

Άρθρο Ανασκόπησης

Ο Ρόλος της Οξειδωτικής Καταπόνησης στην Αθηρωμάτωση

ΓΕΩΡΓΙΑ ΒΟΓΙΑΤΖΗ, ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ ΤΟΥΣΟΥΛΗΣ, ΧΡΙΣΤΟΔΟΥΛΟΣ ΣΤΕΦΑΝΑΔΗΣ

Πανεπιστημιακή Καρδιολογική Κλινική Ιπποκράτειου Νοσοκομείου Αθηνών

Λέξεις ευρετηρίου:
**Αθηροσκλήρωση,
 οξειδωτική
 καταπόνηση
 (stress),
 αντιοξειδωτικές
 ουσίες,
 ενδοθηλιακή
 δυσλειτουργία.**

Η αυξημένη οξειδωτική καταπόνηση (stress) επηρεάζει την ενδοθηλιακή λειτουργία και θεωρείται πως παρεμβαίνει στις αγγειακές παθήσεις. Υπάρχουν αρκετές παθολογικές καταστάσεις οι οποίες αυξάνουν την παραγωγή ενεργών ριζών οξυγόνου (reactive oxygen species, ROS) στο αγγειακό τοίχωμα, συμπεριλαμβανομένης της υπερχοληστεριναϊμίας, του σακχαρώδη διαβήτη και της αρτηριακής υπέρτασης. Οι ενεργές ρίζες ανιόντος υπεροξειδίου μέσω ενζυμικών συστημάτων όπως της νικοτιναμιδο-αδενινικής δινουκλεοτιδικής οξειδάσης (NADPH), της οξειδάσης της ξανθίνης και της συνθάσης του νιτρικού οξέος συμμετέχουν σε διαδικασίες που εμπλέκονται στην αθηρωμάτωση. Επομένως η φυσιολογική ενδοθηλιακή λειτουργία εξαρτάται από την ισορροπία μεταξύ παραγωγής ενεργών ριζών οξυγόνου και της δράσης αντιοξειδωτικών μορίων. Πολυάριθμες φαρμακολογικές προσεγγίσεις που στοχεύουν στην ενίσχυση των αντιοξειδωτικών μηχανισμών άμυνας και αναστέλλουν τη δημιουργία ενζύμων που οδηγούν στην παραγωγή των ενεργών ριζών οξυγόνου έχουν χρησιμοποιηθεί ώστε να βελτιώσουν τη λειτουργία του ενδοθηλίου.

Ημερ. παραλαβής
 εργασίας:
 23 Ιανουαρίου 2008
 Ημερ. αποδοχής:
 28 Μαΐου 2008

Διεύθυνση
 Επικοινωνίας:
 Δημήτρης Τούσουλης

Πανεπιστημιακή
 Καρδιολογική Κλινική
 Ιπποκράτειο
 Νοσοκομείο Αθηνών
 Βασ. Σοφίας 114,
 ΤΚ: 115 28, Αθήνα
 e-mail:
vgogiatz@yahoo.gr

Συνεχώς όλο και περισσότερες κλινικές μελέτες καταδεικνύουν το στρατηγικό ρόλο της οξειδωτικής καταπόνησης στην παθογένεια της αθηρωμάτωσης.^{1,2} Η υπόθεση της οξειδωτικής καταπόνησης υποστηρίζει ότι η αθηροσκλήρωση είναι συνέπεια της οξειδωτικής τροποποίησης των χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεϊνών μέσω των ελεύθερων ριζών οξυγόνου στο αρτηριακό τοίχωμα. Μεγάλος αριθμός πειραματικών ερευνών έδειξε ότι οι κοινοί παράγοντες που ευθύνονται για την αθηροσκλήρωση αυξάνουν τον κίνδυνο δημιουργίας ελεύθερων ριζών, όχι μόνο από τα ενδοθηλιακά κύτταρα αλλά και από τα λεία μυϊκά κύτταρα και τα κύτταρα του εξωθηλικού χιτώνα.³ Έτσι, η υπερχοληστερολαιμία, ο σακχαρώδης διαβήτης, η αρτηριακή υπέρταση, το κάπνισμα, η ηλικία και η έλλειψη αντοχής στα νιτρώδη αυξάνουν την παραγωγή ενεργών ριζών οξυγόνου. Ξεκινά έτσι μια

σειρά διαδικασιών που εμπλέκονται στην αθηρογένεση συμπεριλαμβανομένης και της έκφρασης των μορίων προσκόλλησης, του πολλαπλασιασμού και της μετανάστευσης των λείων μυϊκών κυττάρων, της απόπτωσης των ενδοθηλιακών κυττάρων, της οξείδωσης των λιπιδίων και της ενεργοποίησης των μεταλλοπρωτεϊνών και της εναλλαγής της αγγειοκινητικής δραστηριότητας.^{4,5} Η υπόθεση αυτή εγείρει ερωτήματα σχετικά με την αναγνώριση και την κατανόηση των μονοπατιών που προάγουν την οξειδωτική διαδικασία καθώς και των μοριακών γεγονότων στο ανθρώπινο αρτηριακό τοίχωμα.⁶

Παθοφυσιολογικοί μηχανισμοί της οξειδωτικής καταπόνησης

Η ενδοθηλιακή λειτουργία βλάπτεται στα πρώιμα στάδια της αθηρογένεσης και σχετίζεται με κάθε αθηρογόνο παράγο-

να κινδύνου. Η ενδοθηλιακή δυσλειτουργία προδιαθέτει σε αθηροσκληρωτικές αλλοιώσεις μακράς διάρκειας και μπορεί να αποδειχθεί σημαντικός διαγνωστικός και προγνωστικός παράγοντας για τα στεφανιαία σύνδρομα.⁷ Η δημιουργία ελεύθερων οξειδωτικών ριζών πιστεύεται ότι προάγει την ενδοθηλιακή δυσλειτουργία και την αθηρογένεση. Η οξειδωτική καταπόνηση οδηγεί στην οξείδωση των λιποπρωτεϊνών χαμηλής πυκνότητας, με αποτέλεσμα την ευκολότερη πρόσληψη τους από τα μακροφάγα κύτταρα σε σχέση με τις μη οξειδωμένες λιποπρωτεΐνες. Όπως έχει αποδειχθεί η κύρια πηγή οξειδωτικών ουσιών και ενεργών ριζών οξυγόνου σε αγγεία με αθηρωματικές αλλοιώσεις είναι τα μακροφάγα και τα λεία μυϊκά κύτταρα.⁸ Όντως, η υπερχοληστερολαιμία διεγείρει την γένεση ανιόντων υπεροξειδίου (O_2^-) από τα λεία μυϊκά κύτταρα των αγγείων με αποτέλεσμα την επιπλέον οξείδωση των λιποπρωτεϊνών χαμηλής πυκνότητας. Επιπρόσθετα οι ρίζες ανιόντος υπεροξειδίου (O_2^-) μπορούν να προκαλέσουν ενδοθηλιακή δυσλειτουργία μειώνοντας το παραγόμενο από το ενδοθήλιο μονοξειδίου του αζώτου. Η αυξημένη παραγωγή των ενεργών ριζών οξυγόνου μειώνει την απελευθέρωση και συνεπώς και τη βιοδιαθεσιμότητα του μονοξειδίου του αζώτου και αυτό έχει ως αποτέλεσμα την αγγειοσύσπαση, τη μείωση της αναστολής της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων και την προσκόλληση των ουδετερόφιλων κυττάρων στο ενδοθήλιο.⁹ Συγκεκριμένα η οξειδωτική καταπόνηση μέσω του υπεροξειδίου του υδρογόνου (H_2O_2) αυξάνει την φωσφορυλίωση των τυροσινικών κινασών με αποτέλεσμα την ισχυρότερη σύνδεση των ουδετερόφιλων κυττάρων στο ενδοθήλιο και τη μεταβολή της αγγειακής διαπερατότητας.¹⁰ Ένα άλλος μηχανισμός μέσω του οποίου η οξειδωτική καταπόνηση (μέσω του H_2O_2) επηρεάζει την αθηρογένεση είναι η παραγωγή μεταγραφικών παραγόντων όπως ο πυρηνικός παράγοντας κB (NF- κB) και η πρωτεΐνη ενεργοποιητής-1 (activator protein (AP)-1), που συμμετέχουν στην έκφραση μορίων προσκόλλησης όπως τα αγγειακά μόρια προσκόλλησης (VCAM-1), τα ενδοκυττάρια μόρια προσκόλλησης (ICAM-1), η E-σελεκτίνη και άλλων κυτοκινών. Έχει διαπιστωθεί ότι ο NF- κB βρίσκεται στα λεία μυϊκά κύτταρα αγγείων με αθηρωματικές αλλοιώσεις και μάλιστα απενεργοποιείται από αντιοξειδωτικές ουσίες και αντιφλεγμονώδη φάρμακα όπως τα σαλικυλικά και τα γλυκοκορτικοειδή.¹¹ Από τα ευρήματα αυτά συμπεραίνεται ότι η αθηροσκληρωτική είναι μια φλεγμονώδης διαδικασία που έχει την αρχή της στην οξειδωτική καταπόνηση.

