

Διατμηματικό Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών «Ιατρική Χημεία»



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ «ΙΑΤΡΙΚΗ ΧΗΜΕΙΑ»

«Μελέτη της επίδρασης εκχυλισμάτων εχινάκειας και επιμέρους συστατικών τους στην αθηροσκλήρωση»

Καραβασίλη Κωνσταντίνα Α.Μ. 279 Χημικός, BSc

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2023

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή

Επιβλέπων:

Τσελέπης Αλέξανδρος, Ομότιμος Καθηγητής Βιοχημείας-Κλινικής Χημείας, Τμήματος Χημείας, Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Μέλη:

Τζάκος Ανδρέας, Αναπληρωτής Καθηγητής Οργανικής Χημείας και Βιοχημείας, Τμήματος Χημείας, Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Πανταζή Δέσποινα, Μέλος Εργαστηριακού Διδακτικού Προσωπικού (ΕΔΙΠ) Τομέα Οργανικής Χημείας και Βιοχημείας, Τμήματος Χημείας, Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Πρόλογος - Ευχαριστίες

Η παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή εκπονήθηκε στο Ερευνητικό Κέντρο Αθηροθρόμβωσης/Ερευνητικό Εργαστήριο Λιπιδίων και Λιποπρωτεϊνών, στον Τομέα Οργανικής Χημείας και Βιοχημείας, του Τμήματος Χημείας, του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, στο πλαίσιο του ΔΠΜΣ «Ιατρική Χημεία», κατά την περίοδο 2021-2023.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον επιβλέποντα καθηγητή μου κ. Αλέξανδρο Τσελέπη, Ομότιμο Καθηγητή Βιοχημείας-Κλινικής Χημείας, του Τμήματος Χημείας, του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων για την ευκαιρία που μου έδωσε να ενταχθώ στην επιστημονική ομάδα του και να εκπονήσω τη μεταπτυχιακή διατριβή μου υπό την επίβλεψη του. Θα ήθελα να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου προς το πρόσωπό του, για την πολύτιμη καθοδήγησή του, τις συμβουλές του και το χρόνο που μου αφιέρωσε καθ' όλη τη διάρκεια της εκπόνησης της διατριβής μου.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Ανδρέα Τζάκο, Αναπληρωτή Καθηγητή Οργανικής Χημείας και Βιοχημείας, του Τμήματος Χημείας, του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων και τη Δρ. Δέσποινα Πανταζή, Μέλος Εργαστηριακού Διδακτικού Προσωπικού (ΕΔΙΠ), του Τομέα Οργανικής Χημείας και Βιοχημείας, του Τμήματος Χημείας, του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, για την ευγενική αποδοχή να συμμετέχουν στην τριμελή επιτροπή μου.

Στη συνέχεια, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους συνεργάτες μας στο Εργαστήριο Φαρμακογνωσίας και Χημείας Φυσικών Προϊόντων, του Τμήματος Φαρμακευτικής, του ΕΚΠΑ, την υποψήφια διδάκτωρ Ειρήνη-Μαρία Μπάτα, το Δρ. Παναγιώτη Σταθόπουλο, Μέλος Εργαστηριακού Διδακτικού Προσωπικού (ΕΔΙΠ), του Τομέα Φαρμακογνωσίας και Χημείας Φυσικών Προϊόντων, του Τμήματος Φαρμακευτικής, του ΕΚΠΑ και τον κ. Αλέξιο-Λέανδρο Σκαλτσούνη, Καθηγητή του Τομέα Φαρμακογνωσίας και Χημείας Φυσικών Προϊόντων, του Τμήματος Φαρμακευτικής, του ΕΚΠΑ και τον κ. Αλέξιο-Λέανδρο Σκαλτσούνη, Καθηγητή του Τομέα Φαρμακογνωσίας και Χημείας Φυσικών Προϊόντων, του Τμήματος Φαρμακευτικής, του ΕΚΠΑ, από τους οποίους παραλάβαμε τα εκχυλίσματα τα οποία μελετήθηκαν στην παρούσα διατριβή.

Επιπλέον, ευχαριστώ τους συνεργάτες και φίλους μου, τη Δρ. Αικατερίνη Τσούκα, την υποψήφια διδάκτωρ Λουίζα Πεχλιβάνη και τον υποψήφιο διδάκτωρ Ιωάννη Κουτσαλιάρη, για την πολύτιμη βοήθειά τους καθ' όλη τη διάρκεια της διατριβής μου. Τους ευχαριστώ που με καθοδήγησαν στην εκμάθηση των εργαστηριακών τεχνικών και που πάντα ήταν πρόθυμοι στο να με βοηθήσουν να επιλύσω τις απορίες μου και τα προβλήματα που προκύπταν, καθώς και για το γεγονός ότι από την πρώτη μου μέρα στο εργαστήριο με έκαναν να νιώσω οικειότητα ως νέο μέλος. Αρχικά, η άψογη συνεργασία μας εντός εργαστηρίου και στη συνέχεια η πολύτιμη φιλία μας εκτός εργαστηρίου, με κάνουν να θέλω να τους ευχαριστήσω θερμά.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον υποψήφιο διδάκτωρ Ηρακλή Μοσχονά και το Δρ. Κωνσταντίνο Τέλλη, Μέλος Εργαστηριακού Διδακτικού Προσωπικού (ΕΔΙΠ), του Τομέα Οργανικής Χημείας και Βιοχημείας, του Τμήματος Χημείας, του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων για το ευχάριστο κλίμα στο εργαστήριο.

Τέλος, δε θα μπορούσα να μην ευχαριστήσω τους γονείς μου, Γεωργία και Σωκράτη, για την αγάπη τους και τη στήριξη τους όλα αυτά τα χρόνια σε όλες τις αποφάσεις που πήρα και σε όλες τις εύκολες και δύσκολες στιγμές. Χωρίς αυτούς δε θα είχα καταφέρει όσα κατάφερα μέχρι σήμερα.

Περιεχόμενα

Σκοπός της διατριβής	9
Κεφάλαιο 1°: Αθηροσκλήρωση	11-30
1.1 Γενικά στοιχεία	11
1.2 Το αγγειακό τοίχωμα	11-14
1.3 Αθηρογόνοι και αθηροπροστατευτικοί παράγοντες	14-16
1.4 Ανάπτυξη αθηροσκλήρωσης	16-26
1.5 Τα χαρακτηριστικά της αθηρωματικής πλάκας	27-30
Κεφάλαιο 2°: Ο ρόλος του οξειδωτικού στρες στην αθηροσκλήρωση	31-37
2.1 Ενδογενής παραγωγή των ROS στην αθηροσκλήρωση	31-34
2.2 Ο ρόλος της οξειδωμένης LDL και του υποδοχέα	LOX-1
στην αθηροσκλήρωση	34-37
Κεφάλαιο 3°: Ο ρόλος της φλεγμονής στην αθηροσκλήρωση	38-44
3.1 Οι επιπτώσεις της φλεγμονής στην ανάπτυξη της αθηροσκλήρωσης	38-40
3.2 Φλεγμονώδεις δείκτες στην αθηροσκλήρωση	41-44
Κεφάλαιο 4°: Echinacea	45-54
4.1 Γενικά στοιχεία	45-46
4.2 Συστατικά της <i>Echinacea</i>	46-50
4.3 Ιδιότητες της <i>Echinacea</i>	50-54
Κεφάλαιο 5°: Υλικά και Μέθοδοι	55-81
5.1 Παραγωγή εκχυλισμάτων εχινάκειας	55-56
5.2 Χημική ανάλυση εκχυλισμάτων εχινάκειας	56-62
5.3 Απομόνωση της λιποπρωτεΐνης LDL με δι	ιαδοχικές
υπερφυγοκεντρήσεις	62-65
5.4 Ποσοτικοποίηση της λιποπρωτεΐνης LDL με την	μέθοδο
BCA	65-67
5.5 Οξειδωτική τροποποίηση της λιποπρωτεΐνης LDL με ιόντα Cu ²⁺	67-68
5.6 Κυτταρομετρία ροής	68-75
5.7 Συσσωρευομετρία οπτικής διαπερατότητας	75-81
Κεφάλαιο 6°: Αποτελέσματα	82-104
6.1 Μελέτη της επίδρασης εκχυλισμάτων Echinacea purpurea στην οξ	ειδωτική
τροποποίηση της LDL	82-86

6.2 Μελέτη της επίδρασης εκχυλισμάτων Echinacea purpurea στη μεμβρανική
έκφραση του ICAM-1 σε καλλιέργεια κυττάρων HUVECs με κυτταρομετρία
ροής
6.3 Μελέτη της επίδρασης εκχυλισμάτων Echinacea purpurea στην ενεργοποίηση των
αιμοπεταλίων σε PRP με συσσωρευομετρία οπτικής διαπερατότητας101-103
6.4 Μελέτη της επίδρασης του ροσμαρινικού οξέος και του γαλλικού οξέος στην
οξειδωτική τροποποίηση της LDL και στη μεμβρανική έκφραση του ICAM-1 σε
καλλιέργεια κυττάρων HUVECs103-104
Κεφάλαιο 7°: Συμπεράσματα-Συζήτηση105-106
Βιβλιογραφία107-123

Σκοπός της διατριβής

Σύμφωνα με την υπάρχουσα βιβλιογραφία, καθίσταται σαφές πως υπάρχει πολύ μεγάλο επιστημονικό ενδιαφέρον σχετικά με την εχινάκεια και τις βιολογικές δράσεις της, καθώς φαίνεται να είναι ένα πολλά υποσχόμενο φυτό. Για το λόγο αυτό, η παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή έχει ως σκοπό να διερευνήσει την αντιοξειδωτική, την αντιφλεγμονώδη και την αντιθρομβωτική δράση εκχυλισμάτων του φυτού *Echinacea purpurea*.

Αρχικά, διερευνήθηκε η επίδραση διαφόρων συγκεντρώσεων των εκχυλισμάτων στην οξείδωση της LDL (Low-Density Lipoprotein) (100µg/mL) παρουσία θειικού χαλκού (CuSO₄) (5µM) στους 37°C για 5h. Στη συνέχεια, ανθρώπινα ενδοθηλιακά κύτταρα ομφαλικής φλέβας (HUVECs, Human Umbilical Vein Endothelial Cells), σε καλλιέργεια, προεπωάστηκαν για 1h με διάφορες συγκεντρώσεις των εκχυλισμάτων και στη συνέχεια ενεργοποιήθηκαν με τον παράγοντα νέκρωσης όγκων α (TNF-α, Tumor Necrosis Factor alpha) (0,5ng/mL) για 6h. Η ανασταλτική δράση των εκχυλισμάτων στην έκφραση του διακυτταρικού μορίου προσκόλλησης 1 (ICAM-1, Intercellular Adhesion Molecule 1 ή CD54) υπολογίστηκε με κυτταρομετρία ροής, χρησιμοποιώντας το φθορισμένο μονοκλωνικό αντίσωμα anti-CD54 PE. Τέλος, μελετήθηκε η ανασταλτική δράση των εκχυλισμάτων στην επαγόμενη από το αραχιδονικό οξύ (AA), το ADP και το TRAP-6 αιμοπεταλιακή συσσώρευση σε πλάσμα πλούσιο σε αιμοπετάλια (PRP, Platelet Rich Plasma), με συσσωρευομετρία οπτικής διαπερατότητας.

1. Αθηροσκλήρωση

1.1 Γενικά στοιχεία

Οι καρδιαγγειακές ασθένειες είναι η κυριότερη αιτία θνησιμότητας στο δυτικό πληθυσμό. Μία από αυτές είναι η αθηροσκλήρωση, η οποία είναι μία χρόνια φλεγμονώδης ασθένεια, με έναν πολυπαραγοντικό φαινότυπο, που επηρεάζει κυρίως το τοίχωμα μεγάλων και μεσαίων αρτηριών, όπως η αορτή, η καρωτίδα και οι στεφανιαίες αρτηρίες. Αρχικά, στα εσωτερικά τοιχώματα των αρτηριών του κυκλοφορικού συστήματος συσσωρεύονται λιπίδια και αυτή η συσσώρευση, με την πάροδο του χρόνου, έχει σαν αποτέλεσμα τη δημιουργία της αθηρωματικής πλάκας, η οποία αποτελείται από λιπίδια, φλεγμονώδη και λεία μυϊκά κύτταρα και από συνδετικό ιστό. Παρόλο που, κλινικά, οι αλλοιώσεις αυτές γίνονται εμφανείς σε ενήλικες της μέσης ηλικίας, έχει αποδειχθεί ότι η συσσώρευση λιπιδίων αρχίζει από την πρώιμη παιδική ηλικία. Επίσης, υπάρχουν διαφορές όσον αφορά την αθηρωματική πλάκα ανάλογα με τον ασθενή, δηλαδή διαφέρουν ως προς τη σοβαρότητα, το βαθμό ενεργοποίησης των φλεγμονωδών κυττάρων, τη σύσταση και την επίδρασή τους στους ιστούς και στα όργανα [1]–[3].

Επιπλέον, λόγω της ανάπτυξης της αθηρωματικής πλάκας, προκαλείται στένωση των αρτηριών και υπάρχει κίνδυνος ρήξης της πλάκας και δημιουργίας θρόμβου. Για το λόγο αυτό, η αθηροσκλήρωση μπορεί να προκαλέσει στεφανιαία νόσο, καρωτιδική νόσο και περιφερική αρτηριακή νόσο. Το γεγονός ότι η αθηροσκλήρωση είναι κύρια αιτία θανάτου οφείλεται στη θρόμβωση, καθώς αυτή οδηγεί σε καταστάσεις που μπορεί να αποβούν μοιραίες για την ζωή του ασθενούς, όπως το έμφραγμα του μυοκαρδίου και το ισχαιμικό εγκεφαλικό επεισόδιο [3].

1.2 Το αγγειακό τοίχωμα

Ο έσω χιτώνας του αγγείου (intima) σχηματίζεται από ένα στρώμα ενδοθηλιακών κυττάρων, τα οποία βρίσκονται στη βασική μεμβράνη μέσω μορίων προσκόλλησης και διαχωρίζονται από το μέσο χιτώνα (media) με την εσωτερική ελαστική μεμβράνη (Εικόνα 1). Το ενδοθήλιο είναι ένας ημιπερατός φραγμός με ενδοκυτταρικές συνδέσεις που ρυθμίζει τη διέλευση μορίων διαμέσου του αγγειακού τοιχώματος. Οι σημαντικότερες ιδιότητες του ενδοθηλίου είναι η διατήρηση του αγγειακού τόνου με την απελευθέρωση αγγειοδιασταλτικών και αγγειοσυσταλτικών παραγόντων, η διατήρηση μιας αντιθρομβωτικής κατάστασης, η συμμετοχή του τόσο σε ανοσολογικές

11

όσο και σε φλεγμονώδεις αποκρίσεις, καθώς και η ρύθμιση της αγγειακής διαπερατότητας. Επομένως, το ενδοθήλιο παίζει σημαντικό ρόλο στην αγγειακή ομοιόσταση. Επιπλέον, οι περισσότερες από τις αθηροπροστατευτικές ιδιότητες του ενδοθηλίου αποδίδονται στο μονοξείδιο του αζώτου (NO) [1], [4]–[9].

Τα ενδοθηλιακά κύτταρα παρουσιάζουν φαινοτυπική διακύμανση στα διάφορα αγγεία και αυτή η διακύμανση μπορεί να προκαλέσει διαφορετικές βιολογικές αποκρίσεις στο ίδιο είδος ερεθίσματος και μπορεί να επηρεάσει και τα γειτονικά κύτταρα. Η βασική μεμβράνη, η οποία είναι μέρος της εξωκυττάρια μήτρας, αποτελείται κυρίως από διαφορετικούς τύπους κολλαγόνου, λαμινίνης, πρωτεογλυκανών, ινωδονεκτίνης και του παράγοντα von Willebrand (vWF) και παρέχει μηχανική στήριξη και ένα περιβάλλον αλληλεπίδρασης κυττάρων και μοριακής δραστηριότητας [1], [5], [7].

Ο μέσο χιτώνας αποτελείται κυρίως από αγγειακά λεία μυϊκά κύτταρα και από την εξωκυττάρια μήτρα (Εικόνα 1). Τα λεία μυϊκά κύτταρα εμφανίζουν δύο φαινότυπους: τον συσταλτικό και τον εκκριτικό. Γενικά, ο συσταλτικός φαινότυπος είναι ο πιο άφθονος και μπορεί να μετατραπεί σε εκκριτικό φαινότυπο υπό παθοφυσιολογικά ερεθίσματα, όπως η φλεγμονή. Το πιο συγνό είναι ότι, κάτω από μια ποικιλία ερεθισμάτων, τα λεία μυϊκά κύτταρα προκαλούν αγγειακή συστολή και χαλάρωση με έναν μηχανισμό που εξαρτάται από το ασβέστιο. Ο εκκριτικός φαινότυπος πολλαπλασιάζεται, μεταναστεύει, παράγει και εκκρίνει πρωτεΐνες της εξωκυττάριας μήτρας, η οποία παρέχει δομική και μηχανική υποστήριξη και ενισχύει τις κυτταρικές αλληλεπιδράσεις. Επιπλέον, η εξωκυττάρια μήτρα λειτουργεί ως φυσικό εμπόδιο και η ακεραιότητά της είναι ζωτικής σημασίας για την ομαλή λειτουργία του αγγείου, καθώς η διαταραγή της προκαλεί πολλαπλές κυτταρικές αποκρίσεις. Αποτελείται κυρίως από ίνες ελαστίνης, οι οποίες εκτός του ότι έχουν δομική λειτουργία, εμπλέκονται και στη ρύθμιση του πολλαπλασιασμού των λείων μυϊκών κυττάρων. Άλλα συστατικά της εξωκυττάριας μήτρας είναι οι ίνες κολλαγόνου, κυρίως τύπου Ι και ΙΙΙ, που βρίσκονται μεταξύ των ινών ελαστίνης [1], [5], [10], [11].

Η εξωτερική ελαστική μεμβράνη διαχωρίζει τον μέσο χιτώνα από τον έξω χιτώνα (adventitia), ο οποίος αποτελείται από ινώδη ελαστικό συνδετικό ιστό (Εικόνα 1). Το κυρίαρχο συστατικό της εξωκυττάριας μήτρας είναι η πρωτεογλυκάνη, η οποία αλληλεπιδρά με τα άλλα συστατικά της εξωκυττάριας μήτρας που συμμετέχουν στις ιδιότητες του αγγειακού τοιχώματος και συνδέουν το αιμοφόρο αγγείο με το συνδετικό ιστό που το περιβάλει. Ο έξω χιτώνας συμμετέχει ενεργά τόσο στις ανοσολογικές όσο

12

και στις φλεγμονώδεις αποκρίσεις, στην ανάπτυξη και στην αναδιαμόρφωση των αγγείων, στην κυτταρική σηματοδότηση και στη ρύθμιση του αγγειακού τόνου. Εκτός από την εξωκυττάρια μήτρα, περιέχει το vasa vasorum, τον περιαγγειακό λιπώδη ιστό, νευρικά άκρα, λεμφικά αγγεία και διαφορετικούς τύπους κυττάρων, όπως ινοβλάστες, δενδριτικά κύτταρα, Τ και Β κύτταρα, μαστοκύτταρα και μακροφάγα, πλασματοκύτταρα, για αυτό και ο έξω χιτώνας παίζει πολύ σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της λειτουργίας του αγγειακού τοιχώματος. Τα κύτταρα του έξω χιτώνα ανταποκρίνονται στα ερεθίσματα παράγοντας κυτοκίνες, χημειοκίνες, δραστικές μορφές οξυγόνου (Reactive Oxygen Species, ROS) και αναδιαμορφωτικές ουσίες. Οι ινοβλάστες είναι ο πιο άφθονος τύπος κυττάρων και παράγουν κυρίως ινώδες κολλαγόνο. Έχουν μια μηχανική λειτουργία, παράγοντας εξωκυττάρια μήτρα, και εμπλέκονται στις πρώτες αγγειακές αποκρίσεις σε μια ποικιλία ερεθισμάτων και δρουν ως αισθητήρες παθοφυσιολογικών διεργασιών, όπως είναι η φλεγμονή. Επίσης, τα μακροφάγα και τα δενδριτικά κύτταρα συμμετέχουν σε όλα τα στάδια της Οı ανοσοαπόκρισης. ενεργοποιημένοι ινοβλάστες διαφοροποιούνται σε μυοϊνοβλάστες, οι οποίοι εμπλέκονται στην ανάπτυξη αγγειοπαθειών, αλλά και στη φυσιολογική αγγειακή αναδιαμόρφωση, παράγοντας κολλαγόνο και άλλα προϊόντα της εξωκυττάριας μήτρας. Αυτή η διαδικασία ρυθμίζεται από μόρια της εξωκυττάριας μήτρας, όπως είναι η ενδοθηλίνη-1 (ET-1), η αγγειοτενσίνη-ΙΙ (Ang-II), οι ιντερλευκίνες (ILs), οι κυτοκίνες και τα μόρια προσκόλλησης. Σε παθολογικές καταστάσεις, οι μυοϊνοβλάστες συμβάλλουν στη διατήρηση ενός συσταλτικού αγγειακού τόνου και μεταναστεύουν σε άλλα στρώματα, συμβάλλοντας έτσι στην μη φυσιολογική αγγειακή αναδιαμόρφωση. Επιπλέον, οι μεταλλοπρωτεϊνάσες (MMPs), οι οποίες εμπλέκονται στην αποικοδόμηση των συστατικών της εξωκυττάριας μήτρας, σε παθολογικές καταστάσεις συμμετέχουν στην κίνηση των μυοϊνοβλαστών προς τα άλλα στρώματα [1], [5], [6], [10], [12]–[16].

Το vasa vasorum είναι ένα δίκτυο μικροαγγείων που παρέχει θρεπτικά συστατικά και οξυγόνο και απομακρύνει τα απόβλητα των μεγάλων αιμοφόρων αγγείων. Ρυθμίζει το δικό του αγγειακό τόνο, ο οποίος μπορεί να μεταβληθεί σε φλεγμονώδεις διαδικασίες. Το vasa vasorum εμπλέκεται, μεταξύ άλλων, και στην ανάπτυξη της αθηρωματικής πλάκας, μέσω της επέκτασης και της νεοαγγειοποίησης που προκαλείται από κύτταρα, όπως τα μακροφάγα και οι ενεργοποιημένοι ινοβλάστες, απελευθερώνοντας φλεγμονώδεις μεσολαβητές και προ-αγγειογόνους παράγοντες [1], [14], [16]–[18].



Εικόνα 1: Η δομή του αγγειακού τοιχώματος (Marchio et al. "Targeting early atherosclerosis: A focus on oxidative stress and inflammation," Oxid. Med. Cell. Longev., vol. 2019, no. Ldl, 2019, doi: 10.1155/2019/8563845).

1.3 Αθηρογόνοι και αθηροπροστατευτικοί παράγοντες

Ο σημαντικότερος παράγοντας καρδιαγγειακού κινδύνου που συμβάλει στην ανάπτυξη της αθηροσκλήρωσης είναι τα αυξημένα επίπεδα χοληστερόλης στο πλάσμα. Η χοληστερόλη μεταφέρεται στο αίμα με τη λιποπρωτεΐνη χαμηλής πυκνότητας (LDL). Αυτά τα λιποπρωτεϊνικά σωματίδια στο εσωτερικό τους έχουν εστέρες χοληστερόλης και τριγλυκερίδια και στο εξωτερικό τους έχουν φωσφολιπίδια, ελεύθερη χοληστερόλη και την απολιποπρωτεΐνη B100 (ApoB100). Ακόμα και χωρίς την παρουσία των άλλων παραγόντων, τα αυξημένα επίπεδα χοληστερόλης μπορούν να οδηγήσουν στην εμφάνιση της αθηροσκλήρωσης. Οι υπόλοιποι παράγοντες κινδύνου, όπως η υπέρταση, ο διαβήτης, η παγυσαρκία, το κάπνισμα, το οξειδωτικό στρες, η φλεγμονή, η γήρανση καθώς και το αρσενικό φύλο, επιταγύνουν τη νόσο, για την οποία υπεύθυνη είναι η LDL, και προωθούν την αγγειακή φλεγμονή και την ενδοθηλιακή ενεργοποίηση. Επιπλέον, η οξείδωση της LDL (ox-LDL) έχει πολύ μεγάλη σημασία στην ανάπτυξη της αθηροσκλήρωσης. Παρά το γεγονός ότι τα μακροφάγα έχουν μικρή συγγένεια για τη μη οξειδωμένη LDL, η μείωση των επιπέδων της LDL αποτρέπει την οξείδωσή της. Όμως, η οξείδωση της LDL δεν είναι ο μοναδικός εκκινητής της φλεγμονής, καθώς η ανισορροπία μεταξύ οξειδωτικών και αντιοξειδωτικών είναι σημαντική για τη διαδικασία της αθηρογένεσης (Εικόνα 2) [1], [3], [4].

Επιπλέον, παράγοντας κινδύνου για την εμφάνιση αθηροσκλήρωσης είναι η υπερομοκυστεϊναιμία, διότι προκαλεί βλάβη στο ενδοθήλιο, καθώς και η υπερινοδωγοναιμία, διότι το ινωδόγονο και το ινώδες συμβάλουν στο σχηματισμό και στην ανάπτυξη της αθηρωματικής πλάκας, διεγείροντας τον πολλαπλασιασμό και τη

μετανάστευση των λείων μυϊκών κυττάρων και προάγοντας την πρόσληψη λιπιδίων από τα μακροφάγα. Επίσης, όσον αφορά το γενετικό υπόβαθρο, έχουν βρεθεί πολυμορφισμοί γονιδίων που συμβάλουν στην αθηρογένεση. Ακόμη, έχει βρεθεί συσχέτιση ανάμεσα στις συστηματικές λοιμώξεις και στην αθηροσκλήρωση, διότι πιθανώς οι μολυσματικοί παράγοντες επηρεάζουν την ενδοθηλιακή λειτουργία και ενεργοποιούν τα μακροφάγα, ώστε να εκκρίνουν φλεγμονώδεις κυτοκίνες, οι οποίες ενεργοποιούν την παραγωγή των ROS και διάφορων πρωτεολυτικών ενζύμων, όπως η πλασμίνη, τα οποία επηρεάζουν την σταθερότητα της πλάκας [2].

Ο έλεγχος των παραγόντων που αναφέρθηκαν παραπάνω, μειώνει τον κίνδυνο οξείας αγγειακής επιπλοκής και θανάτου από καρδιαγγειακές ασθένειες. Αξίζει να σημειωθεί ότι οι θάνατοι από μη μεταδοτικές ασθένειες αντιπροσωπεύουν σχεδόν το 74% και οφείλονται κυρίως σε καρδιαγγειακές νόσους. Η συχνότητα εμφάνισης βλάβης σε όργανα-στόχους που σχετίζονται με τις καρδιαγγειακές ασθένειες, αυξάνεται με την ηλικία και μελέτες έχουν δείξει υψηλότερη συχνότητα εμφάνισης στους άνδρες για εγκεφαλικό επεισόδιο και για στεφανιαία νόσο. Επίσης, το παγκόσμιο ποσοστό θνησιμότητας για τις καρδιαγγειακές ασθένειες έχει μειωθεί σημαντικά τα τελευταία χρόνια, ωστόσο, το εγκεφαλικό επεισόδιο και η στεφανιαία νόσος παραμένουν οι κύριες αιτίες θνησιμότητας στους ενήλικες [1].

Στους παράγοντες που προστατεύουν από την αθηροσκλήρωση, ανήκει η λιποπρωτεΐνη υψηλής πυκνότητας (HDL), η οποία πραγματοποιεί την αντίστροφη μεταφορά χοληστερόλης, δηλαδή μεταφέρει την χοληστερόλη από τους ιστούς στο ήπαρ, εμποδίζοντας έτσι την ανάπτυξη της αθηρωματικής πλάκας και παράλληλα, προστατεύει τον οργανισμό από την αθηρογόνο δράση της LDL, η οποία μεταφέρει την χοληστερόλη από το ήπαρ στους ιστούς, δημιουργώντας έτσι το αθήρωμα. Επιπλέον, παράγοντες όπως η ισορροπημένη διατροφή και η άσκηση δρουν προστατευτικά απέναντι στην αθηροσκλήρωση (Εικόνα 2) [3].

15



Εικόνα 2: Σχηματική απεικόνιση της LDL και της HDL (Badimón et al. "Lipoproteins, Platelets, and Atherothrombosis," Rev. Española Cardiol. (English Ed., vol. 62, no. 10, pp. 1161–1178, 2009, doi: 10.1016/s1885-5857(09)73331-6).

1.4 Ανάπτυξη αθηροσκλήρωσης

Το αρχικό συμβάν στην ανάπτυξη της αθηροσκλήρωσης είναι ο τραυματισμός του ενδοθηλίου. Αυτό προκαλεί συσσώρευση της LDL στον υπενδοθηλιακό χώρο. Στη συνέχεια, η LDL οξειδώνεται. Τα τροποποιημένα σωματίδια της LDL αυξάνουν την έκφραση μορίων προσκόλλησης στα ενδοθηλιακά κύτταρα, κάτι το οποίο οδηγεί στη στρατολόγηση των λευκοκυττάρων, κυρίως μονοκυττάρων και Τ-λεμφοκυττάρων, στον υπενδοθηλιακό χώρο. Με την αλληλεπίδραση χημειοτακτικών πρωτεϊνών, όπως η χημειοτακτική πρωτεΐνη μονοκυττάρων (MCP-1), η εοταξίνη και η ιντερφερόνη-γ (INF-γ), αυτά τα φλεγμονώδη κύτταρα μεταναστεύουν στον έσω χιτώνα του αγγείου. Τα μονοκύτταρα διαφοροποιούνται σε μακροφάγα, εκφράζουν υποδοχείς, όπως οι CD 36, SR-A (Scavenger Receptor A) και LOX-1 (Lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1), και εσωτερικεύουν την ox-LDL. Αυτά τα μακροφάγα τώρα ονομάζονται αφρώδη κύτταρα και η παρουσία τους στο αρτηριακό τοίχωμα είναι το σήμα κατατεθέν της πρώιμης αθηροσκληρωτικής βλάβης (Εικόνες 4 και 7). Τα Τλεμφοκύτταρα και τα μαστοκύτταρα που υποβάλλονται σε μετανάστευση στον έσω χιτώνα του αγγείου, μαζί με τα αφρώδη κύτταρα, απελευθερώνουν μια ποικιλία κυτοκινών, οι οποίες προάγουν τη φλεγμονή και την παραγωγή των ROS. Επίσης, αυξητικοί παράγοντες απελευθερώνονται από αυτά τα κύτταρα, καθώς τα ROS διεγείρουν τη μετανάστευση των λείων μυϊκών κυττάρων και την εναπόθεση του κολλαγόνου, γεγονός που οδηγεί στην ανάπτυξη της αθηρωματικής πλάκας (Εικόνες 5 και 7) [19].

Τα ROS επάγουν την έκφραση των SRs στα λεία μυϊκά κύτταρα και τον μετασχηματισμό τους σε αφρώδη κύτταρα. Τα ROS, επιπλέον, επάγουν την απελευθέρωση των MMPs, οι οποίες αποικοδομούν το ινώδες τοίχωμα της αθηρωματικής πλάκας, κάτι το οποίο οδηγεί στη ρήξη της. Η φυσική ρήξη της πλάκας μπορεί να προκληθεί από την επιφανειακή διάβρωση των ενδοθηλιακών κυττάρων, λόγω βλάβης της βασικής μεμβράνης τους. Ακόμη, η ρήξη των μικρο-αγγείων στην πλάκα προκαλεί μικρο-αιμορραγία και η ρήξη του ινώδους καλύμματος εκθέτει το προθρομβογόνο περιεχόμενο της πλάκας. Αν οι βλάβες αυτές επεκταθούν, μπορεί να προκαλέσουν θρόμβωση στις αρτηρίες. Όμως, αυτές οι ρήξεις δεν προκαλούν πάντα παθολογική απόφραξη της ροής του αίματος. Πολλές φορές, τα αντιπηκτικά μονοπάτια παρακάμπτονται, μια διαδικασία επούλωσης λαμβάνει χώρα και αυτό οδηγεί σε περαιτέρω πολλαπλασιασμό των λείων μυϊκών κυττάρων και σε συσσώρευση κολλαγόνου, μετατρέποντας έτσι μια λιπαρή αθηρωματική πλάκα σε μια πιο ινώδη πλάκα (Εικόνες 6 και 7) [19].

Όσον αφορά τους κυτταρικούς τύπους, τα ενδοθηλιακά κύτταρα, τα λευκοκύτταρα και τα λεία μυϊκά κύτταρα είναι οι πιο σημαντικοί τύποι κυττάρων που συμβάλουν στην ανάπτυξη της αθηροσκλήρωσης (Εικόνα 3) [3].



Εικόνα 3: Αθηρωματική πλάκα. Το αθήρωμα έχει έναν πυρήνα λιπιδίων με κρυστάλλους χοληστερόλης, ζωντανά και αποπτωτικά κύτταρα, και ένα ινώδες κάλυμμα με λεία μυϊκά κύτταρα και κολλαγόνο. Οι λιποπρωτεΐνες του πλάσματος συσσωρεύονται στην υπενδοθηλιακή περιοχή. Διάφοροι τύποι κυττάρων της ανοσοαπόκρισης υπάρχουν σε όλο το αθήρωμα, συμπεριλαμβανομένων των μακροφάγων, των Τ κυττάρων, των μαστοκυττάρων και των δενδριτικών κυττάρων. Το αθήρωμα σχηματίζεται στον έσω χιτώνα της αρτηρίας. Μετά τον έσω χιτώνα, υπάρχει ο μέσο χιτώτας, ο οποίος περιλαμβάνει τα λεία μυϊκά κύτταρα που ρυθμίζουν την αρτηριακή πίεση και την περιφερειακή αιμάτωση, και στη συνέχεια υπάρχει ο έξω χιτώνας, γύρω από το οποίο υπάρχει ο συνδετικός ιστός. Εδώ, συσσωρεύονται τα κύτταρα της ανοσοαπόκρισης και μπορεί να εξελιχθούν σε τριτοταγείς λεμφοειδείς δομές (Hansson et al. "The immune system in atherosclerosis", Nature Immonology, vol. 12, no. 3, pp. 204-212, 2011, doi: 10.1038/ni.2001).



Εικόνα 4: Στάδια δημιουργίας της αθηρωματικής πλάκας. Η LDL υπόκειται σε οξειδωτικές τροποποιήσεις στον υπενδοθηλιακό χώρο. Τα μονοκύτταρα προσκολλώνται στα ενδοθηλιακά κύτταρα τα οποία εκφράζουν μόρια προσκόλλησης και φλεγμονώδεις κυτοκίνες. Τα προσκολλημένα μονοκύτταρα μεταναστεύουν στον υπενδοθηλιακό χώρο και διαφοροποιούνται σε μακροφάγα. Η πρόσληψη της oxLDL μέσω των υποδοχέων των μακροφάγων οδηγεί στο σχηματισμό των αφρωδών κυττάρων (Glass et al. "Atherosclerosis: The Road Ahead", Cell Press, vol. 104, pp. 503-516, 2001).



