pm 0,2 \times 10^{-7} \text{M}$ των ΠΛΕ, η αντίστοιχη συγκέντρωση για το BN 52021 ήταν $2,3 \pm 0,8 \times 10^{-7} \text{M}$. Όταν στα πειραματόζωα δόθηκε αθηρογόνος δίαιτα εμπλουτισμένη με τα ΠΛΠ σε ποσοστό 0,13% w/w στην τροφή για 22 ημέρες παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντική μείωση των αθηρωματικών πλακών εν συγκρίσει με την ομάδα ελέγχου ($145 \pm 20 \mu\text{m}$ πάχος, $429 \pm 105 \mu\text{m}^2 \times 1000$ επιφάνεια και $489 \pm 49 \mu\text{m}$ πάχος, $1408 \pm 470 \mu\text{m}^2 \times 1000$ επιφάνεια αντίστοιχα). Τα αποτελέσματα αυτά σχετίζονται μόνο με τα επίπεδα του προσδεμένου PAF στα συστατικά του αίματος ($36,2 \mu\text{M}$, ενώ η ομάδα ελέγχου είχε $69,8 \mu\text{M}$), αλλά και την αύξηση του απαιτούμενου PAF για την πρόκληση συσσώρευσης των αιμοπεταλίων των πειραματόζωων που τράφηκαν με τα ΠΛΠ (38nM έναντι 12nM της ομάδας ελέγχου), δηλαδή τα αιμοπετάλια της ομάδας ελέγχου ήταν ήδη ενεργοποιημένα. Παραδόξως η HDL μειώθηκε στην ομάδα της παρέμβασης ($33,75 \text{mg/dL}$ έναντι $81,25 \text{mg/dL}$ της ομάδας ελέγχου), ενώ η PAF-AH δεν εμφάνισε διαφοροποιήσεις [218].

Τα πειράματα συνεχίστηκαν μελετώντας αυτή τη φορά την πιθανότητα υποστροφής των αθηρωματικών πλακών. Τα πειραματόζωα σε αυτή τη

μελέτη τράφηκαν με αθηρογόνο δίαιτα για έξι εβδομάδες. Στο τέλος αυτής της παρέμβασης τα πειραματόζωα χωρίστηκαν σε τρεις ομάδες από τις οποίες η μία αποτέλεσε την ομάδα ελέγχου και τράφηκε με τυπική τροφή, η δεύτερη τράφηκε με τυπική τροφή εμπλουτισμένη με 0,34mg ΠΛΠ/g τροφής, ενώ η τρίτη ομάδα αποτέλεσε τη θετική ομάδα ελέγχου και τράφηκε με 0,13mg Simvastatin/g τροφής, ενώ η διάρκεια αυτής της παρέμβασης ήταν τρεις εβδομάδες. Στο τέλος της παρέμβασης τόσο η θετική ομάδα ελέγχου όσο και η ομάδα των ΠΛΠ εμφάνισαν σημαντική μείωση του πάχους και της επιφάνειας των αθηρωματικών πλακών έναντι της ομάδας ελέγχου. Συγκεκριμένα η ομάδα της Simvastatin είχε $0,373 \pm 0,191$ mm πάχος και $0,520 \pm 0,133$ mm²/mm επιφάνεια, η ομάδα των ΠΛΠ $0,345 \pm 0,225$ mm πάχος και $0,402 \pm 0,240$ mm²/mm επιφάνεια, ενώ η ομάδα ελέγχου $0,833 \pm 0,199$ mm πάχος και $0,932 \pm 0,161$ mm²/mm. Η PAF-AH της ομάδας ελέγχου ήταν αυξημένη έναντι και των 2 άλλων ομάδων οι οποίες επανήλθαν σε σχεδόν φυσιολογικά επίπεδα ($357 \pm 32,9$ έναντι $246 \pm 67,4$ της ομάδας των ΠΛΠ και $278 \pm 41,4$ της ομάδας της Simvastatin). Αρκετά ενδιαφέρουσα παρατήρηση της μελέτης ήταν η αύξηση του χρόνου λανθάνουσας φάσης στην ομάδα των ΠΛΠ και της Simvastatin έναντι της ομάδας ελέγχου (108 ± 13 , 79 ± 19 και 59 ± 21 min αντίστοιχα), παρά το ότι ούτε τα ΠΛΠ αλλά ούτε και η Simvastatin έχουν ισχυρές αντιοξειδωτικές ιδιότητες. Το φαινόμενο αυτό αποδίδεται στο ότι και η Simvastatin είναι αναστολέας του PAF αναστέλλοντας τις δράσεις του [219], μεταξύ των οποίων είναι και η παραγωγή ROS όπως έχει αναφερθεί παραπάνω.

Εκτός από τον ελαιοπυρήνα ισχυροί αναστολείς/αγωνιστές του PAF περιέχονται και στα Υγρά Απόβλητα Ελαιουργίας (ΥΑΕ), η δομή των οποίων είναι παρόμοια με αυτές που απομονώθηκαν από το ελαιόλαδο και τον ελαιοπυρήνα (Εικόνα 3) [137]. Τα ΥΑΕ είναι το μίγμα των υπολειμμάτων του ελαιοκάρπου μαζί με το περιεχόμενο στον καρπό νερό, τα οποία απομακρύνονται και μέχρι σήμερα απορρίπτονται ανεξέλεγκτα κατά την εξαγωγή του ελαιολάδου. Το ιδιαίτερο χαρακτηριστικό των ΥΑΕ είναι ότι περιέχουν μεγάλο αριθμό φαινολικών μορίων σε πολύ μεγάλες συγκεντρώσεις καθώς στο σύνολό τους τα μόρια είναι υδρόφιλα έως αμφίφυλα. Τα φαινολικά μόρια εμφανίζουν πλειοτροπικές προστατευτικές δράσεις έναντι της αθηροσκλήρωσης, μεταξύ των οποίων

είναι η ανασταλτική δράση έναντι του PAF, ισχυρή αντιοξειδωτική ικανότητα και ρύθμιση βιοχημικών μονοπατιών [220]. Η μεγάλη συγκέντρωση των ΥΑΕ σε βιολογικώς δραστικά συστατικά (σε κάποια μόρια μεγαλύτερες ακόμα και από αυτές του ελαιολάδου) έχει οδηγήσει πολλούς ερευνητές στην μελέτη μεθόδων ανάκτησης και αξιοποίησης τους [221, 222]. Η ανάκτηση βιολογικά δραστικών μορίων, τα περισσότερα των οποίων είναι υψηλής προστιθέμενης αξίας, θα αποτελέσει και κίνητρο για τη φιλικότερη προς το περιβάλλον διαχείρισή τους.



Εικόνα 3: Οι δομές χαρακτηρισμένων αναστολέων και αγωνιστών του PAF.

1. BN 52021, 2. WEB 2086, 3. Ρουπαταδίνη, 4. Αγωνιστής του PAF από τα υγρά απόβλητα ελαιουργίας, 5. Αγωνιστής του PAF από το ελαιόλαδο, 6. Αγωνιστής του PAF από τον ελαιοπυρήνα 7. διγλυκοζίτης της σεκοΐσολαρισιρεζινόλης και 8. Αγωνιστής του PAF από το λευκό κρασί.

Τα παραπάνω πειραματικά δεδομένα σε συνδυασμό με τις βιβλιογραφικές αναφορές συνηγορούν και ενισχύουν τη θεωρία αθηροσκλήρωσης με εμπλοκή του PAF, αναδεικνύοντας τη κατανάλωση τροφών πλούσιων σε αναστολείς του PAF σαν καθοριστικής σημασίας βήμα για την πρόληψη της εμφάνισης και της εξάπλωσης της αθηρωματικής νόσου. Επιπλέον η ύπαρξη ισχυρότατων ειδικών αναστολέων του PAF στα βασικότερα τρόφιμα της Μεσογειακής Δίαιτας ίσως είναι και η βιοχημική απόδειξη των επιδημιολογικών παρατηρήσεων για τα οφέλη της έναντι της αθηρωματικής νόσου.

3. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: Βιοχημικοί δείκτες της αθηροσκλήρωσης

3.1 Εισαγωγή

Οι βιοχημικοί δείκτες που χρησιμοποιούνται στην καθημερινή πρακτική είναι η LDL χοληστερόλη (LDL-C), η HDL χοληστερόλη (HDL-C), και οι τριακυλογλυκερόλες [223]. Η αδυναμία τους όμως να προβλέψουν τον παράγοντα κινδύνου όλων των ασθενών για εμφάνιση αγγειακού επεισοδίου (τα περισσότερα αγγειακά συμβάντα παρατηρούνται σε ασθενείς με τιμές ολικής χοληστερόλης κάτω του φυσιολογικού) έδωσε κίνητρα στους ερευνητές για την αξιοποίηση της προβλεπτικής ικανότητας άλλων βιοχημικών παραμέτρων [224, 225].

Πολλές έρευνες έχουν μελετήσει την πιθανότητα αύξησης της προβλεπτικής ικανότητας για την εμφάνιση της αθηρωματικής νόσου μέσω νέων βιοχημικών δεικτών. Οι δείκτες αυτοί περιλαμβάνουν μόρια πρόσδεσης όπως τα: 1) VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule) και ICAM-1 (intercellular adhesion molecule), 2) κυτταροκίνες όπως ο TNF- α , η IL-1, η IL-6 και η IL-18, 3) πρωτεάσες της οικογένειας των μεταλοπρωτεασών μήτρας (Matrix Metalloproteinases, MMP) και ειδικότερα της MMP-9, 4) συστατικά των αιμοπεταλίων όπως το CD40L, 5) αδιποκίνες όπως η αδιπονεκτίνη και 6) τελικά προϊόντα της απόκρισης οξείας φάσης όπως η C Αντιδρώσα πρωτεΐνη (C reactive protein, CRP), το PAI-1 (Plasminogen activator inhibitor-1), και το ινωδογόνο. Για να είναι ικανοποιητικοί αυτοί οι δείκτες θα πρέπει να πληρούν κάποιες προϋποθέσεις όπως: α) να αυξάνουν την προβλεπτική ικανότητα για την εξέλιξη της νόσου όταν συνυπολογιστούν με τους καθιερωμένους βιοχημικούς δείκτες της καθημερινής πρακτικής, β) να υπάρχει κατάλληλη μέθοδος μέτρησης του προτεινόμενου μορίου, γ) ο δείκτης να είναι σταθερός δηλαδή ανεξάρτητος της δίαιτας, της ώρας, της μέρας και μεταξύ των ημερών δ) τέλος ο ιδανικός δείκτης θα πρέπει να σχετίζεται μόνο με την εξέλιξη της αθηρωματικής νόσου, να μετράται εύκολα και φθηνά από εμπορικώς διαθέσιμα τυποποιημένα αντιδραστήρια, με μικρές διακυμάνσεις, χωρίς να απαιτούνται ειδικές και περίπλοκες συνθήκες συλλογής του πλάσματος και ανάλυσης [226].

3.2 C αντιδρώσα πρωτεΐνη (C-reactive protein, CRP)

Η CRP είναι μέλος της οικογένειας των πεντραξινών και αποτελεί το πιο ευρέως μελετημένο φλεγμονώδες μόριο. Στο αίμα υγιών οργανισμών ανιχνεύεται μόνο σε ίχνοποσότητες, κάτι που αλλάζει δραματικά, εντός 6 έως 8 ωρών, φθάνοντας ή/και ξεπερνώντας τα 300mg/L στις 48h [227]. Η CRP βιοσυντίθεται από τα ηπατοκύτταρα και βρίσκεται κάτω από αυστηρό έλεγχο μέσω αρκετών κυτοκινών με σημαντικότερη την Ιντερλευκίνη 6 (IL)-6 η οποία διεγείρει την παραγωγή της. Εκτός από τα ηπατοκύτταρα άλλα κύτταρα που έχουν προταθεί ως παραγωγοί της CRP είναι τα λεία μυϊκά κύτταρα (SMCs) και τα μακροφάγα τοπικά μέσα στις αθηρωματικές πλάκες [228, 229]. Μια μελέτη που έγινε σε νεκροτομές ασθενών επιβεβαίωσε τη σχέση μεταξύ της συγκέντρωσης της CRP και της ρήξης της αθηρωματικής πλάκας καθώς αυξημένη συγκέντρωσή της σχετίστηκε με αυξημένο αριθμό αθηρωματικών πλακών με λεπτή μεμβράνη [230]. Η CRP αρχικά θεωρήθηκε σαν ένας απλός δείκτης της αθηρωματικής νόσου, χωρίς όμως να εμπλέκεται σε αυτή. Στη συνέχεια όμως άρχισαν να δημοσιεύονται έρευνες οι οποίες έδειξαν πιθανή άμεση εμπλοκή της CRP σαν ένα μόριο με προφλεγμονώδεις δράσεις, υπεύθυνη για την εμφάνιση και την εξέλιξη-διεύρυνση των αθηρωματικών πλακών. Στην CRP έχουν αποδοθεί αρκετές δράσεις που επιδρούν στην εξέλιξη της νόσου, συμπεριλαμβανομένης της ενεργοποίησης και χημειοέλξης των κυκλοφορούντων μονοκυττάρων, πρόκληση δυσλειτουργίας του ενδοθηλίου, απελευθέρωση κυτταροκινών, ενεργοποίηση του συμπληρώματος, κ.α. [231]. Βέβαια, τα αποτελέσματα αυτά πρέπει να αξιολογηθούν με προσοχή καθώς πρόσφατες μελέτες αποδεικνύουν ότι οι προαναφερθείσες δράσεις της CRP *in vitro* μπορεί να οφείλονται στην ύπαρξη παραπροϊόντων της παραγωγής της CRP [232]. Επιπλέον οι μελέτες σε ζωικά μοντέλα της αθηροσκλήρωσης, συμπεριλαμβανομένων και διαγονιδιακών ποντικών δείχνουν αντικρουόμενα αποτελέσματα [231].

Τα δεδομένα από πολλές προοπτικές μελέτες έχουν αποδείξει την ισχυρή και ανεξάρτητη θετική συσχέτιση των βασικών επιπέδων της CRP με την αύξηση εμφάνισης δυσμενών καρδιοαγγειακών συμβάντων, όπως έμφραγμα του μυοκαρδίου, ισχαιμικό επεισόδιο και αιφνίδιο θάνατο [225, 233-237]. Η προσθήκη των επιπέδων της CRP στην ανάλυση του λιπιδαιμικού προφίλ αυξάνει την προβλεπτική ικανότητα ανεξάρτητα από την LDL χοληστερόλη,

υποδεικνύοντας ότι τα αυξημένα επίπεδα CRP μπορούν να αναγνωρίσουν ασθενείς με φυσιολογικές τιμές χοληστερόλης που όμως έχουν υψηλό κίνδυνο εμφάνισης καρδιαγγειακών συμβάντων [225]. Τα επίπεδα της CRP προσφέρουν σημαντικές προγνωστικές πληροφορίες για τον καρδιαγγειακό κίνδυνο, όχι μόνο όταν συνδυαστούν με τη συγκέντρωση της LDL-C αλλά με όλους τους παράγοντες κινδύνου της μελέτης Framingham [225, 236]. Επιπλέον τα χαρακτηριστικά γνωρίσματα του μεταβολικού συνδρόμου (κοιλιακή παχυσαρκία, αυξημένη συγκέντρωση τριακυλογλυκερολών, μικρή συγκέντρωση HDL χοληστερόλης, υπέρταση, αυξημένη γλυκόζη αίματος) σχετίζονται θετικά με αυξημένη συγκέντρωση CRP πλάσματος [225] και η μέτρησή της συνεισφέρει στον υπολογισμό του κινδύνου εμφάνισης αθηρωματικής νόσου σε αυτούς τους ασθενείς [238]. Τα αποτελέσματα αυτά έχουν οδηγήσει στην ανάπτυξη ενός νέου τρόπου υπολογισμού του συνολικού κινδύνου εμφάνισης αθηρωματικής νόσου στις γυναίκες (Reynolds risk score) [239], στον οποίο χρησιμοποιεί ένα αλγόριθμο που συνυπολογίζει την CRP και τους παράγοντες κινδύνου από τη μελέτη Framingham. Η εφαρμογή αυτής της μεθόδου βελτίωσε την προβλεπτική ικανότητα κινδύνου στις γυναίκες καθώς ανακατατάχθηκε το 50% του πληθυσμού σε κατηγορίες υψηλότερου ή χαμηλότερου κινδύνου.

Επιπλέον η CRP διαθέτει πολλές από τις προϋποθέσεις που προαναφέρθηκαν για τους βιοχημικούς δείκτες, δηλαδή είναι ένας εξαιρετικός σταθερός αναλύτης (ίδια αποτελέσματα σε φρέσκο, αποθηκευμένο και παγωμένο πλάσμα) με καθιερωμένη ευαίσθητη και εμπορικά διαθέσιμη μέθοδο ανάλυσης (ανιχνεύει <math><10\text{mg/L}</math>), με ελάχιστες ημερήσιες διακυμάνσεις, ανεξάρτητος της πρόσληψης τροφής και με μεγάλο χρόνο ημιζωής [240].

Βασισμένη σε αυτά τα αποτελέσματα η Αμερικανική Καρδιολογική Εταιρία καθιέρωσε τον δείκτη CRP σαν ένα νέο ανεξάρτητο παράγοντα κινδύνου για την καρδιαγγειακή νόσο [241]. Προτείνουν ειδικότερα τη χρήση του δείκτη σε ασθενείς που θεωρούνται μεσαίου κινδύνου με τους κλασικούς δείκτες.

Οι ασθενείς με συγκέντρωση CRP <math><1\text{mg/L}</math> θεωρούνται χαμηλού κινδύνου, ενώ αυτοί με $>3\text{mg/L}$ θεωρούνται υψηλού κινδύνου.

Η ευεργετικές δράσεις των στατινών είναι μεγαλύτερες από ότι αναμενόταν με τη μείωση μόνο της LDL χοληστερόλης, υποδεικνύοντας τις πλειοτροπικές δράσεις των μορίων. Μια από τις δράσεις τους αυτές είναι η μείωση της

συγκέντρωσης της CRP κατά 20-30% μαζί με μείωση της LDL χοληστερόλης, όπως φάνηκε για πρώτη φορά στη μελέτη CARE (Cholesterol and Recurrent Events) [242].

Η μελέτη AFCAPS/TexCAPS (The Air Force/Texas Coronary Atherosclerosis Prevention Study) που περιελάμβανε άντρες και γυναίκες χωρίς καρδιακή νόσο και με φυσιολογικές συγκεντρώσεις ολικής και LDL χοληστερόλης πλάσματος αλλά χαμηλή HDL χοληστερόλη. Η χορήγηση στατίνης μείωσε την εμφάνιση συμβάντων στους εθελοντές με λόγο Ολικής χοληστερόλης/HDL χοληστερόλης ή/και συγκέντρωση CRP άνω του μέσου όρου, όσο και στους εθελοντές με λόγο χοληστερόλης χαμηλότερο του μέσου όρου αλλά με συγκέντρωση CRP μεγαλύτερο του μέσου όρου. Αντίθετα η στατίνη δεν επέδρασε στους εθελοντές με μικρούς λόγους χοληστερόλης και μικρή συγκέντρωση CRP, αναδεικνύοντας την ευεργετική επίδραση της στατίνης σε άτομα με χαμηλές συγκεντρώσεις λιποειδών αλλά με αυξημένο CRP [243].

Τα αποτελέσματα της μελέτης PROVEIT TIMI 22 (Pravastatin or Atorvastatin Evaluation and Infection Therapy-Thrombolysis in Myocardial Infarction 22) έδειξε αντίστοιχες συσχετίσεις μεταξύ της μείωσης της συγκέντρωσης της CRP και του κινδύνου επανεμφάνισης συμβάντος σε ασθενείς με οξύ στεφανιαίο σύνδρομο [244]. Όταν οι ασθενείς χωρίστηκαν βάση των καταληκτικών συγκεντρώσεων της CRP και της LDL χοληστερόλης φάνηκε ότι οι ασθενείς με χαμηλή συγκέντρωση CRP είχαν καλύτερη κλινική έκβαση εν συγκρίσει με αυτούς με υψηλή συγκέντρωση, ανεξάρτητα από την τελική συγκέντρωση της LDL χοληστερόλης. Επιπλέον φάνηκε πολύ μικρή συσχέτιση μεταξύ της μείωσης της CRP και της LDL χοληστερόλης (R: 0,1-0,2).

Στη μελέτη REVERSAL (The Reversal of Atherosclerosis with Aggressive Lipid Lowering) έδειξε ότι η μείωση της συγκέντρωσης της CRP σε ασθενείς με αρτηριακή νόσο, με εντατική χρήση στατινών, μείωσε την ανάπτυξη των αθηρωματικών πλακών [245]. Ο συνδυασμός αυτών των αποτελεσμάτων υποδηλώνει ότι η ταυτόχρονη μέτρηση της CRP και της LDL-C μπορούν να συνεισφέρουν στη πρωτογενή και δευτερογενή πρόληψη της καρδιαγγειακής νόσου.

3.3 Ιντερλευκίνη-1 (Interleukin-1,IL-1)

Η Ιντερλευκίνη-1β (IL-1b) είναι μια κυτταροκίνη που έχει μελετηθεί εκτενώς και συνδέεται με μια πληθώρα φλεγμονωδών αποκρίσεων του οργανισμού [246]. Μεταξύ αυτών είναι το σηπτικό σοκ, ο καρκίνος αλλά και η ρευματοειδής αρθρίτιδα. Μερικές εκ των δράσεων της είναι η ενεργοποίηση των ουδετερόφιλων τα οποία με τη σειρά τους ενεργοποιούν την παραγωγή δραστικών μορφών οξυγόνου (reactive oxygen species, ROS) και μεταβολίτες του αραχιδονικού οξέως. Τα ενδοθηλιακά κύτταρα όταν εκτεθούν σε IL-1b εκφράζουν μόρια προσκόλλησης, PAF, προσταγλανδίνες, και ιστικό παράγοντα [247]. Επιπλέον ενδοθηλιακά κύτταρα που υποβάλλονται σε shear stress παράγουν IL-1b [248]. Τα φυσιολογικά ανθρώπινα μονοκύτταρα παράγουν IL-1b όταν εκτεθούν σε οξειδωμένη LDL [249], ενώ η προσθήκη αντιοξειδωτικών αναστέλλει αυτό το φαινόμενο [250]. Επιπλέον η ενεργοποίηση της χαρακτηρισμένης σειράς ανθρωπίνων μονοκυττάρων U937 με IL-1b προκαλεί αύξηση των ενδοκυτταρικών επιπέδων PAF καθώς ενεργοποιεί τα βιοσυνθετικά του ένζυμα, ενώ η χρήση του αναστολέα πρωτεασών refablox δείχνει ότι ο ρόλος του αποικοδομητικού ενζύμου PAF-AH είναι κρίσιμος για τη διατήρηση των επιπέδων του ενδοκυτταρικά [251].

Η παθολογική δράση της IL-1b μελετήθηκε σε apoE ^{-/-} ποντίκια που τράφηκαν με αθηρογόνο δίαιτα πλούσια σε χοληστερόλη με υποδόρια χορήγηση ανθρώπινης ανασυνδυασμένης IL-1ra [252], και σε LDLr^{-/-} ποντίκια [253] ή apoE^{-/-} ποντίκια διασταυρωμένα με διαγονιδιακά ποντίκια που υπερ-εξέφραζαν την [254] ανθρώπινη IL-1ra. Η υπερέκφραση της IL-1ra προκάλεσε αύξηση της χοληστερόλης κατά 50%, αλλά παρόλα αυτά μείωσε την έκταση των αθηρωματικών πλακών κατά 50–70%.

Επιπλέον C57BL/6J ποντίκια με αποσιώπηση της IL-1ra τα οποία τράφηκαν με αθηρογόνο δίαιτα πλούσια σε χοληστερόλη εμφάνισαν μείωση της μη HDL χοληστερόλης αλλά ταυτόχρονα εμφάνισαν μια τάση για μεγαλύτερες αθηρωματικές πλάκες πλούσιες σε αφρώδη κύτταρα, σε σχέση με τα αντίστοιχα πειραματόζωα αγρίου τύπου [253]. Η έλλειψη της IL-1b σε in apoE^{-/-} ποντίκια ,οδήγησε σε δραματική μείωση της ανάπτυξης των αθηρωματικών πλακών [255].Τα παραπάνω δεδομένα συνηγορούν στην άμεση σύνδεση της IL-1b με την ανάπτυξη της αθηροσκλήρωσης.

Η IL-1b έχει βρεθεί αυξημένη σε ασταθή αγγειακά σύνδρομα συνδέοντας τη συστηματική φλεγμονή με τα ασταθή αγγεία και κατά συνέπεια με την πήξη της αθηρωματικής πλάκας. Η IL-1b ενεργοποιεί τη σύνθεση άλλων 2 κυτταροκινών της IL-6 και της IL-8 η οποίες είναι επίσης αυξημένες σε αντίστοιχα περιστατικά [256-259]. Μάλιστα η IL-1b μπορεί να θεωρηθεί καλύτερος προγνωστικός παράγοντας για την εξέλιξη και τη ρήξη του αγγείου από την IL-6 καθώς η δεύτερη μπορεί να έχει και αντιαθηρογόνες δράσεις [246].

3.4 Ογκονεκρωτικός Παράγοντας α (Tumor Necrosis factor-α, TNF-α)

Ο TNF-α παράγεται από πληθώρα κυτάρων σαν απόκριση σε μολυσματικούς παράγοντες και φλεγμονώδη ερεθίσματα. Όπως και η IL-1b ενεργοποιεί τα λευκοκύτταρα και αυξάνει την πρόσδεσή τους στο ενδοθήλιο ενώ αυξάνει την παραγωγή και άλλων φλεγμονωδών μεσολαβητών όπως ο PAF [260, 261]. Ο TNF-α εμπλέκεται περαιτέρω με τον PAF καθώς και τα δύο μόρια αυξάνονται κατά την ισχαιμία-επαναιμάτωση [262], κατά την οποία η παραγωγή του ενεργοποιείται από τις μεταλοπρωτεΐνάσες [263].

Πειράματα που πραγματοποιήθηκαν σε apoE^{-/-} ποντίκια με αποσιωπημένο τον TNF-α έδειξαν μικρότερες αθηρωματικές πλάκες στις αρτηρίες σε σχέση με την ομάδα ελέγχου που παρήγαγε TNF-α. Το φαινόμενο αυτό αποδόθηκε στη μικρότερη παραγωγή μορίων προσκόλλησης και πιο συγκεκριμένα των ICAM-1, VCAM-1, and MCP-1 [264]. Παραδόξως στον TNF-α έχουν αποδοθεί και αντιαθηρογόνες δράσεις, δηλαδή σε ποντίκια C75BL/6 που είχε αποσιωπηθεί ο TNFR1(p55) και τα οποία τράφηκαν με αθηρογόνο δίαιτα εμφάνισαν μεγαλύτερες αθηρωματικές πλάκες από τα αντίστοιχα πειραματόζωα αγρίου τύπου, υποδηλώνοντας ότι η σηματοδότηση μέσω του TNFR1 δρα προστατευτικά έναντι της αθηρωματικής νόσου [265, 266].

Αντίθετα η ίδια ερευνητική ομάδα έδειξε ότι η ανεπάρκεια σε TNF-α ή στον TNFR2(p75) δεν επέδρασαν στην ανάπτυξη των αθηρωματικών πλακών [265, 266]. Μια πιθανή εξήγηση για το φαινόμενο αυτό είναι ότι ο TNF-α μειώνει την έκφραση του γονιδίου που κωδικοποιεί τον εκκαθαριστή υποδοχέα (scavenger receptor) των μακροφάγων [267, 268], οδηγώντας σε μειωμένη πρόσληψη των οξειδωμένων LDL από τα κύτταρα και κατά συνέπεια μείωση του σχηματισμού αφρωδών κυττάρων.

Η αντίφαση των παραπάνω αποτελεσμάτων μπορεί να αποδοθεί στη διαφορά των πειραματικών μεθόδων που χρησιμοποιήθηκαν για τη μελέτη του φαινομένου της αθηρωμάτωσης χωρίς να ληφθούν υπόψη υποβόσκουσες διαφορές των πρωτοκόλλων. Η κυριότερη διαφορά είναι στη δίαιτα καθώς τα αροE-/- ποντίκια τράφηκαν με τυπική τροφή, ενώ τα C75BL/6 με αθηρογόνο. Στη κλινική μελέτη CARE, η συγκέντρωση του TNF-α σχετίστηκε με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης εμφράγματος του μυοκαρδίου και θάνατο από καρδιακό επεισόδιο [225]. Η συγκέντρωση του TNF-α συσχετίστηκε με τη βαρύτητα της αθηρωματικής νόσου όπως αυτή μετρήθηκε με υπέρηχο καρωτίδας σε υγιείς μεσήλικες άνδρες [269].

3.5 PAF-AH (EC 3.1.1.47)

Το υδρολυτικό ένζυμο του PAF είναι η PAF ακετυλοϋδρολάση (PAF-acetyl hydrolase, PAF-AH) η συνδεδεμένη με λιποπρωτεΐνες φωσφολιπάση A2 και η οποία βρίσκεται κυρίως στο πλάσμα και η ύπαρξή της έχει διαπιστωθεί ήδη από το 1980 [270]. Ανήκει στην οικογένεια των Φωσφολιπασών A2 και ειδικότερα στην υποομάδα VIIA.

Τρεις ισομορφές της είναι γνωστές, εκτός από αυτή που βρίσκεται στο πλάσμα συνδεδεμένη με τις λιποπρωτεΐνες όπως προαναφέρθηκε, υπάρχουν άλλες δύο που απαντώνται μόνο ενδοκυτταρικά στους ιστούς και ονομάζονται PAF-AH Ib και PAF-AH II [271]. Η PAF-AH του πλάσματος είναι ένα μονομερές πολυπεπτίδιο που αποτελείται από 441 αμινοξέα με μοριακό βάρος 45 kDa [272, 273]. Η ενδοκυτταρική PAF-AH II έχει μοριακό βάρος 40 kDa και βιοσυντίθεται στο ήπαρ και τα νεφρά, ενώ έχει ομολογία 41% με την PAF-AH του πλάσματος [274]. Η PAF-AH Ib είναι ένα σύμπλεγμα που έχει βρεθεί στον εγκέφαλο το οποίο αποτελείται από δύο καταλυτικές υπομονάδες της $\alpha 1$ and $\alpha 2$, μοριακού βάρους 26 kDa έκαστη και με ομολογία 63% μεταξύ τους, και από μια ρυθμιστική υπομονάδα b με μοριακό βάρος 45-kDa, η οποία εκφράζεται από το γονίδιο των Miller-Dieker [275]. Οι υπομονάδες αυτές έχουν μικρή αναλογία με τις PAF-AH του πλάσματος και την PAF-AH II [4], ενώ και η δραστηριότητα της PAF-AH Ib εμφανίζει διαφοροποίηση σε σχέση με τις άλλες δύο καθώς δεν υδρολύει τα προπιονικά και βουτυρικά PAF ανάλογα, δείχνοντας προτίμηση στην υδρόλυση της ακετυλομάδας στην *sn-2* θέση [274].

Παρά το γεγονός ότι η PAF-AH είναι μια φωσφολιπάση εμφανίζει αρκετά διαφορετικά χαρακτηριστικά από τα υπόλοιπα ένζυμα της ομάδας των A2 φωσφολιπασών [276], τα κυριότερα εκ των οποίων είναι ότι είναι ανεξάρτητη ασβεστίου και εμφανίζει προτίμηση στην υδρόλυση μικρής αλύσου λιπαρών οξέων στην sn-2 θέση της γλυκερόλης [277, 278] αποτρέποντας έτσι την υδρόλυση των λιποπρωτεϊνών και των κυτταρικών μεμβρανών [279].

Η PAF-AH είναι γλυκοζυλιωμένη σε δύο κατάλοιπα ασπαραγινικού κοντά στο καρβόξυ-τελικό της άκρο, συγκεκριμένα τα Asp-423 και Asp-433 τα οποία διατηρούνται στην ανθρώπινη και τη βόεια PAF-AH, ενώ περιέχει συνολικά περίπου 9kDa διαφόρων σακχάρων/πολυσακχαριτών, συμπεριλαμβανομένου του σιαλικού οξέος [272, 280]. Το καταλυτικό κέντρο της PAF-AH αποτελείται από τη συναινετική αλληλουχία Gly-His-Ser-Phe-Gly παρόμοια με τα καταλυτικά κέντρα άλλων εστερασών σερίνης και λιπασών. Η Ser-273 της αλληλουχίας μαζί με την Asp-296 και την His-351 συνιστούν την καταλυτική τριάδα του ενζύμου [276], για το λόγο αυτό η δράση του ενζύμου αναστέλλεται από κλασσικούς αναστολείς των εστερασών σερίνης όπως το Pefabloc και το 2-(φθόρο-(1-μεθυλμεθοξυ)φωσφορικό)οξυπροπάνιο [281, 282]

Η PAF-AH βιοσυντίθεται κυρίως από τα κύτταρα του αιμοποιητικού συστήματος και ειδικότερα από τα μακροφάγα [283] αλλά όχι από τα μονοκύτταρα [273] λόγω διαφορετικής συγγένειας των δύο κυττάρων με τον απαρχητή του γονιδίου [284]. Χαρακτηριστική είναι η περίπτωση ενός Ιάπωνα ασθενή στον οποίο η δραστηριότητα της PAF-AH εξαφανίστηκε ύστερα από μεταμόσχευση μυελού των οστών από δότη με έλλειψη δραστηριότητας PAF-AH [285]. Άλλες κυτταρικές σειρές που παράγουν και εκκρίνουν PAF-AH είναι τα HepG2 (ανθρώπινη σειρά καρκινικών κυττάρων του ήπατος), τα ουδετερόφιλα, διαφοροποιημένα κύτταρα HL-60 (ανθρώπινη σειρά λευχαιμικών κυττάρων), ιστιοκύτταρα, τα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια και τα κύτταρα Kupffer [286-292]. Η βιοσύνθεση της PAF-AH ενεργοποιείται από την αύξηση της συγκέντρωσης του PAF στο αίμα ύστερα από παρέμβαση με Λιπο-πολυσακχαρίτη (Lipopolysaccharide, LPS) [293]. Η χορήγηση των αναστολέων του PAF, BN50739 και WEB2170 ανέστειλε την ενεργοποίηση από το LPS κατά 50% αναδεικνύοντας την άμεση σχέση του PAF και του υποδοχέα του στο φαινόμενο.

Στα υποστρώματα που υδρολύει η PAF-AH εκτός από τον PAF συγκαταλέγονται και τα γλυκερινικά φωσφολιποειδή με μικρή λιπαρή αλυσίδα (C<9) στην sn-2 θέση. Επίσης υποστρώματα της αποτελούν τα προϊόντα μη ενζυμικής οξειδωσης των φωσφολιποειδών, παρότι αποτελούνται από μεγαλύτερης αλύσου λιπαρά οξέα στην sn-2 θέση της γλυκερόλης αλλά έχουν αλδεϋδομάδες στο ω-άκρο τους [51, 294-296]. Επιπλέον μπορεί να υδρολύσει διάκυλο-γλυκερόλες (Diacylglycerol, DAG) και τριακυλο-γλυκερόλες (Triacylglycerol, TG) μικρής αλύσου και γενικά εστερικούς δεσμούς υδατοδιαλυτών ενώσεων, καθώς το ένζυμο προσεγγίζει τα υποστρώματά του στην υδατική φάση διαφοροποιώντας το περαιτέρω από τις υπόλοιπες φωσφολιπάσες, ενώ έχουν αναφερθεί και δράσεις της ως φωσφολιπάση A1 (phospholipase A 1, PLA1) [297]. Τέλος έχει αποδειχθεί και η ικανότητα της να υδρολύει και F2-ισοπροστανία από την sn-2 θέση φωσφολιποειδών τόσο *in vitro* όσο και *in vivo* και αποδείχθηκε ότι είναι το μοναδικό ένζυμο με αυτή τη δραστηριότητα [298]. Τέλος η PAF-AH μπορεί να υδρολύσει τη Γκρελίνη, μια πεπτιδική ορμόνη η οποία συνδέεται με τις LDL και παράγεται στο στομάχι, ενεργοποιώντας την επιθυμία για λήψη τροφής και την έκκριση αυξητικής ορμόνης [299].

Η PAF-AH βρέθηκε ότι στο ανθρώπινο πλάσμα συνδέεται με τις λιποπρωτεΐνες [278, 300, 301], κυρίως με τις LDL και ειδικότερα με τις μικρές πυκνές LDL [302], ενώ σε μικρότερο βαθμό με τις HDL (11-30%) και ειδικότερα με το πολύ υψηλής πυκνότητας-1 υποκλάσμά τους (Very high density lipoprotein, VHDL-1) [278, 302, 303], ενώ σε παθολογικές καταστάσεις και με την Lp(a) στο apoB κομμάτι τους [304]. Όπως είναι φυσικό η χορήγηση στατινών επιφέρει μείωση της μάζας και της δραστηριότητας της PAF-AH καθώς μειώνονται και οι LDL [305]. Αντίστοιχα αποτελέσματα επιφέρουν η εζετιμίμπη και η φαινοφιμπράτη, ενώ η τελευταία αυξάνει και τη PAF-AH δραστηριότητα των HDL [305, 306].

Αντίθετα η δραστηριότητα του ενζύμου παρατηρείται αυξημένη σε άτομα που πάσχουν από τη νόσο της Ταγγέρης (έλλειψη HDL), παρατήρηση που υποδηλώνει ότι η έκκριση της PAF-AH είναι ανεξάρτητη της σύνδεσής της με τις λιποπρωτεΐνες [307].

Εκτός από την υδρολυτική της ικανότητα η PAF-AH εμφανίζει και δράσεις τρανσακετυλάσης μεταφέροντας την ακετυλομάδα της από το μόριο του PAF

σε μόρια λυσο-φωσφατιδύλο χολίνης [86, 308], ενώ σε πιο πρόσφατη έρευνα η δραστηριότητά της στη μαστική αρτηρία οδήγησε τους ερευνητές να διατυπώσουν τη θεωρία ότι η PAF-AH σε φυσιολογικά αγγεία δεν επιτρέπει την αύξηση των επιπέδων του PAF, ενώ στα αθηρωματικά αγγεία παρατηρείται μικτή δράση του ενζύμου (λειτουργεί τόσο ως υδρολάση όσο και ως τρανσακετυλάση) που οδηγεί σε αύξηση των επιπέδων του PAF [87]. Η PAF-AH εμφανίζει εκλεκτικότητα και σε αυτή την αντίδραση καθώς όσο αυξάνεται το μήκος του λιπαρού οξέος του μορίου δότη τόσο μειώνεται η δραστηριότητα του ενζύμου ενώ εμφανίζει 30% μεγαλύτερη δραστηριότητα όταν η *sn-1* θέση του μορίου δότη έχει αιθερικό δεσμό αντί εστερικού. Τέλος η δραστηριότητά του δεν επηρεάζεται από τη δομή του μορίου που λαμβάνει το λιπαρό οξύ [309].

Στις HDL, εκτός από τη PAF-AH, τόσο η παραροξονάση-1 [310, 311] όσο και η Λεκιθινή-Χοληστερόλη ακετυλοτρανσφεράση (Lecithin-Cholesterol Acyltransferase-LCAT) μπορούν να εμφανίσουν δραστηριότητες PAF-AH [308, 312-314], αν και αυτές οι παρατηρήσεις αμφισβητούνται από άλλους ερευνητές και αποδίδονται σε υπολείμματα-προσμίξεις από PAF-AH λόγω ανεπαρκούς καθαρισμού [315]. Η LCAT δεν εμφανίζει σε φυσιολογικές συνθήκες PAF-AH δραστηριότητα αλλά μόνο σε συνθήκες οξειδωτικού στρες όπου χάνεται η βασική της δράση (σχηματισμός ετέρων χοληστερόλης) από τα προϊόντα οξειδωσης και ενεργοποιείται η υδρολυτική της ικανότητα.

Ο ρόλος της PAF-AH στην αθηροσκλήρωση είναι αμφιλεγόμενος καθώς πολλές έρευνες της έχουν αποδώσει τόσο προ-αθηρογόνους όσο και αντι-αθηρογόνους δράσεις. Η κυριότερη αντιαθηρογόνος δράση που της αποδίδεται είναι η υδρόλυση του PAF και των αναλόγων του από τις οξειδωμένες LDL μειώνοντας έτσι τις φλεγμονώδεις δράσεις τους οι οποίες είναι πιθανότατα τα γενεσιουργά αίτια της αθηρογένεσης [50, 316], δρώντας με αυτό τον τρόπο σαν εκκαθαριστής (scavenger) των προϊόντων οξειδωσης [271]. Η βιοσύνθεση της PAF-AH στα μακροφάγα αναστέλλεται *in vitro* από πολλούς προ-φλεγμονώδεις μεσολαβητές όπως το LPS, TNF- α , IL-1, IL-8 και η Ιντερφερόνη- γ (Interferon- γ , IFN- γ) [284, 287, 293, 317, 318], ενώ αντιθέτως η αύξηση της συγκέντρωσης του PAF ενεργοποιεί τη βιοσύνθεση του ενζύμου [284]. Τα δεδομένα επιβεβαιώνονται από μια μελέτη στην οποία

μετρήθηκε μειωμένη δραστικότητα του ενζύμου σε ασθενείς με ρευματοειδή αρθρίτιδα, λόγο μείωσης της έκφρασης και έκκρισης του από τα μακροφάγα, φαινόμενο που αποδόθηκε στη δράση των προ-φλεγμονωδών μεσολαβητών εμφανίζοντας αρνητική συσχέτιση με τη συγκέντρωση του CRP [319]. Μειωμένη δραστικότητα του ενζύμου έχει μετρηθεί και σε άλλες φλεγμονώδεις νόσους όπως το άσθμα [320], ο λύκος [321], η σήψη [322] και η νόσος του Crohn [323]. Σε αντίθεση με τις παραπάνω μελέτες η *in vivo* χορήγηση LPS, TNF- α , IL-1 σε πειραματόζωα οδήγησε σε αύξηση της δραστικότητας του ενζύμου [293, 324].

Η υδρόλυση των οξειδωμένων λιποειδών και του PAF από την PAF-AH αποτρέπει την οξειδωτική τροποποίηση των apoB (που απαρτίζουν την LDL) και κατ' επέκταση και την ίδια την LDL, υποδεικνύοντας ότι για την οξειδωτική τροποποίηση των LDL ευθύνονται τα ολόκληρα μόρια των οξειδωμένων λιποειδών και όχι τα προϊόντα υδρόλυσής τους [81].

Επιπλέον η δράση του ενζύμου αναστέλλει *in vitro* τις προ-αθηρογόνες δράσεις των ox-LDL, συγκεκριμένα τη πρόσδεση ενδοθηλιακών κυττάρων με μονοκύτταρα και παραγωγή MCP-1, οι οποίες οφείλονται στην ύπαρξη οξειδωμένων λιποειδών [325]. Η καταστροφή της PAF-AH στις ox-LDL οδηγεί σε αυξημένη ενεργοποίηση και χημειοκακτισμό των μονοκυττάρων, φαινόμενο το οποίο αναστάλθηκε από αναστολείς του PAF-R [326], ενώ οι ox-LDL από ασθενείς με έλλειψη PAF-AH εμφάνιζαν μεγαλύτερη βιολογική δραστικότητα εν συγκρίσει με την ομάδα ελέγχου [325].

Βέβαια τα προϊόντα της ενζυμικής δράσης της PAF-AH δηλαδή ο λύσο-PAF και τα οξειδωμένα λιποειδή με τη σειρά τους είναι και αυτά προ-φλεγμονώδη μόρια [294-297, 327]. Η μεγάλη περιεκτικότητα των μικρών πυκνών LDL σε PAF-AH αποτρέπει τη συσσώρευση, σε συνθήκες οξειδωτικού στρες, μορίων PAF και άλλων οξειδωμένων PAF-like λιποειδών, υδρολύοντάς τα στα λυσοανάλογά τους [76], αυξάνοντας έτσι τη συγκέντρωσή τους τόσο σε νορμολιπιδαιμικούς όσο και υπερχοληστεραιμικούς ασθενείς [328, 329], η οποία μπορεί να ευνοεί τη δράση της PAF-AH ως τρανσακετυλάσης αυξάνοντας με αυτό τον τρόπο τη συγκέντρωση του PAF όπως προαναφέρθηκε.

Τα αυξημένα επίπεδα του ενζύμου στο πλάσμα έχουν σχετιστεί με αύξηση του κινδύνου εμφάνισης της αθηρωματικής νόσου, χωρίς όμως να έχει

προσδιοριστεί επακριβώς αν είναι το αίτιο ή φυσιολογική αντίδραση του οργανισμού στις φλεγμονώδεις καταστάσεις που επικρατούν κατά τη διαδικασία της αθηρωμάτωσης [330, 331]. Η μεγάλη συγκέντρωση της PAF-AH στο αίμα μπορεί να υποδηλώνει απλά την αυξημένη συγκέντρωση των LDL, αφού η θετική συσχέτισή τους έχει αποδειχθεί από πολλές μελέτες [332, 333]. Η αυξημένη συγκέντρωση των LDL στο αίμα των ασθενών αποτελεί από μόνη της παράγοντα κινδύνου εμφάνισης αθηρωματικής νόσου [334].

Η σύνδεση μεταξύ του σχηματισμού των αθηρωματικών πλακών και της PAF-AH ενισχύεται από διάφορες έρευνες. Η μέτρηση τοπικά στις αθηρωματικές πλάκες ασθενών με ελάχιστη αθηρωματική νόσο έδειξε αυξημένη παραγωγή PAF-AH και LPC [335]. Σε άλλη έρευνα η έκφραση της PAF-AH ήταν αυξημένη σε ασθενείς με συμπτωματικές πλάκες καρωτίδας. Επιπλέον υπήρχε αρνητική συσχέτιση με την περιεκτικότητα των πλακών σε κολλαγόνο, ενώ τα επίπεδα της LPC ήταν αυξημένα [336]. Όταν συγκρίθηκε η σχέση μεταξύ της μάζας και της δραστηριότητας της PAF-AH με τη συγκέντρωση των ox-LDL από ενδο-αρτηριοεκτομές καρωτίδων αποδείχτηκε ότι ο λόγος PAF-AH/ox-LDL ήταν αυξημένος στους ασθενείς [337].

Τα δεδομένα από τις επιδημιολογικές μελέτες για τη συγκέντρωση της PAF-AH στο πλάσμα ασθενών με αθηρωματική νόσο είναι αμφιλεγόμενα όπως και τα εργαστηριακά αποτελέσματα. Σε κάποιες από τις επιδημιολογικές μελέτες μετρήθηκε αύξηση της δραστηριότητας του ενζύμου [338, 339], σε άλλες μείωση [340-342] ενώ σε κάποιες άλλες δεν παρατηρήθηκε καμία διαφορά μεταξύ των ασθενών και των φυσιολογικών [343, 344].

Η πρώτη κλινική μελέτη που έδειξε μια σχέση μεταξύ της μάζας του ενζύμου και της καρδιαγγειακής νόσου ήταν η WOSCOPS το 2000 [330], στην οποία η PAF-AH κατάφερε να προβλέψει την εμφάνιση αθηρωματικής νόσου ανεξάρτητα από άλλους γνωστούς παράγοντες κινδύνου συμπεριλαμβανομένης της αντιδρώσας πρωτεΐνης C (CRP).

Στη συνέχεια σχεδόν όλες οι μελέτες έχουν επιβεβαιώσει τη συσχέτιση σε πολλούς διαφορετικούς πληθυσμούς, ενισχύοντας τη θεώρηση των δράσεων της PAF-AH ως προ-αθηρογόνους [345]. Σε πρόσφατη μετα-ανάλυση η οποία χρησιμοποίησε δεδομένα από 33 κλινικές μελέτες επιβεβαίωσε τη συσχέτιση μεταξύ PAF-AH και κινδύνου εμφάνισης καρδιαγγειακών συμβάντων [346].

Η μελέτη σε πειραματόζωα είναι σχεδόν πάντα απαραίτητη προϋπόθεση για την κλιμάκωση σε κλινική μελέτη εθελοντών. Τα αποτελέσματα όμως των μελετών αυτών δεν μπορούν να θεωρηθούν απολύτως σωστά καθώς τα πειραματόζωα συμπεριφέρονται σε αρκετές περιπτώσεις διαφορετικά από τον ανθρώπινο οργανισμό [347]. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το ότι στα ποντίκια παρατηρείται μεγαλύτερη δραστικότητα, μάζα και αντιαθηρογόνος δράση της PAF-AH στις HDL από ότι στις LDL, αντίθετα από ότι συμβαίνει στον άνθρωπο [348].

Η πιο άμεση μέθοδος είναι η μέτρηση ύπαρξης PAF-AH στις αθηρωματικές πλάκες ή στο πλάσμα των πειραματόζωων [349].

Μια πιο στοχευμένη προσέγγιση είναι η χρήση διαγονιδιακών πειραματόζωων, π.χ. ποντίκια που εκφράζουν ανθρώπινα γονίδια. Σε μια τέτοια μελέτη φάνηκε ότι η αυξημένη έκφραση της ανθρώπινης PAF-AH σε ποντίκια με έλλειψη της από-λιποπρωτεΐνης E (ApoE) προκαλεί μείωση της περιεκτικότητας της αθηρωματικής πλάκας κατά 82% σε ox-LDL, 69% σε μακροφάγα και 84% σε λεία μυϊκά κύτταρα (SMC) με επακόλουθη μείωση των αθηρωματικών πλακών κατά 42% [350], ενώ σε άλλη μελέτη αποδείχθηκε ότι η PAF-AH συνδέεται με όλες τις λιποπρωτεΐνες των ποντικίων και προσφέρει προστασία έναντι του οξειδωτικού στρες [351].

Σε μελέτη με υπερλιπιδαιμικούς χοίρους στους οποίους το φαινόμενο της αθηρωμάτωσης έχει μεγαλύτερη συγγένεια με αυτό στους ανθρώπους, βρέθηκε ότι η δραστικότητα της PAF-AH αυξήθηκε ταχύτατα (στον ένα μήνα) μετά την πρόκληση διαβήτη και υπερχοληστερολαιμίας, ενώ και η έκφραση του γονιδίου παρατηρήθηκε αυξημένη [352].

Σε μια εξαιρετική μελέτη στο ίδιο μοντέλο με χοίρους στους οποίους προκλήθηκε διαβήτης και υπερχοληστερολαιμία, συγχρηγήθηκε ένας ειδικός αναστολέας της PAF-AH το darapladib (SB-480848) [353]. Το darapladib δεν επέδρασε στη γλυκόζη και τη χοληστερόλη του πλάσματος των πειραματόζωων, αλλά ούτε και στην ινσουλίνη που χορηγούνταν στα πειραματόζωα. Αντίθετα το darapladib μείωσε τη δραστικότητα της PAF-AH των πειραματόζωων χαμηλότερα και από τα αρχικά επίπεδά της παρότι η δίαιτα και ο διαβήτης τα αύξησαν κατά 230% στα πειραματόζωα που δεν λάμβαναν το σκεύασμα. Στις αρτηρίες των διαβητικών πειραματόζωων μετρήθηκε αύξηση της LPC κατά 305%, ενώ και η σύσταση των λιπαρών

οξέων των υπολοίπων φωσφολιποειδών διαφοροποιήθηκε μεταξύ των δύο ομάδων. Μια από τις πολύ σημαντικές μετρήσεις της έρευνας ήταν η ρύθμιση γονιδίων που εμπλέκονται άμεσα με την αθηροσκλήρωση και την φλεγμονή γενικότερα. Μεταξύ των γονιδίων που μειώθηκε η ρύθμιση πάνω από 50% ήταν φυσικά αυτό της PAF-AH, της IL-1 αλλά και του υποδοχέα του PAF. Τα δεδομένα αυτά συμφωνούν και με τη μορφολογική ανάλυση των πλακών η οποία έδειξε μείωση της επιφάνειας και γενικότερα της έκτασης καθώς επίσης και του νεκρωτικού πυρήνα των αθηρωματικών πλακών στα πειραματόζωα που χορηγήθηκε το darapladib. Οι πλάκες των διαβητικών/υπερχοληστερολαιμικών πειραματόζωων ήταν πλούσιες σε μακροφάγα, ενώ σε εκείνα που τους χορηγήθηκε το darapladib είχαν πλάκες πλούσιες σε SMC [354]. Η χορήγηση του darapladib σε ασθενείς με διαπιστωμένη αγγειακή νόσο (μετρημένη με αγγειογραφία) επέφερε μείωση του νεκρωτικού πυρήνα των αθηρωματικών πλακών φαινόμενο το οποίο αποδόθηκε στη μείωση της δραστηριότητας της PAF-AH και των πρωτεασών κασπάση 3 & 8 οι οποίες σχετίζονται με τον αποπρωτικό θάνατο των κυττάρων [355], ενώ δεν παρατηρήθηκαν διαφοροποιήσεις σε άλλους φλεγμονώδεις δείκτες (πχ CRP) πιθανότατα λόγω του ότι ήταν ήδη χαμηλά από τη λήψη στατινών και δεν μπορούσε να βελτιωθεί περαιτέρω [356], παρότι σε προηγούμενη μελέτη σε ασθενείς με σταθερή (stable) καρδιαγγειακή νόσο, παρατηρήθηκε εκτός από τη μείωση της δραστηριότητας της PAF-AH και ταυτόχρονη μείωση τόσο της CRP όσο και της IL-6 η οποία σχετίζεται άμεσα [357]. Πρόσφατες μελέτες πρόσδεσης *in silico* έδειξαν ότι το darapladib μπορεί να είναι αγωνιστής του PAFR καθώς μπορεί να προσδένεται στον υποδοχέα με ανάλογη συγγένεια με τον PAF. Επίσης το rilapladib προσδένεται στον υποδοχέα αλλά με μικρότερη συγγένεια [358]. Η πρόσδεση του Darapladib στον υποδοχέα του PAF μπορεί να εξηγήσει την παρατηρούμενη μείωση του νεκρωτικού πυρήνα της αθηρωματικής πλάκας ασθενών που το έλαβαν. Αυτό το αποτέλεσμα μπορεί να αποδοθεί στο γεγονός ότι τα μακροφάγα λαμβάνουν την oxLDL μέσω των CD36. Οι oxLDL ενισχύουν την έκφραση των CD36, ενώ οι αναστολείς του PAF αναστέλλουν το φαινόμενο [359, 360].

3.6 Ιντερλευκίνη-6 (Interleukin-6, IL-6)

Η IL-6 είναι μια γλυκοπρωτεΐνη 26-kDa, μονής αλυσίδας, η οποία παράγεται από πολλών ειδών κύτταρα. Συμπεριλαμβανομένων των μονοκυττάρων, των μακροφάγων, των ενδοθηλιακών, αλλά και των κυττάρων του λιπώδους ιστού. Η IL-6 ενεργοποιεί τα μακροφάγα ώστε να εκκρίνουν MCP-1 ενώ επιδρά στον πολλαπλασιασμό των λείων μυϊκών κυττάρων. Επιπλέον τα ενδοθηλιακά κύτταρα όταν ενεργοποιηθούν από IL-6, εκφράζουν το (ICAM-1) [361]. Η ένεση μεγάλων δόσεων ανασυνδυασμένης IL-6 σε ποντικούς επέφερε αυξημένη εμφάνιση λιπαρών πλακών [362]. Η IL-6 αποτελεί την κύρια προθρομβωτική κυτοκίνη [363], όμως η κυριότερη δράση της είναι η ενίσχυση της φλεγμονώδους απόκρισης μέσω της οποίας πιθανότατα εμφανίζονται και οι προφλεγμονώδεις δράσεις της στο αρτηριακό τοίχωμα. Η υπόθεση ενισχύεται από την ύπαρξη μεγάλων ποσοτήτων της IL-6 σε ανθρώπινες αθηρωματικές πλάκες [364, 365] και συγκεκριμένα στις παρυφές (ώμους) των σταθερών αλλά και των ασταθών πλακών μαζί με τον υποδοχέα της τύπου 1 αγγειοτενσίνης II [366], η παραγωγή του οποίου εξαρτάται από την IL-6. Η υπερέκφραση του υποδοχέα οδηγεί σε αγγειοσυστολή προκαλούμενη από την αγγειοτενσίνη II, η οποία με τη σειρά της οδηγεί στο σχηματισμό δραστικών μορφών οξυγόνου τα οποία τελικά οδηγούν στην εμφάνιση δυσλειτουργίας του ενδοθηλίου [367]. Αρκετές κλινικές και επιδημιολογικές μελέτες έχουν μελετήσει την προγνωστική ικανότητα της συκέντρωσης της IL-6 στο πλάσμα για την εμφάνιση καρδιαγγειακού επεισοδίου. Σε ασθενείς με unstable angina, τα αυξημένα επίπεδα της IL-6 για 48h μετά την εισαγωγή τους στο νοσοκομείο, σχετίστηκαν με αυξημένη πιθανότητα νοσηρότητας και θνησιμότητας [368]. Η μελέτη Fragmin and Fast Revascularization During Instability in Coronary Artery Disease II (FRISC II) [369] όχι μόνο επιβεβαίωσε την προβλεπτική ικανότητα της IL-6, αλλά επιπλέον επέδειξε ότι ασθενείς με αυξημένες συγκεντρώσεις της, είναι πιθανότερο να ωφεληθούν από μια εγχειρητική επέμβαση. Αρκετές προοπτικές μελέτες έχουν δείξει ότι τα βασικά επίπεδα της IL-6 προβλέπουν ισχυρά την πιθανότητα εμφάνισης καρδιαγγειακού επεισοδίου σε υγιείς ασυμπτωματικούς ανθρώπους του γενικού πληθυσμού [370-373]. Παρότι η IL-6 έχει αρκετά καλή προγνωστική ικανότητα, το ότι δεν έχει ακόμα

συμπεριληφθεί στη καθημερινή πρακτική οφείλεται κυρίως σε προβλήματα αναλυτικής φύσεως.

3.7 Ινωδογόνο (Fibrinogen)

Αρκετές μεγάλες μελέτες δείχνουν ότι η συγκέντρωση του ινωδογόνου προβλέπει τον κίνδυνο εμφάνισης εμφράγματος του μυοκαρδίου και εγκεφαλικού επεισοδίου [374-376]. Όταν όμως συγκρίθηκε ένα προς ένα με το CRP, το ινωδογόνο φάνηκε να είναι λιγότερο ισχυρός δείκτης εμφάνισης καρδιαγγειακών συμβάντων [377]. Επιπλέον το ινωδογόνο έχει μεγάλες ημερήσιες διακυμάνσεις, με μικρή επαναληψιμότητα των μετρήσεων, μειώνοντας την πιθανότητα χρήσης του ως δείκτη της αθηρωμάτωσης.

3.8 Αναστολέας του ενεργοποιητή του πλασμινογόνου 1(Plasminogen activator inhibitor 1, PAI-1)

Το PAI-1 κυκλοφορεί στο αίμα με χρόνο ημιζωής της τάξης των 6min ενώ εμφανίζει διακυμάνσεις μέσα στο εικοσιτετράωρο. Η παραγωγή και κατά συνέπεια και η συγκέντρωσή του επηρεάζεται από γενετικές προδιαθέσεις [378, 379], αντίσταση στην ινσουλίνη [380] και νευροορμονικούς παράγοντες [381]. Συνεπώς το PAI-1 μπορεί να αποτελέσει ένα περίπλοκο δείκτη φλεγμονής, ελέγχου του μεταβολισμού και νευροορμονικής ενεργοποίησης, τα οποία μπορούν να δράσουν είτε αυτόνομα ή συνεργατικά στην καρδιαγγειακή νόσο. Η αυξημένη συγκέντρωση του PAI-1 προβλέπει την εμφάνιση εμφράγματος του μυοκαρδίου σε μεσήλικες άνδρες και γυναίκες [382].

Φαρμακευτικά σκευάσματα τα οποία μειώνουν το καρδιαγγειακό κίνδυνο, επίσης επιδρούν στη συγκέντρωση του PAI-1. Οι αναστολείς του μετατρεπτικού ενζύμου της αγγειοτενσίνης σε διάφορες μελέτες έχει φανεί να μειώνουν τη συγκέντρωση του PAI-1 σε διάφορες εθνικότητες τόσο στη πρωτογενή όσο και τη δευτερογενή πρόληψη [383, 384].

Στα αρνητικά του PAI-1 σαν δείκτης είναι ότι πρέπει να ληφθεί αίμα πολύ προσεκτικά και τα δείγματα να αναλυθούν άμεσα, μειώνοντας την πρακτικότητά του, ενώ αμφισβητείται και το κατά πόσο αποτελεί ανεξάρτητο παράγοντα κινδύνου, καθώς μέχρι στιγμής δεν υπάρχει κάποια ένδειξη ότι η γνώση των βασικών επιπέδων του PAI-1 βελτιώνει τη πρόβλεψη του κινδύνου βάση της μελέτης Framingham.

3.9 Διαλυτός προσδέτης CD40 (Soluble CD40 Ligand)

Τα μόρια CD40 και CD40L (CD 154), ανήκουν στη υπεροικογένεια των TNF και συνεκφράζονται από όλα τα κύρια κύτταρα που συνδέονται με την αθηρωμάτωση και πιο συγκεκριμένα με τα ενεργοποιημένα T-λεμφοκύτταρα, τα αγγειακά ενδοθηλιακά κύτταρα, τα λεία μυϊκά κύτταρα και τα μονοκύτταρα/μακροφάγα. Τόσο ο υποδοχέας όσο και ο προσδέτης έχουν βιολογικές δράσεις και η αλληλεπίδρασή τους προκαλεί την έκφραση προαθηρογόνων μορίων όπως μορίων προσκόλλησης, χυμοκίνες, κυτταροκίνες, παράγοντες ανάπτυξης. Οι οξειδωμένες LDL (OxLDL) μπορεί να αποτελούν το έναυσμα για την παραγωγή των CD40/CD40L [385]. Η σημαντική σηματοδοτική δράση των CD40 στην ανάπτυξη των αθηρωματικών πλακών έχει αποδειχθεί από μελέτες που χρησιμοποίησαν ποντίκια με ανεπάρκεια στον υποδοχέα της LDL. Η παρεμβολή στο σηματοδοτικό μονοπάτι της CD40 μείωσε δραματικά τη *de novo* σύνθεση αλλά και την εξέλιξη των ήδη σχηματισμένων αθηρωματικών πλακών [386, 387]. Επιπλέον αύξησε δραματικά τη συγκέντρωση του κολλαγόνου σε αθηρωματικές πλάκες ποντικών αλλάζοντας τον φαινότυπο τους σε πιο σταθερές πλάκες [387, 388]. Η ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων ύστερα από τη ρήξη της αθηρωματικής πλάκας προκαλεί αύξηση στην έκφραση του CD40L στην επιφάνεια όπου και αποκόπτεται σχηματίζοντας το διαλυτό (s) CD40L. Το sCD40L ενεργοποιεί τα ενδοθηλιακά κύτταρα τα οποία με τη σειρά τους παράγουν CD40 ενεργοποιώντας ένα καταρράκτη φλεγμονωδών αποκρίσεων στο αγγείο.

Μελέτες σε ανθρώπους έχουν δείξει ότι η συγκέντρωση του sCD40L σχετίζεται με αυξημένη συγκέντρωση λιπιδίων εντός της αθηρωματικής πλάκας σε ασθενείς με ήδη σχηματισμένες καρωτιδικές πλάκες [389]. Η συγκέντρωση του sCD40L επηρεάζεται πολύ από τις συνθήκες δειγματοληψίας ενώ μπορεί να μετρηθεί μόνο σε δείγματα πλάσματος [390, 391]. Το sCD40L σχετίζεται και προβλέπει την ύπαρξη μεταβολικού συνδρόμου [392]. Παρόλα αυτά το sCD40L δεν μπορεί να προβλέψει την ύπαρξη ασυμπτωματικής αθηρωματικής νόσου στον γενικό πληθυσμό, όπως έδειξε η Dallas Heart Study [393]. Αντίθετα σε ασθενείς με σταθερή αρτηριακή νόσο, μετρημένη με αγγειογραφία υπάρχει άμεση συσχέτιση μεταξύ

αθηρωματικού φορτίου, στένωσης του αγγείου και νεκρωτικού πυρήνα με αυξημένη συγκέντρωση του κυκλοφορούντος στο αίμα sCD40L [394, 395].

Η μελέτη Women's Health Study έδειξε ότι αυξημένη συγκέντρωση sCD40L σχετίζεται με αυξημένο αγγειακό κίνδυνο σε φαινομενικά υγιείς γυναίκες [396]. Τα βασικά επίπεδα του sCD40L ήταν αυξημένα στις εθελόντριες που στη συνέχεια εμφάνισαν έμφραγμα του μυοκαρδίου, εγκεφαλικό επεισόδιο και θάνατο από καρδιαγγειακό συμβάν, σε σύγκριση με τις εθελόντριες ίδιας ηλικίας και λοιπών παραγόντων κινδύνου που δεν εμφάνισαν καρδιαγγειακό συμβάν στα τέσσερα χρόνια της μελέτης. Συγκεκριμένα στις γυναίκες στις οποίες οι συγκεντρώσεις του sCD40L ανήκαν στο 95 εκατοστημόριο και πάνω εμφάνισαν αύξηση του σχετικού κινδύνου για καρδιαγγειακό συμβάν κατά 2,8 [396]. Η αυξημένη συγκέντρωση του sCD40L σε ασυμπτωματικούς ασθενείς με μικρή στένωση της καρωτίδας επίσης αποτελεί ένδειξη κινδύνου για την εμφάνιση καρδιαγγειακού συμβάντος [397]. Σε ασθενείς με νεφρική ανεπάρκεια τα αυξημένα επίπεδα του sCD40L προσδίδουν μια αύξηση του σχετικού κινδύνου κατά 6,8 για την αύξηση εμφάνισης θανατηφόρου ή μη θρομβωτικού επεισοδίου [398].

Ένα ενδιαφέρον χαρακτηριστικό του βιοχημικού δείκτη είναι ότι τα αυξημένα του επίπεδα μεταφράζονται εύκολα σε στοχευμένη αντιαιμοπεταλιακή αγωγή του ασθενούς με αναστολείς του υποδοχέα της γλυκοπρωτεΐνης GPIIb/IIIa [399].

3.10 Πρωτεΐνη σχετιζόμενη με το μυελοειδές 8/14 (Myeloid-related protein 8/14, MRP 8/14)

Η MRP-14 εκκρίνεται κυρίως από τα αιμοπετάλια και τα μακροφάγα και σχηματίζει ετεροδιμερή με τη MRP-8. Τα αυξημένα επίπεδα των MRP-8/14 σε υγιή άτομα αποτελούν παράγοντα κινδύνου για την εμφάνιση καρδιαγγειακών συμβάντων, ενώ σε ασθενείς αποτελεί ανεξάρτητο παράγοντα κινδύνου προστιθέμενο στους υπόλοιπους [400].

3.11 Αδιπονεκτίνη (Adiponectin)

Η αδιπονεκτίνη προκαλεί ευαισθησία στην ινσουλίνη, ενώ η έκκρισή της σχετίζεται αρνητικά με την αύξηση του λιπώδους ιστού. Η μείωση του σωματικού βάρους κατά 10% μέσω άθλησης και χαμηλής ενέργειας

Μεσογειακή δίαιτα σε παχύσαρκες γυναίκες (BMI 30Kg/m²) χωρίς διαβήτη υπέρταση και υπερλιπιδαιμία επέφερε μείωση του BMI με ταυτόχρονη αύξηση της συγκέντρωσης της αδιπονεκτίνης [401]. Ασθενείς με παχυσαρκία, διαβήτη τύπου 2, συστηματική υπέρταση, δυσλιπιδαιμία και καρδιαγγειακή νόσο εμφανίζουν μικρότερες συγκεντρώσεις αδιπονεκτίνης εν συγκρίσει με υγιείς μάρτυρες [402, 403]. Πειραματικά και κλινικά δεδομένα υποδηλώνουν ότι η αδιπονεκτίνη αποτελεί το συνδετικό κρίκο μεταξύ παχυσαρκίας, ινσουλινοαντίστασης και καρδιαγγειακής νόσου, ενώ η συγκέντρωσή της σχετίζεται αρνητικά με τις προϋποθέσεις για εμφάνιση μεταβολικού συνδρόμου [404].

Σε έρευνες που έχουν πραγματοποιηθεί η χαμηλή συγκέντρωση αδιπονεκτίνης σε μη διαβητικούς προέβλεψε την εμφάνιση υπέρτασης [405] και αύξηση του κινδύνου εμφάνισης καρδιαγγειακού συμβάντος [406], ενώ σε άλλη έρευνα σχετίστηκε αρνητικά και ανεξάρτητα από άλλους παράγοντες κινδύνου με την πάχυνση της καρωτιδικής αρτηρίας [407].

Τα αποτελέσματα επιβεβαιώθηκαν και σε άνδρες με διαβήτη τύπου 2, πάλι ανεξάρτητα από άλλους παράγοντες κινδύνου, ινσουλινοαντίστασης και συγκεντρώσεως CRP [408].

Ασθενείς με αγγειογραφικά επιβεβαιωμένη στεφανιαία νόσο εμφανίζουν μικρότερες συγκεντρώσεις αδιπονεκτίνης εν συγκρίσει με τους αντίστοιχους υγιείς [409], ενώ επόμενη μελέτη επιβεβαίωσε τα αποτελέσματα και σε διαφορετικές εθνικότητες [410].

Η συγκέντρωση της αδιπονεκτίνης πλάσματος σχετίζεται αρνητικά με την έκταση και την πολυπλοκότητα (μακριές αθηρωματικές πλάκες με μεγάλο βαθμό στένωσης, εξελκώσεις και ανώμαλο σχήμα) των αθηρωματικών πλακών που μετρήθηκαν με αγγειογραφία σε άνδρες με στεφανιαία νόσο [411], υποδηλώνοντας ότι τα χαμηλά επίπεδα αδιπονεκτίνης σχετίζονται με την εμφάνιση ασταθών αθηρωματικών πλακών.

Τελευταίες έρευνες από την άλλη έχουν δείξει κάποια αντικρουόμενα αποτελέσματα. Σε μια προοπτική μελέτη 20 ετών τα βασικά επίπεδα της αδιπονεκτίνης δεν σχετίστηκαν με την εμφάνιση θανατηφόρου καρδιαγγειακού επεισοδίου [412], ενώ σε άλλη προοπτική έρευνα 6 χρόνων τα υψηλά επίπεδα αδιπονεκτίνης σχετίστηκαν με την αύξηση θανάτου τόσο από

καρδιαγγειακό συμβάν όσο και από άλλους λόγους, ανεξάρτητα από την ύπαρξη ή μη καρδιαγγειακής νόσου [413].

3.12 Ιντερλευκίνη 18 (Interleukin 18, IL-18)

Η IL-18 είναι μια προφλεγμονώδης κυτοκίνη με πλειοτροπικές δράσεις η οποία εκφράζεται ευρέως από διάφορα είδη κυττάρων [414]. Οι κυριότερες δράσεις της στην αθηρωματική νόσο είναι η επαγωγή βιοσύνθεσης της IFN- γ [415] που έχει σαν επακόλουθο την ενεργοποίηση της ανοσολογικής απόκρισης των Th1, ενώ ταυτόχρονα ενεργοποιεί τη βιοσύνθεση των μεταλοπρωτεασών [416-418], γεγονότα τα οποία αναδεικνύουν το ρόλο της IL-18 σαν ένα κύριο μεσολαβητή στην αποσταθεροποίηση και τελικά τη ρήξη της αθηρωματικής πλάκας.

Στις αθηρωματικές πλάκες με μεγάλη πιθανότητα για ρήξη έχει παρατηρηθεί αυξημένη έκφραση της IL-18 κυρίως στα μακροφάγα που βρίσκονται μέσα στη πλάκα [416, 419].

Η IL-18 εκκρίνεται αυθόρμητα από τα ανθρώπινα προ-λιποκύτταρα σε όλα τα στάδια της διαφοροποίησής τους, συνδέοντας πιθανά με αυτό το φαινόμενο τα παρελκόμενα της παχυσαρκίας, όπως ο διαβήτης και η καρδιαγγειακή νόσος, καθώς τα λιποκύτταρα των παχύσαρκων παράγουν την τριπλάσια ποσότητα IL-18 από τα αντίστοιχα των υγιών [420]. Τα αυξημένα επίπεδα IL-18 σχετίζονται με σημαντικά αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης διαβήτη τύπου 2 και μεταβολικού συνδρόμου [421, 422].

Σε πειραματικά μοντέλα αθηρωμάτωσης η αναστολή της IL-18 με τη χρήση αναστολέα (IL-18 binding protein) επέφερε μείωση της έκτασης και του μεγέθους των αθηρωματικών πλακών σε ποντίκια με έλλειψη της apoE [423], ενώ σε ποντίκια με διπλά αποσιωπημένη την έκφραση της IL-18 και της apo-E επίσης παρατηρήθηκε μειωμένη έκταση αθηρωμάτωσης [424], ενισχύοντας περαιτέρω το ρόλο της IL-18 ως προφλεγμονώδους μορίου. Η άμεση έγχυση IL-18 επέφερε αθηρογένεση μέσω της IFN- γ [425], ακόμα και απουσία κυττάρων [426], ενώ επέφερε/προώθησε τη μετατροπή του φαινοτύπου των πλακών σε ευπαθή, μειώνοντας το κολλαγόνο και το λόγο καλύμματος προς πυρήνα της πλάκας [427].

Παρότι τα πειραματικά δεδομένα είναι σχετικά συνεπή μεταξύ τους, τα κλινικά δεδομένα για ασθενείς με καρδιαγγειακή νόσο είναι αντικρουόμενα [428-430].

Παρόλα αυτά η IL-18 δεν θεωρείται ως ένας χρήσιμος βιοχημικός δείκτης για τη μελέτη της αθηροσκλήρωσης στο γενικό πληθυσμό καθώς 2 μεγάλες έρευνες δεν έδειξαν ανεξάρτητη συσχέτισή της με την πάχυνση της καρωτιδικής αρτηρίας [431, 432]. Παραδόξως στη μελέτη AtheroGene τα επίπεδα της IL-18 στον ορό ασθενών προέβλεψε ανεξάρτητα το θάνατο από καρδιαγγειακό συμβάν ασθενών με καταγεγραμμένη στεφανιαία νόσο [433], καθώς οι ασθενείς που ανήκαν στο τέταρτο τεταρτημόριο είχαν 3,3 φορές μεγαλύτερο κίνδυνο από αυτούς στο πρώτο κατά τη διάρκεια των 3,9 χρόνων παρακολούθησης των ασθενών, προβλεπτική ικανότητα που χάθηκε όμως στα 5,9 χρόνια παρακολούθησης, θέτοντας υπό αμφισβήτηση τη χρησιμότητα της IL-18 ως δείκτης αθηρωμάτωσης [434]. Τα δεδομένα από τη μελέτη PRIME (Prospective Epidemiological Study of Myocardial Infarction) έδειξαν μια ανεξάρτητη συσχέτιση μεταξύ των βασικών επιπέδων IL-18 στο πλάσμα υγιών μεσήλικων ανδρών και την εμφάνιση στεφανιαίου επεισοδίου [435]. Στη μελέτη MONICA/KORA Augsburg η οποία αφορούσε υγιείς μεσήλικες άνδρες και γυναίκες με μέσω όρο παρακολούθησης τα 11 χρόνια, αντίθετα φάνηκε ότι η προβλεπτική ικανότητα της IL-18 αφορούσε μόνο άνδρες οι οποίοι είχαν ήδη εμφανίσει καρδιαγγειακή νόσο [436].

3.13 Μεταλοπρωτεάση μήτρας 9 (Matrix metalloprotease 9, MMP9)

Οι μεταλοπρωτεάσες μήτρας ανήκουν σε μια οικογένεια ενδοπεπτιδασών με πολλά ενεργά κέντρα τα οποία εξαρτώνται από ψευδάργυρο. Οι μεταλοπρωτεάσες αποικοδομούν τις πρωτεΐνες και πρωτεογλυκάνες της εξωκυττάριας μήτρας [437] και εκφράζονται από μονοκύτταρα, μακροφάγα, ινοβλάστες, ενδοθηλιακά και λεία μυϊκά κύτταρα [438].

Οι μεταλοπρωτεάσες διαχωρίζονται βάση της δομής τους και της ειδικότητάς τους ως προς το υπόστρωμα, με κυριότερες τις κολλαγενάσες (MMP1, 8, 13), τις ζελατινάσες (MMP2 and MMP9) και μεταλοελαστάσες (MMP12) [437].

Οι μεταλοπρωτεάσες φυσιολογικά εμπλέκονται στη θεραπεία πληγών και την επαναρρόφηση των ιστών, όμως η δυσλειτουργία τους μπορεί να οδηγήσει σε αγγειακή και καρδιακή αναδόμηση [437]

Πολλές μελέτες έχουν αποδείξει το ρόλο τους στην αθηρογένεση [438] , δεδομένα που επιβεβαιώνονται από την αυξημένη έκφραση τους στις

αθηρωματικές πλάκες ειδικά σε περιοχές πλούσιες σε μακροφάγα, όπως είναι οι «ώμοι» [439].

Η σκλήρυνση της αορτής αποτελεί ένα ανεξάρτητο καρδιαγγειακό παράγοντα κινδύνου και σχετίζεται θετικά με τη συγκέντρωση της κυκλοφορούσας στο αίμα MMP-9, αναδεικνύοντας το ρόλο του ενζύμου στη συστολική υπέρταση [440], ενώ ασθενείς με συστηματική στεφανιαία νόσο έχουν αυξημένα επίπεδα της στο αίμα, σε σύγκριση με αντίστοιχους υγιείς [394], ενώ σχετίζεται θετικά με τη συγκέντρωση της LDL-C και αρνητικά με την HDL-C [441].

Η αύξηση των επιπέδων της MMP-9 στο πλάσμα ασθενών με θρομβωτικό επεισόδιο κατά 2-3 φορές και η επακόλουθη μείωση τους μέσα σε μια εβδομάδα από αυτό σε φυσιολογικά επίπεδα δείχνουν τη συσχέτιση του ενζύμου με τη παθογένεια της ρήξης των αθηρωματικών πλακών [442, 443]. Σε μια προοπτική μελέτη 4,4 χρόνων τα αυξημένα βασικά επίπεδα MMP-9 στο αίμα ασθενών με $\geq 50\%$ στένωση της καρωτίδας σχετίζεται ανεξάρτητα με διπλασιασμό του κινδύνου για θάνατο από καρδιαγγειακό επεισόδιο [444]. Σε άλλη προοπτική μελέτη 4,1y με ασθενείς που είχαν καταγεγραμμένη στεφανιαία νόσο, οι ασθενείς με αυξημένα τα βασικά επίπεδα της MMP-9 είχαν περισσότερα θανατηφόρα καρδιαγγειακά επεισόδια [445]. Το ενδιαφέρον από αυτή τη μελέτη είναι ότι και οι αυξημένες συγκεντρώσεις των ενδογενών ιστικών αναστολέων των μεταλοπρωτεασών (TIMP) ήταν ικανές για να προβλέψουν θάνατο από καρδιακό επεισόδιο [446], δεδομένα που επιβεβαιώθηκαν και από άλλους ερευνητές [447].

3.14 Υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (Glutathione peroxidase, GPx)

Η GPx είναι ένα ένζυμο που περιέχει σελήνιο με ισχυρές αντιοξειδωτικές ιδιότητες [448], καθώς έχοντας σαν υπόστρωμα τη γλουταθειόνη ανάγει το υπεροξειδίο του υδρογόνου και τα υπεροξειδία των λιπαρών οξέων σε νερό και λιπαρές αλκοόλες αντίστοιχα [449]. Μέχρι σήμερα έχουν απομονωθεί και χαρακτηριστεί 4 ισομορφές του ενζύμου, με ευρύτερα μελετημένη την GPx-1, η οποία είναι ενδοκυτταρική. Πειράματα που έχουν πραγματοποιηθεί σε ποντίκια με αποσιωπημένο το ένζυμο της GPx-1, έδειξαν αυξημένη οξειδωση των LDL [450] ή εκτεταμένη δυσλειτουργία του ενδοθηλίου η οποία αποδόθηκε στην έλλειψη του NO [451].

Στο ένζυμο έχει ακόμα αποδοθεί η μείωση της μεταγραφής της 5-λιποξυγενάσης, αλλά και μείωση της βιοσύνθεσης των λευκοτριενίων και των προστανοϊδών σε μονοκύτταρα, μακροφάγα, ενδοθηλιακά και αιμοπετάλια [452].

Σε μία προοπτική μελέτη [453] διερευνήθηκε η σχέση μεταξύ εμφάνισης καρδιαγγειακού συμβάντος (CV event) με τα βασικά επίπεδα της GPx-1 των ερυθροκυττάρων και της δισμουτάσης του υπεροξειδίου, σε 636 ασθενείς με εκδηλωμένη καρδιαγγειακή νόσο (CHD). Η μελέτη έδειξε ότι υπάρχει αρνητική συσχέτιση μεταξύ του κινδύνου και των επιπέδων της GPx-1. Τα πολύ ενδιαφέροντα αποτελέσματα όμως θα πρέπει να επιβεβαιωθούν και από επόμενες κλινικές μελέτες.

3.15 Μυελουπεροξειδάση (Myeloperoxidase, MPO)

Η MPO είναι μέλος της υπερ-οικογένειας των υπεροξειδασών της αίμης, η οποία παράγεται στα λευκοκύτταρα και εκκρίνεται ύστερα από την ενεργοποίηση και αποκοκκίωσή τους [454].

Υπάρχουν αρκετά μονοπάτια μέσω των οποίων θα μπορούσε να εκδηλώσει τις αρνητικές δράσεις τις η MPO. Η MPO μαζί με άλλα ένζυμα όπως η λιποξυγενάση μπορούν να εκκινήσουν την οξειδωση των λιποειδών στον υποενδοθηλιακό χώρο εντός των αγγείων, καθώς έχουν μετρηθεί αυξημένα επίπεδά της σε ανθρώπινες αθηρωματικές πλάκες [454]. Επιπλέον η χρήση του NO σαν υπόστρωμα οδηγεί σε έλλειψή του, επιφέροντας δυσλειτουργία του ενδοθηλίου όπως συμβαίνει και στην περίπτωση της γλουταθειόνης [455]. Αλλά ίσως η σημαντικότερη δράση της MPO και του κυριότερου προϊόντος της, του HOCl, είναι η ενεργοποίηση των μεταλλοπρωτεασών [456], με την ταυτόχρονη αδρανοποίηση των αναστολέων τους [457], ευνοώντας έτσι τη λέπτυνση του ινώδους καλύμματος της αθηρωματικής πλάκας και τελικά τη ρήξη του.

Στα πειραματικά αυτά δεδομένα συνηγορούν και τα αποτελέσματα από δύο προοπτικές μελέτες σε ασθενείς. Η μάζα της MPO μετρήθηκε στην έρευνα CAPTURE (c7E3 Anti-Platelet Therapy in Unstable Refractory angina), η οποία αφορούσε 1090 ασθενείς με ACS. Στη μελέτη αυτή τα βασικά επίπεδα της MPO είχαν την ικανότητα να προβλέψουν αυξημένο κίνδυνο για εκδήλωση θανατηφόρου καρδιαγγειακού επεισοδίου [458].

Σε μια άλλη μελέτη σε ασθενείς με πόνο στο στήθος, η μέτρηση της MPO την ώρα της εισαγωγής τους είχε την ικανότητα να προβλέψει την εμφάνιση εμφράγματος του μυοκαρδίου [459]. Τα δεδομένα αυτά δείχνουν ότι η MPO μπορεί να αποτελέσει ένα χρήσιμο δείκτη για την εκδήλωση καρδιαγγειακού επεισοδίου, όμως τα αποτελέσματα θα πρέπει να επιβεβαιωθούν και από άλλες έρευνες

3.16 Χημειοτακτική πρωτεΐνη-1 των μονοκυττάρων (Monocyte chemotactic protein 1, MCP-1)

Η MCP-1 (CCL2) είναι η πιο σημαντική χημοκίνη η οποία ρυθμίζει τη μετανάστευση και διείσδυση των μονοκυττάρων και των μακροφάγων. Η δράση της πραγματοποιείται μέσω των υποδοχέων CC2 των χημοκινών (CCR2). Το MCP-1 εκφράζεται από ενδοθηλιακά κύτταρα, μονοκύτταρα, και/ή λεία μυϊκά κύτταρα σαν απόκριση σε διέγερση από διάφορες κυτοκίνες, αυξητικούς παράγοντες, oxLDL, και CD40L [460], οπότε αναμενόμενα η έκφρασή του είναι αυξημένη μέσα στις αθηρωματικές πλάκες, ειδικότερα σε περιοχές πλούσιες σε μακροφάγα [461]. Το MCP-1 προκαλεί χρόνια φλεγμονή στο αγγείο, αυξάνει τον πολλαπλασιασμό και τη μετανάστευση των λείων μυϊκών κυττάρων, μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων, νεοαγγειογένεση στην πλάκα, οξειδωτικό στρες και θρόμβωση [462]. Η ενεργοποίηση του βιοχημικού μονοπατιού του MCP-1/CCR2 έχει αποδειχθεί ότι ενεργοποιεί τη βιοσύνθεση των MMPs [463], εμπλέκοντας άμεσα το MCP-1 με την αποσταθεροποίηση της αθηρωματικής πλάκας. Σε ζωικά μοντέλα αθηροσκλήρωσης, η έκφραση του MCP-1 σχετίστηκε άμεσα με την έκταση της αθηρωματικής βλάβης και της διείσδυσης των μακροφάγων σε αυτές [464] ενώ η χορήγηση αντισωμάτων κατά του MCP-1 σε ποντίκια με αποσιωπημένο το γονίδιο της apoE λιποπρωτεΐνης και εκτενή αθηρωμάτωση επέφερε μείωση της ανάπτυξης και αποσταθεροποίηση της βλάβης [465]. Σε συμφωνία με τα πειραματικά δεδομένα είναι και τα αποτελέσματα της μελέτης OPUS-TIMI 16 (Orbofiban in Patients with Unstable Coronary Syndromes) στην οποία τα αυξημένα επίπεδα του MCP-1 σχετίστηκαν με τον κίνδυνο θανάτου από έμφραγμα του μυοκαρδίου εντός 10 μηνών ανεξάρτητα από αρκετούς παράγοντες κινδύνου, νεφρική λειτουργία, και δείκτες νέκρωσης και φλεγμονής [466]. Στη μελέτη MONICA/KORA

Augsburg database, αντίθετα τα αυξημένα επίπεδα του MCP-1 παρότι προέβλεψαν την εμφάνιση συμβάντος δεν το κατάφεραν ανεξάρτητα από άλλους βασικούς παράγοντες κινδύνου [467].