Αλληλεπίδραση του μονοξειδίου του αζώτου (NO) και των ενεργών ριζών οξυγόνου (ROS) στο αγγειακό τοίχωμα.

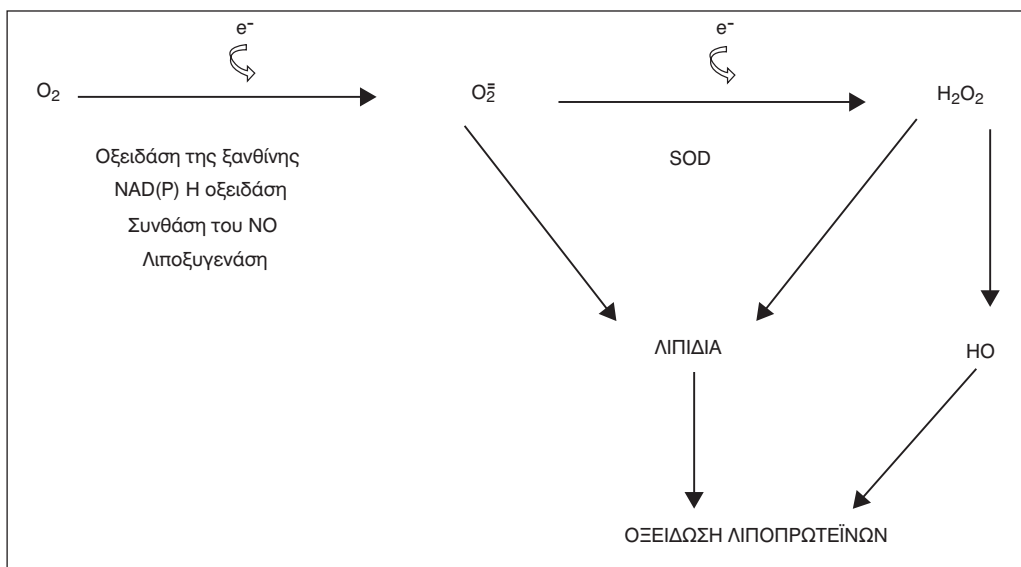
Στις ενεργείς ρίζες οξυγόνου συμπεριλαμβάνονται τα ανιόντα υπεροξειδίου (O_2^-), οι ρίζες υδροξυλίου (OH^-), το υπεροξυ-νιτρώδες ανιόν (NOO^-) ενώ το υπεροξειδίο του υδρογόνου (H_2O_2) και το υποχλωριώδες οξύ ($HOCl$) αν και δεν είναι ελεύθερες ρίζες, έχουν οξειδωτικές ιδιότητες, ειδικά παρουσία ιόντων μετάλλων.¹² Κεντρικό ρόλο κατέχει το H_2O_2 το οποίο είναι περισσότερο σταθερό, μπορεί να διαχυθεί εύκολα και να μετατραπεί σε υδροξυλικές ρίζες υψηλής δραστηριότητας παρουσία ιόντων μεταφορέων (π.χ., Fe^{2+}). Το ανιόν υπεροξειδίου (O_2^-) αλληλεπιδρώντας με το μονοξείδιο του αζώτου (NO) οδηγεί στη δημιουργία υπεροξυ-νιτρώδους ανιόντος, ουσία λιγότερο αποτελεσματική στην ενεργοποίηση της γουανυλικής κυκλάσης, με αποτέλεσμα αξιοσημείωτη μείωση στη βιοδιαθεσιμότητα του NO. Επιπρόσθετα, το NOO^- δεν έχει τις αγγειοδιασταλτικές και αγγειοπροστατευτικές ιδιότητες του NO. Έτσι σε προχωρημένα στάδια αθηροσκληρωτικών αλλοιώσεων η αποσύνθεση του NO από τις ενεργείς ρίζες οξυγόνου αυξάνει παρόλο που η παραγωγή του NO μπορεί να μείνει σταθερή.¹³ (Πίνακας 1)

Η δράση των ενζυμικών συστημάτων στην οξειδωτική διαδικασία (Σχήμα 1)

Η σημασία των ενεργών ριζών οξυγόνου στις αγγειακές παθήσεις είναι πλέον προφανής γι' αυτό και έχει εκδηλωθεί ιδιαίτερο ενδιαφέρον στις πηγές ενζύμων που συνεισφέρουν στην παραγωγή των ελεύθερων ριζών στο αγγειακό τοίχωμα. Όπως φαίνεται στο σχήμα 1 πολυάριθμα ενζυμικά συστήματα φαίνονται σημαντικά στη διαδικασία αυτή τα οποία χρησιμοποιούν ποικίλα υποστρώματα ως πηγές ηλεκτρονίων με αποτέλεσμα τη μείωση του μοριακού οξυγόνου προς όφελος της δημιουργίας μιας ποικιλίας ελευθέρων ριζών οξυγόνου. Η απόσπαση ενός

Πίνακας 1. Παραδείγματα ελεύθερων ριζών στα βιολογικά συστήματα.

ΟΝΟΜΑ	ΤΥΠΟΣ
Ανιόντα υπεροξειδίου	O_2^-
Ρίζες αλκοξυλίου	RO, RO_2
Ρίζες υδροξυλίου	OH
Μονοξείδιο και διοξείδιο του αζώτου	NO, NO_2



Σχήμα 1. Παραγωγή ελεύθερων ριζών οξυγόνου.