Εικόνα 5: Εξέλιξη αθηρογένεσης και σχηματισμός ινώδους πλάκας. Οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των αφρωδών κυττάρων και των Τ κυττάρων προκαλούν μια χρόνια φλεγμονώδη διαδικασία. Οι κυτοκίνες που εκκρίνονται από τα λεμφοκύτταρα και τα μακροφάγα προκαλούν τόσο προ-αθηρογόνα όσο και αντι-αθηρογόνα αποτελέσματα σε καθένα από τα κυτταρικά στοιχεία του αγγειακού τοιχώματος. Τα λεία μυϊκά κύτταρα μεταναστεύουν από τον μέσο χιτώνα του αρτηριακού τοιχώματος, πολλαπλασιάζονται και εκκρίνουν πρωτεΐνες εξωκυττάριας μήτρας οι οποίες σχηματίζουν μια ινώδη πλάκα (Glass et al. "Atherosclerosis: The Road Ahead", Cell Press, vol. 104, pp. 503-516, 2001).



Εικόνα 6: Ρήξη αθηρωματικής πλάκας και θρόμβωση. Η νέκρωση των μακροφάγων και των αφρωδών κυττάρων που προέρχονται από τα λεία μυϊκά κύτταρα οδηγεί στο σχηματισμό ενός νεκρωτικού πυρήνα και στη συσσώρευση λιπιδίων. Η έκκριση μεταλλοπρωτεϊνασών και η νεοαγγείωση συμβάλλουν στην αποδυνάμωση της ινώδους πλάκας και έτσι επέρχεται η ρήξη της. Μετά την ρήξη της πλάκας ακολουθεί η στρατολόγηση και η συσσώρευση των αιμοπεταλίων και τελικά δημιουργείται ο θρόμβος (Glass et al. "Atherosclerosis: The Road Ahead", Cell Press, vol. 104, pp. 503-516, 2001).

Ενδοθηλιακά κύτταρα και ενδοθηλιακή δυσλειτουργία

Το ενδοθήλιο είναι ο κύριος ρυθμιστής της ομοιόστασης του αγγειακού τοιχώματος. Φυσιολογικά, τα ενδοθηλιακά κύτταρα διατηρούν έναν χαλαρό αγγειακό τόνο και χαμηλά επίπεδα οξειδωτικού στρες, απελευθερώνοντας μεσολαβητές, όπως το NO, η προστακυκλίνη (PGI2) και η ET-1, και ελέγχοντας την τοπική δράση της Ang-II. Επιπλέον, το ενδοθήλιο ρυθμίζει την διαπερατότητα των αγγείων στα συστατικά του πλάσματος, την προσκόλληση και την συσσώρευση των αιμοπεταλίων και των λευκοκυττάρων, καθώς και τη θρόμβωση [20].

Όμως, αυτή η ισορροπημένη ενδοθηλιακή ρύθμιση της λειτουργίας των αιμοφόρων αγγείων μπορεί να αλλάξει λόγω διάφορων συνθηκών. Ως απάντηση σε μια ποικιλία επιβλαβών ερεθισμάτων, το ενδοθήλιο υφίσταται φαινοτυπική διαμόρφωση, η οποία είναι γνωστή ως ενδοθηλιακή δυσλειτουργία και χαρακτηρίζεται από απώλεια ή απορύθμιση των μηχανισμών της ομοιόστασης που λειτουργούν σε υγιή ενδοθηλιακά κύτταρα. Αυτή η παθοφυσιολογική κατάσταση σχετίζεται με αυξημένη έκφραση μορίων προσκόλλησης, αυξημένη σύνθεση προφλεγμονωδών και προθρομβωτικών παραγόντων, αυξημένο οξειδωτικό στρες και μη φυσιολογική διαμόρφωση του αγγειακού τόνου, τα οποία μπορεί να οδηγήσουν σε καταστάσεις όπως, η εξασθενημένη αγγειοδιαστολή [20].

Επιπροσθέτως, έχει βρεθεί πως η ενδοθηλιακή δυσλειτουργία συμβαίνει νωρίς στη διαδικασία της αθηρογένεσης, και συμβάλλει στο σχηματισμό και στην πρόοδο της αθηρωματικής πλάκας. Μελέτες έχουν δείξει πως ασθενείς με καρδιαγγειακούς παράγοντες κινδύνου, αλλά ακόμα χωρίς κλινικές ενδείξεις αθηροσκλήρωσης, επηρεάζονται από την ενδοθηλιακή δυσλειτουργία και αυτό διαπιστώνεται από την μειωμένη ανταπόκρισή τους στο ενδοθηλιακά αγγειοδιασταλτικά, όπως η ακετυλοχολίνη και η βραδυκινίνη. Επίσης, από μελέτες έχει προκύψει ότι η ενδοθηλιακή δυσλειτουργία καρογνωστικό παράγοντα μελλοντικών καρδιαγγειακών συμβάντων σε ασθενείς με αθηροσκληρωτικούς παράγοντες κινδύνου, με σταθερή ισχαιμική καρδιακή νόσο ή με οξέα στεφανιαία σύνδρομα [20].

Ακόμη, η ενδοθηλιακή δυσλειτουργία σχετίζεται με κλινικά συμβάντα που έχουν ως αιτία την αθηροθρόμβωση, διότι το ενδοθήλιο ενεργοποιείται και δεν έχει πια προστατευτικές ιδιότητες και έτσι προωθείται η αθηροθρόμβωση. Αξίζει επίσης να σημειωθεί ότι η ύπαρξη αθηρογόνων παραγόντων σχετίζεται με την ενδοθηλιακή δυσλειτουργία όχι μόνο σε αρτηρίες ευαίσθητες στην αθηροσκλήρωση, αλλά και σε αρτηρίες ανθεκτικές στην αθηροσκλήρωση, καθώς και στη μικροκυκλοφορία [3].

Ενδοθηλιακή δυσλειτουργία, δυσλιπιδαιμία και υπέρταση

Οι λιποπρωτεΐνες του πλάσματος επηρεάζουν την ενδοθηλιακή λειτουργία τόσο μακροπρόθεσμα όσο και βραχυπρόθεσμα. Υπάρχει μια καλά τεκμηριωμένη σχέση μεταξύ των αθηρογόνων λιποπρωτεϊνών, των υπολειμμάτων των χυλομικρών και των τριγλυκεριδίων, με τις αποκρίσεις που εξαρτώνται από το ενδοθήλιο [20].

Η υπερχοληστερολαιμία και τα υψηλά επίπεδα ολικής χοληστερόλης και LDL χοληστερόλης είναι αντιστρόφως ανάλογα με την αγγειοδιαστολή που εξαρτάται από το ενδοθήλιο. Ενώ, η HDL έχει αντι-αθηρογόνα δράση και εκτός από τον γνωστό ρόλο της, που είναι η αντίστροφη μεταφορά χοληστερόλης, φαίνεται να ρυθμίζει την ενδοθηλιακή λειτουργία με ευεργετικό τρόπο (Εικόνα 2) [20], [21].

Ωστόσο, τα επίπεδα LDL και HDL στο πλάσμα σε κατάσταση νηστείας εξηγούν μόνο εν μέρει τη σχέση μεταξύ δυσλιπιδαιμίας και αθηροσκλήρωσης, επειδή οι άνθρωποι περνούν ένα σημαντικό χρονικό διάστημα σε μετα-γευματική κατάσταση. Υπάρχουν ενδείξεις ότι οι μετα-γευματικές αλλαγές στις συγκεντρώσεις των υπολειμμάτων των χυλομικρών, που είναι πλούσια σε χοληστερόλη, προάγουν την αθηρογένεση. Αυτά εισέργονται στο αρτηριακό τοίχωμα, προκαλώντας το σχηματισμό των αφρωδών κυττάρων από τα μακροφάγα και τα λεία μυϊκά κύτταρα, λόγω του ότι υπάρχει περίσσεια λιποπρωτεϊνών που είναι πλούσιες σε χοληστερόλη, καθώς και μακροφάγα, Τ κύτταρα και οι φλεγμονώδεις κυτοκίνες τους, που διεισδύουν στην περιοχή με τη βλάβη. Η μετα-γευματική υπερτριγλυκεριδαιμία σχετίζεται με μια φλεγμονώδη κατάσταση και με αυξημένα επίπεδα φλεγμονωδών παραγόντων, όπως είναι ο παράγοντας νέκρωσης όγκων α (TNF-α), η IL-6, το ICAM-1 (Intercellular adhesion molecule 1, γνωστό και ως CD 54) και το VCAM-1 (Vascular cell adhesion molecule 1, γνωστό και ως CD 106). Επιπλέον, τα τριγλυκερίδια που απομονώθηκαν από δείγματα πλάσματος νηστείας ατόμων με υπερτριγλυκεριδαιμία, βρέθηκε ότι προκαλούν φλεγμονώδη απόκριση στα ενδοθηλιακά κύτταρα [20].

Το σύστημα ρενίνης-αγγειοτενσίνης (RAS) παίζει καθοριστικό ρόλο στην παθογένεση της ενδοθηλιακής δυσλειτουργίας. Η ενεργοποίηση του υποδοχέα της Ang-II (AT₁R) οδηγεί σε αγγειοσυστολή και σχετίζεται με αύξηση της απελευθέρωσης των ROS, με απόπτωση των κυττάρων των αγγείων, καθώς και με αυξημένη έκφραση του υποδοχέα της ox-LDL, των μορίων προσκόλλησης, των χημειοτακτικών παραγόντων και των προ-φλεγμονωδών κυτοκινών. Έχει, επίσης, αποδειχθεί ότι η υπεργοληστερολαιμία και το RAS αλληλεπιδρούν. Αυτό συμβαίνει, διότι η υπεργοληστερολαιμία αυξάνει τους ΑΤ₁R και αυξάνει και τη λειτουργική τους ανταπόκριση σε αγγειοσυσταλτικά, ενώ η χορήγηση στατινών για την αντιμετώπιση της υπεργοληστερολαιμίας, μειώνει την έκφραση των ΑΤ₁R και απορυθμίζει τις λειτουργίες τους. Επιπλέον, ο εντοπισμός του ενζύμου μετατροπής της αγγειοτενσίνης (ACE) σε αθηροσκληρωτικές βλάβες υποδηλώνει ικανότητα τοπικής παραγωγής Ang-Π και προ-φλεγμονωδών ουσιών. Υπάρχουν, επίσης, ενδείξεις ότι η υπερχοληστερολαιμία αυξάνει την παραγωγή αγγειοτενσινογόνου στο πλάσμα και ότι ο ανταγωνισμός των ΑΤ1R ενισχύει την ενδοθηλιακή δυσλειτουργία [20], [22]-[24].

Ένας άλλος μηχανισμός που συμβάλλει στην ενδοθηλιακή δυσλειτουργία σε άτομα με υπερχοληστερολαιμία είναι η παραγωγή της ασύμμετρης διμεθυλαργινίνης (ADMA), που είναι ένας ενδογενής ανταγωνιστικός αναστολέας των συνθασών του

23

NO. Έχει αποδειχθεί ότι σε ανθρώπους με υπέρταση τα επίπεδα της ADMA στο πλάσμα και της SDMA, που είναι το βιολογικά ανενεργό συμμετρικό στερεοϊσομερές της ADMA, είναι υψηλά και ότι η βιοδιαθεσιμότητα του NO μειώνεται. Η οξείδωση της LDL στο αγγειακό τοίχωμα μπορεί να είναι υπεύθυνη για αυτό το γεγονός, αναστέλλοντας τη δραστικότητα της διμεθυλαμινο-υδρολάσης της διμεθυλαργινίνης (DDAH), ενός ενζύμου που αποικοδομεί την ADMA. Επιπλέον, η ADMA μπορεί να αυξήσει την έκφραση του LOX-1, που είναι ο κύριος υποδοχέας της οx-LDL στα ενδοθηλιακά κύτταρα. Επιπλέον, υπάρχει πιθανή αλληλεπίδραση μεταξύ της ADMA και του RAS [20], [25]–[29].

<u>Λευκοκύτταρα</u>

Από τις πρώτες κυτταρικές αποκρίσεις στην αθηρογένεση είναι η στρατολόγηση των μονοκυττάρων και των Τ λεμφοκυττάρων και αυτή η κυτταρική απόκριση οδηγεί στην ανάπτυξη της νόσου. Όσον αφορά τα Β λεμφοκύτταρα, σπάνια βρίσκονται στο εσωτερικό της πλάκας, αλλά αφθονούν στο εξωτερικό στρώμα του τοιχώματος των αγγείων. Επίσης, έχουν βρεθεί ενεργοποιημένα μαστοκύτταρα τόσο στην πλάκα όσο και στο εξωτερικό στρώμα του τοιχώματος των αγγείων, συγκεκριμένα σε βλάβες οι οποίες προκαλούν οξέα ισχαιμικά επεισόδια. Επιπλέον, ουδετερόφιλα έχουν βρεθεί σε στεφανιαίες πλάκες όπου υπάρχει θρόμβωση, πιθανώς ως απόκριση στην ρήξη της αθηρωματικής πλάκας [3], [30]–[34].

Η MCP-1 είναι μία χημειοκίνη, η οποία προσελκύει τα μονοκύτταρα και τα Τ λεμφοκύτταρα και παίζει πολύ σημαντικό ρόλο στην στρατολόγησή τους. Επιπλέον, στην αθηροσκλήρωση η MCP-1 υπερεκφράζεται και σε αυτό συνεισφέρουν τα ενδοθηλιακά κύτταρα, τα λεία μυϊκά κύτταρα και τα μακροφάγα. Ο υποδοχέας της MCP-1 (CCR2), που βρίσκεται πάνω στα μονοκύτταρα/μακροφάγα, παρουσιάζει τεράστια αύξηση κατά την δημιουργία της πλάκας, δηλαδή από περίπου 3.000 υποδοχείς ανά κύτταρο που υπάρχουν φυσιολογικά, όταν το κύτταρο δέχεται ερέθισμα αυξάνονται σε πάνω από 60.00 υποδοχείς ανά κύτταρο [3], [30].

Στον έσω χιτώνα των αγγείων, όπως έχει αναφερθεί και παραπάνω, τα μονοκύτταρα διαφοροποιούνται σε μακροφάγα και μέσω υποδοχέων εισέρχεται σε αυτά η LDL. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα, τα μακροφάγα να μετατραπούν σε αφρώδη κύτταρα, δηλαδή σε κύτταρα με τεράστιες ποσότητες εστέρων χοληστερόλης. Έτσι, τα μακροφάγα συνεχίζουν να συσσωρεύουν LDL, μέχρι να οδηγηθούν σε απόπτωση και νέκρωση. Ο θάνατος των μακροφάγων συνεισφέρει στη δημιουργία του πυρήνα της

24

αθηρωματικής πλάκας, που είναι πλούσιος σε λιπίδια. Επιπλέον, τα μακροφάγα έχουν θρομβογενείς ιδιότητες, διότι εκφράζουν πρωτεολυτικά ένζυμα, παραδείγματος χάριν MMPs, καθώς και τον ιστικό παράγοντα (Εικόνα 3) [3], [30], [35], [36].

Επιπρόσθετα, το ανοσοποιητικό σύστημα ρυθμίζει την πρόοδο της νόσου, διότι η ox-LDL, η οποία βρίσκεται σε αφθονία στις αθηρωματικές πλάκες και την αναγνωρίζουν τα Τ λεμφοκύτταρα, είναι υπεύθυνη για την ενεργοποίηση του ανοσοποιητικού συστήματος [3], [31], [37].

<u>Λεία μυϊκά κύτταρα</u>

Μόνο τα ενδοθηλιακά κύτταρα, τα μακροφάγα και μερικά Τ κύτταρα συμμετέχουν στη δημιουργία των αφρωδών κυττάρων, μια διαδικασία που συμβαίνει στην αρχή της νόσου και είναι ασυμπτωματική. Κατά την εξέλιξη της νόσου, η ανοσοφλεγμονώδης απόκριση συνδέεται με την ινωδοπολλαπλασιαστική απόκριση που προκαλείται από τα λεία μυϊκά κύτταρα. Αυτά τα κύτταρα είναι υπεύθυνα για την επούλωση και την επιδιόρθωση μετά από έναν αρτηριακό τραυματισμό. Εάν τα αθηρογόνα ερεθίσματα επιμένουν με την πάροδο των ετών, όπως συμβαίνει συχνά, η επανορθωτική απόκριση θα κυριαρχήσει και αυτό έχει ως αποτέλεσμα να χαθεί ο αυλός του αγγείου, η ροή του αίματος να μειωθεί και έτσι αρχίζει να υφίσταται ισχαιμία. Όμως, τα λεία μυϊκά κύτταρα και η πλούσια σε κολλαγόνο μήτρα που παράγουν, παρέχουν σταθερότητα στις πλάκες, προστατεύοντάς τες από επιβλαβείς συνέπειες, όπως είναι η ρήξη και η θρόμβωση (Εικόνα 3) [3], [38].

Τα λεία μυϊκά κύτταρα είναι τα κύρια κύτταρα που παράγουν συνδετικό ιστό στο φυσιολογικό εσωτερικό αρτηριακό τοίχωμα, αλλά και όταν έχει σχηματιστεί η αθηρωματική πλάκα σε αυτό. Λόγω του ότι αυτά τα κύτταρα έχουν επιδιορθωτικές και προστατευτικές ιδιότητες, η στρατολόγηση και ο πολλαπλασιασμός τους θεωρούνται ευεργετικές καταστάσεις, ενώ η γήρανση, η εξασθενημένη λειτουργία και ο θάνατός τους είναι επιζήμιες καταστάσεις [3], [39], [40].



 Ο ενδοθηλιακός αθηρογενής φαινότυπος έχει αυζημένη διαπερατότητα ως προς την LDL.



 Τα ενεργοποιημένα ενδοθηλιακά κύτταρα απελευθερώνουν προφλεγμονώδεις παράγοντες.



5. Τα μονοκύτταρα ωριμάζουν σε μακροφάγα.



7. Σχηματίζονται τα αφρώδη κύτταρα.



 Σχηματισμός αθηρωματικής πλάκας με λιπιδικό πυρήνα.



2. Η LDL οξειδώνεται.



4. Προσελκύονται μονοκύτταρα.



6. Τα μακροφάγα συνδέονται με την οξειδωμένη LDL.



 Επιδείνωση των φλεγμονωδών σημάτων και του οξειδωτικού στρες.



 Το ινώδες κάλυμμα που περιβάλει το λιπιδικό πυρήνα της πλάκας υφίσταται ρήξη.

Εικόνα 7: Τα βήματα της δημιουργίας της αθηρωματικής πλάκας από την ενδοθηλιακή δυσλειτουργία ως τη ρήξη του αγγειακού αυλού (Marchio et al. "Targeting early atherosclerosis: A focus on oxidative stress and inflammation," Oxid. Med. Cell. Longev., vol. 2019, no. Ldl, 2019, doi: 10.1155/2019/8563845).

1.5 Τα χαρακτηριστικά της αθηρωματικής πλάκας

Πυρήνας πλούσιος σε λιπίδια

Στα αρχικά στάδια της αθηρογένεσης, υφίσταται η δημιουργία των αφρωδών κυττάρων, όπως έχει εξηγηθεί παραπάνω. Όταν αυτά τα αφρώδη κύτταρα πεθαίνουν, αφήνουν πίσω τους τα λιπίδια που έχουν συσσωρεύσει, ως έναν μαλακό, αθηρωματικό πυρήνα μέσα στην πλάκα, ο οποίος στερείται εντελώς του κολλαγόνου και το μέγεθός του είναι κρίσιμο για την σταθερότητα της αθηρωματικής πλάκας (Εικόνες 8a και 8b) [3].

Κυτταρικός θάνατος

Κατά τη διάρκεια της αθηροσκλήρωσης, ενδοθηλιακά κύτταρα, μακροφάγα και λεία μυϊκά κύτταρα πεθαίνουν μέσω απόπτωσης και νέκρωσης. Η αποσύνθεση των αφρωδών κυττάρων και η απώλεια των λείων μυϊκών κυττάρων μπορεί να έχουν επιβλαβείς συνέπειες, καθώς οδηγούν στο σχηματισμό του πλούσιο σε λιπίδια πυρήνα και ενός ινώδους που είναι επιρρεπές σε ρήξη. Επιπλέον, η απόπτωση συνεισφέρει στην υψηλή δραστηριότητα του ιστικού παράγοντα και στην ικανότητα του πυρήνα της πλάκας να δημιουργεί θρόμβους. Το παράδοξο γεγονός ότι η πλάκα μπορεί να αναπτυχθεί παρόλο που ο κυτταρικός θάνατος φαίνεται να υπερβαίνει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό συμβαίνει πιθανώς επειδή, η ανανέωση των κυττάρων γίνεται από την εισροή νέων κυττάρων και όχι από την τοπική διαίρεση. Επιπλέον, κάποια μακροφάγα φαίνεται να πεθαίνουν στο σημείο της αθηρωματικής βλάβης, ενώ άλλα πιθανώς μεταναστεύουν σε άλλες αθηρωματικές πλάκες [3], [39], [41].

Ασβεστοποίηση

Η ασβεστοποίηση στις αθηρωματικές πλάκες είναι πολύ συχνή και αυξάνεται με την πάροδο της ηλικίας. Το συνολικό ποσό της ασβεστοποίησης είναι ένας δείκτης φορτίου στεφανιαίας πλάκας και παρέχει προγνωστικές πληροφορίες. Επίσης, είναι σε κάποιο βαθμό δραστική και ελεγχόμενη και τόσο τα λιπίδια όσο και ο συνδετικός ιστός μπορούν να ασβεστοποιηθούν. Στις στεφανιαίες αρτηρίες, ασβεστοποίηση προκαλείται σχεδόν πάντα από την αθηροσκλήρωση. Επιπλέον, κλινικές παρατηρήσεις έχουν δείξει ότι οι πλάκες που ευθύνονται για οξέα στεφανιαία σύνδρομα είναι λιγότερο ασβεστοποιημένες από τις πλάκες που ευθύνονται για τη σταθερή στηθάγχη [3], [42]–[45].

Νεοαγγείωση και αιμορραγία εντός της πλάκας

Η αγγειογένεση είναι συχνή στην προχωρημένη αθηροσκλήρωση και αποτελεί πιθανώς δείκτη της τρέχουσας δραστηριότητας της νόσου και, επιπλέον, χαρακτηρίζει τις αθηρωματικές πλάκες υψηλού κινδύνου. Ο ενδοθηλιακός πολλαπλασιασμός ξεκινάει από τον έξω χιτώνα του αγγείου και εκτείνεται διαμέσου του μέσου χιτώνα στη βάση της πλάκας, όπου η νεοαγγείωση είναι πιο εμφανής. Τα καινούργια μικροαγγεία που δημιουργούνται εκφράζουν μόρια κυτταρικής προσκόλλησης, όπως το VCAM-1, με αποτέλεσμα να συμβαίνει τοπική εξαγγείωση πρωτεϊνών του πλάσματος, ερυθροκυττάρων, κάτι το οποίο σημαίνει ότι υφίσταται αιμορραγία, καθώς και φλεγμονωδών κυττάρων. Έτσι, η αγγειογένεση και η φλεγμονή συχνά συνυπάρχουν και μπορούν να προκαλέσουν ταχεία εξέλιξη της πλάκας. Ανεξάρτητα από την ακεραιότητα της επιφάνειας της αθηρωματικής πλάκας, η εξαγγείωση των ερυθροκυττάρων είναι συχνή σε περιοχές που συμβαίνει η νεοαγγείωση, όμως δεν υπάρχουν στοιχεία ότι αυτές οι αιμορραγίες μπορούν να προκαλέσουν ρήξη της πλάκας ή θρόμβωση (Εικόνες 8a και 8b) [3], [46]–[50].

Αναδιαμόρφωση των αγγείων και στένωση του αυλού

Κατά την ανάπτυξη της πλάκας, πραγματοποιείται αναδιαμόρφωση της αρτηρίας, η οποία μπορεί να είναι επεκτατική ή περιοριστική, δηλαδή συμβαίνει αύξηση της διαμέτρου του αγγείου ή συρρίκνωση του αγγείου, αντίστοιχα. Οι πλάκες που είναι επιρρεπείς σε ρήξη και εκείνες που είναι υπεύθυνες για οξέα στεφανιαία σύνδρομα είναι σχετικά μεγάλες και σχετίζονται με την εκτεταμένη αναδιαμόρφωση, στην οποία ο αυλός διατηρείται φυσιολογικός. Αντίθετα, οι πλάκες που είναι υπεύθυνες για τη σταθερή στηθάγχη είναι μικρότερες και σχετίζονται με τη συστηματική αναδιαμόρφωση, στην οποία παρατηρείται και στένωση του αυλού. Επιπλέον, το κάπνισμα και ο σακχαρώδης διαβήτης έχουν συνδεθεί με την περιοριστική αναδιαμόρφωση (Εικόνες 8a και 8b) [3], [51].

<u>Ρήξη αθηρωματικής πλάκας</u>

Η ρήξη της αθηρωματικής πλάκας είναι η πιο κοινή αιτία θρόμβωσης της στεφανιαίας αρτηρίας. Ο όρος ρήξη της πλάκας χρησιμοποιείται όταν η πλάκα αυτή έχει ένα κενό στην ινώδη κάψα και έτσι έχει διαχωριστεί ο πλούσιος σε λιπίδια πυρήνας της από το αίμα που κυκλοφορεί στο αγγείο (Εικόνες 8a και 8b) [3], [52].

Μη θανατηφόρα και θανατηφόρα θρόμβωση

Κατά την ανάπτυξη της αθηροσκλήρωσης, η ρήξη της αθηρωματικής πλάκας είναι ένα φαινόμενο ιδιαίτερα συχνό και μάλιστα στα οξέα στεφανιαία σύνδρομα συμβαίνει πολλαπλή ρήξη. Η ρήξη ακολουθείται από αιμορραγία μέσα στην πλάκα και θρόμβωση στον αυλό, προκαλώντας έτσι ξαφνική και ταχεία εξέλιξη της βλάβης, η οποία όμως κλινικά δεν εμφανίζει συμπτώματα (Εικόνες 8a και 8b) [3], [53].

Έρευνες έχουν δείξει ότι η ρήξη της πλάκας ευθύνεται για το 76% όλων των θανατηφόρων καρδιακών προσβολών παγκοσμίως, οι οποίες προκαλούνται από στεφανιαία θρόμβωση, ενώ το υπόλοιπο 24% προκαλείται από διάβρωση της πλάκας και άλλους λιγότερο καλά καθορισμένους μηχανισμούς. Επιπλέον, η ρήξη είναι συχνότερη αιτία στεφανιαίας θρόμβωσης στους άνδρες (80%) από ό,τι είναι στις γυναίκες (60%) [3].

Ινώδες και αιμοπετάλια

Όταν συμβαίνει ρήξη της πλάκας και εκτίθεται ο υπενδοθηλιακός ιστός, τα αιμοπετάλια συσσωρεύονται, προσκολλώνται και έτσι σχηματίζεται το ινώδες, δηλαδή ο θρόμβος. Στην παθογένεση της αρτηριακής θρόμβωσης, η συσσώρευση αιμοπεταλίων είναι υπεύθυνη για την αρχική απόφραξη της ροής του αίματος, αλλά ο σχηματισμός του ινώδους είναι απαραίτητος για τη σταθεροποίηση της πλούσιας σε αιμοπετάλια θρόμβωσης [3].

Η συμβολή των κυττάρων του μυελού των οστών

Τα μακροφάγα που προέρχονται από το μυελό των οστών παίζουν πολύ σημαντικό ρόλο στην έναρξη και στην εξέλιξη της αθηροσκλήρωσης. Ωστόσο, τα ενδοθηλιακά κύτταρα και τα λεία μυϊκά κύτταρα που βρίσκονται στο εσωτερικό του αρτηριακού τοιχώματος, πολλαπλασιάζονται, μεταναστεύουν και εκκρίνουν ό,τι χρειάζεται για την επούλωση και την επιδιόρθωση μετά από έναν τραυματισμό στην αρτηρία. Πειραματικές μελέτες έχουν δείξει ότι πολλά από τα θεραπευτικά λεία μυϊκά κύτταρα προέρχονται από τον μυελό των οστών και μεταφέρονται στο τραυματισμένο τοίχωμα κυκλοφορούν του αγγείου το αίμα. Έτσι, η κινητοποίηση με των αθηροπροστατευτικών κυττάρων από το μυελό των οστών και η προώθησή τους στις πλάκες που είναι επιρρεπείς σε θρόμβωση, μπορεί να είναι ένας τρόπος σταθεροποίησης της αθηροσκλήρωσης, ενάντια στη θρόμβωση και στις συνέπειές της [3], [54], [55].



Εικόνα 8α: Διατομή στεφανιαίας αρτηρίας με αθηρωματική πλάκα που είναι επιρρεπής σε ρήξη. Επισημαίνονται: ο μεγάλος πλούσιος σε λιπίδια πυρήνας (πορτοκαλί αστερίσκος), το λεπτό ινώδες κάλυμμα (μπλε βέλη), η επεκτατική αναδιαμόρφωση (πράσινα βέλη) και το vasa vasorum και η νεοαγγείωση (κόκκινοι ανοιχτοί κύκλοι) (Falk E. "Pathogenesis of Atherosclerosis," J. Am. Coll. Cardiol., vol. 47, no. 8 SUPPL., pp. 0–5, 2006, doi: 10.1016/j.jacc.2005.09.068).



Εικόνα 8b: Ανθρώπινες στεφανιαίες αρτηρίες με διαφορετικούς τύπους αθηροσκληρωτικής βλάβης. Α: ευάλωτη αθηροσκληρωτική πλάκα, με μεγάλο νεκρωτικό κέντρο (nc) και λεπτό ινώδες στρώμα (fl) Β: πλάκα που έχει υποστεί ρήξη και έχει σχηματιστεί θρόμβος (th) (Badimón et al. "Lipoproteins, Platelets, and Atherothrombosis," Rev. Española Cardiol. (English Ed., vol. 62, no. 10, pp. 1161–1178, 2009, doi: 10.1016/s1885-5857(09)73331-6).

2. Ο ρόλος του οξειδωτικού στρες στην αθηροσκλήρωση

Η παθογένεση της αθηροσκλήρωσης περιλαμβάνει την ενεργοποίηση προφλεγμονωδών οδών σηματοδότησης, την έκφραση κυτοκικών/χημειοκινών και το αυξημένο οξειδωτικό στρες. Το οξειδωτικό στρες χαρακτηρίζεται από την ανισορροπία ανάμεσα στα αυξημένα ROS και στα μειωμένα ενδογενώς αντιοξειδωτικά αμυντικά συστήματα. Τα ROS παίζουν σημαντικό ρόλο στις φλεγμονώδεις αποκρίσεις, στην απόπτωση, στην ανάπτυξη των κυττάρων, στη μεταβολή του αγγειακό τόνου, καθώς και στην οξείδωση της LDL. Η παραγωγή των ROS στα τοιχώματα των αγγείων αυξάνεται σε όλες τις καταστάσεις που θεωρούνται παράγοντες κινδύνου για την αθηροσκληρωτική καρδιαγγειακή νόσο, όπως είναι η υπέρταση, ο διαβήτης, το κάπνισμα, η δυσλιπιδαιμία και άλλοι [19].

2.1 Ενδογενής παραγωγή των ROS στην αθηροσκλήρωση

Τα ROS στα αιμοφόρα αγγεία παράγονται κυρίως από την οξειδάση του φωσφορικού δινουκλεοτίδιου νικοτιναμιδίου αδενίνης (NADPH), από την οξειδάση της ξανθίνης, από μιτοχονδριακά ένζυμα, από λιποξυγονάσες, από μυελοϋπεροξειδάσες και από την ενδοθηλιακή συνθάση του NO (eNOS) (Εικόνα 9) [19].

Το πιο σημαντικό σύστημα δημιουργίας των ROS στο καρδιαγγειακό σύστημα είναι οι οξειδάσες του NADPH (NOX). Αφού ενεργοποιηθούν οι NOX, δημιουργείται το ανιόν του σουπεροξειδίου από το μόριο του οξυγόνου, με μεταφορά ηλεκτρονίων από το NADPH. Επιπλέον, οι NOX είναι ενζυμικά σύμπλοκα πολλαπλών υπομονάδων και διάφορες ισομορφές τους έχουν μελετηθεί για το ρόλο που έχουν στην αθηροσκλήρωση. Στα ποντίκια, τα αγγειακά λεία μυϊκά κύτταρα εκφράζουν τις Nox1 και Nox4 και τα ενδοθηλιακά κύτταρα εκφράζουν τις Nox2 και Nox4. Έχει βρεθεί πως η γενετική διαγραφή της Nox1 σε ApoE knockout ποντίκια (ποντίκια από τα οποία απουσιάζει το γονίδιο της απολιποπρωτεΐνης Ε) μειώνει την αθηροσκλήρωση. Παρομοίως, η γενετική διαγραφή της Nox2 έχει αποδειχθεί ότι σχετίζεται με τη μείωση της αθηροσκλήρωσης στην αορτή σε μοντέλα ποντικιών. Από την άλλη, ο ρόλος της Nox4 είναι αμφιλεγόμενος και μερικές μελέτες δείχνουν ότι είναι προστατευτική έναντι της αθηρογένεσης. Αυτό πιθανότατα οφείλεται στο γεγονός ότι η Nox4 παράγει υπεροξείδιο του υδρογόνου αντί για σουπεροξείδιο. Ακόμη, η δραστηριότητα των NOX στα μακροφάγα είναι πολύ σημαντική για την παραγωγή της ox-LDL και, επίσης, οι ΝΟΧ παίζουν ρόλο στην έκφραση των ενδοθηλιακών μορίων προσκόλλησης και στον πολλαπλασιασμό των αγγειακών λείων μυϊκών κυττάρων (Εικόνα 9) [19], [56]–[62].

Οι οξειδάσες της ξανθίνης βρίσκονται στα ενδοθηλιακά κύτταρα και στο πλάσμα και παράγουν ανιόντα σουπεροξειδίου και υπεροξείδιο του υδρογόνου. Έχει βρεθεί ότι τα επίπεδα τους είναι αυξημένα στην αθηρωματική πλάκα στον άνθρωπο. Επιπλέον, μελέτες έχουν δείξει ότι οι αναστολείς της οξειδάσης της ξανθίνης μπορούν να μειώσουν την ανάπτυξη της αθηροσκλήρωσης σε ApoE knockout ποντίκια, όπως επίσης και να μετριάσουν την ενδοθηλιακή δυσλειτουργία στους καπνιστές. Πιο συγκεκριμένα, η οξειδάση της ξανθίνης διεγείρει την έκφραση των LOX-1 και CD 36 στα μακροφάγα και στα αγγειακά λεία μυϊκά κύτταρα και αυξάνει την παραγωγή των ROS. Στη συνέχεια, ενεργοποιείται το φλεγμονόσωμα NLRP3, καθώς και φλεγμονώδης μεσολαβητές, προκαλώντας έτσι το μετασχηματισμό των μακροφάγων και των αγγειακών λείων μυϊκών κυττάρων σε αφρώδη κύτταρα (Εικόνα 9) [19], [63]–[69].

