

ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ  
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ  
026000200786





94

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ**  
**ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ**

**ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΚΟΣ-ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ ΤΟΜΕΑΣ**  
**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΚΛΙΝΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ**

**ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΣΥΣΤΑΣΗΣ ΤΩΝ ΛΙΠΙΔΙΩΝ ΤΟΥ ΠΛΑΣΜΑΤΟΣ**  
**ΑΣΘΕΝΩΝ ΜΕ ΔΙΑΤΑΡΑΧΗ ΤΟΥ ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΥ ΤΩΝ**  
**ΛΙΠΟΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΜΕ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ ΠΥΡΗΝΙΚΟΥ**  
**ΜΑΓΝΗΤΙΚΟΥ ΣΥΝΤΟΝΙΣΜΟΥ ΠΡΩΤΟΝΙΟΥ (H NMR)**

**ΧΡΙΣΤΙΝΑ ΚΩΣΤΑΡΑ**  
**ΧΗΜΙΚΟΣ**

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

**ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2007**



Ημερομηνία:

Ημερομηνία:

Ημερομηνία:

Ημερομηνία:

Ημερομηνία:

Ημερομηνία:

Ημερομηνία:

Ημερομηνία:

Ημερομηνία:

Ημερομηνία:

Ημερομηνία:

Ημερομηνία:

Ημερομηνία:

Ημερομηνία:

Ημερομηνία:

Ημερομηνία:

Ημερομηνία:

Ημερομηνία:

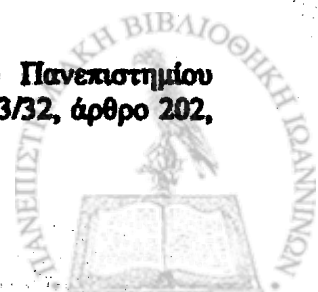
Ημερομηνία:

Ημερομηνία:

Ημερομηνία:

Ημερομηνία:

Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από την Ιατρική Σχολή του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμών του συγγραφέα, Ν. 5343/32, άρθρο 202, παράγραφος 2.



**Ημερομηνία αίτησης της κ. Κωσταρά Χριστίνας: 10-9-2003:**

**Ημερομηνία ορισμού Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: 515<sup>α</sup>/11-11-2003**

**Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:**

Επιβλέπουσα

Μπαϊρακτάρη Ελένη Επίκουρη Καθηγήτρια Βιολογικής Χημείας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Μέλη

Σεφεριάδης Κωνσταντίνος Καθηγητής Βιολογικής Χημείας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Ελισάφ Μωυσής Καθηγητής Παθολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

**Ημερομηνία ορισμού θέματος: 31-10-2003**

*«Διερεύνηση της σύστασης των λιπιδίων του πλάσματος ασθενών με διαταραχή του μεταβολισμού των λιποπρωτεϊνών με φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR)»*

**ΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ : 613<sup>α</sup>/2-10-2007**

|                          |                                                                                  |
|--------------------------|----------------------------------------------------------------------------------|
| - Γουδέβενος Ιωάννης     | Καθηγητής Παθολογίας- Καρδιολογίας, Ιατρικής Σχολής Παν/μίου Ιωαννίνων           |
| Ελισάφ Μωυσής            | Καθηγητής Παθολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων                     |
| Σεφεριάδης Κωνσταντίνος  | τ. Καθηγητής Βιολογικής Χημείας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων          |
| Σιαμόπουλος Κωνσταντίνος | Καθηγητής Παθολογίας –Νεφρολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων        |
| Τσελέπης Αλέξανδρος      | Καθηγητής Βιοχημείας Τμήματος Χημείας Πανεπιστημίου Ιωαννίνων                    |
| Μπαϊρακτάρη Ελένη        | Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Κλινικής Χημείας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων |
| Μηλιώνης Χαράλαμπος      | Επίκουρος Καθηγητής Παθολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων           |

**Έγκριση Διδακτορικής Διατριβής με βαθμό «ΑΡΙΣΤΑ» στις 23-10-2007**

**ΠΡΟΕΔΡΟΣ ΤΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΣΧΟΛΗΣ**

Ιωάννης Γουδέβενος

Καθηγητής Παθολογίας- Καρδιολογίας



Η Γραμματέας της Σχολής

6<sup>α</sup> m  
ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ  
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ



Η πρώτη φορά που έγραψα αυτό το βιβλίο, ήταν το 1970, όταν ήμουν 17 ετών. Τότε, η Ελλάδα βίωνε μια περίοδο μεγάλης αλλαγής. Η κοινωνία ήταν πολύ διαφορετική από σήμερα. Οι άνθρωποι ήταν πιο απλοί, πιο ευγενείς. Είχα μια ιδέα για το τι ήθελα να γράψω, αλλά δεν ήξερα πώς να το κάνω. Τότε, η μητέρα μου μου είπε: «Μην φοβάσαι, γράψε ό,τι θέλεις. Το βιβλίο σου θα είναι για κάποιον».

Από τότε, η ζωή μου άλλαξε. Εργάστηκα, έμαθα, έζησα. Η Ελλάδα άλλαξε πολύ. Οι άνθρωποι έγιναν πιο πολύπλοκοι, πιο απαιτητικοί. Η κοινωνία έγινε πιο δύσκολη. Αλλά, η μουσική μου παρέμεινε η ίδια. Η μουσική μου είναι η μουσική της καρδιάς μου. Είναι η μουσική που με βοηθάει να αντιμετωπίσω την ζωή. Είναι η μουσική που με κάνει να αισθάνομαι καλά. Είναι η μουσική που με κάνει να είμαι εγώ.

Τώρα, είμαι 45 ετών. Είχα μια μεγάλη ζωή. Εργάστηκα, έμαθα, έζησα. Η Ελλάδα άλλαξε πολύ. Οι άνθρωποι έγιναν πιο πολύπλοκοι, πιο απαιτητικοί. Η κοινωνία έγινε πιο δύσκολη. Αλλά, η μουσική μου παρέμεινε η ίδια. Η μουσική μου είναι η μουσική της καρδιάς μου. Είναι η μουσική που με βοηθάει να αντιμετωπίσω την ζωή. Είναι η μουσική που με κάνει να αισθάνομαι καλά. Είναι η μουσική που με κάνει να είμαι εγώ.

Κατά τη διάρκεια της ζωής μου, έγραψα πολλά βιβλία. Κάποια έγιναν δημοφιλή, κάποια όχι. Αλλά, όλα αυτά τα βιβλία είναι μέρος της ζωής μου. Είναι η μουσική μου. Είναι η μουσική που με βοηθάει να αντιμετωπίσω την ζωή. Είναι η μουσική που με κάνει να αισθάνομαι καλά. Είναι η μουσική που με κάνει να είμαι εγώ.

Τώρα, είμαι 45 ετών. Είχα μια μεγάλη ζωή. Εργάστηκα, έμαθα, έζησα. Η Ελλάδα άλλαξε πολύ. Οι άνθρωποι έγιναν πιο πολύπλοκοι, πιο απαιτητικοί. Η κοινωνία έγινε πιο δύσκολη. Αλλά, η μουσική μου παρέμεινε η ίδια. Η μουσική μου είναι η μουσική της καρδιάς μου. Είναι η μουσική που με βοηθάει να αντιμετωπίσω την ζωή. Είναι η μουσική που με κάνει να αισθάνομαι καλά. Είναι η μουσική που με κάνει να είμαι εγώ.

Το βιβλίο αυτό είναι για όλους. Είναι για όλους τους ανθρώπους που αγαπούν τη μουσική. Είναι για όλους τους ανθρώπους που θέλουν να αισθάνονται καλά. Είναι για όλους τους ανθρώπους που θέλουν να είναι εγώ.

**Αφιερώνεται  
στην οικογένειά μου**



## ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διατριβή εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Κλινικής Χημείας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων σε συνεργασία με το Βιοχημικό Εργαστήριο, το Εξωτερικό Ιατρείο Λυτιδίων της Παθολογικής Κλινικής και την Καρδιολογική Κλινική του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Ιωαννίνων.

Αισθάνομαι την ανάγκη να ευχαριστήσω πρωτίστως και ιδιαίτερα την επιβλέπουσα καθηγήτρια κα. Ε. Μπαϊρακτάρη, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Κλινικής Χημείας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων για την ανάθεση του θέματος, την ακούραστη καθοδήγηση και ηθική συμπαράστασή της καθόλη την διάρκεια της διδακτορικής διατριβής τόσο κατά την πειραματική διαδικασία και τις επιστημονικά τεκμηριωμένες υποδείξεις της, όσο και κατά τη συγγραφή της παρούσας διατριβής, καθώς και των σχετικών δημοσιεύσεων.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες θα ήθελα να εκφράσω στα μέλη της τριμελούς εξεταστικής επιτροπής, τον κ. Κ. Σεφεριάδη, Καθηγητή Βιολογικής Χημείας και τον κ. Μ. Ελισάφ, Καθηγητή Παθολογίας για την αμέριστη στήριξή τους, τόσο σε επιστημονικό όσο και σε ανθρώπινο επίπεδο. Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τον κ. Ι. Γουδέβενο, Καθηγητή Καρδιολογίας, τον καρδιολόγο Α. Παπαθανασίου, τον ειδικευόμενο παθολόγο Β. Τζοβάρη, την ειδικευόμενη νευρολόγο Μ. Διάκου και υποψήφιο διδάκτορα Θ. Φιλιππάτο για την πρόθυμη και άψογη συνεργασία τους.

Θερμές ευχαριστίες θα ήθελα να εκφράσω στις ερευνήτριες Α' και υπεύθυνες του Εργαστηρίου NMR του ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος» Δρ. Κ. Γιαννακοπούλου και Δρ. Μ. Πελεκάνου, και ιδιαίτερος στην επιστημονική συνεργατία του Ινστιτούτου Βιολογίας Δρ. Δ. Μπενάκη και στην τεχνική επιστήμονα Δρ. Α. Παναγωτοπούλου για την υποδειγματική φιλοξενία και τις πολύτιμες συμβουλές που μου προσέφεραν κατά την διάρκεια λήψης των  $^1\text{H}$ -NMR φασμάτων. Στα ίδια πλαίσια, θα ήθελα να ευχαριστήσω την επιστημονική υπεύθυνο του Κέντρου Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR) του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, κα. Β. Εξάρχου για εκπαίδευση που μου προσέφερε στη λήψη  $^1\text{H}$  NMR φασμάτων. Αν και εκτός Ελλάδος, ιδιαίτερα σημαντική ήταν η συμβολή του κ. Μ. Τ. Cung, Διευθυντή του Εργαστηρίου Φυσικοχημείας στο Νανσύ στη Γαλλία για την λήψη των  $^1\text{H}$  NMR φασμάτων σε φασματόμετρο 600MHz.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω το Κληροδότημα «Γεωργίου Σταύρου» για την οικονομική στήριξη στην εκπόνηση της διατριβής, καθώς επίσης και το «Μιχαηλίδιο Καρδιολογικό Ίδρυμα» για την χρηματοδότηση του κόστους της μελέτης.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τον υποψήφιο διδάκτορα Κλινικής Χημείας Ν. Ψυχोगιό για την πολύτιμη στήριξη τόσο σε επιστημονικό όσο και σε συναδελφικό επίπεδο και την κα. Β. Σιακλαούρα για την βοήθεια και την συμπαράστασή της καθ' όλη τη διάρκεια της διατριβής.



Θα ήθελα επιπλέον να ευχαριστήσω το επιστημονικό και τεχνικό προσωπικό του Εξωτερικού Ιατρείου Λιπιδίων της Παθολογικής και Καρδιολογικής Κλινικής και του Βιοχημικού Εργαστηρίου του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων για την άριστη συνεργασία τους στη συλλογή των δειγμάτων του ορού των ασθενών και των υγιών ατόμων και στη βιοχημική τους ανάλυση αντίστοιχα, καθ' όλη τη διάρκεια της παρούσας διατριβής.

Τέλος, απέραντη ευχαρίστηση οφείλω να εκφράσω στους γονείς μου που με έμαθαν να αγωνίζομαι για τους στόχους μου με αξιοπρέπεια και επιμονή, στις αδερφές μου που ήταν πάντα δίπλα μου και τους φίλους μου για την συμπαράστασή τους κατά τη διάρκεια εκπόνησης της διατριβής.



## ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ

|          |                                                                                   |
|----------|-----------------------------------------------------------------------------------|
| ABCA1:   | ATP binding cassette transporter 1                                                |
| apoB:    | Apolipoprotein B, Απολιποπρωτεΐνη Β                                               |
| apoCII:  | Apolipoprotein CII, Απολιποπρωτεΐνη CII                                           |
| apoCIII: | Apolipoprotein CIII, Απολιποπρωτεΐνη CIII                                         |
| apoE:    | Apolipoprotein E, Απολιποπρωτεΐνη Ε                                               |
| ARA:     | Arachidonic Acid, Αραχιδονικό οξύ,                                                |
| CETP:    | Cholesterol Ester Transfer Protein, Πρωτεΐνη μεταφοράς εστέρων<br>χοληστερόλης    |
| CHD:     | Coronary Heart Disease, Στεφανιαία νόσος αγγείων                                  |
| CK:      | Creatinine Kinase, κινάσης της κρεατινίνης                                        |
| DHA:     | Docosahexaenoic Acid, Εικοσιδυενοϊκό οξύ                                          |
| EC:      | Esterified Cholesterol, Εστεροποιημένη χοληστερόλη                                |
| EDTA:    | Ethylenediaminetetraacetic acid, Αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ                    |
| EPA:     | Eicosapentaenoic Acid, Εικοσιπεντενοϊκό οξύ                                       |
| FC:      | Free Cholesterol, Ελεύθερη χοληστερόλη                                            |
| FID:     | Free Induction Decay, Ελευθέρως φθίνουσα επαγωγή                                  |
| HDL:     | High Density Lipoproteins, Υψηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνες                        |
| ICAM-1:  | Intercellular adhesion molecule-1, Διακυτταρικό μόριο προσκολλήσεως<br>τύπου 1    |
| IDL:     | Intermediate Density Lipoproteins, Ενδιάμεσης πυκνότητας λιποπρωτεΐνες            |
| IL-6:    | Interleukin-6, Ιντερλευκίνη-6                                                     |
| LCAT:    | Lecithin Cholesterol Acyl Transferase, Λεκιθίνη: Χοληστερόλη-<br>ακυλοτρανσφεράση |
| LDL:     | Low Density Lipoproteins, Χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνες                        |
| Lp(a):   | Lipoprotein (a), Λιποπρωτεΐνη (a)                                                 |
| MDA:     | Multivariate Data Analysis, Ανάλυση Πολυμεταβλητών Δεδομένων                      |
| NCA:     | Normal coronary arteries, Φυσιολογικά αγγεία                                      |
| NMR:     | Proton Nuclear Magnetic Resonance, Πυρηνικός μαγνητικός συντονισμός               |
| NOESY:   | Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy                                            |
| PBS:     | Phosphate buffer solution, Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών                          |
| PC:      | Phosphatidylcholine, Φωσφατιδυλοχολίνη                                            |
| PC:      | Principal Component, Κύρια συνιστώσα                                              |
| PCA:     | Principal Component Analysis, Ανάλυση κύριων συνιστωσών                           |
| PE:      | Phosphatidylethanolamine, Φωσφατιδυλοαιθανολαμίνη                                 |



|             |                                                                                                    |
|-------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------|
| PL:         | Phospholipids, Φωσφολιπίδια                                                                        |
| PLS:        | Partial Least Squares, Μερικά ελάχιστα τετράγωνα ή προβολή σε κρυφές δομές                         |
| PLS-DA:     | Partial Least Squares-Discriminant Analysis, Διαχωριστική ανάλυση μερικών ελαχίστων τετραγώνων     |
| Ppm:        | Parts per million, Μέρη ανά εκατομμύριο                                                            |
| PRESS:      | Predicted Residual Error of Squares, Άθροισμα τετραγώνων των προβλεπόμενων σφαλμάτων των υπολοίπων |
| RSS:        | Residual Sum of Squares, Άθροισμα των τετραγώνων των υπολοίπων                                     |
| OSC:        | Orthogonal Signal Correction, Ορθοκανονική Διόρθωση Σήματος                                        |
| OSC/PLS-DA: | Orthogonal Signal Correction/Partial Least Squares-Discriminant Analysis                           |
| SM:         | Sphingomyelin, Σφιγγομυελίνη                                                                       |
| SR-BI:      | Scavenger Receptor-BI, Υποδοχέας καθαριστής                                                        |
| SSX:        | Sum of Squares of all X variables, Άθροισμα τετραγώνων όλων των μεταβλητών X                       |
| TG:         | Triglycerides, Τριγλυκερίδια                                                                       |
| TMS:        | Tetramethylsilane, Τετραμεθυλοσιλάνιο                                                              |
| TSP:        | Sodium 3-trimethylsilyl-(2,2,3,3- <sup>2</sup> H <sub>4</sub> )-1-propionate                       |
| TVD:        | Triple vessel disease, Νόσος τριών αγγείων                                                         |
| VCAM-1:     | Vascular cell adhesion molecule-1, Μόριο προσκολλησεως στα αγγειακά κύτταρα τύπου 1                |
| VLDL:       | Very Low-Density Lipoproteins, Πολύ χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτείνες                               |



## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

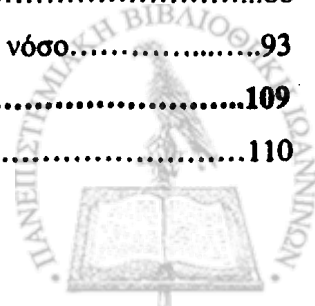
### ΕΙΣΑΓΩΓΗ

|                                                                                                     |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1.1. Τα λιπίδια και οι λιποπρωτεΐνες του πλάσματος.....                                             | 7  |
| 1.1.1. Τα λιπίδια του πλάσματος.....                                                                | 7  |
| 1.1.2. Δομή και σύσταση των λιποπρωτεϊνών.....                                                      | 9  |
| 1.1.3. Μεταβολισμός των λιποπρωτεϊνών.....                                                          | 13 |
| 1.1.4. Κλινικές διαταραχές του μεταβολισμού των λιποπρωτεϊνών.....                                  | 15 |
| 1.1.5. Καρδιαγγειακή νόσος και λιποπρωτεΐνες.....                                                   | 17 |
| 1.2. HDL και nonHDL λιποπρωτεΐνες.....                                                              | 21 |
| 1.2.1. Υψηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνες (HDL).....                                                   | 21 |
| 1.2.1.1. Ιδιότητες των HDL λιποπρωτεϊνών.....                                                       | 21 |
| 1.2.1.2. Επίδραση της σύστασης των λιπιδίων στη δομή και τις λειτουργίες των HDL λιποπρωτεϊνών..... | 22 |
| 1.2.1.3. Μεταβολές της σύστασης και της δομής των HDL σωματιδίων σε παθολογικές καταστάσεις.....    | 23 |
| 1.2.2. nonHDL λιποπρωτεΐνες.....                                                                    | 25 |
| 1.3. Μέθοδοι προσδιορισμού της σύστασης των λιποπρωτεϊνών.....                                      | 27 |
| 1.3.1. Εισαγωγή.....                                                                                | 27 |
| 1.3.2. Μέθοδοι καταβύθισης.....                                                                     | 28 |
| 1.3.3. Φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού πρωτονίου ( $^1\text{H}$ NMR).....            | 29 |
| 1.4. Φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού πρωτονίου.....                                  | 33 |
| 1.4.1. Βασικές αρχές.....                                                                           | 33 |
| 1.4.2. Δημιουργία σήματος NMR .....                                                                 | 35 |
| 1.4.2.1. Επίδραση παλμών .....                                                                      | 36 |
| 1.4.2.2. Ελευθέρως φθίνουσα επαγωγή (Free induction decay-FID).....                                 | 36 |
| 1.4.2.3. Μετασχηματισμός Fourier (Fourier Transformation, FT).....                                  | 37 |
| 1.4.2.4. Λόγος σήματος προς θόρυβο (Signal-to-noise ratio).....                                     | 38 |
| 1.4.3. Χαρακτηριστικά του φάσματος NMR.....                                                         | 38 |
| 1.4.3.1. Αριθμός σημάτων στο φάσμα NMR.....                                                         | 39 |
| 1.4.3.2. Θέσεις των σημάτων στο φάσμα NMR - Χημική μετατόπιση.....                                  | 39 |
| 1.4.3.3. Εμβადόν κορυφών πρωτονίων στο φάσμα NMR.....                                               | 40 |
| 1.4.3.4. Σύζευξη spin-spin (spin-spin coupling).....                                                | 40 |
| 1.5. Τεχνικές αναγνώρισης προτύπων.....                                                             | 43 |

|                                                                         |    |
|-------------------------------------------------------------------------|----|
| 1.5.1. Η έννοια και η ανάλυση των Πολυμεταβλητών δεδομένων.....         | 43 |
| 1.5.2. Προεπεξεργασία των δεδομένων.....                                | 43 |
| 1.5.3. Principal Component Analysis, PCA .....                          | 44 |
| 1.5.4. Partial Least-Squares Discriminant Analysis, PLS-DA.....         | 45 |
| 1.5.5. Orthogonal Signal Correction, OSC .....                          | 46 |
| 1.5.6. Αξιολόγηση των μοντέλων (Validation of models) .....             | 47 |
| 1.5.7. Η έννοια της μεταβονομικής προσέγγισης και οι εφαρμογές της..... | 48 |
| 1.6. Σκοπός της διατριβής.....                                          | 53 |

## ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

|                                                                                                              |     |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 1.7. Υλικό και μέθοδοι.....                                                                                  | 57  |
| 1.7.1. Πληθυσμός της μελέτης και συλλογή δειγμάτων αίματος.....                                              | 57  |
| 1.7.2. Προσδιορισμός των βιοχημικών και λιπιδαιμικών παραμέτρων του ορού.....                                | 58  |
| 1.7.3. Απαιτούμενος εργαστηριακός εξοπλισμός.....                                                            | 60  |
| 1.7.4. Παρασκευή αντιδραστηρίων.....                                                                         | 60  |
| 1.7.5. Διαχωρισμός των HDL και nonHDL λιποπρωτεϊνών.....                                                     | 61  |
| 1.7.5.1. Αρχή μεθόδου καταβύθισης των λιποπρωτεϊνών που περιέχουν apoB.....                                  | 61  |
| 1.7.5.2. Πειραματικό μέρος.....                                                                              | 62  |
| 1.7.6. Εκχύλιση των λιπιδίων.....                                                                            | 63  |
| 1.7.7. Φάσματα $^1\text{H}$ NMR.....                                                                         | 64  |
| 1.7.7.1. Προετοιμασία των δειγμάτων για τη λήψη των φασμάτων $^1\text{H}$ NMR.....                           | 64  |
| 1.7.7.2. Λήψη των φασμάτων $^1\text{H}$ NMR.....                                                             | 64  |
| 1.7.7.3. Επεξεργασία των φασμάτων $^1\text{H}$ NMR.....                                                      | 65  |
| 1.7.8. Μεταβονομική ανάλυση.....                                                                             | 66  |
| 1.7.8.1. Επεξεργασία των φασμάτων $^1\text{H}$ NMR .....                                                     | 66  |
| 1.7.8.2. Δημιουργία στατιστικών μοντέλων .....                                                               | 66  |
| 1.7.9. Στατιστική ανάλυση .....                                                                              | 67  |
| 1.8. Αποτελέσματα.....                                                                                       | 69  |
| 1.8.1. Ανάλυση του $^1\text{H}$ NMR φάσματος εκχυλίσματος λιπιδίων των HDL λιποπρωτεϊνών.....                | 69  |
| 1.8.2. Επίδραση των λιπιδαιμικών παραμέτρων ορού στη σύσταση των HDL λιποπρωτεϊνών.....                      | 75  |
| 1.8.3. Μελέτη της σύστασης των HDL και nonHDL λιποπρωτεϊνών ασθενών με δυσλιπιδαιμία.....                    | 81  |
| 1.8.4. Μελέτη της σύστασης των HDL και nonHDL λιποπρωτεϊνών ασθενών με εγκατεστημένη καρδιαγγειακή νόσο..... | 88  |
| 1.8.5. Μεταβονομική ανάλυση των ασθενών με εγκατεστημένη καρδιαγγειακή νόσο.....                             | 93  |
| 1.9. Συζήτηση.....                                                                                           | 109 |
| 1.9.1. Προεπεξεργασία των δεδομένων.....                                                                     | 110 |



|                                                                                                                  |     |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 1.9.2. Μελέτη επίδρασης των λιπιδαιμικών παραμέτρων του ορού στην % λιπιδιακή σύσταση των HDL λιποπρωτεϊνών..... | 110 |
| 1.9.3. Μελέτη ασθενών με δυσλιπιδαιμία.....                                                                      | 111 |
| 1.9.4. Μελέτη ασθενών με εγκατεστημένη καρδιαγγειακή νόσο.....                                                   | 112 |
| 1.10. Συμπεράσματα.....                                                                                          | 117 |
| Περίληψη στην Ελληνική.....                                                                                      | 119 |
| Περίληψη στην Αγγλική.....                                                                                       | 123 |
| Βιβλιογραφία.....                                                                                                | 127 |

## 1. Το Αιτίο της νόσου

### 1.1. Το Αιτίο της νόσου

Το αιτιολογικό αίτιο της νόσου είναι ο ιός της γρίπης Α, ο οποίος είναι ένας ιός με σφαιρικό σχήμα και με περίβλημα. Ο ιός αυτός είναι πολύ μεταδοτικός και μπορεί να μεταδοθεί από άνθρωπο σε άνθρωπο, από ζώο σε άνθρωπο ή από ζώο σε ζώο. Ο ιός της γρίπης Α είναι ο πιο συχνός αιτιολογικός παράγοντας της γρίπης. Η νόσος που προκαλείται από τον ιό της γρίπης Α είναι η γρίπη Α, η οποία είναι μια οξεία, αλλά συνήθως ήπια, νόσος. Τα συμπτώματα της γρίπης Α είναι η υψηλή πυρετός, η κόπωση, η πονοκέφαλος, η ρινική καταρροή, η βρογχίτις και η πονόλαιμος. Η νόσος διαγιγνώσκεται με βάση τα συμπτώματα και την ιστορία της νόσου. Η θεραπεία της νόσου είναι συμπτωματική και περιλαμβάνει την ανάπαυση, την κατανάλωση υγιεινών τροφών και την λήψη φαρμάκων για την ανακούφιση των συμπτωμάτων. Η πρόληψη της νόσου περιλαμβάνει την χρήση μάσκας, την αποφυγή των μεγάλων συνωστισμών και την λήψη εμβολίου.

Η νόσος είναι πολύ μεταδοτική και μπορεί να μεταδοθεί από άνθρωπο σε άνθρωπο, από ζώο σε άνθρωπο ή από ζώο σε ζώο. Ο ιός της γρίπης Α είναι ο πιο συχνός αιτιολογικός παράγοντας της γρίπης. Η νόσος που προκαλείται από τον ιό της γρίπης Α είναι η γρίπη Α, η οποία είναι μια οξεία, αλλά συνήθως ήπια, νόσος. Τα συμπτώματα της γρίπης Α είναι η υψηλή πυρετός, η κόπωση, η πονοκέφαλος, η ρινική καταρροή, η βρογχίτις και η πονόλαιμος. Η νόσος διαγιγνώσκεται με βάση τα συμπτώματα και την ιστορία της νόσου. Η θεραπεία της νόσου είναι συμπτωματική και περιλαμβάνει την ανάπαυση, την κατανάλωση υγιεινών τροφών και την λήψη φαρμάκων για την ανακούφιση των συμπτωμάτων. Η πρόληψη της νόσου περιλαμβάνει την χρήση μάσκας, την αποφυγή των μεγάλων συνωστισμών και την λήψη εμβολίου.

## ΕΙΣΑΓΩΓΗ



Χημική δομή του 2,2,3-τριμεθυλοπεντάνου



Χημική δομή του 2,2,4-τριμεθυλοπεντάνου

Σχήμα 1.1: Χημικές δομές των 2,2,3-τριμεθυλοπεντάνου και 2,2,4-τριμεθυλοπεντάνου

Το πρώτο μέρος της εργασίας είναι η εισαγωγή, η οποία περιλαμβάνει την παρουσίαση του θέματος της εργασίας, την αιτιολογία της επιλογής του θέματος, την παρουσίαση της μεθοδολογίας που ακολουθήθηκε, την παρουσίαση των αποτελεσμάτων και την παρουσίαση των συμπερασμάτων. Το δεύτερο μέρος της εργασίας είναι η θεωρητική ανάλυση, η οποία περιλαμβάνει την παρουσίαση της θεωρίας που σχετίζεται με το θέμα της εργασίας, την παρουσίαση των μεθόδων που χρησιμοποιήθηκαν για την ανάλυση των δεδομένων και την παρουσίαση των αποτελεσμάτων της ανάλυσης. Το τρίτο μέρος της εργασίας είναι η πειραματική ανάλυση, η οποία περιλαμβάνει την παρουσίαση των πειραμάτων που πραγματοποιήθηκαν, την παρουσίαση των αποτελεσμάτων των πειραμάτων και την παρουσίαση των συμπερασμάτων. Το τέταρτο μέρος της εργασίας είναι η συζήτηση, η οποία περιλαμβάνει την παρουσίαση της συζήτησης σχετικά με τα αποτελέσματα της εργασίας, την παρουσίαση των συμπερασμάτων και την παρουσίαση των προτάσεων για περαιτέρω έρευνα.

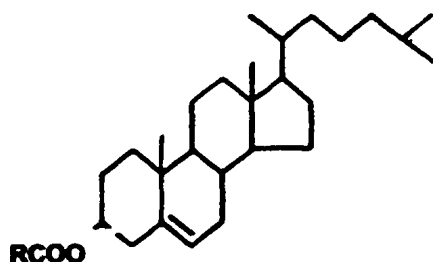


## 1.1. Τα λιπίδια και οι λιποπρωτεΐνες του πλάσματος

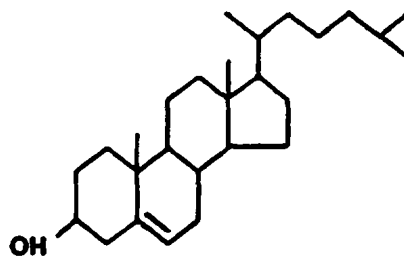
### 1.1.1. Τα λιπίδια του πλάσματος

Τα σημαντικότερα λιπίδια του πλάσματος είναι τα τριγλυκερίδια, η χοληστερόλη, τα φωσφολιπίδια και τα λιπαρά οξέα. Άλλες λιποδιαλυτές ουσίες, παρούσες σε πολύ μικρότερες ποσότητες αλλά μεγάλης φυσιολογικής σημασίας είναι οι στεροειδείς ορμόνες, οι λιποδιαλυτές βιταμίνες κ.ά. Τα λιπίδια αποτελούν την κύρια πηγή ενέργειας για τον ανθρώπινο οργανισμό και είναι σημαντικά συστατικά των κυτταρικών μεμβρανών διότι παρέχουν τη σταθερότητα στις μεμβράνες και επιτρέπουν την διαμεμβρανική μεταφορά των ουσιών μεταξύ των κυττάρων. Τα λιπίδια στο αίμα μεταφέρονται με τις λιποπρωτεΐνες (Marshall., 1998, σελ 285).

Η χοληστερόλη είναι μια στεροειδής αλκοόλη υψηλού μοριακού βάρους. Αποτελείται από ένα πυρήνα κυκλοϋπερυδροφαινανθρενίου, ενώ επιπλέον διαθέτει μια υδροξυλομάδα στη θέση 3, δυο μεθυλομάδες στις θέσεις 10 και 13, αλειφατική αλυσίδα με 8 άτομα άνθρακα στη θέση 17 και ένα διπλό δεσμό σε θέση 5,6. Η προέλευσή της στον ανθρώπινο οργανισμό είναι είτε ενδογενής (ηπατική βιόσυνθεση) είτε εξωγενής (διατροφή). Το 70% της χοληστερόλης βρίσκεται, τον λιπώδη ιστό και τα μυϊκά κύτταρα, ενώ το υπόλοιπο 30% μεταφέρεται με τις λιποπρωτεΐνες. Τα 2/3 της χοληστερόλης του πλάσματος βρίσκονται σε εστεροποιημένη μορφή, ενώ το 1/3 σε ελεύθερη (Εικόνα 1.1-1). Χρησιμοποιείται για την βιόσυνθεση και επιδιόρθωση των κυτταρικών μεμβρανών, τη σύνθεση των χολικών οξέων, της βιταμίνης D και είναι πρόδρομη ένωση για στεροειδείς ορμόνες.



Εστεροποιημένη χοληστερόλη

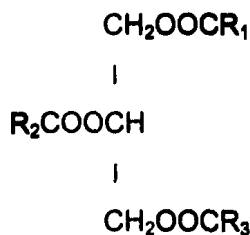


Ελεύθερη χοληστερόλη

Εικόνα 1.1-1: Ελεύθερη και εστεροποιημένη χοληστερόλη

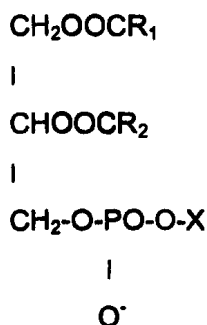
Το μόριο ενός τριγλυκεριδίου αποτελείται από ένα μόριο γλυκερόλης συνδεδεμένο με τρία μόρια λιπαρών οξέων, συνήθως διαφορετικά, τα οποία μπορεί να είναι είτε κορεσμένα είτε ακόρεστα (Εικόνα 1.1-2). Η πηγή προέλευσης των τριγλυκεριδίων στον ανθρώπινο οργανισμό μπορεί να είναι είτε ενδογενής είτε εξωγενής. Τα τριγλυκερίδια, τα οποία αποτελούν το 95% του λίπους στους ιστούς, μεταφέρονται στο πλάσμα με τις πλούσιες σε τριγλυκερίδια λιποπρωτεΐνες, τα χυλομικρά και τις πολύ χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνες (VLDL). Κατά τον μεταβολισμό τους τα λιπαρά οξέα

απελευθερώνονται στα κύτταρα και η γλυκερόλη χρησιμοποιείται για τη βιοσύνθεση νέων μορίων τριγλυκεριδίων (Marshall., 1998, σελ 285).



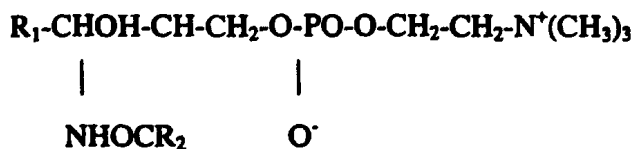
Εικόνα 1.1-2: Τριγλυκερίδιο

Τα φωσφολιπίδια είναι ενώσεις παρόμοιες με τα τριγλυκερίδια με τη διαφορά ότι ένα μόριο λιπαρού οξέος έχει αντικατασταθεί από μια πολική φωσφορική ομάδα και μια αζωτούχα βάση. Είναι αμφίφιλα μόρια δηλαδή περιέχουν μια πολική υδρόφιλη ομάδα και μια μη πολική υδρόφοβη αλυσίδα λιπαρού οξέος. Σχηματίζονται με τη σύνδεση δυο λιπαρών οξέων, 14-24 ατόμων άνθρακα, συνήθως το ένα κορεσμένο και το άλλο ακόρεστο, ενός μορίου γλυκερόλης και μιας πολικής ομάδας φωσφορικού οξέος. Η φωσφορική ομάδα μπορεί να συνδεθεί με χολίνη, αιθανολαμίνη, σερίνη ή ινοσιτόλη και να σχηματιστεί η φωσφατιδυλοχολίνη (λεκιθίνη), φωσφατιδυλαιθανολαμίνη, φωσφατιδυλοσερίνη ή φωσφατιδυλοϊνοσιτόλη, αντίστοιχα. Η σφιγγομυελίνη είναι το μόνο φωσφολιπίδιο του πλάσματος το οποίο δεν έχει στο μόριό του σκελετό γλυκερόλης αλλά σφιγγοσίνης (Εικόνα 1.1-3) (Marshall., 1998, σελ 285).



Όπου X είναι μια αζωτούχα βάση:  $-\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-N}^+(\text{CH}_3)_3$ ,  $-\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH}_3^+$ ,  $-\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH}_3^+\text{COO}^-$  οπότε αντίστοιχα προκύπτουν

η φωσφατιδυλοχολίνη, φωσφατιδυλαιθανολαμίνη, φωσφατιδυλοϊνοσιτόλη και φωσφατιδυλοσερίνη.

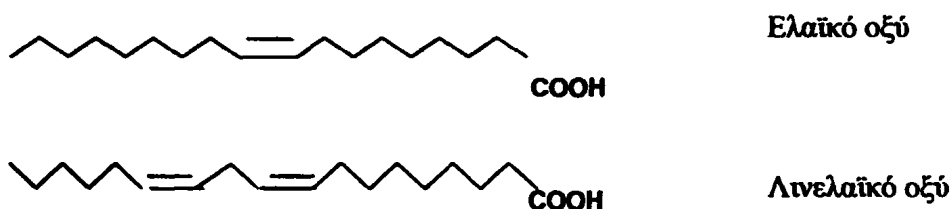


Σφιγγομυελίνη

Εικόνα 1.1-3: Φωσφολιπίδια



Τα λιπαρά οξέα είναι το κύριο συστατικό των τριγλυκεριδίων και των φωσφολιπιδίων. Στους ζωντανούς οργανισμούς απαντούν κυρίως λιπαρά οξέα μακριάς αλυσίδας (>12 άτομα άνθρακα), ενώ ανάλογα με την ύπαρξη ή όχι και τον αριθμό των διπλών δεσμών στο μόριό τους σε κορεσμένα, εάν δεν υπάρχουν διπλοί δεσμοί, μονοακόρεστα εάν υπάρχει ένας διπλός δεσμός και σε πολυακόρεστα εάν υπάρχουν δυο ή περισσότεροι διπλοί δεσμοί. Το μήκος και ο βαθμός ακορεστότητας των λιπαρών οξέων καθορίζουν τις φυσικές τους ιδιότητες καθώς επίσης και τις ιδιότητες των λιπιδίων των οποίων αποτελούν συστατικά (Εικόνα 1.1-4) (Marshall., 1998, σελ 285).



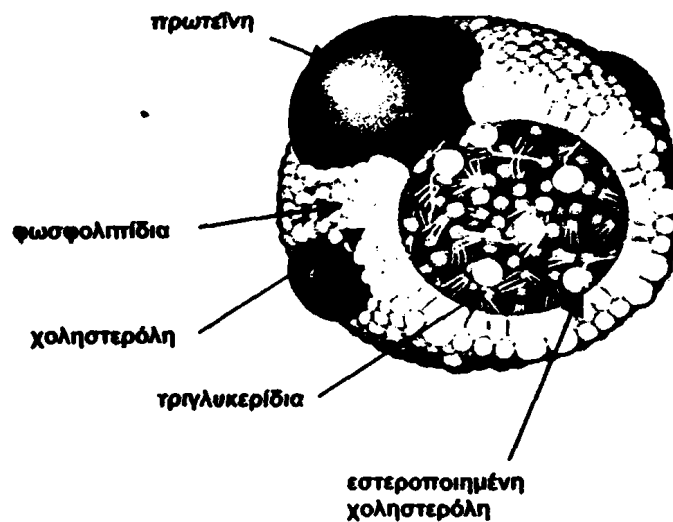
Εικόνα 1.1-4: Λιπαρά οξέα

### 1.1.2. Δομή και σύσταση των λιποπρωτεϊνών

Τα λιποπρωτεϊνικά σωματίδια είναι μακρομοριακά συμπλέγματα λιπιδίων (χοληστερόλης, εστέρων της χοληστερόλης, τριγλυκεριδίων και φωσφολιπιδίων) και πρωτεϊνών που ονομάζονται απολιποπρωτεΐνες (Εικόνα 1.1-5). Αποτελούνται από έναν μη πολικό, υδρόφοβο πυρήνα ο οποίος περιλαμβάνει τριγλυκερίδια και εστέρες της χοληστερόλης και περιβάλλονται από μια πολική, υδατοδιαλυτή επιφανειακή στιβάδα που περιέχει φωσφολιπίδια, ελεύθερη ή μη εστεροποιημένη χοληστερόλη και απολιποπρωτεΐνες. Οι τελευταίες είναι σημαντικές τόσο για τη δομική ακεραιότητα των λιποπρωτεϊνικών σωματιδίων όσο και για το μεταβολισμό τους.

Η σύνδεση των λιπιδίων του πυρήνα με τα φωσφολιπίδια και το πρωτεϊνικό τμήμα της επιφανειακής στιβάδας είναι μη ομοιοπολική και λαμβάνει χώρα κυρίως μέσω δεσμών υδρογόνου και δυνάμεων van der Waals. Η σύνδεση αυτή των λιπιδίων με τις πρωτεΐνες είναι τέτοια ώστε να επιτρέπει την γρήγορη ανταλλαγή των λιπιδίων μεταξύ των λιποπρωτεϊνικών σωματιδίων του πλάσματος και των κυτταρικών μεμβρανών και κατά συνέπεια τον μεταξύ τους διαχωρισμό καθώς και των υποκλασμάτων τους με τη βοήθεια αναλυτικών μεθόδων.

Οι κυριότερες απολιποπρωτεΐνες είναι η apoAΙ και AII, apoB100, apoCII και CIII και η apoE. Δεν έχουν μόνο δομικό ρόλο στο λιποπρωτεϊνικό σωματίδιο αλλά και λειτουργικό, καθώς συμμετέχουν σε διάφορα στάδια του μεταβολισμού τους, είτε έχοντας το ρόλο των συνενζύμων σε αντιδράσεις που λαμβάνουν χώρα κατά τον μεταβολισμό που καταλύονται από εξειδικευμένα ένζυμα, είτε συντελώντας στην αναγνώριση και σύνδεση των σωματιδίων σε εξειδικευμένους κυτταρικούς υποδοχείς, είτε διαδραματίζοντας σημαντικό ρόλο στη μεταφορά λιπιδίων μεταξύ των λιποπρωτεϊνικών σωματιδίων.



**Εικόνα 1.1-5:** Δομή λιποπρωτεϊνικού σωματιδίου  
(Lund-Katz et al. Front Biosci 2003; 8: d1044)

Οι λιποπρωτεΐνες έχουν διαφορετικές φυσικές και χημικές ιδιότητες διότι διαφέρουν ως προς την λιπιδιακή και πρωτεϊνική σύσταση. Ο διαχωρισμός τους μπορεί να γίνει με τη χρήση τεχνικών ηλεκτροφόρησης και υπερφυγοκέντρωσης. Η ταξινόμησή τους γίνεται κυρίως με βάση τη διαφορά πυκνότητας των σωματιδίων, η οποία αποτελεί την αρχή διαχωρισμού τους με την υπερφυγοκέντρωση. Συνεπώς, οι λιποπρωτεΐνες διακρίνονται στις παρακάτω κατηγορίες:

- α) Χυλομικρά με πυκνότητα μικρότερη από 0.096g/ml ( $d < 0.096 \text{g/ml}$ )
- β) Πολύ χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνες (VLDL),  $d = 0.096 - 1.006 \text{ g/ml}$
- γ) Ενδιάμεσης πυκνότητας λιποπρωτεΐνες (IDL),  $d = 1.006 - 1.019 \text{ g/ml}$
- δ) Χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνες (LDL),  $d = 1.019 - 1.063 \text{ g/ml}$
- ε) Λιποπρωτεΐνη (α) [Lp(a)],  $d = 1.060 - 1.100 \text{ g/ml}$
- στ) Υψηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνες (HDL),  $d = 1.063 - 1.210 \text{ g/ml}$

Η Lp(a) είναι μια ξεχωριστή κατηγορία λιποπρωτεϊνών η οποία συσχετίζεται δομικά με τις LDL διότι περιέχει ένα μόριο apoB100 ανά σωματίδιο και έχει παρόμοια σύσταση λιπιδίων αλλά διαφέρει στο ό,τι περιέχει την πλούσια σε υδρογονάνθρακες πρωτεΐνη apo(a) η οποία συνδέεται με την apoB100 μέσω ενός δισουλφιδικού δεσμού.

Όπως προαναφέρθηκε, οι λιποπρωτεΐνες διαφέρουν όσον αφορά τη σύσταση σε λιπίδια και απολιποπρωτεΐνες και το μέγεθός τους (Πίνακας 1.1-1). Τα χυλομικρά είναι τα μεγαλύτερα σε μέγεθος και με τη μικρότερη πυκνότητα λιποπρωτεϊνικά σωματίδια. Είναι οι κύριοι μεταφορείς των τριγλυκεριδίων που προέρχονται από τη διατροφή και απομακρύνονται από την κυκλοφορία του αίματος εντός χρονικού διαστήματος 6 ωρών. Οι VLDL λιποπρωτεΐνες είναι πλούσιες σε τριγλυκερίδια και είναι οι κύριοι μεταφορείς των τριγλυκεριδίων που βιοσυντίθενται ενδογενώς. Οι LDL βιοσυντίθενται στο ήπαρ και μεταφέρουν χοληστερόλη από το ήπαρ στους περιφερικούς ιστούς. Τέλος, οι HDL είναι οι μικρότερες σε μέγεθος αλλά με την μεγαλύτερη πυκνότητα λιποπρωτεΐνες.

Μεταφέρουν το 20-35% της ολικής χοληστερόλης του πλάσματος από τους περιφερικούς ιστούς στο ήπαρ.

Όπως προαναφέρθηκε οι λιποπρωτεΐνες διαφέρουν όσον αφορά τη σύστασή τους σε απολιποπρωτεΐνες. Η απολιποπρωτεΐνη ΑΙ είναι η κύρια δομική πρωτεΐνη των HDL σωματιδίων, βιοσυντίθεται στο ήπαρ και το έντερο και είναι συμπαράγοντας για την LCAT. Επιπρόσθετα, συμβάλλει στην πρόσδεση των HDL λιποπρωτεϊνών με τους υποδοχείς. Η apoB100 είναι η κύρια δομική πρωτεΐνη των VLDL και LDL λιποπρωτεϊνών και συμβάλλει στην αναγνώριση των LDL λιποπρωτεϊνών με τους υποδοχείς των λιποπρωτεϊνών αυτών. Η apoCII είναι το απαραίτητο συνένζυμο για την ενεργοποίηση της δράσης της λιποπρωτεϊνικής λιπάσης, ενώ η apoCIII αναστέλλει τη δράση της. Τέλος, η apoE συνδέεται με τον LDL-υποδοχέα, καθώς επίσης και τον υποδοχέα των υπολειμμάτων των σωματιδίων.

Πίνακας 1.1-1: Ταξινόμηση, χαρακτηριστικά και σύσταση των λιποπρωτεϊνών του πλάσματος

| Παράμετρος                   | Χυλομικρά                              | VLDL                                    | IDL                      | LDL                                                  | HDL                                       |
|------------------------------|----------------------------------------|-----------------------------------------|--------------------------|------------------------------------------------------|-------------------------------------------|
| Πυκνότητα (g/ml)             | <0.95                                  | 0.95-1.006                              | 1.006-1.019              | 1.019-1.063                                          | 1.063-1.210                               |
| Ηλεκτροφορητική κινητικότητα | Δεν μετακινείται                       | Προ-βήτα                                | Μεταξύ προ- και προ-βήτα | Βήτα                                                 | Άλφα                                      |
| Μοριακό Βάρος (Da)           | 0.4-30x10 <sup>9</sup>                 | 5-10x10 <sup>6</sup>                    | 3.9-4.8x10 <sup>5</sup>  | 2.75x10 <sup>5</sup>                                 | 1.8-3.6x10 <sup>5</sup>                   |
| Διάμετρος (nm)               | >70                                    | 26-70                                   | 22-24                    | 19-23                                                | 4-10                                      |
| Προέλευση                    | Έντερο                                 | Ήπαρ                                    | Καταβολισμός VLDL        | Καταβολισμός IDL                                     | Ήπαρ, έντερο                              |
| Κύρια λειτουργία             | Μεταφορά<br>εξωγενών<br>τριγλυκεριδίων | Μεταφορά<br>ενδογενών<br>τριγλυκεριδίων | Πρόδρομος των LDL        | Μεταφορά<br>χοληστερόλης από το<br>ήπαρ στους ιστούς | Ανάστροφη<br>μεταφορά της<br>χοληστερόλης |
| Σύσταση (% κ.β.)             |                                        |                                         |                          |                                                      |                                           |
| •Ελεύθερη χοληστερόλη        | 2                                      | 5-8                                     | 8                        | 13                                                   | 6                                         |
| •Εστεροποιημένη χοληστερόλη  | 5                                      | 11-14                                   | 22                       | 39                                                   | 13                                        |
| •Φωσφολιπίδια                | 7                                      | 20-23                                   | 25                       | 17                                                   | 28                                        |
| •Τριγλυκερίδια               | 84                                     | 44-60                                   | 30                       | 11                                                   | 3                                         |
| •Πρωτεΐνη                    | 2                                      | 4-11                                    | 15                       | 20                                                   | 50                                        |

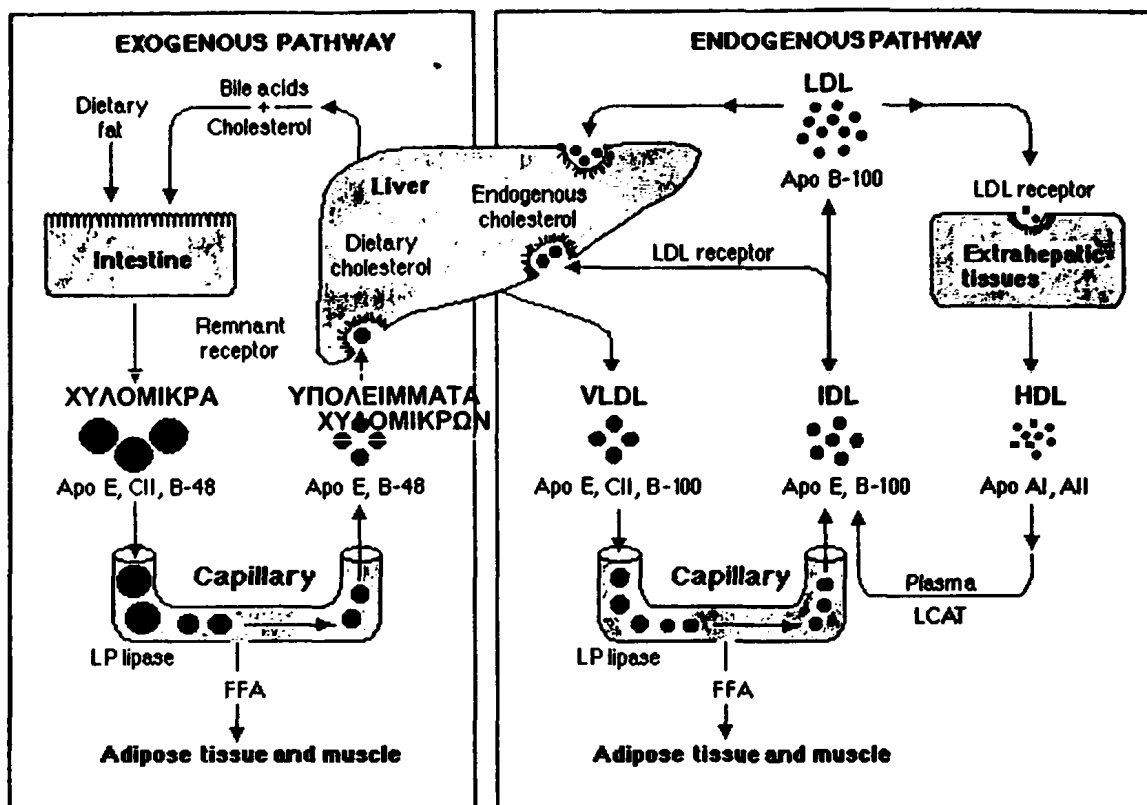
### 1.1.3. Μεταβολισμός των λιποπρωτεϊνών

Ο μεταβολισμός των λιποπρωτεϊνών (Εικόνα 1.1-6) μπορεί να περιγραφεί σε δυο μονοπάτια: το εξωγενές και το ενδογενές.

Σύμφωνα με το εξωγενές μονοπάτι, το διαιτητικό λίπος απορροφάται στα κύτταρα του εντερικού επιθηλίου και ενσωματώνεται στις πλούσιες σε τριγλυκερίδια λιποπρωτεΐνες, τα χυλομικρά, τα οποία εκκρίνονται στα λεμφαγγεία του αίματος μέσω του θωρακικού πόρου υπό μια μεταβολικά δραστική μορφή γνωστή ως νεογενή χυλομικρά. Τα τελευταία αποτελούνται από έναν πυρήνα που περιέχει κυρίως τριγλυκερίδια και εστέρες της χοληστερόλης και περιβάλλεται από μια στιβάδα που περιέχει φωσφολιπίδια, ελεύθερη χοληστερόλη και τις απολιποπρωτεΐνες AI, AII, AIV και B48. Στην κυκλοφορία, προσλαμβάνουν apoCII, apoCIII καθώς και apoE από τις HDL λιποπρωτεΐνες (HDL) και μεταπίπτουν στη μεταβολικά δραστική μορφή που είναι γνωστή με τον όρο χυλομικρά. (Διονυσίου-Αστερίου., 1997, σελ 50-51).

Τα τριγλυκερίδια των χυλομικρών υδρολύονται με τη δράση της λιποπρωτεϊνικής λιπάσης που υπάρχει στα τριχοειδή του λιπώδους ιστού και σκελετικού μυός με αποτέλεσμα την απελευθέρωση γλυκερόλης και λιπαρών οξέων, τα οποία είτε αποθηκεύονται στο λιπώδη ιστό είτε χρησιμοποιούνται για την κάλυψη των ενεργειακών αναγκών του οργανισμού. Τα σωματίδια που προκύπτουν, γνωστά ως υπολείμματα των χυλομικρών περιέχουν αυξημένη συγκέντρωση σε εστέρες της χοληστερόλης από ότι σε τριγλυκερίδια τα οποία μεταφέρονται στο ήπαρ με τη βοήθεια των apoE ή LRP υποδοχέων (Αστερίου-Διονυσίου., 1997, σελ 52). Το λιπιδιακό περιεχόμενο των καταλοίπων των χυλομικρών μετά την είσοδό τους στα ηπατοκύτταρα είτε αποθηκεύεται, είτε καταβολίζεται, είτε επανεκκρίνεται από τα ηπατοκύτταρα ως κύριο συστατικό των ενδογενών πλούσιων σε τριγλυκερίδια λιποπρωτεϊνών, γνωστών ως VLDL λιποπρωτεΐνες.

Σύμφωνα με το ενδογενές μονοπάτι, το ήπαρ συνθέτει τις πολύ χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνες (VLDL), οι οποίες μεταφέρουν τα τριγλυκερίδια και τη χοληστερόλη στους περιφερικούς ιστούς. Με τη επίδραση της λιποπρωτεϊνικής λιπάσης, οι VLDL μετατρέπονται στις IDL λιποπρωτεΐνες, οι οποίες αναφέρονται στη βιβλιογραφία και ως κατάλοιπα των VLDL λιποπρωτεϊνών. Ένα μέρος τους προσλαμβάνεται άμεσα από τα ηπατοκύτταρα διαμέσου υποδοχέων που συνδέονται με την apoE, ενώ το υπόλοιπο με την επίδραση λιπασών μετατρέπεται στις LDL. Ο πυρήνας των LDL λιποπρωτεϊνών αποτελείται σχεδόν αποκλειστικά από εστέρες της χοληστερόλης, ενώ η εξωτερική επιφάνεια από φωσφολιπίδια, ελεύθερη χοληστερόλη και apoB100, η οποία συμβάλλει στην αναγνώριση και σύνδεση των σωματιδίων αυτών με τους apoB/E υποδοχείς. (Διονυσίου-Αστερίου., 1997, σελ 58).



Εικόνα 1.1-6: Σχηματική περιγραφή του μεταβολισμού των λιποπρωτεϊνών.

Τέλος, οι HDL λιποπρωτεΐνες παράγονται από τα ηπατοκύτταρα και το εντερικό βλεννογόνο με τη μορφή σωματιδίων φτωχών σε λιπίδια ή προέρχονται από τα χυλομικρά ή τις VLDL κατά την υδρόλυση των τριγλυκεριδίων. Κατά τον μεταβολισμό τους μεταφέρουν κυρίως χοληστερόλη και φωσφολιπίδια από τα κύτταρα των εξωηπατικών ιστών και κυττάρων στο ήπαρ μέσω ενός μηχανισμού γνωστού ως «ανάστροφη μεταφορά της χοληστερόλης». Μετά τον σχηματισμό τους, τα φτωχά σε λιπίδια HDL σωματίδια προσλαμβάνουν φωσφολιπίδια και ελεύθερη χοληστερόλη με τη βοήθεια μιας μεμβρανικής πρωτεΐνης μεταφορέα που ονομάζεται ABCA1 (ATP binding cassette transporter 1).