3.17 Αυξητικός παράγοντας πλακούντα (Placental Growth Factor, PIGF)

Ο PIGF αποτελεί ένα ακόμα πιθανό δείκτη για την αστάθεια της αθηρωματικής πλάκας. Ο PIGF είναι μια αγγειογενετική πρωτεΐνη περίπου 50-kDa, ενώ εμφανίζει ομολογία κατά 40% στην αλληλουχία των αμινοξέων με τον VEGF [468]. Ο PIGF όπως προδίδει το όνομά του αρχικά ανακαλύφθηκε στον πλακούντα, αλλά πλέον έχει βρεθεί ότι εκφράζεται στην καρδιά, τους πνεύμονες και στο θυρεοειδή [468]. Ιδιαίτερα αυξημένη ήταν η συγκέντρωσή του εντός των αθηρωματικών πλακών [469]. Ο PIGF προκαλεί πολλαπλασιασμό και μετανάστευση των ενδοθηλιακών και λείων μυϊκών κυττάρων, χημειοτακτική προσέλκυση των κυκλοφορούντων μονοκυττάρων και μακροφάγων στις αθηρωματικές πλάκες, αλλά και βιοσύνθεση πολλών κυτταροκινών όπως του TNF- α [469, 470]. Επιπλέον ο PIGF σχηματίζει ετεροδιμερές με τον VEGF, αυξάνοντας τις ανεπιθύμητες δράσεις του παράγοντα αυτού [468].

Πειραματικές μελέτες που πραγματοποιήθηκαν σε ποντίκια apoE^{-/-} και ανεπάρκεια σε PIGF επιβεβαίωσαν την προαθηρογόνο δράση του μορίου καθώς τα πειραματόζωα έδειξαν μικρότερες αθηρωματικές πλάκες αλλά και μειωμένη περιεκτικότητα σε μακροφάγα [471]. Ακόμα η προσθήκη του γονιδίου μέσω ενός αδενοϊού στις καρωτιδικές αρτηρίες υπερχοληστερολαιμικών κουνελιών οδήγησε σε μεγαλύτερο πάχος του έσω χιτώνα του αγγείου, μεγαλύτερη πρόσληψη μακροφάγων, αλλά και αύξηση της νεοαγγειογένεσης στον έξω χιτώνα του αγγείου [471].

Μόνο δύο κλινικές μελέτες έχουν ασχοληθεί με τον πιθανό ρόλο του PIGF ως προγνωστικού παράγοντα για την εμφάνιση αγγειακού συνδρόμου [472, 473]. Οι συγκεντρώσεις του PIGF μετρήθηκαν σε 547 ασθενείς που έλαβαν μέρος στη μελέτη CAPTURE και δεν λάμβαναν θεραπεία και σε 626 ασθενείς που εισήχθησαν στο νοσοκομείο με πόνους στο στήθος. Και στους δύο αυτούς πληθυσμούς οι αυξημένες συγκεντρώσεις του PIGF σχετίστηκαν με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης εμφράγματος του μυοκαρδίου σε 30 ημέρες, ανεξάρτητα από άλλους παράγοντες όπως το sCD40L και CRP [472].

Παρότι τα αποτελέσματα είναι πολύ αξιόλογα πρέπει να πραγματοποιηθούν μετρήσεις σε μεγαλύτερους πληθυσμούς για να πιστοποιηθεί η προβλεπτική ικανότητα του μορίου.

4. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: Μέθοδοι

4.1 Εκχύλιση λιποειδών κατά Bligh-Dyer

Αντιδραστήρια – Όργανα

- Οργανικοί διαλύτες (CHCl_3 , CH_3OH , H_2O) αναλυτικής καθαρότητας.
- Κυκλοαναδευτήρας.
- Αέριο άζωτο.
- Υάλινοι δοκιμαστικοί σωλήνες των 10 ή 20mL.
- Σφαιρικές φιάλες των 100 ή 250 mL.
- Περιστρεφόμενη συσκευή εξάτμισης υπό ελαττωμένη πίεση (flash evaporator) Rotavapor Buch RE III

Αρχή μεθόδου

Με κατάλληλης πολικότητας μονοφασικό σύστημα διαλυτών επιτυγχάνεται η εκχύλιση όλων των λιποειδών καθώς επίσης και η εκχύλιση μικρών ποσοτήτων υδατοδιαλυτών ενώσεων, όπως είναι διάφορα άλατα, αμινοξέα και σάκχαρα. Με την μετατροπή του μονοφασικού συστήματος σε διφασικό σύστημα, αποτελούμενο από χλωροφορμική και υδατική φάση, στη μεν χλωροφορμική φάση κατανέμονται όλα τα λιποειδή, στην δε υδατική κατανέμονται τα υδατοδιαλυτά συστατικά [474].

Αναλυτική πορεία

Το προς εκχύλιση δείγμα κατεργάζεται με μίγμα $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}:\text{H}_2\text{O}$ (1/2/0.8 v/v/v), αναδεύεται έντονα με τη βοήθεια κυκλοαναδευτήρα. Η έντονη ανάδευση επαναλαμβάνεται περιοδικά για διάστημα 10 min. Στη συνέχεια και εφόσον είναι απαραίτητο, το όλο δείγμα φυγοκεντρείται, ώστε να απομακρυνθούν τα αδιάλυτα συστατικά. Ακολούθως προστίθενται συγκεκριμένες ποσότητες CHCl_3 και H_2O ώστε η αναλογία των διαλυτών $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$ να γίνει 1/1/0,9 v/v/v, οπότε σχηματίζονται δύο φάσεις διαλυτών. Η κάτω φάση που είναι η χλωροφορμική φάση και περιέχει τα λιποειδή, μεταφέρεται ανάλογα τον όγκο της, είτε σε δοκιμαστικό σωλήνα, οπότε το δείγμα εξατμίζεται έως ξηρού σε ρεύμα αζώτου, είτε σε σφαιρική φιάλη οπότε ο διαλύτης εξατμίζεται έως μικρό όγκο σε περιστρεφόμενη συσκευή εξάτμισης υπό ελαττωμένη πίεση και στη συνέχεια γίνεται μεταφορά σε δοκιμαστικό σωλήνα όπου συνεχίζεται η εξάτμιση έως ξηρού σε ρεύμα

αζώτου. Σε όλες τις περιπτώσεις, η θερμοκρασία εξάτμισης κυμαίνεται από 30 έως 35°C. Τα λιποειδή αναδιαλύονται σε μικρή ποσότητα μίγματος CHCl₃/CH₃OH (1/1, v/v) για περαιτέρω επεξεργασία.

4.2 Κατανομή κατ' αντιρροή

Αντιδραστήρια-Όργανα

- Οργανικοί διαλύτες (πετρελαϊκός αιθέρας, CH₃CH₂OH, H₂O) αναλυτικής καθαρότητας.
- Αέριο άζωτο.
- Υάλινοι δοκιμαστικοί σωλήνες.
- Υάλινες πιπέτες Pasteur.

Αρχή μεθόδου

Τα ολικά λιποειδή αναμιγνύονται με προεξισορροπημένους διαλύτες πετρελαϊκού αιθέρα και αιθανόλης (CH₃CH₂OH) 87%, σε αναλογία 3/1. Δημιουργείται διφασικό σύστημα διαλυτών, όπου τα μεν πολικά λιποειδή κατανέμονται στην αιθανολική φάση, τα δε ουδέτερα λιποειδή στη φάση του πετρελαϊκού αιθέρα [475].

Αναλυτική πορεία

Σε διαχωριστική χοάνη, γίνεται εξισορρόπηση των διαλυτών του πετρελαϊκού αιθέρα με την αιθανόλη 87%. Σχηματίζονται δύο φάσεις, οπότε παραλαμβάνεται χωριστά η κάτω φάση που είναι η εξισορροπημένη αιθανόλη και στη συνέχεια η άνω φάση που είναι ο εξισορροπημένος πετρελαϊκός αιθέρας, για να ακολουθήσει η περαιτέρω κατεργασία των λιποειδών. Στη συνέχεια, τα ολικά λιποειδή εξατμίζονται και αναδιαλύονται σε 4,5mL προεξισορροπημένου πετρελαϊκού αιθέρα. Προστίθενται 1,5mL προεξισορροπημένης CH₃CH₂OH 87% και ακολουθεί ισχυρή ανάδευση με τη βοήθεια κυκλοαδευτήρα. Η κάτω φάση, που είναι η αιθανολική φάση, παραλαμβάνεται με υάλινη πιπέτα Pasteur και μεταφέρεται σε δεύτερο σωλήνα που περιέχει 4,5mL πετρελαϊκού αιθέρα. Ακολουθεί εκ νέου ισχυρή ανάδευση με τη βοήθεια κυκλοαδευτήρα και παραλαβή της αιθανολικής φάσης η οποία τοποθετείται σε υάλινο δοκιμαστικό σωλήνα. Στον πρώτο δοκιμαστικό σωλήνα προστίθενται 1,5mL προεξισορροπημένης αιθανόλης 87% για να επαναληφθεί η ανωτέρω διαδικασία. Η διαδικασία αυτή γίνεται συνολικά οκτώ φορές. Μετά το πέρας της διαδικασίας, η αιθανολική φάση

(8×1,5mL) που περιέχει τα πολικά λιποειδή, εξατμίζεται έως ξηρού σε ρεύμα αζώτου και αναδιαλύεται σε μικρό όγκο διαλύτη CHCl₃/MeOH 1/1 (v/v). Οι φάσεις του πετρελαϊκού αιθέρα (2×4,5mL) που βρίσκονται στους πρώτους δύο δοκιμαστικού σωλήνες, περιέχουν τα ουδέτερα λιποειδή, και αφού ενωθούν σε έναν υάλινο δοκιμαστικό σωλήνα, εξατμίζονται έως ξηρού σε ρεύμα αζώτου και αναδιαλύονται σε μικρό όγκο διαλύτη CHCl₃/MeOH 1/1 (v/v).

4.3 Εκχύλιση πολικών συστατικών από τα ΥΑΕ

Αντιδραστήρια-Όργανα

- Οργανικοί διαλύτες (εξάνιο, αιθανόλη για τρόφιμα, H₂O) αναλυτικής καθαρότητας
- Αέριο άζωτο
- Διαχωριστικές χοάνες των 12L
- Ογκομετρικοί κύλινδροι των 100, 500 και 1000 mL
- σφαιρικές φιάλες των 1000 mL.
- Διηθητικά πανιά
- Αντλία κενού
- Ζυγός ακριβείας
- Φούρνος (110°C)
- Περιστρεφόμενη συσκευή εξατμησης υπό ελαττωμένη πίεση (flash evaporator) Rotavapor Buch RE III
- Λυοφιλοποιητής

Αρχή μεθόδου

Τα ΥΑΕ αναμιγνύονται με διαλύτες που επιτρέπονται για χρήση στα τρόφιμα με βάση τη νομοθεσία της Ευρωπαϊκής ένωσης, οι οποίοι ήταν εξάνιο, αιθανόλη και νερό. Τα ΥΑΕ αρχικά διαλύονται σε πολικούς διαλύτες δηλαδή σε ένα μίγμα αιθανόλης/νερού σε τελική αναλογία 60/40 και στη συνέχεια εκπλένονται με τον ουδέτερο διαλύτη εξάνιο για την απομάκρυνση των ουδετέρων λιποειδών [222].

Αναλυτική πορεία

Αρχικά προσδιορίστηκε σταθμικά η πυκνότητα των ΥΑΕ (d=0,825kg/L) καθώς και η υγρασία μέσω ξήρανσης έως σταθερού βάρους (70%). Στις

διαχωριστικές χοάνες των 12L τοποθετήθηκε κατάλληλη ποσότητα κασίγαρου και λαμβάνοντας υπόψη την περιεκτικότητά του σε νερό προστέθηκαν κατάλληλες ποσότητες απόλυτης αιθανόλης και νερού δίνοντας την τελική αναλογία αιθανόλη/νερό: 60/40, η οποία είχε προσδιοριστεί ως η βέλτιστη από προηγούμενες δοκιμές ανακτήσεως. Το όλο μίγμα αφέθηκε για 30min υπό ισχυρή ανάδευση σε σκοτεινό χώρο και στη συνέχεια το δείγμα διηθήθηκε παραλαμβάνοντας τα πολικά λιποειδή με τα δραστικά συστατικά στο διήθημα. Με τη διήθηση απομακρύνονται τα υπολείμματα σάρκας και πυρήνα του ελαιοκάρπου. Το διήθημα στη συνέχεια εκπλύθηκε με ίδιο όγκο εξάνιου εις διπλούν. Το εξάνιο το οποίο περιείχε τα ουδέτερα λιποειδή απομακρύνθηκε και τις δύο φορές με αναρρόφηση του με τη βοήθεια αντλίας κενού. Το αιθανολικό εκχύλισμα το οποίο περιείχε τα πολικά λιποειδή και τα φαινολικά μόρια συμπυκνώθηκε στη συνέχεια με τη βοήθεια περιστρεφόμενης εξάτμισης υπό ελαττωμένη πίεση για την απομάκρυνση της περίσσειας των διαλυτών, ενώ το συμπυκνωμένο διάλυμα τελικά λυοφιλοποιήθηκε για την πλήρη απομάκρυνση των διαλυτών και φυλάχτηκε στους -20°C μέχρι να χρησιμοποιηθεί.

4.4 Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (HPLC) λιποειδών

Αντιδραστήρια-Όργανα

- Οργανικοί διαλύτες χρωματογραφικής καθαρότητας (ακετονιτρίλιο, μεθανόλη)
- Νερό χρωματογραφικής καθαρότητας
- Πρότυπα λιποειδή:Merck, Supelco, Sigma
- Υγρός χρωματογράφος:Hewlett-Packard series 1100, με 100μl βρόγχο τοποθέτησης δείγματος
- Καταγραφέας-ολοκληρωτής Hewlett-Packard, HP-3396A
- Μικροσύριγγες ακριβείας 250, 50μL
- Πρόγραμμα λήψης και επεξεργασίας χρωματογραφημάτων CHEMSTATION της Hewlett-Packard
- Στήλη κανονικής φάσης: S5 amino, 250x4,6 mm i.d, Spherisorb.
- Στήλη ανάστροφης φάσης: Nucleosil-300, C18 7μ , 250x4 mm i.d

Αναλυτική πορεία

Οι στήλες, πριν χρησιμοποιηθούν, καθαρίζονται με κατάλληλους διαλύτες ανάλογα με το υλικό πλήρωσής τους και σταθεροποιούνται με τον πρώτο διαλύτη έκλουσης.

Το δείγμα ήταν διαλυμένο μικρό όγκο (5-100μL) κατάλληλου διαλύτη και η έκλουσή του γινόταν, είτε με σταθερή, είτε με μεταβαλλόμενη σύσταση διαλυτών. Η έκλουση των διαχωρισμένων ουσιών ελέγχονταν με τη μεταβολή της οπτικής απορρόφησης στον κατάλληλο μήκος κύματος (208 ή 280nm). Σε περίπτωση μη μεταβολής της οπτικής απορρόφησης, λαμβάνονταν κλάσματα κατά τακτά χρονικά διαστήματα.

Για τη στήλη κανονικής φάσης το σύστημα ξεκινά με ροή 1mL/min και σύσταση διαλυτών ακετονιτρίλιο / μεθανόλη : 60/40, η οποία παραμένει έως τα 35min. Στη συνέχεια αλλάζει σταδιακά σύσταση μέχρι τα 40 min σε μεθανόλη 100%, η οποία και παραμένει έως τα 45min, οπότε και αλλάζει πάλι μέχρι τα 50min σε νερό 100%, η οποία και παραμένει ως το τέλος του διαχωρισμού δηλαδή μέχρι τα 60min.

Για τη στήλη ανάστροφης φάσης σαν υγρή φάση χρησιμοποιήθηκε ένα βαθμιδωτό σύστημα έκλουσης με ροή 1mL/min και με διάλυμα **A** να αποτελείται από νερό / οξικό οξύ : 100/1, το διάλυμα **B** αποτελείται από μεθανόλη/οξικό οξύ : 90/1, και το διάλυμα **Γ** είναι ακετονιτρίλιο. Συγκεκριμένα το σύστημα ξεκινά με σύσταση διαλυτών **A / B / Γ : 90 / 9 / 1** , το οποίο μεταβάλλεται σταδιακά μέχρι τα 30min σε σύσταση διαλυτών **A / B / Γ : 70 / 27 / 3**. Το σύστημα παραμένει ισοκρατικό έως τα 35min, όπου και αρχίζει να μεταβάλλεται σταδιακά μέχρι τα 45min σε **A / B / Γ : 60 / 36 / 4**. Στη συνέχεια αλλάζει σταδιακά σύσταση μέχρι τα 60min σε **A / B / Γ : 50 / 45 / 5**. Από τα 60 έως τα 70min το σύστημα αλλάζει σταδιακά σύσταση σε **A / B / Γ : 0 / 90 / 10** η οποία και παραμένει σταθερή έως τα 80min, οπότε και αλλάζει πάλι μέχρι τα 90 min σε **A / B / Γ : 90 / 9 / 1**, η οποία και παραμένει ως τα 105 min ώστε να ισοροπήσει η απορρόφηση και να είναι έτοιμο το όργανο να δεχτεί την επόμενη ένεση.

4.5 Φασματοσκοπία Μάζας (MS)

Αντιδραστήρια-Όργανα

- Μεθανόλη χρωματογραφικής καθαρότητας

- Διάλυμα Οξικού Αμμωνίου 0,01M
- Φιάλη Αζώτου καθαρότητας 99,99%
- Φιάλη Αζώτου
- Υδρόλουτρο
- Electro-spray Mass spectrometer Fisions VG Quatro με σύστημα ιονισμού VG Biotech Electrospray με εξαπολικούς φακούς, σύστημα αντλιών Varian 9012 και βρόχο τοποθέτησης δείγματος Rheodyne 7125
- Μικροσύριγγα 50 μ L

Αναλυτική πορεία

Το δείγμα των λιποειδών εξατμίζεται μέχρι ξηρού σε ρεύμα αζώτου. Στη συνέχεια αναδιαλύεται σε 100 μ L διαλύματος μεθανόλης : νερού 0,01M σε Οξικό Αμμώνιο (70:30, v/v) και ενίεται στο φασματομέτρο με μικροσύριγγα των 50 μ L. Κάθε ένεση έχει όγκο μέχρι 10 μ L. Άζωτο καθαρότητας 99,99% χρησιμοποιείται ως αέριο εκνέφωσης (nebulizing gas) και έκπλυσης (bath gas) με ροή 20 και 10 dm³/min, αντίστοιχα. Οι συνθήκες λήψης του φάσματος για τη μέγιστη ένταση των κορυφών και τη μικρότερη διάσταση ήταν οι εξής: Διαφορά δυναμικού του τριχοειδούς 3kV για τα αρνητικά και 3,3kV για τα θετικά ιόντα, δυναμικό φακών υψηλής τάσης 0,56kV, δυναμικό φακού εστίασης 40V και δυναμικό φακού Skimmer 45V. Η λήψη των φασμάτων έγινε τόσο στα θετικά όσο και στα αρνητικά ιόντα στην περιοχή με m/z 50-2000.

Λήφθηκαν φάσματα τόσο των αρχικών μορίων που περιέχονται στα εκλούσματα της HPLC, όσο και των σημαντικότερων εκ των εμφανιζομένων θραυσμάτων τους (MS/MS) στα θετικά και στα αρνητικά ιόντα, ώστε να διευκολυνθεί η εξαγωγή συμπερασμάτων για την δομή των μορίων από τα εμφανιζόμενα θραύσματα.

4.6 Βιολογική δοκιμασία συσσώρευσης πλυμένων αιμοπεταλίων κουνελιού

Αντιδραστήρια – Όργανα

- Φυσιολογικός ορός (NaCl 0,1 %) ελεύθερος πυρετογόνων.

- Διάλυμα φύλαξης (stock) 10x Tyrodes : Σε 1L νερού διαλύονται 80g NaCl, 1,95g $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ και 10g γλυκόζης.
- Διάλυμα φύλαξης 100x $CaCl_2$: Σε 100 mL νερού διαλύονται 1,911g $CaCl_2$.
- Διάλυμα φύλαξης EGTA 0,2 M: Ποσότητα 0,76g EGTA διαλύεται σε 10mL νερό. Ρυθμίζεται το pH του διαλύματος στο 7,5 με NaOH 5 M.
- Υδατικό διάλυμα ζελατίνης 10% (w/v).
- Διαλύματα Tyrodes με ζελατίνη pH = 6,5 (Tg pH = 6,5), και Tyrodes με ζελατίνη και EGTA pH = 6,5 (Tg EGTA pH = 6,5): Σε 80mL νερό προσθέτονται 10mL από το αντιδραστήριο φύλαξης Tyrodes 10x. Υπό συνεχή ανάδευση με τη βοήθεια μαγνητικού αναδευτήρα, προστίθενται 2,5mL υδατικού διαλύματος ζελατίνης 10% (w/v) που έχει υποστεί πήξη στο σημείο βρασμού. Ακολούθως, διαλύονται 0,2030g $NaHCO_3$ σε 10mL νερό και από το διάλυμα αυτό προστίθενται 5mL αμέσως μετά την παρασκευή του. Συμπληρώνεται ο όγκος στα 100mL με νερό και χωρίζεται σε δύο τμήματα των 50mL. Στο ένα από τα δύο προσθέτονται 25μL EGTA 0,2M και ρυθμίζεται το pH και των δύο κλασμάτων στο 6,46 με HCl 1N. Αμέσως γεμίζονται γυάλινοι σωλήνες των 20mL και κλείνονται με απομονωτική ταινία στερεής παραφίνης (parafilm), αποφεύγοντας τον εγκλεισμό φυσαλίδων αέρα. Τα διαλύματα φυλάσσονται σε θερμοκρασία δωματίου.
- Διάλυμα Tyrodes με ασβέστιο pH = 7,2 (Tg-Ca pH = 7,2): Σε 5mL διαλύματος φύλαξης tyrodes 10x προστίθενται 40mL νερό. Υπό συνεχή ανάδευση με τη βοήθεια μαγνητικού αναδευτήρα προστίθενται 1,25mL υδατικού διαλύματος ζελατίνης 10% (w/v). Στη συνέχεια προστίθενται 0,5mL διαλύματος φύλαξης $CaCl_2$ 100x και αμέσως μετά 2,5mL διαλύματος $NaHCO_3$ που παρασκευάζεται εκείνη τη στιγμή διαλύοντας 0,2030g $NaHCO_3$ σε 10mL νερό. Συμπληρώνεται ο όγκος μέχρι τα 50mL με νερό και ρυθμίζεται το pH στο 7,16 με HCl 1N. Διατηρείται στους 37°C σε ερμητικά κλειστούς σωλήνες με απομονωτική ταινία στερεής παραφίνης (parafilm).
- Αντιπηκτικό διάλυμα κιτρικών με γλυκόζη (ACD): Σε 100mL νερού διαλύονται 1,365g κιτρικού οξέος, 2,5g κιτρικού νατρίου και 2,0g γλυκόζης.

- Διάλυμα φύλαξης βόειας αλβουμίνης ορού (BSA) 100mg/mL: Ποσότητα 100mg BSA (Sigma) ελεύθερης λιπαρών οξέων διαλύεται σε 1mL φυσιολογικού ορού ελεύθερου πυρετογόνων. Φυλάσσεται στους -20°C.
- Διάλυμα εργασίας βόειας αλβουμίνης ορού (BSA) 2,5 mg/mL: Από 10mL φυσιολογικού ορού ελεύθερου πυρετογόνων αφαιρούνται 250μL και προστίθενται 250μL διαλύματος φύλαξης BSA.
- Ficoll-Paque (Pharmacia).
- Βιδωτοί πλαστικοί σωλήνες των 50mL.
- Πλαστικά σιφώνια των 10mL.
- Πλαστικές πιπέτες μιας χρήσεως
- Συσσωρευματομέτρο, Chrono-log.
- Πεχάμετρο ORION 410A.
- Φωτόμετρο Bausch-Lomb.
- Θερμοστατούμενο υδρόλουτρο στους 37°C.
- Φυγόκεντρος Hereaus Labofuge 400R.
- Διαλύματα εργασίας PAF συγκεντρώσεων $1,846 \times 10^{-9} \text{M}$, σε διάλυμα εργασίας BSA. Σε υάλινο δοκιμαστικό σωλήνα παραλαμβάνονται 500μL από το διάλυμα φύλαξης του PAF συγκέντρωσης $1,846 \times 10^{-9} \text{M}$ τα οποία εξατμίζονται έως ξηρού σε ρεύμα αζώτου και αναδιαλύονται σε 500μL διαλύματος εργασίας BSA. Μετά από παραμονή 10 min ώστε να εκχυλιστεί ο PAF από τη BSA το διάλυμα δοκιμάζεται στα πλυμένα αιμοπετάλια κουνελιού σε διάφορες συγκεντρώσεις ώστε να δημιουργηθεί πρότυπη καμπύλη τουλάχιστον 8 σημείων

Αναλυτική πορεία

- *Απομόνωση πλυμένων αιμοπεταλίων από αίμα κουνελιού*
Σε βιδωτούς πλαστικούς σωλήνες των 50 mL προστίθενται 7mL αντιπηκτικού ACD. Το αίμα συλλέγεται από την κεντρική αρτηρία του αυτιού του κουνελιού. Ο σωλήνας γεμίζεται με αίμα μέχρι τα 50mL με ελεύθερη ροή και αναμιγνύεται με ήπια αναστροφή και τουλάχιστον 20 επαναλήψεις. Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 13min στους 24°C στα 562xg. Κατά τη διάρκεια της φυγοκέντρησης μεταφέρουμε 2 mL Ficoll-Paque σε πλαστικούς σωλήνες των 14mL. Αναρροφώνται τα 2/3 του υπερκείμενου πλάσματος που είναι πλάσμα πλούσιο σε αιμοπετάλια (PRP, Platelet Rich Plasma) με πλαστικό σιφώνιο των 20mL και μεταφέρονται σε άλλο πλαστικό σωλήνα των 50mL. Το πλάσμα

το πλούσιο σε αιμοπετάλια (PRP), τοποθετείται πάνω στο στρώμα του Ficoll, ρυθμίζοντας τον όγκο ώστε πάντοτε να υπάρχουν 6-9mL PRP πάνω από κάθε 2mL Ficoll, χρησιμοποιώντας πολύ αργή ροή με το πλαστικό σιφώνι, ώστε να μην αναμιχθούν τα δύο διαλύματα. Οι πλαστικοί σωλήνες φυγοκεντρώνται για 21min στους 24°C στα 1525xg. Μετά την φυγοκέντρηση τα αιμοπετάλια εμφανίζονται σαν ταινία μεταξύ της στιβάδας του υπερκείμενου πλάσματος του φτωχού σε αιμοπετάλια (PPP, Platelet Poor Plasma) και του στρώματος του Ficoll. Το PPP αναρροφάται και απορρίπτεται με πλαστικό σιφώνιο των 10mL. Το στρώμα των αιμοπεταλίων διαπερνάται με πιπέτα μιας χρήσεως, αναρροφάται το Ficoll μαζί με τα άλλα έμμορφα συστατικά που έχουν διαπεράσει το στρώμα του και απορρίπτονται. Τα αιμοπετάλια με τα υπολείμματα Ficoll ξεπλένονται με το διάλυμα Tg EGTA pH = 6.5, χρησιμοποιώντας τον εμπειρικό κανόνα ότι για τους δύο πρώτους σωλήνες αιμοπεταλίων χρειαζόμαστε 7mL για κάθε σωλήνα και 2mL για κάθε επόμενο. Ο τελικός όγκος του διαλύματος διαμοιράζεται ισόποσα στους σωλήνες και μετά από ήπια ανάδευση ώστε να μην αποκολληθούν τα υπολείμματα των έμμορφων συστατικών που έχουν παραμείνει στο σωλήνα εναποτίθεται ήπια σε καθαρούς σωλήνες που περιέχουν 2mL Ficoll, όπως στο προηγούμενο στάδιο. Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 15min στους 24°C στα 750xg. Όμοια με το προηγούμενο στάδιο το υπερκείμενο ρυθμιστικό διάλυμα και το Ficoll αναρροφώνται και απορρίπτονται. Στη συνέχεια προστίθενται 8mL διαλύματος Tg pH = 6,5 σε κάθε σωλήνα αφήνοντας το διάλυμα να τρέξει στα τοιχώματα του σωλήνα και μετά από ήπια ανάδευση μεταφέρεται το εναιώρημα σε καθαρό πλαστικό σωλήνα των 14mL. Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 15min στους 24°C στα 750xg. Το υπερκείμενο ρυθμιστικό διάλυμα απορρίπτεται με αναστροφή ενώ το σωληνάκι αφήνεται να στραγγίξει μέχρι και την τελευταία σταγόνα πάνω από διηθητικό χαρτί. Ακολούθως προστίθενται 0,8mL Tg pH = 6,5 σε κάθε σωληνάκι αναδιασπείροντας τα κύτταρα με ήπιο τρόπο. Το περιεχόμενο των σωληνών ενώνεται σε πλαστικό σωλήνα όπου και μετράται ο όγκος του.

Από το πυκνό διάλυμα αυτό των αιμοπεταλίων λαμβάνονται 10μL τα οποία αραιώνονται με 990μL Tg pH = 6,5 και το διάλυμα φωτομετρείται στα 530 nm. Ο αριθμός των κυττάρων στα 10μL δίνεται από τον τύπο: κύτταρα/10 μL = $A \times 1,25 \times 10^8$ όπου A είναι η απορρόφηση. Με βάση πρότυπη καμπύλη της

οπτικής απορρόφησης συναρτήσει του αριθμού αιμοπεταλίων υπολογίζεται ο αριθμός αιμοπεταλίων και ετοιμάζεται το επιθυμητό εναιώρημα αιμοπεταλίων, το οποίο περιέχει τελική συγκέντρωση αιμοπεταλίων $1,25 \times 10^8$ κύτταρα/mL [59].

▪ *Συσώρευση πλυμένων αιμοπεταλίων κουνελιού*

Σε γυάλινες κυψελίδες συσσωρευματομέτρου των 0,5mL προστίθενται 50μL από το εναιώρημα αιμοπεταλίων συγκεντρώσεως $1,25 \times 10^8$ κύτταρα/mL και 200μL διαλύματος Tg-Ca pH = 7,2. Ακολουθεί επώαση για 15min σε θερμοστατούμενο υδρόλουτρο θερμοκρασίας 37°C. Στην συνέχεια η κυψελίδα με το εναιώρημα των αιμοπεταλίων τοποθετείται στην ειδική θερμοστατούμενη κυψελίδα του συσσωρευματομέτρου και προστίθενται ένας μικρός μαγνητικός αναδευτήρας ώστε να περιστρέφεται με 1.200 στροφές ανά λεπτό (rpm, rounds per min) κατά τη διάρκεια της μέτρησης. Αρχικά μετρώνται διάφορες τελικές συγκεντρώσεις PAF για να δημιουργηθεί η πρότυπη καμπύλη, ως αύξηση της διαπερατότητας. Η αύξηση της διαπερατότητας στηρίζεται στο γεγονός ότι κατά τη συσώρευση των αιμοπεταλίων διαυγάζεται το περιεχόμενο της κυψελίδας μέσα από την οποία διέρχεται η δέσμη ακτινοβολίας. Το ύψος και η μορφή της καμπύλης είναι ανάλογα με τη συσώρευση, το δε φαινόμενο της συσώρευσης των αιμοπεταλίων εξαρτάται από τη συγκέντρωση του συσσωρευτικού παράγοντα.

Με βάση γνωστής συγκέντρωσης διαλύματα συνθετικού PAF σχεδιάζεται η καμπύλη της επί τοις εκατό συσώρευσης συναρτήσει της συγκέντρωσης του PAF. Ως 100% συσώρευση ορίζεται η μέγιστη αντιστρεπτή συσώρευση των αιμοπεταλίων. Βάση της πρότυπης αυτής καμπύλης και το ύψος της καμπύλης συσώρευσης που προκαλεί το εξεταζόμενο δείγμα, γίνεται ο υπολογισμός της συγκέντρωσης του δείγματος, ως συγκέντρωση ανάλογη της συγκέντρωσης του PAF στην κυψελίδα του συσσωρευματομέτρου (τελική συγκέντρωση) που έχει την ίδια βιολογική δραστηριότητα. Εξετάζεται επίσης, αν η μορφή της καμπύλης συσώρευσης που δίνει το δείγμα ομοιάζει με εκείνη της καμπύλης συσώρευσης του PAF (γρήγορη συσώρευση με αντιστρεπτή μορφή σε μικρές συγκεντρώσεις και μη αντιστρεπτή σε μεγάλες συγκεντρώσεις). Τα αποτελέσματα μπορούν να εκφραστούν και σαν συγκέντρωση του συσσωρευτικού παράγοντα που μπορεί να προκαλέσει το

50% της μέγιστης συσσώρευσης που καλείται EC_{50} (Equivalent Concentration for 50% aggregation)

- *Πειράματα* απευαισθητοποίησης σε πλυμένα αιμοπετάλια κουνελιού
Με κάποια συγκέντρωση PAF ή άλλου συσσωρευτικού παράγοντα προκαλείται αντιστρεπτή συσσώρευση αιμοπεταλίων και όταν τα αιμοπετάλια επανέλθουν στην αρχική τους κατάσταση προστίθεται στην κυψελίδα η ίδια συγκέντρωση PAF ή του άλλου συσσωρευτικού παράγοντα. Παρατηρείται ότι η δεύτερη προσθήκη του συσσωρευτικού παράγοντα προκαλεί μικρότερη συσσώρευση από την αρχική, λόγω απευαισθητοποίησης των αιμοπεταλίων. Στα πειράματα διασταυρούμενης απευαισθητοποίησης το ίδιο πείραμα επαναλαμβάνεται με προσθήκη δύο διαφορετικών συσσωρευτικών παραγόντων.

- *Πειράματα* αναστολής της συσσώρευσης των πλυμένων αιμοπεταλίων κουνελιού

Στη σειρά αυτή των πειραμάτων πριν την προσθήκη του συσσωρευτικού παράγοντα, προστίθενται διάφορες ποσότητες του αναστολέα, ακολουθεί επώαση για 1 min και στη συνέχεια προστίθεται ο PAF που προκαλεί γνωστού ύψους συσσώρευση αιμοπεταλίων. Υπολογίζεται το ποσοστό αναστολής στον PAF για κάθε ποσότητα δείγματος. Σχεδιάζεται η καμπύλη της επί της εκατό αναστολής, συναρτήσει της ποσότητας και τα αποτελέσματα εκφράζονται ως ποσότητα δείγματος ικανή να προκαλέσει 50% αναστολή της συσσώρευσης των πλυμένων αιμοπεταλίων που καλείται IC_{50} (Inhibitory Concentration for 50% Inhibition).

- *Ex vivo υδρόλυση των ανασταλτικών παραγόντων* σε πλυμένα αιμοπετάλια κουνελιού

Η μέθοδος αυτή είναι μια τροποποίηση της μεθόδου αναστολής της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων. Στη σειρά αυτή των πειραμάτων αρχικά προστίθεται ο αναστολέας και ακολουθεί επώαση με 2μL από το PPP για διάφορα χρονικά διαστήματα και τέλος προστίθεται ο PAF που προκαλεί γνωστού ύψους συσσώρευση αιμοπεταλίων, ενώ πραγματοποιείται και τυφλός προσδιορισμός χωρίς την προσθήκη PPP. Όμοια με πριν υπολογίζεται το IC_{50} στον τυφλό και στα δείγματα κατεργασμένα με το PPP και παρατηρούνται τυχόν μειώσεις στην ανασταλτική δράση του αναστολέα ύστερα από την επίδραση των ενζύμων του PPP και κυρίως της Lp-PLA2 η

οποία απομακρύνει ακετυλομάδες που είναι γνωστό ότι ενισχύουν τη δράση των αναστολέων του PAF.

4.7 Προσδιορισμός ολικής χοληστερόλης ορού

Αντιδραστήρια – Όργανα

- Προπαρασκευασμένο αντιδραστήριο (kit) για τον προσδιορισμό της χοληστερόλης (Elitech diagnostics) που περιέχει:
- *Αντιδραστήριο 1* 0,1% σε αζίδιο του νατρίου (NaN_3): Ρυθμιστικό διάλυμα PIPES (πιπεραζινο-N-N'-δι[2-αιθανοσουλφονικό οξύ]) pH = 6,90 50 mmol/L, φαινόλη 24 mmol/L, χολικό νάτριο 0,5 mmol/L.
- *Αντιδραστήριο 2*: Εστεράση της χοληστερόλης > 200U/L, οξειδάση της χοληστερόλης > 250 U/L, υπεροξειδάση \geq 1000 U/L, 4-αμινοαντιπυρίνη 0,5 mmol/L.
- Πρότυπο χοληστερόλης 200mg/dL.
- Αναλυτής RA-XT Techicon.

Αρχή μεθόδου

Ο προσδιορισμός της ολικής χοληστερόλης του πλάσματος γίνεται με τη μέθοδο CHOD-PAD που βασίζεται στη φωτομέτρηση στα 500 nm του τελικού προϊόντος [476].

Αναλυτική πορεία

Αναδιαλύεται το αντιδραστήριο 2 σε κατάλληλο όγκο αντιδραστήριου 1 ώστε να προκύψει το αντιδραστήριο εργασίας. 1mL από το αντιδραστήριο εργασίας αναμιγνύεται με 10μL δείγματος και θερμοστατείται για 5min στους 37°C. Ακολούθως λαμβάνεται η τιμή απορρόφησης στα 500nm. Παράλληλα γίνεται τυφλός προσδιορισμός όπου τα 10μL του δείγματος αντικαθίστανται με 10μL απιονισμένου ύδατος, καθώς και προσδιορισμός πρότυπης χοληστερόλης. Η μέθοδος έχει γραμμική απόκριση έως τα 500mg/dL.

4.8 Προσδιορισμός HDL χοληστερόλης (HDL-C) ορού

Αντιδραστήρια – Όργανα

- Προπαρασκευασμένο αντιδραστήριο (kit) για τον προσδιορισμό της χοληστερόλης (Elitech diagnostics) όπως αναφέρεται στον προσδιορισμό της ολικής χοληστερόλης του πλάσματος

- Αντιδραστήριο καταβύθισης που περιέχει φωσφοβολφραμικό οξύ αρχικής συγκέντρωσης 0,44 mmol/L και χλωριούχο μαγνήσιο 20mmol/L.
- Αναλυτής RA-XT Techicon.

Αρχή μεθόδου

Ο προσδιορισμός της HDL βασίζεται στην καταβύθιση των χυλομικρών, των πολύ χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεϊνών (VLDL) και της χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεϊνών (LDL) όταν προστίθενται στο δείγμα φωσφοβολφραμικό οξύ και ιόντα μαγνησίου. Με φυγοκέντρηση λαμβάνεται στο υπερκείμενο μόνο η υψηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνες (HDL), όπου προσδιορίζεται η χοληστερόλη όπως αναφέρεται στη μέθοδο για τον προσδιορισμό της ολικής χοληστερόλης [477].

Αναλυτική πορεία

Σε πλαστικούς φυγοκεντρικούς σωλήνες (ependorf) του 1mL, προστίθενται 200μL δείγματος και 500μL αντιδραστηρίου καταβύθισης. Το όλο αναμιγνύεται ισχυρά σε κυκλοαναδευτήρα και αφήνεται για 10min σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθως το δείγμα φυγοκεντρείται για 10min σε μικροφυγόκεντρο. Μετά τη φυγοκέντρηση λαμβάνεται το υπερκείμενο και προσδιορίζεται η χοληστερόλη με τη μέθοδο CHOD-PAD που αναφέρεται ανωτέρω για τον προσδιορισμό της ολικής χοληστερόλης. Συγκεκριμένα, προστίθενται 100μL δείγματος, ή απιονισμένου ύδατος στην περίπτωση του τυφλού προσδιορισμού, και 1000μL αντιδραστηρίου εργασίας. Ακολουθεί ανάδευση και επώαση για 5min σε θερμοκρασία 37°C και στη συνέχεια λαμβάνεται η απορρόφηση στα 500nm εντός 1h ως προς το δείγμα του τυφλού προσδιορισμού. Τα αποτελέσματα δίνονται από τον τύπο:

$$\text{HDL χοληστερόλη (mg/dL)} = 219,2 \times A_{500}$$

4.9 Προσδιορισμός τριγλυκεριδίων ορού

Αντιδραστήρια – Όργανα

- Προπαρασκευασμένο αντιδραστήριο (kit) για τον προσδιορισμό της τριγλυκεριδίων (biosis) που περιέχει:
- *Αντιδραστήριο 1:* Ένζυμα
- *Αντιδραστήριο 2:* Ρυθμιστικό διάλυμα.

- Τα δύο αντιδραστήρια αναμιγνύονται κατάλληλα για να δώσουν το αντιδραστήριο εργασίας που περιέχει σε τελικές συγκεντρώσεις: Λιπάσες 300U/mL, PK 0,2 U/mL, Γλυκερολ-3-P-Οξειδάση (GPO) 4U/mL, POD 4U/mL, ATP 1mM, αμινοφαιναζόνη 0,4mM, παράγωγο φαινόλης 4mM, συμπαραγοντες.
- Αναλυτής RA-XT Techicon.

Αρχή μεθόδου

Ο προσδιορισμός των τριγλυκεριδίων του πλάσματος γίνεται με τη μέθοδο GPO-PAP που βασίζεται στη φωτομέτρηση του τελικού έγχρωμου προϊόντος.

Αναλυτική πορεία

1 mL από το αντιδραστήριο εργασίας αναμιγνύεται με 10μL δείγματος και θερμοστατείται για 5min στους 37°C. Ακολούθως λαμβάνεται η τιμή απορρόφησης στα 725nm. Παράλληλα γίνεται τυφλός προσδιορισμός όπου τα 10μL του δείγματος αντικαθίστανται με 10μL απιονισμένου ύδατος. Κατασκευάζεται πρότυπη καμπύλη αναφοράς με πρότυπο δείγμα τριγλυκεριδίων από την οποία υπολογίζεται η συγκέντρωση των τριγλυκεριδίων του δείγματος. Η μέθοδος έχει γραμμική απόκριση έως τα 1000mg/dL.

4.10 Προσδιορισμός LDL χοληστερόλης (LDL-C) ορού

Ο προσδιορισμός της LDL χοληστερόλης του πλάσματος υπολογίζεται εκ διαφοράς με βάση τον τύπο [478]:

$$\text{LDL-C (mg/dL)} = \text{Ολική χοληστερόλη} - (\text{τριγλυκερίδια}/5) - \text{HDL-C}$$

4.11 Παραλαβή ορού, πλάσματος και διαχωρισμός έμμορφων συστατικών του αίματος

Αντιδραστήρια - Όργανα

- Φυσιολογικός ορός (NaCl 0,15M): Διαλύονται 9.1g NaCl σε 1000mL νερού
- Αντιπηκτικό διάλυμα κιτρικών (AC): Σε 100 mL νερού διαλύονται 1,365g κιτρικού οξέος ($\text{H}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$) και 2,5g κιτρικού νατρίου ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)
- Διάλυμα δεξτράνης 3% σε NaCl 0,15M: Διαλύονται 3g Dextrane σε 100mL ορού

- Δ/μα Tris-HCl 50mM (pH 7.4): Διαλύονται 0.605g Tris σε νερό, ρυθμίζεται το pH στο 7.4 με HCl 6N και τελικό όγκο στα 100mL σε ογκομετρική φιάλη με προσθήκη νερού.
- Lysis Buffer (155mM NH₄Cl, 10mM KHCO₃, and 0.1mM EDTA): Διαλύονται 8,29g NH₄Cl, 1,0012g KHCO₃ και 38mg EDTA σε 1000mL νερού.
- Φυγόκεντρος Hereaus Labofuge 400R.
- Βιδωτοί πλαστικοί σωλήνες των 15mL.
- Συσκευή υπερήχων

Αναλυτική πορεία

Διαγραμματικά η πορεία παρουσιάζεται στην Εικόνα 4. Ακολουθεί η αναλυτική πορεία της απομόνωσης των έμμορφων συστατικών.

4.11.1 Παραλαβή ορού αίματος

Για την παραλαβή του ορού λαμβάνονται 10mL αίματος χωρίς αντιπηκτικό σε γυάλινο σωληνάκι. Το αίμα αφήνεται να πήξει σε θερμοκρασία δωματίου για 45min. Αναδεύεται με γυάλινη ράβδο και ακολουθεί φυγοκέντρηση στα 1500xg για 10min στους 25°C. Παραλαμβάνεται το υπερκείμενο και κατανέμεται σε 1 erpendorf του 1mL, 5 των 500μL και 1 των 50 μL και αποθηκεύονται στους -80°C μέχρι να χρησιμοποιηθούν [479].

4.11.2 Παραλαβή και διαχωρισμός πλάσματος και έμμορφων συστατικών αίματος

Σε πλαστικό βιδωτό σωλήνα των 15mL ο οποίος περιέχει 1mL αντιπηκτικού δ/τος κιτρικών προστίθενται 9mL αίματος. Ακολουθεί ήπια ανάδευση και φυγοκέντρηση (1η) στις 630xg για 13min στους 25°C. Μετά τη φυγοκέντρηση έχουμε «2 φάσεις». Η «πάνω» φάση: Πλάσμα Πλούσιο σε Αιμοπετάλια (Platelet Rich Plasma-PRP), ενώ η «κάτω» περιέχει λευκά (L) και ερυθρά (R) αιμοσφαίρια.

4.11.3 Παραλαβή/διαχωρισμός αιμοπεταλίων και πλάσματος

Παραλαμβάνονται με ήπιες κινήσεις τα 3/4 από το PRP της προηγούμενης φυγοκέντρησης (1^{ης}) σε σωληνάκι μιας χρήσεως. Ακολουθεί φυγοκέντρηση (2^η) στα 1400xg για 20min στους 25°C. Το υπερκείμενο της φυγοκέντρησης είναι το πλάσμα το οποίο μοιράζεται σε erpendorfs και τοποθετείται για

αποθήκευση στους -80°C . Το ίζημα (αιμοπετάλια) αναδιασπείρονται σε 1mL δ/τος Tris-HCl και ακολουθεί υπερήχηση μέσα σε πάγο για $4 \times 15\text{sec}$ με ενδιάμεσα διαλλείματα των 15sec. Στη συνέχεια φυγοκεντρώνονται ($3^{\text{η}}$) στα $500 \times g$ για 10min στους 4°C και το υπερκείμενο διαμοιράζεται σε erpendorfs των $5 \times 200\mu\text{L}$ και $1 \times 50\mu\text{L}$ και αποθηκεύονται στους -80°C μέχρι να χρησιμοποιηθούν.

4.11.4 Παραλαβή και διαχωρισμός λευκών και ερυθρών αιμοσφαιρίων

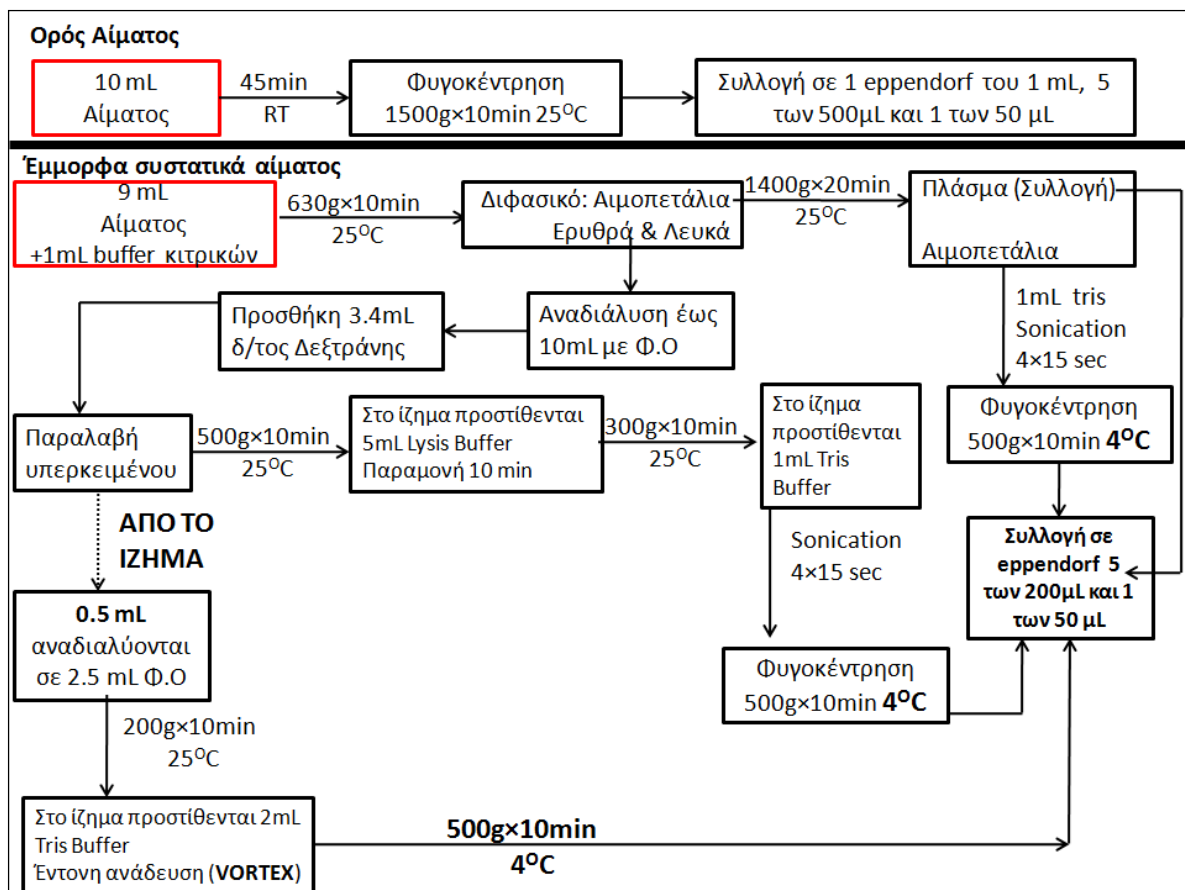
Η «κάτω» φάση από την $1^{\text{η}}$ φυγοκέντρηση συμπληρώνεται με φυσιολογικό ορό μέχρι τελικού 10mL. Ακολουθεί ήπια ανάδευση και προστίθενται 3,4mL δ/τος δεξτράνης, αναδεύονται και παραμένουν για 1h στους 25°C για ολοκλήρωση της καταβύθισης των ερυθρών αιμοσφαιρίων. Σχηματισμός δύο φάσεων: Πάνω-Υπερκείμενο: Πλούσιο σε λευκά αιμοσφαίρια πλάσμα, κάτω: πλούσια σε ερυθρά αιμοσφαίρια πλάσμα.

4.11.5 Λευκά αιμοσφαίρια

Παραλαβή του υπερκειμένου (πλούσιο σε λευκά αιμοσφαίρια πλάσμα) σε ένα πλαστικό σωληνάκι και φυγοκέντρηση του ($4^{\text{η}}$) στα $500 \times g$ για 10min στους 25°C . Απορρίπτεται το υπερκείμενο και το ίζημα αναδιασπείρεται σε 5mL δ/τος Lysis buffer για 5min ώστε να σπάσουν τα υπολείμματα των ερυθρών αιμοσφαιρίων. Ακολουθεί φυγοκέντρηση ($5^{\text{η}}$) στα $300 \times g$ για 10min στους 25°C . Απορρίπτεται το υπερκείμενο και το ίζημα αναδιαλύεται σε 1mL Tris-HCl. Ακολούθως υπερηχείται μέσα σε πάγο για $4 \times 15\text{sec}$ με ενδιάμεσα διαλλείματα των 15sec και τέλος φυγοκεντρείται ($6^{\text{η}}$) στα $500 \times g$ για 10min στους 4°C . Το υπερκείμενο μοιράζεται σε erpendorfs των $5 \times 200\mu\text{L}$ και $1 \times 50\mu\text{L}$ και αποθηκεύονται στους -80°C μέχρι να χρησιμοποιηθούν.

4.11.6 Ερυθρά αιμοσφαίρια

Παραλαμβάνονται 500μL από τον πάτο του σωλήνα με το ίζημα των ερυθρών και προστίθενται σε 2,5mL φυσιολογικού ορού. Ακολουθεί φυγοκέντρηση ($7^{\text{η}}$) στα $200 \times g$ για 10min στους 25°C . Το ίζημα διαλύεται σε 2mL δ/τος Tris-HCl. Ακολουθεί έντονη ανάδευση σε κυκλοαναδευτήρα και φυγοκέντρηση ($8^{\text{η}}$) στα $500 \times g$ για 10min στους 4°C . Το υπερκείμενο μοιράζεται σε erpendorfs των $1 \times 1000\mu\text{L}$, $5 \times 200\mu\text{L}$ και $1 \times 50\mu\text{L}$ και αποθηκεύονται στους -80°C μέχρι να χρησιμοποιηθούν.



Εικόνα 4: Διαγραμματική αναπαράσταση της πορείας παραλαβής ορού, πλάσματος και έμμορφων συστατικών του αίματος

4.12 Παραλαβή και Ομογενοποίηση Ιστών

Αντιδραστήρια - Όργανα

- Φυσιολογικός ορός (NaCl 0,09%)
- Διάλυμα σακχαρόζης 0,25 M : Διαλύονται 8,55g σακχαρόζης σε 100ml νερό
- Διάλυμα ομογενοποίησης Tris (50mM-pH 7,4)-Suc 0,25 M-EDTA 10mM-μερκαπτοαιθανόλη 5mM-NaF 50mM : Διαλύονται 0,605g Tris, 8,55g σακχαρόζης, 0,372g EDTA, 35μL μερκαπτοαιθανόλης και 0,210g NaF σε 100ml νερό. Το pH του διαλύματος ρυθμίζεται με HCl 1N.
- Ψυχόμενη φυγόκεντρος Hereaus Labofuge 400R
- Χειρουργικό νυστέρι
- Μηχανοκίνητος ομογενοποιητής Potter-Elvehjem με έμβολο από Teflon
- Δονητής υπερήχων Virsonic 50
- Υάλιοι ωρολογίου
- Πλαστικοί σωλήνες φυγοκέντρησης των 50 και 10ml

Αναλυτική πορεία

Παραλαβή ιστών

Από το ήπαρ παραλήφθηκε μια μεσότητα του κεντρικού λοβού ώστε να περιέχονται όσο το δυνατόν περισσότερα από τα επίκτητα μορφολογικά χαρακτηριστικά, τα οποία προήλθαν από την παρέμβαση (πχ. λιπώδεις διηθήσεις). Από τα νεφρά λήφθηκε μια μεσότητα κάθετη στο διαμήκη άξονα του νεφρού ώστε να παραληφθεί ένα ολικό δείγμα νεφρού το οποίο περιέχει όλων των ειδών τα κύτταρα του ιστού. Η σπλήνα παραλήφθηκε ολόκληρη. Τα τμήματα αυτά τμήθηκαν με νυστέρι και εκπλύθηκαν αμέσως με φυσιολογικό ορό ώστε να απομακρυνθούν όλα τα έμμορφα συστατικά του αίματος από τον ιστό.

Οι ιστοί τοποθετήθηκαν αμέσως σε παγωμένο διάλυμα σακχαρόζης για να διατηρηθούν μέχρι την ομογενοποίησή τους η οποία πραγματοποιήθηκε το αργότερο σε 2h από τη στιγμή της ευθανασίας του πειραματόζωου.

Ο ιστός ζυγίζεται σε αναλυτικό ζυγό αφού πρώτα αποστραγγιστεί ταχύτατα με διηθητικό χαρτί. Στην συνέχεια ξεπλένεται με παγωμένο διάλυμα σακχαρόζης 0,25M και τεμαχίζεται προσεκτικά με νυστέρι σε μικρά κομμάτια πάνω σε ύαλο ωρολογίου μέσα σε ρυθμιστικό διάλυμα ομογενοποίησης με παράλληλη απομάκρυνση λιπώδους ιστού που πιθανόν να έχει παραμείνει στο δείγμα. Ο τεμαχισμένος ιστός στη συνέχεια συνθλίβεται με εσφυρισμένο πώμα με πιεστικές και περιστροφικές κινήσεις και τοποθετείται σε φυγοκεντρικό σωλήνα όπου προστίθεται σε αυτόν κατάλληλη ποσότητα ρυθμιστικού διαλύματος ομογενοποίησης (περίπου τριπλάσιος όγκος από τον όγκο του ιστού). Στη συνέχεια ο ιστός ομογενοποιείται περαιτέρω με δονητή υπερήχων (4 φορές επί 30sec με παύσεις του 1min). Όλη η πορεία ομογενοποίησης γίνεται υπό ψύξη σε παγόλουτρο.

Ο ομογενοποιημένος ιστός φυγοκεντρείται στα 500g για 10min ώστε να καταβυθιστούν τα κομμάτια ιστού που υπάρχουν στο ομογενοποίημα, τα αδιάσπαστα κύτταρα και οι πυρήνες των κυττάρων. Το υπερκείμενο συλλέγεται προσπαθώντας όσο γίνεται να μην παραληφτεί το λίπος που έχει συσσωρευτεί στην επιφάνεια του και τοποθετείται σε καθαρό σωλήνα και στη συνέχεια μοιράζεται σε erpendorfs των 1x1000μL, 5x200μL και 1x50μL. Επίσης διατηρήθηκαν αντιδείγματα μη ομογενοποιημένου ιστού σε

εppendorfs που περιείχαν διάλυμα ομογενοποίησης. Όλα τα δείγματα αποθηκεύτηκαν στους -80°C μέχρι να χρησιμοποιηθούν.

4.13 Προσδιορισμός πρωτεΐνης με τη μέθοδο Bradford

Αντιδραστήρια - Όργανα

- Αλβουμίνη βόειου ορού (BSA) 4.6 mg/10 mL : Διαλύονται 33mg BSA σε 100mL νερό.
- Προκατασκευασμένο αντιδραστήριο Bradford (Sigma) το οποίο είναι διάλυμα Brilliant Blue G και φωσφορικού οξέος σε μεθανόλη.
- Αποσταγμένο νερό
- Πλαστικοί δοκιμαστικοί σωλήνες των 10mL μιας χρήσης
- Κυψελίδες φασματοφωτομέτρου του 1mL μιας χρήσης
- Κυκλοαναδευτήρας (vortex)
- Φωτόμετρο Helios B, Unicam, Mercers Row, Cambridge CB5 8HY, UK

Αρχή μεθόδου

Η μέθοδος Bradford περιλαμβάνει την τοποθέτηση της όξινης χρωστικής Coomassie Brilliant Blue G στο διάλυμα των πρωτεϊνών. Η χρωστική συμπλέκεται με τα βασικά και αρωματικά αμινοξέα των πρωτεϊνών προκαλώντας μια μετατόπιση της μέγιστης απορρόφησης της χρωστικής από 465nm (καφέ χρώμα) σε 595nm (μπλε χρώμα). Το σύμπλοκο της πρωτεΐνης-χρωστικής σταθεροποιείται σε 5min και είναι σταθερό για 45min. Η απορρόφηση είναι ανάλογη της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης. Η γραμμικότητα της ανάλυσης κυμαίνεται από 1μg σε 10g πρωτεΐνης, ως προς BSA [480].

Αναλυτική πορεία

Παρασκευάζονται πρότυπα διαλύματα BSA των οποίων οι συγκεντρώσεις κυμαίνονται από 1-10μg/mL. Παρασκευάζεται διάλυμα του άγνωστου δείγματος σε νερό ώστε η τελική του συγκέντρωση να βρίσκεται στην περιοχή από 1-10μg/mL. Τα διαλύματα των προτύπων και των αγνώστων δειγμάτων πρέπει να έχουν τελικό όγκο 1mL. Προστίθεται 1mL αντιδραστηρίου Bradford. Τα δείγματα αναδεύονται έντονα στο κυκλοαναδευτήρα και μετά από παραμονή 5min μετράται η απορρόφηση των προτύπων και των δειγμάτων.

Ο υπολογισμός της περιεκτικότητας του δείγματος σε πρωτεΐνη γίνεται με βάση την πρότυπη καμπύλη αναφοράς.

4.14 Προσδιορισμός δραστηριότητας ενδοκυτταρικής PAF ακετυλοϋδρολάσης (PAF-AH) και πλάσματος (Lp-PLA2)

Αντιδραστήρια – Όργανα

- PAF (C_{16:0}), Sigma.
- Βόεια αλβουμίνη ορού (BSA) ελεύθερης λιπαρών οξέων, Sigma
- Ρυθμιστικό διάλυμα Tris(τρις-(υδροξυμεθυλο)-αμινομεθάνιο)-HCl (100 mM-pH 7,2) με 1mM EGTA: Διαλύονται 1,21g Tris και 38,04mg EGTA σε νερό, ρυθμίζεται το pH με HCl 6M στο 7,2 και συμπληρώνεται ο όγκος με νερό έως τα 100mL.
- Διάλυμα φύλαξης (stock) «ψυχρού» PAF σε CHCl₃/MeOH 1/1 (v/v), 2,308nM
- Διάλυμα βόειας αλβουμίνης ορού (BSA) 100 mg/mL: Διαλύονται 1000 mg BSA ελεύθερης λιπαρών οξέων (Sigma) σε 10mL ρυθμιστικού διαλύματος Tris-HCl (50 mM-pH 7,4)
- Διάλυμα εργασίας βόειας αλβουμίνης ορού (BSA) 10mg/mL: Παραλαμβάνεται 1mL από το διάλυμα φύλαξης 100mg/mL και αραιώνονται με 9mL ρυθμιστικού διαλύματος Tris-HCl (50 mM-pH 7,4), δίνοντας τελικό όγκο 10mL
- Διάλυμα εργασίας PAF σε BSA (10mg/mL) συγκέντρωσης 800μM και ειδικής δραστηριότητας 1000cpm/nmol: Φέρεται κατάλληλη ποσότητα διαλύματος ψυχρού PAF 2,308nM και ραδιενεργού PAF, εξατμίζεται ο διαλύτης σε ρεύμα αζώτου και το ίζημα αναδιαλύεται σε κατάλληλη ποσότητα διαλύματος BSA 10mg/mL έτσι ώστε να προκύψει συγκέντρωση PAF 800μM και 1000cpm/nmol. Παρασκευάζεται καινούριο διάλυμα κάθε φορά. Προσθήκη 5 μL από το διάλυμα αυτό στον ενζυμικό προσδιορισμό δίνουν τελική συγκέντρωση PAF 20μM (20.000cpm) και τελική συγκέντρωση BSA 0,25mg/mL.
- Διάλυμα τριχλωροξικού οξέος (CCl₃COOH, TCA) 40% (w/v)
- Φυγόκεντρος Hereaus Labofuge 400R.
- Ανακινούμενο θερμοστατούμενο υδρόλουτρο
- Ειδικό πλαστικό σωλήνες φυγόκεντρου των 0,5mL (eppendorf)

Αρχή μεθόδου

Ο προσδιορισμός της δραστηριότητας της PAF-AH βασίζεται στη μέτρηση της ραδιενέργειας του ραδιενεργού προϊόντος ($[H^3]$ -CH₃COOH) που απελευθερώνεται στο υπερκείμενο διάλυμα μετά την επώαση του ενζυμικού παρασκευάσματος με $[H^3]$ -PAF, παρουσία BSA και την καταβύθιση των πρωτεϊνών με TCA. Το επισημασμένο οξικό οξύ διαχωρίζεται από τον μη υδρολυμένο $[H^3]$ -PAF αφού αυτός δεσμεύεται πάνω στην BSA όπου και καταβυθίζεται ως σύμπλοκο μετά τη προσθήκη του TCA [481].

Αναλυτική πορεία

Σε πλαστικό σωλήνα φυγοκέντρου (erpendorf) των 0,5mL φέρονται κατάλληλη ποσότητα ρυθμιστικού διαλύματος Tris-HCl (100 mM-pH 7,2) με 1mM EGTA, 5μL διαλύματος εργασίας PAF (τελική συγκέντρωσης 20μM) και η αντίδραση ξεκινά με την προσθήκη του κυτταρικού ομογενοποιήματος ή του πλάσματος ανάλογα με το ένζυμο που μελετάται. Πριν την προσθήκη του δείγματος έχει προστεθεί κατάλληλη ποσότητα διαλύματος αναδιάλυσης ώστε να επιτευχθεί τελικός όγκος του μίγματος επώασης στα 200μL. Η επώαση της αντίδρασης γίνεται σε θερμοστατούμενο υδρόλουτρο υπό ανάδευση στους 37°C ενώ ο χρόνος αντίδρασης και η περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη διαφοροποιούνται για κάθε είδος κυττάρου και ιστού. Οι χρόνοι αντίδρασης και η τελική συγκέντρωση σε πρωτεΐνη βελτιστοποιήθηκαν με κινητική μελέτη του ενζύμου για κάθε είδος κυττάρου και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται σε ακόλουθο κεφάλαιο, ενώ μια συνοπτική παρουσίαση τους δίνεται στον Πίνακα 1. Ειδικά για την Lp-PLA₂ έγινε κινητική μελέτη μόνο ως προς το χρόνο καθώς σε κάθε περίπτωση δοκιμάστηκαν 2μL πλάσματος, επίσης έγιναν ξεχωριστές δοκιμές για τα δείγματα μετά το τέλος της παρέμβασης καθώς τα πειραματόζωα είχαν δραματική αύξηση στη συγκέντρωση χοληστερόλης στο αίμα με αντίστοιχη αύξηση των LDL πρωτεϊνών που έχουν προσδεμένη το μεγαλύτερο ποσοστό της Lp-PLA₂ στο αίμα.

Μετά το τέλος της αντίδρασης προσθέτονται 2μL διαλύματος BSA 100 mg/mL για να εξασφαλιστεί η ποσοτική δέσμευση των μορίων PAF τα οποία δεν έχουν υδρολυθεί, και μετά από 1min προστίθενται 64μL ψυχρού διαλύματος TCA 40 % (τελικός όγκος TCA 10 %).

Πίνακας 1: Χρόνοι ενζυμικής αντίδρασης και περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη που χρησιμοποιήθηκε για τον ενζυμικό προσδιορισμό της PAF-AH

Είδος κυττάρου	Πρωτεΐνη (μg/200μL)	Χρόνος (min)
Αιμοπετάλια	20	15
Λευκά αιμοσφαίρια	100	15
Ερυθρά αιμοσφαίρια	300	15
Ηπατοκύτταρα	50	20
Νεφρικά κύτταρα	50	20
Κύτταρα σπλήνας	50	20
Πλάσμα	2μL πλάσματος	5

Το διάλυμα αφήνεται σε πάγο για 15min ώστε να καταβυθιστούν οι πρωτεΐνες και στην συνέχεια φυγοκεντρείται για 5min στα 16.000xg. Παραλαμβάνονται 100μL από το υπερκείμενο και μεταφέρονται σε vials των 20mL τα οποία περιέχουν 5mL του υγρού σπινθηρισμού (dioxane base) για τη μέτρηση της ραδιενέργειας. Γίνεται επίσης και δείγμα αναφοράς, το οποίο δεν περιέχει ενζυμικό παρασκεύασμα. Η δραστηριότητα της PAF-AH υπολογίζεται από τον τύπο:

Δραστηριότητα PAF-AH (nmol/min) =

$$\frac{[RA_{\text{δείγματος}} (\text{cpm}) - RA_{\text{τυφλού}} (\text{cpm})] \times \text{ειδική δραστηριότητα } [H^3]\text{-PAF (nmol/cpm)}}{\text{Χρόνος επώασης (min)}}$$

Χρόνος επώασης (min)

Η ειδική δραστηριότητα ορίζεται για την ενδοκυτταρική PAF-AH ως pmol υδρολυμένου PAF/mg πρωτεΐνης/min, ενώ για την Lp-PLA₂ ορίζεται ως pmol υδρολυμένου PAF/μL πλάσματος/min.

4.15 Προσδιορισμός δραστηριότητας της ανεξάρτητης διθειοθρεϊτόλης φωσφοχολινο-τρανσφεράσης του PAF (PAF-CPT)

Αντιδραστήρια – Όργανα

- 1-O-αλκυλο-2-sn-ακετυλο-γλυκερόλη (AAG) (BIOMOL Int. L.P)
- CDP-Χολίνη (Sigma)
- Διθειοθρεϊτόλη (DTT) (Sigma)
- EDTA (Sigma)

- $MgCl_2$ (Sigma)
- Οργανικοί διαλύτες (οξικό οξύ, ακετόνη, μεθανόλη, αιθανόλη, χλωροφόρμιο)
- Πρότυπα λιποειδή: Merck, Supelco, Sigma
- Προσροφητικό υλικό : πηκτή SiO_2 (Silica Gel G 60)
- Σύστημα επίστρωσης πλακών TLC: Desaga.
- Γυάλινες πλάκες διαστάσεων 20x20cm, 20x10cm και 10x2cm.
- Ψυχόμενες φυγόκεντροι Heraeus Labofuge 400R και Sorvall RC-5B.
- Γυάλινοι θάλαμοι ανάπτυξης διαστάσεων 25x25x10cm και 11x2,5cm.
- Ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl, 100mM pH 8,0 : Διαλύονται 12,114g Tris σε νερό, ρυθμίζεται το pH στο 8,0 με HCl 1N και ρυθμίζεται ο όγκος στα 1000 mL σε ογκομετρική φιάλη με προσθήκη νερού.
- Διάλυμα EDTA 20mM σε Tris-HCl, 100mM pH 8,0 : Διαλύονται 0,3723g EDTA σε 50 mL ρυθμιστικού διαλύματος Tris-HCl, 100mM pH 8,0.
- Διάλυμα φύλαξης (stock) $MgCl_2$ 2,1M: Διαλύονται 100g $MgCl_2$ σε 500 mL απεσταγμένου νερού.
- Διάλυμα εργασίας $MgCl_2$ 0,4M : Αναμιγνύονται 3,8mL διαλύματος φύλαξης $MgCl_2$ 2,1 M με 16,2mL ρυθμιστικού διαλύματος Tris-HCl, 100mM pH 8,0.
- Διάλυμα DTT 0,2M : Διαλύονται 0,617g DTT σε 20mL απεσταγμένου νερού.
- Διάλυμα φύλαξης (stock) CDP-Χολίνης 100 mM : Διαλύονται 0,25g CDP-Χολίνης σε 4,6mL απεσταγμένου νερού.
- Διάλυμα εργασίας CDP-Χολίνης 4mM : Αναμιγνύονται 40μL διαλύματος φύλαξης CDP-Χολίνης 100mM με 960μL αποσταγμένου νερού.
- Αιθανολικό διάλυμα AAG 10mM : Διαλύονται 5mg AAG (95% καθαρότητας) σε 1,325mL αιθανόλης.
- Αλβουμίνη βοδινού ορού (BSA) stock (100mg/mL): Ποσότητα 100mg BSA ελεύθερης λιπαρών οξέων (Sigma)/mL φυσιολογικού ορού. Φυλάσσεται στους 20°C.
- Διάλυμα BSA 2,5mg/mL φυσιολογικού ορού: Από 10mL φυσιολογικού ορού αφαιρούνται 250μL και προστίθενται 250μL BSA stock.
- Διάλυμα BSA 40mg/mL: Διαλύονται 0,400g BSA ελεύθερης λιπαρών οξέων σε 10mL απεσταγμένου νερού.
- Θερμοστατούμενο υδρόλουτρο.

- Σωλήνες πολυπροπυλενίου
- Γυάλινοι σωλήνες.
- Vortex.

Αρχή μεθόδου

Το προϊόν της ενζυμικής αντίδρασης είναι ο PAF, όπου η ομάδα της φωσφοχολίνης μεταφέρεται από την CDP-Χολίνη στην AAG. Μετά την επώαση του ενζυμικού παρασκευάσματος με AAG και CDP-Χολίνη, προστίθεται κατάλληλη ποσότητα μεθανόλης για την απενεργοποίηση του ενζύμου, ενώ με κατάλληλη εκχύλιση με τη μέθοδο Bligh-Dyer εκχυλίζεται από το μίγμα της αντίδρασης ο παραγόμενος PAF στη χλωροφορμική φάση και απομονώνεται. Με τη διαδικασία της TLC ο παραγόμενος PAF διαχωρίζεται από την AAG και τυχόν παραπροϊόντα, ενώ τα επίπεδα του παραγόμενου PAF προσδιορίζονται μέσω της βιολογικής δοκιμασίας σε πλυμένα αιμοπετάλια. Ο προσδιορισμός της δραστηριότητας της PAF-CPT βασίζεται στη μέτρηση των επιπέδων του παραγομένου PAF [482].

Αναλυτική πορεία

Σε σωλήνα πολυπροπυλενίου φέρονται το ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl, 100mM pH 8,0, 10μL διαλύματος εργασίας MgCl₂ (τελική συγκέντρωση 20mM), 5μL διαλύματος EDTA (τελική συγκέντρωση 0,5mM), 15μL διαλύματος DTT (τελική συγκέντρωση 15mM), 5μL διαλύματος BSA συγκέντρωσης 40mg/mL (τελική συγκέντρωση 1mg/mL) και το ρυθμιστικό διάλυμα αναδιάλυσης. Ακολουθεί κυκλοανάδευση με χρήση του Vortex και το όλο μίγμα επωάζεται σε θερμοστατούμενο υδρόλουτρο στους 37°C, ενώ ο χρόνος αντίδρασης και η περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη διαφοροποιούνται για κάθε είδος κυττάρου και ιστού. Οι χρόνοι αντίδρασης και η τελική συγκέντρωση σε πρωτεΐνη βελτιστοποιήθηκαν με κινητική μελέτη του ενζύμου για κάθε είδος κυττάρου και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται σε ακόλουθο κεφάλαιο, ενώ μια συνοπτική παρουσίασή τους δίνεται στον Πίνακα 2.

Στο μίγμα αυτό προστίθενται το ενζυμικό παρασκεύασμα με ανάδευση και μετά από 30sec 2μL αιθανολικού διαλύματος AAG (τελική συγκέντρωση 100mM) με ανάδευση, ενώ μετά από άλλα 30sec προστίθεται 5μL διαλύματος εργασίας CDP-Χολίνης (τελική συγκέντρωση 100mM) με ανάδευση, οπότε και ξεκινά η αντίδραση.

Πίνακας 2: Χρόνοι ενζυμικής αντίδρασης και περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη που χρησιμοποιήθηκε για κάθε είδος κυττάρου για τον ενζυμικό προσδιορισμό της ανεξάρτητης διθειοθρεϊτόλης φωσφοχολινο-τρανσφεράσης του PAF (PAF-CPT).

Είδος κυττάρου	Πρωτεΐνη (μg/200μL)	Χρόνος (min)
Αιμοπετάλια	25	10
Λευκά αιμοσφαίρια	50	10
Ερυθρά αιμοσφαίρια	350	20
Ηπατοκύτταρα	30	10
Νεφρικά κύτταρα	20	20
Κύτταρα σπλήνας	50	10

Επειδή η προστιθέμενη ποσότητα του ενζυμικού παρασκευάσματος, το οποίο είναι διαλυμένο σε ρυθμιστικό διάλυμα αναδιάλυσης, μπορεί να κυμαίνεται από 1-10μL προστίθεται κατάλληλη ποσότητα ρυθμιστικού διαλύματος αναδιάλυσης ώστε όλοι οι προσδιορισμοί να περιέχουν 10μL ρυθμιστικού διαλύματος αναδιάλυσης. Ο τελικός όγκος του μίγματος επώασης είναι 200μL. Η αντίδραση σταματά με την προσθήκη 0,5mL διαλύματος μεθανόλης 2% σε οξικό οξύ που προκαλεί απενεργοποίηση του ενζυμικού παρασκευάσματος.

Για την εκχύλιση του παραγομένου PAF προστίθενται 0,25 mL χλωροφορμίου για να προκύψει διάλυμα μίας φάσης Χλωροφορμίου:Μεθανόλης:νερού με αναλογία 1:2:0,8 και μετά από έντονη ανάδευση σε Vortex προστίθενται 0,24mL Χλωροφορμίου και 0,24mL νερού για να προκύψει διφασικό διάλυμα Χλωροφορμίου:Μεθανόλης:νερού με αναλογία 1:1:0,9 σύμφωνα με τη μέθοδο εκχύλισης Bligh-Dyer. Συλλέγεται η χλωροφορμική φάση, εξατμίζεται σε ρεύμα N₂ και αναδιαλύεται σε διάλυμα Χλωροφορμίου:Μεθανόλης με αναλογία 1:1 και φυλάσσεται στους -20°C.

Ο διαχωρισμός του παραγομένου PAF επιτεύχθηκε με την μέθοδο της TLC. Μεταφέρεται το διάλυμα που περιέχει τον παραγόμενο από την ενζυμική αντίδραση PAF σε στρωμένη σε πλάκα TLC Silica G και ακολουθεί ανάπτυξη της χρωματογραφικής πλάκας TLC σε κορεσμένο θάλαμο ανάπτυξης που περιέχει σύστημα ανάπτυξης Χλωροφόρμιο:Μεθανόλη:οξικό οξύ:νερό σε αναλογία 100:57:16:8, v/v/v/v. Οι διάφορες ζώνες των λιποειδών εμφανίζονται σε ατούς Ιωδίου ενώ τα φωσφολιποειδικά κλάσματα ταυτοποιούνται με συγχρωματογράφηση προτύπων.

Εντοπίζεται η περιοχή του PAF (η περιοχή που βρίσκεται μεταξύ Sm και lyso-PC) και ακολουθεί απόξυση της ζώνης που περιέχει τον PAF ο οποίος εκχυλίζεται από την Silica με τη μέθοδο Bligh-Dyer. Συλλέγεται το διάλυμα του PAF της χλωροφορμικής φάσης, εξατμίζεται σε ρεύμα N₂, αναδιαλύεται σε διάλυμα BSA 2,5mg/mL φυσιολογικού ορού και τα επίπεδα του παραγομένου PAF προσδιορίζονται με την *in vitro* βιολογική δοκιμασία σε πλυμένα αιμοπετάλια κουνελιού.

Για κάθε προσδιορισμό γίνεται και ο αντίστοιχος τυφλός προσδιορισμός απουσία AAG. Η ειδική δραστηριότητα της PAF-CPT καθορίζεται από τα μετρούμενα επίπεδα του παραγομένου PAF.

Η ειδική δραστηριότητα του ενζύμου ορίζεται ως τα pmol παραγομένου PAF/mg πρωτεΐνης/min.

4.16 Προσδιορισμός δραστηριότητας της 1-O-αλκυλο-2-lyso-sn-γλυκερο-3-φωσφοχολίνη: ακετυλο-CoA ακετυλοτρανσφεράσης (lyso-PAF AT)

Αντιδραστήρια – Όργανα

- BSA ελεύθερη λιπαρών οξέων (Sigma)
- Ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl, 50mM pH 7.4 : Διαλύονται 0.605g Tris σε νερό, ρυθμίζεται το pH στο 7.4 με HCl 1N και ρυθμίζεται ο όγκος στα 100mL σε ογκομετρική φιάλη με προσθήκη νερού.
- Διάλυμα φύλαξης (stock) lyso-PAF σε μεθανόλη 2.5mg/mL : Διαλύονται 10mg lyso-PAF σε 4mL μεθανόλη. Το διάλυμα φυλάσσεται σε βιδωτό σωλήνα στους -20°C.
- Διάλυμα BSA 100mg/mL: Διαλύονται 1000mg BSA ελεύθερης λιπαρών οξέων σε 10mL νερού.
- Διάλυμα BSA 12.5mg/mL: Διαλύονται 100mg BSA ελεύθερης λιπαρών οξέων σε 10mL νερού.
- Διάλυμα lyso-PAF σε BSA 12.5mg/mL συγκέντρωσης 1000μM (διάλυμα εργασίας) : Φέρονται 144μL διαλύματος lyso-PAF 3.47mM σε βιδωτό σωλήνα, εξατμίζεται ο διαλύτης σε ρεύμα αζώτου και το ίζημα αναδιαλύεται σε 500μL BSA 12.5mg/mL. Παρασκευάζεται καινούριο διάλυμα κάθε φορά. Προσθήκη 4μL από το διάλυμα αυτό στον ενζυμικό

προσδιορισμό για τελικό όγκο 200μL δίνουν τελική συγκέντρωση lyso-PAF 20μM και τελική συγκέντρωση BSA 0.25mg/mL

- Διάλυμα ακετυλο-CoA 20 μM σε ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl, 50mM pH 7.4 (διάλυμα φύλαξης) : Διαλύονται 25mg (95% καθαρότητας – Sigma) σε 1352mL ρυθμιστικού διαλύματος.
- Θερμοστατούμενο υδρόλουτρο.
- Σωλήνες πολυπροπυλενίου.
- Σωλήνες υάλινοι
- Οργανικοί διαλύτες (οξικό οξύ, ακετόνη, μεθανόλη, αιθανόλη, χλωροφόρμιο)
- Πρότυπα λιποειδή: Merck, Supelco, Sigma
- Προσροφητικό υλικό : πηκτική SiO₂ (Silica Gel G 60)
- Σύστημα επίστρωσης πλακών TLC: Desaga.
- Γυάλινες πλάκες διαστάσεων 20x20cm, 20x10cm και 10x2cm.
- Ψυχόμενες φυγόκεντροι Heraeus Labofuge 400R και Sorvall RC-5B.
- Γυάλινοι θάλαμοι ανάπτυξης διαστάσεων 25x25x10cm και 11x2,5cm.
- Αλβουμίνη βοδινού ορού (BSA) stock (100mg/mL): Ποσότητα 100mg BSA ελεύθερης λιπαρών οξέων (Sigma)/mL φυσιολογικού ορού. Φυλάσσεται στους 20°C.
- Διάλυμα BSA 2,5mg/mL φυσιολογικού ορού: Από 10mL φυσιολογικού ορού αφαιρούνται 250μL και προστίθενται 250μL BSA stock.
- Vortex.

Αρχή μεθόδου

Η μέθοδος αποτελεί τροποποίηση προηγούμενης μεθόδου [483]. Το προϊόν της ενζυμικής αντίδρασης είναι ο PAF όπου η ακετυλο-ομάδα μεταφέρεται από το ακετυλο-CoA στο lyso-PAF. Προστίθεται κατάλληλη ποσότητα μεθανόλης για την απενεργοποίηση του ενζύμου, ενώ με κατάλληλη εκχύλιση με την μέθοδο Bligh-Dyer εκχυλίζεται από το μίγμα της αντίδρασης ο παραγόμενος PAF στην χλωροφορμική φάση και απομονώνεται. Με τη διαδικασία της TLC ο παραγόμενος PAF διαχωρίζεται από τυχόν παραπροϊόντα, ενώ τα επίπεδα του παραγόμενου PAF προσδιορίζονται μέσω της βιολογικής δοκιμασίας σε πλυμένα αιμοπετάλια. Ο προσδιορισμός της δραστηριότητας της lyso-PAF-AT βασίζεται στη μέτρηση των επιπέδων του παραγόμενου PAF [484].

Αναλυτική πορεία

Σε σωλήνα πολυπροπυλενίου φέρονται το ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl, 50mM pH 7.4, 4μL διαλύματος εργασίας lyso-PAF (τελική συγκέντρωση 20μM), 2μL διαλύματος εργασίας ακετυλο-CoA (τελική συγκέντρωση 200μM), το ρυθμιστικό διάλυμα αναδιάλυσης και η αντίδραση ξεκινά με την προσθήκη του ενζυμικού παρασκευάσματος. Επειδή η προστιθέμενη ποσότητα του ενζυμικού παρασκευάσματος, το οποίο είναι διαλυμένο σε ρυθμιστικό διάλυμα αναδιάλυσης, μπορεί να κυμαίνεται από 10-50μL προστίθεται κατάλληλη ποσότητα ρυθμιστικού διαλύματος ώστε όλοι οι προσδιορισμοί να περιέχουν 50μL ρυθμιστικού διαλύματος αναδιάλυσης. Ο τελικός όγκος του μίγματος επώασης είναι 200μL. Η επώαση της αντίδρασης γίνεται σε θερμοστατούμενο υδρόλουτρο στους 37°C, ενώ ο χρόνος αντίδρασης και η περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη διαφοροποιούνται για κάθε είδος κυττάρου και ιστού. Οι χρόνοι αντίδρασης και η τελική συγκέντρωση σε πρωτεΐνη βελτιστοποιήθηκαν με κινητική μελέτη του ενζύμου για κάθε είδος κυττάρου και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται σε ακόλουθο κεφάλαιο, ενώ μια συνοπτική παρουσίαση τους δίνεται στον Πίνακα 3.