Τα μιτοχονδριακά ένζυμα φυσιολογικά παράγουν ανιόντα σουπεροξειδίου, αυτό όμως μπορεί να μετατραπεί σε μία παθολογική κατάσταση αν υπάρχει μιτοχονδριακή δυσλειτουργία, κάτι το οποίο οδηγεί σε υπερβολική παραγωγή των ROS ή αν υπάρχει αποτυχία των αντιοξειδωτικών μηχανισμών. Σε πειράματα που περιλαμβάνουν την γενετική διαγραφή αντιοξειδωτικών συστημάτων σε ApoE knockout ποντίκια, έχει βρεθεί επιταχυνόμενη αθηροσκλήρωση και αυξημένα μιτοχονδριακά ROS, υποδηλώνοντας έτσι έναν ρόλο των μιτοχονδριακών ROS στην αθηρογένεση (Εικόνα 9) [19], [70].

Οι λιποξυγονάσες που σχετίζονται με την αθηρογένεση είναι η 5-λιποξυγονάση και η 12/15-λιποξυγονάση, οι οποίες ενεργοποιούν τις NOX στα αγγειακά λεία μυϊκά κύτταρα, με αποτέλεσμα να δημιουργείται οξειδωτικό στρες στους αγγειακούς ιστούς. Τα λευκοτριένια, που παράγονται από το αραχιδονικό οξύ και την αντίδραση αυτή καταλύουν οι λιποξυγονάσες, είναι τα ίδια προφλεγμονώδη και με τη σειρά τους ενεργοποιούν τα ενδοθηλιακά κύτταρα, τα μακροφάγα και τα αφρώδη κύτταρα, καθώς επίσης οδηγούν και σε απελευθέρωση κυτοκινών και MMPs. Η αναστολή της 5λιποξυγονάσης βελτιώνει τις αλλαγές λόγω της φλεγμονής, που συμβαίνουν μετά από την ισχαιμία του μυοκαρδίου, ενώ 12/15-λιποξυγονάση εμπλέκεται κυρίως στο οξειδωτικό στρες που σχετίζεται με τη διαβητική μυοκαρδιοπάθεια (Εικόνα 9) [19], [71]–[74]. Η μυελοϋπεροξειδάση βρίσκεται κυρίως στα ουδετερόφιλα και σε ένα μικρό βαθμό στα μονοκύτταρα και παράγει υποαλογονούχα οξέα, όπως το υποχλωριώδες οξύ (HOCl⁻), από την αντίδραση με το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H₂O₂). Έχει βακτηριοκτόνο δράση και παίζει σημαντικό ρόλο στο ανοσοποιητικό σύστημα. Η δυσλειτουργία αυτού του συστήματος δημιουργεί τα ROS και προκαλεί οξειδωτικό στρες. Επιπλέον, η μυελοϋπεροξειδάση οξειδώνει την LDL, την HDL και το NO, προκαλώντας και ενισχύοντας την αθηρογένεση και έχει βρεθεί πως τα επίπεδα της μυελοϋπεροξειδάσης αυξάνονται σε ασθενείς με αθηροσκληρωτική στεφανιαία νόσο (Εικόνα 9) [19], [71], [75]–[79].

Το ΝΟ παίζει αγγειοπροστατευτικό ρόλο και εκφράζεται στο ενδοθήλιο μέσω της ενεργοποίησης της eNOS. Όμως, υπό συνθήκες οξειδωτικού στρες, η eNOS γίνεται δυσλειτουργική. Τα ανιόντα υπεροξειδίου που δημιουργούνται από τα ROS συνδυάζονται με το NO και σχηματίζουν ένα πολύ αντιδραστικό OONO⁻, το οποίο, στη συνέχεια, συνδυάζεται με συμπαράγοντες της eNOS και το αποτέλεσμα είναι η eNOS να παράγει ανιόντα υπεροξειδίου αντί για NO, γεγονός που έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή των ROS. Μελέτες έχουν δείξει αντίστροφη σχέση μεταξύ της διαθεσιμότητας των συμπαραγόντων της eNOS και της ανάπτυξης της ενδοθηλιακής δυσλειτουργίας (Εικόνα 9) [19], [80], [81].



Εικόνα 9: Μηχανισμοί με τους οποίους οι παράγοντες καρδιαγγειακού κινδύνου επηρεάζουν την παραγωγή των ROS και την ενδοθηλιακή λειτουργία κατά την αλληλεπίδραση των οξειδωτικών και των αντιοξειδωτικών συστημάτων. Επίσης, απεικονίζεται η επίδραση των ROS σε διάφορα στάδια της αθηροσκλήρωσης (Kattoor et al. "Oxidative Stress in Atherosclerosis," Curr. Atheroscler. Rep., vol. 19, no. 11, 2017, doi: 10.1007/s11883-017-0678-6).

2.2 Ο ρόλος της οξειδωμένης LDL και του υποδοχέα LOX-1 στην αθηροσκλήρωση

Είναι γενικά αποδεκτό ότι η ox-LDL παίζει σημαντικότερο ρόλο από τη μη οξειδωμένη LDL στη διαδικασία της αθηρογένεσης. Αρκετές μελέτες έχουν δείξει αυξημένα επίπεδα της ox-LDL στο πλάσμα ασθενών με αθηροσκληρωτική καρδιαγγειακή νόσο. Η οξείδωση της LDL μπορεί να συμβεί ως αποτέλεσμα της δημιουργίας των ROS στο αρτηριακό τοίχωμα. Πολλές μελέτες έχουν δείξει ότι η ox-LDL προάγει τη δημιουργία των ROS στα ενδοθηλιακά κύτταρα, στα λεία μυϊκά κύτταρα και στα μακροφάγα και αναστέλλει τη δράση της eNOS στα ενδοθηλιακά κύτταρα. Έχουν αναγνωριστεί αρκετές τάξεις υποδοχέων της ox-LDL, μεταξύ αυτών οι SR-A τύπου I και II, CD 36 και LOX-1 πιστεύεται ότι παίζουν σημαντικό ρόλο στην

πρόσληψη της ox-LDL και στο σχηματισμό των αφρωδών κυττάρων. Αν και οι CD 36 και SR-A συμβάλλουν στο 75-90% της πρόσληψης της ox-LDL, ο ρόλος τους στην προώθηση της αθηρογένεσης είναι αμφιλεγόμενος. Από την άλλη πλευρά, ο LOX-1 θεωρείται ότι παίζει σημαντικό ρόλο στην αθηρογένεση και η γενετική διαγραφή του σε ποντίκια LDLr-null έχει αποδειχθεί ότι μειώνει την αθηρογένεση. Η αυξημένη έκφραση του LOX-1 ρυθμίζεται από προ-φλεγμονώδεις κυτοκίνες, από την Ang-II, από την ox-LDL, από τις ελεύθερες ρίζες, καθώς και από καταστάσεις όπως η υπεργλυκαιμία, η υπέρταση και ο διαβήτης (Εικόνα 10) [19], [82]–[85].

Ο LOX-1 είναι ο κύριος υποδοχέας της ox-LDL στα ενδοθηλιακά κύτταρα. Συμμετέχει στη μεταγραφή του NF-κB, ο οποίος με τη σειρά του αυξάνει την έκφραση των μορίων προσκόλλησης στα ενδοθηλιακά κύτταρα. Αυξάνει, επίσης, την έκφραση της MCP-1, η οποία βοηθά στην πρόσληψη μονοκυττάρων, κάτι που αποτελεί ένα πρώιμο βήμα στην αθηρογένεση. Επιπλέον, η ενεργοποίηση του LOX-1 προκαλεί απόπτωση στα ενδοθηλιακά κύτταρα, μειωμένη έκφραση της αντι-αποπτωτικής πρωτεΐνης Bcl-2 και της ανασταλτικής πρωτεΐνης νευρωνικής απόπτωσης (NAIP) και προκαλεί αυξημένη έκφραση της κασπάσης 3 και της κασπάσης 9, οι οποίες διασπούν τις αντι-αποπτωτικές πρωτεΐνες. Επίσης, μειώνει τη μεταγραφή της eNOS, με αποτέλεσμα να μειώνεται η παραγωγή του NO και να συμβαίνει αγγειοσυστολή. Μελέτες έχουν δείξει ότι ο LOX-1 μεσολαβεί στην ενεργοποίηση της πρωτεΐνης p66 (Shc), η οποία εμπλέκεται στην ενδοθηλιακή δυσλειτουργία που παρατηρείται στην υπέρταση και, επίσης, πιστεύεται ότι η πρωτεΐνη αυτή αυξάνει την παραγωγή των ROS και μειώνει τη διαθεσιμότητα του NO, κάτι το οποίο οδηγεί σε αγγειακή δυσλειτουργία (Εικόνα 10) [19], [86]–[90].

Σε σύγκριση με τους άλλους υποδοχείς, ο LOX-1 στα μη διεγερμένα μακροφάγα σχετίζεται μόνο με το 5-10% της πρόσληψης της οx-LDL, αλλά αυτό το ποσοστό μπορεί να φτάσει μέχρι το 40% στα μακροφάγα, όταν η έκφραση του LOX-1 είναι αυξημένη. Η έκθεση σε προφλεγμονώδεις κυτοκίνες, υψηλή συγκέντρωση γλυκόζης και ox-LDL προκαλεί αύξηση της έκφρασης του LOX-1 και καταστολή των άλλων υποδοχέων. Έτσι, πιστεύεται ότι σε αθηροσκληρωτικές αλλοιώσεις, που αναπτύσσονται σε ένα προ-φλεγμονώδες περιβάλλον, ο LOX-1 παίζει σημαντικό ρόλο στην πρόσληψη της ox-LDL και στο σχηματισμό των αφρωδών κυττάρων από τα μακροφάγα (Εικόνα 10) [19], [85], [91], [92].

Ο πολλαπλασιασμός και η μετανάστευση των λείων μυϊκών κυττάρων είναι ένα σημαντικό βήμα στην υπερπλασία του έσω χιτώνα των αγγείων, η οποία συμβαίνει

στην αθηροσκλήρωση. Ο ρόλος του LOX-1 σε αυτή την υπερπλασία έχει μελετηθεί σε μοντέλα ποντικιών και βρέθηκε ότι το αντίσωμα LOX-1 μπόρεσε να καταστείλει σημαντικά την υπερπλασία του έσω χιτώνα και το οξειδωτικό στρες. Περαιτέρω στοιχεία προήλθαν από μελέτες σε ποντίκια LDLR knockout (ποντίκια από τα οποία απουσιάζει το γονίδιο του υποδοχέα LDLR, που είναι υποδοχέας της ApoE), δηλαδή αποδείχτηκε ότι η γενετική διαγραφή του γονιδίου LOX-1 σε ποντίκια ApoE^{-/-} (ποντίκια με καθολική έλλειψη ApoE) μείωσε σημαντικά τον πολλαπλασιασμό και την μετανάστευση των λείων μυϊκών κυττάρων, το πάχος του αυλού του αγγείου, την εναπόθεση κολλαγόνου, καθώς και τα προ-φλεγμονώδη και προ-οξειδωτικά σήματα (Εικόνα 10) [19], [84], [93], [94].

Εκτός από την επίδρασή του σε διάφορα κύτταρα που εμπλέκονται στην αθηροσκλήρωση, ο LOX-1 τροποποιεί τη σταθερότητα της αθηρωματικής πλάκας και ενεργοποιεί τα αιμοπετάλια, που είναι κρίσιμα για την ανάπτυξη οξέων στεφανιαίων συνδρόμων. Η ox-LDL μέσω του LOX-1 συμβάλλει στην αύξηση της δραστηριότητας των MMP-1, MMP-2, MMP-3 και MMP-9. Ανθρώπινα ενδοθηλιακά κύτταρα αορτής που έχουν υποστεί αγωγή με ox-LDL δείχνουν αυξημένη έκφραση του LOX-1 και αυξημένη παραγωγή MMP-9. Η θεραπεία με αντιοξειδωτικά ή με αντισώματα anti-LOX-1 αναιρεί αυτά αποτελέσματα. Επίσης, αυξημένη συγκέντρωση της ox-LDL προκαλεί απόπτωση στα λεία μυϊκά κύτταρα. Σε αντίθεση με τη μη οξειδωμένη LDL, η ox-LDL προκαλεί συνεχή αύξηση στη παραγωγή των ROS έως και 45 λεπτά. Επιπλέον, η ox-LDL αυξάνει την έκφραση του LOX-1 στα λεία μυϊκά κύτταρα και πιστεύεται ότι προκαλεί απόπτωση. Η αυξημένη παραγωγή των MMP και η απόπτωση των λείων μυϊκών κυττάρων συμβάλλουν στην αστάθεια της αθηρωματικής πλάκας (Εικόνα 10) [19], [85], [94]–[97].

Ο LOX-1 εμπλέκεται στην ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων με πολλούς τρόπους. Εκφράζεται στα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια και η δέσμευσή του με την ox-LDL μπορεί να απενεργοποιηθεί με το αντίσωμα anti-LOX-1. Επιπλέον, συμμετέχει στη συσσώρευση των αιμοπεταλίων, η οποία προκαλείται από το ADP και στην ενεργοποίηση των υποδοχέων ινωδογόνου στα αιμοπετάλια. Τα αιμοπετάλια μπορούν, επίσης, να προσκολληθούν στους ενδοθηλιακούς LOX-1, να αλληλεπιδράσουν με τους LOX-1 και CD 40 και να προκαλέσουν απελευθέρωση της ΕΤ-1. Επιπλέον, η αλληλεπίδραση αιμοπεταλίων-ενδοθηλίου οδηγεί σε αυξημένη παραγωγή υπεροξειδίου από τα ενδοθηλιακά κύτταρα, προκαλώντας έτσι απενεργοποίηση του NO, με αποτέλεσμα τη δυσλειτουργία του ενδοθηλίου (Εικόνα 10) [19], [98], [99].


Εικόνα 10: Οι υποδοχείς LOX-1 που υπάρχουν στο ενδοθήλιο προσλαμβάνουν την ox-LDL, γεγονός που αυξάνει την έκφραση των LOX-1 και των μορίων προσκόλλησης. Τα κυκλοφορούντα μονοκύτταρα μετακινούνται στον υπενδοθηλιακό χώρο και μετατρέπονται σε μακροφάγα. Οι υποδοχείς CD36, SR-A και LOX-1 που υπάρχουν στα μακροφάγα προσλαμβάνουν την ox-LDL και έτσι σχηματίζονται τα αφρώδη κύτταρα. Διάφορες φλεγμονώδεις κυτοκίνες και αυξητικοί παράγοντες που εκλύονται από τα μακροφάγα, προκαλούν πολλαπλασιασμό των λείων μυϊκών κυττάρων και των ινοβλαστών και τελικά συμβαίνει ρήξη της πλάκας και σχηματίζεται ο θρόμβος που είναι πλούσιος σε αιμοπετάλια (Goyal et al. "Current concepts of the role of oxidized LDL receptors in atherosclerosis," Curr. Atheroscler. Rep., vol. 14, no. 2, pp. 150–159, 2012, doi: 10.1007/s11883-012-0228-1).

3. Ο ρόλος της φλεγμονής στην αθηροσκλήρωση

3.1 Οι επιπτώσεις της φλεγμονής στην ανάπτυξη της αθηροσκλήρωσης

Η φλεγμονή έχει αποδειχθεί ότι παίζει σημαντικό ρόλο στην έναρξη και στην εξέλιξη της αθηρωματικής πλάκας. Στο πρώτο στάδιο της αθηροσκλήρωσης, οι αιτίες της νόσου είναι ο τραυματισμός του ενδοθηλίου, ο μη φυσιολογικός μεταβολισμός των λιπιδίων και η αιμοδυναμική βλάβη. Επίσης, η αθηρογενής διαδικασία θεωρείται ότι συνοδεύεται από φλεγμονώδεις μεταβολές στα ενδοθηλιακά κύτταρα. Συνοψίζοντας τα όσα αναφέρθηκαν εκτενέστερα παραπάνω, αξίζει να σημειωθεί ότι όταν τα ενδοθηλιακά κύτταρα ενεργοποιούνται, εκφράζουν την MCP-1, την IL-8, το ICAM-1, το VCAM-1, την Ε-σελεκτίνη, την Ρ-σελεκτίνη και άλλους φλεγμονώδεις παράγοντες, οι οποίοι προσελκύουν λεμφοκύτταρα και μονοκύτταρα, τα οποία συνδέονται με το ενδοθήλιο και διεισδύουν στο αρτηριακό τοίχωμα και έτσι αρχίζει η φλεγμονή (Εικόνα 11). Πολλά κύτταρα και πολλές κυτοκίνες εμπλέκονται σε αυτήν τη διαδικασία, όπως μακροφάγα, λεμφοκύτταρα Τ και Β, δενδριτικά κύτταρα, ενδοθηλιακά κύτταρα, λεία μυϊκά κύτταρα, ιντερλευκίνες, μόρια προσκόλλησης, καθώς και ο TNF-α. Επιπλέον, η LDL τροποποιείται και μετατρέπεται σε ox-LDL και συσσωρεύεται στο εσωτερικό τοίχωμα των αγγείων, συμβάλλοντας έτσι στην ανάπτυξη της αθηρωματικής πλάκας. Τα μονοκύτταρα διαφοροποιούνται σε μακροφάγα, στα οποία εισέργεται η ox-LDL και έτσι αυτά μετατρέπονται σε αφρώδη κύτταρα. Άλλοι τύποι ανοσοκυττάρων, όπως τα δενδριτικά κύτταρα, τα Τ κύτταρα, τα Β κύτταρα και τα ουδετερόφιλα συμμετέχουν στην φλεγμονή που λαμβάνει χώρα στην πλάκα (Εικόνα 12). Τα μυελοειδή κύτταρα έχουν προσελκύσει το ενδιαφέρον, διότι αλλάζουν την απόκριση της έμφυτης ανοσίας και επιπλέον μελέτες σε κουνέλια έδειξαν στοιχεία πολλαπλασιασμού των μυελοειδών κυττάρων στις αθηροσκληρωτικές βλάβες [92], [100]-[104].

Σε προχωρημένο στάδιο της αθηροσκλήρωσης, ένας μεγάλος αριθμός μακροφάγων και άλλων φλεγμονωδών κυτοκινών διεισδύουν στο τοίχωμα του αγγείου, εκκρίνουν MMPs και αποικοδομούν ίνες κολλαγόνου στην εξωκυτταρική θεμέλια ουσία της πλάκας, με αποτέλεσμα να συμβεί ρήξη της πλάκας, αιμορραγία και θρόμβωση. Τα μαστοκύτταρα, επίσης, συμβάλλουν στο προφλεγμονώδες περιβάλλον, διότι κατά την ενεργοποίησή τους, απελευθερώνουν ένα πλήθος μεσολαβητών και ενζύμων, που επηρεάζουν την αθηροσκληρωτική βλάβη (Εικόνα 13) [104]–[106]. Η συντονισμένη δράση όλων των προφλεγμονωδών σημάτων που λειτουργούν στην αθηρωματική πλάκα, όχι μόνο ενισχύει τη φλεγμονή, αλλά επίσης εμποδίζει την ανανέωση των δομικών στοιχείων που παρέχουν μηχανική σταθερότητα στο φλεγμονώδη ιστό. Μια ποικιλία προφλεγμονωδών αγγελιοφόρων απελευθερώνονται από τα ενδοθηλιακά κύτταρα των αγγείων και του ανοσοποιητικού, ενεργοποιώντας κυτοκίνες, χημειοκίνες, βιοδραστικές λιπιδικές ενώσεις και μόρια προσκόλλησης, που διατηρούν και ενισχύουν την τοπική φλεγμονή και την ανάπτυξη αθηροσκλήρωσης [101], [104], [107].



Εικόνα 11: Ο ρόλος των μονοκυττάρων στην αθηρογένεση (Libby P. "Inflammation in atherosclerosis," vol. 420, no. December, 2002 [Online] Anailable: www.nature.com/nature).



Εικόνα 12: Ο ρόλος των Τ λεμφοκυττάρων στην αθηρογένεση (Libby P. "Inflammation in atherosclerosis," vol. 420, no. December, 2002 [Online] Anailable: www.nature.com/nature).



Εικόνα 13: Ο ρόλος των μαστοκυττάρων στην αθηρογένεση (Libby P. "Inflammation in atherosclerosis," vol. 420, no. December, 2002 [Online] Anailable: www.nature.com/nature).

3.2 Φλεγμονώδεις δείκτες στην αθηροσκλήρωση

<u>C-αντιδρώσα πρωτεΐνη</u>

Η C-αντιδρώσα πρωτεΐνη (CRP) παράγεται στο ήπαρ από την διέγερση της IL-6, της IL-1β και του TNF-α στο ήπαρ. Όταν ο ιστός υποστεί βλάβη, ενεργοποιείται το σύστημα φλεγμονώδους απόκρισης, δηλαδή τα μακροφάγα συσσωρεύονται στον κατεστραμμένο ιστό και απελευθερώνουν μεγάλες ποσότητες IL-6 και TNF-α, γεγονός που κάνει το ήπαρ να συνθέσει μεγάλες ποσότητες CRP. Άλλοι ιστοί, όπως ο λιπώδης ιστός, μπορεί να είναι σε θέση να συνθέτουν CRP όταν δέχονται προφλεγμονώδη ερεθίσματα. Η CRP μπορεί να προκαλέσει βλάβη στα αγγειακά ενδοθηλιακά κύτταρα, εμποδίζοντας έτσι την επισκευή και τον πολλαπλασιασμό τους. Η μορφή της CRP η οποία κυκλοφορεί στο αίμα είναι η πενταμερική (pCRP) και απελευθερώνεται στην κυκλοφορία μετά από φλεγμονώδη ερεθίσματα. Επιπλέον, τα επίπεδά της μπορούν συχνά να παρέχουν χρήσιμες πληροφορίες για τη διάγνωση, τη θεραπεία και την παρακολούθηση ασθενών με αθηροσκλήρωση και να επιβεβαιώσουν την απόκριση των ασθενών αυτών σε διάφορους διεγερτικούς παράγοντες. Μελέτες έχουν δείξει ότι η CRP συνδέεται με την LDL και ότι υπάρχει στις αθηρωματικές πλάκες. Η CRP δεν υπάρχει στο υγιές αγγειακό τοίχωμα, αλλά ανιχνεύεται στα αρχικά στάδια της αθηρογένεσης και συσσωρεύεται καθώς η νόσος εξελίσσεται. Επίσης, θεωρείται προγνωστικός παράγοντας για μελλοντικά καρδιαγγειακά επεισόδια και στο γενικό πληθυσμό τα επίπεδά της είναι σε θέση να προβλέψουν ανεξάρτητα τον κίνδυνο θνησιμότητας από όλες τις αιτίες και τον κίνδυνο καρδιαγγειακής θνησιμότητας [104], [108]–[116].

Ιντερλευκίνη-6

Η ΙL-6 είναι μια πλειοτροπική κυτοκίνη που σχετίζεται με το ανοσοποιητικό σύστημα και ρυθμίζει την απόκρισή του στην οξεία φάση, καθώς και στη χρόνια φλεγμονή. Επιπλέον, βρέθηκε ότι τα επίπεδα της IL-6 στο αίμα ασθενών με στεφανιαία νόσο ήταν υψηλότερα από τα επίπεδα της IL-6 σε υγιή άτομα. Όσο πιο σοβαρή είναι η ασθένεια, τόσο αυξάνονται και τα επίπεδά της, δηλαδή σε περιπτώσεις ρήξης της αθηρωματικής πλάκας αυξήθηκαν σημαντικά. Επίσης, η γενετική ανεπάρκεια της IL-6 βρέθηκε ότι ενισχύει το σχηματισμό αθηρωματικής πλάκας. Επομένως, η IL-6 μπορεί να είναι ένας πιθανός δείκτης για την πρόβλεψη του πόσο ευάλωτες μπορεί να είναι οι αθηρωματικές πλάκες [104], [117]–[120].

Μόρια προσκόλλησης

Τα μόρια προσκόλλησης είναι πρωτεΐνες που μεσολαβούν ώστε να συμβεί η επαφή και η προσκόλληση των κυττάρων μεταξύ τους και των κυττάρων με την εξωκυττάρια θεμέλια ουσία. Συμμετέχουν σε λειτουργίες κυττάρων, όπως στην αναγνώριση, στην ενεργοποίηση, στη μεταγωγή σήματος, στον πολλαπλασιασμό, στη διαφοροποίηση και στη μετάσταση μέσω αλληλεπιδράσεων που δημιουργούν με τους αντίστοιχους προσδέτες. Μεσολαβούν, επίσης, στη φλεγμονή του ιστού, στις ανοσοαποκρίσεις, συμμετέχουν και ρυθμίζουν τη θρόμβωση. Τα μόρια προσκόλλησης παίζουν σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη της αθηρωματικής πλάκας, έτσι αυτά που σχετίζονται με την αθηροσκλήρωση είναι η οικογένεια σελεκτινών, η υπεροικογένεια των ανοσοσφαιρινών και η οικογένεια των ιντεγκρινών [104], [121].

Η οικογένεια των σελεκτινών αποτελείται από διαμεμβρανικές γλυκοπρωτεΐνες, οι οποίες συμμετέχουν κυρίως στην προσκόλληση των λευκοκυττάρων. Υπάρχουν τρεις τύποι: η σελεκτίνη Ε, η σελεκτίνη Ρ και η σελεκτίνη L. Η σελεκτίνη Ρ παίζει σημαντικό ρόλο στην αθηροσκλήρωση και εμπλέκεται στην ενεργοποίηση και στην προσκόλληση των λευκοκυττάρων, καθώς και στη σύνδεση των λευκοκυττάρων με τα ενδοθηλιακά κύτταρα μέσω αλληλεπιδράσεων με προσδέτες. Κλινικές μελέτες έδειξαν ότι το επίπεδο έκφρασης της σελεκτίνης Ρ συσχετίζεται θετικά με τον βαθμό των αθηροσκληρωτικών βλαβών [104], [122], [123].

Η υπεροικογένεια των ανοσοσφαιρινών αλληλεπιδρά με μόρια προσκόλλησης της οικογένειας των ιντεγκρινών, ως υποδοχείς και προσδέτες, και εμπλέκεται στην αναγνώριση και στην προσκόλληση των κυττάρων. Υπάρχουν τρεις κύριοι τύποι: το ICAM-1, το VCAM-1 και το PECAM-1 (Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule 1, γνωστό και ως CD 31). Το VCAM-1 είναι προσδέτης της ιντεγκρίνης VLA-4 (α4β1) που εκφράζεται στην επιφάνεια των ενδοθηλιακών κυττάρων και ενεργοποιείται από κυτοκίνες και το ICAM-1 είναι προσδέτης της ιντεγκρίνης LFA-1. Η αυξημένη έκφραση των VCAM-1 και ICAM-1 προάγει τον πολλαπλασιασμό των μακροφάγων, με αποτέλεσμα να συσσωρεύεται ένας μεγάλος αριθμός μακροφάγων στην πλάκα και έτσι να αυξάνεται η αστάθειά της. Μελέτες έχουν δείξει ότι τα VCAM-1 και ICAM-1 έχουν στενή σχέση με την αγγειογένεση. Σε μια αθηρωματική πλάκα, η αυξημένη έκφραση των VCAM-1 και ICAM-1 προάγει τη νεοαγγείωση, η οποία χαρακτηρίζεται κυρίως από ανώριμα, πολύ διαπερατά, εύθραυστα αγγεία. Η έκφραση του ICAM-1 συμβαίνει στην αρχή της νόσου, ενώ το VCAM-1 πιθανώς εκφράζεται σε μεταγενέστερο στάδιο [48], [104], [124]. Η οικογένεια των ιντεγκρινών αποτελείται από γλυκοπρωτεΐνες, διαμεμβρανικούς υποδοχείς που βρίσκονται σε πολλές κυτταρικές επιφάνειες. Ως διαμεμβρανικοί υποδοχείς, οι ιντεγκρίνες μπορούν να φέρνουν σε επαφή τον εσωτερικό κυτταροσκελετό ακτομυοσίνης με τα μόρια που ανήκουν υπεροικογένεια των ανοσοσφαιρινών, ανάμεσα σε γειτονικά κύτταρα. Η σηματοδότηση των ιντεγκρινών μπορεί να επηρεάσει πολλές πτυχές της αθηροσκλήρωσης, από την πρώτη πρόκληση φλεγμονής έως την ανάπτυξη αθηρωματικών πλακών, για αυτό και οι ιντεγκρίνες είναι πιθανοί θεραπευτικοί στόχοι για τον περιορισμό των καρδιαγγειακών παθήσεων [104], [125], [126].

Μεταλλοπρωτεϊνάσες εξωκυττάριας ουσίας

Οι MMPs εκκρίνονται από πολλούς τύπους κυττάρων, συμπεριλαμβανομένων των Πιστεύεται ότι μεσολαβούν στην εξέλιξη των μακροφάγων. σταθερών αθηροσκληρωτικών βλαβών σε έναν ασταθή φαινότυπο. Οι MMP-9 και MMP-2 είναι μέλη της οικογένειας των MMPs και σχετίζονται στενά με τη σταθερότητα των αθηροσκληρωτικών βλαβών. Η ΜΜΡ-9, γνωστή και ως ζελατινάση Β, παράγεται κυρίως από ενεργοποιημένα μακροφάγα και λεία μυϊκά κύτταρα. Παίζει, επίσης, κρίσιμο ρόλο στην πρόοδο της αθηροσκλήρωσης, καθώς η απώλειά της μειώνει το αθηροσκληρωτικό φορτίο στην αορτή. Κλινικές μελέτες έχουν δείξει ότι τα επίπεδα της ΜΜΡ-9 στις ευπαθείς αθηροσκληρωτικές πλάκες ήταν υψηλότερα από ό,τι ήταν στις μη ευπαθείς πλάκες και στους υγιείς. Τα αποτελέσματα πειραμάτων σε ζώα έδειξαν ότι το επίπεδο έκφρασής της στα αρτηριακά και περιφερειακά αγγεία του ζωικού μοντέλου αθηροσκλήρωσης ήταν σημαντικά υψηλότερα και το επίπεδο αυτό συσχετίστηκε θετικά με τον βαθμό της αθηροσκληρωτικής βλάβης. Ως εκ τούτου, η ΜΜΡ-9 είναι ένας από τους σημαντικότερους δείκτες για την πρόβλεψη της ευπάθειας της αθηροσκληρωτικής πλάκας. Η ΜΜΡ-2 είναι ένας ανεξάρτητος παράγοντας κινδύνου για την αγγειακή αναδιαμόρφωση και είναι ένα από τα βασικά ένζυμα που εμπλέκονται στον μηχανισμό αποδόμησης. Στην αθηροσκλήρωση, όταν το ενδοθήλιο έχει υποστεί βλάβη, τα μονοκύτταρα/μακροφάγα και τα ενδοθηλιακά κύτταρα εκκρίνουν MMP-2. Η MMP-2 μπορεί να προάγει την αποικοδόμηση της εξωκυτταρικής θεμέλιας ουσίας, καθώς και τον πολλαπλασιασμό και τη μετανάστευση των λείων μυϊκών κυττάρων μετά το σχηματισμό πλάκας. Στο αρχικό στάδιο της αθηροσκλήρωσης, η δράση της ΜΜΡ-2 μπορεί να μειώσει την άμυνα των ενδοθηλιακών κυττάρων και στη συνέχεια να οδηγήσει την LDL στο εσωτερικό

τοίχωμα του αγγείου. Η ανεπάρκεια της MMP-2 μειώνει το σχηματισμό των αθηροσκληρωτικών αλλοιώσεων σε ποντίκια ApoE^{-/-}. Επιπροσθέτως, η ανεπάρκεια της MMP-12 μειώνει το μέγεθος της πλάκας και η ανεπάρκεια της MMP-13 δεν έχει καμία επίδραση στην ανάπτυξη της πλάκας, αλλά μειώνει την περιεκτικότητα του κολλαγόνου στην πλάκα σε ποντίκια ApoE^{-/-} [104], [127]–[134].

4. Echinacea

4.1 Γενικά στοιχεία

Το γένος Echinacea περιλαμβάνει έναν μικρό αριθμό ειδών που είναι ανθεκτικά, ποώδη, πολυετή φυτά, που προέρχονται από περιοχές της Βόρειας Αμερικής. Τρία είδη, η Echinacea angustifolia, η Echinacea pallida και η Echinacea purpurea χρησιμοποιούνται σήμερα στα εμπορικά σκευάσματα. Η Echinacea, κάποτε ταξινομημένη ως Rudbeckia, ομαδοποιείται στην οικογένεια Aster (Asteraceae ή Compositae). Επίσης, το γνωστό ως «purple coneflower», η Echinacea purpurea, που είναι το πιο γνωστό από τα είδη της Echinacea, χαρακτηρίζεται από κάθετους μίσχους που φτάνουν σε ύψος έως τα 2 μέτρα, στενά φύλλα καλυμμένα με τριχίδια, μωβ άνθη, και κεφάλια κοκκινωπά-πορτοκαλί ακανθωτά. Η Echinacea purpurea καλλιεργείται ευρέως σε όλες τις Ηνωμένες Πολιτείες, στον Καναδά και στην Ευρώπη, ειδικά στη Γερμανία, για την ομορφιά του, καθώς και για τις φαρμακευτικές του ιδιότητες [135], [136].

Πριν από τον ευρωπαϊκό αποικισμό, ορισμένοι Αμερικανοί ιθαγενείς χρησιμοποιούσαν την Echinacea για διάφορους σκοπούς. Οι Ευρωπαίοι έμαθαν για τα βότανα των ιθαγενών και έτσι έφεραν σύντομα την Echinacea στη φαρμακοποιία. Οι πρώτες ιστορικές αναφορές στην Echinacea ήταν από τον Clayton στο «Flora Virginica» (1762) και από τον Schöpf στο «Materia Medica Americana» (1787). Οι γιατροί είχαν την Echinacea στα φαρμακευτικά τους κιτ και τη χρησιμοποιούσαν για να αντιμετωπίσουν τσιμπήματα φιδιών και διάφορες μολύνσεις. Επίσης, έχει χρησιμοποιηθεί για να καταπολεμήσει την ρινοφαρυγγική καταρροή, την περιοδοντίτιδα, την αμυγδαλίτιδα, ως υποστηρικτική θεραπεία για λοιμώξεις που μοιάζουν με τη γρίπη, για επαναλαμβανόμενες λοιμώξεις του αναπνευστικού συστήματος και του κατώτερου ουροποιητικού συστήματος, καθώς και εξωτερικά για επούλωση επιφανειακών τραυμάτων [135], [136].

