



**ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ**

**ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ**

**ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ**

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ «ΧΗΜΕΙΑΣ»  
ΕΙΔΙΚΕΥΣΗ «ΚΛΙΝΙΚΗ ΧΗΜΕΙΑ»**

**ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ**

**Μελέτη των αντιοξειδωτικών ιδιοτήτων της HDL σε ασθενείς  
με οξύ ισχαιμικό αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο και η  
συσχέτισή τους με τη βαρύτητα και την έκβαση του  
περιστατικού**

**ΚΑΤΡΙΝΗ ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΑ  
ΧΗΜΙΚΟΣ**

**ΑΘΗΝΑ**

**ΦΕΒΡΟΥΑΡΙΟΣ 2019**





## **ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ**

Μελέτη των αντιοξειδωτικών ιδιοτήτων της HDL σε ασθενείς με οξύ ισχαιμικό αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο και η συσχέτισή τους με τη βαρύτητα και την έκβαση του περιστατικού

**ΚΑΤΡΙΝΗ ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΑ**

**A.M.: 71608**

**ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ:**

Ευρύκλεια Λιανίδου , Καθηγήτρια, Τμήμα Χημείας, ΕΚΠΑ

### **ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

1. Ευρύκλεια Λιανίδου , Καθηγήτρια, Τμήμα Χημείας, ΕΚΠΑ
2. Αγγελική Χρόνη, Ερευνήτρια Α΄, Ινστιτούτο Βιοεπισημών και Εφαρμογών, Ε.ΚΕ.Φ.Ε «Δημόκριτος»
3. Χρήστος Κρούπης, Επίκουρος Καθηγητής Κλινικής Βιοχημείας - Μοριακής Διαγνωστικής, Ιατρική Σχολή, ΕΚΠΑ

**ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΕΞΕΤΑΣΗΣ**

**22/02/2019**



## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το εγκεφαλικό επεισόδιο αποτελεί ένα μεγάλο ιατρικό και κοινωνικό φαινόμενο καθώς συγκαταλέγεται στις κύριες αιτίες θνητότητας και νοσηρότητας στις αναπτυγμένες χώρες. Το μεγαλύτερο ποσοστό των εγκεφαλικών επεισοδίων αποτελούν τα ισχαιμικά αγγειακά εγκεφαλικά επεισόδια, τα οποία οφείλονται σε μειωμένη αιματική ροή στον εγκέφαλο εξαιτίας ενός θρόμβου ή στένωσης προερχόμενων από την ύπαρξη αθηροσκλήρωσης στις κεντρικές αρτηρίες. Ως εκ τούτου τα αγγειακά ισχαιμικά εγκεφαλικά επεισόδια σχετίζονται άμεσα με την αθηρωμάτωση και εν γένει με τις δυσλιπιδαιμίες. Είναι γνωστό ότι τα χαμηλά επίπεδα της HDL-χοληστερόλης (HDL-C) έχουν συσχετιστεί με υψηλό κίνδυνο εμφάνισης καρδιαγγειακών νοσημάτων συμπεριλαμβανομένου του αγγειακού ισχαιμικού εγκεφαλικού επεισοδίου. Ωστόσο, το επιστημονικό ενδιαφέρον έχει μετατοπιστεί περισσότερο προς την ποιότητα της HDL παρά στην ποσότητα διότι μελέτες που στόχευαν στην αύξηση των επιπέδων της HDL απέτυχαν να μείωσουν τον κίνδυνο για καρδιαγγειακά νοσήματα. Η HDL είναι ένα περίπλοκο μόριο που διαθέτει μια σειρά αθηροπροστατευτικών ιδιοτήτων, που περιλαμβάνουν κυρίως την ικανότητα απομάκρυνσης της περίσσειας χοληστερόλης από τα κύτταρα, αντιοξειδωτικές, αντιφλεγμονώδεις και αντιθρομβωτικές ιδιότητες. Όμως, σε χρόνιες ή και οξείες φλεγμονώδεις καταστάσεις δύναται να αλλοιωθεί ο αθηροπροστατευτικός χαρακτήρας της HDL. Ασθενείς με ισχαιμικό εγκεφαλικό επεισόδιο έχουν δυσλειτουργική HDL συγκρινόμενοι με υγιείς, αλλά δεν είναι ξεκάθαρο εάν αυτή η δυσλειτουργία σχετίζεται με τη βαρύτητα και την έκβαση του περιστατικού. Στόχος της παρούσας μελέτης είναι η εκτίμηση της σχέσης μεταξύ της λειτουργικότητας της HDL και της βαρύτητας καθώς και της έκβασης του οξέος ισχαιμικού αγγειακού εγκεφαλικού επεισοδίου (ΑΕΕ). Μελετήθηκαν προοπτικά 199 διαδοχικοί ασθενείς (42,7% άνδρες, ηλικία  $78,6 \pm 6,5$  έτη) με οξύ ισχαιμικό ΑΕΕ. Εκτιμήσαμε την αντιοξειδωτική ικανότητας της HDL με τη μέθοδο της διχλωροφλουορεσκεΐνης DCF, στην οποία το αυξημένο σήμα φθορισμού υποδεικνύει ελαττωμένη αντιοξειδωτική ικανότητα. Βρέθηκε ότι το σήμα φθορισμού σχετίστηκε επίσης θετικά με τη βαρύτητα του εγκεφαλικού και το σήμα φθορισμού ήταν υψηλότερο σε ασθενείς που είχαν υποστεί βαρύτερο εγκεφαλικό καθώς και σε ασθενείς που ήταν λειτουργικά εξαρτημένοι κατά την

έξοδο τους από το νοσοκομείο. Ανεξάρτητοι παράγοντες κινδύνου για βαρύ ΑΕΕ βρέθηκαν να είναι το θήλυ φύλο, (ΣΚ 2.8, 95% ΔΕ 1.37-5.69,  $p=0.005$ ) το σήμα φθορισμού (ΣΚ 1.03, 95% ΔΕ 1.00-1.06,  $p=0.024$ ) και τα επίπεδα γλυκόζης (ΣΚ 1.01, 95% ΔΕ 1.0-1.02,  $p=0.08$ ). Η δραστηριότητα της σχετιζόμενης με την HDL PON1, που αποτελεί ένα από τα κύρια συστατικά που προσδίδουν αντιοξειδωτικές δράσεις στην HDL δεν βρέθηκε να συσχετίζεται με τη βαρύτητα του περιστατικού, ούτε και με την έκβαση του εγκεφαλικού επεισοδίου. Ωστόσο τα επίπεδα της σχετιζόμενης με την HDL μυελοϋπεροξειδάσης (MPO) και ο λόγος MPO/PON1 βρέθηκαν αυξημένα στους ασθενείς με βαρύ ΑΕΕ και στους λειτουργικά εξαρτημένους κατά την έξοδο τους από το νοσοκομείο. Τέλος, η διερεύνηση της σχέσης της αντιοξειδωτικής ικανότητας της HDL και της μακροπρόθεσμης έκβασης των ασθενών με ισχαιμικό ΑΕΕ κατέδειξε πως η ελαττώμενη αντιοξειδωτική ικανότητα σχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο θανάτου κατά τη διάρκεια του πρώτου έτους μετά το επεισόδιο. Συνολικά, τα αποτελέσματά μας δείχνουν ότι η ελαττωμένη αντιοξειδωτική ικανότητα της HDL σχετίζεται με πιο βαρύ οξύ ισχαιμικό ΑΕΕ και ενδεχομένως επίσης να προβλέπει δυσμενέστερη λειτουργική έκβαση και επιβίωση στους ασθενείς αυτούς.

**ΘΕΜΑΤΙΚΗ ΠΕΡΙΟΧΗ:** Κλινική Χημεία

**ΛΕΞΕΙΣ ΚΛΕΙΔΙΑ:** ισχαιμικό εγκεφαλικό επεισόδιο, βαρύτητα ισχαιμικού εγκεφαλικού επεισοδίου, HDL, αντιοξειδωτικές ιδιότητες της HDL, PON1, MPO

## ABSTRACT

Stroke is a major medical and social phenomenon as it is one of the main causes of mortality and morbidity in developed countries. The majority of strokes are ischemic strokes, which are attributed to decreased cerebral perfusion due to atherosclerosis, directly related to dyslipidemias. Traditionally, low plasma HDL-cholesterol levels have been associated with increased risk for cardiovascular disease, including ischemic stroke. However, currently the scientific interest has been shifted towards the quality of HDL than in the quantity of HDL-cholesterol, since studies aiming at increasing HDL-cholesterol levels failed to reduce the risk of cardiovascular disease. HDL is a complex molecule that has a range of atheroprotective properties, including cholesterol efflux capacity, antioxidant, anti-inflammatory and antithrombotic properties. However, in chronic and / or acute inflammatory conditions the atheroprotective capacity of HDL may be impaired. Stroke patients have dysfunctional HDL compared to controls, but it is unclear whether the dysfunctions are associated with the severity and outcome of acute ischemic stroke. In this study we evaluated the antioxidant properties of HDL in ischemic stroke patients and assessed the association between the antioxidant activity of HDL and the severity and outcome of acute ischemic stroke. We prospectively studied 199 consecutive patients admitted with acute ischemic stroke (42.7% males, age  $78.6 \pm 6.5$ ). The antioxidant capacity of HDL was evaluated with the dichlorofluorescein assay (DCF assay), where an increase in fluorescence signal indicates reduced antioxidant potential. We found that the fluorescence signal correlates positively with the severity of ischemic stroke. In addition, patients with severe stroke had higher fluorescence signal than patients with mild stroke and patients who were dependent at discharge had higher fluorescence signal than patients who were independent. Independent risk factors for severe ischemic stroke were female gender (relative risk (RR) 2.8, 95% confidence interval (CI) 1.37-5.69,  $p = 0.005$ ), fluorescence signal (RR 1.03, 95% CI 1.00-1.06,  $p = 0.024$ ) and glucose levels (RR 1.01, 95% CI 1.0-1.02,  $p = 0.08$ ). HDL-associated PON1 activity, which is one of the main constituents that contribute in HDL antioxidant effects, was not found to correlate with the severity or the outcome of the event. However, HDL-associated myeloperoxidase (MPO) levels and



the MPO / PON1 ratio were increased in patients with severe stroke and those who were dependent at hospital discharge. Finally, the analysis of the relationship of antioxidant capacity of HDL and the long-term outcomes of patients with acute ischemic stroke showed that the reduced antioxidant capacity is associated with an increased risk of death during the first year after the incident. Overall, our findings suggest that impaired antioxidant activity of HDL is associated with more severe acute ischemic stroke and might also predict a worse functional outcome and survival in these patients.

**SUBJECT AREA:** Clinical Chemistry

**KEYWORDS:** ischemic stroke, severity of ischemic stroke, HDL, antioxidant activity of HDL, PON1, MPO

## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Για τη διεκπεραίωση της παρούσας ερευνητικής εργασίας θα ήθελα να ευχαριστήσω την κ. Ευρύκλεια Λιανίδου, Καθηγήτρια Αναλυτικής Χημείας – Κλινικής Χημείας του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Αθηνών και Συντονίστρια του Μεταπτυχιακού Προγράμματος Ειδίκευσης στην Κλινική Χημεία, που με συμπεριέλαβε στο μεταπτυχιακό της πρόγραμμα δίνοντας μου έτσι την ευκαιρία να έρθω σε επαφή με επίκαιρα θέματα μεγάλου επιστημονικού ενδιαφέροντος και να εμπλουτίσω με αυτό τον τρόπο τις γνώσεις μου.

Ένα θερμό ευχαριστώ οφείλω στην επιβλέπουσα της διπλωματικής μου εργασίας Δρ. Αγγελική Χρόνη, Ευρευνήτρια Α΄ στο Ινστιτούτο Βιοεπιστημών και Εφαρμογών ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος» όπου και εκπονήθηκε. Η συνεργασία μου με την κύρια Χρόνη μου χάρισε απλόχερα πλούσιες επιστημονικές και εργαστηριακές γνώσεις. Την ευχαριστώ για την αμέριστη κατανόηση και συμπαράσταση, την συνεχή υποστήριξη και καθοδήγησή της και για τις ευκαιρίες που μου δόθηκαν μέσα από τη συνεργασία μας.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά όλα τα μέλη του εργαστηρίου που με συμπεριέλαβαν και με ενσωμάτωσαν στην ομάδα τους, για το ευχάριστο κλίμα συνεργασίας καθώς και για την άρτια εργαστηριακή εκπαίδευση που μου παρείχαν. Ακόμα θα ήθελα να ευχαριστήσω τους μεταπτυχιακούς συμφοιτητές μου για το πνεύμα συνεργασίας, αλληλοϋποστήριξης και συμπαράστασης που επέδειξαν και που συνέβαλλαν στο να μετατραπεί ο στόχος της απόκτησης μεταπτυχιακού διπλώματος σε μια αξέχαστη εμπειρία.



## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

<b>1. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 Γενικές γνώσεις για τις λιποπρωτεΐνες .....</b>	<b>10</b>
1.1 Λιποπρωτεΐνες.....	10
1.1.1 Απολιποπρωτεΐνες .....	12
1.1.2 Χυλομικρά (CM) .....	14
1.1.3 Πολύ χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνες (VLDL) .....	15
1.1.4 Ενδιάμεσης πυκνότητας λιποπρωτεΐνες (IDL).....	16
1.1.5 Χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνες (LDL) .....	16
1.1.6 Υψηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνες (HDL) .....	16
<b>2. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 Κυκλοφορικό σύστημα και αθηροσκλήρωση .....</b>	<b>23</b>
2.1 Το κυκλοφορικό σύστημα και ο ρόλος του .....	23
2.2 Η δομή της αρτηρίας.....	23
2.3 Παθογένεια και παθοφυσιολογία της αθηροσκλήρωσης .....	24
2.4 Πιθανοί μηχανισμοί οξειδωσης LDL.....	29
2.5 Αθηροσκλήρωση και εμφάνιση ισχαιμικού αγγειακού εγκεφαλικού επεισοδίου (ΑΕΕ).....	30
2.5.1 Παράγοντες κινδύνου ΑΕΕ.....	32
<b>3. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 HDL και αθηροσκλήρωση.....</b>	<b>38</b>
3.1 Βιολογικός ρόλος HDL .....	38
3.1.1 HDL και το μονοπάτι της ανάστροφης μεταφοράς χοληστερόλης .....	38
3.1.2 Αντιφλεγμονώδης δράση της HDL .....	40
3.1.3 Προστασία ακεραιότητας ενδοθηλίου .....	40
3.1.4 Αντιθρομβωτικές ιδιότητες.....	41
3.1.5 Αντιοξειδωτικές ιδιότητες .....	41
3.2 Απώλεια λειτουργικότητας της HDL σε παθολογικές καταστάσεις....	47
<b>4. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4 Σκοπός της εργασίας .....</b>	<b>51</b>
4.1 Σκοπός της εργασίας .....	51
<b>5. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5 Υλικά και μέθοδοι .....</b>	<b>53</b>
5.1 Απομόνωση HDL από τον ορό αίματος .....	53
5.1.1 Αντιδραστήρια-υλικά, όργανα.....	53

5.1.2	Αρχή της μεθόδου .....	53
5.1.3	Πειραματική διαδικασία .....	54
5.2	Απομόνωση LDL από ορό αίματος.....	54
5.2.1	Αντιδραστήρια-υλικά, όργανα.....	54
5.2.2	Αρχή της μεθόδου .....	55
5.2.3	Πειραματική διαδικασία .....	55
5.3	Προσδιορισμός Ολικής Χοληστερόλης ,HDL-C και LDL-C.....	55
5.3.1	Αντιδραστήρια-υλικά,όργανα.....	55
5.3.2	Αρχή της μεθόδου .....	56
5.3.3	Πειραματική διαδικασία .....	56
5.4	Προσδιορισμός Τριγλυκεριδίων .....	57
5.4.1	Αντιδραστήρια-υλικά, όργανα.....	57
5.4.2	Αρχή της μεθόδου .....	58
5.4.3	Πειραματική διαδικασία .....	58
5.5	Προσδιορισμός των αντιοξειδωτικών ιδιοτήτων της HDL με την δοκιμασία μέτρησης 2,7 διχλωροφλουορεσκεΐνης (DCF) .....	59
5.5.1	Αντιδραστήρια-υλικά, όργανα.....	59
5.5.2	Αρχή της μεθόδου .....	59
5.5.3	Πειραματική διαδικασία .....	60
5.6	Προσδιορισμός δραστικότητας παραοξονάσης του ενζύμου PON1 .	61
5.6.1	Αντιδραστήρια-υλικά, όργανα.....	61
5.6.2	Αρχή της μεθόδου .....	61
5.6.3	Πειραματική διαδικασία .....	62
5.7	Ποσοτικός προσδιορισμός της αποΑ-I σε ορό ασθενών.....	63
5.7.1	Αντιδραστήρια-υλικά, όργανα.....	63
5.7.2	Αρχή της μεθόδου .....	63
5.7.3	Πειραματική διαδικασία .....	63
5.8	Ποσοτικός προσδιορισμός ενζύμου μυελοϋπεροξειδάση, MPO .....	64
5.8.1	Αντιδραστήρια-υλικά, όργανα.....	64
5.8.2	Αρχή της μεθόδου .....	65
5.8.3	Πειραματική διαδικασία .....	66
5.9	Στατιστική Ανάλυση .....	66
<b>6.</b>	<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6 Αποτελέσματα.....</b>	<b>68</b>
6.1	Γενικά χαρακτηριστικά στο συνολικό πλυθησμό της μελέτης.....	68

6.2	Συσχέτιση της λειτουργικότητας της HDL ως προς τις αντιοξειδωτικές της ιδιότητες και της σύστασής της HDL με τη συγκέντρωση HDL-C σε ασθενείς με ΑΕΕ.....	71
6.3	Διερεύνηση της λειτουργικότητας της HDL ασθενών με ΑΕΕ ως προς τις αντιοξειδωτικές της ιδιότητες και η συσχέτισή της με τη βαρύτητα του περιστατικού.....	73
6.4	Διερεύνηση της λειτουργικότητας της HDL ασθενών με ΑΕΕ ως προς τις αντιοξειδωτικές της ιδιότητες και η συσχέτισή της με την εξάρτηση των ασθενών κατά την έξοδο τους από το νοσοκομείο.....	80
6.5	Διερεύνηση της λειτουργικότητας της HDL ασθενών με ΑΕΕ ως προς τις αντιοξειδωτικές της ιδιότητες και η συσχέτισή της με την ενδονοσοκομειακή θνητότητα. ....	85
6.6	Διερεύνηση της λειτουργικότητας της HDL ασθενών με ΑΕΕ ως προς τις αντιοξειδωτικές της ιδιότητες και η συσχέτισή της με την λειτουργική εξάρτηση 1 έτος μετά το περιστατικό.....	90
6.7	Διερεύνηση της λειτουργικότητας της HDL ασθενών με ΑΕΕ ως προς τις αντιοξειδωτικές της ιδιότητες και η συσχέτισή της με την επανεμφάνιση νέου εγκεφαλικού επεισοδίου 1 έτος μετά το περιστατικό.....	94
6.8	Διερεύνηση της λειτουργικότητας της HDL ασθενών με ΑΕΕ ως προς τις αντιοξειδωτικές της ιδιότητες και η συσχέτισή της με την θνητότητα 1 έτος μετά το περιστατικό. ....	98
<b>7.</b>	<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7 Συμπεράσματα - Συζήτηση.....</b>	<b>103</b>
7.1	Αξιολόγηση των αποτελεσμάτων της μελέτης.....	103
7.1.1	Προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής ικανότητας της HDL με τη μέθοδο της διχλωροφλουορεσκεΐνης (δοκιμασία DCF) .....	104
7.1.2	Προσδιορισμός δραστηριότητας της σχετιζόμενης με την HDL,PON1 .....	105
7.1.3	Προσδιορισμός της σχετιζόμενης με την HDL μυελοϋπεροξειδάση, MPO .....	106
7.1.4	Πολυπαραγοντική ανάλυση.....	108
<b>8.</b>	<b>ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ – ΑΡΚΤΙΚΟΛΕΞΑ – ΑΚΡΩΝΥΜΙΑ.....</b>	<b>111</b>
<b>9.</b>	<b>ΑΝΑΦΟΡΕΣ .....</b>	<b>114</b>

## ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1.1 Σχηματική αναπαράσταση της δομής των λιποπρωτεϊνών. ....	10
Εικόνα 1.2 Αναλογία μεγέθους και σύστασης των διάφορων λιποπρωτεϊνών .....	11
Εικόνα 1.3 Οι υποπληθυσμοί της HDL βάσει μεγέθους και της ηλεκτροφορητικής τους ικανότητας. ....	18
Εικόνα 1.4 Αντίδραση εστεροποίησης της χοληστερόλης που καταλύεται από το ένζυμο LCAT. ....	21
Εικόνα 1.5 Σχηματική αναπαράσταση του μονοπατιού βιογένεσης και καταβολισμού της λιποπρωτεΐνης HDL. ....	22
Εικόνα 2.1 Η δομή μιας φυσιολογικής μεγάλης αρτηρίας.....	24
Εικόνα 2.2 Σχηματική αναπαράσταση της πρώιμης αθηροσκληρωτικής βλάβης.....	28
Εικόνα 5.1 Αντιδράσεις κατά τη μέτρηση χοληστερόλης.....	56
Εικόνα 5.2 Αντίδραση που λαμβάνει χώρα κατά τη δοκιμασία με DCF.....	60
Εικόνα 5.3 Αντίδραση που λαμβάνει χώρα κατά τον προσδιορισμό ενεργότητας του ενζύμου PON1. ....	61
Εικόνα 5.4 Σχηματική αναπαράσταση ELISA τύπου Sandwich.....	65

## ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

Σχήμα 6.1 Αρνητική συσχέτιση συγκέντρωσης HDL-C και σήματος φθορισμού στη δοκιμασία DCF.....	71
Σχήμα 6.2 Θετική συσχέτιση συγκέντρωσης HDL-C και δραστικότητας ενζύμου PON1.....	72
Σχήμα 6.3 Θετική συσχέτιση συγκέντρωσης HDL-C και συγκέντρωσης απο-A-I.....	72
Σχήμα 6.4 Ανυπαρξία συσχέτισης της σύγκεντρωσης HDL-C με τη συγκέντρωση της MPO.....	73
Σχήμα 6.5 Συσχέτιση αντιοξειδωτικής ικανότητας της HDL με τη μέθοδο της διχλωροφλουορεσκεΐνης, DCF και της κλίμακας NIHSS.....	75
Σχήμα 6.6 Ανυπαρξία συσχέτισης της δραστικότητας της σχετιζόμενης με την HDL PON1 και της κλίμακας NIHSS.....	75
Σχήμα 6.7 Συσχέτιση της συγκέντρωσης της σχετιζόμενης με την HDL MPO και της κλίμακας NIHSS.....	76
Σχήμα 6.8 Συσχέτιση του λόγου MPO/PON1 και της κλίμακας NIHSS.....	76
Σχήμα 6.9 Η αντιοξειδωτική ικανότητα της HDL μέσω της δοκιμασίας DCF σε ασθενείς με βαρύ και με ελαφρύ εγκεφαλικό επεισόδιο.....	77
Σχήμα 6.10 Η δραστικότητα της σχετιζόμενης με την HDL PON1 σε ασθενείς με βαρύ και με ελαφρύ εγκεφαλικό επεισόδιο.....	77
Σχήμα 6.11 Συγκέντρωση της σχετιζόμενης με την HDL MPO σε ασθενείς με βαρύ και με ελαφρύ εγκεφαλικό επεισόδιο.....	78
Σχήμα 6.12 Συγκέντρωση του λόγου MPO/PON1 σε ασθενείς με βαρύ και με ελαφρύ εγκεφαλικό επεισόδιο.....	78
Σχήμα 6.13 Η αντιοξειδωτική ικανότητα της HDL μέσω της δοκιμασίας DCF σε ασθενείς λειτουργικά εξαρτημένους και ανεξάρτητους κατά την έξοδό τους από το νοσοκομείο ύστερα από ΑΕΕ.....	81
Σχήμα 6.14 Η δραστικότητα της σχετιζόμενης με την HDL PON1 σε ασθενείς λειτουργικά εξαρτημένους και ανεξάρτητους κατά την έξοδό τους από το νοσοκομείο ύστερα από ΑΕΕ.....	82
Σχήμα 6.15 Συγκέντρωση της σχετιζόμενης με την HDL MPO σε ασθενείς λειτουργικά εξαρτημένους και ανεξάρτητους κατά την έξοδό τους από το νοσοκομείο ύστερα από ΑΕΕ.....	82
Σχήμα 6.16 Συγκέντρωση του λόγου MPO/PON1 σε ασθενείς λειτουργικά εξαρτημένους και ανεξάρτητους κατά την έξοδό τους από το νοσοκομείο ύστερα από ΑΕΕ.....	83
Σχήμα 6.17 Η αντιοξειδωτική ικανότητα της HDL μέσω της δοκιμασίας DCF σε ασθενείς που απεβίωσαν ενδονοσοκομειακά και σε εκείνους που έλαβαν εξιτήριο ύστερα από ΑΕΕ.....	86



Σχήμα 6.18 Η δραστικότητα της σχετιζόμενης με την HDL PON1 σε ασθενείς που απεβίωσαν ενδονοσοκομειακά και σε εκείνους που έλαβαν εξιτήριο ύστερα από ΑΕΕ.....	87
Σχήμα 6.19 Συγκέντρωση της σχετιζόμενης με την HDL MPO σε ασθενείς που απεβίωσαν ενδονοσοκομειακά και σε εκείνους που έλαβαν εξιτήριο ύστερα από ΑΕΕ. ....	87
Σχήμα 6.20 Συγκέντρωση του λόγου MPO/PON1 σε ασθενείς που απεβίωσαν ενδονοσοκομειακά και σε εκείνους που έλαβαν εξιτήριο ύστερα από ΑΕΕ....	88
Σχήμα 6.21 Η αντιοξειδωτική ικανότητα της HDL μέσω της δοκιμασίας DCF σε ασθενείς λειτουργικά εξαρτημένους και ανεξάρτητους 1 έτος μετά το ΑΕΕ....	91
Σχήμα 6.22 Η δραστικότητα της σχετιζόμενης με την HDL PON1 σε ασθενείς λειτουργικά εξαρτημένους και ανεξάρτητους 1 έτος μετά το ΑΕΕ. ....	91
Σχήμα 6.23 Η συγκέντρωση της, σχετιζόμενης με την HDL, MPO σε ασθενείς λειτουργικά εξαρτημένους και ανεξάρτητους 1 έτος μετά το ΑΕΕ. ....	92
Σχήμα 6.24 Η αναλογία, MPO/PON1 σε ασθενείς λειτουργικά εξαρτημένους και ανεξάρτητους 1 έτος μετά το ΑΕΕ. ....	92
Σχήμα 6.25 Η αντιοξειδωτική ικανότητα της HDL μέσω της δοκιμασίας DCF σε ασθενείς που επανεμφάνισαν εγκεφαλικό επεισόδιο και σε αυτούς που δεν εμφάνισαν 1 έτος μετά το ΑΕΕ.....	95
Σχήμα 6.26 Η δραστικότητα της σχετιζόμενης με την HDL PON1 σε ασθενείς που επανεμφάνισαν εγκεφαλικό επεισόδιο και σε αυτούς που δεν εμφάνισαν 1 έτος μετά το ΑΕΕ. ....	95
Σχήμα 6.27 Η συγκέντρωση της σχετιζόμενης με την HDL MPO σε ασθενείς που επανεμφάνισαν εγκεφαλικό επεισόδιο και σε αυτούς που δεν εμφάνισαν 1 έτος μετά το ΑΕΕ. ....	96
Σχήμα 6.28 Η αναλογία MPO/PON1 σε ασθενείς που επανεμφάνισαν εγκεφαλικό επεισόδιο και σε αυτούς που δεν εμφάνισαν 1 έτος μετά το ΑΕΕ. ....	96
Σχήμα 6.29 Η αντιοξειδωτική ικανότητα της HDL μέσω της δοκιμασίας DCF σε ασθενείς που απεβίωσαν και σε ασθενείς που επέζησαν 1 έτος μετά το ΑΕΕ. ....	99
Σχήμα 6.30 Η δραστικότητα της σχετιζόμενης με την HDL PON1 σε ασθενείς που απεβίωσαν και σε όσους επέζησαν 1 έτος μετά το ΑΕΕ.....	99
Σχήμα 6.31 Η συγκέντρωση της σχετιζόμενης με την HDL, MPO σε ασθενείς που απεβίωσαν και σε όσους επέζησαν 1 έτος μετά το ΑΕΕ.....	100
Σχήμα 6.32 Η αναλογία MPO/PON1 σε ασθενείς που απεβίωσαν και σε όσους επέζησαν 1 έτος μετά το ΑΕΕ. ....	100

## ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1.1 Ιδιότητες και σύσταση των κυριότερων λιποπρωτεϊνών.....	12
Πίνακας 1.2 Κατηγορίες απολιποπρωτεϊνών και οι βασικές τους λειτουργίες. .....	14
Πίνακας 5.1 Όγκοι που χρησιμοποιήθηκαν από τον βαθμονομητή, τα δείγματα και το PBS για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης και για τη μέτρηση των δειγμάτων .....	57
Πίνακας 5.2 Όγκοι (μL) του βαθμονομητή προτύπου ορού, των δειγμάτων και του PBS που χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό των τριγλυκεριδίων.. .....	58
Πίνακας 5.3 Όγκοι σε (μL) που χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης.....	64
Πίνακας 6.1 Κλινικά και εργαστηριακά χαρακτηριστικά του πληθυσμού μελέτης με διαγνωσμένο οξύ ισχαιμικό εγκεφαλικό επεισόδιο.....	70
Πίνακας 6.2 Κλινικά και εργαστηριακά χαρακτηριστικά των ασθενών με βαρύ και με ελαφρύ ΑΕΕ.....	79
Πίνακας 6.3 Πολυπαραγοντική διωνυμική ανάλυση με εξαρτημένη μεταβλητή τη βαρύτητα του ΑΕΕ.....	80
Πίνακας 6.4 Κλινικά και εργαστηριακά χαρακτηριστικά των εξαρτημένων και ανεξάρτητων κατά την έξοδό τους από το νοσοκομείο ασθενών με ΑΕΕ.....	84
Πίνακας 6.5 Πολυπαραγοντική διωνυμική ανάλυση με τη λειτουργική εξάρτηση ως εξαρτημένη μεταβλητή στους ασθενείς με ΑΕΕ.....	85
Πίνακας 6.6 Κλινικά και εργαστηριακά χαρακτηριστικά των ασθενών που κατέληξαν κατά τη νοσηλεία και αυτών που έλαβαν εξιτήριο ύστερα από ΑΕΕ. .....	89
Πίνακας 6.7 Πολυπαραγοντική διωνυμική ανάλυση με την ενδονοσοκομειακή θνητότητα ως εξαρτημένη μεταβλητή στους ασθενείς με ΑΕΕ.....	90
Πίνακας 6.8 Κλινικά και εργαστηριακά χαρακτηριστικά για ασθενείς που ήταν εξαρτημένοι 1 χρόνο μετά την εξαγωγή και για ασθενείς που ήταν ανεξάρτητοι.....	93
Πίνακας 6.9 Πολυπαραγοντική διωνυμική ανάλυση με την εξάρτηση μετά από 1 έτος ως εξαρτημένη μεταβλητή.....	94
Πίνακας 6.10 Κλινικά και εργαστηριακά χαρακτηριστικά για ασθενείς που εμφάνισαν νέο εγκεφαλικό επεισόδιο και για όσους δεν επανεμφάνισαν 1 χρόνο μετά το ΑΕΕ.....	97
Πίνακας 6.11 Πολυπαραγοντική διωνυμική ανάλυση με εξαρτημένη μεταβλητή την επανεμφάνιση νέου ΑΕΕ μετά από 1 έτος.....	98

Πίνακας 6.12 Κλινικά και εργαστηριακά χαρακτηριστικά για ασθενείς που απεβίωσαν και για όσους επέζησαν 1 έτος μετά το ΑΕΕ. ....	101
Πίνακας 6.13 Πολυπαραγοντική διωνυμική ανάλυση με εξαρτημένη μεταβλητή τη θνητότητα 1 έτος μετά το ΑΕΕ .....	102

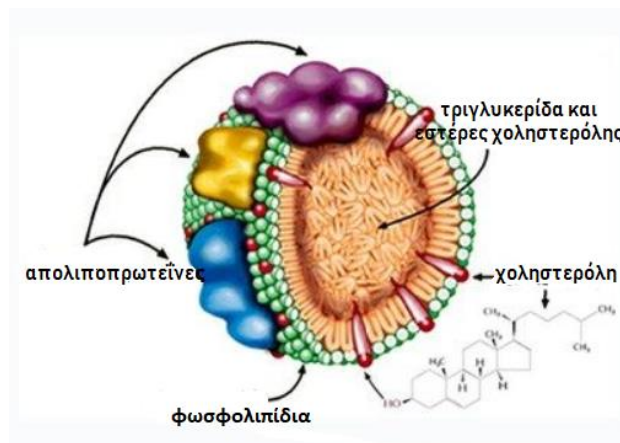
## **ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

# ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

## Γενικές γνώσεις για τις λιποπρωτεΐνες

### 1.1 Λιποπρωτεΐνες

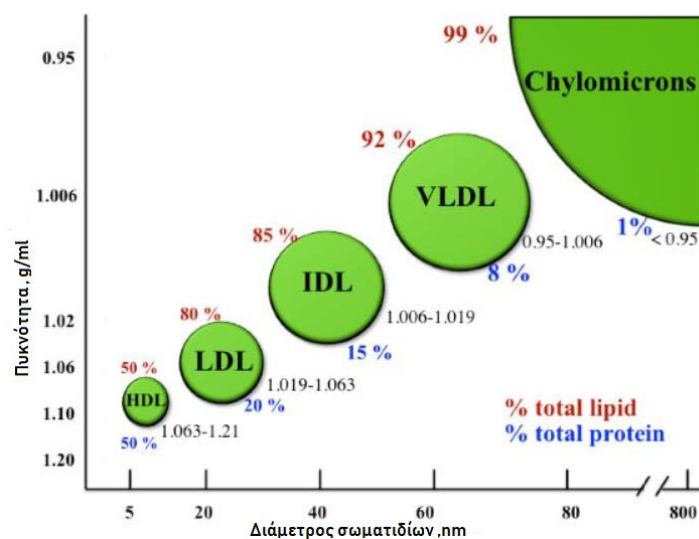
Τα λιπίδια που προσλαμβάνονται μέσω της τροφής καθώς και τα λιπίδια που αποσυντίθενται στον οργανισμό θα πρέπει να μεταφερθούν από και προς τους διάφορους ιστούς καθότι αποτελούν δομικά και λειτουργικά συστατικά των κυττάρων. Εφόσον όμως τα λιπίδια είναι υδρόφοβες χημικές ενώσεις αδιάλυτες στο νερό, η μεταφορά τους στους διάφορους ιστούς του οργανισμού επιτυγχάνεται με την ενσωμάτωση τους σε υδατοδιαλυτά σύμπλοκα, τις λιποπρωτεΐνες. Οι λιποπρωτεΐνες είναι ετερογενή, μακρομοριακά, υδατοδιαλυτά συμπλέγματα λιπιδίων (εστέρες χοληστερόλης, τριγλυκερίδια, φωσφολιπίδια, ελεύθερη χοληστερόλη και λιπαρά οξέα) και των απολιποπρωτεϊνών. Αποτελούν το μέσο μεταφοράς στη συστηματική κυκλοφορία και τη διανομή στους ιστούς, των αδιάλυτων στο νερό λιπιδίων (χοληστερόλη, τριγλυκερίδια, φωσφολιπίδια) και διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στο μεταβολισμό της χοληστερόλης και των τριγλυκεριδίων [1]. Το λιποπρωτεϊνικό σύμπλοκο έχει σφαιρική δομή. Ειδικότερα, αποτελείται από έναν υδρόφοβο πυρήνα που περιέχει κυρίως τριγλυκερίδια (TG: Triglycerides) και εστέρες χοληστερόλης (CE: Cholesterol Esters), και μία υδρόφιλη επιφάνεια που περιέχει φωσφολιπίδια, ελεύθερη χοληστερόλη (μη εστεροποιημένη) και απολιποπρωτεΐνες. (Εικ.1.1)



Εικόνα 1.1 Σχηματική αναπαράσταση της δομής των λιποπρωτεϊνών.[2]

Οι λιποπρωτεΐνες διαφέρουν μεταξύ τους στο μέγεθος και στην αναλογία της πρωτεϊνικής και λιπιδικής τους σύστασης (Πίνακας 1.1) [4], γεγονός που καθορίζει την πυκνότητα και την ηλεκτροφορητική τους ικανότητα. Ο διαχωρισμός τους πραγματοποιείται: α) βασιζόμενος στην επίπλευση τους που εξαρτάται από την πυκνότητα ( $d$ , density) με τη μέθοδο της υπερφυγοκέντρωσης, διακρίνονται σε 5 κλάσματα που είναι τα χυλομικρά (CM, Chylomicrons), η λιποπρωτεΐνη πολύ χαμηλής πυκνότητας (VLDL: Very Low Density Lipoprotein), η λιποπρωτεΐνη ενδιάμεσης πυκνότητας (IDL: Intermediate Density Lipoprotein), η λιποπρωτεΐνη χαμηλής πυκνότητας (LDL: Low Density Lipoprotein) και η λιποπρωτεΐνη υψηλής πυκνότητας (HDL: High Density Lipoprotein)(Εικ.1.2). β) βασιζόμενος στην ηλεκτροφορητική τους κινητικότητα σε πηκτή αгарόζης διακρίνονται σε: χυλομικρά, α-λιποπρωτεΐνες, προ-β-λιποπρωτεΐνες και β-λιποπρωτεΐνες. Οι διαφορετικές κατηγορίες λιποπρωτεϊνών διαδραματίζουν διαφορετικές μεταβολικές λειτουργίες [3].

Οι λιποπρωτεΐνες συντίθενται και καταβολίζονται μέσω τριών ξεχωριστών αλλά αλληλεπιδρώντων μονοπατιών: το μονοπάτι των χυλομικρών, το μονοπάτι των VLDL/IDL/LDL και το μονοπάτι της HDL. Ο σχηματισμός των χυλομικρών και της VLDL γίνεται ενδοκυτταρικά ενώ της HDL εξωκυτταρικά [10,11]. Θα ακολουθήσει αναφορά μόνο στο μονοπάτι βιογένεσης της λιποπρωτεΐνης HDL σε επόμενη ενότητα.



Εικόνα 1.2 Αναλογία μεγέθους και σύστασης των διάφορων λιποπρωτεϊνών.[12]

**Πίνακας 1.1 Ιδιότητες και σύσταση των κυριότερων λιποπρωτεϊνών.[13]**

Ιδιότητες και Συστατικά	Χυλομικρά	VLDL	LDL	HDL
Πηγή	έντερο	ήπαρ	VLDL	ήπαρ και έντερο
Μέγεθος (Å)	750-12.000	300-800	180-300	50-120
Πυκνότητα (g/mL)	<0,95	0,95-1,006	1,019-1,063	1,063-1,21
Μοριακή Μάζα (kDa)	~400.000	10-80.000	2.300	175-360
%Τριγλυκερίδια	80-95	45-65	4-8	2-7
%Φωσφολιπίδια	3-6	15-20	18-24	26-32
%Ελεύθερη Χοληστερόλη	1-3	4-8	6-8	3-5
%Εστεροποιημένη Χοληστερόλη	2-4	16-22	45-50	15-20
%Πρωτεΐνες	1-2	6-10	18-22	45-55
Κύριες απολιποπρωτεΐνες	B48, A-I, A-II, A-IV, CI, CIII,	B-100, , CI, CII, CIII	B-100	A-I, A-II
Δευτερεύουσες απολιποπρωτεΐνες	C-I, C-II, C-III, E	A-I, A-II, A-IV, CIV, A-V, E	C-I, C-II, C-III, E	C-I, C-II, C-III, D, E, J, AV

### 1.1.1 Απολιποπρωτεΐνες

Οι πρωτεΐνες των λιποπρωτεϊνών ονομάζονται απολιποπρωτεΐνες και διακρίνονται σε πέντε κύριες οικογένειες που χαρακτηρίζονται με τα γράμματα A,B,C,D, και E. [1,4] Έχουν απομονωθεί από τις λιποπρωτεΐνες και άλλες απολιποπρωτεΐνες που συμπεριλαμβάνουν τις F,H ,J,L και M , οι οποίες βρίσκονται σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις στο πλάσμα [5-9]. Μέλη της ίδιας οικογένειας διακρίνονται με την προσθήκη ενός λατινικού αριθμού μετά το

γράμμα ,για παράδειγμα A-I, A-II κλπ. Όλες οι απολιποπρωτεΐνες συντίθενται στο ήπαρ και ορισμένες στο επιθήλιο του λεπτού εντέρου. Κάποιες από αυτές είναι σταθερά συνδεδεμένες πάνω στα σωματίδια των λιποπρωτεϊνών ,ενώ άλλες μεταφέρονται ελεύθερα σε άλλες λιποπρωτεΐνες [4].

Η κύρια απολιποπρωτεΐνη των HDL είναι η A-I (αποA-I). Η απολιποπρωτεΐνη B (απο-B) είναι η κύρια απολιποπρωτεΐνη των LDL, αλλά συναντάται και στις VLDL και στα χυλομικρά. Εντούτοις, η απο-B των χυλομικρών (B-48) είναι μικρότερη από την απο-B-100 των LDL(αποτελεί προϊόν RNA-editing του ίδιου γονιδίου) και των VLDL και η μεν αποB-48 συντίθεται στο έντερο η δε αποB-100 στο ήπαρ. Οι απολιποπρωτεΐνες C (I,II ,III κλπ.) είναι μικρότερα πολυπεπτίδια, τα οποία εύκολα μεταφέρονται μεταξύ διαφόρων λιποπρωτεϊνών. Η απο-D βρίσκεται κυρίως στο σωματίδιο των HDL, ενώ η απο-E απομονώνεται από τις VLDL και HDL. Κοινή λειτουργία όλων των λιποπρωτεϊνών είναι να βοηθήσουν στη διαλυτοποίηση των ουδέτερων λιπιδίων στην κυκλοφορία. Ακόμα λειτουργούν σαν συμπαράγοντες ενζύμων, π.χ. η αποC-II στη λιποπρωτεϊνική λιπάση (LPL), η αποA-I στην LCAT. Επίσης οι απολιποπρωτεΐνες μεσολαβούν στην αλληλεπίδραση των λιποπρωτεϊνών με τους αντίστοιχους υποδοχείς των ιστών, π.χ. η αποB-100 αλληλεπιδρά με τον υποδοχέα των LDL [23,4].



**Πίνακας 1.2 Κατηγορίες απολιποπρωτεϊνών και οι βασικές τους λειτουργίες [13].**

Απολιποπρωτεΐνη	Μοριακό βάρος(kDa)	Κύρια λειτουργία
<b>Απο Α-I</b>	28	Βασική απολιποπρωτεΐνη της HDL, ενεργοποιεί την LCAT
<b>Απο Α-II</b>	17	Κυρίως στην HDL, αυξάνει τη δραστικότητα της ηπατικής λιπάσης
<b>Απο Α-IV</b>	46	Κυρίως στις λιποπρωτεΐνες πλούσιες σε λιπίδια
<b>Απο Β-48</b>	24	Βρίσκεται αποκλειστικά στα χυλομικρά
<b>Απο Β-100</b>	513	Βασική απολιποπρωτεΐνη της LDL αλλά και σε VLDL,IDL
<b>Απο C-I</b>	6,6	Ρυθμιστής της ενεργότητας του CETP,ενεργοποιητής της LCAT
<b>Απο C-II</b>	8,9	Ενεργοποιεί την LPL
<b>Απο C-III</b>	8,8	Αναστέλλει την LPL
<b>Απο C-IV</b>	11	Ρυθμίζει τον μεταβολισμό των TG
<b>Απο D</b>	33	Βρίσκεται μόνο στην HDL,σχετίζεται με την LCAT
<b>Απο Ε</b>	34	Τρεις γνωστές ισομορφές (Ε2, Ε3, Ε4) εμπλέκεται στη δυσλιπιδαιμία, αθηροσκλήρωση και νόσο Alzheimer

### 1.1.2 Χυλομικρά (CM)

Τα χυλομικρά είναι τα μεγαλύτερα λιποπρωτεϊνικά σωματίδια, με τη μικρότερη πυκνότητα ( $d < 0,96$  g/mL). Συντίθενται στο έντερο και αποτελούνται κατά 98% από λιπίδια. Στον πυρήνα τους περιέχουν περίπου 88% τριγλυκερίδια, 3% εστεροποιημένη χοληστερόλη, ενώ οι απολιποπρωτεΐνες που περιέχουν στην εξωτερική στοιβάδα ανέρχονται μόλις σε 1-2%. Ο βασικότερος τους ρόλος είναι η μεταφορά των λιπαρών οξέων των τριγλυκεριδίων (TG) και της χοληστερόλης που προσλαμβάνονται μέσω της

τροφής από το έντερο στα κύτταρα των διαφόρων ιστών μέσω της κυκλοφορίας του αίματος [15].

Κατά την είσοδο τους στο λεμφικό σύστημα εμπλουτίζονται με την απο-Ε και δανείζονται αποC-II από την HDL, η οποία ενεργοποιεί την λιποπρωτεϊνική λιπάση (LPL). Τα τριγλυκερίδια των τροφών που είναι προσδεμένα στα χυλομικρά υδρολύονται από το ένζυμο λιποπρωτεϊνική λιπάση (LPL) στο αγγειακό ενδοθήλιο των τριχοειδών αγγείων. Τα ελεύθερα λιπαρά οξέα που προκύπτουν από την παραπάνω υδρόλυση είτε χρησιμοποιούνται άμεσα για την κάλυψη των ενεργειακών αναγκών των κυττάρων, είτε αποθηκεύονται στο λιπώδη ιστό για μελλοντική χρήση αφού πρώτα επανεστεροποιηθούν σε τριγλυκερίδια. Η υδρόλυση των τριγλυκεριδίων από την LPL μειώνει τον αρχικό όγκο των χυλομικρών και αυξάνει την περιεκτικότητά τους σε χοληστερόλη. Τα μετασχηματισμένα αυτά χυλομικρά (κατάλοιπα χυλομικρών) δεν παρουσιάζουν αθηρογόνες ιδιότητες. Τα κατάλοιπα των χυλομικρών φτάνουν στα ηπατοκύτταρα και διασπώνται. Τα χυλομικρά ανιχνεύονται σε υψηλές συγκεντρώσεις στο πλάσμα ύστερα από ένα γεύμα πλούσιο σε λιπαρά καθώς επίσης και σε ασθενείς με υπερλιποπρωτεϊνεία τύπου I [1, 4].

### **1.1.3 Πολύ χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνες (VLDL)**

Οι πολύ χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνες ( $d < 1,006 \text{ g/mL}$ ) συντίθενται κυρίως στο ήπαρ αλλά και στο λεπτό έντερο, το μέγεθός τους είναι περίπου 30 – 70 nm και μεταφέρουν τριγλυκερίδια και χοληστερόλη από το ήπαρ στους ιστούς. Η λιπιδική σύσταση των VLDL αντιπροσωπεύει περίπου το 90% εκ των οποίων, περίπου το 60% είναι τριγλυκερίδια και το 15% χοληστερόλη, ενώ η πρωτεϊνική σύσταση αντιπροσωπεύει περίπου το 10% της ολικής τους μάζας. Οι σημαντικότερες απολιποπρωτεΐνες των VLDL είναι η αποB-100, η αποC-II και η αποE. Στην κυκλοφορία τα τριγλυκερίδια των VLDL υδρολύονται με τη δράση της λιποπρωτεϊνικής (LPL) και της ηπατικής (HL) λιπάσης σε γλυκερόλη και λιπαρά οξέα. Τα λιπαρά οξέα μεταφέρονται συνδεδεμένα με τη λευκωματίνη στη συστηματική κυκλοφορία και είτε χρησιμοποιούνται άμεσα από τους διάφορους ιστούς για ενεργειακούς σκοπούς, είτε αποθηκεύονται στο λιπώδη ιστό. Έτσι, οι VLDL μετασχηματίζονται, μειώνεται το μέγεθος και η πυκνότητά τους και

μεταπίπτουν σε σωματίδια που ονομάζονται IDL(ενδιάμεσης πυκνότητας λιποπρωτεΐνη) και LDL (χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνες [4,17].

#### **1.1.4 Ενδιάμεσης πυκνότητας λιποπρωτεΐνες (IDL)**

Οι ενδιάμεσης πυκνότητας λιποπρωτεΐνες έχουν μικρή διάρκεια ζωής και αποτελούν το αποτέλεσμα δράσης της LPL πάνω στις VLDL και το πρόδρομο μόριο των LDL. Οι IDL περιέχουν περίπου ίσα ποσά χοληστερόλης και τριγλυκεριδίων και οι σημαντικότερες απολιποπρωτεΐνες τους είναι οι apoB και apoE. Οι πιθανοί δρόμοι που μπορούν να ακολουθήσουν οι IDL είναι δύο: α) να κατευθυνθούν προς το ήπαρ όπου συνδέονται με τους ειδικούς υποδοχείς για τις LDL β) να μετατραπούν σε LDL μετά από την περαιτέρω υδρόλυση των τριγλυκεριδίων [17].

#### **1.1.5 Χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνες (LDL)**

Οι λιποπρωτεΐνες χαμηλής πυκνότητας ( $d=1,019-1,063$ ) αποτελούν την τελική μορφή αποικοδόμησης των VLDL. Έχουν διάμετρο 15-25 nm και περιέχουν κυρίως χοληστερόλη σε ποσοστό περίπου 70% επί του συνολικού λιπιδικού φορτίου, την οποία μεταφέρουν και εναποθέτουν στους ιστούς και στα κύτταρα που φέρουν ειδικούς υποδοχείς LDL( LDL- receptor, LDL-R). Η πρωτεϊνική σύσταση αντιπροσωπεύει το 25% της ολικής μάζας των LDL. Αποτελούνται από ένα υδρόφοβο πυρήνα που περιέχει εστεροποιημένη χοληστερόλη 48% και τριγλυκερίδια 13%, ενώ η επιφάνεια του σωματιδίου αποτελείται από φωσφολιπίδια 28%, ελεύθερη χοληστερόλη 10% και την απολιποπρωτεΐνη apoB-100. Οι LDL παρουσιάζουν διαφορές στο μέγεθος, την πυκνότητα και το μοριακό τους βάρος, με το πιο μικρό και πιο πυκνό κλάσμα να χαρακτηρίζεται ως το πιο αθηρογόνο. Αυτό οφείλεται στη διαφορετική περιεκτικότητά τους σε λιπίδια. Μείωση της περιεκτικότητας σε λιπίδια συνεπάγεται αύξηση της πυκνότητας της LDL. Η αύξηση των επιπέδων LDL λόγω έλλειψης υποδοχέων (όπως συμβαίνει στην οικογενή υπερχοληστεριλαιμία ), συνδέεται άμεσα με κίνδυνο καρδιαγγειοπαθειών [18].

#### **1.1.6 Υψηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνες (HDL)**

Οι υψηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνες HDL είναι δισκοειδή (σε κάποιες παθολογικές καταστάσεις) ή σφαιρικά σωματίδια διαμέτρου 8-10 nm, πλούσια

σε πρωτεϊνικό περιεχόμενο και με πυκνότητα 1,063-1,21 g/mL [19]. Συντίθενται κυρίως στο ήπαρ και λιγότερο στο έντερο και εμπλουτίζονται στην κυκλοφορία με χοληστερόλη και φωσφολιπίδια που προέρχονται από την λιπόλυση των χυλομικρών [20]. Οι πρωτεΐνες που περιέχουν οι HDL αντιπροσωπεύουν το 30-70% της συνολικής τους μάζας και είναι κατά κύριο λόγο i) απολιποπρωτεΐνες (A-I, A-II, C-I, C-II, C-IV, D, E κ.α.), ii) ένζυμα, όπως η παραοξονάση 1 (PON1), η ακετυλοϋδρολάση του παράγοντα ενεργοποίησης αιμοπεταλίων PAF-AH (Platelet-Activating Factor Acetyl Hydrolase), iii) πρωτεΐνες μεταφοράς λιπιδίων όπως, η λεκιθινο-χοληστερολο-ακετυλοτρανσφεράση (LCAT) και η πρωτεΐνη μεταφοράς εστέρων χοληστερόλης (CETP), iv) άλλες μικρότερες πρωτεΐνες όπως πρωτεΐνες οξείας φάσης (π.χ. serum amyloid A, SAA), συστατικά του συμπληρώματος (π.χ. πρωτεΐνη C3) και αναστολείς πρωτεασών (π.χ. α-1 αντιθρυψίνη) [21]. Παρόλο που οι απολιποπρωτεΐνες και τα ένζυμα είναι ευρέως αναγνωρισμένα ως κύρια λειτουργικά συστατικά της HDL, ο ρόλος των υπολοίπων πρωτεϊνών, κυρίως αυτών που σχετίζονται με τη ρύθμιση του συμπληρώματος, την προστασία από τις λοιμώξεις και την απόκριση σε καταστάσεις οξείας φάσης έχουν λάβει ιδιαίτερη προσοχή μόλις τα τελευταία χρόνια, ως αποτέλεσμα της ανάπτυξης της πρωτεϊνικής ανάλυσης [22].