Πίνακας 3: Χρόνοι ενζυμικής αντίδρασης και περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη που χρησιμοποιήθηκε για κάθε είδος κυττάρου για τον ενζυμικό προσδιορισμό της ακετυλο-CoA ακετυλοτρανσφεράσης (lyso-PAF AT).

Είδος κυττάρου	Πρωτεΐνη (μg/200μL)	Χρόνος (min)
Αιμοπετάλια	25	5
Λευκά αιμοσφαίρια	50	15
Ερυθρά αιμοσφαίρια	350	20
Ηπατοκύτταρα	5	5
Νεφρικά κύτταρα	5	5
Κύτταρα σπλήνας	5	5

Η αντίδραση σταματά με την προσθήκη 0,5mL διαλύματος μεθανόλης που προκαλεί απενεργοποίηση του ενζυμικού παρασκευάσματος.

Για την εκχύλιση του παραγομένου PAF προστίθενται 0,25mL χλωροφορμίου για να προκύψει διάλυμα μίας φάσης Χλωροφορμίου:Μεθανόλης:νερού με αναλογία 1:2:0,8 και μετά από έντονη ανάδευση σε Vortex προστίθενται 0,24mL Χλωροφορμίου και 0,24mL νερού για να προκύψει διφασικό διάλυμα

Χλωροφορμίου:Μεθανόλης:νερού με αναλογία 1:1:0,9 σύμφωνα με τη μέθοδο εκχύλισης Bligh-Dyer. Συλλέγεται η χλωροφορμική φάση, εξατμίζεται σε ρεύμα N₂ και αναδιαλύεται σε διάλυμα Χλωροφορμίου:Μεθανόλης με αναλογία 1:1 και φυλάσσεται στους -20°C.

Ο διαχωρισμός του παραγομένου PAF επιτεύχθηκε με τη μέθοδο της TLC. Μεταφέρεται το διάλυμα που περιέχει τον παραγόμενο από την ενζυμική αντίδραση PAF σε στρωμένη σε πλάκα TLC Silica G και ακολουθεί ανάπτυξη της χρωματογραφικής πλάκας TLC σε κορεσμένο θάλαμο ανάπτυξης που περιέχει σύστημα ανάπτυξης Χλωροφόρμιο:Μεθανόλη:οξικό οξύ:νερό σε αναλογία 100:57:16:8, v/v/v/v. Οι διάφορες ζώνες των λιπιδίων εμφανίζονται σε αμύξες Ιωδίου ενώ τα φωσφολιπιδικά κλάσματα ταυτοποιούνται με συγχρωματογράφιση προτύπων.

Εντοπίζεται η περιοχή του PAF (η περιοχή που βρίσκεται μεταξύ Sm και lyso-PC) και ακολουθεί απόξεση της ζώνης που περιέχει τον PAF ο οποίος εκχυλίζεται από την Silica με την μέθοδο Bligh-Dyer. Συλλέγεται το διάλυμα του PAF της χλωροφορμικής φάσης, εξατμίζεται σε ρεύμα N₂, αναδιαλύεται σε διάλυμα BSA 2,5mg/mL φυσιολογικού ορού και τα επίπεδα του παραγομένου PAF προσδιορίζονται με την *in vitro* βιολογική δοκιμασία σε πλυμένα αιμοπετάλια κουνελιού.

Για κάθε προσδιορισμό γίνεται και ο αντίστοιχος τυφλός προσδιορισμός απουσία lyso-PAF. Η ειδική δραστηριότητα της lyso-PAF-AT καθορίζεται από τα μετρούμενα επίπεδα του παραγομένου PAF.

Η ειδική δραστηριότητα του ενζύμου ορίζεται ως τα pmol παραγομένου PAF/mg πρωτεΐνης/min.

4.17 Μέτρηση ραδιενέργειας με μετρητή σπινθηρισμού υγρών

Αντιδραστήρια - Όργανα

- 2,5-Διφαινυλοξαζόλιο (PPO), BDH Chemicals
- 1,4-Δι-2-(5-φαινυλοξαζόλιο) βενζόλιο (POPOP), BDH Chemicals
- Ναφθαλίνιο
- Διοξάνη
- Υγρό σπινθηρισμού με βάση τη διοξάνη: Το διάλυμα παρασκευάζεται διαλύοντας 7g PPO, 0,3g POPOP και 100g ναφθαλινίου σε 1L διοξάνης και 200mL νερό.

- Κυκλοαναδευτήρας (vortex)
- Πλαστικά φιαλίδια μιας χρήσης (vials) όγκου 20mL.
- Μετρητής σπινθηρισμού υγρών Wallac 1209 Racbeta, Pharmacia, συνδεδεμένος με καταγραφέα Facit B3100

Αρχή μεθόδου

Το ραδιενεργό δείγμα αναμιγνύεται με το διάλυμα σπινθηρισμού που περιέχει ένα διαλύτη και μία ή περισσότερες ουσίες που φθορίζουν. Τα εκπεμπόμενα από το ραδιενεργό δείγμα β σωματίδια διεγείρουν το διαλύτη και αυτός με τη σειρά του διεγείρει τις φθορίζουσες ουσίες που εκπέμπουν φωτόνια, τα οποία καταγράφονται από ένα φωτοπολλαπλασιαστή. Το σύνολο των φωτονίων, που εκπέμπονται μετά από κάθε εκπομπή β σωματιδίων, ανιχνεύονται ως ένας παλμός, ο οποίος μεταβιβάζεται σε ένα σύστημα μέτρησης το οποίο καταγράφει τους παλμούς ως ξεχωριστές κρούσεις.

Αναλυτική πορεία

Τα δείγματα, όγκου μέχρι 0,1mL, φέρονται στα πλαστικά φιαλίδια στα οποία έχουν προστεθεί 5mL υγρού σπινθηρισμού. Αναδεύονται ισχυρά με κυκλοαναδευτήρα, κλείνονται ερμητικά με τα πώματα των φιαλιδίων και τοποθετούνται με ειδικές υποδοχές (raks) στο μετρητή σπινθηρισμού υγρών. Μετρώνται οι κρούσεις του ραδιενεργού δείγματος για 5min και τα αποτελέσματα εκφράζονται σε κρούσεις ανά λεπτό (cpm) αφού αφαιρεθούν οι κρούσεις ανά λεπτό του τυφλού προσδιορισμού που περιέχει μόνο το υγρό σπινθηρισμού.

4.18 *In vitro* οξείδωση πλάσματος με ιόντα Cu^{2+}

Αντιδραστήρια – Όργανα

- Αντιπηκτικό διάλυμα κιτρικών (AC): Σε 100mL νερού διαλύονται 1,365g κιτρικού οξέος ($\text{H}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$) και 2,5g κιτρικού νατρίου ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)
- Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (PBS) pH = 7,4, 146mM σε NaCl: Σε 240mL H_2O που βρίσκονται υπό συνεχή ανάδευση με τη βοήθεια μαγνητικού αναδευτήρα προστίθενται προς διαλυτοποίηση 0,2269g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,0602g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ και 2,1332g NaCl. Στη συνέχεια ρυθμίζεται το pH στο 7,4 και προστίθεται H_2O έως τελικό όγκο 250 mL.

- Υδατικό διάλυμα $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ συγκέντρωσης 1mM: σε 200 mL H_2O που βρίσκονται υπό συνεχή ανάδευση με τη βοήθεια μαγνητικού αναδευτήρα, προστίθενται προς διαλυτοποίηση 49,939 mg $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$.
- Πλαστικοί δοκιμαστικοί σωλήνες των 10mL.
- Πλαστικά σιφώνια των 20mL.
- Κυψελίδες από χαλαζία των 3 mL και οπτικής διαδρομής 1cm
- Αυτόματες πιπέτες των 1000 και 100μL
- Φωτόμετρο Helios

Αρχή μεθόδου

Η μέτρηση της *in vitro* οξειδωσης του πλάσματος την προκαλούμενη από ιόντα Cu^{2+} , βασίζεται στη συνεχή καταγραφή της απορρόφησης στα 245nm. Η απορρόφηση σε αυτό το μήκος κύματος οφείλεται κυρίως στα συζυγή διένια των υδροπεροξειδίων και κατά μικρότερο βαθμό σε άλλες ενώσεις όπως συζυγή διένια υδροξειδίων, που παράγονται κατά την οξειδωση των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων (PUFAs) που απαντούν στις λιποπρωτεΐνες του πλάσματος, όταν προστίθενται ιόντα Cu^{2+} .

Καταγράφοντας την απορρόφηση στα 245nm παρέχεται η δυνατότητα να παρακολουθείται η κινητική της οξειδωσης που λαμβάνει χώρα στο πλάσμα. Η κινητική αυτή είναι περίπλοκη καθώς οι λιποπρωτεΐνες του πλάσματος περιέχουν πληθώρα αντιοξειδωτικών τα οποία οξειδώνονται πρώτα εκδηλώνοντας την αντιοξειδωτική τους δράση. Στο διάστημα της οξειδωσης των αντιοξειδωτικών η απορρόφηση στα 245nm αυξάνεται ελάχιστα. Ο χρόνος που απαιτείται για να οξειδωθούν τα αντιοξειδωτικά καλείται χρόνος λανθάνουσας φάσης και αποτελεί μέτρο της αντίστασης του πλάσματος στην οξειδωση. Μόνο όταν οξειδωθούν τα αντιοξειδωτικά αρχίζουν να παράγονται τα συζυγή διένια και να αυξάνεται η απορρόφηση στα 245nm. Η καταγραφή της απορρόφησης παρέχει μια σιγμοειδή καμπύλη όπως φαίνεται στο σχήμα ή οποία έχει τα εξής χαρακτηριστικά: 1] χρόνος της λανθάνουσας φάσης (lag time), 2] η μέγιστη ταχύτητα (V_{max}) της συσσώρευσης των προϊόντων που απορροφούν στα 245 nm που εκφράζεται σε μονάδες απορρόφησης ανά min, 3] ο χρόνος (t_{max}) κατά τον οποίο παρατηρείται η V_{max} και 4] η μέγιστη συσσώρευση προϊόντων που απορροφούν που εκφράζεται σε μονάδες απορρόφησης [485].

Αναλυτική πορεία

Σε πλαστικό σωλήνα των 50mL που περιέχει 4mL αντιπηκτικού AC, λαμβάνονται 36mL αίμα. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στα 1465g για 20min σε θερμοκρασία 4°C. Λαμβάνεται το πλάσμα με πλαστικό σιφώνιο των 20mL. Ακολουθώντας σε 6 κυψελίδες χαλαζία προσθέτω 2640μL ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών (PBS) pH = 7,4, 146mM σε NaCl και 60μL πλάσματος. Ακολουθεί επώαση στους 37°C για 5min και στη συνέχεια προστίθενται 300μL $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 1mM και γίνεται καταγραφή της απορρόφησης στα 245nm σε 6 δείγματα ταυτόχρονη για χρονικό διάστημα 3h και στη θερμοκρασία των 37°C. Από την καμπύλη απορρόφησης μετρείται ο χρόνος της λανθάνουσας φάσης.

4.19 Πρωτόκολλο μελέτης της επίδρασης των ΥΑΕ σε *in vivo* μοντέλο αθηροσκλήρωσης κουνελιών Νέας Ζηλανδίας

Αντιδραστήρια-Όργανα

- Χοληστερόλη καθαρότητας USP (Sigma-Aldrich).
- Τυπική τροφή εμπορίου για κουνέλια.
- Λυοφιλοποιημένα ΥΑΕ.
- Παρασκευάσματα γιαουρτιού εμπορίου 2% σε λιπαρά και αντίστοιχα εμπλουτισμένα με ΥΑΕ με συγκέντρωση 500mg ΥΑΕ/120g γιαουρτιού
- Διαιθυλαιθέρας.
- Αναλυτικός ζυγός.
- Ανοξειδωτο μεταλλικό δοχείο.
- Ανοξειδωτες μεταλλικές επιφάνειες.

Παρασκευή τροφής

Για την παρασκευή της αθηρογόνου διαίτας (ΑΔ), κατάλληλη ποσότητα χοληστερόλης (30g) ζυγίζεται και διαλύεται σε όσο το δυνατόν μικρότερη ποσότητα διαιθυλαιθέρα η οποία μετά από δοκιμές βρέθηκε να είναι 600mL. Το διάλυμα προστίθεται μέσα σε μεταλλικό ανοξειδωτο δοχείο που περιέχει κατάλληλη ποσότητα τυπικής τροφής εμπορίου για κουνέλια (3000g), ώστε να προκύψει τροφή εμπλουτισμένη με 1% (w/w) χοληστερόλη και ακολουθεί καλή ανάμειξη μέχρι να απορροφηθεί όλη η ποσότητα του διαλύματος από την τροφή. Στη συνέχεια η τροφή απλώνεται σε μεταλλική ανοξειδωτη

επιφάνεια και αφήνεται σε ρεύμα αέρα εντός απαγωγού για τουλάχιστον 24h προκειμένου να εξατμιστεί ο διαιθυλαιθέρας.

Η αθηρογόνος αυτή τροφή χορηγήθηκε στα πειραματόζωα της αρνητικής ομάδας ελέγχου (Ομάδα Α), αλλά και στην ομάδα που χρησιμοποιήθηκε για τη μελέτη της επίδρασης των ΥΑΕ στην υποστροφή των αθηρωματικών πλακών (Ομάδα Δ) για 45 ημέρες. Για την ομάδα που τράφηκε με το γιαούρτι εμπλουτισμένο σε ΥΑΕ (Ομάδα Β) κάθε μέρα αναμιγνυόταν ένας κεσές γιαουρτιού (120g) ο οποίος περιείχε 500mg ΥΑΕ με 1000g τροφής ώστε να επιτευχθεί η τελική επιθυμητή συγκέντρωση των 50mg ΥΑΕ/100g τροφής, ενώ το ίδιο πραγματοποιήθηκε και στην ομάδα ελέγχου στην οποία δόθηκε γιαούρτι εμπορίου 2% σε λιπαρά η οποίες επίσης τράφηκαν με αυτό το σχήμα για 45 ημέρες (Ομάδα Γ).

Πριν την ευθανασία, καταγραφόταν το σωματικό βάρος κάθε κουνελιού, ενώ γινόταν καθημερινή καταγραφή της κατανάλωσης τροφής από κάθε ζώο.

Μετά το πέρας της παρέμβασης τα ζώα ευθανατώθηκαν και παραλήφθηκαν η θωρακική αορτή από την καρδιά έως και τα λαγόνια όπου πραγματοποιήθηκε μορφομετρική ανάλυση τόσο στην ανιούσα αορτή όσο και στο συνολικό μήκος της αορτής, ώστε να υπολογιστεί το πάχος και η έκταση των πρώιμων αθηρωματικών πλακών που είχαν σχηματιστεί. Επίσης παρελήφθη ένας νεφρός, τμήμα του ήπατος και τμήματα του λεπτού και του παχέος εντέρου, τα οποία δόθηκαν για αξιολόγηση στο Εργαστήριο Ιατροδικαστικής και Τοξικολογίας, της Ιατρικής Σχολής του ΕΚΠΑ, σε συνεργασία με τον Αναπληρωτή καθηγητή Σ. Θεοχάρη. Εκτός από τους προαναφερθέντες ιστούς ξεχωριστά τμήματά τους λήφθηκαν για τη μελέτη της επίδρασης της διαιτητικής παρέμβασης στα μεταβολικά ένζυμα του PAF. Εκτός από τους ιστούς σε όλα τα πειραματόζωα λήφθηκε αίμα από την κεντρική αορτή του αυτιού, στην αρχή της μελέτης, και πριν την ευθανασία όπου προσδιορίστηκαν οι βασικοί βιοχημικοί δείκτες στο εργαστήριο Πειραματικής Χειρουργικής και Χειρουργικής Ερεύνης "Ν.Σ. Χρηστέας" της Ιατρικής Σχολής του ΕΚΠΑ, σε συνεργασία με την καθηγήτρια Δ. Περρέα, ενώ απομονώθηκαν ορός, πλάσμα και διαχωρίστηκαν τα έμμορφα συστατικά του, για να μελετηθούν επίσης τα ένζυμα του PAF όπως αναφέρεται σε προηγούμενη παράγραφο.

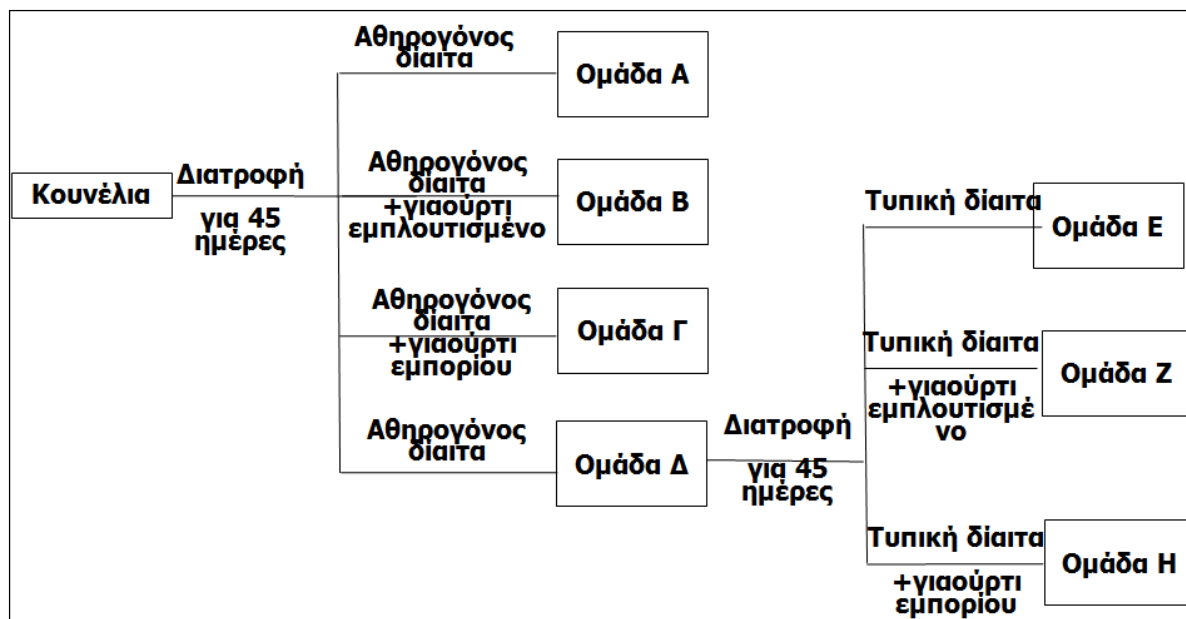
Για το μοντέλο μελέτης της υποστροφής των αθηρωματικών πλακών τα πειραματόζωα της Ομάδας Δ μετά το πέρας των 45 ημερών χωρίστηκαν σε τρεις νέες ομάδες από τις οποίες η μία τράφηκε με τυπική κουνελοτροφή (TK) (Ομάδα Ε), η Ομάδα Η τράφηκε με TK εμπλουτισμένη με γιαούρτι εμπορίου 2% σε λιπαρά και η Ομάδα Ζ η οποία τράφηκε με TK και γιαούρτι 2% σε λιπαρά που περιείχε 500mg ΥΑΕ/120g γιαουρτιού. Οι τρεις αυτές ομάδες τράφηκαν με αυτό το σχήμα για 45 ημέρες, ενώ ακολουθήθηκαν οι ίδιες διαδικασίες ζύγισης και λήψης δειγμάτων όπως περιγράφονται στην προηγούμενη παράγραφο για τη μελέτη της αναστολής σχηματισμού αθηρωματικών πλακών.

Μια σχηματική αναπαράσταση του μοντέλου που ακολουθήθηκε παρουσιάζεται στην Εικόνα 5 [486].

Ζωικά πρότυπα

Το ζωικό πρότυπο του λευκού κουνελιού Νέας Ζηλανδίας είναι πολύ επιδεκτικό στην πρόκληση αθηροσκλήρωσης μέσω διατροφής. Έτσι τα ζώα αυτά αναπτύσσουν πρώιμες αθηροσκληρωτικές βλάβες σε διάστημα 1,5 μηνών, όταν χορηγηθεί σε αυτά τυπική τροφή εμπορίου για κουνέλια εμπλουτισμένη με 1% (w/w) χοληστερόλη.

Για την *in vivo* μελέτη χρησιμοποιήθηκαν 36 υγιή αρσενικά λευκά κουνέλια Νέας Ζηλανδίας. Οι συνθήκες διαβίωσης και χειρισμού των κουνελιών ήταν σύμφωνα με τις προδιαγραφές του Π.Δ. 160/91, με το οποίο εναρμονίστηκε η Ελλάδα στην Κοινοτική οδηγία 609/86. Τα ζώα στεγάστηκαν στον οίκο ζωικών προτύπων του Εργαστηρίου Πειραματικής χειρουργικής και Χειρουργικής Έρευνας της Ιατρικής Σχολής του ΕΚΠΑ, σε ατομικούς ανοξείδωτους μεταλλικούς κλωβούς και σε σταθερές συνθήκες θερμοκρασίας (19 ± 1 °C), σχετικής υγρασίας ($55 \pm 5\%$) και αερισμού (12 πλήρεις αλλαγές αέρα ανά h), καθώς και σταθερό ημερήσιο φωτός/σκότους (12h/12h). Για τον εγκλιματισμό των πειραματόζωων, πριν την έναρξη του *in vivo* πειράματος, παρέμειναν στον εργαστηριακό χώρο για 5 ημέρες.



Εικόνα 5: Σχηματική αναπαράσταση του πρωτόκολλου που ακολουθήθηκε για την παρούσα μελέτη

4.20 Ευθανασία κουνελιών και παραλαβή αορτής

Προκειμένου να περιοριστεί κατά το δυνατόν ο πόνος, η ταλαιπωρία και η αγωνία του ζώου η ευθανασία των κουνελιών γίνεται με χρήση κατάλληλων ουσιών. Συγκεκριμένα χορηγείται ενδομυϊκά ξυλαζίνη σε ποσότητα 5mg/Kg σωματικού βάρους και κεταμίνη σε ποσότητα 25mg/Kg σωματικού βάρους ώστε το ζώο να εισέλθει σε αναισθησία. Ακολούθως χορηγείται ενδοφλέβια νατριούχος θειοπεντανάλη (πεντοθάλη) σε ποσότητα 20mg/Kg σωματικού βάρους και το κουνέλι θανατώνεται.

Με μέση θωρακοκοιλιακή τομή γίνεται προσπέλαση στη θωρακική και κοιλιακή αορτή η οποία και αποκόπτεται από το αορτικό τόξο έως το διχασμό της στα λαγόνια αγγεία.

4.21 Μονιμοποίηση των αορτικών παρασκευασμάτων

Τα αορτικά παρασκευάσματα τοποθετούνται σε μονιμοποιητικό υγρό φορμόλης 10% για 24h σε θερμοκρασία δωματίου. Φροντίζεται να μην υπάρχει αίμα ή άλλα υγρά από τα παρασκευάσματα καθώς αυτά εξασθενούν την ικανότητα της φορμόλης για μονιμοποίηση. Η φορμόλη διεισδύει ταχέως στον ιστό προσδίδοντάς του συμπαγή σύσταση χωρίς να τους καθιστά εύθρυπτους, προσφέροντας καλή μονιμοποίηση στα παρασκευάσματα οπότε γίνεται απαθανάτιση των κυττάρων και της μεσοκυττάριας ύλης σε μια

συγκεκριμένη φάση της λειτουργίας τους. Η καλή μονιμοποίηση αποτελεί πρωταρχική προϋπόθεση για μια τεχνικά άρτια μικροσκοπική τομή.

4.22 Επεξεργασία μονιμοποιημένων αορτικών παρασκευασμάτων για μικροσκοπικές τομές παραφίνης

Προκειμένου να γίνει μελέτη στο μικροσκόπιο είναι απαραίτητη η λήψη πολύ λεπτών τομών των ιστών πάχους 3 έως 5μm. Για να επιτευχθεί τομή τέτοιου πάχους ο καλά μονιμοποιημένος ιστός εμποτίζεται με παραφίνη η οποία προσδίδει στα παρασκευάσματα την απαιτούμενη ανθεκτικότητα για να γίνουν τομές στο μικροτόμο. Πριν την εμπότιση των παρασκευασμάτων με παραφίνη απαιτείται η πλήρης αφυδάτωση του ιστού λόγω του υδρόφοβου χαρακτήρα της παραφίνης. Για το λόγω αυτό μετά τη μονιμοποίησή τους τα αορτικά παρασκευάσματα κατεργάζονται με αιθυλική αλκοόλη. Στη συνέχεια ακολουθεί διαφανοποίηση που συνίσταται σε κατεργασία με ξυλόλη, η οποία είναι αναμίξιμη με την παραφίνη.

Αφυδάτωση των ιστών με αλκοόλες

Τα καλά μονιμοποιημένα αορτικά παρασκευάσματα διέρχονται από υδατικά διαλύματα αλκοόλης που εμφανίζουν προοδευτική αύξηση στην περιεκτικότητά τους μέχρι και τον απόλυτο βαθμό. Η διαδικασία γίνεται υπό συνεχή ανατάραξη για να επιταχύνεται η επεξεργασία αφυδάτωσης. Συγκεκριμένα, η κατεργασία του παρασκευάσματος φαίνεται στον Πίνακα 4. Ο όγκος των αφυδατικών υγρών για τα αορτικά παρασκευάσματα είναι 100mL που ικανοποιεί την απαίτηση για 20 έως 50 φορές μεγαλύτερο όγκο από αυτόν του παρασκευάσματος

Πίνακας 4: Η πορεία κατεργασίας των αορτικών δειγμάτων με αιθανόλη.

Υγρό αφυδάτωσης	Διάρκεια (min)	Συνολική διάρκεια (h)
Αιθανόλη 70 %	25	2,5
Αιθανόλη 80 %	25	
Αιθανόλη 90 %	25	
Αιθανόλη 100 %	30	
Αιθανόλη 100 %	45	

Διαφανοποίηση των ιστών με ξυλόλη

Αφού τα παρασκευάσματα αφυδατωθούν κατεργάζονται με ξυλόλη η οποία είναι αναμίξιμη με την παραφίνη. Η κατεργασία συνίσταται σε δύο αλλαγές ξυλόλης διάρκειας 30min η κάθε μία. Η ξυλόλη έχει την ικανότητα να αυξάνει το δείκτη διάθλασης των ιστών καθιστώντας τους σχετικά διαφανείς.

Εμπότιση των ιστών με λειωμένη παραφίνη

Αφού τα παρασκευάσματα διαφανοποιηθούν κατεργάζονται με λειωμένη παραφίνη στο σημείο τήξης της (περίπου 55°C), προκειμένου ο ιστός να εμποτιστεί με παραφίνη. Η κατεργασία περιλαμβάνει δύο αλλαγές σε λειωμένη παραφίνη διάρκειας 1h η κάθε μία.

Σκήνωμα του δείγματος με παραφίνη

Το δείγμα προσανατολίζεται σε ειδικά καλούπια και σκεπάζεται με λειωμένη παραφίνη. Ακολουθεί αμέσως στερεοποίηση της λειωμένης παραφίνης σε χαμηλές θερμοκρασίες οδηγώντας στο σχηματισμό κύβων (blocks) στερεάς παραφίνης που φέρουν στο μέσο τους εγκλωβισμένο το δείγμα. Ακολούθως λαμβάνονται τομές πάχους 3 έως 5μm στο μικροτόμο.

Προετοιμασία ιστολογικών τομών για χρώση.

Οι ιστολογικές τομές, μετά τη λήψη τους απλώνονται στην επιφάνεια υδατόλουτρου θερμοκρασίας περίπου 45°C, μικρότερης του σημείου τήξης της παραφίνης, και καθώς επιπλέουν αποσπώνται με αντικειμενοφόρες πλάκες και κατεργάζονται στους 60°C οπότε επέρχεται μόνιμη προσκόλληση στην αντικειμενοφόρο πλάκα. Η αντικειμενοφόρος πλάκα με τις τομές του ιστού και σε θερμοκρασία 40°C βυθίζεται σε ξυλόλη δύο φορές και επί 2min κάθε φορά ώστε να διαλυθεί η παραφίνη (αποπαραφίνοποίηση). Στη συνέχεια η αντικειμενοφόρος πλάκα βυθίζεται δύο φορές σε ισοπροπανόλη επί 1min κάθε φορά προκειμένου να απομακρυνθεί η ξυλόλη. Ακολούθως πραγματοποιείται ενυδάτωση με διαδοχικά λουτρά αλκοόλης 80%, 50% και τέλος νερό επί 1min κάθε φορά. Μετά τη διαδικασία αυτή, τα παρασκευάσματα είναι έτοιμα για χρώση.

4.23 Χρώση με αιματοξυλίνη-ηωσίνη

Αντιδραστήρια

- *Αιματοξυλίνη (κατά Ehrlich):*

Διάλυμα A: Διαλύονται 2g αιματοξυλίνης σε 100 mL απόλυτης αιθανόλης.

Διάλυμα Β: Διαλύονται 20g θειικού καλιοαργιλίου σε 100mL απεσταγμένο νερό και προστίθενται 100mL γλυκερίνης.

Αφού επιτευχθεί πλήρης διαλυτοποίηση τα διαλύματα Α και Β αναμιγνύονται και προστίθενται 10mL οξικό οξύ. Το διάλυμα αφήνεται να ωριμάσει για χρονικό διάστημα 2 μηνών. Το διάλυμα αποκτά κόκκινο σκούρο χρώμα, διαρκεί για πολλά χρόνια και βάφει τους πυρήνες των κυττάρων μωβ.

▪ *Ηωσίνη:*

Διαλύεται 1g ηωσίνης Υ σε 1000mL αιθανόλης 70% και προστίθενται 5mL οξικού οξέος. Μετά τη διαλυτοποίηση προστίθενται 1000mL αιθανόλης 70% και 2-3 σταγόνες οξικού οξέος. Το διάλυμα διαρκεί για πολλά χρόνια και βάφει το κυτταρόπλασμα ροζ.

Αναλυτική πορεία βαφής

Τα παρασκευάσματα αφήνονται για 5 έως 15min σε αιματοξυλίνη. Στη συνέχεια ξεπλένονται επί 2-3min με νερό βρύσης ελαφρά αλκαλικό με σόδα (Na_2CO_3). Ακολουθεί βαφή σε ηωσίνη επί 5 έως 10min κατά τη διάρκεια της οποίας γίνεται παρατήρηση του αντικειμένου και συνεχίζεται η χρώση έως επιτεύξεως του επιθυμητού αποτελέσματος. Αν είναι περισσότερο χρωματισμένο από ότι πρέπει βυθίζεται για λίγο σε αιθανόλη και συνεχίζεται η χρώση έως ότου ληφθεί ικανοποιητική εικόνα.

4.24 Μικροσκοπική μορφομετρική ανάλυση των χρωματισμένων ιστολογικών τομών

Η διάταξη ανάλυσης εικόνα περιλαμβάνει μικροσκόπιο Zeiss Axiblab (Carl Zeiss, Jena GmbH, Jena, Germany) με προσαρμοσμένη CCD βιντεοκάμερα (Sony corporation, Tokyo Japan) και συνδεδεμένο H/Y Pentium III, εφοδιασμένο με το ειδικό πρόγραμμα Sigma Scan pro (Science, GmbH, Erkarth Germany) για την επεξεργασία και ανάλυση τάσης μικροσκοπικής εικόνας.

Η επεξεργασία των ιστολογικών τομών έγινε υπό μεγέθυνση x100 και τυπώθηκαν φωτογραφίες στον προσαρμοσμένο ειδικό εκτυπωτή (video printer UP 23009, Sony).

Η μέτρηση τόσο του πάχους όσο και της έκτασης των αθηρωματικών πλακών που είχαν σχηματιστεί στα αγγεία και εμφανίστηκαν στις μικροφωτογραφίες ως αφρώδη κύτταρα, μετρήθηκαν με τη χρήση του λογισμικού προγράμματος Image J v.1.41 (National Institutes of Health, USA).

4.25 Προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής ικανότητας των δειγμάτων με τη μέθοδο του DPPH

Αντιδραστήρια-Όργανα

- Αιθανόλη
- Πρότυπο αιθανολικό διάλυμα DPPH (2,2-διφαινυλο-1-πικρυλοδραζόλη) συγκέντρωσης 0,4mg/mL.
- Κυψελίδες από χαλαζία των 3mL και οπτικής διαδρομής 1cm
- Φιάλη Αζώτου
- Υδρόλουτρο
- Φωτόμετρο Helios

Αρχή της μεθόδου

Σε αυτή τη μέθοδο η έγχρωμη (μοβ) ελεύθερη ρίζα του DPPH ανάγεται από τα υπάρχοντα στο προς μέτρηση δείγμα αντιοξειδωτικά ή αναγωγικά μόρια στην αντίστοιχη υδραζίνη, η οποία είναι χρώματος κίτρινου αχνού. Η ικανότητα δέσμευσης των ελευθέρων ριζών μετράται σε οργανικό διαλύτη (αιθανόλη) με τη μείωση της απορρόφησης του μετρούμενου δείγματος στα 516nm, όταν σταθεροποιηθεί το χρώμα του [487].

Αναλυτική πορεία

Το δείγμα των λιποειδών τοποθετείται μέσα στην κυψελίδα και εξατμίζεται μέχρι ξηρού σε ρεύμα αζώτου. Στη συνέχεια προστίθενται κατάλληλη ποσότητα αιθανόλης και του αιθανολικού διαλύματος του DPPH έτσι ώστε ο τελικός όγκος στην κυψελίδα να είναι 800μL. Στη συνέχεια τα δείγματα θερμοστατούνται σε υδρόλουτρο θερμοκρασίας 37°C για 30min ώστε να ολοκληρωθεί η αντίδραση. Τα δείγματα στη συνέχεια φωτομετρούνται στα 516nm και τα αποτελέσματα εκφράζονται σε EC₅₀, δηλαδή την ποσότητα εκείνη του υπό εξέταση δείγματος η οποία χρειάζεται για να μειωθεί η αρχική

ποσότητα του DPPH στο μισό. Η ποσότητα του DPPH που θα προστεθεί στο δείγμα υπολογίζεται από καμπύλη βαθμονόμησης η οποία κατασκευάζεται πριν τη μέτρηση με διάφορες ποσότητες αιθανολικού διαλύματος DPPH συγκέντρωσης 0,4mg/mL, ώστε να βρεθεί η ποσότητα εκείνη που η απορρόφηση είναι ίση με 1.

4.26 Προσδιορισμός των κυτταροκινών στα βιολογικά δείγματα των κουνελιών

Αντιδραστήρια – όργανα

USCN Elisa kit για TNF-α, IL-1β και CRP κουνελιού που περιλαμβάνει:

Πλακίδια 96 θέσεων προεπιστρωμένα με ειδικό αντίσωμα για τη μετρούμενη κυτταροκίνη κουνελιού (ξεχωριστά πλακίδια για κάθε μία από τις TNF-α, IL-1β και CRP)

Αντιδραστήριο ανίχνευσης A (Detection Reagent A): Το οποίο περιέχει αντίσωμα έναντι της εκάστοτε μετρούμενης κυτταροκίνης προσδεμένο με βιοτίνη. Το διάλυμα αποθήκευσης αραιώνεται 1/100 με διάλυμα αραιώσης A (εργασίας) ώστε να παρασκευαστεί το αντιδραστήριο A εργασίας.

Αντιδραστήριο ανίχνευσης B (Detection Reagent B): Το οποίο περιέχει Αβιδίνη προσδεμένη με υπεροξειδάση από *A. rusticana*. Το διάλυμα αποθήκευσης αραιώνεται 1/100 με διάλυμα αραιώσης B (εργασίας) ώστε να παρασκευαστεί το αντιδραστήριο B εργασίας.

Πρότυπα κυτταροκινών κουνελιού μάζας 1000pg για τον TNF-α, 2000pg για την IL-1β και 10ng για την CRP.

Διαλύματα αραιώσης A και B, τα οποία αραιώνονται σε αναλογία 1/1 ώστε να παραληφθούν τα αντίστοιχα διαλύματα εργασίας τα οποία χρησιμοποιούνται για τη διάλυση των αντιδραστηρίων ανίχνευσης.

Διάλυμα αραιώσης προτύπων, ειδικά για το κάθε πρότυπο κυτταροκίνης

Διάλυμα έκπλυσης (αποθήκευσης). Από το οποίο παρασκευάζεται το διάλυμα έκπλυσης (εργασίας) με προσθήκη 20mL του διαλύματος αποθήκευσης σε 580mL απεσταγμένου νερού.

Διάλυμα 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine (TMB)

Διάλυμα τερματισμού, το οποίο περιέχει θειικό οξύ

Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (PBS): Διαλύονται 0.9076g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.2408g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 9g NaCl σε απεσταγμένο νερό, ρυθμίζεται το pH στο 7.4 και συμπληρώνεται ο όγκος στο 1l σε ογκομετρική φιάλη. Ακολουθεί αποστείρωση για 20 λεπτά στους 110°C .

Δοκιμαστικοί σωλήνες των 10ml

Φιαλίδια erpendorf

Κυκλοαναδευτήρας (vortex)

Φωτόμετρο Elisa reader

Αρχή της μεθόδου

Τα βιολογικά δείγματα τοποθετούνται στις προεπιστρωμένες θέσεις του πλακιδίου όπου δεσμεύεται η περιεχόμενη σε αυτά κυτταροκίνη πάνω στο αντίσωμα. Στη συνέχεια το αντιδραστήριο ανίχνευσης A δεσμεύεται πάνω στα αντισώματα τα οποία έχουν δεσμευτεί με την προς μέτρηση κυτταροκίνη. Το αντιδραστήριο ανίχνευσης B συμπλέκεται με τα μόρια βιοτίνης του αντιδραστηρίου A. Στη συνέχεια προστίθεται το χρωμοφόρο TMB το οποίο αποδίδει μπλε χρώμα στα δείγματα που περιέχουν δεσμευμένη υπεροξειδάση από *A. Rusticana*. Στη συνέχεια η προσθήκη H_2SO_4 στις θέσεις του πλακιδίου, σταματάει την αντίδραση και αποδίδει ένα τελικό κίτρινο χρωματισμό, η ένταση του οποίου φωτομετράται στα $450 \pm 10\text{nm}$. Η συγκέντρωση της ουσίας στο δείγμα προσδιορίζεται με βάση την πρότυπη καμπύλη αναφοράς.

Αναλυτική πορεία

Συλλογή δειγμάτων.

Για την ανάλυση μπορούν να χρησιμοποιηθούν ορός, πλάσμα ή άλλο βιολογικό υγρό. Ο ορός και το πλάσμα παραλαμβάνονται με τη μεθοδολογία που περιγράφεται παραπάνω στο κεφάλαιο. Για τα ομογενοποιημένα ιστών χρειάζεται ένα επιπλέον βήμα φυγοκέντρησης για 20min στα $1000 \times g$ ώστε να απομακρυνθούν τα σωματίδια και παραλαμβάνεται το υπερκείμενο.

Για τη μέτρηση της CRP τα δείγματα ορού αραιώθηκαν σε αναλογία 1/500 σύμφωνα με τις υποδείξεις του κατασκευαστή. Η αραιώση έγινε με διάλυμα PBS σε δύο βήματα, πρώτα το δείγμα αραιώθηκε στο 1/10 (20μL δείγματος

σε 180μL PBS) και στη συνέχεια αυτό το διάλυμα αραιώθηκε ξανά στο 1/50 (10μL σε 490μL PBS).

Για τα δείγματα ιστών πραγματοποιήθηκαν δοκιμαστικές μετρήσεις με διαφορετικές περιεκτικότητες πρωτεΐνης ώστε να επιβεβαιωθεί και να βελτιστοποιηθεί η απόκριση του kit στα προς μέτρηση δείγματα ιστών. Έτσι υπολογίστηκε ότι η βέλτιστη συγκέντρωση μέτρησης των πρωτεϊνών ήταν τα 19μg πρωτεΐνης/100μL και όλες οι αραιώσεις έγιναν με το ρυθμιστικό διάλυμα PBS.

Πρότυπα

Για την παρασκευή των προτύπων καμπυλών στα φιαλίδια που περιέχουν τα εκάστοτε πρότυπα των κυτταροκινών προστίθεται 1mL στο καθένα από το ειδικό διάλυμα αραιώσης του κάθε προτύπου. Στη συνέχεια γίνονται διαδοχικές αραιώσεις του αρχικού αυτού διαλύματος λαμβάνοντας 500μL του αρχικού διαλύματος, τα οποία προστίθενται σε σωληνάκι που περιέχει 500μL του αντίστοιχου διαλύματος αραιώσης, πετυχαίνοντας έτσι αραιώση 1/1. Οι αναδεύσεις γίνονται ήπια με την πιπέτα για να αποφευχθεί ο σχηματισμός φυσαλίδων. Με τη μέθοδο αυτή οι συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν για τον TNF-α σε pg/mL ήταν: 1000, 500, 250, 125, 62,5, 31,2 και 15,6. Οι ίδιες συγκεντρώσεις χρησιμοποιήθηκαν και για την IL-1β καθώς σαν μέγιστο πρότυπο δεν χρησιμοποιήθηκε η 2000pg/mL αλλά η 1/1 αραιώσή της. Για την CRP η καμπύλη σε ng/mL ήταν: 10, 5, 2,5, 1,25, 0,625, 0,312 και 0,156.

Διαδικασία ανάλυσης

Στα πηγαδάκια τοποθετούνται 100μL από τα πρότυπα εις διπλούν από το μεγαλύτερο στο μικρότερο ενώ σε κάθε πλακίδιο τοποθετήθηκαν και τυφλά που ήταν το διάλυμα αραιώσης των προτύπων. Στη συνέχεια τοποθετήθηκαν 100μL από τα βιολογικά δείγματα (ορός και ομογενοποιημένα ιστών). Τα δείγματα καλύπτονται με ειδικές μεμβράνες και αφήνονται να επωαστούν για 2h στους 37°C.

Μετά την πρώτη αυτή επώαση τα πλακίδια αναστρέφονται σε χαρτί και απομακρύνεται το βιολογικό δείγμα. Στη συνέχεια και χωρίς έκπλυση προστίθεται 100μL από το κατάλληλο διάλυμα ανίχνευσης A (εργασίας) για κάθε κυτταροκίνη.

Τα πλακίδια καλύπτονται και αφήνονται για επώαση στους 37°C για 1h, ενώ στη συνέχεια τα πλακίδια αναστρέφονται σε χαρτί και ξεπλένονται με 200μL διαλύματος έκπλυσης (εργασίας) για 4 φορές ανά πηγαδάκι.

Αφού εκπλυθούν και στεγνώσουν καλά στα πηγαδάκια προστίθενται 100μL από το διάλυμα ανίχνευσης B (εργασίας) και αφήνονται να επωαστούν καλυμμένα στους 37°C για 0,5h, μετά το πέρας των οποίων τα πλακίδια αναστρέφονται σε χαρτί και ξεπλένονται με 200μL διαλύματος έκπλυσης (εργασίας) για 6 φορές ανά πηγαδάκι.

Αφού στεγνώσουν τα πηγαδάκια προστίθενται 90μL του χρωμοφόρου διαλύματος TMB και επωάζονται στους 37°C για 15-25min και όχι πάνω από 30min, ενώ παρατηρείται συνεχώς το χρώμα τους εν συγκρίσει με αυτό των προτύπων της καμπύλης ώστε να μη το ξεπεράσουν. Με το πέρας της αντίδρασης προστίθεται άμεσα το διάλυμα τερματισμού το οποίο μετατρέπει το χρώμα από μπλε-ιώδες σε κίτρινο, και τα δείγματα μετρώνται άμεσα στα 450±10nm. Τα αποτελέσματα για τον ορό εκφράζονται σε pg/mL για την IL-1β και τον TNF-α και ng/mL για την CRP, ενώ για τα δείγματα ιστών εκφράζονται σε pg/μg πρωτεΐνης και ng/μg πρωτεΐνης αντίστοιχα.

4.27 Προσδιορισμός σακχάρων στα λιποειδή

Αντιδραστήρια-Όργανα

- Πυκνό θειικό οξύ
- Διάλυμα φαινόλης 5%
- Πρότυπο διάλυμα Γλυκόζης
- Φωτόμετρο Helios
- Υδρόλουτρο
- Φιάλη Αζώτου

Αρχή της μεθόδου

Οι εξόζες σχηματίζουν με την επίδραση πυκνού θειικού οξέος ω-οξυμεθυλοφουρφουρόλη, η οποία δίνει έγχρωμη ένωση που απορροφά στα 490nm, με φαινόλη. Η προσθήκη του πυκνού θειικού οξέος έχει παράλληλα ως αποτέλεσμα την υδρόλυση τυχόν παραγώγων των εξοζών. Με τη μέθοδο

αυτή προσδιορίζονται και οι πεντόζες, οι οποίες σχηματίζουν μεθυλοφουρφουράλη [488].

Αναλυτική πορεία

Το δείγμα, που πρέπει να περιέχει 20-150μg σακχάρων, φέρεται σε ψηλό δοκιμαστικό σωλήνα και ο διαλύτης εξατμίζεται σε ρεύμα αζώτου. Στη συνέχεια προστίθενται 1mL διαλύματος φαινόλης και 2,5mL διαλύματος πυκνού θειικού οξέος. Μετά από 15min παραμονή σε θερμοκρασία δωματίου, τα δείγματα φωτομετρούνται στα 490nm.

Παράλληλα εκτελείται και τυφλός προσδιορισμός για εύρεση πρότυπης καμπύλης αναφοράς με δείγματα που περιέχουν 10-520μg γλυκόζης. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε μg γλυκόζης/mg δείγματος.

4.28 Προσδιορισμός φαινολικών στα λιποειδή

Αντιδραστήρια-Όργανα

- Αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu: Διαλύονται 10g βολφραμικού νατρίου και 2,5g μολυβδαινικού νατρίου σε 70mL νερού. Στη συνέχεια προστίθενται 5mL φωσφορικού οξέος 85% και 10mL πυκνού υδροχλωρικού οξέος. Το μείγμα αφήνεται σε επαναρροή για 10h. Έπειτα, προστίθενται 16g θειικού λιθίου, 5mL νερού και μια σταγόνα βρωμίου και ακολουθεί επαναρροή επί 15min. Αφήνεται να επανέλθει σε θερμοκρασία δωματίου και φέρεται σε όγκο 100mL με προσθήκη νερού. Στο διάλυμα σχηματίζονται εξασθενή σύμπλοκα των φωσφομολυβδαινικού/ φωσφοβολφραμικού οξέος με τις ακόλουθες μορφές σχηματίζονται στο διάλυμα:
 - $3\text{H}_2\text{O} \cdot \text{P}_2\text{O}_5 \cdot 13\text{WO}_3 \cdot 5\text{MOO}_3 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$
 - $3\text{H}_2\text{O} \cdot \text{P}_2\text{O}_5 \cdot 14\text{WO}_3 \cdot 4\text{MOO}_3 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$
 - Πρότυπο διάλυμα Γαλλικού οξέος
 - Διάλυμα Na_2CO_3 35% w/v
 - Φωτόμετρο Helios
 - Υδρόλουτρο
 - Φιάλη Αζώτου

Αρχή της μεθόδου

Παρουσία του αντιδραστηρίου Folin-Ciocalteu, οι φαινόλες οξειδώνονται προς τις αντίστοιχες κινόνες και τα προαναφερθέντα οξέα φωσφομολυβδαινικού/φωσφοβολφραμικού ανάγονται μερικώς από την κατάσταση σθένους +6 σε ένα μείγμα ενώσεων με σθένη +6 και +5, που έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή συμπλόκου μπλε χρώματος, το οποίο και φωτομετρείται στα 725nm [489].

Αναλυτική πορεία

Το δείγμα των λιποειδών εξατμίζεται μέχρι ξηρού σε ρεύμα αζώτου. Στη συνέχεια προστίθενται διαδοχικά: 3,5mL νερό και 0,1mL αντιδραστηρίου Folin-Ciocalteu. Αναδεύονται ισχυρά και μετά από παραμονή 3min, προστίθενται 0,4mL Na₂CO₃ 35% και το μείγμα, αφού αναδευτεί ξανά ισχυρά, αφήνεται προς αντίδραση για μια ώρα και έπειτα φωτομετρείται στα 725nm.

Παράλληλα εκτελείται και τυφλός προσδιορισμός καθώς και προσδιορισμός σε πρότυπα διαλύματα γαλλικού οξέος από 1 έως 60μg, οπότε και κατασκευάζεται πρότυπη καμπύλη αναφοράς, από την οποία υπολογίζεται η περιεκτικότητα σε φαινόλες στο προς ανάλυση δείγμα, η οποία εκφράζεται σε μg γαλλικού οξέος/mg δείγματος.

4.29 Προσδιορισμός ο-διφαινολικών συστατικών στα λιποειδή

Αντιδραστήρια-Όργανα

- Απόλυτη Αιθανόλη
- Πρότυπο διάλυμα Καφεϊκού οξέος
- Διάλυμα Μολυβδαινικού Νατρίου 5% w/v σε αιθανόλη 50%
- Φωτόμετρο Helios
- Φιάλη Αζώτου
- Υδρόλουτρο

Αρχή της μεθόδου

Παρουσία του μολυβδαινικού νατρίου, οι φαινόλες οξειδώνονται προς τις αντίστοιχες κινόνες και τα φωσφομολυβδαινικά/φωσφοβολφραμικά οξέα ανάγονται μερικώς από την κατάσταση σθένους +6 σε ένα μείγμα ενώσεων με

σθένη +6 και +5, που έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή συμπλόκου μπλε χρώματος, το οποίο και φωτομετρείται στα 725nm.

Η διαφορά του από το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu είναι η απουσία οξέος, το οποίο υδρολύει τις πολυφαινόλες ώστε να προσδιοριστούν ποσοτικά [490, 491].

Αναλυτική πορεία

Το δείγμα των λιποειδών εξατμίζεται μέχρι ξηρού σε ρεύμα αζώτου. Στη συνέχεια προστίθενται 3,6mL αιθανόλης 50% και ακολουθεί ισχυρή ανάδευση ώστε να αναδιαλυθούν τα λιποειδή, τα οποία έχουν κολλήσει στο σωληνάκι. Στη συνέχεια προσθέτουμε 400μL του διαλύματος Μολυβδαινικού Νατρίου 5w/v σε αιθανόλη 50%. Αναδεύονται ισχυρά και μετά από παραμονή 15 min, ώστε να ολοκληρωθεί η αντίδραση και στη συνέχεια τα δείγματα φωτομετρούνται στα 370nm.

Παράλληλα εκτελείται και τυφλός προσδιορισμός καθώς και προσδιορισμός σε πρότυπα διαλύματα γαλλικού οξέος από 10 έως 200μg, οπότε και κατασκευάζεται πρότυπη καμπύλη αναφοράς, από την οποία υπολογίζεται η περιεκτικότητα σε φαινόλες στο προς ανάλυση δείγμα, η οποία εκφράζεται σε μg Καφεϊκού οξέος /mg δείγματος.

4.30 Προσδιορισμός των διαφόρων βιοφαινολικών συστατικών στα λιποειδή

Αντιδραστήρια-Όργανα

- Αιθανόλη 95% η οποία περιέχει 0,1% Υδροχλωρικό Οξύ
- Διάλυμα Υδροχλωρικού οξέος 2%
- Πρότυπο διάλυμα Γαλλικού οξέος
- Πρότυπο διάλυμα Καφεϊκού οξέος
- Πρότυπο διάλυμα Κουερσετίνης
- Φωτόμετρο Helios
- Φιάλη Αζώτου
- Υδρόλουτρο

Αρχή της μεθόδου

Το δείγμα υδρολύεται με περίσσεια υδροχλωρικού οξέος και στη συνέχεια οι διάφορες φαινολικές ομάδες προσδιορίζονται φασματοφωτομετρικά σε διάφορα μήκη κύματος [490, 492].

Αναλυτική πορεία

Το δείγμα των λιποειδών εξατμίζεται μέχρι ξηρού σε ρεύμα αζώτου. Στη συνέχεια προστίθενται 400μL αιθανόλης 95% και οξινισμένη μέχρι περιεκτικότητας 0,1% με υδροχλωρικό οξύ ακολουθεί ισχυρή ανάδευση ώστε να αναδιαλυθούν τα λιποειδή, τα οποία έχουν κολλήσει στο σωληνάκι. Στη συνέχεια προσθέτουμε 3,6mL του διαλύματος Υδροχλωρικού οξέος 2%. Αναδεύονται ισχυρά ώστε να υδρολυθούν τα φαινολικά συστατικά. Στη συνέχεια φωτομετρούνται τα δείγματα ως εξής:

- α) Στα 280nm για να προσδιοριστούν τα ολικά βιοφαινολικά συστατικά.
- β) Στα 320nm για να προσδιοριστούν τα παράγωγα του υδροξυκιναμικού οξέως.
- γ) Στα 360nm για να προσδιοριστούν τα φλαβονοειδή.

Παράλληλα εκτελούνται και τυφλοί προσδιορισμοί καθώς και προσδιορισμοί προτύπων διαλυμάτων φαινολικών ενώσεων ως εξής:

- α) Για να προσδιοριστούν τα ολικά βιοφαινολικά συστατικά χρησιμοποιήθηκε πρότυπο διάλυμα Γαλλικού οξέος.
- β) Για να προσδιοριστούν τα παράγωγα του υδροξυκιναμικού οξέος χρησιμοποιήθηκε πρότυπο διάλυμα Καφεϊκού οξέος.
- γ) Για να προσδιοριστούν τα φλαβονοειδή χρησιμοποιήθηκε πρότυπο διάλυμα Κουερσετίνης.

Τα πρότυπα διαλύματα φωτομετρήθηκαν στα ίδια μήκη κύματος με τα αντίστοιχα δείγματα και κατασκευάστηκαν πρότυπες καμπύλες αναφοράς μέσω των οποίων προσδιορίστηκε η περιεκτικότητα των διαφόρων βιοφαινολικών συστατικών στα προς ανάλυση δείγματα, η οποία εκφράζεται σε μg των χρησιμοποιούμενων ενώσεων/mg δείγματος.

4.31 Στατιστική ανάλυση

Για τη στατιστική ανάλυση των δειγμάτων μεταξύ των ομάδων των πειραματοζώνων εφαρμόστηκε το στατιστικό κριτήριο Kruskal-Wallis Test για μη παραμετρικές ανεξάρτητες μεταβλητές. Για τη στατιστική μελέτη των

διαφορών για την ίδια ομάδα σε διαφορετικές χρονικές στιγμές χρησιμοποιήθηκε το κριτήριο Wilcoxon signed rank test. Οι διαφορές θεωρήθηκαν στατιστικά σημαντικές για $p < 0.05$. Η επιλογή των μη παραμετρικών δοκιμών επιλέχτηκε λόγω του μικρού αριθμού δειγμάτων στις ομάδες ανεξάρτητα από το εάν η δοκιμές κανονικότητας έδειξαν κανονικές κατανομές. Η ανάλυση των δεδομένων έγινε με τη χρήση του στατιστικού λογισμικού πακέτου IBM SPSS Statistics.20.0.0 (IBM Inc., Chicago, IL, USA).

5. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

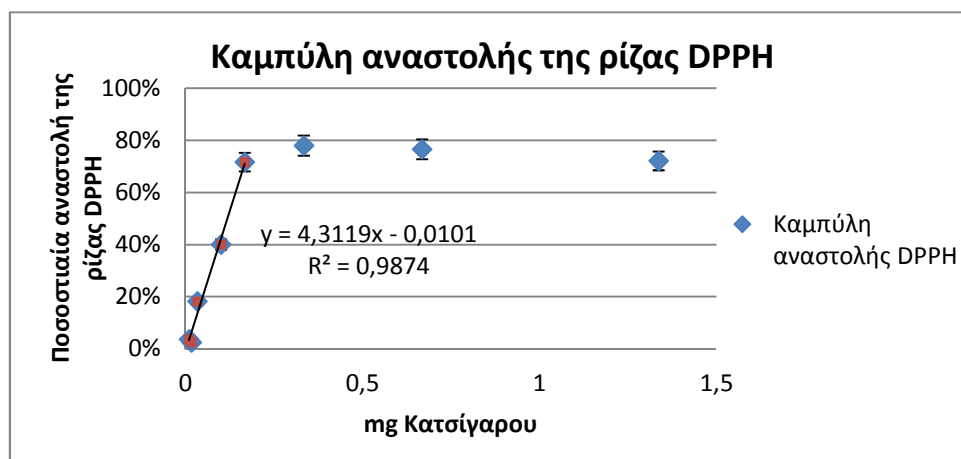
Το λυοφιλοποιημένο πολικό εκχύλισμα των ΥΑΕ που περιγράφηκε στις μεθόδους διαλύεται σε διάλυμα μεθανόλης 70% το οποίο έχει βρεθεί ότι διαθέτει την καλύτερη εκχυλιστική ικανότητα. Οι χημικοί προσδιορισμοί έδειξαν μεγάλη περιεκτικότητα σε φαινολικά συστατικά και σάκχαρα, όπως ήταν αναμενόμενο και από τη βιβλιογραφία. Για το λόγο αυτό οι αναλύσεις επικεντρώθηκαν στη μέτρηση φαινολικών συστατικών και των γλυκοζιτών τους. Τα αποτελέσματα των χημικών προσδιορισμών παρουσιάζονται στον Πίνακα 5, στον οποίο η συγκέντρωση του δείγματος εκφράζεται όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο των μεθόδων.

Πίνακας 5: Αποτελέσματα χημικών αναλύσεων σε λυοφιλοποιημένα ΥΑΕ

	Φαινολικά συστατικά (Folin-Ciocalteu)	ο-διφαινόλες	Ολικές βιοφαινόλες	Παράγωγα υδροξυκινικού οξέος	Φλαβονοειδή	Σάκχαρα
Συγκέντρωση (μg ουσίας/mg δείγματος)	73,2 ± 6,9	38,7 ± 1,9	153,8 ± 47,5	17,8 ± 1,0	15,9 ± 1,0	219,6 ± 16,9

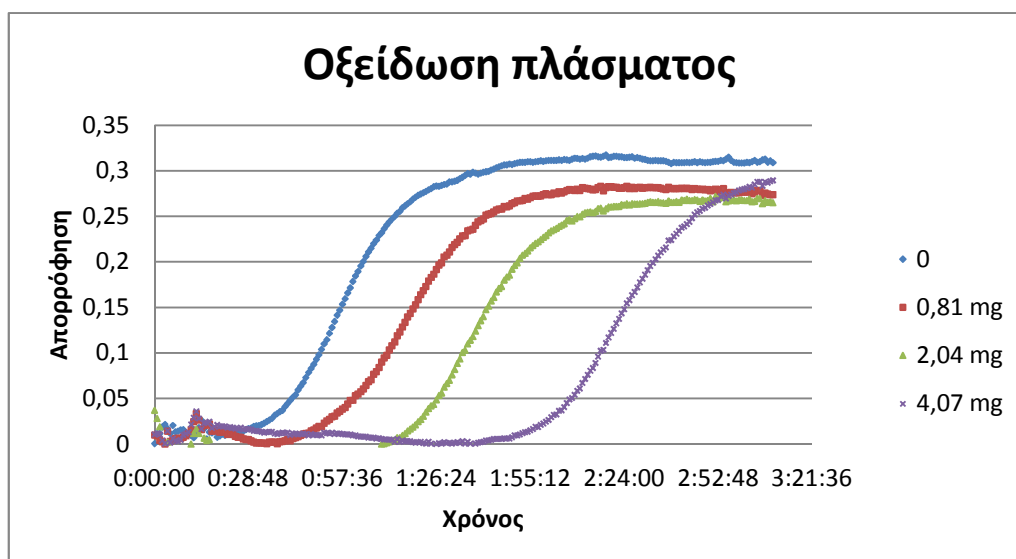
Η μεγάλη περιεκτικότητα του εκχυλίσματος σε φαινολικά συστατικά ήταν το κίνητρο για περαιτέρω μελέτη της πιθανής δράσης του ως αντιοξειδωτικό σε *in vitro* και *ex vivo* πρωτόκολλα μέτρησης αντιοξειδωτικής ικανότητας. Επιλέχθηκε η δοκιμασία της έγχρωμης ρίζας DPPH και η οξειδωση πλάσματος, καθώς είναι ευρέως χρησιμοποιούμενες δοκιμασίες.

Η αναστολή της ρίζας DPPH από τα ΥΑΕ παρουσιάζεται στο Σχήμα 1. Ο υπολογισμός του IC₅₀ έγινε στο ευθύγραμμο κομμάτι της καμπύλης καθώς η αναστολή φτάνει σε ένα μέγιστο όπως φαίνεται και στο σχήμα σε αρκετά μικρές συγκεντρώσεις. Υπολογίστηκε το IC₅₀ = 118,3 ± 2,3 μg δείγματος.



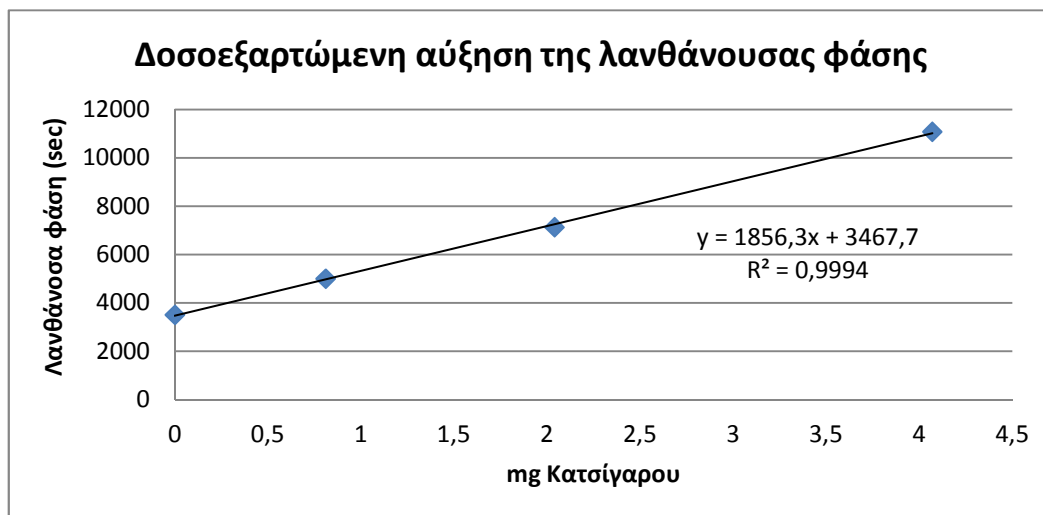
Σχήμα 1: Ποσοστιαία αναστολή της ρίζας DPPH

Η οξειδωση πλάσματος επιλέχθηκε ως ένα καλό μοντέλο για τη μέτρηση αντιοξειδωτικής ικανότητας δειγμάτων καθώς προσομοιάζει φυσιολογικές συνθήκες στον οργανισμό. Τα αποτελέσματα από την επίδραση διαφόρων συγκεντρώσεων ΥΑΕ στο λανθάνοντα χρόνο της αντίδρασης παρουσιάζονται στο Σχήμα 2.



Σχήμα 2: Ανασταλτική δράση των ΥΑΕ στην οξείδωση πλάσματος από ιόντα χαλκού

Από τις καμπύλες αυτές υπολογίστηκε ο χρόνος λανθάνουσας φάσης για κάθε συγκέντρωση και τα αποτελέσματα παρατίθενται στο Σχήμα 3. Υπάρχει θετική γραμμική συσχέτιση μεταξύ της αύξησης της περιεκτικότητας σε ΥΑΕ και του χρόνου της λανθάνουσας φάσης



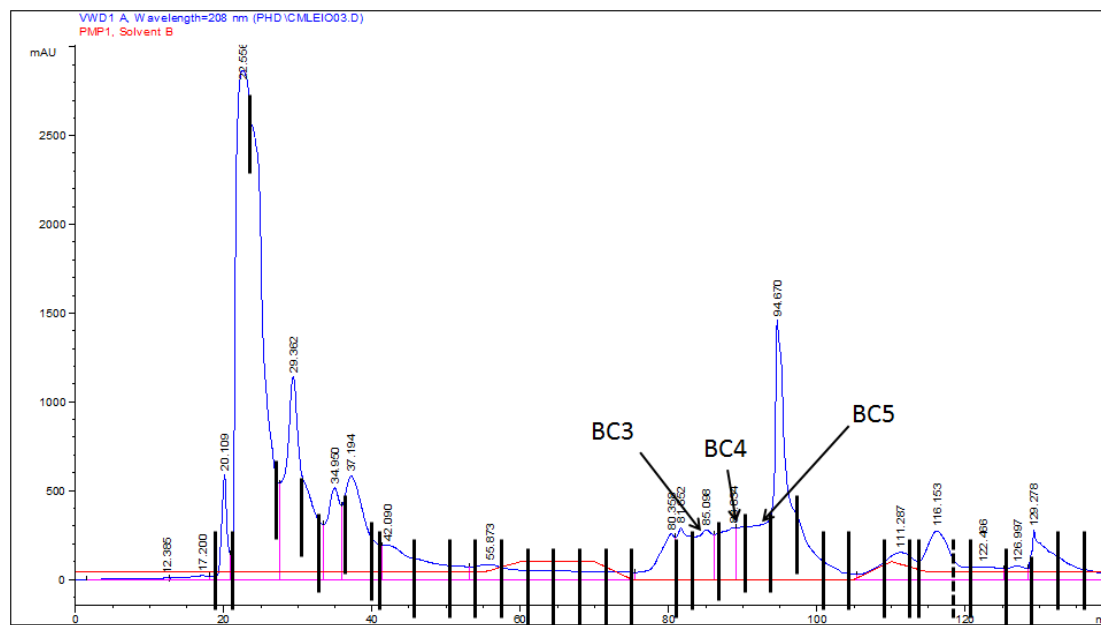
Σχήμα 3: Δοσοεξαρτώμενη ανασταλτική δράση των ΥΑΕ στην οξείδωση πλάσματος από ιόντα χαλκού

5.1 Βιολογική δοκιμασία των ΥΑΕ σε πλυμένα αιμοπετάλια κουνελιού

Τα πολικά λιποειδή από τα ΥΑΕ δοκιμάστηκαν στη συνέχεια σε πλυμένα αιμοπετάλια κουνελιού. Τα πολικά λιποειδή των ΥΑΕ σε συγκέντρωση 8mg/mL προκάλεσαν μικρής έντασης αντιστρεπτή συσσώρευση αιμοπεταλίων ύψους 1,2cm η οποία είναι το ισοδύναμο τελικής συγκέντρωσης PAF ίσης με $2,8 \times 10^{-11} \text{M}$. Η ποσότητα αυτή προκάλεσε απευαισθητοποίηση των αιμοπεταλίων ως προς τον PAF σε τελική συγκέντρωση $2,8 \times 10^{-11} \text{M}$ υποδεικνύοντας ότι το πολικό εκχύλισμα των ΥΑΕ ανταγωνίζεται τον PAF δεσμεύοντας τον υποδοχέα αυτού. Η παρατήρηση ότι τα βιολογικά δραστικά μόρια που περιέχονται στα ΥΑΕ προσδένονται στον PAFR ενισχύονται από το γεγονός ότι η δράση τους αναστέλλεται κατά 100% από τον ειδικό αναστολέα του υποδοχέα, το μόριο BN52021. Σε μεγαλύτερη ποσότητα ίση με 16mg/mL τα ΚΠΛ προκάλεσαν μικρής έντασης συσσώρευση αιμοπεταλίων ύψους 3,5cm, που είναι το ισοδύναμο τελικής συγκέντρωσης PAF ίσης με $7,5 \times 10^{-11} \text{M}$ ενώ τα 24mg/mL προκάλεσαν μικρότερου ύψους συσσώρευση ύψους μόλις 0,5cm φανερώνοντας ότι η απόκριση του PAFR στα ΥΑΕ ακολουθεί τη μορφή κώδωνα, δηλαδή σε μικρές και μεγάλες ποσότητες παρατηρείται μικρότερης έντασης συσσώρευση από αυτή των ενδιάμεσων ποσοτήτων.

5.2 Ανάλυση των ΥΑΕ με HPLC

Τα λιποειδή στη συνέχεια διαχωρίστηκαν διαδοχικά με τη χρήση HPLC τόσο κανονικής όσο και ανάστροφης φάσης. Η βιολογική δοκιμασία σε πλυμένα αιμοπετάλια κουνελιού έδειξε ότι τα βιολογικώς δραστικά λιποειδή εκκλύονται στον ίδιο χρόνο με τα βιολογικώς δραστικά λιποειδή του ελαιολάδου και του ελαιοπυρήνα όταν χρησιμοποιηθεί χρωματογραφία κανονικής φάσης. Στην Εικόνα 6 που ακολουθεί παρουσιάζεται ένα χαρακτηριστικό χρωματογράφημα από την ανάλυση 1,2436g λυοφυλοποιημένων ΥΑΕ σε 100 διαδοχικές ενέσεις στη στήλη με προσδεσμένες αμινομάδες. Τα κλάσματα συλλέχθηκαν όπως φαίνεται στο χρωματογράφημα ενώ ονομάζονται τα τρία δραστικότερα εξ' αυτών.



Εικόνα 6: Ενδεικτικό χρωματογράφημα από την ανάλυση των ΥΑΕ σε στήλη πυριτικού οξέως με προσδεσμένες αμινομάδες.

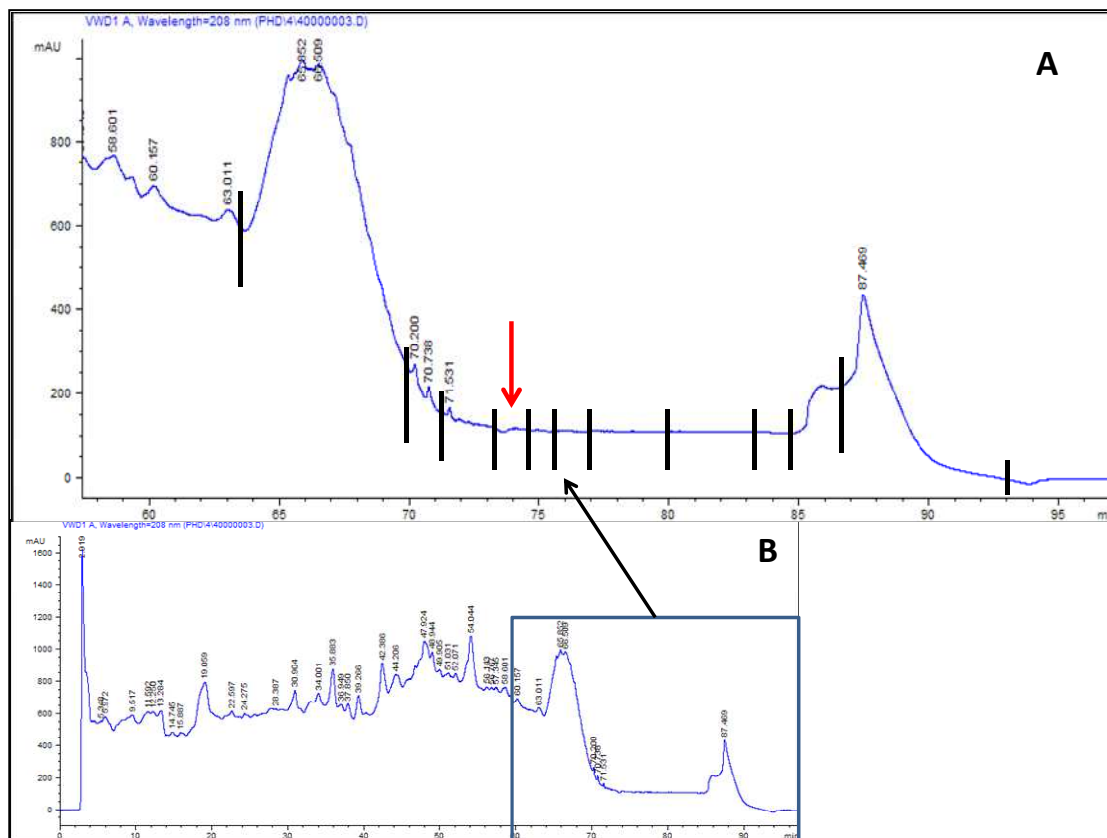
Οι γραμμές δείχνουν τα κλάσμα που ενώθηκαν για να δοκιμαστούν σε πλυμένα αιμοπετάλια κουνελιών. Τα BC3, BC4, BC5, είναι τα τρία δραστικότερα εξ' αυτών.

Στον Πίνακα 6 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της βιολογικής δοκιμασίας των τριών δραστικότερων κλασμάτων εκφρασμένα σε μικρο-ισοδύναμα PAF ανά γραμμάριο λυοφυλοποιημένων ΥΑΕ (μεq PAF /g).

Πίνακας 6: Βιολογική δραστηριότητα των 3 δραστικότερων κλασμάτων από την χρωματογραφία κανονικής φάσης των ΥΑΕ.

Κλάσμα	eq PAF /g
BC 3	1,22E-11± 9,45E-12
BC 4	7,72E-12± 4,72E-13
BC 5	5,22E-10± 1,55E-11

Στη συνέχεια τα τρία αυτά κλάσματα ενώθηκαν και διαχωρίστηκαν με χρωματογραφία ανάστροφης φάσης. Ένα ενδεικτικό χρωματογράφημα αυτής της ανάλυσης παρουσιάζεται στην Εικόνα 7.



Εικόνα 7: Ενδεικτικό χρωματογράφημα ανάστροφης φάσης του κλάσματος που συλλέχθηκε από τη στήλη κανονικής φάσης. Στην Εικόνα 7.B παρουσιάζεται ολόκληρο το χρωματογράφημα, ενώ στην 7.A εμφανίζεται το τμήμα του χρωματογραφήματος από 57-94min μεγεθυμένο. Με κόκκινο βέλος σημειώνεται το δραστικότερο από τα κλάσματα που συλλέχθηκαν.

Τα αποτελέσματα της βιολογικής δοκιμασίας των κλασμάτων σε πλυμένα αιμοπετάλια κουνελιού έδειξαν ότι το δραστικότερο των κλασμάτων ήταν το κλάσμα που συλλέχθηκε από τα 73,2-75min το οποίο σημειώνεται με κόκκινο βέλος στην Εικόνα 7 με τελική συγκέντρωση $5,59 \times 10^{-9} \pm 3,25 \times 10^{-12}$ eqPAF/g YAE.

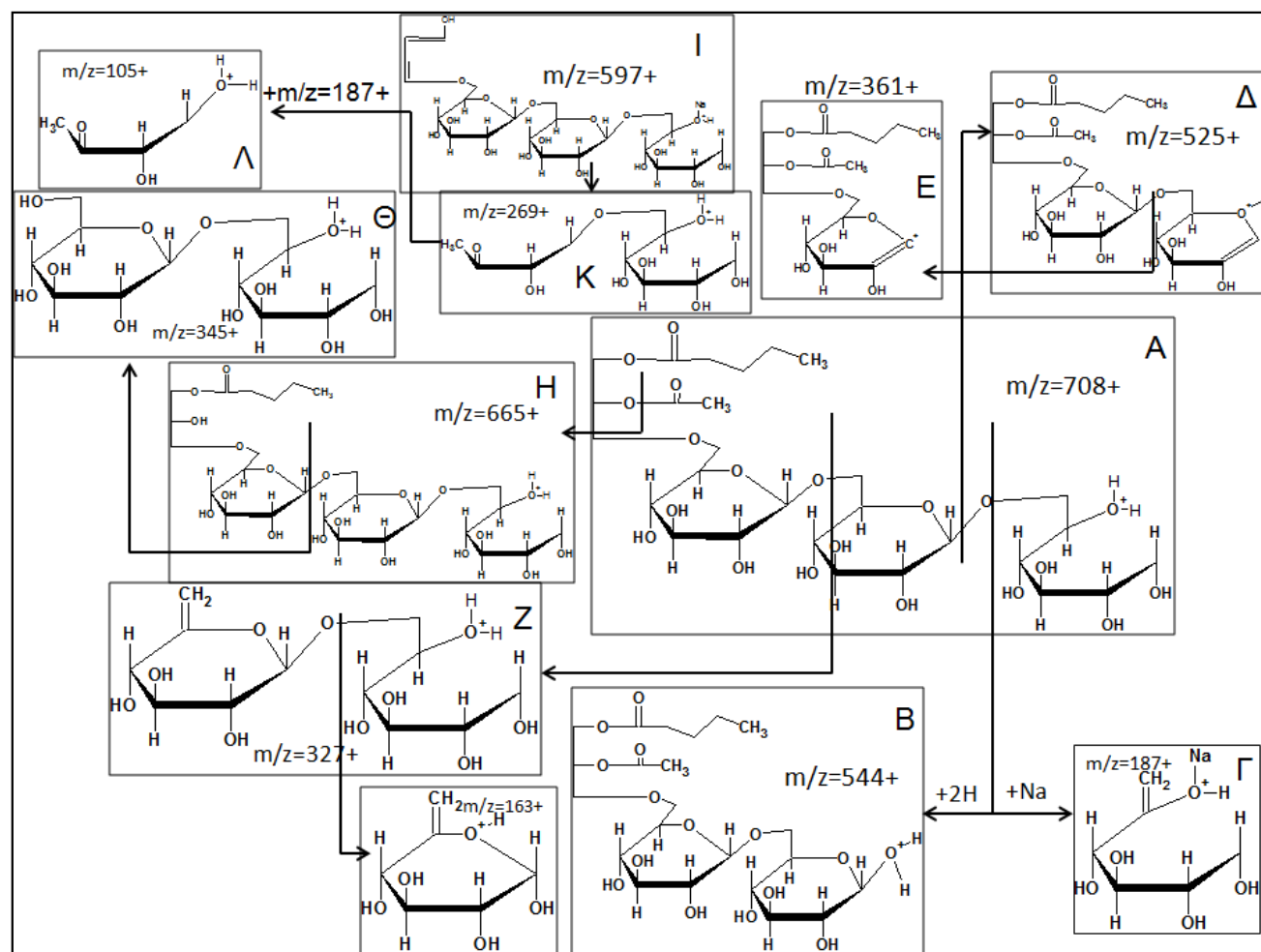
5.3 Φασματομετρία μάζας

Το κλάσμα στη συνέχεια αναλύθηκε και με φασματογραφία μάζας τόσο σε αρνητικό όσο και σε θετικό φάσμα. Η ανάλυση των ολικών φασμάτων MS αλλά και των MS/MS των κυριοτέρων m/z έδειξαν ότι το μοριακό βάρος του

μορίου ήταν 706. Η δομή του μορίου και η ανάλυση των θραυσμάτων παρουσιάζεται στις Εικόνα 8 και 10 για το θετικό και αρνητικό φάσμα αντίστοιχα, ενώ στις Εικόνα 9 και Εικόνα 11 παρουσιάζονται κάποια χαρακτηριστικά φάσματα μάζας από τις αντίστοιχες πολικότητες. Για την ανάλυση των θραυσμάτων μαζί με το m/z , δίνεται σε παρένθεση και ο αριθμός των κρούσεων του ιόντος.

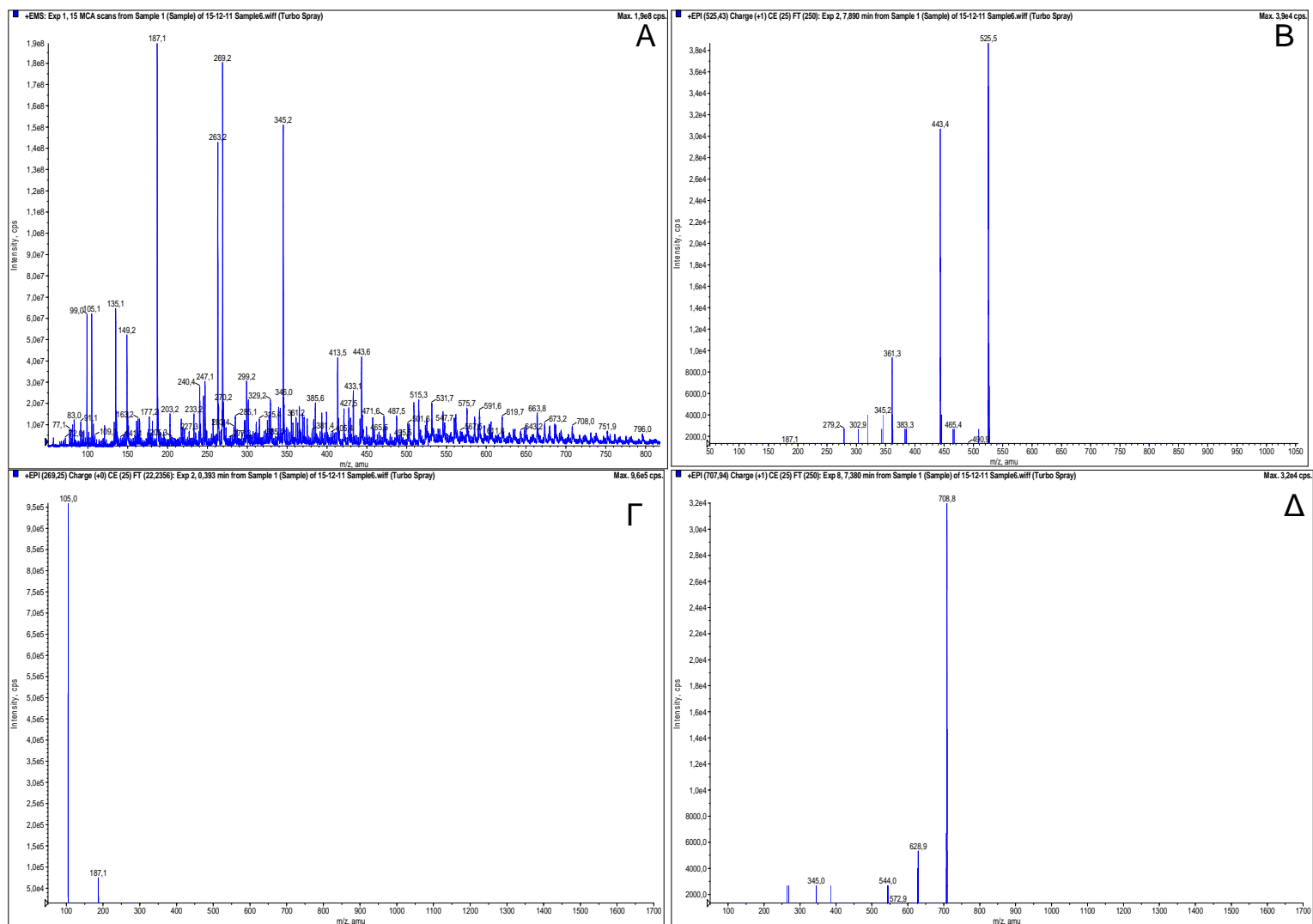
5.3.1 Ανάλυση θετικού φάσματος

Το μοριακό θραύσμα με $m/z=708+$ ($9,2E+6$) αντιστοιχεί σε δομή γλυκερινικού γλυκολιποειδούς με οξικό οξύ εστεροποιημένο στην sn-2 θέση, όπως φαίνεται στο σχήμα 45 (Α). Η δομή πιστοποιείται από διαδοχικές θραυσματοποιήσεις των παραγώγων μορίων. Το $708+$ δίνει με απώλεια της ακραίας ομάδας μανιτόλης δύο θετικά θραύσματα, το $m/z=544+$ ($1,2E+7$) το οποίο είναι το υπόλοιπο μόριο μετά την απώλεια της μανιτόλης (Β), και το $m/z=187+$ ($1,9E+8$) το οποίο αντιστοιχεί στο μετά νατρίου ιόν της μανιτόλης (Γ). Η εναλλακτική θραυσματοποίηση του μορίου και με την απώλεια ενός μορίου νερού δίνει το $m/z=525+$ ($1,3 E+7$) (Δ). Το θραύσμα αυτό με τη σειρά του δίνει το $m/z=361+$ ($1,4 E+7$), το οποίο αντιστοιχεί στο μόριο μετά την απώλεια ενός μορίου γλυκόζης (Ε). Η απομάκρυνση της ακραίας μανιτόλης και ενός μορίου γλυκόζης από το αρχικό μόριο δίνει το θραύσμα $m/z= 327+$ ($1,5 E+7$) (Ζ). Η απώλεια του οξικού από την sn-2 θέση δίνει το θραύσμα $m/z= 665+$ ($1,7 E+7$) (Η), το οποίο με τη σειρά του θραυσματοποιείται και δίνει το $m/z= 345+$ ($1,5 E+8$) (Θ). Επιπλέον η απώλεια των δύο λιπαρών οξέων από το αρχικό μόριο δίνει το θραύσμα $m/z= 597+$ ($1,1 E+7$) (Ι), το οποίο με τη σειρά του δίνει τα θραύσματα $m/z= 269+$ ($1,8 E+8$) (Κ) και $187+$ ($1,9 E+8$) (Γ), ενώ το $269+$ παράγει και αυτό με τη σειρά του το $187+$ ($1,9 E+8$) (Γ) και το $m/z=105+$ ($7,1 E+7$) (Λ).