Το τρέχον ενδιαφέρον για τη φαρμακευτική χρήση της Echinacea επικεντρώνεται στα ανοσοδιεγερτικά-ανοσορυθμιστικά της αποτελέσματα, ιδιαίτερα στη θεραπεία και στην πρόληψη του κοινού κρυολογήματος, της γρίπης και άλλων λοιμώξεων του ανώτερου αναπνευστικού συστήματος. Σήμερα, οι φρέσκιες ή αποξηραμένες ρίζες και των τριών ειδών της Echinacea χρησιμοποιούνται στα διάφορα σκευάσματα που κυκλοφορούν. Επιπλέον, χρησιμοποιούνται τα φρέσκα ή αποξηραμένα άνθη και ο χυμός από τα άνθη της Echinacea purpurea. Τα εμπορικά διαθέσιμα προϊόντα της

45

Echinacea έχουν μεγάλη ποικιλία και περιλαμβάνουν βάμματα, δισκία, κάψουλες, τσάγια, και παρασκευάσματα για παρεντερική χρήση [135], [136].

4.2 Συστατικά της Echinacea

Υπάρχουν κάποιες διαφορές στα συστατικά της Echinacea ανάμεσα στα είδη, αλλά και στα μέρη του φυτού. Γενικά θεωρείται ότι κανένα μεμονωμένο συστατικό ή ομάδα συστατικών της Echinacea δεν είναι υπεύθυνο για τη δράση του φυτού. Μάλλον, πολλές ομάδες συστατικών, όπως τα αλκυλαμίδια, τα παράγωγα του καφεϊκού οξέος, οι πολυσακχαρίτες, τα αλκένια, φαίνεται να συμβάλλουν στη δράση της. Ωστόσο, έχει αναφερθεί ότι μετά την από του στόματος χορήγηση στον άνθρωπο, τα αλκυλαμίδια έχουν μεγάλη βιοδιαθεσιμότητα, ενώ τα παράγωγα καφεϊκού οξέος έχουν μικρή βιοδιαθεσιμότητα, δεν μπορούν να συμβάλουν στη δράση του φυτού (Πίνακες 1 και 2) [135].

Είδη φυτού	Μέρη φυτού	Συστατικά
Echinacea purpurea	Εναέρια μέρη φυτού	Αλκυλαμίδια, εστέρες καφεϊκού οξέος, κιχωρικό οξύ, πολυσακχαρίτες, πολυακετυλένια
Echinacea angustifolia	Ρίζες	Αλκυλαμίδια, εστέρες καφεϊκού οξέος, εχινακοσίδιο, κυναρίνη πολυσακχαρίτες, πολυακετυλένια
Echinacea pallida	Ρίζες	Εστέρες καφεϊκού οξέος, εχινακοσίδιο, πολυσακχαρίτες, πολυακετυλένια

Πίνακας 1: Τα κύρια συστατικά των τριών ειδών της Echinacea (Barnes et al. 2010).

Αλκυλαμίδια	Ρίζες Ε. purpurea	Ρίζες και εναέρια μέρη <i>Ε. purpurea</i>	Ρίζες και εναέρια μέρη <i>E. purpurea</i> και ρίζες <i>E.</i> angustifolia
undeca-2E,4Z-diene-8,10- diynoic acid isobutylamide	Ναι	Ναι	Ναι
undeca-2E-ene-8,10- diynoic acid isobutylamide	Ναι	Ναι	Ναι
dodeca-2Z,4E-diene-8,10- diynoic acid isobutylamide	Ναι	Ναι	Ναι
undeca-2Z-ene-8,10- diynoic acid isobutylamide	Όχι	Όχι	Ναι
undeca-2E,4Z-diene-8,10- diynoic acid 2- methylbutylamide	Ναι	Ναι	Ναι
dodeca-2E,4E-dienoic acid isobutylamide	Όχι	Όχι	Ναι
dodeca-2E-ene-8,10- diynoic acid isobutylamide	Ναι	Ναι	Ναι
dodeca-2E,4E,8Z,10Z- tetraenoic acid isobutylamide	Ναι	Ναι	Ναι
dodeca-2E,4Z,8Z,10E- tetraenoic acid isobutylamide	Όχι	Όχι	Ναι
dodeca-2E,4Z,8Z,10Z- tetraenoic acid isobutylamide	Ναι	Ναι	Ναι
undeca-2Z,4E-diene-8,10- diynoic acid 2- methylbutylamidea	Ναι	Ναι	Ναι
dodeca-2E-ene-8,10- diynoic acid 2- methylbutylamide	Ναι	Ναι	Ναι
dodeca-2E,4Z-diene-8,10- diynoic acid isobutylamide	Ναι	Ναι	Ναι
dodeca-2E,4Z-diene-8,10- diynioc acid 2- methylbutylamide	Ναι	Ναι	Ναι

Πίνακας 2: Αλκυλαμίδια σε τρία εκχυλίσματα της Echinacea (Aarland et al. 2017).

Τα αλκυλαμίδια, κυρίως ισοβουτυλαμίδια λιπαρών οξέων ευθείας αλυσίδας με ολεφινικούς και / ή ακετυλενικούς δεσμούς, υπάρχουν στις ρίζες της *E. angustifolia* και στα εναέρια μέρη της *E. purpurea*, αλλά απουσιάζουν από την *E. pallida*. Επιπλέον, οι ρίζες της *E. purpurea* περιέχουν 0,01-0,04% αλκυλαμίδια. Επίσης, στην *Echinacea*

συναντάμε γλυκοζίτες καφεϊκού οξέος (echinacoside (εχινακοσίδιο), verbascoside, caffeoylechinacoside), εστέρες καφεϊκού οξέος με κινικό οξύ (χλωρογενικό οξύ, ισοχλωρογενικό οξύ, κυναρίνη) και εστέρες καφεϊκού οξέος με τρυγικό οξύ (καφταρικό οξύ, κιχωρικό οξύ). Διάφορα παράγωγα του καφεϊκού οξέος υπάρχουν και στα τρία είδη της Echinacea, με το εχινακοσίδιο να είναι το κύριο συστατικό των ριζών της E. angustifolia και της E. pallida (0,5% - 1,0%) και το κιχωρικό οξύ να είναι το βασικό συστατικό των ριζών της E. purpurea (0,14% 2,05%) και των εναέριων μερών της E. purpurea (1,2% - 3,1%). Επίσης, η κυναρίνη υπάρχει στις ρίζες της E. angustifolia, αλλά όχι στις ρίζες των άλλων δύο ειδών. Ακόμη, οι πολυσακχαρίτες PS1 (μια μεθυλογλυκουρονοαραβινοξυλάνη), PS2 (μια όξινη ραμνοαραβινογαλακτάνη) και μια ξυλογλυκάνη έχουν απομονωθεί από την E. purpurea. Πολυσακχαρίτες και γλυκοπρωτεΐνες υπάρχουν στην Ε. purpurea και στις ρίζες της Ε. pallida. Ο συμπιεσμένος χυμός από τα εναέρια μέρη της Ε. purpurea περιέχει ετερογενείς πολυσακχαρίτες, κλάσματα τύπου ινουλίνης και έναν όξινο πολυδιακλαδισμένο πολυσακχαρίτη αραβινογαλακτάνης. Ο συμπιεσμένος χυμός των εναέριων μερών της E. purpurea, επίσης, περιέχει μια πρωτεΐνη αραβινογαλακτάνης, που περιλαμβάνει 83% πολυσακγαρίτη (η αναλογία γαλακτόζη / αραβινόζη είναι 1,8 : 1), ουρονικά οξέα (4-5%) και πρωτεΐνη (7%) με υψηλές συγκεντρώσεις σερίνης, αλανίνης και υδροξυπρολίνης. Επιπροσθέτως, οι ρίζες της E. pallida (0,2% - 2,0%) περιέχουν κυρίως πολυένια και πολυακετυλένια (pentadeca-1,8Z-diene), καθώς και κετοαλκένια και κετοπολυακετυλένια (pentadeca-8Z-ene-2-one, pentadeca-8Z,11Z-diene-2-one, pentadeca-8Z,13Z-diene-11-yne-2-one, tetradeca-8Z-ene-11,13-diyne-2-one). Αυτές οι ενώσεις είναι ασταθείς και οξειδώνονται. Επιπλέον, τα αιθέρια έλαια από τα εναέρια μέρη των τριών ειδών περιέχουν βορνεόλη, οξικό βορύλιο, γερμακρένιο-D, καρυοφυλίνη και άλλα συστατικά. Υπάρχουν ακόμα διάφορα συστατικά, όπως τα αλκαλοειδή πυρρολιζιδίνης (0,006%) στην E. angustifolia και στην E. purpurea και τα φλαβονοειδή, τα οποία είναι η βαλανοκετόνη, η καεμφερόλη, η ισοραμνετίνη και οι ανθοκυανίνες, που υπάρχουν στα εναέρια μέρη της E. purpurea (0,48%). Έχουν βρεθεί, επίσης, ελεύθερα φαινολικά οξέα, όπως κουμαρικό οξύ, υδροξυβενζοϊκό οξύ, τα οποία έχουν απομονωθεί από τα εναέρια μέρη της E. angustifolia και της E. purpurea. Τέλος, άλλες διάφορες ενώσεις που αναφέρονται είναι η βεταΐνη, λιπαρά οξέα, απλά σάκχαρα, στερόλες και η βανιλίνη (Εικόνες 14 και 15) [135].



dodeca-2E,4E,8Z,10Z-tetraenoic acid isobutylamide



undeca-2E-enoic-8,10-diyne acid isobutylamide







R¹ R² R³ R⁴ H H H caffeoyl

chlorogenic acid (5-caffeoylquinic acid)

R¹ R² R³ R⁴ caffeoyl caffeoyl H H

cynarin (1,3-dicaffeoylquinic acid)



H caffeoyl caffeoyl H

isochlorogenic acid (3,4-dicaffeoylquinic acid)

R¹ R² R³ R⁴ H caffeoyl H caffeoyl isochlorogenic acid (3,5-dicaffeoylquinic acid)



echinacoside glucosyl (1+6) rhamnosyl

verbascoside H rhamnosyl

caffeoyl- 6-caffeoylglucosyl (1+6) rhamnosyl (1+6) echinacoside







pentadeca-8Z,11Z-diene-2-one



pentadeca-8Z,13Z-diene-11-yne-2-one



Εικόνα 14: Συστατικά των ειδών της Echinacea (Barnes et al. "Echinacea species (Echinacea angustifolia (DC.) Hell., Echinacea pallida (Nutt.) Nutt., Echinacea purpurea (L.) Moench): a review of their chemistry, pharmacology and clinical properties", J. Pharm. Pharmacol., vol. 57, no. 8, pp. 929–954, 2010, doi: 10.1211/0022357056127).



Εικόνα 15: Δευτερογενείς μεταβολίτες της Echinacea purpurea (Manayi et al. "Echinacea purpurea: Pharmacology, phytochemistry and analysis methods", Pharmacognosy Reviews, vol. 9, no. 17, pp. 63-72, 2015, doi: 10.4103/0973-7847.156353).

4.3 Ιδιότητες της Echinacea

Ανοσορυθμιστικές ιδιότητες

Η Echinacea μπορεί να είναι αποτελεσματική στη μείωση της διάρκειας και της σοβαρότητας των συμπτωμάτων του κρυολογήματος, αλλά αυτό το φαινόμενο παρατηρείται μόνο με ορισμένα παρασκευάσματα της Echinacea, κυρίως αυτά που περιέχουν την E. purpurea. Όμως, ακόμα και τα εμπορικά παρασκευάσματα που έχουν ως βάση την E. purpurea, μεταξύ τους παρουσιάζουν σημαντικές διαφορές όσον αφορά τις ανοσορρυθμιστικές επιδράσεις τους [138]–[142].

Η Echinacea είναι πιο γνωστή ως ανοσοδιεγερτικό φυτό, όπως υποστηρίζεται από διάφορες μελέτες, με αμφότερες τις αυξήσεις στην έμφυτη και στην ειδική ανοσία. Επιπλέον, σε μελέτες έχουν αναφερθεί αντιφλεγμονώδεις, αντι-ιικές και αντιμικροβιακές επιδράσεις της Echinacea. Αυτό το ευρύ φάσμα δράσης, δείχνει ότι το φυτό αυτό στα μέρη του (φύλλα, άνθη, ρίζες) περιέχει διάφορα δραστικά συστατικά και ανάλογα με το παρασκεύασμα (υδατικό, αλκοολικό, εκχυλίσματα λαδιού ή

αποξηραμένες μορφές) η σύνθεση είναι διαφορετική και έτσι μπορούν να εξηγηθούν τα διαφορετικά αποτελέσματά του [138], [139], [141], [143].

Η χρήση της Echinacea προορίζεται κυρίως να είναι θεραπευτική, όχι προφυλακτική, καθώς στον άνθρωπο τα οφέλη της έγκειται στην ικανότητά της να μειώνει τη διάρκεια και τη σοβαρότητα των συμπτωμάτων της ασθένειας. Όμως, υπάρχει μελέτη που προτείνει τη χρήση της Echinacea για την πρόληψη απέναντι στο κοινό κρυολόγημα, κάνοντας χρήση πολύ τυποποιημένων εκχυλισμάτων του φυτού, με ένα ειδικό φυτοχημικό προφίλ, δηλαδή να περιλαμβάνει πολυσακχαρίτες, το εχινακοσίδιο και να έχει σημαντική έλλειψη αλκυλαμιδίων [136], [138], [139], [141].

Έχουν αποδειχθεί αρκετές διαμορφωτικές επιδράσεις της Echinacea στο ανοσοποιητικό σύστημα, τόσο στην έμφυτη όσο και στην επίκτητη ανοσία. Μελέτες έχουν δείξει ότι η Echinacea διεγείρει τις ανοσολογικές λειτουργίες και στα υγιή και στα ανοσοκατασταλμένα ζώα. Στα μακροφάγα, η φαγοκυττάρωση και η παραγωγή κυτοκίνης (αυξημένος ο TNF-α, η IL-1 και η IFN-β) έχουν ενισχυθεί μετά από θεραπεία με εκχυλίσματα της Echinacea. Επιπλέον, η αυξημένη κινητικότητα των λευκοκυττάρων και η ενεργοποίηση των φυσικών φονικών κυττάρων έχει διαπιστωθεί και σε ζώα και σε ανθρώπους. Εκγυλίσματα της E. purpurea εμπλουτισμένα με πολυσακχαρίτες μπορούν να προωθήσουν την ωρίμανση των δενδριτικών κυττάρων, διαμορφώνοντας τις σηματοδοτικές οδούς JNK, p38 MAPK και NF-κB. Μία μελέτη έχει δείξει ότι τα εκχυλίσματα ολόκληρου του φυτού *Ε. purpurea* και τα εκχυλίσματα μόνο των στελεχών και των φύλλων του φυτού E. purpurea έχουν την ικανότητα να αναστέλλουν την ωρίμανση των δενδριτικών κυττάρων, κάτι το οποίο διαπιστώθηκε με την μειωμένη έκφραση των HLA-DR και CD 32. Σε μία άλλη μελέτη έχει βρεθεί πως το εκχύλισμα της Echinacea ενεργοποιεί σημαντικά τα μακροφάγα τρωκτικών που προέρχονται από τον μυελό των οστών, αυξάνοντας την έκφραση των μορίων CD 80, CD 86 και MHCII και αυξάνοντας κλασικούς δείκτες ενεργοποιημένων μακροφάγων, συμπεριλαμβανομένων των CCR7, IL-1β, IL-6, IL-12p70, TNF-α και NO. Στην ίδια μελέτη, παρατηρήθηκε, επίσης, αυξημένη φαγοκυττάρωση και ενδοκυτταρική βακτηριοκτόνος δράση, καθώς και αλλαγές στον αριθμό και στη δραστηριότητα των Τ και Β κυττάρων και αυξημένη αντίσταση του ξενιστή (Εικόνα 16) [138], [139], [142], [144]-[149].

Μεταξύ των δραστικών συστατικών της *Echinacea* είναι τα αλκυλαμίδια, οι πολυφαινόλες και οι πολυσακχαρίτες. Η *E. purpurea* αποτελείται από περισσότερα από 15 διαφορετικά αλκυλαμίδια. Τα αλκυλαμίδια μπορούν να ενεργοποιήσουν τον

κανναβινοειδή υποδοχέα 2 και, επίσης, φέρεται να έχουν αντιφλεγμονώδεις και ανοσορυθμιστικές ιδιότητες. Έχει αποδειχθεί ότι το αιθανολικό εκχύλισμα από τις ρίζες της Ε. purpurea και οι συνδυασμοί των αλκυλαμιδίων επιδρούν στο ενδοκανναβινοειδές σύστημα in vitro και, επίσης, τα αλκυλαμίδια από την Ε. angustifolia έχει αποδειχθεί ότι αναστέλλουν την κυκλοοξυγονάση και την 5λιποξυγονάση in vitro. Επιπλέον, ενώ η έκφραση της αντιφλεγμονώδους κυτοκίνης IL-10 αυξήθηκε σημαντικά στα μονοκύτταρα περιφερικού αίματος του ανθρώπου, η έκφραση της προφλεγμονώδους κυτοκίνης ΤΝΓ-α παρεμποδίστηκε. Επίσης, τα παράγωγα του καφεϊκού οξέος, συμπεριλαμβανομένου του κιχωρικού οξέος, του καφταρικού οξέος, του χλωρογενικού οξέος, της κυναρίνης, από τις ρίζες της Ε. angustifolia, πιστεύεται ότι είναι υπεύθυνα για την επούλωση των πληγών. Εκτός από τα αλκυλαμίδια και τις φαινολικές ενώσεις, ο πολυσακχαρίτης αραβινογαλακτάνη από την *E. purpurea*, έχει αναγνωριστεί ως ο κύριος ενεργοποιητής των μακροφάγων. Ενώ ενεργοποιεί τα μακροφάγα τόσο in vitro όσο και in vivo, αυτός ο πολυσακγαρίτης δεν ενεργοποιεί τα Β κύτταρα, δεν μπορεί να προκαλέσει τα Τ κύτταρα να παράγουν IL-2, IFN-β, IFN-γ, και προκαλεί μια μικρή αύξηση στον πολλαπλασιασμό των Τ κυττάρων. Έχει βρεθεί πως το εκγύλισμα Ε. purpurea που περιέγει 80% πολυσακγαρίτες, φαινολικές ενώσεις, κυναρίνη, κιγωρικό οξύ, καφταρικό οξύ, αλλά δεν περιέγει αλκυλαμίδια, αυξάνει την παραγωγή IL-2 και IFN-γ. Επιπλέον, οι μεγάλου μοριακού βάρους πολυσακχαρίτες που έχουν απομονωθεί από την E. angustifolia έχουν αντιφλεγμονώδη δράση σε ποντίκια και το έλαιο από τις ρίζες της E. angustifolia έχει αναφερθεί ότι αναστέλλει την ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων σε ποντίκια και αρουραίους (Εικόνα 16) [138], [144], [150]-[157].

Έχουν βρεθεί διάφορα βιοδραστικά συστατικά, τα οποία από τη μία πλευρά υποδεικνύουν ότι τα εκχυλίσματα της *Echinacea* μπορούν να είναι αποτελεσματικά για τη θεραπεία και την πρόληψη του κοινού κρυολογήματος και άλλων λοιμώξεων του ανώτερου αναπνευστικού συστήματος και πιθανώς και άλλων ασθενειών, αλλά από την άλλη πλευρά, θα πρέπει να προσδιοριστούν σαφώς οι αποτελεσματικές δόσεις και τα αποτελεσματικά παρασκευάσματα του φυτού όσον αφορά τη χρήση του ως θεραπευτικό μέσο ή ως μέσο προφύλαξης από τις ασθένειες. Για αυτό το λόγο απαιτούνται περαιτέρω μελέτες για να προσδιοριστεί το ανοσολογικό και το φαρμακευτικό δυναμικό των παρασκευασμάτων της *Echinacea*. Επιπροσθέτως, υπάρχουν ακόμη ερωτήματα σχετικά με τη μακροχρόνια χρήση της *Echinacea*, διότι οι συνέπειες της χρήσης της για χρόνια είναι άγνωστες. Αυτό που είναι γνωστό είναι

ότι δεν υπήρξαν τοξικές επιδράσεις που να συσχετίζονται με τη συνεχή χρήση διαφορετικών παρασκευασμάτων της *Echinacea* για έως και 6 μήνες. Όμως, απαιτείται προσοχή με τα ανοσοδιεγερτικά παρασκευάσματα, καθώς η χρήση τους έχει συσχετιστεί με την ανάπτυξη ή την επιδείνωση της αυτοανοσίας σε άτομα με γενετική προδιάθεση [138], [141], [158], [159].



Εικόνα 16: Βιολογικές και φαρμακολογικές δράσεις των αλκυλαμιδίων που έχουν απομονωθεί από την *E. purpurea*. BM: μυελός των οστών, CB: κανναβινοειδής υποδοχέας, CNS: κεντρικό νευρικό σύστημα, COX: κυκλοοξυγονάση, IL-10: ιντερλευκίνη-10, MP: μακροφάγα, NK: φυσικά φονικά κύτταρα, NO: μονοξείδιο του αζώτου, TNF-α: παράγοντας νέκρωσης όγκων α (Manayi et al. "Echinacea purpurea: Pharmacology, phytochemistry and analysis methods", Pharmacognosy Reviews, vol. 9, no. 17, pp. 63-72, 2015, doi: 10.4103/0973-7847.156353).

Αντιφλεγμονώδεις και αντιοξειδωτικές ιδιότητες

Οι ισχυρισμοί ότι η *Echinacea* έχει αντιφλεγμονώδη δράση στηρίζονται τόσο στη θεωρητική όσο και στην παρατηρούμενη αναστολή φλεγμονωδών μηχανισμών. Η αναστολή της υαλουρονιδάσης ήταν από τις πρώτες φαρμακολογικές ιδιότητες που αποδόθηκαν στην *Echinacea*. Η υαλουρονιδάση υδρολύει το υαλουρονικό οξύ και τη χονδροϊτίνη, επιτρέποντας στα υγρά που περιέχουν προφλεγμονώδεις κυτοκίνες να διαπεράσουν την άμορφη θεμέλια ουσία. Έχει, επίσης, αναφερθεί αναστολή της δραστηριότητας των ινοβλαστών και της δημιουργίας κολλαγόνου. Επιπλέον, αναφέρεται πως τα εκχυλίσματα της Ε. purpurea αναστέλλουν τη συστολή του κολλαγόνου που προκαλείται από τους ινοβλάστες. Το κιγωρικό οξύ φαίνεται να είναι η πιο ισχυρή ουσία της Echinacea όσον αφορά την αναστολή της δράσης της υαλουρονιδάσης. Έχει, επίσης, αναφερθεί αντιφλεγμονώδης δράση μέσω της αναστολής τη λιποξυγονάσης από ένα ισοβουτυλαμίδιο της E. purpurea. Η αναφερόμενη αναστολή της κυκλοοξυγονάσης και της 5-λιποξυγονάσης από εκχυλίσματα της Echinacea τα οποία είναι πλούσια σε αλκυλαμίδια προσδίδει αξιοπιστία στα αναφερόμενα αντιφλεγμονώδη αποτελέσματα της χρήσης του φυτού. Επιπροσθέτως, η E. purpurea φαίνεται να μειώνει τον μεταβολισμό του αραχιδονικού οξέος και την παραγωγή της προσταγλανδίνης Ε2. Αντιφλεγμονώδη δράση έχουν παρουσιάσει και τα εκχυλίσματα της E. angustifolia. Επιπλέον, έχει αναφερθεί αντιοξειδωτική δράση και ικανότητα σάρωσης ελευθέρων ριζών, καθώς και αναστολή της οξείδωσης της LDL από εκγυλίσματα της Echinacea [136].

5. Υλικά και Μέθοδοι

5.1 Παραγωγή εκχυλισμάτων εχινάκειας

Παραλάβαμε από το Εργαστήριο Φαρμακογνωσίας και Χημείας Φυσικών Προϊόντων του τμήματος Φαρμακευτικής του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών τέσσερα εκχυλίσματα, τα οποία προήλθαν από τις ρίζες του φυτού *Echinacea purpurea*, το οποίο συλλέχθηκε στην περιοχή της Περιφέρειας Ηπείρου. Τα εκχυλίσματα αυτά ήταν τα εξής: ένα υδατικό εκχύλισμα, ένα υδατικό εκχύλισμα μετά από επεξεργασία με ρητίνη XAD-7, ένα υδραλκολικό εκχύλισμα και ένα υδραλκολικό εκχύλισμα μετά από επεξεργασία με ρητίνη XAD-7. Παρακάτω αναφέρεται ο τρόπος με τον οποίο έγινε η παραγωγή των προαναφερθέντων εκχυλισμάτων στο Εργαστήριο Φαρμακογνωσίας και Χημείας Φυσικών Προϊόντων του τμήματος Φαρμακευτικής του ΕΚΠΑ.

Για την εκχύλιση του φυτικού υλικού εχινάκειας χρησιμοποιήθηκαν ως διαλύτες εκχύλισης το νερό και το μείγμα ισοπροπανόλης-νερού (1:1 v/v). Η αναλογία μάζας φυτικού υλικού προς τον όγκο διαλύτη ήταν 1:10 (100g φυτικού υλικού εκχυλίστηκαν με 1L διαλύτη). Συγκεκριμένα, το υδατικό εκχύλισμα εχινάκειας ελήφθη έπειτα από ανάδευση του φυτικού υλικού με το νερό στους 85°C για 2h και το υδραλκολικό εκχύλισμα ελήφθη έπειτα από ανάδευση του φυτικού υλικού με το μείγμα ισοπροπανόλης-νερού (1:1 v/v) στους 45°C για 2h. Ακολούθησε διήθηση των εκχυλισμάτων υπό κενό, συμπύκνωση της αλκοόλης σε συσκευή περιστροφικής εξάτμισης υπό ελαττωμένη πίεση και παραλαβή των εκχυλισμάτων σε ξηρή μορφή με την τεχνική του Freeze Drying.

Στη συνέχεια, ποσότητα των ξηρών εκχυλισμάτων υποβλήθηκε σε επεξεργασία με ρητίνη XAD-7, με σκοπό τον εμπλουτισμό του σε βιοδραστικά συστατικά. Η ρητίνη που χρησιμοποιήθηκε ήταν η XAD-7 λόγω της ικανότητάς της να προσροφά αποτελεσματικά τα φαινολικά συστατικά. Για την ενεργοποίηση της ρητίνης πραγματοποιείται έκπλυση με νερό, για την απομάκρυνση των αλάτων συντήρησης και έπειτα πραγματοποιούνται διαδοχικές εκπλύσεις με αλκοόλη, για την ενεργοποίηση των θέσεων προσρόφησης. Στη συνέχεια, η ενεργοποιημένη ρητίνη μεταφέρεται σε κάθετη στήλη από όπου και διαβιβάζονται τα υπό επεξεργασία εκχυλίσματα. Η ρητίνη εκπλένεται με ίσο όγκο νερού, όπου όλα τα υδατοδιαλυτά μη δραστικά συστατικά (σάκχαρα, πολυμερή, λιπαρά κ.α.) απορρίπτονται. Η αποδέσμευση και η παραλαβή των φαινολικών συστατικών από τη ρητίνη πραγματοποιείται με την προσθήκη μείγματος ισοπροπανόλης-νερού (1:1 v/v) με ρυθμό 3mL/min.

5.2 Χημική ανάλυση εκχυλισμάτων εχινάκειας

Η μελέτη της σύστασης των εκχυλισμάτων της εχινάκειας πραγματοποιήθηκε με αναλυτικές μεθοδολογίες, οι οποίες αναπτύχθηκαν και εφαρμόστηκαν στο Εργαστήριο Φαρμακογνωσίας και Χημείας Φυσικών Προϊόντων του τμήματος Φαρμακευτικής του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών. Παρακάτω αναφέρονται κάποιες πληροφορίες σχετικά με τη χημική ανάλυση των προαναφερθέντων εκχυλισμάτων, όπως μας δόθηκαν από το Εργαστήριο Φαρμακογνωσίας και Χημείας Φυσικών Προϊόντων.

Αρχικά, για τη διερεύνηση της φαινολικής σύστασης των εκχυλισμάτων χρησιμοποιήθηκε η συνδυασμένη τεχνική της υγρής χρωματογραφίας υπερύψηλης απόδοσης (UHPLC) με τη φασματομετρία μάζας υψηλής διακριτικής ικανότητας (HRMS). Με αυτή τη συνδυασμένη τεχνική είναι δυνατή η ανίχνευση μορίων στα υπό ανάλυση εκχυλίσματα σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις και επιπλέον, μπορεί να πραγματοποιηθεί ταυτοποίηση ουσιών με μεγάλη ακρίβεια.

Η απόδοση της δομής των συστατικών των εκχυλισμάτων βασίστηκε στη μελέτη των UPLC-HRMS χρωματογραφημάτων τους. Από την αξιολόγηση των χρωματογραφημάτων των εκχυλισμάτων και των φασμάτων μάζας της κάθε χρωματογραφικής κορυφής, προσδιορίστηκαν ποιοτικά τα συστατικά των εκχυλισμάτων (Εικόνα 17, Πίνακας 3).



Εικόνα 17: Αντιπροσωπευτικό χρωματογράφημα UPLC-Q-TOF-HRMS εκχυλίσματος εχινάκειας με το αντίστοιχο φάσμα μάζας HRMS-ESI(-) της κύριας κορυφής του.

RT (min)	Πρόδρομο ιόν [M-H] ⁻	Προτεινόμενος Μ.Τ.	Μοτίβο θραυσματοποίησης HRMS/MS	Ονομασία ένωσης
1,45	191,0201	$C_6H_8O_7$	111/87/85	Κιτρικό οξύ
1,56	161,0456	$C_{6}H_{10}O_{5}$	101/99/59/57	Μεγλουτόλη
4,77	353,0879	$C_{16}H_{18}O_9$	191/127/85	Χλωρογενικό οξύ
5,70	371,0977	C ₁₆ H ₂₀ O ₁₀	249/231/121	(2S,3S,4S,5R,6 R)-6-(-3- βενζοϋλοξυ-2- καρβοξυλικό οξύ
6,24	463,0882	$C_{21}H_{20}O_{12}$	300/271	Κουερσετίνη 3-Ο- γαλακτοσίδη
6,44	549,0889	$C_{24}H_{22}O_{15}$	505/463/300	Κουερσετίνη 3-Ο-μηλονυλο γλυκοσίδη
6,51	515,1198	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂	353/335/179/173/155	3,4-di-O- καφεοΰλκινικό οξύ
6,87	359,0776	C ₁₈ H ₁₆ O ₈	197/179/161/133/135/ 123/72	Ροσμαρινικό οξύ

Πίνακας 3: Συγκεντρωτικός πίνακας βιοδραστικών συστατικών εκχυλισμάτων εχινάκειας.

Στη συνέχεια, τα εκχυλίσματα αναλύθηκαν σε κατάλληλο HPLC-DAD χρωματογραφικό σύστημα (Εικόνα 18-21). Επιπλέον, αναλύθηκε και πρότυπη ένωση του ροσμαρινικού οξέος. Συγκρίνοντας τα χρωματογραφήματα, διαπιστώθηκε ότι η κύρια κορυφή των HPLC-DAD χρωματογραφημάτων των εκχυλισμάτων αντιστοιχεί στην ένωση του ροσμαρινικού οξέος (Εικόνα 22). Άρα, το κύριο βιοδραστικό συστατικό των εκχυλισμάτων είναι το ροσμαρινικό οξύ.



Εικόνα 18: Χρωματογράφημα HPLC-DAD του υδατικού εκχυλίσματος εχινάκειας.



Εικόνα 19: Χρωματογράφημα HPLC-DAD του υδατικού εκχυλίσματος εχινάκειας μετά από κατεργασία με ρητίνη XAD-7.



Εικόνα 20: Χρωματογράφημα HPLC-DAD του υδραλκολικού εκχυλίσματος εχινάκειας.



Εικόνα 21: Χρωματογράφημα HPLC-DAD του υδραλκολικού εκχυλίσματος εχινάκειας μετά από κατεργασία με ρητίνη XAD-7.



Εικόνα 22: Χρωματογράφημα RP-HPLC-DAD εκχυλίσματος εχινάκειας στα 330nm και χρωματογράφημα πρότυπης ένωσης ροσμαρινικού οξέος.

Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε ποσοτικός προσδιορισμός του ροσμαρινικού οξέος στα εκχυλίσματα εχινάκειας, χρησιμοποιώντας τη μέθοδο της καμπύλης αναφοράς. Αρχικά, παρασκευάστηκε πρότυπο διάλυμα ροσμαρινικού οξέος σε μεθανόλη συγκέντρωσης 1mg/mL. Κατόπιν, με διαδοχικές αραιώσεις προέκυψαν τα διαλύματα εργασίας ροσμαρινικού οξέος σε μείγμα μεθανόλης-νερού (1:1 v/v) σε συγκεντρώσεις 5, 12, 25, 35 και 50ppm. Τα διαλύματα εργασίας του ροσμαρινικού οξέος αναλύθηκαν με τη χρωματογραφική μέθοδο HPLC-DAD. Στη συνέχεια, σχεδιάστηκε το διάγραμμα καμπύλης αναφοράς των διαλυμάτων του ροσμαρινικού οξέος και βρέθηκε η εξίσωση της καμπύλης (Εικόνα 23). Έτσι, βρέθηκε η περιεκτικότητα του ροσμαρινικού οξέος σε καθένα από τα εκχυλίσματα της εχινάκειας (Πίνακας 4).



Εικόνα 23: Διάγραμμα καμπύλης αναφοράς διαλυμάτων ροσμαρινικού οξέος.

Εκχυλίσματα Echinacea purpurea	mg ροσμαρινικού οξέος / g εκχυλίσματος	
Υδατικό εκχύλισμα	7,25	
Υδατικό εκχύλισμα εμπλουτισμένο με ρητίνη XAD-7	35,54	
Υδραλκολικό εκχύλισμα	10,85	
Υδραλκολικό εκχύλισμα εμπλουτισμένο με ρητίνη ΧΑD-7	36,71	

Πίνακας 4: Περιεκτικότητα ροσμαρινικού οξέος στα εκχυλίσματα εχινάκειας.

Επιπροσθέτως, πραγματοποιήθηκε προσδιορισμός του ολικού φαινολικού φορτίου των εκχυλισμάτων. Για τον προσδιορισμό αυτό χρησιμοποιήθηκε μια φωτομετρική μέθοδος, που βασίζεται στην οξείδωση των φαινολικών ενώσεων από το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu και χρησιμοποιείται για τη μέτρηση του ολικού φαινολικού περιεχομένου χωρίς να γίνεται διάκριση μεταξύ μονομερών, διμερών ή μεγαλύτερων φαινολικών συστατικών. Οι φαινολικές ουσίες που προσδιορίζονται με τη μέθοδο αυτή εκφράζονται σε ισοδύναμα γαλλικού οξέος. Έτσι, για να βρεθεί η περιεκτικότητα των ολικών φαινολικών ενώσεων σε καθένα από τα εκχυλίσματα της εχινάκειας (Πίνακας 5) χρησιμοποιήθηκε καμπύλη αναφοράς, όπως έγινε στον προσδιορισμό του ροσμαρινικού οξέος που αναφέρθηκε παραπάνω.