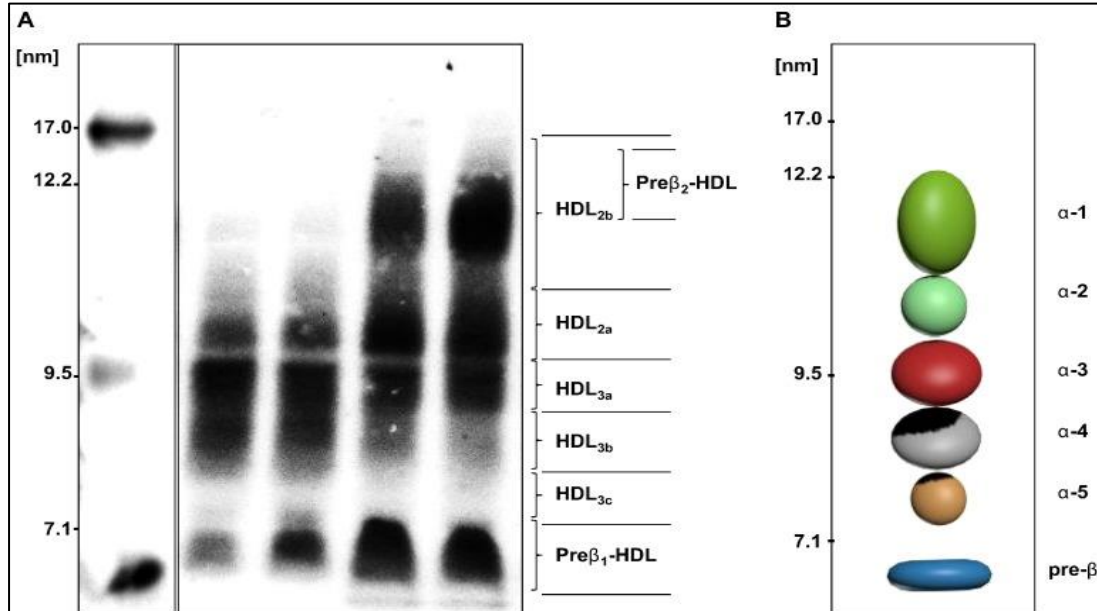
Με λιπιδομική ανάλυση των HDL ταυτοποιήθηκαν πλήθος διαφορετικών ειδών λιπιδίων που περιλαμβάνουν φωσφατιδυλοχολίνη, λυσοφωσφατιδυλοχολίνη, σφυγγομελίνη, κεραμίδιο, φωσφατιδυλαιθανολαμίνη, φωσφατιδυλο-ινοσιτόλη, καρδιολιπίνη, φωσφατιδυλοσερίνη, φωσφατιδυλογλυκερόλη, φωσφατιδικό οξύ, χοληστερόλη, εστέρες χοληστερόλης, τριακυλογλυκερόλες και ελεύθερα λιπαρά οξέα [30].

Επιπλέον, οι HDL μεταφέρουν διάφορους υδροφοβικούς μεταβολίτες όπως βιταμίνες, στεροειδείς ορμόνες, καρτενοειδή καθώς και πολικούς μεταβολίτες όπως ξυλιτόλη και οξαλικό οξύ, τα οποία σχετίζονται με την αντίσταση στην ινσουλίνη [31,32]. Τέλος έχει ανακαλυφθεί ότι τα σωματίδια HDL φέρουν μικρά RNAs, συμπεριλαμβανομένων microRNAs τα οποία είναι μη- κωδικά ρυθμιστικά RNA που ρυθμίζουν την έκφραση ενός γονιδίου μέσω στόχευσης του mRNA και την καταστολή της μετάφρασης [33].

### 1.1.6.1 Υποπληθυσμοί HDL

Οι HDL είναι ιδιαίτερα ετερογενή σωματίδια ως προς τις φυσικοχημικές τους ιδιότητες και το βιολογικό ρόλο τους. Διαφέρουν ως προς την περιεκτικότητά τους σε πρωτεΐνες, φωσφολιπίδια, χοληστερόλη και τριγλυκερίδια. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τα σωματίδια να διαφέρουν μεταξύ τους ως προς το μέγεθος, την πυκνότητα και το φορτίο τους. Έτσι, γίνεται εφικτός ο διαχωρισμός τους με διάφορες εργαστηριακές μεθόδους.

Με τη μέθοδο της υπερφυγοκέντρωσης διαβαθμισμένης πυκνότητας οι HDL διαχωρίζεται στις μικρές, πυκνές, πλούσιες σε λιπίδια HDL<sub>3</sub> (1,125-1,21 g/mL) και στις μεγαλύτερες, λιγότερο πυκνές, πλούσιες σε πρωτεΐνες HDL<sub>2</sub> (1,063-1,125 g/mL) [23]. Οι δύο αυτοί υποπληθυσμοί μπορούν να διαχωριστούν περαιτέρω με ηλεκτροφόρηση σε μη-αποδιατακτικό πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου διαβαθμισμένης πυκνότητας βασιζόμενοι στη διαφορετική τους κινητικότητα σε 5 υποπληθυσμούς. Οι HDL<sub>2</sub> διαχωρίζονται σε HDL<sub>2a</sub> (8,8-9,7 nm, d=1,088-1,110 g/mL) και σε HDL<sub>2b</sub> (9,7-12,0 nm, d=1,063-1,087 g/mL) ενώ οι HDL<sub>3</sub> σε HDL<sub>3c</sub> (7,2-7,8 nm, d=1,154-1,170 g/mL), HDL<sub>3b</sub> (7,8-8,2 nm, d=1,129-1,154 g/mL) και σε HDL<sub>3a</sub> (8,2-8,8 nm, d=1,110-1,129 g/mL) [24] (Εικ.1.3).



Εικόνα 1.3 Οι υποπληθυσμοί της HDL βάσει μεγέθους και της ηλεκτροφορητικής τους ικανότητας.[34]

Ο διαχωρισμός με ηλεκτροφόρηση δύο διαστάσεων συνδυάζει την ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης και την ηλεκτροφόρηση σε μη-αποδιατακτικό πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου διαβαθμισμένης πυκνότητας. Στην πρώτη διάσταση ο διαχωρισμός στηρίζεται στην διαφορετική τους

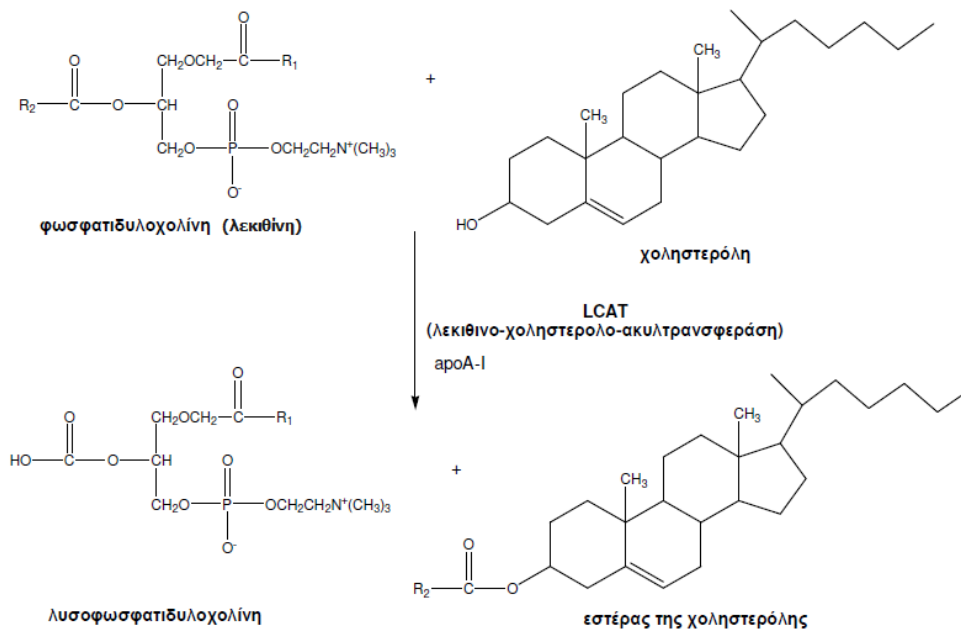
κινητικότητα σε σχέση με την αλβουμίνη και διακρίνονται σε προ-β (μειωμένη κινητικότητα σε σχέση με την αλβουμίνη) και σε α HDL σωματίδια (παρόμοια κινητικότητα). Στη δεύτερη διάσταση διαχωρίζονται βάσει μεγέθους και φορτίου στους προ-β<sub>-1</sub> και προ-β<sub>-2</sub> και στους α<sub>1</sub>, α<sub>2</sub>, α<sub>3</sub> και α<sub>4</sub> HDL υποπληθυσμούς. Υπό φυσιολογικές συνθήκες το ανθρώπινο πλάσμα περιέχει 2-5% προ-β HDL σωματίδια και 95-98% α HDL σωματίδια [25,26]. Ο Atzalos και οι συνεργάτες του μελέτησαν τους υποπληθυσμούς HDL σε υγιή άτομα και σε ασθενείς με στεφανιαία νόσο (ΣΝ) και κατέληξαν στην παρατήρηση ότι η εικόνα των υποπληθυσμών της HDL που περιέχουν αποΑ-I διαφέρει σημαντικά μεταξύ των δύο ομάδων μελέτης. Συγκεκριμένα, στους ασθενείς με ΣΝ με χαμηλά επίπεδα HDL-χοληστερόλης (HDL-C), τα επίπεδα των α<sub>1</sub> και α<sub>2</sub> είναι μειωμένα ενώ των α<sub>3</sub> και προ-β είναι αυξημένα. Έχει προταθεί ότι τα επίπεδα των α<sub>1</sub> και α<sub>2</sub> είναι καλύτερος προβλεπτικός δείκτης για μελλοντικά καρδιολογικά συμβάματα συγκρινόμενο με την HDL-C. Επιπλέον, τα υψηλά επίπεδα των α<sub>1</sub> HDL υποπληθυσμών που περιέχουν μόνο αποΑ-I έχει προταθεί ότι αντιπροσωπεύουν μία βελτιωμένη αντι-αθηρογόνο κατάσταση [27,28].

Με τη μέθοδο της χρωματογραφίας ανοσοσυγγένειας επιτρέπεται ο διαχωρισμός των HDL σωματιδίων βασιζόμενο στο πρωτεϊνικό τους περιεχόμενο, σε σωματίδια που περιέχουν μόνο την απολιποπρωτεΐνη αποΑ-I (LpA-I) και σε σωματίδια που περιέχουν και αποΑ-I και αποΑ-II. [29]

#### **1.1.6.2 Μονοπάτι βιογένεσης, αναδιαμόρφωσης και καταβολισμού της HDL**

Το πρώτο βήμα στο μονοπάτι βιογένεσης της HDL γίνεται με τη σύνθεση της αποΑ-I κυρίως στο ήπαρ και λιγότερο στο έντερο. Συντίθεται ως προ-προ-πρωτεΐνη 267 αμινοξέων. Έπειτα από ενδομεμβρανικό κόψιμο του πεπτιδίου σήματος 18 αμινοξέων από το αμινο-τελικό άκρο, η προ-αποΑ-I εκκρίνεται στο πλάσμα, όπου μια πρωτεάση πέπτει το προπεπτίδιο 6 αμινοξέων από το αμινο-τελικό άκρο της πρωτεΐνης. Η ώριμη αποΑ-I είναι μια μη γλυκοζυλιωμένη πρωτεΐνη 243 αμινοξέων, με μοριακή μάζα 28 kDa [35] Η αποΑ-I είναι η κύρια πρωτεΐνη της HDL και διαδραματίζει απαραίτητο ρόλο στη βιογένεση, δομή, λειτουργία και στη συγκέντρωση της HDL του πλάσματος [10]. Η αποΑ-I εκκρίνεται από τη ήπαρ ελεύθερη λιπιδίων και στη συνέχεια δεσμεύει φωσφολιπίδια και μικρές ποσότητες χοληστερόλης μέσω

της αλληλεπίδρασης με τον μεταφορέα λιπιδίων ABCA1 (ATP-Binding Cassette Transporter A1). Στη συνέχεια, μέσω μιας σειράς ενδιάμεσων βημάτων, η απο-A-I λιπιδιώνεται περαιτέρω και σταδιακά μετατρέπεται σε δισκοειδές σωματίδιο [37]. Τα δισκοειδή σωματίδια επίσης δημιουργούνται από τον ενδοαγγειακό μεταβολισμό και την αναδιαμόρφωση των πλούσιων σε TG λιποπρωτεϊνών που πραγματοποιείται με τη δράση της LPL, παρέχοντας έτσι φωσφολιπίδια και ελεύθερη χοληστερόλη η οποία μπορεί να αποδοθεί στα δισκοειδή σωματίδια μέσω της δράσης της πρωτεΐνης μεταφοράς φωσφολιπιδίων (Phospholipid Transfer Protein, PLTP). Εφόσον σχηματιστούν τα δισκοειδή σωματίδια, αυτά αποτελούν το υπόστρωμα δράσης του ενζύμου λεκιθινο-χοληστερολο-ακυλοτρανσφεράση (Lecithin Cholesterol Acyl Transferase, LCAT) το οποίο ενεργοποιείται από την αποA-I και καταλύει την εστεροποίηση χοληστερόλης του πλάσματος. Συγκεκριμένα, καταλύει τη μεταφορά ενός κατάλοιπου λιπαρού οξέος από την θέση sn-2 της φωσφατιδυλοχολίνης (λεκιθίνη) στην υδροξυλική ομάδα της χοληστερόλης με αποτέλεσμα το σχηματισμό εστεροποιημένης χοληστερόλης και λυσοφωσφατιδυλοχολίνης (Εικ.1.4) Η εστεροποιημένη χοληστερόλη πλέον, καθότι υδρόφοβη, μετακινείται στον πυρήνα των σωματιδίων, αφήνοντας περιθώριο για νέα πρόσληψη ελεύθερης χοληστερόλης από τους ιστούς. Η παραπάνω διαδικασία μεταβάλλει το σχήμα των σωματιδίων από δισκοειδή σε μικρά, πυκνά σφαιρικά σωματίδια (αντιστοιχούν στο κλάσμα HDL3 της υπερφυγοκέντρωσης) [36].



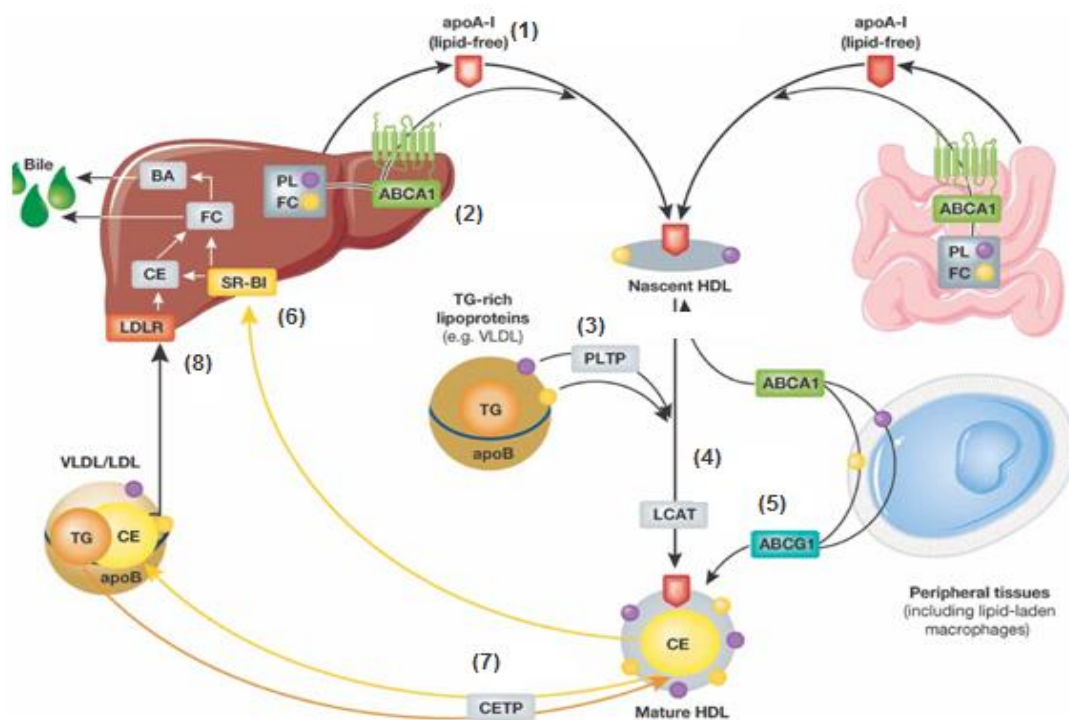
**Εικόνα 1.4 Αντίδραση εστεροποίησης της χοληστερόλης που καταλύεται από το ένζυμο LCAT.[2]**

Τα σωματίδια αυτά συνεχίζουν να αυξάνουν το μέγεθος τους και να αναδιαμορφώνονται συνεχώς υπό την επίδραση του ενζύμου LCAT αλλά και του PLTP. Παράλληλα, τα HDL σωματίδια συνδέονται με τον υποδοχέα-εκκαθαριστή SR-BI (Scavenger Receptor class B type I) και αυτή η αλληλεπίδραση επάγει την επιλεκτική μεταφορά χοληστερόλης από το κύτταρο προς τις HDL. Η χοληστερόλη του κυττάρου μπορεί επίσης να εξαχθεί από το κύτταρο προς την HDL μέσω του μεταφορέα χοληστερόλης ABCG1 (ATP-Binding Cassette Transporter G1) [10]. Οι παραπάνω διεργασίες οδηγούν στο σχηματισμό των ώριμων, μεγάλων σφαιρικών HDL2 σωματιδίων.

Τα μεγάλα HDL2 σωματίδια μπορούν επίσης να μετατραπούν με τη σειρά τους σε μικρά HDL3 μέσω : α) απευθείας πρόσληψης εστέρων χοληστερόλης από τα ηπατοκύτταρα μέσω των ειδικών ηπατικών υποδοχέων SR-BI όπου στη συνέχεια θα μετατραπούν σε χολικά οξέα και θα απεκκριθούν μέσω της χολής, β) μεσολαβούμενης ανταλλαγής λιπιδίων από την πρωτεΐνη μεταφοράς εστέρων χοληστερόλης CETP (Cholesterol Ester Transport Protein, CETP) από τις HDL προς τις απο-B λιποπρωτεΐνες (χυλομικρά/VLDL/IDL/LDL) το οποίο διαμεσολαβεί για την ανταλλαγή 1 μορίου εστεροποιημένης χοληστερόλης προς 1 μόριο τριγλυκεριδίων, με σκοπό την τελική απέκκριση χοληστερόλης



μέσω των υποδοχέων LDL,  $\gamma$ ) της δράσης της ηπατικής λιπάσης (Hepatic Lipase, HP) που υδρολύει τα TG και της ενδοθηλιακής λιπάσης (Endothelial Lipase, EL) η οποία υδρολύει τριγλυκερίδια και φωσfolιπίδια. Τα σχηματιζόμενα HDL3 σωματίδια θα καταβολιστούν περαιτέρω έχοντας σαν αποτέλεσμα την απελευθέρωση φωσfolιπιδίων και τη μεταφορά τους στα προ- $\beta$  δισκοειδή HDL σωματίδια, με τη δράση του ενζύμου PLTP, καθώς και την απελευθέρωση της apoA-I, μέρος της οποίας θα απεκκριθεί από τους νεφρούς, ενώ η υπόλοιπη θα μπορεί να αλληλεπιδράσει με τον μεμβρανικό μεταφορέα ABCA1 για ένα νέο κύκλο λιπιδίωσης [37] (Εικ.1.5).



**Εικόνα 1.5 Σχηματική αναπαράσταση του μονοπατιού βιογένεσης και καταβολισμού της λιποπρωτεΐνης HDL. [38].**

Οι αριθμοί 1 έως 7 αντιστοιχούν στις πρωτεΐνες που συμμετέχουν στο μονοπάτι βιογένεσης και καταβολισμού της HDL. (1) απολιποπρωτεΐνη A-I, (2) μεταφορέας χοληστερόλης και φωσfolιπιδίων ABCA1, (3) πρωτεΐνη μεταφοράς φωσfolιπιδίων PLTP, (4) ένζυμο εστεροποίησης χοληστερόλης LCAT, (5) μεταφορέας χοληστερόλης ABCG1, (6) ηπατικός υποδοχέας SRB-1, (7) πρωτεΐνη μεταφοράς εστέρων χοληστερόλης CETP, (8) ηπατικός υποδοχέας της LDL (Όπου PL: φωσfolιπίδια FC: ελεύθερη χοληστερόλη, CE: εστέρες χοληστερόλης)

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

### Κυκλοφορικό σύστημα και αθηροσκλήρωση

#### 2.1 Το κυκλοφορικό σύστημα και ο ρόλος του

Το κυκλοφορικό σύστημα αποτελείται από διάφορους κοίλους χώρους και πόρους (μέσα στους οποίους διακινείται το αίμα και η λέμφος), οι οποίοι συνδέονται μεταξύ τους και απλώνονται σε όλο το σώμα. Χάρη στο κυκλοφορικό σύστημα εξασφαλίζεται η θρέψη και η λειτουργία διαφόρων οργάνων, διότι με αυτό διακινούνται τα αναπνευστικά αέρια  $O_2$  και  $CO_2$  μεταξύ των πνευμόνων και των ιστών, τα θρεπτικά συστατικά, τα παραπροϊόντα του μεταβολισμού, καθώς και όλες οι άχρηστες ουσίες για τον οργανισμό. Το κυκλοφορικό σύστημα συμβάλλει επίσης με την λειτουργία του στη θερμορύθμιση (μεταφοράς θερμότητας), στην διατήρηση της ομοιοστασίας (διακίνηση ύδατος και ηλεκτρολυτών), στη ρύθμιση της λειτουργίας διαφόρων κυττάρων ή οργάνων πχ ενδοκρινών αδένων (μεταφορά ορμονών) και στην άμυνα του οργανισμού (μεταφορά αντισωμάτων, λευκών αιμοσφαιρίων κτλ). Το κυκλοφορικό σύστημα χωρίζεται σε δυο τμήματα: α) το καρδιαγγειακό ή αιματικό ή κυρίως κυκλοφορικό σύστημα (κυκλοφορία αίματος) και β) στο λεμφικό σύστημα (κυκλοφορία λέμφου). Όσον αφορά το καρδιαγγειακό σύστημα, είναι ένα κλειστό σύστημα μέσα στο οποίο το αίμα κινείται κυκλικά και επανέρχεται περιοδικά στο σημείο εκκινήσεως του. Το σύστημα αυτό αποτελείται από: α) την καρδιά, η οποία λειτουργεί ως αντλία και προωθεί το αίμα και β) τα αγγεία, που μεταφέρουν το αίμα από την καρδιά στα διάφορα όργανα του σώματος (αρτηρίες) και το επιστρέφουν πάλι στην καρδιά (φλέβες). Μεταξύ αρτηριών και φλεβών παρεμβάλλονται τα τριχοειδή [40].

#### 2.2 Η δομή της αρτηρίας

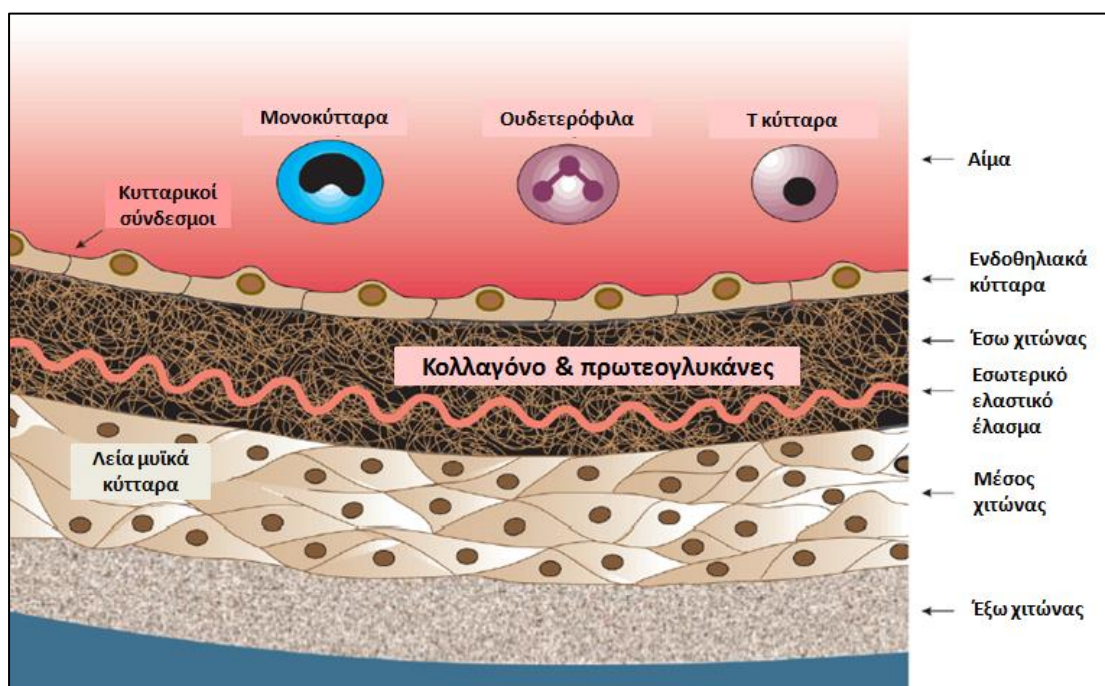
Ένα μεγάλο αγγείο αποτελείται από 3 ξεχωριστά μορφολογικά στρώματα, το εσωτερικό που καλείται *έσω χιτώνας* (intima), το ενδιάμεσο στρώμα που καλείται *μέσος χιτώνας* (media) και το εξωτερικό στρώμα που καλείται *έξω χιτώνας* (adventitia) (Εικ.2.1).

Ο *έσω χιτώνας* επενδύει εσωτερικά τον αρτηριακό αυλό με συνεχές στρώμα ενδοθηλίου, τα κύτταρα του οποίου συνδεόμενα μεταξύ τους και με τη βασική στιβάδα σχηματίζουν ένα είδος φραγμού που ελέγχει την είσοδο

ουσιών από το αίμα στο αρτηριακό τοίχωμα. Ένας φυσιολογικός εσωτερικός χιτώνας είναι μια πολύ λεπτή περιοχή που αποτελείται από εξωκυττάριο συνδετικό ιστό θεμέλιας ουσίας, κυρίως πρωτεογλυκάνες και κολλαγόνο.

Ο μέσος χιτώνας, ο οποίος περιβάλλει τον έσω, αποτελείται από λείες μυϊκές και ελαστικές ίνες, τοποθετημένες σε ένα στρώμα (μικρές μυϊκές αρτηρίες) ή σε πολλαπλά στρώματα (ελαστικές αρτηρίες). Οι ίνες αυτές περιλαμβάνονται μεταξύ της έσω ελαστικής μεμβράνης, που εξαφανίζεται στο επίπεδο των τριχοειδών, και της έξω ελαστικής μεμβράνης, που είναι περισσότερο χαλαρή. Οι μυϊκές ίνες διατηρούν τον τόνο του αρτηριακού τοιχώματος και στο επίπεδο των μικρών αρτηριών ρυθμίζουν την περιφερική ροή, ενώ σε συνδυασμό με τις ελαστικές στιβάδες προσδίδουν στο τοίχωμα των ελαστικών αρτηριών τις προωθητικές ιδιότητες του σφυγμικού κύματος.

Ο έξω χιτώνας αποτελείται από ένα μίγμα χαλαρού και ελαστικού συνδετικού ιστού που περιέχει ινοβλάστες και λεία μυϊκά κύτταρα [41,42].



Εικόνα 2.1 Η δομή μιας φυσιολογικής μεγάλης αρτηρίας.[48Σφάλμα! Το αρχείο προέλευσης της αναφοράς δεν βρέθηκε.]

### 2.3 Παθογένεια και παθοφυσιολογία της αθηροσκλήρωσης

Η αθηροσκλήρωση παλιότερα θεωρούνταν μια νόσος φθοράς ως αναπόφευκτο επακόλουθο της γήρανσης. Τις τελευταίες δεκαετίες όμως, αυτή η αντίληψη έχει αναιρεθεί. Η αθηροσκλήρωση είναι μια χρόνια, προοδευτική παθολογική διαδικασία που περιλαμβάνει τον τραυματισμό του αγγειακού ενδοθηλίου, τη διείσδυση λιπιδίων, την ενεργοποίηση μακροφάγων, τον

πολλαπλασιασμό των λείων μυϊκών κυττάρων των αγγείων, τη θρόμβωση και τη φλεγμονώδη ανοσοαπόκριση. Μετατρέπεται σε κλινικό συμβάν με τη σχάση της αθηρωματικής πλάκας που με τη σειρά της οδηγεί στη θρόμβωση [43]. Η αθηροσκλήρωση είναι πάθηση κυρίως των μεγάλων αγγείων, όπως του εγκεφάλου, της αορτής και των στεφανιαίων αρτηριών και αφορά τον σχηματισμό μιας αργά αναπτυσσόμενης πλάκας (αθηρωματικής πλάκας) στον έσω χιτώνα της αρτηρίας με τελικό αποτέλεσμα τη στένωση του αυλού της αρτηρίας [44]. Στη ρήξη της πλάκας και στη δημιουργία θρόμβου οφείλονται το στεφανιαίο σύνδρομο (ACS: Acute Coronary Syndrome), καθώς και το αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο (ΑΕΕ) [41,43].

Η βασική παθολογία της αθηροσκλήρωσης χαρακτηρίζεται ως μια χρόνια φλεγμονώδης διαδικασία των αρτηριακών τοιχωμάτων που συμβαίνει σε συγκεκριμένες περιοχές με διαταραχές στην ροή του αυλού των αρτηριών, όπως σε περιοχές διακλάδωσης. Ξεκινάει από ενδοθηλιακή δυσλειτουργία και δομικές αλλαγές του αγγείου, έλλειψη σε κάποια σημεία της ελαστικότητας του στρώματος του αγγείου που περιβάλλει τον αυλό και έκθεση των πρωτεογλυκανών, που επιτρέπει την συγκέντρωση των LDL στον υποενδοθηλιακό χώρο (εσωτερικό χιτώνα των αρτηριών). Η LDL υπό φυσιολογικές συνθήκες διαπερνά τον ενδοθηλιακό φραγμό και εισέρχεται στον υποενδοθηλιακό χώρο, όπου παραμένει για μικρό χρονικό διάστημα και στη συνέχεια εξέρχεται επανερχόμενη στην κυκλοφορία του αίματος. Σε περιπτώσεις που η λειτουργία του ενδοθηλίου έχει διαταραχθεί και η συγκέντρωση της LDL είναι αυξημένη στο πλάσμα όπως, σε περιπτώσεις υπερχοληστερολαιμίας, το ενδοθήλιο μπορεί να παρουσιάσει αυξημένη διαπερατότητα και έτσι μεγαλύτερες ποσότητες LDL εισέρχονται με παθητική διάχυση στον υποενδοθηλιακό χώρο. Είναι άλλωστε αποδεκτό ότι η συνηθέστερη αιτιολογία για την ανάπτυξη αθηρωματικής πλάκας είναι η υπερχοληστερολαιμία [41,44]. Έχει δειχθεί ότι οι LDL, αφού μεταφερθούν μέσα στο αρτηριακό τοίχωμα, παγιδεύονται μέσα σε ένα τρισδιάστατο κλουβί από ίνες πρωτεογλυκάνης που εκκρίνονται από τα κύτταρα του αρτηριακού τοιχώματος [45]. Τα κύτταρα αυτά, στη συνέχεια εκκρίνουν προϊόντα οξειδωσης που προέρχονται από διάφορες οξειδωτικές οδούς που με τη σειρά τους προκαλούν την οξείδωση της παγιδευμένης στον υποενδοθηλιακό χώρο LDL. Στη διαδικασία αυτή συμβάλει και το γεγονός ότι τα κύτταρα του αρτηριακού τοιχώματος δημιουργούν κάποιο είδος μικροπεριβάλλοντος το

οποίο δεν περιέχει τα υδατοδιαλυτά αντιοξειδωτικά συστατικά του πλάσματος [45-48].

Αρχικά, η οξειδωτική τροποποίηση των παγιδευμένων LDL συμβαίνει πριν συγκεντρωθούν τα μακροφάγα. Η σύνδεση των LDL με τις αρνητικά φορτισμένες πρωτεογλυκάνες του αρτηριακού τοιχώματος τις καθιστά επιδεκτικές στην οξειδωτική τροποποίηση από δραστικές οξυγονούχες ενώσεις (ROS: Reactive Oxygen Species) ή ένζυμα όπως η μυελοϋπεροξειδάση (Myeloperoxidase, MPO), το NADPH, οι λιποξιγενάσες που απελευθερώνονται από φλεγμονώδη κύτταρα και οδηγεί σε οξείδωση των λιπιδίων του μορίου LDL με μικρή μεταβολή της απο Β-100. Δημιουργείται έτσι η ελαφρώς τροποποιημένη LDL, mm-LDL (Minimally Modified-LDL) η οποία διατηρεί την ικανότητα να αναγνωρίζεται από τον LDL υποδοχέα, χωρίς να παρατηρούνται αλλαγές στα αμινοξέα της αποΒ-100. Το δεύτερο στάδιο ξεκινά όταν συγκεντρωθούν τα μονοκύτταρα στην περιοχή, μετατραπούν σε μακροφάγα και επιδείξουν τη μέγιστη οξειδωτική τους ικανότητα. Στο στάδιο αυτό τα λιπίδια των LDL οξειδώνονται ακόμα περισσότερο. Τα λιπαρά οξέα που μεταφέρονται με την LDL υπό μορφή φωσφολιπιδίων και εστέρων χοληστερόλης μετατρέπονται αρχικά σε ασταθή λιποϋπεροξειδία και αποικοδομούνται γρήγορα σε οξειδωμένα φωσφολιπίδια, οξυστερόλες, αλδεΐδες, κετόνες υδροξυοξέα και άλλα παράγωγα. Η υπεροξειδωση των λιπαρών οξέων μπορεί να συνεχιστεί ως μία αυτοκαταλυόμενη αντίδραση, και προκύπτει ένα πλήθος φλεγμονωδών και κυτταροτοξικών προϊόντων οξείδωσης. Οι λυσίνες της αποΒ-100 αντιδρούν με τις παραγόμενες αλδεΐδες, το αρνητικό φορτίο της πρωτεΐνης αυξάνεται, ενώ μπορεί η αποΒ να αποικοδομηθεί σε πεπτίδια. Σε αυτό το στάδιο πλέον, τροποποιείται το πρωτεϊνικό τμήμα των σωματιδίων με αποτέλεσμα να μην αναγνωρίζονται οι oxLDL από τους LDL υποδοχείς αλλά από ειδικούς υποδοχείς-εκκαθαριστές των μακροφάγων (SR-A, CD36 και CD68). Η πρόσληψη των oxLDL από τους υποδοχείς αυτούς δεν παρουσιάζει αρνητική ρύθμιση, με συνέπεια να συσσωρεύεται μεγάλη ποσότητα χοληστερόλης μέσα στα μακροφάγα και να αποκτούν ένα «αφρώδες» κυτταρόπλασμα, για αυτό και αποκαλούνται «αφρώδη κύτταρα» (foam cells) [49-54](Εικ.2.2). Η έκφραση των υποδοχέων-εκκαθαριστών επάγεται από κυτταροκίνες όπως, ο νεκρωτικός παράγοντας του όγκου (TNF-α: Tumor Necrosis Factor α) και η ιντερφερόνη γ (INF-γ). Ο θάνατος των «αφρωδών κυττάρων» αφήνει πίσω

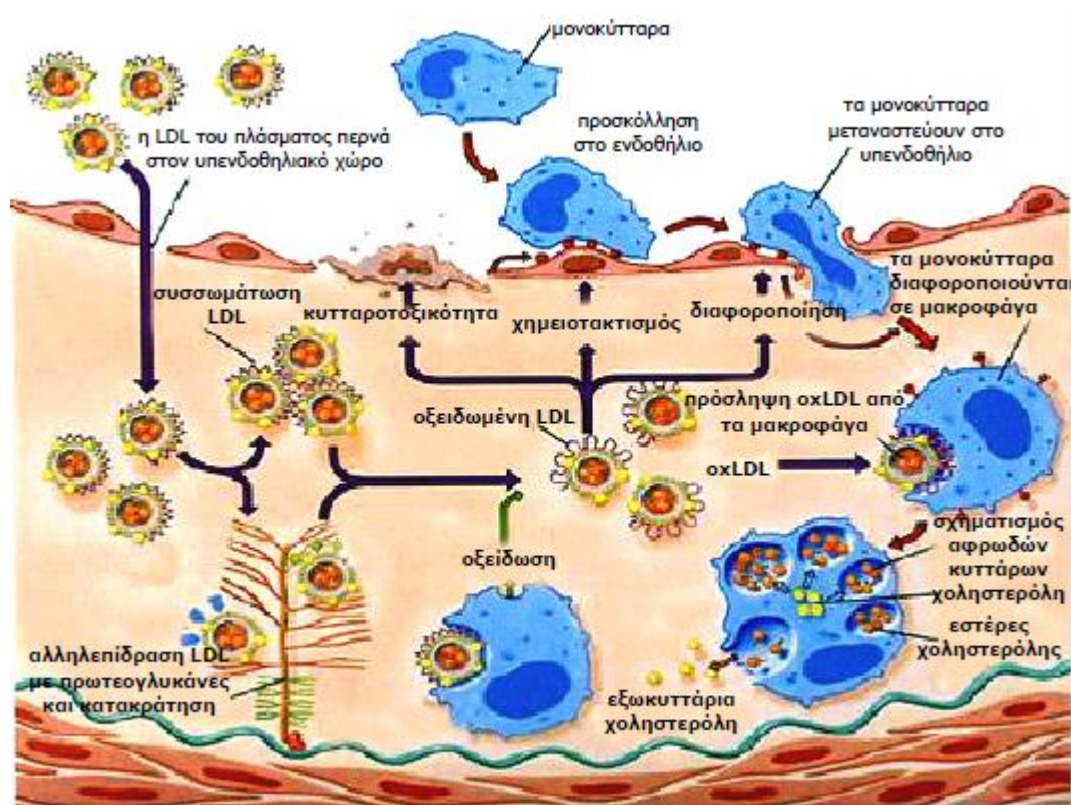
έναν αυξανόμενο όγκο εξωκυττάρων λιπιδίων και άλλων κυτταρικών θραυσμάτων.

Τα οξειδωμένα λιπίδια και οι οξειδωμένες LDL (oxLDL) προάγουν: α) την έκφραση προσκολλητικών μορίων (ICAM-1: IntraCellular Adhesion Molecule 1, P-σελεκτίνης, E-σελεκτίνης, PCAM-1: Platelet Cell Adhesion Molecule 1 and VCAM-1: Vascular Cell Adhesion Molecule 1) β) την έκκριση χημειοτακτικών πρωτεϊνών από τα ενδοθηλιακά κύτταρα, όπως η χημειοτακτική πρωτεΐνη των μονοκυττάρων-1 (MCP-1: Monocyte Chemotactic Protein 1), γ) την έκφραση αυξητικών παραγόντων, όπως ο διεγερτικός παράγοντας των αποικιών των μακροφάγων (M-CSF: Monocyte-Colony Stimulating Factor), τα οποία μαζί με την εναπόθεση χυμοκινών προερχόμενων από αιμοπετάλια, οδηγούν σε διείσδυση κυττάρων του ανοσοποιητικού στον υποενδοθηλιακό χώρο. Οι oxLDL επιδρούν επίσης στα ενδοθηλιακά κύτταρα αναστέλλοντας την παραγωγή του μονοξειδίου του αζώτου (NO: Nitric Oxide), έναν σημαντικό παράγοντα αγγειοδιαστολής και έκφρασης προσκολλητικών μορίων του ενδοθηλίου για τα λευκοκύτταρα. (ELAM: Endothelial Leukocyte Adhesion Molecules). Οι πρώιμες πλάκες λιπαρών εναποθέσεων αποτελούνται από T λεμφοκύτταρα και προερχόμενα από μονοκύτταρα-αφρώδη μακροφάγα κύτταρα φορτωμένα με λιπίδια [41,44].

Ένας αριθμός από παράγοντες κινδύνου όπως τα υψηλά επίπεδα ομοκυστεΐνης και αγγειοτενσίνηςII (παράγεται από τη δράση του μετατρεπτικού ενζύμου της αγγειοτενσίνης, ACE: Angiotensin-Converting Enzyme ) ενεργοποιεί τη μετανάστευση ή τον πολλαπλασιασμό των λείων μυϊκών κυττάρων (Smooth Muscle Cells, SMCs). Τα οιστρογόνα ασκούν ευεργετικές δράσεις στα επίπεδα των λιποπρωτεϊνών του πλάσματος και επίσης διεγείρουν την παραγωγή NO και προστακυκλίνης από τα ενδοθηλιακά κύτταρα. Η αλληλεπίδραση του CD40 με τον προσδέτη του διεγείρει τα T-λεμφοκύτταρα και τα μακροφάγα να εκφράσουν κυτταροκίνες όπως η INF-γ που επηρεάζουν τη φλεγμονή, την αύξηση των SMCs και την συσσώρευση της θεμέλιας ουσίας. Τα SMCs του εσωτερικού χιτώνα εκκρίνουν εξωκυττάρια θεμέλια ουσία που οδηγεί στην ανάπτυξη ινώδους μανδύα. Στις περιοχές γύρω από το νεκρωτικό πυρήνα υπάρχει μεγάλη διείσδυση T-λεμφοκυττάρων και ιστοκυττάρων (mast cells), που παράγουν ένζυμα και προφλεγμονώδεις διαμεσολαβητές, που συνεισφέρουν στην φλεγμονή κοντά στις αναπτυσσόμενες πλάκες. Ευπαθείς πλάκες με λεπτούς



ινώδεις μανδύες είναι το αποτέλεσμα της αποικοδόμησης της θεμέλιας ουσίας από διάφορες πρωτεάσες όπως κολλαγονάσες, ζελατινάσες, στρομολυσίνη, καθεψίνες και την αναστολή της έκκρισης θεμέλιας ουσίας. Ανάμεσα στους διάφορους παράγοντες που μπορούν να αποσταθεροποιήσουν τις πλάκες και να προάγουν την θρόμβωση είναι η μόλυνση, η οποία μπορεί να έχει συστημικές δράσεις, όπως η επαγωγή πρωτεϊνών οξειάς φάσης, αλλά και τοπικές δράσεις, όπως η αυξημένη έκφραση του παράγοντα του ιστού και μειωμένη έκφραση του ενεργοποιητή του πλασμινογόνου (PA). Η ασβεστοποίηση των πλακών φαίνεται να είναι μια ενεργή ρυθμιζόμενη λειτουργία που σχετίζεται με την έκκριση από περι-κυτταρικά ομοιάζοντα κύτταρα (pericyte-like cells) του εσωτερικού χιτώνα ενός πλαισίου στήριξης για την εναπόθεση φωσφορικού ασβεστίου. Ο σχηματισμός του θρόμβου, που αποτελείται από προσκολλημένα αιμοπετάλια και ινώδεις διασυνδέσεις, συνήθως είναι αποτέλεσμα της ρήξης της πλάκας [41,44].



**Εικόνα 2.2** Σχηματική αναπαράσταση της πρώιμης αθηροσκληρωτικής βλάβης[2]. Τα LDL σωματίδια περνούν στον υποενδοθηλιακό χώρο όπου κατακρατούνται και τροποποιούνται σε oxLDL. Οι oxLDL προσλαμβάνονται από τα μακροφάγα, προκαλούν κυτταροτοξικότητα στο ενδοθήλιο, το χημειοτακτισμό των μονοκυττάρων και τη διαφοροποίησή τους σε μακροφάγα.

## 2.4 Πιθανοί μηχανισμοί οξειδωσης LDL

Είναι γενικά αποδεκτό ότι η οξειδωση των LDL δε συμβαίνει στην κυκλοφορία αλλά στο αρτηριακό τοίχωμα, διότι οι λιποπρωτεΐνες που κυκλοφορούν στο πλάσμα προστατεύονται ικανοποιητικά από την οξειδωση από αρκετούς αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς. Επίσης, το ίδιο το σωματίδιο της LDL περιέχει αρκετά αντιοξειδωτικά συστατικά όπως η α-τοκοφερόλη που την προστατεύει από την οξειδωση κατά την κυκλοφορία [61]. Οι LDL εκτίθενται σε οξειδωτικά κυτταρικά παράγωγα στον υποενδοθηλιακό χώρο της αρτηρίας.

Από τα λεία μυϊκά κύτταρα και από τα μονοκύτταρα φαίνεται ότι εκκρίνονται ανιόντα σουπεροξειδίου ( $\cdot O_2^-$ ) και διάφορες μελέτες έχουν δείξει ότι η δισμουτάση του σουπεροξειδίου αναστέλλει την οξειδωση της LDL από τα λεία μυϊκά κύτταρα και τα μονοκύτταρα [55,56]. Η παραγωγή σουπεροξειδίου έχει σχετιστεί με τις θειόλες, επομένως η αυτοοξειδωση των θειολών, όπως η ομοκυστεΐνη, παρουσία ιόντων μετάλλου, έχει βρεθεί ότι προάγει τη λιπιδική υπεροξειδωση. Επίσης, έχει βρεθεί ότι η συνέργεια της σερουπλασμίνης με τις ρίζες του σουπεροξειδίου, που παράγονται από τα ενδοθηλιακά και τα λεία μυϊκά κύτταρα, προάγει την οξειδωση της LDL in vitro, αφού ούτε η σερουπλασμίνη ούτε το σουπεροξειδίο από μόνα τους προκάλεσαν αύξηση της οξειδωσης της LDL.

Ένας άλλος πιθανός τρόπος οξειδωσης φαίνεται να συμβαίνει κατά την επαφή της LDL με τα κύτταρα. Τα δύο γνωστά ένζυμα με τα οποία τα ενδοθηλιακά κύτταρα οξειδώνουν τα λιπίδια, τη λιποξυγενάση και την κυκλοοξυγενάση, μόνο το πρώτο ένζυμο θα μπορούσε να προκαλέσει άμεσα την οξειδωση της LDL, αφού αναστολείς του ενζύμου ελαττώνουν την οξειδωση της LDL μέχρι και 85% [58]. Βέβαια, η λιποξυγενάση βρίσκεται αποκλειστικά στο κυτταρόπλασμα και όχι στην επιφάνεια του κυττάρου. Εντούτοις, θα μπορούσε να προκαλεί την παραγωγή λιπιδικών υπεροξειδίων από τα ενδοκυττάρια λιπίδια και στη συνέχεια αυτά να μεταφέρονται στην LDL μέσω της επαφής με το κύτταρο. Είναι επίσης πιθανό το ένζυμο να μεταναστεύει μερικώς στην επιφάνεια των κυττάρων και να οξειδώνει απευθείας την LDL. Σε κάθε περίπτωση, η λιποξυγενάση φαίνεται να προάγει την οξειδωση της LDL είτε στα πρώιμα είτε στα όψιμα στάδια της αθηροσκλήρωσης [59,60].

Μία άλλη ουσία η μυελοϋπεροξειδάση (MPO) που εκφράζεται άφθονα στα αζουροφιλικά κοκκία των λευκοκυττάρων (ουδετερόφιλα, μονοκύτταρα)



είναι ένα ένζυμο που συνδέεται με τη φλεγμονή και το οξειδωτικό στρες [62,63]. Η MPO είναι μια αιμο-πρωτεΐνη που εκκρίνεται από τα ενεργοποιημένα ουδετερόφιλα και μονοκύτταρα και χρησιμοποιεί το παραγόμενο  $H_2O_2$  ως υπόστρωμα για την οξείδωση ιόντων χλωρίου σε υποχλωριώδες οξύ (HOCl), μιας ισχύρα τοξικής ουσίας. Αποτελεί με αυτό τον τρόπο σημαντικό παράγοντα των αμυντικών μηχανισμών του οργανισμού ενάντια στην εισβολή των μικροοργανισμών. Είναι το μοναδικό ένζυμο στον ανθρώπινο οργανισμό που μπορεί να παράγει υποχλωριώδες οξύ (HOCl). Η MPO είναι μία εξαιρετικά κατιονική πρωτεΐνη που μπορεί να δεσμευτεί στα ενδοθηλιακά κύτταρα, στα λευκοκύτταρα και στις LDL και με αυτόν τον τρόπο προκαλεί βλάβες στην LDL, αλλά και σε άλλα μακρομόρια in vivo. Μεγάλος αριθμός ενεργών μορφών οξυγόνου που παράγονται από την MPO οξειδώνουν λιπίδια και πρωτεΐνες της LDL και η συσχέτιση της MPO με την LDL μπορεί να αυξήσει την οξείδωση της δεύτερης [64,65].

## **2.5 Αθηροσκλήρωση και εμφάνιση ισχαιμικού αγγειακού εγκεφαλικού επεισοδίου (ΑΕΕ)**

Όπως ήδη έχει αναφερθεί η ανάπτυξη αθηρωματικής πλάκας προκαλεί στένωση του αυλού των αγγείων με άμεση συνέπεια τη μείωση της ροής του αίματος προς τους ιστούς (ισχαιμία). Όταν αναπτύσσονται στα εγκεφαλικά αγγεία αθηρωματικές πλάκες μπορεί να προκληθεί ισχαιμικό αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο (ΑΕΕ). Τα αγγειακά εγκεφαλικά επεισόδια είναι μία από τις σημαντικότερες αιτίες θανάτου (μετά τις καρδιοπάθειες και τον καρκίνο) στις Ηνωμένες Πολιτείες αλλά και εν γένει, στις αναπτυγμένες χώρες, κυρίως του δυτικού κόσμου [66]. Ακόμα μεγαλύτερη σημασία έχει το γεγονός ότι το ΑΕΕ είναι σημαντική αιτία αναπηρίας και μάλιστα η πιο συχνή αιτία νευρολογικής αναπηρίας στους ενήλικους. Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας ως ΑΕΕ ορίζεται «κάθε οξείας έναρξης εστιακή ή γενικευμένη διαταραχή της εγκεφαλικής λειτουργίας που διαρκεί περισσότερο από 24 ώρες και οφείλεται αποκλειστικά σε αγγειακά αίτια» [67]. Το μεγαλύτερο ποσοστό των ΑΕΕ αποτελούν τα ισχαιμικά (80-85%) και ακολουθούν τα αιμορραγικά επεισόδια (15-20%). Οι περισσότεροι επιζήσαντες υποφέρουν από διαταραχές του λόγου, των πνευματικών, αισθητικών και κινητικών λειτουργιών. Υπολογίζεται ότι σε ποσοστό 30% χρειάζονται βοήθεια στις καθημερινές τους δραστηριότητες [67]. Έτσι, σε αντίθεση με τους ασθενείς που επέζησαν από

καρδιακό έμφραγμα, και οι οποίοι συνήθως είναι σε θέση να εργαστούν έστω και σε λιγότερο κοπιαστικές εργασίες, οι ασθενείς που υπέστησαν αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο συχνά δεν μπορούν, όχι μόνο να εργαστούν, αλλά ούτε να αυτοεξυπηρετηθούν. Απαιτείται μακρά νοσηλεία κατά την ανάρρωση και μερικές φορές μόνιμη φροντίδα από κάποιον εφ' όρου ζωής, ακόμα και ιδρυματοποίηση [69], πράγμα που κάνει πολύ σημαντικές τις οικονομικές επιπτώσεις της νόσου. Γίνεται λοιπόν, φανερή από τα παραπάνω η σημασία της επιδημιολογίας της νόσου.

Ένα αρκετά μεγάλο ποσοστό (30%) των ισχαιμικών ΑΕΕ χαρακτηρίζονται ως αθηροθρομβωτικά λόγω αθηρωματικής νόσου των μεγάλων αγγείων, ιδιαίτερα της έσω καρωτίδας [70]. Φαίνεται λοιπόν, ότι οι διαταραχές στα λιπίδια που συντελούν στην ανάπτυξη της αθηρωματικής πλάκας, έχουν ιδιαίτερο ρόλο στην εμφάνιση του ισχαιμικού ΑΕΕ. Μολονότι η σημασία των επιπέδων χοληστερόλης και των λιποπρωτεϊνών LDL και HDL στην εμφάνιση καρδιαγγειακών νοσημάτων έχει επιβεβαιωθεί από διαφορές μελέτες και είναι γενικά παραδεκτή, η σημασία τους σαν παράγοντας κινδύνου στο ΑΕΕ δεν είναι πλήρως ξεκάθαρη. Οι περισσότερες επιδημιολογικές μελέτες επισημαίνουν την ύπαρξη συσχέτισης ανάμεσα στις υψηλές τιμές χοληστερόλης και τον αυξημένο κίνδυνο ισχαιμικού ΑΕΕ [71-74]. Η αύξηση της χοληστερόλης (πάνω από τα 5mmol/L) αυξάνει τον σχετικό κίνδυνο για ΑΕΕ στο 2.9 [75]. Η αύξηση του σχετικού κινδύνου για θανατηφόρο ισχαιμικό ΑΕΕ είναι προοδευτική για κάθε επίπεδο τιμών της χοληστερόλης στη μελέτη Multiple Risk Factor Intervention Trial (MRFIT), η οποία συμπεριέλαβε > 350.000 άνδρες [76]. Η συχνότητα των ισχαιμικών ΑΕΕ αυξήθηκε κατά 25% (95% CI, 13% σε 40%) για κάθε 1 mmol/L (38.7 mg/dL) αύξηση στην τιμή της ολικής χοληστερόλης, με βάση τα δεδομένα από 352.033 άτομα που συμμετείχαν στη μελέτη APCSC (In the Asia Pacific Cohort Studies Collaboration) [72]. Παρόμοια ευρήματα ανακοινώθηκαν και για το γυναικείο πληθυσμό σε δύο μεγάλες επιδημιολογικές μελέτες στις ΗΠΑ [77,78]. Στον αντίποδα ωστόσο είναι οι αρνητικές μελέτες, όπως η ARIC (14175 μεσήλικες και των δύο φύλων χωρίς καρδιαγγειακή νόσο) και το Eurostroke Project (22183 άνδρες και γυναίκες) που ανίχνευσαν ασθενείς συσχετίσεις ή έλλειψη συσχετίσεων μεταξύ τιμών λιπιδίων και επίπτωσης ισχαιμικού ΑΕΕ [79,80]. Επίσης, πληθώρα επιδημιολογικών μελετών καταδεικνύουν την ύπαρξη αρνητικής συσχέτισης μεταξύ των τιμών της HDL-χοληστερόλης (HDL-C) και

του ισχαιμικού ΑΕΕ [81-84]. Για κάθε 10 mg/dL αύξησης στην HDL-C ο κίνδυνος ΑΕΕ μειώνεται κατά 11-15% [85]. Ακόμα έχει δειχθεί ότι η χορήγηση στατινών μειώνει τον κίνδυνο ΑΕΕ σε άτομα με αθηροσκλήρωση ή με υψηλό κίνδυνο εμφάνισης αθηροσκλήρωσης [86]. Σε μια μετα-ανάλυση 26 μελετών (>90.000 ασθενείς) οι στατίνες μείωσαν τον σχετικό κίνδυνο όλων των ΑΕΕ κατά περίπου 21% (95% CI, 15% ως 27%) [87]. Η αρχική μέση τιμή της LDL-C κυμαινόταν μεταξύ 124 mg/dL και 188 mg/dL, με μέσο όρο τα 149 mg/dL. Η αναμενόμενη μείωση του κινδύνου για ΑΕΕ ήταν 15.6% (95% CI, 6.7% ως 23.6%), για κάθε μείωση της LDL-C κατά 10%. Όταν οι στατίνες συνδυάστηκαν με άλλες στρατηγικές πρόληψης, σε νεότερη μετα-ανάλυση τυχαιοποιημένων μελετών (165.792 άτομα) από την ίδια ερευνητική ομάδα, φάνηκε ότι η μείωση της LDL-χοληστερόλης κατά 1 mmol/L (39 mg/dL) ισοδυναμούσε με μείωση του σχετικού κινδύνου για ΑΕΕ κατά 21.1% (95% CI, 6.3% ως 33.5%; P=0.009) [88]. Η ευεργετική επίδραση των στατινών στα ισχαιμικά ΑΕΕ πιθανώς σχετίζεται με την ικανότητά τους να προκαλούν μείωση της εξέλιξης ή υποστροφή της αθηροσκλήρωσης. Η δράση τους αυτή απεικονίζεται με ευκρίνεια στην αρνητική συσχέτιση που παρουσίασε η μείωση της LDL-χοληστερόλης με την πρόοδο της πάχυνσης του έσω-μέσου χιτώνα των καρωτίδων στη μετα-ανάλυση των Amarencο et al [86]. Η επίδραση άλλων κατηγοριών υπολιπιδαιμικών φαρμάκων (νιασίνη, φιμπράτες και εξετιμίμπη) στον κίνδυνο ισχαιμικών ΑΕΕ δεν έχει τεκμηριωθεί, οπότε στις πρόσφατες κατευθυντήριες οδηγίες των ΑΗΑ/ΑΣΑ (2011) προτείνεται η χρήση των στατινών, ως επιπρόσθετο μέτρο της αλλαγής του τρόπου ζωής, για την πρωτογενή πρόληψη των ισχαιμικών ΑΕΕ σε άτομα με στεφανιαία νόσο ή ισοδύναμά της, όπως ο σακχαρώδης διαβήτης [89]. Παραμένει αδιευκρίνιστος ωστόσο μέχρι σήμερα ο ενδεχόμενος ευεργετικός ρόλος των στατινών στη δευτερογενή πρόληψη των ΑΕΕ, ιδίως σε ασθενείς που δεν έχουν ιστορικό στεφανιαίας νόσου [90,91].