Εικόνα 8: Ανάλυση των δομών από τα παρατηρούμενα θετικά θραύσματα του μορίου.

(A): Το μοριακό θραύσμα με $m/z=708+$ αντιστοιχεί σε δομή γλυκερινικού γλυκολιπιιδίου με οξικό οξύ εστεροποιημένο στην sn-2 θέση, (B): $m/z=544+$, το μόριο ύστερα από την απομάκρυνση της ακραίας μαννιτόλης, (Γ): $m/z=187+$ το μετά νατρίου ιόν της μανιτόλης, (Δ): $m/z=525+$, απώλεια μανιτόλης και ενός μορίου νερού, (Z): $m/z=327+$, απομάκρυνση της ακραίας μανιτόλης και ενός μορίου γλυκόζης, (H): $m/z=665+$ απώλεια του οξικού από την sn-2 θέση, (Θ): $m/z=345+$, θραυσματοποίηση του ιόντος (H), (I): $m/z=597+$, η απώλεια των 2 λιπαρών οξέων από το μόριο, (K): $m/z=269+$, περαιτέρω θραυσματοποίηση του ιόντος (I), (Λ): $m/z=105+$, περαιτέρω θραυσματοποίηση του ιόντος (K).

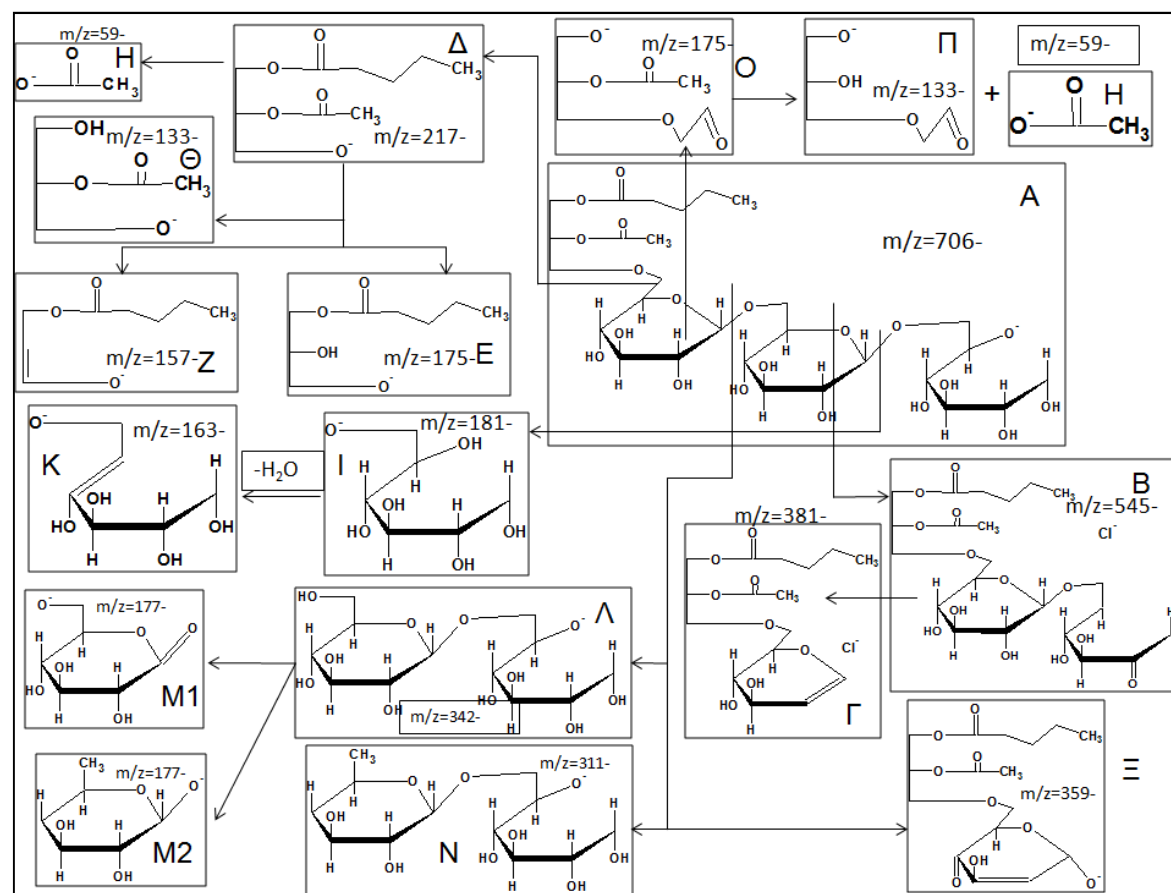


Εικόνα 9: Φάσματα μάζας θετικών ιόντων του μορίου.

(A): Ολικό θετικό φάσμα μάζας, (B): MS/MS φάσμα του θραύσματος με $m/z=525+$, (Γ): MS/MS φάσμα του θραύσματος με $m/z=269+$, (Δ): MS/MS φάσμα του θραύσματος με $m/z=708+$.

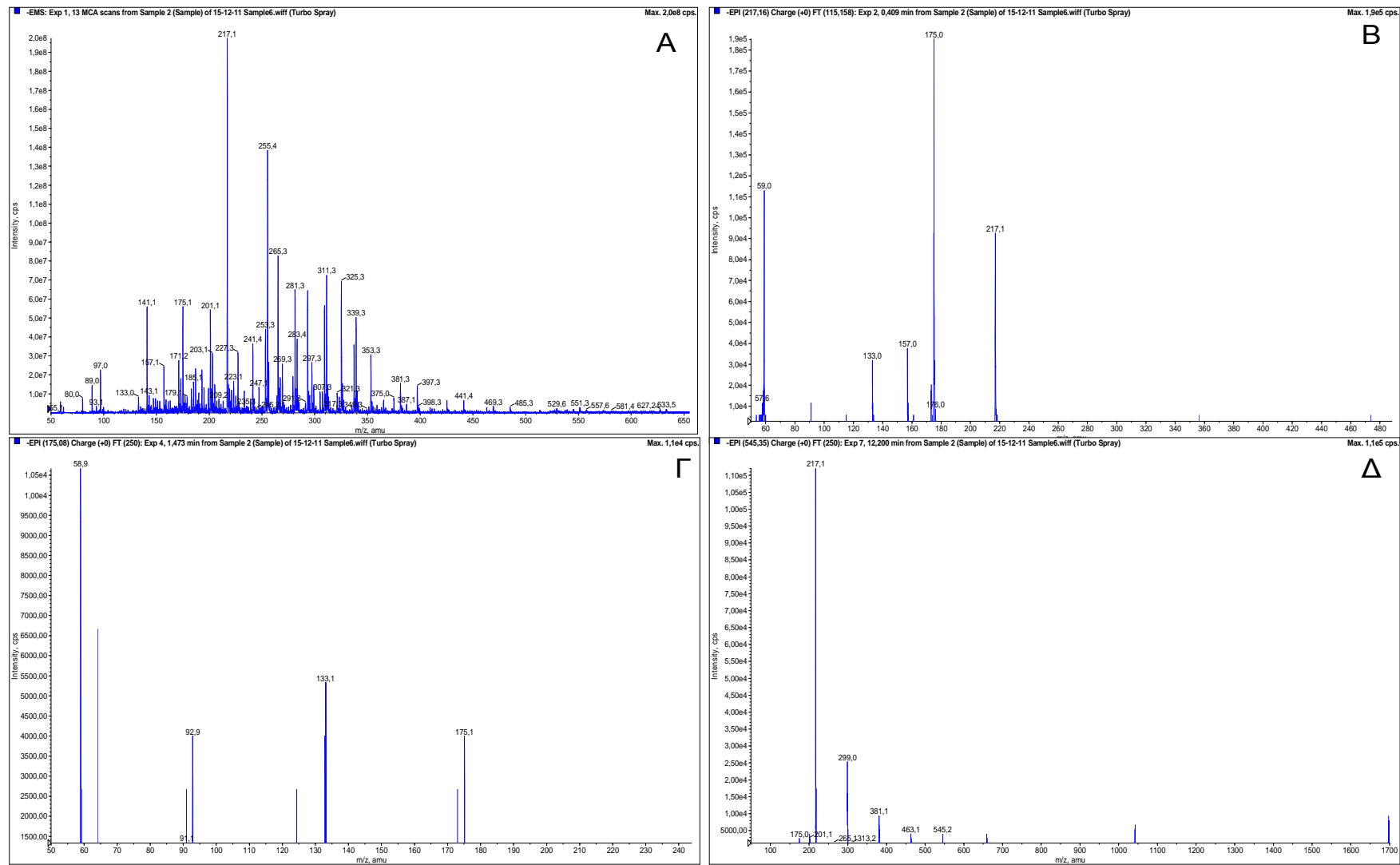
5.3.2 Ανάλυση αρνητικού φάσματος

Το μοριακό ιόν είναι το $m/z=706^-$ ($5,0 E+5$) (A), το οποίο με την απώλεια της μανιτόλης και ενός μορίου νερού δίνει το θραύσμα $m/z=545^-$ ($2,0 E+6$) το οποίο περιέχει ιόν χλωρίου (B). Το θραύσμα 545- με τη σειρά του δίνει το θραύσμα $m/z=381^-$ ($1,6 E+7$) (Γ), το οποίο επίσης είναι χλωριωμένο αλλά και το κύριο παράγωγο του που είναι το θραύσμα $m/z=217^-$ ($2,0 E+8$) και αντιστοιχεί στο ακετυλο-γλυκερινικό κομμάτι του μορίου (Δ). Η δομή του $m/z=217^-$ ($2,0 E+8$) (Δ) πιστοποιείται από πάρα πολλά θραύσματα, συγκεκριμένα το MS/MS του δίνει το $m/z=175^-$ ($6,0 E+7$) (E) και το $m/z=157^-$ ($2,4 E+7$) (Z) τα οποία προκύπτουν ύστερα από απομάκρυνση του οξικού ιόντος από την sn-2 θέση, ενώ ταυτόχρονα εμφανίζεται και το ιόν του οξικού με $m/z=59^-$ ($6,0 E+6$) (H). Επιπλέον από το 217- παράγονται το $m/z=133^-$ ($8,0 E+6$) (Θ) το οποίο προκύπτει από την απομάκρυνση καρβονυλικού ιόντος από την sn-1 θέση. Η απομάκρυνση της ακραίας μανιτόλης δίνει το θραύσμα $m/z=181^-$ ($4,0 E+6$) (I), η οποία στη συνέχεια με την αφαίρεση ενός μορίου νερού δίνει το θραύσμα $m/z=163^-$ ($6,0 E+6$) (K). Η ταυτόχρονη απομάκρυνση της μανιτόλης και της προσδεμένης σε αυτή γλυκόζη γίνεται με δύο διαφορετικές εναλλακτικές πορείες. Η πρώτη δίνει το θραύσμα $m/z=342^-$ ($5,0 E+6$) (Λ), το οποίο στη συνέχεια δίνει το θραύσμα $m/z=177^-$ ($1,0 E+7$) (M). Η δομή του θραύσματος με $m/z=177^-$ μπορεί να έχει δύο διαφορετικές δομές όπως παρουσιάζονται στο σχήμα (M1, M2). Το υπόλοιπο μόριο με αφαίρεση δύο μορίων νερού δίνει τα θραύσματα $m/z=311^-$ που αντιστοιχεί στην απομάκρυνση της μανιτόλης, μιας γλυκόζης και ενός μορίου νερού (N), και το $m/z=359^-$ ($5,0 E+6$) (Ξ). Το $m/z=359^-$ δίνει το χαρακτηριστικό θραύσμα $m/z=217^-$ ($2,0 E+8$) (Δ). Η δομή του $m/z=175^-$ μπορεί να αντιστοιχεί και σε μια διαφορετική δομή όπως αυτή που παρουσιάζεται στο (O) και το οποίο δικαιολογεί τη δομή του καθώς από την MS/MS θραυσματοποίηση του παράγονται τα ιόντα $m/z=133^-$ (Π) και το $m/z=59^-$ του οξικού ιόντος (H).



Εικόνα 10: Ανάλυση των δομών από τα παρατηρούμενα αρνητικά θραύσματα του μορίου.

(A): Το μοριακό θραύσμα με $m/z=706^-$ αντιστοιχεί σε δομή γλυκερινικού γλυκολιποειδούς με οξικό οξύ εστεροποιημένο στην sn-2 θέση, (B): $m/z=545^-$, χλωριωμένο ιόν ύστερα από απώλεια μανιτόλης και ενός μορίου νερού, (Γ): $m/z=381^-$, περαιτέρω θραυσματοποίηση του ιόντος (B), (Δ): $m/z=217^-$, το κυριότερο παραγόμενο ιόν που αντιστοιχεί στο ακετυλο-γλυκερινικό κομμάτι του μορίου, (E): $m/z=175^-$ και (Z): $m/z=157^-$, παράγωγα του (Δ) ύστερα από απομάκρυνση του οξικού ιόντος (H) από την sn-2 θέση, (Θ) $m/z=133^-$, παράγωγο του (Δ) ύστερα από απομάκρυνση καρβονυλικού ιόντος από την sn-1 θέση, (I): $m/z=181^-$, η ακραία μανιτόλη, (K): $m/z=163^-$, παράγωγο της μανιτόλης ύστερα από αφαίρεση ενός μορίου νερού, (Λ): $m/z=342^-$, ταυτόχρονη απομάκρυνση μανιτόλης και γλυκόζης, (M): $m/z=177^-$, παράγωγο του (Λ) με δύο πιθανές δομές τη M1 και M2, (N): $m/z=311^-$, εναλλακτική θραυσματοποίηση με απομάκρυνση μανιτόλης, μιας γλυκόζης και ενός μορίου νερό, (Ξ): $m/z=359^-$, το υπόλοιπο μόριο ύστερα από αφαίρεση του (N) και ενός μορίου νερού, (O): $m/z=175^-$, εναλλακτική δομή του ιόντος, η οποία παράγει το (Π): $m/z=133^-$ και το ιόν οξικού οξέος (H): $m/z=59^-$



Εικόνα 11: Φάσματα μάζας αρνητικών ιόντων του μορίου.

(A): Ολικό αρνητικό φάσμα μάζας, (B): MS/MS φάσμα του θραύσματος με $m/z=217^-$, (Γ): MS/MS φάσμα του θραύσματος με $m/z=176^-$, (Δ): MS/MS φάσμα του θραύσματος με $m/z=646^-$.

5.4 Εισαγωγή των ΥΑΕ σε γιαούρτια

Το λυοφιλοποιημένο πολικό εκχύλισμα των ΥΑΕ στη συνέχεια δόθηκε στη γαλακτοβιομηχανία ΜΕΒΓΑΛ Α.Ε. η οποία παρασκεύασε γιαούρτια τα οποία περιείχαν 0,5g του εκχυλίσματος ανά κεσέ γιαουρτιού των 120g. Η επιλογή της τελικής περιεκτικότητας των γιαουρτιών σε ΥΑΕ έγινε λαμβάνοντας υπόψη τα προηγούμενα πειραματικά δεδομένα σε συνδυασμό με τα αντίστοιχα πειραματικά αποτελέσματα από το ελαιόλαδο, ελαιοπυρήνα αλλά και ΥΑΕ από προηγούμενες έρευνες του εργαστηρίου μας. Για τον υπολογισμό σαν κυριότερο κριτήριο θεωρήθηκε η βιολογική δραστικότητα των δειγμάτων στα πλυμένα αιμοπετάλια κουνελιού και εν συνεχεία η περιεκτικότητα σε φαινολικά/αντιοξειδωτικά μόρια. Ύστερα από συνεννόηση με την εταιρεία επιλέχθηκε τα ΥΑΕ να προστεθούν σε γιαούρτια περιεκτικότητας 2% σε λιπαρά ώστε να παρασκευαστεί ένα προϊόν το οποίο θα αποκρίνεται σε ένα ευρύ κοινό, στο οποίο θα αναδεικνύεται και η γεύση που προσδίδουν τα ΥΑΕ. Η προσθήκη των ΥΑΕ έγινε πριν τη γαλακτική ζύμωση για τη παραγωγή του γιαουρτιού ώστε να μελετηθεί η επίδραση των μικροοργανισμών στη δομή και τη βιολογική δραστικότητα των ΥΑΕ.

Τα γιαούρτια αναλύθηκαν και αυτά με τη σειρά τους με HPLC για να επιβεβαιωθεί η μεταφορά της βιολογικής δραστικότητας του αρχικού εκχυλίσματος στο τελικό προϊόν, το εμπλουτισμένο γιαούρτι. Για την εκχύλιση των λιποειδών χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος για την εκχύλιση των πολικών λιποειδών από τα ΥΑΕ, όπως περιγράφεται στις μεθόδους, με μικρή τροποποίηση. Για τα γιαούρτια θεωρήθηκε ότι αποτελούνταν από νερό κατά 75% και έγινε η κατάλληλη προσθήκη νερού και αιθανόλης έως αναλογίας 60/40. Τα επόμενα βήματα της εκχύλισης παρέμειναν ίδια.

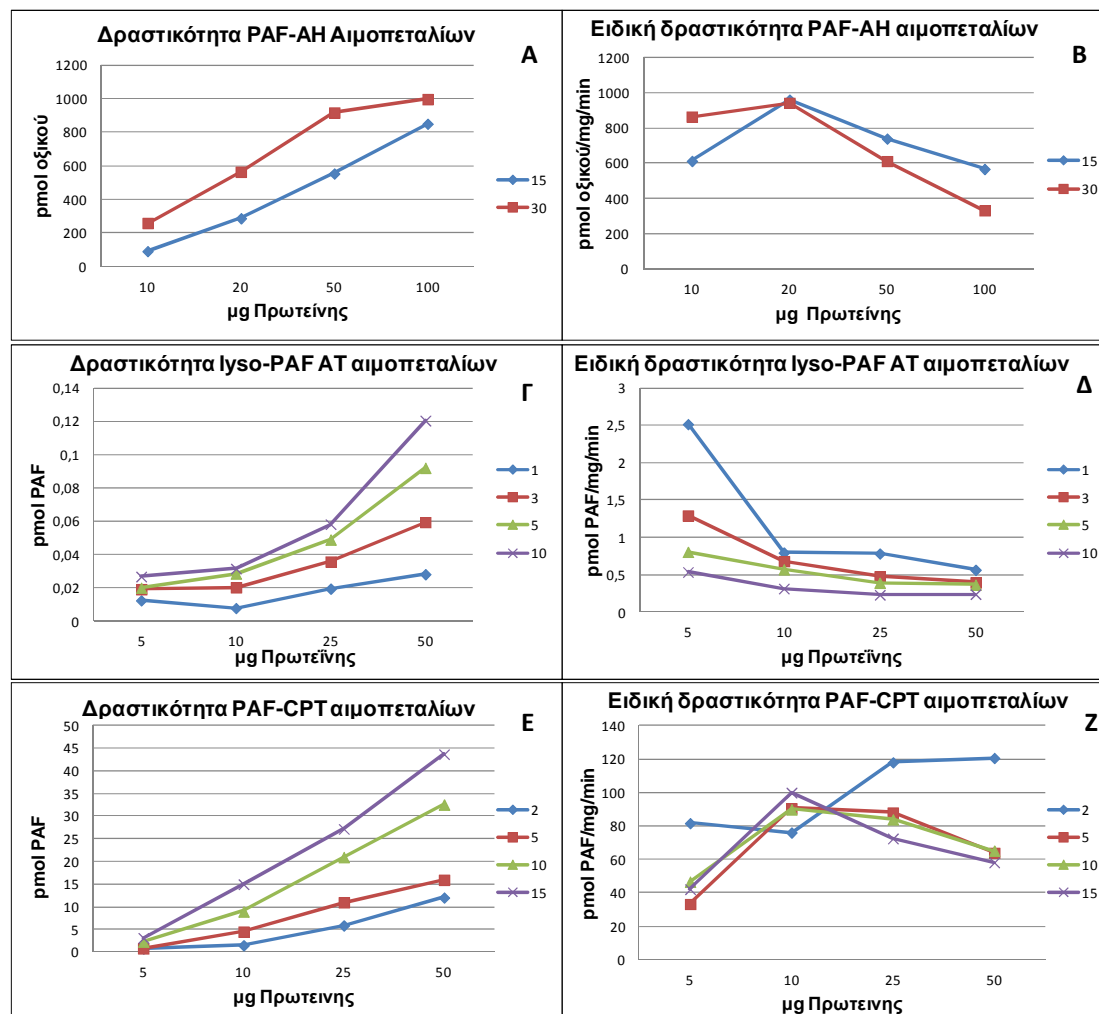
Το εκχύλισμα των πολικών λιποειδών από τα γιαούρτια αλλά και τα κλάσματά τους από την HPLC δοκιμάστηκαν σε πλυμένα αιμοπετάλια κουνελιού, όπου αποδείχθηκε ότι δεν μεταβλήθηκε η βιολογική δραστικότητα των μορίων ενώ και αυτά με τη σειρά τους όταν αναλύθηκαν με HPLC, εκλούστηκαν στον ίδιο χρόνο με τα αρχικά μόρια.

5.5 Κινητική μελέτη των μεταβολικών ενζύμων του PAF

Για τη πραγματοποίηση των ενζυμικών προσδιορισμών των μεταβολικών ενζύμων του PAF έγινε αρχικά μελέτη της δραστηκότητάς τους σε διάφορες συγκεντρώσεις πρωτεϊνικού παρασκευάσματος και για διαφορετικούς χρόνους αντίδρασης. Οι αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν για όλα τα έμμορφα συστατικά του αίματος αλλά και για τα ομογενοποιημένα των ιστών που μελετήθηκαν και συγκεκριμένα για το ήπαρ, τα νεφρά και τη σπλήνα. Τα αποτελέσματα αυτών των προσδιορισμών παρατίθενται αναλυτικά στη συνέχεια.

5.5.1 Αιμοπετάλια

Στα ακόλουθα γραφήματα παρατίθενται οι δραστηκότητες και ειδικές δραστηκότητες των μεταβολικών ενζύμων του PAF, συναρτήκει του ολικού πρωτεϊνικού ομογενοποιημάτος των κυτάρων που προστέθηκε σε τελικό όγκο αντίδρασης 200μL. Οι διαφορετικές σειρές δεδομένων αναφέρονται σε διαφορετικούς χρόνους ενζυμικής αντίδρασης εκφρασμένες σε min.



Σχήμα 4: Διαγραμματική αναπαράσταση των δραστηριοτήτων και ειδικών δραστηριοτήτων για τα μεταβολικά ένζυμα του PAF στα αιμοπετάλια.

(A) δραστηριότητα και (B) ειδική δραστηριότητα της ενδοκυτταρικής PAF-AH, (Γ) δραστηριότητα και (Δ) ειδική δραστηριότητα της lyso-PAF AT, (E) δραστηριότητα και (Z) ειδική δραστηριότητα της PAF-CPT των αιμοπεταλίων σε συνάρτηση με το ολικό κυτταρικό ομογενοποίημα που χρησιμοποιήθηκε εκφρασμένο σε μg Πρωτεΐνης σε τελικό όγκο αντίδρασης 200μL. Οι διαφορετικές σειρές δεδομένων αναφέρονται στους ενζυμικούς χρόνους αντίδρασης.

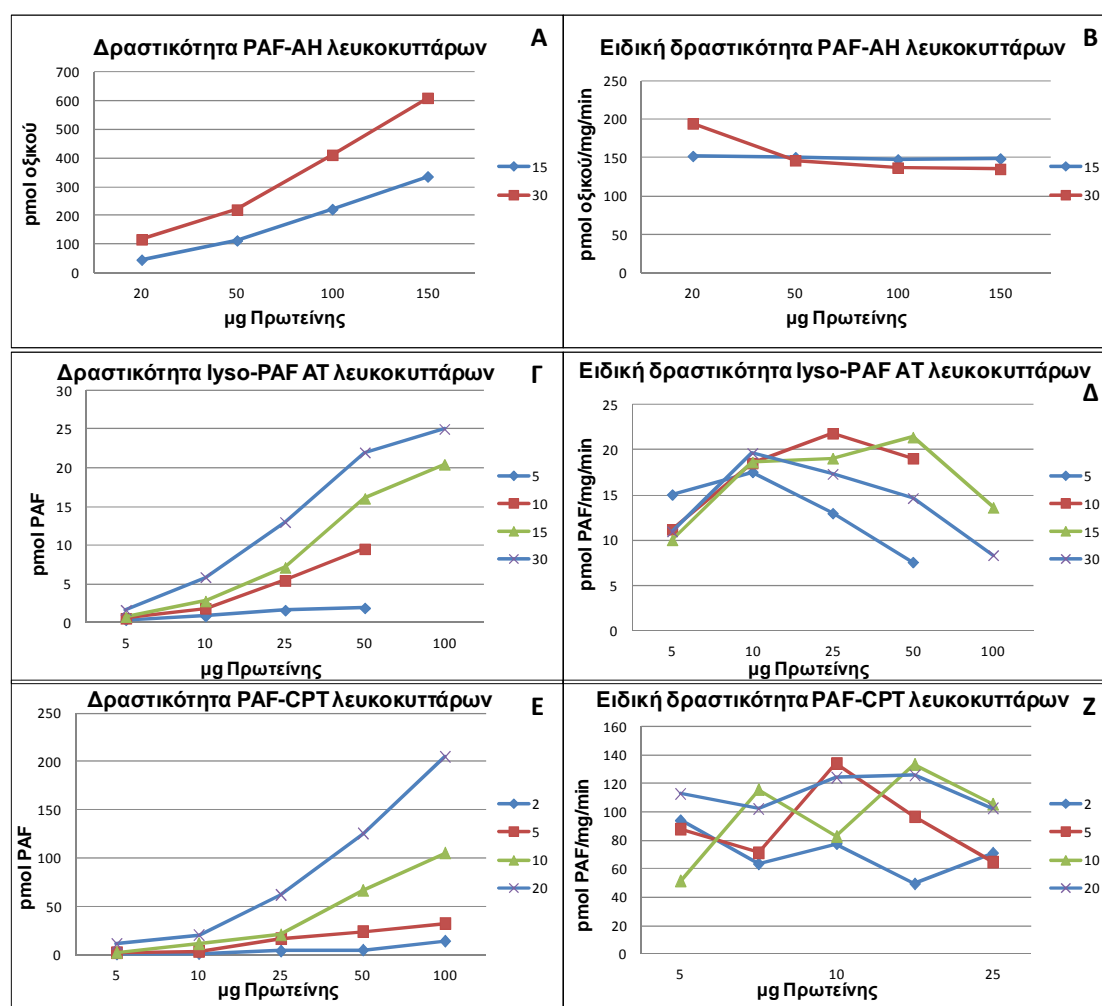
Από τα παραπάνω γραφήματα οι βέλτιστες συνθήκες ενζυμικής αντίδρασης που επιλέχθηκαν ήταν οι ακόλουθες, όπως παρουσιάζονται στον Πίνακα 7.

Πίνακας 7: Συνθήκες ενζυμικής αντίδρασης για τα μεταβολικά ένζυμα του PAF στα αιμοπετάλια

Μεταβολικό ένζυμο PAF στα αιμοπετάλια	μg ολικής πρωτεΐνης σε τελικό όγκο αντίδρασης 200μL	Χρόνος (min)
PAF-AH	20	15
lyso-PAF AT	25	5
PAF-CPT	25	10

5.5.2 Λευκά αιμοσφαίρια

Στα ακόλουθα γραφήματα παρατίθενται οι δραστικότητες και ειδικές δραστικότητες των μεταβολικών ενζύμων του PAF, συναρτήσει του ολικού πρωτεϊνικού ομογενοποιήματος των κυττάρων που προστέθηκε σε τελικό όγκο αντίδρασης 200μL. Οι διαφορετικές σειρές δεδομένων αναφέρονται σε διαφορετικούς χρόνους ενζυμικής αντίδρασης εκφρασμένες σε min.



Σχήμα 5: Διαγραμματική αναπαράσταση των δραστικότητων και ειδικών δραστικότητων για τα μεταβολικά ένζυμα του PAF στα λευκά αιμοσφαίρια. (Α) δραστικότητα και (Β) ειδική δραστικότητα της ενδοκυτταρικής PAF-AH, (Γ) δραστικότητα και (Δ) ειδική δραστικότητα της lyso-PAF AT, (Ε) δραστικότητα και (Ζ) ειδική δραστικότητα της PAF-CPT των λευκών αιμοσφαιρίων σε συνάρτηση με το ολικό κυτταρικό ομογενοποίημα που χρησιμοποιήθηκε εκφρασμένο σε μg πρωτεΐνης σε τελικό όγκο αντίδρασης 200μL. Οι διαφορετικές σειρές δεδομένων αναφέρονται στους ενζυμικούς χρόνους αντίδρασης.

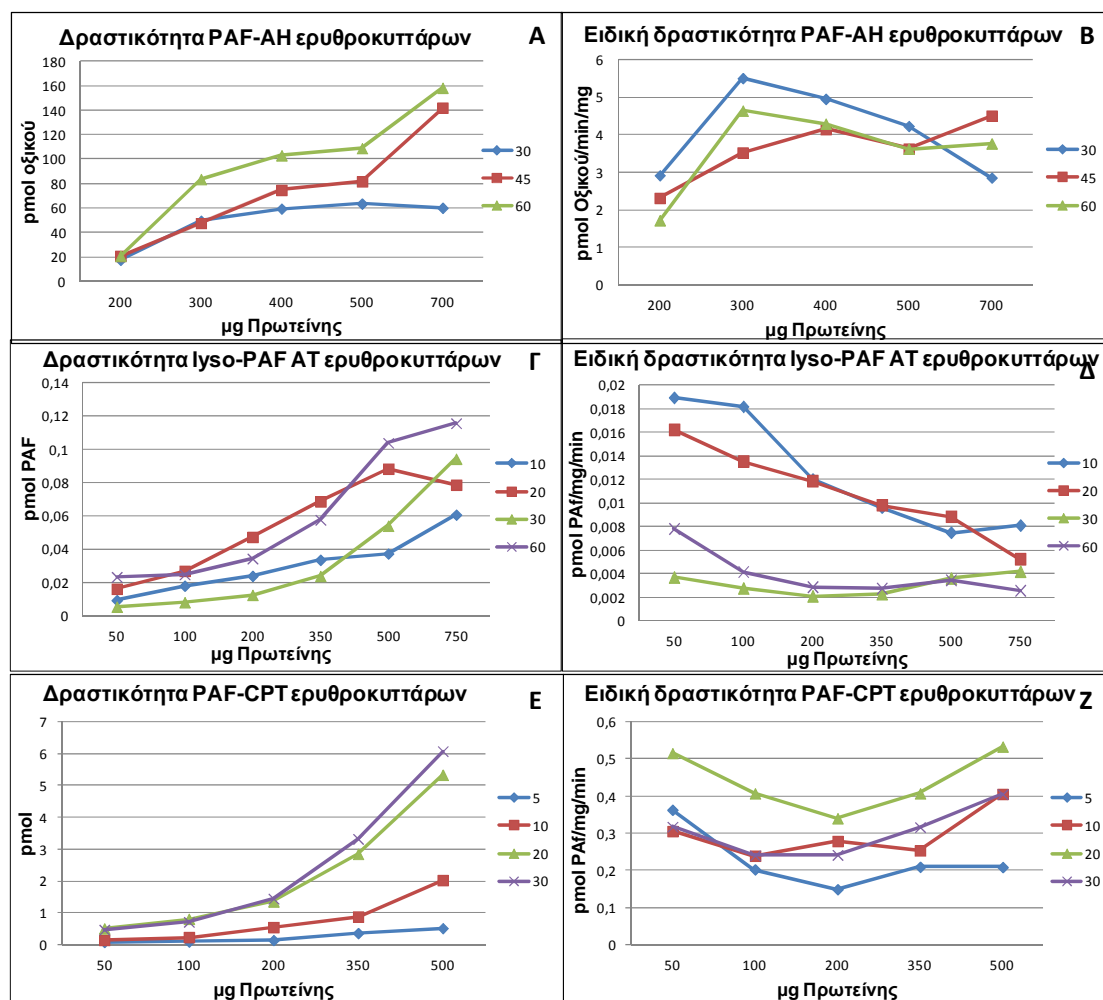
Από τα παραπάνω γραφήματα οι βέλτιστες συνθήκες ενζυμικής αντίδρασης που επιλέχθηκαν ήταν οι ακόλουθες, όπως παρουσιάζονται στον Πίνακα 8.

Πίνακας 8: Συνθήκες ενζυμικής αντίδρασης για τα μεταβολικά ένζυμα του PAF στα λευκά αιμοσφαίρια.

Μεταβολικό ένζυμο PAF στα λευκά αιμοσφαίρια	μg ολικής πρωτεΐνης σε τελικό όγκο αντίδρασης 200μL	Χρόνος (min)
PAF-AH	100	15
lyso-PAF AT	50	15
PAF-CPT	50	10

5.5.3 Ερυθρά αιμοσφαίρια

Στο Σχήμα 6 παρατίθενται οι δραστικότητες και οι ειδικές δραστικότητες των μεταβολικών ενζύμων του PAF, συναρτήσει του ολικού πρωτεϊνικού ομογενοποιηήματος των κυττάρων που προστέθηκε σε όγκο αντίδρασης 200μL.



Σχήμα 6: Διαγραμματική αναπαράσταση των δραστικότητων και ειδικών δραστικότητων για τα μεταβολικά ένζυμα του PAF στα ερυθρά αιμοσφαίρια. (Α) δραστικότητα και (Β) ειδική δραστικότητα της ενδοκυτταρικής PAF-AH, (Γ) δραστικότητα και (Δ) ειδική δραστικότητα της lyso-PAF AT, (Ε) δραστικότητα και (Ζ) ειδική δραστικότητα της PAF-CPT των ερυθρών αιμοσφαιρίων σε συνάρτηση με το ολικό κυτταρικό ομογενοποίημα που χρησιμοποιήθηκε εκφρασμένο σε μg πρωτεΐνης σε τελικό όγκο αντίδρασης 200μL. Οι διαφορετικές σειρές δεδομένων αναφέρονται στους ενζυμικούς χρόνους αντίδρασης.

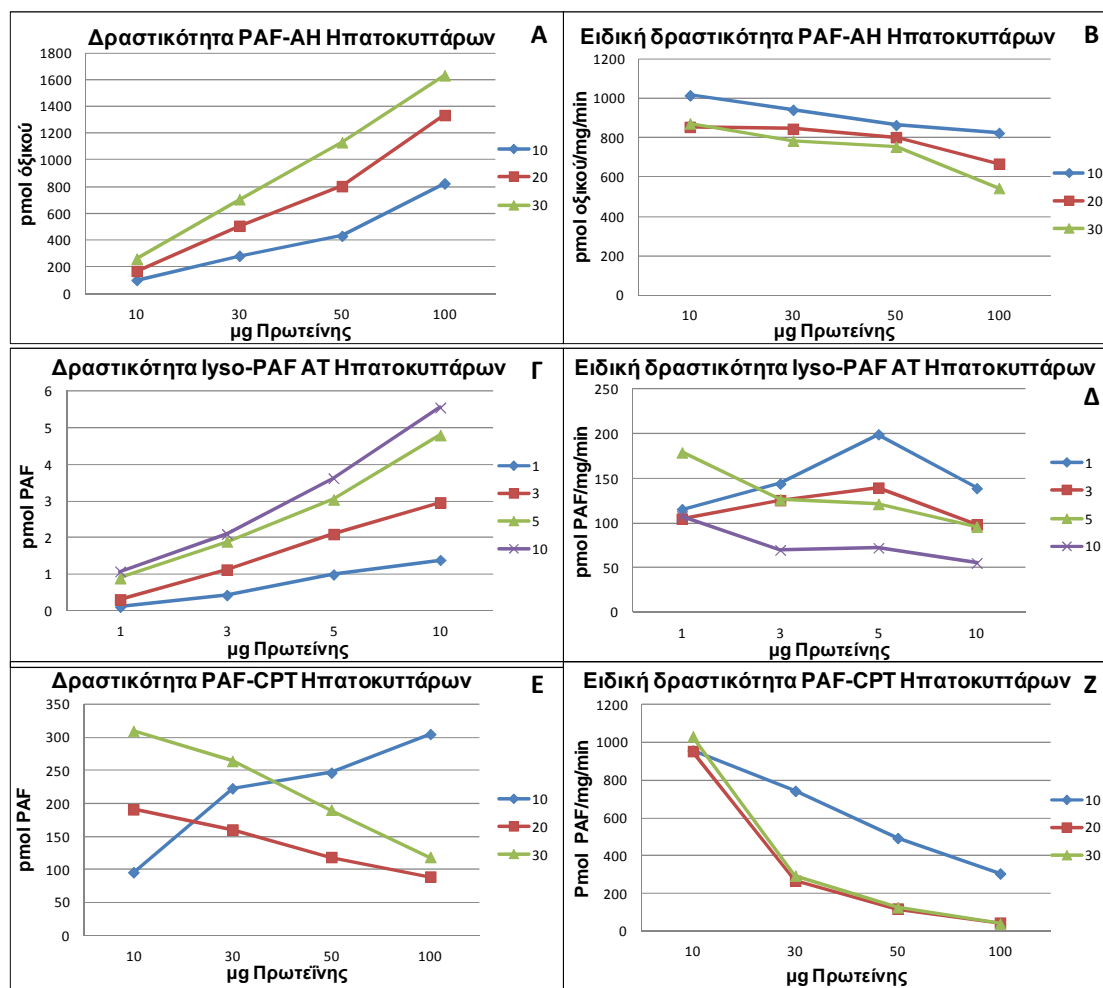
Οι διαφορετικές σειρές δεδομένων αναφέρονται σε διαφορετικούς χρόνους ενζυμικής αντίδρασης εκφρασμένες σε min. Από τα παραπάνω γραφήματα οι βέλτιστες συνθήκες ενζυμικής αντίδρασης που επιλέχθηκαν για τα ερυθρά αιμοσφαίρια παρουσιάζονται στον Πίνακα 9.

Πίνακας 9: Συνθήκες ενζυμικής αντίδρασης για τα μεταβολικά ένζυμα του PAF στα ερυθρά αιμοσφαίρια.

Μεταβολικό ένζυμο PAF στα ερυθρά αιμοσφαίρια	μg ολικής πρωτεΐνης σε τελικό όγκο αντίδρασης 200μL	Χρόνος (min)
PAF-AH	300	45
lyso-PAF AT	350	20
PAF-CPT	350	20

5.5.4 Ηπατικά κύτταρα

Στα ακόλουθα γραφήματα παρατίθενται οι δραστηριότητες και οι ειδικές δραστηριότητες των μεταβολικών ενζύμων του PAF, συναρτήσει του ολικού πρωτεϊνικού ομογενοποιηήματος των ιστών που προστέθηκε σε τελικό όγκο αντίδρασης 200μL. Οι διαφορετικές σειρές δεδομένων αναφέρονται σε διαφορετικούς χρόνους ενζυμικής αντίδρασης εκφρασμένες σε min.



Σχήμα 7: Διαγραμματική αναπαράσταση των δραστικότητας και ειδικών δραστικότητας για τα μεταβολικά ένζυμα του PAF στα ηπατικά κύτταρα (A) δραστικότητας και (B) ειδική δραστικότητα της ενδοκυτταρικής PAF-AH, (Γ) δραστικότητας και (Δ) ειδική δραστικότητα της lyso-PAF AT, (E) δραστικότητα και (Z) ειδική δραστικότητα της PAF-CPT των ηπατικών κυττάρων σε συνάρτηση με το ολικό κυτταρικό ομογενοποίηση που χρησιμοποιήθηκε εκφρασμένο σε μg πρωτεΐνης σε τελικό όγκο αντίδρασης 200μL. Οι διαφορετικές σειρές δεδομένων αναφέρονται στους ενζυμικούς χρόνους αντίδρασης.

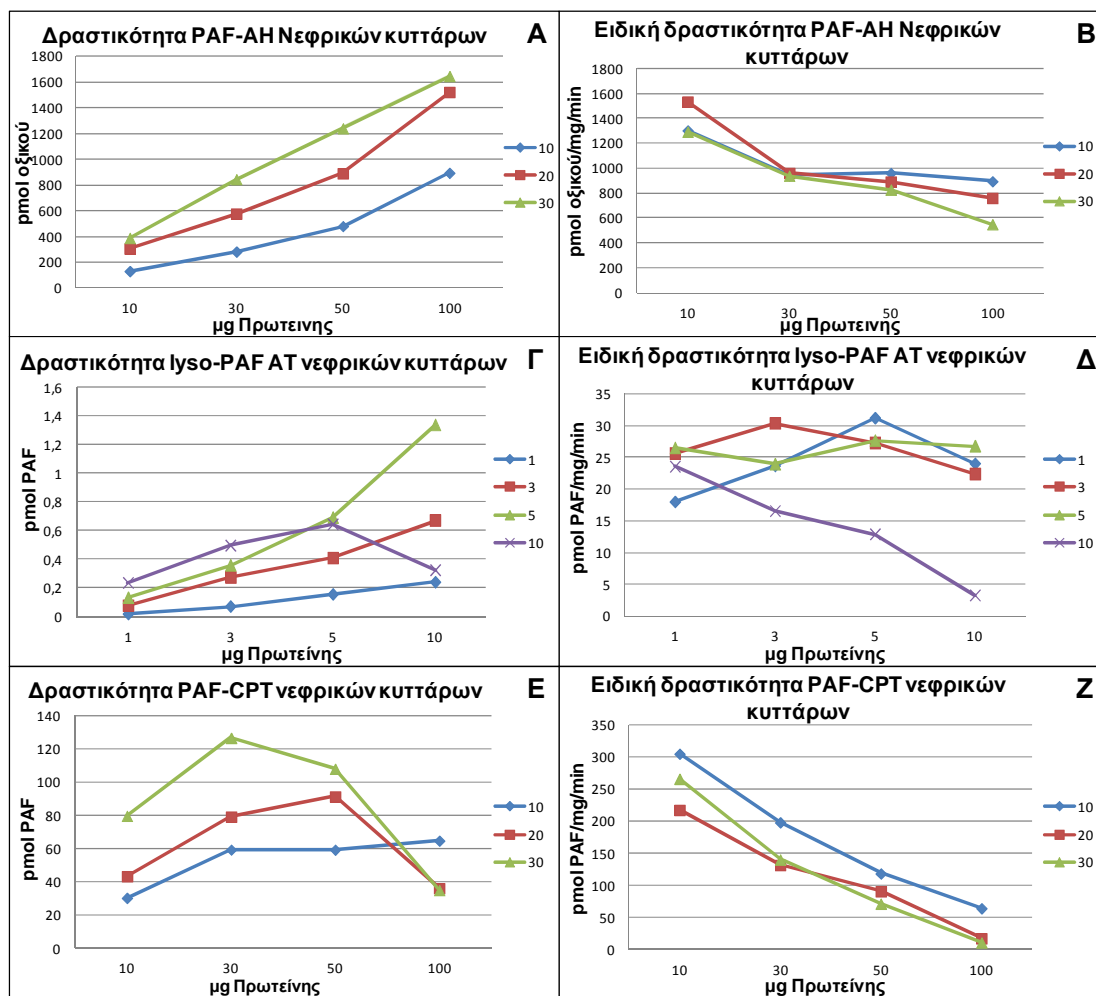
Από τα παραπάνω γραφήματα οι βέλτιστες συνθήκες ενζυμικής αντίδρασης που επιλέχθηκαν για τα ηπατικά κύτταρα ήταν οι ακόλουθες όπως παρουσιάζονται στον Πίνακα 10.

Πίνακας 10: Συνθήκες ενζυμικής αντίδρασης για τα μεταβολικά ένζυμα του PAF στα ηπατικά κύτταρα.

Μεταβολικό ένζυμο PAF στα ηπατικά κύτταρα	μg ολικής πρωτεΐνης σε τελικό όγκο αντίδρασης 200μL	Χρόνος (min)
PAF-AH	50	20
lyso-PAF AT	5	5
PAF-CPT	30	10

5.5.5 Νεφρικά κύτταρα

Στα ακόλουθα γραφήματα παρατίθενται οι δραστηριότητες και οι ειδικές δραστηριότητες των μεταβολικών ενζύμων του PAF, συναρτήσει του ολικού πρωτεϊνικού ομογενοποιήματος των νεφρικών κυττάρων που προστέθηκε σε τελικό όγκο αντίδρασης 200μL. Οι διαφορετικές σειρές δεδομένων αναφέρονται σε διαφορετικούς χρόνους ενζυμικής αντίδρασης εκφρασμένες σε min.



Σχήμα 8: Διαγραμματική αναπαράσταση των δραστηριοτήτων και ειδικών δραστηριοτήτων για τα μεταβολικά ένζυμα του PAF στα νεφρικά κύτταρα. (Α) δραστηριότητας και (Β) ειδική δραστηριότητα της ενδοκυτταρικής PAF-AH, (Γ) δραστηριότητας και (Δ) ειδική δραστηριότητα της lyso-PAF AT, (Ε) δραστηριότητα και (Ζ) ειδική δραστηριότητα της PAF-CPT των νεφρικών κυττάρων σε συνάρτηση με το ολικό κυτταρικό ομογενοποιήμα που χρησιμοποιήθηκε εκφρασμένο σε μg πρωτεΐνης σε τελικό όγκο αντίδρασης 200μL. Οι διαφορετικές σειρές δεδομένων αναφέρονται στους ενζυμικούς χρόνους αντίδρασης.

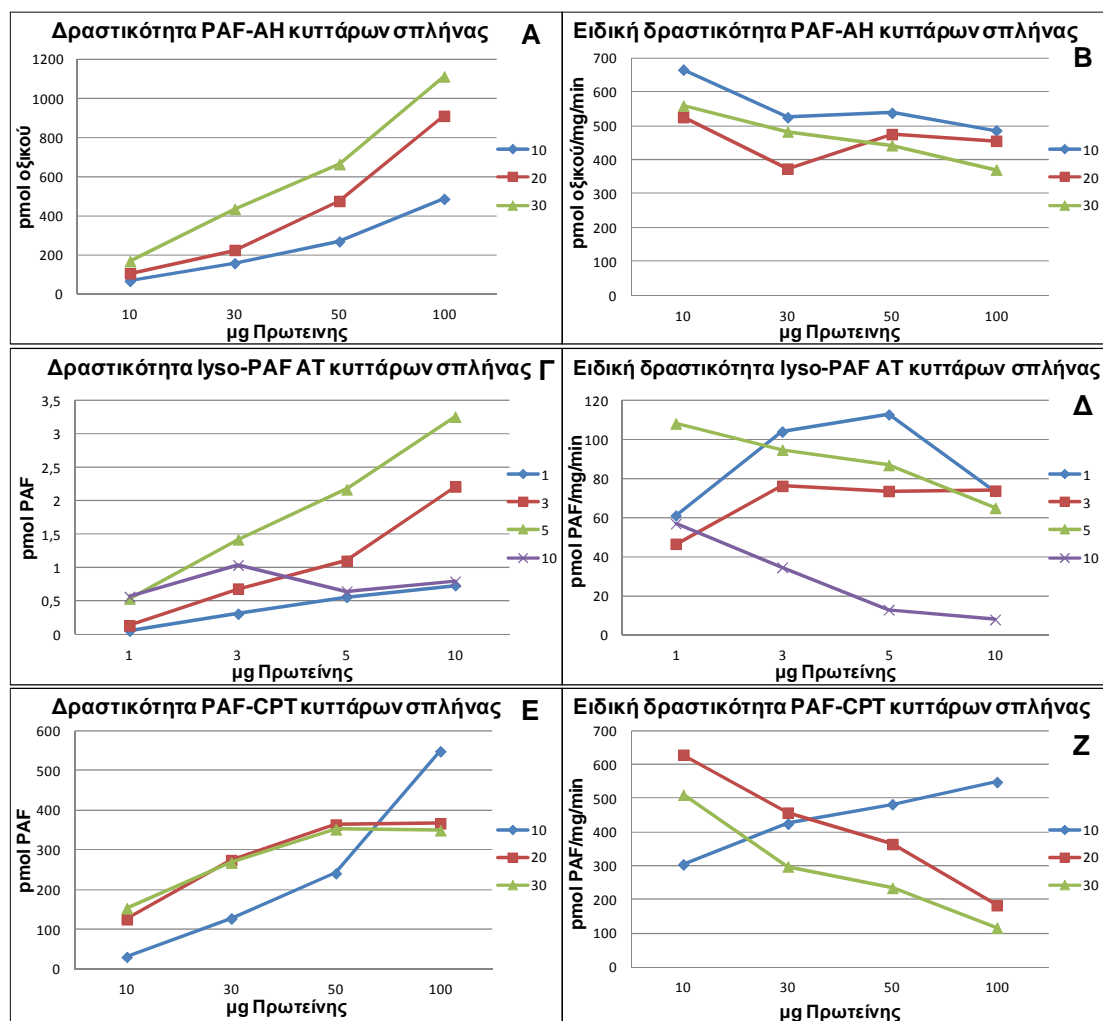
Από τα παραπάνω γραφήματα οι βέλτιστες συνθήκες ενζυμικής αντίδρασης που επιλέχθηκαν για τα νεφρικά κύτταρα ήταν οι ακόλουθες όπως παρουσιάζονται στον Πίνακα 11.

Πίνακας 11: Συνθήκες ενζυμικής αντίδρασης για τα μεταβολικά ένζυμα του PAF στα νεφρικά κύτταρα.

Μεταβολικό ένζυμο PAF στα νεφρικά κύτταρα	μg ολικής πρωτεΐνης σε τελικό όγκο αντίδρασης 200μL	Χρόνος (min)
PAF-AH	50	20
lyso-PAF AT	5	5
PAF-CPT	20	20

5.5.6 Κύτταρα σπλήνας

Στα ακόλουθα γραφήματα παρατίθενται οι δραστηριότητες και οι ειδικές δραστηριότητες των μεταβολικών ενζύμων του PAF, συναρτήσει του ολικού πρωτεϊνικού ομογενοποιήματος των κυττάρων σπλήνας που προστέθηκε σε τελικό όγκο αντίδρασης 200μL. Οι διαφορετικές σειρές δεδομένων αναφέρονται σε διαφορετικούς χρόνους ενζυμικής αντίδρασης εκφρασμένες σε min.



Σχήμα 9: Διαγραμματική αναπαράσταση των δραστηριοτήτων και ειδικών δραστηριοτήτων για τα μεταβολικά ένζυμα του PAF στα κύτταρα σπλήνας.

(Α) δραστικότητα και (Β) ειδική δραστικότητα της ενδοκυτταρικής PAF-AH, (Γ) δραστικότητα και (Δ) ειδική δραστικότητα της lyso-PAF AT, (Ε) δραστικότητα και (Ζ) ειδική δραστικότητα της PAF-CPT των κυττάρων σπλήνας σε συνάρτηση με το ολικό κυτταρικό ομογενοποίημα που χρησιμοποιήθηκε εκφρασμένο σε μg πρωτεΐνης σε τελικό όγκο αντίδρασης 200μL. Οι διαφορετικές σειρές δεδομένων αναφέρονται στους ενζυμικούς χρόνους αντίδρασης.

Από τα παραπάνω γραφήματα οι βέλτιστες συνθήκες ενζυμικής αντίδρασης που επιλέχθηκαν για τα κύτταρα σπλήνας ήταν οι ακόλουθες όπως παρουσιάζονται στον Πίνακα 12.

Πίνακας 12: Συνθήκες ενζυμικής αντίδρασης για τα μεταβολικά ένζυμα του PAF στα κύτταρα σπλήνας.

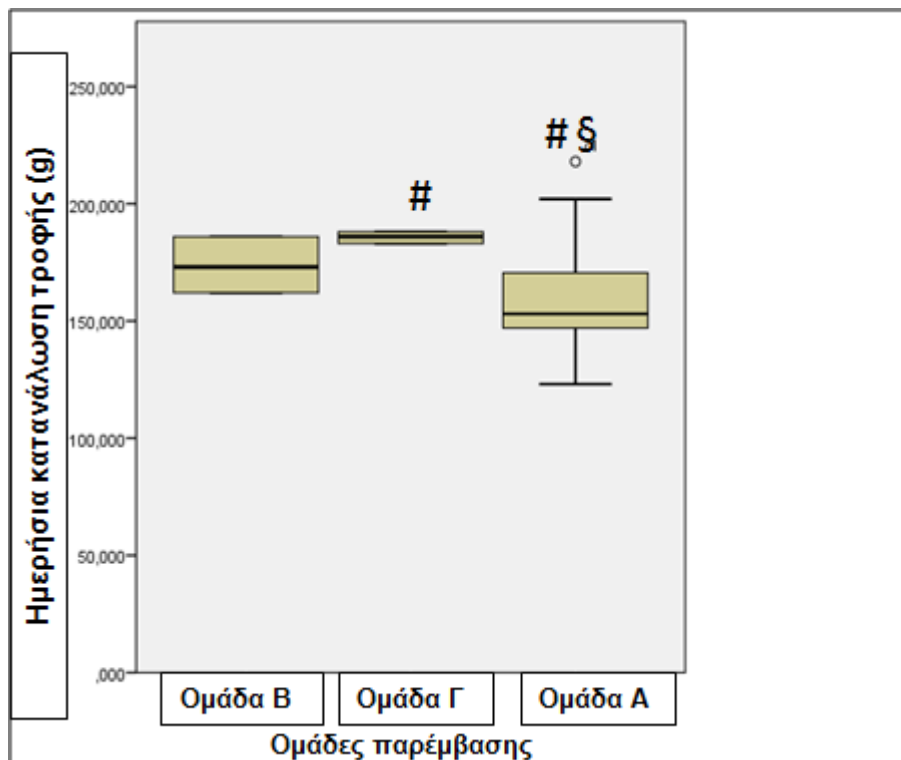
Μεταβολικό ένζυμο PAF στα κύτταρα σπλήνας	μg ολικής πρωτεΐνης σε τελικό όγκο αντίδρασης 200μL	Χρόνος (min)
PAF-AH	50	20
lyso-PAF AT	5	5
PAF-CPT	20	20

Το επόμενο στάδιο της μελέτης ήταν να δοκιμαστούν τα γιαούρτια σε ένα καθιερωμένο μοντέλο μελέτης της αθηρωματικής νόσου *in vivo* σε κουνέλια Νέας Ζηλανδίας.

Τα πειραματόζωα που χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη παρελήφθησαν από πιστοποιημένο εκτροφέα και ελέγχτηκαν από κτηνίατρο πριν την παραλαβή τους για τυχόν λοιμώξεις και βρέθηκαν όλα υγιή. Τα πειραματόζωα εγκλιματίστηκαν για μια εβδομάδα πριν την έναρξη της παρέμβασης, στους χώρους πειραματόζωων του εργαστηρίου Πειραματικής Χειρουργικής και Χειρουργικής Ερεύνης "Ν.Σ. Χρηστέας" της Ιατρικής Σχολής του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών. Ο εγκλιματισμός κρίνεται αναγκαίος για 2 κυρίως λόγους, πρώτον για να μην επηρεαστούν οι αρχικές μετρήσεις από κατάσταση στρες λόγω αλλαγής περιβάλλοντος των πειραματόζωων, αλλά κυρίως να δοθεί χρόνος ώστε να εκδηλωθούν τυχόν υποβόσκουσες ασθένειες των πειραματόζωων, οι οποίες μπορεί να επηρεάσουν ολόκληρη την έκβαση της παρέμβασης. Μετά τη περίοδο εγκλιματισμού τα πειραματόζωα χωρίστηκαν σε ομάδες, όπως παρουσιάζονται στο κεφάλαιο των μεθόδων.

5.6 Αναστολή αθηρωματικών πλακών

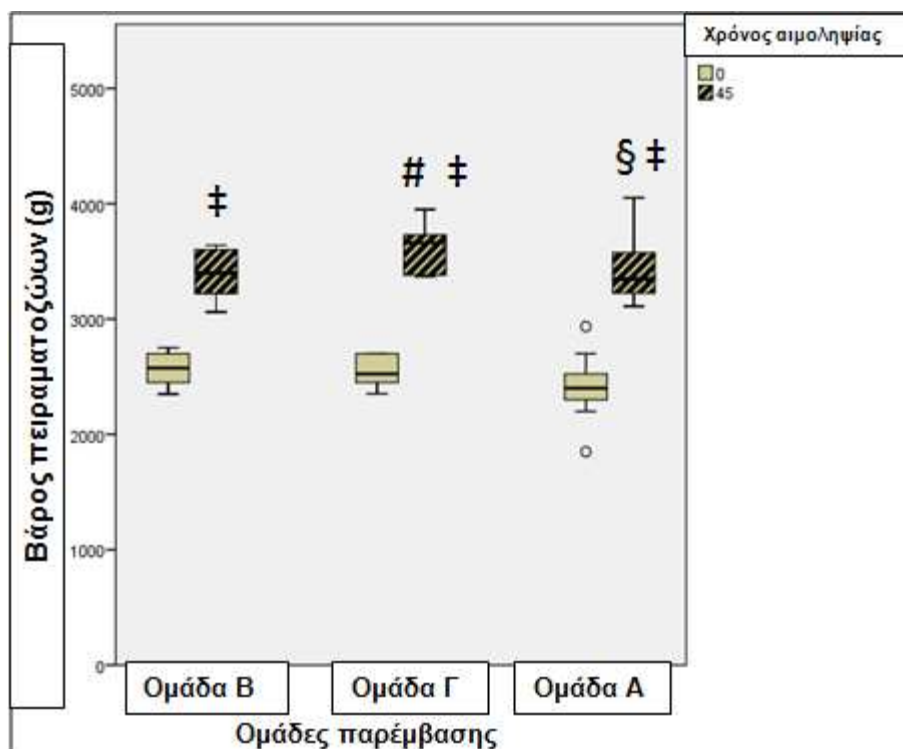
Η κατανάλωση τροφής των πειραματόζων παρουσιάζεται στο Σχήμα 10. Από τα αποτελέσματα είναι φανερό ότι τα πειραματόζωα δεν εμφάνισαν πρόβλημα στη πρόσληψη τροφής αλλά αντίθετα φαίνεται ότι την προτιμούσαν σε σχέση με την απλή ΑΔ.



Σχήμα 10: Η ημερήσια κατανάλωση τροφής από τα πειραματόζωα που ανήκαν στις ομάδες αναστολής των αθηρωματικών πλακών.

Τα αποτελέσματα είναι εκφρασμένα σε γραμμάρια. Ομάδα Α: ΑΔ, Ομάδα Β: ΑΔ+ γιαούρτι με ΥΑΕ, Ομάδα Γ: ΑΔ+ απλό γιαούρτι. #: Σημαντική διαφορά από Ομάδα Β ($p < 0,05$), §: Σημαντική διαφορά από Ομάδα Γ ($p < 0,05$).

Τα πειραματόζωα όλων των ομάδων αναπτύχθηκαν κανονικά καθώς αυξήθηκε το σωματικό βάρος τους, ανεξάρτητα των διαφορετικών μειγμάτων τροφής, ενώ τα πειραματόζωα της Ομάδας Γ εμφάνισαν στο τέλος της παρέμβασης μεγαλύτερο βάρος από τις άλλες 2 ομάδες. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται διαγραμματικά στο Σχήμα 11.

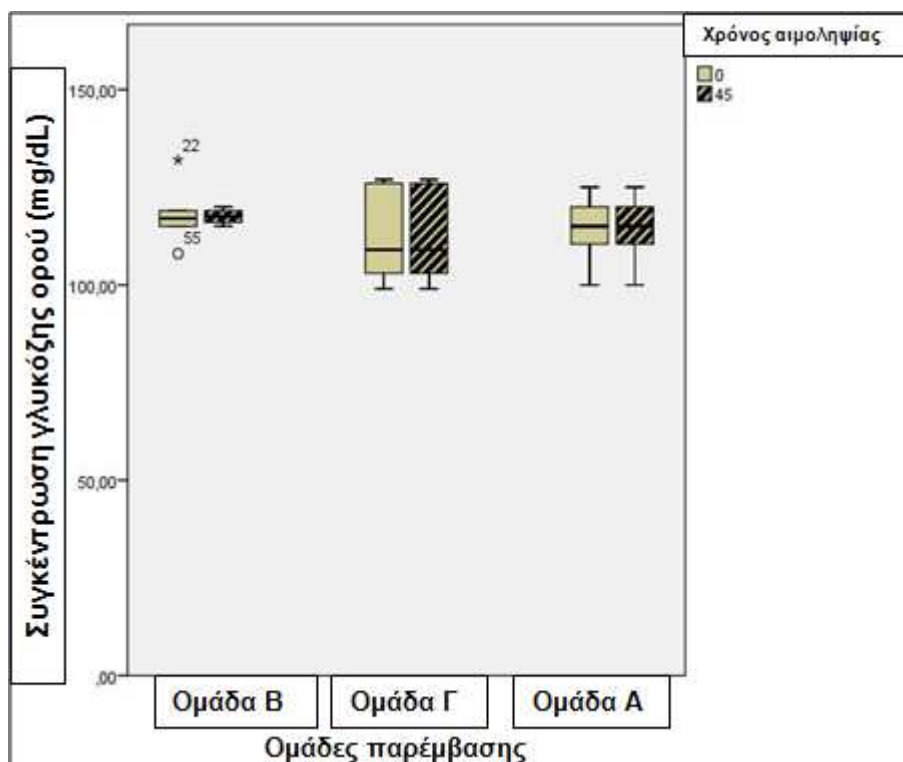


Σχήμα 11: Το βάρος των πειραματόζωων που ανήκαν στις ομάδες αναστολής των αθηρωματικών πλακών.

Τα αποτελέσματα είναι εκφρασμένα σε γραμμάρια. Ομάδα Α: ΑΔ, Ομάδα Β: ΑΔ+ γιαούρτι με ΥΑΕ, Ομάδα Γ: ΑΔ+ απλό γιαούρτι. #: Σημαντική διαφορά από Ομάδα Β ($p<0,05$), §: Σημαντική διαφορά από Ομάδα Γ ($p<0,05$), ‡: Σημαντική διαφορά μεταξύ των 2 διαφορετικών χρονικών στιγμών της ίδιας ομάδας ($p<0,05$).

5.6.1 Αιματολογικές αναλύσεις πειραματόζωων

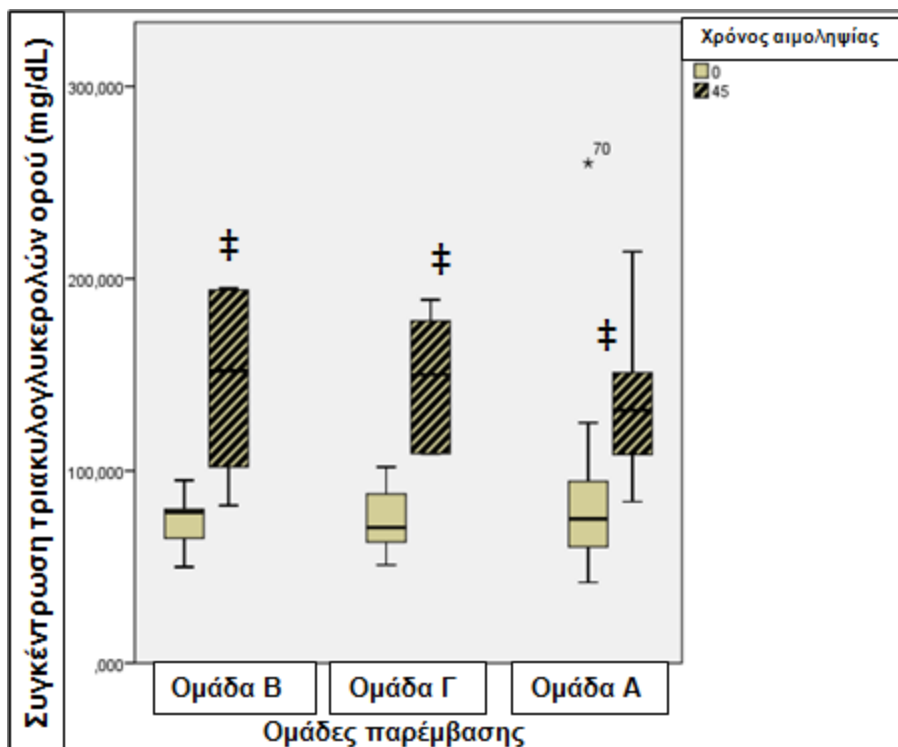
Οι βιοχημικές αναλύσεις αίματος των πειραματόζωων παρουσιάζονται στα σχήματα που ακολουθούν.



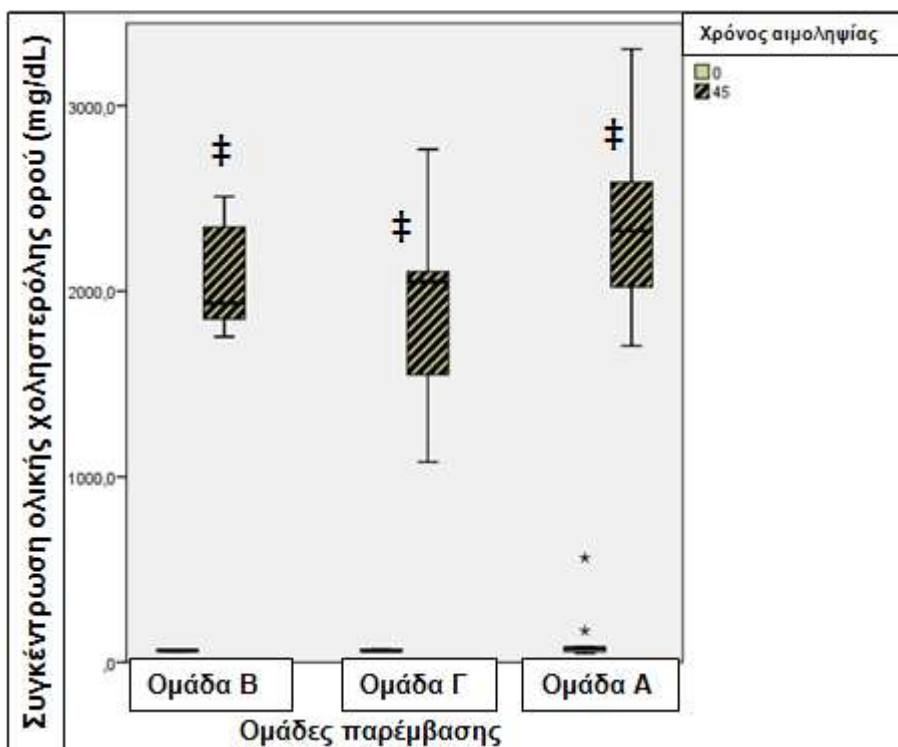
Σχήμα 12: Η γλυκόζη ορού των πειραματόζων που ανήκαν στις ομάδες αναστολής των αθηρωματικών πλακών.

Τα αποτελέσματα είναι εκφρασμένα σε mg γλυκόζης/dL ορού. Ομάδα Α: ΑΔ, Ομάδα Β: ΑΔ+ γιαούρτι με ΥΑΕ, Ομάδα Γ: ΑΔ+ απλό γιαούρτι. ‡: Σημαντική διαφορά μεταξύ των 2 διαφορετικών χρονικών στιγμών της ίδιας ομάδας ($p < 0,05$).

Δεν παρατηρείται διαφορά μεταξύ των τιμών των δύο ομάδων, πριν και μετά τη διατροφική παρέμβαση, όπως φαίνεται στο Σχήμα 12.

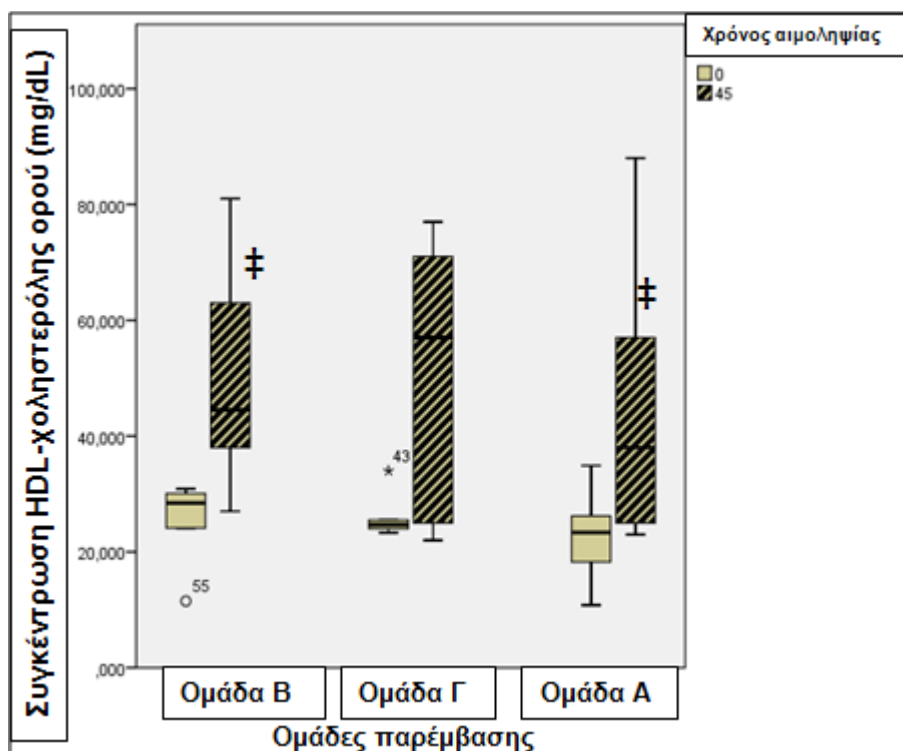


Σχήμα 13: Η συγκέντρωση τριακυλογλυκερολών ορού των πειραματόζων που ανήκαν στις ομάδες αναστολής των αθηρωματικών. Τα αποτελέσματα είναι εκφρασμένα σε mg τριακυλογλυκερολών/dL ορού Ομάδα Α: ΑΔ, Ομάδα Β: ΑΔ+ γιαούρτι με ΥΑΕ, Ομάδα Γ: ΑΔ+ απλό γιαούρτι. ‡: Σημαντική διαφορά μεταξύ των 2 διαφορετικών χρονικών στιγμών της ίδιας ομάδας ($p < 0,05$).



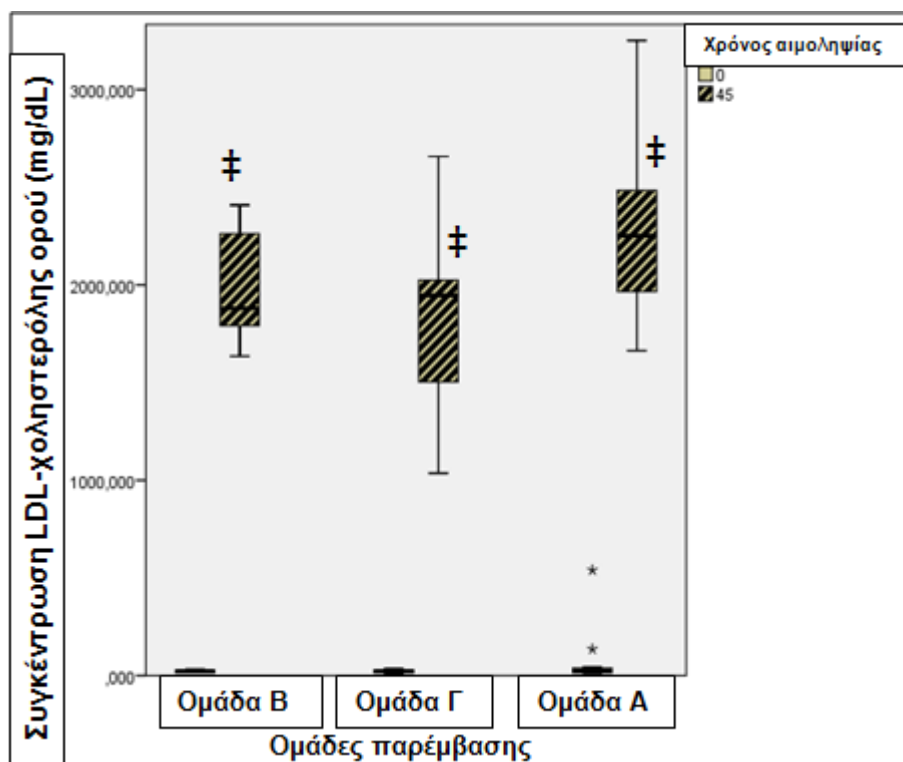
Σχήμα 14: Η συγκέντρωση ολικής χοληστερόλης των πειραματόζων που ανήκαν στις ομάδες αναστολής των αθηρωματικών πλακών.

Τα αποτελέσματα είναι εκφρασμένα σε mg χοληστερόλης/dL ορού Ομάδα Α: ΑΔ, Ομάδα Β: ΑΔ+ γιαούρτι με ΥΑΕ, Ομάδα Γ: ΑΔ+ απλό γιαούρτι. ‡: Σημαντική διαφορά μεταξύ των 2 διαφορετικών χρονικών στιγμών της ίδιας ομάδας ($p < 0,05$).



Σχήμα 15: Η συγκέντρωση HDL-χοληστερόλης ορού των πειραματόζων που ανήκαν στις ομάδες αναστολής των αθηρωματικών.

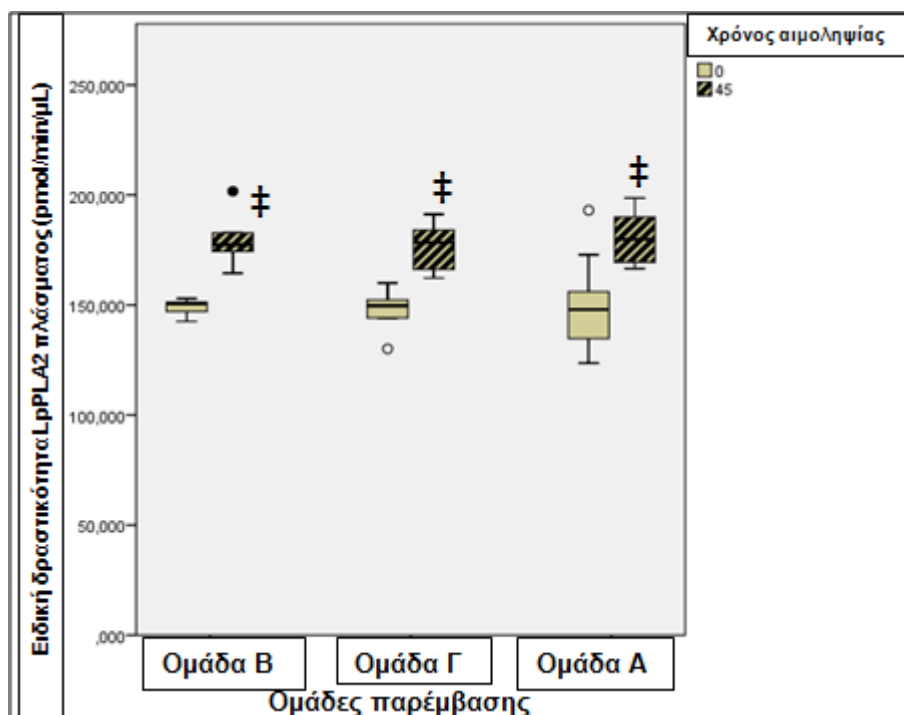
Τα αποτελέσματα είναι εκφρασμένα σε mg HDL-χοληστερόλης/dL ορού Ομάδα Α: ΑΔ, Ομάδα Β: ΑΔ+ γιαούρτι με ΥΑΕ, Ομάδα Γ: ΑΔ+ απλό γιαούρτι. ‡: Σημαντική διαφορά μεταξύ των 2 διαφορετικών χρονικών στιγμών της ίδιας ομάδας ($p < 0,05$).



Σχήμα 16: Η συγκέντρωση της LDL-χοληστερόλης ορού των πειραματόζων που ανήκαν στις ομάδες αναστολής των αθηρωματικών πλακών.

Τα αποτελέσματα είναι εκφρασμένα σε mg LDL-χοληστερόλης/dL ορού Ομάδα Α: ΑΔ, Ομάδα Β: ΑΔ+ γιαούρτι με ΥΑΕ, Ομάδα Γ: ΑΔ+ απλό γιαούρτι. ‡: Σημαντική διαφορά μεταξύ των 2 διαφορετικών χρονικών στιγμών της ίδιας ομάδας ($p < 0,05$).

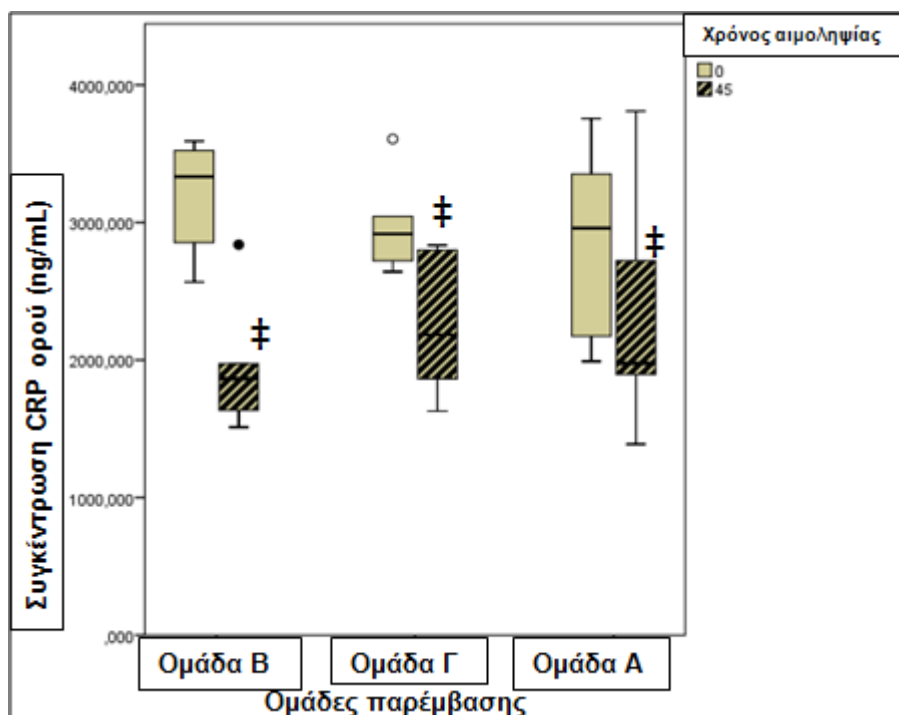
Από τα αποτελέσματα φαίνεται ότι σε όλες τις ομάδες η πρόσληψη της ΑΔ προκάλεσε δραματική αύξηση όλων των λιπιδίων του αίματος. Η αύξηση στην περίπτωση της χοληστερόλης και των λιποπρωτεϊνών ήταν ακόμα και 2 τάξεις μεγέθους μεγαλύτερη από τα φυσιολογικά επίπεδα. Η προσθήκη γιαουρτιού απλού και εμπλουτισμένου με ΥΑΕ δεν επέδρασαν σε αυτή την αύξηση καθώς δεν παρατηρήθηκε καμία διαφορά μεταξύ των ομάδων στο τέλος της παρέμβασης.



Σχήμα 17: Ειδική δραστηριότητα της Lp-PLA₂ στο πλάσμα των πειραματόζων που ανήκαν στις ομάδες αναστολής της αθηρωμάτωσης.

Τα αποτελέσματα είναι εκφρασμένα σε pmol οξικού/min/μL ορού. Ομάδα Α: ΑΔ, Ομάδα Β: ΑΔ+ γιαούρτι με ΥΑΕ, Ομάδα Γ: ΑΔ+ απλό γιαούρτι. ‡: Σημαντική διαφορά μεταξύ των 2 διαφορετικών χρονικών στιγμών της ίδιας ομάδας ($p < 0,05$).

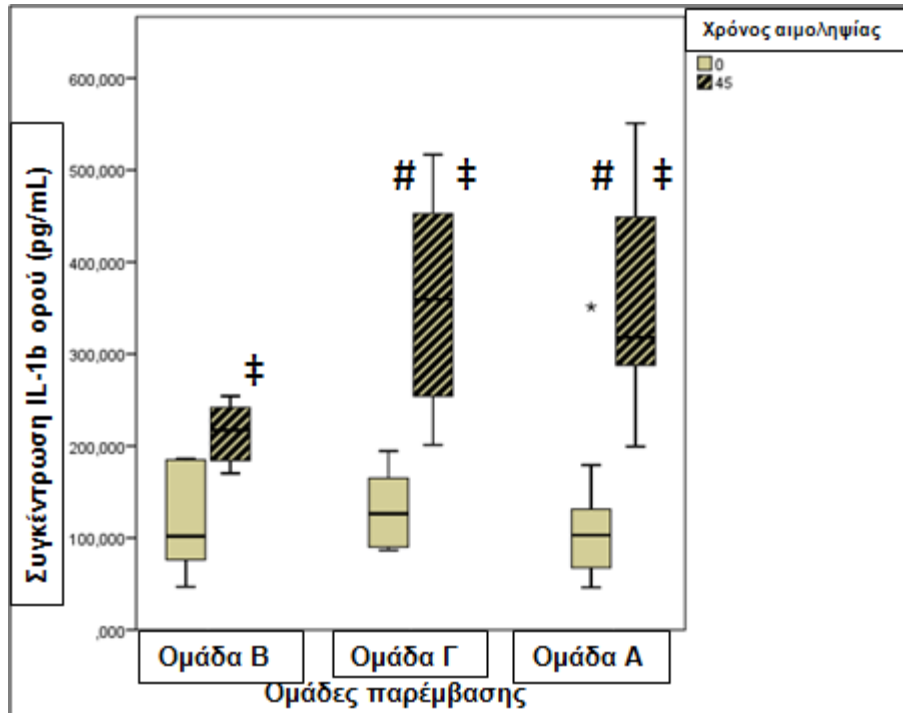
Η δραστηριότητα της Lp-PLA₂ αυξήθηκε σημαντικά και στις 3 ομάδες της παρέμβασης, ενώ δεν παρατηρήθηκε σημαντική διαφορά μεταξύ των ομάδων στις 0 και 45 ημέρες (Σχήμα 17).



Σχήμα 18: Η συγκέντρωση του CRP στον ορό των πειραματόζων που ανήκαν στις ομάδες αναστολής της αθηρωμάτωσης.

Τα αποτελέσματα είναι εκφρασμένα σε ng CRP/mL ορού. Ομάδα Α: ΑΔ, Ομάδα Β: ΑΔ+ γιαούρτι με ΥΑΕ, Ομάδα Γ: ΑΔ+ απλό γιαούρτι. ‡: Σημαντική διαφορά μεταξύ των 2 διαφορετικών χρονικών στιγμών της ίδιας ομάδας ($p < 0,05$).

Η συγκέντρωση του CRP στον ορό των πειραματοζών εμφανίζει ενδιαφέρον καθώς σε όλες τις ομάδες, ανεξαρτήτως διατροφής, εμφανίζεται μια σημαντική μείωση της συγκέντρωσης του, δηλαδή τα πειραματόζα φαίνεται να έχουν μικρότερη φλεγμονώδη απόκριση (Σχήμα 18). Η παρατήρηση αυτή δεν μπορεί να αξιολογηθεί εύκολα και χρειάζεται περαιτέρω πειράματα αλλά και μετρήσεις άλλων δεικτών οι οποίοι θα βοηθήσουν στη κατανόηση του φαινομένου.



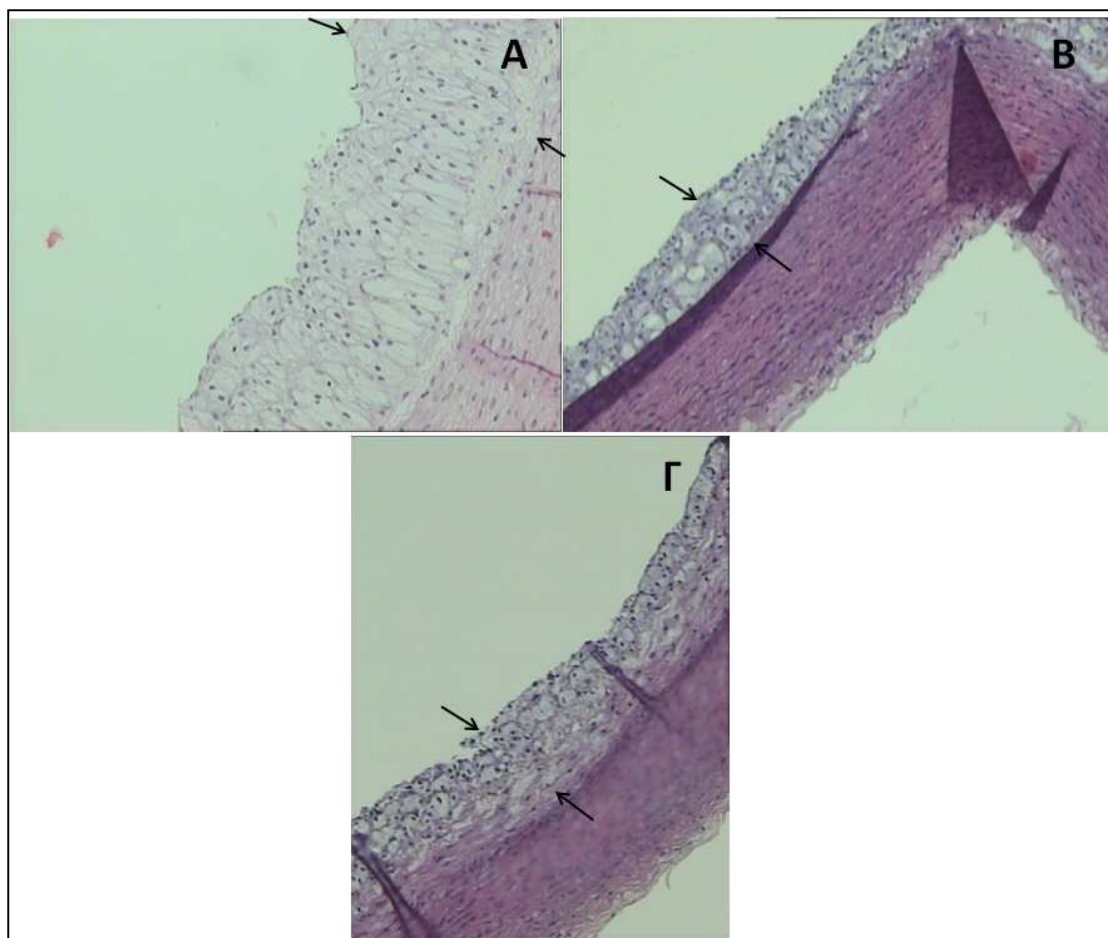
Σχήμα 19: Η συγκέντρωση της IL-1b στον ορό των πειραματόζων που ανήκαν στις ομάδες αναστολής της αθηρωμάτωσης.