ηλεκτρονίου από το μόριο του οξυγόνου οδηγεί στη δημιουργία ανιόντος υπεροξειδίου ενώ η απόσπαση δύο ηλεκτρονίων στη δημιουργία υπεροξειδίου του υδρογόνου.

Νικοτιναμιδο-αδενινική δινοκλεοτιδική οξειδάση NAD(P)H: Το ένζυμο αυτό έχει αναδειχθεί σε πολύ σημαντική πηγή των ελεύθερων ριζών οξυγόνου στα αγγειακά κύτταρα. Αποτελείται από πέντε υπομονάδες: τη p40^{PHOX} (PHOX= phagocyte oxidase), τη p47^{PHOX}, τη p67^{PHOX}, τη p22^{PHOX} και τη Nox.¹⁴ Ρυθμίζεται από μια ποικιλία παθοφυσιολογικών ερεθισμάτων σχετικών με την αθηροσκλήρωση όπως η αγγειοτασίνη II, η θρομβίνη, ο παράγοντας ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων (PDGF), ο καρκινικός παράγοντας νέκρωσης α (TNF-α) και φυσικές δυνάμεις όπως η τοιχωματική καταπόνηση. Η ενεργοποίηση του υποδοχέα τύπου 1 της αγγειοτασίνης II οδηγεί στη διέγερση της πρωτεϊνικής κινάσης C, προκαλώντας την αύξηση των ενεργών ριζών οξυγόνου από την νικοτιναμιδο-αδενινική δινοκλεοτιδική οξειδάση [NAD(P)H] με αποτέλεσμα αύξηση της αρτηριακής πίεσης και διαταραχή στην αγγειοδιαστολή.¹⁵

Οξειδάση της ξανθίνης: (υπάρχει και η δεϋδρογενάση της ξανθίνης όμως μόνο μέσω της οξειδάσης της ξανθίνης μπορούν να παραχθούν ρίζες ανιόντος υπεροξειδίου από την οξείδωση της ξανθίνης σε ουρικό οξύ). Το ένζυμο αυτό υπάρχει στο πλάσμα και τα ενδοθηλιακά κύτταρα αλλά όχι στα λεία μυϊκά κύτταρα. Η δεϋδρογενάση γρήγορα μετατρέπεται, μέσω πρωτεόλυσης, σε οξειδάση. Σε πειραματόζωα

με υπερχοληστερολαιμία ήταν ικανό να παράγει αυξημένες ποσότητες ενεργών ριζών με προφανή συνέπεια τη μειωμένη ενεργότητα του μονοξειδίου του αζώτου.¹⁶ Έχει παρατηρηθεί ότι στα αγγεία ασθενών με υπερχοληστεριναιμία η αγγειοδιαστολή βελτιώνεται παρουσία της οξυπουρινόλης ή αλλοπουρινόλης, αναστολέα του ενζύμου. Επιπρόσθετα στοιχεία που καταδεικνύουν το ρόλο της οξειδάσης της ξανθίνης στη διαδικασία της αθηρογένεσης είναι τα εξής: 1) σε ασθενείς με στεφανιαία νόσο τα επίπεδα του ενζύμου αυτού βρέθηκαν αυξημένα (το ίδιο ισχύει και για την νικοτιναμιδο-αδενινική δινοκλεοτιδική οξειδάση [NAD(P)H] και 2) σε νέους ασυμπτωματικούς με οικογενή υπερχοληστεριναιμία η αύξηση της ενεργότητας του ενζύμου στο ενδοθήλιο αποτελεί ένα πρώιμο γεγονός.¹⁷

Συνθάση του νιτρικού οξέος: Σε φυσιολογικές συνθήκες συνδεόμενη με την τετραϋδροβιοπτερίνη (BH₄) που δρα ως συμπάροντας και χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα την L-αργινίνη οδηγεί στην παραγωγή μονοξειδίου του αζώτου (NO).¹⁸ Υπό συγκεκριμένες όμως συνθήκες η αποσύζευξη αυτού του ενζύμου μπορεί να οδηγήσει στη μείωση του μοριακού οξυγόνου και τη δημιουργία ενεργών ριζών με αποτέλεσμα τη γένεση του υπεροξυ-νιτρώδους ανιόντος και συνεπώς την οξείδωση λιπιδίων και πρωτεϊνών. Πολλές παθολογικές καταστάσεις συνδέονται με την αποδέσμευση του μονοξειδίου του αζώτου όπως η υπερχοληστερολαιμία, η αθηροσκλήρωση, ο σακχαρώδης διαβήτης και η αρτηριακή υπέρταση. Σε ορισμένες περιπτώσεις μπορεί να εί-

να αποτελέσμα των μειωμένων επιπέδων τετραϋδροβιοπεριδίνης.^{19,20} Η παραγωγή του μονοξειδίου του αζώτου στα ενδοθηλιακά κύτταρα απαιτεί συγκεκριμένη ποσότητα BH₄ και η χορήγηση αυτής αποκαθιστά την επηρεασμένη, εξαρτώμενη από το ενδοθήλιο, αγγειοδιαστολή. Επιπρόσθετα η L-αργινίνη είναι επίσης σημαντική για την παραγωγή του μονοξειδίου του αζώτου και τη ενδοθηλιακή λειτουργία.²¹ Σε ασθενείς με υπερχοληστεριναιμία ή προχωρημένη αθηροσκλήρωση, η χορήγηση L-αργινίνης βελτιώνει την παραγωγή του μονοξειδίου του αζώτου και την αγγειοδιαστολή. Τέλος τα επίπεδα της ασύμμετρης διμεθυλαργινίνης (ADMA), ενός μορίου που οδηγεί στην αποσύνδεση της ενδοθηλιακής συνθέτασης του NO,^{22,23} είναι αυξημένα σε πολλές ασθένειες, όπως η αρτηριακή υπέρταση και σχετίζονται σε κάποιο βαθμό με την ενδοθηλιακή δυσλειτουργία. Η χορήγηση L-αργινίνης σε ασθενείς με αυξημένα επίπεδα ασύμμετρης διμεθυλαργινίνης βελτιώνει τη λειτουργία του ενδοθηλίου, προτείνοντας ότι η έλλειψη της L-αργινίνης οδηγεί την συνθέταση του μονοξειδίου του αζώτου στην παραγωγή ελεύθερων ενεργών ριζών.

Μυελοϋπεροξειδάση: Παράγεται από τα ενεργοποιημένα φαγοκύτταρα και χρησιμοποιεί το υπεροξείδιο του υδρογόνου με αποτέλεσμα την παραγωγή ισχυρότερων οξειδωτικών ουσιών. Το ένζυμο αυτό μέσω της νικοτιναμιδο-αδενινικής δινουκλεοτιδικής οξειδάσης [NAD(P)H] παράγει υποχλωριώδες οξύ (HOCl) και τα χλωριωμένα ανάλογα αυτού (προϊόντα που ευθύνονται για τις προκαλούμενες βλάβες των αγγείων από το υπεροξείδιο του υδρογόνου).²⁴ Το μόριο της μυελοϋπεροξειδάσης θεωρείται ότι συμμετέχει στην διαδικασία της αθηρωμάτωσης προκαλώντας οξειδωτικές τροποποιήσεις τόσο στις χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτείνες όσο και στις υψηλής πυκνότητας.²⁵ Αυτή η άποψη συμπίπτει με τα αποτελέσματα κλινικών δοκιμών όπου τα κυκλοφορούντα επίπεδα του ενζύμου και των οξειδωτικών του προϊόντων είναι αυξημένα σε ασθενείς με στεφανιαία σύνδρομο. Σε αντίθεση με τις αλλοιώσεις σε ανθρώπους τέτοια προϊόντα οξειδωτικής είναι χαρακτηριστικά απόντα σε πειραματόζωα με έλλειψη των υποδοχέων των λιποπρωτεϊνών χαμηλής πυκνότητας και την απολιποπρωτεΐνη E. Υπάρχουν τουλάχιστον τρεις μηχανισμοί μέσω των οποίων η μυελοϋπεροξειδάση εμπλέκεται στις οξειδωτικές τροποποιήσεις: η κατανάλωση του μονοξειδίου του αζώτου, η οξείδωση των λιποπρωτεϊνών χαμηλής πυκνότητας και η αντίδραση με την L-αργινίνη για την παραγωγή αναστολέων της συνθέσεως του μονοξειδίου του