### **2.5.1 Παράγοντες κινδύνου ΑΕΕ**

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, το αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο είναι μία από τις συχνότερες αιτίες θανάτου και μία από τις σημαντικότερες αιτίες μόνιμης αναπηρίας. Στην προσπάθεια πρόληψής του, έχουν γίνει πολλές μελέτες με σκοπό να εντοπιστούν οι παράγοντες που το προκαλούν. Οι

παράγοντες για την καλύτερη προσέγγισή τους χωρίζονται σε δύο ομάδες: τους *μη τροποποιήσιμους* και τους *τροποποιήσιμους*.

**Οι μη τροποποιήσιμοι παράγοντες** περιλαμβάνουν:

**α. Την ηλικία:** Ο ισχυρότερος μη τροποποιήσιμος παράγοντας κινδύνου για ισχαιμικά ΑΕΕ είναι η ηλικία, η οποία επιδρά καθοριστικά στην επίπτωση τους, καθώς μόνο το 25% αφορά άτομα μικρότερα των 65 ετών. Σύμφωνα με πληθυσμιακές μελέτες ο κίνδυνος ισχαιμικού ΑΕΕ διπλασιάζεται για κάθε δεκαετία ζωής μετά τα 55 έτη [89]. Σε σύγκριση με την ηλικιακή ομάδα 45-74 ετών, τα άτομα 75 ετών και άνω διατρέχουν 9 και 14 φορές μεγαλύτερο κίνδυνο για πρωτοεμφανιζόμενο ΑΕΕ ή υποτροπή αντίστοιχα [92].

**β. Το φύλο:** Το ανδρικό φύλο αποτελεί ανεξάρτητο παράγοντα κινδύνου για ισχαιμικό ΑΕΕ και τα ΑΕΕ είναι γενικά, συχνότερα στους άνδρες από τις γυναίκες [93]. Οι άνδρες ηλικίας 35-64 ετών παρουσιάζουν σχεδόν διπλάσια συχνότητα ΑΕΕ (συνολικά επεισόδια, ανεξάρτητα από αιτιολογία/ταξινόμηση) σε σύγκριση με συνομήλικές τους γυναίκες [94]. Το αντίθετο ωστόσο, έχει παρατηρηθεί σε άτομα ηλικίας κάτω των 30 ετών, στα οποία το γυναικείο φύλο είναι επιβαρυντικός παράγοντας για ισχαιμικό ΑΕΕ [95]. Η χρήση αντισυλληπτικών δισκίων και η κύηση συμβάλλουν στην αύξηση του κινδύνου για ΑΕΕ στις νέες γυναίκες [89]. Στοιχεία από τη μελέτη του Framingham δείχνουν ότι, το συγκριτικό πλεονέκτημα των γυναικών της λευκής φυλής έναντι των ανδρών χάνεται στις μεγάλες ηλικίες, έτσι ώστε σε γυναίκες άνω των 85 ετών ο κίνδυνος για ΑΕΕ υπερακοντίζει εκείνο των ανδρών [96]. Κατά μέσο όρο πάντως, οι γυναίκες παρουσιάζουν ΑΕΕ σε μεγαλύτερη ηλικία από τους άνδρες (75 ετών οι γυναίκες, 71 ετών οι άνδρες) [96]. Το γεγονός αυτό, σε συνδυασμό με το μεγαλύτερο προσδόκιμο επιβίωσης ερμηνεύει γιατί κάθε χρόνο στις ΗΠΑ περίπου 55.000 περισσότερες γυναίκες από άνδρες παρουσιάζουν ΑΕΕ. Οι γυναίκες διατρέχουν συνολικά στη διάρκεια της ζωής τους, μεγαλύτερο κίνδυνο από τους άνδρες για ΑΕΕ. Ο κίνδυνος αυτός προσδιορίζεται για άτομα ηλικίας 55-75 ετών σε 1 στις 5 γυναίκες (20-21%) και 1 στους 6 άνδρες (14-17%) σύμφωνα πάλι με τη μελέτη του Framingham, ενώ το 2005 το 61% των θανάτων από ΑΕΕ στις ΗΠΑ αφορούσε γυναίκες [96].

**γ. Η εθνικότητα-φυλή:** Σημαντικές διαφορές στη νοσηρότητα, αλλά και στη θνητότητα από ΑΕΕ έχουν παρατηρηθεί μεταξύ των φυλών. Έτσι, οι μαύροι που ζουν στις ΗΠΑ εμφανίζουν πολύ συχνότερα ισχαιμικά εγκεφαλικά επεισόδια σε σχέση με τους λευκούς. Μία προφανής εξήγηση είναι η κατά πολύ συχνότερη στον πληθυσμό αυτό, παρουσία αρτηριακής υπέρτασης και σακχαρώδη διαβήτη. Πάντως, ακόμα και σε απουσία των δύο αυτών παραγόντων, η διαφορά στη συχνότητα ΑΕΕ παραμένει [98-100].

**δ. Η κληρονομικότητα:** Θεωρείται συχνά, από ειδικούς και μη, ως σημαντικός παράγοντας πρόκλησης ΑΕΕ. Ωστόσο, η σημασία της κληρονομικότητας δεν έχει οριστικά αποδειχθεί, σε αντίθεση με αυτήν της στεφανιαίας νόσου. Έτσι υπάρχουν μελέτες που την υποστηρίζουν [101,102] και άλλες που την απορρίπτουν [103]. Πιθανολογήθηκε ότι η συσχέτιση αυτή προκύπτει από την αυξημένη συχνότητα αρτηριακής υπέρτασης, υπερλιπιδαιμίας ή ισχαιμικής καρδιακής νόσου [104] σε άτομα της ίδιας οικογένειας.

**Οι τροποποιήσιμοι παράγοντες** περιλαμβάνουν:

**α. παχυσαρκία:** Η παχυσαρκία (δείκτης μάζας σώματος  $\geq 30$  kg/m<sup>2</sup>) αποτελεί έναν καλά τεκμηριωμένο παράγοντα κινδύνου για ισχαιμική καρδιοπάθεια (CHD) και πρόωρη θνησιμότητα [105]. Η σχέση μεταξύ σωματικού βάρους (ή δεικτών παχυσαρκίας) και ΑΕΕ έχει αποτελέσει το αντικείμενο αρκετών προοπτικών μελετών. Ο δείκτης μάζας σώματος (BMI) παρουσίαζε μη γραμμική συσχέτιση με τη θνησιμότητα σε μια πρόσφατη (2009) μετα-ανάλυση που συμπεριέλαβε 900.000 άτομα [106]. Αν και ο δείκτης μάζας σώματος παρουσιάζει ισχυρή συσχέτιση με την περίμετρο μέσης και άλλους δείκτες παχυσαρκίας [107], όταν μελετήθηκαν οι επιπτώσεις του BMI και του κοιλιακού σωματικού λίπους, το τελευταίο έτεινε να είναι ισχυρότερος προγνωστικός δείκτης του κινδύνου για ΑΕΕ όταν συνοδεύεται από αρτηριακή πίεση ή υπερτριγλυκεριδαιμία αλλά και χωρίς αυτές [108,109].

**β. κάπνισμα:** Το κάπνισμα αποτελεί, σύμφωνα με την πλειονότητα των μεγάλων επιδημιολογικών ερευνών (Framingham, Cardiovascular Health Study και Honolulu Heart Study), ισχυρό παράγοντα κινδύνου για ισχαιμικό ΑΕΕ [89,110]. Οι καπνιστές, σε σύγκριση με τους μη καπνιστές ή τους πρώην καπνιστές που έχουν υπερβεί τη δεκαετία από τη διακοπή, έχουν διπλάσιο

κίνδυνο για ισχαιμικό ΑΕΕ [110]. Η σχέση καπνίσματος και ΑΕΕ είναι δόσοεξαρτώμενη σε όλες τις ηλικίες [110,111]. Το κάπνισμα έχει συνεργιστική δράση με άλλους παράγοντες κινδύνου για ισχαιμικό ΑΕΕ. Υπάρχουν ενδείξεις ότι το παθητικό κάπνισμα πέρα από τη γνωστή αύξηση του κινδύνου για ισχαιμική καρδιοπάθεια, αποτελεί παράγοντα κινδύνου και για ισχαιμικό ΑΕΕ, με αποδιδόμενο κίνδυνο σχεδόν διπλάσιο του αντίστοιχου για το ενεργητικό κάπνισμα [112-114]. Μελέτες φυσιολογίας αποδίδουν το παράδοξο αυτό εύρημα στην ύπαρξη ενός κατώτερου ορίου (“threshold”) έκθεσης στον καπνό, η υπέρβαση του οποίου σηματοδοτεί την αύξηση του κινδύνου παρά στην ύπαρξη γραμμικής σχέσης βαθμού έκθεσης-κινδύνου (doseeffect). Η διακοπή του καπνίσματος συνοδεύεται από μείωση του κινδύνου για ΑΕΕ ανεξάρτητα από το φύλο, την ηλικία και τη φυλή [111]. Η διακοπή του καπνίσματος έχει ως αποτέλεσμα ταχεία μείωση του κινδύνου για ΑΕΕ, που προσεγγίζει, χωρίς όμως να εξισώνεται με αυτόν, τον κίνδυνο ατόμων που δεν κάπνισαν ποτέ [116].

**γ. αλκοόλ:** Υπάρχουν ισχυρές ενδείξεις για την ένταξη/κατάταξη της κατάχρησης αλκοόλ στους παράγοντες κινδύνου για ΑΕΕ όλων των τύπων [117-119]. Οι περισσότερες μελέτες υποδεικνύουν ότι η σχέση της κατανάλωσης αιθυλικής αλκοόλης με τον κίνδυνο (ισχαιμικού) ΑΕΕ παρουσιάζει τη μορφή καμπύλης (τύπου) J, καθώς η μικρή-μέτρια κατανάλωση έχει προστατευτική επίδραση, ενώ αντίθετα η κατάχρηση συνοδεύεται από αύξηση του κινδύνου [117,118,120-123]. Ειδικότερα, κατά τη μετα-ανάλυση 35 μελετών παρατήρησης [124] η κατανάλωση 60 g αλκοόλ την ημέρα συνδέθηκε με αύξηση του κινδύνου για ισχαιμικό ΑΕΕ κατά 69% (RR 1.69, 95% CI, 1.34 - 2.15). Αντίθετα, δρούσαν προστατευτικά η μικρή (<12 g) (RR 0.80, 95% CI, 0.67 - 0.96) και ιδίως η μέτρια (12-24 g) ημερήσια κατανάλωση αλκοόλ (RR 0.72, 95% CI, 0.57 - 0.91) με τη μορφή κυρίως κρασιού. Στους πιθανούς μηχανισμούς ελάττωσης του κινδύνου ισχαιμικού ΑΕΕ με την ήπια-μέτρια έκθεση στην αιθυλική αλκοόλη συμπεριλαμβάνονται η αύξηση της HDL χοληστερόλης [125,126], η μείωση της συνάθροισης των αιμοπεταλίων [127,128] και η χαμηλότερη συγκέντρωση του ινωδογόνου στο πλάσμα [129,130]. Αντίθετα, στις περιπτώσεις κατάχρησης, παράγοντες όπως η σχετιζόμενη με το αλκοόλ υπέρταση, η υπερπηκτικότητα, η εγκεφαλική υποάρδευση και η κολπική μαρμαρυγή ή τα καρδιακά έμβολα στο πλαίσιο της αλκοολικής

μυοκαρδιοπάθειας, συντελούν στην αύξηση του κινδύνου για ισχαιμικό ΑΕΕ [118,119]. Ως προς το ενδεχόμενο υποτροπής ισχαιμικού ΑΕΕ, παρατηρείται σημαντική αύξηση στα άτομα με ιστορικό κατάχρησης αλκοόλ, σύμφωνα με στοιχεία από τη Northern Manhattan cohort [131]. Έτσι, στις τρέχουσες συστάσεις πρωτογενούς πρόληψης των ΑΕΕ η μέγιστη αποδεκτή ημερήσια κατανάλωση αιθυλικής αλκοόλης περιορίζεται στα 2 ποτά για τους άνδρες και στο 1 για τις γυναίκες που δεν κυοφορούν [89].

**δ. αρτηριακή πίεση:** Η υπέρταση είναι συχνή, όχι μόνο στη χώρα μας αλλά και σε άλλες αναπτυγμένες χώρες, και αφορά περίπου το 25% του πληθυσμού των ενηλίκων [132]. Η αρτηριακή υπέρταση συνιστά τον ισχυρότερο τροποποιήσιμο παράγοντα κινδύνου για ΑΕΕ [133]. Αυτό προκύπτει από πληθώρα επιδημιολογικών μελετών, αλλά και μελετών παρέμβασης με στόχο την πρωτογενή (HOT, Syst-Eur, LIFE) και δευτερογενή πρόληψη (PROGRESS) των ΑΕΕ σε άτομα με υπέρταση [134]. Το 50% περίπου των ισχαιμικών ΑΕΕ σχετίζεται αιτιολογικά με την υπέρταση [135].

**ε. καρδιακές παθήσεις:** Η κολπική μαρμαρυγή, ακόμη και η μη βαλβιδικής αιτιολογίας, αποτελεί ισχυρό παράγοντα κινδύνου για ισχαιμικό ΑΕΕ, καθώς πενταπλασιάζει τον κίνδυνο σε όλες τις ηλικίες. Από το σύνολο των ισχαιμικών ΑΕΕ, το 10% είναι καρδιοεμβολικά που οφείλονται σε κολπική μαρμαρυγή. Το ποσοστό των ΑΕΕ που αποδίδονται στην κολπική μαρμαρυγή παρουσιάζει αξιοσημείωτη αύξηση από 1.5% στις ηλικίες 50-59 ετών σε 23.5% στις ηλικίες 80-89 ετών [140,141]. Η κολπική μαρμαρυγή είναι επίσης ανεξάρτητος προγνωστικός παράγοντας αυξημένης θνησιμότητας [142].

**στ. σακχαρώδης διαβήτης:** Η διαταραγμένη ανοχή στη γλυκόζη σχεδόν διπλασιάζει, ενώ ο σακχαρώδης διαβήτης (ΣΔ) τριπλασιάζει τον κίνδυνο για ΑΕΕ σε σύγκριση με άτομα με φυσιολογικές τιμές γλυκόζης [136]. Τόσο μελέτες ασθενών-μαρτύρων με ΑΕΕ, όσο και προοπτικές επιδημιολογικές μελέτες έχουν επιβεβαιώσει ότι σε άτομα με ΣΔ ο σχετικός κίνδυνος για ΑΕΕ είναι 1.8 - 6 φορές μεγαλύτερος σε σχέση με τους μάρτυρες [137]. Ο σακχαρώδης διαβήτης αυξάνει την επίπτωση των ισχαιμικών ΑΕΕ σε όλες τις ηλικίες, αν και ο κίνδυνος είναι μεγαλύτερος σε νεότερα άτομα (< 55 ετών για τη μαύρη φυλή, < 65 ετών για τη λευκή φυλή) . Οι ασθενείς με ΣΔ και

ισχαιμικό ΑΕΕ είναι νεότεροι, κατά πάσα πιθανότητα μαύροι (σε μικτούς φυλετικά πληθυσμούς), με μεγαλύτερη πιθανότητα συνύπαρξης αρτηριακής υπέρτασης, εμφράγματος μυοκαρδίου, και δυσλιπιδαιμίας από τους μη διαβητικούς ασθενείς [138]. Επιπλέον, ο σακχαρώδης διαβήτης είναι ανεξάρτητος προγνωστικός παράγοντας υποτροπής ΑΕΕ, καθώς σε πληθυσμιακές μελέτες το 9% των υποτροπών αποδόθηκαν στο διαβήτη [139].

**η. διαταραχές λιπιδίων:** Η σημασία του επιπέδου της χοληστερόλης και των κλασμάτων της HDL και LDL στην εμφάνιση της στεφανιαίας νόσου και της περιφερικής αγγειοπάθειας έχει επιβεβαιωθεί από διάφορες μελέτες και είναι γενικά παραδεκτός [144-146]. Η σημασία της όμως σαν παράγοντας κινδύνου ΑΕΕ δεν είναι ξεκάθαρη [147,148]. Μερικοί υποστηρίζουν την ύπαρξη διαφοράς στη συχνότητα εγκεφαλικών επεισοδίων μεταξύ φυσιολογικών και υπερχοληστερολαιμικών ατόμων [144,148 ], άλλοι την απορρίπτουν [149,150] και άλλοι τη θεωρούν σημαντική για άτομα ηλικίας μικρότερης των 60 ετών [151]. Όσον αφορά τα τριγλυκερίδια φαίνεται ότι, όταν η αύξηση τους συνοδεύεται από χαμηλές τιμές HDL-C, γίνονται και αυτά παράγοντας που αυξάνει τον κίνδυνο αθηροσκλήρωσης [152].

**θ. κρίσεις ημικρανίας:** Έχουν θεωρηθεί από παλιά ως παράγοντας κινδύνου ισχαιμικού ΑΕΕ σε νεαρά κυρίως άτομα, ιδίως ηλικίας μικρότερης των 40 ετών [153-156]. Πρόκειται όμως πάντοτε, για μια διάγνωση εξ αποκλεισμού στην οποία καταλήγουμε αφού ελεγχθούν όλες οι υπόλοιπες διαγνωστικές πιθανότητες. Ο προτεινόμενος μηχανισμός είναι η ελάττωση της εγκεφαλικής αιματικής ροής που οφείλεται στο σπασμό των αρτηριών. Πιθανόν συμβάλλει, όπως υποστηρίζουν ορισμένοι ερευνητές, η αυξημένη συγκολλητικότητα των αιμοπεταλίων σε ασθενείς με ημικρανία [157-159], πράγμα που θεωρητικά αυξάνει την πιθανότητα απόφραξης του εγκεφαλικού αγγείου και πρόκλησης ισχαιμικού επεισοδίου.



## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3**

### **HDL και αθηροσκλήρωση**

#### **3.1 Βιολογικός ρόλος HDL**

Επιδημιολογικές, γενετικές, καθώς και μελέτες σε μοντέλα ζώων έχουν δείξει ότι τα αυξημένα επίπεδα της HDL στο πλάσμα προστατεύουν από την αθηροσκλήρωση, ενώ αντίθετα τα μειωμένα επίπεδα σχετίζονται με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης καρδιαγγειακής νόσου [160]. Είναι σημαντικό να διευκρινιστεί ότι τα επίπεδα της HDL-C μας πληροφορούν μόνο για το συνολικό ποσό χοληστερόλης που μεταφέρεται στο πλάσμα μέσω των HDL σωματιδίων και δεν παρέχουν καμία πληροφορία για τη σύσταση ή το μέγεθος τους [161]. Πρόσφατες όμως μελέτες, έχουν δείξει ότι τα υψηλά επίπεδα της HDL-C δεν αρκούν για τον αθηροπροστατευτικό της ρόλο της HDL αλλά σημαντικό ρόλο διαδραματίζουν η σωστή σύσταση και η λειτουργία της HDL.

Η HDL φυσιολογικά εξυπηρετεί μια σειρά από σημαντικές αντιαθηρογόνες λειτουργίες που περιλαμβάνουν: την προαγωγή του μονοπατιού της ανάστροφης μεταφοράς χοληστερόλης (Reverse Cholesterol Transport) RCT [162], την αναστολή της οξειδωσης λιπιδίων στις LDL [163], την ρύθμιση των σχετιζόμενων με φλεγμονή κυτταροκινών και μορίων προσκόλλησης στα αγγειακά κύτταρα [164], αρκετές σημαντικές αντιθρομβωτικές και αντιαθηρογόνες επιδράσεις στο ενδοθήλιο [165], όπως της διέγερσης της παραγωγής NO από τα ενδοθηλιακά κύτταρα [166,167] και την προαγωγή των μηχανισμών επιδιόρθωσης του ενδοθηλίου [168,162].

##### **3.1.1 HDL και το μονοπάτι της ανάστροφης μεταφοράς χοληστερόλης**

Η συσσώρευση χοληστερόλης εντός των μακροφάγων οδηγεί στο σχηματισμό των αφρώδων κυττάρων (foam cells) και αποτελεί το κύριο χαρακτηριστικό της αθηρογένεσης [170]. Η HDL έχει την ικανότητα να απομακρύνει την περίσσεια χοληστερόλης από τα μακροφάγα και εν γένει από τα κύτταρα και να τη μεταφέρει στο ήπαρ για απέκκριση και απομάκρυνση από τον οργανισμό, μια διαδικασία που καλείται *ανάστροφη*

μεταφορά χοληστερόλης (Reverse Cholesterol Transport, RCT). Παρόλο που, η εκροή χοληστερόλης από τα μακροφάγα έχει μικρή συνεισφορά στη συνολική από όλα τα κύτταρα μεταφορά χοληστερόλης προς την HDL του πλάσματος εντούτοις, αποτελεί την πλέον σημαντική αθηροπροστατευτική λειτουργία.

Η πορεία της RCT ξεκινά με την εκροή χοληστερόλης από τα μακροφάγα των αγγείων και από άλλους ιστούς προς την ελεύθερη ή φτωχή λιπιδίων αποA-I μέσω του μεταφορέα λιπιδίων ATP-Binding Cassette transporter ABCA1. Επίσης, η εκροή χοληστερόλης συμβαίνει όχι μόνο προς την ελεύθερη ή φτωχή λιπιδίων αποA-I, αλλά και προς την ώριμη HDL, αυτή τη φορά όμως η μεταφορά γίνεται μέσω αλληλεπίδρασης με τον μεταφορέα λιπιδίων ABCG1. Στη συνέχεια, η χοληστερόλη της HDL εστεροποιείται από την LCAT και η εστεροποιημένη πλέον χοληστερόλη οδηγείται στον πυρήνα της λιποπρωτεΐνης. Το τελικό στάδιο στην ανάστροφη μεταφορά χοληστερόλης περιλαμβάνει την πρόσληψη της HDL-C μέσω του υποδοχέα της HDL SR-BI, στο ήπαρ για απομάκρυνση μέσω της χολής. Η εστεροποιημένη χοληστερόλη της HDL μπορεί επίσης να μεταφερθεί αρχικά από την HDL σε λιποπρωτεΐνες που περιέχουν την αποB (VLDL και LDL), μέσω της πρωτεΐνης μεταφοράς εστέρων χοληστερόλης CETP και στην συνέχεια από τις VLDL και LDL να μεταφερθούν μέσω των LDL και LRP υποδοχέων στο ήπαρ [Σφάλμα! Το αρχείο προέλευσης της αναφοράς δεν βρέθηκε.]. Η αντιαθηρογόνος λειτουργία της HDL μέσω της πορείας της RCT οφείλεται στο ότι με τη διευκόλυνση της απομάκρυνσης της περίσσειας κυτταρικής χοληστερόλης από τα μακροφάγα κύτταρα εμποδίζεται η δημιουργία ή μειώνεται ο ρυθμός δημιουργίας αφρωδών κυττάρων και συνεπώς εμποδίζεται ή μειώνεται ο ρυθμός θανάτου των αφρωδών κυττάρων, ο οποίος αφήνει έναν αυξανόμενο όγκο εξωκυττάρων λιπιδίων και άλλων κυτταρικών θραυσμάτων. Δεδομένου ότι από τη διαδοχική συσσώρευση αποπτωτικών κυττάρων, θραυσμάτων και κρυστάλλων χοληστερόλης θα σχηματιστεί ο νεκρωτικός πυρήνα της αθηρωματικής πλάκας [41,44], η δράση της HDL εμποδίζει τον σχηματισμό ή υποστρέφει τον ήδη σχηματισμένο νεκρωτικό πυρήνα.

### 3.1.2 Αντιφλεγμονώδης δράση της HDL

Στα πρώιμα στάδια παθογένεσης της αθηρωμάτωσης λαμβάνει χώρα μια τοπική φλεγμονώδης ενεργοποίηση στο εσωτερικό του αρτηριακού τοιχώματος η οποία χαρακτηρίζεται από αυξημένη έκφραση μορίων προσκόλλησης του ενδοθηλίου με επακόλουθη επιστράτευση και διείσδυση μονοκύτταρων. Η HDL εμφανίζει πολλαπλές αντιφλεγμονώδεις επιδράσεις που περιλαμβάνουν: (i) αναστολή έκφρασης μορίων προσκόλλησης που επάγονται από κυτοκίνες στα ενδοθηλιακά κύτταρα (E-σελεκτίνη, VCAM-1, ICAM-1) , (ii) αναστολή της προσκόλλησης μονοκύτταρων στο ενδοθήλιο, (iii) αναστολή της ενεργοποίησης των μονοκύτταρων, μέσω μειωμένης παραγωγής προ-φλεγμονωδών κυτοκινών και χημειοκινών και (iv) μείωση της ενεργοποίησης των ουδετερόφιλων στο αρτηριακό τοίχωμα [171,172]. Πράγματι, εγχύσεις αποΑ-I και ανασυσταμένης HDL μείωσαν την έκφραση πολλών μορίων προσκόλλησης στο ενδοθήλιο και επίσης μείωσαν την έκφραση της E-σελεκτίνης στις αθηρωματικές πλάκες [171,173]. Οι αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες της HDL φαίνεται κυρίως να οφείλονται στην αποΑ-I με την συνεισφορά φωσφολιπιδίων, κυρίως της 1-φωσφορικής σφιγγοσίνης (S1P) αλλά και της σφιγγοσυλο-φωσφορυλοχολίνης [174].

### 3.1.3 Προστασία ακεραιότητας ενδοθηλίου

Η HDL ασκεί επίσης αρκετές σημαντικές αντιαθηρογόνες επιδράσεις στο ενδοθήλιο [143,144], μεταξύ των οποίων είναι η διατήρηση της λειτουργίας του αγγειακού ενδοθηλίου μέσω της διέγερσης απελευθέρωσης του μονοξειδίου του αζώτου NO [175,167]. Η HDL μπορεί να ρυθμίσει τον αγγειακό τόνο προκαλώντας την απελευθέρωση αγγειοδραστικών μορίων, ιδιαίτερα του NO. Στην πραγματικότητα, η HDL είναι σε θέση να επάγει την έκφραση και την ενεργοποίηση της συνθάσης του ενδοθηλιακού μονοξειδίου του αζώτου (eNOS) [167,177]. Η ενεργοποίηση αυτή επιτυγχάνεται μέσω της πρόσδεσης της HDL στον υποδοχέα της SR-B1, η οποία ακολούθως ενεργοποιεί το μονοπάτι σηματοδότησης PI3K/Akt, οδηγώντας τελικά στην φωσφορυλίωση της συνθάσης eNOS [178]. Επίσης, αυτή η ενεργοποίηση μεσολαβείται και μέσω της σύνδεσης της S1P που μεταφέρεται με την HDL στον υποδοχέα του S1P3 (Sphingosine-1- Phosphate receptor 3) [179**Σφάλμα!**

Το αρχείο προέλευσης της αναφοράς δεν βρέθηκε.]. Καθώς η S1P απαντάται κυρίως στα μικρά και πυκνά HDL3 σωματίδια [179] , φαίνεται ότι αυτός ο υποπληθυσμός HDL μπορεί να είναι πιο σημαντικός και για την εξαρτώμενη από την HDL αγγειοδιαστολή καθώς και την αγγειογένεση και τη λειτουργία ενδοθηλιακού φραγμού, και προστασία κατά της αθηροσκλήρωσης και της βλάβης από ισχαιμίας [21,181].

#### **3.1.4 Αντιθρομβωτικές ιδιότητες**

Το γεγονός ότι η συσσώρευση αιμοπεταλίων είναι αντίστροφα σχετιζόμενη με τα επίπεδα της HDL, υποδηλώνει ότι η HDL έχει αντι-αιμοπεταλιακή δράση. Αρκετές μελέτες υποστηρίζουν την ιδέα ότι τα σωματίδια HDL είναι πιθανοί αναστολείς της ενεργοποίησης και της συσσώρευσης αιμοπεταλίων. Οι αντιθρομβωτικές ιδιότητες της HDL οφείλονται στην αναστολή της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων και στην αναστολή της παραγόντων που προάγουν την πήξη του αίματος όπως ο παράγοντας πήξης X, VIII, V [182,183]. Η χορήγηση ανασυσταμένης HDL (rHDL) σε ανθρώπους ή έγχυση της αποA-I Μιλάνο (αποA-I C173R) σε αρουραίους ανέστειλε την συσσώρευση αιμοπεταλίων, υποστηρίζοντας επιπλέον την υπόθεση ότι η HDL αναστέλλει την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων *in vivo*. Σε ένα μοντέλο αρουραίου με οξεία αρτηριακή θρόμβωση, η έγχυση της αποA-I Μιλάνο είχε σαν αποτέλεσμα επιμήκυνση του χρόνου σχηματισμού του θρόμβου και μείωση του βάρους του θρόμβου υποδηλώνοντας ότι η HDL αναστέλλει τον σχηματισμό του θρόμβου *in vivo* [21].

#### **3.1.5 Αντιοξειδωτικές ιδιότητες**

Η HDL ασκεί τις αντιοξειδωτικές της ικανότητες μέσω μιας πληθώρας μηχανισμών. Η απομάκρυνση των οξειδωμένων LDL από τον υπο-ενδοθηλιακό χώρο αποτελεί το πρώτο βασικό βήμα στη μεσολαβούμενη από την HDL προστασία από την οξειδωτική καταστροφή. Τα λιπιδικά υπεροξειδία που σχηματίζονται στις LDL, μεταναστεύουν στην επιφάνειά τους ως αποτέλεσμα της μεγαλύτερης υδροφιλικότητάς τους. Έτσι, διευκολύνεται η μεταφορά τους στα HDL σωματίδια. Αυτή η μεταφορά μπορεί να συμβεί είτε απευθείας μεταξύ των λιποπρωτεϊνών μέσω της φωσφορικής στιβάδας ή να

επιτευχθεί μέσω πρωτεϊνών μεταφοράς λιπιδίων (CETP, PLTP) [184]. Η HDL φαίνεται ότι παρέχει ένα μονοπάτι για τη μετάβαση των λιπιδικών υπεροξειδίων και των λυσοφωσφολιπιδίων στο ήπαρ μέσω των ηπατικών υποδοχέων-εκκαθαριστών. Στην πραγματικότητα, η HDL μεταβολίζει τα λιπιδικά υπεροξειδία εμποδίζοντας τη συσσώρευσή τους και κατ' επέκτασιν εμποδίζουν την αθηρογόνο τροποποίηση των LDL [185].

Σε πειράματα που πραγματοποιήθηκαν *in vitro*, όταν επώαστηκαν συγχρόνως η LDL και η HDL σε οξειδωτικές συνθήκες παρατηρήθηκε μείωση στη συσσώρευση λιπιδικών υπεροξειδίων στα LDL σωματίδια από την HDL χωρίς όμως παράλληλη αύξηση της σύστασης των λιπιδικών υπεροξειδίων στην HDL [186]. Η αναστολή της οξείδωσης από την HDL μπορεί να διαρκέσει ώρες γεγονός που υποδηλώνει ότι η δράση αυτή δεν προέρχεται από τη δράση αλυσιδωτών αντιοξειδωτικών αλλά είναι κυρίως λόγω ενζυμικής δραστηριότητας [187]. Μόλις ενσωματωθούν στις HDL, τα οξειδωμένα λιπίδια μπορούν να εξουδετερωθούν από διάφορα ένζυμα που διαθέτει το σωματίδιο της HDL (PON1, PAF-AH, LCAT, CETP) ή και μέσω των απολιποπρωτεϊνών τους όπως για παράδειγμα της apoA-I, η οποία διαθέτει κατάλοιπα μεθειονίνης και μπορεί να δράσει ως αντιοξειδωτικό [188]. Οι μικροί και πυκνοί υποπληθυσμοί HDL3 είναι πιο αποτελεσματικοί από τους μεγαλύτερους και ελαφρύτερους HDL2 στο να συγκεντρώνουν και να απενεργοποιούν αυτά τα οξειδωμένα λιπίδια. Αυτό ίσως οφείλεται στη μειωμένη περιεκτικότητα σε σφιγγομυελίνη και ελεύθερη χοληστερόλης στους HDL3 υποπληθυσμούς [191] γεγονός που οδηγεί σε αυξημένη ρευστότητα της λιπιδικής μονοστιβάδας, διευκολύνοντας έτσι την ενσωμάτωση οξειδωμένων λιπιδίων εξωγενούς προέλευσης όπως αυτά που προέρχονται από τις οξειδωμένες LDL [192]. **Σφάλμα! Το αρχείο προέλευσης της αναφοράς δεν βρέθηκε.** Επίσης, η υδρόλυση οξειδωμένων φωσφολιπιδίων βραχείας-αλυσίδας από υδρολυτικά ένζυμα σχετιζόμενα με την HDL εμφανίζεται περισσότερο ενισχυμένη στις μικρές, πυκνές HDL3 [189]. Πράγματι, μικρά, πυκνά σωματίδια HDL3 είναι επίσης περισσότερο ανθεκτικά σε οξειδωτική τροποποίηση σε σύγκριση με τα μεγάλα, ελαφρύτερα HDL2 [190]. Παρακάτω αναλύονται τα συστατικά της HDL λιποπρωτεΐνης καθένα ένα ξεχωριστά για τον τρόπο που συνεισφέρουν στην αντιοξειδωτική ικανότητα της HDL.

- **Η apoA-I** είναι η κύρια απολιποπρωτεΐνη της HDL η οποία συντίθεται κυρίως από το ήπαρ και το λεπτό έντερο. Εκτός από απαραίτητο συστατικό

για τη δομή της HDL και την ενεργοποίηση ενζύμων που σχετίζονται με την HDL όπως η PON1 και η LCAT [196], εμπλέκεται στην ικανότητα της HDL να εξουδετερώνει οξειδωτικές ουσίες κυρίως, ελεύθερες ρίζες. Πράγματι, τα κατάλοιπα μεθειονίνης, Met που βρίσκονται στις θέσεις 112 και 148 της αποA-I μπορούν να ανάγουν τα λιπιδικά υπεροξειδία ( LOOH ) σε υδροξειδία λιπιδίων (LOH) με οξείδωση των ομάδωνθειόλης τους, τερματίζοντας έτσι τις αλυσιδωτές αντιδράσεις υπεροξειδωσής λιπιδίων [194,195]. Πρόσφατα στοιχεία υποδεικνύουν ότι το κατάλοιπο τυροσίνης, Tyr στη θέση 115 εμπλέκεται επίσης σε μια τέτοια αντίδραση οξειδοαναγωγής [197]. Επιπλέον, πειραματικά έχει δειχθεί ότι η φτωχή λιπιδίων αποA-I μπορεί να απομακρύνει μόρια LOOH από τις LDL λιποπρωτεΐνες [198]. Πράγματι, ανασυσταμένη HDL ( rHDL) που περιέχει μόνο αποA-I και φωσφολιπίδια, παρουσιάζει παρόμοια ικανότητα να αναστέλλει την οξείδωση της LDL σε σύγκριση με τα φυσικά, μικρά, πυκνά HDL3b και 3c σωματίδια [193]. Συνεπώς φαίνεται πως η οξειδοαναγωγική κατάσταση των καταλοίπων Met της αποA-I αντιπροσωπεύει έναν καθοριστικό παράγοντα της αντιοξειδωτικής ικανότητας της HDL, που ακολουθείται από την μεταφορά των LOOH στα σωματίδια HDL.

• **H LCAT** είναι ένα ένζυμο με δράση υδρολάσης το οποίο σχετίζεται με τη λιποπρωτεΐνη HDL. [199,200]. Διαθέτοντας τη δραστικότητα της φωσφολιπάσης A2 (PLA2), η LCAT μπορεί επίσης να υδρολύσει οξειδωμένες ακυλ-αλυσίδες φωσφατιδυλοχολινών (OxPL), παράγοντας τη λιγότερο βιοενεργή λυσοφωσφατιδυλοχολίνη (lysoPC) [201] και οξειδωμένα ελεύθερα λιπαρά οξέα, τα οποία μπορούν εν συνεχεία να χρησιμοποιηθούν από την LCAT για να εστεροποιήσει τη διακυλογλυκερόλη, παράγοντας με αυτόν τον τρόπο τριγλυκερίδια εκτός από τον σχηματισμό εστέρων χοληστερόλης [202]. Επιπλέον, η LCAT μπορεί να λειτουργήσει ως αλυσιδωτός αντιοξειδωτικός παράγοντας μέσω των καταλοίπων κυστεΐνης Cys στις θέσεις 31 και 184 [203]. Υπάρχουν στοιχεία ότι οι μεταλλάξεις στην LCAT μπορεί να μειώσουν την αντιοξειδωτική ικανότητα της HDL . Ωστόσο, αυτές οι μεταλλάξεις δεν συσχετίστηκαν με αυξημένες συγκεντρώσεις των προϊόντων λιπιδικής υπεροξειδωσής στο πλάσμα [204]. Επιπλέον, αναστολή της δράσης LCAT δεν επηρέασε την ικανότητα της HDL να εξουδετερώνει υδροϋπεροξειδία λιπιδίων προερχόμενα από LDL [193**Σφάλμα! Το αρχείο προέλευσης της αναφοράς δεν βρέθηκε.**].

• **H CETP** είναι μια πρωτεΐνη πλάσματος που εκκρίνεται κυρίως από το ήπαρ και το λιπώδη ιστό. Στο πλάσμα, μεσολαβεί στην ανταλλαγή των εστέρων χοληστερόλης και των τριγλυκεριδίων μεταξύ λιποπρωτεϊνών που περιέχουν απο-B ( VLDL, LDL ) και HDL [207]. Διάφορες μελέτες έχουν δείξει ότι η CETP μπορεί να διευκολύνει τη διέλευση τόσο των φωσφολιπιδίων όσο και των υδροϋπεροξειδίων των εστέρων χοληστερόλης από την LDL σε σωματίδια HDL [205,206]. Ως συμπέρασμα, οι Hines και οι συνεργάτες του [208] έδειξαν ότι η προσθήκη της CETP στην HDL αυξάνει την ικανότητά της να αναστέλλει την οξειδωση της LDL.

• **H PLTP** είναι μια άλλη πρωτεΐνη μεταφοράς λιπιδίων που εμπλέκεται στην αναδιαμόρφωση των σωματιδίων HDL. Μεσολαβεί στη μεταφορά των φωσφολιπιδίων από πλούσιες σε τριγλυκερίδια λιποπρωτεΐνες προς τις HDL καθώς και ανταλλαγή φωσφολιπιδίων μεταξύ των υποπληθυσμών HDL [209]. Έχει αναφερθεί ότι η PLTP μπορεί να συμβάλει στην αντιοξειδωτική δραστηριότητα της HDL, αν και δεν έχουν αποκαλυφθεί συγκεκριμένοι μηχανισμοί [210].

• **Το αμυλοειδές A του ορού** (Serum Amyloid A,SAA) είναι μια οικογένεια πρωτεϊνών που εκκρίνονται από το ήπαρ και κυκλοφορούν κατά κύριο λόγο στην HDL [211]. Τρεις από τις ισομορφές SAA (SAA 1, SAA 2 και SAA 3) εκφράζονται κατά τη διάρκεια της οξείας φάσης της φλεγμονής [212] και η τέταρτη ισομορφή (SAA 4) εκφράζεται συστηματικά [213]. Προηγούμενες μελέτες βρήκαν θετική συσχέτιση μεταξύ της συγκέντρωσης SAA 4 και της αντιοξειδωτικής δραστηριότητας της HDL [210]. Επιπλέον, πρόσφατες μελέτες αποκάλυψαν ότι ανασυσταμένα σωματίδια rHDL στα οποία περιέχονταν SAA εμφάνισαν μεγαλύτερη ικανότητα να αναστέλλουν την οξειδωση LDL σε σύγκριση με την φυσική HDL [214,215]. Πράγματι, τα σωματίδια HDL που απομονώνονται από άτομα που παρουσιάζουν υψηλά επίπεδα SAA στην κυκλοφορία έδειξαν ισχυρή αντιοξειδωτική δράση [214]. Είναι αξιοσημείωτο σε αυτή την θεωρία ότι η μη δεσμευμένη SAA μπορεί να δεσμεύει λιπιδικά υδροϋπεροξειδία, με έναν τρόπο παρόμοιο με την απο A-I, αν και σε μικρότερο βαθμό [215].

• **Η ακετυλοϋδρολάση του παράγοντα ενεργοποίησης αιμοπεταλίων, PAF-AH** (Platelet Activating Factor Acetylhydrolase) ,είναι ένα ακόμα ένζυμο με δράση υδρολάσης που περιέχεται στην HDL, που μπορεί να υδρολύει οξειδωμένα φωσφολιπίδια βραχείας αλυσίδας. Ωστόσο, δεν είναι δραστικό ενάντια στα μακράς αλυσίδας μη οξειδωμένα

φωσφολιπίδια [218]. Τα μακροφάγα αντιπροσωπεύουν τη σημαντικότερη πηγή αυτού του ενζύμου [219]. Το ένζυμο PAF-AH κυκλοφορεί στο πλάσμα πάνω στα σωματίδια LDL και HDL, με την πλειονότητα να είναι συνδεδεμένο στη μικρή, πυκνή LDL και στη λιποπρωτεΐνη (α) Lp(a) [220]. Αρκετές μελέτες δείχνουν ότι το ένζυμο PAF-AH είναι η κύρια υδρολάση οξειδωμένων φωσφολιπιδίων (oxPL) των σωματιδίων HDL [216,217], υπονοώντας ότι το μικρό κλάσμα αυτού του ενζύμου που μεταφέρεται με τις HDL, παρουσιάζει αντιαθηρογόνες ιδιότητες [221-223]. Περαιτέρω, η PAF-AH είναι ικανή να υδρολύει oxPLs εντός των οξειδωμένων LDL. Στην περίπτωση αυτή μεταφέρονται υδροϋπεροξειδία ελεύθερων λιπαρών οξέων στις HDL για μετέπειτα αναγωγή σε αντίστοιχα υδροξειδία με τη βοήθεια της apoA-I [224]. Αξίζει να σημειωθεί ότι λόγω της επικάλυψης του υποστρώματος, η δραστηριότητα της PAF-AH είναι δύσκολο να διαχωριστεί από αυτή της PON1 [225]. Παρ'όλα αυτά, όπως αναφέρθηκε παραπάνω, η πλειοψηφία της PAF-AH μεταφέρεται από την LDL, όπου η δραστηριότητά της αντιπροσωπεύει ανεξάρτητο κίνδυνο παράγοντα στεφανιαίας νόσου. Μηχανισμοί στους οποίους βασίζεται αυτή η συσχέτιση μπορεί να περιλαμβάνει απελευθέρωση λυσοφωσφολιπιδίων από τη σχετιζόμενη με την LDL, PAF-AH στον υποενδοθηλιακό χώρο όπου γίνονται επιβλαβή για τα κύτταρα και τις μεμβράνες [226].

• **Η σελενοπεροξειδάση 3 της γλουταθειόνης (GSPX3)**, επίσης γνωστή ως υπεροξειδάση γλουταθειόνης 3, είναι ένα άλλο αντιοξειδωτικό ένζυμο που συνδέεται με την HDL [227]. Εκκρίνεται κυρίως από το νεφρό [228] και, όπως όλα τα GPX ένζυμα, προστατεύει τα βιομόρια από οξειδωτική βλάβη καταλύοντας την αναγωγή του υπεροξειδίου του υδρογόνου, των υπεροξειδίων λιπιδίων και των οργανικών υδροπεροξειδίων, σε μια αντίδραση που εξαρτάται από τη διαθεσιμότητα της ανηγμένης γλουταθειόνης [229].

• **Η PON1** είναι μία γλυκοπρωτεΐνη με ενζυμική δράση η οποία κυκλοφορεί στο αίμα αποκλειστικά συνδεδεμένη με την HDL. Εκκρίνεται κυρίως από το ήπαρ, αν και τοπικά συντίθεται σε αρκετούς ιστούς [239,240]. Υπάρχει πλήθος αποδείξεων που υποστηρίζει το ρόλο του ενζύμου στην αθηροσκλήρωση, προπαντός ενάντια στην οξείδωση και κυρίως την ικανότητα του να υδρολύει λιπιδικά υπεροξειδία. Το ένζυμο PON1 είναι ικανό να υδρολύει μια ευρεία ποικιλία υποστρωμάτων όπως οι λακτόνες, τα γλυκουρονιδικά φάρμακα, οι θειολακτόνες, οι αρυλεστέρες, τα κυκλικά ανθρακικά άλατα και τα οργανοφωσφορικά [232,233]. Το όνομα του



προέρχεται από την ικανότητά του να υδρολύει το παρασιτοκτόνο παραοξόν [234]. Έχει δειχθεί επίσης, πως η PON1 αυξάνει την εκροή χοληστερόλης από τα μακροφάγα προάγοντας την πρόσδεση της HDL επαγόμενη από τον ABCA1 [248]. Η δράση της PON1 μπορεί έμμεσα να μειώσει την προφλεγμονώδη σηματοδότηση στα κύτταρα *in vivo* και να συνεισφέρει στις αντι-αθηρογόνες ιδιότητες της PON1 [249,250]. Η δραστηριότητα της PON1 προς ορισμένα υποστρώματα, συμπεριλαμβανομένης της παραοξόνας, επηρεάζεται από γενετικούς πολυμορφισμούς, με τον καλύτερα μελετημένο να είναι ο πολυμορφισμός R192Q [235]. Παραδοσιακά, θεωρείται ότι η κύρια λειτουργία αυτού του ενζύμου είναι η υδρόλυση των οξειδωμένων φωσφολιπιδίων (oxPLs) [251]. Αυτή η δραστηριότητα περιλαμβάνει την υδρόλυση oxPL με βάση τη φωσφατιδυλοχολίνη και παραγωγή της βιοδραστικής λυσοφωσφατιδυλοχολίνης [232]. Επιπλέον, αρκετές μελέτες έχουν καταδείξει διάφορα στοιχεία που συνδέουν την PON1 με την αθηροσκλήρωση. Σε *in vitro* πειράματα αποδείχθηκε αρχικά ότι το κλάσμα HDL που περιέχει PON1 ήταν εξαιρετικά αποτελεσματικό στην πρόληψη της συσσώρευσης υπεροξειδικών λιπιδίων στις LDL [252,253]. Ζωικά μοντέλα έχουν καταδείξει περαιτέρω στοιχεία για τον αντιοξειδωτικό ρόλο του PON1. Knockout ποντίκια, στα οποία απουσιάζει το ένζυμο PON1, παρουσίασαν εξασθενημένη αντιοξειδωτική δραστηριότητα των HDL, σε συνδυασμό με αυξημένη ευαισθησία στη δηλητηρίαση από οργανοφωσφορικά και στην αθηροσκλήρωση [236,237]. Σύμφωνα με αυτό το εύρημα, τα ποντίκια που υπερεκφράζουν την ανθρώπινη PON1 παρουσίασαν μειωμένη παραγωγή δραστικών μορφών οξυγόνου και μειωμένο σχηματισμό αφρωδών κυττάρων [238]. Διάφορες επιδημιολογικές μελέτες έχουν αναφέρει μια ανάστροφη σχέση μεταξύ της ενεργότητας της PON1 στον ορό και των στεφανιαίων επεισοδίων [239,240]. Όσον αφορά τα γενετικά στοιχεία, η PON1 εμφανίζει αρκετούς πολυμορφισμούς. Ο πολυμορφισμός R192Q έχει ουσιαστική επίδραση στην ικανότητα της PON1 να υδρολύει το παραοξόν. Οι ομοζυγώτες και οι ετεροζυγώτες για το R αλληλίο είναι πιο ανθεκτικοί στο παραθείο σε σύγκριση με τους QQ ομοζυγώτες [254]. Η HDL που απομονώθηκε από τους 192QQ βρέθηκε ότι είναι πιο αποτελεσματική στην προστασία ενάντια στην οξείδωση των LDL, υπονοώντας ότι οι ομόζυγοι 192QQ εμφανίζουν HDL που έχουν αυξημένη αντιοξειδωτική δράση [241,242]. Παρ' όλα αυτά, άλλες μελέτες αμφισβήτησαν τη συνάφεια της PON1 ως αντιοξειδωτικού ενζύμου, καθώς απέτυχε να υδρολύσει oxPLs σε αρκετά *in vitro* πειράματα [243-245].

Επιπλέον, η PON1 είναι ασθενώς δραστική προς LOOH [246]. Επιπλέον, οι Khersonsky και οι συνεργάτες του πρότειναν ότι οι λακτόνες και όχι τα oxPLs συνιστούν φυσιολογικά υποστρώματα του PON1 [233]. Μια ενδιαφέρουσα δυνατότητα απορρέει από το πρόσφατο έργο των Huang et al.,(2013) που προτείνουν ότι η PON1 μπορεί να αποτελέσει ένα τριτογενές σύμπλεγμα με την HDL και τη μυελοϋπεροξειδάση (MPO ) που μπορεί να ρυθμίζει τη δραστηριότητα του τελευταίου [247].

• **Η MPO** είναι ένζυμο της φυσικής ανοσίας και συμμετέχει στην οξειδωση των λιπιδίων. Τα κυτταρικά συστήματα που συμβάλλουν στο οξειδωτικό στρες in vivo περιλαμβάνουν την MPO, την οξειδάση NADPH, και την λιποξυγενάση [255]. Τα τελευταία χρόνια έχει προταθεί ότι το ένζυμο MPO το οποίο προάγει την οξειδωση και η PON1 που έχει αντιοξειδωτική δράση, σχηματίζουν ένα τριμερές σύμπλεγμα με την HDL, όπου οι αντίθετες δραστηριότητες των MPO και PON1 καθορίζουν την οξειδωτική του κατάσταση και καθορίζουν αν η HDL είναι προ-ή αντι-φλεγμονώδης / αθηρογόνος παράγοντας [247]. Μάλιστα, ο λόγος μεταξύ των ενεργοτήτων των ενζύμων έχει επίσης προταθεί ως δείκτης της λειτουργικότητας της HDL και της πρόβλεψης στεφανιαίου κινδύνου [256].

### **3.2 Απώλεια λειτουργικότητας της HDL σε παθολογικές καταστάσεις**

Παραδοσιακά, σε μεγάλο πλήθος ερευνών , τα μειωμένα επίπεδα HDL-C στο πλάσμα έχουν συσχετισθεί με αυξημένο κίνδυνο για στεφανιαία νοσήματα [257]. Σύμφωνα με αυτή την παρατήρηση, πολλές παρεμβάσεις για τη βελτίωση των επιπέδων της HDL-C θεωρείτο πιθανή θεραπευτική στρατηγική για την μείωση του καρδιαγγειακού κινδύνου. Παρά τις ισχυρές ενδείξεις για τις αθηροπροστατευτικές ιδιότητες της HDL, πολλές κλινικές μελέτες έχουν αποτύχει να μειώσουν τον καρδιαγγειακό κίνδυνο αυξάνοντας τα επίπεδα της HDL-C στο αίμα με κατάλληλη φαρμακευτική αγωγή σε ασθενείς ΣΝ. Για παράδειγμα, στην έρευνα ILIUMINATE (Investigation of Lipid Level Management to Understand its Impact in Atherosclerotic Events) στην οποία εξεταζόταν η επίδραση του αναστολέα του CETP torcetrapib ,στα κλινικά αποτελέσματα φάνηκε αυξημένος κίνδυνος θνητότητας και νοσηρότητας σε ασθενείς υψηλού κινδύνου για στεφανιαία συμβάματα παρά την ουσιαστική αύξηση των επιπέδων της HDL-C [263]. Παρόμοια ήταν και τα αποτελέσματα ενός άλλου CETP αναστολέα, του dalcetrapib [264].

