

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

# <u>«Το βιοσύστημα του PAF σε αορτές και μαστικές αρτηρίες. Ο ρόλος του στην αθηρωμάτωση»</u>

Μεταπτυχιακή διπλωματική εργασία του

Τσαβδαρίδη Κωνσταντίνου του Μιλτιάδη

AM : 197

Στα πλαίσια του Διατμηματικού Μεταπτυχιακού Προγράμματος Σπουδών «Ιατρικής Χημείας»

# ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ	i
ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ	iii
ΣΚΟΠΟΣ	iv
ABSTRACT	vi
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1	1
Παθοφυσιολογία της Αθηροσκλήρωσης	1
1.1 Μορφολογία αρτηριακού τοιχώματος	1
1.2 Μακροσκοπική μορφολογία	2
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2	7
Οξειδωμένα Φωσφολιπίδια και Υπεροξείδωση	7
2.1 Εισαγωγή	7
2.2 Σχηματισμός Οx-PL	8
2.2.1 Οξειδωτική σχάση και δημιουργία θραυσματοποιημένων Οx-PL	9
2.2.2 Μη ενζυμική οξείδωση των PL-PUFAs	10
2.3 Προϊόντα οξείδωσης φωσφολιπιδίων	12
2.4 Οξειδωμένα φωσφολιπίδια και αθηροσκλήρωση	14
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3	17
Το βιοσύστημα του ΡΑΕ	17
3.1 Εισαγωγή	17
3.2 Μεταβολισμός του ΡΑΓ	18
3.2.1 Βιοσύνθεση του ΡΑΓ	18
3.2.2 Καταβολισμός του ΡΑΓ	23
3.3 Παθοφυσιολογία του PAF	24
3.3.1 Ο ΡΑΕ στην αθηροσκλήρωση	24
3.4 Λιποπρωτεινική φωσφολιπάση Α₂ (Lp-PLA₂) ή PAF-ακετυλοϋδρολάση	25
3.4.1 Δομή της Lp-PLA <sub>2</sub> του πλάσματος	27
3.4.2 Το φάσμα των υποστρωμάτων της PAF-AH	28
3.4.3 Αθηροσκλήρωση και φλεγμονή	31
3.4.4 Το υπόστρωμα και τα παράγωγα δράσης της PAF-AH	33
3.4.5 «Φτιάχνοντας» και «σπάζοντας» τον PAF και τα PAF μιμητικά μόρια: Ένας αμφίδρομος κύκλος του PAF και των PAF μιμητικών μορίων	35

	3.4.6 Δράση τρανσακετυλάσης της λιποπρωτεϊνικής φωσφολιπάσης Α $_2$ (PAF-AH)	. 38
КЕΦ	ΑΛΑΙΟ 4	. 39
Μεθ	οδολογίες	. 39
*	Προετοιμασία και ομογενοποίηση αρτηριακών τοιχωμάτων	. 39
*	Προσδιορισμός των πρωτεϊνών με τη μέθοδο BSA	.41
*	Δραστικότητα ΡΑF τρανσακετυλάσης	.43
*	Προσδιορισμός της ενεργότητας της PAF-ακέτυλουδρολάσης (Lp-PLA₂)	.45
*	Προσδιορισμός της μάζας της Lp-PLA₂	.49
*	Ιστορικό ασθενούς	. 52
КЕΦ	ΑΛΑΙΟ 5	. 53
Απο	τελέσματα	. 53
≻	Χαρακτηριστικά πληθυσμού μελέτης	. 53
► PÆ	Δημιουργία πρότυπης καμπύλης στο LC/MS-MS για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης του \F-d4	. 53
$\triangleright$	Επίπεδα ενεργότητας τρανσακετυλάσης της Lp-PLA₂ στο αρτηριακό τοίχωμα	. 58
КЕΦ	ΑΛΑΙΟ 6	.63
ΣΥ	ΖΗΤΗΣΗ	.63
BIBA	ΙΟΓΡΑΦΙΑ	.66

Ala	Αλανίνη		
ALPA AT	Αλκυλλυσο-γλυκεροφωσφορική ακετυλοτρανσφεράση		
Asp	Ασπαραγινικό οξύ		
СоА	Συνένζυμο Α		
CoA IT	Ανεξάρτητο/η συνενζύμου Α		
cPLA2	Κυτοπλασμική φωσφολιπάση Α2		
FFAs	Ελεύθερα λιπαρά οξέα		
Gly	Γλυκίνη		
HDL	Υψηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνη		
His	Ιστιδίνη		
iPLA2	Ανεξάρτητης ιόντων Ασβεστίου φωσφολιπάση Α2		
LDL	Χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνη		
Lp-a	Λιποπρωτεΐνη α		
LPCAT1 & 2	Λυσο-φωσφατιδυλοχολινο- ακυλ-οτρανσφεράση 1 & 2		
Lp-PLA2	Λιποπρωτεϊνική φωσφολιπάση Α2		
Lyso-PAF	1-Ο-αλκυλ-ο-sn-γλυκερο-3-φωσφορυλοχολίνη		
Lyso-PAF AT	1-Ο-αλκυλ-ο-sn-γλυκερο-3-φωσφορυλοχολιν- Ακυλ-οτρασνφεράση		
Lyso-PC	Λυσο-φωσφατιδυλοχολίνη		
Lyso-PL	Λυσο φωσφολιπίδια		
NEFAs	Μη εστεροποιημένα λιπαρά οξέα		
ox-LDL	Οξειδωμένα σωματίδια LDL		
ox-NEFAs	Οξειδωμένα μη εστεροποιημένα λιπαρά οξέα		
ox-PL	Οξειδωμένα φωσφολιπίδια		
PAF	1-Ο-αλκυλ2-ακετυλο-sn-γλυκερο-3-φωσφορυλοχολίνη παράγοντας ενεργοποίησης αιμοπεταλίων		
PAF-AH	Ακετυλοϋδρολάση του παράγοντα ενεργοποίησης αιμοπεταλίων		
PAF CPT	1-αλκυλ2-ακετυλ-sn-γλυκερο-χολινοφωσφοτρανσφεράση		
PAF-R	Υποδοχέας του ΡΑΓ		
PAF-TA	Τρανσακετυλάση του παράγοντα ενεργοποίησης αιμοπεταλίων		
PC	Φωσφατιδυλοχολίνη		
Phe	Φαινυλαλανίνη		
PL	Φωσφολιπίδια		
PLA2	Φωσφολιπάση Α2		
PUFAs	Πολυακόρεστα λιπαρά οξέα		
Ser	Σερίνη		
SMCs	Λεία μυϊκά κύτταρα		
sPLA2	Εκκρινόμενη φωσφολιπάση Α2		
TCA	Τριχλωροοξεϊκό οξύ		
Val	Βαλίνη		

# ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ

#### ΣΚΟΠΟΣ

Ο παράγοντας ενεργοποίησης αιμοπεταλίων (PAF), ένας πιθανός διαμεσολαβητής της φλεγμονής, εμπλέκεται στην αθηροσκλήρωση. Ο PAF (1-Ο-αλκυλ--2-ακετυλο-sn-γλυκερο-3φωσφοχολίνη) ανήκει σε μια οικογένεια φωσφολιπιδίων (PL) με πολλές φλεγμονώδεις και θρομβοτικές αποκρίσεις. Επιδεικνύει ένα ευρύ φάσμα ενεργειών σε κύρια προ-φλεγμονώδη κύτταρα, συμπεριλαμβανομένων μονοκυττάρων/μακροφάγων, ενδοθηλιακών κυττάρων και λείων μυϊκών κυττάρων (SMCs). Η αθηροσκλήρωση είναι μια χρόνια φλεγμονώδης νόσος, και πολλές έρευνες προτείνουν ότι ο PAF παίζει κάποιο ρόλο στην αθηρογένεση και αθηροσκλήρωση.

Η PAF ακετυλοϋδρολάση (PAF-AH), το ένζυμο που απενεργοποιεί την βιολογική δράση του PAF, κατέχει τόσο την δραστικότητα ακετυλοϋδρολάσης όσο και αυτήν της τρανσακετυλάσης (TA). Η δράση της ακετυλοϋδρολάσης μετατρέπει τον PAF σε ανενεργό lyso-PAF με την αφαίρεση της ακετυλ-ομάδας στην θέση sn-2. Η δράση της τρανσακετυλάσης από την άλλη, μεταφέρει μικρών αλυσίδων λιπαρά οξέα από τον PAF και τα κοντινά του αιθερικά- και εστερικά- ανάλογα σε αιθερ/εστερ lyso-φωσφολιπίδια. Η δράση της τρανσακετυλάσης μπορεί να υπερβεί αυτήν της ακετυλοϋδρολάσης παρουσία εξωγενώς προστιθέμενων lyso-PLs ή παρουσία οξειδωτικών συνθηκών. Επομένως η ενζυμική μεταφορά οξικού από ανενεργά εστερικά ανάλογα σε lyso-PAF ή ανάλογα του πιθανόν να είναι υπεύθυνη για το σχηματισμό εξωκυττάριας βιοδραστικότητας του PAF.

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι να ερευνηθεί ο ρόλος του βιοσυστήματος του PAF στην πρόοδο της αθηροσκλήρωσης. Μελετάται η δραστικότητα ακετυλοϋδρολάσης και τρανσακετυλάσης της PAF AH και κατά πόσο σχετίζονται με την συσσώρευση του lyso-PAF και το σχηματισμό του PAF. Τέλος θα εκτιμηθεί κατά πόσο η δράση της τρανσακετυλάσης είναι ευεργετική η όχι στην πρόοδο της αθηροσκλήρωσης.

Για το λόγο αυτό συλλέχθηκαν δείγματα από ανθρώπινες μη αθηρωματικές μαστικές αρτηρίες και από αθηρωματικές αορτές και στεφανιαίες αρτηρίες από ασθενείς με στεφανιαία νόσο που υποβλήθηκαν σε αορτοστεφανιαία παράκαμψη.

iv

Στα δείγματα μετρήθηκε i) η δραστικότητα ακετυλοϋδρολάσης και τρανσακετυλάσης της PAF-AH και ii) η μάζα του ενζύμου iii) η ποσότητα πρωτεΐνης σε υγιείς μαστικές αρτηρίες και σε αθηροσκληρωτικές αορτές.

#### ABSTRACT

Platelet Activating Factor (PAF), a potent inflammation mediator, is involved in atherosclerosis. PAF (1-O-alcyl-2-acetyl-sn-glyceryl-3-phosphocholine) is member of a phospholipid family (PL) with many inflammative and thrombotic responses. It demonstrates a wide range of actions in major pro-inflammatory cells, including monocytes / macrophages, endothelial cells and smooth muscle cells (SMCs). Atherosclerosis is a chronic inflammatory disease, and many studies suggest that PAF plays a role in atherogenesis and atherosclerosis.