αζώτου. Και οι τρεις εξαρτώνται από το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H₂O₂). Ανοσοϊστοχημικές μελέτες απέδειξαν την παρουσία του ενζύμου της μυελοϋπεροξειδάσης και του προερχόμενου από αυτήν υποχλωριώδους οξέος στις αθηροσκληρυντικές αλλοιώσεις.²⁶ Επομένως και τα δύο μόρια εμπλέκονται στην τροποποίηση των λιποπρωτεϊνών χαμηλής πυκνότητας και την αθηρογένεση.

Λιποξυγενάσες: Ένζυμα που καταλύουν την αντίδραση πρόσληψης οξυγόνου από πολυακόρεστα λιπαρά οξέα δημιουργώντας μια οικογένεια από βιολογικά ενεργά λιπίδια όπως οι προσταγλαδίνες, οι θρομβοξάνες και τα λευκοτριένια που συνεισφέρουν σε φλεγμονώδεις αντιδράσεις και μπορούν να αυξήσουν την διαπερατότητα των αγγείων. Πειραματικά, η 15-λιποξυγενάση προκαλεί οξείδωση των λιποπρωτεϊνών χαμηλής πυκνότητας μέσω ενζυματικών και μη ενζυματικών αντιδράσεων.²⁷ Η 15-λιποξυγενάση και η 5-λιποξυγενάση εκφράζονται σε αθηροσκληρυντικές αλλοιώσεις τόσο σε ανθρώπους όσο και σε πειραματόζωα με έλλειψη απολιποπρωτεΐνης E. Πειραματόζωα με απουσία του γονιδίου της 15-λιποξυγενάσης ή μειωμένη έκφραση της 5-λιποξυγενάσης είναι προστατευμένα από αλλοιώσεις όπως αυτές που συμβαίνουν σε πειραματόζωα με έλλειψη απολιποπρωτεΐνης E και του υποδοχέα της χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνης. Κλινικά δεδομένα καταδεικνύουν ότι διάφοροι γονότυποι του εκκινητή της 5-λιποξυγενάσης ανευρίσκονται σε ασθενείς με αθηροσκλήρωση ή φλεγμονή.²⁸ Αυτό που μένει να ξεκαθαριστεί είναι εάν οι λιποξυγενάσες επιδρούν στην αθηρογένεση μέσω της οξείδωσης των λιπιδίων ή μέσω αμυντικών τροποποιήσεων. Τα κυριότερα οξειδωτικά ένζυμα και οι αντίστοιχες ρίζες που παράγονται συνοψίζονται στον Πίνακα 2.

Θεραπευτικές προσεγγίσεις

Ο κεντρικός ρόλος της οξειδωτικής καταπόνησης στην αθηροσκληρωτική διαδικασία έχει ερευνηθεί σε πολλαπλές επιδημιολογικές και πειραματικές μελέτες. Παρόλη την ύπαρξη στοιχείων για την συσχέτιση της αυξημένης οξειδωτικής καταπόνησης με ποικίλες αγγειακές παθήσεις, τα αποτελέσματα από τη χρήση αντιοξειδωτικών ουσιών για την πρόληψη καρδιαγγειακών συμβαμάτων είναι αμφιλεγόμενα.^{28,30} Η αρχική υπόθεση για τη χρήση αντιοξειδωτικών ήταν ότι από τη στιγμή που παρεμβαίνουν στην οξείδωση των λιποπρωτεϊνών θα έπρεπε να μειώνουν το βαθμό των αθηρωματικών αλλοιώσεων σε κλινικό επίπεδο. Η υπόθεση αυτή οδήγησε στην

Πίνακας 2. Κυριότερες αντιοξειδωτικές ουσίες και η δράση τους.

Αντιοξειδωτικές ουσίες	Τρόπος δράσης
Βιταμίνη C	Αύξηση της παραγωγής του NO μέσω αύξησης των επιπέδων BH ₄ και της ενεργότητας της συνθετάσης του NO
Βιταμίνη E	Μείωση της οξειδωσης των LDL και της παραγωγής της MCP-1 Βελτίωση της ενεργότητας του NO
Φλαβονοειδή συστατικά	Μείωση της οξειδωσης των LDL Αγγειοδιαστολή των στεφανιαίων αρτηριών
Αναστολείς του MEA	Αγγειοδιαστολή στεφανιαίων και περιφερικών αρτηριών μέσω αύξησης των επιπέδων βραδυκινίνης πλάσματος
Ανταγωνιστές του υποδοχέα της αγγειοτασίνης II	Βελτίωση της ενδοθηλιακής λειτουργίας μέσω αύξησης της ενεργότητας της δεσμουτάσης του υπεροξειδίου και αναστολής της NAD(P)H οξειδάσης
Υπολιπιδαιμικά → Στατίνες	Αύξηση της βιοδιαθεσιμότητας του NO και της έκφρασης της συνθετάσης του NO Μείωση της παραγωγής των ROS από την αγγειοτασίνη II στα λεία μυϊκά κύτταρα αναστέλλοντας την Rac-1 (μόριο κλειδί της NAD(P)H οξειδάσης)

(NO: μονοξείδιο του αζώτου, BH₄: τετραϋδροβιοπτερίνη, LDL: λιποπρωτεΐνες χαμηλής πυκνότητας, MCP-1: monocyte chemoattractant protein-1, NAD(P)H: νικοτινάμιδο-αδενινική δινουκλεοτιδική οξειδάση)

ανάπτυξη κλινικών μελετών για τον έλεγχο της δράσης των αντιοξειδωτικών ουσιών στις καρδιαγγειακές παθήσεις.^{31,32}