Στη συνέχεια, η ελεύθερη χοληστερόλη εστεροποιείται με την επίδραση του ενζύμου ακυλοτρανσφεράση της χοληστερόλης. Τα HDL σωματίδια μεταφέρουν τη χοληστερόλη στο ήπαρ είτε αποδίδοντας επιλεκτικά την εστεροποιημένη χοληστερόλη στα ηπατοκύτταρα διαμέσου ενός ειδικού υποδοχέα περισυλέκτη γνωστού ως SR-BI, είτε προσλαμβάνοντας διαμέσου υποδοχέων οι οποίοι αναγνωρίζουν την apoE ή την apoAI.

#### 1.1.4. Κλινικές διαταραχές του μεταβολισμού των λιποπρωτεϊνών

Οι διαταραχές που αφορούν τον μεταβολισμό και τη διακίνηση των λιπιδίων στο πλάσμα ονομάζονται δυσλιποπρωτεϊναιμίες ή δυσλιπιδαιμίες και διακρίνονται στις υπερλιπιδαιμίες και τις υπολιπιδαιμίες. Οι τελευταίες απαντώνται σπανιότερα σε σχέση με τις πρώτες. Οι υπερλιποπρωτεϊναιμίες διακρίνονται σε πρωτοπαθείς, όταν η διαταραχή δεν οφείλεται σε αναγνωρίσιμη υποκείμενη νόσο και σε δευτεροπαθείς, όταν είναι εκδήλωση μιας άλλης νόσου. Οι δυσλιπιδαιμίες ταξινομούνται σύμφωνα με την ταξινόμηση του Fredrickson, η οποία βασίζεται στην διαφορετική ηλεκτροφορητική κινητικότητα των λιποπρωτεϊνών του πλάσματος (Πίνακας 1.1-2). Σήμερα η χρήση αυτής της ταξινόμησης τείνει να εγκαταληφθεί για τους εξής λόγους: 1) δεν λαμβάνει υπόψη τις λιποπρωτεΐνες υψηλής πυκνότητας (HDL), 2) δεν αποτελεί διαγνωστική ταξινόμηση και 3) δεν προσφέρει πληροφορίες σχετικά με την πρόγνωση των ασθενών (Ελίσάφ., 2003, σελ 31).

Πίνακας 1.1-2: Ταξινόμηση των υπερλιπιδαιμιών κατά Fredrickson

| Φαινότυπος | Λιποπρωτεϊνική διαταραχή | Αυξημένα Λιπίδια              |
|------------|--------------------------|-------------------------------|
| I          | Χυλομικρά                | Τριγλυκερίδια και Χοληστερόλη |
| IIa        | LDL                      | Χοληστερόλη                   |
| IIβ        | VLDL και LDL             | Χοληστερόλη και τριγλυκερίδια |
| III        | B-VLDL                   | Τριγλυκερίδια και Χοληστερόλη |
| IV         | VLDL                     | Τριγλυκερίδια                 |
| V          | Χυλομικρά και VLDL       | Τριγλυκερίδια και χοληστερόλη |

Μια αιτιολογική ταξινόμηση των συχνότερων πρωτοπαθών δυσλιπιδαιμιών φαίνεται στον Πίνακα 1.1-3. Θα ακολουθήσει μια σύντομη αναφορά στις προαναφερθείσες πρωτοπαθείς δυσλιπιδαιμίες. Η οικογενής υπερχοληστερολαιμία (δυσλιπιδαιμία τύπου IIa) είναι η πιο συχνή γενετική διαταραχή του μεταβολισμού των λιποπρωτεϊνών και χαρακτηρίζεται από την ύπαρξη μεταλλάξεων του γονιδίου που κωδικοποιεί τον υποδοχέα των LDL λιποπρωτεϊνών, οι οποίες έχουν ως αποτέλεσμα την ελαττωματική λειτουργία των LDL υποδοχέων, το μειωμένο καταβολισμό των LDL και τη σημαντική αύξηση των επιπέδων της LDL-χοληστερόλης. Η υπεύθυνη διαταραχή για την οικογενή ανεπάρκεια της apoB είναι η παρουσία της ελαττωματικής apoB ως προς την ικανότητα σύνδεσής της με τον LDL υποδοχέα. Η διαταραχή αυτή οφείλεται σε μετάλλαξη στη θέση 3500, όπου η γουανίνη αντικαθίσταται από αδενίνη (Ελίσάφ., 2003, σελ. 32).

Η οικογενής συνδυασμένη (μικτή) υπερλιπιδαιμία είναι μια αρκετά συχνή διαταραχή του μεταβολισμού των λιποπρωτεϊνών, η οποία κληρονομείται με τον αυτοσωμικό επικρατούντα χαρακτήρα και εκδηλώνεται με έναν από τους ακόλουθους φαινότυπους: μεμονωμένη αύξηση της ολικής και LDL-χοληστερόλης (τύπος IIa), μεμονωμένη αύξηση των τριγλυκεριδίων (τύπος IV) ή συνύπαρξη υπερχοληστερολαιμίας και

υπερτριγλυκεριδαιμίας (τύπος IIβ). Η πολυγονική υπερχοληστερολαιμία δεν οφείλεται σε μεταλλάξεις σε ένα συγκεκριμένο γονίδιο, αλλά σε μια πολύπλοκη αλληλεπίδραση πολλαπλών γενετικών και περιβαλλοντικών παραγόντων (δίαιτα πλούσια σε κεκορεσμένα λίπη, παχυσαρκία κ.ά) με αποτέλεσμα την αύξηση της ολικής και LDL χοληστερόλης (Ελισάφ., 2003, σελ. 41-42).

**Πίνακας 1.1-3: Ταξινόμηση των συχνότερων πρωτοπαθών δυσλιπιδαιμιών**

**A. Αύξηση της LDL-χοληστερόλης**

1. Οικογενής υπερχοληστερολαιμία
2. Οικογενής διαταραχή της αποπρωτεΐνης B100
3. Οικογενής συνδυασμένη υπερλιπιδαιμία
4. Πολυγονική υπερχοληστερολαιμία

**B. Ήπια ή μέτρια υπερτριγλυκεριδαιμία**

1. Οικογενής συνδυασμένη υπερλιπιδαιμία
2. Υπερλιπιδαιμία τύπου III
3. Οικογενής υπερτριγλυκεριδαιμία

**Γ. Σοβαρή υπερτριγλυκεριδαιμία**

1. Οικογενής ανεπάρκεια της λιποπρωτεϊνικής λιπάσης
2. Οικογενής ανεπάρκεια της αποπρωτεΐνης CII

**Δ. Μείωση της HDL-χοληστερόλης**

1. Οικογενής υποαλφαλιποπρωτεΐναιμία

Η οικογενής χυλομικροναιμία είναι μια σπάνια γενετική διαταραχή, η οποία κληρονομείται με αυτοσωμικό υπολειπόμενο χαρακτήρα και χαρακτηρίζεται από την παρουσία πολύ υψηλών συγκεντρώσεων τριγλυκεριδίων πλάσματος νηστείας λόγω της συσσώρευσης χυλομικρών. Η κύρια υποκείμενη γενετική διαταραχή αφορά την ανεπάρκεια ή την πλήρη απουσία είτε της λιποπρωτεϊνικής λιπάσης, η οποία είναι απαραίτητη για τον καταβολισμό των τριγλυκεριδίων των χυλομικρών και των VLDL, είτε σπανιότερα της αποπρωτεΐνης CII, η οποία είναι το απαραίτητο συνένζυμο για την ενεργοποίηση της λιποπρωτεϊνικής λιπάσης (Ελισάφ., 2003, σελ. 42).

Η οικογενής υπερλιποπρωτεΐναιμία τύπου III (δυσβηταλιποπρωτεΐναιμία) είναι μια γενετική διαταραχή του μεταβολισμού των λιποπρωτεϊνών, η οποία χαρακτηρίζεται από την συσσώρευση λιποπρωτεϊνικών καταλοίπων στο πλάσμα και την ανάπτυξη πρώιμης αθηρωματικής νόσου. Η κύρια μοριακή διαταραχή της νόσου αφορά την παρουσία ελαττωματικής, ως προς την ικανότητα σύνδεσης με τους λιποπρωτεϊνικούς υποδοχείς, apoE (Ελισάφ., 2003, σελ. 46). Η οικογενής υπερτριγλυκεριδαιμία (υπερλιπιδαιμία τύπου IV) είναι

μια σχετικά συχνή διαταραχή του μεταβολισμού των λιποπρωτεϊνών η οποία χαρακτηρίζεται από αύξηση της συγκέντρωσης των, πολύ χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεϊνών και των τριγλυκεριδίων και κληρονομείται με τον αυτοσωμικό επικρατούντα χαρακτήρα (Ελισάφ., 2003, σελ. 49).

Η οικογενής υποαλφαλιποπρωτεϊναιμία κληρονομείται με αυτοσωμικό επικρατούντα χαρακτήρα και οφείλεται συνήθως σε αυξημένο καταβολισμό των HDL λιποπρωτεϊνών. Η οικογενής υπεραλφαλιποπρωτεϊναιμία χαρακτηρίζεται από μεμονομένη αύξηση της HDL-χοληστερόλης, ενώ τα επίπεδα των υπολοίπων λιπιδαιμικών παραμέτρων είναι φυσιολογικά (Ελισάφ., 2003, σελ. 51). Οι δευτεροπαθείς δυσλιπιδαιμίες συνυπάρχουν με άλλα νοσήματα τα οποία μπορεί να αποτελούν επιλοκές των υπερλιπιδαιμιών, όπως η πρώιμη αθηρωματική νόσος και η οξεία παγκρεατίτιδα. Τα σημαντικότερα αίτια των δευτεροπαθών δυσλιπιδαιμιών είναι ο σακχαρώδης διαβήτης, υποθυρεοδισμός, ηπατική ή νεφρική νόσος ή χορήγηση φαρμάκων που επηρεάζουν το λιπιδαιμικό προφίλ (Ελισάφ., 2003, σελ. 52-53).

#### 1.1.5. Καρδιαγγειακή νόσος και λιποπρωτεΐνες

Η καρδιαγγειακή νόσος είναι η πιο συχνή αιτία νοσηρότητας και θνητότητας στο δυτικό κόσμο και στις περισσότερες περιπτώσεις οφείλεται σε αθηρωμάτωση των αγγείων. Αρκετοί παράγοντες που δρουν συνεργικά με αδιευκρίνιστους παθοφυσιολογικούς μηχανισμούς, διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη παθογένεια της αθηρωματικής νόσου τόσο στα στεφανιαία αγγεία όσο και στα άλλα αγγειακά τμήματα. Οι παράγοντες αυτοί γνωστοί ως παράγοντες κινδύνου διακρίνονται σε τροποποιήσιμους [τρόπος ζωής (δίαιτα, κάπνισμα, υπερβολική κατανάλωση οινοπνεύματος, μειωμένη σωματική δραστηριότητα), βιοχημικά και φυσιολογικά χαρακτηριστικά (υπέρταση, δυσλιπιδαιμία, διαταραχή στην ανοχή της γλυκόζης και σακχαρώδης διαβήτης, παχυσαρκία)] και μη τροποποιήσιμους (ηλικία, φύλο, ατομικό και οικογενειακό ιστορικό πρώιμης καρδιαγγειακής νόσου) (Ελισάφ., 2003, σελ. 1).

Τα τελευταία χρόνια διατυπώθηκε η άποψη ότι εκτός από τους γνωστούς και καθιερωμένους παράγοντες κινδύνου υπάρχουν και άλλες παράμετροι οι οποίες έχουν προγνωστική και ενδεχόμενα παθογενετική σημασία για την εμφάνιση πρώιμης καρδιαγγειακής νόσου όπως η υπερτροφία της αριστερής κοιλίας, τα αυξημένα επίπεδα ομοκυστεΐνης και λιποπρωτεΐνης (α), η υπερτριγλυκεριδαιμία, το οξειδωτικό stress, η υπερπηκτικότητα, η μειωμένη δραστηριότητα του ινωδολυτικού μηχανισμού, οι δείκτες φλεγμονής (π.χ. C αντιδρώσα πρωτεΐνη), λοιμώδεις παράγοντες, κ.ά. (Ελισάφ., 2003, σελ. 5).

Επιπρόσθετα, οι διαταραχές του μεταβολισμού των λιπιδίων και κυρίως η αύξηση των επιπέδων της ολικής και LDL-χοληστερόλης, καθώς και η μείωση των επιπέδων της HDL-χοληστερόλης διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην παθογένεια της αθηροσκληρωτικής νόσου και κατ' επέκταση στην εμφάνιση πρώιμης καρδιαγγειακής νόσου.

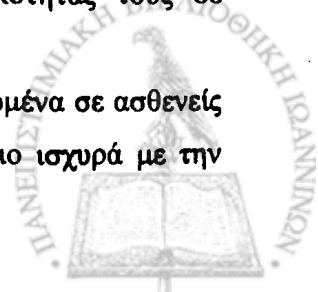
Η αύξηση των επιπέδων της LDL-χοληστερόλης είναι ο πιο σημαντικός παράγοντας κινδύνου για την εμφάνιση πρώιμης καρδιαγγειακής νόσου. Επιπρόσθετα, μελέτη έχει δείξει ότι η μείωση των επιπέδων της LDL-χοληστερόλης κατά 1% οδηγεί σε μείωση του κινδύνου εμφάνισης καρδιαγγειακής νόσου κατά 1% (Robinson et al., 2005). Η οξειδωτική τροποποίηση των LDL σωματιδίων και η συνεπακόλουθη έκφραση των προφλεγμονωδών ιδιοτήτων τους συνεισφέρουν σημαντικά στην ανάπτυξη της αθηρωματικής πλάκας (Ross et al., 1999). Επιπρόσθετα, μελέτες έχουν δείξει ότι η παρουσία μικρών και πυκνών LDL σωματιδίων αυξάνει σημαντικά τον κίνδυνο εμφάνισης πρώιμης αθηρωματικής νόσου σε σύγκριση με τα μεγαλύτερα και πιο ελαφρά LDL σωματίδια (Lamarche et al., 1997).

Τα επίπεδα της HDL-χοληστερόλης στο πλάσμα παρουσιάζουν αρνητική συσχέτιση με τον κίνδυνο εμφάνισης καρδιαγγειακής νόσου (Assmann et al., 1992). Αύξηση της HDL-χοληστερόλης κατά 1mg/dl μειώνει τον κίνδυνο εμφάνισης καρδιαγγειακής νόσου κατά 3-4%, ενώ μείωση της LDL-χοληστερόλης κατά 1mg/dl μειώνει τον κίνδυνο μόνο κατά 1-2% (Wilson et al., 1991, Assmann et al., 1998).

Οι αντιαθηρογόνες και καρδιοπροστατευτικές ιδιότητες των HDL λιποπρωτεϊνών αποδίδονται κυρίως στην ικανότητα των σωματιδίων αυτών να συλλέγουν και να μεταφέρουν ποσότητα χοληστερόλης από τα περιφερικά κύτταρα και τους ιστούς του σώματος στο ήπαρ, μια διαδικασία γνωστή ως ανάστροφη μεταφορά της χοληστερόλης (Fielding et al., 1995). Η αποτελεσματικότητα της ανάστροφης μεταφοράς της χοληστερόλης επηρεάζεται σημαντικά από την πρωτεϊνική και λιπιδιακή σύσταση των HDL σωματιδίων. Μεταβολές της σύστασης προκαλούν εξειδικευμένες αλλαγές στη διαμόρφωση και το φορτίο της apoA1, οι οποίες ευθύνονται για την αλλαγή της λειτουργικότητας των σωματιδίων αυτών (Sparks et al., 1992). Εμπλουτισμός του πυρήνα των HDL σωματιδίων με τριγλυκερίδια αλλάζει τη διαμόρφωση όλης της κεντρικής περιοχής και του C-τελικού άκρου της apoA1 και αφήνει ανεπηρέαστες μόνο δυο περιοχές του N-τελικού άκρου επηρεάζοντας σημαντικά τη λειτουργικότητά της (Curtiss et al., 2000). Αποτέλεσμα αυτού είναι η αποσταθεροποίηση των σωματιδίων αυτών με αποτέλεσμα την αυξημένη αποβολή των συστατικών τους μέσω της σπειραματικής διήθησης.

Επίσης, σημαντικό ρόλο στη λειτουργία των HDL λιποπρωτεϊνών διαδραματίζει η σύστασή τους σε φωσφολιπίδια. Το κύριο συστατικό των HDL σωματιδίων το οποίο παίζει σημαντικό ρόλο στην εκροή της χοληστερόλης από τα κύτταρα είναι τα φωσφολιπίδια (Fournier et al., 1996). Έχει βρεθεί ότι υπάρχει θετική συσχέτιση μεταξύ της εκροής της χοληστερόλης και της περιεκτικότητας των HDL σωματιδίων σε σφιγγομυελίνη και αρνητική μεταξύ εκροής της χοληστερόλης από τα κύτταρα και της περιεκτικότητάς τους σε φωσφατιδυλοαιθανολαμίνη (Fournier et al., 1997).

Κλινικές μελέτες έχουν δείξει ότι τα HDL-φωσφολιπίδια είναι μειωμένα σε ασθενείς με καρδιαγγειακή νόσο και ότι η σοβαρότητα της νόσου συσχετίζεται πιο ισχυρά με την



μείωση των HDL-φωσφολιπιδίων και ιδιαίτερα της σφιγγομυελίνης παρά με τη μείωση της HDL-χοληστερόλης (Piperi et al., 2004, Kunz et al., 1994, Horder et al., 2002). Η σοβαρότητά της παρουσιάζει θετική συσχέτιση με τα επίπεδα των μεγάλων σε μέγεθος VLDL και των μικρών HDL σωματιδίων και αρνητική με ενδιάμεσου μεγέθους HDL σωματίδια (Freedman et al., 1998).

Τέλος, τα τελευταία χρόνια έχει δοθεί ιδιαίτερο ενδιαφέρον στη λιποπρωτεΐνη (a) καθώς φαίνεται ότι η παρουσία αυξημένων επιπέδων Lp(a) στον ορό (>30 mg/dl) αποτελεί ανεξάρτητο παράγοντα κινδύνου για την εμφάνιση πρόωμης καρδιαγγειακής νόσου (Danesh et al., 2000).

## 1.2. HDL και nonHDL λιποπρωτεΐνες

### 1.2.1. Υψηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνες (HDL)

#### 1.2.1.1. Ιδιότητες των HDL λιποπρωτεϊνών

Οι HDL λιποπρωτεΐνες παρουσιάζουν ένα ευρύ φάσμα αντιαθηρογόνων ιδιοτήτων με κύρια τη διαδικασία της ανάστροφης μεταφοράς της χοληστερόλης καθώς επίσης αντιφλεγμονώδεις, αντιθρομβωτικές και αντιαποπρωτικές ιδιότητες. Η ανάστροφη μεταφορά της χοληστερόλης είναι μια από τις πιο σημαντικές αντιαθηρογόνες ιδιότητες των HDL λιποπρωτεϊνών, σύμφωνα με την οποία η περίσσεια της χοληστερόλης μεταφέρεται από τα περιφερικά κύτταρα και τους ιστούς του σώματος στο ήπαρ.

Αρχικά, η apoAΙ μετά τη βιοσύνθεση και έκκρισή της στο πλάσμα, προσλαμβάνει φωσφολιπίδια και χοληστερόλη από διάφορα κύτταρα με αποτέλεσμα τον σχηματισμό των δισκοειδών HDL σωματιδίων, γνωστά ως preB-HDL σωματίδια. Τα σωματίδια αυτά με τη διαρκή πρόσληψη χοληστερόλης, η οποία εστεροποιείται με τη δράση του ενζύμου LCAT μετατρέπονται σε ώριμα σφαιρικά σωματίδια. Με την πάροδο του χρόνου, τα HDL σωματίδια εμπλουτίζονται σε τριγλυκερίδια, με μια αντίδραση που λαμβάνει χώρα ανταλλαγή των εστέρων της χοληστερόλης των HDL σωματιδίων με τα τριγλυκερίδια των apoB λιποπρωτεϊνών και καταλύεται από το ένζυμο CETP. Η παράλληλη δράση της CETP και της ηπατικής λιπάσης έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση του περιεχομένου των λιπιδίων του πυρήνα των HDL σωματιδίων και το σχηματισμό σωματιδίων που είναι μικρότερα σε μέγεθος. Τα σωματίδια συνδέονται με τον SR-B1 υποδοχέα, τον κύριο υποδοχέα των HDL σωματιδίων στα ηπατοκύτταρα και οι εστέρες της χοληστερόλης παραδίδονται στο ήπαρ, μετατρέπονται σε χολικά άλατα και αποβάλλονται μέσω του γαστρεντερικού σωλήνα (Fielding et al., 1995).

Μελέτες έχουν δείξει ότι τα HDL σωματίδια αναστέλλουν την οξείδωση των LDL λιποπρωτεϊνών *in vitro* (Navab et al., 2000, Navab et al., 2000) και *in vivo* (Klimov et al., 1993). Η αντιοξειδωτική ικανότητα των σωματιδίων αυτών οφείλεται στην παρουσία απολιποπρωτεϊνών συμπεριλαμβανομένων της apoAΙ, E, J, AII και AIV, καθώς επίσης και ενζύμων, όπως η παραοξονάση 1, PAF-ακετυλοϋδρολάση, LCAT κ.ά. (Stein et al., 1999, Nofer et al., 2005).

Επιπρόσθετα, οι HDL λιποπρωτεΐνες αναστέλλουν την, επαγόμενη από κυτταροκίνες έκφραση των προφλεγμονωδών μορίων προσκόλλησης (Barter et al., 2002) και μειώνουν την παραγωγή της ιντερλευκίνης-6 (IL-6) (Gomaraschi et al., 2005) και της ενδοθηλίνης-1 (Horio et al., 1993) από τα ενδοθηλιακά κύτταρα. Σημαντικό ρόλο στην αναστολή της έκφρασης των μορίων αυτών παίζει το σχήμα και η σύσταση των HDL σωματιδίων καθώς τα μόρια της φωσφατιδυλοχολίνης που περιέχουν πολυακόρεστα λιπαρά οξέα διότι αναστέλλουν αποτελεσματικά την έκφραση του VCAM-1 σε ενδοθηλιακά κύτταρα (Baker et al., 2000).

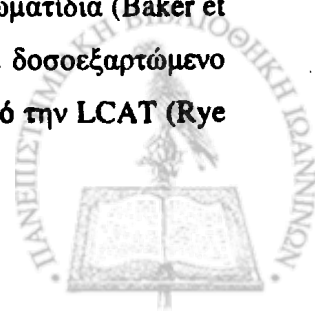
Μελέτες υποστηρίζουν ότι οι HDL λιποπρωτεΐνες αποτρέπουν τη δυσλειτουργία του ενδοθηλίου επάγοντας την παραγωγή του μονοξειδίου του αζώτου και ρυθμίζοντας τον αγγειακό τόνο (Calabresi et al., 2003). Τέλος, οι HDL λιποπρωτεΐνες εκτός από τις αντιοξειδωτικές και αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες έχουν επίσης σημαντικές αντιθρομβωτικές ιδιότητες (Kontush et al., 2006).

#### 1.2.1.2. Επίδραση της σύστασης των λιπιδίων στη δομή και τις λειτουργίες των HDL λιποπρωτεϊνών

Τα HDL σωματίδια υφίστανται τροποποιήσεις από ένζυμα του πλάσματος τα οποία καθορίζουν τη σύσταση, το σχήμα, το μέγεθος και το φορτίο της επιφάνειας των σωματιδίων και είναι κυρίως υπεύθυνα για την ετερογένεια των σωματιδίων αυτών (Rye et al., 1999). Εκτός από την επίδραση των ενζύμων του πλάσματος στη σύσταση και το μέγεθος των HDL σωματιδίων έχει διερευνηθεί αρκετά η επίδραση των συστατικών του πυρήνα και της επιφάνειας των σωματιδίων αυτών στη δομή και τις ιδιότητές τους.

Η επίδραση της σύστασης των λιπιδίων του πυρήνα των HDL λιποπρωτεϊνών στη μοριακή δομή των σωματιδίων, τη διαμόρφωση και τη σταθερότητα της apoAI διερευνήθηκε σε ομογενή ανασυνδυασμένα HDL σωματίδια. Το είδος και η ποσότητα των ουδετέρων λιπιδίων των ανασυνδυασμένων δισκοειδών και σφαιρικών HDL σωματιδίων που περιέχουν apoAI, γνωστά ως LpAI HDL σωματίδια, επηρεάζει το φορτίο της επιφάνειας και τα δομικά χαρακτηριστικά των σωματιδίων αυτών. Η αύξηση του περιεχομένου των εστέρων της χοληστερόλης στα LpAI σωματίδια παρουσιάζει θετική συσχέτιση με την αύξηση της ελεύθερης ενέργειας σταθεροποίησης της α-έλικας της apoAI τόσο στα δισκοειδή όσο και τα σφαιρικά σωματίδια, ενώ η αύξηση του περιεχομένου των τριγλυκεριδίων παρουσιάζει αρνητική συσχέτιση (Sparks et al., 1995). Η αύξηση του λόγου των εστέρων της χοληστερόλης προς τα τριγλυκερίδια συσχετίζεται με την αύξηση των επιπέδων της HDL-χοληστερόλης και του χρόνου παραμονής των σωματιδίων αυτών στο πλάσμα (Braschi et al., 1999).

Για τη διερεύνηση της επίδρασης της μείωσης του περιεχομένου των φωσφολιπιδίων στο μέγεθος και τη δομή των HDL σωματιδίων πραγματοποιήθηκε επώαση των ανασυνδυασμένων HDL σωματιδίων με φωσφολιπάση A<sub>2</sub>, η οποία υδρολύει τα φωσφολιπίδια των σωματιδίων αυτών χωρίς όμως να επηρεάζει τη συγκέντρωση των άλλων συστατικών των σωματιδίων. Από τις μελέτες αυτές προέκυψε ότι η μείωση του περιεχομένου των φωσφολιπιδίων προκαλεί μείωση του μεγέθους τους χωρίς όμως να επηρεάζει τον αριθμό των μορίων της apoAI που συνδέονται με τα HDL σωματίδια (Baker et al., 2000, Rye et al., 2000). Η σφίγγομυελίνη βρέθηκε ότι αναστέλλει με δόσοεξαρτώμενο τρόπο την αντίδραση εστεροποίησης της χοληστερόλης που καταλύεται από την LCAT (Rye et al., 1996, Subbaiah et al., 1993).



Η σύσταση σε λιπαρά οξέα της φωσφατιδυλοχολίνης των HDL σωματιδίων επηρεάζει την ικανότητα των σωματιδίων αυτών να αναστέλλουν την, επαγόμενη από κυτταροκίνες έκφραση του μορίου προσκόλλησης VCAM-1 στα ανθρώπινα ενδοθηλιακά κύτταρα (Baker et al., 2000). Επιπρόσθετα, επηρεάζεται σημαντικά και η αλληλεπίδραση της apoAI με την φωσφατιδυλοχολίνη καθώς η apoAI αλληλεπιδρά ασθενώς με τα μόρια της φωσφατιδυλοχολίνης που περιέχουν μακριάς αλυσίδας λιπαρά οξέα. Αποτέλεσμα αυτού είναι ο υπερκαταβολισμός της apoAI στο πλάσμα καθώς επίσης και τα χαμηλά επίπεδα της HDL-χοληστερόλης και της apoAI που παρατηρούνται σε άτομα που ακολουθούν δίαιτες με πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (Huggins et al., 1998).

Επίσης, διερευνήθηκε η επίδραση των απολιποπρωτεϊνών στη δομή και τη λειτουργία των σφαιρικών, ανασυνδυασμένων HDL σωματιδίων. Η αντικατάσταση της apoAI με apoAII οδηγεί σε μια μικρή αύξηση του μεγέθους των σωματιδίων χωρίς να επηρεάζεται η σειρά διάταξης των ακυλομάδων και πολικών ομάδων των φωσφολιπιδίων. Τα LpAI ανασυνδυασμένα HDL σωματίδια μεταναστεύουν γρηγορότερα σε σχέση με αυτά που περιέχουν apoAII κατά την ηλεκτροφόρηση με gel αгарόζης, διότι τα πρώτα είναι περισσότερο αρνητικά φορτισμένα σε σχέση με τα τελευταία. Η μεταφορά των εστέρων της χοληστερόλης και των τριγλυκεριδίων μεταξύ των HDL σωματιδίων και των πλούσιων σε τριγλυκερίδια λιποπρωτεϊνών είναι ανεξάρτητη από τη σύσταση των απολιποπρωτεϊνών διότι η CETP συνδέεται με τις θετικά φορτισμένες ομάδες των φωσφολιπιδίων στην επιφάνεια των λιποπρωτεϊνών (Rye et al., 1994). Επιπρόσθετα, τα HDL σωματίδια που περιέχουν apoAII απομακρύνονται ταχύτερα από το πλάσμα σε σχέση με αυτά που περιέχουν apoAI (Braschi et al., 1999).

#### 1.2.1.3. Μεταβολές της σύστασης και της δομής των HDL λιποπρωτεϊνών σε παθολογικές καταστάσεις

Έχουν πραγματοποιηθεί αρκετές κλινικές μελέτες με σκοπό την διερεύνηση της συσχέτισης παθολογικών καταστάσεων όπως η δυσλιπιδαιμία, ο σακχαρώδης διαβήτης, η υπέρταση, η καρδιαγγειακή και νεφρική νόσος κ.ά. με τις μεταβολές στη λιπιδιακή σύσταση και τη συνολική δομή των λιποπρωτεϊνικών σωματιδίων του πλάσματος. Στις μελέτες αυτές διερευνήθηκε κυρίως η σύσταση των HDL και LDL λιποπρωτεϊνών του πλάσματος, των οποίων ο διαχωρισμός αλλά και η ανάλυση της λιπιδιακής τους σύστασης πραγματοποιήθηκε με τις κλασικές μεθόδους.

Μέχρι σήμερα δεν έχουν πραγματοποιηθεί κλινικές μελέτες διερεύνησης της σύστασης των HDL και nonHDL λιποπρωτεϊνών του πλάσματος με φασματοσκοπία <sup>1</sup>H NMR, εκτός από την κλινική μελέτη που δημοσιεύτηκε από τον Kriat και τους συνεργάτες του το 1993 στην οποία όμως διερευνήθηκαν οι αλλαγές που παρατηρούνται στο πλάσμα σε ασθενείς με κακοήθεις όγκους. Όπως είναι γνωστό, στις νέες οδηγίες εισάγεται ένας νέος

όρος η “nonHDL-χοληστερόλη” (nonHDL-C) η οποία ορίζεται ως  $[TC - HDL-C]$  δηλαδή είναι το σύνολο (LDL + VLDL) χοληστερόλης και περιλαμβάνει ουσιαστικά όλες τις λιποπρωτεΐνες που περιέχουν apoB, οι περισσότερες από τις οποίες θεωρούνται σε κάποιο βαθμό αθηρωγόνες. Η nonHDL-C αποτελεί ένα δευτερογενή θεραπευτικό στόχο όταν τα επίπεδα των τριγλυκεριδίων είναι  $\geq 200$  mg/dL (Adult Treatment Panel III, 2001).

Σε ασθενείς που πάσχουν από ιδιοπαθή υπέρταση παρατηρήθηκε μείωση του λόγου σφιγγομυελίνης προς φωσφατιδυλοχολίνη στα HDL<sub>2</sub> και HDL<sub>3</sub> υποκλάσματα σε σχέση με τους υγιείς, ενώ οι γυναίκες ασθενείς που πάσχουν από ιδιοπαθή υπέρταση παρουσιάζουν μια επιπρόσθετη αύξηση του λόγου της ελεύθερης χοληστερόλης προς φωσφατιδυλοχολίνη (Bagdade et al., 1995). Πρόσφατη μελέτη έδειξε ότι οι ασθενείς με χρόνια νεφρική νόσο παρουσιάζουν μειωμένα επίπεδα HDL-χοληστερόλης και χαμηλή περιεκτικότητα σε ολική και εστεροποιημένη χοληστερόλη, φωσφολιπίδια και α-τοκοφερόλη (Hasselwander et al., 1999).

Σε καταστάσεις οξείας φάσης τα φυσιολογικά HDL σωματίδια μετατρέπονται στα προφλεγμονώδη οξείας φάσης HDL σωματίδια τα οποία παρουσιάζουν σημαντικές αλλαγές ως προς τη λιπιδιακή και πρωτεϊνική σύσταση, καθώς επίσης και τη δραστικότητα των ενζύμων. Στα σωματίδια αυτά παρατηρείται μείωση της περιεκτικότητας των τριγλυκεριδίων και αύξηση των εστέρων της χοληστερόλης. Ο λόγος της φωσφατιδυλοχολίνης προς σφιγγομυελίνη αυξάνεται, καθώς επίσης και η περιεκτικότητα σε ελεύθερα λιπαρά οξέα, λυσοφωσφατιδυλοχολίνη και ελεύθερη χοληστερόλη, ενώ η περιεκτικότητα σε σφιγγομυελίνη, φωσφατιδυλοαιθανολαμίνη και φωσφατιδυλοινωσιτόλη μειώνεται. Επίσης, στα σωματίδια αυτά περιέχονται περισσότερα μόρια φωσφατιδυλοχολίνης και εστέρων της χοληστερόλης με κορεσμένα λιπαρά οξέα από ότι με πολυακόρεστα (Pruzanski et al., 2000).

Επιμέρους μεταβολές της σύστασης των λιποπρωτεϊνικών σωματιδίων έχουν συσχετισθεί με την ύπαρξη και το βαθμό σοβαρότητας της καρδιαγγειακής νόσου. Κλινικές μελέτες έχουν δείξει ότι οι ασθενείς με στεφανιαία νόσο έχουν μειωμένα επίπεδα HDL-φωσφολιπιδίων και ότι η μείωση αυτή έχει ισχυρότερη συσχέτιση με τη σοβαρότητα της νόσου από ότι η HDL-χοληστερόλη (Naito et al., 1980, Kunz et al., 1994, Piperi et al., 2004). Επιπρόσθετα, τα χαμηλά επίπεδα της HDL-σφιγγομυελίνης στους ασθενείς αυτούς βρέθηκαν να έχουν στατιστικά σημαντική συσχέτιση με την παρουσία της στεφανιαίας νόσου και τον αριθμό των στεφανιαίων στενώσεων (Horter et al., 2002).

Ασθενείς με δυσλιπιδαιμία παρουσιάζουν σημαντικές διαφορές στην περιεκτικότητα σε apoAI, τη συγκέντρωση και το μέγεθος των HDL υποκλασμάτων (Xu et al., 2003, Jia et al., 2006). Οι ασθενείς με οικογενή υπερχοληστερολαιμία παρουσιάζουν χαμηλή συγκέντρωση φωσφολιπιδίων στο HDL<sub>3</sub> υποκλάσμα και αυξημένα επίπεδα ICAM-1 στο πλάσμα σε σχέση με τους υγιείς. Τα HDL<sub>3</sub> σωματίδια που απομονώθηκαν από ασθενείς με οικογενή υπερχοληστερολαιμία με δείκτη μάζας σώματος πάνω από 25 και ασθενείς με

οικογενή υπερχοληστερολαιμία με πρώιμη στεφανιαία νόσο έχουν μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε τριγλυκερίδια σε σχέση με αυτούς με δείκτη μάζας σώματος μικρότερο από 25 και χωρίς πρώιμη στεφανιαία νόσο (Balstad et al., 2005).

### 1.2.2. NonHDL λιποπρωτεΐνες

Με τον όρο nonHDL λιποπρωτεΐνες, γνωστές και ως apoB λιποπρωτεΐνες εννοούμε όλες τις λιποπρωτεΐνες του πλάσματος που περιέχουν apoB, δηλαδή τις LDL και VLDL, οι οποίες θεωρούνται σε κάποιο βαθμό αθηρωγόνες. Δεν υπάρχουν πολλές μελέτες στη βιβλιογραφία που να αναφέρονται στις μεταβολές της σύστασης των nonHDL σωματιδίων σε παθολογικές καταστάσεις.

Οι αλλαγές στη σύσταση των VLDL και LDL λιποπρωτεϊνών μελετήθηκε σε ασθενείς με υπέρταση σε σχέση με τους υγιείς. Οι άνδρες ασθενείς με υπέρταση παρουσιάζουν αύξηση της περιεκτικότητας της ολικής και εστεροποιημένης χοληστερόλης και μείωση της περιεκτικότητας σε φωσφατιδυλοχολίνη, φωσφατιδυλοαιθανολαμίνη, φωσφατιδυλοινωσιτόλη και φωσφατιδυλοσερίνη σε σχέση με τους υγιείς. Οι γυναίκες ασθενείς με υπέρταση παρουσιάζουν αυξημένη περιεκτικότητα σε τριγλυκερίδια, ολική, ελεύθερη και εστεροποιημένη χοληστερόλη, σφιγγομυελίνη ενώ μειωμένη είναι η περιεκτικότητα σε φωσφατιδυλοαιθανολαμίνη, φωσφατιδυλοινωσιτόλη και φωσφατιδυλοσερίνη σε σχέση με τους υγιείς (Bagdade et al., 1995).

### 1.3. Μέθοδοι προσδιορισμού των επιπέδων των λιποπρωτεϊνών και της σύστασής τους

#### 1.3.1. Εισαγωγή

Οι κύριες κλασικές τεχνικές ανάλυσης της σύστασης των λιπιδίων σε κυτταρικά εκχυλίσματα, βιολογικά υγρά και ιστούς που έχουν εφαρμοσθεί είναι η χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας, η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης, η χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής και η αέρια χρωματογραφία. Οι λιποπρωτεΐνες και τα υποκλάσματά τους μπορούν επίσης να διαχωριστούν με ηλεκτροφόρηση, υπερφυγοκέντρωση, χρωματογραφικές μεθόδους και μεθόδους καταβύθισης, καθώς επίσης και με φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού πρωτονίου. Θα κάνουμε μια σύντομη αναφορά στις παραπάνω τεχνικές και ιδιαίτερη έμφαση θα δοθεί στις μεθόδους καταβύθισης και στην φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού πρωτονίου και τις εφαρμογές της που είναι και οι κύριες μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν και εφαρμόστηκαν στο πειραματικό μέρος της διατριβής.

Όπως έχει αναφερθεί, στην ηλεκτροφόρηση βασίστηκε η ονοματολογία των λιποπρωτεϊνικών κλασμάτων και η ταξινόμηση των υπερλιπιδαιμιών κατά Fredrickson. Οι α-λιποπρωτεΐνες (HDL), λόγω της μικρότερης περιεκτικότητας σε πρωτεΐνες και του μικρότερου όγκου, είναι ταχύτερα κινούμενες και ανευρίσκονται στην περιοχή των α-σφαιρινών, οι β-λιποπρωτεΐνες (LDL) στην περιοχή των β-σφαιρινών και οι VLDL στην προ-β περιοχή. Οι IDL κινούνται μεταξύ της β και προ-β περιοχής. Η Lp(a) είναι μεγαλύτερο αλλά και πιο πυκνό μόριο σε σχέση με τις LDL, η πυκνότητά της κυμαίνεται στην περιοχή πυκνοτήτων μεταξύ της LDL (1.051g/ml) και HDL (1.082g/ml) και στο ηλεκτροφόρημα εμφανίζεται πριν από την προ-β θέση. Τέλος, τα χυλομικρά παραμένουν στο σημείο εκκίνησης της ηλεκτροφόρησης διότι δεν έχουν φορτίο (Naito et al., pg 482).

Ο διαχωρισμός των λιποπρωτεϊνών του πλάσματος με υπερφυγοκέντρωση βασίζεται στη διαφορά της πυκνότητας που παρουσιάζουν οι λιποπρωτεΐνες μεταξύ τους αλλά και με τις άλλες πρωτεΐνες του πλάσματος. Σε πυκνότητα μικρότερη από 0.096g/ml διακρίνουμε τα χυλομικρά, σε πυκνότητα που κυμαίνεται από 0.096 έως 1.006g/ml τις VLDL, 1.006-1.019 g/ml τις IDL, 1.019-1.063g/ml τις LDL, 1.060-1.100g/ml την Lp(a) και τέλος σε πυκνότητα 1.063-1.210g/ml τις HDL λιποπρωτεΐνες (Caslake and Packard., pg 509).

Αν και έχουν πραγματοποιηθεί αρκετές μελέτες με σκοπό τον διαχωρισμό των λιποπρωτεϊνών και των κλασμάτων τους καθώς επίσης και τον προσδιορισμό της σύστασής τους με τις κλασικές μεθόδους ανάλυσης των λιπιδίων, παρόλα αυτά σήμερα δεν χρησιμοποιούνται ευρέως στα κλινικά εργαστήρια παρά μόνο για ερευνητικούς σκοπούς, διότι απαιτούν ακριβό εξοπλισμό και είναι αρκετά χρονοβόρες. Επιπρόσθετα, με την μέθοδο της υπερφυγοκέντρωσης έχει αναφερθεί ότι τροποποιούνται οι φυσικές ιδιότητες μερικών λιποπρωτεϊνών (Cheung et al., 1988).

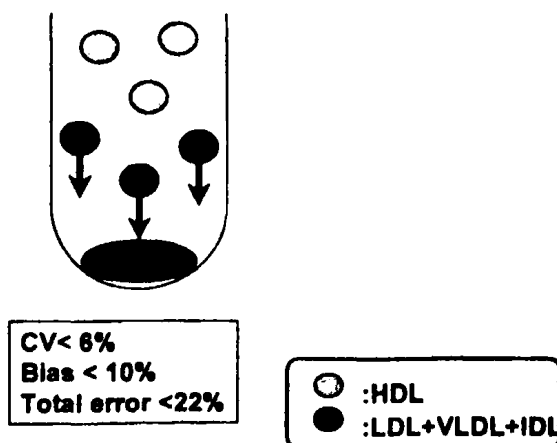
### 1.3.2. Μέθοδοι καταβύθισης

Για τον προσδιορισμό της χοληστερόλης αλλά και των υπολοίπων συστατικών των HDL σωματιδίων το σωματίδιο θα πρέπει να απομονωθεί από τις υπόλοιπες λιποπρωτεΐνες του πλάσματος. Η απομόνωση πραγματοποιείται με τις μεθόδους καταβύθισης (Εικόνα 1.3-1) και στηρίζεται κατά κύριο λόγο στο ότι τα HDL σωματίδια δεν περιέχουν απολιποπρωτεΐνη Β, μια πρωτεΐνη που είναι πλούσια σε θετικά φορτισμένα αμινοξέα αργινίνης και υπάρχει στις LDL, IDL και VLDL λιποπρωτεΐνες. Στις μεθόδους αυτές χρησιμοποιούνται πολυανιόντα ενίοτε σε συνδυασμό με δισθενή κατιόντα τα οποία σχηματίζουν αδιάλυτα σύμπλοκα με όλες τις χαμηλότερης πυκνότητας λιποπρωτεΐνες αφήνοντας τις HDL διαλυτές στο υπερκείμενο. Τα αδιάλυτα σύμπλοκα καταβυθίζονται με χαμηλής ταχύτητας φυγοκέντρωση και η περιεκτικότητα σε λιπίδια των HDL λιποπρωτεϊνών μετράται στο υπερκείμενο διάλυμα.

Η πιο ευρέως διαδεδομένη και σε κλινικές μελέτες είναι η μέθοδος της ηπαρίνης/ $Mn^{2+}$  η οποία συμπεριλαμβάνει στη μέτρηση της και τα HDL σωματίδια που περιέχουν apoE καθώς επίσης και οι μέθοδοι με θειική δεξτράνη/ $Mg^{2+}$  (MW: 50 000 D), φωσφοβολφραμικό/ $Mg^{2+}$  και με ηπαρίνη/ $Ca^{2+}$ .

Όλες οι μέθοδοι καταβύθισης επηρεάζονται από υψηλές τιμές τριγλυκεριδίων τα οποία κατά την καταβύθιση καθιστούν τις συσσωματωμένες λιποπρωτεΐνες (LDL, IDL και VLDL) ελαφρύτερες, δεν καθιζάνουν πλήρως κατά την φυγοκέντρωση με αποτέλεσμα να υπερεκτιμάται η ποσότητα της HDL-χοληστερόλης του δείγματος. Οι μέθοδοι αυτές δεν απαιτούν ακριβό εξοπλισμό και τα αντιδραστήρια δεν έχουν υψηλό κόστος αλλά η προεργασία του δείγματος είναι χρονοβόρα και περιλαμβάνει μέτρηση όγκου για το δείγμα και το αντιδραστήριο και μεταφορά του υπερκείμενου των HDL λιποπρωτεϊνών μετά την καταβύθιση για την λιπιδιακή ανάλυση, διαδικασία η οποία είναι υπεύθυνη για σημαντικό σφάλμα στα αποτελέσματα.

#### Μέθοδος με καταβύθιση



Εικόνα 1.3-1: Σχηματική παράσταση της μεθόδου καταβύθισης των λιποπρωτεϊνών

### 1.3.3. Φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού πρωτονίου ( $^1\text{H}$ NMR)

Όπως προαναφέρθηκε, οι κλασικές μέθοδοι για την ανάλυση της λιπιδιακής σύστασης σε βιολογικά υγρά, κύτταρα και ιστούς, όπως η χρωματογραφία λεπτής στιβάδας, η υψηλής απόδοσης υγρή χρωματογραφία, η χρωματογραφία ιονανταλλαγής, η αέρια χρωματογραφία και η χρωματογραφία μάζης παρέχουν την ταυτόχρονη ανίχνευση και ποσοτικοποίηση όλων των λιπιδίων που υπάρχουν σε ένα δείγμα. Παρόλα αυτά, οι πειραματικές διαδικασίες προσδιορισμού της σύστασης των λιπιδίων με τις παραπάνω μεθόδους είναι αρκετά χρονοβόρες και συνήθως απαιτούνται περισσότερα από ένα βήματα με προεπιλογή των πειραματικών συνθηκών καθιστώντας τις τεχνικές αυτές ακατάλληλες για κλινική πράξη.

Η φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού πρωτονίου παρέχει μια γρήγορη και συνολική ανάλυση της σύστασης των λιπιδίων ενός δείγματος μέσα σε λίγα λεπτά και με μικρή ή καθόλου προεπεξεργασία, παρέχει το σύνολο των μεταβολιτών που υπάρχουν στο δείγμα το οποίο δεν καταστρέφεται, δεν διαταράσσεται η χημική ισορροπία των συστατικών του, δεν απαιτείται ακριβής επιλογή των πειραματικών συνθηκών ανάλυσης και δεν χρησιμοποιούνται αντιδραστήρια.

Η φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού πρωτονίου έχει εφαρμοστεί για τη μελέτη του φάσματος NMR άθικτου πλάσματος (Nicholson et al., 1989, Ala-Korpela., 1995) και τον διαχωρισμό και την ποσοτικοποίηση των λιποπρωτεϊνών και των υποκλασμάτων τους με βάση το σήμα συντονισμού τους (Otvos et al., 1991, Otvos et al., 1992). Επιπρόσθετα, έχουν διεξαχθεί μελέτες για τη διάγνωση εγγενών διαταραχών του μεταβολισμού των λιπιδίων (Parmar et al., 1989, Wilson et al., 1996, Ruan et al., 2001, Oostendorp et al., 2006).

Θα εστιάσουμε περισσότερο την προσοχή μας στις μελέτες που έχουν διεξαχθεί με φασματοσκοπία NMR και αφορούν τη μελέτη της λιπιδιακής σύστασης εκχυλισμάτων κυττάρων, ιστών και βιολογικών υγρών.

Η πρώτη μελέτη όσον αφορά τη διερεύνηση της σύστασης των εκχυλισμάτων των λιπιδίων δημοσιεύτηκε από την Sparling και τους συνεργάτες της το 1989 (Sparling et al., 1989). Τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη ήταν εκχυλίσματα κυτταρικής σειράς. Η μελέτη αυτή ήταν η πρώτη που περιελάμβανε εκτεταμένη αναφορά στην ταυτοποίηση όλων των λιπιδίων (τριγλυκερίδια, διγλυκερίδια, ελεύθερη και εστεροποιημένη χοληστερόλη, φωσφολιπίδια, λιπαρά οξέα) με βάση τις χημικές τους μετατοπίσεις στο φάσμα NMR, τον προσδιορισμό των λόγων τους, καθώς επίσης και τα δομικά χαρακτηριστικά των λιπαρών οξέων (μέσο μήκος αλυσίδας, βαθμός ακορεστότητας, αριθμός λιπαρών οξέων).

Έπειτα, αρκετές μελέτες πραγματοποιήθηκαν σε πειραματικά μοντέλα, όπως σε εκχυλίσματα ήπατος αρουραίων (Casu et al., 1991, Pollesello et al., 1991, Choi et al., 1993), αορτή, νεφρό και καρδιά υπερτασικών αρουραίων (Chi and Gupta., 1998) και πρωτοζώων

(Adosraku et al., 1996). Ο Casu και οι συνεργάτες του το 1991 μελέτησαν ποιοτικά και ποσοτικά τη λιπιδιακή σύσταση εκχυλισμάτων ήπατος αρουραίων. Σε φάσμα NMR μιας και δυο διαστάσεων έγινε ταυτοποίηση όλων των λιπιδίων, καθώς επίσης και των δομικών χαρακτηριστικών των λιπαρών οξέων (Casu et al., 1991). Στη μελέτη που δημοσιεύτηκε από τον Pollesello και τους συνεργάτες του το 1991 διερευνήθηκε η λιπιδιακή σύσταση εκχυλισμάτων μιτοχονδρίων ήπατος. Στο φάσμα  $^1\text{H}$  NMR ταυτοποιήθηκαν οι κορυφές συντονισμού των ολεφινικών πρωτονίων, των πρωτονίων των μέθυλο και μεθυλενο ομάδων της αλυσίδας των λιπαρών οξέων, των φωσφολιπιδίων και της χοληστερόλης. Επιπρόσθετα, υπολογίστηκαν οι λόγοι των λιπιδίων, καθώς επίσης και τα δομικά χαρακτηριστικά των λιπαρών οξέων (Pollesello et al., 1991).

Ο Choi και οι συνεργάτες του το 1993 διερεύνησαν τη λιπιδιακή σύσταση εκχυλίσματος ήπατος αρουραίων. Τα λιπίδια αφού διαχωρίστηκαν με χρωματογραφία με βάση την πολικότητα των λιπιδίων σε 4 κλάσματα (ουδέτερα λιπίδια και χοληστερόλη, ελεύθερα ή μη εστεροποιημένα λιπαρά οξέα, μη όξινα φωσφολιπίδια, όξινα φωσφολιπίδια), έπειτα ελήφθησαν τα αντίστοιχα φάσματα NMR των τεσσάρων κλασμάτων των λιπιδίων όπου έγινε η ταυτοποίησή τους (Choi et al., 1993). Τις αλλαγές στη σύσταση των λιπαρών οξέων των φωσφολιπιδίων των μεμβρανών αορτής, νεφρών και καρδιάς υπερτασικών αρουραίων διερεύνησαν οι Choi και Gupta το 1998 (Chi and Gupta, 1998). Τέλος, το 1996 ο Adosraku και οι συνεργάτες του μελέτησαν τη σύσταση εκχυλισμάτων των λιπιδίων πρωτοζώων *Tetrahymena thermophila* (Adosraku et al., 1996).

Το 1990 πραγματοποιήθηκε από τον Sze και τους συνεργάτες του μελέτη στην οποία διερευνήθηκε η σύσταση εκχυλισμάτων λιπιδίων λεμφοκυττάρων ανθρώπων (Sze et al., 1990). Έπειτα ακολούθησαν μελέτες στα εκχυλίσματα λιπιδίων ήπατος (Pollesello et al., 1993), ερυθροκυττάρων (Adosraku et al., 1994) καθώς και αιμοπεταλίων (Noula et al., 2000).

Η πρώτη κλινική μελέτη διερεύνησης της λιπιδιακής σύστασης των εκχυλισμάτων των λιπιδίων των λιποπρωτεϊνών του πλάσματος δημοσιεύτηκε από τον Kriat και τους συνεργάτες του το 1993 (Kriat et al., 1993). Στη μελέτη αυτή διερευνήθηκαν οι ποιοτικές και ποσοτικές αλλαγές που παρατηρούνται στο πλάσμα ασθενών με κακοήθεις όγκους. Σε ασθενείς με καρκίνο παρατηρήθηκε μια στατιστικά σημαντική αύξηση του λόγου των τριγλυκεριδίων προς τα φωσφολιπίδια και μείωση των ολικών φωσφολιπιδίων, ενώ δεν ανιχνεύτηκαν συγκεκριμένα λιπίδια όπως τα γλυκολιπίδια.

Μέχρι σήμερα δεν έχουν δημοσιευτεί μελέτες της λιπιδιακής σύστασης των HDL και nonHDL λιποπρωτεϊνών του πλάσματος με φασματοσκοπία  $^1\text{H}$  NMR. Η μελέτη της λιπιδιακής σύστασης των δυο αυτών κλασμάτων είναι ιδιαίτερα σημαντική καθώς τα HDL σωματίδια αντιπροσωπεύουν τις αντιαθηρογόνες λιποπρωτεΐνες, των οποίων όπως έχει προαναφερθεί οι λειτουργίες και ιδιότητες επηρεάζονται από αλλαγές στη λιπιδιακή τους σύσταση, ενώ τα nonHDL σωματίδια τις αρB λιποπρωτεΐνες, οι οποίες σε κάποιο βαθμό

είναι αθηρογόνες και σύμφωνα με τις σύγχρονες οδηγίες η nonHDL-χοληστερόλη θεωρείται ένας νέος δευτερογενής θεραπευτικός στόχος θεραπείας ατόμων με αυξημένα επίπεδα τριγλυκεριδίων ( $>200\text{mg/dL}$ ) (Adult Treatment Panel III., 2001).

Τις τελευταίες δυο δεκαετίες, αρκετές κυρίως τοξικολογικές μελέτες έχουν δημοσιευτεί στις οποίες με την φασματοσκοπία  $^1\text{H}$  NMR σε συνδυασμό με τις τεχνικές αναγνώρισης προτύπων καθίσταται εφικτός ο καθορισμός του μεταβολικού προφίλ των βιολογικών υγρών σε πειραματικά μοντέλα με σκοπό την διερεύνηση της αποτελεσματικότητας της χορήγησης φαρμάκων και την ανίχνευση δεικτών τοξικότητας και βλάβης συγκεκριμένων ζωτικών οργάνων (Lindon et al., 2004, Nicholson et al., 2003) και σε μικρότερο βαθμό στην διερεύνηση της σχέσης μεταξύ μεταβολικού προφίλ του ορού και των παθολογικών καταστάσεων στους ανθρώπους. Εκτεταμένη αναφορά θα ακολουθήσει σε επόμενη ενότητα.

## 1. 4. Φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού πρωτονίου

### 1.4.1. Βασικές αρχές

Η φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού πρωτονίου (proton nuclear magnetic resonance spectroscopy,  $^1\text{H}$  NMR spectroscopy) είναι μια αναλυτική τεχνική με εφαρμογές στη Φυσική, Χημεία, Βιοχημεία, Βιοφυσική και την Ιατρική. Το φαινόμενο του πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού βασίζεται σε διεγέρσεις μαγνητικών πυρήνων οι οποίοι είναι τοποθετημένοι σε ισχυρό μαγνητικό πεδίο. Η συχνότητα της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας που προκαλεί τις διεγέρσεις αντιστοιχεί στην περιοχή των ραδιοσυχνοτήτων ( $3 \times 10^8 - 3 \times 10^9 \text{ Hz}$ ).