PAF acetylhydrolase (PAF-AH), the enzyme that inactivates the biological activity of PAF, possesses both acetylhydrolase and transacetylase (TA) activity. The acetylhydrolase activity converts PAF into inactive lyso-PAF by removing the acetyl group at sn-2 position. On the other hand, transacetylase activity, carries short chain fatty acids from PAF and its relatives ether and ester analogs to ether/ester lyso phospholipids. The transacetylase activity can exceed that of acetylhydrolase in the presence of exogenously added lyso-PLs or under oxidative conditions. Thus, enzymatic transfer of acetate from inactive ether/ester analogs to lyso-PAF and its analogs is likely to be responsible for the formation of extracellular bioactivity of PAF.

The purpose of this paper is to investigate the role of PAF's biosystem in the progression of atherosclerosis. PAF AH acetylhydrolase and transacetylase activity is studied and whether they are related to the accumulation of lyso-PAF and the formation of PAF. Finally, it will be assessed whether the activity of transacetylase is beneficial or not in the progression of atherosclerosis.

For this reason, samples were collected from human non-atherosclerotic mammary arteries and atherosclerotic aortas and coronary arteries from patients with coronary artery disease who underwent CABG (coronary artery bypass graft).

The samples were tested for i) PAF AH acetylhydrolase and transacetylase activity, and ii) the mass of the enzyme iii) the amount of protein, in healthy mammary arteries and atherosclerotic aortas.

vi

# ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

# Παθοφυσιολογία της Αθηροσκλήρωσης

# 1.1 Μορφολογία αρτηριακού τοιχώματος

Το αγγειακό σύστημα του ανθρώπου αποτελείται από ένα δίκτυο αρτηριών, φλεβών και τριχοειδών αγγείων. Το αρτηριακό σύστημα στο ανθρώπινο σώμα αποτελείται από τις συστηματικές αρτηρίες, που μεταφέρουν οξυγονωμένο αίμα και θρεπτικά συστατικά σε όλο το σώμα, και τις πνευμονικές αρτηρίες που μεταφέρουν το μη οξυγονωμένο αίμα από την καρδία στους πνεύμονες. Τα αγγεία των αρτηριών έχουν κοινή ιστολογική οργάνωση ανεξάρτητά από τα όργανα και τα συστήματα που συμμετέχουν. Κάθε αρτηρία αποτελείται από τρία διακριτά στρώματα που καλούνται χιτώνες. Το εσωτερικό στρώμα καλείται **έσω χιτώνας** (tunica intima) , το μεσαίο στρώμα **μέσος χιτώνας** (tunica media) και το εξωτερικό στρώμα **έξω χιτώνας** (tunica externa ή adventitia). Οι χιτώνες διαχωρίζονται μεταξύ τους με ένα στρώμα ελαστίνης το οποίο ανάλογα με τους χιτώνες που χωρίζει διακρίνεται σε έσω ελαστικό έλασμα (ανάμεσα σε intima-media) και έξω ελαστικό έλασμα (ανάμεσα σε media-externa) (εικόνα 1.1).



Εικόνα 1.1. Μορφολογία αρτηριακού τοιχώματος

- i. Έσω χιτώνας (tunica intima). Αποτελείται από ενδοθηλιακά κύτταρα και τον λείο υποστηρικτικό ιστό που είναι πλούσιος σε κολλαγόνο και κύτταρα, όπως ινοβλάστες και τα λεία μυϊκά κύτταρα του έσω χιτώνα. Η επιφάνεια της εσωτερικής κοιλότητας των αρτηριών αποτελείται από ένα στρώμα ενδοθηλιακών κυττάρων και βρίσκεται πάνω σε μια επιφάνεια εξωκυττάριας ύλης (extracellular matrix) οριοθετούμενη από το έσω ελαστικό έλασμα.
- ii. Μέσος χιτώνας (tunica media). Αποτελείται από τα λεία μυϊκά κύτταρα τα οποία διατηρούνται σε συνοχή μέσω κυτταρικών συνδέσμων και μια εξωκυττάρια ουσία αποτελούμενη από ελαστικές ίνες κολλαγόνο και πρωτεογλυκάνες. Το πάχος του μέσου χιτώνα ποικίλει ανάλογα με την λειτουργία της αρτηρίας στο σύστημα.
- ίἰι. Έξω χιτώνας (tunica adventitia). Αποτελείται από ίνες ελαστίνης, λεία μυϊκά κύτταρα,
  ινοβλάστες και κολλαγόνο που δομεί τον συνδετικό ιστό (ίνες κολλαγόνου).

#### <u>1.2 Μακροσκοπική μορφολογία</u>

Η αθηροσκλήρωση είναι μια χρόνια φλεγμονώδης νόσος των μεγάλων και μεσαίου μεγέθους αρτηριών και συγκεκριμένα του αρτηριακού τοιχώματος αυτών και διακρίνεται μορφολογικά από το σχηματισμό των αθηρωματικών πλακών<sup>1</sup>. Η αθηρογένεση αναφέρεται στην ανάπτυξη αθηρωματικών πλακών στο εσωτερικό χιτώνα των αρτηριών. Οι πλάκες αυτές χωρίζονται σε <u>πρώιμες</u>.