Οι παραπάνω παρατηρήσεις μετατόπισαν το ενδιαφέρον ως προς τη βελτίωση της λειτουργικότητας της HDL καθότι έχει δειχθεί πως η λειτουργικότητα της HDL επηρεάζεται σε πολλές παθολογικές καταστάσεις λόγω έντονων μεταβολών στη σύνθεση λιπιδίων και πρωτεϊνών και στη λειτουργικότητα των ενζύμων [265,266]. Οι αντιφλεγμονώδεις, αντιοξειδωτικές, και εν γένει οι αθηροπροστατευτικές ιδιότητες της HDL ενδέχεται να επηρεαστούν σε συστημικές συνθήκες όπως για παράδειγμα, στον ερυθρηματώδη λύκο και στην ρευματοειδή αρθρίτιδα, στο μεταβολικό σύνδρομο, στον σακχαρώδη διαβήτη, στην χρόνια νεφρική ανεπάρκεια, ή στη στεφανιαία νόσο [258-262].

Υπάρχουν ισχυρές ενδείξεις ότι σε συνθήκες φλεγμονής όπως αυτές που συνοδεύουν τις παραπάνω καταστάσεις, αναστέλλεται σε σημαντικό βαθμό η ικανότητα της HDL για την ανάστροφη μεταφορά χοληστερόλης (RCT). Σε καταστάσεις φλεγμονής εμφανίζεται αυξημένη de novo σύνθεση λιπαρών οξέων και τριγλυκεριδίων (TG) ενώ παράλληλα ελαττώνεται η δραστηριότητα της LPL με συνέπεια τα αυξημένα επίπεδα VLDL και TG [266,267]. Το ένζυμο CETP το οποίο είναι υπεύθυνο για τη μεταφορά εστέρων χοληστερόλης από τις HDL προς τις λιποπρωτεΐνες πλούσιες σε TG και τη μεταφορά TG προς την αντίθετη κατεύθυνση βρίσκει πλούσιο υπόστρωμα δράσης εντείνοντας τη διαδικασία ετεροανταλλαγής εστέρων χοληστερόλης με TG μεταξύ HDL και VLDL [268]. Άμεση συνέπεια της παραπάνω διαδικασίας είναι η μεταβολή στη λιπιδική σύσταση της HDL, με διαταραγμένη την αναλογία εστέρες χοληστερόλης/τριγλυκερίδια [266]. Ο εμπλουτισμός της HDL σε τριγλυκερίδια οδηγεί σε δομική αστάθεια και αποικοδομείται μέσω υδρόλυσης της ηπατικής λιπάσης, ενώ αδυνατεί να αλληλεπιδράσει με τον υποδοχέα του ήπατος SR-BI μειώνοντας έτσι την συμμετοχή της HDL στο μονοπάτι RCT [269,270]. Επιπρόσθετα, το φλεγμονώδες περιβάλλον προκαλεί μείωση της δραστηριότητας του ενζύμου LCAT, μειώνοντας την εστεροποίηση χοληστερόλης με αποτέλεσμα την παραμονή κυρίως ελεύθερης χοληστερόλης στα HDL σωματίδια. Μειώνεται έτσι η βαθμίδωση συγκέντρωσης της ελεύθερης χοληστερόλης, που είναι αναγκαία για τη συνέχιση της διαδικασίας πρόσληψης νέας ποσότητας ελεύθερης χοληστερόλης από τους ιστούς [271]. Επιπλέον, έχει δειχθεί ότι η MPO τροποποιεί την apoA-I, πιθανώς οξειδώνοντας την στα κατάλοιπα μεθειονίνης, τυροσίνης ή τρυπτοφάνης [272,273]. Αυτές οι μεταβολές οδηγούν

σε σημαντική ελάττωση τόσο της αποΑ-I εξαρτώμενης εκροής χοληστερόλης διαμέσου του μεταφορέα ABCA1, όσο και της εκροής ελεύθερης χοληστερόλης μέσω κυτταρικής διάχυσης, εξαιτίας των μειωμένων επιπέδων της αποΑ-I και του LCAT που διαμεσολαμβάνουν αντίστοιχα τις παραπάνω οδούς μεταφοράς της κυτταρικής χοληστερόλης προς το προ-β-σωματίδια. Συνεπώς, στη μειωμένη δραστικότητα για RCT συμβάλλουν και τα χαμηλά επίπεδα της HDL-C τα οποία σε συνδυασμό με τα αυξημένα επίπεδα TG αποτελούν την πιο τυπική διαταραχή λιπιδίων σε καταστάσεις φλεγμονής/λοίμωξης [269,266,267].

Η παρουσία οξειδωτικού stress που συνοδεύει τη φλεγμονή προκαλεί γενικά δυσλειτουργία των HDL καθώς εμφανίζονται να έχουν μειωμένη αντιοξειδωτική ικανότητα. Κατά την απόκριση οξείας φάσης τρεις δείκτες είναι γνωστοί που αλληλεπιδρούν με τις λιποπρωτεΐνες, η C αντιδρώσα πρωτεΐνη (CRP), το αμυλοειδές A του ορού (SAA) και η χαλκοπλασμίνη. Ενώ η CRP αλληλεπιδρά με λιποπρωτεΐνες που περιέχουν την αποB, η SAA και η χαλκοπλασμίνη συνδέονται με την HDL [267]. Η SAA και η χαλκοπλασμίνη σε υψηλή συγκέντρωση δεσμεύονται στην HDL και εκτοπίζουν την αποΑ-I. Παράλληλα, κατά τη διάρκεια της φλεγμονής η σύνθεση της αποΑ-I μειώνεται και αυτό έχει σαν αποτέλεσμα να μειώνεται και η δραστικότητα της PON1, καθότι η δραστικότητα και η σταθερότητα του ενζύμου εξαρτάται από την ποσότητα και τη σύσταση της HDL που με τη σειρά της εξαρτάται από την αποΑ-I. Η HDL οξείας φάσης απενεργοποιεί την PON1 που περιέχει και αναστέλλει την έκφραση του γονιδίου της στο ήπαρ. Επίσης, άλλα αντιοξειδωτικά ένζυμα της HDL όπως η PAF-AH και η LCAT γίνονται δυσλειτουργικά ή μειώνονται κατά την διάρκεια της φλεγμονής. Έτσι η τροποποιημένη HDL σε μια φλεγμονώδη απόκριση χάνει την ικανότητα της να προστατεύσει τις LDL από την οξείδωση [274].

Από τις παραπάνω παρατηρήσεις συνάγεται ότι η σχέση HDL-C και καρδιαγγειακής νόσου είναι περισσότερο περίπλοκη από ότι είχε εκτιμηθεί αρχικά και πώς η απλή αύξηση των επιπέδων HDL-C δεν συνεπάγεται πάντα καρδιαγγειακό όφελος. Συνεπώς οι φαρμακευτικές παρεμβάσεις θα πρέπει να στοχεύουν εκτός της αύξηση των επιπέδων της HDL-C στην ταυτόχρονη βελτίωση της λειτουργικότητας της HDL, αποκαθιστώντας τη φυσιολογία του μεταβολισμού της και επαναφέροντας τις αθηροπροστατευτικές της ιδιότητες.

## **ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

### Σκοπός της εργασίας

#### 4.1 Σκοπός της εργασίας

Επιδημιολογικές και κλινικές μελέτες έχουν δείξει ότι τα μειωμένα επίπεδα της HDL χοληστερόλης (HDL-C) στο πλάσμα σχετίζονται με αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης καρδιαγγειακής νόσου, συμπεριλαμβανομένων των ισχαιμικών εγκεφαλικών επεισοδίων. Τα ισχαιμικά αγγειακά εγκεφαλικά αποτελούν την τρίτη αιτία θανάτου και την πρώτη αιτία μακροχρόνιας αναπηρίας στις αναπτυγμένες χώρες. Τα στοιχεία που υποδεικνύουν ότι τα ελαττωμένα επίπεδα HDL-C σχετίζονται με βαρύτερα ισχαιμικά αγγειακά εγκεφαλικά επεισόδια και με χειρότερη ενδονοσοκομειακή και μακροχρόνια πρόγνωση, δηλαδή σοβαρότερη αναπηρία και αυξημένη θνητότητα, είναι αρκετά περιορισμένα. Παράλληλα, μελέτες σε ανθρώπους και σε ζωικά μοντέλα έδειξαν ότι οι αθηροπροστατευτικές ιδιότητες της HDL αποδίδονται κατά κύριο λόγο στην ποιότητα της HDL, παρά στην ποσότητα της HDL-C και ότι τα υψηλά επίπεδα HDL-C πρέπει να συνοδεύονται από την ύπαρξη λειτουργικής HDL. Πολύ σημαντική αθηροπροστατευτική λειτουργία της HDL είναι η απομάκρυνση της περίσσειας χοληστερόλης από τα μακροφάγα των αθηρωματικών πλακών. Επιπλέον, η HDL έχει αντιοξειδωτικές, αντιφλεγμονώδεις και αντιθρομβωτικές ιδιότητες και προστατεύει την ακεραιότητα των ενδοθηλιακών κυττάρων των αγγείων του αίματος. Ωστόσο, δεν υπάρχουν μελέτες που να εκτίμησαν την επίδραση της λειτουργικότητας της HDL στην βαρύτητα του οξέος ισχαιμικού αγγειακού εγκεφαλικού επεισοδίου και στην ενδονοσοκομειακή και μακροπρόθεσμη λειτουργική έκβαση και θνητότητα αυτών των ασθενών. Στόχος της παρούσας εργασίας είναι η εκτίμηση της συσχέτισης της λειτουργικότητας της HDL με: α) τη βαρύτητα του οξέος ισχαιμικού αγγειακού εγκεφαλικού επεισοδίου κατά την εισαγωγή στο νοσοκομείο, β) τη λειτουργική έκβαση κατά την έξοδο από το νοσοκομείο και την ενδονοσοκομειακή θνητότητα και γ) τη λειτουργική έκβαση και καρδιαγγειακή νοσηρότητα και θνησιμότητα ένα έτος μετά την έξοδο των ασθενών με οξύ ισχαιμικό αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο από το νοσοκομείο.

Για να προσεγγίσουμε τον σκοπό της εργασίας μας προσδιορίστηκε σε ασθενείς με οξύ ισχαιμικό αγγειακό επεισόδιο

1) η ικανότητα της HDL να απενεργοποιεί οξειδωμένα φωσφολιπίδια στην LDL( δοκιμασία DCF).

2) η δραστηριότητα του αντιοξειδωτικού ενζύμου σχετιζόμενου με την HDL,PON1.

3) η συγκέντρωση του ενζύμου οξείδωσης σχετιζόμενου με την HDL,MPO.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

### Υλικά και μέθοδοι

#### 5.1 Απομόνωση HDL από τον ορό αίματος [275]

##### 5.1.1 Αντιδραστήρια-υλικά, όργανα

- Ορός αίματος ασθενών διαγνωσμένοι με οξύ ισχαιμικό εγκεφαλικό επεισόδιο
- Θειϊκή δεξτράνη ,20 g/L, pH 7 (Sigma). Διατηρείται στους 4°C
- Χλωριούχο Μαγνήσιο ( $MgCl_2$ ), 1 mol/L, pH 7 (Sigma). Διατηρείται στους 4°C,
- HCl, 12 M (AppliChem),
- NaOH 10N (AppliChem).
- Ενεργό αντιδραστήριο: Ίσοι όγκοι διαλυμάτων θειϊκής δεξτράνης και  $MgCl_2$  αναμιγνύονται για να φτιαχτεί ένα διάλυμα με συγκέντρωση θειϊκής δεξτράνης 10 g/L και  $MgCl_2$  500 mmol/L. Αυτό το αντιδραστήριο όταν προστεθεί στα δείγματα δίνει τελική συγκέντρωση θειϊκής δεξτράνης 0,9 g/L και  $MgCl_2$  45 mmol/L].
- ψυχόμενη μικροφυγόκεντρος (Biofuge Fresco, Heraus).

##### 5.1.2 Αρχή της μεθόδου

Οι μηχανισμοί της καθίζησης λιποπρωτεϊνών από πολυανιόντα και δισθενή κατιόντα δεν έχουν διευκρινιστεί με μεγάλη ακρίβεια. Παρόλα αυτά, η αλληλεπίδραση μεταξύ των αρνητικά φορτισμένων ομάδων των πολυανιόντων και των θετικά φορτισμένων ομάδων των πρωτεϊνικών τμημάτων στις λιποπρωτεΐνες είναι πιθανότατα πολύ σημαντική. Επίσης, τα δισθενή ιόντα μετάλλων αλληλεπιδρούν με αρνητικά φορτισμένες ομάδες (πχ. φωσφολιπιδίων) που βρίσκονται πάνω στις λιποπρωτεΐνες ευνοώντας το σχηματισμό αδιάλυτων συμπλόκων. Οι μεγαλύτερες και πλούσιες σε λιπίδια λιποπρωτεΐνες, VLDL και LDL, σχηματίζουν αδιάλυτα σύμπλοκα πιο γρήγορα σε σχέση με τις μικρότερες και πλουσιότερες σε πρωτεΐνη HDL. Τα αδιάλυτα σύμπλοκα καταβυθίζονται στη συνέχεια με φυγοκέντρηση χαμηλής ταχύτητας, υπό την προϋπόθεση ότι η πυκνότητα τους είναι αρκετά μεγαλύτερη από εκείνη του διαλύματος. Παρουσία υψηλών συγκεντρώσεων λιποπρωτεϊνών πλούσιες σε τριγλυκερίδια , τα αδιάλυτα σύμπλοκα ίσως να παραμένουν αιωρούμενα στο διάλυμα ή να επιπλέουν στην επιφάνεια. Από την άλλη μεριά, άλλες πρωτεΐνες του πλάσματος πιθανόν συγκαταβυθίζονται με τις



λιποπρωτεΐνες, ως εκ τούτου αυξάνεται η πυκνότητα των αδιάλυτων συμπλόκων και διευκολύνεται η καθίζηση ακόμα και σε δείγματα με υψηλή συγκέντρωση τριγλυκεριδίων. Η χοληστερόλη που απομένει στο υπερκείμενο διάλυμα μπορεί να θεωρηθεί ότι αντιπροσωπεύει την HDL, εφόσον η καθίζηση των LDL/VLDL είναι πλήρης και δεν έχει καταβυθιστεί HDL.

### **5.1.3 Πειραματική διαδικασία**

Τα δείγματα και τα αντιδραστήρια αφήνονται εκτός ψυγείου πριν τη χρήση τους ώστε να αποκτήσουν θερμοκρασία δωματίου. Ποσότητα δείγματος αναμιγνύεται με το ενεργό αντιδραστήριο σε αναλογία όγκου 10:1. Το μείγμα αναμιγνύεται ισχυρά (vortex) και αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου για 10 min. Στη συνέχεια το μείγμα φυγοκεντρείται σε ψυχόμενη μικροφυγόκεντρο στους 4°C, για 40 min, στα 1300 rpm. Το υπερκείμενο απομακρύνεται και φυλάσσεται σε νέο σωληνάριο. Σε περίπτωση που το δείγμα περιέχει μεγάλη συγκέντρωση τριγλυκεριδίων, πιθανών η καταβύθιση να μην είναι πλήρης και τα αδιάλυτα σύμπλοκα είτε να αιωρούνται στο υπερκείμενο, είτε να επιπλέουν στην επιφάνεια. Σε αυτή την περίπτωση, προστίθενται στο σωληνάριο, χωρίς προηγουμένως να έχει γίνει διαχωρισμός του θολού υπερκείμενου από το ίζημα, NaCl 0.15 mmol/L σε ποσότητα ίση με τον αρχικό όγκο του δείγματος που χρησιμοποιήθηκε συν ενεργό αντιδραστήριο σε ποσότητα ίση με αυτήν που είχε προστεθεί αρχικά και τα δείγματα οδηγούνται ξανά για φυγοκέντρηση υπό τις ίδιες συνθήκες. Σε αυτά τα δείγματα λαμβάνεται υπόψη η επιπλέον αραίωση, εκ τούτου η συγκέντρωση των λιπιδίων HDL που απομονώθηκαν πολλαπλασιάζεται x2 .

## **5.2 Απομόνωση LDL από ορό αίματος**

### **5.2.1 Αντιδραστήρια-υλικά, όργανα**

- Ορός αίματος υγιών ατόμων
- Βρωμιούχο κάλιο (KBr, Sigma)
- Ψυχόμενη υπερφυγόκεντρος (L8-20 M, Beckman)
- Κεφαλή υπερφυγόκεντρος (50.2 Ti)
- Σωληνάρια υπερφυγόκεντρος
- Πιπέτες παστέρ
- PBS 1x (Lonza, Whittaker)

### 5.2.2 Αρχή της μεθόδου

Ο διαχωρισμός των λιποπρωτεϊνών γίνεται με βάση το μέγεθος και την πυκνότητά τους που καθορίζεται από την επίπλευση τους σε διαβάθμιση διαλύματος KBr μετά από υπερφυγοκέντρωση.

### 5.2.3 Πειραματική διαδικασία

Μετρείται η ποσότητα του ορού αίματος που έχουμε στη διάθεση μας. Προσθέτουμε στον ορό ποσότητα KBr σύμφωνα με τον τύπο  $1 \times (\rho - 1) / (1 - 0,298 \times \rho) = g \text{ KBr/mL ορού}$ , όπου  $\rho$  είναι η πυκνότητα την οποία πρέπει να έχει ο ορός, δηλαδή,  $\rho = 1,063 \text{ g/mL}$ , ώστε να παραμείνουν κάτω οι HDL λιποπρωτεΐνες και να επιπλεύσουν όλες οι υπόλοιπες με πυκνότητα μικρότερη του  $1,063 \text{ g/mL}$  (VLDL, IDL, LDL). Στη συνέχεια, ακολουθεί υπερφυγοκέντρωση στους  $5^\circ\text{C}$ , για 29 h στις 35.000 rpm. Μετά από αυτό το στάδιο συλλέγεται το υπερκείμενο προσεκτικά με πιπέτες παστέρ και μετράται ο όγκος του. Στο υπερκείμενο που συλλέξαμε προσθέτουμε PBS σε ποσότητα σύμφωνα με την ακόλουθη εξίσωση:  $V_{\text{PBS}} = V_{\text{υπερκείμ.}} \times (1,063 - \rho) / (\rho - 1)$  όπου  $\rho = 1,019 \text{ g/mL}$  ώστε να καταβυθιστούν οι LDL και να επιπλεύσουν όλες οι λιποπρωτεΐνες με πυκνότητα μικρότερη από  $1,019 \text{ g/mL}$ , δηλαδή οι VLDL και IDL. Κατόπιν, ακολουθεί υπερφυγοκέντρωση στους  $5^\circ\text{C}$ , για 29 h στις 35.000 rpm. Μετά από την υπερφυγοκέντρωση απομακρύνεται το υπερκείμενο αφήνοντας το ίζημα των LDL και 1-2 mL ανά σωλήνα. Το ίζημα των LDL τοποθετείται για 2 h περίπου στους  $4^\circ\text{C}$  για να επαναδιαλυτοποιηθεί. Στο τέλος, γίνεται διαπύδιση του δείγματος σε 1 L διαλύματος PBS στους  $4^\circ\text{C}$ , με χρήση μεμβράνης διαπίδυσης με διάμετρο πόρων που επιτρέπουν την έξοδο μορίων μοριακής μάζας μικρότερη των 12-14 kDa. Με αυτό τον τρόπο απομακρύνεται το KBr. Το διάλυμα διαπίδυσης αλλάζεται 4 φορές και ο ενδιάμεσος χρόνος είναι τουλάχιστον 4 h.

## 5.3 Προσδιορισμός Ολικής Χοληστερόλης, HDL-C και LDL-C

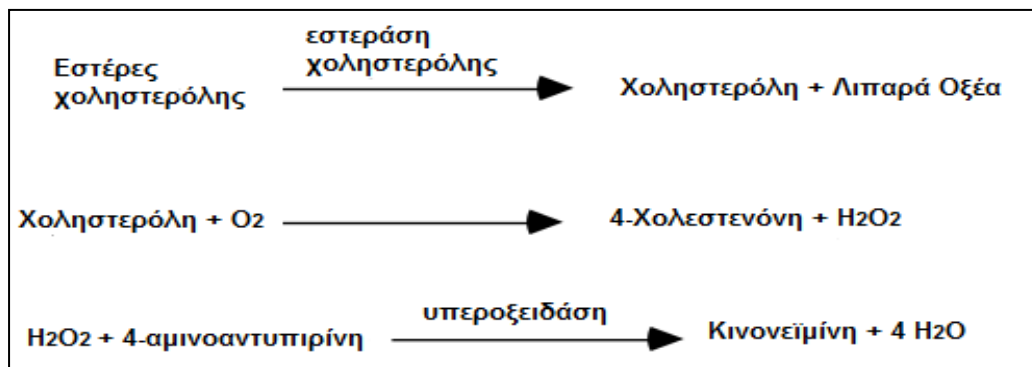
### 5.3.1 Αντιδραστήρια-υλικά, όργανα

- Ορός αίματος ασθενών, απομονωμένη HDL από ορό ασθενών, απομονωμένη LDL από ορό υγιών
- Βαθμονομητής Πρότυπος ορός (Cholesterol Cal, Chemelex) περιεκτικότητας σε χοληστερόλη 200 mg/dL αραιωμένος σε αναλογία 1:4 με PBS 1x

- Αντιδραστήριο μέτρησης χοληστερόλης (Chemelex) : Εστεράσης χοληστερόλης 1000 U/L, Οξειδάση χοληστερόλης 300U/L, Υπεροξειδάση 650 U/L, 4-αμινο-αντιπυρίνη 0,4 mmol/L, φαινόλη 26 mmol/L mmol.L ,PIPES pH 6.9 90 mmol/L
- PBS 1x ( LONZA, Whittaker)
- Πλακίδιο 96 θέσεων (Greiner, Bio-one)
- Μετρητής πλακιδίων φθορισμού-απορρόφησης (TECAN Infinite® M200)

### 5.3.2 Αρχή της μεθόδου

Η μέτρηση της χοληστερόλης βασίζεται σε ενζυμική φωτομετρική μέθοδο. Αρχικά οι εστέρες χοληστερόλης διασπώνται από το ένζυμο εστεράση της χοληστερόλης σε χοληστερόλη και ελεύθερα λιπαρά οξέα. Η ελεύθερη χοληστερόλη που παρήχθησε μαζί με την ελεύθερη που προϋπήρχε οξειδώνεται με τη βοήθεια της οξειδάσης της χοληστερόλης σε χολεστ-4-εν-3-όνη και υπεροξειδίο του υδρογόνου (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Στη συνέχεια, το H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> αντιδρά με την 4-αμινοαντιπυρίνη και παράγεται κινονεΐμίνη, ένα προϊόν με κόκκινο χρώμα του οποίου μετράται η απορρόφηση στα 505 nm. Δίνεται σχηματικά η αντίδραση:



Εικόνα 5.1 Αντιδράσεις κατά τη μέτρηση χοληστερόλης.

### 5.3.3 Πειραματική διαδικασία

Δημιουργείται πρότυπη καμπύλη χρησιμοποιώντας τον πρότυπο ορό βαθμονόμησης με διαδοχικές αραιώσεις με PBS . Οι αραιώσεις φαίνονται στον πίνακα 5.1. Στη συνέχεια, τα πρότυπα δείγματα καθώς και τα προς προσδιορισμό δείγματα αναμιγνύονται καλά με 300 mL χρωμογόνου αντιδραστηρίου. Ακολουθεί επώαση για 10 min σε 37 °C και έπειτα μέτρηση της απορρόφησης στα 505 nm.

**Πίνακας 5.1 Όγκοι που χρησιμοποιήθηκαν από τον βαθμονομητή, τα δείγματα και το PBS για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης και για τη μέτρηση των δειγμάτων.**

<b>ΔΕΙΓΜΑ</b>	<b>PBS 1x</b>
Π1 : 0 $\mu\text{L}$	30 $\mu\text{L}$
Π2 : 1 $\mu\text{L}$	29 $\mu\text{L}$
Π3 : 2 $\mu\text{L}$	28 $\mu\text{L}$
Π4 : 4 $\mu\text{L}$	26 $\mu\text{L}$
Π5 : 6 $\mu\text{L}$	24 $\mu\text{L}$
Π6 : 12 $\mu\text{L}$	18 $\mu\text{L}$
Ορός αίματος: 5 $\mu\text{L}$	25 $\mu\text{L}$
HDL $\mu\text{L}$ : 10 $\mu\text{L}$	20 $\mu\text{L}$
LDL αραιωμένη 1:4 : 10 $\mu\text{L}$	20 $\mu\text{L}$

## **5.4 Προσδιορισμός Τριγλυκεριδίων**

### **5.4.1 Αντιδραστήρια-υλικά, όργανα**

- ορός αίματος ασθενών
- Βαθμονομητής πρότυπος ορός περιεκτικότητας σε τριγλυκερίδια 143 mg/dL (Sentinel Diagnostica)
- Αντιδραστήριο μέτρησης τριγλυκεριδίων (Infinity, Thermo): ATP 2,6 mmol/L, οξικό μαγνήσιο 2,5 mmol/L, 4-αμινοαντιπυρίνη 0,8 mmol/L, 3,5 διχλωρο-2-υδροξυβενζοσουλφονικό οξύ (DHBS) 1 mmol/L, οξειδάση της φωσφογλυκερόλης >3000 mmol/L, κινάση της γλυκερόλης >100 U/L, λιπάση 2000 U/L, υπεροξειδάση >300 U/L, ρυθμιστικό διάλυμα 53 mmol/L, pH  $7 \pm 0,1$  στους 20 °C. Το αντιδραστήριο παρέχεται έτοιμο προς χρήση και διατηρείται στους 4 °C, προστατευμένο από το φως μέχρι την ημερομηνία λήξης του.
- PBS 1x (LONZA, Whittaker)
- Πλακίδιο 96 θέσεων (Greiner Bio-one)
- Μετρητής πλακιδίων φθορισμού-απορρόφησης (TECAN Infinite® M200)

#### 5.4.2 Αρχή της μεθόδου

Τα τριγλυκερίδια του ορού προσδιορίζονται με ενζυματική φωτομετρική μέθοδο, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή ως εξής: Αρχικά, τα τριγλυκερίδια υδρολύονται από τη λιπάση σε ελεύθερα λιπαρά οξέα και γλυκερόλη. Η γλυκερόλη παρούσα ATP φωσφορυλιώνεται από την κινάση της γλυκερόλης (GK) για να παράγει 3 φωσφο-γλυκερόλη και ADP. Στη συνέχεια, η 3 φωσφογλυκερόλη οξειδώνεται από την οξειδάση της φωσφορικής γλυκερόλης (GPO) σε φωσφο-διϋδροξακετόνη παράγοντας  $H_2O_2$ . Τελικά, το  $H_2O_2$  αντιδρά με την 4-αμινοαντιπυτίνη και με το 3,5-διχλωρο-2-υδροξυ-βενζοσουλφονικό οξύ σε μία αντίδραση που καταλύεται από την υπεροξειδάση και σχηματίζει ένα έγχρωμο προϊόν με κόκκινο χρώμα του οποίου η απορρόφηση μετράται στα 505 nm.

#### 5.4.3 Πειραματική διαδικασία

Κατασκευάζεται η πρότυπη καμπύλη με βάση τον πίνακα 5.2 και κατόπιν τα πρότυπα και τα δείγματα ορού ( 5  $\mu$ L δείγματος σε 15 ML PBS) αναμιγνύονται καλά με 300  $\mu$ L χρωμογόνου αντιδραστήριου. Ακολουθεί επώαση στους 37 °C για 5 λεπτά και στη συνέχεια μετράται η απορρόφηση στα 505 nm.

**Πίνακας 5.2 Όγκοι ( $\mu$ L) του βαθμονομητή προτύπου ορού , των δειγμάτων και του PBS που χρησιμοποιήθηκαν για την προσδιορισμό των τριγλυκεριδίων**

<b>ΔΕΙΓΜΑ</b>	<b>PBS 1x</b>
Π1 : 0 $\mu$ L	20 $\mu$ L
Π2 : 2 $\mu$ L	18 $\mu$ L
Π3 : 4 $\mu$ L	16 $\mu$ L
Π4 : 6 $\mu$ L	14 $\mu$ L
Π5 : 12 $\mu$ L	8 $\mu$ L
Π6 : 20 $\mu$ L	0 $\mu$ L
Ορός αίματος: 5 $\mu$ L	15 $\mu$ L

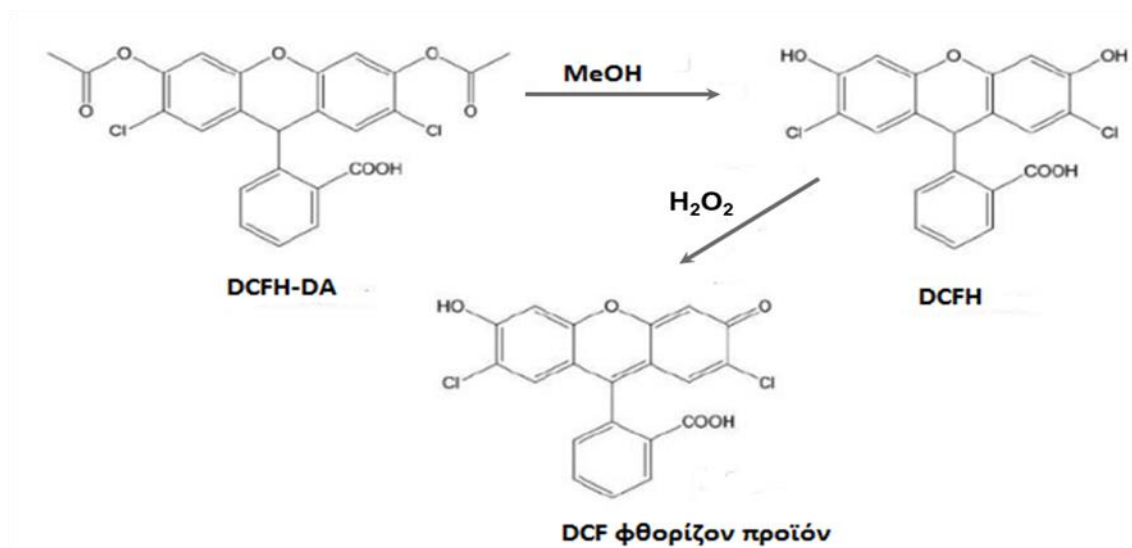
## 5.5 Προσδιορισμός των αντιοξειδωτικών ιδιοτήτων της HDL με τη δοκιμασία μέτρησης 2,7 διχλωροφλουορεσκεΐνης (DCF).[276]

### 5.5.1 Αντιδραστήρια-υλικά, όργανα

- Απομονωμένη HDL από ορό αίματος ασθενών (ενότητα 5.1)
- οξειδωμένη μέσω αέρα ανθρώπινη LDL
- 2,7-διχλωρο-διϋδρο-φλουορεσκεΐνο-διοξικός εστέρας (H<sub>2</sub>DCFDA, Molecular Probes),
- CH<sub>3</sub>OH (Merck, Sigma)
- PBS 1x (LONZA, Whittaker)
- σωλήνες erpendorf
- πλάκα φθορισμού 96 θέσεων (Greiner Bio-one).
- Επωαστήρας (Labtech)
- μετρητής απορρόφησης- φθορισμού (TECAN Infinite® M200)

### 5.5.2 Αρχή της μεθόδου

Οι αντιοξειδωτικές ιδιότητες των HDL μετρώνται *in vitro* με μέθοδο που χρησιμοποιεί 2,7- διχλωροφλουορεσκεΐνη (DCFH). Οι HDL ελέγχονται για την ικανότητά τους να αναστέλλουν την οξείδωση της ανθρώπινης LDL ή να απενεργοποιούν τα ήδη οξειδωμένα λιπίδια της LDL. Η DCFH όταν αλληλεπιδρά με προϊόντα υπεροξειδωσης λιπιδίων που περιέχονται στις LDL σχηματίζει 2,7- διχλωροφλουορεσκεΐνη (DCF), που παράγει έντονο φθορισμό. Η ένταση του φθορισμού που παράγεται μετράται σε φθορισμόμετρο. Οι φυσιολογικές HDL απενεργοποιούν τα οξειδωμένα λιπίδια των LDL εμποδίζοντάς τα να αλληλεπιδράσουν με τη DCFH. Οι αντιοξειδωτικές ιδιότητες των HDL προσδιορίζονται με τη μέτρηση στην αλλαγή της έντασης του φθορισμού από την οξείδωση της DCFH από την LDL παρουσία ή απουσία HDL.



Εικόνα 5.2 Αντίδραση που λαμβάνει χώρα κατά τη δοκιμασία με DCF

### 5.5.3 Πειραματική διαδικασία

Το DCFH-DA διαλύεται σε μεθανόλη σε συγκέντρωση 2 mg/mL με ισχυρή ανάδευση για 2 min. Στη συνέχεια το διάλυμα επωάζεται σε θερμοκρασία δωματίου απουσία φωτός για 20 min, έτσι ώστε να υδρολυθεί ο εστερικός δεσμός και να απελευθερωθεί η DCFH. Στη συνέχεια, μοιράζεται σε σωλήνες τύπου erpendorfs και διαβιβάζεται ρεύμα N<sub>2</sub> για να αποφευχθεί περαιτέρω οξείδωση και φυλάσσεται στους -20°C σε σκοτεινό μέρος. Την ημέρα του πειράματος γίνεται αραιώση 1:10 με PBS (συγκέντρωση 0.2 mg/mL). Σε κάθε μικροφρεάτιο στην πλάκα 96 θέσεων τοποθετείται ποσότητα HDL ασθενούς ώστε η τελική συγκέντρωση να είναι 50 µg/mL χοληστερόλης και ποσότητα LDL ώστε η τελική συγκέντρωση να είναι 100 µg/mL χοληστερόλης. Προσθέτουμε σε κάθε μικροφρεάτιο ποσότητα PBS 1x ώστε σε κάθε ένα ο όγκος να είναι 100 µL. Ως τυφλό χρησιμοποιείται PBS. Κατόπιν η πλάκα επωάζεται στους 37°C, υπό ανακίνηση σε 80 rpm, για 1 h. Κατόπιν, προστίθενται σε κάθε μικροφρεάτιο 10 µL διαλύματος εργασίας DCFH (συγκέντρωση 0.2 mg/mL), αναδεύονται καλά και ακολουθεί επώαση για ακόμα 2 h, στους 37°C, σε 80 rpm ,απουσία φωτός. Μετά από αυτό το διάστημα μετρείται η ένταση φθορισμού που παράγεται σε μετρητή πλακιδίων φθορισμού-απορρόφησης (Διέγερση: 465 nm, Εκπομπή: 535 nm).

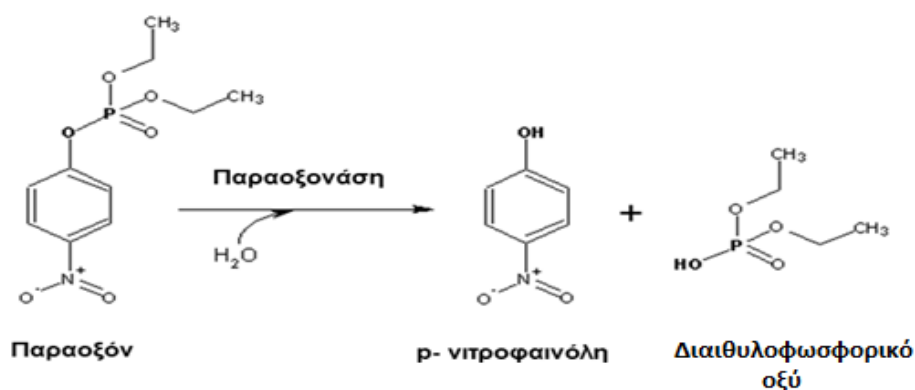
## 5.6 Προσδιορισμός δραστηριότητας παραοξονάσης του ενζύμου PON1 [277]

### 5.6.1 Αντιδραστήρια-υλικά, όργανα

- Απομονωμένη HDL από ορό αίματος ανθρώπου (ενότητα 5.1)
- παραοξόν 4200 mM (Διαιθυλ-π-νιτροφαινυλοφωσφορικό οξύ, Sigma)
- χλωριούχο ασβέστιο ( $\text{CaCl}_2$ , Sigma)
- Tris-HCl (AppliChem)
- ρυθμιστικό διάλυμα μέτρησης δραστηριότητας PON1 έναντι παραοξόν: 100 mM Tris-HCl pH 8.0, 2 mM  $\text{CaCl}_2$ , το διάλυμα φυλάσσεται στους  $4^\circ\text{C}$
- ρυθμιστικό διάλυμα εργασίας παραοξονάσης: το διάλυμα αυτό προκύπτει με την ανάμιξη κατάλληλου όγκου ρυθμιστικού διαλύματος μέτρησης δραστηριότητας PON1 έναντι παραοξόν με αντίστοιχο όγκο παραοξόν ώστε η συγκέντρωση του παραοξόν να είναι 5,97 mM
- πλακίδια 96 θέσεων (Greiner Bio-one)
- μετρητής πλακιδίων απορρόφησης-φθορισμού (TECAN Infinite® M200).

### 5.6.2 Αρχή της μεθόδου

Η ενεργότητα της PON1 προσδιορίζεται έχοντας ως υπόστρωμα το παραοξόν (δραστηριότητα παραοξονάσης). Το παραοξόν μετατρέπεται σε p-νιτροφαινόλη και διαιθυλοφωσφορικό οξύ. Έτσι, βρίσκοντας την ποσότητα της p-νιτροφαινόλης που έχει παραχθεί, έχουμε υπολογίσει και την δραστηριότητα της PON1.



Εικόνα 5.3 Αντίδραση που λαμβάνει χώρα κατά τον προσδιορισμό δραστηριότητας του ενζύμου PON1.



### 5.6.3 Πειραματική διαδικασία

Ο ρυθμός υδρόλυσης του παράδοξων παρακολουθείται κινητικά και προκύπτει από την καταγραφή της αύξησης της απορρόφησης λόγω της παραγωγής p-νιτροφαινόλης στα 405 nm, τους 25°C για 30 κύκλους στο φασματοφωτόμετρο. Ο τελικός όγκος στον οποίο γίνεται η μέτρηση είναι 250 μL τα οποία αποτελούνται από κατάλληλο όγκο δείγματος που αντιστοιχεί σε συγκέντρωση HDL-C 2μg/μικρομικροφρεάτιο και 230 μL ρυθμιστικού διαλύματος εργασίας παραοξονάσης. Ο όγκος σε κάθε μικρομικροφρεάτιο συμπληρώνεται έως τα 250 μL με κατάλληλο όγκο ρυθμιστικού διαλύματος μέτρησης. Ο όγκος του δείγματος μπορεί να μεταβληθεί, ωστόσο ο τελικός όγκος θα πρέπει να παραμένει στα 250 μL. Η τελική συγκέντρωση του παραοξόν στο μίγμα της αντίδρασης είναι 5,5 mM. Στη συνέχεια υπολογίζεται η ποσότητα της p-νιτροφαινόλης που σχηματίστηκε χρησιμοποιώντας τον εξής τύπο:

$$C=A*10^6*d / \epsilon*b$$

Όπου,

C: Η συγκέντρωση της p-νιτροφαινόλης στο διάλυμα U/L

A: Η κλίση της απορρόφησης της αντίδρασης στα 405 nm σε σχέση με το χρόνο

$\epsilon$ : Συντελεστής μοριακής απόσβεσης,  $17000 \text{ (mol/L)}^{-1} \text{ cm}^{-1}$

b: Μήκος οπτικής διαδρομής (cm)

d: Η αραίωση του δείγματος στο τελικό όγκο της αντίδρασης

Η δραστηριότητα της PON1 εκφράζεται σε U/L ορού, ορίζοντας το 1 U ως την δραστηριότητα που καταλύει το σχηματισμό 1 μmol p-νιτροφαινόλης ανά λεπτό.

## 5.7 Ποσοτικός προσδιορισμός της αποΑ-I σε ορό ασθενών

### 5.7.1 Αντιδραστήρια-υλικά, όργανα

- Απομονωμένη HDL από ορό αίματος ανθρώπου (ενότητα 5.1)
- Kit ποσοτικού προσδιορισμού ανθρώπινης αποΑ-I (CHEMELEX) το οποίο περιλαμβάνει: διάλυμα R1(Tris- buffer 20 mmol/L, PEG, pH 8.3 ,NaN<sub>3</sub> 0.95 g/L), αντίσωμα R2 (ορός από αίγα, ανθρώπινο αντίσωμα έναντι της Apo-AI, tris 50 mmol/L, pH 7.5, NaN<sub>3</sub> 0.95 g/L)
- Βαθμονομητής APO-CAL (CHEMELEX) συγκέντρωσης σε αποΑ-I 133mg/dl
- NaCl 9 g/L
- πλακίδια 96 θέσεων (Greiner Bio-one)
- μετρητής πλακιδίων απορρόφησης-φθορισμού (TECAN Infinite® M200)

### 5.7.2 Αρχή της μεθόδου

Η αποΑ-I είναι η κύρια δομική πρωτεΐνη της HDL και αποτελεί περίπου το 70% του συνολικού πρωτεϊνικού τμήματος της. Η αποΑ-I είναι συμπάραγοντας του ενζύμου LCAT ,το οποίο είναι υπεύθυνο για το σχηματισμό των εστέρων χοληστερόλης στο πλάσμα και επίσης παίζει σημαντικό ρόλο στην μεταφορά χοληστερόλης από του περιφερικούς ιστούς στο ήπαρ για την τελική απέκκριση. Η μέτρηση της συγκέντρωσης της αποΑ-I σε ανθρώπινο ορό βασίζεται στη τεχνική της θολωσιμετρίας. Το αντίσωμα της αποΑ-I όταν αναμιχθεί με τα δείγματα που περιέχουν αποΑ-I σχηματίζει αδιάλυτα σύμπλοκα. Αυτά τα αδιάλυτα σύμπλοκα προκαλούν μεταβολή στην απορρόφηση, η οποία μεταβολή εξαρτάται από περιεχόμενη συγκέντρωση της αποΑ-I στο εκάστοτε δείγμα. Η συγκέντρωση της αποΑ-I στα δείγματα μπορεί να ποσοτικοποιηθεί συγκρινόμενα με πρότυπα διαλύματα γνωστής συγκέντρωσης.

### 5.7.3 Πειραματική διαδικασία

Ακολουθήθηκαν οι οδηγίες σύμφωνα με τον κατασκευαστή με τις παρακάτω τροποποιήσεις. Κατασκευάζεται η πρότυπη καμπύλη αναμιγνύοντας ποσότητα από το πρότυπο APO-CAL συγκέντρωσης 133mg/dl με NaCl 9 g/L σύμφωνα με τον πίνακα 5.3

**Πίνακας 5.3 Όγκοι σε (μL) που χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης.**

	1	2	3	4	5	6
<b>APO-CAL(μL)</b>	-	10	25	50	75	100
<b>NaCl 9 g/L9(μL)</b>	100	90	75	50	25	0

Από τα πρότυπα διαλύματα 1-6 καθώς και από τα προς προσδιορισμό δείγματα λαμβάνονται 2 μL και προστίθενται στα φρεάτια στο πλακίδιο 96 θέσεων. Στη συνέχεια σε όλα τα φρεάτια προσθέτουμε 200 μL από το αντιδραστήριο R1 αναμιγνύοντας καλά. Μετράται και καταγράφεται η τιμή της απορρόφησης (A1) στα 342 nm στους 37 °C. Ακολουθεί άμεση προσθήκη 50 μL από το αντίσωμα R2 σε όλα τα φρεάτια ,αναμιγνύοντας καλά. Μετράται και καταγράφεται η δεύτερη τιμή της απορρόφησης (A2) στις ίδιες συνθήκες. Η συγκέντρωση της απο-A-I στα δείγματα υπολογίζεται από την πρότυπη καμπύλη ,όπου η λαμβανόμενη τιμή απορρόφησης είναι η διαφορά των τιμών A2-A1.

## **5.8 Ποσοτικός προσδιορισμός ενζύμου μυελοϋπεροξειδάση, MPO**

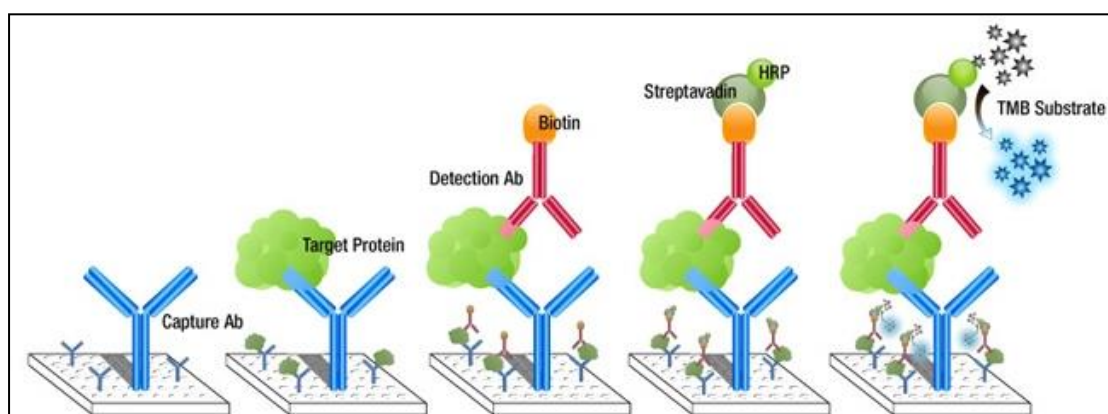
### **5.8.1 Αντιδραστήρια-υλικά, όργανα**

- Απομονωμένη HDL από ορό αίματος ανθρώπου (ενότητα 5.1)
- Kit μέτρησης Human MPO-Instant ELISA (Invitrogen) το οποίο περιλαμβάνει:
  - πλακίδιο με μικρομικροφρεάτια επικαλυμμένα με μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι στην ανθρώπινη MPO, μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι στην ανθρώπινη MPO συζευγμένο με βιοτίνη, στρεπταβιδίνη συζευγμένη με υπεροξειδάση της ραπανίδος και λυοφιλοποιημένο διάλυμα
  - πρότυπα δείγματα γνωστής συγκέντρωσης για την ανθρώπινη MPO

- Ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης φωσφορικών αλάτων με 1% Tween συγκέντρωσης 1x
  - Διαλύτης για τα δείγματα
  - Διάλυμα υποστρώματος (3,3',5,5' τετραμεθυλο-βενζιδίνη, TMB)
  - Διάλυμα τερματισμού αντίδρασης (φωσφορικό οξύ 1M)
  - αυτοκόλλητα φιλμ
- μετρητής πλακιδίων απορρόφησης-φθορισμού (TECAN Infinite® M200)

### 5.8.2 Αρχή της μεθόδου

Το αντίσωμα για την ανθρώπινη MPO είναι προσροφημένο μέσα στα μικροφρεάτια. Η ανθρώπινη MPO που βρίσκεται στα δείγματα προς προσδιορισμό ή στα πρότυπα συνδέεται με το προσροφημένο αντίσωμα. Ένα δεύτερο αντίσωμα για την ανθρώπινη MPO το οποίο είναι συζευγμένο με βιοτίνη δεσμεύεται από το πρώτο αντίσωμα. Η στρεπταβιδίνη ενωμένη με την υπεροξειδάση της ραπανίδος συνδέεται με το αντίσωμα MPO-συζευγμένο με βιοτίνη. Ύστερα από επώαση τα μη συνδεδεμένα αντισώματα-συζευγμένα με βιοτίνη και η στρεπταβιδίνη-υπεροξειδάση της ραπανίδος απομακρύνονται με ένα στάδιο έκπλυσης και προστίθεται το υπόστρωμα για την υπεροξειδάση της ραπανίδος. Σχηματίζεται έγχρωμο προϊόν ανάλογο με την ποσότητα της ανθρώπινης MPO που υπήρχε στα δείγματα. Η αντίδραση τερματίζεται με την προσθήκη οξέος και η απορρόφηση μετράται στα 450 nm.



Εικόνα 5.4 Σχηματική αναπαράσταση ELISA τύπου Sandwich.

### 5.8.3 Πειραματική διαδικασία

Ακολουθήθηκαν οι οδηγίες του κατασκευαστή. Πριν ξεκινήσει η δοκιμασία προετοιμάζονται τα προς ανάλυση δείγματα ως εξής: Αραιώνονται 10  $\mu\text{L}$  από τα δείγματα σε 490  $\mu\text{L}$  διαλύτη. Στα φρεάτια με τα πρότυπα δείγματα συμπεριλαμβανομένου και του τυφλού προστίθενται 150  $\mu\text{L}$  απεσταγμένο νερό. Στα φρεάτια που θα μετρηθούν τα δείγματα ασθενών προστίθενται 100  $\mu\text{L}$  απεσταγμένο νερό και στη συνέχεια προστίθενται 50  $\mu\text{L}$  από τα αραιωμένα δείγματα. Τα φρεάτια καλύπτονται με τις αυτοκόλλητες ταινίες και αφήνεται για επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 3 h. Κατά την περίοδο επώασης συνίσταται ανακίνηση σε 400 rpm. Ύστερα από το διάστημα των 3 h ακολουθεί το στάδιο της έκπλυσης. Αφαιρείται το περιεχόμενο από τα φρεάτια και εκπλένονται επί 4 φορές προσθέτοντας περίπου 400  $\mu\text{L}$  από το ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης. Έπειτα προστίθενται 100  $\mu\text{L}$  από το διάλυμα υποστρώματος (TMB) σε όλα τα φρεάτια και επωάζονται για 10 min απουσία φωτός. Η ανάπτυξη χρώματος διακόπτεται με την άμεση προσθήκη 100  $\mu\text{L}$  από το διάλυμα τερματισμού. Ακολουθεί μέτρηση απορρόφησης στα 450 nm.

### 5.9 Στατιστική Ανάλυση

Η Στατιστική ανάλυση έγινε με τη χρήση του προγράμματος Statistical Package for Social Sciences (SPSS Inc, Chicago, Illinois, version 21) και με το στατιστικό πρόγραμμα GraphPad Prism 6.0 με τα οποία κατασκευάστηκαν οι πίνακες και τα γραφήματα. Πραγματοποιήθηκε έλεγχος κανονικότητας κατανομής των συνεχών μεταβλητών με τη δοκιμασία Kolmogorov-Smirnov test. Για την κάθε παράμετρο εκτιμήθηκαν οι μέσες τιμές με σταθερή τυπική απόκλιση ( $\text{mean} \pm \text{standar deviation}$ ). Οι διαφορές στις παραμέτρους μεταξύ των ασθενών διαφορετικών ομάδων αξιολογήθηκαν με τη δοκιμασία Student (t-test independent samples unpaired t-test) εάν επρόκειτο για παραμέτρους που ακολουθούν την κανονική κατανομή. Για τις μη κανονικές παραμέτρους η σύγκριση των παραμέτρων ανάμεσα στις διαφορετικές ομάδες ασθενών έγινε με τη χρήση του αντίστοιχου ελέγχου U Mann-Whitney. Το επίπεδο της στάθμης εμπιστοσύνης τέθηκε στο 95%, επομένως για μεταβλητές με  $p\text{-value} \leq 0,05$  η διαφορά μεταξύ των 2 ομάδων διερεύνησης θεωρήθηκε στατιστικά σημαντική. Οι συσχετίσεις των παραμέτρων με την HDL-C εκτιμήθηκαν με βάση τον υπολογισμό του συντελεστή Pearson για τις

μεταβλητές με κανονική κατανομή και με βάση τον συντελεστή Spearman για τις μεταβλητές που δεν ακολουθούν κανονική κατανομή. Οι κατηγορικές μεταβλητές εκφράζονται σαν ποσοστό και για τη σύγκρισή τους διενεργήθηκε έλεγχος  $\chi^2$  (Chi-square test) σε πίνακες συνάφειας 2x2. Πραγματοποιήθηκε ανάλυση διωνυμικής λογιστικής παλινδρόμησης (binany logistic regression analysis) για την εύρεση ανεξάρτητων προγνωστικών παραγόντων για την βαρύτητα του ισχαιμικού εγκεφαλικού επεισοδίου καθώς και για την εξάρτηση του ασθενούς μετά το επεισόδιο και την έκβαση 1 έτος μετά το επεισόδιο. Σε όλες τις περιπτώσεις το  $p < 0.05$  θεωρείται στατιστικά σημαντικό.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6

### Αποτελέσματα

#### 6.1 Γενικά χαρακτηριστικά στο συνολικό πλυθησμό της μελέτης

Όπως αναφέρθηκε, στόχος της παρούσας εργασίας είναι η εκτίμηση της συσχέτισης της λειτουργικότητας της HDL με: α) τη βαρύτητα του οξέος ισχαιμικού αγγειακού εγκεφαλικού επεισοδίου κατά την εισαγωγή στο νοσοκομείο, β) τη λειτουργική έκβαση κατά την έξοδο από το νοσοκομείο και την ενδονοσοκομειακή θνητότητα και γ) τη λειτουργική έκβαση και νοσηρότητα και θνησιμότητα ένα έτος μετά την έξοδο των ασθενών με οξύ ισχαιμικό αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο από το νοσοκομείο. Για να προσεγγίσουμε τον σκοπό της εργασίας μας μελετήθηκαν 199 διαδοχικοί ασθενείς που νοσηλεύτηκαν στην Α΄ Προπαιδευτική Παθολογική Κλινική του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης στο Γενικό Νοσοκομείο Θεσσαλονίκης, «ΑΧΕΠΑ» με οξύ ισχαιμικό αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο. Κατά την εισαγωγή τους στο νοσοκομείο καταγράφηκαν για όλους τους ασθενείς τα δημογραφικά χαρακτηριστικά (ηλικία, φύλο), οι καρδιαγγειακοί παράγοντες κινδύνου (υπέρταση, κάπνισμα, σακχαρώδης διαβήτης, κολπική μαρμαρυγή, κατανάλωση αλκοόλ, οικογενειακό ιστορικό καρδιαγγειακής νόσου), τα συνυπάρχοντα καρδιαγγειακά νοσήματα (στεφανιαία νόσος, καρδιακή ανεπάρκεια) και η φαρμακευτική τους αγωγή. Πραγματοποιήθηκε πλήρης κλινική εξέταση με καταγραφή της αρτηριακής πίεσης, των σφίξεων, του σωματικού βάρους, του ύψους και της περιμέτρου μέσης και ισχίων. Επιπλέον, σε όλους τους ασθενείς πραγματοποιήθηκε αιμοληψία κατά τη 2η μέρα νοσηλείας, μετά από νηστείας 12 ωρών και προσδιορίστηκαν τα βιοχημικά χαρακτηριστικά, συγκεκριμένα, η ολική, η LDL και η HDL χοληστερόλη, η γλυκόζη, η κρεατινίνη και το ουρικό οξύ. Τα δείγματα των ασθενών διατηρήθηκαν στους -80 °C για την πραγματοποίηση των μελλοντικών δοκιμασιών εκτίμησης της λειτουργικότητας της HDL. Η βαρύτητα του ισχαιμικού εγκεφαλικού επεισοδίου κατά την εισαγωγή στο νοσοκομείο εκτιμήθηκε σε όλους τους ασθενείς βάσει της National Institutes of Health Stroke Scale (NIHSS), σύμφωνα με την οποία σκορ ίσο ή μεγαλύτερο του 5 ( NIHSS $\geq$ 5) υποδεικνύει βαρύ περιστατικό. Η έκβαση εκτιμήθηκε με τα ποσοστά λειτουργικής εξάρτησης κατά την έξοδο από το νοσοκομείο

(τροποποιημένη κλίμακα Rankin 2-5) και με την ενδονοσοκομειακή θνητότητα. Για την εκτίμηση της λειτουργικότητας της HDL αρχικά απομονώθηκε η HDL από τις υπόλοιπες λιποπρωτεΐνες από τον ορό των ασθενών και στη συνέχεια

- 1) Προσδιορίστηκε η ικανότητα της HDL να απενεργοποιεί οξειδωμένα φωσφολιπίδια στην LDL( δοκιμασία DCF)

- 2) Μετρήθηκε η δραστικότητα του αντιοξειδωτικού ενζύμου PON1 της HDL

- 3) Προσδιορίστηκε η συγκέντρωση του ενζύμου οξείδωσης MPO της HDL

Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται τα δημογραφικά , κλινικά και βιοχημικά χαρακτηριστικά 199 προοδευτικών ασθενών, με μέσο όρο ηλικίας  $78,6 \pm 6,5$  εκ των οποίων το 42,7% είναι αρσενικού φύλου. Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως μέση τιμή  $\pm$  τυπική απόκλιση για τις συνεχείς μεταβλητές και ως ποσοστά για τις κατηγορικές.