Εκχυλίσματα Echinacea purpurea	mg γαλλικού οξέος / g εκχυλίσματος
Υδατικό εκχύλισμα	57,36
Υδατικό εκχύλισμα εμπλουτισμένο με ρητίνη ΧΑD-7	184,66
Υδραλκολικό εκχύλισμα	50,07
Υδραλκολικό εκχύλισμα εμπλουτισμένο με ρητίνη XAD-7	173,06

Πίνακας 5: Περιεκτικότητα ολικών φαινολικών στα εκχυλίσματα εχινάκειας.

5.3 Απομόνωση της λιποπρωτεΐνης LDL με διαδοχικές υπερφυγοκεντρήσεις

<u>Αρχή της μεθόδου</u>

Ο διαχωρισμός των λιποπρωτεϊνών του πλάσματος με υπερφυγοκεντρήσεις βασίζεται στις διαφορές ως προς την πυκνότητα που αυτές εμφανίζουν. Η διαφορετική πυκνότητα των λιποπρωτεϊνικών σωματιδίων οφείλεται σε διαφορές στο λιπιδιακό περιεχόμενο, το οποίο έχει ως αποτέλεσμα σημαντικές διαφορές στη χημική τους σύσταση και συνεπώς στην πυκνότητα. Έτσι, επιτυγχάνεται η επίπλευση τους σε διαφορετικές πυκνότητες. Οι λιποπρωτεΐνες με τις αντίστοιχες πυκνότητές τους είναι οι εξής:

- ➤ VLDL + IDL: d = 0,096-1,019 g/mL
- ➤ LDL: d = 1,019-1,063 g/mL
- ➢ HDL: d = 1,063-1,210 g/mL
- ➤ Lp(a): d = 1,060-1,107 g/mL

Αντιδραστήρια-Όργανα

- Φυγόκεντρος πάγκου (Hermle, Z320)
- Υπερφυγόκεντρος (17, Beckman)
- Κεφαλή υπερφυγοκέντρου (NVT-65, Beckman)
- Σωλήνες υπερφυγοκέντρου (Quickseal, Beckman)

- Titriplex III (Merck)
- Αντιβιοτικό πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη (10.000 U/mL penicillin/10.000 µg/mL streptomycin,100x PAA)
- KBr (Merck): Το KBr ξηραίνεται σε κλίβανο στους 100°C για 24h και διατηρείται σε ξηραντήρα.
- Μεμβράνη διαπίδυσης (Sigma): Η μεμβράνη ενεργοποιείται σε ρυθμιστικό διάλυμα 10mM PBS + 0,05% EDTA για 3h και κατακρατά οποιοδήποτε συστατικό έχει μοριακό βάρος μεγαλύτερο από 12kDa.
- Φίλτρα διήθησης 0,20μ (Corning)

Διαλύματα εργασίας

- Διάλυμα 10% EDTA, pH=7,0: 12,8247g EDTA*2Na*2H₂O (Titriplex III) διαλύονται σε 90mL dH₂O. Το pH ρυθμίζεται σε 7,0 και ο όγκος συμπληρώνεται στα 100mL με dH₂O. Το διάλυμα διατηρείται στους 4°C.
- Ρυθμιστικό διάλυμα 10mM PBS + 0,05% EDTA, pH=7,4: 8,1816g NaCl, 1,3800g NaH₂PO₄*H₂O και 1,7795g Na₂HPO₄*2H₂O διαλύονται σε 800mL dH₂O και αφού ρυθμιστεί το pH σε 7,4 συμπληρώνεται ο όγκος στο 1L με dH₂O. Στο διάλυμα αυτό προστίθενται 5mL διαλύματος 10% EDTA. Το διάλυμα διατηρείται στους 4°C.
- Διάλυμα KBr πυκνότητας 1,019g/mL: 14,92g KBr διαλύονται σε dH₂O μέχρι τελικό όγκο 500mL. Στο διάλυμα αυτό προστίθενται 5μL/mL 10% EDTA και 1,25μL/mL πενικιλίνη-στρεπτομυκίνη και διατηρείται στους 4°C.
- Διάλυμα KBr πυκνότητας 1,063g/mL: 45,99g KBr διαλύονται σε dH₂O μέχρι τελικό όγκο 500mL. Στο διάλυμα αυτό προστίθενται 5μL/mL 10% EDTA και 1,25μL/mL πενικιλίνη-στρεπτομυκίνη και διατηρείται στους 4°C.

Πειραματική πορεία

<u>Απομόνωση πλάσματος</u>

Η συλλογή του αίματος γίνεται σε πλαστικά σωληνάκια τα οποία περιέχουν αντιπηκτικό EDTA, σε αναλογία 100μL αντιπηκτικού για κάθε 10mL αίματος. Μετρείται το βάρος τους, ζυγοσταθμίζονται με νερό και στη συνέχεια φυγοκεντρούνται, σε φυγόκεντρο πάγκου, στα 3100rpm για 20min σε θερμοκρασία δωματίου, για να καταβυθιστούν τα κύτταρα του αίματος. Στη συνέχεια, αφού τελειώσει η φυγοκέντρηση, με μία πιπέτα γίνεται η συλλογή του πλάσματος, το πλάσμα μεταφέρεται σε ένα ποτήρι ζέσεως, μετρείται ο όγκος του και προστίθενται 5μL/mL πλάσματος 10% EDTA για την αποφυγή οξειδωτικής τροποποίησης των λιποπρωτεϊνικών σωματιδίων και 1,25μL/mL πλάσματος αντιβιοτικού πενικιλίνηστρεπτομυκίνη.

<u>Πρώτη υπερφυγοκέντρηση - Απομόνωση της VLDL και της IDL</u>

Αφού μετρηθεί ο όγκος του πλάσματος σε mL, πολλαπλασιάζεται με τον συντελεστή 0,0212. Ο αριθμός που προκύπτει ισούται με τα γραμμάρια στερεού KBr που πρέπει να προσθέσουμε στο πλάσμα, ώστε η πυκνότητα του να γίνει 1,019g/mL. Έτσι, προστίθεται στο πλάσμα η κατάλληλη ποσότητα στερεού KBr και γίνεται ήπια ανάδευση μέχρι να διαλυθεί. Στη συνέχεια, συμπληρώνεται ο όγκος με διάλυμα KBr πυκνότητας 1,019g/mL (στο οποίο έχουν προστεθεί 5μL/mL 10% EDTA και 1,25μL/mL πενικιλίνη-στρεπτομυκίνη) και γίνεται διαμοιρασμός στα σωληνάκια της υπερφυγοκέντρου. Η ζυγοστάθμιση πρέπει να γίνει με ακρίβεια. Τα σωληνάκια σφραγίζονται και τοποθετούνται στην υπερφυγόκεντρο, ώστε να γίνει η υπερφυγοκέντρηση, η οποία ρυθμίζεται στα 45.000rpm για 8h στους 14°C. Μετά το τέλος της πρώτης υπερφυγοκέντρησης, η VLDL και η IDL έχουν συγκεντρωθεί στην πάνω επιφάνεια του σωλήνα, διαχωρισμένες από τα υπόλοιπα συστατικά του πλάσματος. Έτσι, γίνεται η συλλογή τους με μία σύριγγα προσεκτικά και στη συνέχεια απορρίπτονται. Έπειτα, συλλέγεται το υπόλοιπο του πλάσματος, το οποίο περιέχει τις λιποπρωτεΐνες LDL και HDL, καθώς και άλλα συστατικά του πλάσματος, μεταφέρεται σε ένα ποτήρι ζέσεως και μετρείται ο όγκος του.

<u>Δεύτερη υπερφυγοκέντρηση - Απομόνωση της LDL</u>

Αφού μετρήθηκε ο όγκος του υπόλοιπου του πλάσματος από την πρώτη υπερφυγοκέντρηση, ο όγκος αυτός πολλαπλασιάζεται με τον συντελεστή 0,060. Ο αριθμός που προκύπτει ισούται με τα γραμμάρια του στερεού KBr, που πρέπει να προστεθούν στο υπόλοιπο του πλάσματος, ώστε η πυκνότητά του να αυξηθεί από 1,019g/mL σε 1,063g/mL. Έτσι, προστίθεται στο υπόλοιπο του πλάσματος η κατάλληλη ποσότητα στερεού KBr και γίνεται ήπια ανάδευση μέχρι να διαλυθεί. Στη συνέχεια, συμπληρώνεται ο όγκος με διάλυμα KBr πυκνότητας 1,063g/mL (στο οποίο έχουν προστεθεί 5μL/mL 10% EDTA και 1,25μL/mL πενικιλίνη-στρεπτομυκίνη) και γίνεται διαμοιρασμός στα σωληνάκια της υπερφυγοκέντρου. Η ζυγοστάθμιση πρέπει να γίνει με ακρίβεια. Τα σωληνάκια σφραγίζονται και τοποθετούνται στην υπερφυγόκεντρο, ώστε να γίνει η υπερφυγοκέντρηση, η οποία ρυθμίζεται στα 45.000rpm για 8h στους 14°C. Μετά το τέλος της δεύτερης υπερφυγοκέντρησης, η LDL έχει συγκεντρωθεί στην πάνω επιφάνεια του σωλήνα, διαχωρισμένη από τα υπόλοιπα συστατικά του πλάσματος και έτσι γίνεται η συλλογή της με μία σύριγγα προσεκτικά.

<u>Τρίτη υπερφυγοκέντρηση - Έκπλυση της LDL</u>

Η απομονωμένη LDL υποβάλλεται σε υπερφυγοκέντρηση ακόμα μία φορά, ώστε να καθαριστεί όσο το δυνατόν περισσότερο από την αλβουμίνη του πλάσματος. Αρχικά, η LDL μοιράζεται σε σωληνάκια Quickseal και ο όγκος αυτών συμπληρώνεται με διάλυμα KBr πυκνότητας 1,063g/mL. Στη συνέχεια, τα σωληνάκια, αφού ζυγοσταθμιστούν, σφραγίζονται και τοποθετούνται στην υπερφυγόκεντρο, ώστε να γίνει η υπερφυγοκέντρηση, η οποία ρυθμίζεται στα 45.000rpm για 8h στους 14°C. Μετά το τέλος της τρίτης υπερφυγοκέντρησης, η LDL έχει συγκεντρωθεί στην πάνω επιφάνεια του σωλήνα και έτσι γίνεται η συλλογή της με μία σύριγγα προσεκτικά. Έπειτα, πραγματοποιείται διαπίδυση της LDL, διότι πρέπει να απομακρυνθεί το EDTA, έτσι ώστε να μην δεσμεύσει τον χαλκό και να μην εμποδίσει την πραγματοποίηση της οξείδωσης της LDL, που θα λάβει χώρα αργότερα. Έτσι, η LDL μεταφέρεται σε μεμβράνη διαπίδυσης και τοποθετείται σε ποτήρι ζέσεως που περιέχει 200πλάσιο όγκο ρυθμιστικού διαλύματος 10mM PBS pH=7,4, σε σχέση με τον όγκο της. Η διαπίδυση γίνεται στους 4°C υπό συνεχή ανάδευση. Μετά από 5h, το PBS αντικαθίσταται με καινούργιο και η διαπίδυση συνεχίζεται για άλλες 19h. Μετά το τέλος της διαπίδυσης, η LDL συλλέγεται προσεκτικά με μία σύριγγα και διατηρείται στους 4°C με άζωτο.

5.4 Ποσοτικοποίηση της λιποπρωτεΐνης LDL με την μέθοδο BCA

<u>Αρχή της μεθόδου</u>

Τα ιόντα Cu²⁺ ανάγοντα αρχικά από τις πρωτεΐνες, σε αλκαλικό περιβάλλον, προς ιόντα Cu⁺, κάθε ένα από τα οποία σχηματίζει στη συνέχεια έγχρωμο, υδατοδιαλυτό σύμπλοκο με 2 μόρια δισιχρονικού οξέος, σύμφωνα με την παρακάτω αντίδραση, το προϊόν της οποίας απορροφά στα 562nm. Πρωτεΐνη (πεπτιδικοί δεσμοί) + Cu^{2+} → Τετραχηλικό σύμπλοκο πρωτεΐνης- Cu^+ Cu^+ + 2 δισιχρονικό οξύ (BCA) → BCA- Cu^+

<u>Αντιδραστήρια-Όργανα</u>

- Αντιδραστήριο Α: Το αντιδραστήριο Α είναι μείγμα ανθρακικού νατρίου, διττανθρακικού νατρίου, δισιχρονικού οξέος και ταρταρικού νατρίου σε 0,2N NaOH.
- Αντιδραστήριο Β: Διάλυμα 4% CuSO₄
- Πρότυπο διάλυμα 2mg/ml BSA σε 0,9% NaCl και 0,05% NaN₃
- Πλακίδιο ELISA 96 θέσεων (Sarstedt)
- Μετρητής microELISA (Spectra MAX 190, Molecular Devices)

<u>Διαλύματα εργασίας</u>

- Διάλυμα εργασίας: Το διάλυμα εργασίας προκύπτει από την ανάμιξη των αντιδραστηρίων Α και Β σε κατ' όγκο αναλογία 50:1. Το αντιδραστήριο παρασκευάζεται λίγο πριν την χρήση του.
- Πρότυπα διαλύματα BSA: Παρασκευάζονται με κατάλληλη αραίωση του διαλύματος 2mg/ml BSA, έτσι ώστε να προκύψουν τα διαλύματα 0.25, 0.50, 0.75, 1.0, 1.25 και 1.5 mg/mL BSA. Τα πρότυπα διαλύματα BSA διατηρούνται στους -20°C.

Πειραματική πορεία

Σε πλακίδιο ELISA 96 θέσεων τοποθετούνται 20μL από κάθε πρότυπο διάλυμα BSA (πρότυπη καμπύλη), καθώς και 20μL δείγματος (LDL). Στη συνέχεια, προστίθενται 200μL του διαλύματος εργασίας σε κάθε θέση της πλάκας. Η πλάκα καλύπτεται με αυτοκόλλητη μεμβράνη, ανακινείται ήπια και επωάζεται στους 37°C για 30min. Έπειτα, εισάγεται στον μετρητή microELISA όπου καταγράφεται η απορρόφηση στα 562nm.

Με βάση τις απορροφήσεις των προτύπων δειγμάτων σχεδιάζεται, με τη βοήθεια ηλεκτρονικού υπολογιστή, η βέλτιστη ευθεία που έχει στον άξονα των Χ την συγκέντρωση των προτύπων σε BSA και στον άξονα των Υ τις απορροφήσεις των προτύπων. Από την εξίσωση της πρότυπης καμπύλης: Απορρόφηση = α * συγκέντρωση + b, όπου α και b οι συντελεστές της ευθείας γραμμής και από τις απορροφήσεις των δειγμάτων υπολογίζονται τα mg/mL πρωτεΐνης που περιέχουν τα δείγματα.

5.5 Οξειδωτική τροποποίηση της λιποπρωτεΐνης LDL με ιόντα Cu²⁺

Αρχή της μεθόδου

Η οξειδωτική τροποποίηση της LDL επιτυγχάνεται με την επώασή της, σε κατάλληλες συνθήκες, με ιόντα Cu²⁺ στους 37°C. Η παρακολούθηση της οξείδωσης γίνεται στα 234nm, περιοχή όπου απορροφούν τα συζυγή διένια που σχηματίζονται στη λιποπρωτεΐνη κατά την υπεροξείδωση των ενδογενών πολυακόρεστων λιπαρών οξέων.

<u>Αντιδραστήρια-Όργανα</u>

- LDL: Η λιποπρωτεΐνη απομονώνεται υπερφυγοκεντρικά, όπως έχει περιγραφεί παραπάνω, και διατηρείται στους 4°C με άζωτο.
- ➤ CuSO₄ (MB=249,69 g/mol, Sigma-Aldrich)
- Πλακίδιο ELISA 96 θέσεων (Sarstedt)
- Μετρητής microELISA (Spectra MAX 190, Molecular Devices)

<u>Διαλύματα εργασίας</u>

- Ρυθμιστικό διάλυμα 10mM PBS pH=7,4: 8,1816g NaCl, 1,3800g NaH₂PO₄*H₂O και 1,7795g Na₂HPO₄*2H₂O διαλύονται σε 800mL dH₂O και αφού ρυθμιστεί το pH σε 7,4 συμπληρώνεται ο όγκος στο 1L με dH₂O. Το διάλυμα διατηρείται σε RT.
- Διάλυμα 20mM CuSO₄: 0,4993g CuSO₄ διαλύονται σε 100mL dH₂O δίνοντας διάλυμα 20mM CuSO₄. Το διάλυμα διατηρείται στους 4°C.
- Διάλυμα 0,2mM CuSO4: Το διάλυμα αυτό προκύπτει από το διάλυμα 20mM CuSO4 με αραίωση 1:100. Το διάλυμα διατηρείται στους 4°C.
- Διάλυμα 0,1mM CuSO₄: Το διάλυμα αυτό προκύπτει από το διάλυμα 0,2mM CuSO₄ με αραίωση 1:2. Το διάλυμα διατηρείται στους 4°C.

<u>Πειραματική πορεία</u>

Η LDL αραιώνεται στα 100μg πρωτεΐνης/mL με την προσθήκη κατάλληλου όγκου 10mM PBS pH=7,4. Η οξείδωση αρχίζει με την προσθήκη διαλύματος 0,1mM CuSO₄,

τέτοιου όγκου ώστε η τελική συγκέντρωση μέσα στο πηγαδάκι να είναι 5mM. Ο τελικός όγκος στο πηγαδάκι είναι 300μL. Η λιποπρωτεΐνη τοποθετείται σε πλακίδιο ELISA 96 θέσεων και στη συνέχεια το πλακίδιο τοποθετείται σε μετρητή microELISA στους 37°C για 5h. Η οξείδωση παρακολουθείται στα 234nm με καταγραφή της σιγμοειδούς καμπύλης παραγωγής των συζυγών διενίων (Εικόνα 24). Επιπλέον, η οξείδωση της LDL παρουσία διάφορων ουσιών σε διάφορες συγκεντρώσεις γίνεται με τον ίδιο τρόπο για τον έλεγχο της πιθανής αντιοξειδωτικής δράσης αυτών των ουσιών.



Εικόνα 24: Τυπική καμπύλη οξείδωσης της LDL.

5.6 Κυτταρομετρία ροής

Αρχή μεθόδου

Η κυτταρομετρία ροής (Flow Cytometry, FC) είναι μια τεχνική αυτοματοποιημένης κυτταρικής ανάλυσης, η οποία επιτρέπει την ταυτόχρονη ανάλυση πολλών παραμέτρων των φυσικών ή χημικών χαρακτηριστικών μεμονωμένων σωματιδίων (π.χ. κυττάρων) καθώς διέρχονται σε νηματική ροή από ένα σταθερό σημείο, στο οποίο προσπίπτει ακτίνα laser (Εικόνα 25). Το κυτταρόμετρο ροής χρησιμεύει για την ανίχνευση και τη μέτρηση του ποσού φθορίζουσας χρώσης επί των σωματιδίων και αποτελείται από μία ή περισσότερες πηγές laser για την παροχή ενέργειας διέγερσης.

Δύο ανιγνευτές μετρούν δύο ανεξάρτητες του φθορισμού φυσικές παραμέτρους των σωματιδίων, την πρόσθια σκέδαση (Forward Scatter, FSC), η οποία είναι ανάλογη του μεγέθους του σωματιδίου και την πλάγια σκέδαση (Side Scatter, SSC), η οποία είναι ανάλογη της κοκκίωσης του σωματιδίου. Τα προς μέτρηση δείγματα θα πρέπει να βρίσκονται σε μορφή εναιωρήματος, ενώ τα προς εξέταση κύτταρα επισημαίνονται με ένα ή περισσότερα ειδικά κατά περίπτωση μονοκλωνικά αντισώματα, τα οποία έχουν επισημανθεί με κατάλληλες φθορίζουσες ουσίες με στόχο την πρόσδεση των αντισωμάτων στα αντίστοιχα αντιγόνα στην επιφάνεια των κυττάρων. Η ένταση φθορισμού, καθώς και οι δείκτες σκέδασης καταγράφονται για κάθε κύτταρο και οι πληροφορίες αναλύονται με πρόγραμμα υπολογιστή. Οι φθορίζουσες ουσίες, οι οποίες χρησιμοποιούνται και διεγείρονται από laser 488nm, είναι η ισοθειοκυανική φλουοροσκεΐνη (Fluorescein Isothiocyanate, FITC), φυκοερυθρίνη (Phycoerythrin, PE) και το πρωτεϊνικό σύμπλοκο peridinin-γλωροφύλλης (Peridinin Chlorophyll Protein Complex, PerCP), οι οποίες εκπέμπουν σε μήκη κύματος 530nm, 585nm και 650nm, αντίστοιχα. Τα αποτελέσματα αναπαρίστανται ως σημειακό γράφημα κυτταροδιαγράμματος (dot plot), το οποίο παρουσιάζει τις τιμές δύο διαφορετικών γαρακτηριστικών ενός κυτταρικού πληθυσμού (Εικόνα 26α), ως ιστόγραμμα έντασης φθορισμού (histogram), στο οποίο η απεικόνιση της έντασης φθορισμού είναι ανάλογη του αριθμού των φθοριζόντων αντισωμάτων στην επιφάνεια του κυτταρικού πληθυσμού (Εικόνα 26β) ή ως ισομετρικό διάγραμμα (isometric plot) (Εικόνα 26γ).



Εικόνα 25: Αρχή λειτουργίας της FC.



Εικόνα 26: Έκφραση αποτελεσμάτων: α) σημειακό γράφημα κυτταροδιαγράμματος, β) ιστόγραμμα έντασης φθορισμού, γ) ισομετρικό διάγραμμα.

<u>Αντιδραστήρια-Όργανα</u>

- Ανθρώπινα ενδοθηλιακά κύτταρα ομφαλικής φλέβας (Human umbilical vein endothelial cells, HUVECs)
- Κολλαγόνο τύπου Ι (BD Biosciences)
- Οξικό οξύ (17,5N) (CH₃COOH, Riedel-de Haën)
- Θρεπτικό υλικό Medium 199 (Gibco)
- Ορός εμβρύου βοδιού, θερμικά απενεργοποιημένος (Fetal bovine serum, FBS, heat inactivated, Gibco)
- Αυξητικό συμπλήρωμα ενδοθηλιακών κυττάρων (Endothelial cell growth supplement, ECGS, φιαλίδια των 15mg, Sigma)
- Αντιβιοτικά πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη (10.000 U/mL penicillin/10.000 µg/mL streptomycin,100x PAA)
- Ηπαρίνη (5.000 iu/mL) (LEO)
- Διάλυμα θρυψίνης/EDTA (Biochrom)
- Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (D-PBS 10X, Gibco)
- ➢ Water for injection (WFI)
- Αλβουμίνη βόειου ορού (Bovine serum albumin, BSA, Sigma)
- Παράγοντας νέκρωσης όγκων-α (TNF-α) (Sigma)
- Μονοκλωνικό αντίσωμα FITC mouse anti-human CD31 (BD Biosciences)
- Μονοκλωνικό αντίσωμα PE mouse anti-human CD54 (BD Biosciences)
- Αιμοκυτταρόμετρο (πλάκα Neubauer)
- Ανάστροφο μικροσκόπιο (A. Krüss Optronic)
- Φυγόκεντρος πάγκου (Rotofix 32, Hettich)
- Επωαστικός κλίβανος ατμόσφαιρας 5% CO₂ (Nuaire)
- > Τρυβλία κυτταρικής καλλιέργειας (Corning)
- Πλακίδια κυτταρικής καλλιέργειας 6 θέσεων (Corning)
- Κωνικά βαθμονομημένα σωληνάρια των 15 και 50 mL (Corning)
- Φίλτρα διήθησης 0,2 μm (Corning)
- > Αποστειρωμένα σιφώνια των 5, 10 και 25 mL (Starstedt)
- Σωληνάκια κυτταρομέτρου ροής (Becton Dickinson)

Διαλύματα εργασίας

- Ρυθμιστικό διάλυμα PBS 1X, pH=7,4: Ποσότητα διαλύματος D-PBS 10X αραιώνεται με WFI (1:10) προς παρασκευή διαλύματος PBS 1X. Το διάλυμα αποθηκεύεται σε RT.
- Διάλυμα 50µg/mL κολλαγόνου: Ποσότητα διαλύματος 17,5N CH₃COOH αραιώνεται προς παρασκευή διαλύματος 0,02N CH₃COOH, το οποίο στη συνέχεια χρησιμοποιείται για την αραίωση της εμπορικά διαθέσιμης συσκευασίας κολλαγόνου για παρασκευή διαλύματος κολλαγόνου τελικής συγκέντρωσης 50µg/mL. Το διάλυμα αποθηκεύεται στους 4°C.
- Πλήρες θρεπτικό υλικό M199: Σε 237 mL M199 προστίθενται 60mL FBS, 15mg ECGS (διάλυση σε μικρή ποσότητα M199 και αποστείρωση με τη χρήση φίλτρου διήθησης 0,2μm), 150μL ηπαρίνης και 3mL αντιβιοτικού πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη. Το διάλυμα αποθηκεύεται στους 4°C για ένα μήνα.
- Διάλυμα BSA: 0,1% w/v BSA: Το διάλυμα μοιράζεται σε όγκους των 5 mL, τα οποία αποθηκεύονται στους -20°C.
- Διάλυμα επίδρασης: Κατάλληλος όγκος FBS και αντιβιοτικού πενικιλίνης/στρεπτομυκίνης διαλύονται σε θρεπτικό υλικό M199 προς σχηματισμό διαλύματος 5% FBS + 1% πενικιλίνη-στρεπτομυκίνη/M199. Το διάλυμα αποθηκεύεται στους 4°C για ένα μήνα.
- Διάλυμα 10% FBS/M199 και 5% FBS/M199: Κατάλληλος όγκος FBS διαλύεται σε θρεπτικό υλικό M199 προς σχηματισμό διαλυμάτων 10% και 5% FBS σε M199. Το διάλυμα αποθηκεύεται στους 4°C για ένα μήνα.

Πειραματική πορεία καλλιέργειας κυττάρων HUVECs

Στρώσιμο κυττάρων

- Επώαση τρυβλίου κυτταρικής καλλιέργειας με 1mL 50µg/mL κολλαγόνου για 20min στον επωαστικό κλίβανο (37°C, 5%CO₂).
- Προσθήκη κυττάρων (τα οποία είναι αποθηκευμένα σε υγρό N₂) σε κωνικό βαθμονομημένο σωληνάριο, το οποίο περιέχει 9mL πλήρους θρεπτικού υλικού M199.
- 3) Φυγοκέντρηση κυττάρων στα 374×g για 5min.
- Απομάκρυνση υπερκειμένου και επαναιώρηση κυττάρων σε 5mL πλήρους θρεπτικού υλικού.
- 5) Μετά το πέρας των 20min, γίνεται έκπλυση του τρυβλίου με 2×5mL PBS 1X.
- 6) Μεταφορά των κυττάρων από το κωνικό βαθμονομημένο σωληνάριο στο τρυβλίο και επώαση αυτών στον επωαστικό κλίβανο (37°C, 5%CO₂).
- 7) Κάθε 2d πραγματοποιείται αλλαγή θρεπτικού υλικού μέχρι πλήρους κάλυψης (70-90%) της επιφάνειας του τρυβλίου (confluent). Η αλλαγή θρεπτικού υλικού γίνεται ως εξής:
 - **i.** Απομάκρυνση μη προσκολλημένων κυττάρων.
 - ii. Έκπλυση τρυβλίου με $2 \times 5 \text{mL PBS } 1 \text{X}$.
 - iii. Προσθήκη 5mL πλήρους θρεπτικού υλικού.

<u>Αραίωση κυττάρων (split) – Απόκτηση νέας γενιάς κυττάρων</u>

- 1) Απομάκρυνση μη προσκολλημένων κυττάρων.
- 2) Έκπλυση τρυβλίου με 2×5mL PBS 1X.
- Επώαση κυττάρων με 500μL διαλύματος θρυψίνης/EDTA για 1,5min στον επωαστικό κλίβανο (37°C, 5%CO₂).
- Προσθήκη 5mL πλήρους θρεπτικού υλικού και συλλογή κυττάρων σε κωνικό βαθμονομημένο σωληνάριο.
- 5) Μέτρηση κυττάρων (τοποθέτηση 10µL εναιωρήματος κυττάρων σε κάθε εσοχή της πλάκας Neubauer).

Αρ. κυττάρων = [(Συνολικός αρ. κυττάρων στα 5 τετράγωνα)/5,5]×10⁴×V

- 6) Φυγοκέντρηση κυττάρων στα 374×g για 5min.
- Απομάκρυνση υπερκειμένου και επαναιώρηση κυττάρων σε 5mL πλήρους θρεπτικού υλικού.
- 8) Επώαση πλακιδίου κυτταρικής καλλιέργειας 6 θέσεων με 650μL 50μg/mL κολλαγόνου για 20min στον επωαστικό κλίβανο (37°C, 5%CO₂).
- Μετά το πέρας των 20min, γίνεται έκπλυση των θέσεων του πλακιδίου με 2×2mL PBS 1X.
- 9) Στη συνέχεια, στις θέσεις του πλακιδίου γίνεται προσθήκη κυτταρικού εναιωρήματος (10⁵ κύτταρα) σε πλήρες θρεπτικό υλικό M199 και επώαση των κυττάρων στον επωαστικό κλίβανο (37°C, 5%CO₂).
- 10) Πραγματοποιείται αλλαγή θρεπτικού υλικού κάθε 2d μέχρι πλήρους κάλυψης (70-90%) της επιφάνειας των θέσεων του πλακιδίου (confluent). Ανάλογα με

την αραίωση των κυττάρων (split) που πραγματοποιείται, διαφέρει το χρονικό διάστημα που αναπτύσσονται τα κύτταρα έτσι ώστε να καλύψουν πλήρως την επιφάνεια του εκάστοτε πλακιδίου (confluent) (Πίνακας 6).

Πίνακας 6	: Χρονικό	διάστημα	ανάπτυξης	$\tau\omega\nu$	κυττάρων	ανάλογα	με	την	αραίωση	των
κυττάρων π	ου πραγμα	τοποιείται.								

Αραίωση κυττάρων (split)	Κυτταρική καλλιέργεια (confluent)
1:3	~2 d
1:4	~2-3 d
1:5	~4-5 d
1:6	~5-6 d

<u>Μελέτη της επίδρασης των εκχυλισμάτων Echinacea purpurea στη μεμβρανική</u> έκφραση του ICAM-1 σε καλλιέργεια κυττάρων HUVECs

- Όταν τα κύτταρα έχουν καλύψει πλήρως την επιφάνεια των θέσεων του πλακιδίου, γίνεται απομάκρυνση των μη προσκολλημένων κυττάρων και έκπλυση των θέσεων του πλακιδίου με 2×2mL PBS 1X.
- Προσθήκη σε κάθε θέση του πλακιδίου 1,5mL του διαλύματος επίδρασης 5% FBS + 1% πεν.-στρεπ.
- 3) Προ-επώαση των κυττάρων με διάφορες συγκεντρώσεις των εκχυλισμάτων της Echinacea purpurea για 1h στον επωαστικό κλίβανο (37°C, 5%CO₂).
- Μετά το πέρας της 1h, γίνεται επώαση των κυττάρων με 0,5ng/mL TNF-α για 6h στον επωαστικό κλίβανο (37°C, 5%CO₂).
- 5) Μετά το πέρας των 6h, γίνεται απομάκρυνση των μη προσκολλημένων κυττάρων.
- 6) Έκπλυση του πλακιδίου με 2×2mL PBS 1X ανά συνθήκη.
- 7) Επώαση κυττάρων με 600μL διαλύματος θρυψίνης/EDTA ανά θέση για 1,5min στον επωαστικό κλίβανο (37°C, 5%CO₂).
- 8) Προσθήκη 2mL 10% FBS ανά συνθήκη και συλλογή κυττάρων σε κωνικό βαθμονομημένο σωληνάριο.
- 9) Φυγοκέντρηση κυττάρων στα 374×g για 5min.
- 10) Απομάκρυνση υπερκειμένου και επαναιώρηση κυττάρων σε 500µL 10% FBS ανά συνθήκη.

- 11) Μέτρηση των κυττάρων ανά συνθήκη και αραίωση των κυττάρων με κατάλληλη ποσότητα 10% FBS, ώστε σε κάθε θέση του πλακιδίου να υπάρχουν 10⁵ κύτταρα.
- 12) Προσθήκη 200μL 5% FBS ανά συνθήκη.
- 13) Επώαση των κυττάρων με 5μL CD31-FITC μονοκλωνικού αντισώματος και 5μL CD54-PE μονοκλωνικού αντισώματος για 30min στους 4°C.
- 14) Φυγοκέντρηση κυττάρων στα 374×g για 5 min.
- 15) Απομάκρυνση υπερκειμένου και επαναιώρηση κυττάρων σε 200µL 5% FBS ανά συνθήκη (1^η έκπλυση κυττάρων).
- 16) Φυγοκέντρηση κυττάρων στα 374×g για 5 min.
- 17) Απομάκρυνση υπερκειμένου και επαναιώρηση κυττάρων σε 200µL 5% FBS ανά συνθήκη (2^η έκπλυση κυττάρων).
- 18) Φυγοκέντρηση κυττάρων στα $374 \times g$ για 5 min.
- 19) Απομάκρυνση υπερκειμένου και επαναιώρηση κυττάρων σε 200µL 5% FBS ανά συνθήκη (3^η έκπλυση κυττάρων).
- 20) Φυγοκέντρηση κυττάρων στα 374×g για 5 min.
- Απομάκρυνση υπερκειμένου και επαναιώρηση κυττάρων σε 500µL 5% FBS ανά συνθήκη.
- 22) Κυτταρομετρική ανάλυση: Κατά την επεξεργασία των αποτελεσμάτων υπολογίζεται η μέση ένταση φθορισμού (MFI) του CD54 στα ενεργοποιημένα κύτταρα. Η κυτταρομετρική ανάλυση λαμβάνει χώρα στα 10.000 συμβάντα.