Οι πιο σύγχρονες μελέτες δείχνουν μια ποιοτική αλλαγή στην μονοστοιβάδα των ενδοθηλιακών κυττάρων στο εσωτερικό της αρτηριακής επιφάνειας (εικόνα 1.2). Τα ενδοθηλιακά κύτταρα των αρτηριών , που υπό φυσιολογικές συνθήκες δεν επιτρέπουν την πρόσδεση των λευκών κυττάρων του αίματος που περνούν με την κυκλοφορία του αίματος, κάτω από διάφορα ερεθίσματα (δυσλιπιδαιμίες, υπέρταση ή προ-φλεγμονώδεις παράγοντες) εκφράζουν μόρια πρόσφυσης τα οποία παγιδεύουν λευκοκύτταρα στην επιφάνεια τους (εικόνα 1.3).



Εικόνα 1.2. Φυσιολογική μορφολογία εσωτερικού αρτηριακής επιφάνειας (Πηγή<sup>2</sup>)

Παράλληλα αλλαγές στην ενδοθηλιακή διαπερατότητα και την σύνθεση της εξωκυττάριας ύλης κάτω από το ενδοθήλιο προάγουν την είσοδο και συγκράτηση μορίων LDL, που περιέχουν χοληστερόλη, στο αρτηριακό τοίχωμα<sup>3</sup>. Βιοχημικά τροποποιημένα συστατικά των μορίων αυτών, πιθανών να επάγουν περαιτέρω προσκόλληση λευκοκυττάρων, και άθικτα μόρια να υπάγονται σε ενδοκύττωση από τα μακροφάγα, που προέρχονται από μονοκύτταρα, οδηγώντας σε συσσώρευση ενδοκυτταρικής χοληστερόλης. Χημειοελκυτικοί διαμεσολαβητές κατευθύνουν την μετανάστευση των δεσμευμένων λευκοκυττάρων στο εσωτερικό στρώμα της αρτηρίας, τον έσω χιτώνα. Μόλις εγκατασταθούν στο αρτηριακό τοίχωμα, τα μονοκύτταρα - τα πιο πολυάριθμα λευκά κύτταρα του αίματος μέσα στις αθηρωματικές πλάκες – διαφοροποιούνται σε μακροφάγα ιστού. Στο νεοσυντιθέμενο αθήρωμα, αυτά τα μονοπύρηνα φαγοκύτταρα ενσωματώνουν μόρια λιποπρωτεΐνης και μετατρέπονται σε αφρώδη κύτταρα. Η είσοδος των λιπιδίων δημιουργεί περιοχές εναπόθεσης αυτών και μαζί με τα αφρώδη κύτταρα χαρακτηρίζονται ως «**λιπώδεις γραμμώσεις**» (fatty streak), και αποτελούν χαρακτηριστικό των πρώιμων αθηρωματικών πλακών.



Εικόνα 1.3. Σχηματισμός λιπωδών γραμμώσεων (Πηγή<sup>2</sup>)

Ο σχηματισμός αθηρώματος επίσης περιλαμβάνει την πρόσληψη λείων μυϊκών κυττάρων (SMCs) από τον μέσω χιτώνα, το μεσαίο στρώμα του αρτηριακού τοιχώματος (εικόνα 1.4) παρά το γεγονός ότι υπάρχουν λεία μυϊκά κύτταρα και στον έσω χιτώνα. Στη διάρκεια της αθηρογένεσης, κάποια λεία μυϊκά κύτταρα μεταναστεύουν από τον μέσο στον έσω χιτώνα , και πολλαπλασιάζονται ως απόκριση σε διαμεσολαβητές όπως ο αυξητικός παράγοντας των αιμοπεταλίων (platelet-derived growth factor)<sup>4</sup> και κυτοκινών<sup>5</sup> που οδηγούν στην έκκριση πρωτεολυτικών ενζύμων<sup>6</sup>. Στον έσω χιτώνα τα λεία μυϊκά κύτταρα παράγουν εξωκυτταρικά μόρια , συμπεριλαμβανομένου μεσοκυττάριου κολλαγόνου, ελαστικού ιστού και πρωτεογλυκάνες<sup>7</sup>, και σχηματίζουν μια ινώδης κάψα που καλύπτει την πλάκα. Η πλάκα αυτή τυπικά βρίσκεται πάνω από μια συλλογή αφρωδών κυττάρων, κάποια από τα οποία πεθαίνουν (για παράδειγμα από απόπτωση) και ελευθερώνουν λιπίδια τα οποία συσσωρεύονται εξωκυττάρια. Η ανεπαρκής απομάκρυνση των νεκρών κυττάρων – μια διαδικασία γνωστή ως efferocytosis – μπορεί να οδηγήσει στην συγκέντρωση κυτταρικών απορριμμάτων και εξωκυτταρικών λιπιδίων, δημιουργώντας έτσι μια πλούσια σε λιπίδια περιοχή που καλείται νεκρωτικός πυρήνας της πλάκας<sup>8</sup>.



Εικόνα 1.4. Σχηματισμός ινώδους κάψας και νεκρωτικού πυρήνα (Πηγή<sup>2</sup>)

Ο σχηματισμός του νεκρωτικού πυρήνα επιφέρει ριζικές αλλαγές, τόσο στις συσταλτικές όσο και στις δομικές ιδιότητες της αρτηρίας, αφού η ύπαρξη μεγάλων ποσοτήτων εξωκυττάριου λίπους έχει επιπτώσεις στη μηχανική σταθερότητα της αθηρωματικής πλάκας<sup>9</sup>. Οι πλάκες γενικώς προκαλούν κλινικές εκδηλώσεις με την στένωση των αγγείων που περιορίζουν τη ροή του αίματος και οδηγούν σε ισχαιμία ιστού ή προκαλώντας θρόμβους που μπορούν να διακόψουν την ροή αίματος τοπικά ή να μετακινηθούν και να εμβολίσουν περιφερικές αρτηρίες.