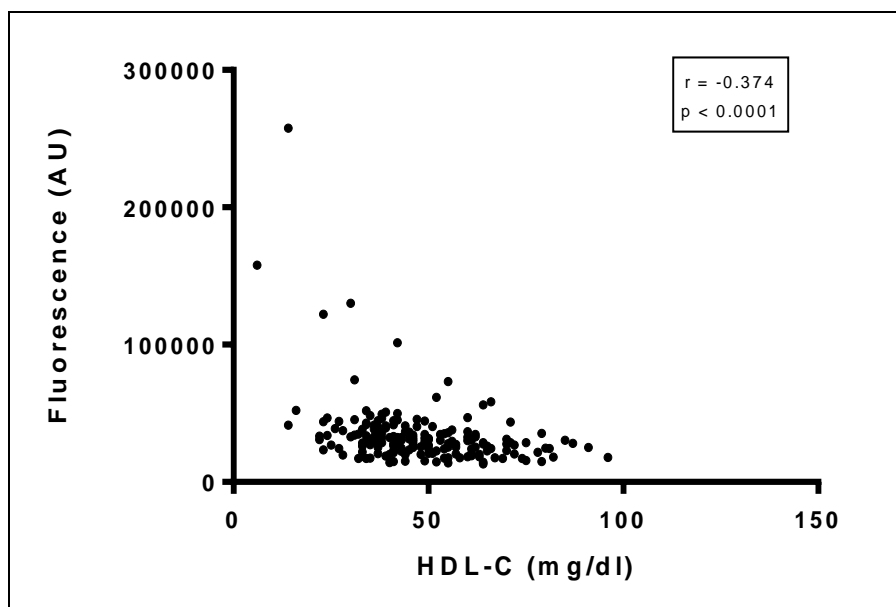


**Πίνακας 6.1 Κλινικά και εργαστηριακά χαρακτηριστικά του πληθυσμού μελέτης με διαγνωσμένο οξύ ισχαιμικό εγκεφαλικό επεισόδιο.** Τα δεδομένα εκφράζονται ως mean± SD για τις συνεχείς μεταβλητές και ως ποσοστό % για τις κατηγορικές μεταβλητές

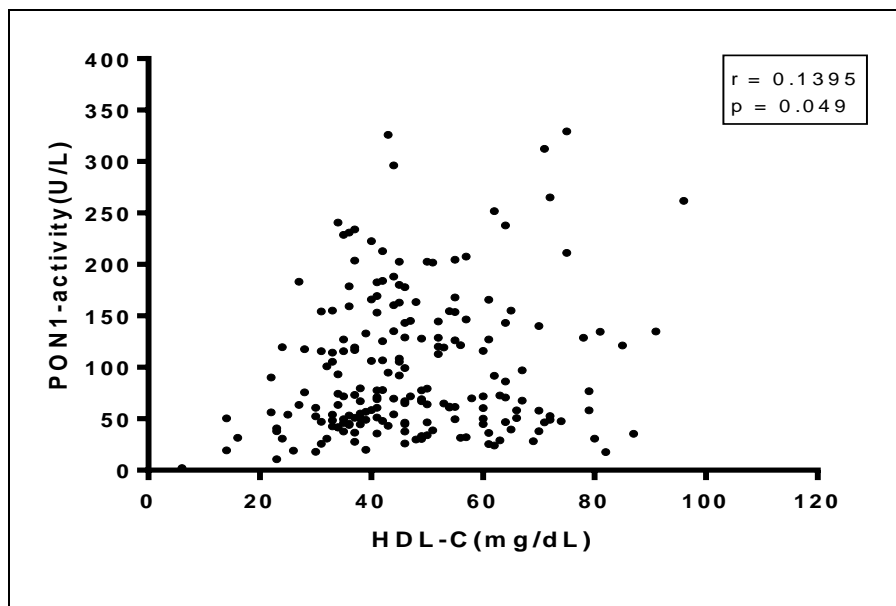
Χαρακτηριστικά	Mean±SD or %
Ηλικία	78.6 ± 6.5 (n=196)
Άντρες ,n (%)	42.7 (n=199)
BMI,(kg/m <sup>2</sup> )	26.9 ± 4.7 (n=122)
Βάρος, kg	74.0 ± 13.1 (n=135)
Παχυσαρκία (%)	13.1 (n=122)
Διαβήτης (%)	31.7 (n=199)
Υπέρταση(%)	85.4 (n=199)
Σφίξεις	77.7 ± 15.3 (n=187)
ΣΑΠ	147.7 ± 26.0 (n=196)
ΔΑΠ	80.6 ± 13.4 (n=196)
Καρδιακή Ανεπ. (%)	18.1 (n=199)
Κολπ.Μαρμαρυγή (%)	37.7 (n=199)
Στεφ.Νόσος (%)	25.1 (n=199)
Οικ.Ιστορικό (%)	15.6 (n=199)
Κάπνισμα (νυν/τεως)	11.1/20.1 (n=199)
Αλκοόλ	1.4 ± 4.1 (n=190)
Γλυκόζη, mg/dL	114.6 ± 41.4 (n=174)
Ολ.Χοληστερόλη,mg/dL	179.6 ± 46.3 (n=199)
HDL-C, mg/dL	47.2 ± 15.7 (n=199)
LDL-C, mg/dL	109.5 ± 40.9 (n=199)
Τριγλυκερίδια, mg/dL	114.2 ± 48.8 (n=199)
ΑποΑ-I mg/dL	140.2 ± 59.7 (n=199)
Ουρικό οξύ,mg/dL	5.8 ± 1.9 (n=175)
EGFR (mL/min/1.73m <sup>2</sup> )	63.1 ± 18.6 (n=183)
NIHSS	8.6 ± 9.4 (n=177)
Rankin score	2.6 ± 2.2 (n=169)

## 6.2 Συσχέτιση της λειτουργικότητας της HDL ως προς τις αντιοξειδωτικές της ιδιότητες και της σύστασής της HDL με τη συγκέντρωση HDL-C σε ασθενείς με ΑΕΕ

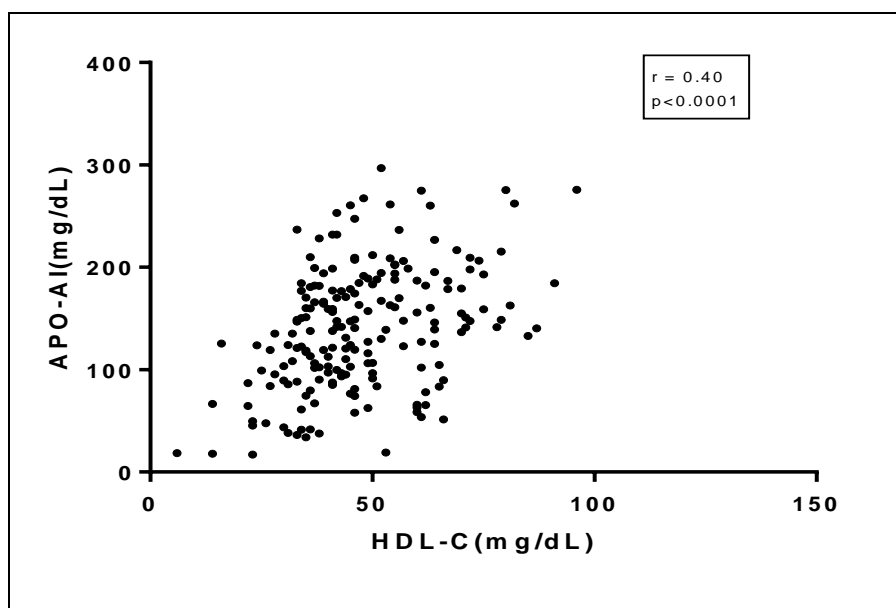
Η συγκέντρωση της HDL-C παρουσίασε ισχυρή αρνητική συσχέτιση με το σήμα φθορισμού που μετρήθηκε κατά τη μέθοδο της διχλωροφλουορεσκεΐνης, DCF ( $r = -0.374$ ,  $p < 0.001$ , Σχημ.6.1) και θετική συσχέτιση με τη δραστικότητα της PON1 της HDL, ( $r = 0.139$ ,  $p = 0.049$ , Σχημ. 6.2). Θετική ήταν επίσης η συσχέτιση της συγκέντρωσης της απολιπρωτεΐνης αποΑ-I με την HDL-C ( $r = 0.4098$ ,  $p < 0.0001$ , Σχημ. 6.3). Μεταξύ της συγκέντρωσης της MPO της HDL και της HDL-C δεν παρουσιάστηκε συσχέτιση ( $r = -0.051$ ,  $p = 0.485$ , Σχημ. 6.4).



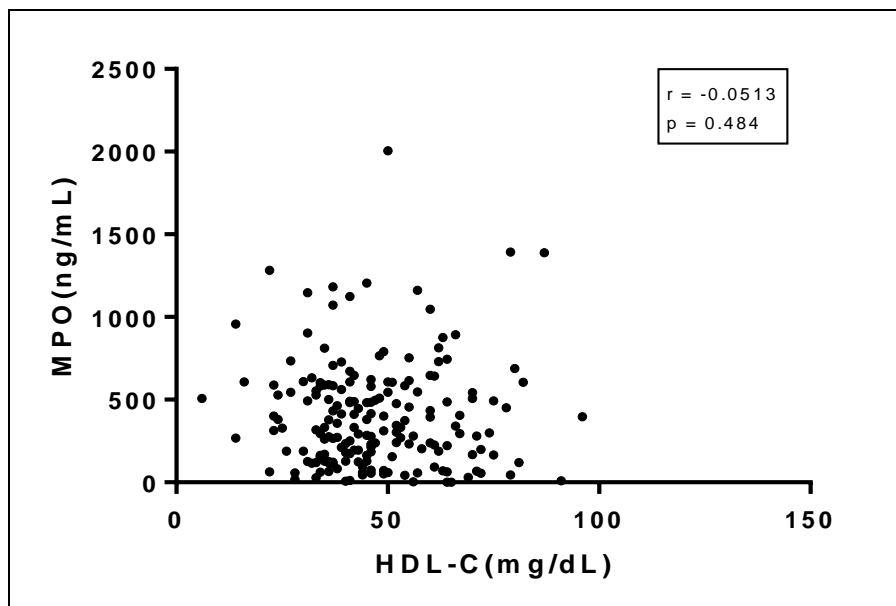
**Σχήμα 6.1** Αρνητική συσχέτιση συγκέντρωσης HDL-C και σήματος φθορισμού στη δοκιμασία DCF. Η συσχέτιση μεταξύ των μεταβλητών εκτιμήθηκε χρησιμοποιώντας το συντελεστή συσχέτισης Spearman's για μη παραμετρικές μεταβλητές.  $p < 0.05$  θεωρήθηκε στατιστικά σημαντικό.



**Σχήμα 6.2** Θετική συσχέτιση συγκέντρωσης HDL-C και δραστικότητας ενζύμου PON1. Η συσχέτιση μεταξύ των μεταβλητών εκτιμήθηκε χρησιμοποιώντας το συντελεστή συσχέτισης Spearman's για μη παραμετρικές μεταβλητές.  $p < 0.05$  θεωρήθηκε στατιστικά σημαντικό.



**Σχήμα 6.3** Θετική συσχέτιση συγκέντρωσης HDL-C και συγκέντρωσης απο-A-I. Η συσχέτιση μεταξύ των μεταβλητών εκτιμήθηκε χρησιμοποιώντας το συντελεστή συσχέτισης Pearson για παραμετρικές μεταβλητές. P-value  $< 0.05$  θεωρήθηκε στατιστικά σημαντικό.



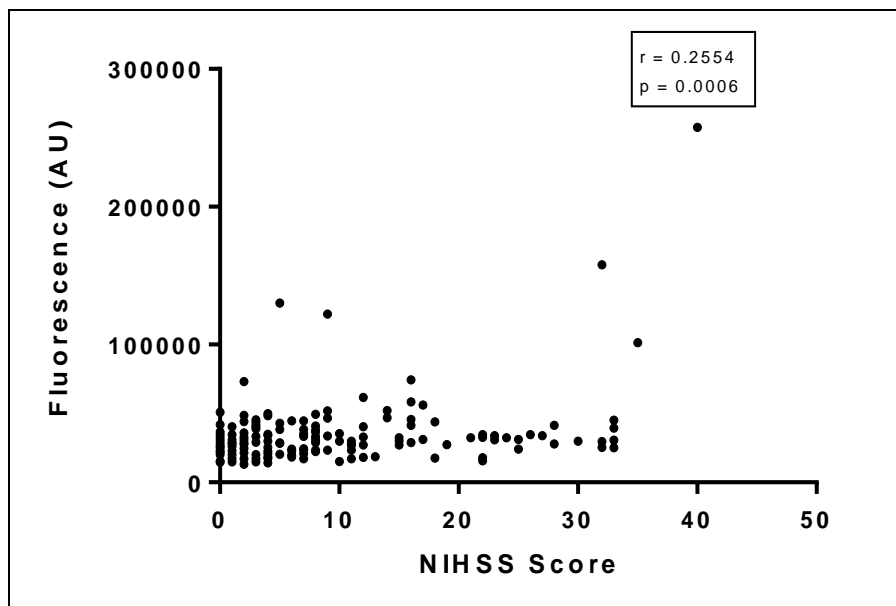
**Σχήμα 6.4** Ανυπαρξία συσχέτισης της συγκέντρωσης HDL-C με τη συγκέντρωση της MPO. Η συσχέτιση μεταξύ των μεταβλητών εκτιμήθηκε χρησιμοποιώντας το συντελεστή συσχέτισης Spearman's για μη παραμετρικές μεταβλητές.  $p < 0.05$  θεωρήθηκε στατιστικά σημαντικό.

### 6.3 Διερεύνηση της λειτουργικότητας της HDL ασθενών με AEE ως προς τις αντιοξειδωτικές της ιδιότητες και η συσχέτισή της με τη βαρύτητα του περιστατικού.

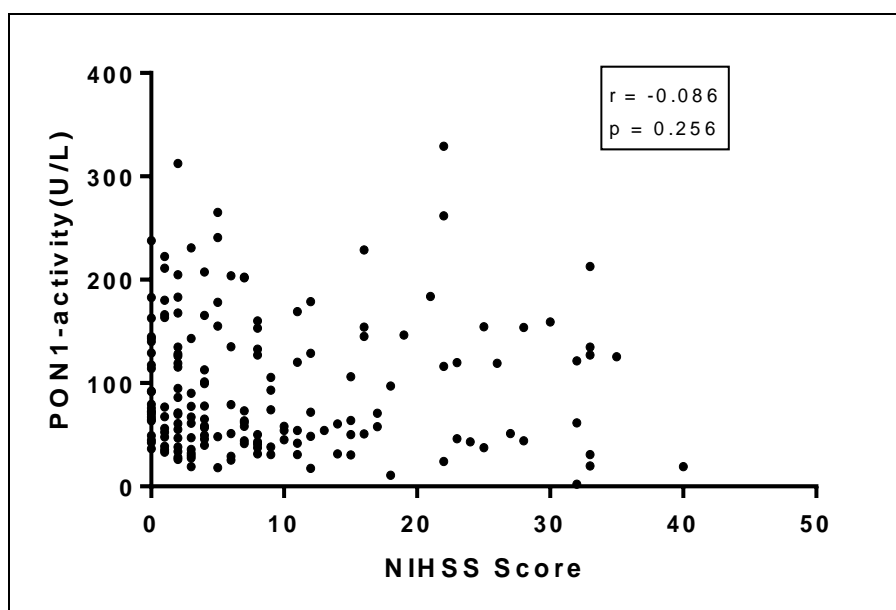
Προκειμένου να διερευνηθεί κατά πόσο οι αντιοξειδωτικές ιδιότητες της HDL συσχετίζονται με τη βαρύτητα του οξέος ισχαιμικού εγκεφαλικού επεισοδίου πραγματοποιήθηκε έλεγχος γραμμικής συσχέτισης για τα αποτελέσματα των μετρήσεων μας με την κλίμακα βαρύτητας του εγκεφαλικού επεισοδίου NIHSS σύμφωνα με την οποία όσοι ασθενείς συγκεντρώνουν σκορ κάτω από 5 κατηγοριοποιούνται ως ελαφρύ περιστατικό ενώ από 5 και άνω ως βαρύ περιστατικό. Σύμφωνα με τη διερεύνησή μας, εντοπίσαμε ότι η κλίμακα NIHSS σχετίστηκε θετικά με το σήμα φθορισμού από τη δοκιμασία DCF, όπου αυξημένο σήμα υποδεικνύει μείωση της ικανότητας της HDL να απενεργοποιεί ή να αναστέλλει την οξείδωση των οξειδωμένων LDL σωματιδίων (ox-LDL), ( $r = -0.2554$ ,  $p = 0.0006$ , Σχημ. 6.5) αλλά δεν εντοπίστηκε συσχέτιση με τη δραστικότητα της PON1 της HDL ( $r = -0.0786$   $p = 0.256$ , Σχημ. 6.6). Η συσχέτιση της συγκέντρωσης MPO της HDL με την κλίμακα NIHSS βρέθηκε θετική ( $r = 0.2412$ ,  $p = 0.0015$ , Σχημ. 6.7). Ακόμα εκτιμήθηκε η συσχέτιση του λόγου MPO/PON1 με την κλίμακα βαρύτητας NIHSS  $r = 0.226$ ,  $p = 0.003$ , Σχημ.6.8) καθότι ο λόγος MPO/PON1 έχει προταθεί τα τελευταία χρόνια ως πιθανός προγνωστικός δείκτης για την δυσλειτουργία της HDL λιποπρωτεΐνης

[256]. Ακολούθως πραγματοποιήθηκε συγκριτική μελέτη μεταξύ των ασθενών που κατηγοριοποιούνται ως βαρύ περιστατικό με βάση την κλίμακα NIHSS ( $\text{NIHSS} \geq 5$ ) και αυτών που κατηγοριοποιούνται ως ελαφρύ ( $\text{NIHSS} < 5$ ). Οι ασθενείς με βαρύ ισχαιμικό εγκεφαλικό επεισόδιο βρέθηκε να έχουν μειωμένη αντιοξειδωτική ικανότητα με βάση το σήμα φθορισμού της δοκιμασίας DCF ( $39044.3 \pm 32552.9$  έναντι  $28422.9 \pm 10361.5$ ,  $p = 0.002$ , Σχημ.6.9). Η δραστηριότητα της PON1 της HDL δε διέφερε σημαντικά μεταξύ των δύο ομάδων ( $93.9 \pm 67.9$  έναντι  $94.6 \pm 60.1$   $p = 0.51$ , Σχημ. 6.10). Στους ασθενείς με βαρύ ισχαιμικό εγκεφαλικό επεισόδιο βρέθηκε επίσης αυξημένη η συγκέντρωση της MPO της HDL σε σχέση με τους ασθενείς με ελαφρύ επεισόδιο ( $455.9 \pm 323.0$  έναντι  $365.6 \pm 304.8$ ,  $p = 0.024$ , Σχημ.6.11).

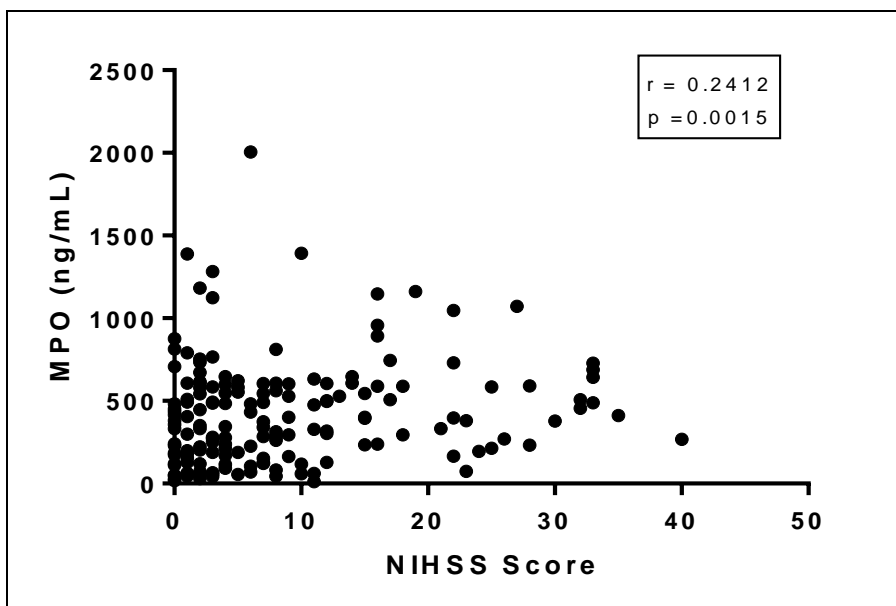
Επιπλέον, στους ασθενείς με βαρύ επεισόδιο ήταν αυξημένος και ο λόγος MPO/PON1 ( $8.23 \pm 9.30$  έναντι  $5.67 \pm 6.66$ ,  $p = 0.035$ , Σχημ.6.11). Επιπρόσθετα, η συγκριτική ανάλυση των κλινικο-εργαστηριακών χαρακτηριστικών των ασθενών κατέδειξε ότι οι ασθενείς που υπέστησαν σοβαρότερο εγκεφαλικό επεισόδιο ήταν πιο συχνά γυναίκες, είχαν υψηλότερα επίπεδα γλυκόζης στο αίμα κατανάλωναν περισσότερο αλκοόλ και είχαν χαμηλότερο ρυθμό σπειραματικής διήθησης (Πίν. 6.2). Σε πολυπαραγοντική ανάλυση, ανεξάρτητοι παράγοντες κινδύνου για τη βαρύτητα του ΑΕΕ ήταν το θήλυ φύλο (σχετικός κίνδυνος (ΣΚ) 2.8, 95% διάστημα εμπιστοσύνης (ΔΕ) 1.37-5.69,  $p=0.005$ ) το σήμα φθορισμού (ΣΚ 1.03, 95% ΔΕ 1.00-1.06,  $p=0.024$ ) και τα επίπεδα γλυκόζης (ΣΚ 1.01, 95% ΔΕ 1.0-1.02,  $p=0.08$ ).



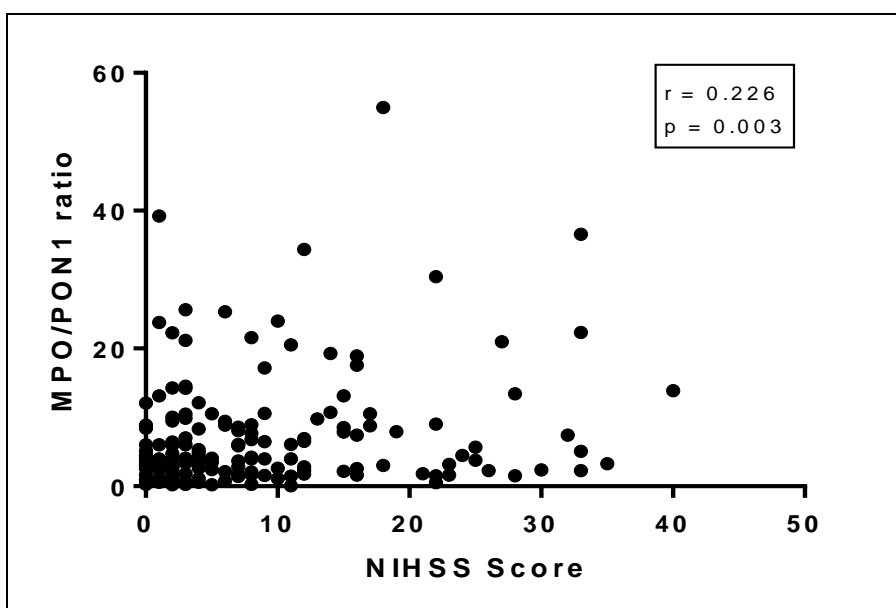
**Σχήμα 6.5** Συσχέτιση αντιοξειδωτικής ικανότητας της HDL με τη μέθοδο της διχλωροφλουορεσκεΐνης, DCF και της κλίμακας NIHSS. Η συσχέτιση μεταξύ των μεταβλητών εκτιμήθηκε χρησιμοποιώντας το συντελεστή συσχέτισης Spearman's για μη παραμετρικές μεταβλητές. P-value <0.05 θεωρήθηκε στατιστικά σημαντικό.



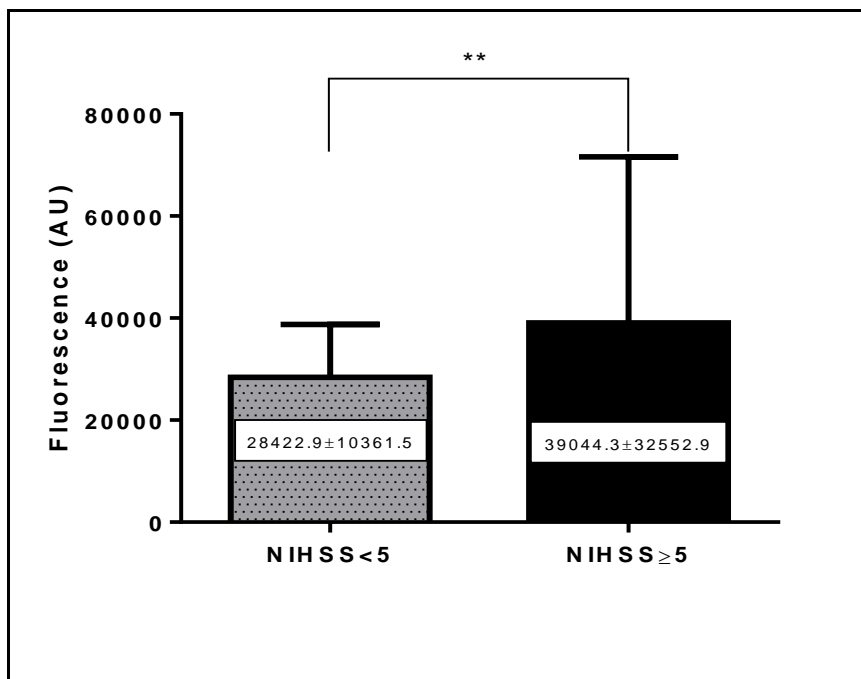
**Σχήμα 6.6** Ανυπαρξία συσχέτιση της δραστηκότητας της σχετιζόμενης με την HDL PON1 και της κλίμακας NIHSS. Η συσχέτιση μεταξύ των μεταβλητών εκτιμήθηκε χρησιμοποιώντας το συντελεστή συσχέτισης Spearman's για μη παραμετρικές μεταβλητές. P-value <0.05 θεωρήθηκε στατιστικά σημαντικό.



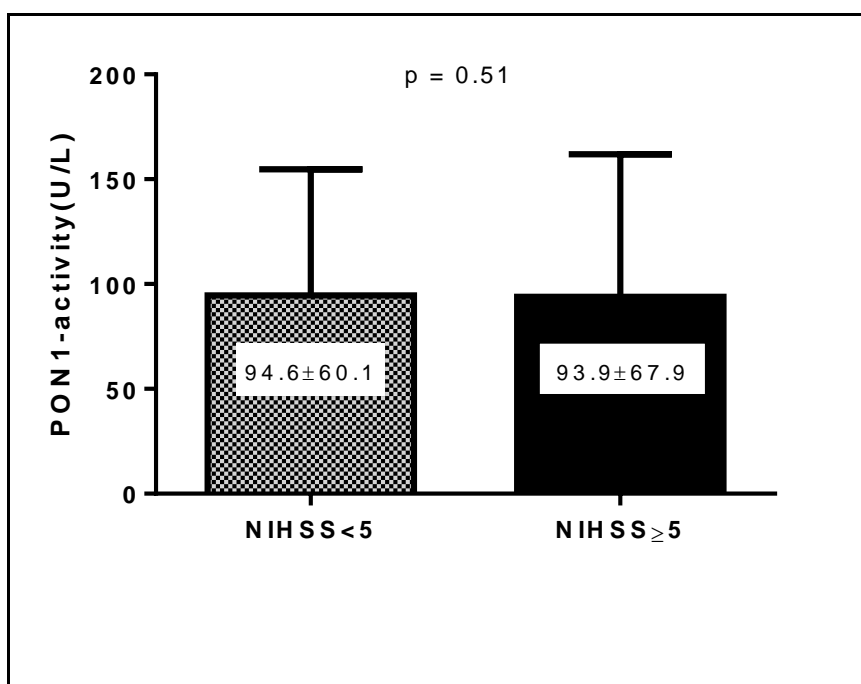
**Σχήμα 6.7** Συσχέτιση της συγκέντρωσης της σχετιζόμενης με την HDL MPO και της κλίμακας NIHSS. Η συσχέτιση μεταξύ των μεταβλητών εκτιμήθηκε χρησιμοποιώντας το συντελεστή συσχέτισης Spearman's για μη παραμετρικές μεταβλητές.  $p < 0.05$  θεωρήθηκε στατιστικά σημαντικό



**Σχήμα 6.8** Συσχέτιση του λόγου MPO/PON1 και της κλίμακας NIHSS. Η συσχέτιση μεταξύ των μεταβλητών εκτιμήθηκε χρησιμοποιώντας το συντελεστή συσχέτισης Spearman's για μη παραμετρικές μεταβλητές.  $p < 0.05$  θεωρήθηκε στατιστικά σημαντικό.

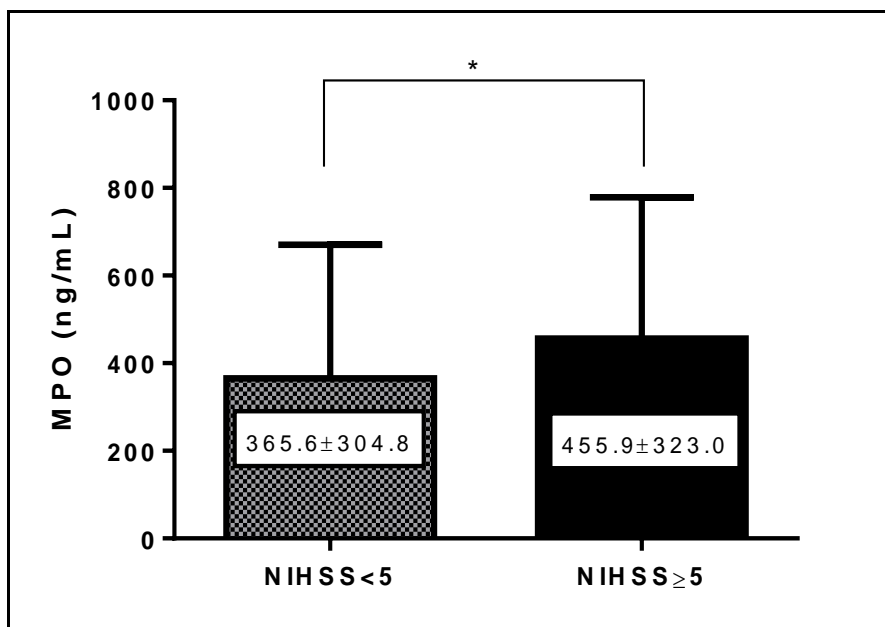


**Σχήμα 6.9** Η αντιοξειδωτική ικανότητα της HDL μέσω της δοκιμασίας DCF σε ασθενείς με βαρύ και με ελαφρύ εγκεφαλικό επεισόδιο. Η στατιστική σύγκριση μεταξύ των δύο ομάδων πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του μη παραμετρικού ελέγχου σημαντικότητας Mann-Whitney U test, \*\* $p < 0.01$ .

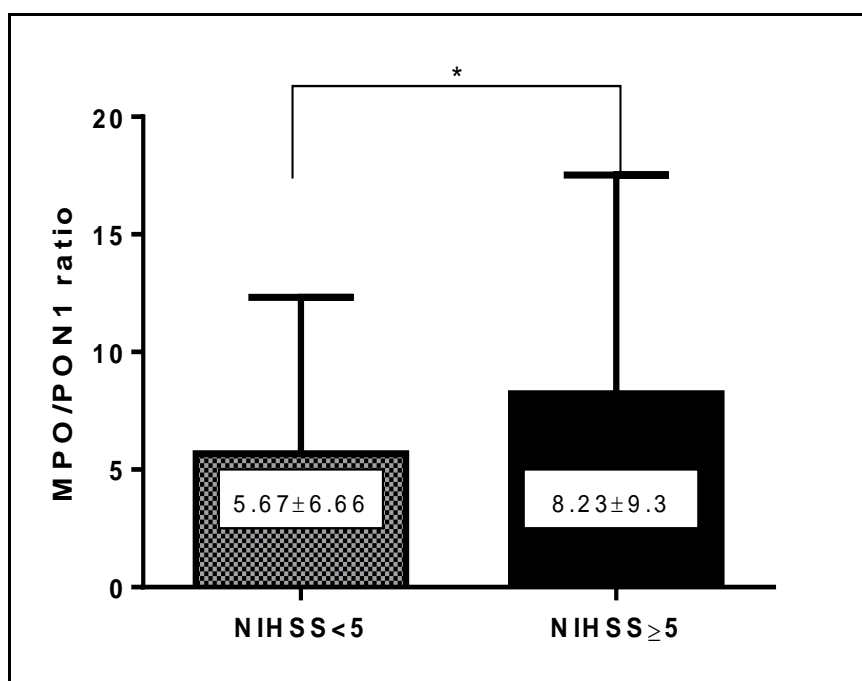


**Σχήμα 6.10** Η δραστηριότητα της σχετιζόμενης με την HDL PON1 σε ασθενείς με βαρύ και με ελαφρύ εγκεφαλικό επεισόδιο. Η στατιστική σύγκριση μεταξύ των δύο ομάδων πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του μη παραμετρικού ελέγχου σημαντικότητας Mann-Whitney U test, όπου δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά,  $p > 0.05$ .





**Σχήμα 6.11 Συγκέντρωση της σχετιζόμενης με την HDL MPO σε ασθενείς με βαρύ και με ελαφρύ εγκεφαλικό επεισόδιο.** Η στατιστική σύγκριση μεταξύ των δύο ομάδων πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του μη παραμετρικού ελέγχου σημαντικότητας Mann-Whitney U test, \*, $p < 0.05$ .



**Σχήμα 6.12 Συγκέντρωση του λόγου MPO/PON1 σε ασθενείς με βαρύ και με ελαφρύ εγκεφαλικό επεισόδιο.** Η στατιστική σύγκριση μεταξύ των δύο ομάδων πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του μη παραμετρικού ελέγχου σημαντικότητας Mann-Whitney U test, \*, $p < 0.05$ .

**Πίνακας 6.2 Κλινικά και εργαστηριακά χαρακτηριστικά των ασθενών με βαρύ και με ελαφρύ ΑΕΕ.** Τα δεδομένα εκφράζονται ως mean±SD για τις συνεχείς μεταβλητές και ως ποσοστό % για τις κατηγορικές μεταβλητές. Στατιστική σημαντική διαφορά θεωρήθηκε για p<0.05, \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001

Χαρακτηριστικά	Ασθενείς με βαρύ επεισόδιο (n=91)	Ασθενείς με ελαφρύ επεισόδιο (n=86)	P
Ηλικία	79.3 ±5.8 (n=88)	77.7 ±6.9 (n=86)	0.153
Άντρες, (%)	35.2 (n=91)	51.2 (n=86)	<b>0.032*</b>
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	26.8±4.6 (n=62)	26.9±4.7 (n=60)	0.870
Βάρος, (kg)	73.2±13.5 (n=55)	75.0±13.4 (n=69)	0.458
Παχυσαρκία, (%)	11.9 (n=51)	14.1 (n=60)	0.830
Διαβήτης, (%)	34.1 (n=91)	29.1 (n=86)	0.475
Υπέρταση, (%)	84.6 (n=91)	86.0 (n=86)	0.788
Σφίξεις	79.8±16.3 (n=85)	76.4±15.1 (n=81)	0.228
ΣΑΠ	145.5±26.3 (n=90)	147.2±24 (n=85)	0.649
ΔΑΠ	80.3±13.7 (n=90)	80.0±12.9 (n=85)	0.961
Καρδιακή Ανεπάρ. (%)	20.9 (n=91)	15.1 (n=86)	0.319
Κολπική Μαρμαρυγή, (%)	42.9 (n=91)	36.0 (n=86)	0.354
Στεφ.Νόσος (%)	28.6 (n=91)	22.1 (n=86)	0.323
Οικ.Ιστορικό (%)	18.7 (n=91)	14.0 (n=86)	0.396
Κάπνισμα (νυν/τεως,%)	9.9/20.9 (n=91)	15.1/22.1 (n=86)	0.527
Αλκοόλ	1.3±3.7 (n=83)	1.9±4.9 (n=85)	<b>0.05</b>
Γλυκόζη, mg/dL	122.4±43.8 (n=81)	106.84±37.8 (n=75)	<b>0.006**</b>
Ολ.Χοληστερόλη,mg/dL	176.5±50.2 (n=91)	181.8±44.3 (n=86)	0.458
HDL-Chol,mg/dL	45.3±16.8 (n=91)	49.2±14.8 (n=86)	0.072
LDL-Chol,mg/dL	108.5±44.4 (n=91)	110.4±39.1 (n=86)	0.666
Τριγλυκερίδια,mg/dL	113.6±56.5 (n=91)	111.6±35.1 (n=86)	0.512
ΑποΑ-I,mg/dL	145.6±66.3 (n=91)	140.2±56.2 (n=86)	0.564
Ουρικό οξύ, mg/dL	5.8±2.3 (n=82)	5.7±1.4 (n=75)	0.837
EGFR (mL/min/1.73m <sup>2</sup> )	59.5±18.4 (n=86)	65.6±17.7 (n=79)	<b>0.031*</b>

**Πίνακας 6.3 Πολυπαραγοντική διωνυμική ανάλυση με εξαρτημένη μεταβλητή την βαρύτητα του ΑΕΕ.** Στο μοντέλο εισήχθησαν όσοι παράμετροι ευρέθησαν στατιστικά σημαντικοί. Παρουσιάζεται το τελευταίο βήμα του μοντέλου της ανάλυσης.

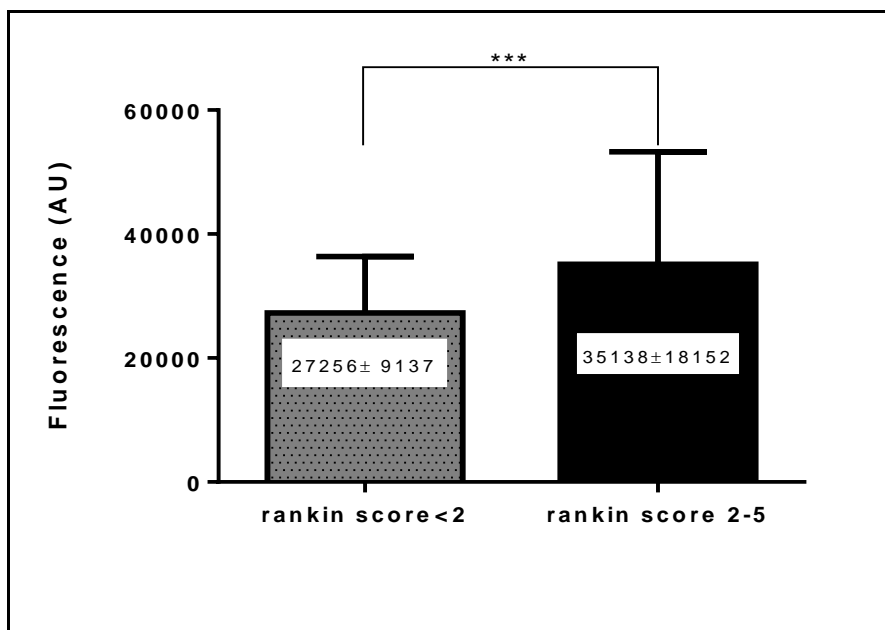
	B	S.E.	Wald	df	Sig.	Exp(B)	95% C.I. for EXP(B)	
							Lower	Upper
Step 4 <sup>a</sup>								
Θήλυ	,993	,360	7,604	1	,005	2,795	1,372	5,695
DCFsignal	,036	,015	5,671	1	,024	1,034	1,004	1,064
Γλυκόζη	,013	,005	6,712	1	,008	1,014	1,004	1,024
Constant	-3,092	,803	14,828	1	,000	,045		

a. Variable(s) entered on step 1: Θήλυ , DCFsignal, Γλυκόζη , EGFRI, MPO, MPO/PON1.

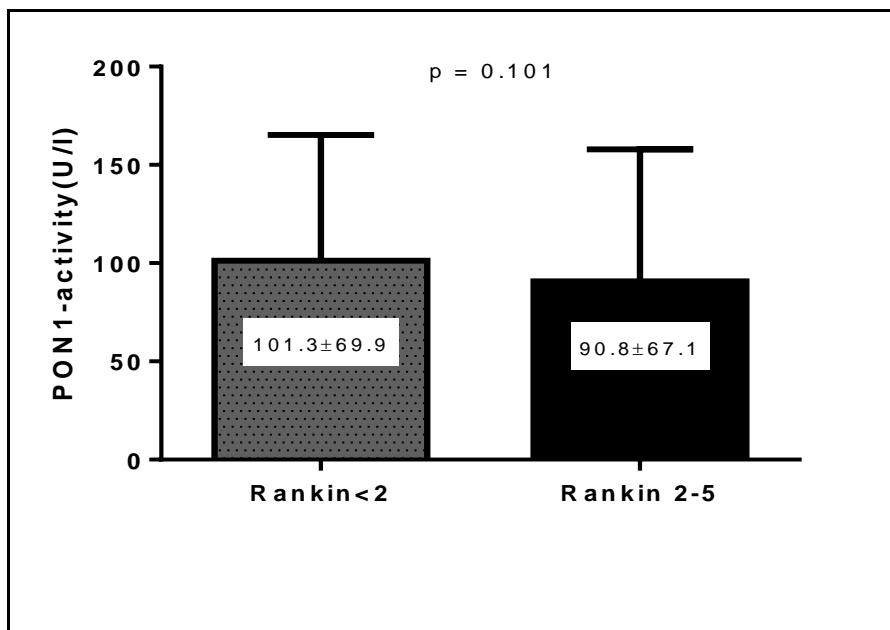
#### **6.4 Διερεύνηση της λειτουργικότητας της HDL ασθενών με ΑΕΕ ως προς τις αντιοξειδωτικές της ιδιότητες και η συσχέτισή της με την εξάρτηση των ασθενών κατά την έξοδο τους από το νοσοκομείο.**

Η λειτουργική εξάρτηση των ασθενών που έχουν υποστεί οξύ ισχαιμικό εγκεφαλικό επεισόδιο αξιολογείται με βάση την τροποποιημένη κλίμακα Rankin σύμφωνα με την οποία ασθενείς που συγκεντρώνουν βαθμολογία μικρότερη από 2 θεωρούνται λειτουργικά ανεξάρτητοι ενώ όσοι συγκεντρώνουν από 2 έως 5 θεωρούνται ως λειτουργικά εξαρτημένοι. Η διερεύνηση της συσχέτισης των αντιοξειδωτικών ιδιοτήτων της HDL με την εξάρτηση κατέδειξε πως οι ασθενείς οι οποίοι ήταν λειτουργικά εξαρτημένοι κατά την έξοδό τους από το νοσοκομείο είχαν μειωμένη αντιοξειδωτική ικανότητα της HDL όπως αυτή μετρήθηκε με τη μέθοδο της διχλωροφλουορεσκεΐνης, (DCF), όπου υψηλότερο σήμα φθορισμού υποδεικνύει ελαττωμένη αντιοξειδωτική ικανότητα (35138±18152 έναντι 27256±9137,  $p = 0.0006$  Σχημ 6.12). Η δραστικότητα του ενζύμου PON1 της HDL δεν βρέθηκε να διαφέρει στατιστικά σημαντικά μεταξύ των δύο ομάδων (90.8±67.1 έναντι 101.3±63.9,  $p = 0.101$ , Σχημ. 6.13). Η συγκέντρωση της σχετιζόμενης με την HDL MPO βρέθηκε να είναι περισσότερο αυξημένη στους εξαρτημένους ασθενείς έναντι των ανεξάρτητων (433.3±271.6 έναντι 383.2±370.4,  $p = 0.0412$ , Σχημ 6.14). Επιπλέον, η αναλογία MPO/PON1 που έχει προταθεί σαν δείκτης λειτουργικότητας της HDL [256] βρέθηκε να είναι αυξημένος στους λειτουργικά εξαρτημένους ασθενείς έναντι των ανεξάρτητων (8.34±9.27 έναντι 5.34±6.54,  $p = 0.010$ , Σχημ. 6.15).

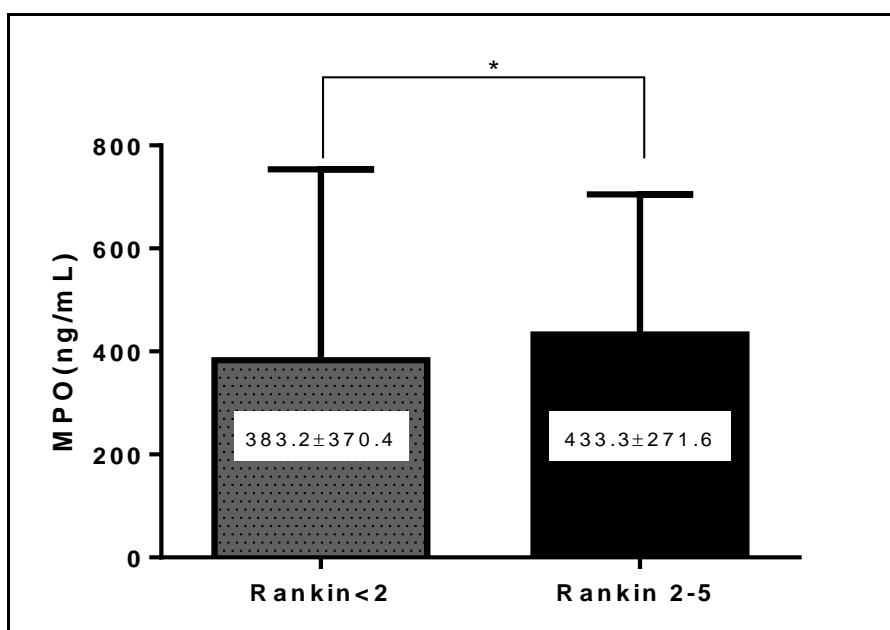
Η συγκριτική μελέτη των κλινικο-εργαστηριακών χαρακτηριστικών των δύο ομάδων κατέδειξε ότι οι εξαρτημένοι ασθενείς ήταν περισσότερο ηλικιωμένοι έναντι των ανεξάρτητων, παρουσίασαν περισσότερες σφίξεις, είχαν υψηλότερη συγκέντρωση γλυκόζης και συγκέντρωσαν μεγαλύτερη βαθμολογία στην κλίμακα βαρύτητας NIHSS (Πιν. 6.4) Σε πολυπαραγοντική ανάλυση, ανεξάρτητοι προγνωστικοί δείκτες εξάρτησης κατά την έξοδο από το νοσοκομείο ήταν η ηλικία (ΣΚ 1.1, 95% ΔΕ 1.00-1.2,  $p=0.03$ ) και η NIHSS κατά την εισαγωγή (ΣΚ 1.47, 95% ΔΕ 1.25-1.74,  $p<0.001$ ) (Πιν. 6.5).



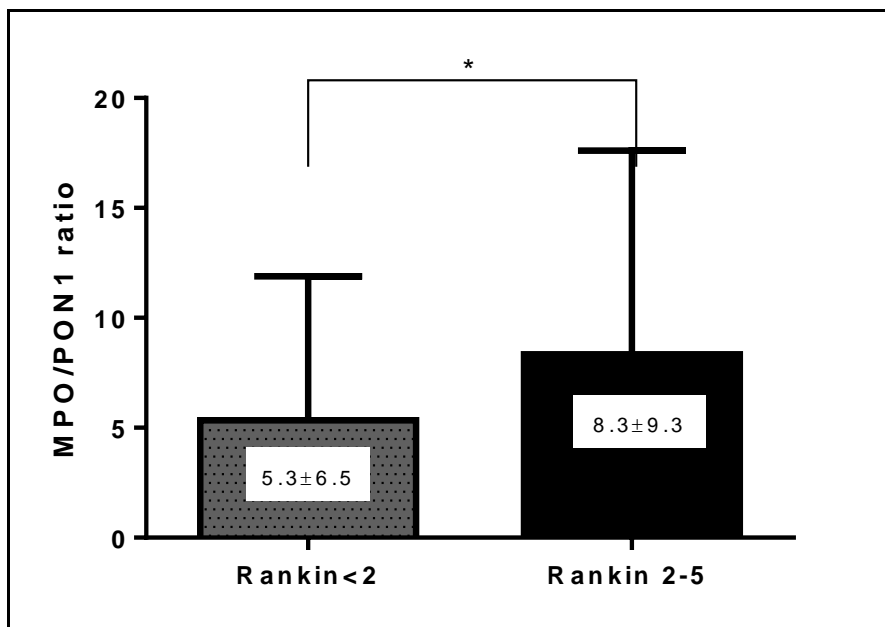
**Σχήμα 6.13** Η αντιοξειδωτική ικανότητα της HDL μέσω της δοκιμασίας DCF σε ασθενείς λειτουργικά εξαρτημένους και ανεξάρτητους κατά την έξοδο του από το νοσοκομείο ύστερα από ΑΕΕ. Η στατιστική σύγκριση μεταξύ των δύο ομάδων πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του μη παραμετρικού ελέγχου σημαντικότητας Mann-Whitney U test, \*\*\* $p< 0.001$ .



**Σχήμα 6.14** Η δραστικότητα της σχετιζόμενης με την HDL PON1 σε ασθενείς λειτουργικά εξαρτημένους και ανεξάρτητους κατά την έξοδο του από το νοσοκομείο ύστερα από ΑΕΕ. Η στατιστική σύγκριση μεταξύ των δύο ομάδων πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του μη παραμετρικού ελέγχου σημαντικότητας Mann-Whitney U test, όπου δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά,  $p > 0.05$ .



**Σχήμα 6.15** Συγκέντρωση της σχετιζόμενης με την HDL MPO σε ασθενείς λειτουργικά εξαρτημένους και ανεξάρτητους κατά την έξοδο του από το νοσοκομείο ύστερα από ΑΕΕ. Η στατιστική σύγκριση μεταξύ των δύο ομάδων πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του μη παραμετρικού ελέγχου σημαντικότητας Mann-Whitney U test,  $*p < 0.05$ .