Τα αποτελέσματα είναι εκφρασμένα σε pg IL-1b/mL ορού. Ομάδα Α: ΑΔ, Ομάδα Β: ΑΔ+ γιαούρτι με ΥΑΕ, Ομάδα Γ: ΑΔ+ απλό γιαούρτι. #: Στατιστικώς σημαντική διαφορά από Ομάδα Β με $p < 0,05$, ‡: Σημαντική διαφορά μεταξύ των 2 διαφορετικών χρονικών στιγμών της ίδιας ομάδας ($p < 0,05$).

Η διατροφική παρέμβαση αύξησε σημαντικά τη συγκέντρωση της IL-1b σε όλες της ομάδες πειραματόζων. Η συγκέντρωσης της ήταν ιδιαίτερα αυξημένη στις ομάδες Α και Γ και οι οποίες διαφοροποιήθηκαν σημαντικά από την Ομάδα Β η οποία τράφηκε με γιαούρτι εμπλουτισμένο σε ΥΑΕ (Σχήμα 19).

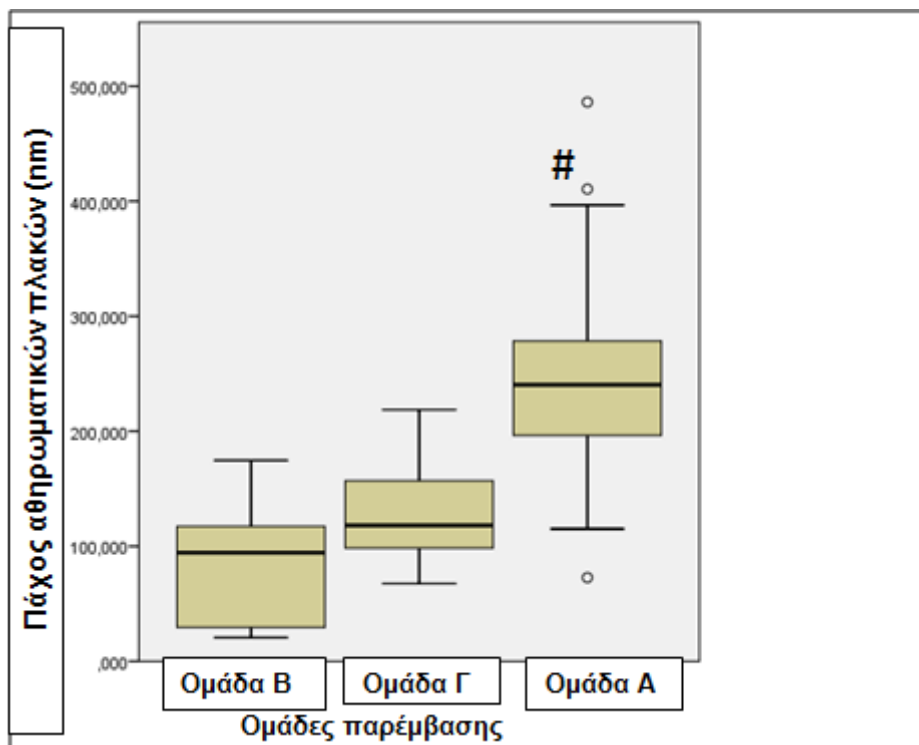
5.6.2 Αθηρωματική βλάβη

Μετά την ευθανασία στα πειραματόζωα μετρήθηκε το μέγιστο πάχος των αθηρωματικών πλακών αλλά και το μέσο πάχος (βλάβη) των αθηρωματικών πλακών, σύμφωνα με τη διαδικασία που περιγράφεται στις μεθόδους. Στην Εικόνα 12 που ακολουθεί παρουσιάζονται φωτογραφίες από οπτικό μικροσκόπιο αθηρωματικών πλακών από όλες τις ομάδες παρέμβασης. Οι φωτογραφίες αντιστοιχούν στις μέσες τιμές των δύο παραμέτρων που μετρήθηκαν, δηλαδή το μέγιστο και το μέσο πάχος του αγγείου, από όλα τα αγγεία όλων των πειραματόζων, ώστε να οπτικοποιηθούν τα αριθμητικά αποτελέσματα που παρουσιάζονται σε ακόλουθα σχήματα.

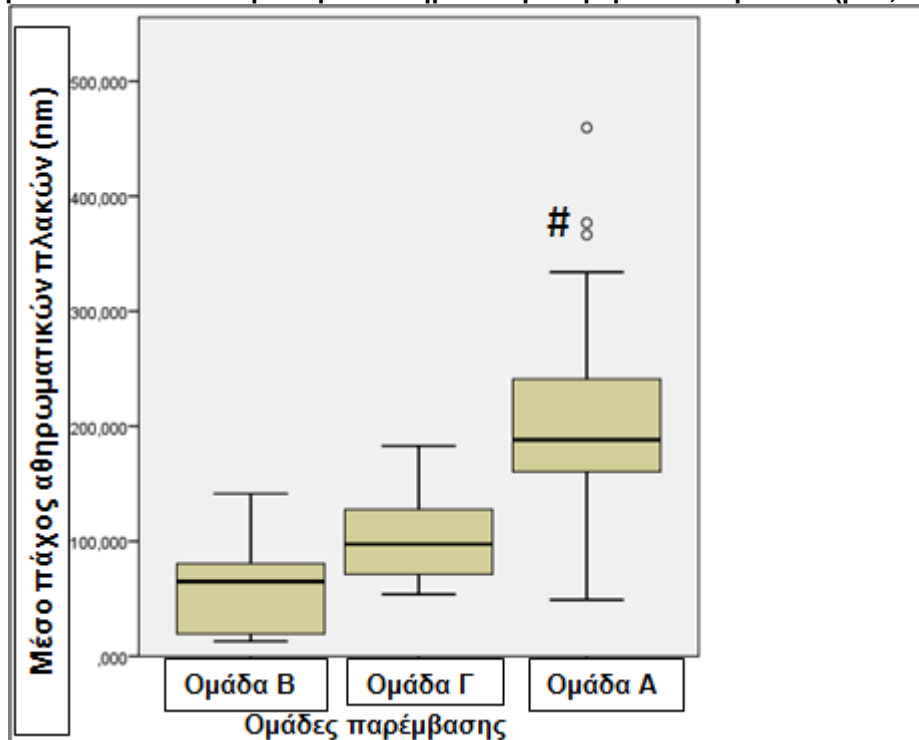


Εικόνα 12: Χαρακτηριστικές φωτογραφίες αγγείων από οπτικό μικροσκόπιο ύστερα από χρώση των πειραματόζων που ανήκουν στις ομάδες αναστολής των αθηρωματικών πλακών.

A: Φωτογραφία πειραματόζου της Ομάδας A (ΑΔ), **B:** Φωτογραφία πειραματόζου της Ομάδας B (ΑΔ +γιαούρτι με ΥΑΕ) και **Γ:** Φωτογραφία πειραματόζου της Ομάδας Γ (ΑΔ+ απλό γιαούρτι). Με τα βέλη σημειώνεται το μέγιστο πάχος του αγγείου.



Σχήμα 20: Το μέγιστο πάχος των αθηρωματικών πλακών των πειραματόζων που ανήκαν στις ομάδες αναστολής της αθηρωμάτωσης. Τα αποτελέσματα είναι εκφρασμένα σε nm. Ομάδα Α: ΑΔ, Ομάδα Β: ΑΔ+ γιαούρτι με ΥΑΕ, Ομάδα Γ: ΑΔ+ απλό γιαούρτι. #: Σημαντική διαφορά από Ομάδα Β ($p < 0,05$).



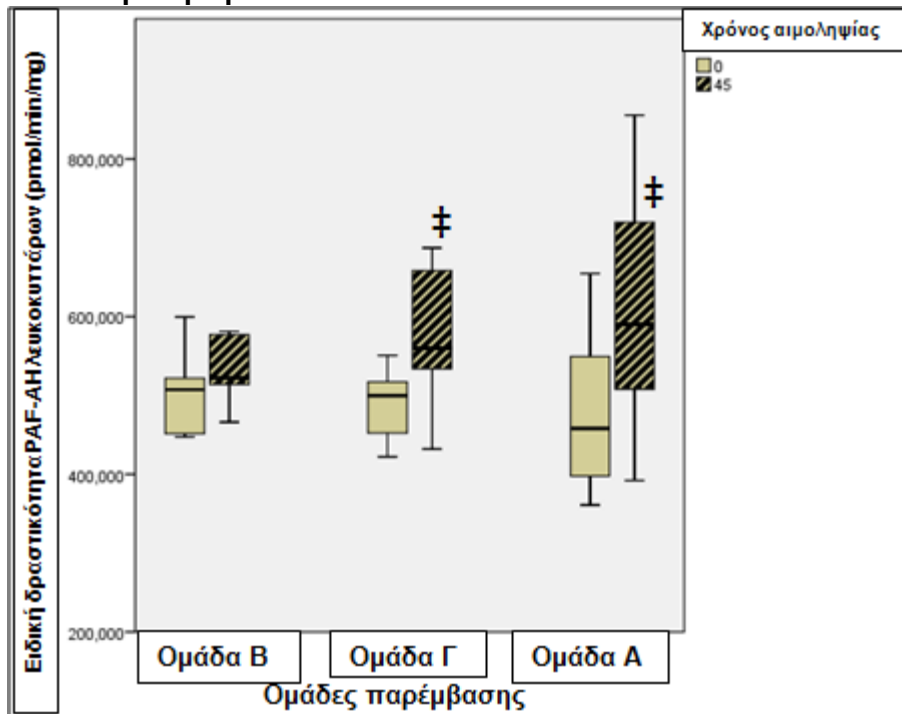
Σχήμα 21: Το μέσο πάχος (βλάβη) των αθηρωματικών πλακών των πειραματόζων που ανήκαν στις ομάδες αναστολής της αθηρωμάτωσης. Τα αποτελέσματα είναι εκφρασμένα σε nm. Ομάδα Α: ΑΔ, Ομάδα Β: ΑΔ+ γιαούρτι με ΥΑΕ, Ομάδα Γ: ΑΔ+ απλό γιαούρτι. #: Σημαντική διαφορά από Ομάδα Β ($p < 0,05$).

Από τα αποτελέσματα είναι φανερό ότι οι δύο διαφορετικές μετρήσεις είναι συσχετιζόμενες καθώς εμφανίζουν την ίδια σχετική εκτίμηση της βλάβης στα αγγεία των πειραματόζων (Σχήμα 20 & 21).

5.6.3 Αναλύσεις έμμορφων συστατικών αίματος

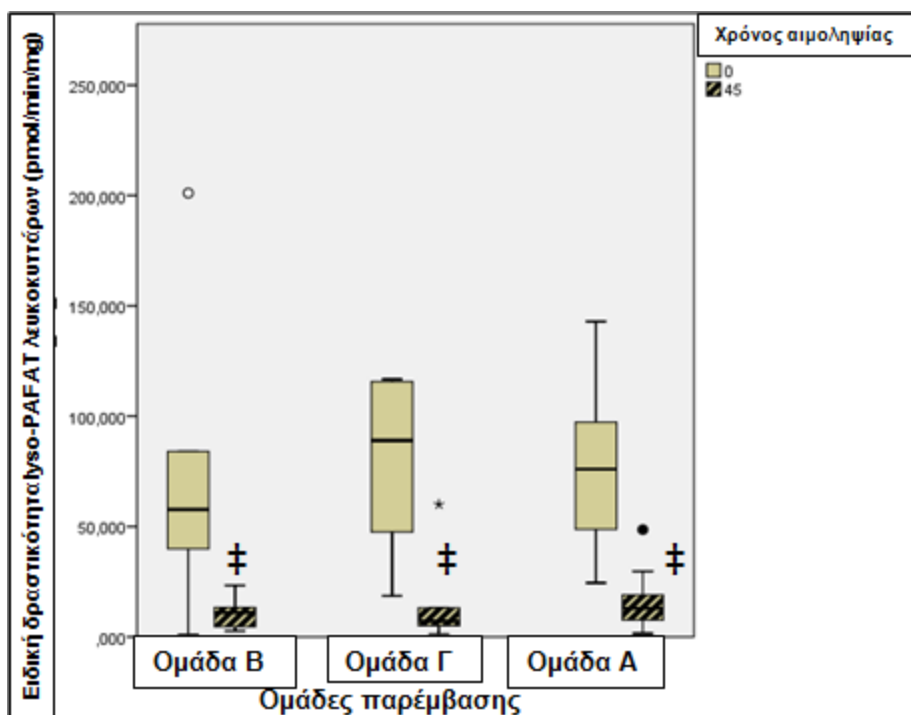
Οι αιμοληψίες και ο διαχωρισμός των διαφορετικών κυττάρων του αίματος αλλά και η παραλαβή ορού και πλάσματος έγιναν όπως περιγράφεται στις μεθόδους πριν την έναρξη της παρέμβασης και πριν την ευθανασία των πειραματόζων στο τέλος αυτής. Στα κύτταρα έγινε προσδιορισμός των μεταβολικών ενζύμων του PAF.

5.6.3.1 Λευκά αιμοσφαίρια



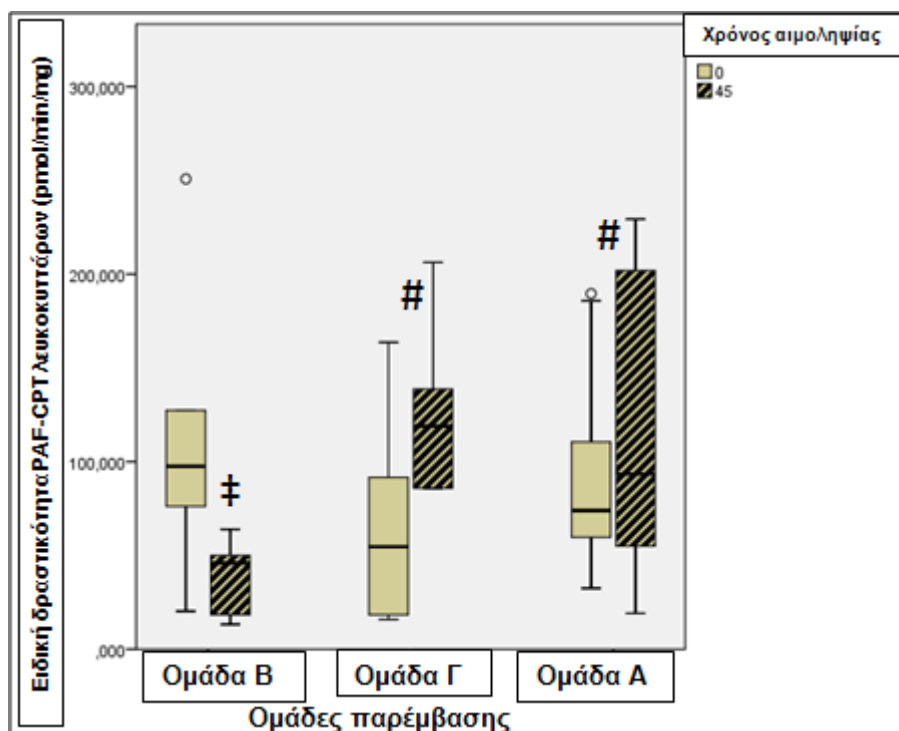
Σχήμα 22: Ειδική δραστηριότητα της ενδοκυτταρικής PAF-AH στα λευκά αιμοσφαίρια των πειραματόζων που ανήκαν στις ομάδες αναστολής της αθηρωμάτωσης. Τα αποτελέσματα είναι εκφρασμένα σε pmol οξικού/min/mg. Ομάδα Α: ΑΔ, Ομάδα Β: ΑΔ+ γιαούρτι με ΥΑΕ, Ομάδα Γ: ΑΔ+ απλό γιαούρτι. †: Σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο διαφορετικών χρονικών στιγμών της ίδιας ομάδας ($p < 0,05$).

Στα λευκά αιμοσφαίρια παρατηρείται μια αύξηση της δραστηριότητας της ενδοκυτταρικής PAF-AH μετά το πέρας της παρέμβασης. Η αύξηση αυτή είχε σημαντική διαφορά από τα βασικά επίπεδα μόνο στην περίπτωση των Ομάδων Α και Γ, οι οποίες τράφηκαν με ΑΔ και ΑΔ+ απλό γιαούρτι αντίστοιχα (Σχήμα 22).



Σχήμα 23: Ειδική δραστηριότητα της lyso-PAF AT στα λευκά αιμοσφαίρια των πειραματόζων που ανήκαν στις ομάδες αναστολής της αθηρωμάτωσης. Τα αποτελέσματα είναι εκφρασμένα σε pmol PAF/min/mg. Ομάδα Α: ΑΔ, Ομάδα Β: ΑΔ+ γιαούρτι με ΥΑΕ, Ομάδα Γ: ΑΔ+ απλό γιαούρτι. ‡: Σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο διαφορετικών χρονικών στιγμών της ίδιας ομάδας ($p < 0,05$).

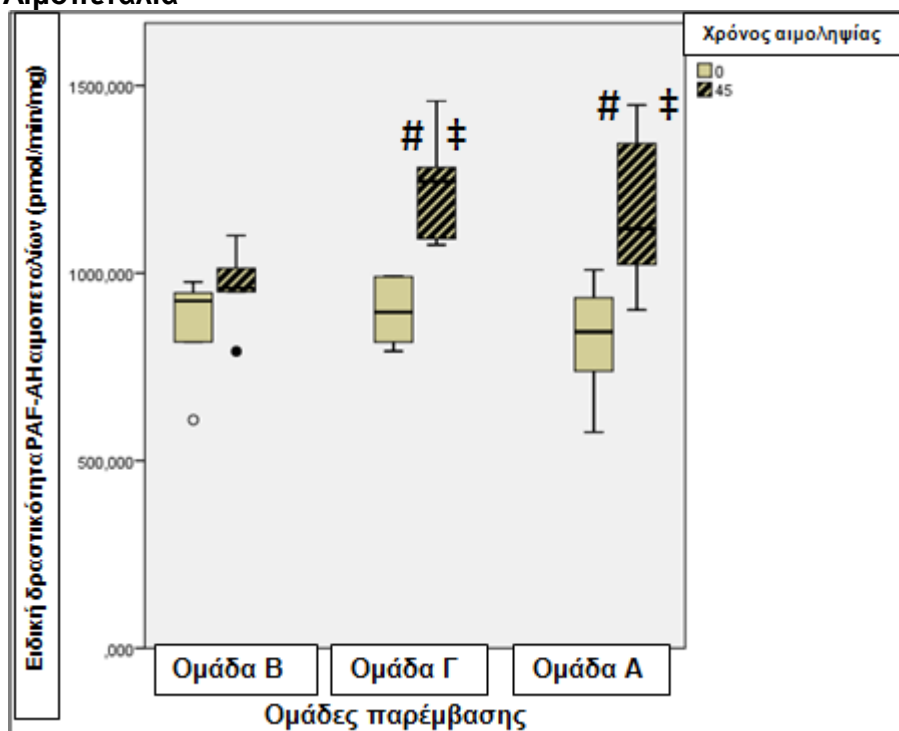
Τα πειραματικά αποτελέσματα από τη δραστηριότητα της lyso-PAF AT δείχνουν σημαντική μείωση και στις τρεις διαφορετικές ομάδες, μετά το πέρας της παρέμβασης, σε σχέση με τα βασικά επίπεδα τους στην έναρξη αυτής. Δεν υπάρχει διαφορά μεταξύ των τιμών των τριών ομάδων σε καμία από τις χρονικές στιγμές (Σχήμα 23).



Σχήμα 24: Ειδική δραστηριότητα της PAF-CPT στα λευκά αιμοσφαίρια των πειραματόζων που ανήκαν στις ομάδες αναστολής της αθηρωμάτωσης. Τα αποτελέσματα είναι εκφρασμένα σε pmol PAF/min/mg. Ομάδα Α: ΑΔ, Ομάδα Β: ΑΔ+ γιαούρτι με ΥΑΕ, Ομάδα Γ: ΑΔ+ απλό γιαούρτι. #: Σημαντική διαφορά από Ομάδα Β ($p < 0,05$), ‡: Σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο διαφορετικών χρονικών στιγμών της ίδιας ομάδας ($p < 0,05$).

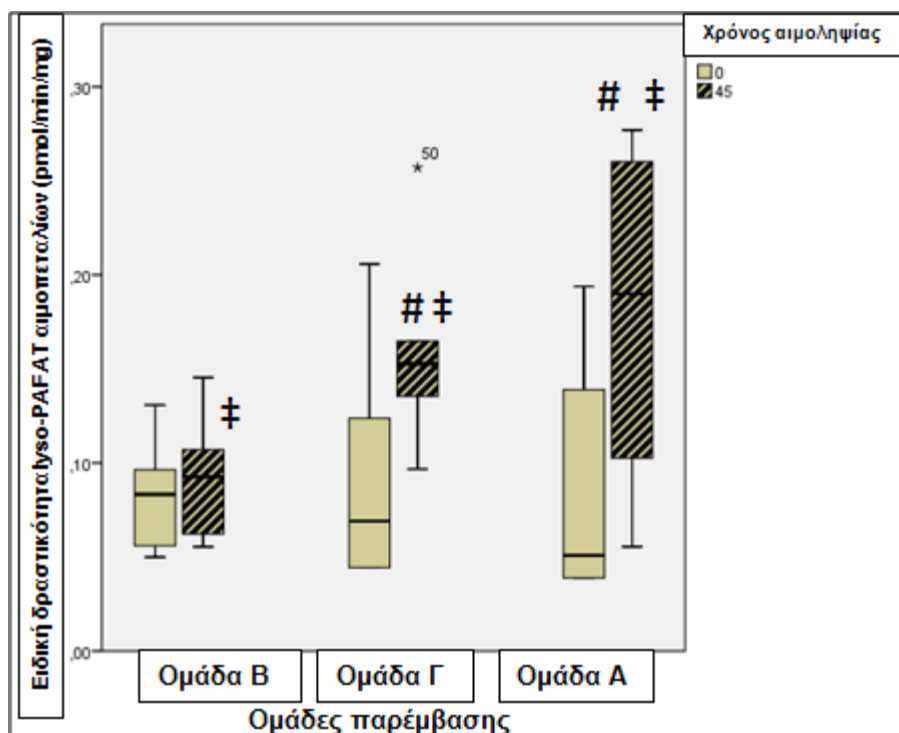
Η δραστηριότητα της PAF-CPT εμφανίζει μεγάλες διακυμάνσεις μεταξύ των ομάδων. Μετά το πέρας της παρέμβασης η ομάδα Β (ΑΔ+ γιαούρτι με ΥΑΕ) εμφανίζει σημαντική μείωση της ειδικής της δραστηριότητας, σε σχέση με τις βασικές τιμές. Αντίθετα οι Ομάδες Α και Γ έχουν αυξημένες τιμές, οι οποίες όμως δεν διαφοροποιούνται στατιστικά από τις βασικές τους τιμές πριν την έναρξη της παρέμβασης. Οι τιμές της Ομάδας Β στις 45 ημέρες είναι σημαντικά μικρότερες από τις αντίστοιχες των ομάδων Α και Γ (Σχήμα 24).

5.6.3.2 Αιμοπετάλια



Σχήμα 25: Ειδική δραστηριότητα της ενδοκυτταρικής PAF-AH στα αιμοπετάλια των πειραματόζων που ανήκαν στις ομάδες αναστολής της αθηρωμάτωσης. Τα αποτελέσματα είναι εκφρασμένα σε pmol οξικού/min/mg. Ομάδα Α: ΑΔ, Ομάδα Β: ΑΔ+ γιαούρτι με ΥΑΕ, Ομάδα Γ: ΑΔ+ απλό γιαούρτι. #: Σημαντική διαφορά από Ομάδα Β ($p < 0,05$), ‡: Σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο διαφορετικών χρονικών στιγμών της ίδιας ομάδας ($p < 0,05$).

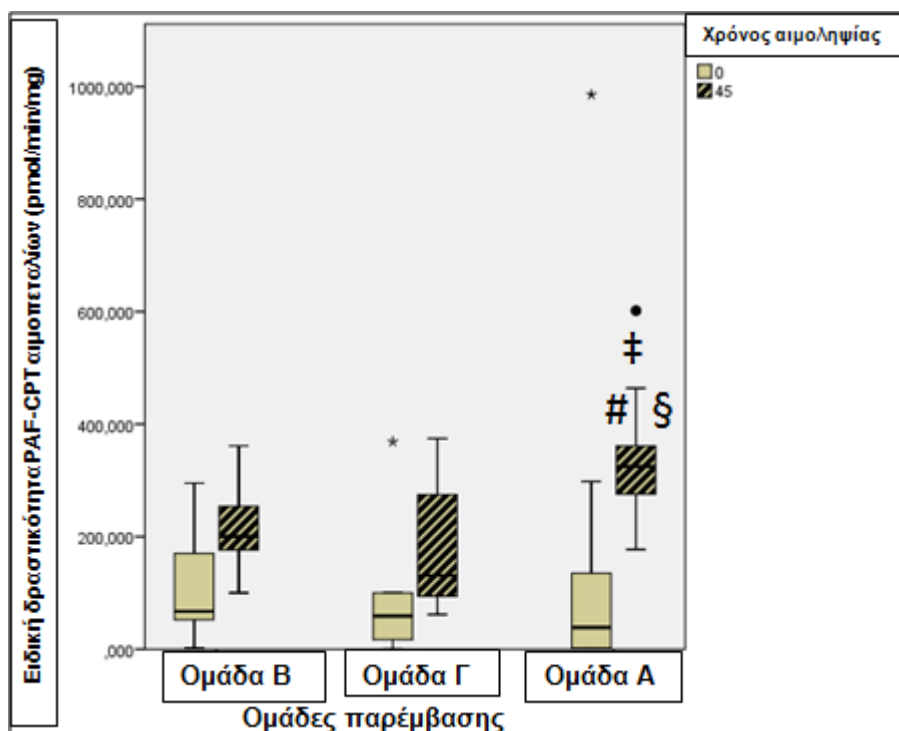
Στα αιμοπετάλια η δραστηριότητα της ενδοκυτταρικής PAF-AH εμφανίζει αύξηση και στις τρεις διαφορετικές Ομάδες στις 45 μέρες. Η αύξηση στις Ομάδες Α και Γ είναι σημαντικά μεγαλύτερη από τις αντίστοιχες βασικές τιμές, αντίθετα η Ομάδα Β δεν έχει στατιστικώς σημαντική διαφορά στις 45 ημέρες σε σχέση με το χρόνο 0. Οι τιμές των ομάδων Α και Γ είναι σημαντικά μεγαλύτερες από αυτές της Ομάδας Β (Σχήμα 25).



Σχήμα 26: Ειδική δραστηριότητα της lyso-PAF AT στα αιμοπετάλια των πειραματόζων που ανήκαν στις ομάδες αναστολής της αθηρωμάτωσης.

Τα αποτελέσματα είναι εκφρασμένα σε pmol PAF /min/mg. Ομάδα Α: ΑΔ, Ομάδα Β: ΑΔ+ γιαούρτι με ΥΑΕ, Ομάδα Γ: ΑΔ+ απλό γιαούρτι. #: Σημαντική διαφορά από Ομάδα Β ($p < 0,05$), ‡: Σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο διαφορετικών χρονικών στιγμών της ίδιας ομάδας ($p < 0,05$).

Η δραστηριότητα της lyso-PAF AT στα αιμοπετάλια, αντίθετα από τα λευκά αιμοσφαίρια, εμφανίζει σημαντική αύξηση και στις τρεις Ομάδες της παρέμβασης σε σχέση με τις βασικές τους τιμές. Οι τιμές των Ομάδων Α και Γ στο τέλος της παρέμβασης είναι σημαντικά αυξημένες σε σχέση με τις αντίστοιχες της Ομάδας Β (Σχήμα 26).

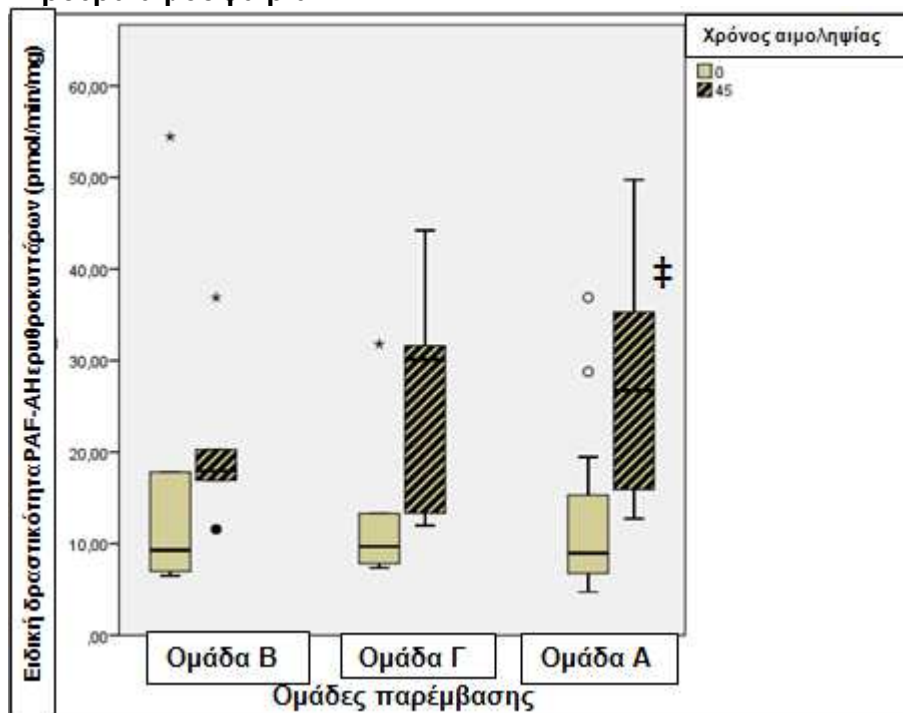


Σχήμα 27: Ειδική δραστηριότητα της PAF-CPT στα αιμοπετάλια των πειραματόζων που ανήκαν στις ομάδες αναστολής της αθηρωμάτωσης.

Τα αποτελέσματα είναι εκφρασμένα σε pmol PAF /min/mg. Ομάδα Α: ΑΔ, Ομάδα Β: ΑΔ+ γιαούρτι με ΥΑΕ, Ομάδα Γ: ΑΔ+ απλό γιαούρτι. #: Σημαντική διαφορά από Ομάδα Β ($p<0,05$), §:Σημαντική διαφορά από Ομάδα Γ ($p<0,05$), ‡: Σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο διαφορετικών χρονικών στιγμών της ίδιας ομάδας ($p<0,05$).

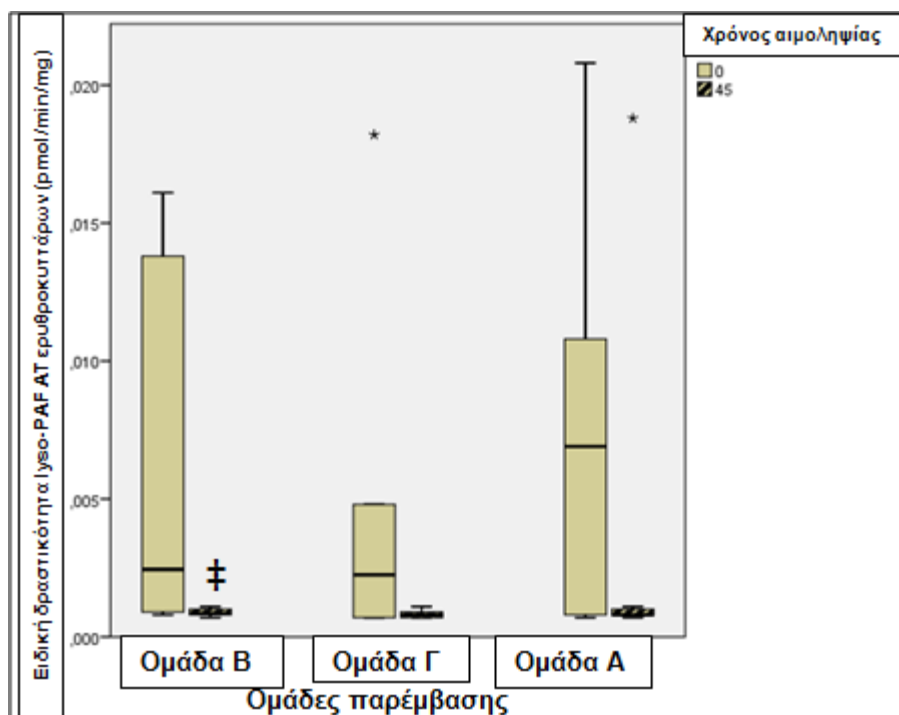
Η δραστηριότητα της PAF-CPT των αιμοπεταλίων στις 45 ημέρες, αυξήθηκε σημαντικά μόνο στην Ομάδα Α, σε σχέση με τις βασικές τιμές. Η δραστηριότητα της PAF-CPT στις 45 ημέρες ήταν σημαντικά αυξημένη σε σχέση με τις αντίστοιχες τιμές των Ομάδων Β και Γ (Σχήμα 27).

5.6.3.3 Ερυθρά αιμοσφαίρια



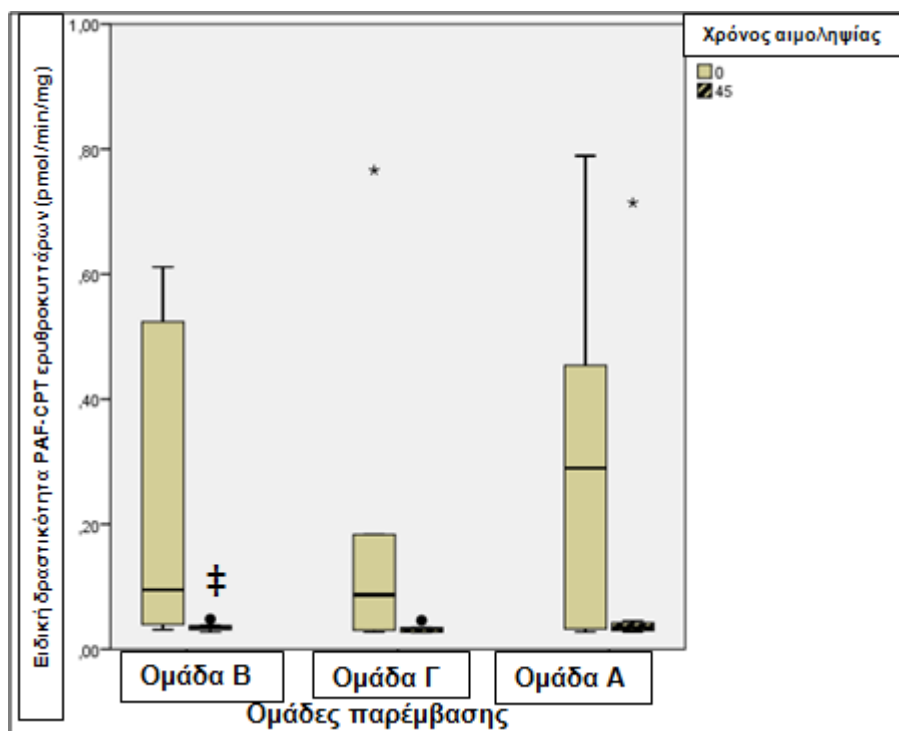
Σχήμα 28: Ειδική δραστηριότητα της PAF-AH στα ερυθρά αιμοσφαίρια των πειραματόζων που ανήκαν στις ομάδες αναστολής της αθηρωμάτωσης. Τα αποτελέσματα είναι εκφρασμένα σε pmol οξικού /min/mg. Ομάδα Α: ΑΔ, Ομάδα Β: ΑΔ+ γιαούρτι με ΥΑΕ, Ομάδα Γ: ΑΔ+ απλό γιαούρτι. ‡: Σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο διαφορετικών χρονικών στιγμών της ίδιας ομάδας ($p < 0,05$).

Η δραστηριότητα της ενδοκυτταρικής PAF-AH στα ερυθρά αιμοσφαίρια των πειραματόζων είναι σημαντικά αυξημένη μόνο στην Ομάδα Α, μετά την παρέμβαση σε σχέση με τις αρχικές τους τιμές. Δεν υπάρχει διαφοροποίηση μεταξύ των ομάδων (Σχήμα 28).



Σχήμα 29: Ειδική δραστηριότητα της lyso-PAF AT στα ερυθρά αιμοσφαίρια των πειραματόζων που ανήκαν στις ομάδες αναστολής της αθηρωμάτωσης. Τα αποτελέσματα είναι εκφρασμένα σε pmol PAF/min/mg. Ομάδα Α: ΑΔ, Ομάδα Β: ΑΔ+ γιαούρτι με ΥΑΕ, Ομάδα Γ: ΑΔ+ απλό γιαούρτι. ‡: Σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο διαφορετικών χρονικών στιγμών της ίδιας ομάδας ($p < 0,05$).

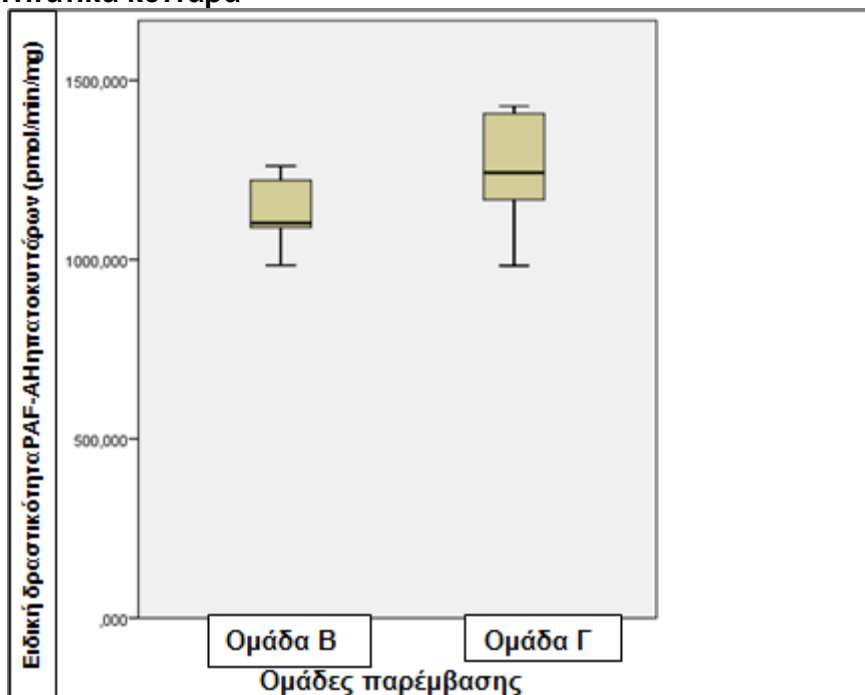
Τα πειραματικά αποτελέσματα από τη δραστηριότητα της lyso-PAF AT των ερυθρών αιμοσφαιρίων δείχνουν σημαντική μείωση στις 45 ημέρες μόνο στην Ομάδα Β, σε σχέση με τα βασικά επίπεδα τους στην έναρξη αυτής. Δεν υπάρχει διαφορά μεταξύ των τιμών των τριών ομάδων σε καμία από τις χρονικές στιγμές (Σχήμα 29).



Σχήμα 30: Ειδική δραστηριότητα της PAF-CPT στα ερυθρά αιμοσφαίρια των πειραματόζων που ανήκαν στις ομάδες αναστολής της αθηρωμάτωσης. Τα αποτελέσματα είναι εκφρασμένα σε pmol PAF/min/mg. Ομάδα Α: ΑΔ, Ομάδα Β: ΑΔ+ γιαούρτι με ΥΑΕ, Ομάδα Γ: ΑΔ+ απλό γιαούρτι. †: Σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο διαφορετικών χρονικών στιγμών της ίδιας ομάδας ($p < 0,05$).

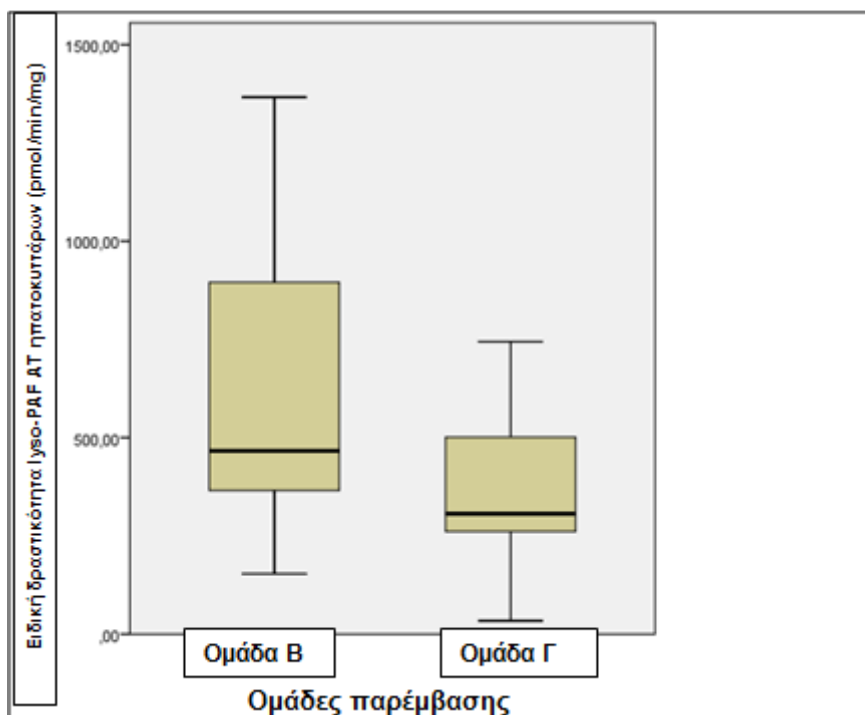
Τα πειραματικά αποτελέσματα από τη δραστηριότητα της lyso-PAF AT των ερυθρών αιμοσφαιρίων δείχνουν σημαντική μείωση στις 45 ημέρες μόνο στην Ομάδα Β, σε σχέση με τα βασικά επίπεδα τους στην έναρξη αυτής. Δεν υπάρχει διαφορά μεταξύ των τιμών των τριών ομάδων σε καμία από τις χρονικές στιγμές (Σχήμα 30).

5.6.3.4 Ηπατικά κύτταρα



Σχήμα 31: Ειδική δραστηριότητα της PAF-AH στα ηπατοκύτταρα των πειραματόζων που ανήκαν στις ομάδες αναστολής της αθηρωμάτωσης. Τα αποτελέσματα είναι εκφρασμένα σε pmol οξικού /min/mg. Ομάδα Β: ΑΔ+ γιαούρτι με ΥΑΕ, Ομάδα Γ: ΑΔ+ απλό γιαούρτι.

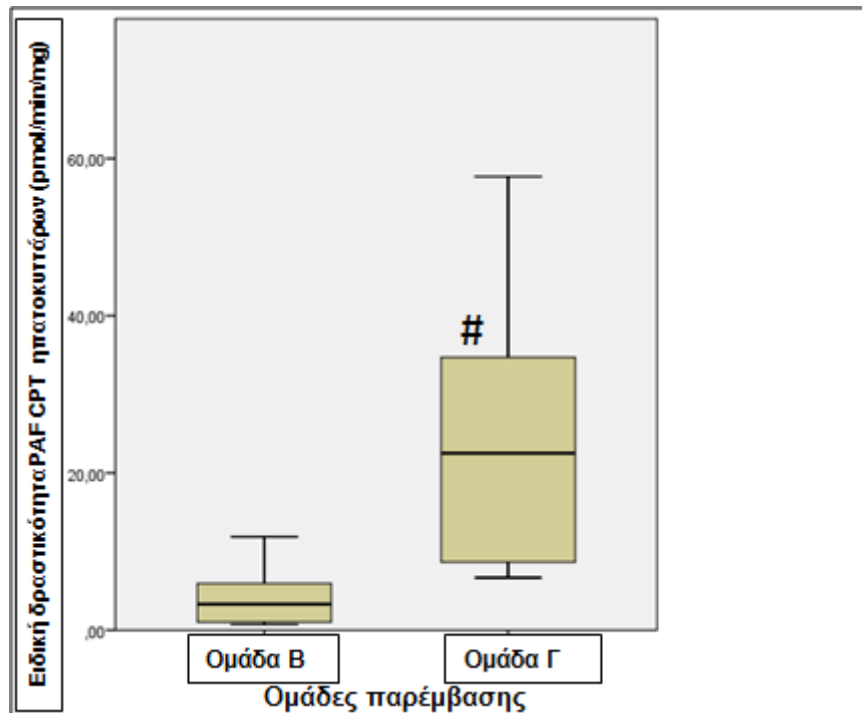
Δεν παρατηρείται διαφορά στις τιμές της ειδικής δραστηριότητας της PAF-AH των δύο ομάδων μετά το πέρας της διατροφικής παρέμβασης (Σχήμα 31).



Σχήμα 32: Ειδική δραστηριότητα της lyso-PAF AT στα ηπατοκύτταρα των πειραματόζων που ανήκαν στις ομάδες αναστολής της αθηρωμάτωσης.

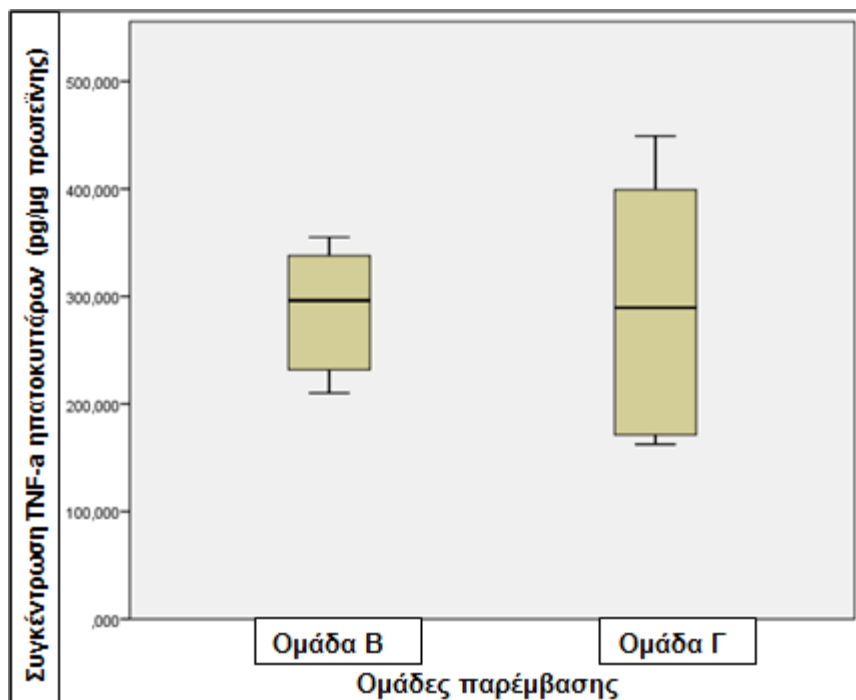
Τα αποτελέσματα είναι εκφρασμένα σε $\mu\text{mol PAF}/\text{min}/\text{mg}$. Ομάδα Β: ΑΔ+ γιαούρτι με ΥΑΕ, Ομάδα Γ: ΑΔ+ απλό γιαούρτι.

Δεν παρατηρείται διαφορά στις τιμές της ειδικής δραστηριότητας της lyso PAF-AT των δύο ομάδων μετά το πέρας της διατροφικής παρέμβασης (Σχήμα 32).



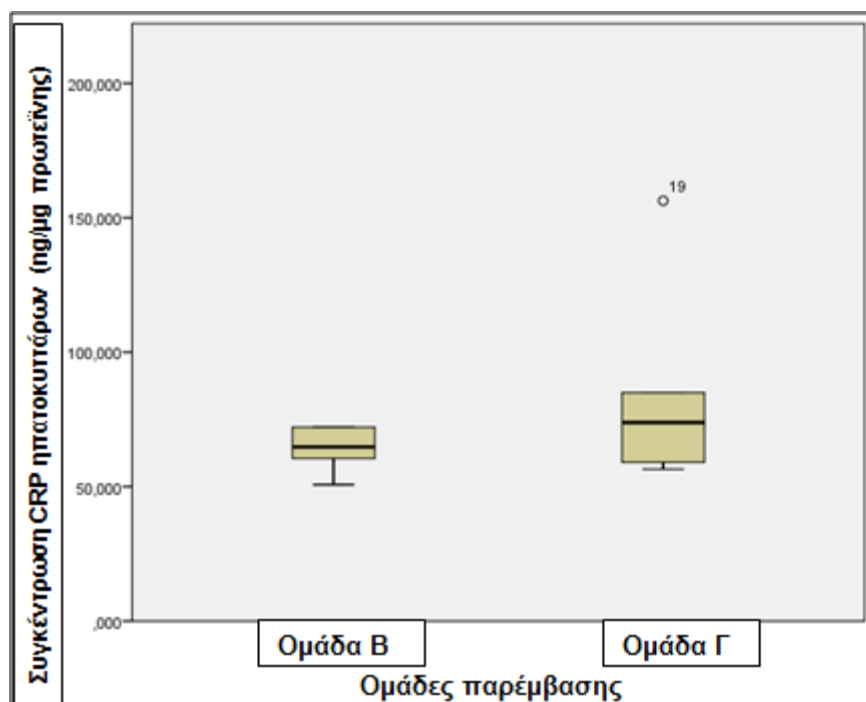
Σχήμα 33: Ειδική δραστηριότητα της PAF-CPT στα ηπατοκύτταρα των πειραματόζων που ανήκαν στις ομάδες αναστολής της αθηρωμάτωσης. Τα αποτελέσματα είναι εκφρασμένα σε $\mu\text{mol PAF}/\text{min}/\text{mg}$. Ομάδα Β: ΑΔ+ γιαούρτι με ΥΑΕ, Ομάδα Γ: ΑΔ+ απλό γιαούρτι. #: Σημαντική διαφορά από Ομάδα Β ($p < 0,05$).

Η δραστηριότητα της PAF-CPT στα ηπατοκύτταρα είναι σημαντικά αυξημένη στην Ομάδα Γ η οποία τράφηκε με απλό γιαούρτι σε σχέση με την Ομάδα Β η οποία τράφηκε με το γιαούρτι εμπλουτισμένο σε ΥΑΕ (Σχήμα 33).



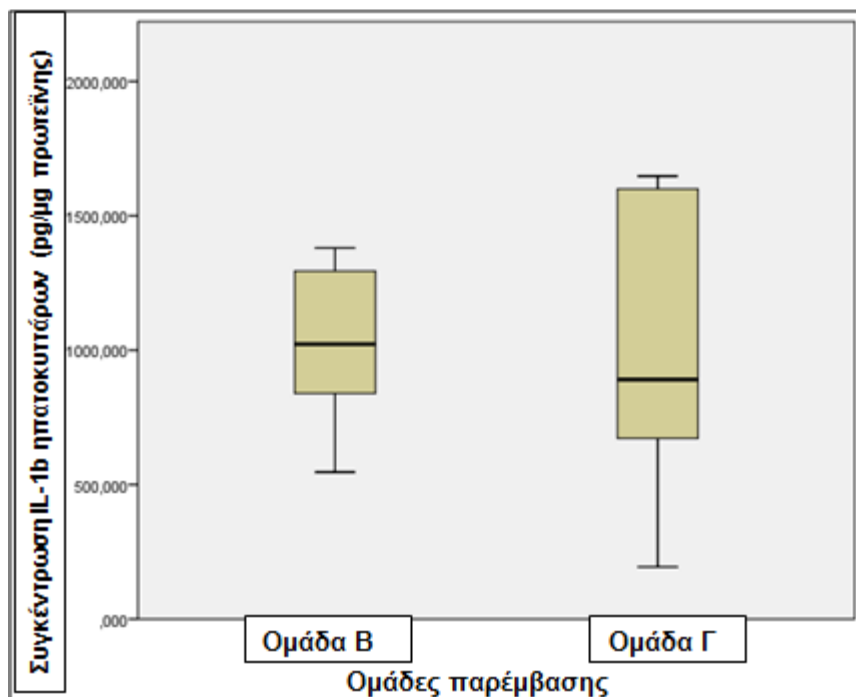
Σχήμα 34: Συγκέντρωση του TNF-α στα ηπατοκύτταρα των πειραματόζων που ανήκαν στις ομάδες αναστολής της αθηρωμάτωσης. Τα αποτελέσματα είναι εκφρασμένα σε pg/μg πρωτεΐνης. Ομάδα Β: ΑΔ+ γιαούρτι με ΥΑΕ, Ομάδα Γ: ΑΔ+ απλό γιαούρτι.

Δεν παρατηρείται διαφορά στη συγκέντρωση του TNF-α στα ηπατοκύτταρα των δύο ομάδων μετά το πέρας της διατροφικής παρέμβασης (Σχήμα 34).



Σχήμα 35: Συγκέντρωση του CRP στα ηπατοκύτταρα των πειραματόζων που ανήκαν στις ομάδες αναστολής της αθηρωμάτωσης. Τα αποτελέσματα είναι εκφρασμένα σε ng/μg πρωτεΐνης. Ομάδα Β: ΑΔ+ γιαούρτι με ΥΑΕ, Ομάδα Γ: ΑΔ+ απλό γιαούρτι.

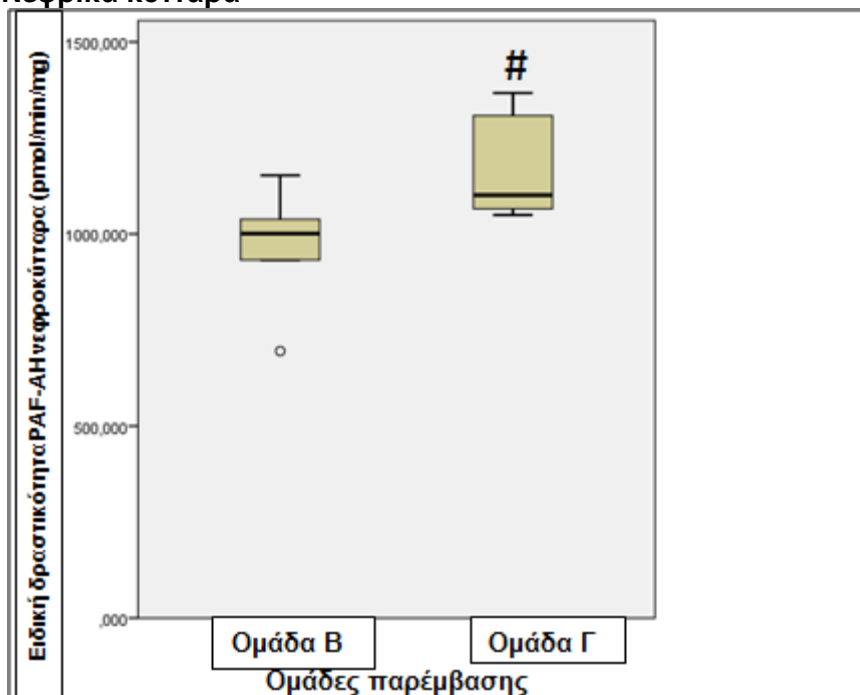
Δεν παρατηρείται διαφορά στη συγκέντρωση της CRP στα ηπατοκύτταρα των δύο ομάδων μετά το πέρας της διατροφικής παρέμβασης (Σχήμα 35).



Σχήμα 36: Συγκέντρωση της IL-1β στα ηπατοκύτταρα των πειραματόζων που ανήκαν στις ομάδες αναστολής της αθηρωμάτωσης. Τα αποτελέσματα είναι εκφρασμένα σε pg/μg πρωτεΐνης. Ομάδα Β: ΑΔ+ γιαούρτι με ΥΑΕ, Ομάδα Γ: ΑΔ+ απλό γιαούρτι.

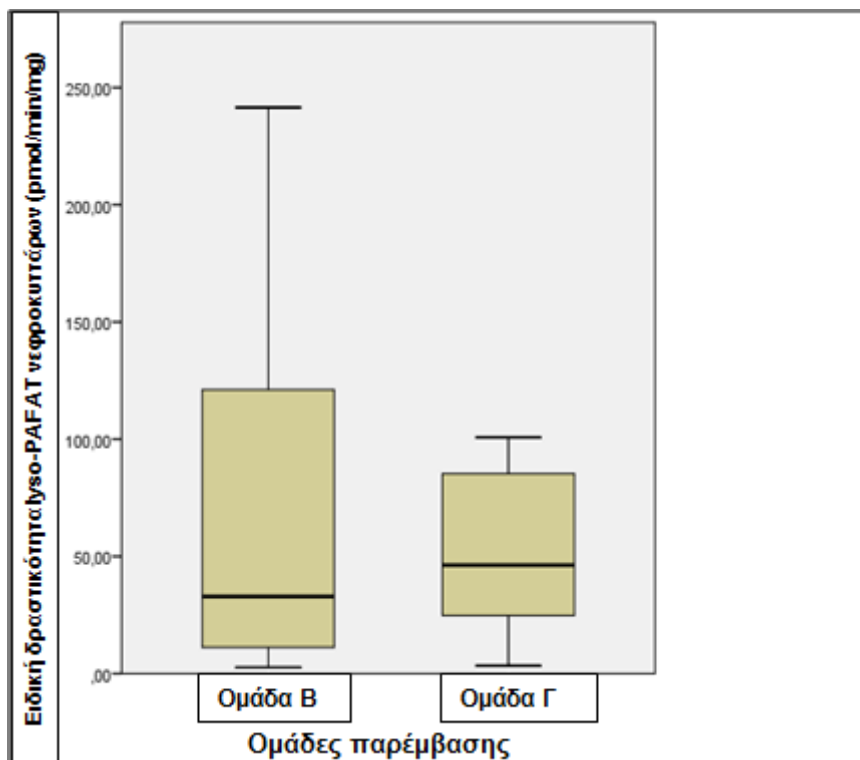
Δεν παρατηρείται διαφορά στη συγκέντρωση της IL-β των ηπατοκυττάρων μεταξύ των δύο ομάδων μετά το πέρας της διατροφικής παρέμβασης (Σχήμα 36).

5.6.3.5 Νεφρικά κύτταρα



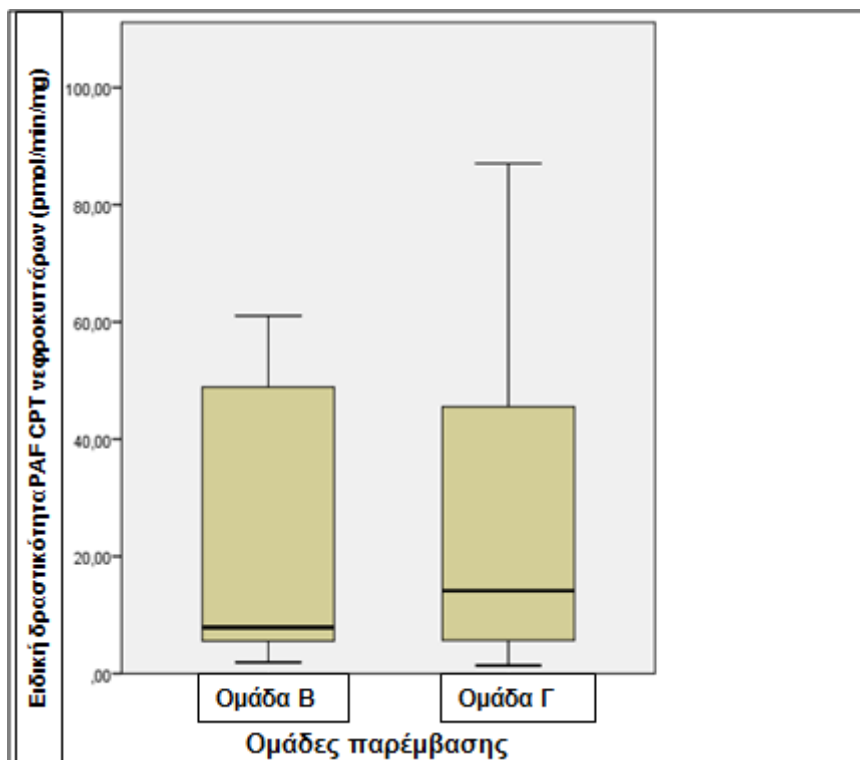
Σχήμα 37: Ειδική δραστηριότητα της PAF-AH στα νεφροκύτταρα των πειραματόζων που ανήκαν στις ομάδες αναστολής της αθηρωμάτωσης. Τα αποτελέσματα είναι εκφρασμένα σε pmol οξικού /min/mg. Ομάδα Β: ΑΔ+ γιαούρτι με ΥΑΕ, Ομάδα Γ: ΑΔ+ απλό γιαούρτι. #: Σημαντική διαφορά από Ομάδα Β ($p < 0,05$).

Η δραστηριότητα της ενδοκυτταρικής PAF-AH στα νεφρικά κύτταρα της Ομάδας Γ που τράφηκε με απλό γιαούρτι ήταν σημαντικά αυξημένη σε σχέση με αυτή της Ομάδας Β που τράφηκε με γιαούρτι εμπλουτισμένο σε ΥΑΕ (Σχήμα 37).



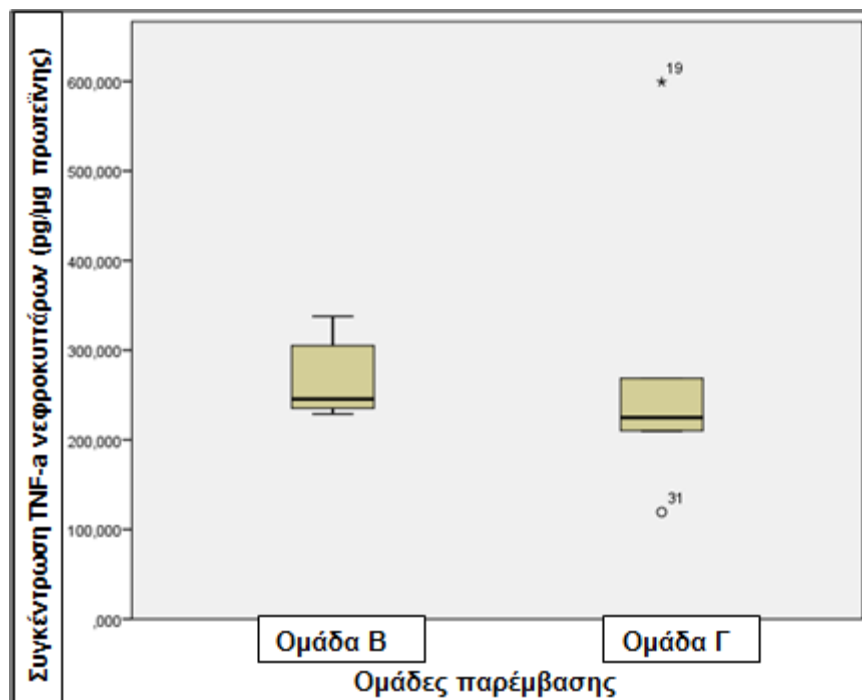
Σχήμα 38: Ειδική δραστηριότητα της lyso-PAF AT στα νεφροκύτταρα των πειραματόζων που ανήκαν στις ομάδες αναστολής της αθηρωμάτωσης. Τα αποτελέσματα είναι εκφρασμένα σε pmol PAF/min/mg. Ομάδα Β: ΑΔ+ γιαούρτι με ΥΑΕ, Ομάδα Γ: ΑΔ+ απλό γιαούρτι.

Δεν παρατηρήθηκε διαφορά στην ειδική δραστηριότητα της lyso-PAF AT στα νεφρικά κύτταρα των δύο διαφορετικών ομάδων, μετά τη διατροφική παρέμβαση (Σχήμα 38).



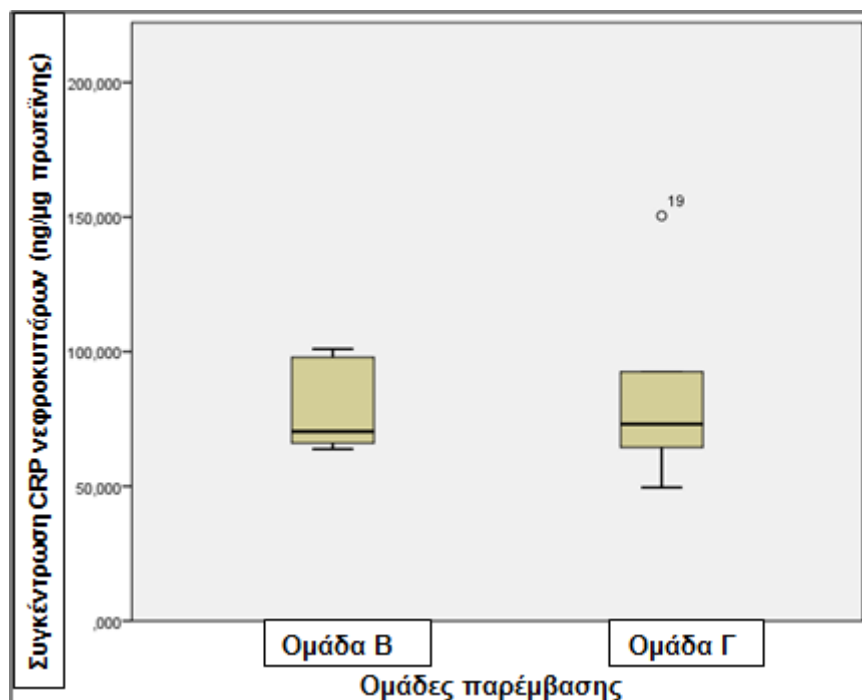
Σχήμα 39: Ειδική δραστηριότητα της PAF CPT στα νεφροκύτταρα των πειραματόζων που ανήκαν στις ομάδες αναστολής της αθηρωμάτωσης. Τα αποτελέσματα είναι εκφρασμένα σε pmol PAF/min/mg. Ομάδα Β: ΑΔ+ γιαούρτι με ΥΑΕ, Ομάδα Γ: ΑΔ+ απλό γιαούρτι.

Δεν παρατηρήθηκε διαφορά στη δραστηριότητα της PAF-CPT στα νεφρικά κύτταρα των δύο διαφορετικών ομάδων, μετά τη διατροφική παρέμβαση (Σχήμα 39).



Σχήμα 40: Συγκέντρωση του TNF-α στα νεφροκύτταρα των πειραματόζων που ανήκαν στις ομάδες αναστολής της αθηρωμάτωσης. Τα αποτελέσματα είναι εκφρασμένα σε pg/μg πρωτεΐνης. Ομάδα Β: ΑΔ+ γιαούρτι με ΥΑΕ, Ομάδα Γ: ΑΔ+ απλό γιαούρτι.

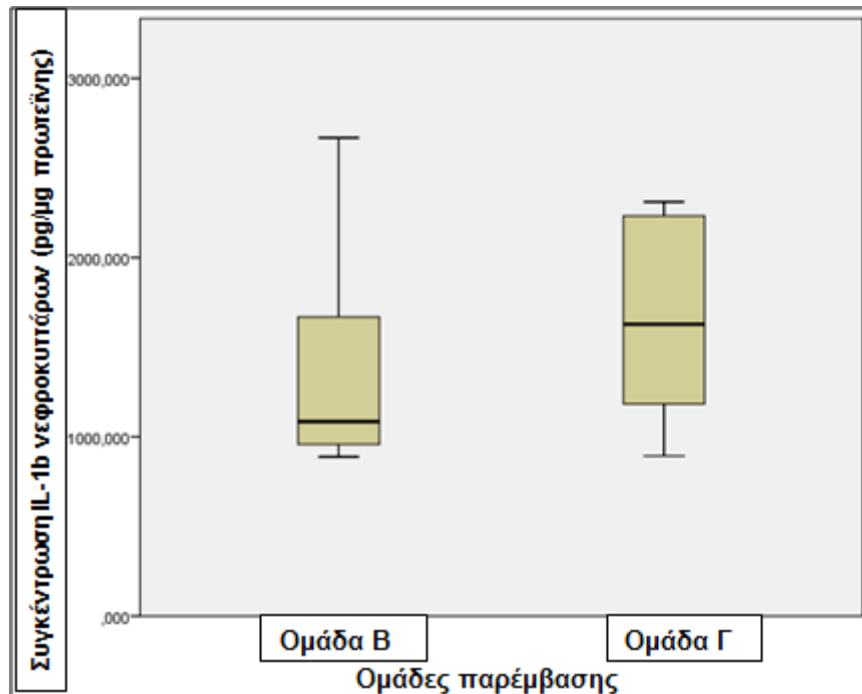
Δεν παρατηρήθηκε διαφορά στη συγκέντρωση του TNF-α στα νεφρικά κύτταρα των δύο διαφορετικών ομάδων, μετά τη διατροφική παρέμβαση (Σχήμα 40).



Σχήμα 41: Συγκέντρωση του CRP στα νεφροκύτταρα των πειραματόζων που ανήκαν στις ομάδες αναστολής της αθηρωμάτωσης.

Τα αποτελέσματα είναι εκφρασμένα σε ng/μg πρωτεΐνης. Ομάδα Β: ΑΔ+ γιαούρτι με ΥΑΕ, Ομάδα Γ: ΑΔ+ απλό γιαούρτι.

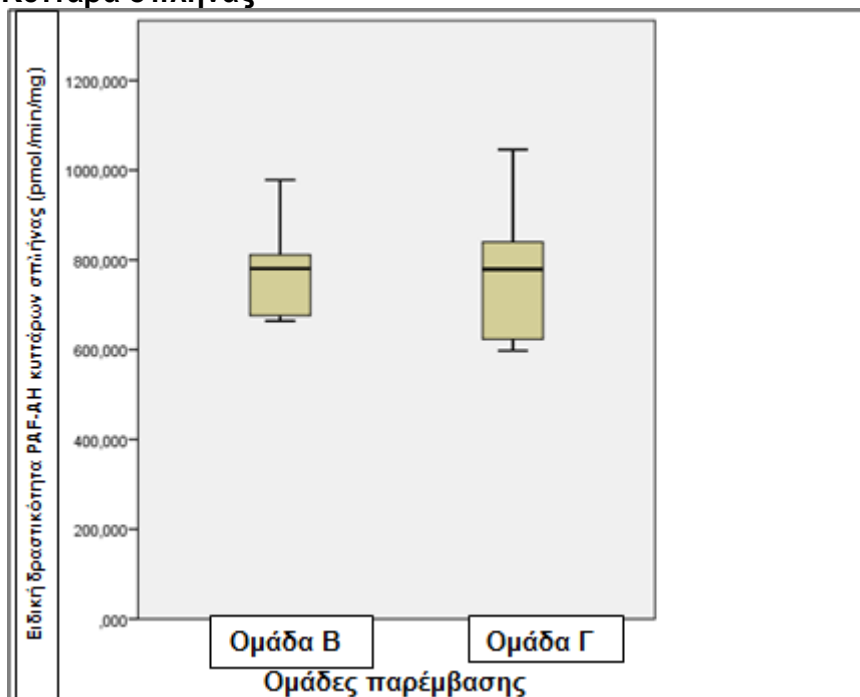
Δεν παρατηρήθηκε διαφορά στη συγκέντρωση του CRP στα νεφρικά κύτταρα των δύο διαφορετικών ομάδων, μετά τη διατροφική παρέμβαση (Σχήμα 41).



Σχήμα 42: Συγκέντρωση της IL-1b στα νεφροκύτταρα των πειραματόζων που ανήκαν στις ομάδες αναστολής της αθηρωμάτωσης. Τα αποτελέσματα είναι εκφρασμένα σε ng/μg πρωτεΐνης. Ομάδα Β: ΑΔ+ γιαούρτι με ΥΑΕ, Ομάδα Γ: ΑΔ+ απλό γιαούρτι.

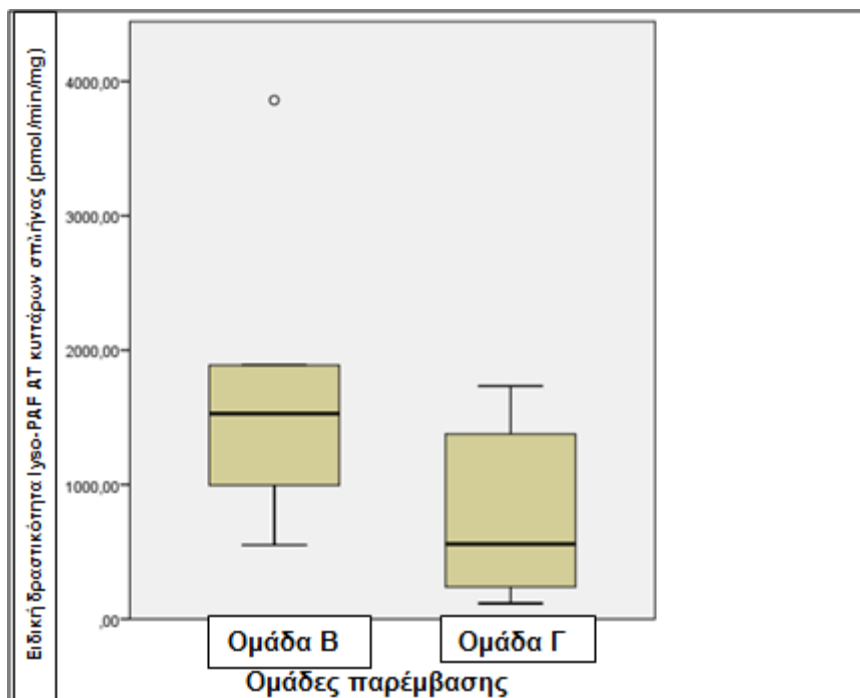
Δεν παρατηρήθηκε διαφορά στη συγκέντρωση της IL-1b στα νεφρικά κύτταρα των δύο διαφορετικών ομάδων, μετά τη διατροφική παρέμβαση (Σχήμα 42).

5.6.3.6 Κύτταρα σπλήνας



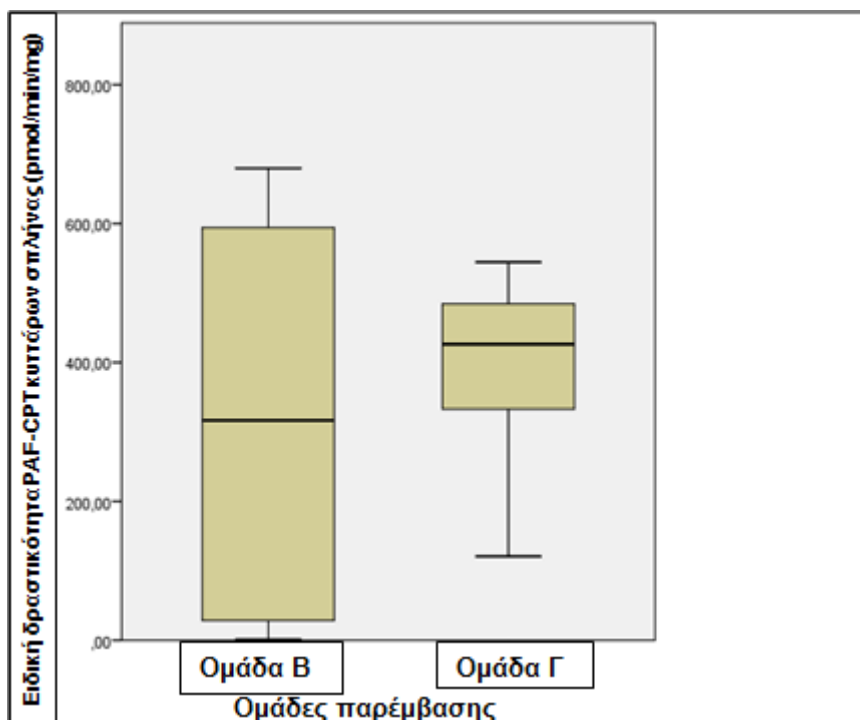
Σχήμα 43: Ειδική δραστηριότητα της PAF-AH στα κύτταρα σπλήνας των πειραματόζων που ανήκαν στις ομάδες αναστολής της αθηρωμάτωσης. Τα αποτελέσματα είναι εκφρασμένα σε pmol οξικού /min/mg. Ομάδα Β: ΑΔ+ γιαούρτι με ΥΑΕ, Ομάδα Γ: ΑΔ+ απλό γιαούρτι.

Δεν παρατηρήθηκε διαφορά στη δραστηριότητα της ενδοκυτταρικής PAF-AH στα κύτταρα σπλήνας των δύο διαφορετικών ομάδων, μετά τη διατροφική παρέμβαση (Σχήμα 43).



Σχήμα 44: Ειδική δραστηριότητα της lyso-PAF AT στα κύτταρα σπλήνας των πειραματόζων που ανήκαν στις ομάδες αναστολής της αθηρωμάτωσης. Τα αποτελέσματα είναι εκφρασμένα σε pmol PAF/min/mg. Ομάδα Β: ΑΔ+ γιαούρτι με ΥΑΕ, Ομάδα Γ: ΑΔ+ απλό γιαούρτι.

Δεν παρατηρήθηκε διαφορά στη δραστηριότητα της lyso-PAF-AH στα κύτταρα σπλήνας των δύο διαφορετικών ομάδων, μετά τη διατροφική παρέμβαση (Σχήμα 44).



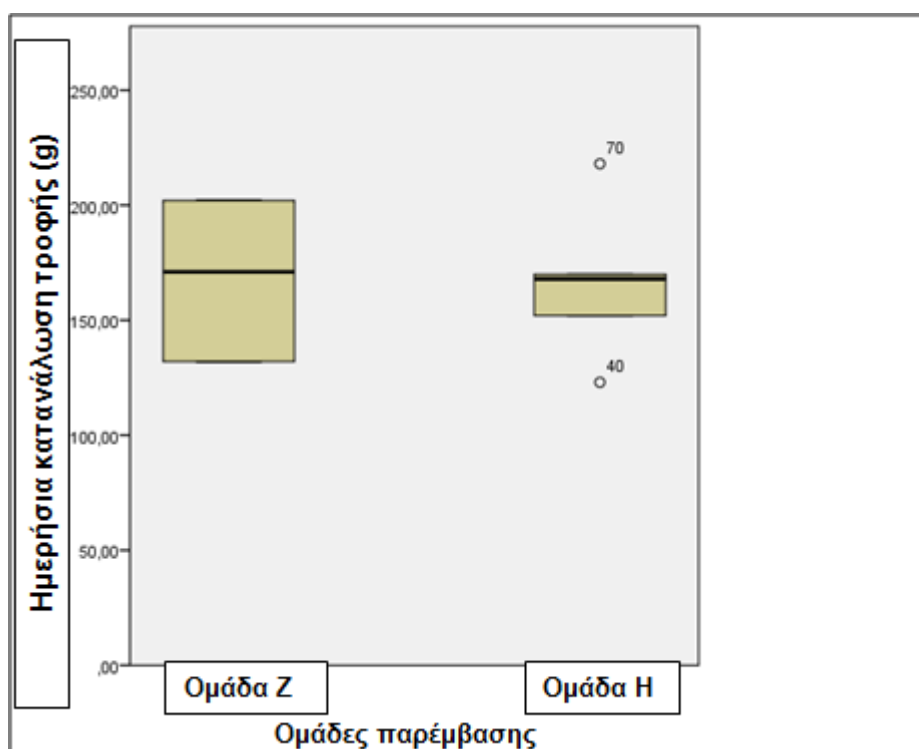
Σχήμα 45: Ειδική δραστηριότητα της PAF-CPT στα κύτταρα σπλήνας των πειραματόζων που ανήκαν στις ομάδες αναστολής της αθηρωμάτωσης.

Τα αποτελέσματα είναι εκφρασμένα σε $\mu\text{mol PAF}/\text{min}/\text{mg}$. Ομάδα Β: ΑΔ+ γιαούρτι με ΥΑΕ, Ομάδα Γ: ΑΔ+ απλό γιαούρτι.

Δεν παρατηρήθηκε διαφορά στη δραστικότητα της lyso-PAF-AH στα κύτταρα σπλήνας των δύο διαφορετικών ομάδων, μετά τη διατροφική παρέμβαση (Σχήμα 45).

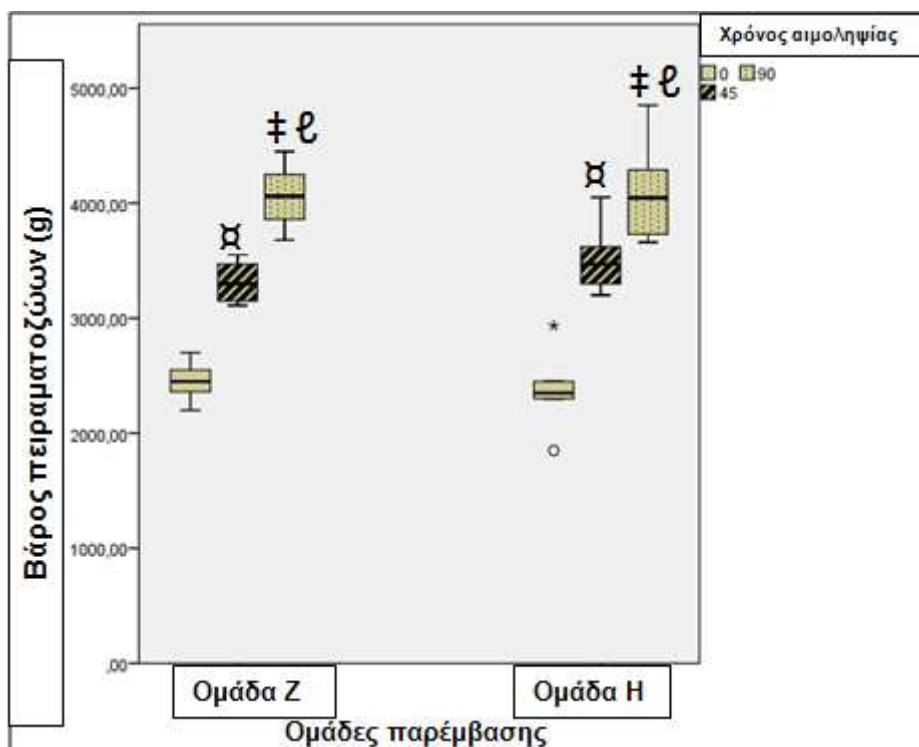
5.7 Υποστροφή αθηρωματικών πλακών

Όπως και στο προηγούμενο πείραμα τα πειραματόζωα δεν εμφάνισαν καμία δυσκολία στην πρόσληψη τροφής. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στο ακόλουθο σχήμα.



Σχήμα 46: Η ημερήσια κατανάλωση τροφής από τα πειραματόζωα που ανήκαν στις ομάδες υποστροφής των αθηρωματικών πλακών. Τα αποτελέσματα είναι εκφρασμένα σε g. Ομάδα Ζ: TK+ γιαούρτι με ΥΑΕ, Ομάδα Η: TK+ απλό γιαούρτι.

Δεν εμφανίζεται διαφοροποίηση στην πρόσληψη τροφής μεταξύ των 2 ομάδων (Σχήμα 46).



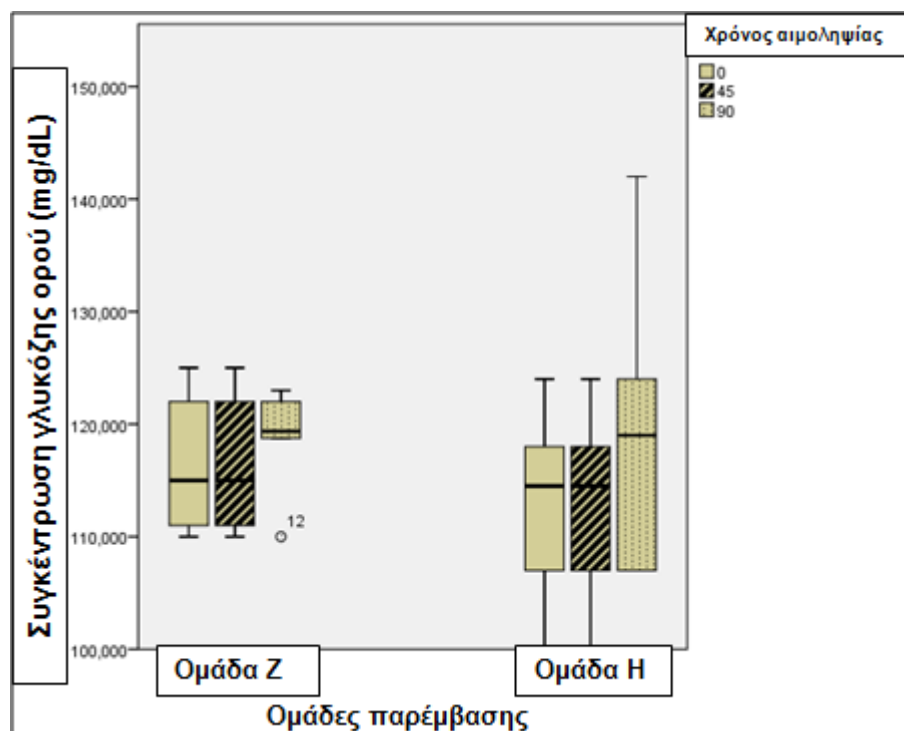
Σχήμα 47: Το βάρος των πειραματόζωων που ανήκαν στις ομάδες υποστροφής των αθηρωματικών πλακών.