Παραδόξως, οι θρομβωτικές επιπλοκές δεν συμβαίνουν πάντοτε στις θέσεις των πιο σοβαρών αρτηριακών στενώσεων από πλάκες. Αντ 'αυτού, οι θρόμβοι εμφανίζονται συχνά

μετά από φυσική διάσπαση της πλάκας, συνηθέστερα ένα ράγισμα της ινώδους κάψας που εκθέτει προ-θρομβωτικά συστατικά του πυρήνα της πλάκας, στις πρωτεΐνες πήξης στο αίμα, προκαλώντας θρόμβωση (εικόνα 1.5). Οι πλάκες στις οποίες συμβάινει ρήξη έχουν συνήθως λεπτή φτωχή σε κολλαγόνο κάψα, με λίγα λεία μυϊκά κύτταρα αλλά αφθονία μακροφάγων και αφρωδών κυττάρων. Φλεγμονώδη κύτταρα μπορεί να επιταχύνουν την ρήξη της πλάκας είτε υπό την διεργασια κολλαγονολυτικών ενζύμων που μπορούν να αποικοδομήσουν το κολλαγόνο, είτε με το να προκαλούν κυτταρικό θάνατο στα λεία μυϊκά κύτταρα που είναι η πηγή του αρτηριακού κολλαγόνου<sup>10</sup>. Τα μακροφάγα της πλάκας παράγουν επίσης τον παράγοντα προ-θρομβωτικού ιστού που καθιστά τον λιπιδικό πυρήνα θρομβογόνο. Έτσι, τα φλεγμονώδη κύτταρα που έχουν διεισδύσει αλληλεπιδρούν με τα ενδογενή αρτηριακά κύτταρα (λεία μυϊκά και ενδοθηλιακά), προωθώντας τον σχηματισμό αλλοιώσεων και τις επιπλοκές οι οποίες μπορεί να είναι είτε χρόνια σταθερά συμπτώματα είτε θρομβωτικές επιπλοκές όπως το οξύ εμφραγμα του μυοκαρδίου ή το αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο<sup>11</sup>.



Εικόνα 1.5. Ρήξη της πλάκας και σχηματισμός θρόμβου (Πηγή<sup>2</sup>)

# ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

# Οξειδωμένα Φωσφολιπίδια και Υπεροξείδωση

### <u>2.1 Εισαγωγή</u>

Τα φωσφολιπίδια που περιέχουν πολυακόρεστα λιπαρά οξέα είναι ιδιαίτερα επιρρεπή στην τροποποίηση από δραστικά είδη οξυγόνου (ROS). Τείνουν να υποβάλλονται σε υπεροξείδωση λιπιδίων για να σχηματίσουν οξειδωμένα φωσφολιπίδια (Ox-PLs) τα οποία επάγουν την κυτταροτοξικότητα και την απόπτωση και παίζουν σημαντικό ρόλο στη φλεγμονή. Η υπεροξείδωση μεταβάλλει σημαντικά τις φυσικοχημικές ιδιότητες των λιπιδικών διπλοστοιβάδων των μεμβρανών και συνεπώς προκαλεί μια σηματοδότηση εξαρτώμενη από το σχηματισμό ή την αναδιοργάνωση περιοχών μεμβράνης ή την ειδική δέσμευση μορίων <sup>12</sup>. Ορισμένα είδη Ox-PLs μπορούν να αλληλεπιδράσουν με ειδικές θέσεις πρόσδεσης και υποδοχείς που οδηγούν στην ενεργοποίηση μεμονωμένων μονοπατιών σηματοδότησης. Η πλέον διαδεδομένη στεφανιαία αθηροσκλήρωση είναι μια χρόνια φλεγμονώδης νόσος που εμφανίζεται λόγω ανωμαλιών των λιπιδίων. Η προ-φλεγμονώδης οξειδωμένη λιποπρωτεΐνη χαμηλής πυκνότητας (Ox-LDL) έχει προταθεί να αποτελεί μια σύνδεση μεταξύ της συσσώρευσης λιπιδίων και της φλεγμονής στα τοιχώματα των αγγείων. Τα αυξημένα επίπεδα των προϊόντων οξείδωσης των φωσφολιπιδίων έχουν ανιχνευθεί σε διάφορα όργανα και παθολογικές καταστάσεις, συμπεριλαμβανομένων αθηροσκληρωτικών αγγείων<sup>13,14</sup>, στη φλεγμονή πνεύμονα<sup>15,16</sup>, στο πλάσμα ασθενών με στεφανιαία νόσο<sup>17</sup>, καθώς και σε αποπτωτικά κύτταρα<sup>18,19</sup>, κύτταρα μολυσμένα με ιό, κύτταρα που διεγείρονται με φλεγμονώδεις αγωνιστές <sup>20</sup>.