**Σχήμα 6.16 Συγκέντρωση του λόγου MPO/PON1 σε ασθενείς λειτουργικά εξαρτημένους και ανεξάρτητους κατά την έξοδο του από το νοσοκομείο ύστερα από ΑΕΕ. Η στατιστική σύγκριση μεταξύ των δύο ομάδων πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του μη παραμετρικού ελέγχου σημαντικότητας Mann-Whitney U test, \* $p < 0.05$ .**

**Πίνακας 6.4 Κλινικά και εργαστηριακά χαρακτηριστικά των εξαρτημένων και ανεξάρτητων κατά την έξοδο τους από το νοσοκομείο ασθενών με ΑΕΕ.** Τα δεδομένα εκφράζονται ως mean±SD για τις συνεχείς μεταβλητές και ως ποσοστό % για τις κατηγορικές μεταβλητές. Στατιστική σημαντική διαφορά θεωρήθηκε για  $p<0.05$ \* $p<0.05$ , \*\* $p<0.01$ , \*\*\* $p<0.001$

Χαρακτηριστικά	Ασθενείς εξαρτημένοι κατά την έξοδο(n=83)	Ασθενείς ανεξάρτητοι κατά την έξοδο (n=71)	P
Ηλικία	79.8±6.1 (n=83)	76.3±6.4 (n=71)	<b>0.0006***</b>
Άντρες ,(%)	38.6 (n=83)	47.9 (n=71)	0.243
BMI,(kg/m <sup>2</sup> )	26.5±4.7 (n=48)	28.1±5.0 (n=51)	0.095
Βάρος ,kg	72.5±13.1 (n=53)	77.2±14.3 (n=57)	0.075
Παχυσαρκία (%)	20.8 (n=48)	29.4 (n=51)	0.389
Διαβήτης (%)	34.9 (n=83)	26.8 (n=71)	0.275
Υπέρταση (%)	84.3 (n=83)	90.1 (n=71)	0.286
Σφίξεις	79.5±15.4 (n=79)	74.8±13.0 (n=67)	<b>0.013*</b>
ΣΑΠ	145,98±27,07 (n=83)	150.76±23.95 (n=70)	0.157
ΔΑΠ	79.63±12.58 (n=83)	81.61±11.81 (n=70)	0.389
Καρδιακή Ανεπ.(%)	19.3 (n=83)	15.5 (n=71)	0.538
Κολπ.Μαρμαρυγή (%)	37.3 (n=83)	38.0 (n=71)	0.931
Στεφ.Νόσος (%)	25.3 (n=83)	25.4 (n=71)	0.994
Οικ.Ιστορικό (%)	16.9 (n=83)	18.3 (n=71)	0.814
Κάπνισμα (νυν/τέως, %)	7.2/16.9 (n=83)	9.9/31.0 (n=71)	0.076
Αλκοόλ	1.22±3.62 (n=79)	2.0±5.2 (n=70)	<b>0.032*</b>
NIHSS	10.85±8.45 (n=79)	2.097±2.54 (n=62)	<b>&lt;0.0001***</b>
Γλυκόζη, mg/dl	120.6±44 (n=77)	103.4±30.6 (n=61)	<b>0.005**</b>
Ολ.Χοληστερόλη,mg/dl	179.4±47.2 (n=83)	183.3±49.6 (n=71)	0.619
HDL-C, mg/dl	45.5±15.1 (n=83)	47.8±15.0 (n=71)	0.375
LDL-C, mg/dl	111.8±40.1 (n=83)	111.5±44.1 (n=71)	0.958
Τριγλυκερίδια, mg/dl	109.9±49.7 (n=83)	120.2±43.7 (n=71)	0.05
ΑροΑ-I mg/dl	131.1±60.5 (n=83)	146.2±57.2 (n=71)	0.114
Ουρικό οξύ,mg/dl	5.6±2.0 (n=75)	5.8±1.4 (n=62)	0.693
EGFR (mL/min/1.73m <sup>2</sup> )	60.7±18.8 (n=81)	66.2±18.9 (n=64)	0.082

**Πίνακας 6.5 Πολυπαραγοντική διωνυμική ανάλυση με τη λειτουργική εξάρτηση ως εξαρτημένη μεταβλητή στους ασθενείς με ΑΕΕ. Στο μοντέλο εισήχθησαν οι παράμετροι που ευρέθησαν στατιστικά σημαντικοί.**

	B	S.E.	Wald	df	Sig.	Exp(B)	95% C.I. for EXP(B)		
							Lower	Upper	
Step 1 <sup>a</sup>	Ηλικία	,094	,044	4,524	1	,033	1,098	1,007	1,198
	Γλυκόζη (mg/dL)	,014	,007	3,885	1	,049	1,014	1,000	1,028
	NIHSS score	,387	,086	20,295	1	,000	1,473	1,245	1,743
	Σφίξεις	,025	,017	2,267	1	,132	1,026	,992	1,060
	Constant	-12,428	3,938	9,960	1	,002	,000		
Step 2 <sup>a</sup>	Ηλικία	,094	,043	4,769	1	<b>,029</b>	<b>1,102</b>	<b>1,010</b>	<b>1,204</b>
	Γλυκόζη (mg/dL)	,013	,007	3,670	1	,095	1,013	0,998	1,027
	NIHSS score	,386	,085	20,533	1	<b>,000</b>	<b>1,472</b>	<b>1,247</b>	<b>1,737</b>
	Constant	-10,432	3,596	8,414	1	,004	,000		

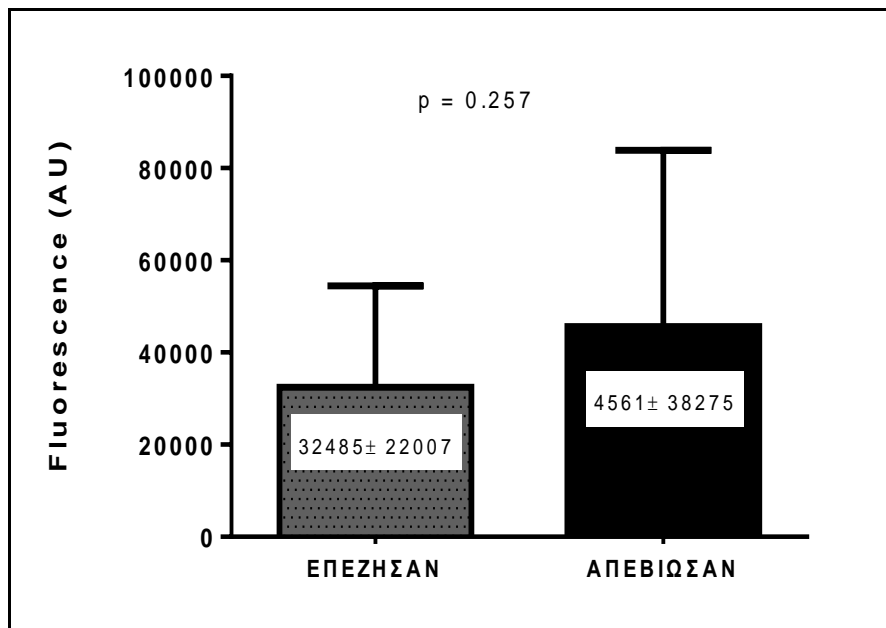
a. Variable(s) entered on step 1: Ηλικία, Γλυκόζη (mg/dL), NIHSS score, Σφίξεις.

### **6.5 Διερεύνηση της λειτουργικότητας της HDL ασθενών με ΑΕΕ ως προς τις αντιοξειδωτικές της ιδιότητες και η συσχέτισή της με την ενδονοσοκομειακή θνητότητα.**

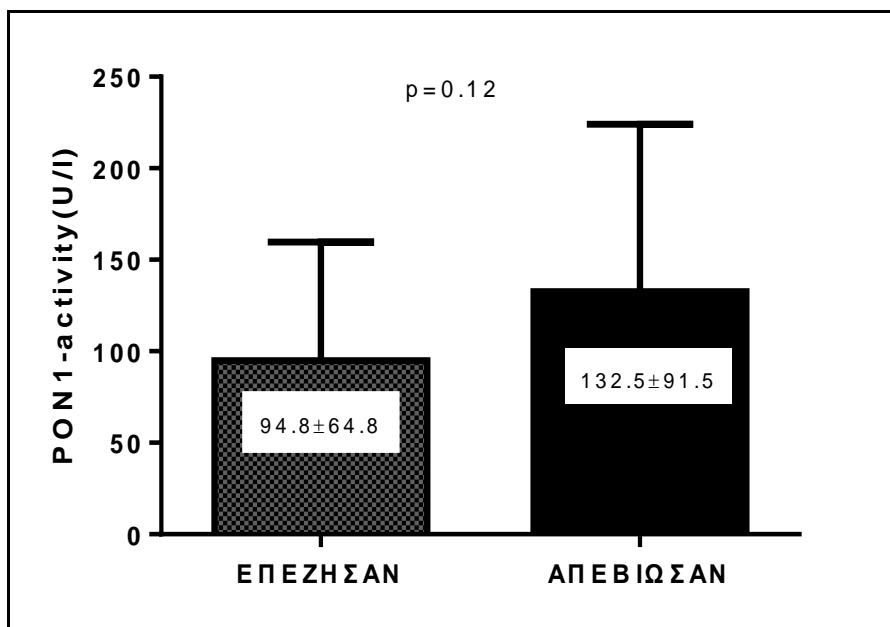
Η διερεύνηση της συσχέτισης των αντιοξειδωτικών ιδιοτήτων της HDL με την ενδονοσοκομειακή θνητότητα κατέδειξε πως οι ασθενείς οι οποίοι κατέληξαν κατά τη νοσηλεία τους ύστερα από οξύ ισχαιμικό εγκεφαλικό επεισόδιο, δεν διέφερε η αντιοξειδωτική ικανότητα της HDL αξιολογούμενη με τη μέθοδο της διχλωροφλουορεσκεΐνης, (DCF), όπου υψηλότερο σήμα φθορισμού υποδεικνύει ελαττωμένη αντιοξειδωτική ικανότητα ( $4560.8 \pm 38275.4$  έναντι  $32485.3 \pm 22006.8$ ,  $p=0.257$  Σχημ 6.16). Η δρατικότητα του ενζύμου PON1 της HDL επίσης δεν βρέθηκε να διαφέρει στατιστικά σημαντικά μεταξύ των δύο ομάδων ( $132.5 \pm 91.5$  έναντι  $94.8 \pm 64.8$ ,  $p=0.12$ , Σχημ. 6.17). Η συγκέντρωση της σχετιζόμενης με την HDL MPO βρέθηκε να είναι περισσότερο αυξημένη στους ασθενείς που απεβίωσαν κατά τα νοσηλεία έναντι όσων έλαβαν εξιτήριο ( $568.5 \pm 272$  έναντι  $399.3 \pm 293.8$ ,  $p = 0.0432$ , Σχημ 6.18). Ωστόσο, η αναλογία MPO/PON1 δεν βρέθηκε να διαφέρει ανάμεσα στις 2 ομάδες ( $6.26 \pm 8.95$  έναντι  $6.99 \pm 8.23$ ,  $p = 0.34$ , Σχημ. 6.19). Η συγκριτική μελέτη των κλινικο-εργαστηριακών χαρακτηριστικών των δύο



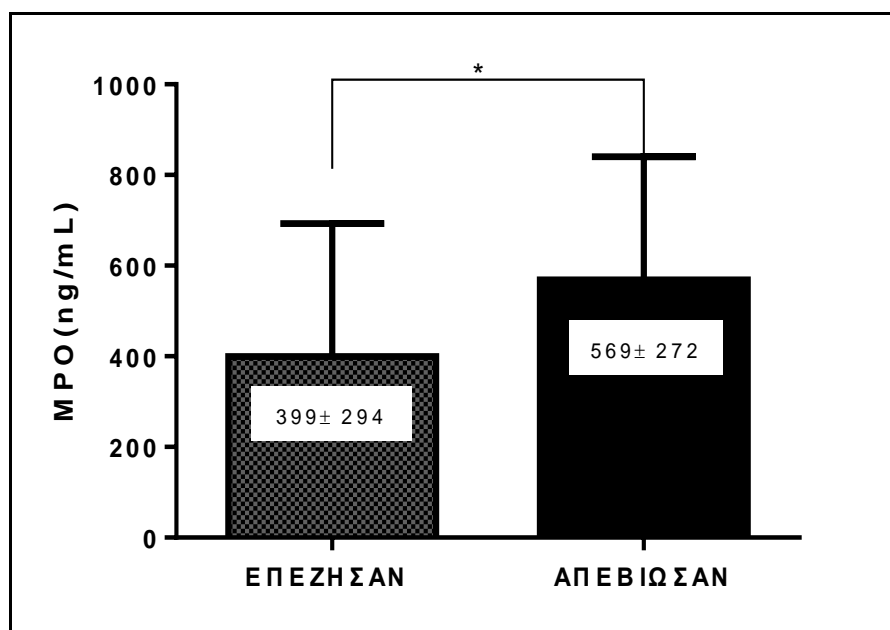
ομάδων κατέδειξε ότι οι ασθενείς που απεβίωσαν κατά τη διάρκεια της νοσηλείας είχαν πιο συχνά κοιλιακή μαρμαρυγή, είχαν μικρότερο δείκτη μάζας σώματος και υψηλότερη βαθμολογία στην κλίμακα NIHSS σε σύγκριση με τους ασθενείς που έλαβαν εξιτήριο. (Πιν. 6.6) Σε πολυπαραγοντική ανάλυση, ανεξάρτητοι προγνωστικοί δείκτες για τη ενδονοσοκομειακή θνητότητα ήταν ο δείκτης μάζας σώματος (ΣΚ 0.82, 95% ΔΕ 0.66-1.02,  $p=0.08$ ) και η NIHSS κατά την εισαγωγή (ΣΚ 1.16, 95% ΔΕ 1.06-1.27,  $p=0.002$ ) (Πιν. 6.7).



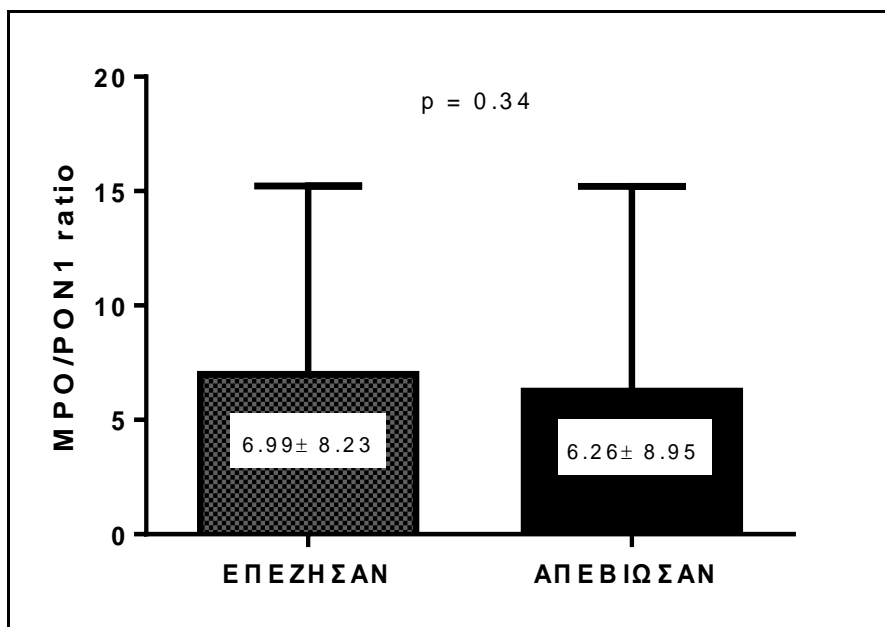
**Σχήμα 6.17** Η αντιοξειδωτική ικανότητα της HDL μέσω της δοκιμασίας DCF σε ασθενείς που απεβίωσαν ενδονοσοκομειακά και σε εκείνους που έλαβαν εξιτήριο ύστερα από ΑΕΕ. Η στατιστική σύγκριση μεταξύ των δύο ομάδων πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του μη παραμετρικού ελέγχου σημαντικότητας Mann-Whitney U test, όπου δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά,  $p>0.05$ .



**Σχήμα 6.18** Η δραστηριότητα της σχετιζόμενης με την HDL PON1 σε ασθενείς που απεβίωσαν ενδονοσοκομειακά και σε εκείνους που έλαβαν εξιτήριο ύστερα από ΑΕΕ.. Η στατιστική σύγκριση μεταξύ των δύο ομάδων πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του μη παραμετρικού ελέγχου σημαντικότητας Mann-Whitney U test, όπου δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά ,  $p > 0.05$ .



**Σχήμα 6.19** Συγκέντρωση της σχετιζόμενης με την HDL MPO σε ασθενείς που απεβίωσαν ενδονοσοκομειακά και σε εκείνους που έλαβαν εξιτήριο ύστερα από ΑΕΕ. Η στατιστική σύγκριση μεταξύ των δύο ομάδων πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του μη παραμετρικού ελέγχου σημαντικότητας Mann-Whitney U test, \*,  $p < 0.05$



**Σχήμα 6.20** Συγκέντρωση του λόγου ΜΡΟ/ΡΟΝ1 σε ασθενείς που απεβίωσαν ενδονοσοκομειακά και σε εκείνους που έλαβαν εξιτήριο ύστερα από ΑΕΕ. Η στατιστική σύγκριση μεταξύ των δύο ομάδων πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του μη παραμετρικού ελέγχου σημαντικότητας Mann-Whitney U test, όπου δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά,  $p > 0.05$ .

**Πίνακας 6.6 Κλινικά και εργαστηριακά χαρακτηριστικά των ασθενών που κατέληξαν κατά τη νοσηλεία και αυτών που έλαβαν εξιτήριο ύστερα από ΑΕΕ.** Τα δεδομένα εκφράζονται ως mean± SD για τις συνεχείς μεταβλητές και ως ποσοστό % για τις κατηγορικές μεταβλητές. Στατιστική σημαντική διαφορά θεωρήθηκε για p<0.05, \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001

Χαρακτηριστικά	Ασθενείς που απεβίωσαν κατά τη νοσηλεία (n=15)	Ασθενείς που πήραν εξιτήριο (n=184)	P
Ηλικία	78.9±7.5 (n=13)	78.5±6.4 (n=183)	0.870
Άντρες (%)	40.0 (n=15)	78.6 (n=184)	0.825
BMI, (kg/m <sup>2</sup> )	23.1±2.6 (n=6)	27.3±4.9 (n=99)	<b>0,039*</b>
Βάρος, kg	67.5±61.2 (n=6)	74.3±13.3 (n=129)	0.159
Παχυσαρκία (%)	0 (n=6)	22,4 (n=116)	0.064
Διαβήτης (%)	26.7 (n=15)	32.1 (n=184)	0.670
Υπέρταση (%)	66.7 (n=15)	87.0 (n=184)	<b>0.032*</b>
Σφίξεις	85.8±15.1 (n=12)	77.2±15.2 (n=175)	<b>0.041*</b>
ΣΑΠ	140.4±33.7 (n=13)	148.2±25.4 (n=183)	0.321
ΔΑΠ	85.8±22.4 (n=13)	80.2±12.5 (n=183)	0.454
Καρδιακή Ανεπ. (%)	6.7 (n=15)	19.0 (n=184)	0.232
Κολπ.Μαρμαρυγή (%)	66.7 (n=15)	35.3 (n=184)	<b>0.016*</b>
Στεφ.Νόσος (%)	20.0 (n=15)	25.5 (n=184)	0.634
Οικ.Ιστορικό (%)	20.0 (n=15)	15.2 (n=184)	0.623
Κάπνισμα (νυν/τεως)	20.0/6.7 (n=15)	10.3/21.2 (n=18)	0.262
Αλκοόλ	0.9±2.5 (n=15)	1.5±4.2 (n=175)	0.526
NIHSS	23.8±9.2 (n=12)	7.0±7.9 (n=141)	<b>&lt;0.0001***</b>
Γλυκόζη, mg/dL	121.4±56.5 (n=10)	114.2±40.5 (n=164)	0.803
Ολ.Χοληστερόλη,mg/dL	166.6±45.1 (n=15)	180.6±46.3 (n=184)	0.261
HDL-C, mg/dL	50.9±24.1 (n=15)	46.9±14.9 (n=184)	0.503
LDL-C, mg/dL	96.3±41.8 (n=15)	110.6±40.8 (n=184)	0.196
Τριγλυκερίδια, mg/dL	97.1±39.7 (n=15)	115.6±49.3 (n=184)	0.085
ΑpoA-I mg/dL	156.3±66.0 (n=15)	138.9±59.2 (n=184)	0.277
Ουρικό οξύ,mg/dL	6.0±1.0 (n=11)	5.7±1.9 (n=184)	0.421
EGFR (mL/min/1.73m <sup>2</sup> )	60.4±18.9 (n=10)	63.3±18.6 (n=173)	0.634

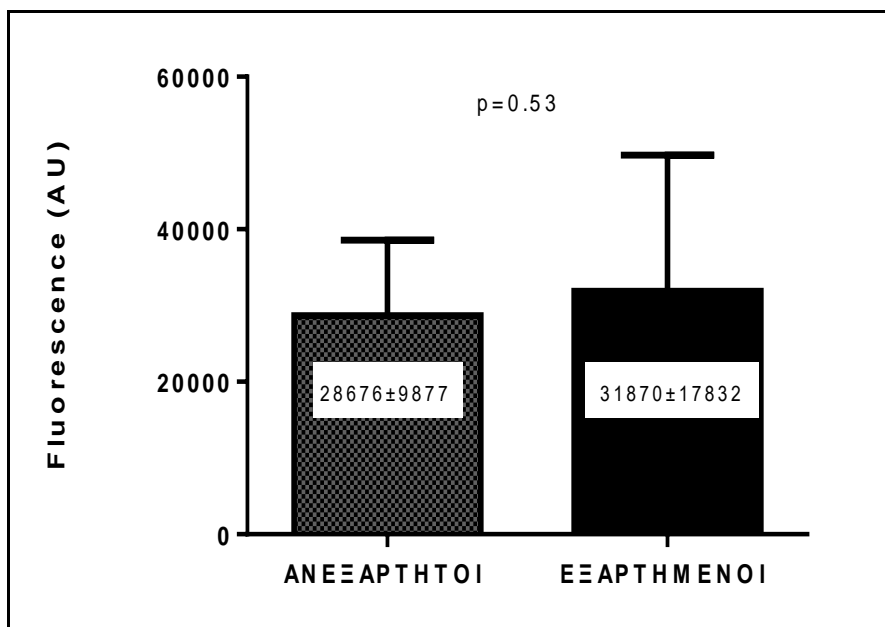
**Πίνακας 6.7 Πολυπαραγοντική διωνυμική ανάλυση με την ενδονοσοκομειακή θνητότητα ως εξαρτημένη μεταβλητή στους ασθενείς με ΑΕΕ.** Στο μοντέλο εισήχθησαν οι παράμετροι που ευρέθησαν στατιστικά σημαντικοί. Παρουσιάζεται το τελευταίο βήμα του μοντέλου ανάλυσης.

	B	S.E.	Wald	df	Sig.	Exp(B)	95% C.I. for EXP(B)	
							Lower	Upper
BMI	-,196	,111	3,131	1	,077	,822	,662	1,021
Step 5 <sup>a</sup> NIHSS	,147	,048	9,532	1	,002	1,158	1,055	1,272
Constant	,143	2,689	,003	1	,958	1,154		

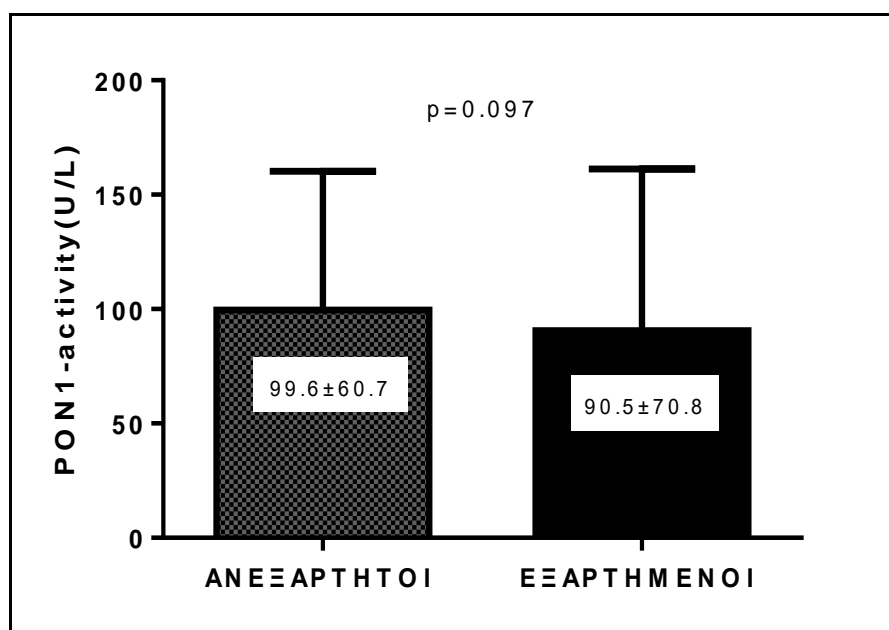
a. Variable(s) entered on step 1: MPO, BMI, Κολπ.Μαρμαρυγή, NIHSS, Υπέρταση, Σφίξεις.

### **6.6 Διερεύνηση της λειτουργικότητας της HDL ασθενών με ΑΕΕ ως προς τις αντιοξειδωτικές της ιδιότητες και η συσχέτισή της με την λειτουργική εξάρτηση 1 έτος μετά το περιστατικό.**

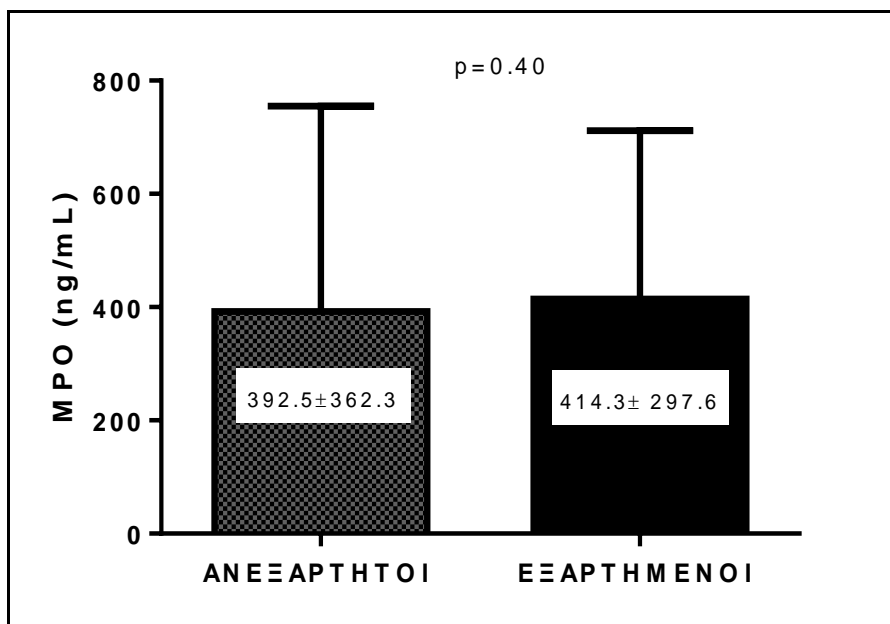
Οι ασθενείς που ήταν εξαρτημένοι 1 έτος μετά την έξοδο από το νοσοκομείο σύμφωνα με την τροποποιημένη κλίμακα Rankin score είχαν παρόμοια αντιοξειδωτική ικανότητα όπως αυτή αξιολογήθηκε με τη δοκιμασία της διχλωροφλουορεσκεΐνης, DCF με τους ασθενείς που ήταν ανεξάρτητοι 1 έτος μετά την έξοδο από το νοσοκομείο ( $31870 \pm 17832$  έναντι  $28676 \pm 9877$ ,  $p = 0.53$ , Σχημ.6.20) και παρόμοια δραστηριότητα PON1 ( $90.5 \pm 70.8$  έναντι  $99.6 \pm 60.7$ ,  $p = 0.097$ , Σχημ 6.21). Η συγκέντρωση της σχετιζόμενης με την HDL MPO, επίσης δεν βρέθηκε να διαφέρει ανάμεσα στις 2 ομάδες ( $414.3 \pm 297.6$  έναντι  $392.5 \pm 362.3$ ,  $p = 0.40$ , Σχημ. 6.22) καθώς ούτε και ο λόγος MPO/PON1 βρέθηκε να διαφοροποιείται σημαντικά ανάμεσα στους εξαρτημένους μετά από 1 έτος από το περιστατικό και στους ανεξάρτητους ( $7.16 \pm 7.0$  έναντι  $5.7 \pm 7.0$ ,  $p = 0.135$ , Σχημ. 6.23). Οι ασθενείς που ήταν εξαρτημένοι 1 έτος μετά την έξοδο από το νοσοκομείο ήταν περισσότερο ηλικιωμένοι, είχαν χαμηλότερη συγκέντρωση γλυκόζης και είχαν υψηλότερο Rankin score κατά την έξοδο από το νοσοκομείο σε σύγκριση με τους ασθενείς που ήταν ανεξάρτητοι 1 έτος μετά την έξοδο από το νοσοκομείο (Πιν.6.8) Σε πολυπαραγοντική ανάλυση, ο μόνος ανεξάρτητος προγνωστικός δείκτης εξάρτησης 1 έτος μετά την έξοδο από το νοσοκομείο ήταν το Rankin score κατά την έξοδο από το νοσοκομείο (ΣΚ 3.15, 95% ΔΕ 1.9-5.2,  $p < 0.001$ ) (Πιν.6.9)



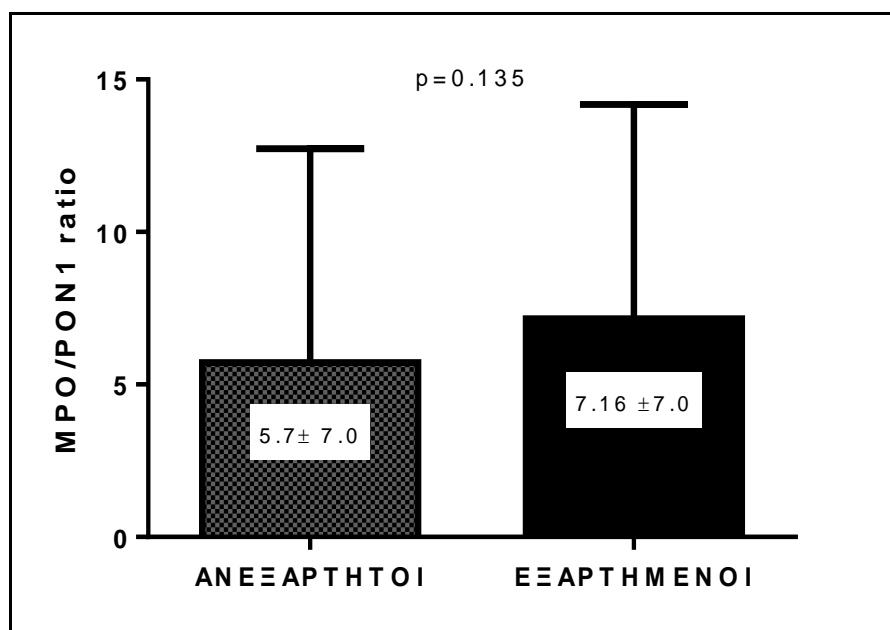
**Σχήμα 6.21** Η αντιοξειδωτική ικανότητα της HDL μέσω της δοκιμασίας DCF σε ασθενείς λειτουργικά εξαρτημένους και ανεξάρτητους 1 έτος μετά το ΑΕΕ. Η στατιστική σύγκριση μεταξύ των δύο ομάδων πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του μη παραμετρικού ελέγχου σημαντικότητας Mann-Whitney U test, όπου δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά,  $p > 0.05$ .



**Σχήμα 6.22** Η δραστηριότητα της σχετιζόμενης με την HDL PON1 σε ασθενείς λειτουργικά εξαρτημένους και ανεξάρτητους 1 έτος μετά το ΑΕΕ. Η στατιστική σύγκριση μεταξύ των δύο ομάδων πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του μη παραμετρικού ελέγχου σημαντικότητας Mann-Whitney U test, όπου δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά,  $p > 0.05$ .



**Σχήμα 6.23** Η συγκέντρωση της, σχετιζόμενης με την HDL ,MPO σε ασθενείς λειτουργικά εξαρτημένους και ανεξάρτητους 1 έτος μετά το ΑΕΕ. Η στατιστική σύγκριση μεταξύ των δύο ομάδων πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του μη παραμετρικού ελέγχου σημαντικότητας Mann-Whitney U test, όπου δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά,  $p > 0.05$ .



**Σχήμα 6.24** Η αναλογία ,MPO/PON1 σε ασθενείς λειτουργικά εξαρτημένους και ανεξάρτητους 1 έτος μετά το ΑΕΕ. Η στατιστική σύγκριση μεταξύ των δύο ομάδων πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του μη παραμετρικού ελέγχου σημαντικότητας Mann-Whitney U test, όπου δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά,  $p > 0.05$ .

**Πίνακας 6.8 Κλινικά και εργαστηριακά χαρακτηριστικά για ασθενείς που ήταν εξαρτημένοι 1 χρόνο μετά την εξαγωγή και για ασθενείς που ήταν ανεξάρτητοι.** Τα δεδομένα εκφράζονται ως mean± SD για τις συνεχείς μεταβλητές και ως ποσοστό % για τις κατηγορικές μεταβλητές. Στατιστική σημαντική διαφορά θεωρήθηκε για p<0.05, \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001

Χαρακτηριστικά	Ασθενείς εξαρτημένοι 1 έτος μετά το ΑΕΕ (n=47)	Ασθενείς ανεξάρτητοι 1 έτος μετά το ΑΕΕ (n=55)	P
Ηλικία	79.3±5.3 (n=47)	76.8±5.60 (n=55)	<b>0.018*</b>
Άντρες ,n (%)	42.6 (n=47)	50.9 (n=55)	0.400
BMI,(kg/m <sup>2</sup> )	28.4±3.5 (n=33)	27.2±4.2 (n=38)	0.213
Βάρος ,kg	76.3±11.0 (n=35)	75.2±12.4 (n=43)	0.662
Παχυσαρκία (%)	24.2 (n=33)	18.4 (n=38)	0.312
Διαβήτης (%)	31.9 (n=47)	30.9 (n=17)	0.913
Υπέρταση(%)	85.1 (n=40)	89.1 (n=49)	0.548
Σφίξεις	75.9±14.2 (n=46)	73.3±15.0 (n=54)	0.290
ΣΑΠ	145.7±26.2 (n=47)	148.2±21.0 (n=55)	0.601
ΔΑΠ	79.4±10.3 (n=47)	78.7±10.1 (n=55)	0.995
Καρδιακή Ανεπ.(%)	21.3 (n=47)	14.5 (n=55)	0.374
Κολπ.Μαρμαρυγή(%)	34.0 (n=47)	34.5 (n=55)	0.957
Στεφ.Νόσος (%)	23.4 (n=47)	25.5 (n=55)	0.810
Οικ.Ιστορικό(%)	17.0 (n=47)	14.5 (n=55)	0.732
Κάπνισμα(νυν/τέως)	2.1/25.5 (n=47)	10.9/27.3 (n=55)	0.192
Αλκοόλ	0.7±2.5 (n=46)	2.0±5.6 (n=54)	<b>0.043*</b>
Rankin score	3.0±2.0 (n=40)	0.44±0.65 (n=48)	<b>&lt;0.001***</b>
Γλυκόζη, mg/dl	112.7±40.0 (n=41)	104.1±29.9 (n=49)	0.333
Ολ.Χοληστερόλη,mg/dl	179.5±49.2 (n=47)	184.0±47.7 (n=55)	0.440
HDL-C, mg/dl	46.5±15.0 (n=47)	47.6±15.6 (n=55)	0.819
LDL-C, mg/dl	109.6±47.7 (n=47)	112.0±41.0 (n=55)	0.774
Τριγλυκερίδια, mg/dl	116.1±50.8 (n=47)	127.3±44.1 (n=55)	0.327
ΑpoA-I mg/dl	147.5±60.0 (n=47)	146.7±61.2 (n=55)	0.943
Ουρικό οξύ,mg/dl	5.31±2.0 (n=47)	5.7±1.5 (n=55)	0.344
EGFR (mL/min/1.73m <sup>2</sup> )	62.3±18.7 (n=47)	67.9±17.7 (n=50)	0.138



**Πίνακας 6.9 Πολυπαραγοντική διωνυμική ανάλυση με την εξάρτηση μετά από 1 έτος ως εξαρτημένη μεταβλητή.** Στο μοντέλο εισήχθησαν οι παράμετροι που ευρέθησαν στατιστικά σημαντικοί. Παρουσιάζεται το τελευταίο βήμα του μοντέλου ανάλυσης

	B	S.E.	Wald	df	Sig.	Exp(B)	95% C.I. for EXP(B)		
							Lower	Upper	
Step 1 <sup>a</sup>	Ηλικία	,035	,054	,409	1	,522	1,035	,931	1,151
	Rankin	1,191	,278	18,359	1	,000	3,291	1,909	5,676
	Αλκοόλ	-,163	,126	1,686	1	,194	,849	,664	1,087
	Constant	-4,279	4,185	1,045	1	,307	,014		
Step 2 <sup>a</sup>	Rankin	1,214	,277	19,247	1	,000	3,365	1,957	5,787
	Αλκοόλ	-,166	,127	1,695	1	,193	,847	,661	1,087
	Constant	-1,624	,394	16,957	1	,000	,197		
Step 3 <sup>a</sup>	Rankin	1,146	,256	20,016	1	,000	3,144	1,904	5,194
	Constant	-1,726	,388	19,801	1	,000	,178		

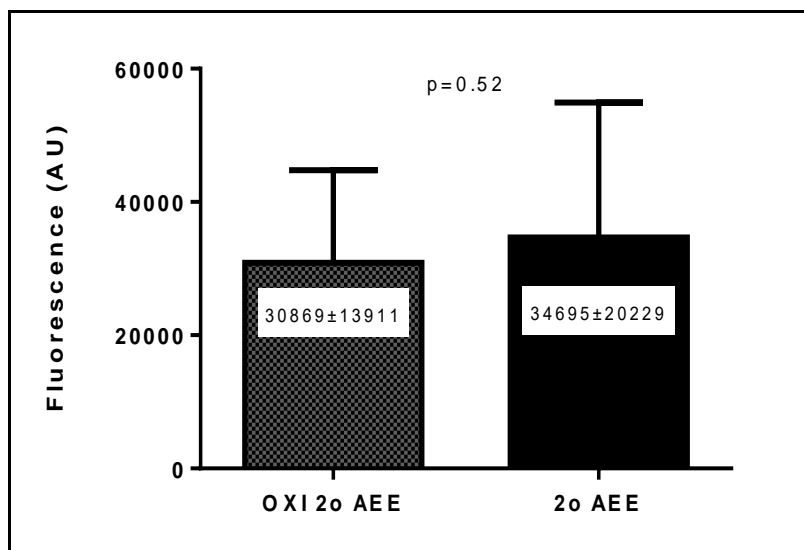
a. Variable(s) entered on step 1: Ηλικία, Rankin, Αλκοόλ.

### **6.7 Διερεύνηση της λειτουργικότητας της HDL ασθενών με ΑΕΕ ως προς τις αντιοξειδωτικές της ιδιότητες και η συσχέτισή της με την επανεμφάνιση νέου εγκεφαλικού επεισοδίου 1 έτος μετά το περιστατικό.**

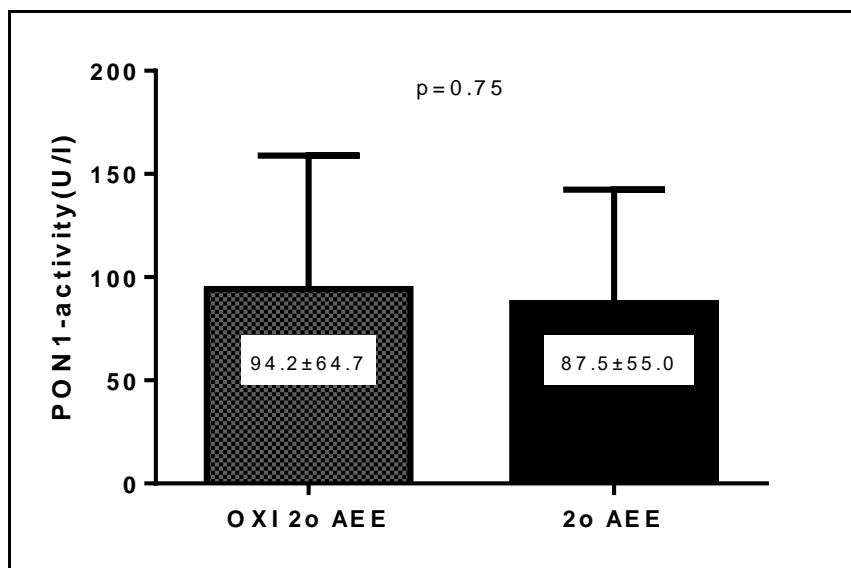
Οι ασθενείς που εμφάνισαν νέο ισχαιμικό αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο στο 1 έτος μετά την έξοδο από το νοσοκομείο είχαν παρόμοια αντιοξειδωτική ικανότητα όπως αυτή εκτιμήθηκε με τη δοκιμασία της διχλωροφλουορεσκειΐνης, DCF, με τους ασθενείς που δεν εμφάνισαν νέο ισχαιμικό αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο ( $34695 \pm 20229$  έναντι  $30869 \pm 13911$   $p = 0.52$ , Σχημ. 6.24) και παρόμοια δραστικότητα PON1 ( $87.5 \pm 55.0$  έναντι  $94.2 \pm 64.7$ ,  $p = 0.75$ , Σχημ. 6.25). Η συγκέντρωση της σχετιζόμενης με την HDL MPO επίσης δεν βρέθηκε να διαφέρει ανάμεσα στις 2 ομάδες ( $405.5 \pm 358.5$  έναντι  $415.3 \pm 333.5$ ,  $p = 0.59$ , Σχημ. 6.26) καθώς ούτε και ο λόγος MPO/PON1 βρέθηκε να διαφοροποιείται σημαντικά ανάμεσα στους ασθενείς που επανεμφάνισαν νέο αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο μετά από ένα έτος από το πρωταρχικό ( $5.7 \pm 5.4$  έναντι  $7.1 \pm 8.5$ ,  $p = 0.65$ , Σχημ. 6.27).

Οι ασθενείς που εμφάνισαν νέο ισχαιμικό αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο στο 1 έτος μετά την έξοδο από το νοσοκομείο είχαν μεγαλύτερη κατανάλωση αλκοόλ, υψηλότερη γλυκόζη και το αρχικό εγκεφαλικό επεισόδιο ήταν περισσότερο βαρύ σύμφωνα με την κλίμακα NIHSS σε σύγκριση με τους ασθενείς που δεν εμφάνισαν νέο ισχαιμικό αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο

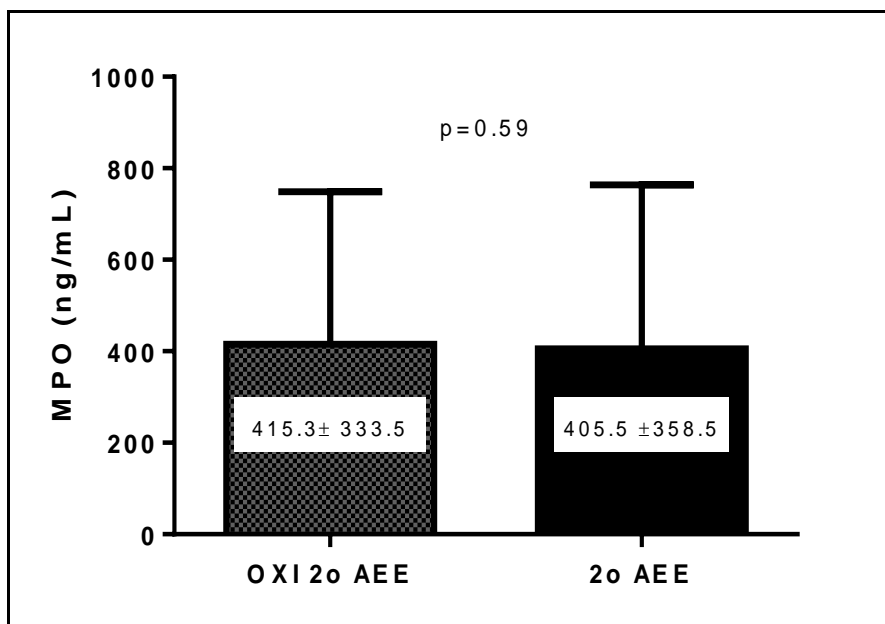
(Πιν. 6.10). Σε πολυπαραγοντική ανάλυση, ανεξάρτητοι προγνωστικοί δείκτες νέου ισχαιμικού αγγειακού εγκεφαλικού επεισοδίου ήταν η γλυκόζη (ΣΚ 1.012, 95% ΔΕ 1.001-1.023,  $p=0.031$ , Πιν.6.11).



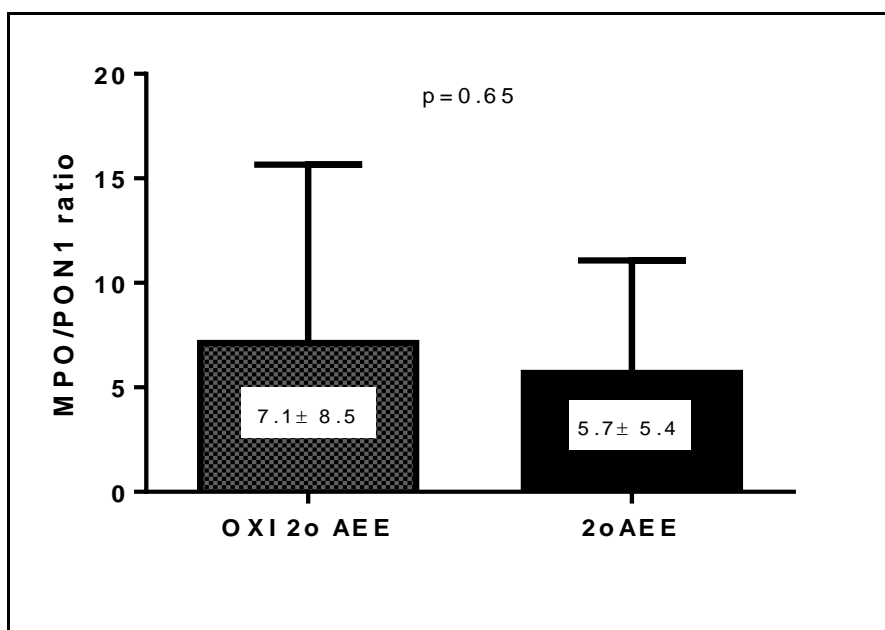
**Σχήμα 6.25** Η αντιοξειδωτική ικανότητα της HDL μέσω της δοκιμασίας DCF σε ασθενείς που επανεμφάνισαν εγκεφαλικό επεισόδιο και σε αυτούς που δεν εμφάνισαν 1 έτος μετά το ΑΕΕ. Η στατιστική σύγκριση μεταξύ των δύο ομάδων πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του μη παραμετρικού ελέγχου σημαντικότητας Mann-Whitney U test, όπου δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά,  $p>0.05$ .



**Σχήμα 6.26** Η δραστηριότητα της σχετιζόμενης με την HDL PON1 σε ασθενείς που επανεμφάνισαν εγκεφαλικό επεισόδιο και σε αυτούς που δεν εμφάνισαν 1 έτος μετά το ΑΕΕ. Η στατιστική σύγκριση μεταξύ των δύο ομάδων πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του μη παραμετρικού ελέγχου σημαντικότητας Mann-Whitney U test, όπου δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά,  $p>0.05$ .



**Σχήμα 6.27** Η συγκέντρωση της σχετιζόμενης με την HDL MPO σε ασθενείς που επανεμφάνισαν εγκεφαλικό επεισόδιο και σε αυτούς που δεν εμφάνισαν 1 έτος μετά το AEE. Η στατιστική σύγκριση μεταξύ των δύο ομάδων πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του μη παραμετρικού ελέγχου σημαντικότητας Mann-Whitney U test, όπου δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά,  $p > 0.05$ .



**Σχήμα 6.28** Η αναλογία MPO/PON1 σε ασθενείς που επανεμφάνισαν εγκεφαλικό επεισόδιο και σε αυτούς που δεν εμφάνισαν 1 έτος μετά το AEE. Η στατιστική σύγκριση μεταξύ των δύο ομάδων πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του μη παραμετρικού ελέγχου σημαντικότητας Mann-Whitney U test, όπου δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά,  $p > 0.05$ .

**Πίνακας 6.10 Κλινικά και εργαστηριακά χαρακτηριστικά για ασθενείς που εμφάνισαν νέο εγκεφαλικό επεισόδιο και για όσους δεν επανεμφάνισαν 1 χρόνο μετά το ΑΕΕ.** Τα δεδομένα εκφράζονται ως mean±SD για τις συνεχείς μεταβλητές και ως ποσοστό % για τις κατηγορικές μεταβλητές. Στατιστική σημαντική διαφορά θεωρήθηκε για  $p < 0.05$ , \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$

Χαρακτηριστικά	Εμφάνιση νέου επεισοδίου 1 έτος μετά (n=32)	Μη εμφάνιση νέου επεισοδίου 1 έτος μετά (n=105)	P
Ηλικία	79.1±6.5 (n=31)	78.7±5.7 (n=105)	0.74
Άντρες ,n (%)	37.5 (n=32)	41.9 (n=105)	0.66
BMI, (kg/m <sup>2</sup> )	27.6±3.8 (n=19)	26.7±4.6 (n=71)	0.45
Βάρος, kg	74.5±12.0 (n=20)	73.2±13.6 (n=77)	0.69
Παχυσαρκία (%)	21.1 (n=19)	19.7 (n=71)	0.96
Διαβήτης (%)	40.6 (n=32)	29.5 (n=105)	0.24
Υπέρταση (%)	87.5 (n=32)	85.7 (n=105)	0.80
Σφίξεις	79.5±14.03 (n=31)	75.4±15.8 (n=102)	0.07
ΣΑΠ	147.3±24.0 (n=32)	146.2±24.3 (n=105)	0.82
ΔΑΠ	80.72±14.0 (n=32)	78.7±9.9 (n=105)	0.40
Καρδιακή Ανεπ. (%)	31.3 (n=32)	19.0 (n=105)	0.14
Κολπ.Μαρμαρυγή (%)	50.0 (n=32)	36.2 (n=105)	0.16
Στεφ.Νόσος (%)	28.1 (n=32)	23.8 (n=105)	0.62
Οικ.Ιστορικό(%)	18.8 (n=32)	13.3 (n=105)	0.45
Κάπνισμα(νυν/τέως)	6.3/12.5 (n=32)	7.6/26.7 (n=105)	0.22
Αλκοόλ	0.29±1.3 (n=28)	1.5±4.8 (n=103)	<b>0.025*</b>
Rankin score	2.8±2.3 (n=24)	1.9±2.0 (n=88)	0.122
NIHSS	10.6±8.9 (n=28)	6.72±8.2 (n=90)	<b>0.006**</b>
Γλυκόζη, mg/dL	131.±54.0 (n=30)	108.8±33.5 (n=92)	<b>0.041*</b>
ΟΛ.Χοληστερόλη,mg/dL	174.4±42.6 (n=32)	180.0±48.9 (n=105)	0.60
HDL-C, mg/dL	45.9±13.6 (n=32)	47.21±15.7 (n=105)	0.80
LDL-C, mg/dL	107.3±37,5 (n=32)	109.4±42.3 (n=105)	0.80
Τριγλυκερίδια, mg/dL	106.6±47.2 (n=32)	116.5±47.3 (n=105)	0.19
ΑpoA-I mg/dL	136.8±63.7 (n=32)	142.7±59.5 (n=105)	0.52
Ουρικό οξύ,mg/dL	5.5±1,8 (n=30)	5.7±1.8 (n=93)	0.62
EGFR (mL/min/1.73m <sup>2</sup> )	60.69±19.01 (n=31)	63.3±18.2 (n=97)	0.49

**Πίνακας 6.11 Πολυπαραγοντική διωνυμική ανάλυση με εξαρτημένη μεταβλητή την επανεμφάνιση νέου ΑΕΕ μετά από 1 έτος.** Στο μοντέλο εισήχθησαν οι παράμετροι που ευρέθησαν στατιστικά σημαντικοί.

	B	S.E.	Wald	df	Sig.	Exp(B)	95% C.I. for EXP(B)		
							Lower	Upper	
Step 1 <sup>a</sup>	Αλκοόλ	-,167	,168	,988	1	,320	,846	,609	1,176
	Γλυκόζη	,010	,006	3,489	1	,062	1,010	,999	1,021
	NIHSS	,034	,027	1,614	1	,204	1,034	,982	1,090
Step 2 <sup>a</sup>	Constant	-2,594	,757	11,730	1	,001	,075		
	Γλυκόζη	,011	,006	3,907	1	,048	1,011	1,000	1,022
	NIHSS	,039	,027	2,118	1	,146	1,039	,987	1,095
Step 3 <sup>a</sup>	Constant	-2,828	,748	14,300	1	,000	,059		
	Γλυκόζη	<b>,012</b>	<b>,005</b>	<b>4,665</b>	<b>1</b>	<b>,031</b>	<b>1,012</b>	<b>1,001</b>	<b>1,023</b>
	Constant	-2,591	,709	13,341	1	,000	,075		

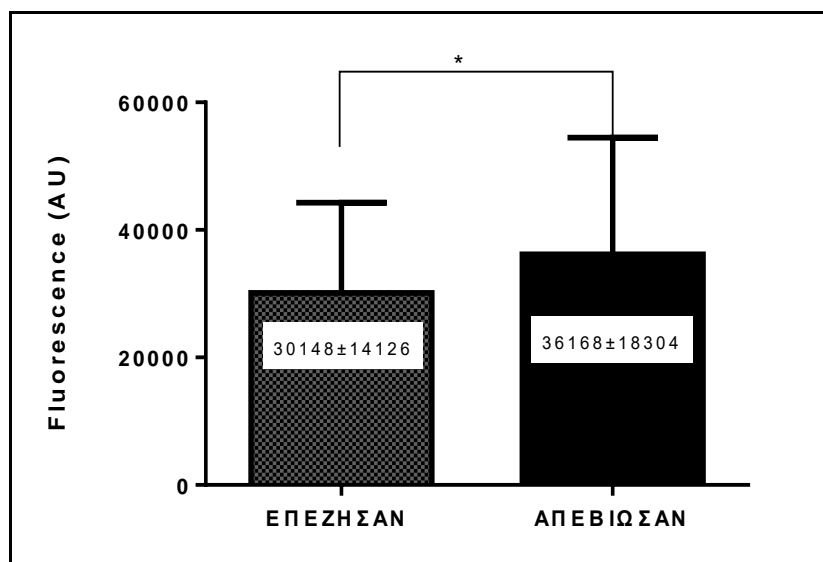
a. Variable(s) entered on step 1: Αλκοόλ, Γλυκόζη, NIHSS.