Οι πυρήνες όλων των στοιχείων περιέχουν φορτία και όταν περιστρέφονται, λόγω των ιδιοπεριστροφών τους (spin), συμπεριφέρονται ως μαγνητικά δίπολα και επάγουν μαγνητικά πεδία κάθετα στο επίπεδο περιστροφής. Το μέγεθος του δημιουργούμενου διπόλου αποτελεί θεμελιώδη πυρηνική ιδιότητα που καλείται πυρηνική μαγνητική ροπή ( $\mu$ )

$$\mu = \frac{\gamma \hbar [I(I+1)]^{1/2}}{2\pi}$$

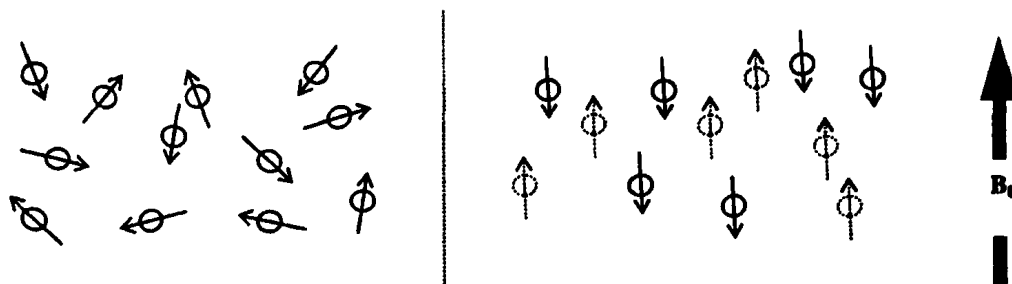
όπου  $\hbar$  είναι η σταθερά του Planck,  $\gamma$  μια πυρηνική σταθερά που ονομάζεται γυρομαγνητικός λόγος και  $I$  η γωνιακή στροφορμή.

Υπάρχουν τρία είδη πυρήνων: α) πυρήνες που έχουν άρτιο ατομικό και μαζικό αριθμό, δεν παρουσιάζουν γωνιακή στροφορμή ( $I=0$ ), δεν εκδηλώνουν μαγνητικές ιδιότητες και επομένως δεν δίνουν σήματα NMR, β) πυρήνες που έχουν περιττό μαζικό αριθμό και περιττό ή άρτιο ατομικό αριθμό, παρουσιάζουν ημιακέραιους αριθμούς spin δηλαδή  $I=n(1/2)$  και γ) πυρήνες που έχουν άρτιο μαζικό αριθμό και περιττό ατομικό αριθμό οι οποίοι παρουσιάζουν ακέραιους αριθμούς spin. Οι πυρήνες με  $I=1/2$  παρουσιάζουν συμμετρική σφαιρική κατανομή του φορτίου τους και είναι κυρίως αυτοί που χρησιμοποιούνται στην φασματοσκοπία NMR σε αντίθεση με τους πυρήνες με  $I \geq 1$  που παρουσιάζουν ελλειψοειδή κατανομή φορτίου (Χατζηιωάννου και Κουμπάρη., 1997, σελ 312, Attua-ur-Rahman and Choudhary Ml., 1996, pg 18).

Απουσία εξωτερικού μαγνητικού πεδίου τα ανύσματα των πυρηνικών μαγνητικών ροπών προσανατολίζονται τυχαία στο χώρο (Εικόνα 1.4-1α). Με την παρουσία όμως εξωτερικού μαγνητικού πεδίου  $B_0$  κατά μήκος του άξονα  $z$  επιλέγεται μια φυσική διεύθυνση προς την οποία τείνουν να προσανατολιστούν οι μαγνητικές ροπές των πυρήνων: παράλληλα προς το εξωτερικό μαγνητικό πεδίο  $B_0$  (χαμηλότερη ενεργειακή κατάσταση) ή αντιπαράλληλα (υψηλότερη ενεργειακή κατάσταση) (Εικόνα 1.4-1β). Καθένας από τους προσανατολισμούς αυτούς αντιστοιχεί σε ένα ενεργειακό επίπεδο:

$$E = \pm \mu B_0 = \pm \frac{m_I \gamma \hbar B_0}{2\pi}$$

όπου  $m_I$  είναι ο μαγνητικός κβαντικός αριθμός του πυρήνα.



**Εικόνα 1.4-1:** Προσανατολισμός των διανυσμάτων των πυρηνικών μαγνητικών διπολικών ροπών  $\mu$   
α) απουσία εξωτερικού μαγνητικού πεδίου, β) παρουσία εξωτερικού μαγνητικού πεδίου

Η τιμή της γωνιακής στροφορμής του πυρήνα του πρωτονίου είναι  $\frac{1}{2}$  και επομένως μπορεί να έχει δυο δυνατούς προσανατολισμούς: παράλληλα προς το μαγνητικό πεδίο  $B_0$  ( $I=1/2$ , χαμηλότερη ενεργειακή κατάσταση) και αντιπαράλληλα ( $I=-1/2$ , υψηλότερη ενεργειακή κατάσταση). Η μετάβαση από την χαμηλότερη προς την υψηλότερη ενεργειακή κατάσταση πραγματοποιείται με την απορρόφηση ενέργειας γνωστή ως ενέργεια διέγερσης, η οποία είναι ίση με την ενεργειακή διαφορά των δυο καταστάσεων (Εικόνα 1.4-2). Η διαφορά ενέργειας  $\Delta E$  δίνεται από τη σχέση:

$$\Delta E = h\nu_0 = \frac{\mu B_0}{I} = \frac{\gamma \hbar B_0}{2\pi}$$

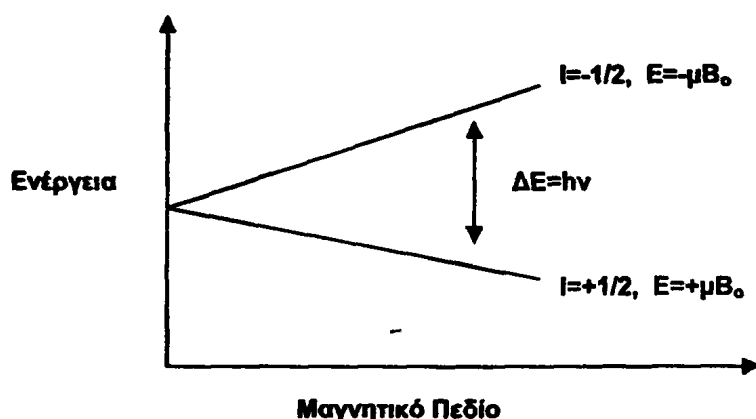
όπου  $\nu_0$  είναι η συχνότητα της μεταπτωτικής κίνησης του πυρήνα (συχνότητα Larmor),  $\mu$  η πυρηνική μαγνητική ροπή και  $\gamma$  ο γυρομαγνητικός λόγος του πυρήνα. Η συχνότητα Larmor δίνεται από τη σχέση:

$$\nu_0 = \frac{\gamma B_0}{2\pi}$$

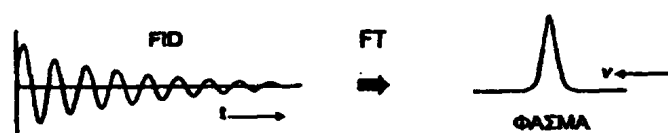
Η αποδιέγερση του πυρήνα και κατά συνέπεια η επιστροφή του στη χαμηλότερη ενεργειακή κατάσταση (θεμελιώδη κατάσταση) χαρακτηρίζεται από τον spin-πλέγμα χρόνο αποκατάστασης  $T_1$  (spin-lattice relaxation  $T_1$ ), μια διεργασία που συνοδεύεται με απώλεια ενέργειας του διεγερμένου πυρηνικού spin προς το περιβάλλον του μοριακού πλέγματος και τον spin-spin χρόνο αποκατάστασης  $T_2$  (spin-spin relaxation  $T_2$ ) που συνοδεύεται με απώλεια ενέργειας του διεγερμένου πυρηνικού spin προς τους γειτονικούς.

Η εκθετική εξασθένιση του σήματος κατά την αποδιέγερση των πυρήνων καλείται ελευθέρως φθίνουσα επαγωγή (Free Induction Decay-FID) η οποία αποθηκεύεται στη μνήμη

του υπολογιστή και μετατρέπεται με μια μαθηματική συνάρτηση γνωστή ως «μετασχηματισμός Fourier» σε σήμα συχνοτήτων, το φάσμα NMR (Εικόνα 1.4-3) (Μαυρομούστακος και Ματσούκας., 2006, σελ 24).



Εικόνα 1.4-2: Μεταβάσεις μεταξύ δυο καταστάσεων που συμβαίνουν με την απορρόφηση ή εκπομπή κβαντικής ενέργειας ισοδύναμης με την ενεργειακή διαφορά των δυο καταστάσεων



Εικόνα 1.4-3: Επεξεργασία της FID από τον ηλεκτρονικό υπολογιστή.

## 1.4.2. Δημιουργία σήματος NMR

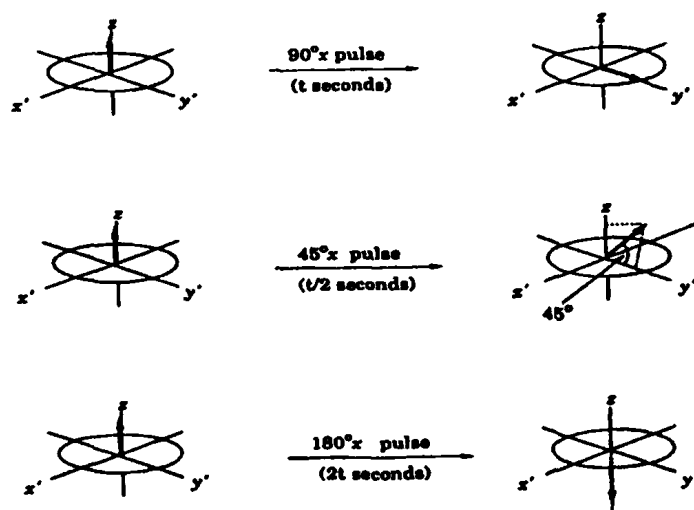
Το δείγμα υπό μορφή διαλύματος σε κατάλληλα δευτεριωμένο διαλύτη μεταφέρεται σε ειδικό γυάλινο σωληνάριο NMR με ομοιογενή τοιχώματα και τοποθετείται σε ένα μεταλλικό κάθετο σωλήνα που βρίσκεται μεταξύ των πόλων του μαγνήτη. Η ακτινοβολία με παλμούς ραδιοσυχνοτήτων (συνήθως παλμός  $90^\circ$ ) εκπέμπεται από ένα πηνίο (πομπός) που είναι περιτυλιγμένο γύρω από το δείγμα για χρονικό διάστημα μερικών  $\mu\text{sec}$ . Ο ραδιοπαλμός δεν είναι μονοχρωματικός αλλά περιλαμβάνει ένα εύρος συχνοτήτων ( $\sim\text{MHz}$ ) γύρω από την κεντρική συχνότητα εκπομπής του  $\nu_0$ . Το εύρος των συχνοτήτων μπορεί να θεωρηθεί ως μια κατανομή γύρω από την κεντρική συχνότητα  $\nu_0 \pm 1/t_p$ , όπου  $t_p$  είναι η διάρκεια εφαρμογής του παλμού. Με τον τρόπο αυτό διεγείρονται ταυτόχρονα όλοι οι πυρήνες πρωτονίου και ο καθένας αποδιεγείρεται ανάλογα με το γειτονικό ηλεκτρονιακό του περιβάλλον. Το πείραμα επαναλαμβάνεται αρκετές φορές για να ενισχυθεί το σήμα, αφήνοντας στο ενδιάμεσο κάποιο χρονικό διάστημα για την πλήρη αποδιέγερση όλων των πυρήνων του δείγματος. Τα

δεδομένα καταγράφονται με τη μορφή ενός σήματος συνάρτησης χρόνου (FID) το οποίο όπως προαναφέρθηκε μετατρέπεται με τον μετασχηματισμό Fourier σε συνάρτηση συχνοτήτων.

#### 1.4.2.1. Επίδραση παλμών

Αρχικά, η μαγνήτιση του πυρήνα είναι παράλληλη με το εξωτερικό μαγνητικό πεδίο σε μια διεύθυνση παράλληλη προς τον άξονα  $+z$ . Με την εφαρμογή ενός παλμού κατά μήκος ενός κάθετου προς τον  $z$  άξονα (π.χ. κατά μήκος του  $+x$ ,  $-x$ ,  $+y$  ή  $-y$ ) η μαγνήτιση αλλάζει διεύθυνση. Όταν ο παλμός εφαρμοστεί κατά μήκος του άξονα  $x$ , ένα γραμμικό πεδίο δημιουργείται κατά μήκος του άξονα  $y$ .

Ο βαθμός με τον οποίο η μαγνήτιση του άξονα  $z$  αποκλίνει καθορίζεται από τον χρόνο εφαρμογής του παλμού. Με τον όρο παλμός  $90^\circ$  εννοούμε ότι προκαλείται απόκλιση του ανύσματος της μαγνήτισης κατά  $90$  μοίρες. Εάν ο χρόνος εφαρμογής ενός παλμού  $90^\circ$  είναι  $t$   $\mu s$ , τότε απαιτείται το μισό χρονικό διάστημα ( $t/2$   $\mu s$ ) για να αποκλίνει η μαγνήτιση κατά  $45^\circ$ , ενώ το διπλάσιο ( $2t$   $\mu s$ ) για να αποκλίνει κατά  $180^\circ$  (Εικόνα 1.4-4). Η διάρκεια εφαρμογής ενός παλμού είναι αντιστρόφως ανάλογη του εύρους συχνοτήτων δηλαδή για να γίνει διέγερση των πυρήνων σε μεγάλο εύρος συχνοτήτων πρέπει να εφαρμοστεί ένας παλμός μικρής διάρκειας και αντίστροφα (Attua-ur-Rahman and Choudhary MI., 1996, pg 23).



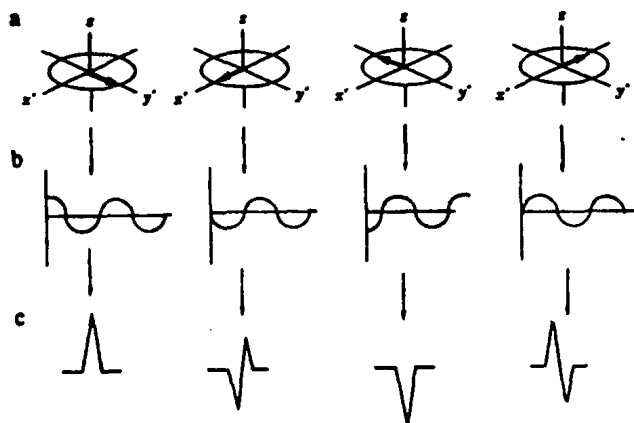
Εικόνα 1.4-4: Επίδραση του παλμού στην κατεύθυνση του ανύσματος της μαγνήτισης

#### 1.4.2.2. Ελευθέρως φθίνουσα επαγωγή (Free induction decay-FID)

Όταν το άνυσμα της μαγνήτισης βρίσκεται κατά μήκος του άξονα  $z$  δεν προκύπτει κάποιο σήμα NMR. Όταν ένας παλμός εφαρμοστεί κατά μήκος του άξονα  $x'$  αφενός μεν η μαγνήτιση αποκλίνει από τον άξονα  $z$  και εμφανίζεται κατά μήκος του άξονα  $y'$ , αφετέρου οι

πυρήνες που βρίσκονται εντός του εύρους συχνοτήτων που δημιουργεί ο παλμός, αποκλίνουν ταυτόχρονα κατά την ίδια γωνία. Η ένταση του σήματος θα είναι μέγιστη αμέσως μετά την εφαρμογή του παλμού κατά μήκος του άξονα  $x'$ . Κατά τη διάρκεια της αποκατάστασης, το άνυσμα της μαγνήτισης θα μετακινηθεί από τον άξονα  $y'$  προς τον άξονα  $x'$  και το σήμα θα εξασθενίσει μέχρι που θα λάβει την τιμή μηδέν όταν φτάσει στον άξονα  $x'$  (Εικόνα 1.45a). Καθώς μετατοπίζεται προς τον άξονα  $-y'$ , εμφανίζεται αρνητικό σήμα το οποίο λαμβάνει τη μέγιστη αρνητική τιμή όταν το άνυσμα μετακινηθεί στον άξονα  $-y'$ . Καθώς το άνυσμα μετακινείται προς τον άξονα  $-x'$ , το αρνητικό σήμα λαμβάνει πάλι την τιμή μηδέν και έπειτα λαμβάνει θετικές τιμές μέχρι να φτάσει στον άξονα  $y'$  (Εικόνα 1.45b).

Η σχέση της θέσης του ανύσματος της μαγνήτισης με το σήμα και την φάση του σήματος φαίνεται στην Εικόνα 1.4-5. Η εκθετικά φθίνουσα συνάρτηση του σήματος με το χρόνο η οποία περιέχει και το φάσμα πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού ονομάζεται ελευθέρως φθίνουσα επαγωγή (Free Induction Decay-FID) (Attua-ur-Rahman and Choudhary MI., 1996, pg31).



Εικόνα 1.4-5: Σχέση α) της θέσης του ανύσματος της μαγνήτισης με β) το σήμα συνάρτησης χρόνου και γ) το σήμα συνάρτησης συχνότητας

### 1.4.2.3. Μετασχηματισμός Fourier (Fourier Transformation, FT)

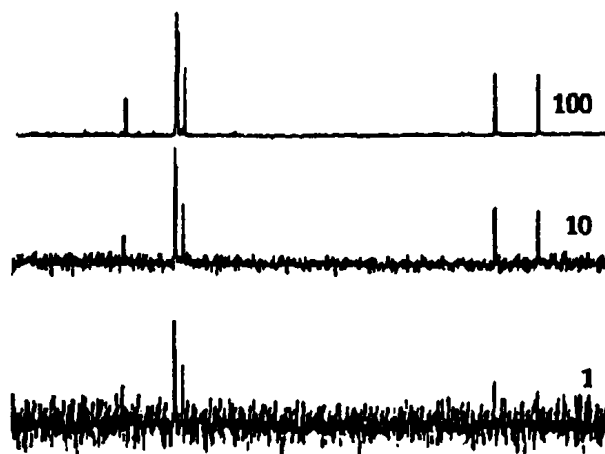
Τα δεδομένα στον NMR φασματογράφο λαμβάνονται συναρτήσει του χρόνου και για να χρησιμοποιηθούν πρέπει να μετατραπούν συναρτήσει της συχνότητας. Η μετατροπή των δεδομένων συναρτήσης χρόνου σε φάσμα συνάρτησης της συχνότητας πραγματοποιείται με τον μετασχηματισμό Fourier (Fourier Transformation), μια μαθηματική συνάρτηση στην οποία συσχετίζονται τα δεδομένα συναρτήσης χρόνου  $f(t)$  με τα δεδομένα συνάρτησης συχνότητας  $f(\omega)$  με τον Cooley-Tukey αλγόριθμο:

$$F(\omega) = \int_{-\infty}^{+\infty} f(t) e^{-i\omega t} dt$$

όπου  $F(\nu)$  είναι η συνάρτηση συχνότητας και  $f(t)$  είναι η αντίστοιχη σχέση χρόνου για το σήμα (δηλαδή η FID).

#### 1.4.2.4. Λόγος σήματος προς θόρυβο (Signal-to-noise ratio)

Ένα από τα σημαντικά μειονεκτήματα της φασματοσκοπίας NMR είναι η χαμηλή ευαισθησία σε σχέση με τις μεθόδους IR και UV-VIS. Ένας τρόπος για τη βελτίωση του λόγου του σήματος προς τον θόρυβο είναι η αύξηση της ισχύος του εφαρμοζόμενου μαγνητικού πεδίου ή η αύξηση της σάρωσης του φάσματος αρκετές φορές ώστε να γίνει μαθηματική προσθήκη των κορυφών του φάσματος. Με τον τρόπο αυτό, οι κορυφές απορρόφησης του NMR θα προστεθούν και θα ενταθούν, ενώ ο θόρυβος που είναι τυχαία κατανεμημένος εξουδετερώνεται. Η μέθοδος οδηγεί σε σημαντική βελτίωση του λόγου σήματος/θορύβου (που δίνεται από την τετραγωνική ρίζα του αριθμού των σαρώσεων, π.χ. για 1000 σαρώσεις ο λόγος γίνεται μεγαλύτερος κατά 10 φορές) (Εικόνα 1.4-6).



Εικόνα 1.4-6: Φάσμα  $^1\text{H}$  NMR αραιού διαλύματος αιθυλοβενζολίου με διαφορετικό αριθμό σαρώσεων (1, 10, 100). Με αύξηση των σαρώσεων ο «θόρυβος» μειώνεται, ενώ ενισχύονται οι φασματικές γραμμές απορρόφησης.

#### 1.4.3. Χαρακτηριστικά του φάσματος NMR

Το φάσμα NMR που περιλαμβάνει πολλές κορυφές απορρόφησης (σήματα), οι σχετικές θέσεις των οποίων απεικονίζουν διαφορές στο χημικό περιβάλλον των πρωτονίων, μπορεί να δώσει λεπτομερή πληροφορία σχετικά με τη μοριακή δομή των ενώσεων. Θα εξετάσουμε τα χαρακτηριστικά του φάσματος NMR:

1. τον αριθμό των σημάτων, όπου είναι εφικτή η άντληση πληροφοριών σχετικά με τον αριθμό των διαφορετικών ειδών πρωτονίων που υπάρχουν στο μόριο μιας ένωσης
2. τις θέσεις των σημάτων, από τις οποίες αντλούνται πληροφορίες σχετικά με το ηλεκτρονιακό περιβάλλον κάθε είδους πρωτονίων



3. τις εντάσεις των σημάτων που δίνουν πληροφορίες για τον αριθμό των πρωτονίων που υπάρχουν σε κάθε είδος και
4. τη σχέση του σήματος σε εκμέρους κορυφές, που δίνει πληροφορίες σχετικά με το περιβάλλον του πρωτονίου σε σχέση με τα γειτονικά πρωτόνια.

### 1.4.3.1. Αριθμός σημάτων στο φάσμα NMR

Σε ένα δεδομένο μόριο, πρωτόνια με το ίδιο περιβάλλον απορροφούν στην ίδια (εφαρμοζόμενη) ένταση πεδίου, ενώ πρωτόνια με διαφορετικό περιβάλλον απορροφούν σε διαφορετικές (εφαρμοζόμενες) εντάσεις πεδίου. Τα πρώτα ονομάζονται χημικώς ισοδύναμα πρωτόνια, ενώ τα τελευταία χημικώς μη-ισοδύναμα. Ο αριθμός των σημάτων στο φάσμα NMR δίνει πληροφορίες για τον αριθμό των ισοδύναμων πρωτονίων και τα είδη των πρωτονίων που υπάρχουν σε ένα μόριο.



a    b

2 NMR σήματα



a    b    c

3 NMR σήματα

### 1.4.3.2. Θέσεις των σημάτων στο φάσμα NMR - Χημική μετατόπιση

Οι θέσεις των σημάτων στην κλίμακα του φάσματος δίνουν πληροφορίες για τα είδη των πρωτονίων: πρωτοταγή, δευτεροταγή, τριτοταγή, αρωματικά, αλειφατικά, βενζυλικά, βινυλικά, ακετυλινικά, γειτονικά σε αλογόνα ή σε άλλα άτομα ή ομάδες. Αυτά τα διαφορετικά είδη πρωτονίων έχουν διαφορετικό ηλεκτρονιακό περιβάλλον το οποίο καθορίζει τη θέση όπου απορροφά ακριβώς το πρωτόνιο στο φάσμα NMR.

Η κυκλοφορία των ηλεκτρονίων γύρω από γειτονικούς πυρήνες δημιουργεί δευτεροταγή μαγνητικά πεδία, τα εκγυμνάμενα μαγνητικά πεδία τα οποία είτε αντιτίθενται είτε ενισχύουν το εφαρμοζόμενο πεδίο εκί του πρωτονίου. Στην πρώτη περίπτωση το πεδίο που γίνεται αντλητικό από το πρωτόνιο μειώνεται και το πρωτόνιο λέμε ότι είναι προστατευμένο, ενώ στη δεύτερη αυξάνεται και το πρωτόνιο λέμε ότι αποπροστατεύεται.

Εάν  $B_z$  είναι η ένταση πεδίου που πραγματικά εφαρμόζεται στον πυρήνα μέσα στο άτομο, ισχύει η σχέση:

$$B_z = B_0(1-\sigma)$$

όπου  $\sigma$  είναι η σταθερά θρακίσσεως ή προστασίας του ατόμου, που είναι καθαρός αριθμός και εξαρτάται από την ηλεκτρονιακή πυκνότητα γύρω από το πρωτόνιο, η οποία είναι συνάρτηση της δομής της ένωσης. Ως αποτέλεσμα αυτού, η συχνότητα συντονισμού μετατοπίζεται σε διαφορετική τιμή πεδίου και δίνεται από τη σχέση:



$$\nu = \frac{\gamma B_0(1-\sigma)}{2\pi}$$

Ένα προστατευμένο πρωτόνιο, συγκρινόμενο με το γυμνό πρωτόνιο, απαιτεί ισχυρότερη ένταση εφαρμοζόμενου πεδίου, ενώ ένα αποπροστατευόμενο πρωτόνιο απαιτεί χαμηλότερη. Κατά συνέπεια, η προστασία μετατοπίζει την απορρόφηση σε υψηλότερο πεδίο, ενώ η αποπροστασία σε χαμηλότερο. Οι μετατοπίσεις στη θέση της απορρόφησης NMR, που προκαλούνται από προστασία ή αποπροστασία των ηλεκτρονίων, αποκαλούνται χημικές μετατοπίσεις.

Η χημική μετατόπιση εκφράζεται σε μέρη ανά εκατομμύριο (ppm) του ολικού εφαρμοζόμενου μαγνητικού πεδίου. Δεδομένου ότι η προστασία και η αποπροστασία προκαλούνται από επαγόμενα δευτερογενή πεδία, το μέγεθος της χημικής μετατόπισης είναι ανάλογο της ραδιοσυχνότητας με την οποία το πεδίο θα πρέπει να παραβληθεί. Η θέση συντονισμού ενός πρωτονίου εκφράζεται σε σχέση με μια πρότυπη ένωση (TMS, TSP κ.ά.). Η κλίμακα που χρησιμοποιείται κυρίως είναι η  $\delta$  (δέλτα) και λιγότερο η  $\tau$ . Οι δύο κλίμακες σχετίζονται με τη σχέση  $\tau=10-\delta$ .

Εάν  $\nu_\delta$  και  $\nu_\alpha$  είναι οι συχνότητες συντονισμού του εξεταζόμενου πρωτονίου (ή ομάδων πρωτονίων) του δείγματος και της ουσίας αναφοράς, αντίστοιχα, και  $\nu_0$  η βασική συχνότητα λειτουργίας του φασματομέτρου (σε Hz), τότε η χημική μετατόπιση εκφράζεται με την κλίμακα  $\delta$ , όπου

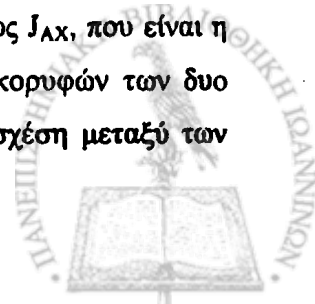
$$\delta = \frac{\nu_\delta - \nu_\alpha}{\nu_0} \times 10^6 \text{ ppm}$$

#### 1.4.3.3. Εμβαδόν κορυφών πρωτονίων στο φάσμα NMR

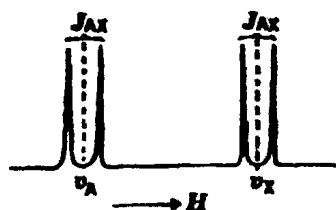
Για την ποσοτική σύγκριση των κορυφών διαφόρων πρωτονίων υπολογίζονται τα εμβαδά των κορυφών. Η περιοχή κάτω από ένα σήμα NMR είναι ευθέως ανάλογη του αριθμού των πρωτονίων που προκαλούν το σήμα. Όσο μεγαλύτερος είναι ο αριθμός των πρωτονίων που διεγείρονται τόσο μεγαλύτερο είναι το ποσό της ενέργειας που απορροφάται και συνεπώς είναι μεγαλύτερη η περιοχή κάτω από την κορυφή απορρόφησης.

#### 1.4.3.4. Σύζευξη spin-spin (spin-spin coupling)

Σε πολλά φάσματα  $^1\text{H}$  NMR οι κορυφές συντονισμού διαχωρίζονται σε συμμετρικές πολλαπλές ομάδες κορυφών (διπλές, τριπλές, τετραπλές κλπ). Η πολλαπλότητα αυτή των σημάτων συντονισμού (λεπτή υφή) καλείται spin-spin σύζευξη (spin-spin coupling) και οφείλεται στην αλληλεπίδραση των spin γειτονικών μαγνητικών πυρήνων, η οποία διαδίδεται όχι μέσω του χώρου, αλλά μέσω των δεσμών του μορίου. Η σύζευξη μεταξύ δυο πυρήνων (ή δυο ομάδων ισότιμων πυρήνων) χαρακτηρίζεται από τη σταθερά συζεύξεως  $J_{\text{ΑΧ}}$ , που είναι η απόσταση σε Hz των επιμέρους κορυφών των σύνθετων (πολλαπλών) κορυφών των δυο ομάδων. Η σταθερά συζεύξεως εξαρτάται μόνο από την ηλεκτρονιακή σχέση μεταξύ των



αλληλεπιδρώντων πρωτονίων και επομένως είναι η ίδια στις δυο ομάδες (Εικόνα 1.4-7) και, σε αντίθεση με τη σταθερά θωρακίσεως  $\sigma$ , ανεξάρτητη από την ένταση του μαγνητικού πεδίου, γι' αυτό και δε δίνεται σε ppm, αλλά πάντοτε σε Hz.



Εικόνα 1.4-7: Σύζευξη πρωτονίων με μεγάλη διαφορά ( $\Delta\nu$ ) χημικών μετατοπίσεων.

Κατά συνέπεια, με την λήψη του φάσματος NMR μιας ένωσης σε δυο συχνότητες μπορούμε να διακρίνουμε τις πολλαπλές κορυφές που οφείλονται σε πρωτόνια με διαφορετική χημική μετατόπιση από εκείνες που οφείλονται σε spin-spin σύζευξη (Gerothanasis et al., 2002).

## **1.5. Τεχνικές αναγνώρισης προτύπων**

### **1.5.1. Η έννοια και η ανάλυση των Πολυμεταβλητών δεδομένων**

Η μελέτη των βιολογικών συστημάτων πραγματοποιείται με τον ποιοτικό και ποσοτικό προσδιορισμό πολλών δεδομένων τα οποία ονομάζονται πολυμεταβλητά (multivariate data) διότι πολλές μεταβλητές μετρώνται σε πολλά δείγματα ή χρονικά διαστήματα. Η ανάλυση των δεδομένων αυτών είναι αρκετά δύσκολη.

Εκτός από τις κλασσικές μεθόδους στατιστικής, τα τελευταία χρόνια έχει δοθεί ιδιαίτερη έμφαση στην ανάλυση των δεδομένων αυτών με άλλες τεχνικές. Με τον όρο Multivariate Data Analysis, MDA (Ανάλυση Πολυμεταβλητών Δεδομένων) εννοούμε την ανάλυση που πραγματοποιείται με σκοπό την ανάκτηση της πιο σημαντικής πληροφορίας από πίνακες που περιέχουν πολυάριθμα πειραματικά δεδομένα (Erikson et al., 2007, pg 7). Η Multivariate Data Analysis συχνά αποκαλείται και Pattern Recognition, PR (Αναγνώριση Προτύπων) διότι αποβλέπει στην εύρεση ενός data pattern (μοντέλου δεδομένων) για τον χαρακτηρισμό ή την ταξινόμηση μιας ή περισσότερων κλάσεων παρατηρήσεων (classes observations) (Wold et al., 1984). Το pattern (μοντέλο) μιας κλάσης περιέχει πληροφορίες για τις σχέσεις και τις αναλογίες που χαρακτηρίζουν τις παρατηρήσεις της κλάσης αυτής καθώς επίσης για το πόσο όμοιες ή όχι είναι οι variables (μεταβλητές) του υπό μελέτη συστήματος.

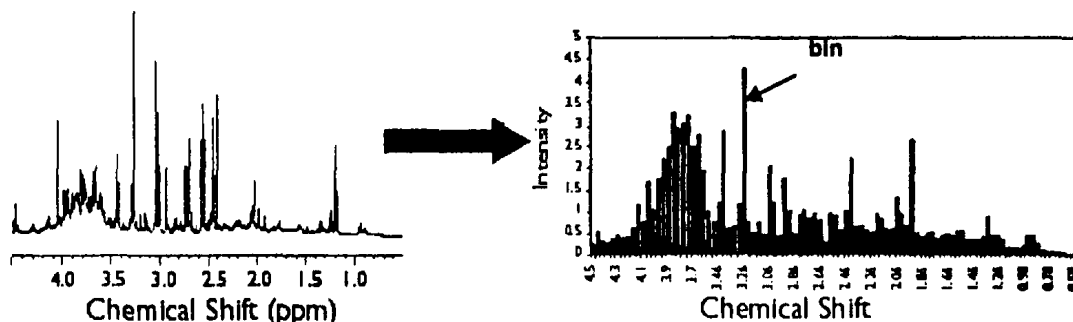
Οι στατιστικές μέθοδοι που εφαρμόζονται στην Multivariate Data Analysis διακρίνονται σε δυο κατηγορίες: τις supervised και unsupervised μεθόδους (Lindon et al., 2001). Με τις unsupervised τεχνικές επιτυγχάνεται η ανάλυση των δεδομένων και η ερμηνεία τους πραγματοποιείται με τα scores plot (γράφημα συντεταγμένων) στα οποία φαίνεται εάν υπάρχουν τάσεις ομαδοποίησης μεταξύ των δειγμάτων και τα loadings plots (γραφήματα φορτίων) στα οποία φαίνονται οι μεταβλητές που συνεισφέρουν στις παρατηρούμενες τάσεις ομαδοποίησης.

Με τις supervised τεχνικές χρησιμοποιούνται γνωστές πληροφορίες από τα δεδομένα με τις οποίες γίνεται, πριν τη δημιουργία του στατιστικού μοντέλου, προεπιλεγμένα η ταξινόμηση των δειγμάτων σε ομάδες ή υποομάδες. Για την αξιολόγηση (validation) των στατιστικών μοντέλων επιλέγεται τυχαία ένας αριθμός δειγμάτων από το σύνολο αυτών και αποτελεί την ομάδα βαθμονόμησης (calibration set) και ελέγχεται η ορθή ή όχι ταξινόμηση ενός άλλου αριθμού δειγμάτων που επίσης έχει επιλεγεί τυχαία από το σύνολο των δειγμάτων και αποτελεί την ομάδα ελέγχου (test set). Στις unsupervised μεθόδους ανήκει η Principal Component Analysis, PCA, ενώ στις supervised η Partial Least Squares, PLS και η Partial Least Squares-Discriminant Analysis, PLS-DA.

### **1.5.2. Προεπεξεργασία των δεδομένων**

Τα φάσματα NMR μετατρέπονται με τη χρήση κατάλληλων προγραμμάτων σε πίνακες πολυμεταβλητών δεδομένων και έπειτα πραγματοποιείται η ανάλυση αυτών με

εφαρμογή των τεχνικών PR. Όπως φαίνεται από την Εικόνα 1.5-1 κάθε φάσμα NMR, που αντιστοιχεί σε μια παρατήρηση ή δείγμα (odsevation), διαιρείται σε ίσου εύρους τμήματα (bins), που αντιστοιχούν σε μια συγκεκριμένη φασματική περιοχή μετατόπισης ( $\delta$ , ppm) και αποτελούν τις μεταβλητές (variables).



Εικόνα 1.5-1: Διαίρεση της αλειφατικής περιοχής του φάσματος  $^1\text{H}$  NMR βιολογικού δείγματος σε φασματικές περιοχές ίσου εύρους σε ppm.

(<http://www.raci.org.au/chemaust/docs/pdf/2004/CiA%20July2004p13.pdf>)

Τις γραμμές στον πίνακα δεδομένων αποτελούν τα δείγματα (observations), ενώ τις στήλες οι τιμές της έντασης για κάθε bin (Craig et al., 2006). Πριν την εφαρμογή κάποιας τεχνικής PR, γίνεται κατάλληλη προ-επεξεργασία (preprocessing) των δεδομένων δηλαδή κανονικοποίηση (normalization) και scaling. Η κανονικοποίηση εφαρμόζεται κατά μήκος των γραμμών του πίνακα με τέτοιο τρόπο ώστε τα φασματοσκοπικά δεδομένα να καταστούν άμεσα συγκρίσιμα μεταξύ τους. Η διαδικασία του scaling εκτελείται σε κάθε στήλη του πίνακα δηλαδή σε κάθε μεταβλητή (bin). Η πιο συχνή διαδικασία στη μεταβονομική είναι η αφαίρεση από όλες τις τιμές της στήλης του μέσου όρου αυτών και ονομάζεται mean-centering.

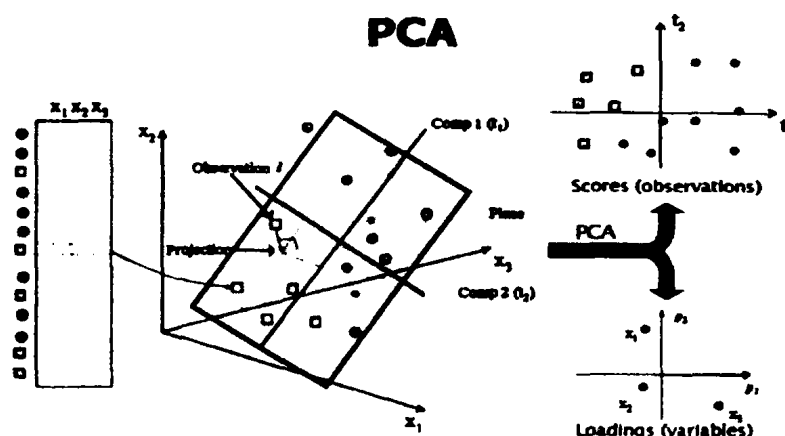
### 1.5.3. Principal Component Analysis, PCA

Η ανάλυση PCA αποτελεί το αρχικό στάδιο για την ανάλυση των πολυμεταβλητών δεδομένων (Wold et al., 1984, Wold et al., 1987). Δημιουργούνται ανεξάρτητοι συνδυασμοί των αρχικών μεταβλητών που ονομάζονται Principal Components, PC (Κύριες Συνιστώσες), οι οποίοι αφενός μεν είναι ανεξάρτητοι μεταξύ τους, αφετέρου να περιέχουν όσο γίνεται μεγαλύτερο μέρος της διακύμανσης των αρχικών μεταβλητών.

Η πρώτη PC είναι ένας γραμμικός συνδυασμός των αρχικών μεταβλητών και περιέχει τη μέγιστη διακύμανση των δεδομένων, ενώ η δεύτερη ένας άλλος γραμμικός συνδυασμός ορθογώνιος ως προς τον πρώτο και περιέχει την επόμενη πιο ολοκληρωμένη περιγραφή των δεδομένων. Η γραφική παράσταση των δυο πρώτων PC περιέχει το μέγιστο βαθμό

πληροφορίας, ενώ οι επόμενες PC εκφράζουν όλο και λιγότερο ποσοστό από τη διακύμανση των δεδομένων.

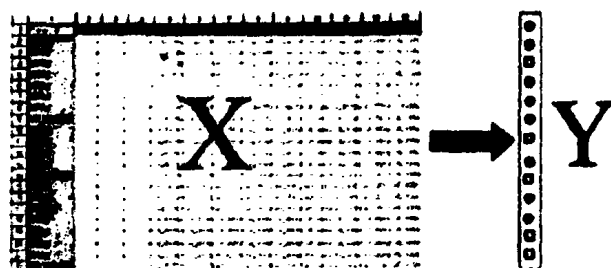
Όπως φαίνεται από την Εικόνα 1.5-2, σε κάθε παρατήρηση (observation) αντιστοιχεί μια μοναδική προβολή (projection) σε ένα επίπεδο 2 διαστάσεων με άξονες τις 2 πρώτες PC (comp 1 ( $t_1$ ), comp 2 ( $t_2$ )). Από το επίπεδο αυτό προκύπτουν δυο γραφήματα: το scores plot (γράφημα συντεταγμένων) στο οποίο απεικονίζονται οι σχέσεις που υπάρχουν ανάμεσα στις παρατηρήσεις (εντοπισμός ομάδων, τάσεων ομαδοποίησης ή ακραίων συμπεριφορών) και το loadings plot (γράφημα φορτίων) στο οποίο απεικονίζεται η επίδραση των μεταβλητών στο στατιστικό μοντέλο καθώς και οι μεταξύ τους σχέσεις. Τα δυο αυτά γραφήματα είναι αλληλοεξαρτώμενα καθώς η διάταξη των μεταβλητών στο γράφημα των φορτίων ερμηνεύει την διάταξη των δειγμάτων στο γράφημα συντεταγμένων (Trygg et al., 2007).



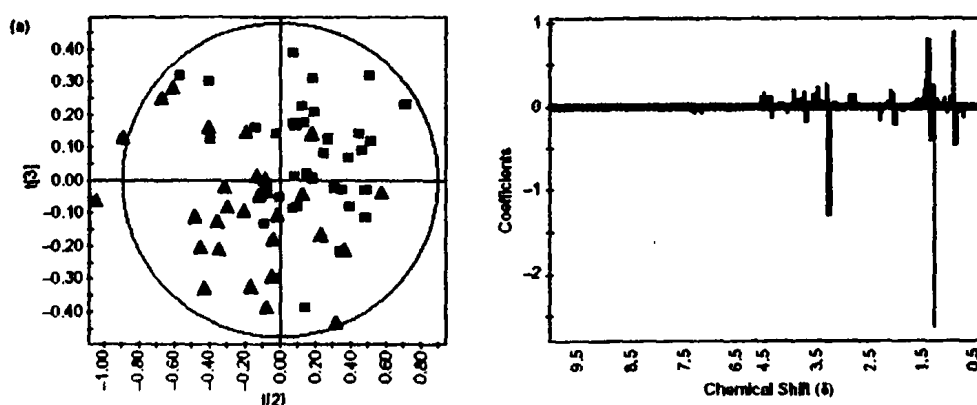
Εικόνα 1.5-2: Το PCA μοντέλο προσεγγίζει τη διακύμανση μεταξύ των δεδομένων. Η ερμηνεία του βασίζεται στο scores plot (γράφημα συντεταγμένων) και το loadings plot (γράφημα φορτίων).

#### 1.5.4. Partial Least-Squares Discriminant Analysis, PLS-DA

Η Partial Least-Squares Discriminant Analysis, PLS-DA (Διακριτική Ανάλυση Μερικών Ελαχίστων Τετραγώνων) όπως αναφέρθηκε ανήκει στις supervised μεθόδους καθώς τα δείγματα με βάση κάποιες ποιοτικές μεταβλητές που τα χαρακτηρίζουν όπως το γένος, η νόσος ταξινομούνται σε έναν πίνακα Y. Οι ποιοτικές αυτές μεταβλητές συμβολίζονται με τις μεταβλητές ταξινόμησης π.χ. 1 αν το δείγμα ανήκει σε μια ομάδα και 0 αν δεν ανήκει (Εικόνα 1.5-3) (Trygg et al., 2007). Με τη μέθοδο αυτή προσδιορίζονται εκείνες οι μεταβλητές που συμβάλλουν στο βέλτιστο διαχωρισμό μεταξύ των υπό μελέτη ομάδων (Εικόνα 1.5-4). Η ερμηνεία των αποτελεσμάτων πραγματοποιείται με τη βοήθεια δυο γραφημάτων, όπως στην PCA ανάλυση, το scores plot (γράφημα συντεταγμένων) και το regression coefficients plot (γράφημα των συντελεστών παλινδρόμησης) (Εικόνα 1.5-4).



**Εικόνα 1.5-3:** Τα δεδομένα των κλάσεων μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την δημιουργία μιας επιπλέον στήλης  $Y$ , η οποία θα περιλαμβάνει τις μεταβλητές ταξινόμησης (dummy variables) που θα υποδηλώνουν την κλάση που ανήκει κάθε δείγμα (Trygg et al., 2007).

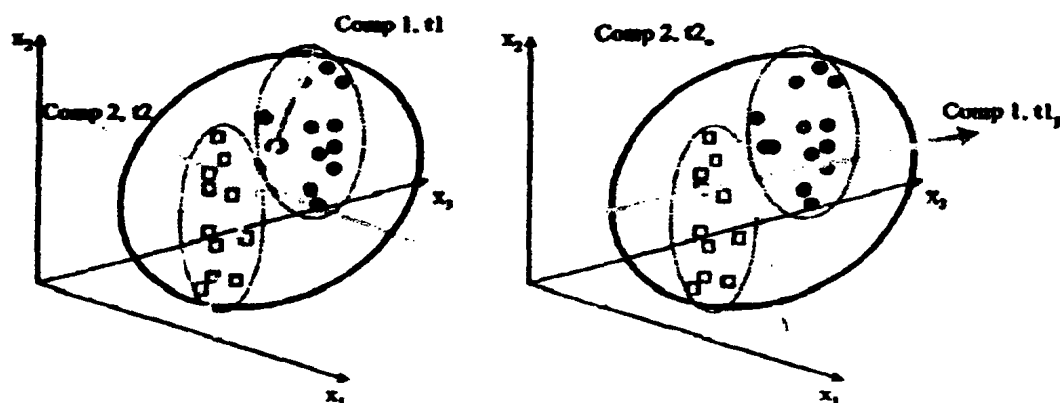


**Εικόνα 1.5-4:** Αριστερά το scores plot και δεξιά το regression coefficients plot του PLS-DA μοντέλου. Στο γράφημα των συντεταγμένων φαίνεται ο διαχωρισμός των ασθενών με νόσο 3 αγγείων (μπλε τετράγωνα) και των ασθενών με φυσιολογικά αγγεία (κόκκινα τρίγωνα) (Brindle et al., 2002), ενώ στο γράφημα των συντελεστών παλινδρόμησης εμφανίζονται οι περιοχές του φάσματος του ορού που συμβάλλουν στον διαχωρισμό των δυο ομάδων.

### 1.5.5. Orthogonal Signal Correction, OSC

Η Orthogonal Signal Correction, OSC είναι μια τεχνική η οποία ανακαλύφθηκε από τον Wold και τους συνεργάτες του το 1998 (Wold et al., 1998). Σύμφωνα με την τεχνική αυτή χρησιμοποιείται ένα φίλτρο δηλαδή μια μαθηματική συνάρτηση για την αφαίρεση της συστηματικής διακύμανσης (systematic variation) των δεδομένων του πίνακα  $X$  που ουσιαστικά δεν συνεισφέρει στην εξαγωγή των αποτελεσμάτων και είναι μαθηματικώς ανεξάρτητη από τα δεδομένα του πίνακα  $Y$  (Εικόνα 1.5-5).

Τα στατιστικά μοντέλα που προκύπτουν μετά την εφαρμογή της τεχνικής φιλτραρίσματος ερμηνεύονται με αντίστοιχα γραφήματα όπως στην περίπτωση των PCA και PLS-DA μοντέλων.



Εικόνα 1.5-5: Η γεωμετρική απεικόνιση των PLS-DA και OSC/PLS-DA μοντέλων. Στο αριστερό γράφημα που αφορά το PLS-DA μοντέλο, δεν μπορεί να διαχωριστεί η μεταξύ των ομάδων διακύμανση από αυτή εντός των ομάδων. Στο δεξί γράφημα που αφορά το OSC/PLS-DA μοντέλο διαχωρίζονται οι δυο αυτές διακυμάνσεις με αποτέλεσμα με την δεύτερη συνιστώσα (Comp 2) να διαχωρίζονται οι δυο ομάδες μεταξύ τους (Trygg et al., 2007).

#### 1.5.6. Αξιολόγηση των μοντέλων (Validation of models)

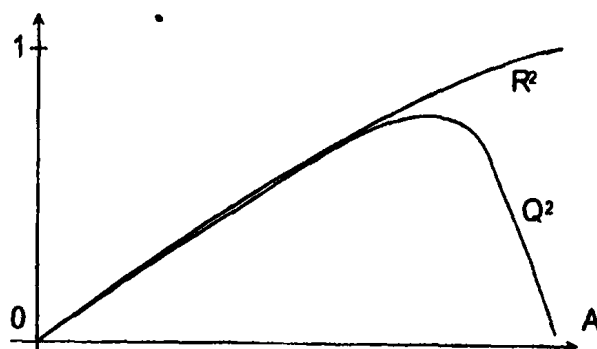
Για την αξιολόγηση των στατιστικών μοντέλων που δημιουργούνται μια από τις τεχνικές που χρησιμοποιείται είναι η cross validation η οποία εκτιμάται με τις παραμέτρους  $R^2$  (explained variation) και  $Q^2$  (predicted variation). Η παράμετρος  $R^2$  δίνει μια ποσοτική εκτίμηση της προσαρμογής του στατιστικού μοντέλου στα δεδομένα (goodness of fit) και υπολογίζεται βάσει της εξίσωσης:

$$R^2 = 1 - \text{RSS} / \text{SSX}_{\text{tot corr}}$$

όπου ο όρος  $\text{SSX}_{\text{tot corr}}$  (Sum of Squares of all X variables) εκφράζει την ολική διακύμανση των δεδομένων του πίνακα X και  $\text{RSS}$  είναι το άθροισμα τετραγώνων των υπολοίπων (Residuals sum of squares). Η παράμετρος  $Q^2$  υπολογίζεται με βάση την εξίσωση:

$$Q^2 = 1 - \text{PRESS} / \text{SSX}_{\text{tot corr}}$$

όπου ο όρος  $\text{PRESS}$  (Press Predicted Residual Error Sum of Squares) είναι το άθροισμα τετραγώνων των προβλεπόμενων σφαλμάτων των υπολοίπων και δίνει μια συνολική εκτίμηση της ικανότητας πρόβλεψης του στατιστικού μοντέλου (goodness of prediction). Οι δύο αυτές παράμετροι είναι αδιάστατα μεγέθη με την  $R^2$  να είναι πάντα μεγαλύτερη της  $Q^2$  και την  $Q^2$  να μπορεί να λάβει και αρνητικές τιμές. Όσο αυξάνει η πολυπλοκότητα του μοντέλου με τη χρήση περισσότερων PC, τόσο η  $R^2$  τείνει στο 1 και η  $Q^2$  μειώνεται. Συνεπώς η επιλογή του βέλτιστου αριθμού των PC έγκειται στον συμβιβασμό της αυξανόμενης  $R^2$  και της μειούμενης  $Q^2$  όπως φαίνεται στην Εικόνα 1.5-6.



Εικόνα 1.5-6: Ο κατακόρυφος άξονας αναπαριστά την παράμετρο  $R^2$  (explained variation) και  $Q^2$  (predicted variation) και ο οριζόντιος άξονας απεικονίζει την πολυπλοκότητα του μοντέλου (Erikson et al., 2001).

Η αξιοπιστία των στατιστικών μοντέλων που δημιουργούνται με την PLS-DA τεχνική, ελέγχεται με την εσωτερική ή εξωτερική αξιολόγηση (internal or external validation). Με την εξωτερική αξιολόγηση γίνεται αποτίμηση της ικανότητας πρόβλεψης ενός στατιστικού μοντέλου με τη χρήση δεδομένων τα οποία όμως δεν συμμετέχουν στη δημιουργία του μοντέλου. Τα νέα αυτά δεδομένα αποτελούν την ομάδα εξωτερικής αξιολόγησης (prediction set) των οποίων το μοντέλο στοχεύει να προβλέψει κάποια ιδιότητα. Στις περιπτώσεις που ο αριθμός των δειγμάτων είναι μικρός ή δεν υπάρχουν διαθέσιμα νέα δεδομένα, η ικανότητα πρόβλεψης του μοντέλου μπορεί να γίνει με την εσωτερική αξιολόγηση (held-back data) με τη χρησιμοποίηση κατάλληλης ομάδας ελέγχου ή ομάδας εσωτερικής αξιολόγησης (test set). Τα δεδομένα της ομάδας αυτής έχουν επιλεγεί τυχαία κατά τη διαδικασία βαθμονόμησης του στατιστικού μοντέλου. Συνήθως το 20% των αρχικών δεδομένων επιλέγεται τυχαία από όλες τις ομάδες για να αποτελέσει την ομάδα ελέγχου και το υπόλοιπο 80% αποτελεί την ομάδα βαθμονόμησης. Τα ποσοστά ταξινόμησης (calibration rates) εκτιμώνται με τη βοήθεια δυο παραμέτρων: της ειδικότητας (specificity) και της ευαισθησίας (sensitivity).

#### 1.5.7. Η έννοια της μεταβολομικής προσέγγισης και οι εφαρμογές της

Με τον όρο «μεταβολομική» (metabonomics) εννοούμε τον ποσοτικό προσδιορισμό των πολυπαραμετρικών μεταβολικών αποκρίσεων ζώντων συστημάτων σε παθοφυσιολογικές διεγέρσεις ή γενετικές τροποποιήσεις (Nicholson et al., 1999), δηλαδή είναι ένα σύστημα προσέγγισης για την in vivo μελέτη των μεταβολικών προφίλ των βιολογικών υγρών η οποία στοχεύει στην συλλογή πληροφοριών που αφορούν τον μηχανισμό δράσης παθολογικών καταστάσεων, της τοξικότητας των φαρμάκων και της επίδρασης των γονιδίων. Ο σκοπός

μιας τέτοιας διαδικασίας είναι να αποκαλύψει βιοχημικές πληροφορίες οι οποίες αντικατοπτρίζουν πραγματικά βιολογικά συμβάντα παρά ενδεχόμενα.

Καθώς τα βιολογικά υγρά πληρούν διάφορους βιολογικούς σκοπούς, η σύστασή τους σε μεταβολίτες κυμαίνεται ανάλογα με τον ρόλο και την λειτουργία των οργανικών συστημάτων που επικοινωνούν μαζί τους και τελικά με την φυσιολογική κατάσταση όλου του οργανισμού. Αυτά τα μεταβολικά προφίλ αντικατοπτρίζουν τόσο την φυσιολογική διακύμανση όσο και την παθοφυσιολογική επίδραση της νόσου σε ένα απλό ή πολλαπλό σύστημα οργάνων. Οι παθολογικές μεταβολές μπορεί να οφείλονται είτε σε ατέλεια των μεταβολικών διαδικασιών είτε σε ατελή, παθολογικό «χειρισμό» των μορίων αυτών από ένα όργανο. Για την διερεύνηση των περίπλοκων μεταβολικών προφίλ απαιτούνται αναλυτικές προσεγγίσεις οι οποίες πρέπει να είναι μη-εκλεκτικές αλλά και «πλούσιες σε πληροφορία», όπως οι φασματοσκοπίες πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR) και μάζης (MS), η αέριος χρωματογραφία/φασματομετρία μάζης (GC/MS), η υψηλής πιστότητας υγρή χρωματογραφία (HPLC) και τεχνικές οπτικής πυκνότητας. Βιοαναλυτικά οι φασματοσκοπίες NMR και μάζης είναι τα πιο ισχυρά μέσα δημιουργίας πολυπαραγοντικών μεταβολικών δεδομένων, των οποίων η ανάλυση και ερμηνεία πραγματοποιείται με τις τεχνικές αναγνώρισης προτύπων.

Τις τελευταίες δυο δεκαετίες η μεταβολομική έχει αρκετές εφαρμογές σε κλινικά και βιοιατρικά θέματα, όπως η μελέτη της τοξικότητας των φαρμάκων και η ταυτοποίηση δεικτών τοξικότητας και νόσων (Holmes et al., 1994, Holmes et al., 1998, Griffin et al., 2000, Tate et al., 2000, Waters et al., 2002, Coen et al., 2003, Bollard et al., 2005, Waters et al., 2005) καθώς επίσης και η κατανόηση των μηχανισμών των μεταβολικών αποκρίσεων (Nicholson et al., 2002, Lindon et al., 2004). Η φασματοσκοπία  $^1\text{H}$  NMR είναι η κύρια μέθοδος προσδιορισμού του μεταβολικού προφίλ σε μελέτες μεταβολομικής καθώς η ταυτοποίηση και η ποσοτικοποίηση ενδογενών μεταβολιτών καθίσταται γρήγορη και επαναλήψιμη χωρίς να απαιτείται διαχωρισμός αυτών (Holmes et al., 1998, Lindon et al., 2000, Nicholson et al., 2002, Nicholson et al., 2003, Lindon et al., 2004).