Όπως είναι γνωστό, υπάρχουν πολυάριθμοι καρδιαγγειακοί παράγοντες που έχουν αντιοξειδωτικές ιδιότητες όπως η καρβεδιλόλη (μη ειδικός β-ανταγωνιστής που δρα και ως α-ανταγωνιστής), η νεμπιβολόλη που μειώνει την οξειδωτική καταπόνηση σε υπερτασικούς ασθενείς και αυξάνει την παραγωγή του μονοξειδίου του αζώτου, οι αναστολείς των διαύλων Ca⁺⁺ και η ασπιρίνη των οποίων η χρήση σχετίζεται με βελτίωση της ενδοθηλιακής λειτουργίας.³³ Επιπλέον, η αναστολή του συστήματος ρενίνης-αγγειοτασίνης από αναστολείς του μεταπρεπτικού ενζύμου της αγγειοτασίνης (ραμπριλίη-μελέτη SECURE) ή του υποδοχέα της αγγειοτασίνης-II (λοξαρτάνη-μελέτη LIFE) έχει αποδειχθεί ότι μειώνει τη δραστηριότητα της οξειδάσης του NAD(P)H, βελτιώνει την ενδοθηλιακή δυσλειτουργία και οδηγεί σε ελάττωση των καρδιαγγειακών συμβαμάτων σε πειραματικά μοντέλα με αρτηριακή υπέρταση και υπερχοληστερολαιμία καθώς και σε ασθενείς υψηλού κινδύνου.^{34,35} Οι στατίνες σύμφωνα με πειραματικά δεδομένα αναστέλλουν την οξειδωση των λιποπρωτεϊνών αυξάνοντας τα επίπεδα της καταλάσης και της τετραϋδροβιοπτερίνης (BH₄) με αποτέλεσμα την αύξηση του μονοξειδίου του αζώτου ενώ παράλληλα αποκαθιστά τα επίπεδα των βιταμινών C και E και των ενδογενών αντιοξειδωτικών όπως η ουβικινόνη και η γλουταθειόνη. Αντιοξειδωτικές ουσίες που μπορούν να αναστείλουν την οξειδωτική διαδικασία με σκοπό την πρόληψη των διαδικασιών

της αθηροσκλήρωσης είναι και οι βιταμίνες C και η E. Έχει αποδειχθεί ότι η βιταμίνη C σε πειραματικά μοντέλα με αθρομάτωση διεγείρει την αύξηση των επιπέδων της τέτραϋδροβιοπτεριδίνης (BH₄) και την ενεργότητα της συνθετάσης του μονοξειδίου του αζώτου και βελτιώνει την ενδοθηλιακή δυσλειτουργία.³⁶ Επιπλέον, σύμφωνα με κλινικές μελέτες η χρήση βιταμίνης C σε ασθενείς με στεφανιαία νόσο, αρτηριακή υπέρταση και υπερχοληστεριναμία οδήγησε σε αύξηση της βιοδιαθεσιμότητας του μονοξειδίου του αζώτου.^{37,38,39} Ίδια στοιχεία προκύπτουν και από τη χορήγηση της βιταμίνης E η οποία μειώνει την οξειδωση των λιποπρωτεϊνών χαμηλής πυκνότητας και βελτιώνει την βιοδραστικότητα του μονοξειδίου του αζώτου και την ενδοθηλιακή δυσλειτουργία που οφείλεται στην κακή διατροφή. Η συγχρήγηση βιταμίνης C και E φαίνεται πως βελτιώνει τη λειτουργία του ενδοθηλίου σε υπερχοληστερολαιμικούς ασθενείς.⁴⁰ Εργαστηριακές έρευνες έχουν δείξει ότι οι αντιοξειδωτικές βιταμίνες μπορούν να αποκαταστήσουν την έλλειψη των αντιοξειδωτικών ενζύμων τα οποία ανευρίσκονται μειωμένα στις διάφορες καρδιαγγειακές παθήσεις.⁴¹ Υπεροξειδάση της γλουταθειόνης είναι σημαντικά μειωμένη σε ασθενείς με στεφανιαία νόσο. Συνεπώς, καθώς τα επίπεδα αυτού του ενζύμου είναι αντιστρόφως ανάλογα του κινδύνου για στεφανιαία νόσο θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως ένας νέος δείκτης της οξειδωτικής καταπόνησης.⁴² Σε ασθενείς με καρδιαγγειακές νόσους έχει επίσης παρατηρηθεί μείωση της ενεργότητας της δεσμουτάσης του υπεροξειδίου, γεγονός το οποίο συνεισφέρει στην ενδοθηλιακή δυσλειτουργία

γία. Επιπρόσθετα, υπάρχουν πειραματικές έρευνες που δείχνουν ότι η υπερέκφραση αυτού του ενζύμου μειώνει την οξειδωση των λιποπρωτεϊνών χαμηλής πυκνότητας και την επικείμενη απόπτωση. Μελέτες σε ανθρώπινα κύτταρα έχουν αποδείξει ότι η βιταμίνη C μπορεί να υποκαταστήσει την απύουσα γλουταθειόνη ενώ ο συνδυασμός C και E αυξάνει την ενεργότητα της παραοξανάσης, η οποία είναι μειωμένη σε παθήσεις των καρωτίδων και άλλες καρδιαγγειακές νόσους. Ιδιαίτερα χρήσιμα παρουσιάζονται και τα φυσικά αντιοξειδωτικά όπως οι πολυφαινόλες που βρίσκονται σε ποικιλία φρούτων και λαχανικών και μπορούν να βελτιώσουν τον μεταβολισμό των λιπιδίων και να μειώσουν την παραγωγή οξειδωμένων λιποπρωτεϊνών.^{43,44} Ο συνδυασμός αυτών φαίνεται πως είναι καλύτερος έναντι της μονοθεραπείας. Στον Πίνακα 2 φαίνονται οι κυριότερες αντιοξειδωτικές ουσίες καθώς και ο τρόπος δράσης τους.

Μειονεκτήματα των θεραπευτικών προσεγγίσεων για την αντιμετώπιση της οξειδωτικής καταπόνησης

Η σημαντικότερη αμφισβήτηση για το ρόλο της οξειδωτικής τροποποίησης των λιποπρωτεϊνών στην αθηρωμάτωση έρχεται από τις αποτυχημένες προσπάθειες των αντιοξειδωτικών θεραπειών τόσο στην πρόληψη όσο και στον περιορισμό της αθηρογένεσης και των καρδιαγγειακών επιπλοκών της στους ανθρώπους. Από τις 12 μελέτες στις οποίες έγινε χρήση αντιοξειδωτικών βιταμινών σε ποικίλες συγκεντρώσεις, μόνο 5 έδειξαν όφελος σε σχέση με καταληκτικά γεγονότα.⁴⁵ Στη μελέτη CHAOS (Cambridge Heart Antioxidant Study), η χρήση ατοκοφερόλης (βιταμίνη E) σε δόση 400 ή 800IU/d είχε σαν αποτέλεσμα αξιοσημείωτη μείωση σε θανάτους από καρδιαγγειακές παθήσεις και έμφραγμα μυοκαρδίου. Στη μελέτη SPACE (Secondary Prevention with Antioxidants of Cardiovascular disease in End-stage renal disease) η χορήγηση 800IU/d ατοκοφερόλης σε ασθενείς που βρίσκονται υπό αιμοδιάλυση με προϋπάρχουσα καρδιοαγγειακή νόσο επέφερε μείωση στο θανατηφόρο και μη έμφραγμα του μυοκαρδίου, στα αγγειακά εγκεφαλικά επεισόδια, στην περιφερική αγγειοπάθεια και την ασταθή στηθάγχη. Στη μελέτη ASAP (Antioxidant Supplementation in Atherosclerosis Prevention) η συνδυαστική χορήγηση ατοκοφερόλης (272IU/d) και ασκορβικού οξέος (500mg/d) επέφερε μείωση του πάχους των καρωτίδων σε άνδρες ασθενείς με υπερχοληστερολαιμία.^{1,46,47} Σε αντίθεση με αυτά τα θετικά συμπεράσματα, οι υπόλοιπες