Τα αποτελέσματα είναι εκφρασμένα σε g. Ομάδα Z: TK+ γιαούρτι με ΥΑΕ, Ομάδα H: TK+ απλό γιαούρτι. α: Σημαντική διαφορά μεταξύ 0 και 45 ημερών, εντός της ίδιας ομάδας ($p < 0,05$), ‡: Σημαντική διαφορά μεταξύ 45 και 90 ημερών, εντός της ίδιας ομάδας ($p < 0,05$), ℓ: Σημαντική διαφορά μεταξύ 0 και 90 ημερών, εντός της ίδιας ομάδας ($p < 0,05$).

Τα πειραματόζωα και των δύο ομάδων συνέχισαν να αναπτύσσονται κανονικά καθώς συνέχισε να αυξάνεται το σωματικό βάρος τους σημαντικά καθ' όλη τη διάρκεια της παρέμβασης, ανεξάρτητα των διαφορετικών μειγμάτων τροφής. Δεν παρατηρήθηκε διαφοροποίηση μεταξύ των δύο διαφορετικών ομάδων (Σχήμα 47).

5.7.1 Αιματολογικές αναλύσεις πειραματόζωων

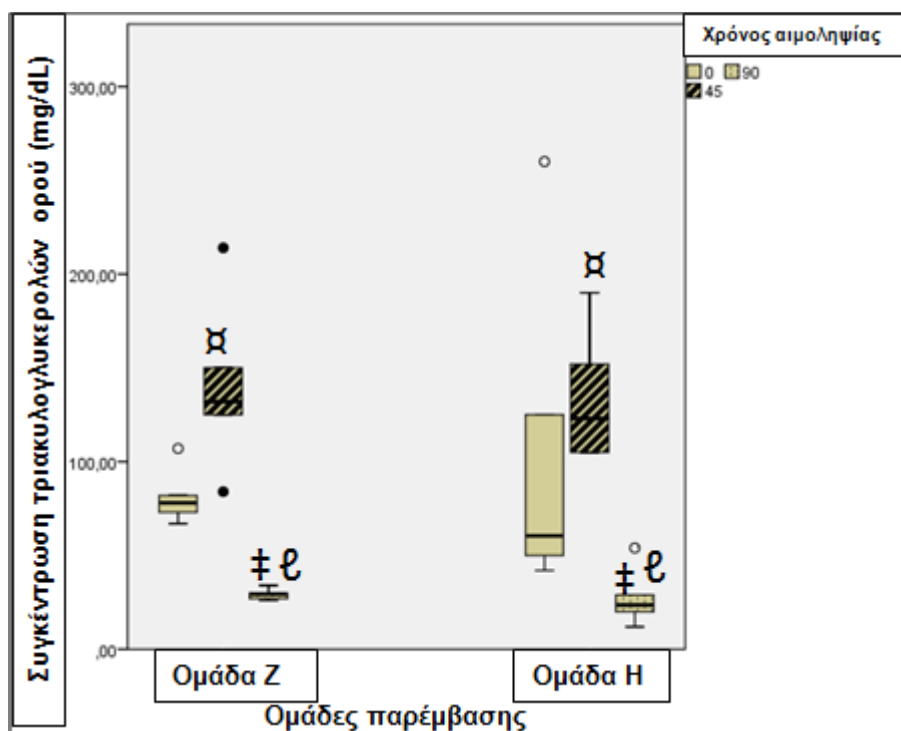
Οι βιοχημικές αναλύσεις αίματος των πειραματόζωων παρουσιάζονται στα σχήματα που ακολουθούν.



Σχήμα 48: Η γλυκόζη ορού των πειραματόζων που ανήκαν στις ομάδες υποστροφής των αθηρωματικών πλακών.

Τα αποτελέσματα είναι εκφρασμένα σε mg γλυκόζης/dL ορού. Ομάδα Z: TK+ γιαούρτι με ΥΑΕ, Ομάδα Η: TK+ απλό γιαούρτι.

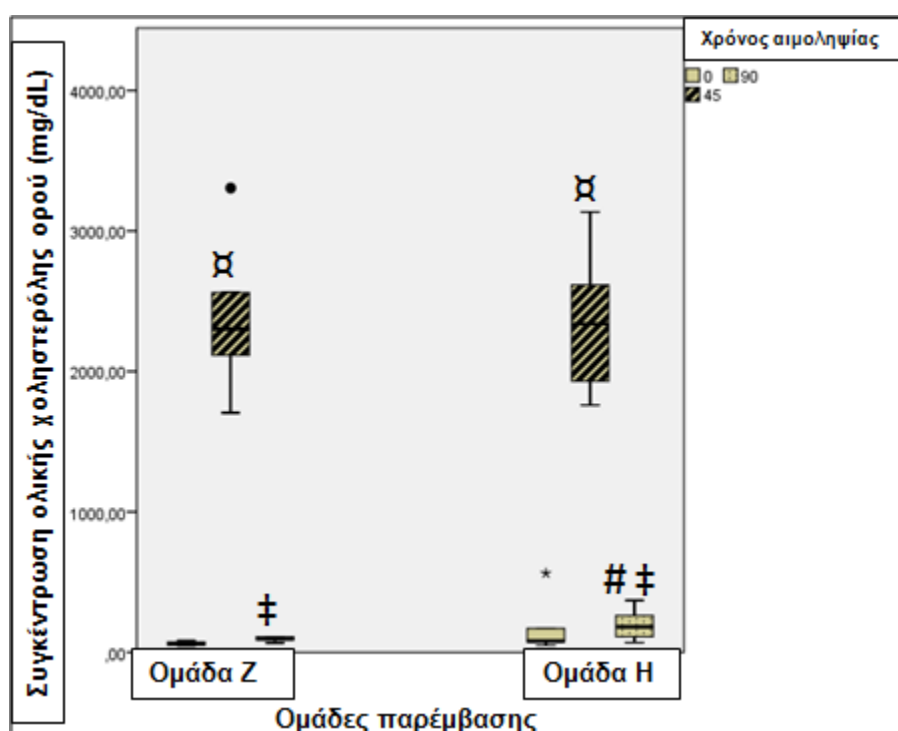
Δεν παρατηρείται διαφορά μεταξύ των ομάδων ως προς τη συγκέντρωση σακχάρων στον ορό τους (Σχήμα 48).



Σχήμα 49: Η συγκέντρωση τριακυλογλυκερολών ορού των πειραματόζων που ανήκαν στις ομάδες υποστροφής των αθηρωματικών πλακών.

Τα αποτελέσματα είναι εκφρασμένα σε mg τριακυλογλυκερολών/dL ορού. Ομάδα Z: TK+ γιαούρτι με ΥΑΕ, Ομάδα H: TK+ απλό γιαούρτι. α: Σημαντική διαφορά μεταξύ 0 και 45 ημερών, εντός της ίδιας ομάδας ($p<0,05$), ‡: Σημαντική διαφορά μεταξύ 45 και 90 ημερών, εντός της ίδιας ομάδας ($p<0,05$), †: Σημαντική διαφορά μεταξύ 0 και 90 ημερών, εντός της ίδιας ομάδας ($p<0,05$).

Η χορήγηση χοληστερόλης αυξάνει σημαντικά τη συγκέντρωση των τριακυλογλυκερολών και στις 2 ομάδες στις 45 ημέρες. Είναι φανερό πώς η διακοπή της ΑΔ και η αντικατάσταση της από TK με γιαούρτι εμπλουτισμένου ή μη μείωσε σημαντικά τη συγκέντρωση των τριακυλογλυκερολών τόσο σε σχέση με τις 45 αλλά και με το χρόνο 0 (Σχήμα 49).

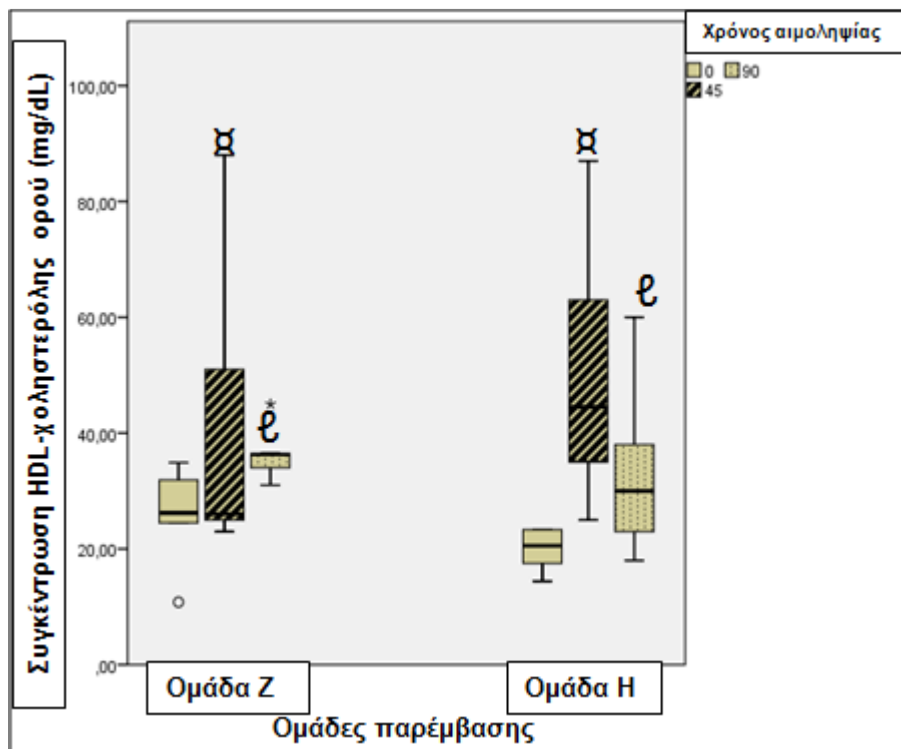


Σχήμα 50: Η συγκέντρωση ολικής χοληστερόλης ορού των πειραματόζωων που ανήκαν στις ομάδες υποστροφής των αθηρωματικών πλακών.

Τα αποτελέσματα είναι εκφρασμένα σε mg χοληστερόλης/dL ορού. Ομάδα Z: TK+ γιαούρτι με ΥΑΕ, Ομάδα H: TK+ απλό γιαούρτι. #: Σημαντική διαφορά από Ομάδα Z ($p<0,05$), α: Σημαντική διαφορά μεταξύ 0 και 45 ημερών, εντός της ίδιας ομάδας ($p<0,05$), ‡: Σημαντική διαφορά μεταξύ 45 και 90 ημερών, εντός της ίδιας ομάδας ($p<0,05$).

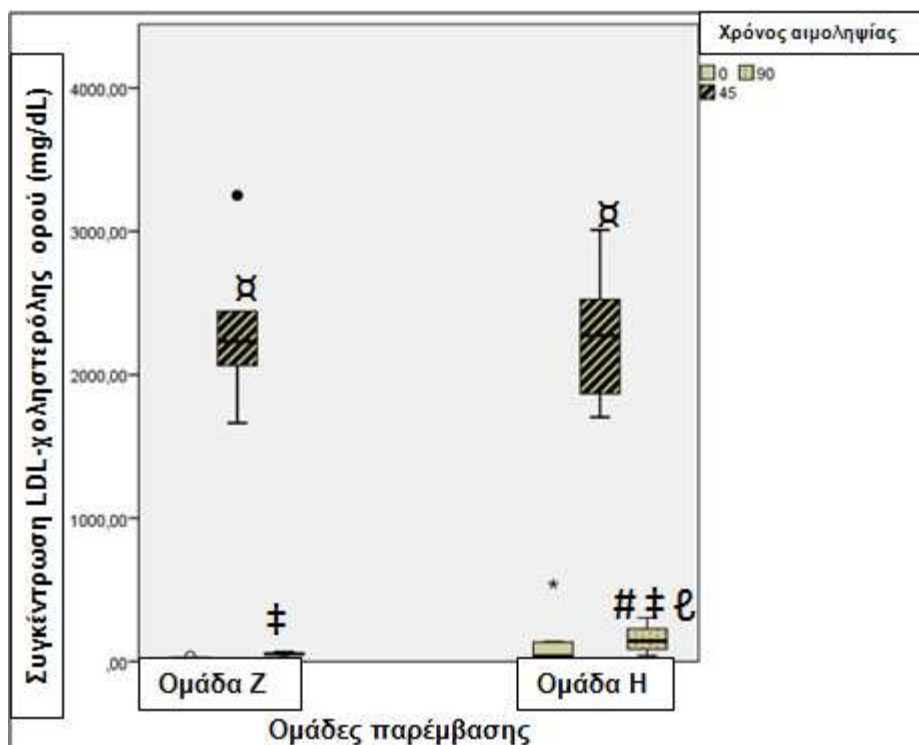
Η παρέμβαση στα πειραματόζωα με χοληστερόλη αύξησε σημαντικά τη συγκέντρωση της χοληστερόλης ορού, όπως ήταν αναμενόμενο. Η αντικατάσταση της ΑΔ με TK και γιαούρτι μείωσε σημαντικά τη συγκέντρωση της ολικής χοληστερόλης, επαναφέροντάς την στα βασικά επίπεδα των πειραματόζωων πριν την έναρξη της παρέμβασης στο χρόνο 0. Επιπλέον η

Ομάδα Z που τράφηκε με TK +γιαούρτι με ΥΑΕ είχε σημαντικά χαμηλότερες συγκεντρώσεις από την Ομάδα Η που τράφηκε με TK+ απλό γιαούρτι (Σχήμα 50).



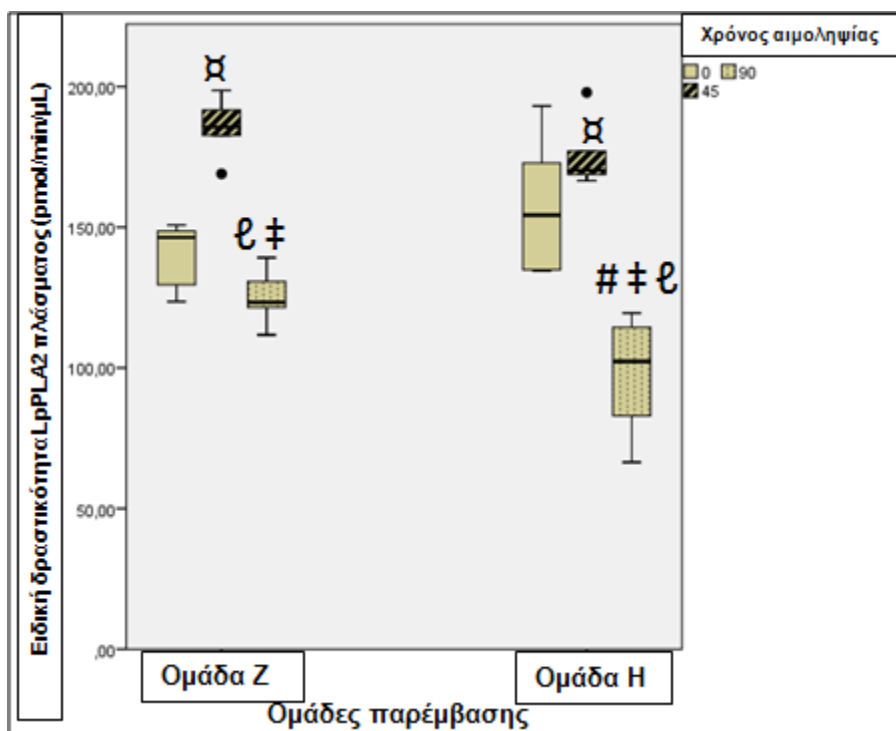
Σχήμα 51: Η συγκέντρωση HDL-χοληστερόλης ορού των πειραματόζωων που ανήκαν στις ομάδες υποστροφής των αθηρωματικών πλακών. Τα αποτελέσματα είναι εκφρασμένα σε mg HDL-χοληστερόλης/dL ορού. Ομάδα Z: TK+ γιαούρτι με ΥΑΕ, Ομάδα Η: TK+ απλό γιαούρτι. α: Σημαντική διαφορά μεταξύ 0 και 45 ημερών, εντός της ίδιας ομάδας ($p < 0,05$), ε: Σημαντική διαφορά μεταξύ 0 και 90 ημερών, εντός της ίδιας ομάδας ($p < 0,05$).

Η χορήγηση ΑΔ επέφερε αύξηση της συγκέντρωσης της HDL-χοληστερόλης και στις δύο ομάδες της παρέμβασης. Η αντικατάσταση της ΑΔ με TK και γιαούρτι απλό και εμπλουτισμένο με ΥΑΕ στις 45 ημέρες δεν επέφερε καμία αλλαγή στη συγκέντρωση της HDL-χοληστερόλης τους ενώ οι δύο ομάδες δεν διαφοροποιήθηκαν μεταξύ τους, ενώ παρέμειναν σημαντικά μεγαλύτερες από τις αντίστοιχες μετρήσεις τους στο χρόνο 0 (Σχήμα 51).



Σχήμα 52: Η συγκέντρωση της LDL-χοληστερόλης ορού των πειραματόζων που ανήκαν στις ομάδες υποστροφής των αθηρωματικών πλακών. Τα αποτελέσματα είναι εκφρασμένα σε mg LDL-χοληστερόλης/dL ορού. Ομάδα Z: TK+ γιαούρτι με ΥΑΕ, Ομάδα H: TK+ απλό γιαούρτι. #: Σημαντική διαφορά από Ομάδα Z ($p < 0,05$). α: Σημαντική διαφορά μεταξύ 0 και 45 ημερών, εντός της ίδιας ομάδας ($p < 0,05$), ‡: Σημαντική διαφορά μεταξύ 45 και 90 ημερών, εντός της ίδιας ομάδας ($p < 0,05$), ε: Σημαντική διαφορά μεταξύ 0 και 90 ημερών, εντός της ίδιας ομάδας ($p < 0,05$).

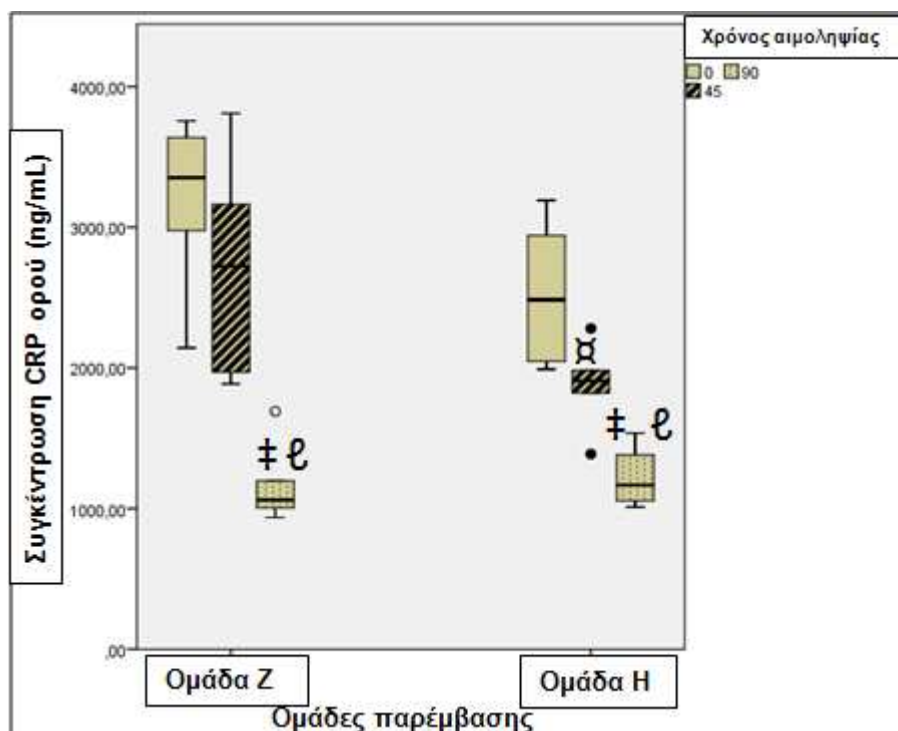
Η επίδραση της διαίτας στην LDL-χοληστερόλη ήταν αντίστοιχη αυτής που παρατηρήθηκε στην ολική χοληστερόλη. Δηλαδή η ΑΔ αύξησε σημαντικά τη συγκέντρωση της HDL- χοληστερόλης στις 45 ημέρες και στις δύο ομάδες, χωρίς αυτές να διαφοροποιούνται μεταξύ τους. Η αντικατάσταση της ΑΔ με TK και γιαούρτι μείωσε σημαντικά τη συγκέντρωση της LDL-χοληστερόλης, και στις δύο ομάδες. Τα πειραματόζωα της Ομάδας Z επανήλθαν στις συγκεντρώσεις πριν την παρέμβαση, ενώ η Ομάδα H είχε σημαντικά μεγαλύτερες συγκεντρώσεις από τις αντίστοιχες στο χρόνο 0, ενώ ήταν σημαντικά μεγαλύτερες και από τις αντίστοιχες της Ομάδας Z (Σχήμα 52).



Σχήμα 53: Ειδική δραστηριότητα της Lp-PLA₂ στο πλάσμα των πειραματόζων που ανήκαν στις ομάδες υποστροφής των αθηρωματικών.

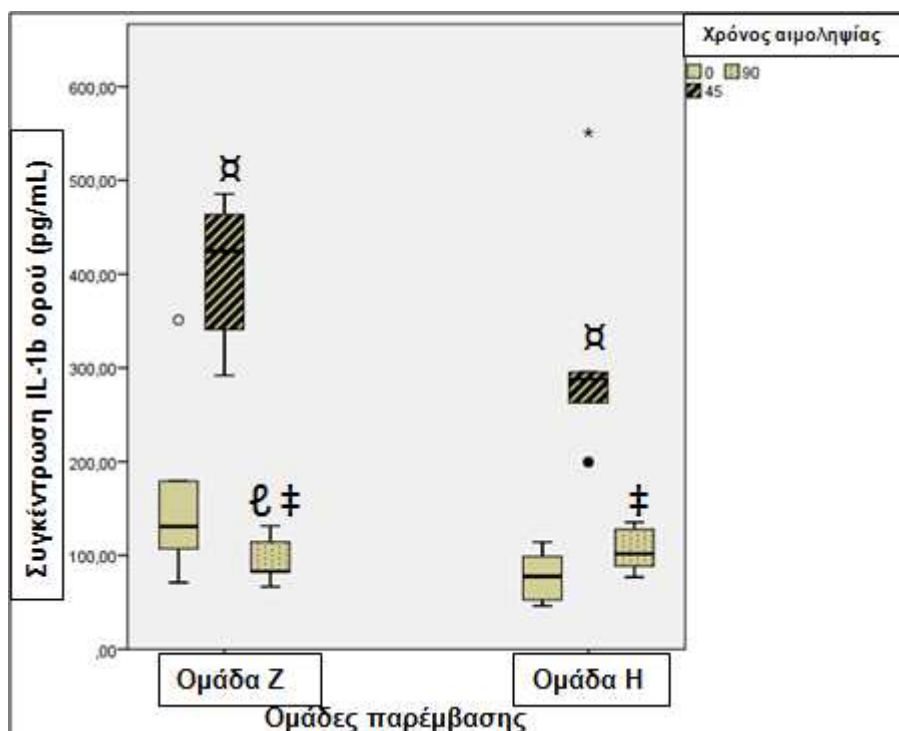
Τα αποτελέσματα είναι εκφρασμένα σε pmol οξικού/min/μL ορού. Ομάδα Z: TK+ γιαούρτι με ΥΑΕ, Ομάδα H: TK+ απλό γιαούρτι. #: Σημαντική διαφορά από Ομάδα Z ($p < 0,05$). α: Σημαντική διαφορά μεταξύ 0 και 45 ημερών, εντός της ίδιας ομάδας ($p < 0,05$), β: Σημαντική διαφορά μεταξύ 45 και 90 ημερών, εντός της ίδιας ομάδας ($p < 0,05$), ε: Σημαντική διαφορά μεταξύ 0 και 90 ημερών, εντός της ίδιας ομάδας ($p < 0,05$).

Η δραστηριότητα της Lp-PLA₂ αυξάνεται σημαντικά μετά την παρέμβαση με χοληστερόλη και στις 2 ομάδες της παρέμβασης σε σχέση με τις αρχικές τους τιμές στο χρόνο 0. Η παρέμβαση με γιαούρτι μείωσε σημαντικά τη δραστηριότητα της Lp-PLA₂ και στις δύο ομάδες σε σχέση με τις τιμές τους στις 45 ημέρες, αλλά και με τις αρχικές τιμές στο χρόνο 0. Επιπλέον η ειδική δραστηριότητα της Lp-PLA₂ στην Ομάδα Z ήταν σημαντικά μεγαλύτερη από αυτήν της Ομάδας H στις 90 ημέρες (Σχήμα 53).



Σχήμα 54: Η συγκέντρωση του CRP στον ορό των πειραματόζων που ανήκαν στις ομάδες υποτροφής των αθηρωματικών πλακών. Τα αποτελέσματα είναι εκφρασμένα σε ng CRP/mL ορού. Ομάδα Z: TK+ γιαούρτι με ΥΑΕ, Ομάδα H: TK+ απλό γιαούρτι. α: Σημαντική διαφορά μεταξύ 0 και 45 ημερών, εντός της ίδιας ομάδας ($p < 0,05$), ‡: Σημαντική διαφορά μεταξύ 45 και 90 ημερών, εντός της ίδιας ομάδας ($p < 0,05$), ℓ: Σημαντική διαφορά μεταξύ 0 και 90 ημερών, εντός της ίδιας ομάδας ($p < 0,05$).

Η συγκέντρωση του CRP στον ορό των πειραματόζων εμφανίζει ενδιαφέρον καθώς και σε αυτή την παρέμβαση υπάρχει σημαντική μείωση της συγκέντρωσης του ανεξαρτήτως δίαιτας. Συγκεκριμένα η χορήγηση χοληστερόλης μείωσε τη συγκέντρωση του CRP αλλά σημαντική μείωση παρατηρήθηκε μόνο στην περίπτωση της Ομάδας H, ενώ η χορήγηση γιαουρτιού μείωσε περαιτέρω τη συγκέντρωσή του σημαντικά σε σχέση με τις τιμές στις 0 και 45 ημέρες. Δηλαδή τα πειραματόζωα έχουν μικρότερη φλεγμονώδη απόκριση, επομένως και μικρότερη πιθανότητα εμφάνισης αθηρωματικής νόσου, όταν στην τροφή τους προστέθηκε γιαούρτι (Σχήμα 54).



Σχήμα 55: Η συγκέντρωση της IL-1b στον ορό των πειραματόζων που ανήκαν στις ομάδες υποστροφής των αθηρωματικών.

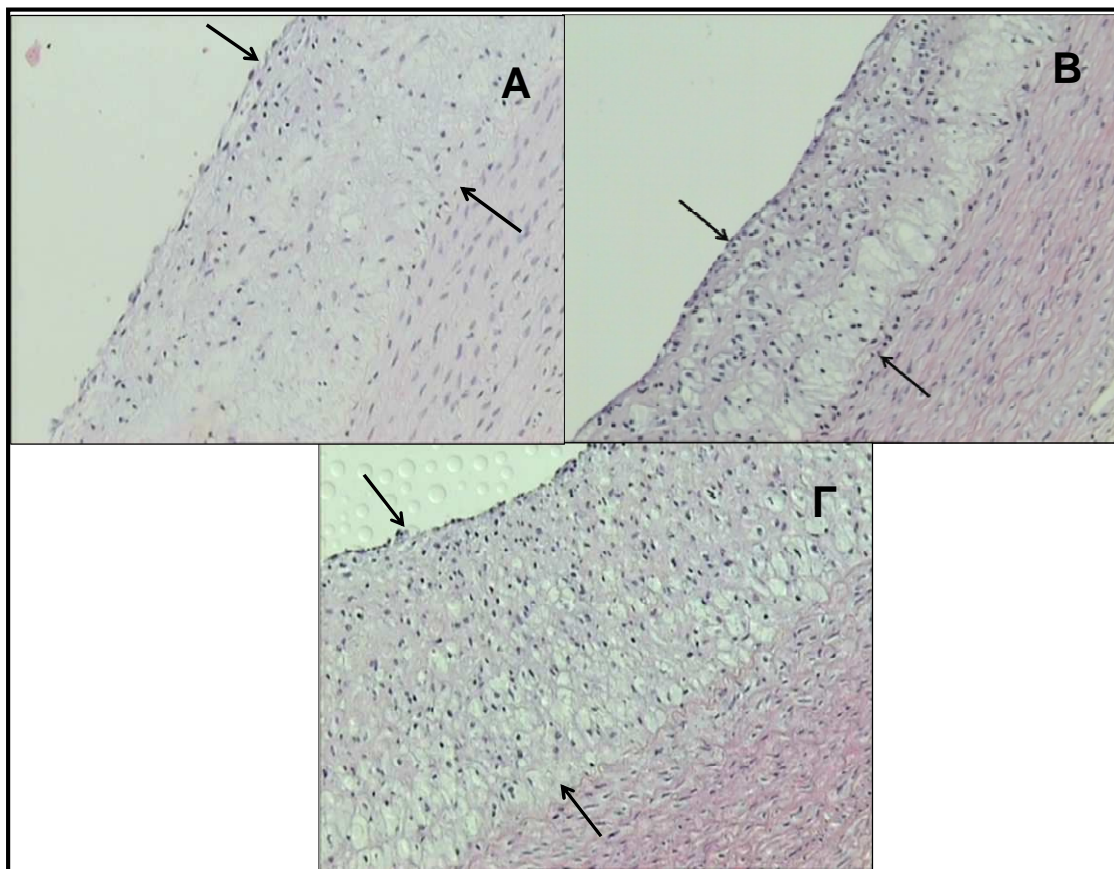
Τα αποτελέσματα είναι εκφρασμένα σε pg IL-1b/mL ορού. Ομάδα Z: TK+ γιαούρτι με ΥΑΕ, Ομάδα H: TK+ απλό γιαούρτι. α: Σημαντική διαφορά μεταξύ 0 και 45 ημερών, εντός της ίδιας ομάδας ($p < 0,05$), ‡: Σημαντική διαφορά μεταξύ 45 και 90 ημερών, εντός της ίδιας ομάδας ($p < 0,05$), ℓ: Σημαντική διαφορά μεταξύ 0 και 90 ημερών, εντός της ίδιας ομάδας ($p < 0,05$).

Η διατροφική παρέμβαση με χοληστερόλη αύξησε τη συγκέντρωση της IL-1b στον ορό των πειραματόζων και των δύο ομάδων. Η χορήγηση γιαουρτιού μείωσε σημαντικά τη συγκέντρωση της IL-b και στις δύο ομάδες πειραματόζων, επιπλέον στην περίπτωση της Ομάδας Z οι τιμές της ήταν μικρότερες ακόμα και από τις αρχικές τιμές της Ομάδας στο χρόνο 0 (Σχήμα 55).

5.7.2 Αθηρωματική βλάβη

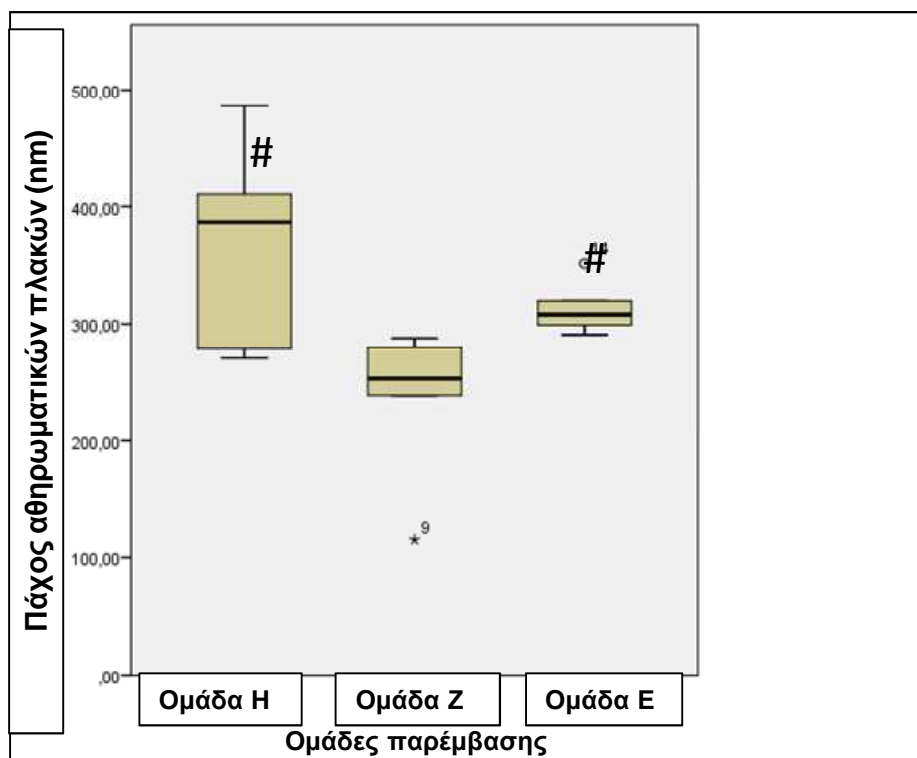
Μετά την ευθανασία στα πειραματόζωα μετρήθηκε το μέγιστο πάχος των αθηρωματικών πλακών αλλά και το μέσο πάχος (βλάβη) των αθηρωματικών πλακών, σύμφωνα με τη διαδικασία που περιγράφεται στις μεθόδους. Στην Εικόνα 13 που ακολουθεί παρουσιάζονται φωτογραφίες από οπτικό μικροσκόπιο αθηρωματικών πλακών από όλες τις ομάδες παρέμβασης. Οι φωτογραφίες αντιστοιχούν στις μέσες τιμές των δύο παραμέτρων που μετρήθηκαν, δηλαδή το μέγιστο και το μέσο πάχος του αγγείου, από όλα τα

αγγεία όλων των πειραματόζων, ώστε να οπτικοποιηθούν τα αριθμητικά αποτελέσματα που παρουσιάζονται σε ακόλουθα σχήματα.

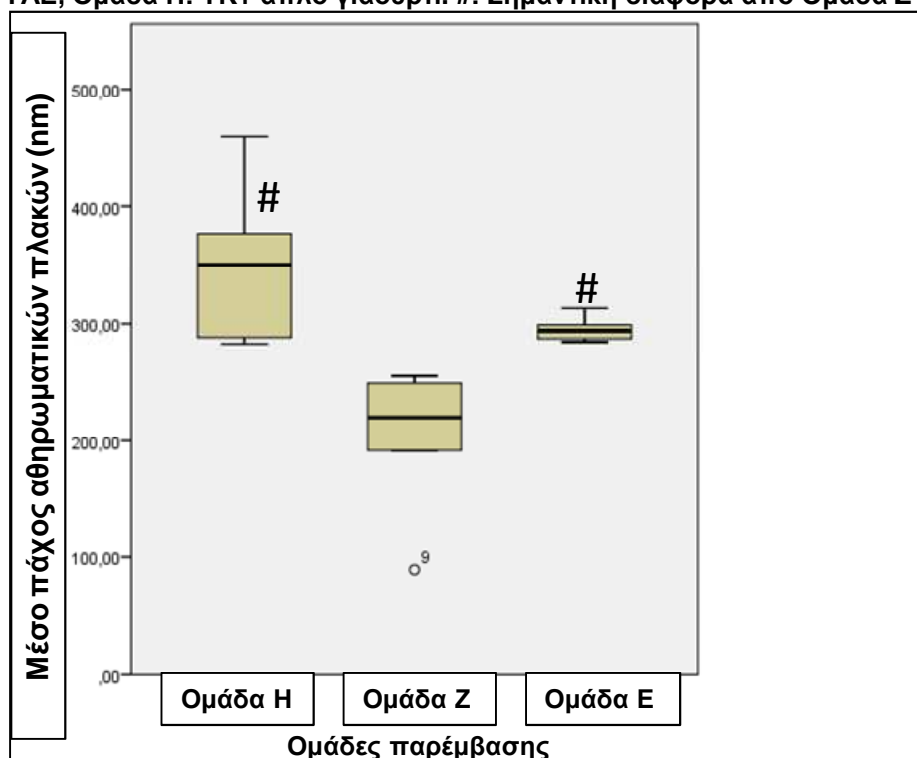


Εικόνα 13: Χαρακτηριστικές φωτογραφίες αγγείων από οπτικό μικροσκόπιο ύστερα από χρώση των πειραματοζών που ανήκουν στις ομάδες υποστροφής των αθηρωματικών πλακών.

A: Φωτογραφία πειραματόζου της Ομάδας E (TK), **B:** Φωτογραφία πειραματόζου της Ομάδας Z (TK +γιαούρτι με ΥΑΕ) και **Γ:** Φωτογραφία πειραματόζου της Ομάδας H (TK+ απλό γιαούρτι).



Σχήμα 56: Το μέγιστο πάχος των αθηρωματικών πλακών των πειραματόζων που ανήκαν στις ομάδες υποστροφής των αθηρωματικών πλακών. Τα αποτελέσματα είναι εκφρασμένα σε nm. Ομάδα E: TK, Ομάδα Z: TK+ γιαούρτι με ΥΑΕ, Ομάδα H: TK+ απλό γιαούρτι. #: Σημαντική διαφορά από Ομάδα Z ($p < 0,05$).

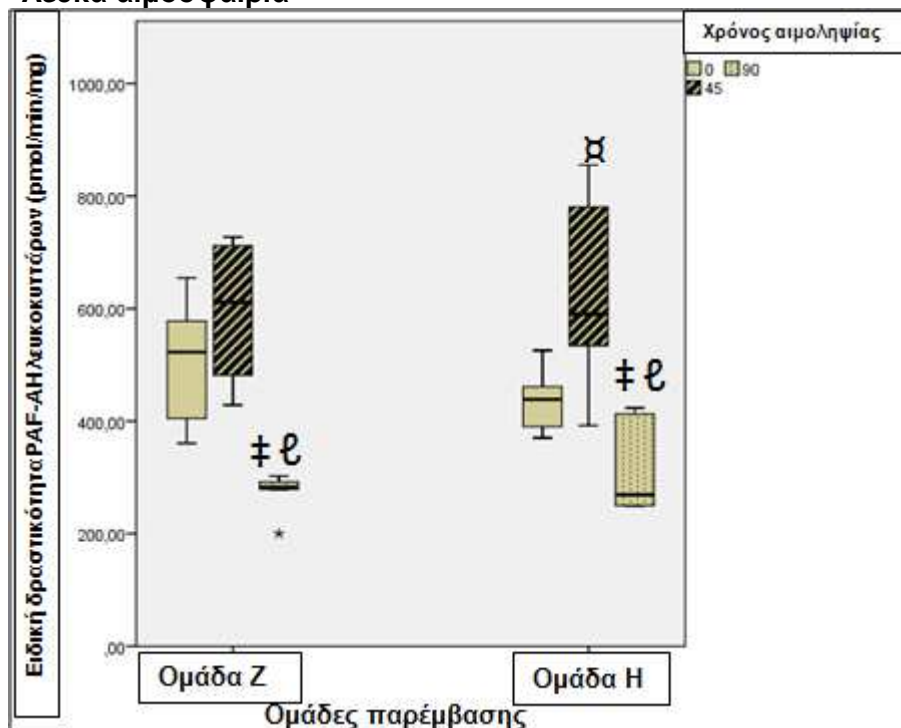


Σχήμα 57: Το μέσο πάχος (βλάβη) των αθηρωματικών πλακών των πειραματόζων που ανήκαν στις ομάδες υποστροφής των αθηρωματικών πλακών. Τα αποτελέσματα είναι εκφρασμένα σε nm. Ομάδα E: TK, Ομάδα Z: TK+ γιαούρτι με ΥΑΕ, Ομάδα H: TK+ απλό γιαούρτι. #: Σημαντική διαφορά από Ομάδα Z ($p < 0,05$).

Τα αποτελέσματα είναι και σε αυτή την περίπτωση συσχετιζόμενα, όπως συμβαίνει και στις μετρήσεις της αναστολής ανάπτυξης αθηρωματικών πλακών. Οι μετρήσεις συνηγορούν ότι υπάρχει σημαντική μείωση του μέγιστου πάχους αλλά και του μέσου πάχους (βλάβη αγγείου) στην ομάδα Z που τράφηκε με TK+ γιαούρτι εμπλουτισμένο με ΥΑΕ, σε σχέση με την Ομάδα E που αποτελούσε την Ομάδα ελέγχου και τράφηκε με TK, αλλά και με την Ομάδα H που τράφηκε με TK+ γιαούρτι εμπορίου. Δεν παρατηρήθηκε διαφορά μεταξύ των πειραματόζωων της Ομάδας H και της Ομάδας ελέγχου E (Σχήμα 56 & 57).

5.7.3 Αναλύσεις έμμορφων συστατικών του αίματος

5.7.3.1 Λευκά αιμοσφαίρια

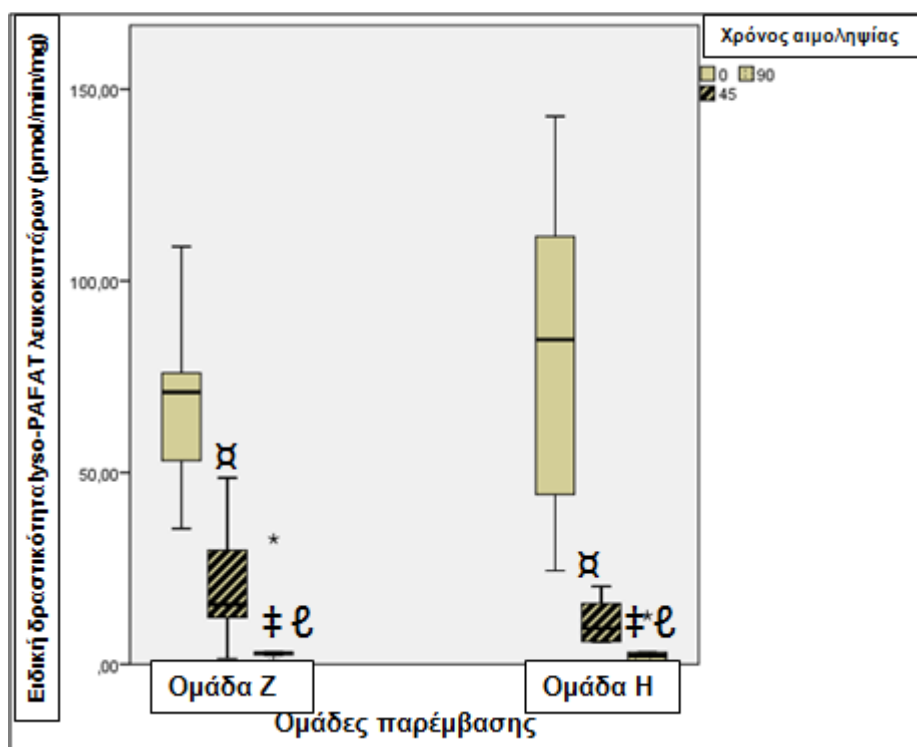


Σχήμα 58: Ειδική δραστηριότητα της ενδοκυτταρικής PAF-AH στα λευκά αιμοσφαίρια των πειραματόζωων που ανήκαν στις ομάδες υποστροφής των αθηρωματικών πλακών.

Τα αποτελέσματα είναι εκφρασμένα σε pmol οξικού/min/mg. Ομάδα Z: TK+ γιαούρτι με ΥΑΕ, Ομάδα H: TK+ απλό γιαούρτι. α: Σημαντική διαφορά μεταξύ 0 και 45 ημερών, εντός της ίδιας ομάδας ($p < 0,05$), ‡: Σημαντική διαφορά μεταξύ 45 και 90 ημερών, εντός της ίδιας ομάδας ($p < 0,05$), ℓ: Σημαντική διαφορά μεταξύ 0 και 90 ημερών, εντός της ίδιας ομάδας ($p < 0,05$).

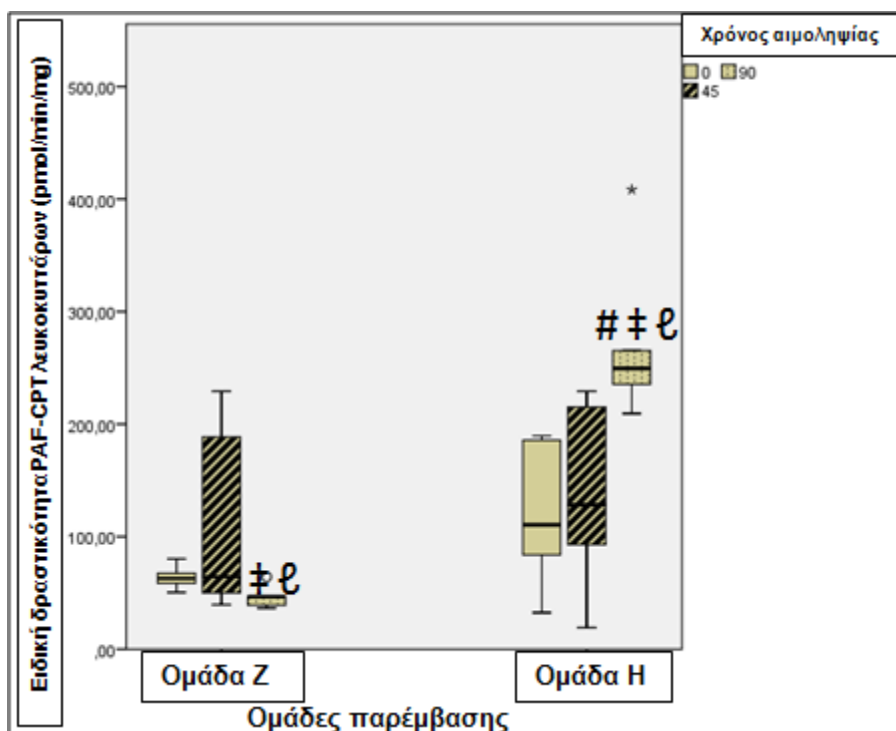
Η ειδική δραστηριότητα της ενδοκυτταρικής PAF-AH στα λευκά αιμοσφαίρια αυξάνεται, μετά το πέρας της παρέμβασης με χοληστερόλη, και στις δύο

ομάδες πειραματόζων αλλά μόνο στην ομάδα Η, η διαφορά αποκτά στατιστική σημαντικότητα. Η χορήγηση γιαουρτιού επέφερε μείωση της ειδικής δραστηριότητας και στις δύο ομάδες στις οποίες μάλιστα η δραστηριότητα ήταν σημαντικά μικρότερη από τις αντίστοιχες αρχικές τιμές στο χρόνο 0 (Σχήμα 58).



Σχήμα 59: Ειδική δραστηριότητα της lyso-PAF AT στα λευκά αιμοσφαίρια των πειραματόζων που ανήκαν στις ομάδες υποστροφής των αθηρωματικών πλακών. Τα αποτελέσματα είναι εκφρασμένα σε pmol PAF/min/mg. Ομάδα Ζ: TK+ γιαούρτι με ΥΑΕ, Ομάδα Η: TK+ απλό γιαούρτι. *: Σημαντική διαφορά μεταξύ 0 και 45 ημερών, εντός της ίδιας ομάδας ($p < 0,05$), ‡: Σημαντική διαφορά μεταξύ 45 και 90 ημερών, εντός της ίδιας ομάδας ($p < 0,05$), †: Σημαντική διαφορά μεταξύ 0 και 90 ημερών, εντός της ίδιας ομάδας ($p < 0,05$).

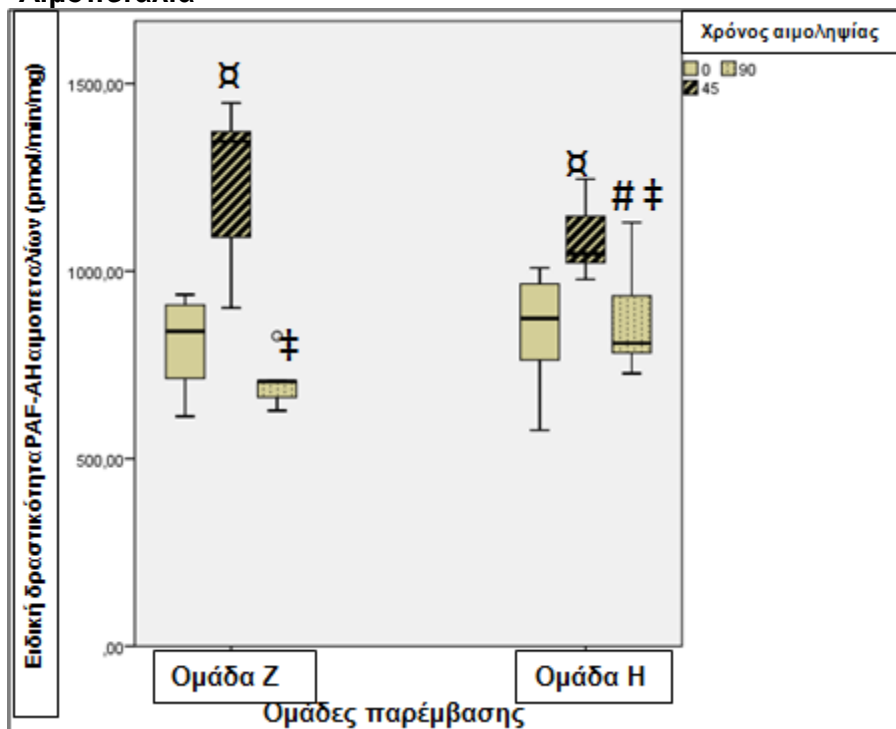
Η δραστηριότητα της lyso-PAF AT στα λευκοκύτταρα δείχνει σημαντική μείωση και στις δύο ομάδες, μετά το πέρας της παρέμβασης με χοληστερόλη, σε σχέση με τα βασικά επίπεδα τους στην έναρξη αυτής. Η ειδική δραστηριότητα μειώνεται επιπλέον μετά την παρέμβαση με τα γιαούρτια και στις δύο ομάδες. Δεν υπάρχει διαφορά μεταξύ των ομάδων σε καμία από τις χρονικές στιγμές (Σχήμα 59).



Σχήμα 60: Ειδική δραστηριότητα της PAF-CPT στα λευκά αιμοσφαίρια των πειραματόζωων που ανήκαν στις ομάδες υποστροφής των αθηρωματικών πλακών. Τα αποτελέσματα είναι εκφρασμένα σε pmol PAF/min/mg. Ομάδα Z: TK+ γιαούρτι με ΥΑΕ, Ομάδα H: TK+ απλό γιαούρτι. #: Σημαντική διαφορά από Ομάδα Z ($p < 0,05$), ‡: Σημαντική διαφορά μεταξύ 45 και 90 ημερών, εντός της ίδιας ομάδας ($p < 0,05$), ℓ: Σημαντική διαφορά μεταξύ 0 και 90 ημερών, εντός της ίδιας ομάδας ($p < 0,05$).

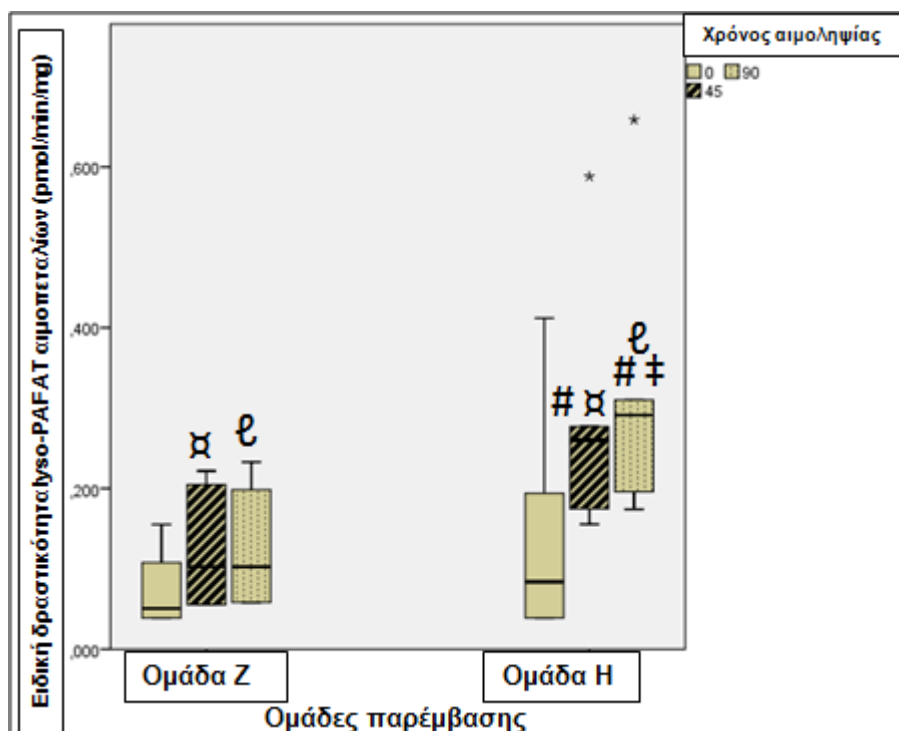
Η δραστηριότητα της PAF-CPT εμφανίζει μεγάλες διακυμάνσεις μεταξύ των ομάδων. Η χορήγηση χοληστερόλης δεν επηρέασε την ειδική δραστηριότητα του ενζύμου στις 45 ημέρες. Μετά το πέρας της παρέμβασης η ομάδα Z (TK+ γιαούρτι με ΥΑΕ) εμφανίζει σημαντική μείωση της ειδικής δραστηριότητας, σε σχέση με τις βασικές τιμές στο χρόνο 0. Αντίθετα η Ομάδα H εμφανίζει σημαντική αύξηση της δραστηριότητας της PAF-CPT σε σχέση με τις αρχικές τιμές της πριν την παρέμβαση, ενώ όπως είναι αναμενόμενο είναι σημαντικά μεγαλύτερη από τις αντίστοιχες τιμές της Ομάδας Z (Σχήμα 60).

5.7.3.2 Αιμοπετάλια



Σχήμα 61: Ειδική δραστικότητα της ενδοκυτταρικής PAF-AH στα αιμοπετάλια των πειραματόζων που ανήκαν στις ομάδες υποστροφής των αθηρωματικών πλακών. Τα αποτελέσματα είναι εκφρασμένα σε pmol οξικού/mi/min/mg. Ομάδα Z: TK+ γιαούρτι με ΥΑΕ, Ομάδα H: TK+ απλό γιαούρτι. #: Σημαντική διαφορά από Ομάδα Z ($p < 0,05$). #: Σημαντική διαφορά μεταξύ 0 και 45 ημερών, εντός της ίδιας ομάδας ($p < 0,05$), ‡: Σημαντική διαφορά μεταξύ 45 και 90 ημερών, εντός της ίδιας ομάδας ($p < 0,05$).

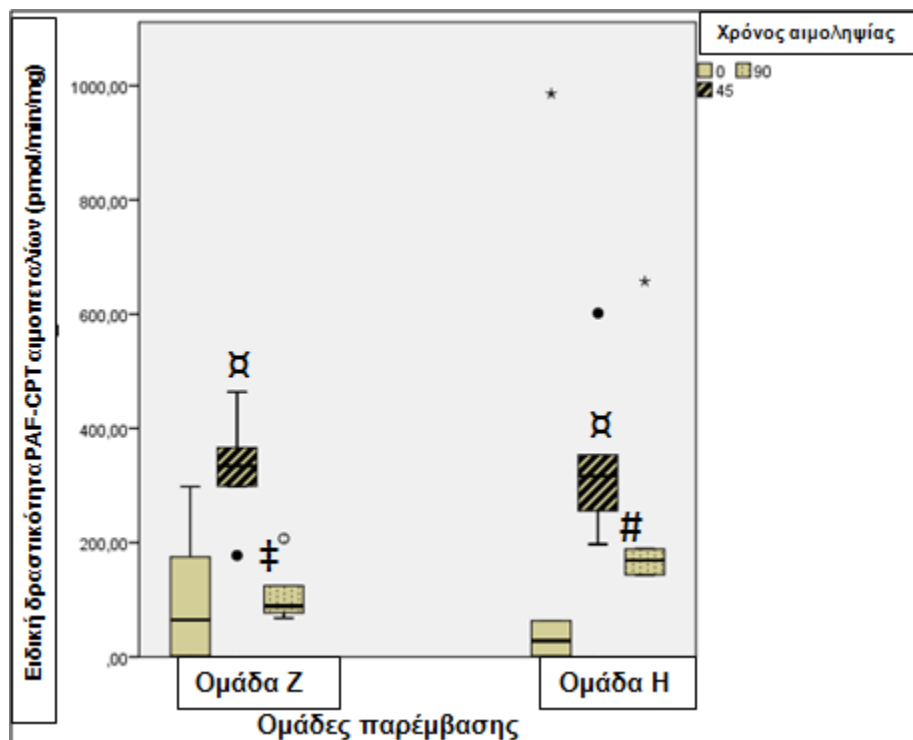
Η δραστικότητα της ενδοκυτταρικής PAF-AH αυξάνεται σημαντικά και στις δύο ομάδες στις 45 ημέρες ύστερα από τη χορήγηση χοληστερόλης. Η παρέμβαση με το γιαούρτι επέφερε σημαντική μείωσή της στο τέλος της παρέμβασης και στις δύο ομάδες πειραματόζων στις 45 ημέρες. Η δραστικότητα της Ομάδας H παρά τη μείωσή της στις 90 ημέρες παρέμεινε σημαντικά μεγαλύτερη από την αντίστοιχη δραστικότητα της Ομάδας Z (Σχήμα 61).



Σχήμα 62: Ειδική δραστηριότητα της lyso-PAF AT στα αιμοπετάλια των πειραματόζων που ανήκαν στις ομάδες υποστροφής των αθηρωματικών πλακών.

Τα αποτελέσματα είναι εκφρασμένα σε pmol PAF/min/mg. Ομάδα Z: TK+ γιαούρτι με ΥΑΕ, Ομάδα H: TK+ απλό γιαούρτι. #: Σημαντική διαφορά από Ομάδα Z ($p < 0,05$). α: Σημαντική διαφορά μεταξύ 0 και 45 ημερών, εντός της ίδιας ομάδας ($p < 0,05$). β: Σημαντική διαφορά μεταξύ 45 και 90 ημερών, εντός της ίδιας ομάδας ($p < 0,05$). ε: Σημαντική διαφορά μεταξύ 0 και 90 ημερών, εντός της ίδιας ομάδας ($p < 0,05$).

Η δραστηριότητα της lyso-PAF AT στα αιμοπετάλια εμφανίζει το παράδοξο του να διαφέρει σημαντικά μεταξύ των ομάδων μετά τη διατροφή τους με χοληστερόλη. Πιο συγκεκριμένα η ειδική δραστηριότητα της Lyso-PAF AT της Ομάδας H στις 45 ημέρες είναι σημαντικά μεγαλύτερη αυτή της Ομάδας Z. Αυτή η διαφοροποίηση δεν έχει κάποια φυσιολογική εξήγηση και μάλλον οφείλεται σε τυχαίο γεγονός. Μετά το πέρας της παρέμβασης με τα γιαούρτια η ειδική δραστηριότητα της Ομάδας Z δεν μεταβλήθηκε στις 45 ημέρες, ενώ αντίθετα η αντίστοιχη δραστηριότητα της Ομάδας H αυξήθηκε σημαντικά. Όπως είναι λογικό η ειδική δραστηριότητα της Ομάδας H στις 90 ημέρες είναι σημαντικά μεγαλύτερη από την αντίστοιχη της Ομάδας Z. Δηλαδή η αρχική διαφοροποίηση των ομάδων παρέμεινε και μετά την παρέμβαση, όμως η ειδική δραστηριότητα της Ομάδας H αυξήθηκε στις 45 ημέρες. Η ειδική δραστηριότητα των 90 ημερών ήταν σημαντικά μεγαλύτερη και στις δύο ομάδες σε σχέση με τα βασικά τους επίπεδα στο χρόνο 0 (Σχήμα 62).

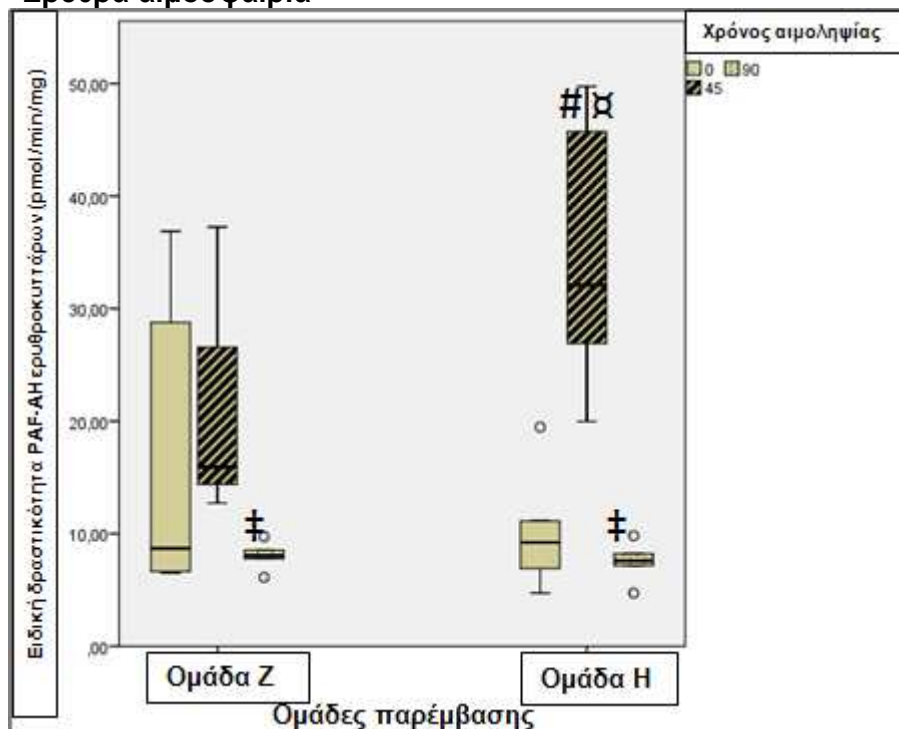


Σχήμα 63: Ειδική δραστηριότητα της PAF-CPT στα αιμοπετάλια των πειραματόζων που ανήκαν στις ομάδες υποστροφής των αθηρωματικών.

Τα αποτελέσματα είναι εκφρασμένα σε pmol PAF/min/mg. Ομάδα Z: TK+ γιαούρτι με ΥΑΕ, Ομάδα H: TK+ απλό γιαούρτι. #: Σημαντική διαφορά από Ομάδα Z ($p < 0,05$). #: Σημαντική διαφορά μεταξύ 0 και 45 ημερών, εντός της ίδιας ομάδας ($p < 0,05$), ‡: Σημαντική διαφορά μεταξύ 45 και 90 ημερών, εντός της ίδιας ομάδας ($p < 0,05$).

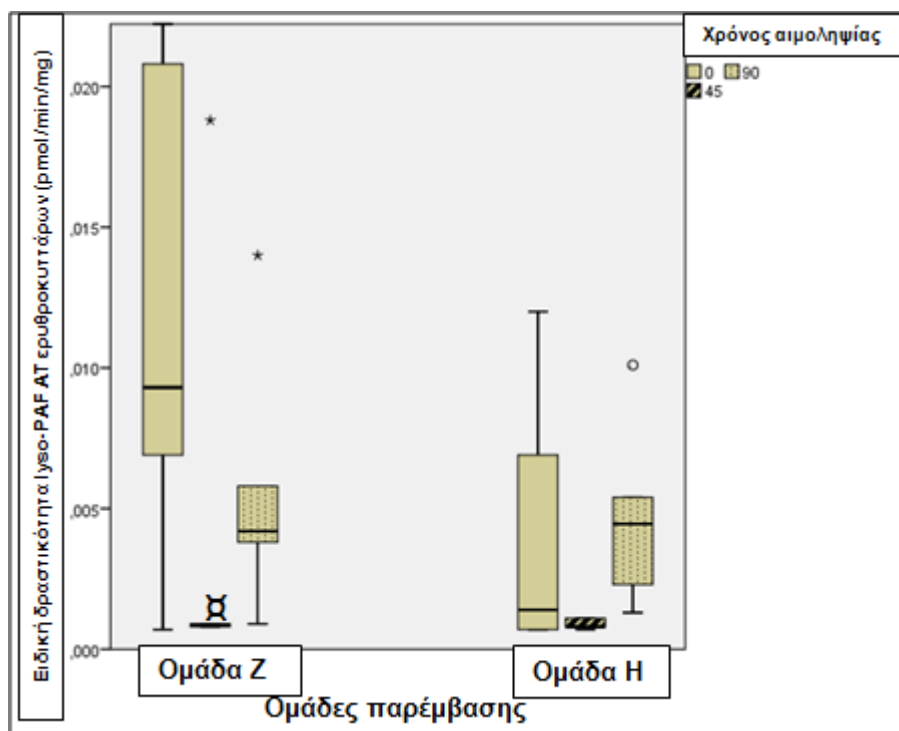
Η χορήγηση χοληστερόλης στα πειραματόζωα αύξησε σημαντικά τη δραστηριότητα της PAF-CPT στα αιμοπετάλια και στις δύο ομάδες σε σχέση με τα βασικά τους επίπεδα. Η δραστηριότητα της PAF-CPT στις 90 ημέρες, μειώθηκε σημαντικά μόνο στην περίπτωση της Ομάδας Z, στις 45 ημέρες. Η δραστηριότητα της PAF-CPT στην Ομάδα H επίσης μειώθηκε αλλά όχι σημαντικά, ενώ ήταν σημαντικά μεγαλύτερη από αυτή της Ομάδας Z (Σχήμα 63).

5.7.3.3 Ερυθρά αιμοσφαίρια



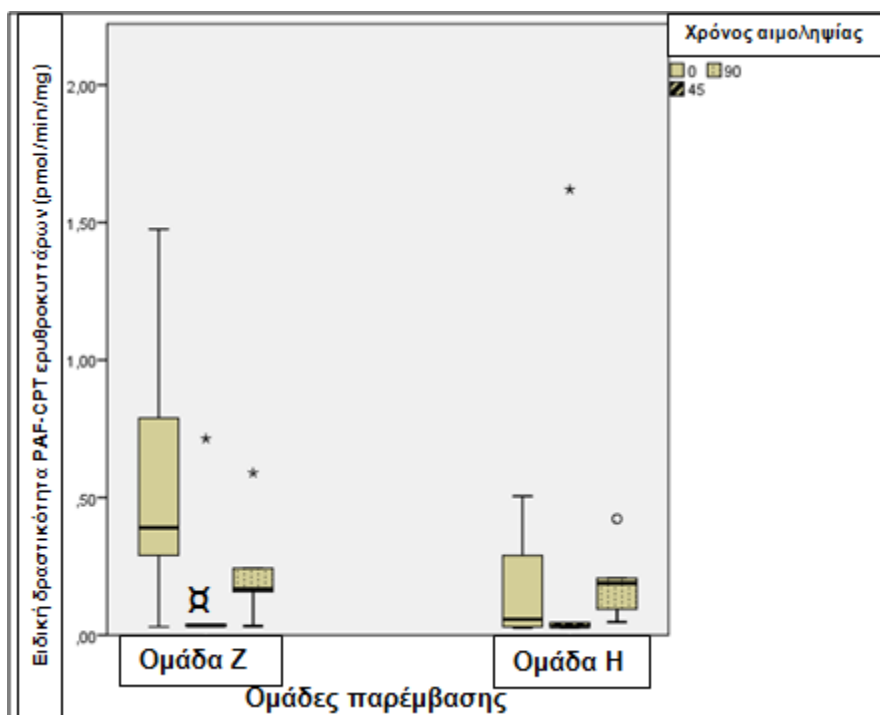
Σχήμα 64: Ειδική δραστηριότητα της PAF-AH στα ερυθρά αιμοσφαίρια των πειραματόζων που ανήκαν στις ομάδες υποτροφής των αθηρωματικών. Τα αποτελέσματα είναι εκφρασμένα σε pmol οξικού/μιν/μg. Ομάδα Z: TK+ γιαούρτι με ΥΑΕ, Ομάδα H: TK+ απλό γιαούρτι. #: Σημαντική διαφορά από Ομάδα Z ($p < 0,05$). α: Σημαντική διαφορά μεταξύ 0 και 45 ημερών, εντός της ίδιας ομάδας ($p < 0,05$), ‡: Σημαντική διαφορά μεταξύ 45 και 90 ημερών, εντός της ίδιας ομάδας ($p < 0,05$).

Η δραστηριότητα της ενδοκυτταρικής PAF-AH στα ερυθρά αιμοσφαίρια είναι, όπως και στην περίπτωση της lyso-PAF AT των αιμοπεταλίων, διαφορετική μεταξύ των ομάδων πριν την έναρξη της παρέμβασης. Δηλαδή η ειδική δραστηριότητα της Ομάδας H είναι σημαντικά μεγαλύτερη από αυτή της Ομάδας Z στις 45 ημέρες και διαφοροποιείται σημαντικά από τα βασικά επίπεδα της στο χρόνο 0. Μετά την παρέμβαση στις 90 ημέρες η ειδική δραστηριότητα και των δύο Ομάδων μειώνεται σημαντικά και δεν εμφανίζεται διαφοροποίηση μεταξύ των τιμών τους (Σχήμα 64).



Σχήμα 65: Ειδική δραστηριότητα της lyso-PAF AT στα ερυθρά αιμοσφαίρια των πειραματόζων που ανήκαν στις ομάδες υποστροφής των αθηρωματικών. Τα αποτελέσματα είναι εκφρασμένα σε pmol PAF/min/mg. Ομάδα Z: TK+ γιαούρτι με ΥΑΕ, Ομάδα H: TK+ απλό γιαούρτι. *: Σημαντική διαφορά μεταξύ 0 και 45 ημερών, εντός της ίδιας ομάδας ($p < 0,05$).

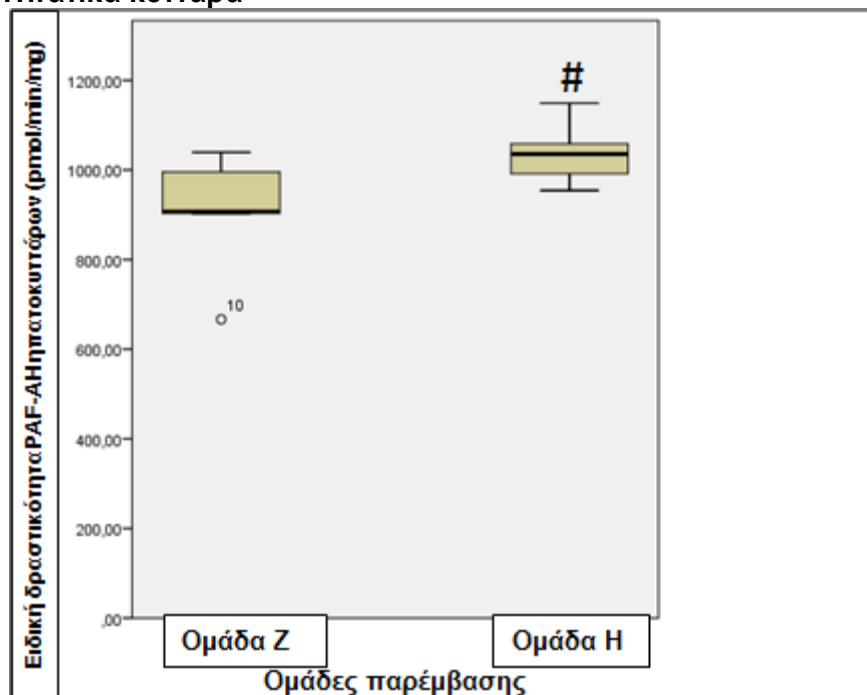
Η δραστηριότητα της lyso-PAF AT δεν εμφανίζει διαφοροποίηση μεταξύ των δύο διαφορετικών ομάδων της παρέμβασης σε καμία από τις χρονικές στιγμές της αιμοληψίας. Η δραστηριότητα και των δύο ομάδων αυξάνεται στις 90 ημέρες αλλά δεν αποκτά στατιστική σημαντικότητα. Η μόνη στατιστική διαφορά που εντοπίστηκε ήταν μεταξύ των βασικών τιμών και των 45 ημερών στην ομάδα Z μετά τη χορήγηση χοληστερόλης (Σχήμα 65).



Σχήμα 66: Ειδική δραστηριότητα της PAF-CPT στα ερυθρά αιμοσφαίρια των πειραματόζων που ανήκαν στις ομάδες υποτροφής των αθηρωματικών πλακών. Τα αποτελέσματα είναι εκφρασμένα σε pmol PAF/min/mg. Ομάδα Z: TK+ γιαούρτι με ΥΑΕ, Ομάδα H: TK+ απλό γιαούρτι. #: Σημαντική διαφορά μεταξύ 0 και 45 ημερών, εντός της ίδιας ομάδας ($p < 0,05$).

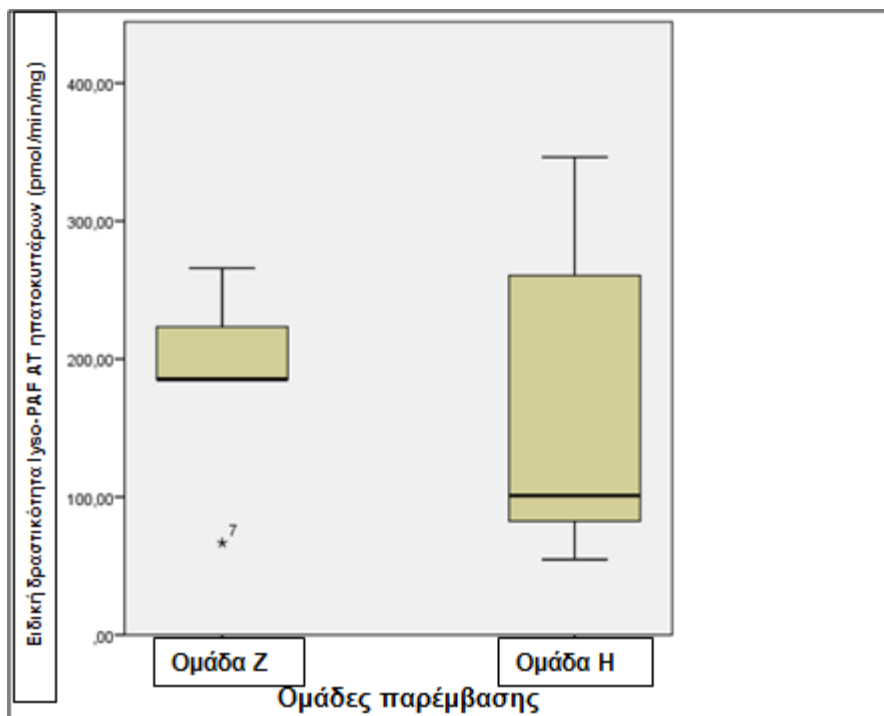
Όπως και στην περίπτωση της lyso-PAF AT, η δραστηριότητα της lyso-PAF AT δεν εμφανίζει διαφοροποίηση μεταξύ των διαφορετικών ομάδων της παρέμβασης σε καμία από τις χρονικές στιγμές της αιμοληψίας. Η δραστηριότητα και των δύο ομάδων αυξάνεται στις 90 ημέρες σε σχέση με τις 45 αλλά δεν αποκτά στατιστική σημαντικότητα. Η μόνη στατιστική διαφορά που εντοπίστηκε ήταν μεταξύ των βασικών τιμών και των 45 ημερών στην ομάδα Z μετά τη χορήγηση χοληστερόλης (Σχήμα 66).

5.7.3.4 Ηπατικά κύτταρα



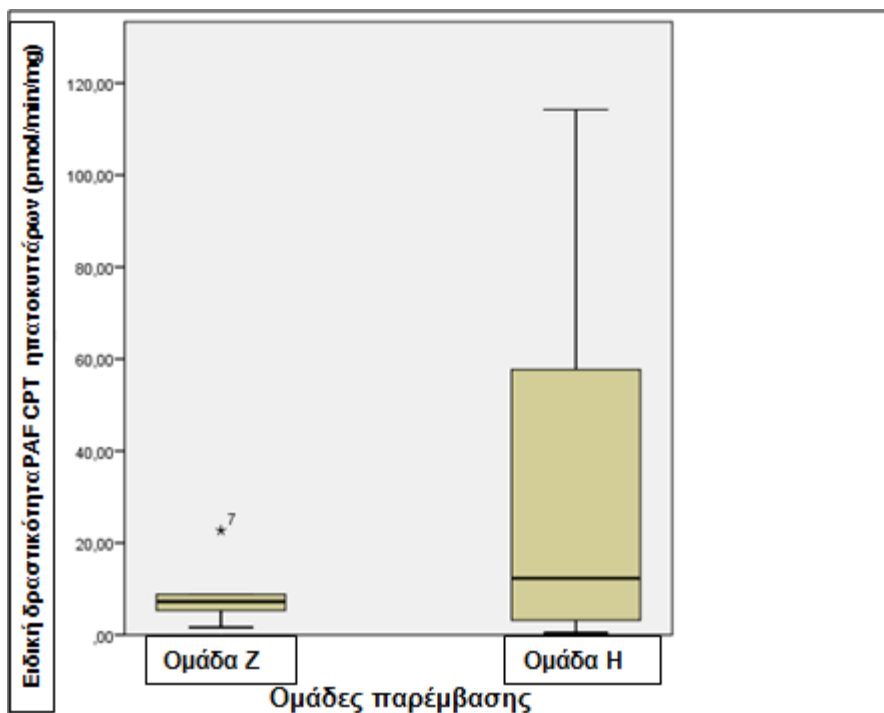
Σχήμα 67: Ειδική δραστηριότητα της PAF-AH στα ηπατοκύτταρα των πειραματόζων που ανήκαν στις ομάδες υποστροφής των αθηρωματικών πλακών. Τα αποτελέσματα είναι εκφρασμένα σε pmol οξικού/min/mg. Ομάδα Z: TK+ γιαούρτι με ΥΑΕ, Ομάδα H: TK+ απλό γιαούρτι. #: Σημαντική διαφορά από Ομάδα Z ($p < 0,05$).

Η ειδική δραστηριότητα της PAF-AH στα ηπατικά κύτταρα της Ομάδας H που τράφηκε με TK+ γιαούρτι εμπορίου ήταν σημαντικά μεγαλύτερη από τη δραστηριότητα της Ομάδας Z που τράφηκε με TK+ γιαούρτι με ΥΑΕ (Σχήμα 67).



Σχήμα 68: Ειδική δραστηριότητα της lyso-PAF AT στα ηπατοκύτταρα των πειραματόζων που ανήκαν στις ομάδες υποστροφής των αθηρωματικών πλακών. Τα αποτελέσματα είναι εκφρασμένα σε pmol PAF/min/mg. Ομάδα Z: TK+ γιαούρτι με ΥΑΕ, Ομάδα Η: TK+ απλό γιαούρτι. #: Σημαντική διαφορά από Ομάδα Z ($p < 0,05$).

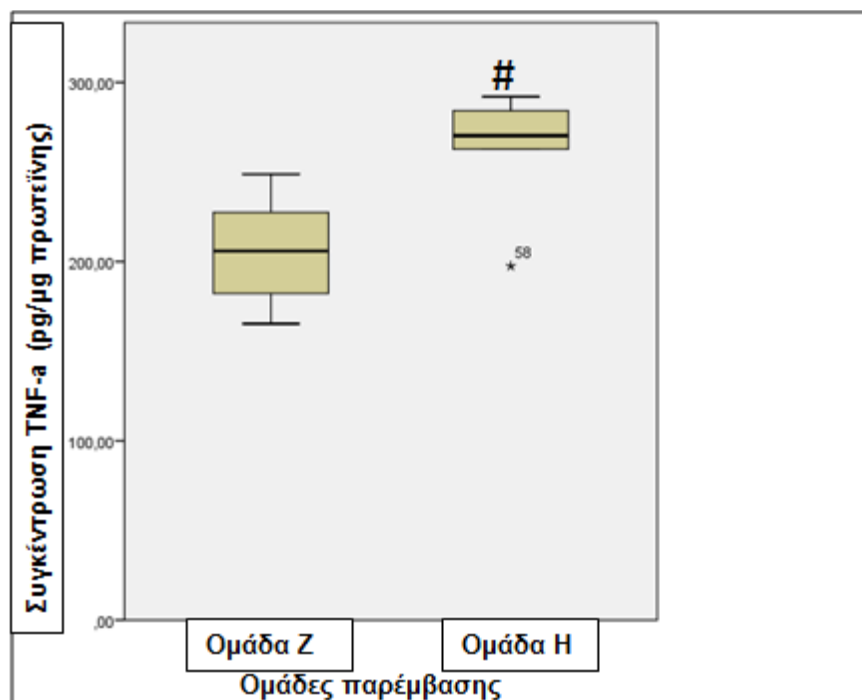
Δεν παρατηρείται διαφορά στις τιμές των δύο ομάδων μετά το πέρας της διατροφικής παρέμβασης (Σχήμα 68).



Σχήμα 69: Ειδική δραστηριότητα της PAF-CPT στα ηπατοκύτταρα των πειραματόζων που ανήκαν στις ομάδες υποστροφής των αθηρωματικών πλακών.

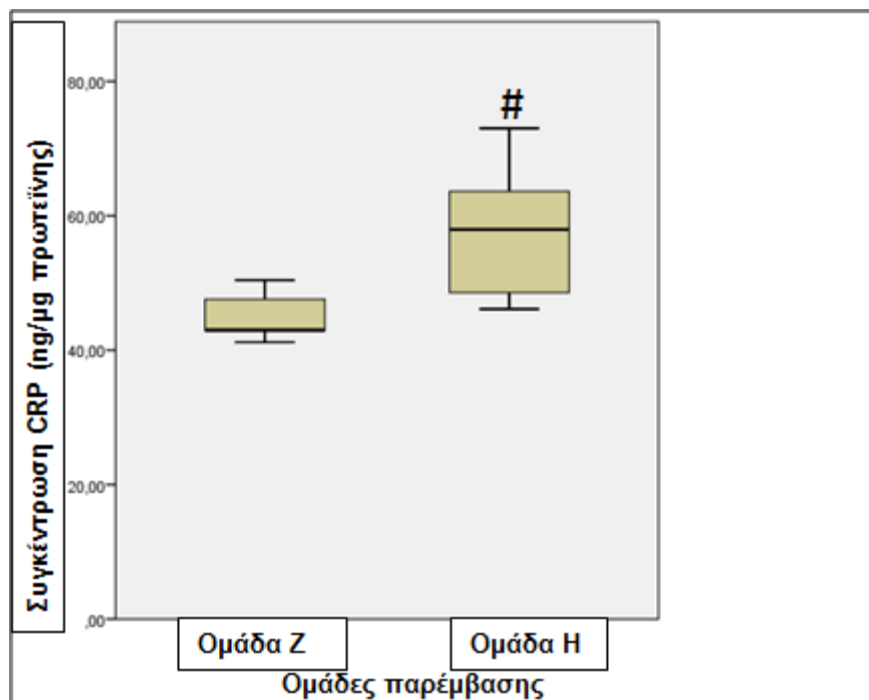
Τα αποτελέσματα είναι εκφρασμένα σε pg/ml PAF/min/mg . Ομάδα Z: TK+ γιαούρτι με ΥΑΕ, Ομάδα Η: TK+ απλό γιαούρτι.

Δεν παρατηρείται διαφορά στις τιμές των δύο ομάδων μετά το πέρας της διατροφικής παρέμβασης (Σχήμα 69).