Ιδιαίτερη αναφορά θα γίνει στις μελέτες εκείνες στις οποίες εμπλέκονται οι λιποπρωτείνες του πλάσματος. Η ικανότητα της μεταβολομικής να διαγνώσει μη επεμβατικά την παρουσία και την σοβαρότητα της στεφανιαίας νόσου από δείγμα ορού διερευνήθηκε από τον Nicholson και τους συνεργάτες του το 2002 (Brindle et al., 2002). Στο πρώτο μέρος της μελέτης, 36 δείγματα ορού ασθενών με σοβαρού βαθμού στεφανιαία νόσο (νόσο 3 αγγείων) συγκρίθηκαν με 30 δείγματα ορού ασθενών με φυσιολογικά αγγεία τεκμηριωμένα αγγειογραφικά με σκοπό την εκτίμηση της ικανότητας της μεθόδου να διαγνώσει την παρουσία της στεφανιαίας νόσου. Τα αποτελέσματα της μελέτης έδειξαν ότι η εφαρμογή των τεχνικών OSC και PLS-DA σε φάσματα NMR ολικού ορού ασθενών επέτρεψαν την διάκριση των ασθενών με νόσο τριών αγγείων από τους ασθενείς με φυσιολογικά αγγεία με ειδικότητα

άνω του >90%. Από τα διαγράμματα των συντελεστών παλινδρόμησης προέκυψε ότι οι φασματικές περιοχές που κυρίως χαρακτηρίζουν τους ασθενείς με νόσο 3 αγγείων ήταν οι μεθυλο και μεθυλενομάδες των αλυσίδας των λιπαρών οξέων των VLDL και LDL λιποπρωτεϊνών, ενώ τους ασθενείς με φυσιολογικά αγγεία οι μεθυλενομάδες της αλυσίδας των λιπαρών οξέων των HDL λιποπρωτεϊνών καθώς επίσης και η ομάδα της χολίνης των φωσφολιπιδίων. Στο δεύτερο μέρος της μελέτης, δείγματα ασθενών με στένωση ενός, δυο και τριών κύριων αρτηριών συγκρίθηκαν με σκοπό να διερευνηθεί αν με την τεχνική αυτή ήταν εφικτός ο διαχωρισμός των ασθενών με βάση τη σοβαρότητα της νόσου. Στα μοντέλα που δημιουργήθηκαν με την ανάλυση PLS-DA ήταν εφικτός ο διαχωρισμός μεταξύ των ασθενών με στένωση ενός, δυο και τριών κύριων αρτηριών.

Τρία χρόνια μετά ο Kirschenlohr δημοσίευσε μια μελέτη στην οποία διερεύνησαν την προγνωστική ικανότητα της ίδιας μεθοδολογίας σε ένα μεγαλύτερο αριθμό ασθενών (244 άνδρες και 78 γυναίκες) χρησιμοποιώντας όμως χαμηλότερη ισχύ μαγνητικού πεδίου σε σχέση με την προηγούμενη μελέτη (400MHz αντί 600MHz) και δείγματα πλάσματος που ελήφθησαν με κιτρικό οξύ αντί ορού (Kirschenlohr et al., 2006). Επιπρόσθετα, μελετήθηκε η επίδραση του φύλου και της χορήγησης υπολιπιδαιμικών φαρμάκων και συγκεκριμένα στατινών, τα οποία επηρεάζουν τη λιπιδιακή σύσταση.

Τα αποτελέσματα της μελέτης έδειξαν ότι το φύλο επηρεάζει σημαντικά την προγνωστική ικανότητα της μεθόδου και σε μικρότερο αλλά, σημαντικό βαθμό η χορήγηση στατινών. Η ικανότητα πρόβλεψης των ασθενών με νόσο 3 αγγείων και αυτών με φυσιολογικά αγγεία ήταν σωστή κατά 80.3% για τους ασθενείς στους οποίους δεν χορηγήθηκαν στατίνες και 61.3% για αυτούς που χορηγήθηκαν. Επίσης, αναφέρθηκε ότι η χαμηλή ένταση μαγνητικού πεδίου, η χρήση πλάσματος με κιτρικό οξύ και η παρατεταμένη κατάψυξη των δειγμάτων δεν συμβάλλουν στα διαφορετικά αποτελέσματα που προκύπτουν σε σχέση με την προηγούμενη μελέτη. Στη μελέτη αυτή, οι φασματικές περιοχές που συνέβαλαν στον διαχωρισμό μεταξύ ανδρών και γυναικών είναι αυτές που αντιστοιχούσαν στις μεθυλο- και μεθυλενομάδες των λιπαρών οξέων (Kirschenlohr et al., 2006).

Μια άλλη μεταβιομική μελέτη δημοσιεύτηκε από τον Brindle και τους συνεργάτες του το 2003 και αφορούσε την διερεύνηση της συσχέτισης του μεταβολικού προφίλ του ορού με τη υπέρταση (Brindle et al., 2003). Στη μελέτη αυτή συμμετείχαν 28 ασθενείς με χαμηλή/φυσιολογική συστολική πίεση του αίματος ( $SBP \leq 130$ mm Hg), 19 ασθενείς με οριακά αυξημένη πίεση ( $SBP: 131-149$ mm Hg) και 17 ασθενείς με υψηλή πίεση ( $SBP \geq 150$ mm Hg). Τα μεταβολικά προφίλ του ορού των ασθενών με χαμηλή/φυσιολογική πίεση αίματος ήταν διαφορετικά από τα αντίστοιχα αυτών με οριακά αυξημένη ή αυξημένη πίεση, ενώ τα μεταβολικά προφίλ αυτών με οριακά αυξημένη ή αυξημένη πίεση ήταν παρόμοια.



Δυο χρόνια αργότερα, ο Le Moyes και οι συνεργάτες του διερεύνησαν με φασματοσκοπία NMR και την τεχνική PCA τις αλλαγές στη λιπιδιακή σύσταση του ορού σε 60 άνδρες ασθενείς με υπερχοληστερολαιμία στους οποίους χορηγήθηκαν στατίνες. Στους 30 από αυτούς χορηγήθηκε συμβαστατίνη ενώ στους υπόλοιπους ατορβαστατίνη. Με ανάλυση της περιοχής 0.6-1.1ppm του NMR φάσματος, η οποία αντιστοιχεί στη χοληστερόλη, στις μεθυλομάδες των λιπαρών οξέων προέκυψε ότι και οι δυο στατίνες προκάλεσαν μείωση στα συστατικά των LDL λιποπρωτεϊνών και αύξηση στα συστατικά των HDL λιποπρωτεϊνών (Le Moyes et al., 2005). Τέλος, το 2006 δημοσιεύτηκε μια ακόμα μεταβολομική μελέτη από τον Makinen και τους συνεργάτες του που αφορούσε τη διάγνωση της διαβητικής νεφροπάθειας με φασματοσκοπία NMR. Στη μελέτη αυτή συμμετείχαν 182 ασθενείς με διαβήτη τύπου I και 21 μη διαβητικοί ασθενείς και συγκρίθηκε το μεταβολικό προφίλ των λιποπρωτεϊνών και των χαμηλού μοριακού βάρους μεταβολιτών του ορού των δυο ομάδων της μελέτης (Makinen et al., 2006).

### 1.6. Σκοπός της διατριβής

Σκοπός της παρούσας διατριβής είναι η ανάπτυξη της μεθοδολογίας για την ανάλυση της λιπιδιακής σύστασης των λιποπρωτεϊνών με φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού πρωτονίου και η εφαρμογή της στη μελέτη των διαταραχών της σύστασης των HDL και nonHDL λιποπρωτεϊνών που λαμβάνουν χώρα στη δυσλιπιδαιμία και την εγκατεστημένη καρδιαγγειακή νόσο. Επίσης, σκοπός της διατριβής είναι η εφαρμογή των τεχνικών αναγνώρισης προτύπων (Pattern Recognition Techniques) στα  $^1\text{H}$  NMR φάσματα των εκχυλισμάτων των λιπιδίων των λιποπρωτεϊνών του πλάσματος με σκοπό τη δημιουργία στατιστικών μοντέλων ικανά να προσεγγίσουν την παρουσία της εγκατεστημένης καρδιαγγειακής νόσου.

## ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ



## 1.7. Υλικό και μέθοδοι

### 1.7.1. Πληθυσμός της μελέτης και συλλογή δειγμάτων αίματος

Ο πληθυσμός της μελέτης αποτελείται από δυο ομάδες. Η πρώτη ομάδα περιλαμβάνει 54 ασθενείς οι οποίοι εισήχθησαν στην Καρδιολογική Κλινική του Π.Γ.Ν. Ιωαννίνων με επιβεβαιωμένο οξύ στεφανιαίο σύνδρομο με ανεπίπλεκτη κλινική πορεία και αγγειογραφικά εκτεταμένη στεφανιαία νόσο (τουλάχιστον μια στένωση >50% του αυλού σε τουλάχιστον 3 επικάρδιες στεφανιαίες αρτηρίες). Οι ασθενείς αυτοί είχαν ελεύθερο ατομικό αναμνηστικό καρδιαγγειακής ή άλλης νόσου και δεν ήταν σε οποιαδήποτε φαρμακευτική αγωγή πριν από το επεισόδιο. Η διάγνωση του οξέος στεφανιαίου συνδρόμου έγινε με βάση την κλινική εικόνα (τυπικό στηθαγχικό άλγος διάρκειας μεγαλύτερης των 20 λεπτών) και την ύπαρξη ηλεκτροκαρδιογραφικών αλλαγών με ή χωρίς αυξημένους βιοχημικούς δείκτες μυοκαρδιακής νέκρωσης (τιμές ολικής κινάσης της κρεατινίνης (CK) ή του μυοκαρδιακού της κλάσματος (CK-MB)) διπλάσιες των φυσιολογικών ή θετικές τιμές τροπονίνης I >0.3ng/mL (Grundy et al., 1999). Οι ασθενείς υποβλήθηκαν σε διαγνωστική αγγειογραφία των στεφανιαίων αγγείων εντός 7 ημερών από την εμφάνιση του επεισοδίου. Την ομάδα ομάδα ελέγχου αποτέλεσαν 41 άτομα με φυσιολογικά αγγεία οι οποίοι υποβλήθηκαν σε στεφανιογραφία στα πλαίσια διερεύνησης άτυπης κλινικής συμπτωματολογίας. Οι ασθενείς αυτοί είχαν υποβληθεί σε δοκιμασία κόπωσης η οποία ήταν μη διαγνωστική και εμφάνισαν «φυσιολογικά» στεφανιαία αγγεία (λεία στεφανιαία αγγεία με φυσιολογική διάμετρο αυλού) στη στεφανιογραφία.

Από τη μελέτη αποκλείστηκαν ασθενείς με ιστορικό σακχαρώδη διαβήτη (επίπεδα γλυκόζης νηστείας >126mg/dL), ηπατικής ή νεφρικής νόσου (επίπεδα ALT/AST μεγαλύτερα από 3 φορές των ανωτέρων φυσιολογικών τιμών και κρεατινίνης ορού >1.6mg/dL, αντίστοιχα), νεοπλασίας, υποθυρεοειδισμό (επίπεδα TSH >5μIU/mL), καθώς και ασθενείς με νόσο ρευματικής αιτιολογίας, αφού είναι γνωστό ότι οι παραπάνω παθολογικές καταστάσεις αποτελούν αιτίες διαταραχής του μεταβολισμού των λιπιδίων. Επιπρόσθετα, από τη μελέτη εξαιρέθηκαν ασθενείς στους οποίους είχε χορηγηθεί υπολιπιδαιμική αγωγή, ασθενείς που υποβλήθηκαν σε διαγνωστική στεφανιογραφία στα πλαίσια εκτίμησης μυοκαρδιοπάθειας ή βαλβιδοπάθειας και τέλος, ασθενείς που υποβλήθηκαν σε στεφανιογραφία στα πλαίσια πρωτογενούς αντιμετώπισης του οξέος στεφανιαίου επεισοδίου (εντός του πρώτου 48ώρου).

Η δεύτερη ομάδα περιλαμβάνει 31 ασθενείς με υπερχοληστερολαιμία (επίπεδα χοληστερόλης >200mg/dL και τριγλυκεριδίων <150mg/dL) και 30 ασθενείς με μικτή υπερλιπιδαιμία (επίπεδα χοληστερόλης >200mg/dL και τριγλυκεριδίων >150mg/dL) οι οποίοι προσήλθαν στο Εξωτερικό Ιατρείο Λιπιδίων του Π.Γ.Ν. Ιωαννίνων. Ως ομάδα ελέγχου επιλέχθηκαν 44 άτομα με φυσιολογικά επίπεδα λιπιδίων (επίπεδα χοληστερόλης <200mg/dL και τριγλυκεριδίων <150mg/dL). Από τη μελέτη αποκλείστηκαν άτομα στα οποία είχε χορηγηθεί υπολιπιδαιμική αγωγή, άτομα με ιστορικό στεφανιαίας νόσου, σακχαρώδη διαβήτη

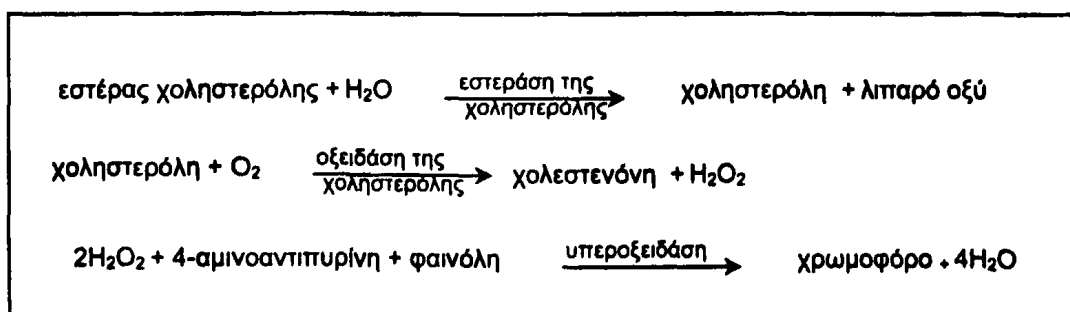
(επίπεδα γλυκόζης νηστείας  $>126\text{mg/dL}$ ), νεφρική ανεπάρκεια (επίπεδα κρεατινίνης ορού  $>1.6\text{mg/dL}$ ), ηπατική νόσο (επίπεδα ALT/AST μεγαλύτερα από 3 φορές των ανωτέρων φυσιολογικών τιμών), υποθυρεοειδισμό (επίπεδα TSH  $>5\text{mIU/ml}$ ), υπέρταση, παχύσαρκοι ασθενείς (δείκτης μάζας σώματος  $>30\text{Kg/m}^2$ ), καθώς και ασθενείς με νεοπλασία ή ασθενείς με νόσο ρευματικής αιτιολογίας.

Τα δείγματα αφού συλλέχθηκαν μετά από 12ωρη νηστεία, τοποθετήθηκαν σε πλαστικά σωληνάρια αιμοληψίας Vacutainer SST II. Τα δείγματα αίματος αφού παρέμειναν σε θερμοκρασία δωματίου για χρονικό διάστημα 15 λεπτών για να ολοκληρωθεί η διαδικασία της πήξης, έπειτα φυγοκεντρήθηκαν για 15 λεπτά στις 3000 στροφές ανά λεπτό. Συλλέχθηκε ο ορός, μεταφέρθηκε σε πλαστικά σωληνάκια τύπου Cryovials και καταψύχθηκε σε θερμοκρασία  $-80^\circ\text{C}$  μέχρι το επόμενο στάδιο της πειραματικής διαδικασίας.

### 1.7.2. Προσδιορισμός των βιοχημικών και λιπιδαιμικών παραμέτρων του ορού

Ο βιοχημικός έλεγχος, ο οποίος περιλαμβάνει τον προσδιορισμό των επιπέδων της γλυκόζης, ινσουλίνης, κρεατινίνης, ουρικού οξέος, ηπατικών και μυϊκών ενζύμων, καθώς επίσης και ο λιπιδαιμικός έλεγχος, ο οποίος περιλαμβάνει τον προσδιορισμό των επιπέδων ολικής- και HDL-χοληστερόλης και τριγλυκεριδίων πραγματοποιήθηκαν σε αυτόματο βιοχημικό αναλυτή OLYMPUS AU640 (Olympus Diagnostica, Hamburg, Germany).

Η μέτρηση των επιπέδων της ολικής χοληστερόλης πραγματοποιείται με ενζυματική μέθοδο. Το πρώτο στάδιο της μέτρησης της χοληστερόλης περιλαμβάνει την υδρόλυση του ποσοστού της χοληστερόλης που είναι εστεροποιημένη προς ελεύθερη χοληστερόλη και λιπαρό οξύ από το ένζυμο εστεράση της χοληστερόλης (Εικόνα 1.7-1) και στην συνέχεια η ολική χοληστερόλη παρουσία οξυγόνου οξειδώνεται προς χολεστενόνη ( $\Delta^4$ -χολεστεν-3-όνη) και υπεροξείδιο του υδρογόνου από το ένζυμο οξειδάση της χοληστερόλης.

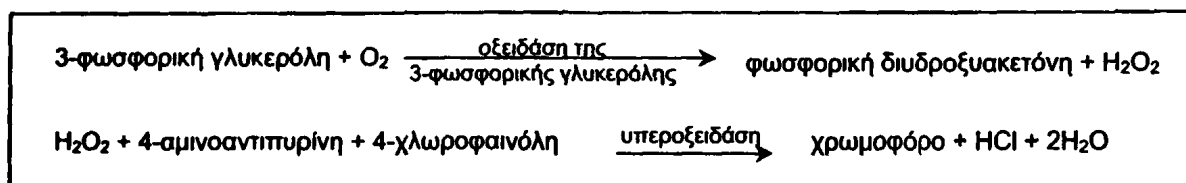
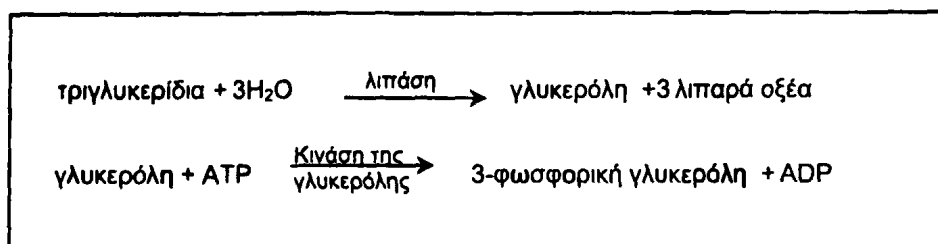


Εικόνα 1.7-1. Αντιδράσεις προσδιορισμού της χοληστερόλης

Το  $\text{H}_2\text{O}_2$  που παράγεται χρησιμοποιείται για την οξειδωτική σύζευξη δύο χρωμογόνων συστατικών υπό την καταλυτική δράση υπεροξειδάσης προς χρωμοφόρο quinoneimine το οποίο μετράται φωτομετρικά στα 500 nm περίπου.

Ο προσδιορισμός των επιπέδων των τριγλυκεριδίων πραγματοποιείται ενζυματικά. Τα τριγλυκερίδια με τη δράση της λιπάσης υδrolύονται σε γλυκερόλη και λιπαρά οξέα και

στη συνέχεια η γλυκερόλη μετατρέπεται σε 3-φωσφορική γλυκερόλη με την κινάση της γλυκερόλης. Στη συνέχεια η 3-φωσφορική γλυκερόλη οξειδώνεται και το  $H_2O_2$  που παράγεται με την δράση της υπεροξειδάσης δίνει το έγχρωμο προϊόν p-benzoquinoneimino-rhenazone (Εικόνα 1.7-2).



Εικόνα 1.7-2. Αντιδράσεις προσδιορισμού των τριγλυκεριδίων

Ο προσδιορισμός της HDL-χοληστερόλης πραγματοποιήθηκε με ομογενή (ή άμεση) μέθοδο. Οι μέθοδοι αυτές είναι αυτοματοποιημένες και απαιτούν πολύ μικρό όγκο δείγματος ο οποίος επωάζεται με ένα αντιδραστήριο (κυρίως α-κυκλοδεξτρίνη, συνθετικά πολυμερή ή αντισώματα κατά των απολιποπρωτεϊνών) που σχηματίζει σταθερά σύμπλοκα με όλες τις άλλες λιποπρωτεΐνες. Σε αντίθεση με τη μέθοδο καταβύθισης τα σύμπλοκα αυτά παραμένουν διαλυτά στο μίγμα της αντίδρασης και δεν χρειάζεται να διαχωριστούν. Τα σωματίδια των HDL λιποπρωτεϊνών είναι τα μόνα που μένουν ελεύθερα για την μέτρηση της χοληστερόλης που περιέχουν. Το αντιδραστήριο που χρησιμοποιήθηκε περιείχε αντισώματα κατά των apoB.

Η LDL-χοληστερόλη του πλάσματος (LDL-C) υπολογίστηκε έμμεσα από την εξίσωση του Friedewald (Friedewald et al., 1972) ως εξής:

$$\text{LDL-χοληστερόλη} = \text{ολική χοληστερόλη} - (\text{HDL-χοληστερόλη} + \text{TG}/5) \text{ σε mg/dL}$$

Με την εξίσωση του Friedewald υπολογίζονται τα επίπεδα της LDL-χοληστερόλης μόνο για δείγματα με επίπεδα τριγλυκεριδίων <400mg/dL.

Η «nonHDL-χοληστερόλη» (nonHDL-χοληστερόλη) ορίζεται ως [ολική χοληστερόλη - HDL-χοληστερόλη] δηλαδή είναι το σύνολο της χοληστερόλης των LDL + VLDL σωματιδίων και περιλαμβάνει ουσιαστικά όλες τις λιποπρωτεΐνες που περιέχουν apoB, οι περισσότερες από τις οποίες θεωρούνται σε κάποιο βαθμό αθηρωγόνες. Η nonHDL-χοληστερόλη αποτελεί ένα δευτερογενή θεραπευτικό στόχο όταν τα επίπεδα των τριγλυκεριδίων είναι  $\geq 200 \text{ mg/dL}$  (Adult Treatment Panel III., 2001). Στην παραγματικότητα,

με τον υπολογισμό της nonHDL-χοληστερόλης παρακάμπτονται τα μειονεκτήματα στον υπολογισμό της LDL-χοληστερόλης με την εξίσωσης Friedewald όταν τα επίπεδα των τριγλυκεριδίων είναι υψηλά.

Τέλος, οι απολιποπρωτεΐνες AI, B, E και η λιποπρωτεΐνη(a) μετρήθηκαν ανοσονεφελόμετρικά σε νεφελόμετρο BN Prospec (Dade-Behring, Liebernach, Germany).

#### 1.7.3. Απαιτούμενος εργαστηριακός εξοπλισμός

Για την εκτέλεση των πειραμάτων απαιτήθηκαν τα παρακάτω όργανα-σκεύη

1. Φασματογράφος Bruker Avance DRX 600MHz και 500MHz
2. Ζυγός (Adventurer™, OHAUS)
3. Φυγόκεντρος (Hettich, Universal II)
4. Σωληνάκια NMR (NMR tubes εσωτερικής διαμέτρου 5mm)
5. Πλαστικά σωληνάκια Cryovials (Cryo Tube™ Vials, NUNC)

#### 1.7.4. Παρασκευή αντιδραστηρίων

Για την εκτέλεση των πειραμάτων απαιτήθηκαν τα παρακάτω αντιδραστήρια:

1. Αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ (EDTA,  $C_4H_{11}NO_3$ , MB= 121.14g/ml, Sigma-Aldrich)
2. Χλωριούχο Νάτριο (NaCl, MB=58.44g/ml, Merck)
3. Θεϊκή δεξτράνη (Dextran-Sulfate, Dextralip®, MB=50.000g/ml, 5gr, Sigma-Aldrich)
4. Ένυδρο χλωριούχο μαγνήσιο ( $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ , MB=203.30g/mol, Merck)
5. Ένυδρο μονοόξινο φωσφορικό νάτριο ( $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ , MB=177.99 g/mol, Merck)
6. Ένυδρο δισόξινο φωσφορικό νάτριο ( $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ , MB=138.01 g/mol, Merck)
7. Μεθανόλη (LAB-SCAN)
8. Χλωροφόρμιο (LAB-SCAN)
9. Δευτεριωμένη μεθανόλη (Methanol- $d_4$  με βαθμό δευτερίωσης 99.8%, Aldrich)
10. Δευτεριωμένο χλωροφόρμιο ( $CDCl_3$  με βαθμό δευτερίωση 99.8%, Merck)

Παρασκευάστηκαν τα παρακάτω διαλύματα:

- Διάλυμα θεϊκής δεξτράνης συγκεντρώσεως 20g/L και pH=7

Ζυγίστηκε ποσότητα 1gr θεϊκής δεξτράνης και διαλύθηκε σε 40ml απιονισμένου ύδατος σε ποτήρι ζέσης των 100ml. Το pH του διαλύματος που προέκυψε, ρυθμίστηκε σε τιμή 7 με προσθήκη μικρής ποσότητας διαλύματος υδροχλωρικού οξέος (HCl). Το διάλυμα μεταφέρθηκε σε ογκομετρική φιάλη των 50ml, προστέθηκε απιονισμένο ύδωρ μέχρι πληρώσεως και αποθηκεύτηκε στους 4°C.



- Διάλυμα  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  συγκεντρώσεως 1M και  $\text{pH}=7$

Ζυγίστηκε ποσότητα 20.3gr  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  και διαλύθηκε σε 80ml απιονισμένου ύδατος σε ποτήρι ζέσης των 250ml. Το  $\text{pH}$  του διαλύματος που προέκυψε, ρυθμίστηκε στο 7 με προσθήκη διαλύματος υδροξειδίου του νατρίου ( $\text{NaOH}$ ). Το διάλυμα μεταφέρθηκε σε ογκομετρική φιάλη των 100ml, προστέθηκε απιονισμένο ύδωρ μέχρι πληρώσεως και αποθηκεύτηκε στους  $4^\circ\text{C}$ .

- Διάλυμα θειικής δεξτράνης: χλωριούχου μαγνησίου (Dextran Sulfate:  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ )

Για την παρασκευή του διαλύματος θειικής δεξτράνης: χλωριούχου μαγνησίου αναμίχθηκαν ίσοι όγκοι από το διάλυμα θειικής δεξτράνης συγκεντρώσεως 20g/L και χλωριούχου μαγνησίου συγκεντρώσεως 1M.

- Διάλυμα  $\text{NaCl}$  συγκέντρωσης 0.15M

Ζυγίστηκε ποσότητα 2.192gr  $\text{NaCl}$  και μεταφέρθηκε σε ποτήρι ζέσεως των 250ml. Προστέθηκε ποσότητα 100ml απιονισμένου ύδατος μέχρι πλήρους διάλυσης της παραπάνω ποσότητας. Το διάλυμα μεταφέρθηκε σε ογκομετρική φιάλη των 250ml, προστέθηκε απιονισμένο ύδωρ μέχρι πληρώσεως και αποθηκεύτηκε στους  $4^\circ\text{C}$ .

- Διάλυμα  $\text{NaCl}$  (0.15M) - EDTA (1mM)

Ζυγίστηκαν ποσότητες 0.877gr  $\text{NaCl}$  και 0.029gr EDTA και αναμίχθηκαν σε ποτήρι ζέσης των 100ml. Προστέθηκε ποσότητα απιονισμένου ύδατος μέχρι πλήρους διάλυσης των παραπάνω ποσοτήτων των ουσιών. Το διάλυμα που προέκυψε μεταφέρθηκε σε ογκομετρική φιάλη των 100ml και προστέθηκε απιονισμένο ύδωρ μέχρι πληρώσεως.

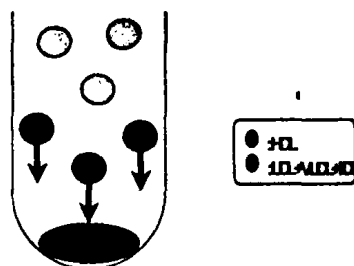
- Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (Phosphate buffer solution, PBS)

Για την παρασκευή ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών ζυγίστηκαν 1.280gr  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , 7.253gr  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  και 3.834gr  $\text{NaCl}$ . Οι ποσότητες αυτές μεταφέρθηκαν σε ποτήρι ζέσης των 250ml όπου προστέθηκε ποσότητα ύδατος μέχρι πλήρους διάλυσης των ποσοτήτων αυτών. Το διάλυμα που προέκυψε μεταφέρθηκε σε φιάλη των 500ml όπου ρυθμίστηκε το  $\text{pH}$  σε τιμή ίση με 7.2.

### 1.7.5. Διαχωρισμός των HDL και nonHDL λιποπρωτεϊνών

#### 1.7.5.1. Αρχή μεθόδου καταβύθισης των λιποπρωτεϊνών που περιέχουν apoB

Για τον προσδιορισμό της σύστασης των HDL λιποπρωτεϊνών θα πρέπει να πραγματοποιηθεί απομόνωση των σωματιδίων αυτών από τις υπόλοιπες λιποπρωτεΐνες του πλάσματος. Η απομόνωση πραγματοποιείται με τις μεθόδους καταβύθισης (Εικόνα 1.7-3) και στηρίζεται κατά κύριο λόγο στο ότι τα HDL σωματίδια δεν περιέχουν απολιποπρωτεΐνη Β, μια πρωτεΐνη που είναι πλούσια σε θετικά φορτισμένα αμινοξέα αργινίνης και υπάρχει στις LDL, IDL και VLDL λιποπρωτεΐνες. Στις μεθόδους αυτές χρησιμοποιούνται πολυανιόντα σε συνδυασμό με δισθενή κατιόντα τα οποία σχηματίζουν αδιάλυτα σύμπλοκα με όλες τις χαμηλότερης πυκνότητας λιποπρωτεΐνες αφήνοντας τις HDL διαλυτές στο υπερκείμενο.



Εικόνα 1.7-3: Σχηματική παράσταση των μεθόδων καταβύθισης

Σημαντικό ρόλο στην αλληλεπίδραση των λιποπρωτεϊνών με πολυανιόντα παίζουν το pH και η ιοντική ισχύς του διαλύματος, η παρουσία των ιόντων μετάλλων, καθώς επίσης και η φύση των πολυσακχαριτών και των λιποπρωτεϊνών.

Η ρύθμιση της ιοντικής ισχύος του διαλύματος παίζει σημαντικό ρόλο στην επιλεκτική καταβύθιση των λιποπρωτεϊνών διότι σε χαμηλές τιμές ιοντικής ισχύος καταβυθίζονται ταυτόχρονα με τα σύμπλοκα των λιποπρωτεϊνών και άλλες πρωτεΐνες του ορού, ενώ σε υψηλές τιμές ιοντικής ισχύος επαναδιαλύονται τα αδιάλυτα σύμπλοκα (Burststein and Samaille., 1957). Επιπρόσθετα, παρατεταμένη αλληλεπίδραση των πολυανιόντων και των δισθενών κατιόντων με τις λιποπρωτεΐνες του πλάσματος που περιέχουν απολιποπρωτεΐνη Β έχει ως αποτέλεσμα την καταβύθιση και των λιποπρωτεϊνών που περιέχουν απολιποπρωτεΐνη ΑΙ. Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε το αντιδραστήριο καταβύθισης Dextran Sulfate (20g/L) :  $MgCl_2 \cdot 6H_2O$  (1M).

#### 1.7.5.2. Πειραματικό μέρος

Σε γυάλινο σωληνάριο τοποθετήθηκε ποσότητα ορού ίση με 1.5ml για την καταβύθιση των nonHDL λιποπρωτεϊνών και την απομόνωση των HDL σωματιδίων. Τα βήματα της πειραματικής διαδικασίας που ακολουθήθηκαν (Warnick et al., 1982) είναι τα εξής:



- Τα δείγματα ορού και τα διαλύματα παρέμειναν σε θερμοκρασία δωματίου για 20 λεπτά
- Παρασκευάστηκε η ποσότητα του αντιδραστήριου καταβύθισης, λαμβάνοντας υπόψη ότι σε κάθε 1ml δείγματος προστίθεται ποσότητα αντιδραστήριου καταβύθισης ίση με 100μl. Κατά συνέπεια, σε 1.5ml δείγματος ορού προστίθενται 150μl από το αντιδραστήριο καταβύθισης
- Ακολούθησε ήπια ανάδευση για τουλάχιστον 3sec και παραμονή για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου
- Ακολούθησε φυγοκέντρηση στις 2500 στροφές για 10 λεπτά
- Συλλέχθηκε το διαυγές υπερκείμενο το οποίο περιείχε τις HDL λιποπρωτεΐνες
- Σε περίπτωση που το υπερκείμενο παρουσιάζει θολερότητα που είναι ένδειξη ατελούς καταβύθισης των nonHDL λιποπρωτεϊνών λόγω υψηλής συγκέντρωσης τριγλυκεριδίων, προστίθεται 1ml από το διάλυμα NaCl (0.15M), επιπλέον 100μl αντιδραστήριου καταβύθισης και επαναλαμβάνεται η παραπάνω πειραματική διαδικασία
- Το ίζημα που αντιστοιχεί στις nonHDL λιποπρωτεΐνες επαναδιαλύθηκε με προσθήκη 1ml ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών (PBS) αραιωμένο κατά 10 φορές με απιονισμένο ύδωρ.

#### 1.7.6. Εκχύλιση των λιπιδίων

Η ίδια πειραματική διαδικασία εκχύλισης των λιπιδίων ακολουθείται για το HDL και nonHDL κλάσμα. Η διαδικασία εκχύλισης βασίζεται σε παραλλαγή της μεθόδου Bligh και Dyer (Bligh and Dyer., 1959) και περιλαμβάνει τα παρακάτω βήματα ως εξής:

- Για κάθε ποσότητα 0.25ml διαλύματος HDL ή nonHDL λιποπρωτεϊνών προστέθηκε ποσότητα 0.4ml διαλύματος NaCl (0.15M) - EDTA (1mM)
- Στη συνέχεια προστέθηκε ποσότητα 1ml μεθανόλης και το διάλυμα αναδεύτηκε για 10 sec
- Προστέθηκε ποσότητα 0.5ml χλωροφορμίου και το διάλυμα αναδεύτηκε για 15 sec
- Προστέθηκε ποσότητα 0.5ml χλωροφορμίου και το διάλυμα αναδεύτηκε για 15 sec
- Τέλος, προστέθηκε ποσότητα 0.5ml χλωροφορμίου και έπειτα 0.5ml απιονισμένου ύδατος, με ανάδευση μετά από την προσθήκη του χλωροφορμίου και του ύδατος
- Ακολούθησε φυγοκέντρηση στις 2400 στροφές για 15 λεπτά
- Με ιδιαίτερη προσοχή, ώστε να μην απορροφηθεί η πάνω υδατική φάση και τμήμα της ενδιάμεσης πρωτεϊνικής φάσης, μεταφέρθηκε με μια μικροσιπάτα pasteur σε καθαρό γυάλινο σωληνάκι η κάτω χλωροφορμική φάση που περιείχε τα λιπίδια

- Τέλος, προστέθηκε ποσότητα 0.5ml χλωροφορμίου στο αρχικό σωληνάκι και επαναλήφθηκαν τα παραπάνω στάδια (ήπια ανάδευση, φυγοκέντρωση) για να συλλεχθούν και τα υπόλοιπα λιπίδια
- Αναμίχθηκαν οι ποσότητες των δυο χλωροφορμικών φάσεων και πραγματοποιήθηκε εξάτμιση του διαλύτη σε ρεύμα αζώτου
- Στα δείγματα αφού διαβιβάστηκε ρεύμα αζώτου, φυλάχθηκαν στους  $-80^{\circ}\text{C}$  μέχρι τη λήψη των φασμάτων  $^1\text{H}$  NMR.

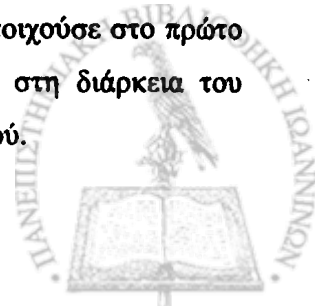
### 1.7.7. Φάσματα $^1\text{H}$ NMR

#### 1.7.7.1. Προετοιμασία των δειγμάτων για τη λήψη των φασμάτων $^1\text{H}$ NMR

Τα εκχυλίσματα των λιπιδίων των HDL και nonHDL λιποπρωτεϊνών παρέμειναν σε θερμοκρασία δωματίου για 20 λεπτά περίπου και επαναδιαλύθηκαν σε μίγμα δευτεριωμένων διαλυτών (για την αποφυγή αλληλεπικάλυψης των σημάτων συντονισμού των πρωτονίων των λιπιδίων με αυτά του διαλύτη). Το μίγμα των διαλυτών περιελάμβανε δευτεριωμένη μεθανόλη (Methyl- $\text{d}_3$  alcohol- $\text{d}$ , με βαθμό δευτερίωσης 99.8%): δευτεριωμένο χλωροφόρμιο (Chloroform- $\text{d}_1$ , με βαθμό δευτερίωσης 99.8%), σε αναλογία 2:1 (v/v) αντίστοιχα (Adosraku et al., 1994, Noula et al., 2000). Η επαναδιάλυση των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε σε ποσότητα 500μl του παραπάνω μίγματος δευτεριωμένων διαλυτών και τα διαλύματα μεταφέρθηκαν με πιπέτα σε ειδικά σωληνάκια NMR (NMR tubes, εσωτερικής διαμέτρου 5mm). Η παρασκευή του μίγματος των δευτεριωμένων διαλυτών πραγματοποιήθηκε λίγο πριν την έναρξη του πειράματος ώστε να ελαχιστοποιηθεί η εξάτμιση των πτητικών διαλυτών.

#### 1.7.7.2. Λήψη των φασμάτων $^1\text{H}$ NMR

Η λήψη των φασμάτων  $^1\text{H}$  NMR πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Φασματοσκοπίας NMR στο Εθνικό Κέντρο Έρευνας Φυσικών Επιστημών «Δημόκριτος» στην Αθήνα, σε φασματογράφο Bruker Avance DRX 500MHz εντάσεως μαγνητικού πεδίου 11.74 Tesla σε θερμοκρασία 298°K και στο εργαστήριο Φυσικοχημείας στο Νανσύ στη Γαλλία, σε φασματογράφο Bruker Avance DRX 600MHz εντάσεως μαγνητικού πεδίου 14.1 Tesla στην ίδια θερμοκρασία. Για την καταστολή του σήματος του νερού χρησιμοποιήθηκε η 1D παλμική ακολουθία NOESYPRESAT (RD-90°- $t_1$ -90°-  $t_m$ -FID λήψη) (Nicholson et al., 1995), όπου RD (relaxation delay), ο χρόνος αποδιέγερσης ήταν 3s ώστε να εξασφαλιστεί πλήρη αποδιέγερση των πυρήνων μεταξύ των διαδοχικών παλμών στη διάρκεια του οποίου έγινε καταστολή της κορυφής του νερού,  $t_1$  ήταν ο χρόνος 3μs και αντιστοιχούσε στο πρώτο increment του πειράματος NOESY,  $t_m$  ήταν χρόνος ανάμειξης 150ms στη διάρκεια του οποίου έγινε επιλεκτική ακτινοβολή της κορυφής συντονισμού του νερού.



Σε κάθε φάσμα έγινε συλλογή 128 παλμών (scans) 64K δεδομένων (data points) με φασματικό εύρος 5000Hz και παλμό 90°. Οι 128 ελευθέρως φθίνουσες επαγωγές (FID) αυξήθηκαν με προσθήκη μηδενικών στη μνήμη του υπολογιστή (zero filling), ώστε να ληφθεί τελική μήτρα δεδομένων 128K x 128K. Για την αύξηση της ευαισθησίας, οι FID πολλαπλασιάστηκαν πριν το μετασχηματισμό Fourier με κατάλληλη εκθετική συνάρτηση (exponential weighting function) που αντιστοιχούσε σε διεύρυνση γραμμών (line broadening) 0.3Hz. Ο μέσος χρόνος λήψης ενός φάσματος ήταν περίπου 10 λεπτά.

### 1.7.7.3. Επεξεργασία των φασμάτων $^1\text{H}$ NMR

Τα φάσματα επεξεργάστηκαν με το λογισμικό πρόγραμμα WINNMR 1D (WIN NMR, Bruker-Franzen Analytik GmbH). Όπως προαναφέρθηκε, η FID αφού πολλαπλασιαστεί αρχικά με την εκθετική συνάρτηση (LB=0.3) στη συνέχεια μετασχηματίζεται κατά Fourier στο φάσμα συνάρτησης συχνότητας. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκαν τα παρακάτω βήματα, ώστε το φάσμα να είναι κατάλληλο για τον ποσοτικό προσδιορισμό των λιπιδίων:

- *Βαθμονόμηση (Calibration)*: Η βαθμονόμηση πραγματοποιήθηκε με βάση το σήμα συντονισμού της δευτεριωμένης μεθανόλης στα 3.30ppm
- *Διόρθωση φάσης (Phase Correction)*: Η διόρθωση της φάσης, μηδενικής και πρώτης τάξης, βελτίωσε τη συμμετρία των κορυφών
- *Διόρθωση γραμμής βάσης (Baseline correction)*: Η διόρθωση της γραμμής βάσης θεωρήθηκε απαραίτητη για την ακριβή ολοκλήρωση των κορυφών συντονισμού και κατά συνέπεια του ποσοτικού προσδιορισμού των συστατικών των λιπιδίων
- *Καταγραφή της χημικής μετατόπισης (Peak picking)*: Πραγματοποιήθηκε η καταγραφή της χημικής μετατόπισης των κορυφών που υπάρχουν στο φάσμα ως προς την ουσία αναφοράς (μεθανόλη στα 3.30ppm)
- *Ολοκλήρωση των περιοχών (Integration)*: Με την ολοκλήρωση, υπολογίστηκε το εμβαδόν μιας απλής ή μιας ομάδας κορυφών, το οποίο είναι ανάλογο του αριθμού των πρωτονίων που περιέχουν. Για να είναι συγκρίσιμα τα αποτελέσματα, το ολοκλήρωμα του σήματος συντονισμού των πρωτονίων του άνθρακα 18 της χοληστερόλης ( $\text{C}_{18}\text{H}_3$ ,  $\delta=0.68\text{ppm}$ ) τέθηκε ίσο με την τιμή 1. Έπειτα υπολογίζονται οι τιμές των ολοκληρωμάτων των σημάτων συντονισμού των υπολοίπων λιπιδίων αναλογικά με την τιμή του ολοκληρώματος της χοληστερόλης. Οι τιμές των ολοκληρωμάτων αυτών ανάγονται με βάση την τιμή του ολοκληρώματος της χοληστερόλης, λαμβάνοντας υπόψη τον αριθμό των πρωτονίων κάθε σήματος συντονισμού.

Για τον υπολογισμό του λόγου της εστεροποιημένης προς την ελεύθερη χοληστερόλη από την κορυφή των πρωτονίων του άνθρακα 18 ( $C_{18}H_3$ ) στα 0.68ppm και του λόγου της φωσφατιδυλοχολίνης προς σφιγγομυελίνη από την κορυφή της N-τριμεθυλομάδας  $N^+(CH_3)_3$  στα 3.20ppm πραγματοποιήθηκε εκ νέου επεξεργασία της FID με την συνάρτηση Sine-Bell Squared (SSB=16) και αναγωγή της αναλογίας του ύψους τους στο αρχικό συνολικό τους ολοκλήρωμα. Για την ποσοτικοποίηση των διαλλυλικών μεθυλενίων των λιπαρών οξέων και του λινελαϊκού οξέος, η FID πολλαπλασιάστηκε με την συνάρτηση Sine-Bell Squared (SSB=2) και πραγματοποιήθηκε αναγωγή της αναλογίας των εμβαδών τους στο αρχικό συνολικό τους ολοκλήρωμα.

Η ταυτοποίηση των χημικών μετατοπίσεων των σημάτων συντονισμού των πρωτονίων των λιπιδίων πραγματοποιήθηκε με βάση τη διεθνή βιβλιογραφία και με τη λήψη 1D και 2D φασμάτων (Sparling et al., 1989, Kriat et al., 1993, Noula et al., 2000).

### **1.7.8. Μεταβολομική ανάλυση**

#### **1.7.8.1. Επεξεργασία των φασμάτων $^1H$ NMR**

Η περιοχή 0.505-0.595ppm των  $^1H$  NMR φασμάτων διαιρέθηκε αυτόματα με τη βοήθεια του λογισμικού προγράμματος AMIX (Analysis of MIXtures) (έκδοση 3.2.4. Bruker Analytik, Rheinstetten, Germany) σε 145 φασματικές περιοχές (bins) πλάτους 0.03ppm. Αφαιρέθηκε η φασματική περιοχή μεταξύ 4.58 και 5.00ppm που περιελάμβανε το σήμα της καταστολής του ύδατος, καθώς επίσης και η περιοχή 3.24-3.50ppm η οποία περιελάμβανε το σήμα της μεθανόλης. Όλα τα δεδομένα κανονικοποιήθηκαν διαιρώντας κάθε bin με το ολικό εμβαδό του φάσματος. Στη συνέχεια, τα bins μεταφέρθηκαν σε αρχείο Microsoft Excel (Microsoft Office 2000) και έπειτα στο λογισμικό πρόγραμμα SIMCA-P (version 10.5, UMETRICS AB, Box 7960, SE 90719, Umea, Sweden) για τη μεταβολομική ανάλυση.

#### **1.7.8.2. Δημιουργία στατιστικών μοντέλων**

Πριν την ανάλυση, εφαρμόστηκε η τεχνική του κεντραρίσματος του μέσου όρου. Η PCA (ανάλυση κύριων συνιστωσών) χρησιμοποιήθηκε αρχικά για την γενική επισκόπηση των δεδομένων, τον εντοπισμό δειγμάτων που παρουσιάζουν ακραίες συμπεριφορές (outliers) ή τάσεις ομαδοποίησης (groupings). Η ερμηνεία των αποτελεσμάτων της τεχνικής PCA πραγματοποιήθηκε με τα γραφήματα συντεταγμένων και τα γραφήματα φορτίων, στα οποία παρουσιάζονται τα bins που συνέβαλαν στις παρατηρούμενες τάσεις ομαδοποίησης ή τις ακραίες συμπεριφορές αυτών, καθώς επίσης και τα bins που συσχετίζονται μεταξύ τους.

Η PLS-DA (Διακριτική ανάλυση μερικών ελαχίστων τετραγώνων) πραγματοποιήθηκε για να προβλέψει την κατηγορία κλάσης (class membership) των ασθενών με βάση τη νόσο των αγγείων. Η ερμηνεία των γραφημάτων πραγματοποιήθηκε με τα γραφήματα συντελεστών παλινδρόμησης στα οποία εμφανίζονται οι φασματικές περιοχές

που συμβάλλουν στην παρατηρούμενη τάση διαχωρισμού μεταξύ των ομάδων. Η τεχνική OSC (ορθοκανονική διόρθωση σήματος) εφαρμόστηκε για να αφαιρεθεί η ορθοκανονική διακύμανση των  $^1\text{H}$  NMR δεδομένων, που συσχετίζονται με την ενδοατομική μεταβλητότητα.

Εφαρμόστηκε η προεπιλεγμένη μέθοδος του προγράμματος SIMCA-P της αξιολόγησης cross validation. Η παράμετρος  $Q^2$  χρησιμοποιήθηκε για την ικανότητα πρόβλεψης του στατιστικού μοντέλου. Όταν η τιμή του  $Q^2$  ήταν μεγαλύτερη από 0.5 το στατιστικό μοντέλο θεωρείται «καλό», ενώ όταν  $Q^2 > 0.9$  θεωρείται «άριστο». Η παράμετρος  $R^2$  δίνει μια ποσοτική εκτίμηση της προσαρμογής του στατιστικού μοντέλου στα δεδομένα. Για την εσωτερική και εξωτερική αξιολόγηση (internal and external validation) των στατιστικών μοντέλων χρησιμοποιήθηκε ως ομάδα βαθμονόμησης (calibration set) το 80% των δειγμάτων και ως ομάδα αξιολόγησης (test set) το 20% αυτών.

Η ευαισθησία και η ειδικότητα της μεθόδου υπολογίστηκαν με βάση τους τύπους:

$$\text{Ευαισθησία} = A\theta / (A\theta + \Psi A) \times 100 \text{ και } \text{Ειδικότητα} = AA / (\Psi\theta + AA) \times 100$$

Όπου,  $A\theta$  είναι τα «αληθώς θετικά» δηλαδή δείγματα ασθενών τα οποία πάσχουν από τη νόσο και κατατάσσονται σωστά στην ομάδα αυτών που πάσχουν,  $\Psi\theta$  είναι τα «ψευδώς θετικά» δηλαδή δείγματα ασθενών τα οποία είναι γνωστό ότι δεν πάσχουν, αλλά κατατάσσονται στην ομάδα αυτών που πάσχουν,  $\Psi A$  είναι τα «ψευδώς αρνητικά» δηλαδή δείγματα ασθενών τα οποία πάσχουν αλλά κατατάσσονται στην ομάδα αυτών που δεν πάσχουν και τέλος,  $AA$  είναι τα «αληθώς αρνητικά» δηλαδή δείγματα ατόμων που δεν πάσχουν και κατατάσσονται στην ομάδα αυτών που δεν πάσχουν (Bylesjo et al., 2006).

#### 1.7.9. Στατιστική ανάλυση

Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με το στατιστικό πρόγραμμα Statistica εκδ 6.0 (StatSoft Inc. Tulca, OK, USA). Οι επιμέρους συγκεντρώσεις των λιπιδίων υπολογίστηκαν ως mmol/L. Οι παράμετροι εκφράστηκαν ως μέσες τιμές  $\pm$  μια τυπική απόκλιση (mean  $\pm$  standard deviation), εκτός από τις τιμές της  $L_p(a)$  οι οποίες εκφράστηκαν ως ενδιάμεση τιμή (median) – εύρος (range). Η σύγκριση των μέσων τιμών των παραμέτρων έγινε με τη δοκιμασία Students' t-test για σύγκριση μεταξύ δύο ανεξάρτητων ομάδων. Σε κάθε περίπτωση  $p < 0.05$  θεωρήθηκε στατιστικά σημαντικό.

## 1.8. Αποτελέσματα

### 1.8.1. Ανάλυση του $^1\text{H}$ NMR φάσματος εκχυλίσματος λιπιδίων των HDL λιποπρωτεϊνών

Έχει ήδη αναφερθεί, ότι έχουν διεξαχθεί αρκετές μελέτες που αφορούν τη διερεύνηση της λιπιδιακής σύστασης εκχυλισμάτων λιπιδίων κυττάρων και ιστών με φασματοσκοπία  $^1\text{H}$  NMR. Στην παρούσα διατριβή μελετήθηκε η ανάλυση του  $^1\text{H}$  NMR φάσματος εκχυλίσματος λιπιδίων των HDL και nonHDL λιποπρωτεϊνών του πλάσματος.

Στην Εικόνα 1.8-1 παρουσιάζεται ένα αντιπροσωπευτικό φάσμα εκχυλίσματος λιπιδίων των HDL λιποπρωτεϊνών. Κάθε ομάδα κορυφών αντιπροσωπεύει πρωτόνια συγκεκριμένης χημικής φύσης από το ετερογενές μίγμα των λιπιδίων (Πίνακας 1.8-1). Στο φάσμα αυτό διακρίνονται οι κορυφές που αντιστοιχούν στη χοληστερόλη, ελεύθερη (FC) και εστεροποιημένη (CE), τα φωσφολιπίδια, φωσφατιδυλοχολίνη (PC) και σφιγγομυελίνη (SM), το σκελετό της γλυκερόλης των τριγλυκεριδίων και τα λιπαρά οξέα.

**Χοληστερόλη:** Τα σήματα συντονισμού των πρωτονίων της χοληστερόλης εμφανίζονται σε όλη την περιοχή του φάσματος (0.68-5.36ppm). Το σήμα συντονισμού των πρωτονίων της μεθυλομάδας του άνθρακα 18 (Εικόνα 1.8-2) της χοληστερόλης (0.68ppm) είναι το πιο ευδιάκριτο από τα υπόλοιπα σήματα συντονισμού των πρωτονίων του μορίου και με βάση αυτό πραγματοποιείται η ταυτοποίηση και ο ποσοτικός της προσδιορισμός. Επιπρόσθετα, το σήμα αυτό σχάζεται σε δυο κορυφές που αντιστοιχούν στην ελεύθερη και εστεροποιημένη χοληστερόλη, απ' όπου μπορεί να υπολογιστεί η αναλογία τους (Εικόνα 1.8-1α). Ο διαχωρισμός των 2 μορφών της χοληστερόλης είναι καλύτερος από το σήμα συντονισμού των πρωτονίων του άνθρακα 19 όμως λόγω συντονισμού και άλλων λιπιδίων στην ίδια περιοχή υπάρχει ένα σημαντικό σφάλμα στον ποσοτικό προσδιορισμό. Άλλα ευδιάκριτα σήματα συντονισμού του μορίου είναι αυτά που προέρχονται από τα πρωτόνια των ανθράκων 21, 26 και 27 στα 0.87ppm, του άνθρακα 3 στα 3.40ppm και από τα ολεφινικά πρωτόνια του άνθρακα 6 στα 5.36ppm (Εικόνα 1.8-2, Πίνακας 1.8-1).

**Φωσφολιπίδια:** Τα δύο κύρια φωσφολιπίδια των λιποπρωτεϊνών του πλάσματος είναι η φωσφατιδυλοχολίνη και η σφιγγομυελίνη τα οποία και αντιπροσωπεύουν περίπου το 93% των συνολικών φωσφολιπιδίων. Τα δυο φωσφολιπίδια περιέχουν την χαρακτηριστική ομάδα της χολίνης από την οποία και ταυτοποιούνται με τρεις χαρακτηριστικές κορυφές στο φάσμα NMR: την κορυφή του σήματος της N-τριμεθυλομάδας  $\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$  στα 3.20ppm, της α-μεθυλομάδας  $-\text{CH}_2-\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$  στα 3.60ppm και της β-μεθυλομάδας  $-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$  στα 4.24ppm (κορυφές 14, 16 και 18 στην Εικόνα 1.8-1 και στον Πίνακα 1.8-1). Ο ποσοτικός προσδιορισμός των ολικών φωσφολιπιδίων που περιέχουν χολίνη (φωσφατιδυλοχολίνη και σφιγγομυελίνη) πραγματοποιήθηκε από το σήμα της N-τριμεθυλομάδας στα 3.20ppm. Η επαναληψιμότητα του προσδιορισμού ελέγχθηκε από τα άλλα δυο σήματα και βρέθηκε να κυμαίνεται από 94-99%. Επιπρόσθετα, το σήμα της N-τριμεθυλομάδας της χολίνης στα 3.20ppm σχάζεται σε δυο κορυφές, την N-τριμεθυλομάδα της

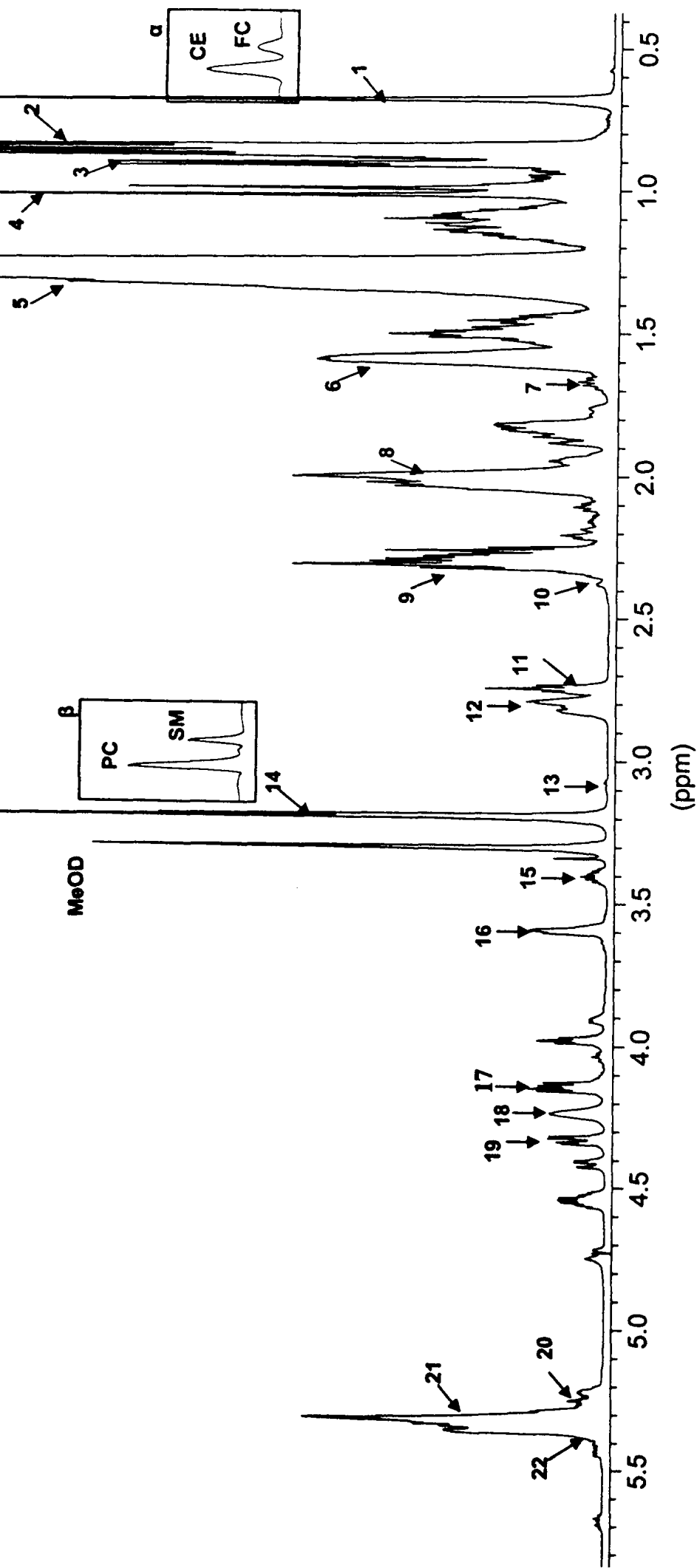
φωσφατιδυλοχολίνης και της σφιγγομυελίνης από όπου μπορεί να υπολογιστεί ο λόγος των δυο φωσφολιπιδίων (Εικόνα 1.8-1β). Η φωσφατιδυλοαιθανολαμίνη ταυτοποιείται από το χαρακτηριστικό σήμα των πρωτονίων της μεθυλομάδας  $-\text{CH}_2-\text{NH}_2$  στα 3.10ppm του οποίου η ένταση είναι αρκετά μικρή λόγω της χαμηλής περιεκτικότητας των λιποπρωτεϊνών σε φωσφατιδυλοαιθανολαμίνη.