Για ένα μεγάλο διάστημα, η υπεροξείδωση λιπιδίων στα κύτταρα και τους ιστούς των θηλαστικών είχε θεωρηθεί αποκλειστικά ως σύμπλεγμα τεχνητών, επιβλαβών ή παθολογικών διεργασιών. Αυτή η υπόθεση αποδείχθηκε αργότερα μόνο εν μέρει σωστή. Πράγματι, ένας μεγάλος αριθμός διαφορετικών επιβλαβών ουσιών, π.χ. μερικά ιόντα βαρέων μετάλλων,

ακτινοβολία υψηλής ενέργειας, ξενοβιοτικά, ενδογενείς επαγωγείς ελευθέρων ριζών και αντιδραστικά είδη οξυγόνου (ROS), είναι ικανά να προκαλέσουν υπεροξείδωση λιπιδίων σε βιομεμβράνες. Η υπεροξείδωση των λιπιδίων είναι φαινομενικά μια συνέπεια της ζωής παρουσία οξυγόνου. Οι οργανισμοί έχουν προσαρμοστεί σε αυτές τις συνθήκες με την ανάπτυξη αντιοξειδωτικών αμυντικών συστημάτων που περιλαμβάνουν τόσο ένζυμα (υπεροξειδάσες γλουταθειόνης, δισμουτάσες υπεροξειδίου, καταλάση) όσο και χαμηλού μοριακού βάρους ενώσεις (ουρικό οξύ, τοκοφερόλες, ασκορβικό οξύ, καροτενοειδή, ουβικινολίνες κλπ.). Έτσι, η μη ενζυμική υπεροξείδωση των λιπιδίων ελέγχεται in vivo με τη διατήρηση της ισορροπίας μεταξύ προ-οξειδωτικών και αντι-οξειδωτικών διεργασιών.

## 2.2 Σχηματισμός Ox-PL

Τα Ox-PLs παράγονται με την οξείδωση καταλοίπων πολυακόρεστων λιπαρών οξέων, τα οποία συνήθως υπάρχουν στα φωσφολιπίδια στη θέση sn-2. Η οξείδωση των φωσφολιπιδίων ξεκινά είτε ενζυμικά με λιποξυγενάσες είτε με δραστικά είδη οξυγόνου και διαδίδεται μέσω του κλασικού μηχανισμού αλυσιδωτής αντίδρασης υπεροξείδωσης λιπιδίων. Αυτό σημαίνει ότι η παραγωγή των Ox-PLs δεν μπορεί να ρυθμιστεί με ρύθμιση της ποσότητας ή της δραστικότητας των ενζύμων. Ως εκ τούτου υπάρχει μια πιθανότητα της ανεξέλεγκτης δημιουργίας Ox-PLs κατά τη διάρκεια οξειδωτικού στρες. Αρκετές ενδείξεις υποδεικνύουν ότι τα Ox-PLs σχηματίζονται από πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (PUFAs) στη θέση sn-2 <sup>21,22</sup>. Τα βιοενεργά οξειδωμένα φωσφολιπίδια μπορεί να περιέχουν προϊόντα θραυσματοποίησης των PUFAs, όπως 1-παλμιτοϋλ-2-οξοβαλεροϋλ-sn-γλυκερο-3-φωσφορυλχολίνη και 9-κετο-10δωδεκενδιοϊκό οξυλεστέρα της 2-λυσοφωσφατιδυλ χολίνης (KOdiA-PC). Αυτά τα μόρια παρουσιάζουν διαφορετικές βιολογικές δραστικότητες. Ο χρωματογραφικός διαχωρισμός πολλών προϊόντων που σχηματίστηκαν με οξείδωση της 1-παλμιτοϋλ-2-αραχιδονυλο-snγλυκερο-3-φωσφορυλοχολίνης (PAPC) οδήγησε στην ταυτοποίηση του 1-παλμιτοϋλ-2- (5οξοβαλεροϋλ) (POVPC), 1-παλμιτοϋλ-2-γλουταροϋλ-sn-γλυκερο-3-φωσφατιδυλοχολίνη (PGPC) και 1-παλμιτοϋλ-2- (5,6-εποξυϊσοπροπάνιο E2) -sn-γλυκερο-3-φωσφατιδυλχολίνη ως ισχυρούς διαμεσολαβητές της φλεγμονής. Η υψηλή διαρθρωτική διακύμανση μπορεί να εξηγήσει γιατί τα Ox-PLs επιδεικνύουν μια αξιοσημείωτη ποικιλία βιολογικών δραστηριοτήτων.

Οι ενζυμικές και μη ενζυμικές αντιδράσεις, οι ελεύθερες ρίζες και οι διαδικασίες χωρίς ρίζες είναι ικανές να εκκινούν ένα ευρύ φάσμα αντιδράσεων που προκαλούν την οξείδωση των PUFAs. Η πλειοψηφία αυτών των αντιδράσεων παράγει ταυτόσημα πρωτογενή προϊόντα οξειδώσεως (δηλ., Υπεροξυλικές ρίζες και υδροϋπεροξείδια). Η επακόλουθη οξείδωση των Οχ-PLs είναι μια στοχαστική διαδικασία ανεξάρτητη από ένζυμα και παράγει ένα ευρύ φάσμα των Ox-PLs. Τα προϊόντα υπεροξειδώσεως που παράγονται κατ 'αυτόν τον τρόπο προχωρούν σύμφωνα με διάφορους μηχανισμούς όπως οξείδωση υπολειμμάτων PUFA, κυκλοποίηση υπεροξυλικής ρίζας ή οξειδωτική διάσπαση εστεροποιημένων PUFAs που παράγουν είτε κατάλοιπα πλήρους μήκους που ενσωματώνουν αρκετά άτομα οξυγόνου, είτε μικρού μήκους κατάλοιπα λιπαρών οξέων. Η εισαγωγή επιπλέον ατόμων οξυγόνου σε PUFAs είναι ένας κοινός μηχανισμός που αυξάνει την πολυπλοκότητα των μιγμάτων Ox-PLs, ωστόσο οι βιολογικές δραστηριότητες των πολυ-οξυγονωμένων PLs δεν έχουν χαρακτηριστεί πλήρως ακόμα. Από την άλλη πλευρά, η κυκλοποίηση της υπεροξυλικής ρίζας παράγει κυκλικό υπεροξείδιο, το οποίο υφίσταται επαναδιατάξεις αποδίδοντας δικυκλικό ενδοϋπεροξείδιο ή περαιτέρω οξείδωση που εισάγει επιπλέον μη κυκλική ή κυκλική ομάδα υπεροξειδίου. Η κυκλοποίηση της ρίζας υπεροξυλίου είναι δυνατή μόνο για τα λιπαρά οξέα που έχουν τρεις ή περισσότερους διπλούς δεσμούς.