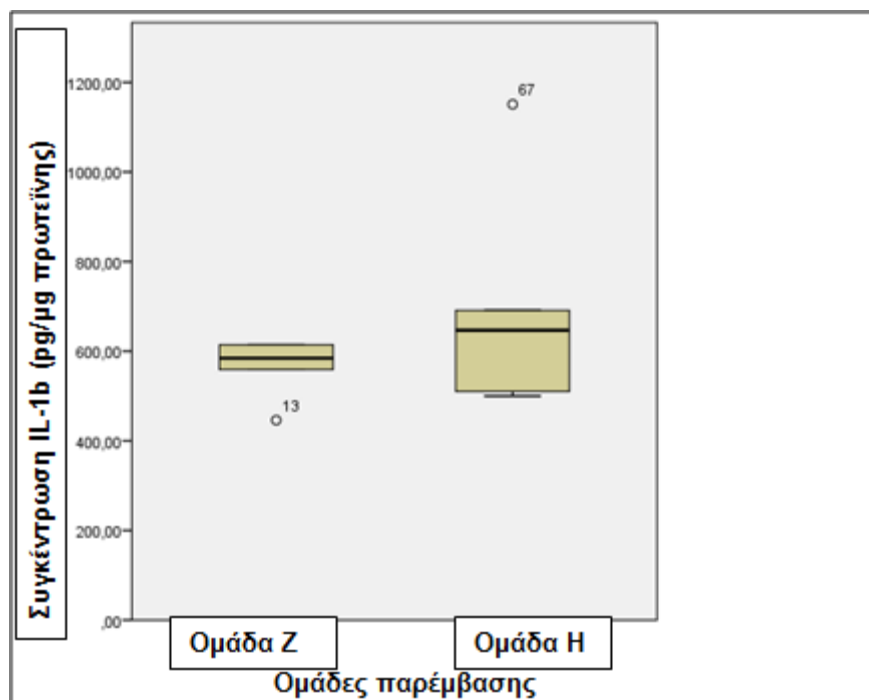
Σχήμα 70: Συγκέντρωση του TNF-a στα ηπατοκύτταρα των πειραματόζων που ανήκαν στις ομάδες υποστροφής των αθηρωματικών πλακών. Τα αποτελέσματα είναι εκφρασμένα σε $\text{pg TNF-a/mg πρωτεΐνης}$. Ομάδα Z: TK+ γιαούρτι με ΥΑΕ, Ομάδα Η: TK+ απλό γιαούρτι. #: Σημαντική διαφορά από Ομάδα Z ($p < 0,05$).

Η συγκέντρωση του TNF-a στα ηπατικά κύτταρα της Ομάδας Η που τράφηκε με TK+ γιαούρτι εμπορίου ήταν σημαντικά μεγαλύτερη από τη συγκέντρωση της Ομάδας Z που τράφηκε με TK+ γιαούρτι με ΥΑΕ (Σχήμα 70).



Σχήμα 71: Συγκέντρωση του CRP στα ηπατοκύτταρα των πειραματόζων που ανήκαν στις ομάδες υποστροφής των αθηρωματικών πλακών. Τα αποτελέσματα είναι εκφρασμένα σε ng CRP/μg πρωτεΐνης. Ομάδα Z: TK+ γιαούρτι με ΥΑΕ, Ομάδα H: TK+ απλό γιαούρτι. #: Σημαντική διαφορά από Ομάδα Z ($p < 0,05$).

Η συγκέντρωση του CRP στα ηπατικά κύτταρα της Ομάδας H που τράφηκε με TK+ γιαούρτι εμπορίου ήταν σημαντικά μεγαλύτερη από τη συγκέντρωση της Ομάδας Z που τράφηκε με TK+ γιαούρτι με ΥΑΕ (Σχήμα 71).

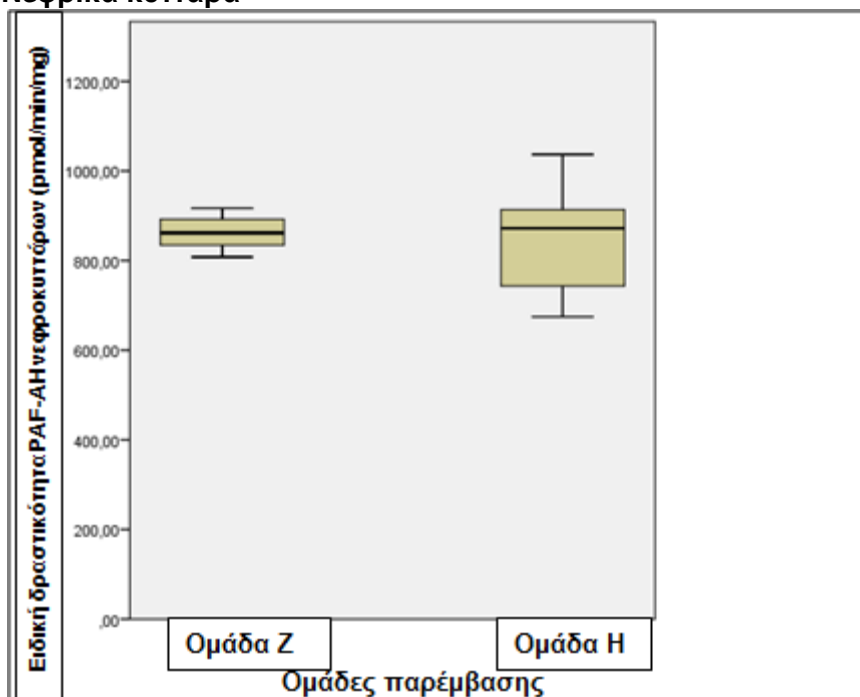


Σχήμα 72: Συγκέντρωση της IL-1β στα ηπατοκύτταρα των πειραματόζων που ανήκαν στις ομάδες υποστροφής των αθηρωματικών πλακών.

Τα αποτελέσματα είναι εκφρασμένα σε pg IL-1b/μg πρωτεΐνης. Ομάδα Z: TK+ γιαούρτι με ΥΑΕ, Ομάδα Η: TK+ απλό γιαούρτι.

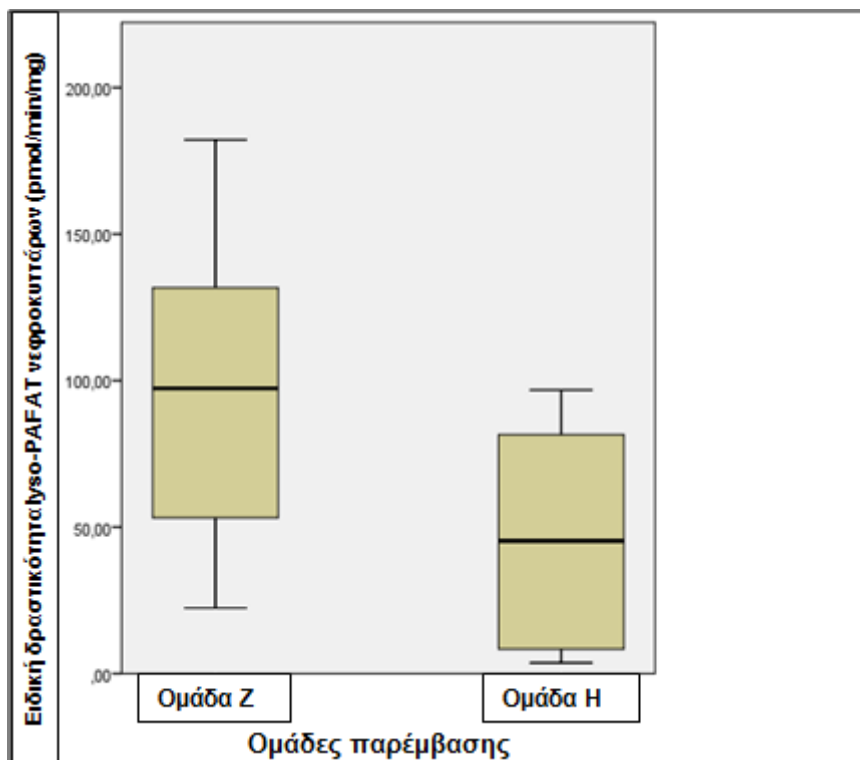
Δεν παρατηρείται διαφορά στη συγκέντρωση της IL-β των ηπατοκυττάρων μεταξύ των δύο ομάδων μετά το πέρας της διατροφικής παρέμβασης (Σχήμα 72).

5.7.3.5 Νεφρικά κύτταρα



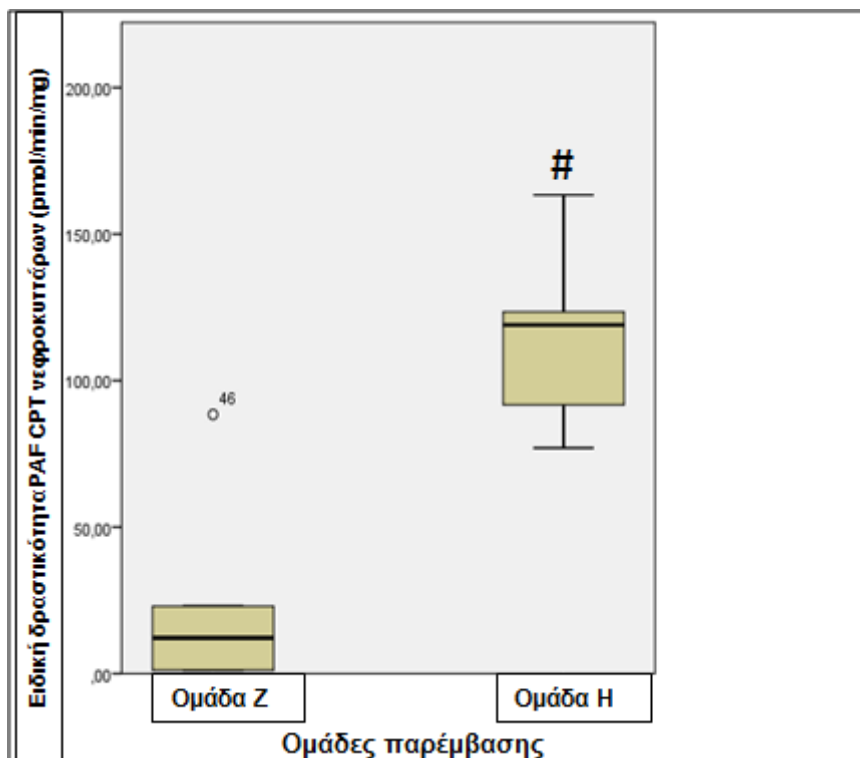
Σχήμα 73: Ειδική δραστηριότητα της PAF-AH στα νεφροκύτταρα των πειραματόζωνων που ανήκαν στις ομάδες υποστροφής των αθηρωματικών πλακών. Τα αποτελέσματα είναι εκφρασμένα σε pmol οξικού /min/mg. Ομάδα Z: TK+ γιαούρτι με ΥΑΕ, Ομάδα Η: TK+ απλό γιαούρτι.

Η δραστηριότητα της ενδοκυτταρικής PAF-AH στα νεφρικά κύτταρα δεν εμφάνισε διαφοροποίηση μεταξύ των ομάδων μετά το πέρας της παρέμβασης στις 90 ημέρες (Σχήμα 73).



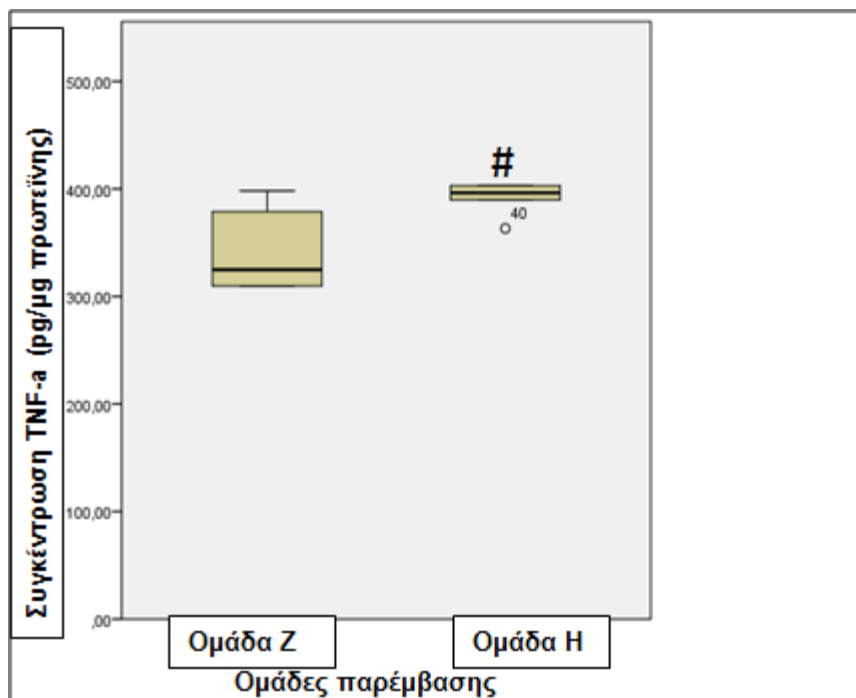
Σχήμα 74: Ειδική δραστηριότητα της lyso-PAF AT στα νεφροκύτταρα των πειραματόζων που ανήκαν στις ομάδες υποστρώσης των αθηρωματικών πλακών. Τα αποτελέσματα είναι εκφρασμένα σε pmol PAF/min/mg. Ομάδα Z: TK+ γιαούρτι με ΥΑΕ, Ομάδα H: TK+ απλό γιαούρτι.

Δεν παρατηρήθηκε διαφορά στη δραστηριότητα της lyso-PAF AT στα νεφρικά κύτταρα των δύο διαφορετικών ομάδων, μετά το πέρας της διατροφικής παρέμβασης (Σχήμα 74).



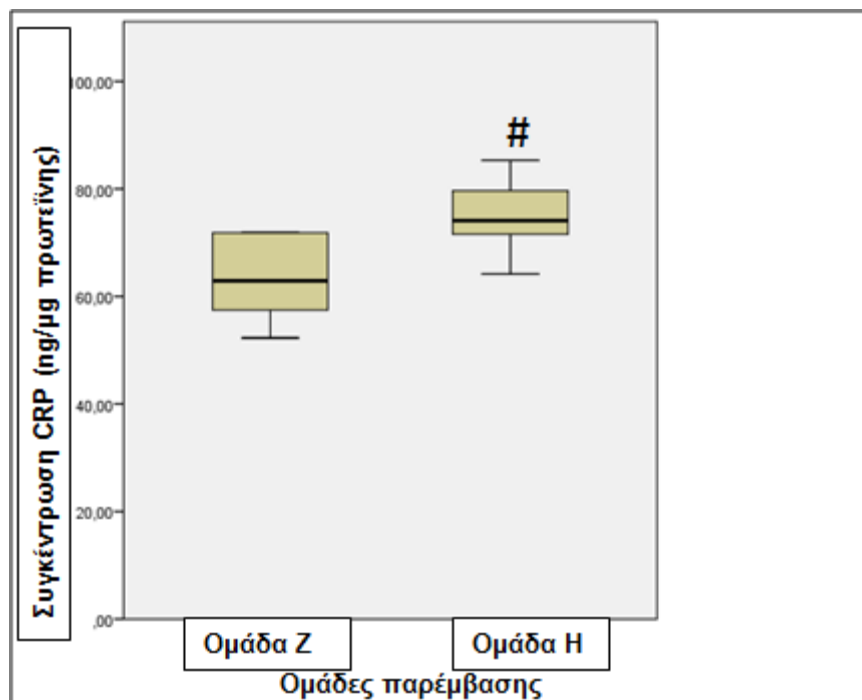
Σχήμα 75: Ειδική δραστηριότητα της PAF CPT στα νεφροκύτταρα των πειραματόζων που ανήκαν στις ομάδες υποστροφής των αθηρωματικών πλακών. Τα αποτελέσματα είναι εκφρασμένα σε pmol PAF/min/mg. Ομάδα Z: TK+ γιαούρτι με ΥΑΕ, Ομάδα H: TK+ απλό γιαούρτι. #: Σημαντική διαφορά από Ομάδα Z ($p < 0,05$).

Η ειδική δραστηριότητα της PAF-CPT στα νεφρικά κύτταρα της Ομάδας H που τράφηκε με TK+ γιαούρτι εμπορίου, ήταν σημαντικά μεγαλύτερη από την αντίστοιχη της Ομάδας Z που τράφηκε με TK+ γιαούρτι εμπλουτισμένο με ΥΑΕ, μετά το πέρας της παρέμβασης στις 90 ημέρες (Σχήμα 75).



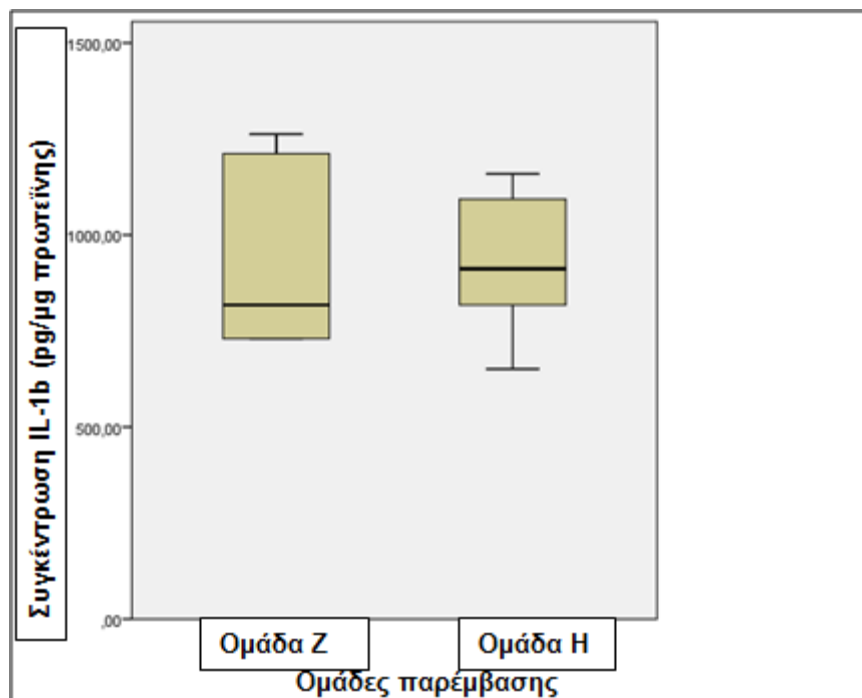
Σχήμα 76: Συγκέντρωση του TNF-a στα νεφροκύτταρα των πειραματόζων που ανήκαν στις ομάδες υποστροφής των αθηρωματικών πλακών. Τα αποτελέσματα είναι εκφρασμένα σε pg TNF-a/μg πρωτεΐνης. Ομάδα Z: TK+ γιαούρτι με YAE, Ομάδα H: TK+ απλό γιαούρτι. #: Σημαντική διαφορά από Ομάδα Z ($p < 0,05$).

Όπως και στην περίπτωση των ηπατικών κυττάρων, η συγκέντρωση του TNF-a στα νεφρικά κύτταρα της Ομάδας H που τράφηκε με TK+ γιαούρτι εμπορίου ήταν σημαντικά μεγαλύτερη από τη συγκέντρωση της Ομάδας Z που τράφηκε με TK+ γιαούρτι με YAE (Σχήμα 76).



Σχήμα 77: Συγκέντρωση του CRP στα νεφροκύτταρα των πειραματόζων που ανήκαν στις ομάδες υποστροφής των αθηρωματικών πλακών. Τα αποτελέσματα είναι εκφρασμένα σε ng CRP/μg πρωτεΐνης. Ομάδα Z: TK+ γιαούρτι με YAE, Ομάδα H: TK+ απλό γιαούρτι. #: Σημαντική διαφορά από Ομάδα Z ($p < 0,05$).

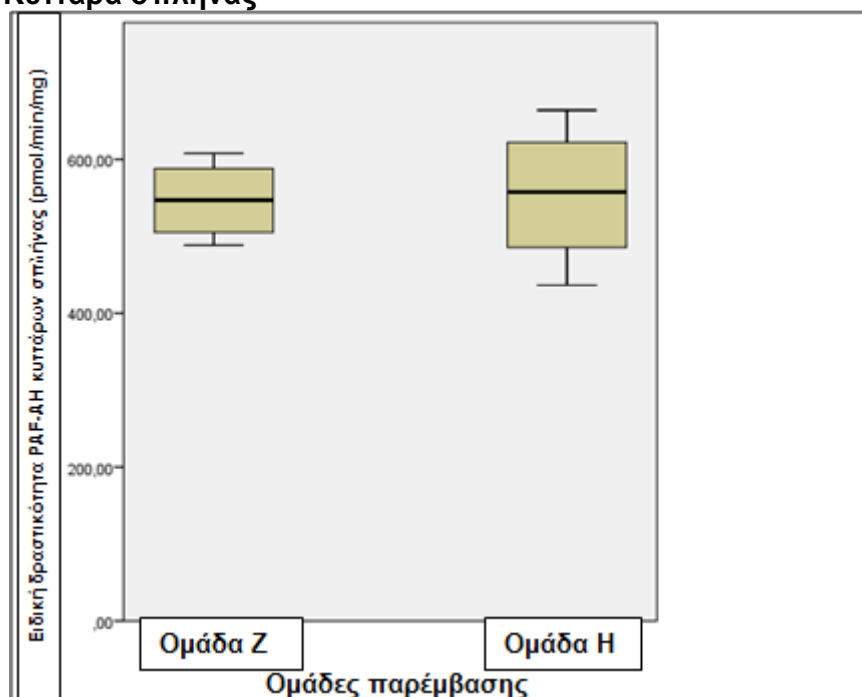
Όπως και στην περίπτωση των ηπατικών κυττάρων, η συγκέντρωση του CRP στα νεφρικά κύτταρα της Ομάδας H που τράφηκε με TK+ γιαούρτι εμπορίου ήταν σημαντικά μεγαλύτερη από τη συγκέντρωση της Ομάδας Z που τράφηκε με TK+ γιαούρτι με YAE (Σχήμα 77).



Σχήμα 78: Συγκέντρωση της IL-1b στα νεφροκύτταρα των πειραματόζων που ανήκαν στις ομάδες αναστολής της αθηρωμάτωσης. Τα αποτελέσματα είναι εκφρασμένα σε pg IL-1b/μg πρωτεΐνης. Ομάδα Β: ΑΔ+ γιαούρτι με ΥΑΕ, Ομάδα Γ: ΑΔ+ απλό γιαούρτι.

Δεν παρατηρήθηκε διαφορά στη συγκέντρωση της IL-1b στα νεφρικά κύτταρα των δύο διαφορετικών ομάδων, μετά τη διατροφική παρέμβαση (Σχήμα 78).

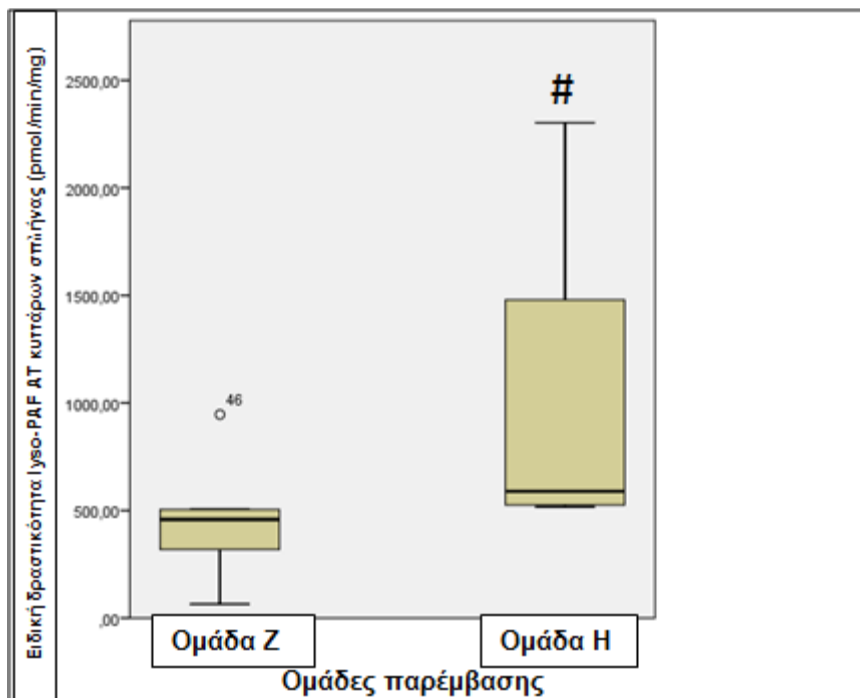
5.7.3.6 Κύτταρα σπλήνας



Σχήμα 79: Ειδική δραστηριότητα της PAF-AH στα κύτταρα σπλήνας των πειραματόζων που ανήκαν στις ομάδες υποστροφής των αθηρωματικών πλακών.

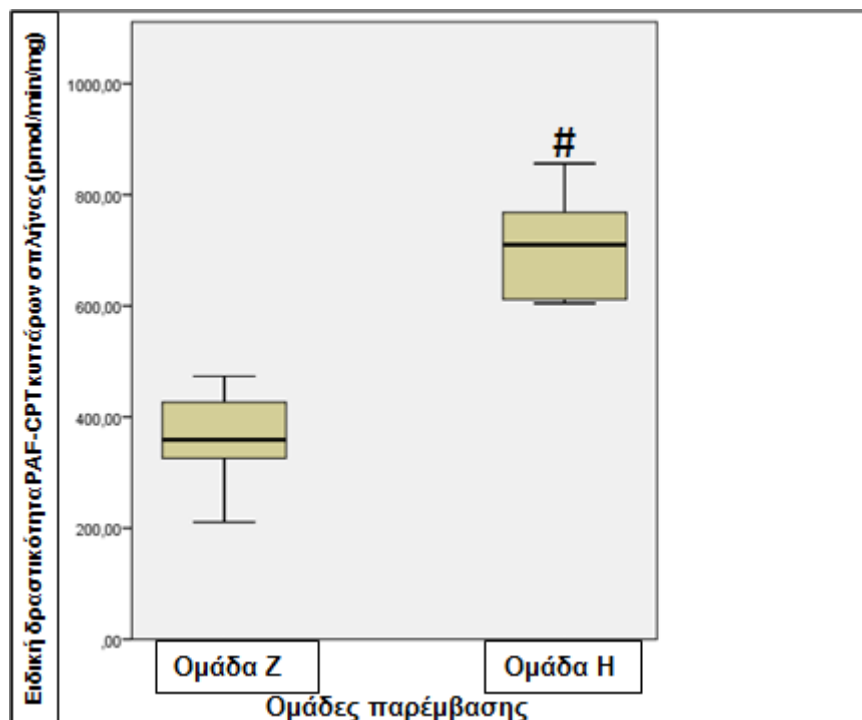
Τα αποτελέσματα είναι εκφρασμένα σε pmol οξικού /min/mg. Ομάδα Z: TK+ γιαούρτι με ΥΑΕ, Ομάδα Η: TK+ απλό γιαούρτι.

Δεν παρατηρήθηκε διαφορά στη δραστικότητα της ενδοκυτταρικής PAF-AH στα κύτταρα σπλήνας των δύο διαφορετικών ομάδων, μετά τη διατροφική παρέμβαση (Σχήμα 79).



Σχήμα 80: Ειδική δραστικότητα της lyso-PAF AT στα κύτταρα σπλήνας των πειραματόζων που ανήκαν στις ομάδες υποστρώσης των αθηρωματικών πλακών. Τα αποτελέσματα είναι εκφρασμένα σε pmol PAF/min/mg. Ομάδα Z: TK+ γιαούρτι με ΥΑΕ, Ομάδα Η: TK+ απλό γιαούρτι. #: Σημαντική διαφορά από Ομάδα Z ($p < 0,05$).

Η ειδική δραστικότητα της lyso-PAF AT στα κύτταρα σπλήνας της Ομάδας Η που τράφηκε με TK+ γιαούρτι εμπορίου, ήταν σημαντικά μεγαλύτερη από την αντίστοιχη της Ομάδας Z που τράφηκε με TK+ γιαούρτι εμπλουτισμένο με ΥΑΕ, μετά το πέρας της παρέμβασης στις 90 ημέρες (Σχήμα 80).



Σχήμα 81: Ειδική δραστηριότητα της PAF-CPT στα κύτταρα σπλήνας των πειραματόζων που ανήκαν στις ομάδες υποστρώσης των αθηρωματικών πλακών. Τα αποτελέσματα είναι εκφρασμένα σε pmol PAF/min/mg. Ομάδα Z: TK+ γιαούρτι με ΥΑΕ, Ομάδα H: TK+ απλό γιαούρτι. #: Σημαντική διαφορά από Ομάδα Z ($p < 0,05$).

Η ειδική δραστηριότητα της PAF-CPT στα κύτταρα σπλήνας της Ομάδας H που τράφηκε με TK+ γιαούρτι εμπορίου, ήταν σημαντικά μεγαλύτερη από την αντίστοιχη της Ομάδας Z που τράφηκε με TK+ γιαούρτι εμπλουτισμένο με ΥΑΕ, μετά το πέρας της παρέμβασης στις 90 ημέρες (Σχήμα 81).

6. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η παρούσα διατριβή προσπάθησε αρχικά να επιβεβαιώσει την ύπαρξη και στη συνέχεια να διαλευκάνει τη δομή των δραστικών μορίων με αντι-PAF δράσεις που περιέχονται στα ΥΑΕ. Η ύπαρξη των μορίων είχε ήδη διαπιστωθεί σε άλλα απόβλητα της ελαιουργίας από προηγούμενες μελέτες του εργαστηρίου Βιοχημείας του τμήματος Χημείας του ΕΚΠΑ. Η μελέτη άρχισε από το βασικό τρόφιμο της Μεσογειακής δίαιτας, το ελαιόλαδο [136]. Η ανάλυση των πολικών λιποειδών που περιείχαν τη μεγαλύτερη συγκέντρωση σε δραστικά μόρια έδειξε ότι η δομή των δραστικότερων εξ' αυτών αντιστοιχούσε σε γλυκεριναιθερικά γλυκολιποειδή. Μετά το ελαιόλαδο μόρια με αντι-PAF δράσεις βρέθηκαν και στα υπόλοιπα υποπροϊόντα της ελαιοπαραγωγής [137]. Το πρώτο συμπαράγωγο ελαιουργίας που δοκιμάστηκε ήταν ο ελαιοπυρήνας, του οποίου επίσης τα πολικά λιποειδή (ΠΛΠ) ήταν αυτά με τη μεγαλύτερη συγκέντρωση σε βιολογικώς δραστικά λιποειδή.

Τα δεδομένα από τα προαναφερθέντα πειράματα άνοιξαν το δρόμο για τη μελέτη των ΥΑΕ. Τα ΥΑΕ είναι το μίγμα των υπολειμμάτων του ελαιοκάρπου μαζί με το περιεχόμενο στον καρπό νερό, τα οποία απομακρύνονται και μέχρι σήμερα απορρίπτονται ανεξέλεγκτα κατά την εξαγωγή του ελαιολάδου. Αρχικά μελετήθηκε η ύπαρξη δραστικών αντι PAF μορίων, τα οποία και σε αυτή την περίπτωση περιέχονταν στο κλάσμα των πολικών λιποειδών, ενώ στη συνέχεια έγινε καθαρισμός τους με τη χρήση φυσικών προσροφητικών. Επιλέχθηκαν πρώτες ύλες οι οποίες ήταν φθηνές και εύκολο να βρεθούν στις ελαιοπαραγωγές περιοχές. Με τη χρήση των προσροφητικών υλικών επετεύχθη εμπλουτισμός των αποβλήτων σε βιολογικώς δραστικά λιποειδή με αντι-PAF δράσεις. Επίσης πρώιμα πειράματα δομής έδειξαν ότι τα δραστικότερα μόρια ήταν αντίστοιχης δομής με αυτά που απομονώθηκαν από το ελαιόλαδο και τον ελαιοπυρήνα [222].

Η μελέτη της δομής των δραστικών μορίων των ΥΑΕ μελετήθηκε εκτενώς στη παρούσα διατριβή. Η δομή που προτείνεται στην εργασία, ανήκει στο δραστικότερο εκ των μορίων που βρέθηκε στα απόβλητα ελαιουργίας. Για την απομόνωσή του δοκιμάστηκαν διαδοχικοί διαχωρισμοί με HPLC, σε αντίθεση με τις προηγούμενες μελέτες που η ανάλυση του μορίου έγινε στο κλάσμα

που συλλέχθηκε από την HPLC κανονικής φάσης. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 6, το δείγμα καθαρίστηκε εκτενώς από μόρια που περιέχονται στα ΥΑΕ, τα περισσότερα των οποίων είναι φαινόλες/πολυφαινόλες. Η ύπαρξή τους επιβεβαιώνεται τόσο από τους χημικούς προσδιορισμούς, όσο και από τη χρωματογραφία ανάστροφης φάσης στην οποία χρησιμοποιήθηκε ένα σύστημα ανάλυσης φαινολικών μορίων από απόβλητα ελαιουργίας [493, 494]. Η ύπαρξη των φαινολικών μορίων επιβεβαιώνεται εμμέσως και από την ισχυρή αντιοξειδωτική δράση του πολικού κλάσματος των ΥΑΕ, όπως παρουσιάζεται στους στα σχήματα 1 και 2. Ο καθαρισμός του μορίου από προσμίξεις αναδεικνύεται από τα δεδομένα που ελήφθησαν από τη φασματομετρία μάζας, στην οποία τα φάσματα είναι σχετικά καθαρά (Εικόνα 9 & 11), αλλά και από τα αποτελέσματα της βιολογικής δοκιμασίας σε πλυμένα αιμοπετάλια κουνελιού, στα οποία η δραστηριότητα αυξάνεται με κάθε στάδιο καθαρισμού. Αυτό μπορεί να αποδοθεί στην απομάκρυνση των φαινολικών μορίων τα οποία είναι γνωστοί αναστολείς/αγωνιστές του PAF [495, 496]. Η ανάλυση του φάσματος όπως εμφανίζεται στις Εικόνες 8 και 10, δείχνει ότι το μόριο είναι και σε αυτή την περίπτωση γλυκεριναιθερικό γλυκολιποειδές, όπως στην περίπτωση του ελαιολάδου και του ελαιοπυρήνα [136, 137]. Το ενδιαφέρον χαρακτηριστικό του μορίου είναι το μόριο μανιτόλης, το οποίο παρότι όχι συχνά απαντώμενο, υπάρχει στον ελαιόκαρπο αλλά και τα απόβλητα ελαιουργίας [497, 498]. Μια άλλη ιδιαιτερότητα του μορίου η οποία μπορεί να επηρεάζει τη δραστηριότητα του είναι η ύπαρξη αλυσίδων μικράς αλύσου στις θέσεις *sn-1* και *sn-2* σε αντίθεση με τις δομές των προηγούμενων μορίων τα οποία είχαν μικρή ανθρακική αλυσίδα μόνο στη θέση *sn-2* και συγκεκριμένα οξικό οξύ. Η ύπαρξη του οξικού στην *sn-2* θέση παίζει σημαντικό ρόλο στην αντι-PAF δράση του μορίου καθώς η προκατεργασία του μορίου με ορό από κουνέλια, ο οποίος περιέχει Lp-PLA2, οδήγησε σε ολική απώλεια της δραστηριότητάς του, όπως και στην περίπτωση των μορίων από το ελαιόλαδο και τον ελαιοπυρήνα.

Μετά τη αποσαφήνιση της δομής του μορίου και τα αποτελέσματα από τις αντι-PAF δράσεις του το μόριο θεωρήθηκε ένας πολύ καλός αντιαθηρωματικός παράγοντας. Για το λόγο αυτό έγινε προσπάθεια αξιοποίησης του με το να ενσωματωθεί σε ένα τρόφιμο ώστε να αυξήσει τη

θρεπτική και βιολογική αξία του, δηλαδή να παραχθεί ένα νέο λειτουργικό τρόφιμο.

Σαν βασικό τρόφιμο «μήτρα» επιλέχθηκε το γιαούρτι το οποίο επίσης είναι τρόφιμο της Μεσογειακής δίαιτας. Το γιαούρτι εμφανίζει πολλά πλεονεκτήματα για να αποτελέσει το βασικό τρόφιμο. Το κυριότερο είναι οι ήπιες συνθήκες που χρησιμοποιούνται κατά την παρασκευή του, δηλαδή χαμηλές θερμοκρασίες για μικρά χρονικά διαστήματα. Το μόνο που έπρεπε να μελετηθεί ήταν η επίδραση των μικροοργανισμών στα βιολογικά δραστικά μόρια αλλά και το αντίθετο, δηλαδή αν τα μόρια επηρεάζουν την ανάπτυξη των μικροοργανισμών και τελικά την ποιότητα του γιαουρτιού. Για το λόγο αυτό το εργαστήριο μας συνεργάστηκε με τη γαλακτοβιομηχανία ΜΕΒΓΑΛ Α.Ε., μια από τις μεγαλύτερες εταιρείες στην Ελλάδα. Στην εταιρεία δόθηκε λυοφιλοποιημένο πολικό εκχύλισμα των ΥΑΕ και παρασκευάστηκαν γιαούρτια 2% σε λιπαρά. Η εισαγωγή του εκχυλίσματος σε τρόφιμο έκανε υποχρεωτική την αλλαγή της μεθόδου εκχύλισης των μορίων με τη χρήση διαλυτών που επιτρέπεται να χρησιμοποιηθούν από τη βιομηχανία τροφίμων, όπως αιθανόλη και εξάνιο. Για το λόγο αυτό η κατανομή κατ' αντιρροή που χρησιμοποιείται ευρέως αντικαταστάθηκε από τη μέθοδο εκχύλισης που περιγράφεται στη παράγραφο 4.3. Τα εκχυλίσματα προστέθηκαν στο γάλα πριν την γαλακτική ζύμωση και έγιναν όλες οι απαραίτητες μετρήσεις του ελέγχου ποιότητας όπου δεν παρατηρήθηκε καμία διαφορά στις φυσικοχημικές ιδιότητες του ή στον αριθμό των μικροοργανισμών του τελικού προϊόντος. Στη συνέχεια τα γιαούρτια εκχυλίστηκαν και παρελήφθησαν τα βιολογικά δραστικά λιποειδή τους με αντίστοιχη μέθοδο και αναλύθηκαν με HPLC και τα κλάσματα αλλά και το αρχικό εκχύλισμα δοκιμάστηκαν σε πλυμένα αιμοπετάλια κουνελιού, όπου φάνηκε ότι οι μικροοργανισμοί δεν επιδρούν στα μόρια κατά τη ζύμωση του γάλακτος.

Ένα άλλο χαρακτηριστικό του γιαουρτιού είναι ότι το τρόφιμο αυτό έχει αντιαθηρογόνες δράσεις, οι οποίες δεν έχουν εξηγηθεί επαρκώς. Η πρώτη μελέτη που έδειξε την αντιαθηρογόνο δράση του γιαουρτιού ήταν σε πειραματόζωα, στα οποία έδειξε ισχυρή υποχοληστερολαιμική δράση και αναστολή της εμφάνισης αθηρωματικών πλακών, φαινόμενο το οποίο αποδόθηκε στο ασβέστιο αλλά και σε άλλα μόρια που περιέχονται στο

γιαούρτι [499]. Μια κλινική μελέτη έδειξε ότι η κατανάλωση γιαουρτιού μπορεί να μειώσει το πάχος του έσω χιτώνα των καρωτίδων, ανεξάρτητα από άλλους παράγοντες [500]. Επιπλέον τα άτομα που κατανάλωναν 11-14 μερίδες γιαουρτιού την εβδομάδα είχαν χαμηλότερες συγκεντρώσεις σε δείκτες φλεγμονής όπως το CRP, η IL-6 και ο TNF-α κατά 16%, 5%, και 12% χαμηλότερες αντίστοιχα από τους εθελοντές που κατανάλωναν λιγότερο γιαούρτι. Οι αντίστοιχες διαφορές για εθελοντές που κατανάλωναν περισσότερες από 14 μερίδες ήταν 29%, 9%, και 20% [501].

Με την εισαγωγή των ΥΑΕ στο γιαούρτι και η *in vivo* μελέτη τόσο του απλού όσο και του εμπλουτισμένου, σε σχέση με μία ομάδα ελέγχου θα μπορούσε να προσδώσει περισσότερα στοιχεία για τη δράση του στο μηχανισμό της αθηρωμάτωση μέσω της επίδρασης των συστατικών του στον PAF και τα μεταβολικά του ένζυμα [502].

Με το παρόν πρωτόκολλο μελετήθηκε τόσο η ικανότητα του γιαουρτιού να αναστείλει την ανάπτυξη αθηρωματικών πλακών αλλά και την υποστροφή των ήδη σχηματισμένων.

Όσον αφορά την παρέμβαση της αναστολής των αθηρωματικών πλακών, δεν υπήρχε διαφοροποίηση μεταξύ των πειραματόζων και των βιοχημικών παραμέτρων τους σε καμία από τις τρεις ομάδες. Οι αθηρωματικές πλάκες μειώθηκαν σημαντικά στην ομάδα Β σε σχέση με την ομάδα ελέγχου Α, ενώ το απλό γιαούρτι έδειξε μόνο μια τάση μείωσής τους αλλά όχι στατιστικώς σημαντική. Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν με τη μείωση της IL-1b στην ομάδα Β. Ως προς τα ένζυμα μεταβολισμού του PAF η Lp-PLA2 αυξάνεται σε όλες τις Ομάδες καθώς η πρόσληψη της αθηρογόνου δίαιτας διατηρεί μια ισχυρά φλεγμονώδη κατάσταση. Στα κύτταρα και στους ιστούς τα μεταβολικά ένζυμα του PAF διαφοροποιούνται με τέτοιο τρόπο που συμφωνούν με τα ευνοϊκά αποτελέσματα από τη χρήση του γιαουρτιού απλού ή ενισχυμένου, αν και υπάρχουν συγκεκριμένες περιπτώσεις που δεν μπορούν να εξηγηθούν.

Όσον αφορά την παρέμβαση της υποστροφής των αθηρωματικών πλακών, δεν υπήρχε διαφοροποίηση στην ανάπτυξη των πειραματόζων, αλλά υπήρξε στις βιοχημικές παραμέτρους. Συγκεκριμένα η χορήγηση γιαουρτιού απλού ή ενισχυμένου μείωσε τα λιποειδή αίματος σε πολλές περιπτώσεις στα

βασικά επίπεδα πριν τη χορήγηση χοληστερόλης. Στην περίπτωση της ολικής και της LDL χοληστερόλης το εμπλουτισμένο γιαούρτι μείωσε τις τιμές στα βασικά επίπεδα, ενώ και τα δύο γιαούρτια μείωσαν τα επίπεδα των τριάκυλογλυκελών χαμηλότερα και από τις αρχικές τιμές.

Οι αθηρωματικές πλάκες μειώθηκαν σημαντικά στην ομάδα Z σε σχέση με την ομάδα ελέγχου E, αλλά και την Ομάδα H που τράφηκε με απλό γιαούρτι. Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν με τη μείωση της IL-1b στην ομάδα Z η οποία μειώθηκε κάτω και από τα αρχικά της επίπεδα στο τέλος της παρέμβασης. Ως προς τα ένζυμα μεταβολισμού του PAF η Lp-PLA2 αυξάνεται σε όλες τις Ομάδες με την πρόσληψη της αθηρογόνου δίαιτας, αλλά μειώνεται κάτω και από τα βασικά της επίπεδα στο χρόνο 0 μετά την πρόσληψη των γιαουρτιών, αφού παύει η ισχυρή φλεγμονώδης κατάσταση και εισέρχονται στη δίαιτα τα βιολογικώς δραστικά μόρια από τα γιαούρτια. Όπως και στην περίπτωση της αναστολής έτσι και στην περίπτωση της υποστροφής των αθηρωματικών πλακών στα κύτταρα και στους ιστούς τα μεταβολικά ένζυμα του PAF διαφοροποιούνται με τέτοιο τρόπο που συμφωνούν με τα ευνοϊκά αποτελέσματα από τη χρήση του γιαουρτιού απλού ή ενισχυμένου, αν και υπάρχουν συγκεκριμένες περιπτώσεις που δεν μπορούν να εξηγηθούν.

7. ΠΙΝΑΚΑΣ ΟΡΟΛΟΓΙΑΣ

Πίνακας 13: Πίνακας ορολογίας με τις αντιστοιχίσεις των ελληνικών και ξενόγλωσσων όρων

Ξενόγλωσσος όρος	Ελληνικός Όρος
adiponectin	Αδιπονεκτίνη
apolipoprotein B	Απολιποπρωτεΐνη Β
C reactive protein	Αντιδρώσα πρωτεΐνη C
Cytokine	κυτταροκίνη
Diacylglycerol	διάκυλογλυκερόλη
Epidermal growth factor	επιδερμικού αυξητικού παράγοντα
Fibrinogen	Ινωδογόνο
Foam cells	αφρώδη κύτταρα
Glutathione peroxidase	Υπεροξειδάση της γλουταθειόνης
High performance liquid chromatography	Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης
Intima	Χιτώνας
Intercellular adhesion molecule	Ενδοκυτταρικό μόριο προσκόλλησης
Interferon-g	Ιντερφερόνη-γ
Interleukin-8	Ιντερλευκίνης-8
Lecithin-Cholesterol Acyltransferase	Λεκιθινή-Χοληστερόλη ακετυλοτρανσφεράση
Lipopolysaccharide	Λιποπολυσακχαρίτης
Low Density Lipoproteins	Λιποπρωτεΐνες Χαμηλής Πυκνότητας
lyso-phosphatidyl choline	Λυσοφωσφατιδυλοχολίνη
Lysosomal acid lipase	Όξινη λυσοσωμική λιπάση
Matrix Metalloproteinases	Μεταλοπρωτεάσες Μήτρας
Minimally modified LDL	μηδαμινώς τροποποιημένη LDL
Monocyte chemotactic protein-1	Χημειοτακτικής πρωτεΐνης-1 των μονοκυττάρων
Myeloperoxidase	μυελοπεροξειδάση
Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells	πυρηνικό παράγοντα κΒ
Olive mill wastes	Υγρά απόβλητα ελαιουργίας
PAF acetyl hydrolase	PAF ακετυλο υδρολάση
PAF like	ανάλογα του PAF
PAF receptor	Υποδοχέας PAF
Phosphate buffered saline	Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών και χλωριούχων αλάτων
Phospholipase	Φωσφολιπάση
Phosphorylated endothelial Nitric oxide synthase	Φωσφορυλιωμένης Ενδοθηλιακής Συνθάσης του Νιτρικού Οξέος
Placental Growth Factor	Αυξητικός παράγοντας πλακούντα
Plasminogen activator inhibitor 1	Αναστολέας του ενεργοποιητή του πλασμινογόνου 1

Platelet Activating Factor	Παράγοντας Ενεργοποίησης Αιμοπεταλίων
P-selectin glycoprotein ligand-1	γλυκοπρωτεϊνικού προσδέτη της P-σελεκτίνης
Scavenger receptor	Εκκαθαριστής υποδοχέας
Secoisolariciresinol diglucoside	διγλυκοζίτης της σεκοϊσολαρισιρεζινόλης
Smooth muscle cells	Λείων μυϊκών κυττάρων
Superoxide dismutase	Δισμουτάση του υπεροξειδίου
Thin layer chromatography	Χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας
TNF receptor	Υποδοχέας TNF
Triacylglycerol	Τριακυλογλυκερόλη
Tumor Necrosis Factor-α	Ογκονεκρωτικός παράγοντας -α
Vascular cell adhesion molecule 1	Μόριο προσκόλλησης αγγειακών κυττάρων
Vascular endothelial growth factor	Αγγειακός-Ενδοθηλιακός Αυξητικός Παράγοντας
Very high density lipoprotein	πολύ υψηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνης
Very Low Density Lipoproteins	Λιποπρωτεΐνες πολύ Χαμηλής Πυκνότητας

8. ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ-ΑΡΚΤΙΚΟΛΕΞΑ-ΑΚΡΩΝΥΜΙΑ

Πίνακας 14: Ακρωνύμια και ανάπτυξή τους

apoB	apolipoprotein B
CRP	C reactive protein
DAG	Diacylglycerol
EGF	Epidermal growth factor
GPx	Glutathione peroxidase
HPLC	High performance liquid chromatography
ICAM-1	Intercellular adhesion molecule
IFN-g	Interferon-g
IL-8	Interleukin-8
LCAT	Lecithin-Cholesterol Acyltransferase
LPS	Lipopolysaccharide
LDL	Low Density Lipoproteins
lyso-PC	lyso-phospatidyl choline
LAL	Lysosomal acid lipase
MMP	Matrix Metalloproteinases
mmLDL	Minimally modified LDL
MCP-1	Monocyte chemotactic protein-1
MPO	Myeloperoxidase
NF-kB	Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
OMW	Olive mill wastes
PAF-AH	PAF acetyl hydrolase
PAF-R	PAF receptor
PBS	Phosphate buffered saline
PL	Phospholipase
p-eNOS	Phosphorylated endothelial Nitric oxide synthase
PIGF	Placental Growth Factor
PAI-1	Plasminogen activator inhibitor 1
PAF	Platelet Activating Factor
PSGL-1	P-selectin glycoprotein ligand-1
SR	Scavenger receptor
SDG	Secoisolariciresinol diglucoside
SMC	Smooth muscle cells
SOD	Superoxide dismutase
TLC	Thin layer chromatography
TNFR	TNF receptor
TG	Triacylglycerol
TNF-a	Tumor Necrosis Factor-a

VCAM-1	Vascular cell adhesion molecule 1
VEGF	Vascular endothelial growth factor
VHDL	Very high density lipoprotein
VLDL	Very Low Density Lipoproteins
ΕΚΠΑ	Εθνικό & Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών
ΥΑΕ	Υγρά απόβλητα ελαιουργίας

9. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι

Πίνακας 15: Μέσοι όροι και τυπικές αποκλίσεις των βιοχημικών παραμέτρων των πειραματόζων που ανήκαν στις Ομάδες αναστολής των αθηρωματικών πλακών

Αναστολή Αθηρωματικών πλακών						
Παράμετρος	Ομάδα Α		Ομάδα Β		Ομάδα Γ	
	Μέση τιμή	Τυπική απόκλιση	Μέση τιμή	Τυπική απόκλιση	Μέση τιμή	Τυπική απόκλιση
Γλυκόζη (0 Ημέρες)	140,25	8,85	149,00	9,32	144,67	12,09
Γλυκόζη (45 Ημέρες)	114,67	7,19	118,00	7,87	112,17	11,74
Ολική χοληστερόλη (0 Ημέρες)	116,50	144,21	63,50	3,94	63,17	7,99
Ολική χοληστερόλη (45 Ημέρες)	2367,08	496,84	2055,00	305,42	1933,33	570,53
Τριακυλογλυκερόλες (0 Ημέρες)	90,25	58,22	74,50	15,32	74,17	18,26
Τριακυλογλυκερόλες (45 Ημέρες)	136,25	36,72	146,17	52,34	147,50	33,58
HDL χοληστερόλη (0 Ημέρες)	22,85	6,84	25,58	7,31	26,03	3,98
HDL χοληστερόλη (45 Ημέρες)	44,83	23,56	49,67	19,30	51,50	24,30
LDL χοληστερόλη (0 Ημέρες)	75,60	150,14	23,02	5,71	22,38	8,75
LDL χοληστερόλη (45 Ημέρες)	2295,00	483,33	1976,10	300,02	1852,33	545,32
Κατανάλωση τροφής (0-45 Ημέρες)	152,92	14,39	173,67	10,75	185,67	2,25
Βάρος Πειραματόζων (0 Ημέρες)	2412,08	265,19	2566,67	150,55	2542,00	138,79
Βάρος Πειραματόζων (45 Ημέρες)	3415,83	262,94	3386,67	223,40	3625,00	221,07
CRP (0 ημέρες)	2862,86	634,25	3200,29	419,51	2975,11	349,27
CRP (45 ημέρες)	2296,65	686,66	1947,73	468,50	2248,45	487,88
IL-1β (0 ημέρες)	119,78	82,46	116,37	58,83	131,48	43,34
IL-1β (45 ημέρες)	359,59	107,12	214,14	32,34	357,31	126,27
LpPLA2 (0 Ημέρες)	149,09	19,36	149,14	3,77	147,64	10,16
LpPLA2 (45 Ημέρες)	180,33	11,72	179,66	12,46	176,75	11,31
Μέγιστο πάχος Αθηρωματικών πλακών	197,89	43,59	88,48	57,65	129,67	52,71
Μέσο πάχος Αθηρωματικών πλακών	157,45	36,24	64,08	47,53	105,16	45,94
PAF-AH Λευκά (0 ημέρες)	472,39	92,57	505,87	55,48	490,26	46,16
PAF-AH Λευκά (45 ημέρες)	609,50	144,38	530,47	43,47	571,82	91,92
lyso-PAF AT Λευκά (0 ημέρες)	75,66	34,25	73,61	68,89	79,43	39,47
lyso-PAF AT Λευκά (45 ημέρες)	15,83	12,76	11,00	7,32	15,61	22,11
PAF-CPT Λευκά (0 Ημέρες)	91,28	51,58	111,58	77,73	66,46	57,20
PAF-CPT Λευκά (45 Ημέρες)	120,79	78,99	39,58	19,63	125,78	44,61
PAF-AH Αιμοπετάλια (0 Ημέρες)	826,11	138,09	866,75	137,83	897,13	84,34
PAF-AH Αιμοπετάλια (45 Ημέρες)	1165,54	179,36	962,30	100,85	1232,47	140,56
lyso-PAF AT Αιμοπετάλια (0 Ημέρες)	1,08E-01	1,09E-01	8,33E-02	2,93E-02	9,27E-02	6,42E-02
lyso-PAF AT Αιμοπετάλια (45 Ημέρες)	2,05E-01	1,44E-01	9,25E-02	3,25E-02	1,60E-01	5,34E-02
PAF-CPT Αιμοπετάλια (0 Ημέρες)	142,66	280,16	109,05	106,67	100,63	138,48
PAF-CPT Αιμοπετάλια (45 Ημέρες)	334,61	113,99	215,35	87,54	177,75	121,48
PAF-AH Ερυθρά (0 Ημέρες)	13,08	10,10	17,39	18,62	13,28	9,34
PAF-AH Ερυθρά (45 Ημέρες)	27,45	12,39	20,26	8,65	26,89	12,24
lyso-PAF AT Ερυθρά (0 Ημέρες)	9,08E-03	1,12E-02	6,08E-03	6,96E-03	4,85E-03	6,74E-03

Παράμετρος	Μέση τιμή	Τυπική απόκλιση	Μέση τιμή	Τυπική απόκλιση	Μέση τιμή	Τυπική απόκλιση
lyso-PAF AT Ερυθρά (45 Ημέρες)	5,47E-03	1,16E-02	9,02E-04	1,50E-04	8,47E-04	1,42E-04
PAF-CPT Ερυθρά (0 Ημέρες)	3,61E-01	4,24E-01	2,33E-01	2,63E-01	1,97E-01	2,85E-01
PAF-CPT Ερυθρά (45 Ημέρες)	2,23E-01	4,81E-01	3,56E-02	7,07E-03	3,34E-02	6,89E-03
PAF-AH Ήπαρ	970,18	120,33	1126,52	99,79	1244,84	166,25
PAF-AH Νεφρά	857,23	90,41	969,87	152,83	1165,32	136,84
PAF-AH Σπλήνα	550,51	65,08	781,80	113,79	777,60	163,34
lyso-PAF AT Ήπαρ	171,45	92,17	618,90	438,70	358,86	241,76
lyso-PAF AT Νεφρά	72,09	53,89	73,71	93,18	51,12	38,53
lyso-PAF AT Σπλήνα	729,83	604,29	1725,25	1150,49	763,75	652,70
PAF-CPT Ήπαρ	21,09	33,33	4,36	4,18	25,46	18,95
PAF-CPT Νεφρά	69,29	57,09	22,20	25,78	27,99	33,16
PAF-CPT Σπλήνα	534,65	203,54	322,73	321,55	389,19	152,69
TNF-α Ήπαρ	234,36	42,57	287,89	58,11	293,51	118,19
TNF-α Νεφρά	366,52	38,88	266,32	44,40	274,48	166,57
CRP Ήπαρ	51,28	9,87	64,15	8,26	84,10	37,00
CRP Νεφρά	69,01	9,37	78,25	16,68	83,86	35,50
IL-1β Ήπαρ	629,06	179,36	1017,51	306,19	982,54	558,77
IL-1β Νεφρά	926,25	208,38	1392,17	683,52	1645,94	593,54

Ομάδα Α: Αθηρογόνος Δίαιτα, Ομάδα Β: Αθηρογόνος Δίαιτα + γιαούρτι με ΥΑΕ, Ομάδα Γ: Αθηρογόνος Δίαιτα + απλό γιαούρτι.

Πίνακας 16: Μέσοι όροι και τυπικές αποκλίσεις των βιοχημικών παραμέτρων των πειραματόζων που ανήκαν στις Ομάδες υποστροφής των αθηρωματικών πλακών

Υποστροφή Αθηρωματικών πλακών				
Παράμετρος	Ομάδα Z		Ομάδα H	
	Μέση τιμή	Τυπική απόκλιση	Μέση τιμή	Τυπική απόκλιση
Γλυκόζη (0 Ημέρες)	134,50	2,07	146,00	9,42
Γλυκόζη (45 Ημέρες)	116,33	5,99	113,00	8,44
Γλυκόζη (90 Ημέρες)	118,75	4,62	119,67	13,02
Ολική χοληστερόλη (0 Ημέρες)	63,83	12,83	169,17	197,31
Ολική χοληστερόλη (45 Ημέρες)	2381,67	541,57	2352,50	499,27
Ολική χοληστερόλη (90 Ημέρες)	94,25	15,92	196,17	107,87
Τριακυλογλυκερόλες (0 Ημέρες)	80,83	13,83	99,67	83,99
Τριακυλογλυκερόλες (45 Ημέρες)	139,50	42,62	133,00	33,53
Τριακυλογλυκερόλες (90 Ημέρες)	29,25	2,78	27,00	14,37
HDL χοληστερόλη (0 Ημέρες)	25,75	8,35	19,95	3,62
HDL χοληστερόλη (45 Ημέρες)	39,83	25,82	49,83	22,24
HDL χοληστερόλη (90 Ημέρες)	36,50	4,67	33,17	14,86
LDL χοληστερόλη (0 Ημέρες)	21,92	7,62	129,28	206,45
LDL χοληστερόλη (45 Ημέρες)	2313,93	535,09	2276,07	476,17
LDL χοληστερόλη (90 Ημέρες)	51,90	14,00	157,60	95,87
Κατανάλωση τροφής (0-45 Ημέρες)	145,33	7,28	160,50	16,26
Κατανάλωση τροφής (45-90 Ημέρες)	168,33	31,37	166,50	30,92
Βάρος Πειραματόζων (0 Ημέρες)	2451,67	172,09	2372,50	348,34
Βάρος Πειραματόζων (45 Ημέρες)	3313,33	175,46	3518,33	309,99
Βάρος Πειραματόζων (90 Ημέρες)	4060,00	272,98	4103,33	433,02
CRP (0 ημέρες)	3202,63	591,48	2523,09	508,02
CRP (45 ημέρες)	2712,24	734,33	1881,07	289,07
CRP (90 ημέρες)	1158,59	275,65	1219,65	208,44
IL-1β (0 ημέρες)	161,76	99,90	77,81	27,43
IL-1β (45 ημέρες)	405,14	74,53	314,04	121,29
IL-1β (90 ημέρες)	82,70	44,52	105,40	22,59
LpPLA2 (0 Ημέρες)	140,86	11,44	157,32	23,05
LpPLA2 (45 Ημέρες)	185,51	10,04	175,14	11,70
LpPLA2 (90 Ημέρες)	124,96	9,24	97,98	19,98
Μέγιστο πάχος Αθηρωματικών πλακών	242,94	67,93	366,60	87,08
Μέσο πάχος Αθηρωματικών πλακών	207,47	64,85	331,27	91,95
PAF-AH Λευκά (0 ημέρες)	507,25	113,21	437,53	55,84
PAF-AH Λευκά (45 ημέρες)	595,26	127,33	623,73	170,77
PAF-AH Λευκά (90 ημέρες)	272,94	36,79	312,31	82,57
lyso- PAF AT Λευκά (0 ημέρες)	69,23	24,81	82,10	43,21
lyso- PAF AT Λευκά (45 ημέρες)	20,54	16,48	11,13	5,77
lyso- PAF AT Λευκά (90 ημέρες)	7,46	12,39	3,60	4,59

Παράμετρος	Μέση τιμή	Τυπική απόκλιση	Μέση τιμή	Τυπική απόκλιση
PAF-CPT Λευκά (0 Ημέρες)	63,81	10,00	118,74	62,80
PAF-CPT Λευκά (45 Ημέρες)	106,03	81,31	135,56	81,18
PAF-CPT Λευκά (90 Ημέρες)	46,67	9,70	269,62	70,53
PAF-AH Αιμοπετάλια (0 Ημέρες)	808,80	124,64	843,42	160,30
PAF-AH Αιμοπετάλια (45 Ημέρες)	1250,39	209,15	1080,69	98,77
PAF-AH Αιμοπετάλια (90 Ημέρες)	706,19	67,10	864,77	147,33
lyso-PAF AT Αιμοπετάλια (0 Ημέρες)	7,37E-02	4,76E-02	1,42E-01	1,46E-01
lyso-PAF AT Αιμοπετάλια (45 Ημέρες)	1,24E-01	7,27E-02	2,86E-01	1,56E-01
lyso-PAF AT Αιμοπετάλια (90 Ημέρες)	1,26E-01	7,37E-02	3,20E-01	1,75E-01
PAF-CPT Αιμοπετάλια (0 Ημέρες)	100,76	117,35	184,56	393,31
PAF-CPT Αιμοπετάλια (45 Ημέρες)	329,09	94,26	340,14	140,09
PAF-CPT Αιμοπετάλια (90 Ημέρες)	109,15	51,75	245,18	202,62
PAF-AH Ερυθρά (0 Ημέρες)	16,04	13,30	10,11	5,12
PAF-AH Ερυθρά (45 Ημέρες)	20,46	9,60	34,43	11,33
PAF-AH Ερυθρά (90 Ημέρες)	8,04	1,17	7,51	1,67
lyso-PAF AT Ερυθρά (0 Ημέρες)	1,43E-02	1,37E-02	3,86E-03	4,65E-03
lyso-PAF AT Ερυθρά (45 Ημέρες)	3,84E-03	7,33E-03	7,11E-03	1,54E-02
lyso-PAF AT Ερυθρά (90 Ημέρες)	5,47E-03	4,50E-03	4,66E-03	3,08E-03
PAF-CPT Ερυθρά (0 Ημέρες)	5,61E-01	5,10E-01	1,61E-01	1,96E-01
PAF-CPT Ερυθρά (45 Ημέρες)	1,48E-01	2,77E-01	2,98E-01	6,48E-01
PAF-CPT Ερυθρά (90 Ημέρες)	2,26E-01	1,91E-01	1,91E-01	1,30E-01
PAF-AH Ήπαρ	903,12	128,90	1037,23	66,67
PAF-AH Νεφρά	862,45	38,97	852,00	128,05
PAF-AH Σπλήνα	547,23	45,96	553,79	84,73
lyso-PAF AT Ήπαρ	185,28	66,34	157,62	117,60
lyso-PAF AT Νεφρά	97,34	56,47	46,85	40,87
lyso-PAF AT Σπλήνα	459,04	287,88	1000,62	737,91
PAF-CPT Ήπαρ	8,82	7,31	33,36	45,05
PAF-CPT Νεφρά	23,01	33,78	115,57	29,82
PAF-CPT Σπλήνα	359,15	90,17	710,15	95,35
TNF-α Ήπαρ	205,90	30,01	262,81	33,82
TNF-α Νεφρά	341,04	39,05	392,01	15,54
CRP Ήπαρ	44,68	3,53	57,88	9,87
CRP Νεφρά	63,21	7,77	74,82	7,20
IL-1β Ήπαρ	567,15	63,86	690,98	239,78
IL-1β Νεφρά	928,38	247,94	924,13	184,50

Ομάδα Z: Τυπική Κουνελοτροφή+ γιαούρτι με ΥΑΕ, Ομάδα H: Τυπική Κουνελοτροφή + απλό γιαούρτι.

10. ΑΝΑΦΟΡΕΣ

1. Rokitsansky, C., *A manual of pathological anatomy*. London, Sydenham Society, 1852: p. 261.
2. Stocker, R. and J.F. Keane, Jr., *Role of oxidative modifications in atherosclerosis*. *Physiol Rev*, 2004. **84**(4): p. 1381-478.
3. Virchow, R., *Cellular pathology. As based upon physiological and pathological histology. Lecture XVI--Atheromatous affection of arteries*. 1858. *Nutr Rev*, 1989. **47**(1): p. 23-5.
4. Abid, M.R., et al., *NADPH oxidase activity is required for endothelial cell proliferation and migration*. *FEBS Lett*, 2000. **486**(3): p. 252-6.
5. Abrahamsson, T., et al., *Vascular bound recombinant extracellular superoxide dismutase type C protects against the detrimental effects of superoxide radicals on endothelium-dependent arterial relaxation*. *Circ Res*, 1992. **70**(2): p. 264-71.
6. Abu-Soud, H.M. and S.L. Hazen, *Nitric oxide is a physiological substrate for mammalian peroxidases*. *J Biol Chem*, 2000. **275**(48): p. 37524-32.
7. Ross, R. and J.A. Glomset, *Atherosclerosis and the arterial smooth muscle cell: Proliferation of smooth muscle is a key event in the genesis of the lesions of atherosclerosis*. *Science*, 1973. **180**(93): p. 1332-9.
8. Consigny, P.M., *Pathogenesis of Atherosclerosis*. *Am J Roentgenol* 1995. **164**(3): p. 553-558.
9. Jonasson, L., et al., *Regional Accumulations of T-Cells, Macrophages, and Smooth-Muscle Cells in the Human Atherosclerotic Plaque*. *Arteriosclerosis*, 1986. **6**(2): p. 131-138.
10. Ross, R. and J.A. Glomset, *The pathogenesis of atherosclerosis (second of two parts)*. *N Engl J Med*, 1976. **295**(8): p. 420-5.
11. Ross, R. and J.A. Glomset, *The pathogenesis of atherosclerosis (first of two parts)*. *N Engl J Med*, 1976. **295**(7): p. 369-77.
12. Ross, R., *Atherosclerosis--an inflammatory disease*. *N Engl J Med*, 1999. **340**(2): p. 115-26.
13. Carew, T.E., et al., *Measurement in vivo of irreversible degradation of low density lipoprotein in the rabbit aorta. Predominance of intimal degradation*. *Arteriosclerosis*, 1984. **4**(3): p. 214-24.
14. Schwenke, D.C. and T.E. Carew, *Initiation of atherosclerotic lesions in cholesterol-fed rabbits. II. Selective retention of LDL vs. selective increases in LDL permeability in susceptible sites of arteries*. *Arteriosclerosis*, 1989. **9**(6): p. 908-18.
15. Schwenke, D.C. and D.B. Zilversmit, *The arterial barrier to lipoprotein influx in the hypercholesterolemic rabbit. 1. Studies during the first two days after mild aortic injury*. *Atherosclerosis*, 1989. **77**(2-3): p. 91-103.
16. Falcone, D.J., D.P. Hajjar, and C.R. Minick, *Lipoprotein and albumin accumulation in reendothelialized and deendothelialized aorta*. *Am J Pathol*, 1984. **114**(1): p. 112-20.
17. Camejo, G., et al., *Binding of low density lipoproteins by proteoglycans synthesized by proliferating and quiescent human arterial smooth muscle cells*. *J Biol Chem*, 1993. **268**(19): p. 14131-7.
18. Yla-Herttuala, S., et al., *Glycosaminoglycans and apolipoproteins B and A-I in human aortas. Chemical and immunological analysis of lesion-free aortas from children and adults*. *Arteriosclerosis*, 1987. **7**(4): p. 333-40.
19. Boren, J., et al., *Identification of the principal proteoglycan-binding site in LDL. A single-point mutation in apo-B100 severely affects proteoglycan interaction without affecting LDL receptor binding*. *J Clin Invest*, 1998. **101**(12): p. 2658-64.
20. Skalen, K., et al., *Subendothelial retention of atherogenic lipoproteins in early atherosclerosis*. *Nature*, 2002. **417**(6890): p. 750-4.
21. Veniant, M.M., et al., *Susceptibility to atherosclerosis in mice expressing exclusively apolipoprotein B48 or apolipoprotein B100*. *J Clin Invest*, 1997. **100**(1): p. 180-8.
22. Flood, C., et al., *Identification of the proteoglycan binding site in apolipoprotein B48*. *J Biol Chem*, 2002. **277**(35): p. 32228-33.
23. Williams, K.J., et al., *Lipoprotein lipase modulates net secretory output of apolipoprotein B in vitro. A possible pathophysiologic explanation for familial combined hyperlipidemia*. *J Clin Invest*, 1991. **88**(4): p. 1300-6.
24. Williams, K.J., et al., *Mechanisms by which lipoprotein lipase alters cellular metabolism of lipoprotein(a), low density lipoprotein, and nascent lipoproteins. Roles for low density*

- lipoprotein receptors and heparan sulfate proteoglycans*. J Biol Chem, 1992. **267**(19): p. 13284-92.
25. Nievelstein, P.F., et al., *Lipid accumulation in rabbit aortic intima 2 hours after bolus infusion of low density lipoprotein. A deep-etch and immunolocalization study of ultrarapidly frozen tissue*. Arterioscler Thromb, 1991. **11**(6): p. 1795-805.
26. Tamminen, M., et al., *Ultrastructure of early lipid accumulation in ApoE-deficient mice*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1999. **19**(4): p. 847-53.
27. Xu, X.X. and I. Tabas, *Sphingomyelinase enhances low density lipoprotein uptake and ability to induce cholesteryl ester accumulation in macrophages*. J Biol Chem, 1991. **266**(36): p. 24849-58.
28. Hannun, Y.A., *The sphingomyelin cycle and the second messenger function of ceramide*. J Biol Chem, 1994. **269**(5): p. 3125-8.
29. Joseph, C.K., et al., *Bacterial lipopolysaccharide has structural similarity to ceramide and stimulates ceramide-activated protein kinase in myeloid cells*. J Biol Chem, 1994. **269**(26): p. 17606-10.
30. Hakala, J.K., et al., *Lysosomal enzymes are released from cultured human macrophages, hydrolyze LDL in vitro, and are present extracellularly in human atherosclerotic lesions*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2003. **23**(8): p. 1430-6.
31. Ismail, N.A., M.Z. Alavi, and S. Moore, *Lipoprotein-proteoglycan complexes from injured rabbit aortas accelerate lipoprotein uptake by arterial smooth muscle cells*. Atherosclerosis, 1994. **105**(1): p. 79-87.
32. Vijayagopal, P., et al., *Lipoprotein-proteoglycan complexes from atherosclerotic lesions promote cholesteryl ester accumulation in human monocytes/macrophages*. Arterioscler Thromb, 1992. **12**(2): p. 237-49.
33. Goldstein, J.L., et al., *Binding site on macrophages that mediates uptake and degradation of acetylated low density lipoprotein, producing massive cholesterol deposition*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1979. **76**(1): p. 333-7.
34. Steinbrecher, U.P., et al., *Modification of low density lipoprotein by endothelial cells involves lipid peroxidation and degradation of low density lipoprotein phospholipids*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1984. **81**(12): p. 3883-7.
35. Haberland, M.E., A.M. Fogelman, and P.A. Edwards, *Specificity of receptor-mediated recognition of malondialdehyde-modified low density lipoproteins*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1982. **79**(6): p. 1712-6.
36. Haberland, M.E., C.L. Olch, and A.M. Fogelman, *Role of lysines in mediating interaction of modified low density lipoproteins with the scavenger receptor of human monocyte macrophages*. J Biol Chem, 1984. **259**(18): p. 11305-11.
37. Cushing, S.D., et al., *Minimally modified low density lipoprotein induces monocyte chemotactic protein 1 in human endothelial cells and smooth muscle cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1990. **87**(13): p. 5134-8.
38. Rajavashisth, T.B., et al., *Induction of endothelial cell expression of granulocyte and macrophage colony-stimulating factors by modified low-density lipoproteins*. Nature, 1990. **344**(6263): p. 254-7.
39. Navab, M., et al., *Monocyte transmigration induced by modification of low density lipoprotein in cocultures of human aortic wall cells is due to induction of monocyte chemotactic protein 1 synthesis and is abolished by high density lipoprotein*. J Clin Invest, 1991. **88**(6): p. 2039-46.
40. Boring, L., et al., *Decreased lesion formation in CCR2^{-/-} mice reveals a role for chemokines in the initiation of atherosclerosis*. Nature, 1998. **394**(6696): p. 894-7.
41. Gosling, J., et al., *MCP-1 deficiency reduces susceptibility to atherosclerosis in mice that overexpress human apolipoprotein B*. J Clin Invest, 1999. **103**(6): p. 773-8.
42. Quinn, M.T., et al., *Oxidatively modified low density lipoproteins: a potential role in recruitment and retention of monocyte/macrophages during atherogenesis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1987. **84**(9): p. 2995-8.
43. McMurray, H.F., S. Parthasarathy, and D. Steinberg, *Oxidatively modified low density lipoprotein is a chemoattractant for human T lymphocytes*. J Clin Invest, 1993. **92**(2): p. 1004-8.

44. Stiko-Rahm, A., et al., *Native and oxidized LDL enhances production of PDGF AA and the surface expression of PDGF receptors in cultured human smooth muscle cells*. *Arterioscler Thromb*, 1992. **12**(9): p. 1099-109.
45. Parums, D.V., D.L. Brown, and M.J. Mitchinson, *Serum antibodies to oxidized low-density lipoprotein and ceroid in chronic periaortitis*. *Arch Pathol Lab Med*, 1990. **114**(4): p. 383-7.
46. Salonen, J.T., et al., *Autoantibody against oxidised LDL and progression of carotid atherosclerosis*. *Lancet*, 1992. **339**(8798): p. 883-7.
47. Griffith, R.L., et al., *Low density lipoprotein metabolism by human macrophages activated with low density lipoprotein immune complexes. A possible mechanism of foam cell formation*. *J Exp Med*, 1988. **168**(3): p. 1041-59.
48. Klimov, A.N., et al., *Lipoprotein-antibody immune complexes. Their catabolism and role in foam cell formation*. *Atherosclerosis*, 1985. **58**(1-3): p. 1-15.
49. Libby, P., *Inflammation in atherosclerosis*. *Nature*, 2002. **420**(6917): p. 868-74.
50. Demopoulos, C.A., H.C. Karantonis, and S. Antonopoulou, *Platelet activating factor - a molecular link between atherosclerosis theories*. *Eur J Lipid Sci Technol*, 2003. **105**(11): p. 705-716.
51. Prescott, S.M., et al., *Platelet-activating factor and related lipid mediators*. *Annu Rev Biochem*, 2000. **69**: p. 419-45.
52. Antonopoulou, S., et al., *PAF, a potent lipid mediator*, in *Bioactive Phospholipids. Role in inflammation and Atherosclerosis*, A.D. Tselepis, Editor. 2008, Transworld Research Network: Kerala, India. p. 85-134.
53. Benveniste, J., *Paf-acether, an ether phospho-lipid with biological activity*. *Prog Clin Biol Res*, 1988. **282**: p. 73-85.
54. Bussolino, F. and G. Camussi, *Platelet-activating factor produced by endothelial cells. A molecule with autocrine and paracrine properties*. *Eur J Biochem*, 1995. **229**(2): p. 327-37.
55. Dentan, C., et al., *Phagocytic activation induces formation of platelet-activating factor in human monocyte-derived macrophages and in macrophage-derived foam cells Relevance to the inflammatory reaction in atherogenesis*. *Eur J Biochem*, 1996. **236**(1): p. 48-55.
56. Evangelou, A.M., *Platelet-activating factor (PAF): implications for coronary heart and vascular diseases*. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 1994. **50**(1): p. 1-28.
57. Chao, W. and M.S. Olson, *Platelet-Activating-Factor - Receptors and Signal-Transduction*. *Biochem J*, 1993. **292**: p. 617-629.
58. Hwang, S.B., *Specific receptors of platelet-activating factor, receptor heterogeneity, and signal transduction mechanisms*. *Journal of Lipid Mediators*, 1990. **2**(3-4): p. 123-158.
59. Demopoulos, C.A., R.N. Pinckard, and D.J. Hanahan, *Platelet-activating factor. Evidence for 1-O-alkyl-2-acetyl-sn-glycerol-3-phosphorylcholine as the active component (a new class of lipid chemical mediators)*. *J Biol Chem*, 1979. **254**(19): p. 9355-8.
60. Demopoulos, C.A. and S. Antonopoulou, *A discovery trip to compounds with PAF-like activity*. *Adv Exp Med Biol*, 1996. **416**: p. 59-63.
61. McIntyre, T.M., G.A. Zimmerman, and S.M. Prescott, *Biologically active oxidized phospholipids*. *J Biol Chem*, 1999. **274**(36): p. 25189-25192.
62. Camussi, G., C. Tetta, and C. Baglioni, *The role of platelet-activating factor in inflammation*. *Clin Immunol Immunopathol*, 1990. **57**(3): p. 331-8.
63. Labrakis-Lazanas, K., et al., *PAF of biological fluids in disease: blood levels in allergic rhinitis*. *Haematologica*, 1988. **73**(5): p. 379-82.
64. Beer, J.H., B. Wuthrich, and A. von Felten, *Allergen exposure in acute asthma causes the release of platelet-activating factor (PAF) as demonstrated by the desensitization of platelets to PAF*. *Int Arch Allergy Immunol*, 1995. **106**(3): p. 291-6.
65. Cavallo-Perin, P., et al., *Increased blood levels of platelet-activating factor in insulin-dependent diabetic patients with microalbuminuria*. *Nephrol Dial Transplant*, 2000. **15**(7): p. 994-9.
66. Kudolo, G.B. and R.A. DeFronzo, *Urinary platelet-activating factor excretion is elevated in non-insulin dependent diabetes mellitus*. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*, 1999. **57**(2-3): p. 87-98.
67. Imaizumi, T.A., et al., *Effect of Cigarette-Smoking on the Levels of Platelet-Activating Factor-Like Lipid(S) in Plasma-Lipoproteins*. *Atherosclerosis*, 1991. **87**(1): p. 47-55.

68. Travers, J.B., *Oxidative stress can activate the epidermal platelet-activating factor receptor*. J Invest Dermatol, 1999. **112**(3): p. 279-83.
69. Rouis, M., F. Nigon, and M.J. Chapman, *Platelet activating factor is a potent stimulant of the production of active oxygen species by human monocyte-derived macrophages*. Biochem Biophys Res Commun, 1988. **156**(3): p. 1293-301.
70. Stewart, A.G., et al., *Platelet-activating factor may act as a second messenger in the release of eicosanoids and superoxide anions from leukocytes and endothelial cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1990. **87**(8): p. 3215-9.
71. Bautista, A.P. and J.J. Spitzer, *Platelet activating factor stimulates and primes the liver, Kupffer cells and neutrophils to release superoxide anion*. Free Radic Res Commun, 1992. **17**(3): p. 195-209.
72. Takahashi, S., et al., *Role of platelet-activating factor (PAF) in superoxide production by human polymorphonuclear leukocytes*. Lipids, 1991. **26**(12): p. 1227-30.
73. Braquet, P., et al., *Effect of platelet-activating factor on tumor necrosis factor-induced superoxide generation from human neutrophils. Possible involvement of G proteins*. Lipids, 1991. **26**(12): p. 1071-5.
74. Gaut, J.P. and J.W. Heinecke, *Mechanisms for oxidizing low-density lipoprotein. Insights from patterns of oxidation products in the artery wall and from mouse models of atherosclerosis*. Trends Cardiovasc Med, 2001. **11**(3-4): p. 103-12.
75. Liapikos, T.A., et al., *Platelet-activating factor formation during oxidative modification of low-density lipoprotein when PAF-acetylhydrolase has been inactivated*. Biochim Biophys Acta, 1994. **1212**(3): p. 353-60.
76. Tsoukatos, D.C., et al., *Copper-catalyzed oxidation mediates PAF formation in human LDL subspecies. Protective role of PAF:acetylhydrolase in dense LDL*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1997. **17**(12): p. 3505-12.
77. Liapikos, T.A., et al., *Platelet-Activating-Factor Formation during Oxidative Modification of Low-Density-Lipoprotein When Paf-Acetylhydrolase Has Been Inactivated*. Biochimica Et Biophysica Acta-Lipids and Lipid Metabolism, 1994. **1212**(3): p. 353-360.
78. Marathe, G.K., et al., *Inflammatory platelet-activating factor-like phospholipids in oxidized low density lipoproteins are fragmented alkyl phosphatidylcholines*. J Biol Chem, 1999. **274**(40): p. 28395-28404.
79. Snyder, F., *Platelet-activating factor: the biosynthetic and catabolic enzymes*. Biochem J, 1995. **305** (Pt 3): p. 689-705.
80. Stafforini, D.M., et al., *Platelet-activating factor acetylhydrolases*. J Biol Chem, 1997. **272**(29): p. 17895-8.
81. Stafforini, D.M., et al., *The platelet-activating factor acetylhydrolase from human plasma prevents oxidative modification of low-density lipoprotein*. Trans Assoc Am Physicians, 1992. **105**: p. 44-63.
82. Dentan, C., et al., *PAF-acether-degrading acetylhydrolase in plasma LDL is inactivated by copper- and cell-mediated oxidation*. Arterioscler Thromb, 1994. **14**(3): p. 353-60.
83. Ambrosio, G., et al., *Oxygen radicals inhibit human plasma acetylhydrolase, the enzyme that catabolizes platelet-activating factor*. J Clin Invest, 1994. **93**(6): p. 2408-16.
84. Kato, M., et al., *Platelet-activating factor-induced enhancement of superoxide anion generation in guinea-pigs*. Eur J Pharmacol, 1993. **232**(1): p. 7-12.
85. Schwappach, J.R., J.G. Wood, and L.Y. Cheung, *Superoxide dismutase attenuates effects of platelet-activating factor on gastric microcirculation*. J Surg Res, 1995. **59**(6): p. 733-8.
86. Tsoukatos, D.C., et al., *Platelet-activating factor acetylhydrolase and transacetylase activities in human plasma low-density lipoprotein*. Biochem J, 2001. **357**(Pt 2): p. 457-64.
87. Tsoukatos, D.C., et al., *Platelet-activating factor acetylhydrolase and transacetylase activities in human aorta and mammary artery*. Journal of Lipid Research, 2008. **49**(10): p. 2240-2249.
88. Montrucchio, G., G. Alloatti, and G. Camussi, *Role of platelet-activating factor in cardiovascular pathophysiology*. Physiological Reviews, 2000. **80**(4): p. 1669-1699.
89. Golino, P., et al., *Short-Term and Long-Term Role of Platelet-Activating-Factor as a Mediator of in-Vivo Platelet-Aggregation*. Circulation, 1993. **88**(3): p. 1205-1214.
90. Mcmanus, L.M., D.J. Hanahan, and R.N. Pinckard, *Human-Platelet Stimulation by Acetyl Glyceryl Ether Phosphorylcholine*. J Clin Invest, 1981. **67**(3): p. 903-906.

91. Kulikov, V.I. and G.I. Muzya, *Ether lipids and platelet-activating factor: evolution and cellular function*. Biochemistry (Moscow), 1997. **62**(10): p. 1103-1108.
92. Shattil, S.J., H. Kashiwagi, and N. Pampori, *Integrin signaling: The platelet paradigm*. Blood, 1998. **91**(8): p. 2645-2657.
93. Barry, O.P. and G.A. FitzGerald, *Mechanisms of cellular activation by platelet microparticles*. Thrombosis and Haemostasis, 1999. **82**(2): p. 794-800.
94. Klinger, M.H.F., *Platelets and inflammation*. Anat Embryol, 1997. **196**(1): p. 1-11.
95. Weyrich, A.S., et al., *Signal-dependent translation of a regulatory protein, Bcl-3, in activated human platelets*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1998. **95**(10): p. 5556-5561.
96. Pabla, R., et al., *Integrin-dependent control of translation: Engagement of integrin alpha(IIb)beta(3) regulates synthesis of proteins in activated human platelets*. Journal of Cell Biology, 1999. **144**(1): p. 175-184.
97. Lindemann, S., et al., *Activated platelets mediate inflammatory signaling by regulated interleukin 1 beta synthesis*. Journal of Cell Biology, 2001. **154**(3): p. 485-490.
98. Lorant, D.E., et al., *Inflammatory Roles of P-Selectin*. J Clin Invest, 1993. **92**(2): p. 559-570.
99. Zimmerman, G.A., et al., *The platelet-activating factor signaling system and its regulators in syndromes of inflammation and thrombosis*. Crit Care Med, 2002. **30**(5): p. S294-S301.
100. Lorant Diane E., Z.G.A., McIntyre Thomas M., Prescott Stephen M., *Platelet-activating factor mediates procoagulant activity on the surface of endothelial cells by promoting leukocyte adhesion*. Seminars in Cell Biology, 1995. **6**(5): p. 295-303.
101. Weyrich, A.S., et al., *Monocyte tethering by P-selectin regulates monocyte chemotactic protein-1 and tumor necrosis factor-alpha secretion. Signal integration and NF-kappa B translocation*. J Clin Invest, 1995. **95**(5): p. 2297-303.
102. Weyrich, A.S., et al., *Activated platelets signal chemokine synthesis by human monocytes*. J Clin Invest, 1996. **97**(6): p. 1525-34.
103. Smith, B.R. and H.M. Rinder, *Interactions of platelets and endothelial cells with erythrocytes and leukocytes in thrombotic thrombocytopenic purpura*. Semin Hematol, 1997. **34**(2): p. 90-7.
104. Handley, D.A., et al., *Effect of platelet activating factor on endothelial permeability to plasma macromolecules*. Immunopharmacology, 1984. **8**(3-4): p. 137-42.
105. Wu, K.K., *Endothelial cells in hemostasis, thrombosis, and inflammation*. Hosp Pract (Off Ed), 1992. **27**(4): p. 145-50, 152, 163-6.
106. Peplow, P.V., *Regulation of platelet-activating factor (PAF) activity in human diseases by phospholipase A2 inhibitors, PAF acetylhydrolases, PAF receptor antagonists and free radical scavengers*. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids, 1999. **61**(2): p. 65-82.
107. Prescott, S.M., et al., *Inflammation as an early component of atherosclerosis and vascular damage--a role for P-selectin and platelet-activating factor*. Jpn Circ J, 1996. **60**(3): p. 137-41.
108. Gerrity, R.G., *The role of the monocyte in atherogenesis: II. Migration of foam cells from atherosclerotic lesions*. Am J Pathol, 1981. **103**(2): p. 191-200.
109. Steinberg, D., et al., *Beyond cholesterol. Modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity*. N Engl J Med, 1989. **320**(14): p. 915-24.
110. Falk, E., P.K. Shah, and V. Fuster, *Coronary plaque disruption*. Circulation, 1995. **92**(3): p. 657-71.
111. Jouvin-Marche, E., et al., *Biosynthesis of Paf-acether (platelet-activating factor). VII. Precursors of Paf-acether and acetyl-transferase activity in human leukocytes*. J Immunol, 1984. **133**(2): p. 892-8.
112. Ross, R., *The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s*. Nature, 1993. **362**(6423): p. 801-9.
113. Pan, Z., V.V. Kravchenko, and R.D. Ye, *Platelet-activating factor stimulates transcription of the heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor in monocytes. Correlation with an increased kappa B binding activity*. J Biol Chem, 1995. **270**(14): p. 7787-90.
114. Hegele, R.A., *The pathogenesis of atherosclerosis*. Clin Chim Acta, 1996. **246**(1-2): p. 21-38.
115. Mueller, H.W., et al., *Measurement of Platelet-Activating-Factor in a Canine Model of Coronary-Thrombosis and in Endarterectomy Samples from Patients with Advanced Coronary-Artery Disease*. Circ Res, 1995. **77**(1): p. 54-63.