**Τριγλυκερίδια:** Τα πρωτόνια του ανθρακικού σκελετού της γλυκερόλης εμφανίζονται με τρία διαφορετικά σήματα στην περιοχή 4.16-5.22ppm. Τα σήματα συντονισμού των πρωτονίων υψηλής και χαμηλής έντασης εφαρμοζόμενου μαγνητικού πεδίου (up-down field protons) των ατόμων του άνθρακα 1 και 3 της γλυκερόλης εμφανίζονται στα 4.16 και 4.32ppm αντίστοιχα, ενώ του πρωτονίου του άνθρακα 2 στα 5.22ppm (Πίνακας 1.8-1 και Εικόνα 1.8-1). Ο ποσοτικός προσδιορισμός των τριγλυκεριδίων πραγματοποιήθηκε από το πιο ευδιάκριτο σήμα των πρωτονίων του άνθρακα 1 ( $\text{C}_1\text{H}^d$ ) και 3 ( $\text{C}_3\text{H}^d$ ) στα 4.32 ppm.

**Λιπαρά οξέα:** Τα μεθυλο- και μεθυλενο- πρωτόνια ( $\omega\text{-CH}_3$  και  $(\text{CH}_2)_n$ ) εμφανίζονται συνολικά στις θέσεις 0.88 και 1.30ppm. Τα  $\alpha$ - και  $\beta$ - πρωτόνια ( $-\text{CH}_2\text{-COOH}$  και  $-\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-COOH}$ ) ως προς την καρβοξυλομάδα συντονίζονται στις περιοχές 2.30 και 1.59ppm αντίστοιχα. Τα ακόρεστα λιπαρά οξέα ανιχνεύονται από το σήμα των αλλυλικών πρωτονίων στα 2.04ppm ( $-\text{CH-CH=}$ ), των διαλλυλικών στα 2.80ppm ( $(\text{CH=CH-CH}_2\text{-CH=CH})_n, n>1$ ) και των ολεφινικών ( $-\text{CH=CH-}$ ) στα 5.36ppm. Από τα επιμέρους ακόρεστα λιπαρά οξέα στο φάσμα NMR μπορούμε να διακρίνουμε το λινελαϊκό οξύ (linoleic acid, 18:2  $\Delta^{9,12}$ ) στα 2.75ppm, το εικοσιδυενοϊκό (docosahexaenoic acid, DHA) στα 2.38ppm και το άθροισμα αραχιδονικού και εικοσιπεντενοϊκού (arachidonic and eicosapentaenoic acid, ARA + EPA) στα 1.65ppm.

Ο ποσοτικός προσδιορισμός των λιπιδίων και της % σύστασής τους πραγματοποιήθηκε ως εξής: αρχικά υπολογίστηκαν οι τιμές των ολοκληρωμάτων των σημάτων συντονισμού που αντιστοιχούν στην χοληστερόλη, ελεύθερη και εστεροποιημένη, τα φωσφολιπίδια, φωσφατιδυλοχολίνη και σφιγγομυελίνη, τα τριγλυκερίδια και τα λιπαρά οξέα. Οι τιμές των ολοκληρωμάτων αυτών που υπολογίστηκαν ανάγονται με βάση την τιμή του ολοκληρώματος της χοληστερόλης, λαμβάνοντας υπόψη τον αριθμό των πρωτονίων κάθε σήματος συντονισμού. Για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης των λιπιδίων πολλαπλασιάζουμε τις τιμές των ολοκληρωμάτων που έχουν αναχθεί, όπως προαναφέρθηκε, με την τιμή της HDL-χοληστερόλης, η οποία προσδιορίστηκε με την ενζυματική μέθοδο.





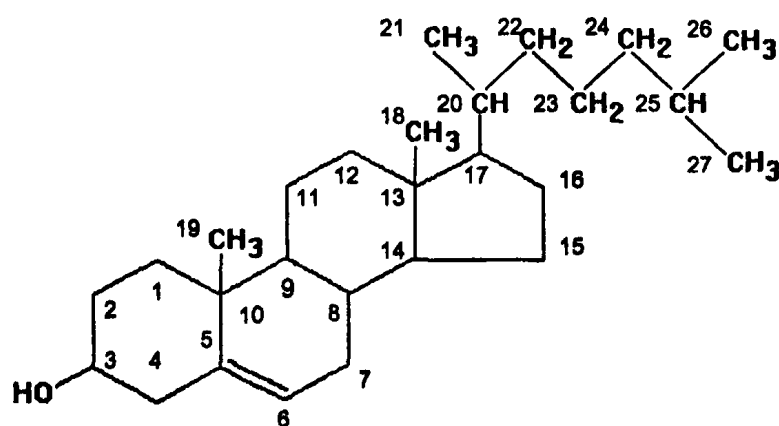
Εικόνα 1.8-1: Φάσμα  $^1\text{H}$ -NMR εκχυλίσματος των ολικών λιπιδίων των HDL λιποπρωτεϊνών : Χοληστερόλη: [1:  $\text{C}_{18}\text{H}_3$  (0.68ppm), 3:  $\text{C}_{26}\text{H}_3$ ,  $\text{C}_{27}\text{H}_3$ ,  $\text{C}_{21}\text{H}_3$  (0.87ppm), 4:  $\text{C}_{19}\text{H}_3$  (1.00ppm), 15:  $\text{C}_3\text{H}$  (3.40ppm), 22:  $\text{C}_6\text{H}$  (5.36ppm)], Τριγλυκερίδια: [17:  $\text{C}_1\text{H}^r$  και  $\text{C}_3\text{H}^r$  (4.16ppm), 19:  $\text{C}_1\text{H}^d$  και  $\text{C}_3\text{H}^d$  (4.32ppm), 20:  $\text{C}_2\text{H}$  της γλυκερόλης (5.22ppm)], Φωσφολιπίδια: [14:  $\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$  της PC και M (3.20ppm), 16:  $\text{CH}_2\text{-N}^+(\text{CH}_3)_3$  της PC και SM (3.59ppm), 18:  $-\text{O-CH}_2\text{-CH}_2\text{-N}^+(\text{CH}_3)_3$  της PC και SM (4.24ppm), 13:  $\text{CH}_2\text{-NH}_2$  της PE (3.10ppm)], Λιπαρά οξέα: [2:  $\omega\text{-CH}_3$  (0.88ppm), 5:  $\text{CH}_2$  (1.30ppm), 6:  $\text{CO-CH}_2\text{-CH}_2$  (1.59ppm), 7:  $\beta\text{-CH}_2$  του ARA και EPA (1.67ppm), 8:  $\text{CH-CH=}$  (2.04ppm), 9:  $-\text{CO-CH}_2$  (2.30ppm), 10:  $\alpha$  και  $\beta$   $\text{CH}_2$  του DHA (2.38ppm), 11:  $-\text{CH=CH-CH}_2\text{-H=CH-}$  του λινελαϊκού οξέος (2.75ppm), 12:  $(\text{CH=CH-CH}_2\text{-CH=CH})_n$ ,  $n>1$  (2.80ppm), 21:  $\text{CH=CH}$  (5.36ppm)].

Πίνακας 1.8-1.  $^1\text{H}$  NMR χημικές μετατοπίσεις των λιπιδίων των λιποπρωτεϊνών

| Λιπίδια       | Αριθμός* | Ερμηνεία                                                                          | Χημική μετατόπιση (ppm) |
|---------------|----------|-----------------------------------------------------------------------------------|-------------------------|
| Χοληστερόλη   | 1        | $\text{C}_{18}\text{H}_3$                                                         | 0.68                    |
|               | 3        | $\text{C}_{26}\text{H}_3$ , $\text{C}_{27}\text{H}_3$ , $\text{C}_{21}\text{H}_3$ | 0.87                    |
|               | 4        | $\text{C}_{10}\text{H}_3$                                                         | 1.00                    |
|               | 15       | $\text{C}_3\text{H}$                                                              | 3.40                    |
|               | 22       | $\text{C}_6\text{H}$                                                              | 5.36                    |
| Τριγλυκερίδια | 17       | $\text{C}_1\text{H}^u$ και $\text{C}_3\text{H}^u$ της γλυκερόλης                  | 4.16                    |
|               | 19       | $\text{C}_1\text{H}^d$ και $\text{C}_3\text{H}^d$ της γλυκερόλης                  | 4.32                    |
|               | 20       | $\text{C}_2\text{H}$ της γλυκερόλης                                               | 5.22                    |
| Φωσφολιπίδια  | 14       | $\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$ της PC & SM                                           | 3.20                    |
|               | 16       | $\text{CH}_2\text{-N}^+(\text{CH}_3)_3$ της PC+SM                                 | 3.59                    |
|               | 18       | $\text{-O-CH}_2\text{-CH}_2\text{-N}^+(\text{CH}_3)_3$ της PC+SM                  | 4.24                    |
|               | 13       | $\text{CH}_2\text{-NH}_2$ της PE                                                  | 3.10                    |
| Λιπαρά οξέα   | 2        | $\omega\text{-CH}_3$                                                              | 0.88                    |
|               | 5        | $(\text{CH}_2)_n$                                                                 | 1.30                    |
|               | 6        | $\text{CO-CH}_2\text{-CH}_2$                                                      | 1.59                    |
|               | 7        | $\beta\text{-CH}_2$ of ARA+EPA                                                    | 1.67                    |
|               | 8        | $\text{CH-CH=}$                                                                   | 2.04                    |
|               | 9        | $\text{-CO-CH}_2$                                                                 | 2.30                    |
|               | 10       | $\alpha$ και $\beta$ $\text{CH}_2$ του DHA                                        | 2.38                    |
|               | 11       | $\text{-CH=CH-CH}_2\text{-CH=CH-}$ του λινελαϊκού οξέος                           | 2.75                    |
|               | 12       | $(\text{CH=CH-CH}_2\text{-CH=CH})_n$ , $n>1$                                      | 2.80                    |
|               | 21       | $\text{CH=CH}$                                                                    | 5.36                    |

\*: αριθμός στο φάσμα της Εικόνας 1.8-1.

u, up-field, d, down-field, ARA: αραχιδονικό οξύ, DHA: εικοσιδυενοϊκό οξύ, EPA: εικοσιπεντενοϊκό οξύ, PC: φωσφατιδυλοχολίνη, PE: φωσφατιδυλοαιθανολαμίνη, SM: σφιγγομυελίνη



Εικόνα 1.8-2: Μόριο της χοληστερόλης

### Υπολογισμοί:

1. Ο βαθμός ακορεστότητας των λιπαρών οξέων υπολογίζεται από τον λόγο της τιμής του ολοκληρώματος του σήματος συντονισμού των ολεφινικών πρωτονίων προς το αντίστοιχο των πρωτονίων των α-μεθυλενίων, δηλαδή βαθμός ακορεστότητας ανά μονάδα λιπαρού οξέος

$$\frac{[-\text{CH}=\text{CH}-]}{[-\text{CH}_2-\text{COOH}]}$$

2. Το μέσο μήκος της αλυσίδας των λιπαρών οξέων υπολογίζεται από το άθροισμα των τιμών των ολοκληρωμάτων των σημάτων συντονισμού των α- και β- μεθυλενίων, ολεφινικών και αλλυλικών πρωτονίων και των πρωτονίων των μεθυλενο και μεθυλομάδων προς την τιμή του ολοκληρώματος του σήματος των α-μεθυλενίων

$$\frac{[-\text{CH}_2-\text{COOH}] + [-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{COOH}] + [-\text{CH}=\text{CH}-] + [-\text{CH}-\text{CH}=] + [-\text{CH}=\text{CH}-(\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH})_n] + [-(\text{CH}_2)_n] + [-\text{CH}_3]}{[-\text{CH}_2-\text{COOH}]}$$

### 3. Προσδιορισμός της % σύστασης των λιπιδίων

Για τον προσδιορισμό της % σύστασης των λιπιδίων θεωρήθηκε ως ολική σύσταση των σωματιδίων σε λιπίδια το άθροισμα της ελεύθερης και εστεροποιημένης χοληστερόλης, φωσφατιδυλοχολίνης, σφιγγομυελίνης και των τριγλυκεριδίων. Συνεπώς,

$$\% \text{ Ελεύθερη χοληστερόλη} = \frac{100 \times \text{Ελεύθερη χοληστερόλη}}{\text{Ολική σύσταση των λιπιδίων}}$$

$$\% \text{ Εστεροποιημένη χοληστερόλη} = \frac{100 \times \text{Εστεροποιημένη χοληστερόλη}}{\text{Ολική σύσταση των λιπιδίων}}$$

$$\% \text{ Σφιγγομυελίνη} = \frac{100 \times \text{Σφιγγομυελίνη}}{\text{Ολική σύσταση των λιπιδίων}}$$

$$\% \text{ Τριγλυκερίδια} = \frac{100 \times \text{Τριγλυκερίδια}}{\text{Ολική σύσταση των λιπιδίων}}$$

Η % σύσταση των λιπαρών οξέων σε ακόρεστα λιπαρά οξέα υπολογίστηκε με βάση τη σχέση

$$\% \text{ Ακόρεστα λιπαρά οξέα} = \frac{100 \times \text{Ολεφινικά πρωτόνια}}{\alpha\text{-μεθυλένια}}$$

ενώ η % σύσταση σε κορεσμένα λιπαρά οξέα

$$\% \text{ Κορεσμένα λιπαρά οξέα} = 100 - \% \text{ Ακόρεστα λιπαρά οξέα}$$

Η % σύσταση των επιμέρους πολυακόρεστων λιπαρών οξέων υπολογίζεται ως εξής:

$$\% \text{ Λινελαϊκό οξύ} = \frac{100 \times \text{Λινελαϊκό οξύ}}{\alpha\text{-μεθυλένια}}$$

$$\% \text{ Εικοσιδυενοϊκό οξύ} = \frac{100 \times \text{Εικοσιδυενοϊκό οξύ}}{\alpha\text{-μεθυλένια}}$$

$$\% \text{ Αραχιδονικό και εικοσιπεντενοϊκό οξύ} = \frac{100 \times (\text{Αραχιδονικό και εικοσιπεντενοϊκό})}{\alpha\text{-μεθυλένια}}$$

Τέλος, υπολογίστηκε η % περιεκτικότητα των σωματιδίων σε λιπίδια του πυρήνα ως το άθροισμα της % περιεκτικότητας σε εστεροποιημένη χοληστερόλη και τριγλυκερίδια και η % περιεκτικότητα σε λιπίδια της εξωτερικής στιβάδας ως το άθροισμα της % περιεκτικότητας σε φωσφολιπίδια και ελεύθερη χοληστερόλη.

Για να ελεγχθεί η επαναληψιμότητα της μεθόδου, πραγματοποιήθηκαν ξεχωριστά 3 εκχυλίσες των λιπιδίων των HDL και nonHDL λιποπρωτεϊνών δυο διαφορετικών δειγμάτων ορού. Η επαναληψιμότητα της μεθόδου κυμαίνεται αναλυτικά για κάθε συστατικό των σωματιδίων:

Χοληστερόλη, ελεύθερη και εστεροποιημένη: 99.17-99.83%

Τριγλυκερίδια: 93.88-95.83%

Ολικά Φωσφολιπίδια: 92.69-99.45%

Φωσφατιδυλοχολίνη: 94.83-95.51%

Σφιγγομυελίνη: 99.28-99.13%

Λιπαρά οξέα: 95.21-99.38%



### 1.8.2. Επίδραση των λιπιδαιμικών παραμέτρων του ορού στη σύσταση των HDL λιποπρωτεϊνών

Για τη μελέτη αυτή επιλέχθηκαν 105 άτομα, τα επίπεδα λιπιδίων των οποίων, κάλυπταν ένα ευρύ φάσμα φυσιολογικών και παθολογικών τιμών. Οι λιπιδαιμικές παράμετροι του ορού του πληθυσμού της μελέτης παρουσιάζονται στον Πίνακα 1.8-2. Τα επίπεδα της ολικής χοληστερόλης κυμαίνονται από 121 έως 558 mg/dL, των τριγλυκερίδιων 36-246 mg/dL, της HDL-C 28-113 mg/dL, της LDL-C 56-434 mg/dL και της nonHDL-C 65-446 mg/dL. Επίσης, αναγράφονται οι συγκεντρώσεις των απολιποπρωτεϊνών AI και B και οι λόγοι HDL-C/apoAI, LDL-C/apoB και nonHDL-C/apoB.

Πίνακας 1.8-2. Λιπιδαιμικές παράμετροι του ορού του πληθυσμού της μελέτης

|                            | mean $\pm$ S.D.  | Εύρος       |
|----------------------------|------------------|-------------|
| Αριθμός                    | 105              |             |
| Ηλικία                     | 57.2 $\pm$ 8.1   | 41 - 74     |
| Φύλο, Α/Γ                  | 51/54            |             |
| Όλική χοληστερόλη (mg/dL)  | 254.4 $\pm$ 72.4 | 121 - 558   |
| Τριγλυκερίδια (mg/dL)      | 126.9 $\pm$ 58.5 | 36 - 246    |
| HDL-χοληστερόλη (mg/dL)    | 58 $\pm$ 15.6    | 28 - 113    |
| LDL-χοληστερόλη (mg/dL)    | 170.8 $\pm$ 60.8 | 56 - 434    |
| nonHDL-χοληστερόλη (mg/dL) | 196.8 $\pm$ 63.6 | 65 - 446    |
| apoAI (mg/dL)              | 133.4 $\pm$ 30.4 | 34.2 - 188  |
| apoB (mg/dL)               | 104.3 $\pm$ 30.9 | 38.7 - 176  |
| LDL-C /apoB                | 3.93 $\pm$ 0.62  | 2.74 - 5.77 |
| HDL-C/apoAI                | 1.06 $\pm$ 0.26  | 0.72 - 2.04 |
| nonHDL-C/apoB              | 4.58 $\pm$ 0.67  | 3.39 - 6.28 |

Mean: Μέση τιμή, S.D.: Τυπική απόκλιση

Στον Πίνακα 1.8-3 αναφέρονται τα κύρια χαρακτηριστικά της % λιπιδιακής σύστασης των HDL σωματιδίων του πληθυσμού της μελέτης: η χοληστερόλη (ολική, ελεύθερη και εστεροποιημένη), τα τριγλυκερίδια και τα φωσφολιπίδια (ολικά, φωσφατιδυλοχολίνη και σφιγγομυελίνη). Επιπρόσθετα, έχει υπολογιστεί η % περιεκτικότητα των ουδετέρων λιπιδίων του πυρήνα των σωματιδίων ως το άθροισμα των τριγλυκερίδιων και της εστεροποιημένης χοληστερόλης, των λιπιδίων της εξωτερικής στιβάδας ως το άθροισμα της ελεύθερης χοληστερόλης και των φωσφολιπιδίων, καθώς επίσης και οι λόγοι της εστεροποιημένης χοληστερόλης προς τα τριγλυκερίδια (CE/TG), της ελεύθερης χοληστερόλης προς τα φωσφολιπίδια (FC/PL) και της φωσφατιδυλοχολίνης προς την σφιγγομυελίνη (PC/SM).

Η % περιεκτικότητα των HDL σωματιδίων σε ολική χοληστερόλη κυμαίνεται από 31.3 έως 54.5%, εστεροποιημένη 18.7-44.8, ελεύθερη 4.1-13.8, τριγλυκερίδια 1.4-28.3, ολικά φωσφολιπίδια 37.8-55.2, φωσφατιδυλοχολίνη 31.5-46.8 και σε σφιγγομυελίνη 3.8-12.6%. Οι διακυμάνσεις αυτές αντικατοπτρίζουν την ισχυρή επίδραση του λιπιδαιμικού προφίλ στην σύσταση των HDL σωματιδίων όπως αυτή περιγράφεται από την αναλογία του πυρήνα και της επιφανειακής στιβάδας και τους λόγους CE/TG, FC/PL και PC/SM.

**Πίνακας 1.8-3. % Σύσταση των HDL σωματιδίων του πληθυσμού της μελέτης**

| Moles/100 moles των ολικών λιπιδίων              | mean $\pm$ S.D. | Εύρος       |
|--------------------------------------------------|-----------------|-------------|
| Χοληστερόλη, % ολική(TC)                         | 44.6 $\pm$ 4.4  | 31.3 - 54.5 |
| % ελεύθερη (FC)                                  | 9.7 $\pm$ 1.8   | 4.1 - 13.8  |
| % εστεροποιημένη(CE)                             | 34.9 $\pm$ 4.4  | 18.7 - 44.8 |
| %Τριγλυκερίδια (TG)                              | 9.1 $\pm$ 4.5   | 1.4 - 28.3  |
| Φωσφολιπίδια, % ολικά (PL)                       | 46.3 $\pm$ 3.2  | 37.8 - 55.2 |
| % φωσφατιδυλοχολίνη (PC)                         | 38.4 $\pm$ 2.9  | 31.5 - 46.8 |
| % σφιγγομυελίνη (SM)                             | 7.9 $\pm$ 1.3   | 3.8 - 12.6  |
| % Λιπίδια του πυρήνα                             | 44.0 $\pm$ 3.8  | 33.1 - 52.6 |
| % Λιπίδια της επιφάνειας                         | 56.0 $\pm$ 3.8  | 47.4 - 66.9 |
| Λιπίδια επιφάνειας/πυρήνα                        | 1.3 $\pm$ 0.2   | 0.9 - 2.0   |
| Εστεροποιημένη χοληστερόλη/τριγλυκερίδια (CE/TG) | 5.3 $\pm$ 4.0   | 0.8 - 29.0  |
| Ελεύθερη χοληστερόλη/φωσφολιπίδια (FC/PL)        | 0.2 $\pm$ 0.0   | 0.1 - 0.3   |
| Φωσφατιδυλοχολίνη/σφιγγομυελίνη (PC/SM)          | 5.0 $\pm$ 1.0   | 2.6 - 9.1   |

Στη συνέχεια διερευνήθηκε η συσχέτιση μεταξύ των λιπιδαιμικών παραμέτρων του ορού και της σύστασης των HDL σωματιδίων και κατά συνέπεια της συνολικής τους δομής. Τα αποτελέσματα της συσχέτισης αυτής παρουσιάζονται στον Πίνακα 1.8-4.

Τα επίπεδα της ολικής χοληστερόλης δεν φαίνεται να έχουν κάποια αξιοσημείωτη επίδραση στη σύσταση των HDL σωματιδίων σε αντίθεση με τα επίπεδα των τριγλυκεριδίων τα οποία είχαν ισχυρή επίδραση. Η % περιεκτικότητα των σωματιδίων σε τριγλυκερίδια αυξάνεται καθώς αυξάνονται τα επίπεδα των τριγλυκεριδίων του ορού ( $r=0.52$ ,  $p<0.001$ ), ενώ η % περιεκτικότητα σε χοληστερόλη κυρίως εστεροποιημένη και σε σφιγγομυελίνη μειώνεται ( $r=-0.41$ ,  $p<0.001$  και  $r=-0.28$ ,  $p=0.003$ , αντίστοιχα). Οι αλλαγές αυτές επηρέασαν κυρίως τους λόγους της εστεροποιημένης χοληστερόλης προς τα τριγλυκερίδια και της φωσφατιδυλοχολίνης προς την σφιγγομυελίνη (Πίνακας 1.8-4).

Τα επίπεδα της HDL-C του ορού είχαν αντίθετη επίδραση από αυτή των τριγλυκεριδίων στη σύσταση των HDL σωματιδίων, καθώς παρουσίασαν θετική συσχέτιση με την % περιεκτικότητα σε ελεύθερη και εστεροποιημένη χοληστερόλη ( $r=0.33$ ,  $p<0.001$  και

$r=0.41$ ,  $p<0.001$ , αντίστοιχα) και αρνητική με την % περιεκτικότητα σε τριγλυκερίδια ( $r=-0.41$ ,  $p<0.001$ ). Οι αλλαγές αυτές επηρέασαν τους λόγους CE/TG και FC/PL.

Ο λόγος HDL-C/apoA1 είχε παρόμοια επίδραση με τα επίπεδα της HDL-C όσον αφορά την % περιεκτικότητα των σωματιδίων σε χοληστερόλη (Πίνακας 1.8-4). Αρνητική συσχέτιση παρουσίασε με την % περιεκτικότητα των σωματιδίων σε φωσφολιπίδια ( $r=0.42$ ,  $p<0.001$ ) κυρίως σε φωσφατιδυλοχολίνη.

Τα επίπεδα της ολικής, LDL, nonHDL-C και της apoB δεν είχαν σημαντική επίδραση στη σύσταση των HDL σωματιδίων, ενώ ο λόγος LDL-C/apoB είχε ισχυρή επίδραση, καθώς παρουσίασε θετική συσχέτιση με την % περιεκτικότητα των σωματιδίων σε χοληστερόλη, κυρίως εστεροποιημένη ( $r=0.45$ ,  $p<0.001$ ), ενώ αρνητική με τα φωσφολιπίδια λόγω της μείωσης της % περιεκτικότητας σε φωσφατιδυλοχολίνη ( $r=-0.44$ ,  $p<0.001$ ). Οι αλλαγές αυτές επηρέασαν τον λόγο FC/PL και την κατανομή των λιπιδίων μεταξύ του πυρήνα και της επιφάνειας. Αξίζει επίσης να αναφερθεί, η αρνητική συσχέτιση του λόγου nonHDL-C/apoB με το ποσοστό των φωσφολιπιδίων των HDL σωματιδίων η οποία επηρέασε τους λόγους FC/PL και λιπιδίων της επιφάνειας προς του πυρήνα (Πίνακας 1.8-4).

Στον Πίνακα 1.8-5 φαίνονται τα κύρια δομικά χαρακτηριστικά των λιπαρών οξέων των HDL σωματιδίων, δηλαδή ο βαθμός ακορεστότητας, το μέσο μήκος της αλυσίδας καθώς επίσης και το ποσοστό των κορεσμένων, μονο- και πολυακόρεστων λιπαρών οξέων. Επίσης, υπολογίστηκαν ποσοτικά ορισμένα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα, όπως το λινελαϊκό και εικοσιδυενοϊκό οξύ και το αθροίσμα του εικοσιπεντενοϊκού και αραχιδονικού οξέος.

Στον Πίνακα 1.8-6 φαίνονται οι συσχετίσεις μεταξύ των λιπιδαιμικών παραμέτρων του ορού και της σύστασης των HDL σωματιδίων σε λιπαρά οξέα. Οι λιπιδαιμικές παράμετροι του ορού δεν είχαν σημαντική επίδραση στον βαθμό ακορεστότητας των λιπαρών οξέων, ενώ οι λόγοι HDL-C/apoA1, LDL-C/apoB και nonHDL-C/apoB παρουσίασαν αρνητική συσχέτιση ( $r=-0.31$ ,  $p<0.05$ ,  $r=-0.38$ ,  $p<0.01$  και  $r=-0.30$ ,  $p<0.05$  αντίστοιχα). Το μέσο μήκος της αλυσίδας των λιπαρών οξέων, καθώς επίσης και η περιεκτικότητα σε κορεσμένα και συνολικά σε ακόρεστα λιπαρά οξέα δεν επηρεάζονται στατιστικά σημαντικά από τις λιπιδαιμικές παραμέτρους του ορού. Το ποσοστό των μονοακόρεστων λιπαρών οξέων παρουσίασε αρνητική συσχέτιση με την LDL-C ( $r=-0.21$ ,  $p<0.05$ ) και τους λόγους LDL-C/apoB ( $r=-0.47$ ,  $p<0.001$ ) και nonHDL-C/apoB ( $r=-0.34$ ,  $p<0.05$ ). Το λινελαϊκό οξύ παρουσίασε μια ισχυρά αρνητική συσχέτιση με τα επίπεδα των τριγλυκεριδίων ( $r=-0.41$ ,  $p<0.001$ ) και θετική με την HDL-C ( $r=0.25$ ,  $p<0.05$ ). Τέλος, το σύνολο του αραχιδονικού και εικοσιπεντενοϊκού οξέος επηρεάστηκε σε μικρό βαθμό από την ολική, LDL- και nonHDL-χοληστερόλη.

Πίνακας 1.8-4. Συσχετίσεις μεταξύ των λιπιδαιμικών παραμέτρων του ορού και της σύστασης των HDL σωματιδίων

|                         | % Χοληστερόλη   |                |                 | % Τριγλυκερίδια | % Φωσφολιπίδια  |                 |                 | FC/PL          | Λιπίδια επιφάνειας/πυρήνα | PC/SM          |
|-------------------------|-----------------|----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|----------------|---------------------------|----------------|
|                         | Ολική           | FC             | CE              |                 | Ολικά           | PC              | SM              |                |                           |                |
| Ολική χοληστερόλη       | 0.19*<br>0.05   | 0.10<br>NS     | 0.14<br>NS      | -0.08<br>NS     | -0.19<br>NS     | -0.13<br>NS     | -0.13<br>NS     | 0.16<br>0.04   | -0.08<br>NS               | 0.05<br>NS     |
| Τριγλυκερίδια           | -0.49*<br>0.001 | -0.23<br>0.02  | -0.41*<br>0.001 | 0.52*<br>0.001  | -0.02<br>NS     | 0.10<br>NS      | -0.28*<br>0.003 | -0.19<br>0.05  | -0.11<br>NS               | 0.31*<br>0.001 |
| HDL-χοληστερόλη         | 0.55*<br>0.001  | 0.33*<br>0.001 | 0.41*<br>0.001  | -0.41*<br>0.001 | -0.21<br>0.03   | -0.22<br>0.02   | 0.04<br>NS      | 0.39*<br>0.001 | 0.00<br>NS                | -0.12<br>NS    |
| apoA1                   | 0.27<br>0.05    | 0.38<br>0.05   | 0.09<br>NS      | -0.38<br>0.005  | 0.14<br>NS      | 0.11<br>NS      | 0.07<br>NS      | 0.28<br>0.02   | 0.26<br>NS                | 0.02<br>NS     |
| HDL-χοληστερόλη/apoA1   | 0.47*<br>0.001  | 0.02<br>NS     | 0.52*<br>0.001  | -0.13<br>NS     | -0.42*<br>0.001 | -0.32<br>0.02   | -0.24<br>NS     | 0.12<br>NS     | -0.35<br>0.01             | 0.12<br>NS     |
| LDL-χοληστερόλη         | 0.20<br>0.05    | 0.07<br>NS     | 0.17<br>NS      | -0.11<br>NS     | -0.17<br>NS     | -0.12<br>NS     | -0.10<br>NS     | 0.13<br>NS     | -0.07<br>NS               | 0.17<br>NS     |
| nonHDL-χοληστερόλη      | 0.09<br>NS      | 0.05<br>NS     | 0.07<br>NS      | -0.01<br>NS     | -0.17<br>NS     | -0.10<br>NS     | -0.14<br>NS     | 0.11<br>NS     | -0.08<br>NS               | 0.06<br>NS     |
| apoB                    | 0.03<br>NS      | -0.22<br>NS    | 0.12<br>NS      | -0.02<br>NS     | -0.01<br>NS     | 0.14<br>NS      | -0.22<br>NS     | -0.26<br>NS    | -0.08<br>NS               | 0.23<br>NS     |
| LDL-χοληστερόλη/apoB    | 0.45*<br>0.001  | 0.03<br>NS     | 0.45*<br>0.001  | -0.13<br>NS     | -0.48*<br>0.001 | -0.44*<br>0.001 | -0.17<br>NS     | 0.26<br>0.01   | -0.34<br>0.01             | -0.03<br>NS    |
| nonHDL-χοληστερόλη/apoB | 0.23<br>NS      | 0.00<br>NS     | 0.24<br>NS      | 0.08<br>NS      | -0.47*<br>0.001 | -0.42*<br>0.001 | -0.19<br>NS     | 0.14<br>0.01   | -0.35<br>0.01             | 0.05<br>NS     |

\*: R

P

\*: Στατιστική σημαντικότητα μετά τη διόρθωση Bonferroni για πολλαπλά tests

PC: Φωσφατιδυλοχολίνη, SM: Σφίγγομυελίνη, TG: Τριγλυκερίδια, CE: Εστεροποιημένη Χοληστερόλη, FC: Ελεύθερη Χοληστερόλη, PL: Φωσφολιπίδια

**Πίνακας 1.8-5: Κύρια δομικά χαρακτηριστικά των λιπαρών οξέων των HDL σωματιδίων**

|                             |                     | mean $\pm$ S.D. | Εύρος       |
|-----------------------------|---------------------|-----------------|-------------|
| <b>Βαθμός ακορεστότητας</b> |                     | 1.3 $\pm$ 0.11  | 0.8 - 1.5   |
| <b>Μέσο μήκος αλυσίδας</b>  |                     | 17.9 $\pm$ 1.38 | 15.7 - 22.1 |
| <b>% SFA*</b>               |                     | 25.6 $\pm$ 5.06 | 7.4 - 38.0  |
| <b>% UFA*</b>               |                     | 74.4 $\pm$ 5.06 | 62.0 - 92.6 |
| <b>% MUFA*</b>              |                     | 34.0 $\pm$ 7.38 | 11.5 - 52.7 |
| <b>% PUFA</b>               | <b>Ολικά</b>        | 40.4 $\pm$ 5.63 | 24.4 - 55.0 |
|                             | <b>Λινελαϊκό</b>    | 22.8 $\pm$ 3.86 | 12.0 - 33.7 |
|                             | <b>(EPA + ARA)*</b> | 14.4 $\pm$ 4.90 | 4.9 - 26.7  |
|                             | <b>DHA*</b>         | 3.2 $\pm$ 1.14  | 1.0 - 6.1   |

\*SFA: Κορεσμένα λιπαρά οξέα, UFA: Ακόρεστα λιπαρά οξέα, MUFA: Μονοακόρεστα λιπαρά οξέα, EPA: εικοσιπεντενοϊκό οξύ, ARA: Αραχιδονικό οξύ, DHA: εικοσιδυενοϊκό οξύ

Πίνακας 1.8-6: Συσχετίσεις μεταξύ των λιπιδαιμικών παραμέτρων του ορού και της σύστασης των λιπαρών οξέων των HDL σωματιδίων

|                   | Βαθμός<br>απορεστότητας | Μέσο μήκος<br>αλυσίδας | % SFA        | % UFA         | % MUFA          | % PUFA       |                 |              |             |
|-------------------|-------------------------|------------------------|--------------|---------------|-----------------|--------------|-----------------|--------------|-------------|
|                   |                         |                        |              |               |                 | Ολικά        | Λινελαϊκό       | EPA +ARA     | DHA         |
| Ολική Χοληστερόλη | -0.19*<br>NS            | -0.01<br>NS            | 0.02<br>NS   | -0.02<br>NS   | -0.19<br>0.05   | 0.16<br>NS   | -0.05<br>NS     | 0.22<br>0.03 | 0.15<br>NS  |
| Τριγλυκερίδια     | -0.06<br>NS             | 0.02<br>NS             | 0.13<br>NS   | -0.13<br>NS   | 0.07<br>NS      | -0.14<br>NS  | -0.41*<br>0.001 | 0.09<br>NS   | 0.10<br>NS  |
| HDL-C             | -0.18<br>NS             | -0.08<br>NS            | 0.03<br>NS   | -0.03<br>NS   | -0.18<br>NS     | 0.15<br>NS   | 0.25<br>0.01    | 0.04<br>NS   | 0.03<br>NS  |
| apoA1             | -0.01<br>NS             | -0.06<br>NS            | 0.03<br>NS   | -0.03<br>NS   | -0.06<br>NS     | 0.05<br>NS   | 0.25<br>NS      | -0.03<br>NS  | -0.18<br>NS |
| HDL-C/apoA1       | -0.31<br>0.03           | -0.18<br>NS            | 0.04<br>NS   | -0.04<br>NS   | -0.18<br>NS     | 0.14<br>NS   | 0.19<br>NS      | -0.03<br>NS  | -0.03<br>NS |
| LDL-C             | -0.17<br>NS             | 0.03<br>NS             | 0.00<br>NS   | -0.00<br>NS   | -0.21<br>0.03   | 0.19<br>0.05 | -0.02<br>NS     | 0.24<br>0.02 | 0.17<br>NS  |
| nonHDL-C          | -0.18<br>NS             | 0.04<br>NS             | 0.01<br>NS   | -0.01<br>NS   | -0.17<br>NS     | 0.14<br>NS   | -0.09<br>NS     | 0.23<br>0.02 | 0.17<br>NS  |
| apoB              | -0.06<br>NS             | 0.08<br>NS             | -0.02<br>NS  | 0.02<br>NS    | -0.11<br>NS     | 0.14<br>NS   | -0.14<br>NS     | 0.26<br>NS   | 0.16<br>NS  |
| LDL-C/apoB        | -0.38*<br>0.003         | -0.28<br>0.04          | 0.28<br>0.04 | -0.28<br>0.04 | -0.47*<br>0.001 | 0.31<br>0.03 | 0.20<br>NS      | 0.17<br>NS   | 0.18<br>NS  |
| nonHDL-C/apoB     | -0.30<br>0.03           | -0.21<br>NS            | 0.26<br>NS   | -0.26<br>NS   | -0.34<br>0.01   | 0.17<br>NS   | 0.00<br>NS      | 0.19<br>NS   | 0.19<br>NS  |



### 1.8.3. Μελέτη της σύστασης των HDL και nonHDL λιποπρωτεϊνών ασθενών με δυσλιπιδαιμία

Τα άτομα της προηγούμενης μελέτης χωρίστηκαν σε 3 ομάδες με βάση τα επίπεδα των λιπιδίων: άτομα με φυσιολογικά επίπεδα λιπιδίων (επίπεδα χοληστερόλης  $<200\text{mg/dL}$  και τριγλυκεριδίων  $<150\text{mg/dL}$ ), υπερχοληστερολαιμία (επίπεδα χοληστερόλης  $>200\text{mg/dL}$  και τριγλυκεριδίων  $<150\text{mg/dL}$ ) και μικτή υπερλιπιδαιμία (επίπεδα χοληστερόλης  $>200\text{mg/dL}$  και τριγλυκεριδίων  $>150\text{mg/dL}$ ).

Τα βιοχημικά χαρακτηριστικά των ομάδων της μελέτης φαίνονται στον Πίνακα 1.8-7. Οι ασθενείς με υπερχοληστερολαιμία παρουσίασαν υψηλότερα επίπεδα ολικής, HDL, LDL και nonHDL-χοληστερόλης, τριγλυκεριδίων, απολιποπρωτεΐνης B, καθώς επίσης και των λόγων LDL-C/αποB, HDL-C/αποAI και nonHDL-C/αποB σε σύγκριση με τα άτομα με φυσιολογικά επίπεδα λιπιδίων. Οι ασθενείς με μικτή υπερλιπιδαιμία παρουσίασαν υψηλότερα επίπεδα ολικής, HDL- και nonHDL-χοληστερόλης, τριγλυκεριδίων, αποB και HDL-C/αποAI ενώ χαμηλότερα επίπεδα αποAI σε σχέση με τα άτομα με φυσιολογικά επίπεδα λιπιδίων (Πίνακα 1.8-7).

Στις τρεις ομάδες υπολογίστηκε η % σύσταση των λιπιδίων και των λιπαρών οξέων των HDL και nonHDL σωματιδίων (Πίνακες 1.8-8 και 1.8-9). Οι ασθενείς με υπερχοληστερολαιμία δεν παρουσίασαν στατιστικά σημαντικές αλλαγές όσον αφορά την % σύσταση των λιπιδίων και των λιπαρών οξέων των HDL σωματιδίων σε σύγκριση με τα άτομα με φυσιολογικά επίπεδα λιπιδίων, παρά μόνο στατιστικά σημαντικά υψηλότερη % περιεκτικότητα σε ελεύθερη χοληστερόλη και υψηλότερο λόγο FC/PL (Πίνακας 1.8-8α και 1.8-8β). Οι ασθενείς με υπερχοληστερολαιμία παρουσίασαν στατιστικά σημαντικά υψηλότερη % περιεκτικότητα των nonHDL σωματιδίων σε ολική, ελεύθερη και εστεροποιημένη χοληστερόλη, ολικά φωσφολιπίδια, φωσφατιδυλοχολίνη και σφιγγομυελίνη και χαμηλότερη % περιεκτικότητα των τριγλυκεριδίων σε σχέση με τα άτομα με φυσιολογικά επίπεδα λιπιδίων. Οι αλλαγές αυτές επηρέασαν την % περιεκτικότητα των nonHDL σωματιδίων σε λιπίδια του πυρήνα και της επιφάνειας και τον λόγο CE/TG (Πίνακας 1.8-9α). Δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές αλλαγές όσον αφορά την % σύσταση των λιπαρών οξέων των nonHDL σωματιδίων των ασθενών με υπερχοληστερολαιμία σε σύγκριση με τα άτομα με φυσιολογικά επίπεδα λιπιδίων (Πίνακας 1.8-9β).

Οι ασθενείς με μικτή υπερλιπιδαιμία παρουσίασαν στατιστικά σημαντικά χαμηλότερη περιεκτικότητα των HDL σωματιδίων σε ολική χοληστερόλη, κυρίως λόγω της χαμηλότερης περιεκτικότητας σε εστεροποιημένη χοληστερόλη καθώς επίσης και υψηλότερη περιεκτικότητα σε τριγλυκερίδια σε σχέση με τα άτομα με φυσιολογικά επίπεδα λιπιδίων. Οι αλλαγές αυτές επηρέασαν τον λόγο CE/TG (Πίνακας 1.8-8α). Επίσης, παρουσίασαν στατιστικά σημαντικά χαμηλότερη περιεκτικότητα σε λινελαϊκό οξύ σε σύγκριση με τα άτομα με φυσιολογικά επίπεδα λιπιδίων (Πίνακας 1.8-8β).

Οι ασθενείς με μικτή υπερλιπιδαιμία παρουσίασαν στατιστικά σημαντικά χαμηλότερη περιεκτικότητα των nonHDL σωματιδίων σε ολική, ελεύθερη και εστεροποιημένη χοληστερόλη, ολικά φωσφολιπίδια και σφιγγομυελίνη και υψηλότερη περιεκτικότητα σε τριγλυκερίδια σε σχέση με τα άτομα με φυσιολογικά επίπεδα λιπιδίων (Πίνακας 1.8-9α). Οι αλλαγές αυτές επηρέασαν την % περιεκτικότητα των λιπιδίων του πυρήνα και της επιφάνειας και τους λόγους CE/TG, PC/SM και των λιπιδίων της επιφάνειας προς τα λιπίδια του πυρήνα. Δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές αλλαγές όσον αφορά την % περιεκτικότητα των nonHDL σωματιδίων σε λιπαρά οξέα παρά μόνο μια στατιστικά σημαντικά υψηλότερη περιεκτικότητα σε μονοακόρεστα λιπαρά οξέα και χαμηλότερη σε λινελαϊκό οξύ σε σύγκριση με τα άτομα με φυσιολογικά επίπεδα λιπιδίων (Πίνακας 1.8-9β).

Οι ασθενείς με μικτή υπερλιπιδαιμία παρουσίασαν στατιστικά σημαντικά χαμηλότερη περιεκτικότητα των HDL σωματιδίων σε ολική χοληστερόλη κυρίως λόγω της χαμηλότερης περιεκτικότητας σε εστεροποιημένη, ενώ η περιεκτικότητα σε ελεύθερη χοληστερόλη και τριγλυκερίδια είναι υψηλότερη σε σύγκριση με τους ασθενείς με υπερχοληστερολαιμία. Οι αλλαγές αυτές επηρέασαν τους λόγους CE/TG, FC/PL και PC/SM (Πίνακας 1.8-8α).

Οι ασθενείς με μικτή υπερλιπιδαιμία παρουσίασαν στατιστικά σημαντικά χαμηλότερη περιεκτικότητα των nonHDL σωματιδίων σε ολική, ελεύθερη και εστεροποιημένη χοληστερόλη, ολικά φωσφολιπίδια, κυρίως λόγω της χαμηλότερης περιεκτικότητας σε σφιγγομυελίνη και υψηλότερη περιεκτικότητα σε τριγλυκερίδια σε σύγκριση με τους ασθενείς με υπερχοληστερολαιμία. Οι αλλαγές αυτές επηρέασαν την % περιεκτικότητα σε λιπίδια του πυρήνα και της επιφάνειας και τους λόγους CE/TG και PC/SM (Πίνακας 1.8-9α). Επίσης, οι ασθενείς με μικτή υπερλιπιδαιμία παρουσίασαν σημαντικά υψηλότερη περιεκτικότητα των nonHDL σωματιδίων σε μονοακόρεστα λιπαρά οξέα και χαμηλότερη περιεκτικότητα σε λινελαϊκό οξύ σε σύγκριση με τους ασθενείς με υπερχοληστερολαιμία (Πίνακας 1.8-9β).



**Πίνακας 1.8-7: Λιπιδαιμικός παράμετροι των τριών ομάδων της μελέτης**

|                       | Άτομα με φυσιολογικά επίπεδα λιπιδίων | Ασθενείς με υπερχοληστερολαιμία | Ασθενείς με μικτή υπερλιπιδαιμία |
|-----------------------|---------------------------------------|---------------------------------|----------------------------------|
| Αριθμός               | 44                                    | 31                              | 30                               |
|                       | Mean ± S.D.                           |                                 |                                  |
| Χοληστερόλη (mg/dL)   | 198 ± 33.6                            | 325.2 ± 64***                   | 269.2 ± 47.2***,***              |
| Τριγλυκερίδια (mg/dL) | 89.1 ± 30.6                           | 103.5 ± 26.1*                   | 198.9 ± 44.1***,***              |
| HDL-C (mg/dL)         | 52.4 ± 9.6                            | 73.6 ± 15.2***                  | 49.6 ± 11.2                      |
| LDL-C (mg/dL)         | 124.8 ± 30.4                          | 230 ± 57.2***                   | 178 ± 38.4***,***                |
| nonHDL-C (mmol/L)     | 143.6 ± 33.2                          | 251.6 ± 56***                   | 219.2 ± 39.2***,***              |
| apoA1 (mg/dL)         | 140.1 ± 21.9                          | 139.2 ± 32.3                    | 113.4 ± 28.7***,***              |
| apoB (mg/dL)          | 80.5 ± 20.9                           | 117.4 ± 24.6***                 | 121.4 ± 25.8***                  |
| LDL-C/apoB            | 3.87 ± 0.65                           | 5.15 ± 1.60**                   | 3.66 ± 0.55 <sup>#</sup>         |
| HDL-C/apoA1           | 0.95 ± 0.21                           | 1.36 ± 0.44***                  | 1.11 ± 0.31*                     |
| nonHDL-C/apoB         | 4.45 ± 0.63                           | 5.59 ± 1.63**                   | 4.56 ± 0.77 <sup>#</sup>         |

\*: p<0.05, \*\*: p<0.01, \*\*\*: p<0.001 σε σύγκριση με τα άτομα με φυσιολογικά επίπεδα λιπιδίων

<sup>#</sup>: p<0.05, \*\*<sup>#</sup>: p<0.01, \*\*\*<sup>#</sup>: p<0.001 σε σύγκριση με τα άτομα με υπερχοληστερολαιμία

Πίνακας 1.8-8a): Σύσταση των HDL σωματιδίων των τριών ομάδων της μελέτης

|                                                  | Άτομα με φυσιολογικά επίπεδα λιπιδίων | Ασθενείς με υπερχοληστερολαιμία | Ασθενείς με μικτή υπερλιπιδαιμία |
|--------------------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------|----------------------------------|
| Αριθμός                                          | 44                                    | 31                              | 30                               |
| Moles/100 moles των ολικών λιπιδίων              | Mean ± S.D.                           |                                 |                                  |
| Χοληστερόλη, % Ολική (TC)                        | 45.17 ± 3.92                          | 46.84 ± 3.39                    | 41.62 ± 4.49 <sup>***,###</sup>  |
| % Ελεύθερη (FC)                                  | 9.31 ± 2.14                           | 10.44 ± 1.61 <sup>*</sup>       | 9.58 ± 1.34 <sup>###</sup>       |
| % Εστεροποιημένη (CE)                            | 35.86 ± 3.96                          | 36.40 ± 3.12                    | 32.04 ± 4.72 <sup>***,§</sup>    |
| % Τριγλυκερίδια, (TG)                            | 8.15 ± 3.68                           | 7.42 ± 2.92                     | 12.20 ± 5.52 <sup>***,###</sup>  |
| Φωσφολιπίδια, % Ολικά (PL)                       | 46.68 ± 3.01                          | 45.74 ± 2.63                    | 46.18 ± 3.89                     |
| % Φωσφατιδυλοχολίνη (PC)                         | 38.59 ± 2.68                          | 37.80 ± 2.41                    | 38.68 ± 3.71                     |
| % Σφινγομυελίνη (SM)                             | 8.09 ± 1.55                           | 7.94 ± 1.08                     | 7.50 ± 1.21                      |
| % Λιπίδια του πυρήνα                             | 44.01 ± 3.82                          | 43.82 ± 3.10                    | 44.24 ± 4.60                     |
| % Λιπίδια της επιφάνειας                         | 55.99 ± 3.82                          | 56.18 ± 3.10                    | 55.76 ± 4.60                     |
| Λιπίδια της επιφάνειας/πυρήνα                    | 1.29 ± 0.20                           | 1.29 ± 0.17                     | 1.29 ± 0.26                      |
| Εστεροποιημένη χοληστερόλη/τριγλυκερίδια (CE/TG) | 5.93 ± 4.95                           | 5.91 ± 3.16                     | 3.58 ± 2.79 <sup>*,##</sup>      |
| Ελεύθερη χοληστερόλη/φωσφολιπίδια (FC/PL)        | 0.20 ± 0.05                           | 0.23 ± 0.04 <sup>**</sup>       | 0.21 ± 0.03 <sup>#</sup>         |
| Φωσφατιδυλοχολίνη/σφινγομυελίνη (PC/SM)          | 4.97 ± 1.13                           | 4.84 ± 0.73                     | 5.30 ± 1.08 <sup>###</sup>       |

<sup>\*</sup>: p<0.05, <sup>\*\*</sup>: p<0.01, <sup>\*\*\*</sup>: p<0.001 σε σύγκριση με τα άτομα με φυσιολογικά επίπεδα λιπιδίων

<sup>§</sup>: p<0.05, <sup>##</sup>: p<0.01, <sup>###</sup>: p<0.001 σε σύγκριση με τα άτομα με υπερχοληστερολαιμία

Πίνακας 1.8-8β): Κόρια δομικά χαρακτηριστικά των λιπαρών οξέων των HDL σωματιδίων των τριών ομάδων μελέτης

|                      |               | Άτομα με φυσιολογικά επίπεδα λιπιδίων | Ασθενείς με υπερχοληστερολαιμία | Ασθενείς με μικτή υπερλιπιδαιμία |
|----------------------|---------------|---------------------------------------|---------------------------------|----------------------------------|
| Αριθμός              |               | 44                                    | 31                              | 30                               |
|                      |               | Mean $\pm$ S.D.                       |                                 |                                  |
| Βαθμός ακορεστότητας |               | 1.26 $\pm$ 0.13                       | 1.24 $\pm$ 0.09                 | 1.26 $\pm$ 0.09                  |
| Μέσο μήκος αλυσίδας  |               | 17.74 $\pm$ 1.20                      | 18.13 $\pm$ 1.34                | 18.03 $\pm$ 1.64                 |
| % SFA                |               | 26.07 $\pm$ 4.69                      | 24.75 $\pm$ 4.25                | 25.83 $\pm$ 6.28                 |
| % UFA                |               | 73.93 $\pm$ 4.69                      | 75.25 $\pm$ 4.25                | 74.17 $\pm$ 6.28                 |
| % MUFA               |               | 33.74 $\pm$ 7.63                      | 32.87 $\pm$ 7.54                | 35.51 $\pm$ 6.80                 |
| % PUFA               | Ολικά         | 40.19 $\pm$ 5.53                      | 42.38 $\pm$ 6.44                | 38.66 $\pm$ 4.24                 |
|                      | Λινελαϊκό οξύ | 23.78 $\pm$ 4.32                      | 23.40 $\pm$ 3.25                | 20.79 $\pm$ 2.96*                |
|                      | EPA + ARA     | 13.36 $\pm$ 4.38                      | 15.62 $\pm$ 5.86                | 14.63 $\pm$ 4.34                 |
|                      | DHA           | 3.05 $\pm$ 1.12                       | 3.36 $\pm$ 1.31                 | 3.24 $\pm$ 0.98                  |

Πίνακας 1.8-9α): Σύσταση των nonHDL σωματιδίων των τριών ομάδων της μελέτης

| Αριθμός                                          | Άτομα με φυσιολογικά επίπεδα λιπιδίων | Ασθενείς με υπερχοληστερολαιμία | Ασθενείς με μικτή υπερλιπιδαιμία |
|--------------------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------|----------------------------------|
|                                                  | 44                                    | 31                              | 30                               |
| <b>Moles/100 moles των ολικών λιπιδίων</b>       | <b>Mean ± S.D.</b>                    |                                 |                                  |
| Χοληστερόλη, % Ολική (TC)                        | 54.92 ± 5.63                          | 60.37 ± 5.52***                 | 47.87 ± 5.22***.###              |
| % Ελεύθερη (FC)                                  | 16.50 ± 1.75                          | 18.07 ± 1.70***                 | 14.97 ± 1.62***.##               |
| % Εστεροποιημένη (CE)                            | 38.42 ± 4.68                          | 42.30 ± 4.34***                 | 32.89 ± 4.10***.###              |
| %Τριγλυκερίδια, (TG)                             | 24.18 ± 6.55                          | 17.33 ± 5.91***                 | 32.21 ± 3.36***.###              |
| Φωσφολιπίδια, % Ολικά (PL)                       | 20.89 ± 1.73                          | 22.30 ± 1.64***                 | 19.92 ± 1.67*.#                  |
| % Φωσφατιδυλοχολίνη (PC)                         | 13.90 ± 1.32                          | 14.61 ± 1.42*                   | 13.87 ± 1.28                     |
| % Σφιγγομυελίνη (SM)                             | 6.99 ± 1.06                           | 7.68 ± 0.97**                   | 6.05 ± 0.93***.##                |
| % Λιπίδια του πυρήνα                             | 62.60 ± 2.78                          | 59.63 ± 2.80***                 | 65.10 ± 3.08***.##               |
| % Λιπίδια της επιφάνειας                         | 37.40 ± 2.78                          | 40.37 ± 2.80***                 | 34.90 ± 3.08***.##               |
| Λιπίδια της επιφάνειας/πυρήνα                    | 0.60 ± 0.07                           | 0.68 ± 0.08***                  | 0.54 ± 0.07***.###               |
| Εστεροποιημένη χοληστερόλη/τριγλυκερίδια (CE/TG) | 1.79 ± 0.83                           | 2.88 ± 1.58***                  | 1.08 ± 0.32***.###               |
| Ελεύθερη χοληστερόλη/φωσφολιπίδια (FC/PL)        | 0.80 ± 0.11                           | 0.81 ± 0.08                     | 0.75 ± 0.05                      |
| Φωσφατιδυλοχολίνη/σφιγγομυελίνη (PC/SM)          | 2.04 ± 0.37                           | 1.94 ± 0.34                     | 2.35 ± 0.43***.##                |

\* : p<0.05, \*\* : p<0.01, \*\*\* : p<0.001 σε σύγκριση με τα άτομα με φυσιολογικά επίπεδα λιπιδίων

.# : p<0.05, ## : p<0.01, ### : p<0.001 σε σύγκριση με τα άτομα με υπερχοληστερολαιμία

**Πίνακας 1.8-9β):** Κύρια δομικά χαρακτηριστικά των λιπαρών οξέων των nonHDL σωματιδίων των τριών ομάδων μελέτης

|                      |               | Άτομα με φυσιολογικά επίπεδα λιπιδίων | Ασθενείς με υπερχοληστερολαιμία | Ασθενείς με μικτή υπερλιπιδαιμία |
|----------------------|---------------|---------------------------------------|---------------------------------|----------------------------------|
| Αριθμός              |               | 44                                    | 31                              | 30                               |
|                      |               | Mean $\pm$ S.D.                       |                                 |                                  |
| Βαθμός ακορεστότητας |               | 1.22 $\pm$ 0.10                       | 1.22 $\pm$ 0.06                 | 1.25 $\pm$ 0.17                  |
| Μέσο μήκος αλυσίδας  |               | 16.64 $\pm$ 0.98                      | 16.49 $\pm$ 0.89                | 16.70 $\pm$ 2.23                 |
| % SFA                |               | 27.64 $\pm$ 4.96                      | 26.06 $\pm$ 3.79                | 26.49 $\pm$ 11.53                |
| % UFA                |               | 72.36 $\pm$ 4.96                      | 73.94 $\pm$ 3.79                | 73.51 $\pm$ 11.53                |
| % MUFA               |               | 36.53 $\pm$ 6.04                      | 37.04 $\pm$ 4.28                | 40.62 $\pm$ 6.83 <sup>a,b</sup>  |
| % PUFA               | Ολικά         | 35.83 $\pm$ 4.32                      | 36.90 $\pm$ 3.88                | 32.89 $\pm$ 3.52                 |
|                      | Λινελαϊκό οξύ | 25.27 $\pm$ 4.37                      | 26.72 $\pm$ 3.71                | 22.86 $\pm$ 4.72 <sup>a,b</sup>  |
|                      | EPA + ARA     | 9.07 $\pm$ 5.09                       | 8.93 $\pm$ 4.46                 | 8.52 $\pm$ 3.76                  |
|                      | DHA           | 1.49 $\pm$ 1.19                       | 1.25 $\pm$ 0.98                 | 1.51 $\pm$ 0.96                  |

#### 1.8.4. Μελέτη της σύστασης των HDL και nonHDL λιποπρωτεϊνών ασθενών με εγκατεστημένη καρδιαγγειακή νόσο

Τα κλινικά και βιοχημικά χαρακτηριστικά των ομάδων της μελέτης φαίνονται στον Πίνακα 1.8-10. Οι ασθενείς με εκτεταμένη καρδιαγγειακή νόσο 3 αγγείων ήταν πιο ηλικιωμένοι και εμφάνισαν στατιστικά σημαντικά υψηλότερα επίπεδα τριγλυκεριδίων και χαμηλότερα επίπεδα HDL-C, apoAΙ και E σε σύγκριση με τους ασθενείς με φυσιολογικά αγγεία. Δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των δυο ομάδων της μελέτης όσον αφορά τους παράγοντες κινδύνου, όπως τον δείκτη μάζας σώματος, την επίπτωση της αρτηριακής υπέρτασης, του καπνίσματος και του οικογενειακού ιστορικού πρώιμης καρδιαγγειακής νόσου αλλά και τα επίπεδα της ολικής-, LDL-, nonHDL-C, apoB και της Lp(a).