5.7 Συσσωρευομετρία οπτικής διαπερατότητας

<u>Αρχή της μεθόδου</u>

Η συσσωρευομετρία οπτικής διαπερατότητας (Light transmittance aggregometry, LTA) αποτελεί ιστορική "gold standard" τεχνική για τη μέτρηση της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων σε πλάσμα πλούσιο σε αιμοπετάλια (Platelet rich plasma, PRP) ή πλυμένα αιμοπετάλια (Washed platelets, WPs). Η μέθοδος βασίζεται στην ανίχνευση της διαφοράς της οπτικής διαπερατότητας, με τη χρήση ενός φωτόμετρου, μετά την προσθήκη ενός αιμοπεταλιακού αγωνιστή στο PRP ή τα WPs (Εικόνα 27). Οι μετρήσεις παρέχουν μια καμπύλη συσσώρευσης, η οποία περιγράφει τις μεταβολές της οπτικής διαπερατότητας.

φάσμα αγωνιστών, παρέχοντας μια εικόνα των διαφορετικών οδών αιμοπεταλιακής ενεργοποίησης/συσσώρευσης. Η μέγιστη έκταση της συσσώρευσης, εκφρασμένη σε ποσοστά, η φάση προσαρμογής και η κλίση της καμπύλης αποτελούν τις παραμέτρους οι οποίες προσδιορίζονται συνήθως.

Η μέθοδος απαιτεί τη χρήση ενός ειδικού οργάνου, το οποίο ονομάζεται συσσωρευόμετρο, ένα φασματοφωτόμετρο σταθερού μήκους κύματος με μία ή τέσσερις θέσεις δειγμάτων, οι οποίες επιτρέπουν την ταυτόχρονη μέτρηση της συσσώρευσης σε τέσσερα διαφορετικά δείγματα (Εικόνα 28). Κατά τη διάρκεια του πειράματος, τα δείγματα θερμαίνονται στους 37°C, προσομοιάζοντας τις in vivo συνθήκες, και αναδεύονται με ειδικό μαγνητάκι στις 1200 rpm, βοηθώντας στην παραγωγή διατμητικών δυνάμεων και την ανάδευση των αιμοπεταλίων. Μια ακτίνα υπέρυθρου φωτός, το οποίο ανιχνεύεται από φωτοδιόδους σιλικόνης, περνά μέσα από τις κυψελίδες, οι οποίες περιέχουν PRP ή WPs και ομόλογο πλάσμα φτωχό σε αιμοπετάλια (PPP) ή διάλυμα εναιώρησης (δείγμα και δείγμα αναφοράς, αντίστοιχα). Το φως, το οποίο περνάει από την κυψελίδα που περιέχει PRP ή WPs (πριν την προσθήκη του αγωνιστή) θεωρείται 0% διαπερατότητα ή συσσώρευση, ενώ το φως που περνάει από την κυψελίδα που περιέχει PPP ή διάλυμα εναιώρησης θεωρείται 100% διαπερατότητα ή συσσώρευση. Η συσσωρευτική ικανότητα των αιμοπεταλίων κρίνεται βάσει των αλλαγών στην εκπομπή του φωτός, η οποία καταγράφεται φωτομετρικά και αναπαρίσταται ως κατερχόμενη καμπύλη. Η προσθήκη ενός αγωνιστή στο δείγμα προκαλεί αύξηση της αλληλεπίδρασης των αιμοπεταλίων, με αποτέλεσμα τη μεταβολή της διαπερατότητας του διαλύματος. Τα αιμοπετάλια, ανταποκρινόμενα στη προσθήκη του αγωνιστή, υφίστανται αλλαγή του σχήματός τους, οδηγώντας σε αύξηση του μεγέθους τους με αποτέλεσμα να επιτρέπεται να περάσει λιγότερο φως από την κυψελίδα, το οποίο καταγράφεται ως μικρότερη διαπερατότητα. Στη συνέχεια, τα αιμοπετάλια προσκολλώνται το ένα πάνω στο άλλο με αποτέλεσμα να σχηματίζονται συσσωματώματα, το οποίο καταγράφεται ως μεγαλύτερη διαπερατότητα, καθώς περνάει περισσότερο φως από την κυψελίδα. Η καταγραφή της συσσώρευσης in vitro χαρακτηρίζεται από την αλλαγή σχήματος των αιμοπεταλίων (μικρή ανερχόμενη καμπύλη και μείωση διαπερατότητας), τη μέγιστη αύξηση στη διαπερατότητα του φωτός, η οποία προκαλείται από τον αγωνιστή (% συσσώρευση), το ρυθμό της συσσώρευσης (% μεταβολή συσσώρευσης/min), την πρωτογενή συσσώρευση (κατερχόμενη καμπύλη και αύξηση διαπερατότητας), η οποία οδηγεί είτε σε αποσυσσώρευση (ανερχόμενη καμπύλη και αύξηση διαπερατότητας) είτε σε ένα σταθερό πλατό (ευθεία γραμμή και σταθερή διαπερατότητα) είτε περνά ένα πλατό και προχωρά στη δεύτερη φάση της συσσώρευσης (δευτερογενής συσσώρευση), η οποία συμβαίνει όταν τα αιμοπετάλια εκκρίνουν τα συστατικά των κοκκίων τους, τα οποία προκαλούν επιπρόσθετη συσσώρευση (δεύτερη κατερχόμενη καμπύλη και επιπρόσθετη αύξηση διαπερατότητας). Η καταγραφή της συσσώρευσης πραγματοποιείται για 5 min.



Εικόνα 27: Αρχή μεθόδου της LTA.



Εικόνα 28: Διάταξη συσσωρευομέτρου.

<u>Αντιδραστήρια-Όργανα</u>

- Κιτρικό οξύ (C₆H₈O₇, 192,13g/mol, Merck)
- Κιτρικό νάτριο (C₆H₅Na₃O₇*2H₂O, 294,10g/mol, Merck)
- D(+) Γλυκόζη (C₆H₁₂O₆, 180,16g/mol, Fluka)
- Οξαλικό αμμώνιο ((NH4)₂C₂O₄, 142,11g/mol, Mallinckrodt)
- Διφωσφορική αδενοσίνη [ADP (C₁₀H₁₅N₅O₁₀P₂, 427,201g/mol, Chrono-Log)]
- Πεπτίδιο-ενεργοποιητής του υποδοχέα της θρομβίνης-6 [TRAP-6 (C₃₄H₅₆N₁₀O₉, 748,87g/mol, Bachem)]
- Αραχιδονικό οξύ [AA (CH₃(CH₂)₄(CH=CHCH₂)₄CH₂CH₂CO₂H, 304,47g/mol, Sigma)]
- \blacktriangleright Διμεθυλοσουλφοξείδιο [DMSO (C₂H₆OS, 78,13g/mol, Carloerba)]
- Φυγόκεντρος πάγκου (Hermle, Z 320)
- Αιμοκυτταρόμετρο (πλάκα Neubauer)
- Οπτικό μικροσκόπιο (Olympus, CX41)
- Συσσωρευόμετρο 700-4DR (Chrono-Log)
- Λογισμικό Aggrolink8 (Chrono-Log)
- Γυάλινες κυψελίδες (Chrono-Log)
- Μαγνητάκια (Chrono-Log)

<u>Διαλύματα εργασίας</u>

- Αντιπηκτικό διάλυμα κιτρικών αλάτων (ACD): Το υδατικό αντιπηκτικό διάλυμα ACD περιέχει 42 mM κιτρικού οξέος, 75 mM κιτρικού νατρίου και 139 mM D(+) γλυκόζης. Συγκεκριμένα, 0,8 g κιτρικού οξέος, 2,2 g κιτρικού νατρίου και 2,5 g D(+) γλυκόζης διαλύονται σε 100 ml απεσταγμένου ύδατος. Το διάλυμα διατηρείται στους 4°C για 1 μήνα.
- Διάλυμα οξαλικού αμμωνίου (1% w/v (NH₄)₂C₂O₄): Το οξαλικό αμμώνιο διαλύεται στο απεσταγμένο νερό και το διάλυμα αποθηκεύεται στους 4°C. Το οξαλικό αμμώνιο βοηθάει στη λύση τυχόν υπαρχόντων ερυθροκυττάρων. Χρησιμεύει στη μέτρηση των αιμοπεταλίων.
- Διάλυμα φυσιολογικού ορού (saline) (0,9% w/v NaCl): Το διάλυμα αποθηκεύεται σε RT.

Πειραματική πορεία-Μελέτη της επίδρασης των εκχυλισμάτων Echinacea purpurea στην επαγόμενη από το ADP, το TRAP-6 και το AA συσσώρευση των αιμοπεταλίων σε PRP

- Συλλέγονται 20mL περιφερικού φλεβικού αίματος σε σωληνάκια πολυπροπυλενίου, τα οποία περιέχουν αντιπηκτικό διάλυμα ACD σε αναλογία 1:9.
- 2) Ακολουθεί φυγοκέντρηση των δειγμάτων στα 126×g για 15min.
- 3) Συλλέγονται τα 2/3 του υπερκειμένου, το οποίο αποτελεί το PRP, και στη συνέχεια μεταφέρονται προσεκτικά σε άλλο σωληνάκι πολυπροπυλενίου. Μετράτε ο όγκος του PRP. Επίσης, κατά τη συλλογή του υπερκειμένου, είναι σημαντικό να μη γίνει ανάμειξη του PRP με το υποκείμενο στρώμα των λευκών ή των ερυθρών αιμοσφαιρίων.
- Ακολουθεί μια ακόμα φυγοκέντρηση των υπόλοιπων δειγμάτων στα 1500×g για 20min.
- 5) Συλλέγεται το υπόλοιπο υπερκείμενο, το οποίο αποτελεί το PPP (Platelet poor plasma) και στη συνέχεια μεταφέρεται προσεκτικά σε άλλο σωληνάκι πολυπροπυλενίου. Μετράτε ο όγκος του PPP. Επίσης, κατά τη μεταφορά, πάλι είναι σημαντικό να μη γίνει ανάμειξη του PPP με το υποκείμενο στρώμα των λευκών ή των ερυθρών αιμοσφαιρίων.
- 6) Μέτρηση αριθμού αιμοπεταλίων:
 - i. Γίνεται αραίωση του PRP σε 1% w/v (NH₄)₂C₂O₄ (1:20). Δηλαδή, σε ένα eppendorf προστίθενται 190µL οξαλικού αµµωνίου και 10µL PRP και αναδεύονται ελαφρά µε το χέρι µέχρι να διαλυθεί καλά όλη η ποσότητα του PRP στο οξαλικό αµµώνιο.
 - ii. Τοποθετούνται από 10µL του παραπάνω εναιωρήµατος σε κάθε εσοχή της πλάκας Neubauer, προσέχοντας η λήψη των 10µL να γίνεται από το κέντρο της ποσότητας του εναιωρήµατος και όχι από την επιφάνεια ή από τον πάτο.
 - iii. Γίνεται επώαση της πλάκας Neubauer σε τρυβλίο Petri για 15min. Η επώαση γίνεται σε υγρό περιβάλλον το οποίο επιτυγχάνεται με ένα μικρό κομμάτι βαμβάκι που βρέχεται και τοποθετείται στο τρυβλίο.

iv. Πραγματοποιείται μέτρηση των αιμοπεταλίων στην πλάκα Neubauer σε οπτικό μικροσκόπιο φωτεινού πεδίου (40X). Συγκεκριμένα, μετρούνται τα αιμοπετάλια σε 5 μεσαίου μεγέθους τετράγωνα της πλάκας Neubauer (στα 4 γωνιακά τετράγωνα και στο μεσαίο τετράγωνο). Ο αριθμός των αιμοπεταλίων υπολογίζεται με τον παρακάτω τύπο:

 $C_{plts} = άθροισμα αιμοπεταλίων στα 5 μεσαία τετράγωνα * 1000 plts/μL$

7) Με βάση τον αριθμό των αιμοπεταλίων που βρέθηκε από το βήμα 6, υπολογίζεται η ποσότητα του PPP με την οποία πρέπει να αραιωθεί το PRP, έτσι ώστε η τελική συγκέντρωση αιμοπεταλίων να είναι 250.000 αιμοπετάλια/μL.

$$C_{\alpha\rho\chi.} * V_{PRP} = C_{\tau\epsilon\lambda.} * (V_{PRP} + V_{PPP})$$

- 8) Άνοιγμα συσσωρευομέτρου μισή ώρα πριν τις μετρήσεις για να φτάσει η θερμοκρασία του οργάνου στους 37°C.
- 9) Σε γυάλινη κυψελίδα συσσώρευσης προστίθενται 500µL PPP και η κυψελίδα τοποθετείται στη θέση "PPP" του οργάνου. Το δείγµα αυτό δε φέρει µαγνητάκι και παραµένει στη θέση αυτή µέχρι να τελειώσει το πείραµα.
- 10) Χρησιμοποιούνται γυάλινες κυψελίδες συσσώρευσης με μαγνητάκια. Σε μια κυψελίδα προστίθεται PRP και ο διαλύτης των εκχυλισμάτων που είναι το νερό (δείγμα control) και σε μια άλλη κυψελίδα προστίθεται PRP και το εκάστοτε εκχύλισμα σε μια συγκεκριμένη συγκέντρωση. Οι κυψελίδες τοποθετούνται στις θέσεις "PRP" του οργάνου και γίνεται επώαση για 5min. Μετά το πέρας των 5min, γίνεται η προσθήκη των αγωνιστών (Πίνακας 7) και γίνεται άλλη μια επώαση για 5min. Ο τελικός όγκος σε κάθε κυψελίδα ισούται με 500 μL. Καταγράφονται οι καμπύλες συσσώρευσης των δειγμάτων και υπολογίζεται το ποσοστό της αναστολής της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων.

Πίνακας 7: Συγκεντρώσεις αγωνιστών.

Αγωνιστές	Συγκεντρώσεις αγωνιστών στις κυψελίδες	Αρχικά stock αγωνιστών
ADP	10µM	1mM
TRAP-6	10µM	5mM
AA	0,5mM	50mM

6. Αποτελέσματα

6.1 Μελέτη της επίδρασης εκχυλισμάτων Echinacea purpurea στην οξειδωτική τροποποίηση της LDL

Αρχικά, διερευνήθηκε η επίδραση των εκχυλισμάτων της Echinacea purpurea σε συγκεντρώσεις 5, 10, 15, 25, 40, 50, 100 και 200 μg/mL στην οξείδωση της LDL (100µg/mL), παρουσία CuSO4 (5µM) στους 37°C για 5h. Η παρακολούθηση της οξείδωσης για αυτές τις 5h μας δίνει μια σιγμοειδή καμπύλη της απορρόφησης των διενίων σε σχέση με τον χρόνο. Η καμπύλη αυτή έχει 3 φάσεις, τη λανθάνουσα, την παραγωγική και τη φάση αποικοδόμησης. Κάθε φάση χαρακτηρίζεται από μια παράμετρο που είναι ο λανθάνων χρόνος για τη λανθάνουσα φάση, ο μέγιστος ρυθμός παραγωγής συζυγών διενίων για την παραγωγική φάση και ο συνολικός αριθμός των συζυγών διενίων που σχηματίζονται κατά τη φάση αποικοδόμησης. Ο υπολογισμός του λανθάνοντος χρόνου γίνεται με το σχεδιασμό της εφαπτομένης στη σιγμοειδή καμπύλη. Το σημείο στο οποίο η εφαπτομένη τέμνει τον άξονα του χρόνου είναι η τιμή του λανθάνοντος χρόνου. Ο ρυθμός παραγωγής διενίων υπολογίζεται από τον τύπο $[(A_2 - A_1)/(t_2 - t_1)]^*x$, όπου A_1 , A_2 είναι η αρχική και τελική απορρόφηση της παραγωγικής φάσης, όπου t1, t2, είναι οι αντίστοιχοι χρόνοι και όπου x είναι ο συντελεστής μοριακής απορρόφησης των συζυγών διενίων στα 234nm, που ισούται με x=29500 l/mol/cm. Επιπλέον, ο συνολικός αριθμός των συζυγών διενίων που σχηματίζονται κατά τη φάση αποικοδόμησης υπολογίζεται από τον τύπο A2*x, όπου A2 είναι η τελική απορρόφηση και x είναι ο συντελεστής μοριακής απορρόφησης των συζυγών διενίων.

Παρακάτω παρουσιάζονται πίνακες με τα ποσοστά αναστολής της οξείδωσης της LDL για τις διάφορες συγκεντρώσεις των εκχυλισμάτων (Πίνακας 8) και με τις τιμές threshold και IC₅₀ των εκχυλισμάτων (Πίνακας 9). Επιπλέον, παρουσιάζονται αντιπροσωπευτικά διαγράμματα για καθένα από τα εκχυλίσματα, που δείχνουν πώς το κάθε εκχύλισμα σε διάφορες συγκεντρώσεις αναστέλει την οξείδωση της LDL (Εικόνες 29-32). Ακόμα, παρουσιάζεται πίνακας με το λανθάνοντα χρόνο, το ρυθμό παραγωγής συζυγών διενίων για την παραγωγική φάση και το συνολικό αριθμό των συζυγών διενίων που σχηματίζονται κατά τη φάση αποικοδόμησης της σιγμοειδούς καμπύλης οξείδωσης των εκχυλισμάτων (Πίνακας 10, 11).

Fahingaag	% Αναστολή της οξείδωσης της LDL								
Echinacea	200	100	50	40	25	15	10	5	
purpurea	µg/mL	µg/mL	µg/mL	µg/mL	µg/mL	µg/mL	µg/mL	µg/mL	
Υδατικό	100+0	100±0	99,50	98,75	91,75	0+0	0+0	0+0	
εκχύλισμα	100±0	100±0	±1	±2,50	±5,56	0±0	0±0	0±0	
Υδατικό									
εκχύλισμα	96,67	97	97,67	99	91	88,33	010	010	
μετά από	±3,06	$\pm 5,20$	±2,52	±1,73	±6,56	±16,07	0±0	0±0	
ρητίνη XAD-7									
Υδραλκολικό	100	0712	93,75	96,80	010	0+0	010	010	
εκχύλισμα	± 0	9/±2	±4,99	±1,71	0±0	0±0	0±0	0±0	
Υδραλκολικό									
εκχύλισμα	96,67	06+4	96,25	97,50	97	97,33	87,33	28	
μετά από	±4,16	90±4	±2,63	±1,73	± 0	±1,53	±4,93	$\pm 8,54$	
ρητίνη XAD-7									

Πίνακας 8: Ποσοστά αναστολής της οξείδωσης της LDL για διάφορες συγκεντρώσεις των εκχυλισμάτων Echinacea purpurea.

Πίνακας 9: Συγκεντρώσεις Threshold και IC₅₀ των εκχυλισμάτων Echinacea purpurea.

Echinacea purpurea	Threshold (µg/mL)	IC50 (µg/mL)
Υδατικό εκχύλισμα	25	21,95
Υδατικό εκχύλισμα μετά από ρητίνη XAD-7	15	13,41
Υδραλκολικό εκχύλισμα	40	32,12
Υδραλκολικό εκχύλισμα μετά από ρητίνη XAD-7	10	9,03



Εικόνα 29: Αντιπροσωπευτικές σιγμοειδείς καμπύλες του υδατικού εκχυλίσματος, το οποίο σε διάφορες συγκεντρώσεις αναστέλει την οξείδωση της LDL.



Εικόνα 30: Αντιπροσωπευτικές σιγμοειδείς καμπύλες του υδατικού εκχυλίσματος μετά από ρητίνη XAD-7, το οποίο σε διάφορες συγκεντρώσεις αναστέλει την οξείδωση της LDL.



Εικόνα 31: Αντιπροσωπευτικές σιγμοειδείς καμπύλες του υδραλκολικού εκχυλίσματος, το οποίο σε διάφορες συγκεντρώσεις αναστέλει την οξείδωση της LDL.



Εικόνα 32: Αντιπροσωπευτικές σιγμοειδείς καμπύλες του υδραλκολικού εκχυλίσματος μετά από ρητίνη XAD-7, το οποίο σε διάφορες συγκεντρώσεις αναστέλει την οξείδωση της LDL.

Πίνακας 10: Λανθάνων χρόνος, ρυθμός παραγωγής συζυγών διενίων για την παραγωγική φάση και συνολικός αριθμός συζυγών διενίων που σχηματίζονται κατά τη φάση αποικοδόμησης της σιγμοειδούς καμπύλης οξείδωσης των εκχυλισμάτων.

	Υδ εκχί	ατικό λισμα	Υδατικό : μετά απ ΧΑ	εκχύλισμα ό ρητίνη D-7	Υδραλκολικό εκχύλισμα		Υδραλκολικό εκχύλισμα μετά από ρητίνη XAD-7	
	10 μg/mL	5 μg/mL	10 μg/mL	5 μg/mL	25 μg/mL	10 μg/mL	5 μg/mL	5 μg/mL
Λανθάνων χρόνος (min)	112,35 ± 63,8	91,09 ± 39,86	144,47 ± 15,18	89,66 ± 18,23	92,19 ± 41,73	115,3 ± 58,12	96,02 ± 39,57	93,85 ± 23,47
Αριθμός διενίων (nmol διενίων/ mg LDL)	846,67 ± 2,71	813,32± 62,82	780,38 ± 4,2	850,98 ± 5,75	859,18 ± 28,57	808,2 ± 102,68	852,32 ± 46,29	751,99 ± 124,35
Ρυθμός διενίων (nmol διενίων/ mg LDL/ min)	5,98 ± 1,43	6,94 ± 0,45	4,41 ± 0,91	6,17 ± 0,28	4,87 ± 0,23	6,73 ± 0,93	6,83 ± 1,17	6,27 ± 1,04

Πίνακας 11: Λανθάνων χρόνος, ρυθμός παραγωγής συζυγών διενίων για την παραγωγική φάση και συνολικός αριθμός συζυγών διενίων που σχηματίζονται κατά τη φάση αποικοδόμησης της σιγμοειδούς καμπύλης οξείδωσης της LDL.

	Control (LDL)
	100 μg/mL
Λανθάνων χρόνος (min)	$74,36 \pm 5,99$
Αριθμός διενίων	915 22 + 52 70
(nmol διενίων/ mg LDL)	$813,23 \pm 32,70$
Ρυθμός διενίων	7 12 + 1 50
(nmol διενίων/ mg LDL/ min)	7,15 ± 1,59

6.2 Μελέτη της επίδρασης εκχυλισμάτων *Echinacea purpurea* στη μεμβρανική έκφραση του ICAM-1 σε καλλιέργεια κυττάρων HUVECs με κυτταρομετρία ροής

Αρχικά, διερευνήθηκε η επίδραση των εκχυλισμάτων της Echinacea purpurea σε συγκεντρώσεις 50, 100 και 200 μg/mL στη μεμβρανική έκφραση του μορίου προσκόλλησης ICAM-1 σε καλλιέργεια ενδοθηλιακών κυττάρων HUVECs. Κύτταρα HUVECs, σε καλλιέργεια, προεπωάστηκαν για 1h με διάφορες συγκεντρώσεις των εκχυλισμάτων και ενεργοποιήθηκαν με TNF-α (0,5ng/mL) για 6h. Στη συνέχεια, η ανασταλτική δράση των εκχυλισμάτων στην έκφραση του ICAM-1 (CD54) υπολογίστηκε με κυτταρομετρία ροής, χρησιμοποιώντας τη μέση ένταση φθορισμού (MFI) του φθορισμένου μονοκλωνικού αντισώματος anti-CD54 PE. Χρησιμοποιήθηκε ο παρακάτω τύπος:

% αναστολή της έκφρασης του ICAM – 1 =
$$\frac{(MFI_{Activated} - MFI_{Resting}) - (MFI_{Ek\chi \upsilon \lambda i σ \mu \alpha \tau \sigma \varsigma} - MFI_{Resting})}{(MFI_{Activated} - MFI_{Resting})}$$

Όπου MFI_{Activated} είναι η μέση ένταση φθορισμού του μονοκλωνικού αντισώματος anti-CD54 PE των κυττάρων HUVECs τα οποία έχουν ενεργοποιηθεί με TNF-α, αλλά δεν έχει γίνει επίδραση με κάποιο εκχύλισμα (control), MFI_{Resting} είναι η μέση ένταση φθορισμού του μονοκλωνικού αντισώματος anti-CD54 PE των κυττάρων HUVECs τα οποία δεν έχουν ενεργοποιηθεί με TNF-α και δεν έχει γίνει επίδραση με κάποιο εκχύλισμα (control) και MFI_{Eκχυλίσματος} είναι η μέση ένταση φθορισμού του μονοκλωνικού αντισώματος anti-CD54 PE των κυττάρων HUVECs τα οποία έχουν ενεργοποιηθεί με TNF-α και έχει γίνει επίδραση με κάποιο εκχύλισμα.

Παρακάτω παρουσιάζονται πίνακας και διάγραμμα με τα ποσοστά αναστολής της έκφρασης του ICAM-1 για τις διάφορες συγκεντρώσεις των εκχυλισμάτων (Πίνακας 12, Εικόνα 33). Επιπλέον, παρουσιάζονται αντιπροσωπευτικά σημειακά γραφήματα κυτταροδιαγράμματος, ιστογράμματα έντασης φθορισμού και ισομετρικά διαγράμματα του κυτταρομετρικού προφίλ των ενδοθηλιακών κυττάρων HUVECs. Επίσης, τα πειράματα έγιναν σε κύτταρα HUVECs 4^{ης} και 5^{ης} γενιάς.

Echinacoa nurnuroa	% Αναστολή της έκφρασης του ΙCAM-1				
Ecninacea parparea	50 μg/mL	100 µg/mL	200 µg/mL		
Υδατικό εκχύλισμα	11,50±7,78	9,50±4,95	28,50±3,54		
Υδατικό εκχύλισμα μετά από ρητίνη XAD-7	24,00±2,83	11,00±7,07	12,50±0,71		
Υδραλκολικό εκχύλισμα	9,50±3,54	0±0	8,50±12,02		
Υδραλκολικό εκχύλισμα μετά από ρητίνη XAD-7	5,00±1,41	7,50±0,71	2,50±0,71		

Πίνακας 12: Ποσοστά αναστολής της μεμβρανικής έκφρασης του ICAM-1 για διάφορες συγκεντρώσεις των εκχυλισμάτων *Echinacea purpurea*.



Εικόνα 33: Η επίδραση των εκχυλισμάτων *Echinacea purpurea* σε συγκεντρώσεις 50, 100 και 200 μg/mL στη μεμβρανική έκφραση του ICAM-1. Τα ποσοστά αναστολής της έκφρασης του ICAM-1 εκφράζονται ως μέσος όρος ± τυπική απόκλιση 3 ανεξάρτητων πειραμάτων.

Επιπλέον, για να δούμε την επίδραση των εκχυλισμάτων στα κύτταρα απουσία ενεργοποίησης, έγινε προ-επώαση των κυττάρων με τα εκχυλίσματα στις συγκεντρώσεις 50, 100 και 200μg/mL για 1h και κατά την κυτταρομετρική ανάλυση, διαπιστώθηκε ότι μόνα τους τα εκχυλίσματα δεν έχουν επίδραση στα κύτταρα.

Στις εικόνες 34-38 παρουσιάζεται ένα αντιπροσωπευτικό πείραμα καλλιέργειας κυττάρων HUVECs με τις εξής 5 συνθήκες: κύτταρα HUVECs στα οποία ούτε έχει γίνει επίδραση με εκχύλισμα ούτε έχουν ενεργοποιηθεί με TNF-α (Resting), κύτταρα HUVECs στα οποία δεν έχει γίνει επίδραση με εκχύλισμα, αλλά έχουν ενεργοποιηθεί με TNF-α (Activated), κύτταρα HUVECs τα οποία προεπωάστηκαν με το υδατικό εκχύλισμα σε συγκέντρωση 50 μg/mL και στη συνέχεια ενεργοποιήθηκαν με TNF-α, κύτταρα HUVECs τα οποία προεπωάστηκαν με το υδατικό εκχύλισμα σε συγκέντρωση 100 μg/mL και στη συνέχεια ενεργοποιήθηκαν με TNF-α και κύτταρα HUVECs τα οποία προεπωάστηκαν με το υδατικό εκχύλισμα σε συγκέντρωση 50 μg/mL και στη συνέχεια ενεργοποιήθηκαν με TNF-α, κύτταρα HUVECs τα οποία προεπωάστηκαν με το υδατικό εκχύλισμα σε συγκέντρωση 100 μg/mL και στη συνέχεια ενεργοποιήθηκαν με TNF-α και κύτταρα HUVECs τα οποία προεπωάστηκαν με το υδατικό εκχύλισμα σε συγκέντρωση 200 μg/mL και στη συνέχεια ενεργοποιήθηκαν με TNF-α.



Εικόνα 34: Α) Αντιπροσωπευτικό σημειακό γράφημα κυτταροδιαγράμματος των HUVECs. B) και Γ) Αντιπροσωπευτικά ιστογράμματα έντασης φθορισμού των φθορισμένων μονοκλωνικών αντισωμάτων CD31 και CD54, αντίστοιχα. Δ) Αντιπροσωπευτικό ισομετρικό διάγραμμα του κυτταρομετρικού προφίλ των HUVECs, το οποίο δείχνει την έκφραση των CD31⁺/CD54⁺ κυττάρων στο πάνω δεξιά τεταρτημόριο (% Gated UR).



Εικόνα 35: Α) Αντιπροσωπευτικό σημειακό γράφημα κυτταροδιαγράμματος των HUVECs. B) και Γ) Αντιπροσωπευτικά ιστογράμματα έντασης φθορισμού των φθορισμένων μονοκλωνικών αντισωμάτων CD31 και CD54, αντίστοιχα. Δ) Αντιπροσωπευτικό ισομετρικό διάγραμμα του κυτταρομετρικού προφίλ των HUVECs, το οποίο δείχνει την έκφραση των CD31⁺/CD54⁺ κυττάρων στο πάνω δεξιά τεταρτημόριο (% Gated UR).



Εικόνα 36: Α) Αντιπροσωπευτικό σημειακό γράφημα κυτταροδιαγράμματος των HUVECs. B) και Γ) Αντιπροσωπευτικά ιστογράμματα έντασης φθορισμού των φθορισμένων μονοκλωνικών αντισωμάτων CD31 και CD54, αντίστοιχα. Δ) Αντιπροσωπευτικό ισομετρικό διάγραμμα του κυτταρομετρικού προφίλ των HUVECs, το οποίο δείχνει την έκφραση των CD31⁺/CD54⁺ κυττάρων στο πάνω δεξιά τεταρτημόριο (% Gated UR).



Εικόνα 37: Α) Αντιπροσωπευτικό σημειακό γράφημα κυτταροδιαγράμματος των HUVECs. B) και Γ) Αντιπροσωπευτικά ιστογράμματα έντασης φθορισμού των φθορισμένων μονοκλωνικών αντισωμάτων CD31 και CD54, αντίστοιχα. Δ) Αντιπροσωπευτικό ισομετρικό διάγραμμα του κυτταρομετρικού προφίλ των HUVECs, το οποίο δείχνει την έκφραση των CD31⁺/CD54⁺ κυττάρων στο πάνω δεξιά τεταρτημόριο (% Gated UR).



Εικόνα 38: Α) Αντιπροσωπευτικό σημειακό γράφημα κυτταροδιαγράμματος των HUVECs. B) και Γ) Αντιπροσωπευτικά ιστογράμματα έντασης φθορισμού των φθορισμένων μονοκλωνικών αντισωμάτων CD31 και CD54, αντίστοιχα. Δ) Αντιπροσωπευτικό ισομετρικό διάγραμμα του κυτταρομετρικού προφίλ των HUVECs, το οποίο δείχνει την έκφραση των CD31⁺/CD54⁺ κυττάρων στο πάνω δεξιά τεταρτημόριο (% Gated UR).

Στις εικόνες 39-43 παρουσιάζεται ένα αντιπροσωπευτικό πείραμα καλλιέργειας κυττάρων HUVECs με τις εξής 5 συνθήκες: κύτταρα HUVECs στα οποία ούτε έχει γίνει επίδραση με εκχύλισμα ούτε έχουν ενεργοποιηθεί με TNF-α (Resting), κύτταρα HUVECs στα οποία δεν έχει γίνει επίδραση με εκχύλισμα, αλλά έχουν ενεργοποιηθεί με TNF-α (Activated), κύτταρα HUVECs τα οποία προεπωάστηκαν με το υδατικό εκχύλισμα μετά από ρητίνη XAD-7 σε συγκέντρωση 50 μg/mL και στη συνέχεια ενεργοποιήθηκαν με TNF-α και κύτταρα HUVECs τα οποία προεπωάστηκαν με το υδατικό εκχύλισμα μετά από ρητίνη XAD-7 σε συγκέντρωση 100 μg/mL και στη συνέχεια ενεργοποιήθηκαν με TNF-α και κύτταρα HUVECs τα οποία προεπωάστηκαν με το υδατικό εκχύλισμα μετά από ρητίνη XAD-7 σε συγκέντρωση 200 μg/mL και στη συνέχεια ενεργοποιήθηκαν με TNF-α και κύτταρα HUVECs τα οποία προεπωάστηκαν με το υδατικό εκχύλισμα μετά από ρητίνη XAD-7 σε συγκέντρωση 200 μg/mL και στη συνέχεια ενεργοποιήθηκαν με TNF-α και κύτταρα HUVECs τα οποία προεπωάστηκαν με το υδατικό εκχύλισμα μετά από ρητίνη XAD-7 σε συγκέντρωση 100 μg/mL και στη συνέχεια ενεργοποιήθηκαν με TNF-α και κύτταρα HUVECs τα οποία προεπωάστηκαν με το υδατικό εκχύλισμα μετά από ρητίνη XAD-7 σε συγκέντρωση 100 μg/mL και στη συνέχεια ενεργοποιήθηκαν με TNF-α και κύτταρα HUVECs τα οποία προεπωάστηκαν με το υδατικό εκχύλισμα μετά από ρητίνη XAD-7 σε συγκέντρωση 200 μg/mL και στη συνέχεια ενεργοποιήθηκαν με TNF-α και κύτταρα HUVECs τα οποία προεπωάστηκαν με το υδατικό εκχύλισμα μετά από ρητίνη XAD-7 σε συγκέντρωση 200 μg/mL και στη συνέχεια ενεργοποιήθηκαν με TNF-α.



Εικόνα 39: Α) Αντιπροσωπευτικό σημειακό γράφημα κυτταροδιαγράμματος των HUVECs. B) και Γ) Αντιπροσωπευτικά ιστογράμματα έντασης φθορισμού των φθορισμένων μονοκλωνικών αντισωμάτων CD31 και CD54, αντίστοιχα. Δ) Αντιπροσωπευτικό ισομετρικό διάγραμμα του κυτταρομετρικού προφίλ των HUVECs, το οποίο δείχνει την έκφραση των CD31⁺/CD54⁺ κυττάρων στο πάνω δεξιά τεταρτημόριο (% Gated UR).



Εικόνα 40: Α) Αντιπροσωπευτικό σημειακό γράφημα κυτταροδιαγράμματος των HUVECs. B) και Γ) Αντιπροσωπευτικά ιστογράμματα έντασης φθορισμού των φθορισμένων μονοκλωνικών αντισωμάτων CD31 και CD54, αντίστοιχα. Δ) Αντιπροσωπευτικό ισομετρικό διάγραμμα του κυτταρομετρικού προφίλ των HUVECs, το οποίο δείχνει την έκφραση των CD31⁺/CD54⁺ κυττάρων στο πάνω δεξιά τεταρτημόριο (% Gated UR).