116. Heery, J.M., et al., *Oxidatively modified LDL contains phospholipids with platelet-activating factor-like activity and stimulates the growth of smooth muscle cells*. J Clin Invest, 1995. **96**(5): p. 2322-30.
117. Cirillo, P., et al., [*Effect of platelets and leukocytes on in vitro proliferation of muscle cells: role of platelet-derived chemical mediators*]. Cardiologia, 1996. **41**(2): p. 141-7.
118. Keaney, J.F.j., *Atherosclerosis: from lesion formation to plaque activation and endothelial dysfunction*. Molecular Aspects of Medicine, 2000. **21** p. 99-166.
119. Rouis, M., et al., *Expression of elastase activity by human monocyte-macrophages is modulated by cellular cholesterol content, inflammatory mediators, and phorbol myristate acetate*. Arteriosclerosis, 1990. **10**(2): p. 246-55.
120. Bocan, T.M., T.A. Schifani, and J.R. Guyton, *Ultrastructure of the human aortic fibrolipid lesion. Formation of the atherosclerotic lipid-rich core*. Am J Pathol, 1986. **123**(3): p. 413-24.
121. Valone, F.H., et al., *Specific binding of phospholipid platelet-activating factor by human platelets*. Journal of Immunology, 1982. **129**(4): p. 1637-1641.
122. *Platelet-Activating Factor in Endotoxin and Immune Diseases*. INFLAMMATORY DISEASE AND THERAPY, ed. D.E. Furst. 1990, New York: MARCEL DEKKER, INC. 692.
123. Hwang, S.B., et al., *Specific receptor sites for 1-O-alkyl-2-O-acetyl-sn-glycero-3-phosphocholine (Platelet Activating Factor) on rabbit platelet and guinea pig smooth muscle membranes*. Biochemistry, 1983. **22**(20): p. 4756-4763.
124. Ishii, S. and T. Shimizu, *Platelet-activating factor (PAF) receptor and genetically engineered PAF receptor mutant mice*. Prog Lipid Res, 2000. **39**(1): p. 41-82.
125. Honda, Z., S. Ishii, and T. Shimizu, *Platelet-activating factor receptor*. Journal of Biochemistry, 2002. **131**(6): p. 773-9.
126. Terashita, Z.I., Y. Imura, and K. Nishikawa, *Inhibition by CV-3988 of the binding of [3H]-platelet activating factor (PAF) to the platelet*. Biochemical Pharmacology, 1985. **34**(9): p. 1491-1495.
127. Nunez, D., M. Chignard, and R. Korth, *Specific inhibition of PAF-acether-induced platelet activation by BN 52021 and comparison with the PAF-acether inhibitors Kadsurenone and CV 3988*. European Journal of Pharmacology, 1986. **123**(2): p. 197-205.
128. Oura, Y., et al., *Effect of Platelet Activating Factor(Paf) on the Collagen Induced Platelet-Aggregation in Whole-Blood*. Thrombosis and Haemostasis, 1987. **58**(1): p. 185-185.
129. Terashita, Z.I., et al., *A lethal role of platelet activating factor in anaphylactic shock in mice*. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 1987. **243**(1): p. 378-383.
130. Terashita, Z., S. Tsushima, and Y. Yoshioka, *CV-3988 - A specific antagonist of platelet activating factor (PAF)*. Life Sciences, 1983. **32**(17): p. 1975-1982.
131. Arnout, J., et al., *Effectiveness and tolerability of CV-3988, a selective PAF antagonist, after intravenous administration to man*. British Journal of Clinical Pharmacology, 1988. **25**(4): p. 445-451.
132. Qayumi, A.K., W.R.E. Jamieson, and A. Poostizadeh, *Effects of platelet-activating factor antagonist CV-3988 in preservation of heart and lung for transplantation*. Annals of Thoracic Surgery, 1991. **52**(4): p. 1026-1032.
133. Hadvary, P. and H.R. Baumgartner, *Interference of PAF-acether antagonists with platelet aggregation and with the formation of platelet thrombi*. Prostaglandins, 1985. **30**(4): p. 694.
134. Terashita, Z.I., Y. Imura, and M. Takatani, *CV-6209, a highly potent antagonist of platelet activating factor in vitro and in vivo*. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 1987. **242**(1): p. 263-268.
135. Nogami, M., et al., *The effect of CV-3988 and CV-6209 on the acute gastric erosions of rats due to water-immersion and restraint stress*. Lipids, 1991. **26**(12): p. 1354-1355.
136. Karantonis, H.C., S. Antonopoulou, and C.A. Demopoulos, *Antithrombotic lipid minor constituents from vegetable oils. Comparison between olive oils and others*. J. Agric. Food Chem., 2002. **50**(5): p. 1150-1160.
137. Karantonis, H.C., et al., *Bioactive polar lipids in olive oil, pomace and waste byproducts*. J Food Biochem, 2008. **32**(4): p. 443-459.
138. Fragopoulou, E., S. Antonopoulou, and C.A. Demopoulos, *Biologically active lipids with antiatherogenic properties from white wine and must*. J. Agric. Food Chem., 2002. **50**(9): p. 2684-94.

139. Fan, G.J., et al., *Glyceroglycolipids, a novel class of platelet-activating factor antagonists from Kalimeris indica*. *Phytochemistry Letters*, 2008. **1**(4): p. 207-210.
140. Karantonis, H.C., et al., *In vivo antiatherogenic properties of olive oil and its constituent lipid classes in hyperlipidemic rabbits*. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*, 2006. **16**(3): p. 174-185.
141. Tsantila, N., et al., *Atherosclerosis inhibition and regression can be induced by extracts of olive oil and its respective pomace*. 33rd FEBS Congress & 11th IUBMB Conference, 2008.
142. Antonopoulou, S., et al., *Bioactive polar lipids from Chroococcidiopsis sp. (Cyanobacteria)*. *Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology*, 2005. **142**(3): p. 269-282.
143. Handley, D.A., R.G. Van Valen, and J.C. Tomesch, *Biological properties of the antagonist SRI 63-441 in the PAF and endotoxin models of hypotension in the rat and dog*. *Immunopharmacology*, 1987. **13**(2): p. 125-132.
144. Handley, D.A., J.C. Tomesch, and R.N. Saunders, *Inhibition of PAF-induced systemic responses in the rat, guinea pig, dog and primate by the receptor antagonist SRI 63-441*. *Thrombosis and Haemostasis*, 1986. **56**(1): p. 40-44.
145. Patterson, R., et al., *Evaluation of the effect of a platelet activating factor antagonist on platelet activating factor and Ascaris antigen-induced airway responses in rhesus monkeys*. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 1987. **110**(5): p. 606-611.
146. Hwang, S.B., M.H. Lam, and T. Biftu, *Trans-2,3-bis-(3,4,5-trimethoxyphenyl)tetrahydrofuran. An orally active specific and competitive receptor antagonist of platelet activating factor*. *Journal of Biological Chemistry*, 1985. **260**(29): p. 15639-15645.
147. Shen, T.Y., S.B. Hwang, and M.N. Chang, *Characterization of a platelet-activating factor receptor antagonist isolated from haifenteng (Piper futokadsura): Specific inhibition of in vitro and in vivo platelet-activating factor-induced effects*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1985. **82**(3): p. 672-676.
148. Doebber, T.W., M.S. Wu, and W.C. Robbins, *Platelet activating factor (PAF) involvement in endotoxin-induced hypotension in rats. Studies with PAF-receptor antagonist kadsurenone*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1985. **127**(3): p. 799-808.
149. Ponpipom, M.M., et al., *Structure-activity relationships of kadsurenone analogues*. *Journal of Medicinal Chemistry*, 1987. **30**(1): p. 136-142.
150. Ponpipom, M.M., B.Z. Yue, and R.L. Bugianesi, *Total synthesis of kadsurenone and its analogs*. *Tetrahedron Letters*, 1986. **27**(3): p. 309-312.
151. Chang, M.N., et al., *Neolignans from Piper futokadsura*. *Phytochemistry*, 1985. **24**(9): p. 2079-2082.
152. Dupont, L., *Three-dimension model for PAF-acether (AGEPC) and for Kadsurenone, a specific PAF-receptor antagonist*. *Prostaglandins*, 1985. **30**(4): p. 720.
153. Koltai, M. and P.G. Braquet, *Platelet-activating factor antagonists*. *Clinical Reviews in Allergy*, 1995. **12**(4): p. 361-380.
154. Casals-Stenzel, J., G. Muacevic, and K.H. Weber, *Pharmacological actions of WEB 2086, a new specific antagonist of platelet activating factor*. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 1987. **241**(3): p. 974-981.
155. Casals-Stenzel, J., *Effects of WEB 2086, a novel antagonist of platelet activating factor, in active and passive anaphylaxis*. *Immunopharmacology*, 1987. **13**(2): p. 117-124.
156. Pretolani, M., et al., *Interference by the novel PAF-acether antagonist WEB 2086 with the bronchopulmonary responses to PAF-acether and to active and passive anaphylactic shock in guinea-pigs*. *European Journal of Pharmacology*, 1987. **140**(3): p. 311-321.
157. Brambilla, A., A. Ghiorzi, and A. Giachetti, *WEB 2086: A potent PAF antagonist exerts protective effect toward PAF-induced gastric damage*. *Pharmacological Research Communications*, 1987. **19**(2): p. 147-151.
158. Casals-Stenzel, J., *Protective effect of WEB 2086, a novel antagonist of platelet activating factor, in endotoxin shock*. *European Journal of Pharmacology*, 1987. **135**(2): p. 117-122.
159. Mahadevan, S. and Y. Park, *Multifaceted therapeutic benefits of Ginkgo biloba L.: Chemistry, efficacy, safety, and uses*. *Journal of Food Science*, 2008. **73**(1).
160. DeKosky, S.T., et al., *Ginkgo biloba for prevention of dementia: A randomized controlled trial*. *JAMA - Journal of the American Medical Association*, 2008. **300**(19): p. 2253-2262.

161. Pietri, S., et al., *Cardioprotective and anti-oxidant effects of the terpenoid constituents of Ginkgo biloba extract (EGb 761)*. Journal of Molecular and Cellular Cardiology, 1997. **29**(2): p. 733-742.
162. Dupont, L., G. Germain, and O. Dideberg, *Crystal and molecular structure of BN 52021, a PAF-acether antagonist. Comparison with the conformation of Kadsurenone and related compounds*. Pharmacological Research Communications, 1986. **18**(SUPPL.): p. 25-32.
163. Sbit, M., et al., *Structure of Ginkgolide-a (Bn52020) Monohydrate and Ginkgolide-C (Bn52022).Ethanol.1.5hydrate, Isolated from Ginkgo-Biloba L*. Acta Crystallographica Section C-Crystal Structure Communications, 1987. **43**: p. 2377-2381.
164. Dupont, L., et al., *Structure of Ginkgolide-B (Bn 52021) Monohydrate, a Highly Specific Paf Acether Receptor Antagonist Isolated from Ginkgo-Biboba L*. Acta Crystallographica Section C-Crystal Structure Communications, 1986. **42**: p. 1759-1762.
165. Braquet, P., et al., *BN 52021 and related compounds: A new series of highly specific PAF-acether receptor antagonists isolated from Ginkgo biloba*. Blood Vessels, 1985. **16**: p. 559-572.
166. Braquet, P.G., *BN 52021 and related compounds: A new series of highly specific PAF-acether receptor antagonists: Effects on PAF-acether-induced platelet aggregation*. Journal of Molecular and Cellular Cardiology, 1985. **17**(Supplement 3): p. 54-54.
167. Lamant, V., G. Mauco, and P. Braquet, *Inhibition of the metabolism of platelet activating factor (PAF-acether) by three specific antagonists From ginkgo biloba*. Biochemical Pharmacology, 1987. **36**(17): p. 2749-2752.
168. Baggiolini, M. and B. Dewald, *Stimulus amplification by PAF and LTB₄ in human neutrophils*. Pharmacological Research Communications, 1986. **18**(SUPPL.): p. 51-59.
169. Bruynzeel, P.L.B., L. Koenderman, and P.T.M. Kok, *Platelet-activating factor (PAF-acether) induced leukotrene C₄ formation and luminol dependent chemiluminescence by human eosinophils*. Pharmacological Research Communications, 1986. **18**(SUPPL.): p. 61-69.
170. Desquand, S., C. Touvay, and J. Randon, *Interference of BN 52021 (ginkgolide B) with the bronchopulmonary effects of PAF-acether in the guinea-pig*. European Journal of Pharmacology, 1986. **127**(1-2): p. 83-95.
171. Adnot, S., et al., *Interference of the PAF-acether antagonist BN 52021 with endotoxin-induced hypotension in the guinea-pig*. Prostaglandins, 1986. **32**(6): p. 791-802.
172. Etienne, A., F. Hecquet, and C. Soulard, *In vivo inhibition of plasma protein leakage and Salmonella enteritidis-induced mortality in the rat by a specific paf-acether antagonist: BN 52021*. Agents and Actions, 1986. **17**(3-4): p. 368-370.
173. Feuerstein, G., et al., *Protective effect of a PAF-acether antagonist, BN 52021, in trichothecene toxicosis*. Toxicology Letters, 1987. **38**(3): p. 271-274.
174. Qian, C., et al., *Anti-inflammatory activities of LDP-392, a dual PAF receptor antagonist and 5-lipoxygenase inhibitor*. Pharmacological Research, 2001. **44**(3): p. 213-220.
175. Fujita, M., et al., *Approach to dual-acting platelet activating factor (PAF) receptor antagonist/thromboxane synthase inhibitor (TxSI) based on the link of PAF antagonists and TxSIs*. Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters, 2002. **12**(3): p. 341-344.
176. Hussaini, I.M., et al., *Dithiolane analogs of lignans inhibit interferon- γ and lipopolysaccharide-induced nitric oxide production in macrophages*. Acta Pharmacologica Sinica, 2000. **21**(10): p. 897-904.
177. Keam, S.J. and G.L. Plosker, *Rupatadine: A review of its use in the management of allergic disorders*. Drugs, 2007. **67**(3): p. 457-474.
178. Simon, M.F., et al., *Effect of BN 52021, a specific antagonist of platelet activating factor (PAF-acether), on calcium movements and phosphatidic acid production induced by PAF-acether in human platelets*. Thromb Res, 1987. **45**(4): p. 299-309.
179. Wickham, N.W.R., et al., *Neutrophils Are Primed to Release Toxic Oxidants by Contact with Thrombin-Stimulated Endothelium - Role of Endothelial Cell-Generated Platelet-Activating-Factor*. Clinical Research, 1987. **35**(3): p. A603-A603.
180. Feliste, R., et al., *Protective Effect of Bn-52021, a Specific Antagonist of Platelet-Activating Factor (Paf-Acether) against Diet-Induced Cholesteryl Ester Deposition in Rabbit Aorta*. Atherosclerosis, 1989. **78**(2-3): p. 151-158.

181. Habib, J.B., et al., *Preservation of Endothelium-Dependent Vascular Relaxation in Cholesterol-Fed Rabbit by Treatment with the Calcium Blocker Pn-200110*. *Circ Res*, 1986. **58**(2): p. 305-309.
182. Lithell, H.O.L., *Effect of antihypertensive drugs on insulin, glucose, and lipid metabolism*. *Diabetes Care*, 1991. **14**(3): p. 203-209.
183. Bakke, J.E. and H.J. Klosterman, *A new diglucoside from flaxseed*. *Proc North Dakota Acad Sci*, 1956(10): p. 18-22.
184. Cox, C.P. and K.L. Wood, *Selective Antagonism of Platelet-Activating-Factor (Paf)-Induced Aggregation and Secretion in Washed Rabbit Platelets by Cv-3988, L-652731, Triazolam and Alprazolam*. *Thromb Res*, 1987. **47**(3): p. 249-257.
185. Prasad, K., et al., *Reduction of hypercholesterolemic atherosclerosis by CDC-flaxseed with very low alpha-linolenic acid*. *Atherosclerosis*, 1998. **136**(2): p. 367-375.
186. Westcott, N.D. and D. Paton, *A complex containing lignan, phenolic and aliphatic substances from flax and process for preparing*. 2001.
187. Rickard, S.E., et al., *Dose-dependent production of mammalian lignans in rats and in vitro from the purified precursor secoisolariciresinol diglycoside in flaxseed*. *Journal of Nutrition*, 1996. **126**(8): p. 2012-2019.
188. Prasad, K., *Hydroxyl radical-scavenging property of secoisolariciresinol diglucoside (SDG) isolated from flax-seed*. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 1997. **168**(1-2): p. 117-123.
189. Kitts, D.D., et al., *Antioxidant activity of the flaxseed lignan secoisolariciresinol diglycoside and its mammalian lignan metabolites enterodiol and enterolactone*. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 1999. **202**(1-2): p. 91-100.
190. Prasad, K., *Dietary flax seed in prevention of hypercholesterolemic atherosclerosis*. *Atherosclerosis*, 1997. **132**(1): p. 69-76.
191. Lee, P. and K. Prasad, *Effects of flaxseed oil on serum lipids and atherosclerosis in hypercholesterolemic rabbits*. *Journal of Cardiovascular Pharmacology and Therapeutics*, 2003. **8**(3): p. 227-235.
192. Prasad, K., *Reduction of serum cholesterol and hypercholesterolemic atherosclerosis in rabbits by secoisolariciresinol diglucoside isolated from flaxseed*. *Circulation*, 1999. **99**(10): p. 1355-1362.
193. Fukumitsu, S., et al., *Flaxseed lignan attenuates high-fat diet-induced fat accumulation and induces adiponectin expression in mice*. *Brit J Nutr*, 2008. **100**(3): p. 669-676.
194. Penumathsa, S.V., et al., *Secoisolariciresinol diglucoside induces neovascularization-mediated cardioprotection against ischemia-reperfusion injury in hypercholesterolemic myocardium*. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 2008. **44**(1): p. 170-179.
195. Prasad, K., *Regression of hypercholesterolemic atherosclerosis in rabbits by secoisolariciresinol diglucoside isolated from flaxseed*. *Atherosclerosis*, 2008. **197**(1): p. 34-42.
196. Prasad, K., *Antihypertensive activity of secoisolariciresinol diglucoside (SDG) isolated from flaxseed: Role of guanylate cyclase*. *Int J Angiol*, 2004. **13**(1): p. 7-14.
197. Penumathsa, S.V., et al., *Secoisolariciresinol diglucoside: Relevance to angiogenesis and cardioprotection against ischemia-reperfusion injury*. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 2007. **320**(2): p. 951-959.
198. Lehr, H.A., et al., *Oxidized LDL-Induced Leukocyte-Endothelium Interaction in-Vivo Involves the Receptor for Platelet-Activating-Factor*. *Arterioscler. Thromb.*, 1993. **13**(7): p. 1013-1018.
199. Koussisis, S.G., et al., *PAF antagonists in foods: Isolation and identification of PAF in virgin olive oil*. *Rev Fr Corp Gras* 1993. **40**: p. 323-327.
200. Fragopoulou, E., et al., *Separation of biologically active lipids from red wine*. *J Agric Food Chem*, 2000. **48**(4): p. 1234-8.
201. Fragopoulou, E., et al., *Biological activity of total lipids from red and white wine/must*. *J Agric Food Chem*, 2001. **49**(11): p. 5186-93.
202. Panayiotou, A., et al., *Lipid fractions with aggregatory and antiaggregatory activity toward platelets in fresh and fried cod (Gadus morhua): correlation with platelet-activating factor and atherogenesis*. *J. Agric. Food Chem.*, 2000. **48**(12): p. 6372-9.
203. Rementzis, J., et al., *Biologically active lipids from S. scombrus*. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 1996. **416**: p. 65-72.

204. Koussissis, S.G., et al., *PAF antagonists in food: Isolation and identification of PAF antagonists in honey and wax*. *Revue Francaise des Corps Gras*, 1994. **41**: p. 127-132.
205. Antonopoulou, S., et al., *Platelet-Activating Factor (PAF) antagonists in foods. A study of lipids, with PAF or anti-PAF like-activity, in cow's milk and yoghurt*. *J. Agric. Food Chem.*, 1996. **44**: p. 3047-3051.
206. Apitz-Castro, R., et al., *Effects of garlic extract and of three pure components isolated from it on human platelet aggregation, arachidonate metabolism, release reaction and platelet ultrastructure*. *Thromb Res*, 1983. **32**(2): p. 155-69.
207. Dorsch, W., et al., *Anti-asthmatic effects of onions. Alk(en)ylsulfinothioic acid alk(en)yl-esters inhibit histamine release, leukotriene and thromboxane biosynthesis in vitro and counteract PAF and allergen-induced bronchial obstruction in vivo*. *Biochem Pharmacol*, 1988. **37**(23): p. 4479-86.
208. Antonopoulou, S. and H.C. Karantonis, *Separation of polar lipids from soybean oil and cotton seed oil by one-step HPLC system. Biological activity of isolated lipids*. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 2002. **25**(5): p. 771-779.
209. Nomikos, T., et al., *One-step separation system for the main phospholipids, glycolipids, and phenolics by normal phase HPLC. Application to polar lipid extracts from olive and sunflower oils*. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 2002. **25**(1): p. 137-149.
210. Unno, N., et al., *Plasma platelet-activating factor acetylhydrolase deficiency is associated with atherosclerotic occlusive disease in japan*. *J Vasc Surg*, 2000. **32**(2): p. 263-7.
211. Macpherson, J.L., et al., *Occurrence of Platelet-Activating Factor (Paf) and an Endogenous Inhibitor of Platelet-Aggregation in Diffuse Cutaneous Mastocytosis*. *Clinical and Experimental Immunology*, 1989. **77**(3): p. 391-396.
212. Antonopoulou, S., C.A. Demopoulos, and C. Iatrou, *Blood cardiolipin in haemodialysis patients, its implication in the biological action of platelet-activating factor*. *Int J Biochem Cell Biol*, 1996. **28**(1): p. 43-51.
213. De la Cruz, J.P., et al., *Antithrombotic potential of olive oil administration in rabbits with elevated cholesterol*. *Thromb Res*, 2000. **100**(4): p. 305-315.
214. Blankenberg, S., et al., *Plasma PAF-acetylhydrolase in patients with coronary artery disease: results of a cross-sectional analysis*. *J Lipid Res*, 2003. **44**(7): p. 1381-1386.
215. Nomikos, T., et al., *Antiatherogenic properties of lipid fractions of raw and fried fish*. *Food Chem*, 2006. **96**(1): p. 29-35.
216. Nasopoulou, C., et al., *Comparison of antiatherogenic properties of lipids obtained from wild and cultured sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and gilthead sea bream (*Sparus aurata*)*. *Food Chem*, 2007. **100**(2): p. 560-567.
217. Nasopoulou, C., et al., *In vivo anti-atherogenic properties of cultured gilthead sea bream (*Sparus aurata*) polar lipid extracts in hypercholesterolaemic rabbits*. *Food Chem*, 2010. **120**(3): p. 831-836.
218. Tsantila, N., et al., *Antithrombotic and antiatherosclerotic properties of olive oil and olive pomace polar extracts in rabbits*. *Mediat Inflamm*, 2007. **2007**: p. 36204.
219. Tsantila, N., et al., *In vitro and in vivo effects of statins on Platelet Activating Factor (PAF) and its metabolic enzymes*. *Angiology*, 2010. **Accepted**.
220. Nomikos, T., E. Fragopoulou, and S. Antonopoulou, *Food ingredients and lipid mediators*. *Curr Nutr and Food Sci*, 2007. **3**(4): p. 255-276.
221. Niaounakis, M. and C.P. Halvadakis, *Olive Processing Waste Management - Literature Review and Patent Survey*. 2nd ed. *Waste Management*, ed. L.F. Diaz. Vol. 5. 2006, Oxford UK: Elsevier. 1-498.
222. Stamatakis, G., et al., *Detection and Isolation of Antiatherogenic and Antioxidant Substances Present in Olive Mill Wastes by a Novel Filtration System*. *J. Agric. Food Chem.*, 2009. **57**(22): p. 10554-10564.
223. Cleeman, J.I., *Executive summary of the third report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) expert panel on detection, evaluation, and treatment of high blood cholesterol in adults (adult treatment panel III)*. *Journal of the American Medical Association*, 2001. **285**(19): p. 2486-2497.
224. Castelli, W.P., *Lipids, risk factors and ischaemic heart disease*. *Atherosclerosis*, 1996. **124**(SUPPL.).

225. Ridker, P.M., et al., *Comparison of C-reactive protein and low-density lipoprotein cholesterol levels in the prediction of first cardiovascular events*. New England Journal of Medicine, 2002. **347**(20): p. 1557-1565.
226. Packard, R.R.S. and P. Libby, *Inflammation in atherosclerosis: From vascular biology to biomarker discovery and risk prediction*. Clinical Chemistry, 2008. **54**(1): p. 24-38.
227. Kushner, I., M.L. Broder, and D. Karp, *Control of the acute phase response. Serum C-reactive protein kinetics after acute myocardial infarction*. Journal of Clinical Investigation, 1978. **61**(2): p. 235-242.
228. Calabro, P., J.T. Willerson, and E.T.H. Yeh, *Inflammatory cytokines stimulated C-reactive protein production by human coronary artery smooth muscle cells*. Circulation, 2003. **108**(16): p. 1930-1932.
229. Yasojima, K., et al., *Generation of C-reactive protein and complement components in atherosclerotic plaques*. American Journal of Pathology, 2001. **158**(3): p. 1039-1051.
230. Burke, A.P., et al., *Elevated C-reactive protein values and atherosclerosis in sudden coronary death - Association with different pathologies*. Circulation, 2002. **105**(17): p. 2019-2023.
231. Verma, S., S. Devaraj, and I. Jialal, *Is C-reactive protein an innocent bystander or proatherogenic culprit? C-reactive protein promotes atherothrombosis*. Circ, 2006. **113**(17): p. 2135-2150.
232. Pepys, M.B., et al., *Proinflammatory effects of bacterial recombinant human C-reactive protein are caused by contamination with bacterial products, not by C-reactive protein itself*. Circulation Research, 2005. **97**(11): p. e97-e103.
233. Kuller, L.H., et al., *Relation of C-reactive protein and coronary heart disease in the MRFIT nested case-control study*. American Journal of Epidemiology, 1996. **144**(6): p. 537-547.
234. Ridker, P.M., et al., *Inflammation, aspirin, and the risk of cardiovascular disease in apparently healthy men*. New England Journal of Medicine, 1997. **336**(14): p. 973-979.
235. Ridker, P.M., et al., *C-reactive protein and other markers of inflammation in the prediction of cardiovascular disease in women*. New England Journal of Medicine, 2000. **342**(12): p. 836-843.
236. Koenig, W., et al., *C-Reactive Protein Modulates Risk Prediction Based on the Framingham Score - Implications for Future Risk Assessment: Results from a Large Cohort Study in Southern Germany*. Circulation, 2004. **109**(11): p. 1349-1353.
237. Pai, J.K., et al., *Inflammatory markers and the risk of coronary heart disease in men and women*. New England Journal of Medicine, 2004. **351**(25): p. 2599-2610.
238. Ridker, P.M., et al., *C-reactive protein, the metabolic syndrome, and risk of incident cardiovascular events: an 8-year follow-up of 14 719 initially healthy American women*. Circulation, 2003. **107**(3): p. 391-397.
239. Ridker, P.M., et al., *Development and validation of improved algorithms for the assessment of global cardiovascular risk in women: The Reynolds Risk Score*. Journal of the American Medical Association, 2007. **297**(6): p. 611-619.
240. Ridker, P.M., *Clinical application of C-reactive protein for cardiovascular disease detection and prevention*. Circulation, 2003. **107**(3): p. 363-369.
241. Pearson, T.A., et al., *Markers of inflammation and cardiovascular disease: Application to clinical and public health practice: A statement for healthcare professionals from the centers for disease control and prevention and the American Heart Association*. Circulation, 2003. **107**(3): p. 499-511.
242. Ridker, P.M., et al., *Long-term effects of pravastatin on plasma concentration of C-reactive protein*. Circulation, 1999. **100**(3): p. 230-235.
243. Ridker, P.M., et al., *Measurement of C-reactive protein for the targeting of statin therapy in the primary prevention of acute coronary events*. New England Journal of Medicine, 2001. **344**(26): p. 1959-1965.
244. Ridker, P.M., et al., *C-reactive protein levels and outcomes after statin therapy*. New England Journal of Medicine, 2005. **352**(1): p. 20-28.
245. Nissen, S.E., et al., *Statin therapy, LDL cholesterol, C-reactive protein, and coronary artery disease*. New England Journal of Medicine, 2005. **352**(1): p. 29-38.
246. Dinarello, C.A., *Interleukin-1*. 1994. p. 21-51.
247. Dejana, E., et al., *Modulation of endothelial cell functions by different molecular species of interleukin 1*. Blood, 1987. **69**(2): p. 695-699.

248. Sterpetti, A.V., et al., *Shear stress increases the release of interleukin-1 and interleukin-6 by aortic endothelial cells*. *Surgery*, 1993. **114**(5): p. 911-914.
249. Thomas, C.E., et al., *Multiple lipid oxidation products in low density lipoproteins induce interleukin-1 beta release from human blood mononuclear cells*. *Journal of Lipid Research*, 1994. **35**(3): p. 417-427.
250. Ku, G., et al., *Ex vivo lipopolysaccharide-induced interleukin-1 secretion from murine peritoneal macrophages inhibited by probucol, a hypocholesterolemic agent with antioxidant properties*. *FASEB Journal*, 1990. **4**(6): p. 1645-1653.
251. Vlachogianni, I.C., et al., *Interleukin-1beta stimulates platelet-activating factor production in U-937 cells modulating both its biosynthetic and catabolic enzymes*. *Cytokine*, 2013. **63**(2): p. 97-104.
252. Elhage, R., et al., *Differential effects of interleukin-1 receptor antagonist and tumor necrosis factor binding protein on fatty-streak formation in apolipoprotein E-deficient mice*. *Circulation*, 1998. **97**(3): p. 242-244.
253. Devlin, C.M., et al., *Genetic alterations of IL-1 receptor antagonist in mice affect plasma cholesterol level and foam cell lesion size*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2002. **99**(9): p. 6280-6285.
254. Merhi-Soussi, F., et al., *Interleukin-1 plays a major role in vascular inflammation and atherosclerosis in male apolipoprotein E-knockout mice*. *Cardiovascular Research*, 2005. **66**(3): p. 583-593.
255. Kinoshita, M., et al., *Mast cell tryptase in mast cell granules enhances MCP-1 and interleukin-8 production in human endothelial cells*. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 2005. **25**(9): p. 1858-1863.
256. Kanda, T., et al., *Interleukin-8 as a sensitive marker of unstable coronary artery disease*. *American Journal of Cardiology*, 1996. **77**(4): p. 304-307.
257. Biasucci, L.M., et al., *Elevated levels of interleukin-6 in unstable angina*. *Circulation*, 1996. **94**(5): p. 874-877.
258. Apostolopoulos, J., P. Davenport, and P.G. Tipping, *Interleukin-8 production by macrophages from atheromatous plaques*. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 1996. **16**(8): p. 1007-1012.
259. Wang, N., et al., *Interleukin 8 is induced by cholesterol loading of macrophages and expressed by macrophage foam cells in human atheroma*. *Journal of Biological Chemistry*, 1996. **271**(15): p. 8837-8842.
260. Tracey, K.J. and A. Cerami, *Tumor necrosis factor: A pleiotropic cytokine and therapeutic target*. *Annual Review of Medicine*, 1994. **45**: p. 491-503.
261. Camussi, G., et al., *Tumor necrosis factor/cachectin stimulates peritoneal macrophages, polymorphonuclear neutrophils, and vascular endothelial cells to synthesize and release platelet-activating factor*. *Journal of Experimental Medicine*, 1987. **166**(5): p. 1390-1404.
262. Colletti, L.M., et al., *Role of tumor necrosis factor- α in the pathophysiologic alterations after hepatic ischemia/reperfusion injury in the rat*. *Journal of Clinical Investigation*, 1990. **85**(6): p. 1936-1943.
263. Gearing, A.J.H., et al., *Processing of tumour necrosis factor- α precursor by metalloproteinases*. *Nature*, 1994. **370**(6490): p. 555-557.
264. Ohta, H., et al., *Disruption of tumor necrosis factor- α gene diminishes the development of atherosclerosis in ApoE-deficient mice*. *Atherosclerosis*, 2005. **180**(1): p. 11-17.
265. Schreyer, S.A., J.J. Peschon, and R.C. LeBoeuf, *Accelerated atherosclerosis in mice lacking tumor necrosis factor receptor p55*. *Journal of Biological Chemistry*, 1996. **271**(42): p. 26174-26178.
266. Schreyer, S.A., C.M. Vick, and R.C. Leboeuf, *Loss of lymphotoxin- α but not tumor necrosis factor- α reduces atherosclerosis in mice*. *Journal of Biological Chemistry*, 2002. **277**(14): p. 12364-12368.
267. Hsu, H.Y., A.C. Nicholson, and D.P. Hajjar, *Inhibition of macrophage scavenger receptor activity by tumor necrosis factor- α is transcriptionally and post-transcriptionally regulated*. *Journal of Biological Chemistry*, 1996. **271**(13): p. 7767-7773.
268. Van Lenten, B.J. and A.M. Fogelman, *Lipopolysaccharide-induced inhibition of scavenger receptor expression in human monocyte-macrophages is mediated through tumor necrosis factor- α* . *Journal of Immunology*, 1992. **148**(1): p. 112-116.

269. Skoog, T., et al., *Plasma tumour necrosis factor- α and early carotid atherosclerosis in healthy middle-aged men*. *European Heart Journal*, 2002. **23**(5): p. 376-383.
270. Farr, R.S., et al., *Preliminary Studies of an Acid-Labile Factor (Alf) in Human-Sera That Inactivates Platelet-Activating Factor (Paf)*. *Clinical Immunology and Immunopathology*, 1980. **15**(3): p. 318-330.
271. Min, J.H., et al., *Platelet-activating factor acetylhydrolases: Broad substrate specificity and lipoprotein binding does not modulate the catalytic properties of the plasma enzyme*. *Biochemistry*, 2001. **40**(15): p. 4539-4549.
272. Tew, D.G., et al., *Purification, properties, sequencing, and cloning of a lipoprotein-associated, serine-dependent phospholipase involved in the oxidative modification of low-density lipoproteins*. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology*, 1996. **16**(4): p. 591-599.
273. Tjoelker, L.W., et al., *Anti-inflammatory properties of a platelet-activating factor acetylhydrolase*. *Nature*, 1995. **374**(6522): p. 549-553.
274. Hattori, K., et al., *Purification and characterization of Platelet-Activating-Factor acetylhydrolase-II from bovine liver cytosol*. *Journal of Biological Chemistry*, 1995. **270**(38): p. 22308-22313.
275. Hattori, M., et al., *Miller-Dieker Lissencephaly gene encodes a subunit of brain Platelet-Activating-Factor acetylhydrolase*. *Nature*, 1994. **370**(6486): p. 216-218.
276. Tjoelker, L.W., et al., *Plasma platelet-activating factor acetylhydrolase is a secreted phospholipase A2 with a catalytic triad*. *Journal of Biological Chemistry*, 1995. **270**(43): p. 25481-7.
277. Wardlow, M.L., et al., *Substrate specificity and partial characterization of the PAF-acetylhydrolase in human serum that rapidly inactivates platelet-activating factor*. *Journal of Immunology*, 1986. **136**(9): p. 3441-6.
278. Stafforini, D.M., S.M. Prescott, and T.M. McIntyre, *Human-plasma Platelet-Activating-Factor acetylhydrolase. Purification and properties*. *Journal of Biological Chemistry*, 1987. **262**(9): p. 4223-4230.
279. Imaizumi, T.-a., et al., *The fate of platelet-activating factor: PAF acetylhydrolases from plasma and tissues*, in *Advances in Lipobiology*, W.G. Richard, Editor. 1996, JAI. p. 141-162.
280. Akiyama, M., et al., *Identification of a major PAF acetylhydrolase in human serum/plasma as a 43 kDa glycoprotein containing about 9 kDa asparagine-conjugated sugar chain(s)*. *Journal of Biochemistry*, 1998. **123**(5): p. 786-789.
281. Stafforini, D.M., T.M. McIntyre, and S.M. Prescott, *Platelet-Activating -Factor acetylhydrolase from human plasma*. *Methods in Enzymology*, 1990. **187**: p. 344-357.
282. Dentan, C., et al., *Pefabloc, 4- 2-aminoethyl benzenesulfonyl fluoride, is a new, potent nontoxic and irreversible inhibitor of PAF-degrading acetylhydrolase*. *Biochimica Et Biophysica Acta-Lipids and Lipid Metabolism*, 1996. **1299**(3): p. 353-357.
283. Stafforini, D.M., et al., *Human macrophages secrete Platelet-Activating Factor acetylhydrolase*. *Journal of Biological Chemistry*, 1990. **265**(17): p. 9682-9687.
284. Cao, Y., et al., *Expression of plasma platelet-activating factor acetylhydrolase is transcriptionally regulated by mediators of inflammation*. *Journal of Biological Chemistry*, 1998. **273**(7): p. 4012-4020.
285. Asano, K., et al., *Cellular source(s) of platelet-activating-factor acetylhydrolase activity in plasma*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1999. **261**(2): p. 511-514.
286. Satoh, K., et al., *Platelet-Activating-Factor (PAF) stimulates the production of PAF acetylhydrolase by the human hepatoma cell line, HepG2*. *Journal of Clinical Investigation*, 1991. **87**(2): p. 476-481.
287. Narahara, H., R.A. Frenkel, and J.M. Johnston, *Secretion of Platelet-Activating-Factor acetylhydrolase following phorbol ester stimulated differentiation of HL-60 cells*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 1993. **301**(2): p. 275-281.
288. Lee, T.C., et al., *Differentiation-induced increase of Platelet-Activating-Factor acetylhydrolase in HL-60 cells*. *Journal of Lipid Mediators and Cell Signalling*, 1994. **9**(3): p. 267-283.
289. Nakajima, K., et al., *Activated mast cells release extracellular type platelet-activating factor acetylhydrolase that contributes to autocrine inactivation of platelet-activating factor*. *Journal of Biological Chemistry*, 1997. **272**(32): p. 19708-19713.
290. Korth, R., et al., *Human platelets release a PAF-acether-acetylhydrolase similar to that in plasma*. *Lipids*, 1993. **28**(3): p. 193-199.

291. Goudevenos, J., et al., *Platelet-associated and secreted PAF-acetylhydrolase activity in patients with stable angina: sequential changes of the enzyme activity after angioplasty*. European Journal of Clinical Investigation, 2001. **31**(1): p. 15-23.
292. Svetlov, S.I., et al., *Secretory PAF-acetylhydrolase of the rat hepatobiliary system: characterization and partial purification*. American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology, 1998. **274**(5): p. G891-G900.
293. Howard, K.M., et al., *Cell-specific regulation of expression of plasma-type platelet-activating factor acetylhydrolase in the liver*. Journal of Biological Chemistry, 1997. **272**(44): p. 27543-27548.
294. Steinbrecher, U.P. and P.H. Pritchard, *Hydrolysis of phosphatidylcholine during LDL oxidation is mediated by Platelet-Activating-Factor acetylhydrolase*. Journal of Lipid Research, 1989. **30**(3): p. 305-315.
295. Stremmler, K.E., et al., *Human plasma Platelet-Activating-Factor acetylhydrolase. Oxidatively fragmented phospholipids as substrates*. Journal of Biological Chemistry, 1991. **266**(17): p. 11095-11103.
296. Stremmler, K.E., et al., *An oxidized derivative of phosphatidylcholine is a substrate for the Platelet-Activating-Factor acetylhydrolase from human plasma*. Journal of Biological Chemistry, 1989. **264**(10): p. 5331-5334.
297. Min, J.H., et al., *Membrane-bound plasma platelet activating factor acetylhydrolase acts on substrate in the aqueous phase*. Biochemistry, 1999. **38**(39): p. 12935-12942.
298. Stafforini, D.M., et al., *Release of free F-2-isoprostanes from esterified phospholipids is catalyzed by intracellular and plasma platelet-activating factor acetylhydrolases*. Journal of Biological Chemistry, 2006. **281**(8): p. 4616-4623.
299. De Vriese, C., et al., *Ghrelin interacts with human plasma lipoproteins*. Endocrinology, 2007. **148**(5): p. 2355-2362.
300. Stafforini, D.M., et al., *Human plasma platelet-activating factor acetylhydrolase. Association with lipoprotein particles and role in the degradation of platelet-activating factor*. J Biol Chem, 1987. **262**(9): p. 4215-22.
301. Ostermann, G., et al., *The role of lipoproteins in the degradation of Platelet-Activating-Factor*. Thrombosis Research, 1986. **44**(3): p. 303-314.
302. Tselepis, A.D., et al., *PAF-degrading acetylhydrolase is preferentially associated with dense LDL and VLDL-1 in human plasma. Catalytic characteristics and relation to the monocyte-derived enzyme*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1995. **15**(10): p. 1764-73.
303. Caslake, M.J., et al., *Lipoprotein-associated phospholipase A(2), platelet-activating factor acetylhydrolase: a potential new risk factor for coronary artery disease*. Atherosclerosis, 2000. **150**(2): p. 413-419.
304. Tsimikas, S., L.D. Tsironis, and A.D. Tselepis, *New insights into the role of lipoprotein(a)-associated lipoprotein-associated phospholipase A2 in atherosclerosis and cardiovascular disease*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2007. **27**(10): p. 2094-9.
305. Saougos, V.G., et al., *Differential effect of hypolipidemic drugs on lipoprotein-associated phospholipase A2*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2007. **27**(10): p. 2236-43.
306. Tsimihodimos, V., et al., *Fenofibrate induces HDL-associated PAF-AH but attenuates enzyme activity associated with apoB-containing lipoproteins*. J Lipid Res, 2003. **44**(5): p. 927-34.
307. Pritchard, P.H., A. Chonn, and C.C.H. Yeung, *The degradation of Platelet-Activating-Factor in the plasma of a patient with familial High Density Lipoprotein Deficiency (tanger Disease)*. Blood, 1985. **66**(6): p. 1476-1478.
308. Liu, M. and P.V. Subbiah, *Hydrolysis and transesterification of Platelet-Activating-Factor by Lecithin-Cholesterol Acyltransferase*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1994. **91**(13): p. 6035-6039.
309. Tselepis, A.D. and M.J. Chapman, *Inflammation, bioactive lipids and atherosclerosis: Potential roles of a lipoprotein-associated phospholipase A2, platelet activating factor-acetylhydrolase*. Atherosclerosis Supplements, 2002. **3**(4): p. 57-68.
310. Rodrigo, L., et al., *Hydrolysis of platelet-activating factor by human serum paraoxonase*. Biochem J, 2001. **354**(Pt 1): p. 1-7.
311. Kakafika, A.I., et al., *The PON1 M55L gene polymorphism is associated with reduced HDL-associated PAF-AH activity*. Journal of Lipid Research, 2003. **44**(10): p. 1919-1926.

312. Aron, L., S. Jones, and C.J. Fielding, *Human plasma Lecithin-Cholesterol acyltransferase. Characterization of co-factor dependent phospholipase activity*. Journal of Biological Chemistry, 1978. **253**(20): p. 7220-7226.
313. McCall, M.R., et al., *Modification of LCAT activity and HDL Structure -New links between cigarette-smoke and coronary heart disease risk*. Arteriosclerosis and Thrombosis, 1994. **14**(2): p. 248-253.
314. Subbaiah, P.V. and M. Liu, *Disparate effects of oxidation on plasma acyltransferase activities: Inhibition of cholesterol esterification but stimulation of transesterification of oxidized phospholipids*. Biochimica Et Biophysica Acta-Lipids and Lipid Metabolism, 1996. **1301**(1-2): p. 115-126.
315. Marathe, G.K., G.A. Zimmerman, and T.M. McIntyre, *Platelet-activating factor acetylhydrolase, and not paraoxonase-1, is the oxidized phospholipid hydrolase of high density lipoprotein particles*. J Biol Chem, 2003. **278**(6): p. 3937-47.
316. Chisolm, G.M. and D. Steinberg, *The oxidative modification hypothesis of atherogenesis: An overview*. Free Radical Biology and Medicine, 2000. **28**(12): p. 1815-1826.
317. Narahara, H. and J.M. Johnston, *Effects of endotoxins and cytokines on the secretion of Platelet-Activating-Factor acetylhydrolase by human decidual macrophages*. American Journal of Obstetrics and Gynecology, 1993. **169**(3): p. 531-537.
318. Kawano, Y., H. Narahara, and J.M. Johnston, *Inhibitory effect of interleukin-8 on the secretion of platelet-activating factor acetylhydrolase by human decidual macrophages*. Journal of the Society for Gynecologic Investigation, 1999. **6**(6): p. 328-332.
319. Tselepis, A.D., et al., *Association of the inflammatory state in active juvenile rheumatoid arthritis with hypo-high-density lipoproteinemia and reduced lipoprotein-associated platelet-activating factor acetylhydrolase activity*. Arthritis Rheum, 1999. **42**(2): p. 373-83.
320. Tsukioka, K., et al., *Increased plasma level of platelet-activating factor (PAF) and decreased serum PAF acetylhydrolase (PAFAH) activity in adults with bronchial asthma*. Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology, 1996. **6**(1): p. 22-29.
321. Tetta, C., et al., *Release of Platelet-Activating-Factor in systemic Lupus-Erythematosus*. International Archives of Allergy and Applied Immunology, 1990. **91**(3): p. 244-256.
322. Graham, R.M., et al., *Plasma degradation of Platelet-Activating-Factor in severely ill patients with clinical sepsis*. Critical Care Medicine, 1994. **22**(2): p. 204-212.
323. Kald, B., et al., *Platelet-activating factor acetylhydrolase activity in intestinal mucosa and plasma of patients with Crohn's disease*. Digestion, 1996. **57**(6): p. 472-477.
324. Memon, R.A., et al., *In vivo regulation of plasma platelet-activating factor acetylhydrolase during the acute phase response*. American Journal of Physiology-Regulatory Integrative and Comparative Physiology, 1999. **277**(1): p. R94-R103.
325. Watson, A.D., et al., *Effect of platelet activating factor-acetylhydrolase on the formation and action of minimally oxidized low density lipoprotein*. J Clin Invest, 1995. **95**(2): p. 774-82.
326. Lee, C., et al., *All ApoB-containing lipoproteins induce monocyte chemotaxis and adhesion when minimally modified - Modulation of lipoprotein bioactivity by platelet-activating factor acetylhydrolase*. Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology, 1999. **19**(6): p. 1437-1446.
327. Macphee, C.H., et al., *Lipoprotein-associated phospholipase A(2), platelet-activating factor acetylhydrolase, generates two bioactive products during the oxidation of low-density lipoprotein: use of a novel inhibitor*. Biochemical Journal, 1999. **338**: p. 479-487.
328. Karabina, S.A., et al., *Distribution of PAF-acetylhydrolase activity in human plasma low-density lipoprotein subfractions*. Biochim Biophys Acta, 1994. **1213**(1): p. 34-8.
329. Karabina, S.A., et al., *Increased activity of platelet-activating factor acetylhydrolase in low-density lipoprotein subfractions induces enhanced lysophosphatidylcholine production during oxidation in patients with heterozygous familial hypercholesterolaemia*. Eur J Clin Invest, 1997. **27**(7): p. 595-602.
330. Packard, C.J., et al., *Lipoprotein-Associated Phospholipase A2 as an Independent Predictor of Coronary Heart Disease*. New England Journal of Medicine, 2000. **343**(16): p. 1148-1155.
331. Tellis, C.C. and A.D. Tselepis, *The role of lipoprotein-associated phospholipase A2 in atherosclerosis may depend on its lipoprotein carrier in plasma*. Biochimica et Biophysica Acta, 2009.

332. Tsimihodimos, V., et al., *Altered distribution of platelet-activating factor- acetylhydrolase activity between LDL and HDL as a function of the severity of hypercholesterolemia*. J Lipid Res, 2002. **43**(2): p. 256-63.
333. Guerra, R., et al., *Determinants of plasma platelet-activating factor acetylhydrolase: heritability and relationship to plasma lipoproteins*. Journal of Lipid Research, 1997. **38**(11): p. 2281-2288.
334. Grundy, S.M., *HMG-CoA reductase inhibitors for treatment of hypercholesterolemia*. New England Journal of Medicine, 1988. **319**(1): p. 24-33.
335. Lavi, S., et al., *Local production of lipoprotein-associated phospholipase A2 and lysophosphatidylcholine in the coronary circulation: Association with early coronary atherosclerosis and endothelial dysfunction in humans*. Circulation, 2007. **115**(21): p. 2715-2721.
336. Mannheim, D., et al., *Enhanced expression of Lp-PLA(2) and lysophosphatidylcholine in symptomatic carotid atherosclerotic plaques*. Stroke, 2008. **39**(5): p. 1448-1455.
337. Vickers, K.C., et al., *Relationship of lipoprotein-associated phospholipase A2 and oxidized low density lipoprotein in carotid atherosclerosis*. Journal of Lipid Research, 2009. **50**(9): p. 1735-1743.
338. Satoh, K., et al., *Platelet-Activating-Factor acetylhydrolase in plasma-lipoproteins from patients with ischemic stroke*. Stroke, 1992. **23**(8): p. 1090-1092.
339. Ostermann, G., et al., *The degradation of Platelet-Activating-Factor in serum and its discriminative value in atherosclerotic patients*. Thrombosis Research, 1988. **52**(6): p. 529-540.
340. Graham, R.M., et al., *Plasma Platelet-Activating-Factor degradation in patients with severe coronary-artery disease*. Clinical Science, 1992. **82**(5): p. 535-541.
341. Stephens, C.J., et al., *Variation in plasma Platelet-Activating-Factor degradation and serum lipids after acute myocardial infarction*. Coronary Artery Disease, 1993. **4**(2): p. 187-193.
342. Serebruany, V.L., et al., *Depressed plasma platelet-activating factor acetylhydrolase in patients presenting with acute myocardial infarction*. Cardiology, 1998. **90**(2): p. 127-130.
343. Shohet, R.V., et al., *Plasma platelet-activating factor acetylhydrolase activity is not associated with premature coronary atherosclerosis*. American Journal of Cardiology, 1999. **83**(1): p. 109-+.
344. Tselepis, A.D., et al., *Platelet aggregatory response to platelet activating factor (PAF), ex vivo, and PAF-acetylhydrolase activity in patients with unstable angina: effect of c7E3 Fab (abciximab) therapy*. Cardiovascular Research, 1999. **43**(1): p. 183-191.
345. Zalewski, A. and C. Macphee, *Role of lipoprotein-associated phospholipase A2 in atherosclerosis: biology, epidemiology, and possible therapeutic target*. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology, 2005. **25**(5): p. 923-31.
346. Madjid, M., M. Ali, and J.T. Willerson, *Lipoprotein-Associated Phospholipase A(2) as a Novel Risk Marker for Cardiovascular Disease A Systematic Review of the Literature*. Texas Heart Institute Journal, 2010. **37**(1): p. 25-39.
347. Suckling, K., *The ideal model in atherosclerosis and dyslipidaemia - does it exist?* Expert Opinion on Drug Discovery, 2006. **1**(6): p. 507-511.
348. Tsaoussis, V. and C. Vakirtzilemonias, *The mouse plasma PAF acetylhydrolase. It consists of 2 enzymes both associated with the HDL*. Journal of Lipid Mediators and Cell Signalling, 1994. **9**(3): p. 317-331.
349. Hakkinen, T., et al., *Lipoprotein-associated phospholipase A(2), platelet-activating factor acetylhydrolase, is expressed by macrophages in human and rabbit atherosclerotic lesions*. Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology, 1999. **19**(12): p. 2909-2917.
350. Quarck, R., et al., *Adenovirus-mediated gene transfer of human platelet-activating factor-acetylhydrolase prevents injury-induced neointima formation and reduces spontaneous atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice*. Circulation, 2001. **103**(20): p. 2495-2500.
351. Noto, H., et al., *Human plasma platelet-activating factor acetylhydrolase binds to all the murine lipoproteins, conferring protection against oxidative stress*. Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology, 2003. **23**(5): p. 829-835.
352. Shi, Y., et al., *Role of lipoprotein-associated phospholipase A(2) in leukocyte activation and inflammatory responses*. Atherosclerosis, 2007. **191**(1): p. 54-62.

353. Blackie, J.A., et al., *The identification of clinical candidate SB-480848: A potent inhibitor of lipoprotein-associated phospholipase A(2)*. Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters, 2003. **13**(6): p. 1067-1070.
354. Wilensky, R.L., et al., *Inhibition of lipoprotein-associated phospholipase A(2) reduces complex coronary atherosclerotic plaque development*. Nature Medicine, 2008. **14**(10): p. 1059-1066.
355. Shi, Y., et al., *Selective Inhibition Of Lipoprotein-associated Phospholipase A2 Attenuates Markers Of Plaque Vulnerability In Humans*. Circulation, 2007. **116**(16_MeetingAbstracts): p. II_108-.
356. Serruys, P.W., et al., *Effects of the direct lipoprotein-associated phospholipase A2 inhibitor darapladib on human coronary atherosclerotic plaque*. Circulation, 2008. **118**(11): p. 1172-1182.
357. Mohler, E.R., et al., *The effect of darapladib on plasma lipoprotein-associated phospholipase A(2) activity and cardiovascular biomarkers in patients with stable coronary heart disease or coronary heart disease risk equivalent*. Journal of the American College of Cardiology, 2008. **51**(17): p. 1632-1641.
358. Papakyriakou, A., G.M. Stamatakis, and C.A. Demopoulos, *Computational Investigation of Darapladib and Rilapladib Binding to Platelet Activating Factor Receptor. A Possible Mechanism of Their Involvement in Atherosclerosis*. International Journal of Chemistry, 2014. **6**(1): p. p50.
359. Feng, J., et al., *Induction of CD36 expression by oxidized LDL and IL-4 by a common signaling pathway dependent on protein kinase C and PPAR-γ*. Journal of Lipid Research, 2000. **41**(5): p. 688-698.
360. Rios, F.J.O., et al., *Role of PPAR-gamma in the modulation of CD36 and FcγRII induced by LDL with low and high degrees of oxidation during the differentiation of the monocytic THP-1 cell line*. Cellular Physiology and Biochemistry, 2008. **22**(5-6): p. 549-556.
361. Rattazzi, M., et al., *C-reactive protein and interleukin-6 in vascular disease: culprits or passive bystanders?* Journal of Hypertension, 2003. **21**(10): p. 1787-1803.
362. Huber, S.A., et al., *Interleukin-6 exacerbates early atherosclerosis in mice*. Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology, 1999. **19**(10): p. 2364-2367.
363. Kerr, R., D. Stirling, and C.A. Ludlam, *Interleukin 6 and haemostasis*. British Journal of Haematology, 2001. **115**(1): p. 3-12.
364. Seino, Y., et al., *Interleukin-6 gene transcripts are expressed in human atherosclerotic lesions*. Cytokine, 1994. **6**(1): p. 87-91.
365. Rus, H.G., R. Vlaicu, and F. Niculescu, *Interleukin-6 and interleukin-8 protein and gene expression in human arterial atherosclerotic wall*. Atherosclerosis, 1996. **127**(2): p. 263-271.
366. Schieffer, B., et al., *Expression of angiotensin II and interleukin 6 in human coronary atherosclerotic plaques - Potential implications for inflammation and plaque instability*. Circulation, 2000. **101**(12): p. 1372-1378.
367. Schieffer, B., et al., *Impact of interleukin-6 on plaque development and morphology in experimental atherosclerosis*. Circulation, 2004. **110**(22): p. 3493-3500.
368. Biasucci, L.M., et al., *Increasing levels of interleukin (IL)-1Ra and IL-6 during the first 2 days of hospitalization in unstable angina are associated with increased risk of in-hospital coronary events*. Circulation, 1999. **99**(16): p. 2079-2084.
369. Lindmark, E., et al., *Relationship between interleukin 6 and mortality in patients with unstable coronary artery disease - Effects of an early invasive or noninvasive strategy*. Jama-Journal of the American Medical Association, 2001. **286**(17): p. 2107-2113.
370. Ridker, P.M., et al., *Plasma concentration of interleukin-6 and the risk of future myocardial infarction among apparently healthy men*. Circulation, 2000. **101**(15): p. 1767-1772.
371. Pradhan, A.D., et al., *Inflammatory biomarkers, hormone replacement therapy, and incident coronary heart disease - Prospective analysis from the Women's Health Initiative observational study*. Jama-Journal of the American Medical Association, 2002. **288**(8): p. 980-987.
372. Harris, T.B., et al., *Associations of elevated interleukin-6 and C-reactive protein levels with mortality in the elderly*. American Journal of Medicine, 1999. **106**(5): p. 506-512.
373. Volpato, S., et al., *Cardiovascular disease, interleukin-6, and risk of mortality in older women - The women's health and aging study*. Circulation, 2001. **103**(7): p. 947-953.

374. Wilhelmsen, L., K. Svardsudd, and K. Korsan-Bengtson, *Fibrinogen as a risk factor for stroke and myocardial infarction*. New England Journal of Medicine, 1984. **311**(8): p. 501-505.
375. Kannel, W.B., et al., *Fibrinogen and risk of cardiovascular disease. The Framingham Study*. Journal of the American Medical Association, 1987. **258**(9): p. 1183-1186.
376. Ma, J., et al., *A prospective study of fibrinogen and risk of myocardial infarction in the Physicians' Health Study*. Journal of the American College of Cardiology, 1999. **33**(5): p. 1347-1352.
377. Ridker, P.M., M.J. Stampfer, and N. Rifai, *Novel risk factors for systemic atherosclerosis: A comparison of C-reactive protein, fibrinogen, homocysteine, lipoprotein(a), and standard cholesterol screening as predictors of peripheral arterial disease*. Journal of the American Medical Association, 2001. **285**(19): p. 2481-2485.
378. Dawson, S., et al., *Genetic variation at the plasminogen activator inhibitor-1 locus is associated with altered levels of plasma plasminogen activator inhibitor-1 activity*. Arteriosclerosis and Thrombosis, 1991. **11**(1): p. 183-190.
379. Festa, A., et al., *Promoter (4G/5G) plasminogen activator inhibitor-1 genotype and plasminogen activator inhibitor-1 levels in blacks, hispanics, and non-hispanic whites: The Insulin Resistance Atherosclerosis Study*. Circulation, 2003. **107**(19): p. 2422-2427.
380. Juhan-Vague, I. and M.C. Alessi, *PAI-1, obesity, insulin resistance and risk of cardiovascular events*. Thrombosis and Haemostasis, 1997. **78**(1): p. 656-660.
381. Brown, N.J., et al., *Effect of activation and inhibition of the renin-angiotensin system on plasma PAI-1*. Hypertension, 1998. **32**(6): p. 965-971.
382. Thøgersen, A.M., et al., *High plasminogen activator inhibitor and tissue plasminogen activator levels in plasma precede a first acute myocardial infarction in both men and women: Evidence for the fibrinolytic system as an independent primary risk factor*. Circulation, 1998. **98**(21): p. 2241-2247.
383. Brown, N.J., et al., *Comparative effects of estrogen and angiotensin-converting enzyme inhibition on plasminogen activator inhibitor-1 in healthy postmenopausal women*. Circulation, 2002. **105**(3): p. 304-309.
384. Vaughan, D.E., et al., *Effects of ramipril on plasma fibrinolytic balance in patients with acute anterior myocardial infarction*. Circulation, 1997. **96**(2): p. 442-447.
385. Schönbeck, U., et al., *Oxidized low-density lipoprotein augments and 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors limit CD40 and CD40L expression in human vascular cells*. Circulation, 2002. **106**(23): p. 2888-2893.
386. Mach, F., et al., *Reduction of atherosclerosis in mice by inhibition of CD40 signalling*. Nature, 1998. **394**(6689): p. 200-203.
387. Schönbeck, U., et al., *Inhibition of CD40 signaling limits evolution of established atherosclerosis in mice*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2000. **97**(13): p. 7458-7463.
388. Lutgens, E., et al., *Both early and delayed anti-CD40L antibody treatment induces a stable plaque phenotype*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2000. **97**(13): p. 7464-7469.
389. Blake, G.J., et al., *Soluble CD40 ligand levels indicate lipid accumulation in carotid atheroma: an in vivo study with high-resolution MRI*. Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology, 2003. **23**(1): p. e11-14.
390. Weber, M., et al., *Influence of sample type and storage conditions on soluble CD40 ligand assessment*. Clinical Chemistry, 2006. **52**(5): p. 888-891.
391. Varo, N., et al., *Influence of pre-analytical and analytical factors on soluble CD40L measurements*. Clinical Science, 2006. **111**(5): p. 341-347.
392. Lee, W.L., et al., *The presence of metabolic syndrome is independently associated with elevated serum CD40 ligand and disease severity in patients with symptomatic coronary artery disease*. Metabolism: Clinical and Experimental, 2006. **55**(8): p. 1029-1034.
393. De Lemos, J.A., et al., *Associations between soluble CD40 ligand, atherosclerosis risk factors, and subclinical atherosclerosis: Results from the Dallas Heart Study*. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology, 2005. **25**(10): p. 2192-2196.
394. Tayebjee, M.H., et al., *Plasma matrix metalloproteinase-9, tissue inhibitor of metalloproteinase-2, and CD40 ligand levels in patients with stable coronary artery disease*. American Journal of Cardiology, 2005. **96**(3): p. 339-345.

395. Blake, G.J., et al., *Soluble CD40 ligand levels indicate lipid accumulation in carotid atheroma: an in vivo study with high-resolution MRI*. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 2003. **23**(1).
396. Schönbeck, U., et al., *Soluble CD40L and cardiovascular risk in women*. *Circulation*, 2001. **104**(19): p. 2266-2268.
397. Novo, S., et al., *Soluble CD40L and cardiovascular risk in asymptomatic low-grade carotid stenosis*. *Stroke*, 2005. **36**(3): p. 673-675.
398. Hocher, B., et al., *Soluble CD154 is a unique predictor of nonfatal and fatal atherothrombotic events in patients who have end-stage renal disease and are on hemodialysis*. *Journal of the American Society of Nephrology*, 2007. **18**(4): p. 1323-1330.
399. Heeschen, C., et al., *Soluble CD40 ligand in acute coronary syndromes*. *New England Journal of Medicine*, 2003. **348**(12): p. 1104-1111.
400. Healy, A.M., et al., *Platelet expression profiling and clinical validation of myeloid-related protein-14 as a novel determinant of cardiovascular events*. *Circulation*, 2006. **113**(19): p. 2278-2284.
401. Esposito, K., et al., *Effect of Weight Loss and Lifestyle Changes on Vascular Inflammatory Markers in Obese Women: A Randomized Trial*. *Journal of the American Medical Association*, 2003. **289**(14): p. 1799-1804.
402. Matsuzawa, Y., *Therapy insight: Adipocytokines in metabolic syndrome and related cardiovascular disease*. *Nature Clinical Practice Cardiovascular Medicine*, 2006. **3**(1): p. 35-42.
403. Patel, D.A., et al., *Adiponectin and its correlates of cardiovascular risk in young adults: the Bogalusa Heart Study*. *Metabolism: Clinical and Experimental*, 2006. **55**(11): p. 1551-1557.
404. Salmenniemi, U., et al., *Multiple abnormalities in glucose and energy metabolism and coordinated changes in levels of adiponectin, cytokines, and adhesion molecules in subjects with metabolic syndrome*. *Circulation*, 2004. **110**(25): p. 3842-3848.
405. Chow, W.S., et al., *Hypoadiponectinemia as a predictor for the development of hypertension - A 5-year prospective study*. *Hypertension*, 2007. **49**(6): p. 1455-1461.
406. Lim, S., et al., *Association of adiponectin and resistin with cardiovascular events in Korean patients with type 2 diabetes: The Korean atherosclerosis study (KAS) A 42-month prospective study*. *Atherosclerosis*, 2008. **196**(1): p. 398-404.
407. Iglseider, B., et al., *Plasma adiponectin levels and sonographic phenotypes of subclinical carotid artery atherosclerosis - Data from the SAPHIR study*. *Stroke*, 2005. **36**(12): p. 2577-2582.
408. Dullaart, R.P.F., et al., *Lower plasma adiponectin is a marker of increased intima-media thickness associated with type 2 diabetes mellitus and with male gender*. *European Journal of Endocrinology*, 2007. **156**(3): p. 387-394.
409. Rothenbacher, D., et al., *Adiponectin, risk of coronary heart disease and correlations with cardiovascular risk markers*. *European Heart Journal*, 2005. **26**(16): p. 1640-1646.
410. Lu, G.J., et al., *Adiponectin levels are associated with coronary artery disease across Caucasian and African American ethnicity*. *Translational Research*, 2007. **149**(6): p. 317-323.
411. Otsuka, F., et al., *Plasma adiponectin levels are associated with coronary lesion complexity in men with coronary artery disease*. *Journal of the American College of Cardiology*, 2006. **48**(6): p. 1155-1162.
412. Laughlin, G.A., et al., *Association of adiponectin with coronary heart disease and mortality - The Rancho Bernardo Study*. *American Journal of Epidemiology*, 2007. **165**(2): p. 164-174.
413. Wannamethee, S.G., et al., *Circulating adiponectin levels and mortality in elderly men with and without cardiovascular disease and heart failure*. *Archives of Internal Medicine*, 2007. **167**(14): p. 1510-1517.
414. Gracie, J.A., S.E. Robertson, and I.B. McInnes, *Interleukin-18*. *Journal of Leukocyte Biology*, 2003. **73**(2): p. 213-224.
415. Okamura, H., et al., *Cloning of a new cytokine that induces IFN-Gamma production by T-cells*. *Nature*, 1995. **378**(6552): p. 88-91.
416. Gerdes, N., et al., *Expression of interleukin (IL)-18 and functional IL-18 receptor on human vascular endothelial cells, smooth muscle cells, and macrophages: Implications for atherogenesis*. *Journal of Experimental Medicine*, 2002. **195**(2): p. 245-257.
417. Nold, M., et al., *IL-18 initiates release of matrix metalloproteinase-9 from peripheral blood mononuclear cells without affecting tissue inhibitor of matrix metalloproteinases-1:*

- suppression by TNF alpha blockage and modulation by IL-10*. Naunyn-Schmiedebergs Archives of Pharmacology, 2003. **367**(1): p. 68-75.
418. Ishida, Y., et al., *The role of IL-18 in the modulation of matrix metalloproteinases and migration of human natural killer (NK) cells*. FEBS Letters, 2004. **569**(1-3): p. 156-160.
419. Mallat, Z., et al., *Expression of interleukin-18 in human atherosclerotic plaques and relation to plaque instability*. Circulation, 2001. **104**(14): p. 1598-1603.
420. Skurk, T., et al., *The proatherogenic cytokine interleukin-18 is secreted by human adipocytes*. European Journal of Endocrinology, 2005. **152**(6): p. 863-868.
421. Thorand, B., et al., *Elevated levels of interleukin-18 predict the development of type 2 diabetes - Results from the MONICA/KORA Augsburg Study, 1984-2002*. Diabetes, 2005. **54**(10): p. 2932-2938.
422. Hung, J., et al., *Elevated interleukin-18 levels are associated with the metabolic syndrome independent of obesity and insulin resistance*. Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology, 2005. **25**(6): p. 1268-1273.
423. Mallat, Z., et al., *Interleukin-18/interleukin-18 binding protein signaling modulates atherosclerotic lesion development and stability*. Circulation Research, 2001. **89**(7): p. E41-+.
424. Elhage, R., et al., *Reduced atherosclerosis in interleukin-18 deficient apolipoprotein E-knockout mice*. Cardiovascular Research, 2003. **59**(1): p. 234-240.
425. Whitman, S.C., P. Ravisankar, and A. Daugherty, *Interleukin-18 enhances atherosclerosis in apolipoprotein E-/- mice through release of interferon-gamma*. Circulation Research, 2002. **90**(2): p. E34-E38.
426. Tenger, C., et al., *IL-18 accelerates atherosclerosis accompanied by elevation of IFN-γ and CXCL16 expression independently of T cells*. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology, 2005. **25**(4): p. 791-796.
427. De Nooijer, R., et al., *Overexpression of IL-18 decreases intimal collagen content and promotes a vulnerable plaque phenotype in apolipoprotein-E-deficient mice*. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology, 2004. **24**(12): p. 2313-2319.
428. Mallat, Z., et al., *Increased plasma concentrations of interleukin-18 in acute coronary syndromes*. Heart, 2002. **88**(5): p. 467-469.
429. Kawasaki, D., et al., *Usefulness of circulating interleukin-18 concentration in acute myocardial infarction as a risk factor for late restenosis after emergency coronary angioplasty*. American Journal of Cardiology, 2003. **91**(10): p. 1258-1261.
430. Narins, C.R., et al., *Interleukin-18 and interleukin-18 binding protein levels before and after percutaneous coronary intervention in patients with and without recent myocardial infarction*. American Journal of Cardiology, 2004. **94**(10): p. 1285-1287.
431. Chapman, C.M.L., et al., *Interleukin-18 levels are not associated with subclinical carotid atherosclerosis in a community population. The Perth Carotid Ultrasound Disease Assessment Study (CUDAS)*. Atherosclerosis, 2006. **189**(2): p. 414-419.
432. Zirlik, A., et al., *Interleukin-18, the metabolic syndrome, and subclinical atherosclerosis: Results from the Dallas Heart Study*. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology, 2007. **27**(9): p. 2043-2049.
433. Blankenberg, S., et al., *Interleukin-18 is a strong predictor of cardiovascular death in stable and unstable angina*. Circulation, 2002. **106**(1): p. 24-30.
434. Tiret, L., et al., *Genetic analysis of the interleukin-18 system highlights the role of the interleukin-18 gene in cardiovascular disease*. Circulation, 2005. **112**(5): p. 643-650.
435. Blankenberg, S., et al., *Interleukin-18 and the risk of coronary heart disease in European men - The Prospective Epidemiological Study of Myocardial Infarction (PRIME)*. Circulation, 2003. **108**(20): p. 2453-2459.
436. Koenig, W., et al., *Increased concentrations of C-reactive protein and IL-6 but not IL-18 are independently associated with incident coronary events in middle-aged men and women - Results from the MONICA/KORA Augsburg case-cohort study, 1984-2002*. Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology, 2006. **26**(12): p. 2745-2751.
437. Galis, Z.S. and J.J. Khatri, *Matrix metalloproteinases in vascular remodeling and atherogenesis - The good, the bad, and the ugly*. Circulation Research, 2002. **90**(3): p. 251-262.
438. Jones, C.B., D.C. Sane, and D.M. Herrington, *Matrix metalloproteinases: A review of their structure and role in acute coronary syndrome*. Cardiovascular Research, 2003. **59**(4): p. 812-823.

439. Galis, Z.S., et al., *Increased expression of matrix metalloproteinases and matrix-degrading activity in vulnerable regions of human atherosclerotic plaques*. Journal of Clinical Investigation, 1994. **94**(6): p. 2493-2503.
440. Yasmin, et al., *Matrix metalloproteinase-9 (MMP-9), MMP-2, and serum elastase activity are associated with systolic hypertension and arterial stiffness*. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology, 2005. **25**(2): p. 372-378.
441. Noji, Y., et al., *Circulating matrix metalloproteinases and their inhibitors in premature coronary atherosclerosis*. Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, 2001. **39**(5): p. 380-384.
442. Inokubo, Y., et al., *Plasma levels of matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 are increased in the coronary circulation in patients with acute coronary syndrome*. American Heart Journal, 2001. **141**(2): p. 211-217.
443. Kai, H., et al., *Peripheral blood levels of matrix metalloproteinases-2 and -9 are elevated in patients with acute coronary syndromes*. Journal of the American College of Cardiology, 1998. **32**(2): p. 368-372.
444. Eldrup, N., et al., *Elevated matrix metalloproteinase-9 associated with stroke or cardiovascular death in patients with carotid stenosis*. Circulation, 2006. **114**(17): p. 1847-1854.
445. Blankenberg, S., et al., *Plasma concentrations and genetic variation of matrix metalloproteinase 9 and prognosis of patients with cardiovascular disease*. Circulation, 2003. **107**(12): p. 1579-1585.
446. Lubos, E., et al., *Prognostic value of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 for cardiovascular death among patients with cardiovascular disease: Results from the AtheroGene study*. European Heart Journal, 2006. **27**(2): p. 150-156.
447. Cavusoglu, E., et al., *Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) is an independent predictor of all-cause mortality, cardiac mortality, and myocardial infarction*. American Heart Journal, 2006. **151**(5): p. 1108.e1-1108.e8.
448. Raes, M., C. Michiels, and J. Remacle, *Comparative study of the enzymatic defence systems against oxygen-derived free radicals. The key role of glutathione-peroxidase*. Free Radical Biology and Medicine, 1987. **3**(1): p. 3-7.
449. Ursini, F., M. Maiorino, and A. Roveri, *Phospholipid Hydroperoxide Glutathione Peroxidase (PHGPx): More Than an Antioxidant Enzyme?* Biomedical and Environmental Sciences, 1997. **10**(2-3): p. 327-332.
450. Guo, Z., et al., *Changes in expression of antioxidant enzymes affect cell-mediated LDL oxidation and oxidized LDL-induced apoptosis in mouse aortic cells*. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology, 2001. **21**(7): p. 1131-1138.
451. Forgione, M.A., et al., *Cellular glutathione peroxidase deficiency and endothelial dysfunction*. American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology, 2002. **282**(4 51-4): p. H1255-H1261.
452. Lackner, K.J. and S. Blankenberg, *Atherosclerosis, oxidative stress and glutathione peroxidase-1: A new kid on the block*. Italian Heart Journal, 2004. **5**(3): p. 169-172.
453. Blankenberg, S., et al., *Glutathione Peroxidase 1 Activity and Cardiovascular Events in Patients with Coronary Artery Disease*. New England Journal of Medicine, 2003. **349**(17): p. 1605-1613.
454. Nicholls, S.J. and S.L. Hazen, *Myeloperoxidase and cardiovascular disease*. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology, 2005. **25**(6): p. 1102-1111.
455. Eiserich, J.P., et al., *Myeloperoxidase, a leukocyte-derived vascular NO oxidase*. Science, 2002. **296**(5577): p. 2391-2394.
456. Fu, X., et al., *Hypochlorous Acid Oxygenates the Cysteine Switch Domain of Pro-matrilysin (MMP-7): A mechanism for matrix metalloproteinase activation and atherosclerotic plaque rupture by myeloperoxidase*. Journal of Biological Chemistry, 2001. **276**(44): p. 41279-41287.
457. Shabani, F., J. McNeil, and L. Tippet, *The oxidative inactivation of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) by hypochlorous acid (HOCl) is suppressed by anti-rheumatic drugs*. Free Radical Research, 1998. **28**(2): p. 115-123.
458. Baldus, S., et al., *Myeloperoxidase serum levels predict risk in patients with acute coronary syndromes*. Circulation, 2003. **108**(12): p. 1440-1445.

459. Brennan, M.L., et al., *Prognostic Value of Myeloperoxidase in Patients with Chest Pain*. New England Journal of Medicine, 2003. **349**(17): p. 1595-1604.
460. Mach, F., *The role of chemokines in atherosclerosis*. Current Atherosclerosis Reports, 2001. **3**(3): p. 243-251.
461. Yla-Herttuala, S., et al., *Expression of monocyte chemoattractant protein 1 in macrophage-rich areas of human and rabbit atherosclerotic lesions*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1991. **88**(12): p. 5252-5256.
462. Egashira, K., *Molecular mechanisms mediating inflammation in vascular disease: Special reference to monocyte chemoattractant protein-1*. Hypertension, 2003. **41**(3 II): p. 834-841.
463. Yamamoto, T., et al., *Monocyte chemoattractant protein-1 enhances gene expression and synthesis of matrix metalloproteinase-1 in human fibroblasts by an autocrine IL-1 α loop*. Journal of Immunology, 2000. **164**(12): p. 6174-6179.
464. Namiki, M., et al., *Local overexpression of monocyte chemoattractant protein-1 at vessel wall induces infiltration of macrophages and formation of atherosclerotic lesion: Synergism with hypercholesterolemia*. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology, 2002. **22**(1): p. 115-120.
465. Inoue, S., et al., *Anti-monocyte chemoattractant protein-1 gene therapy limits progression and destabilization of established atherosclerosis in apolipoprotein E-knockout mice*. Circulation, 2002. **106**(21): p. 2700-2706.
466. De Lemos, J.A., et al., *Association between plasma levels of monocyte chemoattractant protein-1 and long-term clinical outcomes in patients with acute coronary syndromes*. Circulation, 2003. **107**(5): p. 690-695.
467. Herder, C., et al., *Chemokines and incident coronary heart disease: Results from the MONICA/KORA Augsburg case-cohort study, 1984-2002*. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology, 2006. **26**(9): p. 2147-2152.
468. Iyer, S. and K.R. Acharya, *Role of placenta growth factor in cardiovascular health*. Trends in Cardiovascular Medicine, 2002. **12**(3): p. 128-134.
469. Lutun, A., et al., *Revascularization of ischemic tissues by PLGF treatment, and inhibition of tumor angiogenesis, arthritis and atherosclerosis by anti-Flt1*. Nature Medicine, 2002. **8**(8): p. 831-840.
470. Autiero, M., et al., *Placental growth factor and its receptor, vascular endothelial growth factor receptor-1: Novel targets for stimulation of ischemic tissue revascularization and inhibition of angiogenic and inflammatory disorders*. Journal of Thrombosis and Haemostasis, 2003. **1**(7): p. 1356-1370.
471. Khurana, R., et al., *Placental growth factor promotes atherosclerotic intimal thickening and macrophage accumulation*. Circulation, 2005. **111**(21): p. 2828-2836.
472. Heeschen, C., et al., *Prognostic Value of Placental Growth Factor in Patients with Acute Chest Pain*. Journal of the American Medical Association, 2004. **291**(4): p. 435-441.
473. Lenderink, T., et al., *Elevated placental growth factor levels are associated with adverse outcomes at four-year follow-up in patients with acute coronary syndromes*. Journal of the American College of Cardiology, 2006. **47**(2): p. 307-311.
474. Bligh, E.G. and W.J. Dyer, *A rapid method of total lipid extraction and purification*. Can. J. Biochem. Physiol., 1959. **37**(8): p. 911-917.
475. Galanos, D.S., Kapoulas, V. M., *Isolation of polar lipids from triglyceride mixtures*. J. Lipid Res., 1962. **3**: p. 134-137.
476. Allain, C.C., et al., *Enzymatic Determination of Total Serum-Cholesterol*. Clinical Chemistry, 1974. **20**(4): p. 470-475.
477. Burstein, M., Scholnic.Hr, and R. Morfin, *Rapid Method for Isolation of Lipoproteins from Human Serum by Precipitation with Polyanions*. Journal of Lipid Research, 1970. **11**(6): p. 583-&.
478. Friedewa.Wt, Fredrick.Ds, and R.I. Levy, *Estimation of Concentration of Low-Density Lipoprotein Cholesterol in Plasma, without Use of Preparative Ultracentrifuge*. Clinical Chemistry, 1972. **18**(6): p. 499-&.
479. Tsoupras, A.B., et al., *Platelet-activating factor and its basic metabolic enzymes in blood of naive HIV-infected patients*. Angiology, 2012. **63**(5): p. 343-352.
480. Bradford, M.M., *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Anal Biochem, 1976. **72**: p. 248-54.

481. Pinckard, R.N. and J.C. Ludwig, *Determination of PAF-2-acetylhydrolase activity*. Fedn Proc, 1986. **45**: p. 856.
482. Tsoupras, A.B., et al., *Characterization of the de novo biosynthetic enzyme of platelet activating factor, DDT-insensitive cholinephosphotransferase, of human mesangial cells*. Mediators Inflamm, 2007. **2007**: p. 27683.
483. Lee, T.C., D.S. Vallari, and F. Snyder, *1-alkyl-2-lyso-sn-glycero-3-phosphocholine acetyltransferase*. Methods Enzymol, 1992. **209**: p. 396-401.
484. Tsoupras, A.B., et al., *Anti-platelet-activating factor effects of highly active antiretroviral therapy (HAART): a new insight in the drug therapy of HIV infection?* AIDS Res Hum Retroviruses, 2008. **24**(8): p. 1079-86.
485. Schnitzer, E., et al., *Lipid oxidation in unfractionated serum and plasma*. Chemistry and Physics of Lipids, 1998. **92**(2): p. 151-170.
486. Stamatakis, G., et al., *Inhibition of atherogenesis in rabbits by yoghurt enriched with olive mill by-product extracts*. Hellenic Journal of atherosclerosis, Accepted. **1**(1): p. 37-43.
487. Magalhães, L.M., et al., *Methodological aspects about in vitro evaluation of antioxidant properties*. Analytica Chimica Acta, 2008. **613**(1): p. 1-19.
488. Galanos, D.S. and V.M. Kapoulas, *Preparation and analysis of lipid extracts from milk and other tissues*. Biochim. Biophys. Acta, 1965. **98**: p. 278-292.
489. Singleton, V.L. and J.A. Rossi, *Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents*. Am. J. Enol. Vitic., 1965. **16**: p. 144-158.
490. Obied, H.K., et al., *Bioscreening of Australian olive mill waste extracts: Biophenol content, antioxidant, antimicrobial and molluscicidal activities*. Food and Chemical Toxicology, 2007. **45**(7): p. 1238-1248.
491. Mateos, R., et al., *Determination of phenols, flavones, and lignans in virgin olive oils by solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography with diode array ultraviolet detection*. J Agric Food Chem, 2001. **49**(5): p. 2185-92.
492. Mazza, G., et al., *Anthocyanins, phenolics, and color of Cabernet Franc, Merlot, and Pinot Noir wines from British Columbia*. J Agric Food Chem, 1999. **47**(10): p. 4009-17.
493. Obied, H.K., et al., *Investigation of Australian olive mill waste for recovery of biophenols*. J Agric Food Chem, 2005. **53**(26): p. 9911-20.
494. Obied, H.K., et al., *Bioactivity and analysis of biophenols recovered from olive mill waste*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2005. **53**(4): p. 823-837.
495. Fragopoulou, E., et al., *Structure elucidation of phenolic compounds from red/white wine with antiatherogenic properties*. Biochim Biophys Acta, 2003. **1632**(1-3): p. 90-9.
496. Fragopoulou, E., et al., *Antiatherogenic properties of red/white wine, musts, grape-skins, and yeast*. Chemistry and Physics of Lipids, 2004. **130**(1): p. 66-66.
497. Fernández-Bolaños, J., et al., *Extraction of interesting organic compounds from olive oil waste*. Grasas y Aceites, 2006. **57**(1): p. 95-106.
498. Guillén, R., et al., *Fibre fraction carbohydrates in Olea europaea (Gordal and Manzanilla var.)*. Food Chemistry, 1992. **44**(3): p. 173-178.
499. Thakur, C.P. and A.N. Jha, *Influence of milk, yoghurt and calcium on cholesterol-induced atherosclerosis in rabbits*. Atherosclerosis, 1981. **39**(2): p. 211-215.
500. Ivey, K.L., et al., *Association between yogurt, milk, and cheese consumption and common carotid artery intima-media thickness and cardiovascular disease risk factors in elderly women*. American Journal of Clinical Nutrition, 2011. **94**(1): p. 234-239.
501. Panagiotakos, D.B., et al., *Dairy products consumption is associated with decreased levels of inflammatory markers related to cardiovascular disease in apparently healthy adults: The ATTICA study*. Journal of the American College of Nutrition, 2010. **29**(4): p. 357-364.
502. Antonopoulou, S., et al., *Platelet-Activating Factor (PAF) Antagonists in Foods: A Study of Lipids with PAF or Anti-PAF-like Activity in Cow's Milk and Yogurt*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1996. **44**(10): p. 3047-3051.