7 μελέτες σχετικά με τη χορήγηση αντιοξειδωτικών ουσιών δεν έδειξαν καμία θετική επίδραση σε πρωτεύοντα καταληκτικά γεγονότα των καρδιαγγειακών παθήσεων.⁴⁸ Ανάμεσα τους η μελέτη CARET στην οποία χορηγήθηκε β-καροτίνη (30 mg/d) και διακόπηκε πρόωρα λόγω αύξησης της θνητότητας από καρδιακές παθήσεις⁴⁹ καθώς και άλλες όπως η HPS (Heart Protection Study) και η HATS. Οι μελέτες συνοψίζονται στον Πίνακα 3. Η αναποτελεσματικότητα των αντιοξειδωτικών στην πρόληψη και θεραπεία καρδιαγγειακών παθήσεων μπορεί να αποδοθεί σε ποικίλους λόγους. Υπάρχουν ζητήματα που πρέπει να εξεταστούν όπως:

1. Το γεγονός ότι η τυχαία παραγωγή ελεύθερων ριζών δεν μπορεί να εξηγήσει το ρυθμό εμφάνισης της αθηροσκλήρωσης.

2. Ο βαθμός έκτασης κατά τον οποίο οι χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνες οξειδώνονται.

3. Ο τρόπος με τον οποίο η οξειδωτική διαδικασία συμβάλλει στη δημιουργία της αθηρωματικής πλάκας αλλά και γιατί οι αθηρωματικές αλλοιώσεις συμβαίνουν σε συγκεκριμένες περιοχές του αγγειακού τοιχώματος.

4. Ποια αντιοξειδωτικά αναστέλλουν καλύτερα την ενδοθηλιακή δυσλειτουργία, τον πολλαπλασιασμό των λείων μυϊκών κυττάρων, την υπερτροφία και την οξειδωση των λιπιδίων.

5. Ποιες ομάδες ασθενών ανταποκρίνονται στην θεραπεία και ποιες όχι.

6. Ποιες είναι οι απαιτούμενες δόσεις αντιοξειδωτικών ουσιών και πως θα αντιμετωπισθούν οι ανεπιθύμητες ενέργειες των αντιοξειδωτικών βιταμινών όπως για παράδειγμα η βλάβη που προκαλείται στο DNA μετά από υψηλές δόσεις βιταμίνης C.

7. Τέλος, είναι αξιοσημείωτο πως, τουλάχιστον εργαστηριακά, η δημιουργία των οξειδωμένων λιποπρωτεϊνών απαιτεί την πλήρη μείωση της βιταμίνης E και γνωρίζουμε πως ούτε αυτή, ούτε η βιταμίνη C μειώνονται τόσο πολύ ακόμα και σε προχωρημένες αθηρωματικές αλλοιώσεις.^{50,51}

Σύμφωνα με τα παραπάνω γίνεται φανερό πως, τουλάχιστον σε πειραματικά μοντέλα, το φαινόμενο της αθηροσκλήρωσης μπορεί να διαχωριστεί από τις οξειδωτικές διαδικασίες καθώς η αναστολή της οξειδωσης των λιποπρωτεϊνών δεν είναι απαραίτητη και ούτε επαρκεί ώστε να περιορίσει την αθηροσκληρυντική διαδικασία. Αυτό έρχεται σε συμφωνία με μελέτες που έχουν καταδείξει την ελάχιστη επίδραση των αντιοξειδωτικών βιταμινών C και E στις αθηρωματικές αλλοιώσεις. Ακόμα όμως και αν μελετηθούν κάποιοι δείκτες της οξει-

Πίνακας 3. Κυριότερες μελέτες για την χρήση αντιοξειδωτικών βιταμινών.

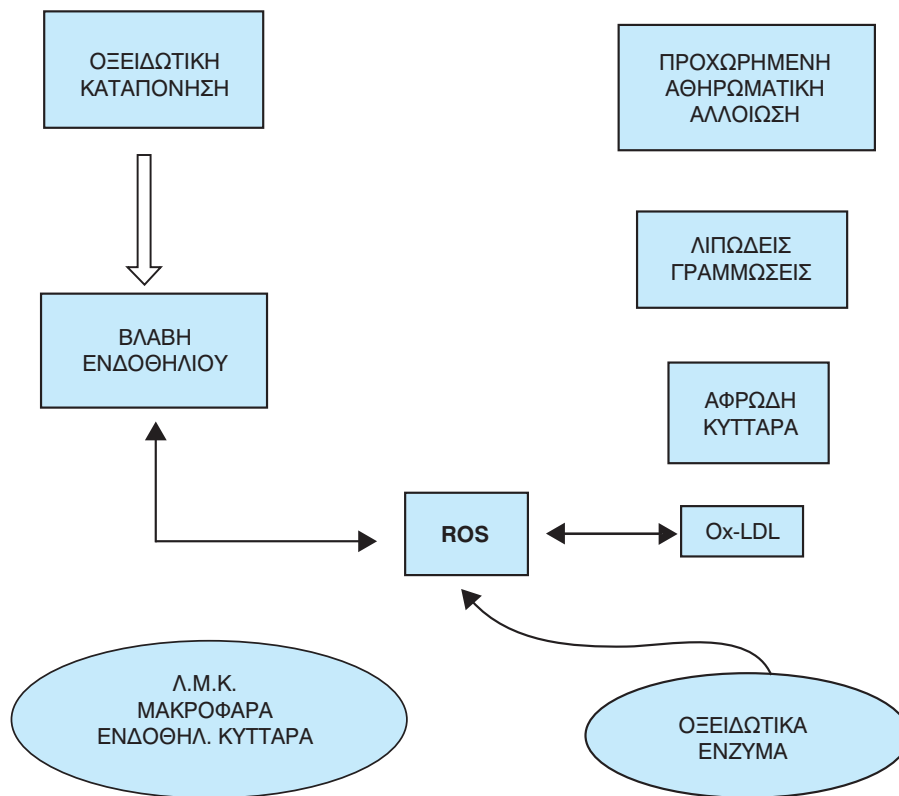
Μελέτες	Πληθυσμός μελέτης	Θεραπευτική παρέμβαση	Αποτελέσματα
CHAOS	2.002 ασθενείς με στεφανιαία νόσο διαπιστωμένη αγγειογραφικά, παρακολούθηση για 1,5 έτη (U.K.)	βιταμίνη E 800mg/d ή 400mg/d	Σημαντική μείωση στα καρδιαγγειακά συμβάματα και το μη-θανατηφόρο έμφραγμα του μυοκαρδίου. Όχι σημαντική μείωση στη θνητότητα από καρδιαγγειακά συμβάματα
ASAP	520 καπνίζοντες και μη-καπνίζοντες άνδρες και μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες, 45-69 ετών με υπερχοληστερολαμία. Ο βαθμός αθηροσκλήρωσης στις κοινές καρωτίδες αρτηρίες εκτιμήθηκε υπερχοληστερολαμικά, παρακολούθηση για 6 έτη	α-τοκοφερόλη 91mg/d και βιταμίνη C 250mg/d	Σημαντική μείωση του πάχους στο όριο έσω-μέσου χιτώνα των κοινών καρωτίδων αρτηριών
CARET	4.060 άνδρες, 45-74 ετών, εργαζόμενοι σε περιβάλλον με αμίαντο και 14.254 γυναίκες και άνδρες, βαρείς καπνιστές (>20 pack-years) παρακολουθούμενοι για 5,5 έτη. (U.S.)	β-καροτίνη 30 mg/d, +/- ρετινάλη (βιταμίνη A ₁) 25.000 IU/d.	Η μελέτη διακόπηκε πρόωρα λόγω αύξησης της θνητότητας από το συνδυασμό των σκευασμάτων
HPS	20.536 άτομα υψηλού κινδύνου, παρακολούθηση για 5 έτη	βιταμίνη E 600 IU/d, βιταμίνη C 250mg/d, β-καροτίνη 20mg/d	Η συνδυασμένη αντιοξειδωτική θεραπεία απέτυχε στη μείωση του κινδύνου και της θνητότητας για καρδιαγγειακά νοσήματα κατά το χρόνο παρακολούθησης
HATS	160 ασθενείς με κλινική στεφανιαία νόσο, παρακολούθηση για 3 έτη	σιμβαστατίνη, νιασίνη και /ή συνδυασμό βιταμίνης E (800IU/d), C(1g/d), β-καροτίνης(25mg/d), σεληνίου(100mg/d)	Η χρήση αντιοξειδωτικών δεν μείωσε το σχετικό κίνδυνο για νέα
ATBC	27.271 άνδρες, 50-69 ετών, καπνιστές, ελεύθερο ατομικό ιστορικό	β-καροτίνη 20 mg/d, βιταμίνη E 50mg/d	Βιταμίνη E: σημαντική μείωση στο θανατηφόρο έμφραγμα του μυοκαρδίου. Β-καροτίνη: καμία επίπτωση στο θανατηφόρο έμφραγμα του μυοκαρδίου