Η λιπιδιακή σύσταση των HDL σωματιδίων των δυο ομάδων της μελέτης φαίνεται στον Πίνακα 1.8-11α. Αν και οι ασθενείς με νόσο 3 αγγείων παρουσίασαν στατιστικά σημαντικά χαμηλότερη % περιεκτικότητα των σωματιδίων σε χοληστερόλη ελεύθερη και εστεροποιημένη σε σύγκριση με τους ασθενείς με φυσιολογικά αγγεία, οι αλλαγές αυτές δεν επηρέασαν την % περιεκτικότητα των σωματιδίων σε λιπίδια του πυρήνα λόγω της στατιστικά σημαντικά υψηλότερης % περιεκτικότητας σε τριγλυκερίδια, αλλά επηρέασαν τον λόγο CE/TG. Η % περιεκτικότητα της σφιγγομυελίνης είναι χαμηλότερη στους ασθενείς με νόσο 3 αγγείων σε σύγκριση με τους ασθενείς με φυσιολογικά αγγεία, ενώ η % περιεκτικότητα σε φωσφολιπίδια, φωσφατιδυλοχολίνη και σε επιφανειακή στιβάδα, καθώς επίσης ο λόγος των λιπιδίων της επιφάνειας προς του πυρήνα δεν παρουσίασαν στατιστικά σημαντικές αλλαγές μεταξύ των δυο ομάδων της μελέτης. Τέλος, ο λόγος PC/SM είναι στατιστικά σημαντικά υψηλότερος, ενώ ο λόγος FC/PL χαμηλότερος στους ασθενείς με νόσο 3 αγγείων σε σύγκριση με τους ασθενείς με φυσιολογικά αγγεία.

Το ποσοστό των μονοακόρεστων λιπαρών οξέων, καθώς επίσης και το μέσο μήκος της αλυσίδας ήταν σημαντικά υψηλότερο στους ασθενείς με νόσο 3 αγγείων σε σύγκριση με τους ασθενείς με φυσιολογικά αγγεία, ενώ το άθροισμα του εικοσιπεντενοϊκού και αραχιδονικού οξέος χαμηλότερο. Στατιστικά σημαντικές αλλαγές μεταξύ των δυο ομάδων της μελέτης δεν παρατηρούνται όσον αφορά τον βαθμό ακορεστότητας και το ποσοστό των κορεσμένων και ακόρεστων λιπαρών οξέων, του λινελαϊκού και εικοσιδυενοϊκού οξέος (Πίνακας 1.8-11β).

Η λιπιδιακή σύσταση των nonHDL σωματιδίων των δυο ομάδων της μελέτης φαίνεται στον Πίνακα 1.8-12α. Η % περιεκτικότητα των σωματιδίων σε ολική, ελεύθερη, εστεροποιημένη χοληστερόλη ήταν χαμηλότερη στους ασθενείς με νόσο 3 αγγείων σε σύγκριση με τους ασθενείς με φυσιολογικά αγγεία, ενώ η % περιεκτικότητα των τριγλυκεριδίων υψηλότερη, με αποτέλεσμα στα σωματίδια αυτά την υψηλότερη % περιεκτικότητα των σωματιδίων σε πυρήνα. Η % περιεκτικότητα των σωματιδίων σε σφιγγομυελίνη ήταν χαμηλότερη στους ασθενείς με νόσο 3 αγγείων σε σχέση με τους ασθενείς με φυσιολογικά αγγεία, ενώ η % περιεκτικότητα σε φωσφολιπίδια και φωσφατιδυλοχολίνη δεν παρουσίασε στατιστικά σημαντική αλλαγή μεταξύ των δυο ομάδων της

μελέτης. Οι αλλαγές αυτές επηρέασαν τους λόγους FC/PL, PC/SM και των λιπιδίων της επιφάνειας προς του πυρήνα.

Οι ασθενείς με νόσο 3 αγγείων παρουσίασαν στατιστικά σημαντικά υψηλότερη % περιεκτικότητα σε μονοακόρεστα λιπαρά οξέα και χαμηλότερη % περιεκτικότητα σε εικοσιδυενοϊκού οξύ και στο άθροισμα του εικοσιπεντενοϊκού και αραχιδονικού οξέος σε σύγκριση με τους ασθενείς με φυσιολογικά αγγεία (Πίνακας 1.8-12β).

Πίνακας 1.8-10: Κλινικά και βιοχημικά χαρακτηριστικά των ασθενών της μελέτης

|                                                            | Ασθενείς με νόσο 3<br>αγγείων | Ασθενείς με<br>φυσιολογικά αγγεία | p      |
|------------------------------------------------------------|-------------------------------|-----------------------------------|--------|
|                                                            | 54                            | 41                                |        |
| Ηλικία (έτη)                                               | 67.85 ± 9.75 *                | 61.26 ± 9.42                      | <0.01  |
| Άνδρες/Γυναίκες                                            | 46/8                          | 24/17                             |        |
| Παράγοντες κινδύνου για στεφανιαία νόσο                    |                               |                                   |        |
| Υπέρταση (n,%)                                             | 31 (57.4%)                    | 22 (52.4%)                        | NS     |
| Ενεργοί καπνιστές (n,%)                                    | 19 (35.2%)                    | 15 (35.7%)                        | NS     |
| Κληρονομικό ιστορικό πρώιμης<br>καρδιαγγειακής νόσου (n,%) | 6 (11.1%)                     | 5 (11.9%)                         | NS     |
| Δείκτης μάζας σώματος (kg/m <sup>2</sup> )                 | 26.9 ± 2.37                   | 27.8 ± 2.24                       | NS     |
| Ολική χοληστερόλη (mg/dL)                                  | 216.4 ± 58                    | 220 ± 49.2                        | NS     |
| Τριγλυκερίδια (mg/dL)                                      | 165.6 ± 30.8                  | 154 ± 19.2                        | <0.001 |
| HDL-C (mg/dL)                                              | 42.8 ± 9.2                    | 50.4 ± 12.4                       | <0.001 |
| LDL-C (mg/dL)                                              | 139.6 ± 51.2                  | 144.4 ± 40.4                      | NS     |
| nonHDL-C (mg/dL)                                           | 174 ± 48.4                    | 169.2 ± 40.8                      | NS     |
| apoA1 (mg/dL)                                              | 108.9 ± 26.5                  | 134.6 ± 27.9                      | <0.001 |
| apoB (mg/dL)                                               | 101.4 ± 32.6                  | 100.8 ± 26.6                      | NS     |
| apoE (mg/L)                                                | 36.2 ± 13.1                   | 40.5 ± 12.2                       | <0.05  |
| Lp(a) (mg/dL)                                              | 19.6 – 21.9                   | 23.8 ± 34.2                       | NS     |

\*: p< 0.05 επίπεδο σημαντικότητας, #: εκφρασμένα ως mean ± S.D.

NS: Στατιστικά μη σημαντικό

**Πίνακας 1.8-11α) Λιπιδιακή σύσταση των HDL σωματιδίων των δυο ομάδων μελέτης**

|                                                  | Ασθενείς με νόσο 3<br>αγγείων | Ασθενείς με φυσιολογικά<br>αγγεία | p      |
|--------------------------------------------------|-------------------------------|-----------------------------------|--------|
| Αριθμός                                          | 54                            | 41                                |        |
|                                                  | mean ± S.D.                   |                                   |        |
| Χοληστερόλη, % Ολική (TC)                        | 41.08 ± 4.36                  | 44.92 ± 3.38                      | <0.001 |
| % Ελεύθερη (FC)                                  | 9.78 ± 1.29                   | 10.55 ± 1.15                      | <0.05  |
| % Εστεροποιημένη (CE)                            | 31.30 ± 4.22                  | 34.37 ± 3.35                      | <0.001 |
| Τριγλυκερίδια, (TG)                              | 12.35 ± 5.38                  | 9.44 ± 4.15                       | <0.01  |
| Φωσfolιπίδια, % Ολικά (PL)                       | 46.57 ± 5.45                  | 45.64 ± 4.36                      | NS     |
| % Φωσφατιδυλοχολίνη (PC)                         | 38.42 ± 5.33                  | 36.83 ± 4.22                      | NS     |
| % Σφιγγομυελίνη (SM)                             | 8.14 ± 1.24                   | 8.81 ± 1.09                       | <0.01  |
| Λιπίδια του πυρήνα                               | 43.65 ± 5.28                  | 43.81 ± 4.50                      | NS     |
| Λιπίδια της επιφάνειας                           | 56.35 ± 5.28                  | 56.19 ± 4.50                      | NS     |
| Λιπίδια Επιφάνειας/Πυρήνα                        | 1.32 ± 0.28                   | 1.31 ± 0.25                       | NS     |
| Εστεροποιημένη χοληστερόλη/Τριγλυκερίδια (CE/TG) | 3.22 ± 2.24                   | 4.40 ± 2.13                       | <0.01  |
| Ελεύθερη χοληστερόλη/Φωσfolιπίδια (FC/PL)        | 0.21 ± 0.05                   | 0.23 ± 0.04                       | <0.05  |
| Φωσφατιδυλοχολίνη/Σφιγγομυελίνη (PC/SM)          | 4.84 ± 1.14                   | 4.24 ± 0.69                       | <0.01  |

**Κύρια δομικά χαρακτηριστικά των λιπαρών οξέων των HDL σωματιδίων των δυο ομάδων μελέτης**

|                       |               | Ασθενείς με νόσο 3<br>αγγείων | Ασθενείς με φυσιολογικά<br>αγγεία | p     |
|-----------------------|---------------|-------------------------------|-----------------------------------|-------|
| Αριθμός               |               | 54                            | 41                                |       |
|                       |               | mean ± S.D.                   |                                   |       |
| Αριθμός ακορεστότητας |               | 1.38 ± 0.23                   | 1.33 ± 0.08                       | NS    |
| Μέσο μήκος αλυσίδας   |               | 18.95 ± 3.16                  | 17.74 ± 1.28                      | <0.05 |
| SFA                   |               | 21.31 ± 14.32                 | 24.79 ± 4.43                      | NS    |
| UFA                   |               | 78.69 ± 14.32                 | 75.21 ± 4.43                      | NS    |
| MUFA                  |               | 38.10 ± 10.72                 | 32.73 ± 6.06                      | <0.01 |
| PUFA                  | Ολικά         | 40.58 ± 8.15                  | 42.48 ± 7.32                      | NS    |
|                       | Λινελαϊκό οξύ | 21.60 ± 5.18                  | 21.18 ± 2.77                      | NS    |
|                       | EPA + ARA     | 15.34 ± 4.44                  | 17.30 ± 3.37                      | <0.05 |
|                       | DHA           | 3.64 ± 0.98                   | 4.00 ± 0.99                       | NS    |

Πίνακας 1.8-12α) Λιπδιακή σύσταση των nonHDL σωματιδίων των δυο ομάδων μελέτης

|                                                  | Ασθενείς με νόσο 3<br>αγγείων | Ασθενείς με φυσιολογικά<br>αγγεία | p     |
|--------------------------------------------------|-------------------------------|-----------------------------------|-------|
| Αριθμός                                          | 54                            | 41                                |       |
|                                                  | mean ± S.D.                   |                                   |       |
| Χοληστερόλη, % Ολική (TC)                        | 48.64 ± 7.07                  | 52.38 ± 6.72                      | <0.01 |
| % Ελεύθερη (FC)                                  | 15.55 ± 2.27                  | 16.74 ± 2.03                      | <0.01 |
| % Εστεροποιημένη (CE)                            | 33.09 ± 5.34                  | 35.64 ± 5.10                      | <0.01 |
| %Τριγλυκερίδια, (TG)                             | 31.18 ± 8.64                  | 27.01 ± 8.05                      | <0.05 |
| Φωσφολιπίδια, % Ολικά (PL)                       | 20.18 ± 1.81                  | 20.61 ± 1.65                      | NS    |
| % Φωσφατιδυλοχολίνη (PC)                         | 13.53 ± 1.24                  | 13.31 ± 1.14                      | NS    |
| % Σφιγγομυελίνη (SM)                             | 6.65 ± 1.18                   | 7.30 ± 1.13                       | <0.01 |
| % Λιπίδια του πυρήνα                             | 64.26 ± 3.87                  | 62.65 ± 3.50                      | <0.05 |
| % Λιπίδια της επιφάνειας                         | 35.74 ± 3.86                  | 37.35 ± 3.50                      | <0.05 |
| Λιπίδια Επιφάνειας/Πυρήνα                        | 0.56 ± 0.10                   | 0.60 ± 0.09                       | <0.05 |
| Εστεροποιημένη χοληστερόλη/Τριγλυκερίδια (CE/TG) | 1.24 ± 0.74                   | 1.53 ± 0.77                       | NS    |
| Ελεύθερη χοληστερόλη/Φωσφολιπίδια (FC/PL)        | 0.77 ± 0.07                   | 0.81 ± 0.06                       | <0.01 |
| Φωσφατιδυλοχολίνη/Σφιγγομυελίνη (PC/SM)          | 2.10 ± 0.44                   | 1.87 ± 0.32                       | <0.01 |

β) Κύρια δομικά χαρακτηριστικά των λιπαρών οξέων των nonHDL σωματιδίων των δυο ομάδων μελέτης

|                      |           | Ασθενείς με νόσο 3<br>αγγείων | Ασθενείς με φυσιολογικά<br>αγγεία | p      |
|----------------------|-----------|-------------------------------|-----------------------------------|--------|
| Αριθμός              |           | 54                            | 41                                |        |
|                      |           | mean ± S.D.                   |                                   |        |
| Βαθμός ακορεστότητας |           | 1.24 ± 0.07                   | 1.26 ± 0.07                       | NS     |
| Μέσο μήκος αλυσίδας  |           | 16.31 ± 0.58                  | 16.32 ± 0.79                      | NS     |
| % SFA                |           | 30.16 ± 4.99                  | 28.60 ± 3.39                      | NS     |
| % UFA                |           | 69.84 ± 4.99                  | 71.40 ± 3.39                      | NS     |
| % MUFA               |           | 38.01 ± 6.32                  | 34.59 ± 5.35                      | <0.01  |
| % PUFA               | Ολικά     | 31.84 ± 2.62                  | 36.81 ± 3.17                      | NS     |
|                      | Λινελεϊκό | 22.10 ± 3.56                  | 22.85 ± 3.38                      | NS     |
|                      | EPA + ARA | 8.21 ± 3.56                   | 11.94 ± 3.03                      | <0.001 |
|                      | DHA       | 1.53 ± 0.80                   | 2.02 ± 0.81                       | <0.01  |

### 1.8.5. Μεταβονομική ανάλυση των ασθενών με εγκατεστημένη καρδιαγγειακή νόσο

#### *Δημιουργία στατιστικού μοντέλου με βάση τη νόσο των αγγείων*

Στην μεταβονομική ανάλυση συμμετείχαν 54 ασθενείς με νόσο 3 αγγείων και 41 ασθενείς με φυσιολογικά αγγεία. Αρχικά, εφαρμόστηκε η τεχνική PCA για την γενική επισκόπηση των HDL και nonHDL πολυμεταβλητών δεδομένων. Από τα γραφήματα συντεταγμένων φάνηκε ότι δεν υπήρχε κάποια τάση διαχωρισμού των δυο ομάδων ασθενών για τα HDL δεδομένα (Εικόνα 1.8-3α), ενώ μια μικρή τάση διακρίθηκε για τα nonHDL δεδομένα (Εικόνα 1.8-3β).

Με εφαρμογή της τεχνικής PLS-DA δημιουργήθηκαν τα PLS-DA HDL και nonHDL στατιστικά μοντέλα. Τα γραφήματα συντεταγμένων για τα μοντέλα αυτά έδειξαν ότι αν και υπήρχε σημαντικός βαθμός επικάλυψης, η ομάδα των ασθενών με νόσο 3 αγγείων είχε μια τάση διαχωρισμού από αυτή των ασθενών με φυσιολογικά αγγεία (Εικόνα 1.8-3γ και 1.8-3δ, αντίστοιχα). Τα γραφήματα των συντελεστών παλινδρόμησης για το HDL και nonHDL μοντέλο (Εικόνα 1.8-3ε και 1.8-3στ, αντίστοιχα) απεικονίζουν τις φασματικές περιοχές που αντιστοιχούν σε συγκεκριμένα λιπίδια ή δομικά χαρακτηριστικά των λιπαρών οξέων και τον βαθμό συνεισφοράς τους στο διαχωρισμό.

Από το γράφημα για το HDL στατιστικό μοντέλο (Εικόνα 1.8-3ε), προέκυψε ότι οι ασθενείς με νόσο 3 αγγείων παρουσίασαν, κατά σειρά σημαντικότητας, χαμηλότερα επίπεδα χοληστερόλης, μεγαλύτερο μέσο μήκος αλυσίδας λιπαρών οξέων (ACL), χαμηλότερα επίπεδα βαθμού ακορεστότητας (DU) και φωσφατιδυλοχολίνης, υψηλότερα επίπεδα μονοακόρεστων λιπαρών οξέων και τέλος, χαμηλότερο αριθμό λιπαρών οξέων, επιπέδων εικοσιπεντενοϊκού και αραχιδονικού οξέος, πολυακόρεστων λιπαρών οξέων και λινελαϊκού οξέος σε σύγκριση με τους ασθενείς με φυσιολογικά αγγεία. Σε μικρότερο βαθμό συνεισέφεραν στην παρατηρούμενη τάση διαχωρισμού τα υψηλότερα επίπεδα των τριγλυκεριδίων και τα χαμηλότερα επίπεδα σφίγγομυελίνης που παρατηρήθηκαν στους ασθενείς με νόσο 3 αγγείων. Σύμφωνα με το γράφημα των συντελεστών παλινδρόμησης για το nonHDL στατιστικό μοντέλο (Εικόνα 1.8-3στ) οι ασθενείς με νόσο 3 αγγείων παρουσίασαν μεγαλύτερο μέσο μήκος αλυσίδας (ACL) και αριθμό λιπαρών οξέων (NFA), χαμηλότερο βαθμό ακορεστότητας (DU), υψηλότερα επίπεδα μονοακόρεστων λιπαρών οξέων, σφίγγομυελίνης και χοληστερόλης, χαμηλότερα επίπεδα εικοσιπεντενοϊκού και αραχιδονικού οξέος και φωσφατιδυλοχολίνης σε σύγκριση με τους ασθενείς με φυσιολογικά αγγεία. Σε μικρότερο βαθμό συνεισέφεραν στην παρατηρούμενη τάση διαχωρισμού τα χαμηλότερα επίπεδα των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων, λινελαϊκού και εικοσιδυενοϊκού οξέος και τα υψηλότερα επίπεδα των τριγλυκεριδίων που παρατηρήθηκαν στους ασθενείς με νόσο 3 αγγείων. Οι τιμές των  $R^2$  και  $Q^2$  παραμέτρων είναι 0.13 και 0.09 για το HDL και 0.27 και 0.25 για το nonHDL στατιστικό μοντέλο.

Η μέθοδος OSC (Orthogonal Signal Correction) εφαρμόστηκε για να αφαιρεθεί η πιθανή συνεισφορά της ενδοατομικής διακύμανσης. Μετά την αφαίρεση δυο ορθοκανονικών συνιστωσών, η τεχνική PLS-DA επαναλήφθηκε. Από τα γραφήματα των συντεταγμένων για τα OSC/PLS-DA HDL

και nonHDL στατιστικά μοντέλα (Εικόνα 1.8-3ζ και 1.8-3η, αντίστοιχα) ήταν εμφανής ο σαφής διαχωρισμός μεταξύ των δυο ομάδων και ιδιαίτερα για το HDL μοντέλο, με τους ασθενείς με νόσο 3 αγγείων να βρίσκονται στο δεξί μέρος του γραφήματος και τους ασθενείς με φυσιολογικά αγγεία στο αριστερό.

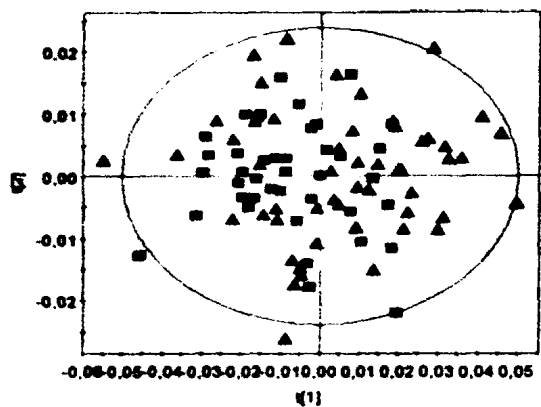
Από το γράφημα των συντελεστών παλινδρόμησης, για το OSC/PLS-DA HDL στατιστικό μοντέλο (Εικόνα 1.8-3θ), προέκυψε ότι οι ασθενείς με νόσο 3 αγγείων παρουσίασαν μεγαλύτερο μέσο μήκος αλυσίδας (ACL) και αριθμό λιπαρών οξέων (NFA), χαμηλότερο βαθμό ακορεστότητας (DU) και επίπεδα χοληστερόλης και υψηλότερα επίπεδα μονοακόρεστων λιπαρών οξέων και φωσφατιδυλοχολίνης σε σύγκριση με τους ασθενείς με φυσιολογικά αγγεία. Σε μικρότερο βαθμό συνεισέφεραν στον διαχωρισμό των δυο ομάδων τα χαμηλότερα επίπεδα εικοσιπεντενοϊκού και αραχιδονικού οξέος και πολυακόρεστων λιπαρών οξέων, τα υψηλότερα επίπεδα σφιγγομυελίνης, τα χαμηλότερα επίπεδα εικοσιδυενοϊκού οξέος και τα υψηλότερα επίπεδα τριγλυκεριδίων που παρατηρήθηκαν στους ασθενείς με νόσο 3 αγγείων.

Αντίστοιχα, στο nonHDL στατιστικό μοντέλο, οι ασθενείς με νόσο 3 αγγείων παρουσίασαν μεγαλύτερο μέσο μήκος αλυσίδας (ACL) και αριθμό λιπαρών οξέων (NFA), χαμηλότερο βαθμό ακορεστότητας (DU), υψηλότερα επίπεδα μονοακόρεστων λιπαρών οξέων και χαμηλότερα επίπεδα χοληστερόλης σε σύγκριση με τους ασθενείς με φυσιολογικά αγγεία. Σε μικρότερο βαθμό συνεισέφεραν τα χαμηλότερα επίπεδα εικοσιπεντενοϊκού και αραχιδονικού οξέος, τα υψηλότερα επίπεδα σφιγγομυελίνης και τριγλυκεριδίων, τα χαμηλότερα επίπεδα πολυακόρεστων λιπαρών οξέων, τα υψηλότερα επίπεδα φωσφατιδυλοχολίνης και τέλος, τα χαμηλότερα επίπεδα λινελαϊκού οξέος που παρατηρήθηκαν στους ασθενείς με νόσο 3 αγγείων (Εικόνα 1.8-3ι). Οι τιμές των  $R^2$  και  $Q^2$  παραμέτρων βελτιώθηκαν σημαντικά σε 0.68 και 0.66 για το HDL και 0.56 και 0.54 για το nonHDL στατιστικό μοντέλο, αντίστοιχα.

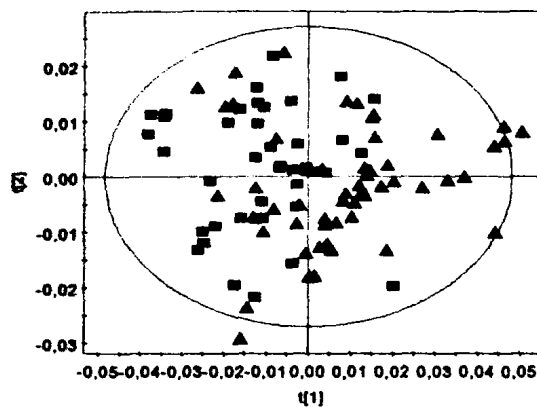
Για να ελέγξουμε την αξιοπιστία των OSC/PLS-DA HDL και nonHDL στατιστικών μοντέλων όσον αφορά τη διάκριση των ασθενών με νόσο τριών αγγείων από τους ασθενείς με φυσιολογικά αγγεία, εφαρμόστηκε η τεχνική της εσωτερικής και εξωτερικής αξιολόγησης. Εβδομήντα έξι ασθενείς (44 με νόσο 3 αγγείων και 32 με φυσιολογικά αγγεία) επιλέχθηκαν τυχαία και συγκρότησαν την ομάδα βαθμονόμησης, ενώ οι υπόλοιποι 19 ασθενείς (10 με νόσο 3 αγγείων και 9 με φυσιολογικά αγγεία) συγκρότησαν την ομάδα εσωτερικής και εξωτερικής αξιολόγησης (Εικόνα 1.8-3κ και 1.8-3λ, Εικόνα 1.8-3μ και 1.8-3λ, αντίστοιχα). Στην εσωτερική αξιολόγηση, το HDL μοντέλο ταξινόμησε σωστά 10 στους 10 ασθενείς με νόσο 3 αγγείων και 8 στους 9 ασθενείς με φυσιολογικά αγγεία, ενώ το nonHDL μοντέλο 10 στους 10 ασθενείς με νόσο 3 αγγείων και 6 στους 9 ασθενείς με φυσιολογικά αγγεία. Στην εξωτερική αξιολόγηση, το HDL μοντέλο ταξινόμησε σωστά 8 στους 10 ασθενείς με νόσο 3 αγγείων και 6 στους 9 ασθενείς με φυσιολογικά αγγεία, ενώ το nonHDL μοντέλο 7 στους 10 ασθενείς με νόσο 3 αγγείων και 8 στους 9 ασθενείς με φυσιολογικά αγγεία.



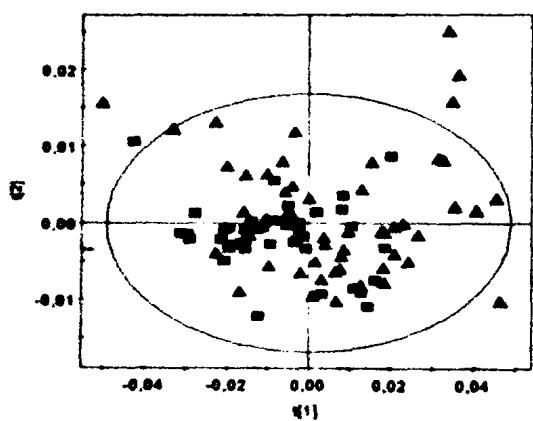
α) HDL



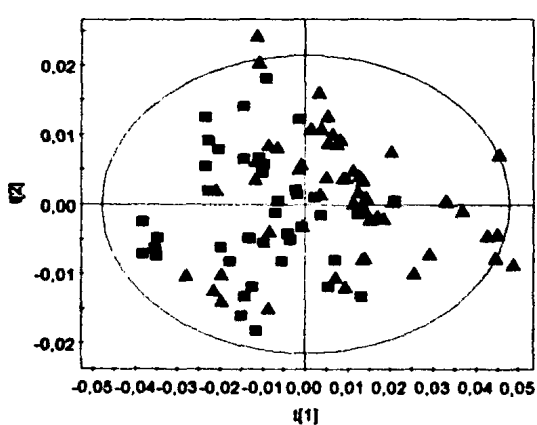
β) nonHDL



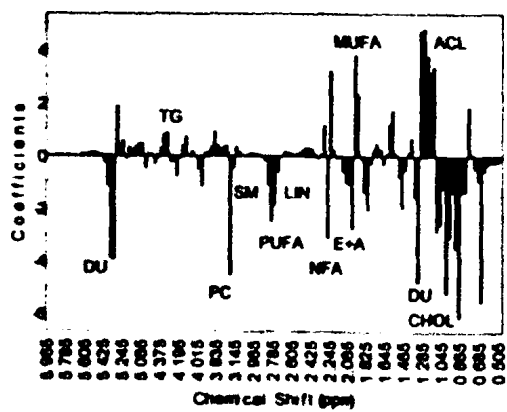
γ)



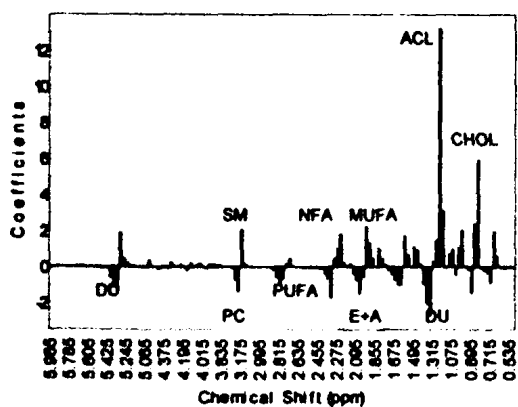
δ)



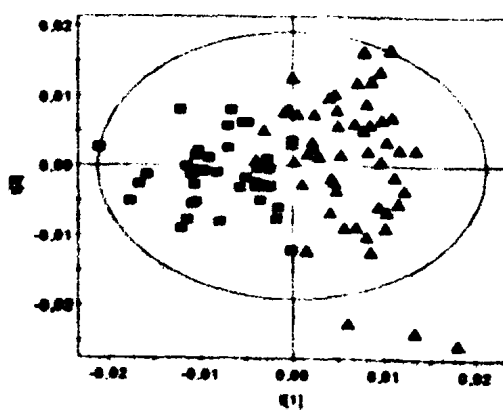
ε)



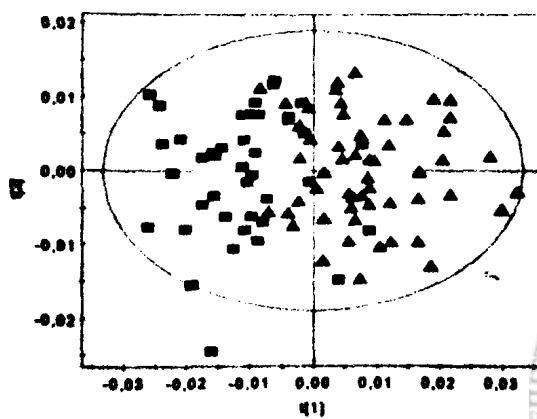
στ)

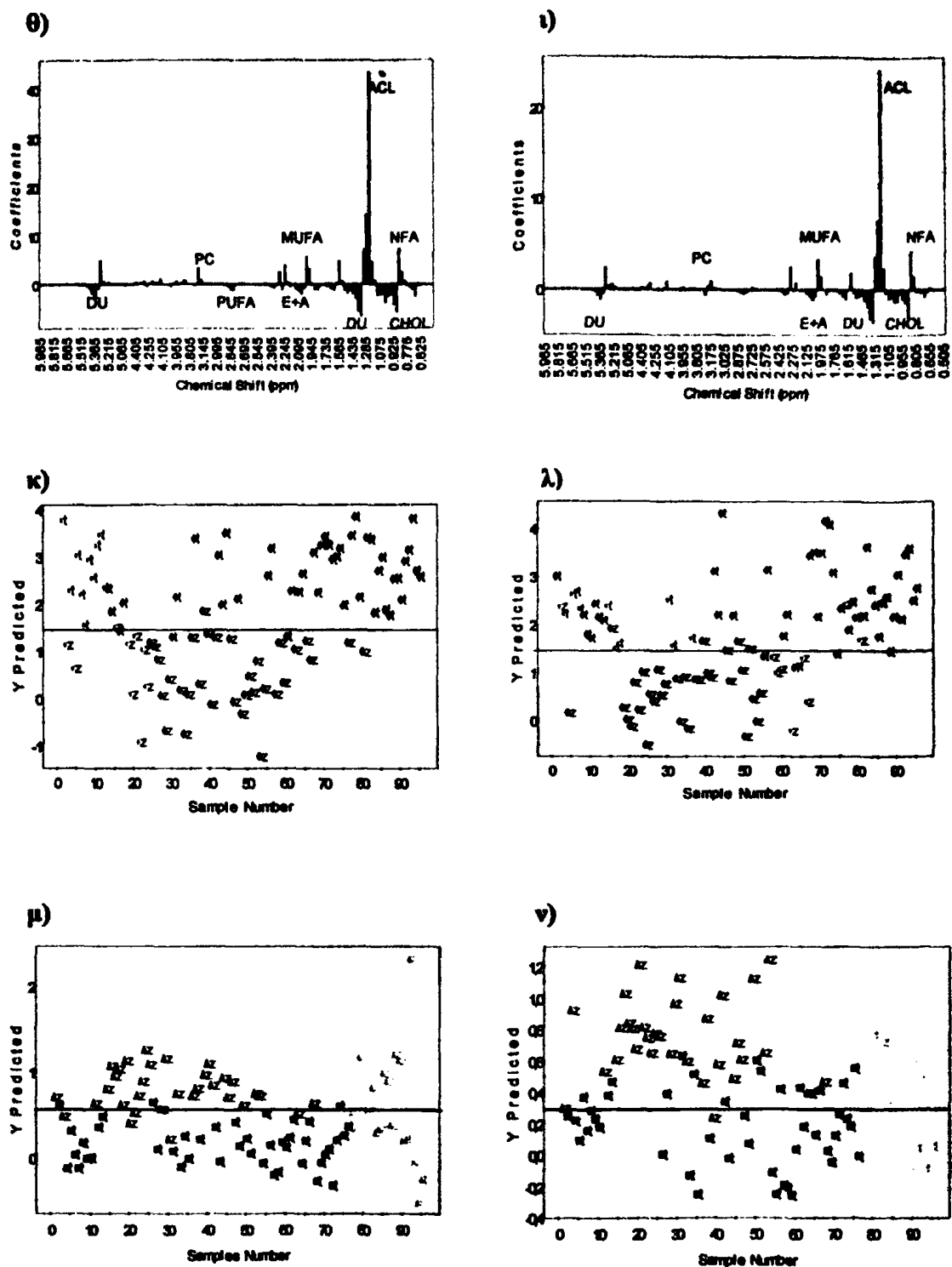


θ)



η)





Εικόνα 1.8-3: α-β) Τα PCA γραφήματα συντεταγμένων των  $^1\text{H}$  NMR HDL και nonHDL δεδομένων των 41 ασθενών με φυσιολογικά αγγεία (■) και των 54 ασθενών με νόσο 3 αγγείων (▲), γ-δ) Τα PLS-DA γραφήματα συντεταγμένων, ε-στ) Τα αντίστοιχα γραφήματα των συντελεστών παλινδρόμησης, ζ-η) Τα OSC/PLS-DA γραφήματα συντεταγμένων για τα HDL και nonHDL στατιστικά μοντέλα, θ-ι) Τα αντίστοιχα γραφήματα των συντελεστών παλινδρόμησης και κ-λ) Τα διαγράμματα ελέγχου της αξιοπιστίας των OSC/PLS-DA HDL και nonHDL στατιστικών μοντέλων. Η ευθεία  $y=1.5$  χρησιμοποιήθηκε ως όριο διαχωρισμού των ομάδων. Την ομάδα βαθμονόμησης αποτέλεσαν 44 ασθενείς με νόσο 3 αγγείων (♦ι) και 32 με φυσιολογικά αγγεία (♦z) και

την ομάδα εσωτερικής και εξωτερικής αξιολόγησης 10 ασθενείς με νόσο 3 αγγείων (\*t) και 9 με φυσιολογικά αγγεία (\*z).

**DU (Degree of unsaturation):** Ο βαθμός ακορεστότητας εκφράστηκε από τα πρωτόνια των μεθυλενίων που βρίσκονται κοντά σε ακόρεστους δεσμούς (1.345 και 1.375ppm) και τα ολεφινικά πρωτόνια (5.365ppm), **ACL (Average chain length):** Το μέσο μήκος της αλυσίδας από τα πρωτόνια των μεθυλομάδων (1.225, 1.255, 1.285 και 1.315ppm) και των β-μεθυλενίων (1.585ppm), **CHOL (Cholesterol):** Η χοληστερόλη από τα πρωτόνια των μεθυλομάδων λόγω της συνεισφοράς του C<sub>21</sub>, C<sub>27</sub>, C<sub>26</sub> (0.865-1.045ppm) και τα πρωτόνια του C<sub>18</sub> (0.685ppm), **NFA (Number of fatty acids):** Ο αριθμός λιπαρών οξέων από τα πρωτόνια των μεθυλομάδων (0.835ppm) και των α-μεθυλενίων (2.305ppm), **MUFA (Monounsaturated fatty acids):** Τα μονοακόρεστα λιπαρά οξέα από τα αλλυλικά πρωτόνια (2.005ppm), **PUFA (Polyunsaturated fatty acids):** Τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα από τα διαλλυλικά πρωτόνια (2.815ppm), **E+A (Arachidonic and eicosapentaenoic acid):** Το άθροισμα του εικοσιπεντενοϊκού και αραχιδονικού οξέος (2.065ppm), **LIN (Linoleic acid):** Το λινελαϊκό οξύ (2.785ppm), **PC (Phosphatidylcholine):** Η φωσφατιδυλοχολίνη (3.205ppm), **SM (Sphingomyelin):** Η σφιγγομυελίνη (3.175ppm) και **TG (Triglycerides):** Τα τριγλυκερίδια (4.315ppm).

Πίνακας 1.8-13: Μεταβολομικές παράμετροι των PLS-DA και OSC/PLS-DA μοντέλων

| Παράμετροι                         | Αριθμός ασθενών                                                         | PLS-DA         |                | OSC/PLS-DA     |                |
|------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
|                                    |                                                                         | R <sup>2</sup> | Q <sup>2</sup> | R <sup>2</sup> | Q <sup>2</sup> |
| HDL στατιστικό μοντέλο             |                                                                         |                |                |                |                |
| Νόσος των αγγείων                  | 54 3Α<br>41 ΦΑ                                                          | 0.13           | 0.09           | 0.68           | 0.66           |
| Νόσος των αγγείων/Φύλο των ασθενών | 54 3Α { 46 άνδρες<br>8 γυναίκες<br><br>41 ΦΑ { 24 άνδρες<br>17 γυναίκες | 0.06           | 0.03           | 0.23           | 0.21           |
| Νόσος των αγγείων/Επίπεδα TG       | 54 3Α { 27 ↑ TG<br>27 ↓ TG<br><br>41 ΦΑ { 10 ↑ TG<br>31 ↓ TG            | 0.09           | -0.001         | 0.25           | 0.23           |
| Νόσος αγγείων/Επίπεδα HDL-C        | 54 3Α { 26 ↑ HDL-C<br>27 ↓ HDL-C<br><br>41 ΦΑ { 33 ↑ HDL-C<br>9 ↓ HDL-C | -0.01          | 0.02           | 0.33           | 0.20           |
| NonHDL στατιστικό μοντέλο          |                                                                         |                |                |                |                |
| Νόσος των αγγείων                  | 54 3Α<br>41 ΦΑ                                                          | 0.27           | 0.25           | 0.56           | 0.54           |
| Νόσος των αγγείων/Φύλο των ασθενών | 54 3Α { 46 άνδρες<br>8 γυναίκες<br><br>41 ΦΑ { 24 άνδρες<br>17 γυναίκες | 0.10           | 0.08           | 0.20           | 0.18           |
| Νόσος των αγγείων/Επίπεδα TG       | 54 3Α { 27 ↑ TG<br>27 ↓ TG<br><br>41 ΦΑ { 10 ↑ TG<br>31 ↓ TG            | 0.14           | 0.12           | 0.25           | 0.23           |
| Νόσος αγγείων/Επίπεδα HDL-C        | 54 3Α { 26 ↑ HDL-C<br>27 ↓ HDL-C<br><br>41 ΦΑ { 33 ↑ HDL-C<br>9 ↓ HDL-C | 0.02           | 0.03           | 0.55           | 0.48           |

3Α: Ασθενείς με νόσο 3 αγγείων

ΦΑ: Ασθενείς με φυσιολογικά αγγεία



#### Δημιουργία στατιστικού μοντέλου με βάση τη νόσο των αγγείων και το φύλο των ασθενών

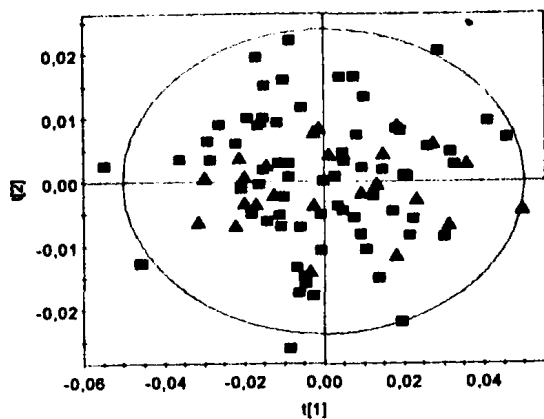
Δημιουργήθηκαν τα HDL και nonHDL στατιστικά μοντέλα για να εξεταστεί η επίδραση του φύλου των ασθενών στην ικανότητα των OSC/PLS-DA μοντέλων να προβλέψουν την εγκατεστημένη καρδιαγγειακή νόσο. Στη μεταβονομική ανάλυση συμμετείχαν 54 ασθενείς με νόσο 3 αγγείων από τους οποίους 46 ήταν άνδρες και 8 γυναίκες και 41 ασθενείς με φυσιολογικά αγγεία από τους οποίους 24 ήταν άνδρες και 17 γυναίκες (Πίνακας 1.8-13).

Με την τεχνική PCA δημιουργήθηκαν αρχικά τα HDL και nonHDL στατιστικά μοντέλα με βάση τη νόσο των αγγείων και το φύλο των ασθενών. Όπως φαίνεται από τα γραφήματα των συντεταγμένων για το HDL μοντέλο (Εικόνα 1.8-4α) δεν παρατηρείται κάποια τάση διαχωρισμού μεταξύ των ασθενών ούτε με βάση τη νόσο των αγγείων ούτε με βάση το φύλο των ασθενών, ενώ στο nonHDL μοντέλο φαίνεται να υπάρχει μια τάση διαχωρισμού ως προς τη νόσο και όχι ως προς το φύλο (Εικόνα 1.8-4β). Με εφαρμογή της τεχνικής PLS-DA προέκυψαν τα PLS-DA HDL και nonHDL στατιστικά μοντέλα από τα γραφήματα των οποίων (Εικόνα 1.8-4γ και 1.8-4δ, αντίστοιχα) φαίνεται ότι υπάρχει μια τάση διαχωρισμού μεταξύ των ασθενών με βάση τη νόσο των αγγείων και όχι το φύλο, με τους άνδρες και τις γυναίκες με νόσο 3 αγγείων να βρίσκονται στο δεξί μέρος του γραφήματος και τους άνδρες και τις γυναίκες με φυσιολογικά αγγεία στο αριστερό μέρος.

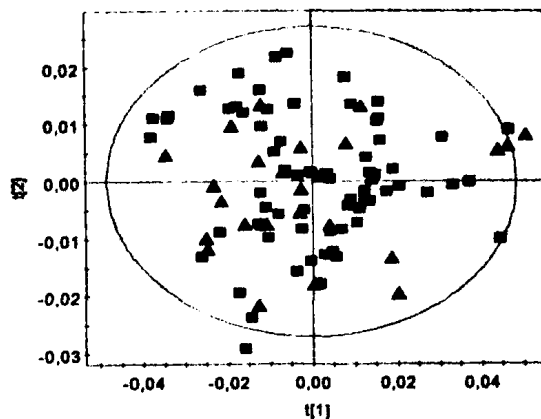
Σύμφωνα με τα γραφήματα των συντελεστών παλινδρόμησης για το HDL και nonHDL στατιστικό μοντέλο (Εικόνα 1.8-4ε και 1.8-4στ, αντίστοιχα), προέκυψε ότι τα λιπίδια και τα δομικά χαρακτηριστικά των λιπαρών οξέων που συνέβαλλαν στην παρατηρούμενη τάση διαχωρισμού ήταν παρόμοια, αλλά με διαφορετική σειρά σημαντικότητας σε σχέση με αυτά των αρχικών μοντέλων που δημιουργήθηκαν με βάση μόνο τη νόσο των αγγείων. Οι τιμές των  $R^2$  και  $Q^2$  παραμέτρων είναι 0.06 και 0.03 για το HDL και 0.10 και 0.08 για το nonHDL στατιστικό μοντέλο.

Μετά την εφαρμογή της τεχνικής OSC προέκυψαν τα OSC/PLS-DA HDL και nonHDL στατιστικά μοντέλα και από τα γραφήματα συντεταγμένων φαίνεται ευδιάκριτα ο διαχωρισμός των ομάδων με βάση τη νόσο των αγγείων και όχι το φύλο των ασθενών (Εικόνα 1.8-4ζ και 1.8-4η, αντίστοιχα). Σύμφωνα με τα γραφήματα των συντελεστών παλινδρόμησης για το HDL και nonHDL στατιστικό μοντέλο (Εικόνα 1.8-4θ και 1.8-4ι, αντίστοιχα), προέκυψε ότι τα λιπίδια και τα δομικά χαρακτηριστικά των λιπαρών οξέων που συνέβαλλαν στον διαχωρισμό των ομάδων διαφοροποιήθηκαν λίγο σε σχέση με αυτά του αρχικού μοντέλου, καθώς ο διαχωρισμός με βάση τη νόσο των αγγείων πραγματοποιείται σε τέσσερις ομάδες ασθενών και όχι σε δυο. Η βελτίωση των τιμών των  $R^2$  και  $Q^2$  παραμέτρων ήταν μικρή και σημαντικά χαμηλότερη από ότι στο αρχικό μοντέλο στο οποίο συμμετείχαν δυο ομάδες ασθενών (0.23 και 0.21 vs 0.68 και 0.66 για το HDL και 0.20 και 0.18 vs 0.68 και 0.66 για το nonHDL στατιστικό μοντέλο) (Πίνακας 1.8-13). Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν ότι ο διαχωρισμός των ομάδων οφείλεται στη νόσο των αγγείων και ότι δεν υπάρχει συνεισφορά από το φύλο των ασθενών.

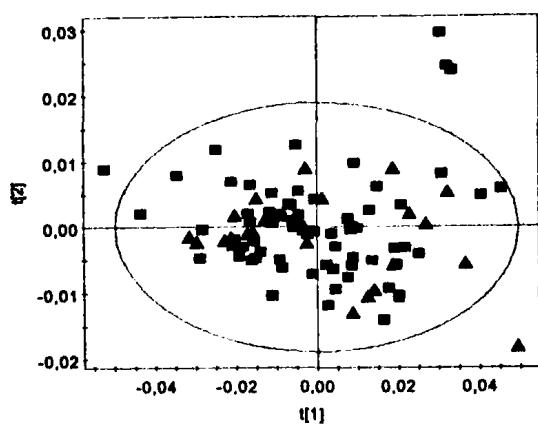
α) HDL



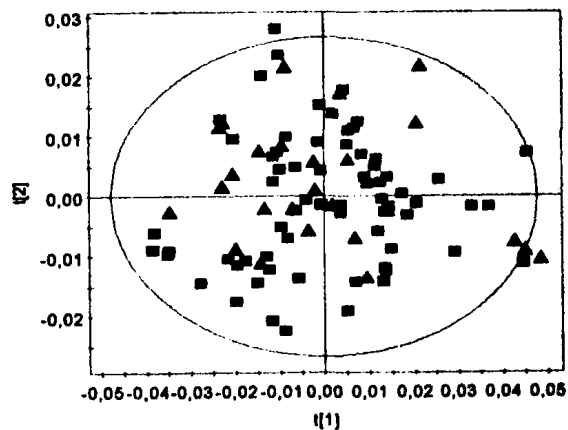
β) nonHDL



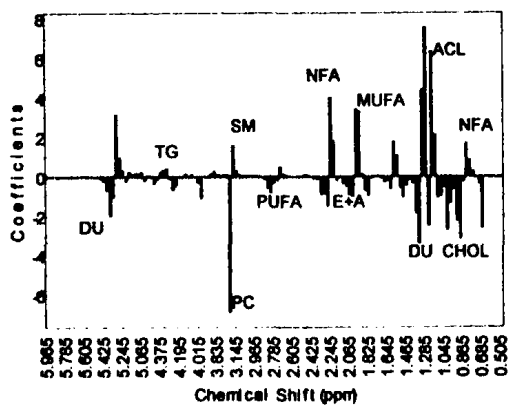
γ)



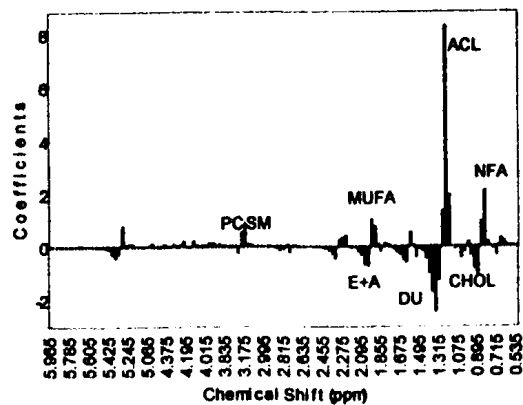
δ)



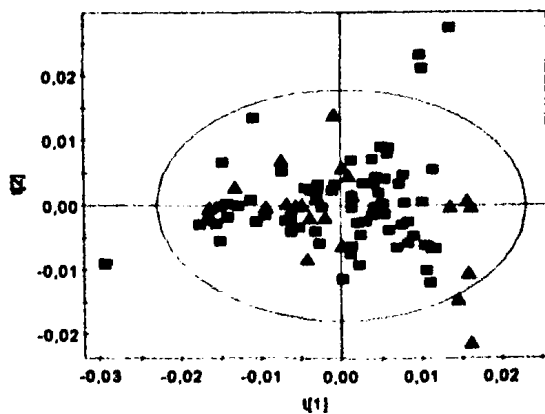
ε)



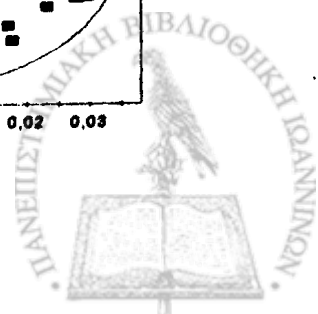
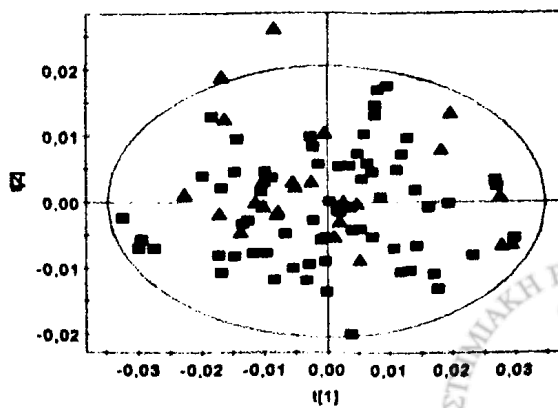
στ)

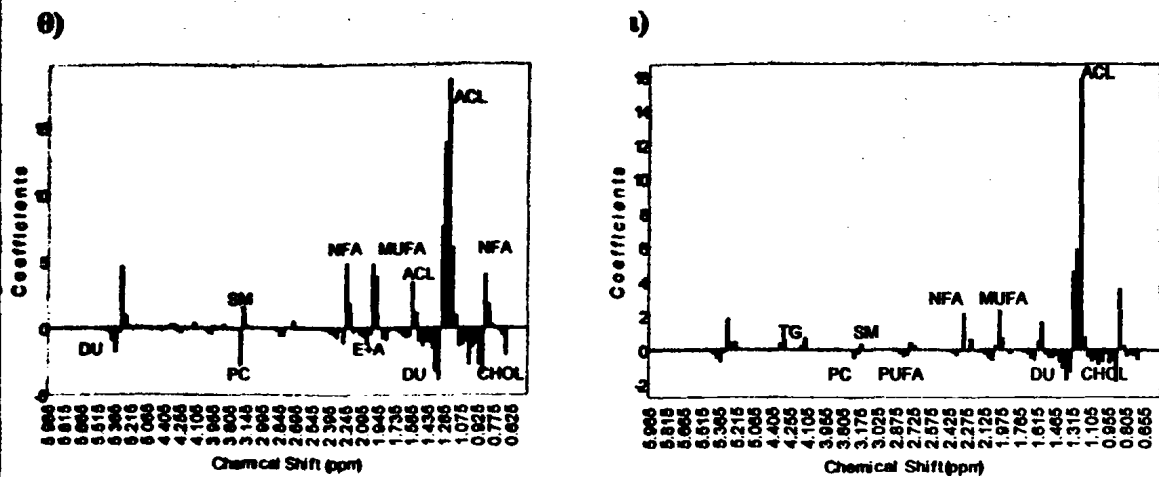


ζ)



η)





Εικόνα 1.8-4: α-β) Τα PCA γραφήματα συντεταγμένων των  $^1\text{H}$  NMR HDL και nonHDL δεδομένων των 46 ανδρών (■) και 8 γυναικών (▲) με νόσο 3 αγγείων και των 24 ανδρών (■) και 17 γυναικών (▲) με φυσιολογικά αγγεία, γ-δ) Τα PLS-DA γραφήματα συντεταγμένων, ε-στ) Τα αντίστοιχα γραφήματα των συντελεστών παλινδρόμησης, ζ-η) Τα OSC/PLS-DA γραφήματα συντεταγμένων για τα HDL και nonHDL στατιστικά μοντέλα, θ-ι) Τα αντίστοιχα γραφήματα των συντελεστών παλινδρόμησης.