Εικόνα 41: Α) Αντιπροσωπευτικό σημειακό γράφημα κυτταροδιαγράμματος των HUVECs. B) και Γ) Αντιπροσωπευτικά ιστογράμματα έντασης φθορισμού των φθορισμένων μονοκλωνικών αντισωμάτων CD31 και CD54, αντίστοιχα. Δ) Αντιπροσωπευτικό ισομετρικό διάγραμμα του κυτταρομετρικού προφίλ των HUVECs, το οποίο δείχνει την έκφραση των CD31⁺/CD54⁺ κυττάρων στο πάνω δεξιά τεταρτημόριο (% Gated UR).



Εικόνα 42: Α) Αντιπροσωπευτικό σημειακό γράφημα κυτταροδιαγράμματος των HUVECs. B) και Γ) Αντιπροσωπευτικά ιστογράμματα έντασης φθορισμού των φθορισμένων μονοκλωνικών αντισωμάτων CD31 και CD54, αντίστοιχα. Δ) Αντιπροσωπευτικό ισομετρικό διάγραμμα του κυτταρομετρικού προφίλ των HUVECs, το οποίο δείχνει την έκφραση των CD31⁺/CD54⁺ κυττάρων στο πάνω δεξιά τεταρτημόριο (% Gated UR).



Εικόνα 43: Α) Αντιπροσωπευτικό σημειακό γράφημα κυτταροδιαγράμματος των HUVECs. B) και Γ) Αντιπροσωπευτικά ιστογράμματα έντασης φθορισμού των φθορισμένων μονοκλωνικών αντισωμάτων CD31 και CD54, αντίστοιχα. Δ) Αντιπροσωπευτικό ισομετρικό διάγραμμα του κυτταρομετρικού προφίλ των HUVECs, το οποίο δείχνει την έκφραση των CD31⁺/CD54⁺ κυττάρων στο πάνω δεξιά τεταρτημόριο (% Gated UR).

Στις εικόνες 44-48 παρουσιάζεται ένα αντιπροσωπευτικό πείραμα καλλιέργειας κυττάρων HUVECs με τις εξής 5 συνθήκες: κύτταρα HUVECs στα οποία ούτε έχει γίνει επίδραση με εκχύλισμα ούτε έχουν ενεργοποιηθεί με TNF-α (Resting), κύτταρα HUVECs στα οποία δεν έχει γίνει επίδραση με εκχύλισμα, αλλά έχουν ενεργοποιηθεί με TNF-α (Activated), κύτταρα HUVECs τα οποία προεπωάστηκαν με το υδραλκολικό εκχύλισμα σε συγκέντρωση 50 μg/mL και στη συνέχεια ενεργοποιήθηκαν με TNF-α, κύτταρα HUVECs τα οποία προεπωάστηκαν με το υδραλκολικό εκχύλισμα σε συγκέντρωση 100 μg/mL και στη συνέχεια ενεργοποιήθηκαν με TNF-α και κύτταρα HUVECs τα οποία προεπωάστηκαν με TNF-α και κύτταρα 200 μg/mL και στη συνέχεια ενεργοποιήθηκαν με TNF-α.



Εικόνα 44: Α) Αντιπροσωπευτικό σημειακό γράφημα κυτταροδιαγράμματος των HUVECs. B) και Γ) Αντιπροσωπευτικά ιστογράμματα έντασης φθορισμού των φθορισμένων μονοκλωνικών αντισωμάτων CD31 και CD54, αντίστοιχα. Δ) Αντιπροσωπευτικό ισομετρικό διάγραμμα του κυτταρομετρικού προφίλ των HUVECs, το οποίο δείχνει την έκφραση των CD31⁺/CD54⁺ κυττάρων στο πάνω δεξιά τεταρτημόριο (% Gated UR).



Εικόνα 45: Α) Αντιπροσωπευτικό σημειακό γράφημα κυτταροδιαγράμματος των HUVECs. B) και Γ) Αντιπροσωπευτικά ιστογράμματα έντασης φθορισμού των φθορισμένων μονοκλωνικών αντισωμάτων CD31 και CD54, αντίστοιχα. Δ) Αντιπροσωπευτικό ισομετρικό διάγραμμα του κυτταρομετρικού προφίλ των HUVECs, το οποίο δείχνει την έκφραση των CD31⁺/CD54⁺ κυττάρων στο πάνω δεξιά τεταρτημόριο (% Gated UR).



Εικόνα 46: Α) Αντιπροσωπευτικό σημειακό γράφημα κυτταροδιαγράμματος των HUVECs. B) και Γ) Αντιπροσωπευτικά ιστογράμματα έντασης φθορισμού των φθορισμένων μονοκλωνικών αντισωμάτων CD31 και CD54, αντίστοιχα. Δ) Αντιπροσωπευτικό ισομετρικό διάγραμμα του κυτταρομετρικού προφίλ των HUVECs, το οποίο δείχνει την έκφραση των CD31⁺/CD54⁺ κυττάρων στο πάνω δεξιά τεταρτημόριο (% Gated UR).



Εικόνα 47: Α) Αντιπροσωπευτικό σημειακό γράφημα κυτταροδιαγράμματος των HUVECs. B) και Γ) Αντιπροσωπευτικά ιστογράμματα έντασης φθορισμού των φθορισμένων μονοκλωνικών αντισωμάτων CD31 και CD54, αντίστοιχα. Δ) Αντιπροσωπευτικό ισομετρικό διάγραμμα του κυτταρομετρικού προφίλ των HUVECs, το οποίο δείχνει την έκφραση των CD31⁺/CD54⁺ κυττάρων στο πάνω δεξιά τεταρτημόριο (% Gated UR).



Εικόνα 48: Α) Αντιπροσωπευτικό σημειακό γράφημα κυτταροδιαγράμματος των HUVECs. B) και Γ) Αντιπροσωπευτικά ιστογράμματα έντασης φθορισμού των φθορισμένων μονοκλωνικών αντισωμάτων CD31 και CD54, αντίστοιχα. Δ) Αντιπροσωπευτικό ισομετρικό διάγραμμα του κυτταρομετρικού προφίλ των HUVECs, το οποίο δείχνει την έκφραση των CD31⁺/CD54⁺ κυττάρων στο πάνω δεξιά τεταρτημόριο (% Gated UR).

Στις εικόνες 49-53 παρουσιάζεται ένα αντιπροσωπευτικό πείραμα καλλιέργειας κυττάρων HUVECs με τις εξής 5 συνθήκες: κύτταρα HUVECs στα οποία ούτε έχει γίνει επίδραση με εκχύλισμα ούτε έχουν ενεργοποιηθεί με TNF-α (Resting), κύτταρα HUVECs στα οποία δεν έχει γίνει επίδραση με εκχύλισμα, αλλά έχουν ενεργοποιηθεί με TNF-α (Activated), κύτταρα HUVECs τα οποία προεπωάστηκαν με το υδραλκολικό εκχύλισμα μετά από ρητίνη XAD-7 σε συγκέντρωση 50 μg/mL και στη συνέχεια ενεργοποιήθηκαν με TNF-α, κύτταρα HUVECs τα οποία προεπωάστηκαν με το υδραλκολικό εκχύλισμα μετά από ρητίνη XAD-7 σε συγκέντρωση 100 μg/mL και στη συνέχεια ενεργοποιήθηκαν με TNF-α και κύτταρα HUVECs τα οποία προεπωάστηκαν με το υδραλκολικό εκχύλισμα μετά από ρητίνη XAD-7 σε συγκέντρωση 200 μg/mL και στη συνέχεια ενεργοποιήθηκαν με TNF-α και κύτταρα HUVECs τα οποία προεπωάστηκαν με το υδραλκολικό εκχύλισμα μετά από ρητίνη XAD-7 σε συγκέντρωση 200 μg/mL και στη συνέχεια ενεργοποιήθηκαν με TNF-α και κύτταρα HUVECs τα οποία προεπωάστηκαν με το υδραλκολικό εκχύλισμα μετά από ρητίνη XAD-7 σε συγκέντρωση 200 μg/mL και στη συνέχεια ενεργοποιήθηκαν με TNF-α και κύτταρα HUVECs τα οποία προεπωάστηκαν με το υδραλκολικό εκχύλισμα μετά από ρητίνη XAD-7 σε συγκέντρωση 200 μg/mL



Εικόνα 49: Α) Αντιπροσωπευτικό σημειακό γράφημα κυτταροδιαγράμματος των HUVECs. B) και Γ) Αντιπροσωπευτικά ιστογράμματα έντασης φθορισμού των φθορισμένων μονοκλωνικών αντισωμάτων CD31 και CD54, αντίστοιχα. Δ) Αντιπροσωπευτικό ισομετρικό διάγραμμα του κυτταρομετρικού προφίλ των HUVECs, το οποίο δείχνει την έκφραση των CD31⁺/CD54⁺ κυττάρων στο πάνω δεξιά τεταρτημόριο (% Gated UR).



Εικόνα 50: Α) Αντιπροσωπευτικό σημειακό γράφημα κυτταροδιαγράμματος των HUVECs. B) και Γ) Αντιπροσωπευτικά ιστογράμματα έντασης φθορισμού των φθορισμένων μονοκλωνικών αντισωμάτων CD31 και CD54, αντίστοιχα. Δ) Αντιπροσωπευτικό ισομετρικό διάγραμμα του κυτταρομετρικού προφίλ των HUVECs, το οποίο δείχνει την έκφραση των CD31⁺/CD54⁺ κυττάρων στο πάνω δεξιά τεταρτημόριο (% Gated UR).



Εικόνα 51: Α) Αντιπροσωπευτικό σημειακό γράφημα κυτταροδιαγράμματος των HUVECs. B) και Γ) Αντιπροσωπευτικά ιστογράμματα έντασης φθορισμού των φθορισμένων μονοκλωνικών αντισωμάτων CD31 και CD54, αντίστοιχα. Δ) Αντιπροσωπευτικό ισομετρικό διάγραμμα του κυτταρομετρικού προφίλ των HUVECs, το οποίο δείχνει την έκφραση των CD31⁺/CD54⁺ κυττάρων στο πάνω δεξιά τεταρτημόριο (% Gated UR).



Εικόνα 52: Α) Αντιπροσωπευτικό σημειακό γράφημα κυτταροδιαγράμματος των HUVECs. B) και Γ) Αντιπροσωπευτικά ιστογράμματα έντασης φθορισμού των φθορισμένων μονοκλωνικών αντισωμάτων CD31 και CD54, αντίστοιχα. Δ) Αντιπροσωπευτικό ισομετρικό διάγραμμα του κυτταρομετρικού προφίλ των HUVECs, το οποίο δείχνει την έκφραση των CD31⁺/CD54⁺ κυττάρων στο πάνω δεξιά τεταρτημόριο (% Gated UR).



Εικόνα 53: Α) Αντιπροσωπευτικό σημειακό γράφημα κυτταροδιαγράμματος των HUVECs. B) και Γ) Αντιπροσωπευτικά ιστογράμματα έντασης φθορισμού των φθορισμένων μονοκλωνικών αντισωμάτων CD31 και CD54, αντίστοιχα. Δ) Αντιπροσωπευτικό ισομετρικό διάγραμμα του κυτταρομετρικού προφίλ των HUVECs, το οποίο δείχνει την έκφραση των CD31⁺/CD54⁺ κυττάρων στο πάνω δεξιά τεταρτημόριο (% Gated UR).

6.3 Μελέτη της επίδρασης εκχυλισμάτων Echinacea purpurea στην ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων σε PRP με συσσωρευομετρία οπτικής διαπερατότητας

Αρχικά, διερευνήθηκε η επίδραση των εκχυλισμάτων της Echinacea purpurea σε συγκέντρωση 200 μg/mL στην ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων. Μελετήθηκε η ανασταλτική δράση των εκχυλισμάτων αυτών στην επαγόμενη από το αραχιδονικό οξύ (AA), το ADP και το TRAP-6 αιμοπεταλιακή συσσώρευση σε PRP. Χρησιμοποιήθηκε ο παρακάτω τύπος:



Όπου control δείγμα είναι το δείγμα το οποίο στη κυψελίδα αντί για το εκχύλισμα περιέχει το διαλύτη του εκχυλίσματος (νερό). Τα ποσοστά συσσώρευσης των αιμοπεταλίων βρίσκονται από τις καμπύλες συσσώρευσης του συσσωρευομέτρου.

Παρακάτω παρουσιάζεται πίνακας και διάγραμμα με τα ποσοστά αναστολής της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης για τα εκχυλίσματα *Echinacea purpurea* (Πίνακας 13, Εικόνα 54). Επιπλέον, παρουσιάζονται αντιπροσωπευτικές καμπύλες συσσώρευσης για τα εκχυλίσματα και με τους 3 αγωνιστές που χρησιμοποιήθηκαν για την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων (Εικόνες 55-57).

Echinacea purpurea	% Αναστολή της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων				
	AA (0,5mM)	ADP (10μM)	TRAP-6 (10μM)		
Υδατικό εκχύλισμα (200μg/mL)	31,34±2,82	8,84±1,49	13,63±1,15		
Υδατικό εκχύλισμα μετά από ρητίνη XAD-7 (200μg/mL)	31,47±6,22	3,32±1,58	22,35±6,40		
Υδραλκολικό εκχύλισμα (200μg/mL)	15,35±3,26	14,93±0,90	16,41±0,90		
Υδραλκολικό εκχύλισμα μετά από ρητίνη XAD-7 (200μg/mL)	18,23±0,35	4,75±1,05	11,91±0,04		

Πίνακας 13: Ποσοστά αναστολής της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης για διάφορες συγκεντρώσεις των εκχυλισμάτων *Echinacea purpurea*.



Εικόνα 54: Η επίδραση των εκχυλισμάτων Echinacea purpurea (200µg/mL) στη συσσώρευση των αιμοπεταλίων με αγωνιστές το AA (0,5mM), το ADP (10µM) και το TRAP-6 (10µM). Τα ποσοστά αναστολής της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων εκφράζονται ως μέσος όρος \pm τυπική απόκλιση 3 ανεξάρτητων πειραμάτων (p<0,05 σε σύγκριση με το control).



Εικόνα 55: Ενδεικτικές καμπύλες συσσώρευσης των αιμοπεταλίων τα οποία είναι ενεργοποιημένα με ΑΑ. Μπλε καμπύλη: control, μαύρη καμπύλη: υδατικό εκχύλισμα, κόκκινη καμπύλη: υδατικό εκχύλισμα μετά από ρητίνη XAD-7, πράσινη καμπύλη: υδραλκολικό εκχύλισμα.



Εικόνα 56: Ενδεικτικές καμπύλες συσσώρευσης των αιμοπεταλίων τα οποία είναι ενεργοποιημένα με ADP. Μπλε καμπύλη: control, μαύρη καμπύλη: υδατικό εκχύλισμα, κόκκινη καμπύλη: υδατικό εκχύλισμα μετά από ρητίνη XAD-7, πράσινη καμπύλη: υδραλκολικό εκχύλισμα.



Εικόνα 57: Ενδεικτικές καμπύλες συσσώρευσης των αιμοπεταλίων τα οποία είναι ενεργοποιημένα με TRAP-6. Μπλε καμπύλη: control, μαύρη καμπύλη: υδατικό εκχύλισμα, κόκκινη καμπύλη: υδατικό εκχύλισμα μετά από ρητίνη XAD-7, πράσινη καμπύλη: υδραλκολικό εκχύλισμα.

6.4 Μελέτη της επίδρασης του ροσμαρινικού οξέος και του γαλλικού οξέος στην οξειδωτική τροποποίηση της LDL και στη μεμβρανική έκφραση του ICAM-1 σε καλλιέργεια κυττάρων HUVECs

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, το κυριότερο συστατικό των υπό διερεύνηση εκχυλισμάτων βρέθηκε ότι είναι το ροσμαρινικό οξύ. Για το λόγο αυτό, διερευνήθηκε η επίδραση του ροσμαρινικού οξέος σε συγκεντρώσεις 1-10µg/mL στην οξείδωση της LDL (100µg/mL), παρουσία CuSO₄ (5µM) στους 37°C για 5h υπό συνεχή καταγραφή της καμπύλης οξείδωσης. Υπολογίστηκε η ελάχιστη συγκέντρωση με την μέγιστη ανασταλτική δράση (Threshold) και το ήμισυ της μέγιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης (IC₅₀) (Πίνακας 14).

Επίσης, όπως αναφέρθηκε παραπάνω, έγινε προσδιορισμός του συνόλου των φαινολικών ουσιών των υπό διερεύνηση εκχυλισμάτων, οι οποίες σύμφωνα με την μεθοδολογία που ακολουθήθηκε εκφράστηκαν σε ισοδύναμα γαλλικού οξέος. Για το λόγο αυτό, διερευνήθηκε η επίδραση του γαλλικού οξέος σε συγκεντρώσεις 1-

10µg/mL στην οξείδωση της LDL (100µg/mL), παρουσία CuSO₄ (5µM) στους 37°C για 5h υπό συνεχή καταγραφή της καμπύλης οξείδωσης. Υπολογίστηκε η ελάχιστη συγκέντρωση με την μέγιστη ανασταλτική δράση (Threshold) και το ήμισυ της μέγιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης (IC₅₀) (Πίνακας 14).

Ουσία	Threshold (µg/mL)	IC ₅₀ (μg/mL)
Ροσμαρινικό οξύ	5	2,30
Γαλλικό οξύ	7	4,82

Πίνακας 14: Τιμές threshold και IC_{50} για το ροσμαρινικό οξύ και το γαλλικό οξύ.

Επιπλέον, διερευνήθηκε η επίδραση του ροσμαρινικού οξέος και του γαλλικού οξέος στη μεμβρανική έκφραση του μορίου προσκόλλησης ICAM-1 σε καλλιέργεια ενδοθηλιακών κυττάρων HUVECs, με κυτταρομετρία ροής χρησιμοποιώντας το φθορισμένο μονοκλωνικό αντίσωμα anti-CD54 PE. Κύτταρα HUVECs, σε καλλιέργεια, προεπωάστηκαν για 1h με διάφορες συγκεντρώσεις του ροσμαρινικού οξέος και στη συνέχεια ενεργοποιήθηκαν με TNF-α (0,5ng/mL) για 6h. Η ίδια πειραματική πορεία ακολουθήθηκε και για το γαλλικό οξύ. Στις συγκεντρώσεις 10μg/mL και 25μg/mL του ροσμαρινικού οξέος που χρησιμοποιήθηκαν βρέθηκε ότι δεν υπάρχει ανασταλτική δράση της έκφρασης του ICAM-1 ούτε στις συγκεντρώσεις 10μg/mL και 25μg/mL του γαλλικού οξέος που χρησιμοποιήθηκαν.

7. Συμπεράσματα-Συζήτηση

Στην παρούσα διατριβή διερευνήθηκε η πιθανή αντιοξειδωτική, αντιφλεγμονώδης και αντιθρομβωτική δράση 4 εκχυλισμάτων από τις ρίζες του φυτού *Echinacea purpurea*. Τα εκχυλίσματα που μελετήθηκαν είναι το υδατικό εκχύλισμα, το υδατικό εκχύλισμα μετά από κατεργασία με ρητίνη XAD-7, το υδραλκολικό εκχύλισμα μετά από κατεργασία με ρητίνη XAD-7.

Αρχικά, μελετήθηκε η επίδραση των 4 εκχυλισμάτων στην οξειδωτική τροποποίηση της LDL. Από τα παραπάνω αποτελέσματα, διαπιστώνεται ότι και τα 4 εκχυλίσματα σε συγκεντρώσεις 40-200µg/mL αναστέλλουν την οξείδωση της LDL σε ποσοστό >90% (Πίνακας 8). Επιπλέον, συγκρίνοντας τις τιμές threshold και IC₅₀ των 4 εκχυλισμάτων διαπιστώνεται ότι το εκχύλισμα με την ισχυρότερη ανασταλτική δράση έναντι της οξείδωσης της LDL είναι το υδραλκολικό εκχύλισμα μετά από κατεργασία με ρητίνη XAD-7 (Πίνακας 9). Το αποτέλεσμα αυτό έρχεται σε συμφωνία με το γεγονός ότι από τα 4 εκχυλίσματα, το υδραλκολικό εκχύλισμα μετά από κατεργασία με ρητίνη XAD-7 έχει τη μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε ροσμαρινικό οξύ (Πίνακας 4), το οποίο αναστέλλει ισχυρά την οξειδωτική τροποποίηση της LDL (Πίνακας 14).

Επιπλέον, μελετήθηκε η επίδραση των 4 εκχυλισμάτων στη μεμβρανική έκφραση του ICAM-1 σε καλλιέργεια κυττάρων HUVECs με κυτταρομετρία ροής. Από τα παραπάνω αποτελέσματα, διαπιστώνεται ότι τα εκχυλίσματα δεν παρουσιάζουν ισχυρή ανασταλτική δράση στη μεμβρανική έκφραση του ICAM-1, κάτι το οποίο έρχεται σε συμφωνία με το γεγονός ότι το ροσμαρινικό οξύ, που είναι το κύριο συστατικό των εκχυλισμάτων και το γαλλικό οξύ, το οποίο εκφράζει το ολικό φαινολικό φορτίο των εκχυλισμάτων, δεν έχουν ανασταλτική δράση στην έκφραση του ICAM-1.

Τέλος, μελετήθηκε η επίδραση των εκχυλισμάτων στην επαγόμενη από το AA, το ADP και το TRAP-6 αιμοπεταλιακή συσσώρευση σε PRP με συσσωρευομετρία οπτικής διαπερατότητας. Από τα παραπάνω αποτελέσματα, διαπιστώνεται ότι τα εκχυλίσματα παρουσιάζουν την ισχυρότερη ανασταλτική δράση στην επαγόμενη από το AA και το TRAP-6 αιμοπεταλιακή συσσώρευση, σε σχέση με την επαγόμενη από το ADP αιμοπεταλιακή συσσώρευση (Πίνακας 13). Αυτό μπορεί να σημαίνει ότι τα εκχυλίσματα δε δρουν στους υποδοχείς P₂Y₁₂, στους οποίους προσδένεται το ADP για να ενεργοποιήσει τα αιμοπετάλια. Για να διευκρινιστεί ο μηχανισμός αυτός κρίνεται απαραίτητο να πραγματοποιηθούν περαιτέρω πειράματα. Με το AA ως αγωνιστή, από τα 4 εκχυλίσματα την ισχυρότερη ανασταλτική δράση στην αιμοπεταλιακή συσσώρευση παρουσιάζουν το υδατικό εκχύλισμα και το υδατικό εκχύλισμα μετά από κατεργασία με ρητίνη XAD-7 και με το TRAP-6 ως αγωνιστή, από τα 4 εκχυλίσματα την ισχυρότερη ανασταλτική δράση στην αιμοπεταλιακή συσσώρευση παρουσιάζει το υδατικό εκχύλισμα μετά από κατεργασία με ρητίνη XAD-7.

Βιβλιογραφία

- P. Marchio, S. Guerra-Ojeda, J. M. Vila, M. Aldasoro, V. M. Victor, and M. D. Mauricio, "Targeting early atherosclerosis: A focus on oxidative stress and inflammation," *Oxid. Med. Cell. Longev.*, vol. 2019, no. Ldl, 2019, doi: 10.1155/2019/8563845.
- [2] A. Rognoni *et al.*, "Pathophysiology of Atherosclerotic Plaque Development," *Cardiovasc. Hematol. Agents Med. Chem.*, vol. 13, no. 1, pp. 10–13, 2015, doi: 10.2174/1871525713666141218163425.
- [3] E. Falk, "Pathogenesis of Atherosclerosis," J. Am. Coll. Cardiol., vol. 47, no. 8
 SUPPL., pp. 0–5, 2006, doi: 10.1016/j.jacc.2005.09.068.
- P. M. Vanhoutte, H. Shimokawa, E. H. C. Tang, and M. Feletou, "Endothelial dysfunction and vascular disease," *Acta Physiol.*, vol. 196, no. 2, pp. 193–222, 2009, doi: 10.1111/j.1748-1716.2009.01964.x.
- [5] J. Eble and S. Niland, "The Extracellular Matrix of Blood Vessels," *Curr. Pharm. Des.*, vol. 15, no. 12, pp. 1385–1400, 2009, doi: 10.2174/138161209787846757.
- Y. Zhao, P. M. Vanhoutte, and S. W. S. Leung, "Vascular nitric oxide: Beyond eNOS," *J. Pharmacol. Sci.*, vol. 129, no. 2, pp. 83–94, 2015, doi: 10.1016/j.jphs.2015.09.002.
- [7] H. F. Galley and N. R. Webster, "Physiology of the endothelium," Br. J. Anaesth., vol. 93, no. 1, pp. 105–113, 2004, doi: 10.1093/bja/aeh163.
- [8] W. C. Aird, "Endothelium as an organ system.," *Crit. Care Med.*, vol. 32, no. 5
 Suppl, pp. 271–279, 2004, doi: 10.1097/01.ccm.0000129669.21649.40.
- [9] L. Badimón, G. Vilahur, and T. Padró, "Lipoproteins, Platelets, and Atherothrombosis," *Rev. Española Cardiol. (English Ed.*, vol. 62, no. 10, pp. 1161–1178, 2009, doi: 10.1016/s1885-5857(09)73331-6.
- [10] P. Libby and G. K. Hansson, "Inflammation and immunity in diseases of the arterial tree: Players and layers," *Circ. Res.*, vol. 116, no. 2, pp. 307–311, 2015, doi: 10.1161/CIRCRESAHA.116.301313.
- [11] R. C. Webb, "Smooth muscle contraction and relaxation," *Am. J. Physiol. Adv. Physiol. Educ.*, vol. 27, no. 1–4, pp. 201–206, 2003, doi: 10.1152/advan.00025.2003.
- [12] M. Gollasch, "Vasodilator signals from perivascular adipose tissue," Br. J.

Pharmacol., vol. 165, no. 3, pp. 633–642, 2012, doi: 10.1111/j.1476-5381.2011.01430.x.

- [13] G. Fésüs *et al.*, "Adiponectin is a novel humoral vasodilator," *Cardiovasc. Res.*, vol. 75, no. 4, pp. 719–727, 2007, doi: 10.1016/j.cardiores.2007.05.025.
- K. R. Stenmark *et al.*, "The adventitia: Essential regulator of vascular wall structure and function," *Annu. Rev. Physiol.*, vol. 75, pp. 23–47, 2013, doi: 10.1146/annurev-physiol-030212-183802.
- [15] E. C. Boyle, D. G. Sedding, and A. Haverich, "Targeting vasa vasorum dysfunction to prevent atherosclerosis," *Vascul. Pharmacol.*, vol. 96–98, pp. 5– 10, 2017, doi: 10.1016/j.vph.2017.08.003.
- [16] D. G. Sedding *et al.*, "Vasa vasorum angiogenesis: Key player in the initiation and progression of atherosclerosis and potential target for the treatment of cardiovascular disease," *Front. Immunol.*, vol. 9, no. APR, 2018, doi: 10.3389/fimmu.2018.00706.
- [17] E. L. Ritman and A. Lerman, "The dynamic vasa vasorum," *Cardiovasc. Res.*, vol. 75, no. 4, pp. 649–658, 2007, doi: 10.1016/j.cardiores.2007.06.020.
- [18] K. Maiellaro and W. R. Taylor, "The role of the adventitia in vascular inflammation," *Cardiovasc. Res.*, vol. 75, no. 4, pp. 640–648, 2007, doi: 10.1016/j.cardiores.2007.06.023.
- [19] A. J. Kattoor, N. V. K. Pothineni, D. Palagiri, and J. L. Mehta, "Oxidative Stress in Atherosclerosis," *Curr. Atheroscler. Rep.*, vol. 19, no. 11, 2017, doi: 10.1007/s11883-017-0678-6.
- [20] S. Sitia *et al.*, "From endothelial dysfunction to atherosclerosis," *Autoimmun. Rev.*, vol. 9, no. 12, pp. 830–834, 2010, doi: 10.1016/j.autrev.2010.07.016.
- [21] G. D. Norata, E. Callegari, H. Inoue, and A. L. Catapano, "HDL3 Induces Cyclooxygenase-2 Expression and Prostacyclin Release in Human Endothelial Cells Via a p38 MAPK/CRE-Dependent Pathway: Effects on COX-2/PGI-Synthase Coupling," *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, vol. 24, no. 5, pp. 871– 877, 2004, doi: 10.1161/01.ATV.zhq0504.1403.
- [22] E. Matsuura, G. R. V. Hughes, and M. A. Khamashta, "Oxidation of LDL and its clinical implication," *Autoimmun. Rev.*, vol. 7, no. 7, pp. 558–566, 2008, doi: 10.1016/j.autrev.2008.04.018.
- [23] A. Daugherty, D. L. Rateri, H. Lu, T. Inagami, and L. A. Cassis, "Hypercholesterolemia stimulates angiotensin peptide synthesis and contributes
to atherosclerosis through the AT1A receptor," *Circulation*, vol. 110, no. 25, pp. 3849–3857, 2004, doi: 10.1161/01.CIR.0000150540.54220.C4.

- [24] S. Wassmann, S. Hilgers, U. Laufs, M. Böhm, and G. Nickenig, "Angiotensin II type 1 receptor antagonism improves hypercholesterolemia-associated endothelial dysfunction," *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, vol. 22, no. 7, pp. 1208–1212, 2002, doi: 10.1161/01.ATV.0000022847.38083.B6.
- [25] L. Vladimirova-Kitova, T. Deneva, E. Angelova, F. Nikolov, B. Marinov, and N. Mateva, "Relationship of asymmetric dimethylarginine with flow-mediated dilatation in subjects with newly detected severe hypercholesterolemia," *Clin. Physiol. Funct. Imaging*, vol. 28, no. 6, pp. 417–425, 2008, doi: 10.1111/j.1475-097X.2008.00825.x.
- [26] F. Perticone *et al.*, "Asymmetric dimethylarginine, L-arginine, and endothelial dysfunction in essential hypertension," *J. Am. Coll. Cardiol.*, vol. 46, no. 3, pp. 518–523, 2005, doi: 10.1016/j.jacc.2005.04.040.
- [27] I. V. Smirnova, T. Sawamura, and M. S. Goligorsky, "Upregulation of lectinlike oxidized low-density lipoprotein receptor-1 (LOX-1) in endothelial cells by nitric oxide deficiency," *Am. J. Physiol. - Ren. Physiol.*, vol. 287, no. 1 56-1, 2004, doi: 10.1152/ajprenal.00449.2003.
- [28] M. van Leeuwen, J. Damoiseaux, A. Duijvestijn, and J. W. C. Tervaert, "The therapeutic potential of targeting B cells and anti-oxLDL antibodies in atherosclerosis," *Autoimmun. Rev.*, vol. 9, no. 1, pp. 53–57, 2009, doi: 10.1016/j.autrev.2009.03.001.
- [29] Z. Veresh, A. Racz, G. Lotz, and A. Koller, "ADMA impairs nitric oxidemediated arteriolar function due to increased superoxide production by angiotensin II-NAD(P)H oxidase pathway," *Hypertension*, vol. 52, no. 5, pp. 960–966, 2008, doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.108.116731.
- [30] Peter Libby, "insight review articles 868, Inflammation in atherosclerosis," vol.420, no. December, 2002, [Online]. Available: www.nature.com/nature.
- [31] C. A. Disease, "Inflammation, Atherosclerosis, and Coronary Artery Disease," pp. 1685–1695, 2005.
- [32] M. A. Houtkamp, O. J. De Boer, C. M. Van Der Loos, A. C. Van Der Wal, and A. E. Becker, "Adventitial infiltrates associated with advanced atherosclerotic plaques: Structural organization suggests generation of local humoral immune responses," *J. Pathol.*, vol. 193, no. 2, pp. 263–269, 2001, doi: 10.1002/1096-

9896(2000)9999:9999<:::AID-PATH774>3.0.CO;2-N.

- [33] M. Kaartinen *et al.*, "Mast cell infiltration in acute coronary syndromes: Implications for plaque rupture," *J. Am. Coll. Cardiol.*, vol. 32, no. 3, pp. 606–612, 1998, doi: 10.1016/S0735-1097(98)00283-6.
- [34] T. Naruko *et al.*, "Neutrophil infiltration of culprit lesions in acute coronary syndromes," *Circulation*, vol. 106, no. 23, pp. 2894–2900, 2002, doi: 10.1161/01.CIR.0000042674.89762.20.
- [35] G. F. Lewis and D. J. Rader, "New insights into the regulation of HDL metabolism and reverse cholesterol transport," *Circ. Res.*, vol. 96, no. 12, pp. 1221–1232, 2005, doi: 10.1161/01.RES.0000170946.56981.5c.
- [36] S. E. Nissen *et al.*, "Effect of Recombinant ApoA-I Milano," *JAMA*, vol. 290, no. 17, pp. 2292–300, 2003, [Online]. Available: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14600188.
- [37] J. Nilsson, G. K. Hansson, and P. K. Shah, "Immunomodulation of atherosclerosis: Implications for vaccine development," *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, vol. 25, no. 1, pp. 18–28, 2005, doi: 10.1161/01.ATV.0000149142.42590.a2.
- [38] A. H. Kragel, S. G. Reddy, J. T. Wittes, and W. C. Roberts, "Morphometric analysis of the composition of atherosclerotic plaques in the four major epicardial coronary arteries in acute myocardial infarction and in sudden coronary death," *Circulation*, vol. 80, no. 6, pp. 1747–1756, 1989, doi: 10.1161/01.CIR.80.6.1747.
- [39] Y. J. Geng and P. Libby, "Progression of atheroma: A struggle between death and procreation," *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, vol. 22, no. 9, pp. 1370–1380, 2002, doi: 10.1161/01.ATV.0000031341.84618.A4.
- [40] F. D. Kolodgie *et al.*, "Targeting of Apoptotic Macrophages and Experimental Atheroma with Radiolabeled Annexin V: A Technique with Potential for Noninvasive Imaging of Vulnerable Plaque," *Circulation*, vol. 108, no. 25, pp. 3134–3139, 2003, doi: 10.1161/01.CIR.0000105761.00573.50.
- [41] J. Llodrá, V. Angeli, J. Liu, E. Trogan, E. A. Fisher, and G. J. Rendolph, "Emigration of monocyte-derived cells from atherosclerotic lesions characterizes regressive, but not progressive, plaques," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 101, no. 32, pp. 11779–11784, 2004, doi: 10.1073/pnas.0403259101.
- [42] U. Hoffmann, T. J. Brady, and J. Muller, "Use of New Imaging Techniques to

Screen for Coronary Artery Disease," *Circulation*, vol. 108, no. 8, pp. 1–4, 2003, doi: 10.1161/01.cir.0000085363.88377.f2.