δωτικής καταπόνησης, της φλεγμονής και της αντιοξειδωτικής κατάστασης αυτό δε φαίνεται να είναι αρκετό να καθορίσει τον κίνδυνο εμφάνισης καρδιαγγειακών ασθενειών και να αναγνωρίσει τις ομάδες των ασθενών που θα ωφεληθούν από την αντιοξειδωτική θεραπεία.^{52,53}

Συμπεράσματα

Πλήθος ενδείξεων συνδέει τη δράση της οξειδωτικής καταπόνησης με την παθογένεια της αθρωματικής διαδικασίας. Εντούτοις δεν μπορεί ακόμα να

προκύψει μια ακριβής αιτιολογική σχέση μεταξύ των οξειδωτικών γεγονότων γενικά και της οξειδωτικής μετατροπής των λιποπρωτεϊνών χαμηλής πυκνότητας ειδικά στην αθηροσκλήρωση. Οι υπάρχουσες κλινικές μελέτες για το ρόλο των αντιοξειδωτικών ουσιών σχετικά με τα καταληκτικά γεγονότα είναι κυρίως απογοητευτικές. Είναι επομένως σημαντικό, με τη βοήθεια της μοριακής καρδιολογίας και της φαρμακογενετικής να διευκρινιστούν επακριβώς τα μόρια-μεσολαβητές καθώς και οι ανασταλτικοί μηχανισμοί που εμπλέκονται στην οξειδωτική διαδικασία.



Εικόνα 1. Αλληλεπίδραση οξειδωτικής καταπόνησης και αθηρωμάτωσης.

Βιβλιογραφία

- Stephens NG, Parsons A, Schofield PM, et al. Randomised controlled trial of vitamin E in patients with coronary disease: Cambridge Heart Antioxidant Study (CHAOS). *Lancet*. 1996; 347: 781-786.
- Ohara Y, Peterson TE and Harrison DG. Hypercholesterolemia increases endothelial superoxide anion production. *The Journal of Clinical Investigation*. 1993; 91: 2546-2551.
- Gozin A, Franzini E, Andrieu V, et al. Reactive oxygen species activate focal adhesion kinase, paxillin and p130cas tyrosine phosphorylation in endothelial cells. *Free Radical Biology and Medicine*. 1998; 25: 1021-1032.
- Nageswara R, Madamanchi, Aleksandr Vendrov, Marscall S, et al. Oxidative stress and vascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005; 25: 29-38.
- Hazel Lum, Kenneth A. Roebuck. Oxidant stress and endothelial cell dysfunction. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2001; 280: C719-C741.
- David Harrison, Kathy K. Griendling, Ulf Landmesser, et al. Role of oxidative stress in atherosclerosis. *Am J Cardiol*. 2003; 91: 7A-11AR.
- Stocker JF. Keany. New insights on oxidative stress in the artery wall. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2005; 3: 1825-1834.
- Antoniades C, Tousoulis D, Stefanadis C, et al. Effect of endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms on oxidative stress, inflammatory status and coronary atherosclerosis: an example of transient phenotype. *J Am Coll Cardiol*. 2007; 49: 1226.
- Vepa S, Scribner WM, Parinandi NL, et al. Hydrogen peroxide stimulates tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase in vascular endothelial cells. *American Journal of Physiology*. 1999; 277: L150-L158.
- Bourcier T, Sukhova G, Libby P. The nuclear factor- κ B signalling pathway participates in disregulation of vascular smooth muscle cells in vitro and in human atherosclerosis. *The Journal of Biological Chemistry*. 1997; 272: 15817-15824.
- Tousoulis D, Antoniades C, Stefanadis C. Assessing inflammatory status in cardiovascular diseases. *Heart*. 2007; 93: 1001-1007.
- Navab M, Berliner JA, Watson AD, Hama SY, et al. The Yin and Yan of oxidation in the development of the fatty streak. A review based on the 1994 George Lyman Duff Memorial Lecture. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1996; 16: 831-842.
- Hsich E, Segal BH, Pagano PJ, et al. Vascular effects following homologous disruption of p47 PHOX: an essential component of NADPH oxidase. *Circulation*. 2000; 101: 1234-1236.
- Gusik TJ, West NE, Black E, et al. Vascular superoxide production by NAD(P)H oxidase: association with endothelial dysfunction and clinical risk factors. *Circ Res*. 2000; 86: E85-90.
- Droge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev*. 2002; 82: 47-95.
- Antoniades C, Tousoulis D, Marinou K, et al. Athens University Medical School, 1st Cardiology Department, Hippokraton Hospital, Athens, Greece. Effects of Lipid Profile on Forearm Hyperemic Response in Young Subjects. *Hellenic J Cardiol*. 2006; 47: 152-157.