### **6.8 Διερεύνηση της λειτουργικότητας της HDL ασθενών με ΑΕΕ ως προς τις αντιοξειδωτικές της ιδιότητες και η συσχέτισή της με την θνητότητα 1 έτος μετά το περιστατικό.**

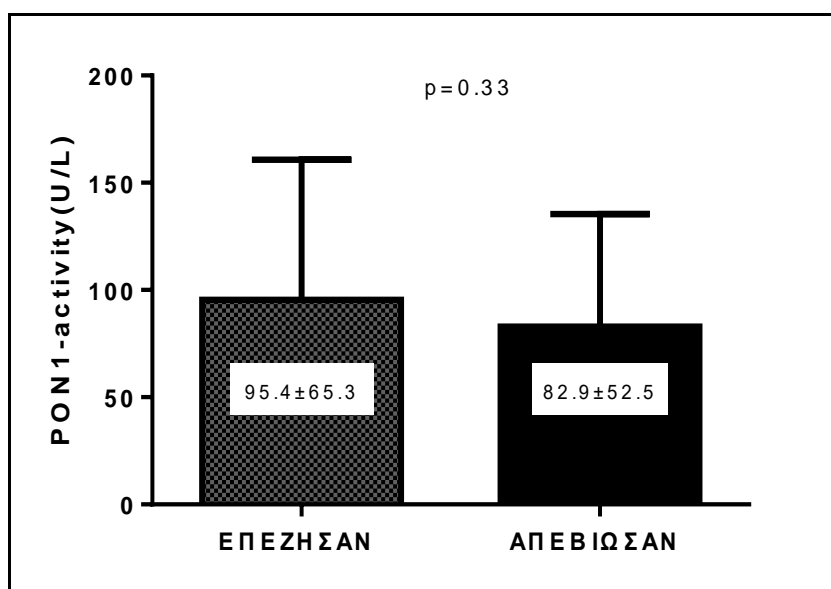
Οι ασθενείς που απεβίωσαν 1 έτος μετά την έξοδο από το νοσοκομείο είχαν μειωμένη αντιοξειδωτική ικανότητα όπως αυτή αξιολογήθηκε με τη μέθοδο της διχλωροφλουορεσκεΐνης, DCF συγκριτικά με τους ασθενείς που ήταν ζωντανοί 1 έτος μετά την έξοδο από το νοσοκομείο ( $36168 \pm 18304$  έναντι  $30148 \pm 14126$ ,  $p = 0.017$ , Σχημ. 6.28) ενώ η δραστικότητα της PON1 δε διέφερε μεταξύ των δύο ομάδων ( $82.9 \pm 52.5$  έναντι  $95.4 \pm 65.3$ ,  $p = 0.334$ , Σχημ. 6.29). Επιπλέον η συγκέντρωση της σχετιζόμενης με την HDL, MPO δεν βρέθηκε να διαφέρει ανάμεσα στις 2 ομάδες ( $445.7 \pm 355.2$  έναντι  $402.5 \pm 332.7$ ,  $p = 0.622$ , Σχημ. 6.30) όπως ούτε και η αναλογία MPO/PON1 ( $8.4 \pm 10.3$  έναντι  $6.4 \pm 7.0$   $p = 0.31$ , Σχημ. 6.31).

Οι ασθενείς που απεβίωσαν 1 έτος μετά την έξοδο από το νοσοκομείο ήταν οι περισσότεροι θηλυκού γένους, περισσότερο ηλικιωμένοι, είχαν μικρότερο δείκτη μάζας σώματος, περισσότερες Σφίξεις κατά την εισαγωγή, υψηλότερα επίπεδα γλυκόζης, χαμηλότερα επίπεδα τριγλυκεριδίων, χαμηλότερο ρυθμό σπειραματικής διήθησης και υψηλότερο Rankin score κατά την έξοδο τους από το νοσοκομείο σε σύγκριση με τους ασθενείς που ήταν

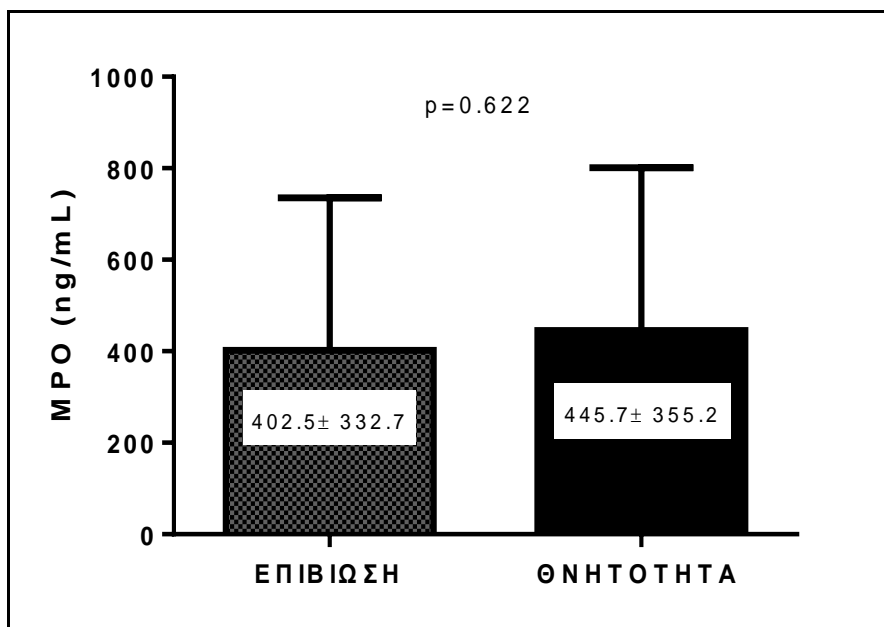
ζωντανοί 1 έτος μετά την έξοδο από το νοσοκομείο(Πιν.6.12). Σε πολυπαραγοντική ανάλυση, ανεξάρτητοι προγνωστικοί δείκτες θνητότητας 1 έτος μετά την έξοδο από το νοσοκομείο ήταν ο δείκτης μάζας σώματος (ΣΚ 0.82, 95% ΔΕ 0.7-0.97,  $p=0.022$ ) και το Rankin score κατά την έξοδο από το νοσοκομείο (relative risk 2.1, 95% confidence interval 1.34-3.20,  $p=0.001$ ) (Πιν.6.13)



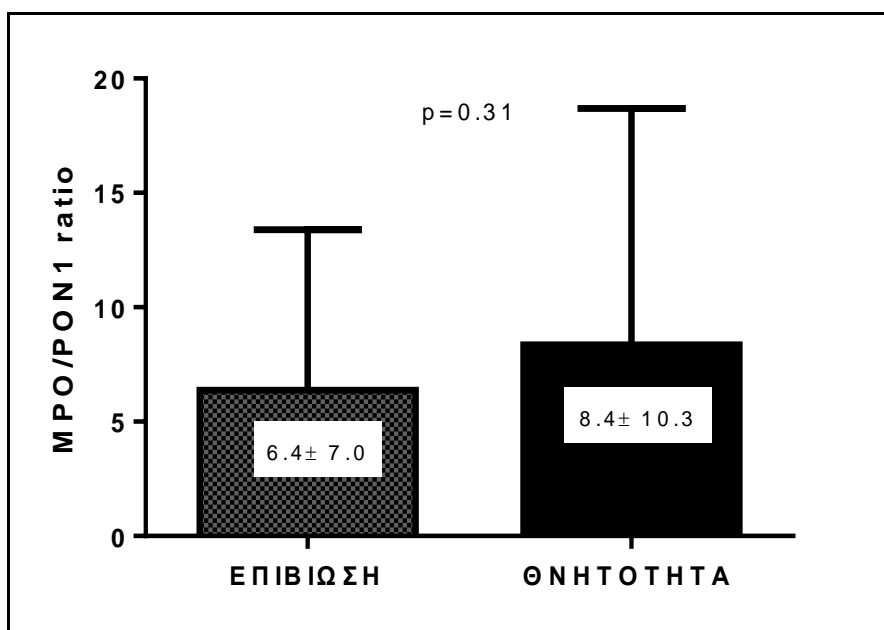
Σχήμα 6.29 Η αντιοξειδωτική ικανότητα της HDL μέσω της δοκιμασίας DCF σε ασθενείς που απεβίωσαν και σε ασθενείς που επέζησαν 1 έτος μετά το ΑΕΕ. Η στατιστική σύγκριση μεταξύ των δύο ομάδων πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του μη παραμετρικού ελέγχου σημαντικότητας Mann-Whitney U test,  $*p<0.05$



Σχήμα 6.30 Η δραστηριότητα της σχετιζόμενης με την HDL PON1 σε ασθενείς που απεβίωσαν και σε όσους επέζησαν 1 έτος μετά το ΑΕΕ. Η στατιστική σύγκριση μεταξύ των δύο ομάδων πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του μη παραμετρικού ελέγχου σημαντικότητας Mann-Whitney U test, όπου δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά,  $p>0.05$



**Σχήμα 6.31** Η συγκέντρωση της σχετιζόμενης με την HDL, MPO σε ασθενείς που απεβίωσαν και σε όσους επέζησαν 1 έτος μετά το ΑΕΕ. Η στατιστική σύγκριση μεταξύ των δύο ομάδων πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του μη παραμετρικού ελέγχου σημαντικότητας Mann-Whitney U test, όπου δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά,  $p > 0.05$



**Σχήμα 6.32** Η αναλογία MPO/PON1 σε ασθενείς που απεβίωσαν και σε όσους επέζησαν 1 έτος μετά το ΑΕΕ. Η στατιστική σύγκριση μεταξύ των δύο ομάδων πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του μη παραμετρικού ελέγχου σημαντικότητας Mann-Whitney U test, όπου δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά,  $p > 0.05$

**Πίνακας 6.12 Κλινικά και εργαστηριακά χαρακτηριστικά για ασθενείς που απεβίωσαν και για όσους επέζησαν 1 έτος μετά το ΑΕΕ.** Τα δεδομένα εκφράζονται ως mean± SD για τις συνεχείς μεταβλητές και ως ποσοστό % για τις κατηγορικές μεταβλητές. Στατιστική σημαντική διαφορά θεωρήθηκε για p<0.05, \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001

Χαρακτηριστικά	Απεβίωσαν 1 έτος μετά (n=37)	Επέζησαν ένα 1 έτος μετά (n=102)	P
Ηλικία	81.3±5.8 (n=36)	77.9±5.6 (n=102)	<b>0.003**</b>
Άντρες ,n (%)	27.0 (n=37)	47.1 (n=102)	<b>0.034*</b>
BMI,(kg/m <sup>2</sup> )	24.1±5.0 (n=21)	27.7±3.9 (n=71)	<b>0.001**</b>
Βάρος, kg	65.5±15.1 (n=35)	75.7±11.7 (n=78)	<b>0.001**</b>
Παχυσαρκία (%)	19.0 (n=21)	21.1 (n=71)	<b>0.008**</b>
Διαβήτης (%)	35.1 (n=37)	31.4 (n=102)	0.675
Υπέρταση (%)	83.8 (n=37)	87.3 (n=102)	0.599
Σφίξεις	81.7 ±16.7 (n=35)	74.5±14.5 (n=100)	<b>0.013</b>
ΣΑΠ	145.7±25.9 (n=37)	147.0±23.5 (n=102)	0.572
ΔΑΠ	80.5±13.2 (n=37)	79.0±10.2 (n=102)	0.553
Καρδιακή Ανεπ.(%)	32.4 (n=37)	17.6 (n=102)	<b>0.061*</b>
Κολπ.Μαρμαρυγή (%)	51.4 (n=37)	34.3 (n=102)	0.069
Στεφ.Νόσος (%)	24.3 (n=37)	24.5 (n=102)	0.982
Οικ.Ιστορικό (%)	13.5 (n=37)	15.7 (n=102)	0.752
Κάπνισμα (νυν/τέως)	8.1/13.5 (n=37)	6.9/26.5 (n=102)	
Αλκοόλ	0.85±3.82 (n=33)	1.41±4.5 (n=100)	0.52
Rankin score	3.96±1.6 (n=26)	1.59±1.9 (n=88)	<b>&lt;0.001***</b>
Γλυκόζη, mg/dL	131.5±48.8 (n=34)	108.0±34.9 (n=90)	<b>0.012*</b>
Ολ.Χοληστερόλη,mg/dL	168.9±43.2 (n=37)	181.9±48.2 (n=102)	0.150
HDL-C, mg/dL	46.16±15.1 (n=37)	47.1±15.3 (n=102)	0.769
LDL-C, mg/dL	102.9±40.2 (n=37)	110.9±41.2 (n=102)	0.392
Τριγλυκερίδια, mg/dL	99.7±43.9 (n=37)	119.5±47.2 (n=102)	<b>0.010*</b>
ΑpoA-I mg/dL	127.4±57.5 (n=37)	147.1±30.3 (n=102)	0.087
Ουρικό οξύ,mg/dL	5.8±2.0 (n=35)	5.5±1.7 (n=90)	0.205
EGFR (mL/min/1.73m <sup>2</sup> )	57.1±18,0 (n=35)	65.3±18.2 (n=95)	<b>0.025*</b>



**Πίνακας 6.13 Πολυπαραγοντική διωνυμική ανάλυση με εξαρτημένη μεταβλητή τη θνητότητα 1 έτος μετά το ΑΕΕ.** Στο μοντέλο εισήχθησαν οι μεταβλητές που παρουσίαζαν στατιστικά σημαντική διαφορά από τη συγκριτική διερεύνηση και παρουσιάζεται το τελικό μοντέλο της ανάλυσης.

	B	S.E.	Wald	df	Sig.	Exp(B)	95% C.I. for EXP(B)	
							Lower	Upper
Step 6 <sup>a</sup> BMI	-,195	,085	5,222	1	,022	,823	,696	,973
Rankin score	,727	,223	10,679	1	,001	2,069	1,338	3,201
EGFR	-,044	,023	3,791	1	,052	,957	,916	1,000
Constant	4,418	2,698	2,680	1	,102	82,908		

a. Variable(s) entered on step 1: BMI, Σφίξεις, Rankin score, Γλυκόζη, Τριγλυκερίδια, Ηλικία , EGFR, Φύλο.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7

### Συμπεράσματα - Συζήτηση

#### 7.1 Αξιολόγηση των αποτελεσμάτων της μελέτης

Τα χαμηλά επίπεδα της HDL-C έχουν συσχετιστεί με την ανάπτυξη καρδιαγγειακών νοσημάτων και αποτελούν παράγοντα κινδύνου για την εμφάνιση εγκεφαλικών αγγειακών επεισοδίων [278]. Προηγούμενες μελέτες έχουν ήδη συσχετίσει τα επίπεδα HDL-C με το εγκεφαλικό επεισόδιο. Σε μερικές μελέτες έχει βρεθεί ότι τα χαμηλά επίπεδα HDL-C σχετίζονται με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης εγκεφαλικού [279-280] ενώ, μερικές άλλες δεν έχουν βρει κάποια συσχέτιση [281-283]. Ωστόσο είναι πλέον γνωστό ότι πέρα από την ποσότητα της HDL-C η σύστασή της και η λειτουργικότητά της είναι μεγαλύτερης σημασίας σε χρόνιες και παθολογικές καταστάσεις. Για παράδειγμα στο διαβήτη τύπου 2 και στο μεταβολικό σύνδρομο η HDL καθίσταται δυσλειτουργική παρουσιάζοντας μειωμένη ικανότητα προστασίας του ενδοθηλίου συγκρινόμενη με εκείνη υγιών ατόμων [284]. Εκτός από την κύρια συμμετοχή της στην ανάστροφη μεταφορά χοληστερόλης, η HDL διαδραματίζει επίσης μια σειρά από αντιοξειδωτικές, αντιφλεγμονώδεις, αντιαποπρωτικές δράσεις οι οποίες οφείλονται στα συστατικά από τα οποία αποτελείται. Η εγκεφαλική βλάβη ύστερα από ένα ισχαιμικό εγκεφαλικό αναπτύσσεται μέσω μίας πολύπλοκης σειράς παθοφυσιολογικών γεγονότων συμπεριλαμβανομένων του οξειδωτικού στρες και της φλεγμονής [285]. Σε πειραματικές μελέτες έχει δείχθει αυξημένη δημιουργία ελεύθερων ριζών κατά τη διάρκεια της αγγειακής ισχαιμικής βλάβης [286-287]. Παρόλα αυτά, τα δεδομένα αναφορικά με τη λειτουργικότητα της HDL σε ασθενείς με οξύ ισχαιμικό εγκεφαλικό είναι ακόμα περιορισμένα. Στην παρούσα μελέτη εξετάσαμε τη λειτουργικότητα της HDL ως προς τις αντιοξειδωτικές της ικανότητες σε 199 ασθενείς που έχουν υποστεί οξύ ισχαιμικό αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο και τη συσχέτισή της με τη βαρύτητα του περιστατικού και με την έκβαση του περιστατικού τόσο κατά την έξοδο των ασθενών από το νοσοκομείο όσο και μετά το πέρας ενός έτους. Μελετώντας τις αντιοξειδωτικές ιδιότητες της HDL καταλήξαμε στο γενικό συμπέρασμα ότι η μειωμένη αντιοξειδωτική ικανότητα της HDL σχετίζεται με τη βαρύτητα του οξέος ισχαιμικού εγκεφαλικού επεισοδίου.

### 7.1.1 Προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής ικανότητας της HDL με τη μέθοδο της διχλωροφλουορεσκεΐνης (δοκιμασία DCF)

Ο ρόλος της οξειδωτικής βλάβης των λιποπρωτεϊνών στο ανθρώπινο κεντρικό νευρικό σύστημα (ΚΝΣ) και το εγκεφαλικό επεισόδιο δεν είναι εντελώς αποσαφηνισμένος. Η ισχαιμική εγκεφαλική βλάβη είναι σαφώς συνδεδεμένη με τη ρήξη του αιματοεγκεφαλικού φραγμού αυξάνοντας τη δυνατότητα έκθεσης του ΚΝΣ στις λιποπρωτεΐνες του πλάσματος [288]. Σε πλάσμα απομονωμένο από ασθενείς με εγκεφαλικό έχουν παρατηρηθεί υψηλά επίπεδα προϊόντων λιπιδικής και πρωτεϊνικής οξειδωσης σε σύγκριση με υγιή άτομα υποδεικνύοντας ότι κατά το εγκεφαλικό επεισόδια συμβαίνει οξειδωτική βλάβη [289-292]. Τα αυξημένα επίπεδα oxLDL στο πλάσμα ασθενών υποστηρίζουν την άποψη για το σημαντικό ρόλο που διαδραματίζει η υπεροξειδωση των λιποπρωτεϊνών στο εγκεφαλικό επεισόδιο [293]. Η HDL διαθέτει στο μόριο της πολλά συστατικά που της προσδίδουν αντιοξειδωτική δράση (Ενότητα 3.2.5) αλλά έχειδειχθεί ότι σε συνθήκες φλεγμονής και οξειδωτικού στρες είναι δυνατόν να μειωθούν οι προστατευτικές ιδιότητες της HDL. Στην παρούσα μελέτη θέλαμε να προσδιορίσουμε την συνολική αντιοξειδωτική ικανότητα της HDL σε ασθενείς με ΑΕΕ και τη συσχέτιση της με τη βαρύτητα και την έκβαση του περιστατικού. Η δοκιμασία DCF που χρησιμοποιήσαμε βασισμένη στην αρχική δημοσίευση του Navab et al [276] εκτιμάει την ικανότητα της HDL να απενεργοποιεί την oxLDL. Η ποσότητα HDL που χρησιμοποιήθηκε ήταν κανονικοποιημένη ως προς την HDL-C. Παρατηρήσαμε αρχικά ότι η αντιοξειδωτική ικανότητα της HDL σχετίστηκε αρνητικά με την συγκέντρωση της HDL-C ( $r = -0.374$ ,  $p < 0.001$ ). Στη συνέχεια, εξετάσαμε τη σχέση της με τη βαρύτητα του περιστατικού η οποία αξιολογήθηκε με την κλίμακα NIHSS και παρατηρήσαμε ότι η αντιοξειδωτική ικανότητα της HDL μετρούμενη με τη μέθοδο DCF σχετίστηκε αρνητικά με την κλίμακα βαρύτητας NIHSS ( $r = -0.2554$ ,  $p = 0.0006$ ). Παρατηρήθηκε επίσης ότι οι ασθενείς με βαρύ ισχαιμικό αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο ( $\text{NIHSS} \geq 5$ ) είχαν μειωμένη αντιοξειδωτική ικανότητα σε σχέση με τους ασθενείς με ήπιο αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο ( $39044.3 \pm 32552.9$  έναντι  $28422.9 \pm 10361.5$ ,  $p = 0.002$ ). Η έκβαση του περιστατικού περιελάμβανε την εξάρτηση των ασθενών κατά την έξοδο τους από το νοσοκομείο, την ενδονοσοκομειακή θνητότητα, και την έκβαση των ασθενών ένα έτος μετά την έξοδο τους από το

νοσοκομείο. Μετά το πέρας ενός έτους αξιολογήθηκε εξάρτηση των ασθενών, η επανεμφάνιση νέου ισχαιμικού αγγειακού εγκεφαλικού επεισοδίου και η θνητότητα. Παρατηρήσαμε ότι οι ασθενείς με εξάρτηση κατά την έξοδο τους από το νοσοκομείο είχαν επίσης μειωμένη αντιοξειδωτική ικανότητα σε σύγκριση με τους ασθενείς που ήταν ανεξάρτητοι κατά την έξοδο από το νοσοκομείο ( $35138.2 \pm 18151.6$  έναντι  $27255.9 \pm 9137.2$ ,  $p < 0.001$ ) αλλά μεταξύ όσων απεβίωσαν ενδονοσοκομειακά και όσων επέζησαν δεν βρέθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά ( $4560.8 \pm 38275.4$  έναντι  $32485.3 \pm 22006.8$ ,  $p=0.257$ ), πιθανόν εξαιτίας του μικρού αριθμού δειγμάτων των ασθενών που απεβίωσαν ( $n=15$ ). Από την παρακολούθηση ενός έτους μετά την έξοδο παρατηρήθηκε ότι οι ασθενείς που ήταν εξαρτημένοι ένα έτος μετά την έξοδο τους από το νοσοκομείο είχαν παρόμοια αντιοξειδωτική ικανότητα με τους ασθενείς που ήταν ανεξάρτητοι ( $31870 \pm 17832$  έναντι  $28676 \pm 9877$ ,  $p = 0.53$ ), οι ασθενείς που εμφάνισαν νέο ισχαιμικό αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο στο ένα έτος μετά την έξοδο από το νοσοκομείο είχαν παρόμοια αντιοξειδωτική ικανότητα με τους ασθενείς που δεν εμφάνισαν ( $34695.6 \pm 20228.8$  έναντι  $30868.7 \pm 13911.3$ ,  $p = 0.52$ ) και ασθενείς που απεβίωσαν 1 έτος μετά την έξοδο από το νοσοκομείο είχαν μειωμένη αντιοξειδωτική ικανότητα από τους ασθενείς που ήταν ζωντανοί ένα έτος μετά την έξοδο από το νοσοκομείο ( $36168.3 \pm 18303.9$  έναντι  $30147.8 \pm 14126.0$ ,  $p = 0.017$ ). Από τα ανωτέρω ευρήματα εξάγαμε το συμπέρασμα ότι η μειωμένη αντιοξειδωτική ικανότητα της HDL σχετίζεται με πιο βαρύ οξύ ισχαιμικό εγκεφαλικό επεισόδιο.

### **7.1.2 Προσδιορισμός δραστικότητας της σχετιζόμενης με την HDL PON1**

Η σχετιζόμενη με HDL PON1 έχει δειχθεί από πολλές μελέτες ότι ασκεί αντιοξειδωτική δράση και έχει προστατευτική επίδραση ενάντια στην αθηροσκλήρωση και στην οξειδωτική καταστροφή [238,239,251,252]. Επιπλέον, πλήθος μελετών έχουν καταδείξει ότι η προστατευτική ικανότητα της PON1 ενάντια στην οξείδωση μειώνεται σε παθολογικές καταστάσεις όπου η HDL καθίσταται δυσλειτουργική [294-297]. Στην παρούσα μελέτη στόχος μας ήταν να βρούμε εάν υπάρχει συσχέτιση της δραστικότητας της PON1 με τη βαρύτητα και την έκβαση του οξέος ισχαιμικού εγκεφαλικού επεισοδίου. Αρχικά παρατηρήσαμε ότι η συγκέντρωση της HDL-C σχετίστηκε θετικά με τη δραστικότητα της PON1 της σχετιζόμενης με HDL ( $r = 0.1395$ ,  $p =$

0.049) και εν συνεχεία, προχωρήσαμε σε διερεύνηση της σχέσης της δραστηριότητας της σχετιζόμενης με HDL PON1 και της κλίμακας βαρύτητας του εγκεφαλικού επεισοδίου NIHSS σύμφωνα με την οποία δεν υπήρξε μεταξύ τους συσχέτιση ( $r = -0.0786$   $p = 0.256$ ). Η σύγκριση των ασθενών με βαρύ εγκεφαλικό με εκείνους με ελαφρύ κατέδειξε ότι οι δεν υπήρχε στατιστικά σημαντική διαφορά στη δραστηριότητα της σχετιζόμενης με HDL PON1 ( $93.9 \pm 67.9$  έναντι  $94.6 \pm 60.1$ ,  $p = 0.51$ ). Στους ασθενείς που ήταν εξαρτημένοι κατά την έξοδο από το νοσοκομείο επίσης δεν παρατηρήθηκε διαφορά σε σχέση με τους ανεξάρτητους ασθενείς. ( $90.8 \pm 67.1$  έναντι  $101.2 \pm 63.9$ ,  $p = 0.101$ ). Επίσης και στους ασθενείς που απεβίωσαν κατά τη διάρκεια της νοσηλείας δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με εκείνους που έλαβαν εξιτήριο ( $132.5 \pm 91.5$  έναντι  $94.8 \pm 64.8$ ,  $p = 0.12$ ). Οι ασθενείς που ήταν εξαρτημένοι ένα έτος μετά την έξοδο από το νοσοκομείο παρατηρήθηκε παρόμοια δραστηριότητα της σχετιζόμενης με HDL PON1 με όσους ασθενείς ήταν ανεξάρτητοι ένα έτος μετά ( $90.5 \pm 70.7$  έναντι  $99.6 \pm 60.7$ ,  $p = 0.097$ ). Οι ασθενείς που εμφάνισαν νέο ισχαιμικό αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο στο ένα έτος μετά την έξοδο από το νοσοκομείο επίσης είχαν παρόμοια δραστηριότητα της σχετιζόμενης με HDL PON1 με εκείνους που δεν επανεμφάνισαν ΑΕΕ ( $87.5 \pm 55.0$  έναντι  $94.2 \pm 64.7$ ,  $p = 0.75$ ). Τέλος, στους ασθενείς που απεβίωσαν ένα έτος μετά την έξοδο από το νοσοκομείο και σε όσους επέζησαν επίσης δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στη δραστηριότητα της σχετιζόμενης με HDL PON1 ( $82.9 \pm 52.5$  έναντι  $95.4 \pm 65.3$ ,  $p = 0.334$ ). Από τα ανωτέρω ευρήματα φαίνεται στην παρούσα μελέτη ότι η δραστηριότητα της σχετιζόμενης με την HDL PON1 δεν σχετίζεται με τη βαρύτητα του περιστατικού καθώς και ούτε με την έκβαση του περιστατικού.

### **7.1.3 Προσδιορισμός της σχετιζόμενης με την HDL μυελοϋπεροξειδάση MPO**

Η MPO όπως έχει ήδη αναφερθεί είναι ένα ένζυμο που συμμετέχει την άμυνα του οργανισμού εναντίον παθογόνων μικροοργανισμών και επίσης μπορεί να τροποποιεί την HDL στοχεύοντας κυρίως την apoA-I και κατ'επέκτασιν να αλλοιώνει τις προστατευτικές ιδιότητες της HDL καθιστώντας την δυσλειτουργική. Ο Hazen και οι συνεργάτες του έχουν δείξει ότι τα επίπεδα της MPO στο αίμα είναι υψηλότερα σε ασθενείς με καρδιακές διαταραχές σε

σύγκριση με υγιείς [298]. Επιπλέον όπως έχει αναφερθεί παραπάνω (Ενότητα 3.2.5) ο λόγος των σχετιζόμενων με την HDL ενζύμων MPO/PON1 φαίνεται να είναι πιθανός δείκτης δυσλειτουργίας της HDL σε ασθενείς με ΣΝ [256]. Σκοπός μας ήταν να δούμε τα επίπεδα της σχετιζόμενης με την HDL MPO στους ασθενείς με ΑΕΕ και την αναλογία MPO/PON1 καθώς και τη συσχέτιση τους με τη βαρύτητα και την έκβαση του εγκεφαλικού επεισοδίου. Αρχικά, παρατηρήθηκε ότι τα επίπεδα της σχετιζόμενης με HDL, MPO δεν παρουσίασαν συσχέτιση με τα επίπεδα της HDL-C. Κατά τη διερεύνηση της βαρύτητας του περιστατικού παρατηρήθηκε ότι η συγκέντρωση της σχετιζόμενης με HDL MPO σχετίστηκε θετικά με την κλίμακα βαρύτητας NIHSS ( $r = 0.2412$ ,  $p = 0.0015$ ) όπως θετικά σχετίστηκε και ο λόγος MPO/PON1 ( $r = 0.226$ ,  $p = 0.003$ ). Οι ασθενείς με βαρύ εγκεφαλικό επεισόδιο είχαν αυξημένα επίπεδα της σχετιζόμενης με HDL MPO σε σύγκριση με εκείνους με ελαφρύ ( $455.9 \pm 323.0$  έναντι  $365.6 \pm 304.8$ ,  $p = 0.024$ ) και επίσης αυξημένος ήταν και ο λόγος MPO/PON1 ( $8.23 \pm 9.30$  έναντι  $5.67 \pm 6.66$ ,  $p = 0.035$ ). Η διερεύνηση για την έκβαση του επεισοδίου έδειξε πως οι εξαρτημένοι ασθενείς κατά την έξοδο τους από το νοσοκομείο είχαν αυξημένα επίπεδα της σχετιζόμενης με HDL MPO σε σύγκριση με εκείνους που ήταν ανεξάρτητοι ( $433.3 \pm 271.6$  έναντι  $383.2 \pm 370.4$ ,  $p = 0.0412$ ). Επίσης, ο λόγος MPO/PON1 στους εξαρτημένους ασθενείς ήταν υψηλότερος ( $8.34 \pm 9.27$  έναντι  $5.34 \pm 6.54$ ,  $p = 0.010$ ). Όσον αφορά την ενδονοσοκομειακή θνητότητα, οι ασθενείς που κατέληξαν φάνηκε να έχουν υψηλότερα επίπεδα της σχετιζόμενης με HDL MPO συγκριτικά με όσους επέζησαν ( $568.5 \pm 272$  έναντι  $399.3 \pm 293.8$ ,  $p = 0.0432$ ), αλλά ο λόγος MPO/PON1 δεν βρέθηκε να διαφέρει στατιστικά σημαντικά στις 2 δύο ομάδες ( $6.26 \pm 8.95$  έναντι  $6.99 \pm 8.23$ ,  $p = 0.34$ ). Η διερεύνηση ένα έτος μετά την έξοδο των ασθενών από το νοσοκομείο κατέδειξε ότι οι εξαρτημένοι ασθενείς ένα έτος μετά και οι ανεξάρτητοι είχαν παρόμοια επίπεδα της σχετιζόμενης με HDL MPO ( $414.3 \pm 297.6$  έναντι  $392.5 \pm 362.3$ ,  $p = 0.40$ ) καθώς επίσης ούτε ο λόγος MPO/PON1 βρέθηκε να διαφοροποιείται σημαντικά ανάμεσα στους εξαρτημένους και στους ανεξάρτητους ένα έτος μετά ( $7.16 \pm 7.0$  έναντι  $5.7 \pm 7.0$ ,  $p = 0.135$ ). Οι ασθενείς που επανεμφάνισαν οξύ ισχαιμικό εγκεφαλικό επεισόδιο ένα έτος μετά είχαν παρόμοια επίπεδα της σχετιζόμενης με HDL MPO συγκριτικά με όσους δεν επανεμφάνισαν ( $405.5 \pm 358.5$  έναντι  $415.3 \pm 333.5$ ,  $p = 0.59$ ) και παρόμοια αναλογία MPO/PON1 ( $5.7 \pm 5.4$  έναντι  $7.1 \pm 8.5$ ,  $p = 0.65$ ). Επιπλέον, και στους

ασθενείς που απεβίωσαν ένα έτος μετά το περιστατικό σε σχέση με όσους επέζησαν δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά της σχετιζόμενης με HDL MPO ( $445.7 \pm 355.2$  έναντι  $402.5 \pm 332.7$ ,  $p=0.622$ ) ούτε και του λόγου MPO/PON1 ( $8.4 \pm 10.3$  έναντι  $6.4 \pm 7.0$   $p=0.31$ ). Από τις ανωτέρω παρατηρήσεις φαίνεται πως η συγκέντρωση της σχετιζόμενης με HDL MPO καθώς και ο λόγος MPO/PON1 δε συσχετίζεται με τη μακροπρόθεσμη έκβαση, αλλά φαίνεται ότι συσχετίζεται με τη βαρύτητα του οξέος ισχαιμικού εγκεφαλικού επεισοδίου και με την έκβαση του κατά τη χρονική στιγμή του συμβάντος.

#### 7.1.4 Πολυπαραγοντική ανάλυση

Τα κλινικο-εργαστηριακά και τα δημογραφικά χαρακτηριστικά των ασθενών αξιολογήθηκαν στατιστικά ώστε να αναδειχθούν οι παράγοντες που αναμιγνύονται στην βαρύτητα και στην έκβαση του οξέος ισχαιμικού εγκεφαλικού επεισοδίου. Από την στατιστική ανάλυση καταλήξαμε στα παρακάτω συμπεράσματα:

1. ασθενείς με βαρύ οξύ ισχαιμικό εγκεφαλικό ήταν συχνότερα γυναίκες είχαν υψηλότερα επίπεδα γλυκόζης στο αίμα, κατανάλωναν περισσότερο αλκοόλ και είχαν χαμηλότερο ρυθμό σπειραματικής διήθησης (Πιν.6.2). Σε πολυπαραγοντική ανάλυση, ανεξάρτητοι παράγοντες κινδύνου για τη βαρύτητα του ΑΕΕ ήταν το θήλυ φύλο (σχετικός κίνδυνος (ΣΚ) 2.8, 95% διάστημα εμπιστοσύνης (ΔΕ) 1.34-5.69,  $p=0.005$ ), το σήμα φθορισμού (ΣΚ 1.03, 95% ΔΕ 1.00-1.06,  $p=0.024$ ) και τα επίπεδα γλυκόζης (ΣΚ 1.01, 95% ΔΕ 1.00-1.02,  $p=0.08$ ) (Πιν.6.3)
2. οι εξαρτημένοι ασθενείς κατά την έξοδό τους από το νοσοκομείο ήταν περισσότερο ηλικιωμένοι έναντι των ανεξάρτητων, παρουσίασαν περισσότερες σφίξεις, είχαν υψηλότερη συγκέντρωση γλυκόζης και συγκέντρωσαν μεγαλύτερη βαθμολογία στην κλίμακα βαρύτητας NIHSS (Πιν. 6.4). Σε πολυπαραγοντική ανάλυση, ανεξάρτητοι προγνωστικοί δείκτες εξάρτησης κατά την έξοδο από το νοσοκομείο ήταν η ηλικία (ΣΚ 1.012, 95% ΔΕ 1.01-1.2,  $p=0.03$ ) και η NIHSS κατά την εισαγωγή (ΣΚ 1.47, 95% ΔΕ 1.25-1.74,  $p<0.001$ ) (Πιν. 6.5).
3. Οι ασθενείς που απεβίωσαν κατά τη διάρκεια της νοσηλείας είχαν πιο συχνά κολπική μαρμαρυγή και είχαν μικρότερο δείκτη μάζας σώματος και υψηλότερη NIHSS από τους ασθενείς που έλαβαν εξιτήριο (Πιν.

- 6.6). Σε πολυπαραγοντική ανάλυση, ανεξάρτητοι προγνωστικοί δείκτες ενδονοσοκομειακής θνητότητας ήταν ο ήταν ο δείκτης μάζας σώματος (ΣΚ 0.82, 95% ΔΕ 0.66-1.02,  $p=0.08$ ) και η NIHSS κατά την εισαγωγή (ΣΚ 1.16, 95% ΔΕ 1.06-1.27,  $p=0.002$ )(Πιν. 6.7).
4. Οι ασθενείς που ήταν εξαρτημένοι 1 έτος μετά την έξοδο από το νοσοκομείο ήταν περισσότερο ηλικιωμένοι, είχαν χαμηλότερη συγκέντρωση γλυκόζης και είχαν υψηλότερο Rankin score κατά την έξοδο από το νοσοκομείο σε σύγκριση με τους ασθενείς που ήταν ανεξάρτητοι 1 έτος μετά την έξοδο από το νοσοκομείο (Πιν. 6.8). Σε πολυπαραγοντική ανάλυση, ο μόνος ανεξάρτητος προγνωστικός δείκτης εξάρτησης 1 έτος μετά την έξοδο από το νοσοκομείο ήταν το Rankin score κατά την έξοδο από το νοσοκομείο (ΣΚ 3.15, 95% ΔΕ 1.9-5.2,  $p<0.001$ )(Πιν.6.9).
  5. Οι ασθενείς που εμφάνισαν νέο ισχαιμικό αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο 1 έτος μετά την έξοδο από το νοσοκομείο είχαν μεγαλύτερη κατανάλωση αλκοόλ, υψηλότερα επίπεδα γλυκόζης και το αρχικό εγκεφαλικό επεισόδιο ήταν περισσότερο βαρύ σύμφωνα με την κλίμακα NIHSS σε σύγκριση με τους ασθενείς που δεν εμφάνισαν νέο ισχαιμικό αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο (Πιν.6.10). Σε πολυπαραγοντική ανάλυση, ανεξάρτητοι προγνωστικοί δείκτες νέου ισχαιμικού αγγειακού εγκεφαλικού επεισοδίου ήταν τα επίπεδα γλυκόζης (ΣΚ 1.012, 95% ΔΕ 1.001-1.023,  $p=0.031$ , Πιν.6.11).
  6. Οι ασθενείς που απεβίωσαν 1 έτος μετά την έξοδο από το νοσοκομείο ήταν οι περισσότεροι θηλυκού γένους, περισσότερο ηλικιωμένοι, είχαν μικρότερο δείκτη μάζας σώματος, περισσότερες σφίξεις κατά την εισαγωγή, υψηλότερα επίπεδα γλυκόζης, χαμηλότερα επίπεδα τριγλυκεριδίων, χαμηλότερο ρυθμό σπειραματικής διήθησης και υψηλότερο Rankin score κατά την έξοδο τους από το νοσοκομείο σε σύγκριση με τους ασθενείς που ήταν ζωντανοί 1 έτος μετά την έξοδο από το νοσοκομείο (Πιν.6.12). Σε πολυπαραγοντική ανάλυση, ανεξάρτητοι προγνωστικοί δείκτες θνητότητας 1 έτος μετά την έξοδο από το νοσοκομείο ήταν ο δείκτης μάζας σώματος (ΣΚ 0.82, 95% ΔΕ 0.7-0.97,  $p=0.022$ ) και το Rankin score κατά την έξοδο από το νοσοκομείο (ΣΚ 2.1, 95% ΔΕ 1.34-3.20,  $p=0.001$ )(Πιν.6.13).



**Συμπεράσματα:** Τα ευρήματα της παρούσας εργασίας μας οδηγούν στο συμπέρασμα ότι η μειωμένη αντιοξειδωτική ικανότητα της HDL σχετίζεται με τη βαρύτητα του οξέος ισχαιμικού εγκεφαλικού επεισοδίου και μάλιστα αποτελεί ανεξάρτητο παράγοντα κινδύνου για την εμφάνιση βαρέως εγκεφαλικού επεισοδίου. Το παραπάνω συμπέρασμα είναι σε συμφωνία με δεδομένα άλλων μελετών που υποστηρίζουν την άποψη ότι η HDL καθίσταται δυσλειτουργική σε πολλές παθολογικές καταστάσεις. Μελετώντας τις σχετιζόμενες με την HDL, PON1 και MPO, δύο συστατικά που εμπλέκονται στην οξειδωση, είδαμε πως η δραστικότητα της PON1 δεν διέφερε στις ομάδες ελέγχου της εργασίας μας (ασθενείς με βαρύ εγκεφαλικό συγκρινόμενοι με εκείνους με ελαφρύ εγκεφαλικό) γεγονός που ενισχύει τις αντικρουόμενες απόψεις κατά πόσο το συγκεκριμένο ένζυμο θα μπορούσε να αποτελέσει μέτρο λειτουργικότητας της HDL. Επιπλέον, τα επίπεδα της MPO ήταν αυξημένα στους ασθενείς με βαρύ επεισόδιο γεγονός που συνάδει με τη βιβλιογραφία που υποστηρίζει τα αυξημένα της επίπεδα σε παθολογικές καταστάσεις. Φαίνεται από τα ανωτέρω, ότι μελλοντικά θα αποτελούσε στόχο να αποσαφηνίσουμε τους μηχανισμούς οι οποίοι επιδρούν στην μείωση της αντιοξειδωτικής ικανότητας της HDL στους πάσχοντες από ΑΕΕ με απώτερο σκοπό την ανάπτυξη ενός κατάλληλου προγνωστικού δείκτη ώστε να μειωθεί το ποσοστό νοσηρότητας και θνητότητας από τη συγκεκριμένη πάθηση. Άλλωστε, κύριος γνώμονας της επιστήμης είναι η βελτίωση της ποιότητας ζωής του ανθρώπου.

## ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ – ΑΡΚΤΙΚΟΛΕΞΑ – ΑΚΡΩΝΥΜΙΑ

αποA-I,B,C,E	απολιποπρωτεΐνη A-I,B,C,E
AEE	Αγγειακό Εγκεφαλικό Επεισόδιο
OEM	Οξύ Έμφραγμα του Μυοκαρδίου
ΣΝ	Στεφανιαία Νόσος
ABCA1	ATP-Binding Cassette Transporter A1
ABCG1	ATP-Binding cassette Transporter G1
ACS	Acute Coronary Syndrome
CE	Cholesterol Esters
CM	Chylomicrons
CETP	Cholesteryl Ester Transfer Protein
ELAMS	Endothelial Leukocyte Adhesion Molecules
HDL	High-Density Lipoprotein
HL	Hepatic Lipase
ICAM-1	IntraCellular Adhesion Molecule 1,
IDL	Intermediate-Density Lipoprotein
LCAT	Lecithin:Cholesterol Acyl Transferase
LDL	Low-Density Lipoprotein
LDL-R	Low-Density Lipoprotein Receptor
Lp(a)	Lipoprotein (a)
LPL	Lipoprotein Lipase
MCP-1	Monocyte Chemotactic Protein 1
M-CSF	Monocyte-Colony Stimulating Factor
MM-LDL	Minimally Modified-LDL
MPO	MyeloPerOxidase
NIHSS	National Institute of Health Stroke Scale

NO	Nitric Oxide
oxLDL	Oxidized-LDL
PAF-AH	Platelet-Activating Factor Acetyl Hydrolase
PCAM-1	Platelet Cell Adhesion Molecule 1
PLTP	PhosphoLipid Transfer Protein
RCT	Reverse Cholesterol Transport
rHDL	reconstituted HDL
ROS	Reactive Oxygen Species
S1P	SphingoSine-1-phosphate
SAA	Serum Amyloid A
sandwich ELISA	sandwich Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
SMCs	Smooth Muscle Cells
SR-BI	Scavenger Receptor Class B Type I
TNF- $\alpha$	Tumor Necrosis Factor $\alpha$
TG	TriGlycerides
VCAM-1	Vascular Cell Adhesion Molecule 1
VLDL	Very Low Density Lipoprotein



## ΑΝΑΦΟΡΕΣ

1. Brewer B, Gregg R, Hoeg J, Fojo S. Apolipoprotein and lipoproteins in human plasma: an overview. *Clin Chem* 1988, 34(8B):B4–B8
2. Χαριλόγης Κων. Δομικές και λειτουργικές μελέτες πεπτιδικών μοντέλων της απολιποπρωτεΐνης Α-Ι. Ρολος στην αθηρωμάτωση (Διδακτορική Διατριβή) Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, 2009.
3. Zannis V.I., Kypreos K.E., Chroni A., Kardassis D., and Zanni E.E. Lipoproteins and atherogenesis. *Molecular Mechanisms of Atherosclerosis*. 2004, 8:111-174.
4. Mahley R.W., Innerarity T.L., Rall, S.C., Jr., and Weisgraber, K.H., Plasma lipoproteins: apolipoprotein structure and function. *J.Lipid Res.* 1984 25:1277-1294.
5. Wang X. et al, "Molecular cloning and expression of lipid transfer inhibitor protein reveals its identity with apolipoprotein F", *The Journal of Biological Chemistry*, 1999, 274:1814-1820.
6. Gao B. et al, "Sequence of cDNA encoding bovine apolipoprotein H", *Gene*, 1993, 287-288.
7. H. V. de Silvat et al, "A70-kDa Apolipoprotein designated apoJ is a marker for subclasses of human plasma high density lipoproteins", *The Journal of Biological Chemistry*, 1999, 265:13240-13247.
8. Duchateau P.N., Pullinger C.R., Orellana R.E., Kunitake S.T., et al. "Apolipoprotein L, a new human high density lipoprotein apolipoprotein expressed in pancreas", *The Journal of Biological Chemistry*, 1997 272: 25576-25572.
9. Xu N., Dahlback B., "A novel human apolipoprotein (apoM)", *The Journal of Biological Chemistry*, 1999, 274:31286-31296.
10. Zannis V.I., Chroni A., and Krieger, M.. Role of apoA-I, ABCA1, LCAT, and SR-BI in the biogenesis of HDL. *J.Mol.Med.* 2006 84:276-294.
11. Tall A.R., Breslow J.L., Rubin E.M., Genetic disorders affecting plasma high-density lipoproteins. *The Metabolic & Molecular Bases of Inherited Disease*. C.R.Scriver, Beaudet, A.L., Valle D., and Sly, W.S., editors. McGraw-Hill, New York. 2001, 2915-2936.
12. Jairam V., Uchida K., Narayanaswami V., Pathophysiology of Lipoproteins Oxidation. *IntechOpen*, 2012.
13. Kotsovassilis C., Bei T.A., Lipoproteins and atherosclerosis. *Archives of Hellenic Medicine* 2003, 20(4):384–406
14. Mahley R. W., Innerarity T. L., Lipoprotein receptors and cholesterol homeostasis. *Biochim. Biophys. Acta.* 1983, 737: 197-222
15. Stein EA., Lipids, lipoprotein and atherosclerosis. Titz WN. *Fundamentals of Clinical Chemistry*, Third Edition, WB Saunders Co 1987, p 448-460
16. Brown MS, Kovanen PT, Goldstein JL. Regulation of plasma cholesterol by lipoprotein receptors, *Science* 1981, 212: 628-635.
17. Mayers P. Lipid transport and storage. Murray R Granner D, Mayers P, Rodwell V. *Harper's Biochemistry*, Appleton & Lange 1996, 27:254

18. Goldstein J. L., Brown M. S., The LDL receptor defect in familial hypercholesterolemia. Implications for pathogenesis and therapy. *Med. Clin. North Am.* 1982 66: 335-362.
19. Kontush A, Chapman MJ . High-density lipoproteins: structure, metabolism, function and therapeutics. Wiley, New York, 2012.
20. Tall A. R., Small D. M., Plasma high density lipoproteins. *N. Engl. J. Med.* 1978 299: 1232-1236.
21. Eren E., Yilmaz N., and Aydin O. High Density Lipoprotein and it's Dysfunction. *Open.Biochem.J.* 2012, 6:78-93.
22. Hoofnagle AN, Heinecke JW., Lipoproteomics: using mass spectrometry-based proteomics to explore the assembly, structure, and function of lipoproteins. *J Lipid Res* 2009, 50(10):1967–1975.
23. Kontush, A. Lindahl, M. Lhomme, M. Calabresi, L.Chapman, M.J. Davidson, W.S. Structure of HDL: particle subclasses and molecular components. *Handb. Exp. Pharmacol.*, 2015, 224 3-51
24. Anderson D.W., Nichols A.V., Forte T.M., Lindgren F.T. Particle distribution of human serum high density lipoproteins. *Biochim.Biophys.Acta* 1977, 493:55-68
25. Nanjee M.N., Cooke C.J., Olszewski W.L., Miller N.E. Concentrations of electrophoretic and size subclasses of apolipoprotein A-I-containing particles in human peripheral lymph. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.*2000, 20:2148-2155.
26. Fielding C.J., Fielding P.E. Molecular physiology of reverse cholesterol transport. *J. Lipid Res.*, 1995, 36(2), 211-228.
27. Asztalos B.F., Collins D., Cupples L.A. Demissie S. Horvath, K.V. et al. Value of high-density lipoprotein (HDL)subpopulations in predicting recurrent cardiovascular eventsin the Veterans Affairs HDL Intervention Trial. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 2005, 25(10), 2185-2191.
28. Asztalos B.F., Horvath K.V., Kajinami K., Nartsupha C., Cox C.E., Batista M. et al. Apolipoprotein composition of HDL in cholesteryl ester transfer protein deficiency. *J. Lipid. Res.*, 2004, 45(3), 448-455
29. Duriez P., Fruchart J.C., High-density lipoprotein subclasses and apolipoprotein A-I. *Clin. Chim. Acta*, 1999, 286(1-2), 97-114.
30. Wiesner P., Leidl K., Boettcher A., Schmitz G., Liebisch G. Lipid profiling of FPLC-separated lipoprotein fractions by electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J. Lipid Res.*, 2009, 50(3), 574-585
31. Vickers K.C., Remaley A.T. HDL and cholesterol: life after the divorce? *J. Lipid Res.*, 2014, 55(1), 4-12.
32. Hyotylainen T., Mattila I., Wiedmer S.K., Koivuniemi A., Taskinen M.R., Yki-Jarvinen H. et al. Metabolomic analysis of polar metabolites in lipoprotein fractions identifies lipoprotein-specific metabolic profiles and their association with insulin resistance. *Mol. Biosyst.*, 2012, 8(10), 2559-2565.
33. Vickers K.C., Palmisano B.T., Shoucri B.M., Shamburek R.D., Remaley A.T. MicroRNAs are transported in plasma and delivered to recipient cells by high-density lipoproteins. *Nat. Cell Biol.*, 2011, 13(4), 423-433.
34. Hafiane An., Genest J.High density lipoproteins: Measurement techniques and potential biomarkers of cardiovascular risk.*BBA Clinical*, (review) 2015.

35. Zannis V.I., Karathanasis, S.K., Keutmann, H.T., Goldberger, G., and Breslow, J.L. Intracellular and extracellular processing of human apolipoprotein A-I: secreted apolipoprotein A-I isoprotein 2 is a propeptide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 1983, 80:2574-2578.
36. Rothblat G. H. and Phillips, M. C. High-density lipoprotein heterogeneity and function in reverse cholesterol transport. *Curr. Opin. Lipidol.* 2010, 21, 229–238.
37. Zannis V.I.; Fotakis P., Koukos, G., Kardassis D., Ehnholm C., Jauhiainen M., Chroni A. HDL biogenesis, remodeling, and catabolism. *Handb. Exp. Pharmacol.*, 2015, 224 53-111.
38. Besler Ch., F. Lüscher F.Th., Landmesser Ulf. Molecular mechanisms of vascular effects of High-density lipoprotein: alterations in cardiovascular disease. *EMBO Molecular Med.*, 2012, 4:256-258.
39. Kontush A, Guérin M, and Chapman MJ. Spotlight on HDL-raising therapies: insights from the torcetrapib trials. *Nature Clinical Practice Cardiovascular Medicine* 2008, 5:329-336.
40. Γκίμπα-Τζιαμπίρη Ο. Η φυσιολογία του ανθρώπου, Τόμος Β. Η λειτουργία του κυκλοφορικού συστήματος ως σύνολο. 1999. Εκδόσεις Ζυγός
41. Lusis A.J. 2000. Atherosclerosis. *Nature* 407:233-241.
42. Keaney Jf, JR., Atherosclerosis: from lesion formation to plaque activation and endothelial dysfunction. *Mol Aspects Med* 2000, 21:99-166.
43. Fuster V, Badimon L, Badimon JJ, et al. The pathogenesis of coronary artery disease and the acute coronary syndromes. *N Engl J Med* 1992, 326: 242-250.
44. Weber C., Noels H. Atherosclerosis: current pathogenesis and therapeutic options. *Nat. Med.* 2011, 17:1410-1422.
45. Witztum JL, Steinberg D., Role of oxidized low density lipoprotein in atherogenesis. *J Clin Invest* 1991, 88: 1785-1792.
46. Quinn M.T., Parthasarathy S, Fong L.G., Steinberg D., Oxidatively modified low density lipoproteins: A potential role in recruitment and retention of monocyte/macrophages during atherogenesis. *Med. Science*, 1987, 84: 2995-2998.
47. Parthasarathy S. Mechanism(s) of cell mediated oxidation of low density lipoprotein. IN: Nohl H, Esterbauer H, Rice Evans C, eds. *Free Rad Env Med Toxic.* London, England: Richelieu Press. 1994β:163-167
48. Witztum JL. The oxidation hypothesis of atherosclerosis. *Lancet* 1994, 344:793-795.
49. Sparrow CP., Parthasarathy S, Steinberg D. A macrophage receptor that recognizes oxidized low density lipoprotein but not acetylated low density lipoprotein *J Biol Chem* 1989, 264: 2599-2604.
50. Kaperonis E.A. et al., “Inflammation and Atherosclerosis”, *Eur J Vasc Endovasc Surg* (2006), 31, 386–393.
51. Fredrikson G. N. et al., Identification of autoantibodies in human plasma recognizing an apoB-100 LDL receptor binding site peptide, *J. Lipid Res.* 2006. 47: 2049–2054.
52. Erkkila A. T. et al., Antibodies against oxidized LDL and cardiolipin and mortality in patients with coronary heart disease, *Atherosclerosis*, 2005, 183:157–162.