- [43] M. Pletcher, J. Tice, M. Pignone, and W. Browner, "to Predict Coronary Heart Disease Events," Arch. Intern. Med., vol. 164, pp. 1285–1292, 2004.
- [44] R. M. Weiss, "Another calcium paradox?," *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, vol. 21, no. 10, pp. 1561–1562, 2001, doi: 10.1161/atvb.21.10.1561.
- [45] S. Ehara *et al.*, "Spotty calcification typifies the culprit plaque in patients with acute myocardial infarction: An intravascular ultrasound study," *Circulation*, vol. 110, no. 22, pp. 3424–3429, 2004, doi: 10.1161/01.CIR.0000148131.41425.E9.
- [46] L. Sandvik, J. Erikssen, E. Thaulow, and G. Erikssen, "The New England Journal of Medicine Downloaded from nejm.org at MCGILL UNIVERSITY LIBRARY on November 30, 2015. For personal use only. No other uses without permission. From the NEJM Archive. Copyright © 2010 Massachusetts Medical Society. All rights rese," *Phys. Fit. as a Predict. Mortal. Men*, vol. 328(8), pp. 2010–2013, 1993.
- [47] F. D. Kolodgie, H. K. Gold, and A. P. Burke, "Intraplaque hemorrhage and progression of coronary atheroma," ACC Curr. J. Rev., vol. 13, no. 2, pp. 10–11, 2004, doi: 10.1016/j.accreview.2003.12.007.
- [48] R. Virmani *et al.*, "Atherosclerotic plaque progression and vulnerability to rupture: Angiogenesis as a source of intraplaque hemorrhage," *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, vol. 25, no. 10, pp. 2054–2061, 2005, doi: 10.1161/01.ATV.0000178991.71605.18.
- [49] W. Casscells *et al.*, "Plaque blush, branch location, and calcification are angiographic predictors of progression of mild to moderate coronary stenoses," *Am. Heart J.*, vol. 145, no. 5, pp. 813–820, 2003, doi: 10.1016/S0002-8703(02)94727-7.
- [50] B. Cohn, J. N., Archibald, D. G., Ziesche, S., Franciosa, J. A., Harston, W. E., Tristani, F. E., Duneman, B., Baker, "The New England Journal of Medicine Downloaded from nejm.org at UC SHARED JOURNAL COLLECTION on November 22, 2014. For personal use only. No other uses without permission. From the NEJM Archive. Copyright © 2009 Massachusetts Medical Society. All rights r," *N. Engl. J. Med.*, vol. 314, no. 24, pp. 1547–1552, 1986.
- [51] A. Vink et al., "Plaque burden, arterial remodeling and plaque vulnerability:

Determined by systemic factors?," *J. Am. Coll. Cardiol.*, vol. 38, no. 3, pp. 718–723, 2001, doi: 10.1016/S0735-1097(01)01444-9.

- [52] J. A. Schaar *et al.*, "Terminology for high-risk and vulnerable coronary artery plaques," *Eur. Heart J.*, vol. 25, no. 12, pp. 1077–1082, 2004, doi: 10.1016/j.ehj.2004.01.002.
- [53] A. P. Burke *et al.*, "Healed Plaque Ruptures and Sudden Coronary Death," *Circulation*, vol. 103, no. 7, pp. 934–940, 2001, doi: 10.1161/01.cir.103.7.934.
- [54] N. M. Caplice *et al.*, "Smooth muscle cells in human coronary atherosclerosis can originate from cells administered at marrow transplantation," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 100, no. 8, pp. 4754–4759, 2003, doi: 10.1073/pnas.0730743100.
- [55] J. M. Hill *et al.*, "Circulating Endothelial Progenitor Cells, Vascular Function, and Cardiovascular Risk," *Obstet. Gynecol. Surv.*, vol. 58, no. 7, pp. 467–468, 2003, doi: 10.1097/01.ogx.0000074096.62998.d7.
- [56] A. Görlach, R. P. Brandes, K. Nguyen, M. Amidi, F. Dehghani, and R. Busse, "A gp91phox containing NADPH oxidase selectively expressed in endothelial cells is a major source of oxygen radical generation in the arterial wall," *Circ. Res.*, vol. 87, no. 1, pp. 26–32, 2000, doi: 10.1161/01.RES.87.1.26.
- [57] T. Ago *et al.*, "Nox4 as the Major Catalytic Component of an Endothelial NAD(P)H Oxidase," *Circulation*, vol. 109, no. 2, pp. 227–233, 2004, doi: 10.1161/01.CIR.0000105680.92873.70.
- [58] I. Takac *et al.*, "The E-loop is involved in hydrogen peroxide formation by the NADPH oxidase Nox4," *J. Biol. Chem.*, vol. 286, no. 15, pp. 13304–13313, 2011, doi: 10.1074/jbc.M110.192138.
- [59] T. J. Guzik *et al.*, "Calcium-Dependent NOX5 Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate Oxidase Contributes to Vascular Oxidative Stress in Human Coronary Artery Disease," *J. Am. Coll. Cardiol.*, vol. 52, no. 22, pp. 1803–1809, 2008, doi: 10.1016/j.jacc.2008.07.063.
- [60] P. Yu *et al.*, "Unique role of NADPH oxidase 5 in oxidative stress in human renal proximal tubule cells," *Redox Biol.*, vol. 2, no. 1, pp. 570–579, 2014, doi: 10.1016/j.redox.2014.01.020.
- [61] C. E. Holterman *et al.*, "Nephropathy and elevated BP in mice with podocytespecific NADPH oxidase 5 expression," *J. Am. Soc. Nephrol.*, vol. 25, no. 4, pp. 784–797, 2014, doi: 10.1681/ASN.2013040371.

- [62] A. E. Vendrov, Z. S. Hakim, N. R. Madamanchi, M. Rojas, C. Madamanchi, and M. S. Runge, "Atherosclerosis is attenuated by limiting superoxide generation in both macrophages and vessel wall cells," *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, vol. 27, no. 12, pp. 2714–2721, 2007, doi: 10.1161/ATVBAHA.107.152629.
- [63] P. Patetsios *et al.*, "Identification of uric acid and xanthine oxidase in atherosclerotic plaque," *Am. J. Cardiol.*, vol. 88, no. 2, pp. 188–191, 2001, doi: 10.1016/S0002-9149(01)01621-6.
- [64] H. D. McNally JS, Davis ME, Giddens DP, Saha A, Hwang J, Dikalov S, Jo H,
 "Vascular Signaling by Free Radicals Role of xanthine oxidoreductase and NAD
 (P) H oxidase in endothelial superoxide production in response to oscillatory shear stress," no. 13, pp. 2290–2297, 2018.
- [65] U. Landmesser *et al.*, "Angiotensin II induces endothelial xanthine oxidase activation: Role for endothelial dysfunction in patients with coronary disease," *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, vol. 27, no. 4, pp. 943–948, 2007, doi: 10.1161/01.ATV.0000258415.32883.bf.
- [66] S. Guthikonda, C. Sinkey, T. Barenz, and W. G. Haynes, "Xanthine oxidase inhibition reverses endothelial dysfunction in heavy smokers," *Circulation*, vol. 107, no. 3, pp. 416–421, 2003, doi: 10.1161/01.CIR.0000046448.26751.58.
- [67] K. Schröder *et al.*, "Xanthine oxidase inhibitor tungsten prevents the development of atherosclerosis in ApoE knockout mice fed a Western-type diet," *Free Radic. Biol. Med.*, vol. 41, no. 9, pp. 1353–1360, 2006, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2006.03.026.
- [68] Y. Dai, Y. Cao, Z. Zhang, S. Vallurupalli, and J. L. Mehta, "Xanthine Oxidase Induces Foam Cell Formation through LOX-1 and NLRP3 Activation," *Cardiovasc. Drugs Ther.*, vol. 31, no. 1, pp. 19–27, 2017, doi: 10.1007/s10557-016-6706-x.
- [69] H. C. Lin *et al.*, "Allopurinol, benzbromarone and risk of coronary heart disease in gout patients: A population-based study," *Int. J. Cardiol.*, vol. 233, pp. 85–90, 2017, doi: 10.1016/j.ijcard.2017.02.013.
- [70] N. R. Madamanchi and M. S. Runge, "Mitochondrial dysfunction in atherosclerosis," *Circ. Res.*, vol. 100, no. 4, pp. 460–473, 2007, doi: 10.1161/01.RES.0000258450.44413.96.
- [71] K. Cervantes Gracia, D. Llanas-Cornejo, and H. Husi, "CVD and Oxidative Stress," J. Clin. Med., vol. 6, no. 2, p. 22, 2017, doi: 10.3390/jcm6020022.

- [72] M. Bäck and G. K. Hansson, "Leukotriene receptors in atherosclerosis," *Ann. Med.*, vol. 38, no. 7, pp. 493–502, 2006, doi: 10.1080/07853890600982737.
- [73] A. Adamek *et al.*, "Role of 5-lipoxygenase in myocardial ischemia-reperfusion injury in mice," *Eur. J. Pharmacol.*, vol. 571, no. 1, pp. 51–54, 2007, doi: 10.1016/j.ejphar.2007.05.040.
- [74] H. Suzuki *et al.*, "Arachidonate 12/15-lipoxygenase-induced inflammation and oxidative stress are involved in the development of diabetic cardiomyopathy," *Diabetes*, vol. 64, no. 2, pp. 618–630, 2015, doi: 10.2337/db13-1896.
- [75] C. L. Hawkins, "The role of hypothiocyanous acid (HOSCN) in biological systems HOSCN in biological systems C. L. Hawkins," *Free Radic. Res.*, vol. 43, no. 12, pp. 1147–1158, 2009, doi: 10.3109/10715760903214462.
- [76] S. Baldus *et al.*, "Myeloperoxidase enhances nitric oxide catabolism during myocardial ischemia and reperfusion," *Free Radic. Biol. Med.*, vol. 37, no. 6, pp. 902–911, 2004, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2004.06.003.
- [77] M. Exner, M. Hermann, R. Hofbauer, B. Hartmann, S. Kapiotis, and B. Gmeiner, "Thiocyanate catalyzes myeloperoxidase-initiated lipid oxidation in LDL," *Free Radic. Biol. Med.*, vol. 37, no. 2, pp. 146–155, 2004, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2004.04.039.
- [78] C. Bergt *et al.*, "The myeloperoxidase product hypochlorous acid oxidizes HDL in the human artery wall and impairs ABCA1-dependent cholesterol transport," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 101, no. 35, pp. 13032–13037, 2004, doi: 10.1073/pnas.0405292101.
- [79] I. Salonen *et al.*, "Serum myeloperoxidase is independent of the risk factors of atherosclerosis," *Coron. Artery Dis.*, vol. 23, no. 4, pp. 251–258, 2012, doi: 10.1097/MCA.0b013e328353a676.
- [80] C. Antoniades *et al.*, "Altered plasma versus vascular biopterins in human atherosclerosis reveal relationships between endothelial nitric oxide synthase coupling, endothelial function, and inflammation," *Circulation*, vol. 116, no. 24, pp. 2851–2859, 2007, doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.107.704155.
- [81] S. Ueda, H. Matsuoka, H. Miyazaki, M. Usui, S. Okuda, and T. Imaizumi, "Tetrahydrobiopterin restores endothelial function in long-term smokers," *J. Am. Coll. Cardiol.*, vol. 35, no. 1, pp. 71–75, 2000, doi: 10.1016/S0735-1097(99)00523-9.
- [82] U. Förstermann and W. C. Sessa, "Nitric oxide synthases: Regulation and

function," *Eur. Heart J.*, vol. 33, no. 7, pp. 1–13, 2012, doi: 10.1093/eurheartj/ehr304.

- [83] T. Goyal *et al.*, "Current concepts of the role of oxidized LDL receptors in atherosclerosis," *Curr. Atheroscler. Rep.*, vol. 14, no. 2, pp. 150–159, 2012, doi: 10.1007/s11883-012-0228-1.
- [84] J. L. Mehta *et al.*, "Deletion of LOX-1 reduces atherogenesis in LDLR knockout mice fed high cholesterol diet," *Circ. Res.*, vol. 100, no. 11, pp. 1634–1642, 2007, doi: 10.1161/CIRCRESAHA.107.149724.
- [85] S. Xu, S. Ogura, J. Chen, P. J. Little, J. Moss, and P. Liu, "LOX-1 in atherosclerosis: Biological functions and pharmacological modifiers," *Cell. Mol. Life Sci.*, vol. 70, no. 16, pp. 2859–2872, 2013, doi: 10.1007/s00018-012-1194z.
- [86] "Sawamura, LOX-1 colning and antibody, Nature 1997.pdf.".
- [87] D. Li and J. L. Mehta, "Intracellular signaling of LOX-1 in endothelial cell apoptosis," *Circ. Res.*, vol. 104, no. 5, pp. 566–568, 2009, doi: 10.1161/CIRCRESAHA.109.194209.
- [88] S. Ryoo, A. Bhunia, F. Chang, A. Shoukas, D. E. Berkowitz, and L. H. Romer, "OxLDL-dependent activation of arginase II is dependent on the LOX-1 receptor and downstream RhoA signaling," *Atherosclerosis*, vol. 214, no. 2, pp. 279–287, 2011, doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2010.10.044.
- [89] Y. Shi *et al.*, "Oxidized low-density lipoprotein activates p66shc via lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1, protein kinase c-β, and c-jun n-terminal kinase kinase in human endothelial cells," *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, vol. 31, no. 9, pp. 2090–2097, 2011, doi: 10.1161/ATVBAHA.111.229260.
- [90] R. D. Spescha *et al.*, "Adaptor protein p66Shc mediates hypertension-associated, cyclic stretch-dependent, endothelial damage," *Hypertension*, vol. 64, no. 2, pp. 347–353, 2014, doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.113.02129.
- [91] D. F. Schaeffer *et al.*, "LOX-1 augments oxLDL uptake by lysoPC-stimulated murine macrophages but is not required for oxLDL clearance from plasma," *J. Lipid Res.*, vol. 50, no. 8, pp. 1676–1684, 2009, doi: 10.1194/jlr.M900167-JLR200.
- [92] A. Pirillo, G. D. Norata, and A. L. Catapano, "LOX-1, OxLDL, and Atherosclerosis," vol. 2013, no. Figure 1, 2013.

- [93] J. I. Hinagata *et al.*, "Oxidized LDL receptor LOX-1 is involved in neointimal hyperplasia after balloon arterial injury in a rat model," *Cardiovasc. Res.*, vol. 69, no. 1, pp. 263–271, 2006, doi: 10.1016/j.cardiores.2005.08.013.
- [94] C. Hu *et al.*, "LOX-1 deletion decreases collagen accumulation in atherosclerotic plaque in low-density lipoprotein receptor knockout mice fed a high-cholesterol diet," *Cardiovasc. Res.*, vol. 79, no. 2, pp. 287–293, 2008, doi: 10.1093/cvr/cvn110.
- [95] L. Li and G. Renier, "The oral anti-diabetic agent, gliclazide, inhibits oxidized LDL-mediated LOX-1 expression, metalloproteinase-9 secretion and apoptosis in human aortic endothelial cells," *Atherosclerosis*, vol. 204, no. 1, pp. 40–46, 2009, doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2008.08.008.
- [96] C. C. Hsieh, M. H. Yen, C. H. Yen, and Y. T. Lau, "Oxidized low density lipoprotein induces apoptosis via generation of reactive oxygen species in vascular smooth muscle cells," *Cardiovasc. Res.*, vol. 49, no. 1, pp. 135–145, 2001, doi: 10.1016/S0008-6363(00)00218-2.
- [97] N. Kume and T. Kita, "Apoptosis of Vascular Cells by Oxidized LDL: Involvement of Caspases and LOX-1 and Its Implication in Atherosclerotic Plaque Rupture," *Circ. Res.*, vol. 94, no. 3, pp. 269–270, 2004, doi: 10.1161/01.RES.0000119804.92239.97.
- [98] M. R. Marwali *et al.*, "Modulation of ADP-induced platelet activation by aspirin and pravastatin: Role of lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1, nitric oxide, oxidative stress, and inside-out integrin signaling," *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, vol. 322, no. 3, pp. 1324–1332, 2007, doi: 10.1124/jpet.107.122853.
- [99] L. Cominacini *et al.*, "The platelet-endothelium interaction mediated by lectinlike oxidized low-density lipoprotein receptor-1 reduces the intracellular concentration of nitric oxide in endothelial cells," *J. Am. Coll. Cardiol.*, vol. 41, no. 3, pp. 499–507, 2003, doi: 10.1016/S0735-1097(02)02811-5.
- [100] I. Tabas, G. García-Cardeña, and G. K. Owens, "Recent insights into the cellular biology of atherosclerosis," J. Cell Biol., vol. 209, no. 1, pp. 13–22, 2015, doi: 10.1083/jcb.201412052.
- [101] D. A. Chistiakov, A. A. Melnichenko, A. V. Grechko, V. A. Myasoedova, and A. N. Orekhov, "Potential of anti-inflammatory agents for treatment of atherosclerosis," *Exp. Mol. Pathol.*, vol. 104, no. 2, pp. 114–124, 2018, doi: 10.1016/j.yexmp.2018.01.008.

- [102] N. Ranjit *et al.*, "Psychosocial factors and inflammation in the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis," *Arch. Intern. Med.*, vol. 167, no. 2, pp. 174–181, 2007, doi: 10.1001/archinte.167.2.174.
- [103] F. K. Swirski, M. Nahrendorf, and P. Libby, "Mechanisms of myeloid cell modulation of atherosclerosis," *Myeloid Cells Heal. Dis. A Synth.*, pp. 813–824, 2017, doi: 10.1128/9781555819194.ch47.
- [104] Y. Zhu *et al.*, "Research progress on the relationship between atherosclerosis and inflammation," *Biomolecules*, vol. 8, no. 3, pp. 1–11, 2018, doi: 10.3390/biom8030080.
- [105] Y. Liu, H. Yu, Y. Zhang, and Y. Zhao, "TLRs are important inflammatory factors in atherosclerosis and may be a therapeutic target," *Med. Hypotheses*, vol. 70, no. 2, pp. 314–316, 2008, doi: 10.1016/j.mehy.2007.05.030.
- [106] P. Libby, "Current concepts of the pathogenesis of the acute coronary syndromes," *Circulation*, vol. 104, no. 3, pp. 365–372, 2001, doi: 10.1161/01.CIR.104.3.365.
- [107] G. K. Hansson, P. Libby, and I. Tabas, "Inflammation and plaque vulnerability," *J. Intern. Med.*, vol. 278, no. 5, pp. 483–493, 2015, doi: 10.1111/joim.12406.
- [108] P. Calabro, D. W. Chang, J. T. Willerson, and E. T. H. Yeh, "Release of C-reactive protein in response to inflammatory cytokines by human adipocytes: Linking obesity to vascular inflammation [1]," *J. Am. Coll. Cardiol.*, vol. 46, no. 6, pp. 1112–1113, 2005, doi: 10.1016/j.jacc.2005.06.017.
- [109] M. B. Pepys and G. M. Hirschfield, "C-reactive protein: a critical update," J. Clin. Invest., vol. 112, no. 2, pp. 299–299, 2003, doi: 10.1172/jci18921c1.
- [110] S. Hakobyan *et al.*, "Complement factor H binds to denatured rather than to native pentameric C-reactive protein," *J. Biol. Chem.*, vol. 283, no. 45, pp. 30451–30460, 2008, doi: 10.1074/jbc.M803648200.
- [111] E. Peña, R. De La Torre, G. Arderiu, M. Slevin, and L. Badimon, "mCRP triggers angiogenesis by inducing F3 transcription and TF signalling in microvascular endothelial cells," *Thromb. Haemost.*, vol. 117, no. 2, pp. 357– 370, 2017, doi: 10.1160/TH16-07-0524.
- [112] B. Molins, E. Peña, G. Vilahur, C. Mendieta, M. Slevin, and L. Badimon, "Creactive protein isoforms differ in their effects on thrombus growth," *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, vol. 28, no. 12, pp. 2239–2246, 2008, doi: 10.1161/ATVBAHA.108.174359.

- [113] M. K. Chang, C. J. Binder, M. Torzewski, and J. L. Witztum, "C-reactive protein binds to both oxidized LDL and apoptotic cells through recognition of a common ligand: Phosphorylcholine of oxidized phospholipids," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 99, no. 20, pp. 13043–13048, 2002, doi: 10.1073/pnas.192399699.
- [114] M. J. Blaha *et al.*, "Association between obesity, high-sensitivity C-reactive protein ≥2 mg/L, and subclinical atherosclerosis: Implications of JUPITER from the multi-ethnic study of atherosclerosis," *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, vol. 31, no. 6, pp. 1430–1438, 2011, doi: 10.1161/ATVBAHA.111.223768.
- [115] L. Badimon *et al.*, "C-reactive protein in atherothrombosis and angiogenesis," *Front. Immunol.*, vol. 9, no. MAR, pp. 1–7, 2018, doi: 10.3389/fimmu.2018.00430.
- [116] Y. Li *et al.*, "Hs-CRP and all-cause, cardiovascular, and cancer mortality risk: A meta-analysis," *Atherosclerosis*, vol. 259, pp. 75–82, 2017, doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2017.02.003.
- [117] S. A. Jones, "Directing Transition from Innate to Acquired Immunity: Defining a Role for IL-6," J. Immunol., vol. 175, no. 6, pp. 3463–3468, 2005, doi: 10.4049/jimmunol.175.6.3463.
- [118] S. Aker *et al.*, "Influence of interleukin-6 G-174C gene polymorphism on coronary artery disease, cardiovascular complications and mortality in dialysis patients," *Nephrol. Dial. Transplant.*, vol. 24, no. 9, pp. 2847–2851, 2009, doi: 10.1093/ndt/gfp141.
- [119] C. Held *et al.*, "Inflammatory biomarkers interleukin-6 and c-reactive protein and outcomes in stable coronary heart disease: Experiences from the STABILITY (stabilization of atherosclerotic plaque by initiation of darapladib therapy) trial," *J. Am. Heart Assoc.*, vol. 6, no. 10, 2017, doi: 10.1161/JAHA.116.005077.
- [120] M. Madan, B. Bishayi, M. Hoge, and S. Amar, "Atheroprotective role of interleukin-6 in diet- and/or pathogen-associated atherosclerosis using an ApoE heterozygote murine model," *Atherosclerosis*, vol. 197, no. 2, pp. 504–514, 2008, doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2007.02.023.
- [121] D. T. Price and J. Loscalzo, "Cellular adhesion molecules and atherogenesis," *Am. J. Med.*, vol. 107, no. 1, pp. 85–97, 1999, doi: 10.1016/S0002-9343(99)00153-9.
- [122] A. Pasquali et al., "Detection of a large deletion in the P-selectin (SELP) gene,"

Mol. Cell. Probes, vol. 24, no. 3, pp. 161–165, 2010, doi: 10.1016/j.mcp.2009.11.006.

- [123] D. Green, N. Foiles, C. Chan, J. Kang, P. J. Schreiner, and K. Liu, "An association between clotting factor VII and carotid intima-media thickness: The CARDIA study," *Stroke*, vol. 41, no. 7, pp. 1417–1422, 2010, doi: 10.1161/STROKEAHA.110.580100.
- [124] A. Mantovani, C. Garlanda, and M. Locati, "Macrophage diversity and polarization in atherosclerosis: A question of balance," *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, vol. 29, no. 10, pp. 1419–1423, 2009, doi: 10.1161/ATVBAHA.108.180497.
- [125] T. D. Ross *et al.*, "Integrins in mechanotransduction," *Curr. Opin. Cell Biol.*, vol. 25, no. 5, pp. 613–618, 2013, doi: 10.1016/j.ceb.2013.05.006.
- [126] A. C. Finney, K. Y. Stokes, C. B. Pattillo, and A. W. Orr, "Integrin signaling in atherosclerosis," *Cell. Mol. Life Sci.*, vol. 74, no. 12, pp. 2263–2282, 2017, doi: 10.1007/s00018-017-2490-4.
- [127] J. L. Johnson, "Matrix metalloproteinases: Influence on smooth muscle cells and atherosclerotic plaque stability," *Expert Rev. Cardiovasc. Ther.*, vol. 5, no. 2, pp. 265–282, 2007, doi: 10.1586/14779072.5.2.265.
- [128] A. Luttun *et al.*, "Loss of Matrix Metalloproteinase-9 or Matrix Metalloproteinase-12 Protects Apolipoprotein E-Deficient Mice Against Atherosclerotic Media Destruction but Differentially Affects Plaque Growth," *Circulation*, vol. 109, no. 11, pp. 1408–1414, 2004, doi: 10.1161/01.CIR.0000121728.14930.DE.
- [129] S. Rašić, D. Rebić, S. Hasić, I. Rašić, and M. D. Šarac, "Influence of Malondialdehyde and Matrix Metalloproteinase-9 on Progression of Carotid Atherosclerosis in Chronic Renal Disease with Cardiometabolic Syndrome," *Mediators Inflamm.*, vol. 2015, 2015, doi: 10.1155/2015/614357.
- [130] J. T. Peterson, H. Li, L. Dillon, and J. W. Bryant, "Evolution of matrix metalloprotease and tissue inhibitor expression during heart failure progression in the infarcted rat," *Cardiovasc. Res.*, vol. 46, no. 2, pp. 307–315, 2000, doi: 10.1016/S0008-6363(00)00029-8.
- [131] Y. Konstantino, T. T. Nguyen, R. Wolk, R. J. Aiello, S. G. Terra, and D. A. Fryburg, "Potential implications of matrix metalloproteinase-9 in assessment and treatment of coronary artery disease," *Biomarkers*, vol. 14, no. 2, pp. 118–

129, 2009, doi: 10.1080/13547500902765140.

- [132] J. L. Johnson *et al.*, "Suppression of atherosclerotic plaque progression and instability by tissue inhibitor of metalloproteinase-2: Involvement of macrophage migration and apoptosis," *Circulation*, vol. 113, no. 20, pp. 2435– 2444, 2006, doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.106.613281.
- [133] M. Kuzuya, K. Nakamura, T. Sasaki, W. C. Xian, S. Itohara, and A. Iguchi, "Effect of MMP-2 deficiency on atherosclerotic lesion formation in apoEdeficient mice," *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, vol. 26, no. 5, pp. 1120–1125, 2006, doi: 10.1161/01.ATV.0000218496.60097.e0.
- [134] J. O. Deguchi *et al.*, "Matrix metalloproteinase-13/collagenase-3 deletion promotes collagen accumulation and organization in mouse atherosclerotic plaques," *Circulation*, vol. 112, no. 17, pp. 2708–2715, 2005, doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.105.562041.
- [135] J. Barnes, L. A. Anderson, S. Gibbons, and J. D. Phillipson, "Echinacea species (Echinacea angustifolia (DC.) Hell., Echinacea pallida (Nutt.) Nutt., Echinacea purpurea (L.) Moench): a review of their chemistry, pharmacology and clinical properties[†], "*J. Pharm. Pharmacol.*, vol. 57, no. 8, pp. 929–954, 2010, doi: 10.1211/0022357056127.
- [136] B. Barrett, "Medicinal properties of Echinacea: A critical review," *Phytomedicine*, vol. 10, no. 1, pp. 66–86, 2003, doi: 10.1078/094471103321648692.
- [137] R. C. Aarland *et al.*, "Studies on phytochemical, antioxidant, anti-inflammatory, hypoglycaemic and antiproliferative activities of Echinacea purpurea and Echinacea angustifolia extracts," *Pharm. Biol.*, vol. 55, no. 1, pp. 649–656, 2017, doi: 10.1080/13880209.2016.1265989.
- [138] M. Catanzaro, E. Corsini, M. Rosini, M. Racchi, and C. Lanni, "Immunomodulators inspired by nature: A review on curcumin and Echinacea," *Molecules*, vol. 23, no. 11, pp. 1–17, 2018, doi: 10.3390/molecules23112778.
- [139] S. S. Percival, "Use of echinacea in medicine," *Biochem. Pharmacol.*, vol. 60, no. 2, pp. 155–158, 2000, doi: 10.1016/S0006-2952(99)00413-X.
- [140] M. Karsch-Völk, B. Barrett, D. Kiefer, R. Bauer, K. Ardjomand-Woelkart, and K. Linde, "Echinacea for preventing and treating the common cold," *Cochrane Database Syst. Rev.*, vol. 2014, no. 2, pp. 618–619, 2014, doi: 10.1002/14651858.CD000530.pub3.

- [141] M. Rondanelli *et al.*, "Self-Care for Common Colds: The Pivotal Role of Vitamin D, Vitamin C, Zinc, and Echinacea in Three Main Immune Interactive Clusters (Physical Barriers, Innate and Adaptive Immunity) Involved during an Episode of Common Colds Practical Advice on Dosages ," *Evidence-based Complement. Altern. Med.*, vol. 2018, 2018, doi: 10.1155/2018/5813095.
- [142] B. J. Bałan, I. Sokolnicka, E. Skopińska-Rózewska, and P. Skopiński, "The modulatory influence of some Echinacea-based remedies on antibody production and cellular immunity in mice," *Cent. Eur. J. Immunol.*, vol. 41, no. 1, pp. 12– 18, 2016, doi: 10.5114/ceji.2016.58813.
- [143] M. T. Sultan, M. S. Buttxs, M. M. N. Qayyum, and H. A. R. Suleria, "Immunity: Plants as Effective Mediators," *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, vol. 54, no. 10, pp. 1298–1308, 2014, doi: 10.1080/10408398.2011.633249.
- [144] B. Luettig, C. Steinmüller, G. E. Gifford, H. Wagner, and M. L. Lohmannmatthes, "Macrophage activation by the polysaccharide arabinogalactan isolated from plant cell cultures of Echinacea purpurea," *J. Natl. Cancer Inst.*, vol. 81, no. 9, pp. 669–675, 1989, doi: 10.1093/jnci/81.9.669.
- [145] D. M. See, N. Broumand, L. Sahl, and J. G. Tilles, "*In vitro* effects of echinacea and ginseng on natural killer and antibody-dependent cell cytotoxicity in healthy subjects and chronic fatigue syndrome or acquired immunodeficiency syndrome patients," *Immunopharmacology*, vol. 35, no. 3, pp. 229–235, 1997, doi: 10.1016/S0162-3109(96)00125-7.
- [146] Y. Li *et al.*, "Echinacea pupurea extracts promote murine dendritic cell maturation by activation of JNK, p38 MAPK and NF-κB pathways," *Dev. Comp. Immunol.*, vol. 73, pp. 21–26, 2017, doi: 10.1016/j.dci.2017.03.002.
- [147] C. Y. Wang *et al.*, "Modulatory effects of Echinacea purpurea extracts on human dendritic cells: A cell- and gene-based study," *Genomics*, vol. 88, no. 6, pp. 801–808, 2006, doi: 10.1016/j.ygeno.2006.08.011.
- [148] A. Fu *et al.*, "Echinacea purpurea Extract Polarizes M1 Macrophages in Murine Bone Marrow-Derived Macrophages Through the Activation of JNK," *J. Cell. Biochem.*, vol. 118, no. 9, pp. 2664–2671, 2017, doi: 10.1002/jcb.25875.
- [149] S. Vimalanathan, R. Schoop, A. Suter, and J. Hudson, "Prevention of influenza virus induced bacterial superinfection by standardized Echinacea purpurea, via regulation of surface receptor expression in human bronchial epithelial cells," *Virus Res.*, vol. 233, pp. 51–59, 2017, doi: 10.1016/j.virusres.2017.03.006.

- [150] E. M. Williamson, "1-s2.0-S0944711304700586-main," vol. 8, no. 5, pp. 401–409, 2001.
- [151] A. L. Huntley, J. T. Coon, and E. Ernst, "The safety of herbal medicinal products derived from Echinacea species: A systematic review," *Drug Saf.*, vol. 28, no. 5, pp. 387–400, 2005, doi: 10.2165/00002018-200528050-00003.
- [152] S. Raduner *et al.*, "Alkylamides from Echinacea are a new class of cannabinomimetics: Cannabinoid type 2 receptor-dependent and -independent immunomodulatory effects," *J. Biol. Chem.*, vol. 281, no. 20, pp. 14192–14206, 2006, doi: 10.1074/jbc.M601074200.
- [153] A. Chicca *et al.*, "Synergistic immunomopharmacological effects of Nalkylamides in Echinacea purpurea herbal extracts," *Int. Immunopharmacol.*, vol. 9, no. 7–8, pp. 850–858, 2009, doi: 10.1016/j.intimp.2009.03.006.
- [154] K. Spelman, K. Iiams-Hauser, N. B. Cech, E. W. Taylor, N. Smirnoff, and C. A. Wenner, "Role for PPARγ in IL-2 inhibition in T cells by Echinacea-derived undeca-2E-ene-8,10-diynoic acid isobutylamide," *Int. Immunopharmacol.*, vol. 9, no. 11, pp. 1260–1264, 2009, doi: 10.1016/j.intimp.2009.08.009.
- [155] E. Tragni, C. L. Galli, A. Tubaro, P. Del Negro, and R. Della Loggia, "Antiinflammatory activity of Echinacea angustifolia fractions separated on the basis of molecular weight," *Pharmacol. Res. Commun.*, vol. 20, pp. 87–90, 1988, doi: 10.1016/S0031-6989(88)80848-8.
- [156] B. Muller-Jakic, W. Breu, A. Probstle, K. Redl, H. Greger, and R. Bauer, "In vitro inhibition of cyclooxygenase and 5-lipoxygenase by alkamides from Echinaceae and Achillea species," Planta Med., vol. 60, no. 1, pp. 37–40, 1994, doi: 10.1055/s-2006-959404.
- [157] F. N. Fonseca *et al.*, "Echinacea purpurea (L.) Moench modulates human T-cell cytokine response," *Int. Immunopharmacol.*, vol. 19, no. 1, pp. 94–102, 2014, doi: 10.1016/j.intimp.2013.12.019.
- [158] K. Ardjomand-Woelkart and R. Bauer, "Review and Assessment of Medicinal Safety Data of Orally Used Echinacea Preparations," *Planta Med.*, vol. 82, no. 1–2, pp. 17–31, 2015, doi: 10.1055/s-0035-1558096.
- [159] P. G. Neri *et al.*, "Oral Echinacea purpurea extract in low-grade, steroiddependent, autoimmune idiopathic uveitis: A pilot study," *J. Ocul. Pharmacol. Ther.*, vol. 22, no. 6, pp. 431–436, 2006, doi: 10.1089/jop.2006.22.431.
- [160] G. K. Hansson and A. Hermansson, "The immune system in atherosclerosis",

Nature Immonology, vol. 12, no. 3, pp. 204-212, 2011, doi: 10.1038/ni.2001.

- [161] C. K. Glass and J. L. Witztum, "Atherosclerosis: The Road Ahead", *Cell Press*, vol. 104, pp. 503-516, 2001.
- [162] A. Manayi, M. Vazirian and S. Saeidnia, "Echinacea purpurea: Pharmacology, phytochemistry and analysis methods", *Pharmacognosy Reviews*, vol. 9, no. 17, pp. 63-72, 2015, doi: 10.4103/0973-7847.156353.