## 2.2.1 Οξειδωτική σχάση και δημιουργία θραυσματοποιημένων Ox-PL

Τα υπεροξείδια / υπεροξύλια μετασχηματίζονται σε προχωρημένα προϊόντα οξειδώσεως με θραυσματοποίηση των υδροϋπεροξειδίων. Τα γ-υδροξυ (ή οχο) α, β-ακόρεστα PLs με τερματικές αλδεϋδικές ομάδες παράγονται από υδροϋπεροξείδια μέσω οξείδωσης / θρυμματισμού ή πολυμερισμού / διάσπασης. Οξειδωτική θραυσματοποίηση των υδροϋπεροξειδίων συμβαίνει μέσω διαφόρων μηχανισμών που περιλαμβάνουν την ανασύνθεση, την αναδιάταξη του Hock ή την κυκλοποίηση της αλκοξυ ρίζας που παράγεται από το υδροϋπεροξείδιο<sup>23</sup>. Τα φωσφολιπίδια των γ-υδροξυ (ή οξο) -α, β-ακόρεστες αλδεϋδών είναι εξαιρετικά δραστικές ενώσεις, οι οποίες είναι ικανές να συνδέονται ομοιοπολικά με αμινομάδες πρωτεϊνών, καθώς και ομάδες θειόλης βιομορίων <sup>24</sup>. Από την άλλη πλευρά, η υπεροξυλική ρίζα μπορεί να αντιδράσει με διπλούς δεσμούς που υπάρχουν σε υδροϋπεροξείδια που παράγουν υπεροξυδιμερή, τα οποία είναι ασταθή προϊόντα και διασπώνται αυθόρμητα σχηματίζοντας είτε νέες ρίζες είτε α, β-ακόρεστες αλδεΰδες <sup>25</sup>. Εκτός από αυτά τα προϊόντα, παράγονται με οξειδωτικό θρυμματισμό των PUFA-PLs, κορεσμένα θραυσματοποιημένα είδη που περιέχουν τερματικές ομάδες καρβονυλίου, τα πιο κοινά μεταξύ των οποίων είναι τα οξονεννοϊκά και τα αζελαϊκά που σχηματίζονται από το λινελαϊκό οξύ, οξοαλεϊκό και γλουταρικό άλας που παράγονται από αραχιδονικό οξύ, ή το οξοβουτυρικό προϊόν από το εικοσιδυαεξανοϊκό οξύ<sup>22,26</sup>. Τα κορεσμένα θραυσματοποιημένα Ox-PLs μπορούν να σχηματιστούν με περαιτέρω οξείδωση των γ-υδροξυ (ή οξο) -α, β-ακόρεστων PLs επιπλέον του άμεσου σχηματισμού από υδροϋπεροξείδια <sup>22</sup>. Τα κορεσμένα θραυσματοποιημένα Ox-PLs δεν έχουν διπλούς δεσμούς και ως εκ τούτου είναι ανθεκτικά σε περαιτέρω οξείδωση καθώς η απουσία διπλών δεσμών εντός κατακερματισμένων αλυσίδων έχει ως αποτέλεσμα μειωμένη δραστικότητα αλδεΰδης που περιέχει κορεσμένα Ox-PLs σε σύγκριση με α, β-ακόρεστα θρυμματισμένα Ox-PLs.

#### 2.2.2 Μη ενζυμική οξείδωση των PL-PUFAs

Οι ενζυμικές και μη ενζυμικές μορφές υπεροξείδωσης των λιπιδίων στις βιομεμβράνες δεν εμφανίζονται ανεξάρτητα η μια από την άλλη. Μάλλον υπάρχει μια αμοιβαία ενεργοποίηση αυτών των διαδικασιών. Έτσι, λόγω μιας μηχανιστικής ιδιαιτερότητας της κατάλυσης της λιποξυγενάσης, η ενζυμική αντίδραση μπορεί να ξεκινήσει μόνο εάν δημιουργηθεί ένας ορισμένος «τόνος υδροϋπεροξειδίου», όπως για παράδειγμα μια σταθεροποιημένη συγκέντρωση υδροϋπεροξειδίων πάνω από μια συγκεκριμένη τιμή στην υπομικρομοριακή περιοχή. Τέτοιες ποσότητες υδροϋπεροξειδίων ως εκκινητές για διεργασίες λιποξυγονώσεως μπορούν εύκολα να παραχθούν με μη ενζυμική υπεροξείδωση λιπιδίων χαμηλού επιπέδου. Μόλις ξεκινήσει, η λιποξυγενάση παράγει περισσότερες υδροϋπεροξει αυ αυτόκαταλυτική διεργασία. Από την άλλη πλευρά, μια αντίδραση

που καταλύεται από τη λιποξυγενάση μπορεί να προκαλέσει μη ενζυμική υπεροξείδωση λιπιδίων στις βιομεμβράνες με διάφορους τρόπους δράσης (Σχήμα 2).