53. Sherer Y, et al., Autoantibodies to Oxidized Low-Density Lipoprotein in Coronary Artery Disease, *Am J Hypertens*, 2001, 14:149–154.
54. Tinahones F. J., Autoantibodies to oxidized LDL and age, *Atherosclerosis*, 2007, 190:24–25.
55. Heinecke JW., Baker L., Rosen H., et al., Superoxide-mediated modification of low density lipoprotein by arterial smooth muscle cells. *J Clin Invest* 1986, 77:757-761.
56. Hiramatsu K, Rosen H, Heinecke JW et al. Superoxide initiates oxidation of low density lipoprotein by human monocytes. *Arteriosclerosis* 1987, 7: 55-60.
57. Steinbrecher UP. Role of superoxide in endothelial cell modification of low density lipoproteins. *Biochim Biophys Acta* 1988, 959:20-30.
58. Parthasarathy S, Wieland E, Steinberg D. A role for endothelial cell lipoxygenase in the oxidative modification of low density lipoprotein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989, 86:1046-1050.
59. Yla- Herttula S., Rosenfeld ME., Parthasarathy S., et al., Colocalization of 15-lipoxygenase with epitopes characteristic of oxidized LDL in macrophage-risk areas of atherosclerotic lesion. *Circulation* 1990, 829(Suppl III) :abstract 2218
60. Gault JP., Heinecke JW., Mechanisms of Oxidizing Low-Density Lipoprotein. *Trends Cardiovasc Med* 2001, 11:103-112
61. Steinberg D. The LDL modification hypothesis of atherogenesis: an update. *J Lipid Res* 2009, S376–81 April Supple.
62. Schindhelm RK., van der Zwan LP., Teerlink T., Scheffer PG., Myeloperoxidase: a useful biomarker for cardiovascular disease risk stratification? *Clin Chem* 2009, 55:1462–70.
63. Klebanoff SJ., Myeloperoxidase: friend or foe. *J Leukoc Biol* 2005, 77:598–625.
64. Carr AC., Myzak MC., Stocker R., McCall MR., Frei B., Myeloperoxidase binds to lowdensity lipoprotein: potential implications for atherosclerosis. *FEBS Lett* 2000, 487:176–80.
65. Heller JI., Crowley JR., Hazen SL., et al., p-Hydroxyphenylacetaldehyde, an aldehyde generated by myeloperoxidase, modifies phospholipids amino groups of low density lipoprotein in human atherosclerotic intima. *J Biol Chem* 2000, 275:9957-9962.
66. National Center for Health Statistics, Centers for Disease Control and Prevention. *Health, United States, With special features on mortality*, 2017.
67. World Health Organization, *Global Atlas on cardiovascular disease prevention and control*, 2011.
68. Wolf Philips. Contribution of epidemiology to the prevention of stroke. *Circulation*. 1992 Nov 88(5):2471-78.
69. Heart and stroke facts. Dallas, Texas: American Heart Association, 1992.
70. Adams HP Jr., Bendixen BH., Kappelle LJ., Biller J., Love BB., et al., Classification of subtype of acute ischemic stroke. Definitions for use in a multicenter clinical trial. TOAST. Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment. *Stroke* 1993, 24:35–41.
71. Bowman TS., Sesso HD., Ma J., Kurth T., Kase CS., Stampfer MJ., et al., Cholesterol and the risk of ischemic stroke. *Stroke*. 2003, 34:2930–2934.



72. Zhang X., Patel A., Horibe H., Wu Z., Barzi F., Rodgers A., et al., Asia Pacific Cohort Studies Collaboration. Cholesterol, coronary heart disease, and stroke in the Asia Pacific region. *Int J Epidemiol*. 2003, 32:563–572.
73. Bots ML., Elwood PC., Nikitin Y., Salonen JT., Freire de Concalves A., Inzitari D., et al., Total and HDL cholesterol and risk of stroke. EUROSTROKE: a collaborative study among research centres in Europe. *J Epidemiol Community Health*. 2002, 56 Suppl 1:i19–i24.
74. Cui R., Iso H., Yamagishi K., Saito I., Kokubo Y., Inoue M., et al., JPHC Study Group. High serum total cholesterol levels is a risk factor of ischemic stroke for general Japanese population: the JPHC study. *Atherosclerosis*. 2012, 221:565–569.
75. Hankey G.J., Warlow C.P., Transient Ischaemic Attacks of the Brain and Eye, *Journal of Neuroimaging*, 1995, 256.
76. Iso H., Jacobs DR Jr., Wentworth D., Neaton JD, Cohen JD. Serum cholesterol levels and six-year mortality from stroke in 350,977 men screened for the Multiple Risk Factor Intervention Trial. *N Engl J Med* 1989, 320:904–910.
77. Horenstein RB., Smith DE., Mosca L. Cholesterol predicts stroke mortality in the Women’s Pooling Project. *Stroke* 2002, 33:1863–1868.
78. Kurth T., Everett B.M., Buring J.E., Kase C.S., Ridker P.M. et al., Lipid levels and the risk of ischemic stroke in women. *Neurology* 2007, 68:556–562.
79. Shahar E, Chambless L.E., Rosamond W.D., Boland L.L., Ballantyne C.M., et al., Plasma lipid profile and incident ischemic stroke: the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) study. *Stroke* 2003, 34:623–631.
80. Bots M.L., Elwood P.C., Nikitin Y., Salonen J.T., Freire de Concalves A. et al., Total and HDL cholesterol and risk of stroke. EUROSTROKE: a collaborative study among research centres in Europe. *J Epidemiol Community Health* 2002, 56 (suppl1):i19 –i24.
81. Sanossian N., Saver J.L., Navab M., Ovbiagele B., High-density lipoprotein cholesterol: an emerging target for stroke treatment. *Stroke* 2007, 38:1104–1109.
82. Soyama Y., Miura K., Morikawa Y., Nishijo M., Nakanishi Y., et al., High-density lipoprotein cholesterol and risk of stroke in Japanese men and women: the Oyabe Study. *Stroke* 2003, 34:863–868.
83. Tanne D., Yaari S., Goldbourt U., High-density lipoprotein cholesterol and risk of ischemic stroke mortality: a 21-year follow-up of 8586 men from the Israeli Ischemic Heart Disease Study. *Stroke* 1997, 28:83–87.
84. Sacco R.L., Benson R.T., Kargman D.E., Boden-Albala B., Tuck C., et al., High-density lipoprotein cholesterol and ischemic stroke in the elderly: the Northern Manhattan Stroke Study. *JAMA* 2001, 285:2729–2735.
85. Amarenco P., Labreuche J., Touboul P.J., High-density lipoprotein-cholesterol and risk of stroke and carotid atherosclerosis: a systematic review. *Atherosclerosis* 2008, 196:489–496.
86. Amarenco P., Labreuche J., Lavalley P., Touboul P.J., Statins in stroke prevention and carotid atherosclerosis: systematic review and up-to-date meta-analysis. *Stroke* 2004, 35:2902–2909.

87. Baigent C., Keech A., Kearney P.M, Blackwell L., Buck G. et al. Efficacy and safety of cholesterol-lowering treatment: prospective meta-analysis of data from 90,056 participants in 14 randomised trials of statins. *Lancet* 2005, 366:1267–1278.
88. Amarenco P., Labreuche J., Lipid management in the prevention of stroke: review and updated meta-analysis of statins for stroke prevention. *Lancet Neurol* 2009, 8:453–463.
89. Goldstein L.B., Bushnell C.D., Adams R.J., Appel L.J., Braun L.T. et al. Guidelines for the primary prevention of stroke: a guideline for healthcare professionals from the American Heart Association/American Stroke Association. *Stroke* 2011, 42:517-584.
90. Collins R., Armitage J., Parish S., Sleight P., Peto R., Heart Protection Study Collaborative Group. Effects of cholesterol-lowering with simvastatin on stroke and other major vascular events in 20536 people with cerebrovascular disease or other high-risk conditions. *Lancet* 2004, 363:757–67.
91. Ovbiagele B., Statin therapy after stroke or transient ischemic attack: a new weapon in our secondary stroke prevention arsenal? *Nat Clin Pract Neuro* 2007, 3:130–1.
92. Feigin V.L., Lawes C.M., Bennett D.A., Anderson C.S., Stroke epidemiology: a review of population-based studies of incidence, prevalence, and case-fatality in the late 20<sup>th</sup> century. *Lancet Neurol.* 2003, 2:43-53.
93. Hinkle J.L., Guanci M.M., Acute Ischemic Stroke Review. *J Neurosci Nurs* 2007, 39:285-93,310.
94. Truelsen T., Mähönen M., Tolonen H., Asplund K., Bonita R., Vanuzzo D., WHO MONICA Project. Trends in stroke and coronary heart disease in the WHO MONICA Project. *Stroke* 2003, 34:1346–52.
95. Spengos K., Vemmos K., Risk factors, etiology, and outcome of first-ever ischemic stroke in young adults aged 15 to 45 - the Athens young stroke registry. *Eur J Neurol* 2010, 17:1358-64.
96. Petrea R.E, Beiser A.S, Seshadri S., Kelly-Hayes M., Kase C.S., Wolf P.A., Gender differences in stroke incidence and poststroke disability in the Framingham Heart Study. *Stroke* 2009, 40:1032–1037.
97. Kleindorfer D.O., Khoury J., Moomaw C.J., Alwell K., Woo D., et al., Stroke incidence is decreasing in whites but not in blacks: a population-based estimate of temporal trends in stroke incidence from the Greater Cincinnati/Northern Kentucky Stroke Study. *Stroke* 2010, 41:1326–1331.
98. Gillum R.F., Stroke in Blacks. *Stroke* 1988, 19(1): 1-9
99. Kittner S.J., White L.R., et al. Black and white differences in stroke incidence in a national sample. *JAMA* 1990, 264:1267-70.
100. Markus H.S., Khan U., Birns J., Evans A., Kalra L., et al., Differences in stroke subtypes between black and white patients with stroke: the South London Ethnicity and Stroke Study. *Circulation* 2007, 116:2157–64.
101. Khaw K.T., Barrett -Connor E. et al. Family history of stroke as an independent predictor of ischemic heart disease in men and stroke in women. *Am.J.Epidemiology* 1986 123(l):59-66

102. Kiely D.K., Wolf P.A., Familial aggregation of stroke. The Framingham study. *Stroke* 1993, 24:1366-71.
103. Bamford J., Sandercock P., et al., A prospective study of acute cerebrovascular disease in the community. the Oxfordshire community stroke project 1981-86:1. Methodology, demography and incident cases of first ever stroke. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1988, 51:1373-80.
104. Graffagnino C., Gasecki A.P., Doing G.S., et al., The importance of family history in C.V.D. *Stroke* 1994, 25: 1599-1604.
105. Hyman D.J., Pavlik V.N., Characteristics of patients with uncontrolled hypertension in the United States. *N Engl J Med* 2001, 345:479-486.
106. Prospective Studies Collaboration, Whitlock G, Lewington S, Sherliker P, Clarke R, Emberson J, Halsey J, Qizilbash N, Collins R, Peto R. Body-mass index and cause-specific mortality in 900 000 adults: collaborative analyses of 57 prospective studies. *Lancet* 2009, 373:1083-1096.
107. Flegal K.M., Shepherd J.A., Looker A.C., Graubard B.I., Borrud L.G., et al., Comparisons of percentage body fat, body mass index, waist circumference, and waist-stature ratio in adults. *Am J Clin Nutr* 2009, 89:500-508.
108. Folsom A.R., Prineas R.J., Kaye S.A., Munger R.G., Incidence of hypertension and stroke in relation to body fat distribution and other risk factors in older women. *Stroke* 1990, 21:701-706.
109. Walker S.P., Rimm E.B., Ascherio A., Kawachi I., Stampfer M.J., et al., Body size and fat distribution as predictors of stroke among US men. *Am J Epidemiol* 1996, 144:1143-1150.
110. Shah R.S., Cole J.W., Smoking and stroke: the more you smoke the more you stroke. *Expert Rev Cardiovasc Ther* 2010, 8:917-32.
111. Bhat V.M., Cole J.W., Sorkin J.D., Wozniak M.A., Malarcher A.M. et al., Dose-response relationship between cigarette smoking and risk of ischemic stroke in young women. *Stroke* 2008, 39:2439-43.
112. Bonita R., Duncan J., Truelsen T., Jackson R.T., Beaglehole R., Passive smoking as well as active smoking increases the risk of acute stroke. *Tob Control* 1999, 8:156-160.
113. He Y., Lam T.H., Jiang B., Wang J., Sai X., et al., Passive smoking and risk of peripheral arterial disease and ischemic stroke in Chinese women who never smoked. *Circulation* 2008, 118:1535-1540.
114. Zhang X., Shu X.O., Yang G., Li H.L., Xiang Y.B., et al., Association of passive smoking by husbands with prevalence of stroke among Chinese women nonsmokers. *Am J Epidemiol* 2005, 161:213-218.
115. Goldstein L.B., Adams R., Becker K., Furberg C.D., Gorelick P.B., et al., Primary prevention of ischemic stroke: A statement for healthcare professionals from the Stroke Council of the American Heart Association. *Circulation* 2001, 103:163-82.
116. Fagerstrom K., The epidemiology of smoking: health consequences and benefits of cessation. *Drugs* 2002, 62(suppl 2):1-9.
117. Gill J.S., Zezulka A.V., Shipley M.J., Gill S.K., Beevers D.G., Stroke and alcohol consumption. *N Engl J Med* 1986, 315:1041-1046.

118. Hillbom M., Numminen H., Juvela S., Recent heavy drinking of alcohol and embolic stroke. *Stroke* 1999, 30:2307–2312.
119. Klatsky A.L., Armstrong M.A., Friedman G.D., Sidney S., Alcohol drinking and risk of hospitalization for ischemic stroke. *Am J Cardiol* 2001, 88:703–706.
120. Elkind M.S., Sciacca R., Boden-Albala B., Rundek T., Paik M.C., et al., Moderate alcohol consumption reduces risk of ischemic stroke: the Northern Manhattan Study. *Stroke* 2006, 37:13–19.
121. Iso H., Baba S., Mannami T., Sasaki S., Okada K., et al., Alcohol consumption and risk of stroke among middle-aged men: the JPHC Study Cohort I. *Stroke* 2004, 35:1124–1129.
122. Sacco R.L., Elkind M., Boden-Albala B., Lin I.F., Kargman D.E., et al., The protective effect of moderate alcohol consumption on ischemic stroke. *JAMA* 1999, 281:53–60.
123. Stampfer M.J., Colditz G.A., Willett W.C., Speizer F.E., Hennekens C.H., A prospective study of moderate alcohol consumption and the risk of coronary disease and stroke in women. *N Engl J Med* 1988, 319:267–273.
124. Reynolds K., Lewis B., Nolen J.D., Kinney G.L., Sathya B. et al. Alcohol consumption and risk of stroke: a meta-analysis. *JAMA* 2003, 289: 579–588.
125. Gaziano J.M., Buring J.E., Breslow J.L., Goldhaber S.Z., Rosner B., et al., Moderate alcohol intake, increased levels of high-density lipoprotein and its subfractions, and decreased risk of myocardial infarction. *N Engl J Med* 1993, 329:1829–1834.
126. Soyama Y., Miura K., Morikawa Y., Nishijo M., Nakanishi Y., et al., High density lipoprotein cholesterol and risk of stroke in Japanese men and women: the Oyabe Study. *Stroke* 2003, 34:863–868.
127. Pellegrini N., Pareti F.I., Stabile F., Brusamolino A., Simonetti P., Effects of moderate consumption of red wine on platelet aggregation and haemostatic variables in healthy volunteers. *Eur J Clin Nutr* 1996, 50:209–213.
128. Torres Duarte A.P., Dong Q.S., Young J., Abi-Younes S., Myers A.K., Inhibition of platelet aggregation in whole blood by alcohol. *Thromb Res* 1995, 78:107–115.
129. Ernst E., Resch K.L., Fibrinogen as a cardiovascular risk factor: a meta-analysis and review of the literature. *Ann Intern Med* 1993, 118:956–963.
130. McKenzie C.R., Abendschein D.R., Eisenberg P.R., Sustained inhibition of whole-blood clot procoagulant activity by inhibition of thrombus-associated factor Xa. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1996, 16:1285–1291.
131. Furie K.L., Kasner S.E., Adams R.J., Albers G.W., Bush R.L., et al., Guidelines for the prevention of stroke in patients with stroke or transient ischemic attack: a guideline for healthcare professionals from the American Heart Association/American Stroke Association. *Stroke* 2011, 42:227-76.
132. Πρακτικές κατευθυντήριες οδηγίες για την υπέρταση. *Archives of Hellenic Medicine* 2008, 25:271-285.
133. Chobanian A.V., Bakris G.L., Black H.R., Cushman W.C., Green L.A., Izzo J.L., et al., The Seventh Report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure: the JNC 7 report. *JAMA* 2003, 289:2560–2572.

134. Pinto A., Tuttolmondo A., Di Raimondo D., Fernandez P., Licata G., Cerebrovascular risk factors and clinical classification of strokes. *Semin Vasc Med* 2004; 4:287–303.
135. Stroke Statistics from The Stroke Association (October 2012). [www.stroke.org.uk](http://www.stroke.org.uk)
136. Vermeer S.E., Sandee W., Algra A., Koudstaal P.J., Kappelle L.J. et al., Dutch TIA Trial Study Group. Impaired glucose tolerance increases stroke risk in nondiabetic patients with transient ischemic attack or minor ischemic stroke. *Stroke* 2006; 37:1413–7.
137. Guide to Clinical Preventive Services: Report of the U. S. Preventive Services Task Force, November 2012. <http://www.uspreventiveservicestaskforce.org/annlrpt2/index.html>
138. Kissela B.M., Khoury J., Kleindorfer D., Woo D., Schneider A., et al., Epidemiology of ischemic stroke in patients with diabetes: the greater Cincinnati/Northern Kentucky Stroke Study. *Diabetes Care* 2005, 28:355–9.
139. Arauz A., Murillo L., Cantú C., Barinagarrementeria F., Higuera J., Prospective study of single and multiple lacunar infarcts using magnetic resonance imaging: risk factors, recurrence, and outcome in 175 consecutive cases. *Stroke* 2003, 34:2453–8.
140. Wolf P.A., Abbott R.D., Kannel W.B., Atrial fibrillation as an independent risk factor for stroke: the Framingham Study. *Stroke* 1991, 22:983–88.
141. Kannel W.B., Benjamin E.J., Status of the epidemiology of atrial fibrillation. *Med Clin North Am* 2008, 92:17–40.
142. Benjamin E.J., Wolf P.A., D'Agostino R.B., Silbershatz H., Kannel W.B., Levy D., Impact of atrial fibrillation on the risk of death: the Framingham Heart Study. *Circulation* 1998, 98:946–952.
143. Di Mascia R., Marchiali R., Serum cholesterol and risk of ischemic stroke results of case control study. On behalf of PROGETTO 3 investigators. *Prev. Med.* 1995 24:128-33.
144. Benfante R., Xano K., Elevated serum cholesterol is a risk factor for both coronary heart disease and thromboembolic stroke in Hawaiian, Japanese men implications of shared risk. Honolulu heart program. *Stroke* 1994 25:814-20.
145. Miller G.J, Miller N.E., plasma H.D.L.concentration and development of ischemic heart disease. *Lancet* 1975, 1:16-19.
146. Stamler J., Wentworth D., et al., Is relationship between serum cholesterol and risk of premature death from CHD continuous and graded? Findings in 356,222 screener for M.R.F.I. T. *JAMA* 1986, 256:2823-8.
147. Wolf P.A., Kannel W.B., et al., Prospective investigations: the Framingham study and the epidemiology of stroke. *Advances in Neurology* 1978, 19:7-120.
148. Tell G.S., Crouse G.R., et al., Relation between blood lipids, lipoproteins and cerebrovascular atherosclerosis- a review. *Stroke* 1988, 19:423-30.
149. Ellekjaer E.F., Wyller T.B., et al., Lifestyle factors and risk of cerebral infarction. *Stroke* 1992, 6:829-34.
150. Harmsen P., Rosengren A., Tsipogianni A., et al., Risk factors for stroke in Middle-Aged Men in Goteborg, Sweden. *Stroke* 1990, 21:223-29.

151. Kannel W.B, Gordon T., Role of lipids in the development of brain infarction The Framingham study. *Stroke* 1974, 5:679-85.
152. Burchfield C.M., Lauss A., Combined effects of H.D.L.cholesterol.triglycerides and total cholesterol concentrations on 18-year risk of atherosclerotic disease. *Circulation* 1995, 92: 1430-6.
153. Hindfelt B., Nilsson O., Brain infarction in young adults. *Acta Neurol.Scand.* 1979, 55:145-57.
154. Buring J.E, Hebert P., Ramerò J., et al., Migraine and subsequent risk of stroke in the physicians'Health study. *Arch.Neurol.* 1995, 52: 129-34.
155. Rothrock J., North J., Migraine and migrainous stroke: risk factors and prognosis. *Neurology* 1993, 43:2473-6.
156. Spaccavento L.J., Solomon G., Migraine as an aetiology of stroke in young adults. *Headache* 1984, 24:19-22.
157. Kalendovsky Z., Austin J., Steele P., et al., Increased platelet aggregability in young patients with stroke. *Arch.Neurol.* 1975, 32: 13-20.
158. Gawel M.J., Rose F.C., et al., Platelet junction in migraine. *Adv Neurol.* 1982, 33:237-42.
159. Couch J.R., Hassanein R.S., et al., Platelet aggregability in migraine. *Neurology* 1977, 33:843-8.
160. Gordon D.J., Probstfield J.L., Garrison R.J., Neaton J.D., Castelli W.P., Knoke J.D., Jacobs D.R., Bangdiwala S., Tyroler H.A., High-density lipoprotein cholesterol and cardiovascular disease. Four prospective American studies. *Circulation*, 1989, 79:8-15.
161. Kontush A., HDL particle number and size as predictors of cardiovascular disease. *Front Pharmacol.* 2015, 6:218.
162. Brewer H.B. Jr., High-density lipoproteins: a new potential therapeutic target for the prevention of cardiovascular disease. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.*, 2004, 24:387-391.
163. Ansell B.J., Fonarow G.C., Fogelman A.M., High-density lipoprotein: is it always atheroprotective? *Curr .Atheroscler.Rep.*, 2006, 8:405-411.
164. Barter P.J., Nicholls S., Rye K.A., Anantharamaiah G.M., Navab M., Fogelman A.M., Antiinflammatory properties of HDL. *Circ.Res.*2004, 95:764-772.
165. Mineo C., Deguchi H., Griffin J.H., Shaul P.W., Endothelial and antithrombotic actions of HDL. *Circ.Res.* 2006, 98:1352-1364.
166. Yuhanna I.S., Zhu Y., Cox B.E., Hahner L.D., Osborne-Lawrence S., Lu P., et al., High-density lipoprotein binding to scavenger receptor-BI activates endothelial nitric oxide synthase. *Nat.Med.*2001, 7:853-857.
167. Nofer J.R., van der,Giet M., Tolle M., Wolinska I., von Wnuck L.K., Baba H.A., et al., HDL induces NO-dependent vasorelaxation via the lysophospholipid receptor S1P3. *J.Clin.Invest.* 2004, 113:569-581.
168. Tso C., Martinic G., Fan W.H., Rogers C., Rye K.A., Barter P.J., High-density lipoproteins enhance progenitor-mediated endothelium repair in mice. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* 2006, 26:1144-1149.
169. Noor R., Shuaib U., Wang C.X., Todd K., Ghani U., Schwindt B., Shuaib A. High-density lipoprotein cholesterol regulates endothelial progenitor cells by increasing eNOS and preventing apoptosis. *Atherosclerosis*, 2007, 192:92-99.

170. Wynn T.A., Chawla A., et al., Macrophage biology in development, homeostasis and disease. *Nature*, 2013, 496:445–455.
171. Nicholls S.J., Dusting G.J., Cutri B., Bao S., Drummond G.R., et al., Reconstituted high-density lipoproteins inhibit the acute pro-oxidant and proinflammatory vascular changes induced by a periarterial collar in normocholesterolemic rabbits. *Circulation*. 2005, 111:1543–1550.
172. Yvan-Charvet L., Wang N., Tall A.R., Role of HDL, ABCA1, and ABCG1 transporters in cholesterol efflux and immune responses. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2010, 30:139–143.
173. Shaw J. A., Bobik A., Murphy A., Kanellakis P., Blombery P., et al. Infusion of reconstituted high-density lipoprotein leads to acute changes in human atherosclerotic plaque. *Circ. Res.* 2008, 103:1084–1091.
174. Nofer J.-R., Assmann G., Atheroprotective effects of high density lipoprotein-associated lysosphingolipids. *Trends Cardiovasc. Med.* 2005, 15: 265–271.
175. Calabresi L., Gomaraschi M., Franceschini G., Endothelial protection by high-density lipoproteins: from bench to bedside. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2003, 23:1724–1731.
176. Mineo C., Deguchi H., Griffin J. H., Shaul P. W. Endothelial and antithrombotic actions of HDL. *Circ Res.* 2006, 98: 1352–1364.
177. Kuvin J.T., Ramet M.E., Patel A.R., Pandian N.G., Mendelsohn M.E., Karas R.H., A novel mechanism for the beneficial vascular effects of high-density lipoprotein cholesterol: enhanced vasorelaxation and increased endothelial nitric oxide synthase expression, *Am. Heart J.* 2002, 144:165–172.
178. Yuhanna I.S., Zhu Y., Cox B.E., Hahner L.D., Osborne-Lawrence S., Lu P., Marcel Y.L., et al., High-density lipoprotein binding to scavenger receptor-BI activates endothelial nitric oxide synthase, *Nat. Med.* 2001, 7:853–857.
179. Kontush A., Therond P., Zerrad A., Couturier M., Negre-Salvayre A., de Souza J.A., Chapman M.J. Preferential sphingosine-1-phosphate enrichment and sphingomyelin depletion are key features of small dense HDL3 particles: relevance to antiapoptotic and antioxidative activities. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2007, 27:1843–1849.
180. Sattler K., Levkau B., Sphingosine-1-phosphate as a mediator of high-density lipoprotein effects in cardiovascular protection. *Cardiovasc. Res.* 2009, 82:201–211.
181. Egom E. E., Mamas M. A., Soran H., HDL quality or cholesterol cargo: what really matters—spotlight on sphingosine-1-phosphate-rich HDL. *Curr. Opin. Lipid.* 2013, 24: 351–356.
182. Nofer J. R., Brodde M. F., Kehrel B. E. High-density lipoproteins, platelets and the pathogenesis of atherosclerosis. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2010, 37:726–735.
183. Nofer J. R., Kehrel B., Fobker M., Levkau B., Assmann G., et al., HDL and arteriosclerosis: beyond reverse cholesterol transport. *Atherosclerosis* 2002, 161:1–16.
184. Parthasarathy S., Barnett J., Fong L.G., High-density lipoprotein inhibits the oxidative modification of low-density lipoprotein. *Biochim. Biophys. Acta*, 1990, 1044:275–283.

185. Mackness B., Durrington P.N., Mackness M.I., Lack of protection against oxidative modification of LDL by avian HDL. *Biochem.Biophys.Res. Commun.*1998, 247:443–446.
186. Mackness M.I., Arrol S., Abbott C., Durrington P.N., Protection of low-density lipoprotein against oxidative modification by high-density lipoprotein associated paraoxonase. *Atherosclerosis*, 1993, 104:129–135.
187. Durrington P.N., Mackness B., Mackness M.I., Paraoxonase and atherosclerosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 2001, 21:473–480.
188. Garner B., Waldeck A.R., Witting P.K, Rye K.A., Stocker R., Oxidation of high density lipoproteins. II. Evidence for direct reduction of lipid hydroperoxides by methionine residues of apolipoproteins AI and AII, *J. Biol. Chem.*, 1998, 273: 6088–6095.
189. Kontus A., Chapman M.J., Antiatherogenic function of HDL particle subpopulations: focus on antioxidative activities, *Curr. Opin. Lipidol.*, 2010, 21: 312–318.
190. Shuhei N., Soderlund S., Jauhiainen M., Taskinen M.R., Effect of HDL composition and particle size on the resistance of HDL to the oxidation, *Lipids Health Dis.*, 2010, 9:104.
191. Kontush, A., Therond P., Zerrad A., Couturier M., Negre-Salvayre, A., et al. Preferential sphingosine-1-phosphate enrichment and sphingomyelin depletion are key features of small dense HDL3 particles: relevance to antiapoptotic and antioxidative activities. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 2007, 27:1843–1849.
192. Kontush A., Chantepie S., Chapman M. J., Small, dense HDL particles exert potent protection of atherogenic LDL against oxidative stress. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 2003, 23:1881–1888.
193. Zerrad-Saadi A., Therond P., Chantepie S., Couturier M., Rye K.A., Chapman M.J., et al., HDL3-mediated inactivation of LDL-associated phospholipid hydroperoxides is determined by the redox status of apolipoprotein A-I and HDL particle surface lipid rigidity: relevance to inflammation and atherogenesis, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2009, 29: 2169–2175.
194. Garner B., Waldeck A.R., Witting P.K., Rye K.A., Stocker R., Oxidation of high density lipoproteins. II. Evidence for direct reduction of lipid hydroperoxides by methionine residues of apolipoproteins AI and AII, *J. Biol. Chem.*,1998, 273: 6088–6095.
195. Panzenbock U., Stocker R., Formation of methionine sulfoxide-containing specific forms of oxidized high-density lipoproteins, *Biochim. Biophys. Acta* 2005, 171-181.
196. Rye K.A., Barter P.J., Cardioprotective functions of HDLs, *J. Lipid Res.* 2014, 55 :168–179.
197. Bashtovyy D., Jones M.K., Anantharamaiah G.M., Segrest J.P., Sequence conservation of apolipoprotein A-I affords novel insights into HDL structure-function, *J. Lipid Res.*2011, 52:435–450.
198. Navab M., Hama S.Y., Cooke C.J., Anantharamaiah G.M., Chaddha M., Jin L., et al., Normal high density lipoprotein inhibits three steps in the formation of mildly oxidized low density lipoprotein: step 1, *J. Lipid Res.* 2000, 41:1481–1494.



199. Jonas A., Lecithin cholesterol acyltransferase. *Biochim.Biophys.Acta* 2000, 1529:245-256.
200. Glomset J.A, Verdery R.B., Role of LCAT in cholesterol metabolism. *Expos.Annu.Biochim.Med.* 1977, 33:137-142.
201. Goyal J., Wang K., Liu M., Subbaiah P.V. Novel function of lecithin-cholesterol acyltransferase. Hydrolysis of oxidized polar phospholipids generated during lipoprotein oxidation. *J.Biol.Chem.*, 1997, 272:16231-16239.
202. Subramanian V.S., Goyal J., Miwa M., Sugatami J., Akiyama M., Liu M., et al. Role of lecithin-cholesterol acyltransferase in the metabolism of oxidized phospholipids in plasma: studies with platelet-activating factor-acetyl hydrolase-deficient plasma. *Biochim.Biophys.Acta*, 1999, 1439:95-109.
203. McPherson P.A., Young I.S., McEneny J., A dual role for lecithin:cholesterol acyltransferase (EC 2.3.1.43) in lipoprotein oxidation, *Free Radic. Biol. Med.*, 2007, 43: 1484–1493.
204. Holleboom A.G., Daniil G., Fu X., Zhang R., Hovingh G.K., Schimmel A.W., et al., Lipid oxidation in carriers of lecithin:cholesterol acyltransferase gene mutations, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* , 2012, 32:3066–307
205. Christison J.K., Rye K.A., Stocker R., Exchange of oxidized cholesteryl linoleate between LDL and HDL mediated by cholesteryl ester transfer protein, *J. Lipid Res.*, 1995, 36 :2017–2026.
206. Girotti A.W., Translocation as a means of disseminating lipid hydroperoxide-induced oxidative damage and effector action, *Free Radic. Biol. Med.*, 2008, 44:956–968.
207. Chapman M.J., Le Goff W., Guerin M, Kontush A., Cholesteryl ester transfer protein: at the heart of the action of lipid-modulating therapy with statins, fibrates, niacin, and cholesteryl ester transfer protein inhibitors, *Eur. Heart J.*, 2010, 31:149–164.
208. Hine D., Mackness B., Mackness M., Cholesteryl-ester transfer protein enhances the ability of high-density lipoprotein to inhibit low-density lipoprotein oxidation, *IUBMB Life*, 2011, 63:772–774.
209. Albers J.J., Cheung M.C., Emerging roles for phospholipid transfer protein in lipid and lipoprotein metabolism, *Curr. Opin. Lipidol.*, 2004, 15:255–260.
210. Davidson W.S., Silva R.A., Chantepie S., Lagor W.R., Chapman M.J., Kontush A., Proteomic analysis of defined HDL subpopulations reveals particle-specific protein clusters: relevance to antioxidative function, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 2009, 29: 870–876.
211. Uhlir C.M., Whitehead A.S., Serum amyloid A, the major vertebrate acute-phase reactant, *Eur. J. Biochem.*,1999, 265: 501–523.
212. Zhang N., Ahsan M.H., Purchio A.F., West D.B., Serum amyloid A-luciferase transgenic mice: response to sepsis, acute arthritis, and contact hypersensitivity and the effects of proteasome inhibition, *J. Immunol.*, 2005, 174: 8125–8134.
213. Steel D.M., Sellar G.C. Uhlir C.M., Simon S., DeBeer F.C, Whitehead A.S., A constitutively expressed serum amyloid A protein gene (SAA4) is closely linked to, and shares structural similarities with, an acute-phase serum amyloid A protein gene (SAA2), *Genomics*, 1993, 16: 447–454.

214. Sato M., Ohkawa R., Yoshimoto A., Yano K., Ichimura N., Nishimori M., et al., Effects of serum amyloid A on the structure and antioxidant ability of high-density lipoprotein, *Biosci. Rep.*,36, 2016.
215. Jayaraman S., Haupt C., Gursky O., Paradoxical effects of SAA on lipoprotein oxidation suggest a new antioxidant function for SAA, *J. Lipid Res.*,2016, 57:2138–2149.
216. Connelly P.W., Draganov D., Maguire G.F., Paraoxonase-1 does not reduce or modify oxidation of phospholipids by peroxynitrite, *Free Radic. Biol. Med.*, 2005, 38:164–174.
217. Marathe G.K., Zimmerman G.A., McIntyre T.M., Platelet-activating factor acetylhydrolase, and not paraoxonase-1, is the oxidized phospholipid hydrolase of high density lipoprotein particles, *J. Biol. Chem.*, 2003, 278:3937–3947.
218. Mallat Z., Lambeau G., Tedgui A., Lipoprotein-associated and secreted phospholipases A(2) in cardiovascular disease: roles as biological effectors and biomarkers, *Circulation*, 2010, 122: 2183–2200.
219. McIntyre T.M., Prescott S.M., Stafforini D.M., The emerging roles of PAF acetylhydrolase, *J. Lipid Res.*,2009, 50(Suppl) S255–9.
220. Tselepis A.D., Dentan S., Karabina S.A., Chapman M.J., Ninio E., 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: 1764–1773.
221. Quarck R., De Geest B., Stengel D., Mertens A., Lox M., Theilmeyer G., 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: 495–2500.
222. Tsimihodimos V., Kakafika A., Tambaki A.P., Bairaktari E., Chapman M.J., Elisaf M., et al., Fenofibrate induces HDL-associated PAF-AH but attenuates enzyme activity associated with apoB-containing lipoproteins, *J. Lipid Res.*,2003, 44:927–934.
223. Zalewski A., Macphee C., Role of lipoprotein-associated phospholipase A2 in atherosclerosis: biology, epidemiology, and possible therapeutic target, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 2005, 25: 923–931.
224. Kotosai M., Shimada S., Kanda M., Matsuda N., Sekido K., Shimizu Y., et al., Plasma HDL reduces nonesterified fatty acid hydroperoxides originating from oxidized LDL: a mechanism for its antioxidant ability, *Lipids*, 2013, 48:569–578.
225. Rodrigo L., Mackness B., Durrington P.N., Hernandez A., Mackness M.I., Hydrolysis of platelet-activating factor by human serum paraoxonase, *Biochem. J.*, 2001, 354:1–7.
226. Rosenson R.S., Hurt-Camejo E., Phospholipase A2 enzymes and the risk of atherosclerosis, *Eur. Heart J.*, 2012, 33:2899–2909.
227. Maddipati K.R., Marnett L.J., Characterization of the major hydroperoxide-reducing activity of human plasma. Purification and properties of a selenium-dependent glutathione peroxidase, *J. Biol. Chem.*,1987, 262: 17398–17403.

228. Avissar N., Ornt D.B., Yagil Y., S. Horowitz, R.H. Watkins, E.A. Kerl, et al., Human kidney proximal tubules are the main source of plasma glutathione peroxidase, *Am. J. Phys.*,1994, 266: 367–75.
229. Chen N., Liu Y., Greiner C.D., Holtzman J.L., Physiologic concentrations of homocysteine inhibit the human plasma GSH peroxidase that reduces organic hydroperoxides, *J. Lab. Clin. Med.*, 2001, 136: 58–65.
230. Mackness B., Durrington P.N., Mackness M.I., Human serum paraoxonase, *GenPharmacol.*,1998, 31: 329–336.
231. Harel M., Aharoni A., Gaidukov L., Brumshtein B., Khersonsky O., Meged R., et al., Structure and evolution of the serum paraoxonase family of detoxifying and antiatherosclerotic enzymes, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 2004, 5: 412–419.
232. Ahmed Z., Ravandi A., Maguire G.F., Emili A., Draganov D., La Du B.N., et al., Multiple substrates for paraoxonase-1 during oxidation of phosphatidylcholine by peroxynitrite, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*,2002 290: 391–396.
233. Khersonsky O., Tawfik D.S, Structure-reactivity studies of serum paraoxonase PON1 suggest that its native activity is lactonase, *Biochemistry* ,2005, 16: 6371–6382.
234. Furlong C.E., Richter R.J., Seidel S.L., Costa L.G., Motulsky A.G., Spectrophotometric assays for the enzymatic hydrolysis of the active metabolites of chlorpyrifos and parathion by plasma paraoxonase/arylesterase, *Anal. Biochem.*, 1989, 180, 2: 242–247.
235. Nevin D.N., Zambon A., Furlong C.E., Richter R.J., Humbert R., Hokanson J.E, et al., Paraoxonase genotypes, lipoprotein lipase activity, and HDL, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*,1996, 16, 10:1243–1249.
236. Shih D.M. Xia Y.R., Wang X.P., Miller E., Castellani L.W., Subbanagounder G. , et al., Combined serum paraoxonase knockout/apolipoprotein E knockout mice exhibit increased lipoprotein oxidation and atherosclerosis, *J. Biol. Chem.*,2000, 275, 23:17527–17535.
237. Ng D.S., Chu T., Esposito B., Hui P., Connelly P.W., Gross P.L., Paraoxonase-1 deficiency in mice predisposes to vascular inflammation, oxidative stress, and thrombogenicity in the absence of hyperlipidemia, *Cardiovasc. Pathol.*, 2004, 17, 4: 226–232.
238. She Z.G., Zheng W., Wei Y.S., Chen H.Z., Wang A.B., Li H.L., Liu G. , et al. Human paraoxonase gene cluster transgenic overexpression represses atherogenesis and promotes atherosclerotic plaque stability in ApoE-null mice, *Circ. Res.*,2009, 104, 10:1160–1168.
239. Mackness B., Durrington P., McElduff P., Yarnell J., Azam N., Watt M., Mackness M., Low paraoxonase activity predicts coronary events in the Caerphilly Prospective Study, *Circulation* ,2003, 107, 22:2775–2779.
240. Wang M., Lang X., Cui S., Zou L., Cao J., Wang S., Wu X., Quantitative assessment of the influence of paraoxonase 1 activity and coronary heart disease risk, *DNA Cell Biol.*, 2012, 31:975–982.
241. Bhattacharyya T., Nicholls S.J., Topol E.J., Zhang R., Yang X., Schmitt D., et al. Relationship of paraoxonase 1 (PON1) gene polymorphisms and functional

- activity with systemic oxidative stress and cardiovascular risk, *JAMA* , 2008, 11, 299: 1265–1276.
242. Mackness M.I., Arrol S., Mackness B., Durrington P.N., Alloenzymes of paraoxonase and effectiveness of high-density lipoproteins in protecting low-density lipoprotein against lipid peroxidation, *Lancet*, 1997, 349, 9055: 851–852.
  243. Connelly P.W., Draganov D., Maguire G.F., Paraoxonase-1 does not reduce or modify oxidation of phospholipids by peroxyntirite, *Free Radic. Biol. Med.*, 2005, 2, 38:164–174.
  244. Draganov D.I., Teiber J.F., Speelman A., Osawa Y., Sunahara , R. La Du B.N., Human paraoxonases (PON1, PON2, and PON3) are lactonases with overlapping and distinct substrate specificities, *J. Lipid Res.*, 2005, 6, 46:1239–1247.
  245. Marathe G.K., Zimmerman G.A., McIntyre T.M., Platelet-activating factor acetylhydrolase, and not paraoxonase-1, is the oxidized phospholipid hydrolase of high density lipoprotein particles, *J. Biol. Chem.*,2003, 6, 278: 3937–3947.
  246. Teiber J.F., Draganov D.I., La Du B.N., Purified human serum PON1 does not protect LDL against oxidation in the in vitro assays initiated with copper or AAPH, *J. Lipid Res.*, 2004, 12, 45: 2260–2268.
  247. Huang Y., Wu Z., Riwanto M., Gao S., Levison B.S., Gu X., et al. Myeloperoxidase, paraoxonase-1, and HDL form a functional ternary complex, *J. Clin. Invest.*, 2013, 123:3815–3828.
  248. Rosenblat M., Vaya J., Shih D., Aviram M., Paraoxonase 1 (PON1) enhances HDL-mediated macrophage cholesterol efflux via the ABCA1 transporter in association with increased HDL binding to the cells: a possible role for lysophosphatidylcholine. *Atherosclerosis*, 2005, 179:69-77.
  249. Tward A., Xia Y.R., Wang X.P., .Shi ,Y.S., Park C., Castellani L.W., et al., Decreased atherosclerotic lesion formation in human serum paraoxonase transgenic mice. *Circulation*, 2002, 106:484-490.
  250. Shih D.M., Gu L., Xia Y.R., Navab M., Li W.F., Hama S., Castellani L.W., et al. Mice lacking serum paraoxonase are susceptible to organophosphate toxicity and atherosclerosis. *Nature*, 1998, 394:284-287.
  251. Navab M., Ananthramaiah G.M., Reddy S.T., Van Lenten B.J., Ansell B.J., Fonarow G.C., et al. The oxidation hypothesis of atherogenesis: the role of oxidized phospholipids and HDL, *J. Lipid Res.*, 2004, 45:993–1007.
  252. Mackness M.I., Arrol S., Durrington P.N., Paraoxonase prevents accumulation of lipoperoxides in low-density lipoprotein, *FEBS Lett.*, 1991, 286: 152–154.
  253. Mackness M.I., Arrol S., Abbott C., Durrington P.N., Protection of low-density lipoprotein against oxidative modification by high-density lipoprotein associated paraoxonase, *Atherosclerosis*, 1993, 104: 129–135.
  254. Wheeler J.G., Keavney B.D., Watkins H., Collins R., Danesh J., Four paraoxonase gene polymorphisms in 11212 cases of coronary heart disease and 12786 controls:meta-analysis of 43 studies. *Lancet*, 2004, 363: 689–695.
  255. Karlsson H., Kontush A., James R.W., Functionality of HDL: antioxidation and detoxifying effects. *Handb.Exp.Pharmacol.*,2015, 224:207–228.
  256. Haraguchi Y., Toh R., Hasokawa M., Nakajima H., Honjo T., Otsui K., Serum myeloperoxidase/paraoxonase 1 ratio as potential indicator of dysfunctional

- high-density lipoprotein and risk stratification in coronary artery disease. *Atherosclerosis*, 2014, 234: 288–294.
257. Cullen P., Schulte H., Assmann G., The Munster heart study (PROCAM): total mortality in middle-aged men is increased at low total and LDL cholesterol concentrations in smokers but not in nonsmokers. *Circulation*, 1997, 96:2128–2136.
258. McMahon M, Grossman J, FitzGerald J, Dahlin-Lee E, Wallace DJ, Navab M, et al. Pro-inflammatory high density lipoprotein as a biomarker for atherosclerosis in patients with systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*, 2006, 54:2541–2549.
259. de Souza JA, Vindis C, Hansel B, Negre-Salvayre A, Therond P, Kontush A. et al., Metabolic syndrome features small, apolipoprotein A-I-poor, triglyceride-rich HDL3 particles with defective anti-apoptotic activity. *Atherosclerosis*, 2008, 197:84–94.
260. Landmesser U, Sorrentino SA, Besler C, Rohrer L, Meyer M, Heinrich K, et al. Endothelial-vasoprotective effects of highdensity lipoprotein are impaired in patients with type 2 diabetes mellitus but are improved after extended-release niacin therapy. *Circulation*, 2010, 121:110–122.
261. Riwanto M, Landmesser U. High density lipoproteins and endothelial functions: mechanistic insights and alterations in cardiovascular disease. *J Lipid Res.*, 2013, 54:3227–3243.
262. Kalantar-Zadeh K, Kopple JD, Kamranpour N, Fogelman AM, Navab M., HDL-inflammatory index correlates with poor outcome in hemodialysis patients. *Kidney Int.*, 2007, 72:1149–1156.
263. Barter PJ, Caulfield M, Eriksson M, Grundy SM, Kastelein JJ, Komajda M, et al. Effects of torcetrapib in patients at high risk for coronary events. *N Engl J Med.*, 2007, 357:2109–2122.
264. Schwartz GG, Olsson AG, Abt M, Ballantyne CM, Barter PJ, Brumm J, Chaitman BR, et al. Effects of dalcetrapib in patients with a recent acute coronary syndrome. *N Engl J Med.*, 2012, 367:2089–2099.
265. Esteve E, Ricart W, Fernandez-Real JM. Dyslipidemia and inflammation: an evolutionary conserved mechanism. *Clin Nutr* 2005, 24: 16-31.
266. Khovidhunkit W., Kim M.S., Memon R.A., Shigenaga J.K., Moser A.H., Feingold K.R., Grunfeld C., Effects of infection and inflammation on lipid and lipoprotein metabolism: mechanisms and consequences to the host. *J Lipid Res*, 2004, 45(7):1169-1196.
267. Khovidhunkit W., Memon R.A., Feingold K.R., Grunfeld C., Infection and inflammation-induced proatherogenic changes of lipoproteins. *J Infect Dis*, 2000, 181(Suppl 3):S462-72.
268. Jahangiri A., de Beer M.C., Noffsinger V., Tannock L.R., Ramaiah C., Webb N.R., et al. HDL remodeling during the acute phase response. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*, 2009, 29:261-267.
269. Lamarche B., Rashid S., Lewis G.F., HDL metabolism in hypertriglyceridemic states: an overview. *Clin.Chim. Acta*, 1999, 286:145-161.
270. Greene D.J., Skeggs J.W., Morton R.E., Elevated triglyceride content diminishes the capacity of high density lipoprotein to deliver cholesteryl esters

- via the scavenger receptor class B type I (SR-BI). *J.Biol.Chem.*, 2001, 276:4804-4811.
271. Ly H., Francone O.L., Fielding C.J., et al., Endotoxin and TNF lead to reduced plasma LCAT activity and decreased hepatic LCAT mRNA levels in Syrian hamsters. *J Lipid Res.*, 1995, 36:1254-63.
272. Bergt C., Pennathur S., Fu X., Byun J., O'Brien K., McDonald T., et al. The myeloperoxidase product hypochlorous acid oxidizes HDL in the human artery wall and impairs ABCA1-dependent cholesterol transport. *Proc Natl Acad Sci*, 2004, 101:13032–13037.
273. Shao B., Oda M.N., Bergt C., Fu X., Green P.S., Brot N., Oram J.F., Heinecke J.W., Myeloperoxidase impairs ABCA1-dependent cholesterol efflux through methionine oxidation and site-specific tyrosine chlorination of apolipoprotein A-I. *J Biol Chem.*, 2006, 281:9001–9004.
274. Otocka-Kmiecik A., Mikhailidis,D.P., Nicholls,S.J., Davidson,M., Rysz,J., Banach,M., Dysfunctional HDL: a novel important diagnostic and therapeutic target in cardiovascular disease? *Prog.Lipid Res.*2012, 51:314-324.
275. Russell Warnick G., Benderson J., Albers J.J., Dextran Sulfate-Mg<sup>2+</sup> Precipitation Procedure for Quantitation of High-Density-Lipoprotein Cholesterol. *Clin.Chem.*, 1982, 28: 1379-1385.
276. Navab M., Hama S.Y., Hough Greg P., Subbanagounder G., Reddy S. T. Fogelman A.M., A cell-free assay for detecting HDL that is dysfunctional in preventing the formation for or inactivating oxidized phospholipids. *J.Lipid Res.*, 2001, 42: 1308-1317.
277. Tsimihodimos V., Karabina S.A., Tambaki A.P., Bairaktari E., Goudevenos J.A., Chapman M.J., Elisaf,M., Tselepis A.D., Atorvastatin preferentially reduces LDL-associated platelet-activating factor acetylhydrolase activity in dyslipidemias of type IIA and type IIB. *Arterioscler. Thromb.Vasc.Biol.*, 2002, 22:306-311.
278. Amarenco P., Goldstein L.B., Messig M., O'Neill B.J., Callahan A.3rd, Silleesen H., et al. Relative and cumulative effects of lipid and blood pressure control in the Stroke Prevention by Aggressive Reduction in Cholesterol Levels trial, *Stroke* 2009,40: 2486-2492.
279. Lindenstrom E., Boysen G., Nyboe J., Influence of total cholesterol, high density lipoprotein cholesterol, and triglycerides on risk of cerebrovascular disease: the Copenhagen City Heart Study, *BMJ* 1994,309 :11-15.
280. Tanne D., Yaari S., Goldbourt U., High-density lipoprotein cholesterol and risk of ischemic stroke mortality. A 21-year follow-up of 8586 men from the Israeli Ischemic Heart Disease Study, *Stroke*,1997, 28: 83-87.
281. Shahar E., et al., Plasma lipid profile and incident ischemic stroke: the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study, *Stroke*, 2003, 34:623-63.
282. Woodward M., et al., Associations between high-density lipoprotein cholesterol and both stroke and coronary heart disease in the Asia Pacific region, *Eur. Heart J.*, 2007, 28 (21) 2653-2660.
283. Bots M.L., Elwood P.C, Nikitin Y., Salonen J.T., Freire de Concalves A., Inzitari D., et al., Total and HDL cholesterol and risk of stroke. EUROSTROKE: a collaborative study among research centres in Europe, *J. Epidemiol. Community Health*, 2002, 56: i19-24.

284. Sorrentino S.A., Besler C., Rohrer L., Meyer M., Heinrich K., Bahlmann F.H., et al., Endothelial-vasoprotective effects of high-density lipoprotein are impaired in patients with type 2 diabetes mellitus but are improved after extended-release niacin therapy, *Circulation*, 2010, 121:110-122.
285. Dirnagl U., Iadecola C., Moskowitz M.A., Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. *Trends Neurosci* 1999, 22:391–7.
286. Zini I., Tomasi A., Grimaldi R., Vannini V., Agnati L.F., Detection of free radicals during brain ischemia and reperfusion by spin trapping and microdialysis. *Neurosci Lett* 1992, 138:279 – 82.
287. Globus M.Y., Busto R., Lin B., Schnippering H., Ginsberg M.D., Detection of free radical activity during transient global ischemia and recirculation: effects of intras ischemic brain temperature modulation. *J Neurochem* 1995, 65:1250 –6.
288. Yenari M.A., Xu L., Tang X.N., Qiao Y., Giffard R.G. Microglia potentiate damage to blood-brain barrier constituents improvement by minocycline in vivo and in vitro. *Stroke* 2006, 37:1087–93.
289. Muralikrishna Adibhatla R., Hatcher J.F., Phospholipase A2, reactive oxygen species, and lipid peroxidation in cerebral ischemia. *Free Radic Biol Med* 2006, 40:376–87.
290. Polidori M.C., Frei B., Cherubini A., Nelles G., Rordorf G., Keaney J.F., et al., Increased plasma levels of lipid hydroperoxides in patients with ischemic stroke. *Free Radic Biol Med* 1998, 25:561–7.
291. Cherubini A., Ruggiero C., Polidori M.C., Mecocci P., Potential markers of oxidative stress in stroke. *Free Radic Biol Med* 2005, 39:841–52.
292. Leinonen J.S., Ahonen J.P., Loennrot K., Jehkonen M., Dastidar P., Molnar G., et al. Plasma antioxidant capacity is associated with high lesion volume and neurological impairment in stroke. *Stroke* 2000,31:33–9
293. Shie F.S., Neely M.D., Maezawa I., Wu H., Olson S.J., Jurgens G., et al. Oxidized low-density lipoprotein is present in astrocytes surrounding cerebral infarcts and stimulates astrocyte interleukin-6 secretion. *Am J Pathol* 2004, 164:1173–81.
294. Lambert M., Boullier A., Hachulla E., Fruchart J.C., Teissier E., Hatron P.Y., et al. Paraoxonase activity is dramatically decreased in patients positive for anticardiolipin antibodies. *Lupus*, 2000, 9:299-300.
295. Kennedy D J., Tang W. H., Fan Y., Wu Y., Mann S., Pepoy M., Hazen S.L., Diminished Antioxidant Activity of High-Density Lipoprotein–Associated Proteins in Chronic Kidney Disease. *J Am Heart Assoc.* 2013,1-6.
296. Zhang J., Zhang Y., Hongwei L., Huai B., Ying W., Changan J., Ping F., Antioxidant properties of high-density lipoproteins are impaired in women with polycystic ovary syndrome. *Fertility and Sterility*, 2015 103: 1346-1352.
297. Liu M.E., Liao Y.C., Lin R.T., Wang Y.S., His E., Lin H.F., et al., A functional polymorphism of PON1 interferes with microRNA binding to increase the risk of ischemic stroke and carotid atherosclerosis, *Atherosclerosis*.2013,228: 161-167.
298. Tang W.H., Hazen S.L., Brennan M.L., Philip K., Tong W., et al. Plasma Myeloperoxidase Levels in Patients With Chronic Heart Failure *Am J Cardiol* , 2006, 98:796 –799.