*Δημιουργία στατιστικού μοντέλου με βάση τη νόσο των αγγείων και τα επίπεδα των τριγλυκεριδίων του ορού των ασθενών*

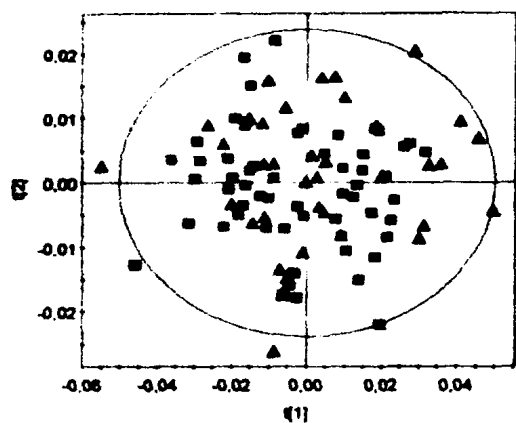
Για να εξεταστεί η επίδραση των επιπέδων των τριγλυκεριδίων του ορού των ασθενών στην πρόβλεψη της καρδιαγγειακής νόσου δημιουργήθηκαν νέα HDL και nonHDL στατιστικά μοντέλα στα οποία συμμετείχαν οι 54 ασθενείς με νόσο 3 αγγείων από τους οποίους 27 είχαν υψηλά επίπεδα τριγλυκεριδίων ( $>150\text{mg/dL}$ ) και 27 χαμηλά ( $<150\text{mg/dL}$ ) και οι 41 ασθενείς με φυσιολογικά αγγεία από τους οποίους 10 είχαν υψηλά επίπεδα τριγλυκεριδίων και 31 χαμηλά (Πίνακας 1.8-13). Δημιουργήθηκαν ξανά τα PCA HDL και nonHDL στατιστικά μοντέλα με βάση τόσο τη νόσο των αγγείων όσο και τα επίπεδα των τριγλυκεριδίων του ορού των ασθενών. Στα γραφήματα των συντεταγμένων των HDL και nonHDL μοντέλων (Εικόνα 1.8-5α και 1.8-5β, αντίστοιχα) η μόνη τάση διαχωρισμού που παρατηρήθηκε ήταν αυτή μεταξύ των ασθενών στο HDL μοντέλο. Στα γραφήματα συντεταγμένων των PLS-DA HDL και nonHDL μοντέλων παρατηρήθηκε μια τάση διαχωρισμού μεταξύ των ασθενών με βάση τη νόσο των αγγείων και όχι τα επίπεδα των τριγλυκεριδίων του ορού (Εικόνα 1.8-5γ και 1.8-5δ, αντίστοιχα). Όπως και στο αρχικό συνολικό μοντέλο (Εικόνα 1.8-3γ και 1.8-3δ) οι ασθενείς με νόσο 3 αγγείων ανεξάρτητα από τα επίπεδα των τριγλυκεριδίων βρίσκονται κυρίως στο δεξί μέρος του γραφήματος, ενώ οι ασθενείς με φυσιολογικά αγγεία στο αριστερό.

Από τα γραφήματα των συντελεστών παλινδρόμησης για το HDL και nonHDL στατιστικό μοντέλο (Εικόνα 1.8-5ε και 1.8-5στ, αντίστοιχα) προέκυψε ότι τα λιπίδια και τα δομικά χαρακτηριστικά των λιπαρών οξέων διαφοροποιήθηκαν ως προς τη σειρά σημαντικότητας στη συνεισφορά τους στην παρατηρούμενη τάση διαχωρισμού σε σχέση με το αρχικό συνολικό μοντέλο που δημιουργήθηκε με βάση μόνο τη νόσο των αγγείων. Οι τιμές των  $R^2$  και  $Q^2$  παραμέτρων ήταν 0.09 και -0.001 για το HDL και 0.14 και 0.12 για το nonHDL στατιστικό μοντέλο (Πίνακας 1.8-13).

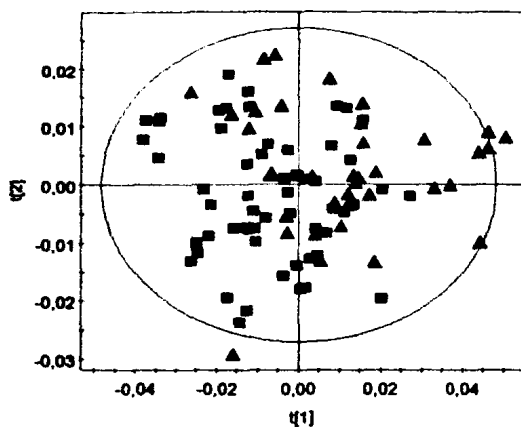
Από τα γραφήματα συντεταγμένων των HDL και nonHDL μοντέλων που προέκυψαν μετά την εφαρμογή της τεχνικής OSC φάνηκε πιο ευδιάκριτα ο διαχωρισμός των ασθενών με βάση τη νόσο των αγγείων και όχι τα επίπεδα των τριγλυκεριδίων του ορού (Εικόνα 1.8-5ζ και 1.8-5η, αντίστοιχα). Οι ασθενείς με νόσο 3 αγγείων ανεξάρτητα από τα επίπεδα των τριγλυκεριδίων βρίσκονται κυρίως στο δεξί μέρος του γραφήματος, ενώ οι ασθενείς με φυσιολογικά αγγεία στο αριστερό. Από τα γραφήματα των συντελεστών παλινδρόμησης για το HDL και nonHDL στατιστικό μοντέλο (Εικόνα 1.8-5θ και 1.8-5ι, αντίστοιχα) προέκυψε ότι τα λιπίδια και τα δομικά χαρακτηριστικά των λιπαρών οξέων που συνέβαλαν στον διαχωρισμό των 4 ομάδων με βάση τη νόσο των αγγείων διαφοροποιήθηκαν ως προς τη σειρά σημαντικότητας σε σχέση με το αρχικό συνολικό μοντέλο. Επίσης, η βελτίωση των τιμών  $R^2$  και  $Q^2$  παραμέτρων ήταν μικρή (0.25 και 0.23 για το HDL και 0.25 και 0.23 για το nonHDL στατιστικό μοντέλο) (Πίνακας 1.8-13).



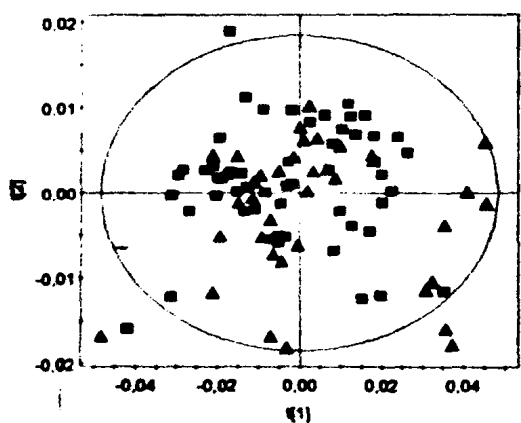
α) HDL



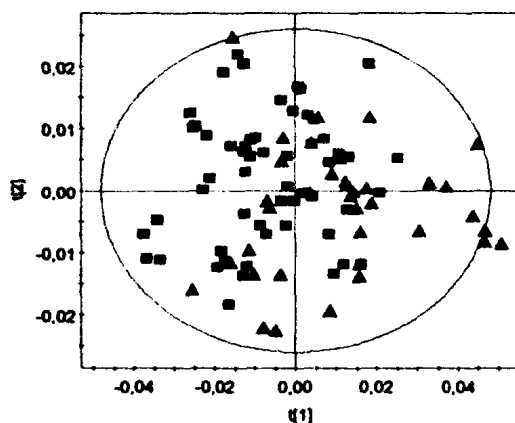
β) nonHDL



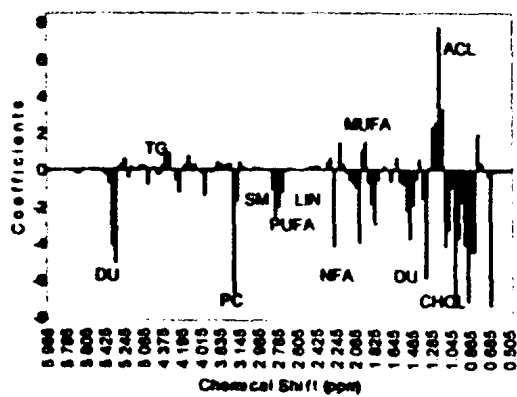
γ)



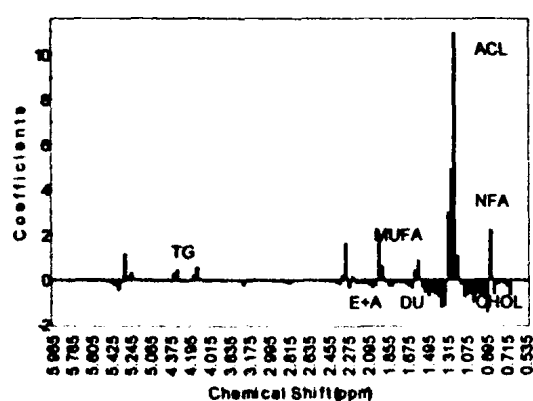
δ)



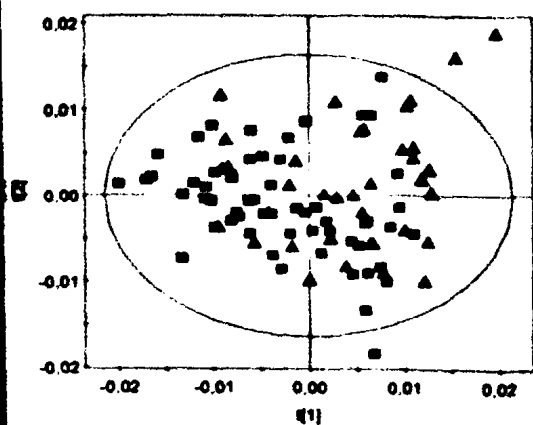
ε)



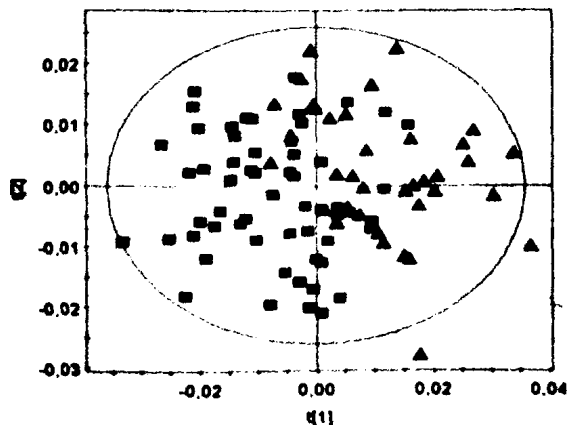
στ)

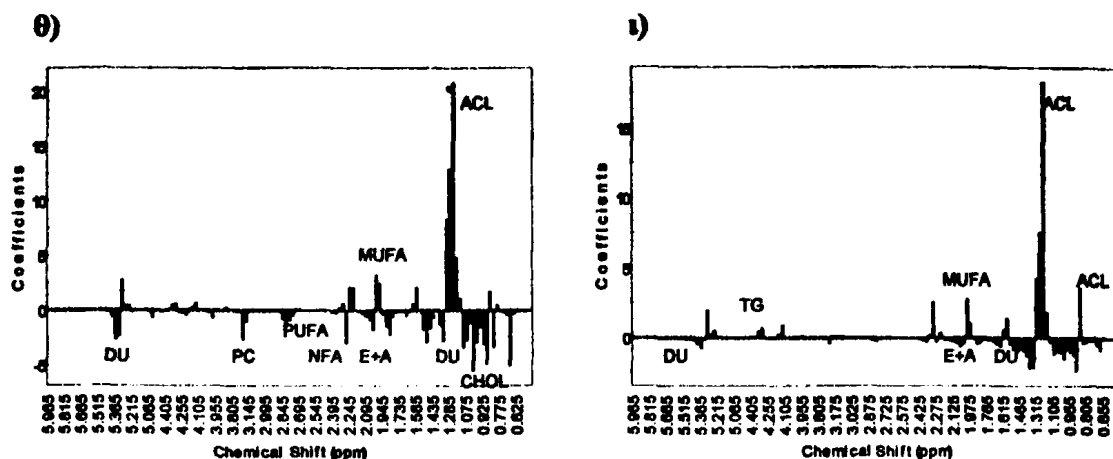


ζ)



η)





Εικόνα 1.8-5: α-β) Τα PCA γραφήματα συντεταγμένων των  $^1\text{H}$  NMR HDL και nonHDL δεδομένων των 27 ασθενών με υψηλότερα (▲) και 27 ασθενών με χαμηλότερα (■) επίπεδα τριγλυκεριδίων με νόσο 3 αγγείων και 10 ασθενών με υψηλότερα (▲) και 31 ασθενών με χαμηλότερα (■) επίπεδα τριγλυκεριδίων με φυσιολογικά αγγεία, γ-δ) Τα PLS-DA γραφήματα συντεταγμένων, ε-στ) Τα αντίστοιχα γραφήματα των συντελεστών παλινδρόμησης, ζ-η) Τα OSC/PLS-DA γραφήματα συντεταγμένων για τα HDL και nonHDL στατιστικά μοντέλα, θ-ι) Τα αντίστοιχα γραφήματα των συντελεστών παλινδρόμησης.

### *Δημιουργία στατιστικού μοντέλου με βάση τη νόσο των αγγείων και τα επίπεδα της HDL-C του ορού των ασθενών*

Για να εξεταστεί η επίδραση των επιπέδων της HDL-C του ορού των ασθενών στην πρόβλεψη της καρδιαγγειακής νόσου δημιουργήθηκαν νέα HDL και nonHDL στατιστικά μοντέλα στα οποία συμμετείχαν οι 54 ασθενείς με νόσο 3 αγγείων από τους οποίους 26 ασθενείς είχαν υψηλότερα επίπεδα HDL-C ( $>40\text{mg/dL}$ ) και 27 χαμηλότερα ( $<40\text{mg/dL}$ ) και οι 41 ασθενείς με φυσιολογικά αγγεία από τους οποίους 33 είχαν υψηλότερα επίπεδα HDL-C και 9 χαμηλότερα (Πίνακας 1.8-13). Δημιουργήθηκαν τα PCA HDL και nonHDL στατιστικά μοντέλα με βάση τόσο τη νόσο των αγγείων όσο και τα επίπεδα της HDL-C του ορού των ασθενών. Στα γραφήματα των συντεταγμένων των PCA και PLS-DA HDL και nonHDL στατιστικών μοντέλων (Εικόνα 1.8-6α και 1.8-6β και Εικόνα 1.8-6γ και 1.8-6δ, αντίστοιχα) δεν παρατηρήθηκε τάση διαχωρισμού μεταξύ των ασθενών με βάση κάποια από τις δυο παραμέτρους.

Στο OSC/PLS-DA HDL στατιστικό μοντέλο, με βάση την πρώτη κύρια συνιστώσα ( $t_1$ ) ο διαχωρισμός των δυο ομάδων ασθενών οφείλεται στη νόσο των αγγείων των ασθενών, ενώ με βάση την δεύτερη συνιστώσα ο διαχωρισμός των ασθενών σε ομάδες οφείλεται στα επίπεδα της HDL-C (Εικόνα 1.8-6ε). Ο διαχωρισμός των ομάδων που πραγματοποιείται στο OSC/PLS-DA nonHDL στατιστικό μοντέλο γίνεται κυρίως με βάση την πρώτη συνιστώσα και οφείλεται στα επίπεδα της HDL-C (Εικόνα 1.8-6στ).

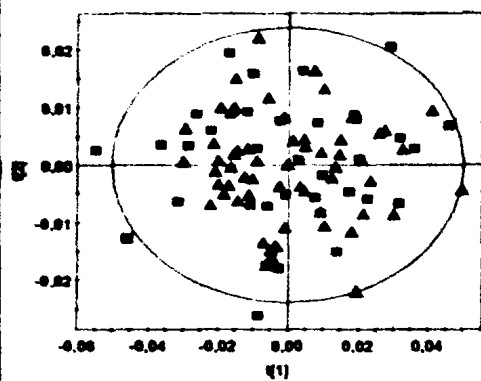
Από το γράφημα των συντελεστών παλινδρόμησης για το OSC/PLS-DA HDL στατιστικό μοντέλο (Εικόνα 1.8-6ζ) προέκυψε ότι οι ασθενείς με νόσο 3 αγγείων παρουσίασαν κατά σειρά σημαντικότητας μεγαλύτερο μέσο μήκος αλυσίδας και αριθμό λιπαρών οξέων, χαμηλότερα επίπεδα βαθμού ακορεστότητας, υψηλότερα επίπεδα φωσφατιδυλοχολίνης και μονοακόρεστων λιπαρών οξέων σε σύγκριση με τους ασθενείς με φυσιολογικά αγγεία. Σε μικρότερο βαθμό επίσης συνεισέφεραν τα υψηλότερα επίπεδα λινελαϊκού οξέος και χοληστερόλης και τα χαμηλότερα επίπεδα του εικοσιπεντενοϊκού και αραχιδονικού οξέος και του εικοσιδυενοϊκού οξέος που παρατηρήθηκαν στους ασθενείς με νόσο 3 αγγείων.

Από το γράφημα των συντελεστών παλινδρόμησης για το OSC/PLS-DA nonHDL στατιστικό μοντέλο (Εικόνα 1.8-4η) προέκυψε ότι οι ασθενείς με υψηλότερα επίπεδα HDL-C παρουσίασαν μεγαλύτερο μήκος αλυσίδας και αριθμού λιπαρών οξέων, χαμηλότερα επίπεδα βαθμού ακορεστότητας, υψηλότερα επίπεδα χοληστερόλης, φωσφατιδυλοχολίνης και μονοακόρεστων λιπαρών οξέων σε σύγκριση με τους ασθενείς με χαμηλότερα επίπεδα HDL-C. Σε μικρότερο βαθμό επίσης συνεισέφεραν τα χαμηλότερα επίπεδα του εικοσαπεντενοϊκού και αραχιδονικού οξέος, εικοσιδυενοϊκού οξέος και τα υψηλότερα επίπεδα λινελαϊκού οξέος και σφιγγομυελίνης που παρατηρήθηκαν στους ασθενείς με αυξημένα επίπεδα HDL-C. Οι τιμές των  $R^2$  και  $Q^2$  παραμέτρων ήταν 0.33 και 0.20 για το HDL και 0.55 και 0.48 για το nonHDL στατιστικό μοντέλο.

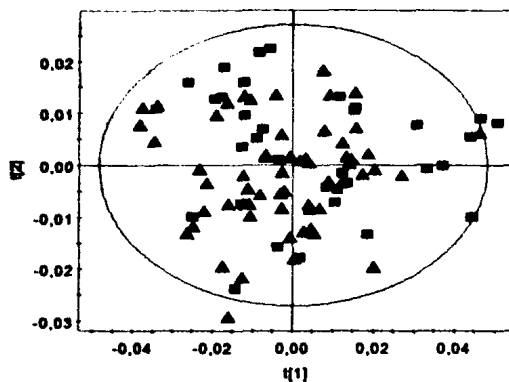
Επειδή ο αριθμός των ασθενών με φυσιολογικά αγγεία που παρουσίασαν χαμηλά επίπεδα HDL-C ήταν πολύ μικρός, επιλέχθηκαν από τους 54 ασθενείς με νόσο 3 αγγείων οι 26 που είχαν υψηλότερα επίπεδα HDL-C ( $>40\text{mg/dL}$ ) και από τους 41 ασθενείς με φυσιολογικά αγγεία οι 33 αντίστοιχα έτσι ώστε να σχηματιστεί μια ομοιογενής ομάδα ασθενών.

Δημιουργήθηκαν τα PCA HDL και nonHDL στατιστικά μοντέλα με βάση τόσο τη νόσο των αγγείων όσο και τα επίπεδα της HDL-C του ορού των ασθενών. Μετά την εφαρμογή της τεχνικής OSC προέκυψαν τα OSC/PLS-DA HDL και nonHDL στατιστικά μοντέλα και από τα γραφήματα συντεταγμένων φαίνεται ευδιάκριτα ο διαχωρισμός των ομάδων με βάση τη νόσο των αγγείων και όχι τα επίπεδα της HDL-χοληστερόλης (Εικόνα 1.8-7α και 1.8-7β). Από τα γραφήματα των συντελεστών παλινδρόμησης για το HDL και nonHDL στατιστικό μοντέλο (Εικόνα 1.8-7γ και 1.8-7δ, αντίστοιχα) προέκυψε ότι τα λιπίδια και τα δομικά χαρακτηριστικά των λιπαρών οξέων που συνέβαλαν στον διαχωρισμό των 4 ομάδων με βάση τη νόσο των αγγείων διαφοροποιήθηκαν ως προς τη σειρά σημαντικότητας σε σχέση με το αρχικό συνολικό μοντέλο. Οι τιμές των  $R^2$  και  $Q^2$  παραμέτρων ήταν 0.71 και 0.61 για το HDL και 0.66 και 0.53 για το nonHDL στατιστικό μοντέλο.

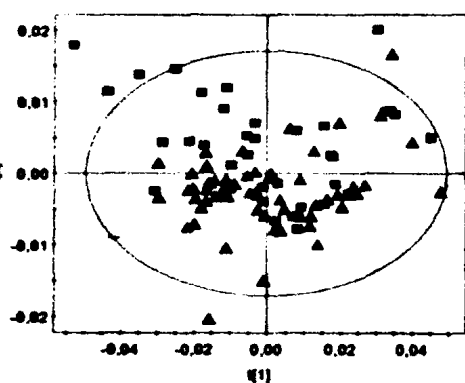
α) HDL



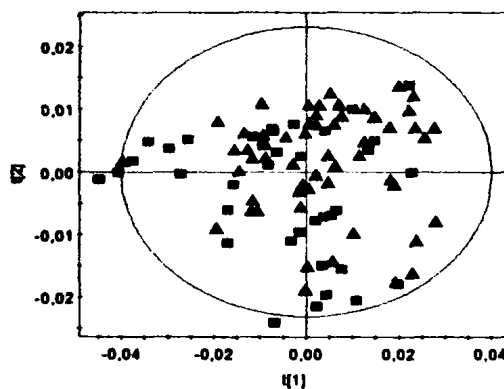
β) nonHDL



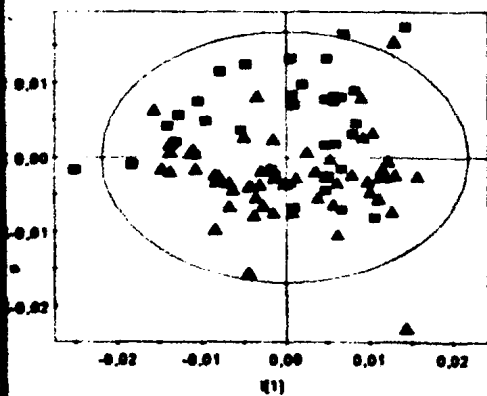
γ)



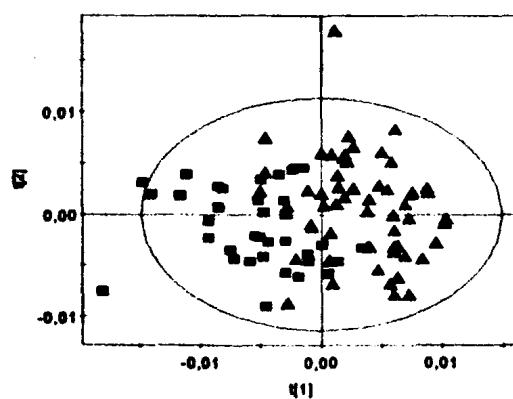
δ)



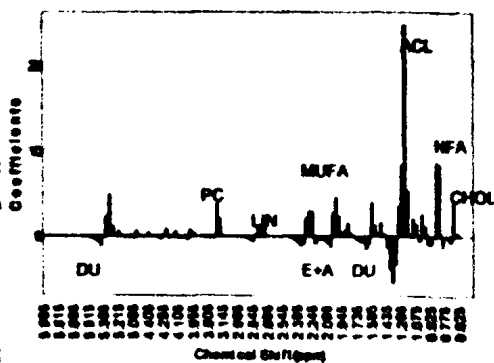
ε)



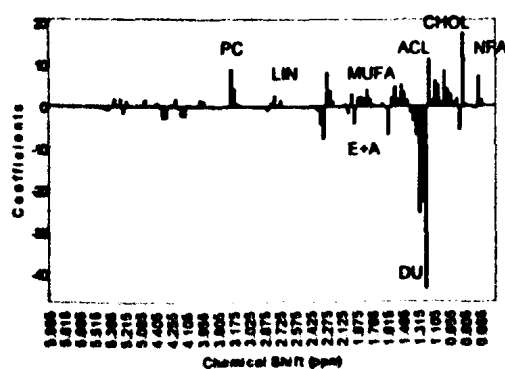
στ)



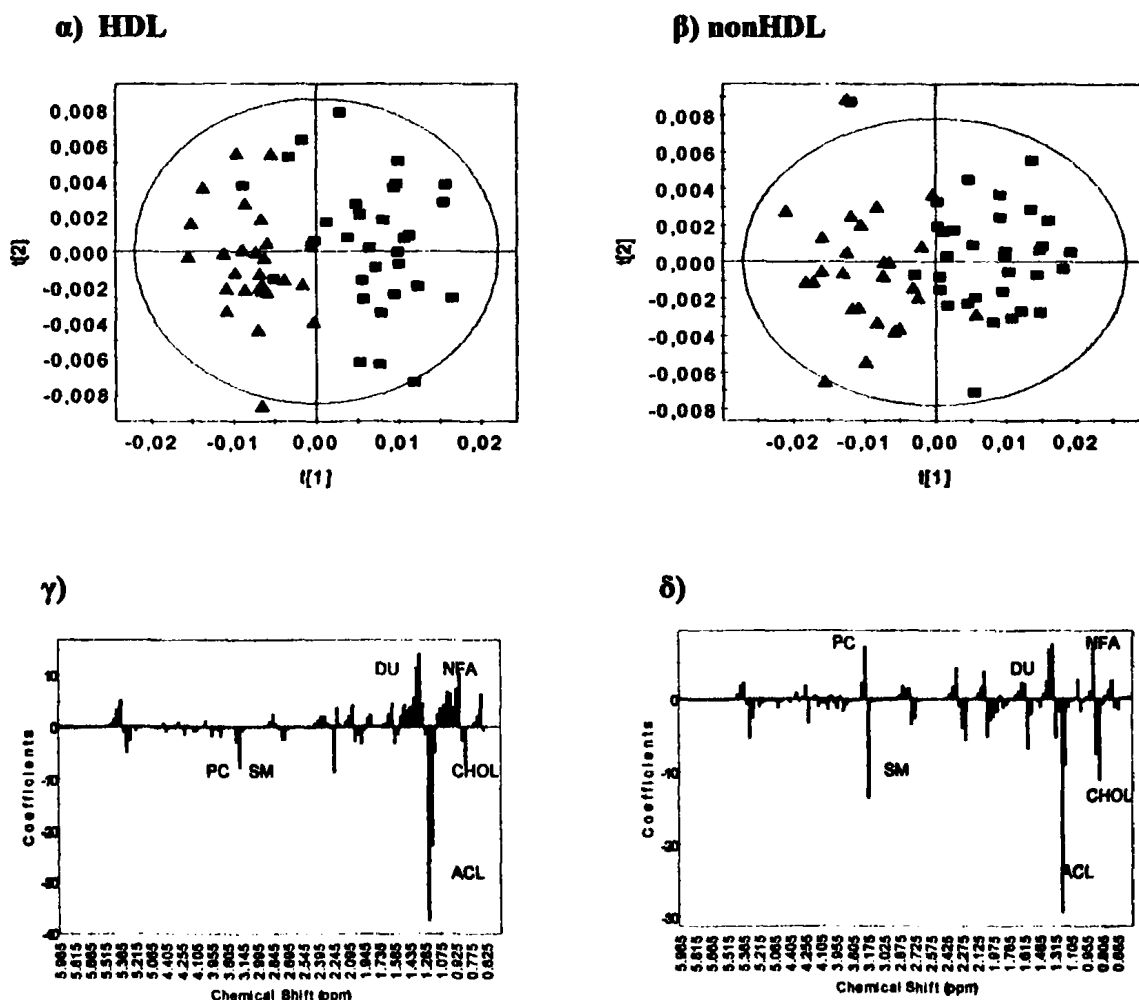
ζ)



η)



Εικόνα 1.8-6: α-β) Τα PCA γραφήματα συντεταγμένων των  $^1\text{H}$  NMR HDL και nonHDL δεδομένων των 26 ασθενών με υψηλότερα ( $\blacktriangle$ ) και 27 ασθενών με χαμηλότερα ( $\blacksquare$ ) επίπεδα HDL-C με νόσο 3 αγγείων και 33 ασθενών με υψηλότερα ( $\blacktriangle$ ) και 9 ασθενών με χαμηλότερα ( $\blacksquare$ ) επίπεδα HDL-C με φυσιολογικά αγγεία, γ-δ) Τα PLS-DA γραφήματα συντεταγμένων, ε-στ) Τα αντίστοιχα γραφήματα των συντελεστών παλινδρόμησης, ζ-η) Τα OSC/PLS-DA γραφήματα συντεταγμένων για τα HDL και nonHDL στατιστικά μοντέλα, θ-ι) Τα αντίστοιχα γραφήματα των συντελεστών παλινδρόμησης.



Εικόνα 1.8-7: α-β) Τα OSC/PLS-DA γραφήματα συντεταγμένων των  $^1\text{H}$  NMR HDL και nonHDL δεδομένων των 26 ασθενών με υψηλότερα ( $\blacktriangle$ ) επίπεδα HDL-C με νόσο 3 αγγείων και 33 αντίστοιχα ( $\blacksquare$ ), με φυσιολογικά αγγεία, γ-δ) Τα αντίστοιχα γραφήματα των συντελεστών παλινδρόμησης.

## 1.9. Συζήτηση

Στην παρούσα διατριβή αναπτύχθηκε η μεθοδολογία ανάλυσης της ποιοτικής και ποσοτικής λιπιδιακής σύστασης των λιποπρωτεϊνών με βάση την φασματοσκοπία  $^1\text{H}$  NMR. Στη συνέχεια, μελετήθηκαν οι διαταραχές στη σύσταση των HDL και nonHDL λιποπρωτεϊνών που λαμβάνουν χώρα σε καταστάσεις δυσλιπιδαιμίας και εγκατεστημένης καρδιαγγειακής νόσου και διερευνήθηκε η εφαρμογή των τεχνικών αναγνώρισης προτύπων στα  $^1\text{H}$  NMR φάσματα των εκχυλισμάτων των λιπιδίων των λιποπρωτεϊνών αυτών με σκοπό τη δημιουργία στατιστικών μοντέλων ικανών να προσεγγίσουν την παρουσία της εγκατεστημένης καρδιαγγειακής νόσου.

Στο πρώτο μέρος της διατριβής μελετήθηκε το  $^1\text{H}$  NMR φάσμα του εκχυλίσματος των λιπιδίων των HDL και nonHDL λιποπρωτεϊνών. Το φάσμα αυτό είναι αρκετά πολύπλοκο καθώς σε πολλές περιπτώσεις τα σήματα συντονισμού των πρωτονίων που αντιστοιχούν στα λιπίδια ή τα δομικά χαρακτηριστικά των λιπαρών οξέων αλληλεπικαλύπτονται, με αποτέλεσμα να είναι δύσκολη η ταυτοποίηση αλλά και ο ποσοτικός τους προσδιορισμός. Διερευνήθηκαν οι πειραματικές διαδικασίες στη λήψη και επεξεργασία των φασμάτων για τη βελτίωση της ευκρίνειας των σημάτων και επιλέχθηκαν εκείνα τα σήματα συντονισμού που ήταν αξιόπιστα για τον ποσοτικό προσδιορισμό.

Στο δεύτερο μέρος της διατριβής επιλέχθηκε ένα σύνολο ατόμων τα οποία κάλυπταν ένα ευρύ φάσμα επιπέδων λιπιδίων και υπολογίστηκε η % σύσταση των λιπιδίων και των λιπαρών οξέων των HDL λιποπρωτεϊνών. Έπειτα, μελετήθηκε η επίδραση των λιπιδαιμικών παραμέτρων του ορού στη σύσταση των HDL λιποπρωτεϊνών.

Στο τρίτο μέρος της διατριβής, τα άτομα της προηγούμενης ενότητας χωρίστηκαν σε 3 ομάδες, με βάση τα επίπεδα των λιπιδίων: στα άτομα με φυσιολογικά επίπεδα, υπερχοληστερολαιμία και μικτή υπερλιπιδαιμία, στις οποίες συγκρίθηκε η % λιπιδιακή σύσταση των HDL και nonHDL λιποπρωτεϊνών. Οι ασθενείς με μικτή υπερλιπιδαιμία παρουσίασαν αξιοσημείωτες αλλαγές στην % λιπιδιακή σύσταση των HDL και nonHDL λιποπρωτεϊνών σε σχέση με τα άτομα με φυσιολογικά επίπεδα λιπιδίων, ενώ οι ασθενείς με υπερχοληστερολαιμία δεν παρουσίασαν εκτεταμένες αλλαγές όσον αφορά την % λιπιδιακή σύσταση των HDL σωματιδίων αλλά κυρίως των nonHDL σωματιδίων. Επίσης, μελετήθηκαν οι διαφορές στην % λιπιδιακή σύσταση των HDL και nonHDL λιποπρωτεϊνών ασθενών με καρδιαγγειακή νόσο σε σχέση με τους ασθενείς με φυσιολογικά αγγεία τεκμηριωμένα αγγειογραφικά. Οι ασθενείς με νόσο 3 αγγείων παρουσίασαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στην % λιπιδιακή σύσταση των HDL και nonHDL λιποπρωτεϊνών σε σχέση με αυτούς με φυσιολογικά αγγεία.

Στο τέταρτο και τελευταίο μέρος της διατριβής διερευνήθηκε η εφαρμογή τεχνικών αναγνώρισης προτύπων στη δημιουργία στατιστικών μοντέλων ικανών να προσεγγίσουν την παρουσία της καρδιαγγειακής νόσου. Για την μεταβονομική ανάλυση, αρχικά πραγματοποιήθηκε μια γενική επισκόπηση των πολυμεταβλητών δεδομένων με την τεχνική PCA και στη συνέχεια με την εφαρμογή των τεχνικών PLS-DA και OSC προέκυψαν στατιστικά μοντέλα τα οποία ήταν ικανά να

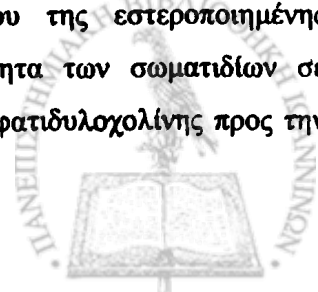
προβλέψουν με επιτυχία μέσω διαδικασιών εσωτερικής και εξωτερικής αξιολόγησης τη νόσο των αγγείων με επίπεδο εμπιστοσύνης >95%. Στη συνέχεια, εξετάστηκε η επίδραση του φύλου των ασθενών και των επιπέδων των τριγλυκεριδίων και της HDL-χοληστερόλης του ορού στην πρόβλεψη της νόσου. Το φύλο των ασθενών, τα επίπεδα των τριγλυκεριδίων του ορού, καθώς επίσης και τα επίπεδα της HDL-χοληστερόλης δεν επηρέασαν την πρόβλεψη της στεφανιαίας νόσου. Στο στατιστικό μοντέλο των nonHDL δεδομένων που δημιουργήθηκε με βάση τη νόσο των αγγείων και τα επίπεδα της HDL-χοληστερόλης φαίνεται ότι ο διαχωρισμός των δυο ομάδων ασθενών οφείλεται στα επίπεδα της HDL-χοληστερόλης, ενώ όταν δημιουργήθηκε μια ομοιογενής ομάδα ασθενών μόνο με υψηλά επίπεδα HDL-C με νόσο 3 αγγείων και φυσιολογικά αγγεία ο διαχωρισμός των ομάδων πραγματοποιήθηκε με βάση τη νόσο των αγγείων.

### **1.9.1. Προεπεξεργασία των δεδομένων**

Η επιλογή του εύρους της περιοχής ολοκλήρωσης (bin) και των μεθόδων κανονικοποίησης (normalization) και κεντραρίσματος (scaling) είναι τρεις παράμετροι που λαμβάνονται υπόψη στο στάδιο προεπεξεργασίας των πολυμεταβλητών δεδομένων διότι επηρεάζουν σημαντικά την ερμηνεία των αποτελεσμάτων. Όπως έχει προαναφερθεί η κορυφή της N-τριμεθυλομάδας της χολίνης σχάζεται σε δυο κορυφές από όπου μπορεί να υπολογιστεί ο λόγος των δυο φωσφολιπιδίων, της φωσφατιδυλοχολίνης και της σφιγγομυελίνης. Στη παρούσα διατριβή, επιλέχθηκε το εύρος της περιοχής του bin να είναι 0.03rrpm θέτοντας ως αρχή τα 0.505rrpm ώστε να είναι εφικτός ο διαχωρισμός των δυο φωσφολιπιδίων, καθώς το bin στα 3.175rrpm αντιστοιχεί στην σφιγγομυελίνη, ενώ στα 3.205rrpm στην φωσφατιδυλοχολίνη. Με τον τρόπο αυτό η εκτίμηση της συνεισφοράς των δυο φωσφολιπιδίων στο διαχωρισμό των υπό μελέτη ομάδων ήταν ακριβής. Η κανονικοποίηση των δεδομένων επιλέχθηκε να γίνει ως προς την ένταση του ολικού φάσματος και όχι ως προς την χοληστερόλη διότι οι συγκεντρώσεις των λιπιδίων παρουσιάζουν μεγάλη διατομική μεταβλητότητα κυρίως στις ομάδες των ασθενών (Craig et al., 2006).

### **1.9.2. Μελέτη επίδρασης των λιπιδαιμικών παραμέτρων του ορού στην % λιπιδιακή σύσταση των HDL λιποπρωτεϊνών**

Όπως είναι γνωστό, τα αυξημένα επίπεδα τριγλυκεριδίων του ορού συσχετίζονται με μειωμένα επίπεδα της HDL-χοληστερόλης και υψηλό κίνδυνο εμφάνισης καρδιαγγειακής νόσου (Assmann et al., 1992). Στην παρούσα μελέτη εντοπίστηκαν δυο σημαντικές μεταβολές στην % λιπιδιακή σύσταση των HDL σωματιδίων όταν τα τριγλυκερίδια του ορού αυξάνουν. Πρώτον, ο πυρήνας των HDL σωματιδίων εμπλουτίζεται σε τριγλυκερίδια και μειώνεται η περιεκτικότητά του σε εστεροποιημένη χοληστερόλη με αποτέλεσμα τη μείωση του λόγου της εστεροποιημένης χοληστερόλης προς τα τριγλυκερίδια και δεύτερον, η % περιεκτικότητα των σωματιδίων σε σφιγγομυελίνη μειώνεται με αποτέλεσμα την αύξηση του λόγου της φωσφατιδυλοχολίνης προς την



σφιγγομυελίνη. Πειραματικές μελέτες έχουν δείξει ότι η αυξημένη περιεκτικότητα του πυρήνα των HDL σωματιδίων σε τριγλυκερίδια έχει αρνητική επίδραση στη σταθερότητα των σωματιδίων, ενώ η αυξημένη περιεκτικότητα σε εστεροποιημένη χοληστερόλη θετική (Sparks et al., 1995). Η σφιγγομυελίνη επηρεάζει τη δομή των δισκοειδών και σφαιρικών ανασυνδυασμένων HDL σωματιδίων καθώς προκαλεί αλλαγή της διάταξης των πολικών ομάδων στην επιφάνεια και αναστέλλει την αντίδραση εστεροποίησης της χοληστερόλης που καταλύεται από το ένζυμο LCAT (Rye et al., 1996). Η εκροή της χοληστερόλης από τα κύτταρα συσχετίζεται θετικά με τα επίπεδα της HDL-σφιγγομυελίνης και αρνητικά με τα επίπεδα της HDL-φωσφατιδυλοαιθανολαμίνης (Fournier et al., 1997). Από προηγούμενες μελέτες έχει προκύψει ότι η αποτελεσματικότητα των HDL σωματιδίων στη μεταφορά της χοληστερόλης από τους περιφερικούς ιστούς στο ήπαρ μειώνεται στους υπερτριγλυκεριδαίμικους ασθενείς και ότι η δράση αυτή συσχετίζεται με αλλαγές στη σύσταση και το μέγεθός τους (Sparks et al., 1991, Sparks et al., 1995).

Όταν τα επίπεδα της HDL-χοληστερόλης αυξάνουν, ο πυρήνας των σωματιδίων εμπλουτίζεται σε εστεροποιημένη χοληστερόλη, ενώ μειώνεται η περιεκτικότητά του σε τριγλυκερίδια με αποτέλεσμα την αύξηση του λόγου της εστεροποιημένης χοληστερόλης προς τα τριγλυκερίδια και όπως προαναφέρθηκε τη σταθερότητα των σωματιδίων (Sparks et al., 1995). Μια άλλη αλλαγή στη δομή των HDL σωματιδίων που συσχετίζεται με την αύξηση των επιπέδων της HDL-χοληστερόλης είναι η αύξηση της περιεκτικότητας σε ελεύθερη χοληστερόλη και του λόγου της ελεύθερης χοληστερόλης προς τα φωσφολιπίδια. Πειραματικές μελέτες έχουν δείξει ότι η μειωμένη εκροή της χοληστερόλης συσχετίζεται με την μείωση του λόγου των φωσφολιπιδίων προς την ελεύθερη χοληστερόλη λόγω της μείωσης της περιεκτικότητας των φωσφολιπιδίων (Kuksis et al., 1982, Johnson et al., 1986, Davit-Spraul et al., 1999), ενώ η μείωση του λόγου λόγω της αύξησης της ελεύθερης χοληστερόλης δεν επηρεάζει την εκροή της χοληστερόλης (Johnson et al., 1986, Davit-Spraul et al., 1999).

Ένα στατιστικά ισχυρό εύρημα που προέκυψε από την παρούσα μελέτη είναι η αρνητική συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων των τριγλυκεριδίων του ορού και της % περιεκτικότητας των HDL σωματιδίων σε λινελαϊκό οξύ. Σε μελέτη στην οποία συμμετείχαν ασθενείς με έμφραγμα του μυοκαρδίου και υγιή άτομα βρέθηκε ότι οι ασθενείς με έμφραγμα του μυοκαρδίου παρουσίασαν μειωμένα επίπεδα HDL-φωσφολιπιδίων και λινελαϊκού οξέος σε σχέση με τους υγιείς. Οι αλλαγές αυτές επηρέασαν τη δραστηριότητα της απολιποπρωτεΐνης AI και πιθανά τα χαμηλά επίπεδα λινελαϊκού οξέος στα HDL σωματίδια αποτελούν ένα επιπρόσθετο αθηρογόνο χαρακτηριστικό της μικτής υπερλιπιδαιμίας (Marques-Vidal et al., 1995).

### 1.9.3. Μελέτη ασθενών με δυσλιπιδαιμία

Οι ασθενείς με υπερχοληστερολαιμία δεν παρουσίασαν στατιστικά σημαντικές διαφορές όσον αφορά την % σύσταση των λιπιδίων και των λιπαρών οξέων των HDL σωματιδίων σε σύγκριση με τα

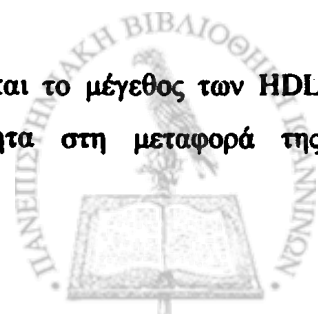
άτομα με φυσιολογικά επίπεδα λιπιδίων, παρά μόνο μια στατιστικά σημαντική υψηλότερη % περιεκτικότητα σε ελεύθερη χοληστερόλη και τον λόγο της ελεύθερης χοληστερόλης προς τα φωσφολιπίδια. Όπως προαναφέρθηκε, η μείωση του λόγου λόγω της αύξησης της ελεύθερης χοληστερόλης δεν επηρεάζει την εκροή της χοληστερόλης και για το λόγο αυτό δεν θεωρείται ως πιθανό αθηρογόνο χαρακτηριστικό της υπερχοληστερολαιμίας (Johnson et al., 1986, Davit-Spraul et al., 1999). Οι ασθενείς με υπερχοληστερολαιμία παρουσίασαν στατιστικά σημαντική αύξηση στην % περιεκτικότητα των nonHDL σωματιδίων σε ολική, ελεύθερη και εστεροποιημένη χοληστερόλη, ολικά φωσφολιπίδια, φωσφατιδυλοχολίνη και σφιγγομυελίνη και μείωση στην % περιεκτικότητα σε τριγλυκερίδια σε σχέση με τα άτομα με φυσιολογικά επίπεδα λιπιδίων. Το λιπιδαιμικό προφίλ του συνόλου των σωματιδίων αυτών στη δυσλιπιδαιμία και σε άλλες παθολογικές καταστάσεις ή πειραματικά μοντέλα δεν έχει μελετηθεί έτσι ώστε να συσχετισθούν τα ευρήματα αυτά με πιθανούς παθοφυσιολογικούς μηχανισμούς.

Οι ασθενείς με μικτή υπερλιπιδαιμία παρουσίασαν στατιστικά σημαντικά χαμηλότερη % περιεκτικότητα των HDL σωματιδίων σε ολική χοληστερόλη, κυρίως της εστεροποιημένης και υψηλότερη περιεκτικότητα σε τριγλυκερίδια σε σχέση με τα άτομα με φυσιολογικά επίπεδα λιπιδίων με αποτέλεσμα να επηρεαστεί ο λόγος της εστεροποιημένης χοληστερόλης προς τα τριγλυκερίδια. Όπως προαναφέρθηκε η αποτελεσματικότητα των HDL σωματιδίων στη μεταφορά της χοληστερόλης από τους περιφερικούς ιστούς στο ήπαρ μειώνεται στους υπερτριγλυκεριδαιμικούς ασθενείς και οφείλεται σε αλλαγές στη λιπιδιακή σύσταση του πυρήνα και το μέγεθος των σωματιδίων αυτών (Sparks et al., 1991, Sparks et al., 1995). Οι ασθενείς με μικτή υπερλιπιδαιμία παρουσίασαν στατιστικά σημαντικά χαμηλότερη περιεκτικότητα των nonHDL σωματιδίων σε ολική, ελεύθερη και εστεροποιημένη χοληστερόλη, σε φωσφολιπίδια κυρίως λόγω της σφιγγομυελίνης και υψηλότερη περιεκτικότητα σε τριγλυκερίδια σε σχέση με τα άτομα με φυσιολογικά επίπεδα λιπιδίων. Επίσης, παρουσίασαν υψηλότερη περιεκτικότητα σε μονοακόρεστα λιπαρά οξέα και χαμηλότερη σε λινελαϊκό οξύ σε σχέση με τα άτομα με φυσιολογικά επίπεδα λιπιδίων.

#### **1.9.4. Μελέτη ασθενών με εγκατεστημένη καρδιαγγειακή νόσο**

Οι ασθενείς με νόσο 3 αγγείων παρουσίασαν στατιστικά σημαντικά χαμηλότερη περιεκτικότητα των HDL σωματιδίων σε ολική, ελεύθερη και εστεροποιημένη χοληστερόλη, σφιγγομυελίνη και υψηλότερη περιεκτικότητα σε τριγλυκερίδια σε σύγκριση με τους ασθενείς με φυσιολογικά αγγεία. Οι αλλαγές αυτές συνέβαλαν στην παρατηρούμενη, στους ασθενείς αυτούς, μείωση των λόγων της εστεροποιημένης χοληστερόλης προς τα τριγλυκερίδια και της ελεύθερης χοληστερόλης προς τα φωσφολιπίδια και σε αύξηση του λόγου της φωσφατιδυλοχολίνης προς την σφιγγομυελίνη σε σύγκριση με τους ασθενείς με φυσιολογικά αγγεία.

Όπως ήδη προαναφέρθηκε, οι αλλαγές στη λιπιδιακή σύσταση και το μέγεθος των HDL σωματιδίων επηρεάζουν τη σταθερότητα και την αποτελεσματικότητα στη μεταφορά της



χοληστερόλης από τους περιφερικούς ιστούς στο ήπαρ (Sparks et al., 1991, Sparks et al., 1995). Η σφιγγομυελίνη επηρεάζει τη δομή και τη σταθερότητα των HDL (Rye et al., 1996) και συσχετίζεται θετικά με την αύξηση της εκροής της χοληστερόλης από τα κύτταρα (Fournier et al., 1997).

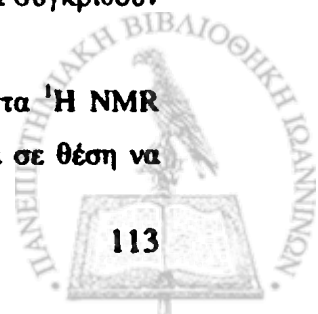
Κλινικές μελέτες έχουν δείξει ότι οι ασθενείς με καρδιαγγειακή νόσο παρουσιάζουν μειωμένα επίπεδα HDL-φωσφολιπιδίων και ότι η σοβαρότητα της νόσου παρουσιάζει ισχυρότερη συσχέτιση με την μείωση των HDL-φωσφολιπιδίων από ότι με την HDL-χοληστερόλη (Kunz et al., 1994, Naito et al., 1980). Σε πρόσφατη κλινική μελέτη, στην οποία συμμετείχαν 87 μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες εκ των οποίων οι 55 με καρδιαγγειακή νόσο επιβεβαιωμένη αγγειογραφικά και οι 32 αποτέλεσαν την ομάδα ελέγχου, διερευνήθηκε η συσχέτιση των λιπιδαιμικών παραμέτρων του ορού και της σύστασης των HDL-φωσφολιπιδίων με την καρδιαγγειακή νόσο. Μεταξύ των παραμέτρων των HDL σωματιδίων που μελετήθηκαν, τα μειωμένα επίπεδα της HDL-σφιγγομυελίνης είχαν την ισχυρότερη συσχέτιση με την παρουσία της καρδιαγγειακής νόσου και ήταν η μόνη παράμετρος με σημαντική και ανεξάρτητη συσχέτιση με τον αριθμό των στεφανιαίων στενώσεων (Horter et al., 2002).

Οι ασθενείς με εγκατεστημένη καρδιαγγειακή νόσο 3 αγγείων παρουσίασαν μείωση στην % περιεκτικότητα των HDL σωματιδίων σε ελεύθερη χοληστερόλη και του λόγου της ελεύθερης χοληστερόλης προς τα φωσφολιπίδια σε σχέση με τους ασθενείς με φυσιολογικά αγγεία. Η περιεκτικότητα της ελεύθερης χοληστερόλης στο HDL<sub>2</sub> υποκλάσμα είναι 4-5 φορές μεγαλύτερη από αυτή στο HDL<sub>3</sub> (Moshides., 1987). Συνεπώς τα υψηλά επίπεδα ελεύθερης χοληστερόλης στα HDL σωματίδια των ασθενών με φυσιολογικά αγγεία υποδηλώνουν την ύπαρξη κυρίως HDL<sub>2</sub> σωματιδίων και κατά συνέπεια τα χαμηλότερα επίπεδα που παρουσιάζονται κυρίως στους ασθενείς με εγκατεστημένη καρδιαγγειακή νόσο θεωρούνται ένα επιπρόσθετο αθηρογόνο χαρακτηριστικό.

Σε μεγάλες επιδημιολογικές μελέτες έχει διερευνηθεί ο ρόλος της διατροφής και της σύστασης των λιπαρών οξέων του ορού στον κίνδυνο ανάπτυξης καρδιαγγειακής νόσου (Ascherio., 2002, Kris-Etherton et al., 2002, Von Schacky et al., 2004, Lopez-Garcia et al., 2004).

Στατιστικά σημαντικές διαφορές παρατηρήθηκαν στη λιπιδιακή σύσταση και τη σύσταση των λιπαρών οξέων των nonHDL σωματιδίων μεταξύ των ασθενών με καρδιαγγειακή νόσο 3 αγγείων και αυτών με φυσιολογικά αγγεία. Οι ασθενείς με καρδιαγγειακή νόσο παρουσίασαν στατιστικά σημαντική αύξηση στην % περιεκτικότητα σε ολική, ελεύθερη και εστεροποιημένη χοληστερόλη και σφιγγομυελίνη σε σχέση με τους ασθενείς με φυσιολογικά αγγεία. Επίσης, οι ασθενείς με νόσο 3 αγγείων παρουσίασαν χαμηλότερα επίπεδα μονοακόρεστων λιπαρών οξέων, αραχιδονικού και εικοσιπεντενοϊκού οξέος και εικοσιδυενοϊκού οξέος σε σχέση με τα άτομα με φυσιολογικά αγγεία. Το προφίλ της λιπιδιακής σύστασης των nonHDL σωματιδίων στην εγκατεστημένη καρδιαγγειακή νόσο ή πειραματικά μοντέλα που να συσχετίζονται με τη νόσο δεν έχει μελετηθεί, έτσι ώστε να συγκριθούν με τα ευρήματα της παρούσας μελέτης.

Τέλος, διερευνήθηκε εάν η εφαρμογή των τεχνικών αναγνώρισης προτύπων στα <sup>1</sup>H NMR φάσματα των εκχυλισμάτων των λιπιδίων των HDL και nonHDL λιποπρωτεϊνών είναι σε θέση να



διακρίνει την εγκατεστημένη καρδιαγγειακή νόσο. Από τα αρχικά PLS-DA HDL και nonHDL στατιστικά μοντέλα που δημιουργήθηκαν με βάση τη νόσο των αγγείων προέκυψε ότι οι ασθενείς με νόσο 3 αγγείων παρουσίασαν σημαντικές διαφοροποιήσεις σε σύγκριση με τα άτομα με φυσιολογικά αγγεία τεκμηριωμένα αγγειογραφικά. Στο HDL στατιστικό μοντέλο, οι ασθενείς με νόσο 3 αγγείων παρουσίασαν κυρίως χαμηλότερα επίπεδα χοληστερόλης, μεγαλύτερο μήκος αλυσίδας λιπαρών οξέων, χαμηλότερα επίπεδα βαθμού ακορεστότητας και φωσφατιδυλοχολίνης, υψηλότερα επίπεδα μονοακόρεστων λιπαρών οξέων και τέλος, χαμηλότερο αριθμό λιπαρών οξέων σε σύγκριση με τα άτομα με φυσιολογικά αγγεία. Στο nonHDL στατιστικό μοντέλο οι ασθενείς με νόσο 3 αγγείων παρουσίασαν μεγαλύτερο μήκος αλυσίδας και αριθμό λιπαρών οξέων, χαμηλότερο βαθμό ακορεστότητας, υψηλότερα επίπεδα μονοακόρεστων λιπαρών οξέων, σφιγγομυελίνης και χοληστερόλης.

Με τη εφαρμογή της τεχνικής φιλτραρίσματος ο διαχωρισμός των δυο ομάδων ασθενών ήταν σαφής. Από το OSC/PLS-DA HDL στατιστικό μοντέλο προέκυψε ότι οι ασθενείς με νόσο 3 αγγείων παρουσίασαν μεγαλύτερο μήκος αλυσίδας και αριθμό λιπαρών οξέων, χαμηλότερο βαθμό ακορεστότητας και επίπεδα χοληστερόλης σε σύγκριση με τα άτομα με φυσιολογικά αγγεία. Αντίστοιχα, από το nonHDL στατιστικό μοντέλο, οι ασθενείς με νόσο 3 αγγείων παρουσίασαν μεγαλύτερο μήκος αλυσίδας και αριθμό λιπαρών οξέων, χαμηλότερο βαθμό ακορεστότητας, υψηλότερα επίπεδα μονοακόρεστων λιπαρών οξέων και χαμηλότερα επίπεδα χοληστερόλης σε σύγκριση με τους ασθενείς με φυσιολογικά αγγεία.