17. Spiekermann S, Landmesser U, Dikalov S, et al. Electron spin resonance characterization of vascular xanthine and NAD(P)H oxidase activity in patients with coronary artery disease: relation to endothelium-dependent vasodilation. *Circulation*. 2003; 107: 383-1389.
18. Fleming L, Busse R. Molecular mechanisms involved in the regulation of the endothelial nitric oxide synthase. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2003; 284: R1-12.
19. Landmesser U, Dikalov S, Price SR, et al. Oxidation of tetrahydrobiopterin leads to uncoupling of endothelial cell nitric oxide synthase in hypertension. *J Clin Invest*. 2003; 111: 1201-1209.
20. Marinou K, Antoniadis C, Tousoulis D. Homocysteine: a risk factor for coronary artery disease? *Hellenic J Cardiol*. 2005; 46: 59-67.
21. Vasquez-Vivar J, Kalyanaraman B, Martasek P, et al. Superoxide generation by endothelial nitric oxide synthase: the influence of co-factors. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1998; 95: 9220-5.
22. Antoniadis C, Tousoulis D, Marinou K, et al. Asymmetrical dimethylarginine regulates endothelial function in methionine-induced but not in chronic homocystinemia in humans: effect of oxidative stress and proinflammatory cytokines. *Am J Clin Nutr*. 2006; 84: 781-788.
23. Antoniadis C, Shirodaria C, Leeson P, et al. Plasma asymmetrical-dimethyl arginine affects eNOS derived vascular superoxide radical production and nitric oxide bioavailability in human arteries and veins. *Journal of American Cardiology*. 2008; 51: 815-814.
24. Bergt C, Pennathur S, Fu X, et al. The myeloperoxidase product hypochlorous acid oxidizes HDL in the human artery wall and impairs ABCA-1 dependent cholesterol transport. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2004; 114: 529-541.
25. Dagehrty A, Dunn JI, Rateri DL, et al. Myeloperoxidase, a catalyst for lipoprotein oxidation, is expressed in human atherosclerotic lesions. *J Clin Invest*. 1994; 94: 437-444.
26. Pennathur S, Bergt C, Shao B, et al. Human atherosclerotic intima and blood of patients with established coronary artery disease contain HDL daaged by reactive nitrogen species. *J Biol Chem*. 2004; 279: 42977-42983.
27. Tousoulis D, Boger RH, Antoniadis C, et al. Mechanisms of disease: L-arginine in coronary atherosclerosis – a clinical perspective. *Nat Clin Cardiovasc Med*. 2007; 4: 274-783.
28. Toutouzas K, Stefanadis C. 1st. Department of Cardiology, Athens Medical School, Hippokration Hospital, Athens, Greece. *Advances in Vulnerable Plaque Detection and Treatment: How Far Have We Gone?* *Hellenic J Cardiol*. 2006; 47: 129-131.
29. Mehrabian M, Allayee H, Wong J, et al. Identification of 5-lipoxygenase mRNA as a major gene contributing to atherosclerosis susceptibility in mice. *Circ Res*. 2002; 91: 6959-6663.
30. Dwyer JH, Allayee H, Dwyer KM, et al. Arachidonate 5-lipoxygenase promoter genotype, dietary arachidonic acid, and atherosclerosis. *N Engl J Med*. 2004; 350: 29-37.
31. Rudic RD, Shesely EG, Maeda N, et al. Direct evidence for the importance of endothelium-derived nitric oxide in vascular remodeling. *J Clin Invest*. 1998; 101: 731-736.
32. Al Suwaidi J, Hamasaki S, Higano S, et al. Long-term follow-up of patients with mild coronary artery disease and endothelial dysfunction. *Circulation*. 2000; 101: 948-954.
33. Lee J, Leeson P.C. Department of Cardiovascular Medicine, University of Oxford, United Kingdom. Lipoproteins and the Endothelium: Past, Present and Future. *Hellenic J Cardiol*. 2006; 47: 158-159.
34. Tousoulis D, Antoniadis C, Stefanadis C, et al. Statins and anti-oxidant vitamins: should co-administration be avoided? *J Am Coll Cardiol*. 2006; 47: 1237.
35. Lonn EM, Yusuf S, Dzavik V, et al. Effects of ramipril and vitamin E on atherosclerosis: the Study to Evaluate Carotid Ultrasound changes in patients treated with Ramipril and Vitamin E (SECURE). *Circulation*. 2001; 103: 919-925.
36. Dahlöf B, Devereux RB, Kjeldsen SE, et al. Cardiovascular morbidity and mortality in the Losartan Intervention For Endpoint Study (LIFE): a randomised trial against atenolol. *Lancet*. 2002; 359: 995-1003.
37. Taddei S, Virdis A, Ghiadoni L, et al. Vitamin C improves endothelium-dependent vasodilation by restoring nitric oxide activity in essential hypertension. *Circulation*. 1998; 97: 2222-2229.
38. Tousoulis D, Antoniadis C, Komallos N, et al. Novel therapies targeting vascular endothelium. *Endothelium*. 2006; 13: 411-421.
39. Engler MM, Engler MB, Malloy MJ, et al. Antioxidant vitamins C and E improve endothelial function in children with hyperlipidemia. *Circulation*. 2003; 108: 1059-1063.
40. Carr A, Frei B. Does vitamin C act as pro-oxidant under physiological conditions? *FASEB J*. 1999; 13: 1007-1024.
41. Blakenberg S, Rupprecht HJ, Bickel C, et al. Glutathione peroxidase I activity and cardiovascular events in patients with coronary artery disease. *N Engl J Med*. 2003; 349: 1605-1613.
42. Nickenig G, Harrison DG. The AT1-type angiotensin receptor in oxidative stress and atherogenesis. Part I: oxidative stress and atherogenesis. *Circulation*. 2002; 105: 393-396.
43. Wassmann S, Laufs U, Baumer AT, et al. HMG-CoA reductase inhibitors improve endothelial dysfunction in normocholesterolaemic hypertension via reduced production of reactive oxygen species. *Hypertension*. 2001; 37: 1450-1457.
44. Neunteufl T, Priglinger U, Heher S, et al. Effects of vitamin E on chronic and acute endothelial dysfunction in smokers. *J Am Coll Cardiol*. 2000; 35: 277-283.
45. D'Uscio LV, Milstien S, Richardson D, et al. Long-term vitamin C treatment increases vascular tetrahydrobiopterin levels and nitric oxide synthase activity. *Circ Res*. 2003; 92: 88-95.
46. Boaz M, Smetana S, Weinstein T, et al. Secondary prevention with Antioxidants of Cardiovascular Disease in End-stage Renal Disease (SPACE): randomised placebo-controlled trial. *Lancet* 2000; 356: 1213-1218.
47. Salonen RM, Nyyssonen K, Kaikkonen J, et al. Six-year effect of combined vitamin C and E supplementation on atherosclerotic progression. The Antioxidant Supplementation in Atherosclerosis Prevention (ASAP) Study. *Circulation* 2003; 107: 947-953.
48. Antoniadis C, Tousoulis D, Tentolouris C, et al. Oxidative stress, antioxidant vitamins and atherosclerosis. From basic research to clinical practice. *Herz*. 2003; 28: 628-638.
49. Tousoulis D, Davies G, Toutouzas P. Vitamin C increases nitric oxide availability in coronary atherosclerosis. *Ann Intern Med*. 1999; 131: 156-157.
50. Anderson T, Meredith I, Yeung A, et al. The effect of cholesterol lowering and antioxidant therapy on endothelium-dependent coronary vasomotion. *N Engl J Med*. 1995; 332: 488-493.

51. Omenn GS, Goodman GE, Thornquist MD, et al. Effects of a combination of beta carotene and vitamin A on lung cancer and cardiovascular disease. *N Eng J Med.* 1996; 334: 1550-1555.
52. Antoniadis C, Tousoulis D, Tentolouris C, et al. Effects of antioxidant vitamins C and E on endothelial function and thrombosis/fibrinolysis system in smokers. *Thromb Haemost.* 2003; 89: 990-995.
53. Steinberg D, Witztum JL. Current perspective. Is the oxidative modification hypothesis relevant to human atherosclerosis? Do the antioxidant trials conducted to date refute the hypothesis? *Circulation.* 2002; 105: 2107.