Τα αποτελέσματα που προέκυψαν με την μεταβονομική ανάλυση συμφωνούσαν σε μεγάλο βαθμό με αυτά που προέκυψαν από την ποσοτική ανάλυση των συστατικών των λιπιδίων από το φάσμα NMR.

Στη διεθνή βιβλιογραφία υπάρχουν δυο προηγούμενες μεταβονομικές μελέτες στις οποίες διερευνήθηκε η ικανότητα των τεχνικών PR να διαγνώσουν την παρουσία στεφανιαίας νόσου. Και στις δυο μελέτες χρησιμοποιήθηκαν δείγματα ολικού ορού στον οποίο οι λιποπρωτεΐνες είναι άθικτα σωματίδια και όχι σε μορφή αποδιατεταγμένων λιπιδίων και στο ίδιο δείγμα συνυπάρχουν τα HDL και nonHDL σωματίδια. Επίσης, στα δείγματα ορού συνυπάρχουν οι πρωτεΐνες του πλάσματος καθώς και πολλοί μεταβολίτες μικρού μοριακού βάρους. Η παρούσα μελέτη είναι η πρώτη που αναλύει τη σύσταση των HDL και nonHDL σωματιδίων με όρους μεταβονομικής.

Τα αποτελέσματα της παρούσας διατριβής συμφωνούν με τη μελέτη που δημοσιεύτηκε από τον Nicholson και τους συνεργάτες του το 2002, που προκύπτει ότι οι μεθυλο και μεθυλενομάδες των λιπαρών οξέων, η ομάδα της χολίνης των φωσφολιπιδίων κυρίως των HDL λιποπρωτεϊνών συνεισφέρουν σημαντικά στον διαχωρισμό των ασθενών με νόσο 3 αγγείων από αυτούς με φυσιολογικά αγγεία (Brindle et al., 2002). Σε πρόσφατη κλινική μελέτη που πραγματοποιήθηκε σε δείγματα ολικού ορού ασθενών με καρδιαγγειακή νόσο διερευνήθηκε η επίδραση του φύλου των ασθενών και της χορήγησης στατινών στη διάγνωση της στεφανιαίας νόσου. Τα αποτελέσματα της

μελέτης αυτής, με τα οποία δεν συμφωνούν τα αντίστοιχα της παρούσας διατριβής, έδειξαν ότι το φύλο των ασθενών επηρέασε σημαντικά την ικανότητα της μεθόδου να διαγνώσει τη νόσο και σε μικρότερο αλλά σημαντικό βαθμό η θεραπεία με στατίνες. Επιπρόσθετα, η πρόβλεψη για την ομάδα των ασθενών με φυσιολογικά αγγεία και τους ασθενείς με νόσο 3 αγγείων ήταν σωστή μόνο κατά 80.3% σ' αυτούς που δεν χορηγήθηκαν στατίνες και 61.3% σ' αυτούς που χορηγήθηκαν. Οι φασματικές περιοχές που συνέβαλαν στον διαχωρισμό μεταξύ των ανδρών και των γυναικών αντιστοιχούσαν στις μεθυλενο- και μεθυλομάδες των λιπαρών οξέων (Kirschenlohr et al., 2006). Στη συνέχεια, δημιουργήθηκαν στην παρούσα μελέτη τα HDL και nonHDL μοντέλα συνυπολογίζοντας εκτός από τη νόσο των αγγείων και 1) το φύλο των ασθενών, 2) τα επίπεδα των τριγλυκεριδίων του ορού των ασθενών και 3) τα επίπεδα της HDL-χοληστερόλης. Η διάκριση των δυο ομάδων ασθενών πραγματοποιήθηκε με βάση τη νόσο των αγγείων και όχι με κάποια από τις άλλες παραμέτρους που εξετάστηκαν.

Από τα HDL και nonHDL στατιστικά μοντέλα που δημιουργήθηκαν στην παρούσα μελέτη με βάση τις δυο παραμέτρους προέκυψε ότι τα συστατικά των λιπιδίων των λιποπρωτεϊνών που συνέβαλαν στον διαχωρισμό των δυο ομάδων συμφωνούσαν σχεδόν σε απόλυτο βαθμό, αλλά με διαφορετική σειρά σημαντικότητας με τα αντίστοιχα συστατικά που συνέβαλαν στον διαχωρισμό των δυο ομάδων με βάση τη νόσο των αγγείων. Οι τιμές των  $R^2$  και  $Q^2$  παραμέτρων των HDL και nonHDL στατιστικών μοντέλων που δημιουργήθηκαν με βάση τις δυο παραμέτρους ήταν σχετικά μειωμένες σε σχέση με τις αντίστοιχες που δημιουργήθηκαν με βάση τη νόσο των αγγείων.

### 1.10. Συμπεράσματα

Στην παρούσα διατριβή αναπτύχθηκε η μεθοδολογία για την ανάλυση της λιπιδιακής σύστασης των εκχυλισμάτων των λιπιδίων των HDL και nonHDL λιποπρωτεϊνών του πλάσματος με φασματοσκοπία  $^1\text{H}$  NMR και εφαρμόστηκε για τη διερεύνηση των αλλαγών της % λιπιδιακής σύστασης των λιποπρωτεϊνών αυτών στη δυσλιπιδαιμία και την εγκατεστημένη καρδιαγγειακή νόσο και τη συσχέτιση των λιπιδαιμικών παραμέτρων του ορού με τη σύσταση των HDL σωματιδίων σε ασθενείς που κάλυπταν ένα ευρύ φάσμα επιπέδων λιπιδίων. Οι ασθενείς με μικτή υπερλιπιδαιμία παρουσίασαν σημαντικές αλλαγές στην λιπιδιακή σύσταση των HDL και nonHDL λιποπρωτεϊνών σε σχέση με τα άτομα με φυσιολογικά επίπεδα λιπιδίων, ενώ οι ασθενείς με υπερχοληστερολαιμία δεν παρουσίασαν εκτεταμένες αλλαγές όσον αφορά την % λιπιδιακή σύσταση των HDL σωματιδίων αλλά κυρίως των nonHDL σωματιδίων. Οι ασθενείς με εγκατεστημένη νόσο 3 αγγείων παρουσίασαν σημαντικές αλλαγές στη λιπιδιακή σύσταση των λιποπρωτεϊνών αυτών σε σχέση με τα άτομα με φυσιολογικά αγγεία.

Η ανάλυση με φασματοσκοπία  $^1\text{H}$  NMR της λιπιδιακής σύστασης των εκχυλισμάτων των λιπιδίων των HDL και nonHDL λιποπρωτεϊνών σε παθολογικές καταστάσεις φαίνεται ότι μπορεί να συμβάλει στην καλύτερη κατανόηση των παθοφυσιολογικών μηχανισμών που τις συνοδεύουν και να αναδείξει ως νέους αθηρογόνους δείκτες, συστατικά τα οποία δεν προσδιορίζονται με τις καθιερωμένες βιοχημικές μεθόδους. Επίσης, η μελέτη αυτή φαίνεται ότι μπορεί να συμβάλει στην διερεύνηση της επίδρασης φυσιολογικών παραγόντων στους μηχανισμούς αυτούς, όπως η διατροφή και η άσκηση και τέλος διευρύνει πέραν της χοληστερόλης, τον έλεγχο της επίδρασης της υπολιπιδαιμικής αγωγής.

Η μεταβονομική προσέγγιση των ασθενών με εγκατεστημένη καρδιαγγειακή νόσο επέτρεψε τη σαφή διάκριση των ασθενών με νόσο 3 αγγείων από εκείνους με φυσιολογικά αγγεία. Η συλλογή δεδομένων από ένα μεγαλύτερο αριθμό ασθενών καθώς και ο έλεγχος της επίδρασης και άλλων φυσιολογικών ή παθολογικών παραγόντων θα μπορέσει πιθανά να οδηγήσει στη δημιουργία μιας αξιόπιστης βάσης δεδομένων που θα αφορά τη νόσο. Ιδιαίτερης σημασίας θα είναι η συλλογή δεδομένων που χαρακτηρίζουν τα πρώιμα στάδια της νόσου έτσι ώστε η μέθοδος να συμβάλει στην έγκαιρη παρέμβαση στους ασθενείς αυτούς.

Η παρούσα μελέτη εντάσσεται στην προσπάθεια που καταβάλλεται για την πλήρη καταγραφή του μεταβολικού προφίλ των βιολογικών υγρών του ανθρώπου, στα πλαίσια του Human Metabolome Project (<http://www.metabolomics.ca/index.htm>). Το πρωτόκολλο αυτό ξεκίνησε τον Ιανουάριο του 2005 με σκοπό την ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση όλων των ανιχνεύσιμων μεταβολιτών ( $>1\mu\text{M}$ ) του ανθρώπινου οργανισμού και έχει οδηγήσει στην δημιουργία της πληρέστερης αυτή τη στιγμή τράπεζας μεταβολομικών δεδομένων στον κόσμο (προερχόμενων και από τη φασματοσκοπία NMR), τα οποία συλλέγονται από τη διεθνή βιβλιογραφία καθώς και από άλλες ηλεκτρονιακές βάσεις δεδομένων (Wishart et al., 2007).

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΣΤΗΝ ΕΛΛΗΝΙΚΗ

Οι λιποπρωτεΐνες του πλάσματος είναι μακρομοριακά συμπλέγματα λιπιδίων (χοληστερόλης, εστέρων της χοληστερόλης, τριγλυκεριδίων και φωσfolιπιδίων) και απολιποπρωτεϊνών. Αποτελούνται από έναν μη πολικό, υδρόφοβο πυρήνα τριγλυκεριδίων και εστέρων της χοληστερόλης ο οποίος περιβάλλεται από μια πολική, υδρόφιλη επιφανειακή στιβάδα που περιέχει φωσfolιπίδια, ελεύθερη χοληστερόλη και απολιποπρωτεΐνες. Μεταβολές τις λιπιδιακής σύστασης και της συνολικής δομής των λιποπρωτεϊνικών σωματιδίων του πλάσματος συνοδεύουν τη δυσλιπιδαιμία και έχουν συσχετισθεί με παθολογικές καταστάσεις όπως η καρδιαγγειακή και νεφρική νόσος και η υπέρταση.

Οι καθιερωμένες τεχνικές για την ανάλυση των λιποπρωτεϊνικών σωματιδίων αν και εκπρέζουν την ταυτόχρονη ανίχνευση και ποσοτικοποίηση των λιπιδίων δεν χρησιμοποιούνται ευρέως στην κλινική πράξη διότι είναι αρκετά χρονοβόρες, απαιτούν προεργασία του δείγματος σε πολλά στάδια και συχνά είναι απαραίτητος ο συνδυασμός περισσότερων από μια τεχνικών. Εναλλακτικά, η φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού πρωτονίου ( $^1\text{H}$  NMR) είναι μια μη επεμβατική αναλυτική τεχνική για τη μελέτη της λιπιδιακής σύστασης και της μοριακής δομής των λιποπρωτεϊνών του πλάσματος, καθώς και τη μέτρηση των λιποπρωτεϊνικών υποκλασμάτων. Η μέθοδος αυτή, με μικρή ή καθόλου προεργασία του δείγματος και χωρίς χημική τροποποίηση, παρέχει μια γρήγορη και συνολική ανάλυση των λιπιδίων, τα συστατικά των οποίων εμφανίζονται με χαρακτηριστικό για τη δομή τους σήμα, η ένταση του οποίου είναι ανάλογη της συγκέντρωσής τους.

Τις τελευταίες δυο δεκαετίες, η φασματοσκοπία  $^1\text{H}$  NMR σε συνδυασμό με τις τεχνικές αναγνώρισης προτύπων έχει εφαρμοστεί για τον καθορισμό του μεταβολικού προφίλ των βιολογικών υγρών σε πειραματικά μοντέλα με σκοπό τη διερεύνηση της αποτελεσματικότητας της χορήγησης φαρμάκων, την ανίχνευση και ταυτοποίηση δεικτών τοξικότητας και βλάβης συγκεκριμένων ζωτικών οργάνων, καθώς επίσης και την κατανόηση των μηχανισμών των μεταβολικών αποκρίσεων. Σε μακρότερο βαθμό έχει εφαρμοστεί στην διερεύνηση της σχέσης του μεταβολικού προφίλ του ορού και των παθολογικών καταστάσεων σε κλινικές μελέτες.

Στην παρούσα διατριβή αναπτύχθηκε η μεθοδολογία για την ανάλυση της λιπιδιακής σύστασης των λιποπρωτεϊνών με φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού πρωτονίου και η εφαρμογή της στη μελέτη των διαταραχών της σύστασης των HDL και nonHDL λιποπρωτεϊνών που λαμβάνουν χώρα στη δυσλιπιδαιμία και την εγκατεστημένη καρδιαγγειακή νόσο. Επίσης, εφαρμόστηκαν οι τεχνικές αναγνώρισης προτύπων (Pattern Recognition Techniques) στα  $^1\text{H}$  NMR φάσματα των εκχυλισμάτων των λιπιδίων των λιποπρωτεϊνών του πλάσματος με σκοπό τη δημιουργία στατιστικών μοντέλων ικανά να προσεγγίζουν την παρουσία της εγκατεστημένης καρδιαγγειακής νόσου.

Για τη μελέτη αυτή επιλέχθηκαν α) 105 άτομα, τα επίπεδα λιπιδίων των οποίων κάλυπταν ένα ευρύ φάσμα φυσιολογικών και παθολογικών τιμών. Στη συνέχεια χωρίστηκαν σε 3 ομάδες με βάση τα επίπεδα των λιπιδίων: άτομα με φυσιολογικά επίπεδα, υπερχοληστερολαιμία και μικτή υπερλιπιδαιμία

και β) 54 ασθενείς με επιβεβαιωμένο οξύ στεφανιαίο σύνδρομο με ανεπίπλεκτη κλινική πορεία και αγγειογραφικά εκτεταμένη στεφανιαία νόσο και 41 ασθενείς με φυσιολογικά αγγεία στη στεφανιογραφία. Μετρήθηκαν οι βιοχημικές και λιπιδαιμικές παράμετροι του ορού καθώς επίσης και οι απολιποπρωτεΐνες AI, B και E και η Lp(a). Η LDL-C υπολογίστηκε από την εξίσωση Friedewald, ενώ η nonHDL-C από τη διαφορά ολικής χοληστερόλης-HDL-C.

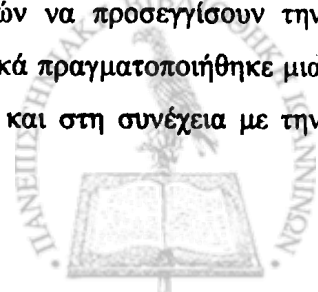
Η απομόνωση των HDL σωματιδίων πραγματοποιήθηκε με καταβύθιση των nonHDL λιποπρωτεϊνών με θειική δεξτράνη/MgCl<sub>2</sub>. Τα λιπίδια των δυο κλασμάτων εκχυλίστηκαν με μίγμα χλωροφορμίου:μεθανόλης. Πριν τη λήψη του φάσματος τα δείγματα των λιπιδίων επαναδιαλύθηκαν σε μίγμα δευτεριωμένων διαλυτών. Η λήψη των φασμάτων πραγματοποιήθηκε σε φασματογράφο Bruker Avance DRX-500 και DRX-600 σε θερμοκρασία 298°K.

Στο πρώτο μέρος της διατριβής μελετήθηκε το <sup>1</sup>H NMR φάσμα του εκχυλίσματος των λιπιδίων των HDL και nonHDL λιποπρωτεϊνών. Το φάσμα αυτό είναι αρκετά πολύπλοκο καθώς σε πολλές περιπτώσεις τα σήματα συντονισμού των πρωτονίων που αντιστοιχούν στα λιπίδια ή τα δομικά χαρακτηριστικά των λιπαρών οξέων αλληλεπικαλύπτονται, με αποτέλεσμα να είναι δύσκολη η ταυτοποίηση αλλά και ο ποσοτικός τους προσδιορισμός. Διερευνήθηκαν οι πειραματικές διαδικασίες στη λήψη και επεξεργασία των φασμάτων για τη βελτίωση της ευκρίνειας των σημάτων και επιλέχθηκαν εκείνα τα σήματα συντονισμού που ήταν αξιόπιστα για τον ποσοτικό προσδιορισμό.

Στο δεύτερο μέρος της διατριβής επιλέχθηκε ένα σύνολο ατόμων τα οποία κάλυπταν ένα ευρύ φάσμα επιπέδων λιπιδίων και υπολογίστηκε η % σύσταση των λιπιδίων και των λιπαρών οξέων των HDL λιποπρωτεϊνών. Έπειτα, μελετήθηκε η επίδραση των λιπιδαιμικών παραμέτρων του ορού στη σύσταση των HDL λιποπρωτεϊνών.

Στο τρίτο μέρος της διατριβής, τα άτομα της προηγούμενης ενότητας χωρίστηκαν σε 3 ομάδες με βάση τα επίπεδα των λιπιδίων: στα άτομα με φυσιολογικά επίπεδα, υπερχοληστερολαιμία και μικτή υπερλιπιδαιμία και συγκρίθηκε η % λιπιδιακή σύσταση των HDL και nonHDL λιποπρωτεϊνών. Οι ασθενείς με μικτή υπερλιπιδαιμία παρουσίασαν αξιοσημείωτες αλλαγές στην % λιπιδιακή σύσταση των HDL και nonHDL λιποπρωτεϊνών σε σχέση με τα άτομα με φυσιολογικά επίπεδα λιπιδίων, ενώ οι ασθενείς με υπερχοληστερολαιμία δεν παρουσίασαν εκτεταμένες αλλαγές όσον αφορά την % λιπιδιακή σύσταση των HDL σωματιδίων αλλά κυρίως των nonHDL. Επίσης, μελετήθηκαν οι διαφορές στην % λιπιδιακή σύσταση των HDL και nonHDL λιποπρωτεϊνών ασθενών με καρδιαγγειακή νόσο σε σχέση με τους ασθενείς με φυσιολογικά αγγεία τεκμηριωμένα αγγειογραφικά. Οι ασθενείς με νόσο 3 αγγείων παρουσίασαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στην % λιπιδιακή σύσταση των HDL και nonHDL λιποπρωτεϊνών σε σχέση με αυτούς με φυσιολογικά αγγεία.

Στο τέταρτο και τελευταίο μέρος της διατριβής διερευνήθηκε η εφαρμογή τεχνικών αναγνώρισης προτύπων για τη δημιουργία στατιστικών μοντέλων ικανών να προσεγγίσουν την παρουσία της καρδιαγγειακής νόσου. Για την μεταβονομική ανάλυση, αρχικά πραγματοποιήθηκε μια γενική επισκόπηση των πολυμεταβλητών δεδομένων με την τεχνική PCA και στη συνέχεια με την



εφαρμογή των τεχνικών PLS-DA και OSC προέκυψαν στατιστικά μοντέλα τα οποία ήταν ικανά να προβλέψουν με επιτυχία μέσω διαδικασιών εσωτερικής αξιολόγησης τη νόσο των αγγείων με επίπεδο εμπιστοσύνης >95%. Στη συνέχεια, εξετάστηκε η επίδραση του φύλου των ασθενών, των επιπέδων των τριγλυκεριδίων και της HDL-χοληστερόλης του ορού στην πρόβλεψη της νόσου. Οι παράμετροι αυτές δεν επηρέασαν την πρόβλεψη της στεφανιαίας νόσου.

Η ανάλυση με φασματοσκοπία <sup>1</sup>H NMR της λιπιδιακής σύστασης των εκχυλισμάτων των λιπιδίων των HDL και nonHDL λιποπρωτεϊνών σε παθολογικές καταστάσεις θα μπορούσε να συμβάλλει στην καλύτερη κατανόηση των παθοφυσιολογικών μηχανισμών που τις συνοδεύουν και να αναδείξει ως νέους αθηρογόνους δείκτες, συστατικά τα οποία δεν προσδιορίζονται με τις καθιερωμένες μεθόδους. Επίσης, θα μπορούσε να συμβάλλει στην διερεύνηση της επίδρασης φυσιολογικών παραγόντων στους μηχανισμούς αυτούς, όπως η διατροφή και η άσκηση και τέλος, να διευρύνει, πέραν της χοληστερόλης, τον έλεγχο της επίδρασης της υπολιπιδαιμικής αγωγής.

Η μεταβονομική προσέγγιση των ασθενών με εγκατεστημένη καρδιαγγειακή νόσο επέτρεψε τη σαφή διάκριση των ασθενών με νόσο 3 αγγείων από εκείνους με φυσιολογικά αγγεία. Η συλλογή δεδομένων από ένα μεγαλύτερο αριθμό ασθενών καθώς και ο έλεγχος της επίδρασης και άλλων φυσιολογικών ή παθολογικών παραγόντων θα μπορέσει πιθανά να οδηγήσει στη δημιουργία μιας αξιόπιστης βάσης δεδομένων που θα αφορά την εγκατεστημένη καρδιαγγειακή νόσο. Ιδιαίτερης σημασίας θα είναι η συλλογή δεδομένων που χαρακτηρίζουν τα πρώιμα στάδια της νόσου έτσι ώστε η μέθοδος να συμβάλλει στην έγκαιρη παρέμβαση στους ασθενείς αυτούς.

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΣΤΗΝ ΑΓΓΛΙΚΗ

Plasma lipoproteins are macromolecular complexes of lipids (free and esterified cholesterol, triglycerides and phospholipids) and proteins, called apolipoproteins. Lipoprotein particles have a spherical shape containing a hydrophobic core of non-polar cholesterol esters and triglycerides surrounded by an amphipathic surface of apolipoproteins, free cholesterol and phospholipids. Alterations in the lipid composition and overall structure of lipoprotein particles have been associated with pathological situations such as dyslipidemia, cardiovascular and renal disease and hypertension.

Conventional methods for the analysis of lipid composition in body fluids, cells and tissues such as thin-layer chromatography (TLC), high performance liquid chromatography (HPLC), ion-exchange chromatography, gas chromatography and mass spectrometry (GC-MS) provide a simultaneous detection and quantification of lipid classes. However, most of these assays are tedious and time-consuming, usually more than a single step is needed while specific pre-selection of the experimental conditions is required, rendering these techniques unsuitable for clinical use. High-resolution nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy has been used as a noninvasive and nondestructive analytical technique for the study of lipoproteins in intact plasma as well as isolated lipoproteins, yielding valuable information on lipid composition, molecular motion and structure.  $^1\text{H}$  NMR spectroscopy of lipid extracts provides a rapid and comprehensive overall lipid assay and can, in principle, yield the levels of all lipids present in a given sample without the need for chemical modification or prejudgment of the experimental conditions and thus may represent a useful tool for the studies of lipids in biology and medicine.

In the last two decades,  $^1\text{H}$  NMR spectroscopy coupled with pattern-recognition techniques has been applied for the determination of metabolic profile of biological fluids in experimental studies in order to study the effectiveness of drug administration, identification of toxicity markers and damage of specific organs and moreover, understanding of mechanisms of metabolic responses. To a lesser extend has been applied in the study of the association between serum metabolic profile and pathological situations in a clinical level.

The aim of the present thesis is the development of the methodology for the analysis of lipid composition of plasma lipoproteins with  $^1\text{H}$  NMR spectroscopy and the application in the study of alterations in the composition of HDL and nonHDL lipoproteins occurred in dyslipidemia and coronary heart disease. In addition, the aim of the present thesis is the application of pattern recognition techniques in the  $^1\text{H}$  NMR spectra of lipid extracts of these lipoproteins in order to construct statistical models able to approach the presence of CHD.

Serum samples from a) 105 individuals with a broad spectrum of lipid levels, normal or pathological and after divided in three groups based on lipid levels: normolipidemic individuals, hypercholesterolemic patients and patients with mixed hyperlipidemia and b) 54 patients with severe triple vessel coronary heart disease (TVD) and 41 patients with angiographically normal coronary

arteries (NCA). Analysis of clinical chemistry parameters of serum and apoAI, B, E and Lp(a) was carried out. LDL-C was calculated by the Friedewald formula and nonHDL-C was calculated as total cholesterol– HDL-C.

HDL lipoprotein particles were isolated from the nonHDL lipoproteins by precipitation with Dextran Sulfate/MgCl<sub>2</sub>. Lipid content was extracted with methanol/chloroform according to a modification of the Bligh and Dyer method. <sup>1</sup>H NMR spectra were recorded on a Bruker Avance DRX-500 and DRX-600 spectrometer at temperature 298°K.

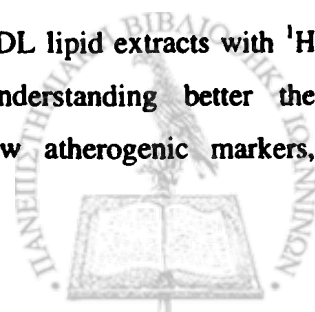
In the first part of the thesis was studied the <sup>1</sup>H NMR spectrum of lipid extracts of HDL and nonHDL lipoproteins. Signals attributed to cholesterol, in free and esterified form, triglycerides, phospholipids and fatty acid residues comprise the total lipid extract NMR fingerprint. Certain signals, having similar chemical nature with signals from other molecules, occur superimposed, whereas others appear well resolved having a unique chemical shift and are therefore suitable for identification and accurate quantification.

In the second part of the thesis selected individuals with a broad spectrum of lipid levels and calculated the % composition of lipids and fatty acids of HDL lipoproteins. Moreover, was studied the influence of serum lipidemic parameters in the composition of HDL lipoproteins.

In the third part, patients presented a broad spectrum of lipid levels divided in three groups based on lipid levels: normolipidemic individuals, patients with hypercholesterolemia and mixed dyslipidemia and studied the alterations in the lipid composition of HDL and nonHDL lipoproteins. Patients with mixed dyslipidemia presented significant alterations in the lipid composition of HDL and nonHDL lipoproteins compared to normolipidemic individuals, whereas patients with hypercholesterolemia did not exhibit extend alterations in the lipid composition of HDL particles but mainly of nonHDL particles. Moreover, studied the alterations in the % lipid composition of HDL and nonHDL lipoproteins of patients with CHD. Patients with TVD presented significant alterations in the lipid composition of HDL and nonHDL lipoproteins compared to those with angiographically NCA.

In the fourth part of the thesis, investigated the application of pattern recognition techniques to <sup>1</sup>H NMR spectra of lipid extracts of HDL and nonHDL lipoproteins in order to construct statistical models able to approach the presence of CHD. PCA was used for the overview of the metabonomic dataset and the spotting of outliers, and then for the detection of grouping or separation trend, whereas PLS-DA and OSC techniques resulted in statistical models which were able to predict via internal validation procedures CHD with a confidence limit >95%. After, examined the influence of gender, HDL-C and triglycerides levels in the predictive power of the method. Non of these parameters effected the prediction of CHD.

In conclusion, the analysis of lipid composition of HDL and nonHDL lipid extracts with <sup>1</sup>H NMR spectroscopy in pathological situations will contribute to understanding better the pathophysiological mechanisms accompanied them and elected as new atherogenic markers,



components which do not measured with the clasic methods. Also, would contribute to the examination of the effect of physiological factors, such as nutrition and exercise and finally, expand beyond cholesterol, the control of effect of lipid lowering therapy.

The metabonomic approach of patients with CHD allowed the distinct separation of patients with tripple vessel disease from those with normal coronary arteries. The collection of data from a large number of patients as well as the control of effect and other physiological or pathological factors would contribute to the creation of reliable data base concerning with CHD. It is worth to collect data characterizing the first stages of disease in order to contribute to the convenient intervention in these patients.

## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

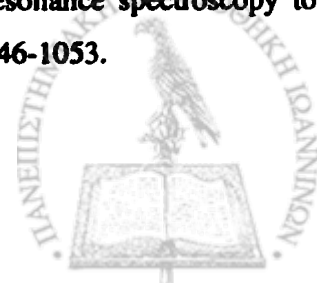
1. Διονυσίου-Αστερίου Αμαλία Γ. Αθηροσκλήρυνση. Βιοχημική Προσέγγιση. Ιατρικές εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδης. Αθήνα, 1997.
2. Ελισάφ Μ. Δυσλιπιδαιμία. Διάγνωση και αντιμετώπιση. Ιατρικές εκδόσεις Βαγιονάκης, Ιωάννινα 2003.
3. Μαυρομούστακος Θ. και Ματσούκας Ι. Αρχές και εφαρμογές φασματοσκοπίας πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού στην Ιατρική, Φαρμακευτική Χημεία, Βιοχημεία, Χημεία Τροφίμων. Εκδόσεις Γιάννης Β. Παρισιάνος, Αθήνα 2006.
4. Χατζηιωάννου Θ.Π. και Κουπαρη Μ.Α. Ενόργανη ανάλυση. Πανεπιστήμιο Αθηνών, Αθήνα 1997.
5. Adosraku RK, Choi GT, Constantinou-Kokotos V, Anderson MM, Gibbons WA. NMR lipid profiles of cells, tissues, and body fluids: proton NMR analysis of human erythrocyte lipids. *J Lipid Res* 1994; 35: 1925-1931.
6. Adosraku RK, Smith JD, Nicolaou A, Gibbons WA. *Tetrahymena thermophila*: analysis of phospholipids and phosphonolipids by high-field  $^1\text{H}$ -NMR. *Biochim Biophys Acta* 1996; 1299: 167-174.
7. Ala-Korpela M.  $^1\text{H}$ -NMR spectroscopy of human blood plasma. *Prog NMR Spectrosc* 1995; 27: 475-554.
8. Ascherio A. Epidemiological studies on dietary fats and coronary heart disease. *Am J Med* 2002;113: 9S-12S.
9. Assmann G, Cullen P, Schulte H. The Munster Heart Study (PROCAM): results of follow-up at 8 years. *Eur Heart J* 1998; 19 (Suppl A): A2-A11.
10. Assmann G, Schulte H. Relation of high density lipoprotein cholesterol and triglycerides to incidence of atherosclerotic coronary artery disease (the PROCAM experience). *Am J Cardiol* 1992; 70: 733-737.

11. Attua-ur-Rahman and Choudhary MI (1996). The second dimension in solving problems with NMR spectroscopy. 1<sup>st</sup> Edition, Academic Press, San Diego, CA, USA.
12. Bagdade JD, Buchanan WF, Pollare T, Lithell H. Abnormal lipoprotein phospholipid composition in patients with essential hypertension. *Atherosclerosis* 1995; 117: 209-215.
13. Baker PW, Rye KA, Gamble JR, Vadas MA, Barter PJ. Phospholipid composition of reconstituted high density lipoproteins influences their ability to inhibit endothelial cell adhesion molecule expression. *J Lipid Res* 2000; 41: 1261-1267.
14. Balstad TR, Holven KB, Ottestad IO, Otterdal K, Halvorsen B, Myhre AM, Ose L, Nenseter MS. Altered composition of HDL<sub>3</sub> in FH subjects causing a HDL subfraction with less atheroprotective function. *Clin Chim Acta* 2005; 359: 171-178.
15. Barter PJ, Baker PW, Rye KA. Effect of high-density lipoproteins on the expression of adhesion molecules in endothelial cells. *Curr Opin Lipidol* 2002; 13: 285-288.
16. Bligh EG, Dyer WJ. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol* 1959; 37: 911-917.
17. Bollard M, Keun HC, Beckonert O, Ebbels TMD, Antti H, Nicholls AW, Shockcor JP, Cantor GH, Stevens G, Lindon JC, Holmes E, Nicholson JK, Comparative metabonomics of differential hydrazine toxicity in the rat and mouse. *Toxicol Appl Pharmacol* 2005; 204: 135-151.
18. Braschi S, Neville TA, Vohl MC, Sparks DL. Apolipoprotein A-I charge and conformation regulate the clearance of reconstituted high density lipoprotein in vivo. *J Lipid Res* 1999; 40: 522-532.
19. Brindle J, Antti H, Holmes E, Tranter G, Nicholson JK, Bethell H, Clarke S, Schofield P, Mc Killigin E, Mosedale D, Grainger D. Rapid and noninvasive diagnosis of the presence and severity of coronary heart disease using <sup>1</sup>H-NMR-based metabonomics. *Nature Med* 2002; 8: 1439-1444.



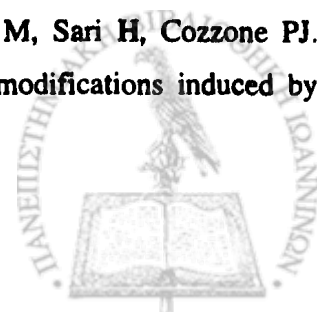
20. Brindle JT, Nicholson JK, Schofield PM, Grainger DJ, Holmes E. Application of chemometrics to <sup>1</sup>H NMR spectroscopic data to investigate a relationship between human serum metabolic profiles and hypertension. *Analyst* 2003; 128: 32-36.
21. Burstein M, Prawerman A. Turbidimetric determination of gamma globulins after precipitation by heparin and cobaltous chloride. *Rev Fr Etud Clin Biol* 1959; 4: 918-921.
22. Burstein M, Samaille J. Selective precipitation beta blood lipoproteins by heparin and synthetic heparinoids in the presence of calcium chloride. *J Physiol (Paris)* 1957; 49: 83-86.
23. Bylesjo M, Rantalainen M, Cloarec O, Nicholson JK, Holmes E, Trygg J. OPLS discriminant analysis: combining the strengths of PLS-DA and SIMCA classification. *J. Chemometrics* 2006; 20: 341-351.
24. Calabresi L, Gomaraschi M, Franceschini G. Endothelial protection by high-density lipoproteins: from bench to bedside. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003; 23: 1724-1731.
25. Casu M, Anderson GJ, Choi G, Gibbons WA. NMR lipid profiles of cells, Tissues and body fluids, *Magn Reson Chem* 1991; 29: 594-602.
26. Cheung MC, Wolf AC. Differential effect of untracentrifugation on apolipoprotein A-I containing lipoprotein subpopulations. *J Lipid Res* 1988; 29: 15-26.
27. Chi Y, Gupta RK. Alterations in membrane fatty acid unsaturation and chain length in hypertension as observed by <sup>1</sup>H-NMR spectroscopy. *AJH* 1998; 11: 340-348.
28. Choi GTY, Casu M and Gibbons WA. NMR lipid profiles of cells, tissues and body fluids, *Biochem J* 1993; 290: 717-721.
29. Coen M, Lenz EM, Nicholson JK, Wilson ID, Pognan F, Lindon JC. An integrated metabonomic investigation of acetaminophen toxicity in the mouse using NMR spectroscopy. *Chem Res Toxicol* 2003; 16: 295-303.
30. Craig A, Cloarec O, Holmes E, Nicholson JK, Lindon JC. Scaling and normalization effects in NMR spectroscopic metabonomic data sets. *Anal Chem* 2006; 78: 2262-2267.

31. Curtiss LK, Bonnet DJ, Rye KA. The conformation of apolipoprotein A-I in high-density lipoproteins is influenced by core lipid composition and particle size: a surface plasma on resonance study. *Biochemistry* 2000; 39: 5712-5721.
32. Danesh J, Collins R, Peto R. Lipoprotein(a) and coronary heart disease. Meta-analysis of prospective studies. *Circulation* 2000; 102: 1082-1108.
33. Davit-Spraul A, Atger V, Pourci ML, Hadchouel M, Legrand A, Moatti N. Cholesterol efflux from Fu5AH cells to the serum of patients with Alagille syndrome. Importance of the hdl-phospholipids/free cholesterol ratio and of the hdl size distribution. *J Lipid Res* 1999; 40: 328-335.
34. Eriksson L, Johansson E, Kettaneh-Wold N, Wold S. Multi- and Megavariate Data Analysis. Principles and Applications. Umetrics AB: Umea, Sweden, 2001, ISBN 91-973730-X.
35. Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults. Executive Summary of the Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III). *JAMA* 2001; 285: 2486-2497.
36. Fielding CJ, Fielding PE. Molecular physiology of reverse cholesterol transport. *J Lipid Res* 1995; 36: 211-228.
37. Fournier N, de la Llera Moya M, Burkey BF, Swaney JB, Paterniti J Jr, Moatti N, Atger V, Rothblat GH. Role of HDL phospholipid in efflux of cell cholesterol to whole serum: studies with human apoA-I transgenic rats. *J Lipid Res* 1996; 37: 1704-1711.
38. Fournier N, Paul JL, Atger V, Cogny A, Soni T, de la Llera-Moya M, Rothblat G, Moatti N. HDL phospholipid content and composition as a major factor determining cholesterol efflux capacity from Fu5AH cells to human serum. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17: 2685-2691.
39. Freedman DS, Otvos JD, Jeyarajah EJ, Barboriak JJ, Anderson AJ, Walker JA. Relation of lipoprotein subclasses as measured by proton nuclear magnetic resonance spectroscopy to coronary artery disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998; 18: 1046-1053.



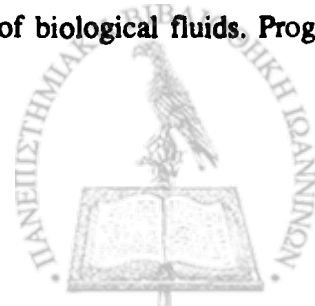
40. Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem* 1972; 18: 499-502.
41. Gerothanasis IP, Troganis A, Exarchou V, Barbarossou K. Nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy: Basic principles and phenomena, and their applications to chemistry, biology and medicine. *Chemistry Education: Research and Practice in Europe* 2002; 3 (2): 229-252.
42. Gomasaschi M, Basilico N, Sisto F, Taramelli D, Eligini S, Colli S, Sirtori CR, Franceschini G, Calabresi L. High-density lipoproteins attenuate interleukin-6 production in endothelial cells exposed to pro-inflammatory stimuli. *Biochim Biophys Acta* 2005; 1736: 136-143.
43. Griffin JL, Walker LA, Troke J, Osborn D, Shore RF, Nicholson JK. The initial pathogenesis of cadmium induced renal toxicity. *FEBS Lett* 2000; 478: 147-150.
44. Grundy SM, Pasternak R, Greenland P, Smith S Jr, Fuster V. Assessment of cardiovascular risk by use of multiple-risk-factor assessment equations: a statement for healthcare professionals from the American Heart Association and the American College of Cardiology. *Circulation* 1999; 100: 1481-1492.
45. Hasselwander O, McEnenu J, McMaster D, Fogarty DG, Nicholls DP, Maxwell AP, Young IS. HDL composition and HDL antioxidant capacity in patients on regular haemodialysis. *Atherosclerosis* 1999; 143: 125-133.
46. Holmes E, Foxall PJD, Nicholson JK, Neild GH, Brown SM, Beddell CR, Sweatman BC, Rahr E, Lindon JC, Spraul M, Neidig P. Automatic data reduction and pattern recognition methods for analysis of <sup>1</sup>H Nuclear Magnetic Resonance spectra of human urine from normal and pathological states. *Anal Biochem* 1994; 220: 284-296.
47. Holmes E, Nicholls AW, Lindon JC, Ramos S, Spraul M, Neidig P, Connor SC, Connelly J, Damment SJP, Haselden J, Nicholson JK. Development of a model for classification of toxin-induced lesions using <sup>1</sup>H NMR spectroscopy of urine combined with pattern recognition, *NMR Biomed* 1998; 11: 235-244.

48. Horio T, Kohno M, Yasunari K, Murakawa K, Yokokawa K, Ikeda M, Fukui T, Takeda T. Stimulation of endothelin-1 release by low-density and very-low-density lipoproteins in cultured human endothelial cells. *Atherosclerosis* 1993; 101: 185-190.
49. Horter MJ, Sondermann S, Reinecke H, Bogdanski J, Woltering A, Kerber S, Breithardt G, Assmann G, Von Eckardstein A. Associations of HDL phospholipids and paraoxonase activity with coronary heart disease in postmenopausal women. *Acta Physiol Scand* 2002; 176: 123-130.
50. Huggins KW, Curtiss LK, Gebre AK, Parks JS. Effect of long chain polyunsaturated fatty acids in the sn-2 position of phosphatidylcholine on the interaction with recombinant high density lipoprotein apolipoprotein A-I. *J Lipid Res* 1998; 39: 2423-2431.
51. Jia L, Fu M, Tian Y, Xu Y, Gou L, Tian H, Tian L. Alterations of high-density lipoprotein subclasses in hypercholesterolemia and combined hyperlipidemia. *Int J Cardiol* 2006 (Epub ahead of print)
52. Johnson WJ, Barnberger MJ, Latta RA, Rapp PE, Phillips MC, Rothblat GH. The bidirectional flux of cholesterol between cells and lipoproteins. Effects of phospholipid depletion of high density lipoprotein. *J Biol Chem* 1986; 261: 5766-5776.
53. Kirschenlohr HL, Griffin JL, Clarke SC, Rhydwen R, Grace AA, Schofield PM, Brindle KM, Metcalfe JC. Erratum: Proton NMR analysis of plasma is a weak predictor of coronary artery disease. *Nat Med* 2006; 12: 705-710.
54. Klimov AN, Gurevich VS, Nikiforova AA, Shatilina LV, Kuzmin AA, Plavinsky SL, Teryukova NP. Antioxidative activity of high density lipoproteins in vivo. *Atherosclerosis* 1993; 100: 13-18.
55. Kontush A, Chapman JM. Functionally defective high-density lipoprotein: A new therapeutic target at the Crossroads at dyslipidemia, Inflammation and atherosclerosis. *Pharmacol Rev* 2006; 58: 342-374.
56. Kriat M, Dury JV, Confort-Gouny S, Favre R, Viout P, Sciaky M, Sari H, Cozzzone PJ. Analysis of plasma lipids by NMR spectroscopy: application to modifications induced by malignant tumors. *J Lipid Res* 1993; 34: 1009-1019.



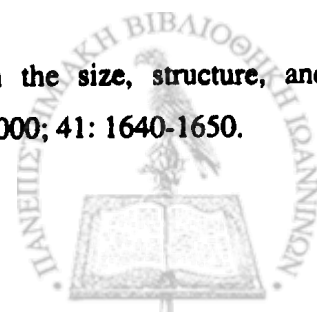
57. Kris-Etherton PM, Harris WS, Appel LJ. American Heart Association. Nutrition Committee. Fish consumption, fish oil, omega-3 fatty acids, and cardiovascular disease. *Circulation* 2002; 106: 2747-2757.
58. Kuksis A, Myher JJ, Geher K, Jones GJ, Breckenridge WC, Feather T, Hewitt D, Little JA. Decreased plasma phosphatidylcholine/free cholesterol ratio as an indicator of risk for ischemic vascular disease. *Arteriosclerosis* 1982; 3: 389-397.
59. Kunz F, Pechlaner C, Erchart R, Fend F, Muhlberger V. HDL and plasma phospholipids in coronary artery disease. *Arterioscler Thromb* 1994; 14: 1146-1150.
60. Lamarche B, Tchernof A, Moorjani S, Cantin B, Dagenais GR, Lupien PJ, Després JP. Small, dense low-density lipoprotein particles as a predictor of the risk of ischemic heart disease in men. Prospective results from the Québec Cardiovascular Study. *Circulation* 1997; 95: 69-75.
61. Le Moyec L, Valensi P, Charniot JC, Hantz E, Albertini JP. Serum <sup>1</sup>H-nuclear magnetic spectroscopy followed by principal component analysis and hierarchical cluster analysis to demonstrate effects of statins on hyperlipidemic patients. *NMR Biomed* 2005; 18: 421-429.
62. Lindon JC, Nicholson JK, Holmes E, Everett JR. Metabonomics: metabolic processes studied by NMR spectroscopy of biofluids combined with pattern recognition. *Concepts Magn Reson* 2000; 12: 289-320.
63. Lindon JC, Holmes E, Nicholson JK. Pattern recognition methods and application in biomedical magnetic resonance. *Prog Nucl Magn Reson* 2001; 39: 1-40.
64. Lindon JC, Holmes E, Nicholson JK. Toxicological applications of magnetic resonance, *Prog NMR Spectrosc* 2004; 45: 109-143.
65. Lopez-Garcia E, Schulze MB, Manson JE, Meigs JB, Albert CM, Rifai N, Willet WC, Hu FB. Consumption of (n-3) fatty acids is related to plasma biomarkers of inflammation and endothelial activation in women. *J Nutr* 2004; 134: 1806-1811.

66. Makinen VP, Soininen P, Forsblom C, Parkkonen M, Ingman P, Kaski K, Groop PH, Ala-Korpela M; FinnDiane Study Group. Diagnosing diabetic nephropathy by <sup>1</sup>H NMR metabonomics of serum. *MAGMA* 2006; 19: 281-296.
67. Marshall W. Κλινική Βιοχημεία. (Μετάφραση και επιμέλεια: Α. Καλοφούτης, Π. Μουτσάτσου-Λαδικού, ΚΕ. Σέκερης), Ιατρικές Εκδόσεις Λίστας, Αθήνα, 1998.
68. Marques-Vidal P, Ruidavets JB, Cambou JP, Cambien F, Chap H, Perret B. Distribution, fatty acid composition and apolipoprotein A-I immunoreactivity of high density lipoprotein subfractions in myocardial infarction. *Atherosclerosis* 1995; 112: 29-38.
69. Moshides JS. High density lipoprotein free cholesterol and other lipids in coronary heart disease. *Arteriosclerosis* 1987; 7: 262-266.
70. Naito HK, Greenstreet RL, David JA, Sheldon WL, Shirey EK, Lewis RC, Proudfit WL, Gerrity RG. HDL-cholesterol concentration and severity of coronary atherosclerosis determined by cine-angiography. *Artery* 1980; 8: 101-112.
71. Naito HK, Ward KM, Schmitz G, Mollers C, Bottcher A, Ploch J, Myers G, New approaches to the use of lipoprotein electrophoresis in the clinical laboratory. In Rifai N, Warninck GR, Dominiczak MH, Eds. *Handbook of lipoprotein testing*. Pp 477-495. Washington: AACC Press, 2000.
72. Navab M, Hama SY, Cooke CJ, Anantharamaiah GM, Chaddha M, Jin L, Subbanagounder G, Faull KF, Reddy ST, Miller NE, Fogelman AM. Normal high density lipoprotein inhibits three steps in the formation of mildly oxidized low density lipoprotein: steps 2 and 3. *J Lipid Res* 2000; 41: 1945-1508.
73. Navab M, Hama SY, Cooke CJ, Anantharamaiah GM, Chaddha M, Jin L, Subbanagounder G, Faull KF, Reddy ST, Miller NE, Fogelman AM. Normal high density lipoprotein inhibits three steps in the formation of mildly oxidized low density lipoprotein: step 1. *J Lipid Res* 2000; 41: 1481-1494.
74. Nicholson JK, Wilson ID. High resolution <sup>1</sup>H NMR spectroscopy of biological fluids. *Prog NMR Spectrosc* 1989; 21: 449-501.



75. Nicholson JK, Foxall PJ, Spraul M, Farrant RD, Lindon JC. 750 MHz  $^1\text{H}$  and  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  NMR spectroscopy of human blood plasma. *Anal Chem* 1995; 67: 793-811.
76. Nicholson JK, Lindon JC, Holmes E. 'Metabonomics': understanding the metabolic responses of living systems to pathophysiological stimuli via multivariate statistical analysis of biological NMR spectroscopic data. *Xenobiotica* 1999; 29: 1181-1189.
77. Nicholson JK, Connelly J, Lindon JC, Holmes E. Metabonomics: a platform for studying drug toxicity and gene function. *Nature Rev Drug Discov* 2002; 1: 153-161.
78. Nicholson JK, Wilson ID. Understanding 'global' systems biology: metabonomics and the continuum of metabolism. *Nature Rev Drug Discov* 2003; 2: 668-676.
79. Nofer JR, Walter M, Assmann G. Current understanding of the role of high-density lipoproteins in atherosclerosis and senescence. *Expert Rev Cardiovasc Ther* 2005; 3: 1063-1078.
80. Nouta C, Bonzom P, Brown A, Gibbons WA, Martin J, Nicolaou A.  $^1\text{H}$ -NMR lipid profiles of human blood platelets; links with coronary artery disease. *Biochim Biophys Acta* 2000; 1487: 15-23.
81. Oostendorp M, Engelke U, Willemsen M, Wevers R. Diagnosing inborn errors of lipid metabolism with proton nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Clin Chem* 2006; 52:1395-1405.
82. Otvos JD, EJ Jeyarajah, DW Bennett. Quantification of plasma lipoproteins by proton nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Clin Chem* 1991; 37: 377-386.
83. Otvos JD, Jeyarajah EJ, Bennett DW, Krauss RM. Development of a proton method for determining plasma lipoprotein concentrations and subspecies distributions from a single, rapid measurement. *Clin Chem* 1992; 38: 1632-1638.
84. Parmar YI, Sparks DL, Frohlich J, Cullis PR, Pritchard PH. Detection of vesicular lipoproteins in lecithin:cholesterol acyltransferase-deficient plasma by  $^1\text{H}$ -NMR spectroscopy. *J Lipid Res* 1989; 30: 765-771.

85. Piperi C, Kalofoutis C, Papaevaggeliou D, Papapanagiotou A, Lekakis J, Kalofoutis A. The significance of serum HDL phospholipid levels in angiographically defined coronary artery disease. *Clin Biochem* 2004; 37: 377-381.
86. Pollesello P, Eriksson O, Kvam BJ, Paoletti S, Saris NE. <sup>1</sup>H-NMR studies of lipid extracts of rat liver mitochondria. *Biochem Biophys Res Commun* 1991; 179: 904-911.
87. Pollesello P, Masutti F, Croce LS, Toffanin R, Eriksson O, Paoletti S, Hockerstedt K, Tiribell C. <sup>1</sup>H-NMR spectroscopic studies of lipid extracts from human fatty liver. *Biochem Biophys Res Commun* 1993; 192:1217-1222.
88. Pruzanski W, Stefanski E, de Beer FC, de Beer MC, Ravandi A, Kuksis A. Comparative analysis of lipid composition of normal and acute-phase high density lipoproteins. *J Lipid Res* 2000; 41: 1035-1047.
89. Robinson JG, Smith B, Maheshwari N, Schrott H. Pleiotropic effects of statins: benefit beyond cholesterol reduction? A meta-regression analysis. *J Am Coll Cardiol* 2005; 46: 1855-1862.
90. Ross R. Atherosclerosis: An inflammatory disease. *N Engl J Med* 1999; 340: 115-126.
91. Ruan B, Wilson WK, Pang J, Gerst N, Pinkerton FD, Tsai J, Kelley RI, Whitby FG, Milewicz DM, Garbern J, Schoepfer GJ Jr. Sterols in blood of normal and Smith-Lemli-Opitz subjects. *J Lipid Res* 2001; 42 : 799-812.
92. Rudel LL, Marzetta EA, Johnson FL. Separation and analysis of lipoproteins by gel filtration. *Methods Enzymol* 1986; 129: 45-56
93. Rye KA, Barter PJ. The influence of apolipoproteins on the structure and function of spheroidal, reconstituted high density lipoproteins. *J Biol Chem* 1994; 269: 10298-10303.
94. Rye KA, Hime NJ, Barter PJ. The influence of sphingomyelin on the structure and function of reconstituted high density lipoproteins. *J Biol Chem* 1996; 27: 4243-4250.
95. Rye KA, Duong MN. Influence of phospholipid depletion on the size, structure, and remodeling of reconstituted high density lipoproteins. *J Lipid Res* 2000; 41: 1640-1650.



96. Sparks DL, Lund-Katz S, Phillips MC. The charge and structural stability of apolipoprotein A-I in discoidal and spherical recombinant high density lipoprotein particles. *J Biol Chem* 1992; 267: 25839-25847.
97. Sparks DL, Davidson WS, Lund-Katz S, Phillips MC. Effects of the neutral lipid content of high density lipoprotein on apolipoprotein A-I structure and particle stability. *J Biol Chem* 1995; 270: 26910-26917.
98. Sparling ML, Zidovetzki R, Muller L, Chan SI. Analysis of membrane lipids by 500MHz <sup>1</sup>H NMR. *Anal Biochem* 1989; 178: 67-76.
99. Stein O, Stein Y. Atheroprotective mechanisms of HDL. *Atherosclerosis* 1999; 144: 285-301.
100. Subbaiah PV, Liu M. Role of sphingomyelin in the regulation of cholesterol esterification in the plasma lipoproteins. Inhibition of lecithin-cholesterol acyltransferase reaction. *J Biol Chem* 1993; 268: 20156-20163.
101. Sze DY, Jardetzky O. Characterization of lipid composition in stimulated human lymphocytes by <sup>1</sup>H-NMR. *Biochim Biophys Acta* 1990; 1054: 198-206.
102. Tate AR, Foxall PJD, Holmes E, Moka D, Spraul M, Nicholson JK, Lindon JC. Distinction between normal and renal cell carcinoma kidney cortical biopsy samples using pattern recognition of H-1 magic angle spinning (MAS) NMR spectra. *NMR Biomed* 2000; 13: 64-71.
103. Trygg J, Holmes E, Lundstedt T. Chemometrics in metabonomics. *J Proteome Res* 2007; 6: 469-479.
104. Von Schacky C. Omega-3 fatty acids and cardiovascular disease. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2004; 7: 131-136.
105. Warnick GR, Benderson J, Albers JJ. Dextran sulfate-Mg<sup>2+</sup> precipitation procedure for quantitation of high-density-lipoprotein cholesterol. *Clin Chem* 1982; 28: 1379-1388.

106. Waters NJ, Holmes E, Waterfield CJ, Farrant RD, Nicholson JK. NMR and pattern recognition studies on liver extracts and intact livers from rats treated with  $\alpha$ -naphthylisothiocyanate. *Biochem Pharmacol* 2002; 64: 67-77.
107. Waters NJ, Waterfield CJ, Farrant RD, Holmes E, Nicholson JK. Metabonomic deconvolution of embedded toxicity: application to thioacetamide hepato- and nephrotoxicity. *Chem Res Toxicol* 2005; 18: 639-654.
108. Wilson PW, Anderson KM, Castelli WP. Twelve-year incidence of coronary heart disease in middle-aged adults during the era of hypertensive therapy. The Framingham Offspring Study. *Am J Med* 1991; 90: 11-16.
109. Wilson WK, Sumpter RM, Warren JJ, Rogers PS, Ruan B, Schroepfer GJ Jr. Analysis of unsaturated C27 sterols by nuclear magnetic resonance spectroscopy. *J Lipid Res* 1996; 37: 1529-1555.
110. Wishart DS, Tzur D, Knox C, Eisner R, Guo AC, Young N, Cheng D, Jewell K, Arndt D, Sawhney S, Fung C, Nikolai L, Lewis M, Coutouly MA, Forsythe I, Tang P, Shrivastava S, Jeroncic K, Stothard P, Amegbey G, Block D, Hau DD, Wagner J, Miniaci J, Clements M, Gebremedhin M, Guo N, Zhang Y, Duggan GE, Macinnis GD, Weljie AM, Dowlatabadi R, Bamforth F, Clive D, Greiner R, Li L, Marrie T, Sykes BD, Vogel HJ, Querengesser L. HMDB: the Human Metabolome Database. *Nucleic Acids Res* 2007; 35: D521-526.
111. Wold S, Esbensen K, Geladi P. Principal component analysis. *Chemom Intell Lab Sys*. 1987; 2: 37-52.
112. Wold S, Antti H, Lindgren F, Ohman J. Orthogonal signal correction of nearinfrared spectra. *Chemom Intell Lab Sys* 1998; 44:175-185.
113. Wold S, Albano C, Dunn WJ, Edlund U, Esbesnen K, Geladi P, Hellberg S, Johansson E, Lindberg W, Sjostrom M (1984). Multivariate data analysis in chemistry, In: B.R. Kowalski (ed.) *Chemometrics: Mathematics and statistics in chemistry*. D. Reidel Publishing Company, Dordrecht, Holland.
114. Xu Y, Fu M. Alterations of HDL subclasses in hyperlipidemia. *Clin Chim Acta* 2003; 332 : 95-102.



## Ηλεκτρονική Βιβλιογραφία

1. <http://www.raci.org.au/>
2. <http://www.raci.org.au/chemanust/docs/pdf/2004/CIA%20July2004p13.pdf>
3. <http://www.metabolomics.ca/index.htm>