Εικόνα 2.1 Τα ενδιάμεσα του καταλυτικού κύκλου της λιποξυγενάσης προκαλούν μη ενζυμική υπεροξείδωση λιπιδίων σε βιομεμβράνες. Κατά τη διάρκεια αυτού του κύκλου σχηματίζονται ρίζες συνδεδεμένες με ένζυμα λιπαρών οξέων οι οποίες μπορούν κάτω από ορισμένες συνθήκες να διαχωριστούν από την ενεργό θέση και να ξεκινήσουν την υπεροξείδωση λιπιδίων. Περαιτέρω, το τελικό προϊόν αντίδρασης της λιποξυγενάσης, το υδροϋπεροξυ λιπαρό οξύ, μπορεί να αντιδράσει με Enz-Fell, που σχηματίζεται κατά τη διάσπαση ελευθέρων ριζών από την ενεργό θέση, παράγοντας έτσι ρίζα αλκοξυλίου η οποία με τη σειρά της μπορεί να προκαλέσει και μη ενζυμική υπεροξείδωση λιπιδίων. Η τελευταία αντίδραση είναι μέρος της δραστικότητας λιποϋδροπεροξειδάσης της λιποξυγενάσης της δραστικότητας λιποϋδροπεροξειδάσης της λιποξυγενάσης της δραστικότητας διπουσου και μη ενζυμική στη λιποξυγενάσης της δραστικότητας λιπουσου και μα ετη σειρά της μεταξύ άλλων σε χαμηλές συγκεντρώσεις οξυγόνου. (Πηγή <sup>27</sup>)

Αυτή η διαδικασία ξεκινά από ελεύθερες ρίζες ή από μη ριζικά δραστικά είδη οξυγόνου (ROS). Η αλυσιδωτή αντίδραση με τη μεσολάβηση των ελεύθερων ριζών ξεκινά από το σχηματισμό ριζών και / ή υδροϋπεροξειδίων των PUFAs (υπεροξείδωση των PUFAs). Λόγω της παρουσίας ομάδων μεθυλενίου ευρισκόμενων μεταξύ διπλών δεσμών (δισ-αλλυλικές ομάδες μεθυλενίου), τα PUFAs είναι περισσότερο ευαίσθητα στην οξείδωση σε σύγκριση με τα κορεσμένα λιπαρά οξέα. Ως αποτέλεσμα, χαρακτηρίζονται από εξασθενημένους δεσμούς υδρογόνου-άνθρακα. (i) Τώρα κατά το στάδιο έναρξης της υπεροξείδωσης των λιπιδίων , οι υπεροξυλίου (R• και ROO•), οι οποίες κάτω από ορισμένες συνθήκες μπορούν να απελευθερωθούν από την ενεργό θέση του ενζύμου. Η ελεύθερη ρίζα ROO•, με τη σειρά της, μπορεί να ξεκινήσει μη ενζυμική υπεροξείδωση λιπιδίων με την απομάκρυνση ενός υδρογόνου από τα δις-αλλυλικά μεθυλένια που υπάρχουν στις αλυσίδες πολυακόρεστων λιπαρών οξέων των φωσφολιπιδίων. (ii) Το τελικό προϊόν της λιποξυγενάσης είναι ένα υδροϋπεροξείδιο (ROOH), το οποίο μπορεί να μετατραπεί παρουσία ορισμένων καταλυτών (σύμπλοκα βαρέων μετάλλων, ημικινόνη, κλπ.) σε αντιδρώσες ελεύθερες ρίζες (ROO• ή RO•), οι οποίες εκκινούν και πάλι υπεροξείδωση λιπιδίων μέσω αφαίρεσης υδρογόνου.

### 2.3 Προϊόντα οξείδωσης φωσφολιπιδίων

Υπάρχει ένας μεγάλος αριθμός προϊόντων οξείδωσης φωσφολιπιδίων που σχηματίζονται από μία ποικιλία φωσφολιπιδίων που περιέχουν πολυακόρεστα λιπαρά οξέα. Έχουν αναγνωριστεί περισσότερα από 30 διαφορετικά προϊόντα βιοδραστικής οξειδώσεως που συσσωρεύονται σε αλλοιώσεις. Αντιπροσωπευτικά Ox-PL που έχουν μελετηθεί σε μεγαλύτερο βαθμό παρουσιάζονται στην Εικόνα 2.1. Επιπλέον, τα κοινά ονόματα σύμφωνα με την International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC) της θέσης sn-2 αυτών των φωσφολιπιδίων δίνονται στον Πίνακα 2.1. Τα Ox-PL περιέχουν κεκορεσμένα λιπαρά οξέα διαφορετικών μηκών στη θέση sn-1, είτε ακυλ-- είτε αλκυλ-- εστέρες και περιέχουν ομάδες φωσφατιδυλοχολίνης (PC), φωσφατιδυλοσερίνης ή φωσφατιδυλοαιθανολαμίνης <sup>28,29</sup>. In vitro τα Ox-PL έχουν παραχθεί χρησιμοποιώντας διάφορες μεθόδους οξείδωσης και όλες από αυτές να δίνουν ενεργά προϊόντα. Οι περισσότερες μελέτες αυτών των μορίων έχει γίνει σε προϊόντα οξειδώσεως φωσφολιπιδίων με αραχιδονικό ή λινολεϊκό άλας στη θέση sn-2. Ορισμένα Ox-PL περιέχουν προϊόντα κατακερματισμού αραχιδονικού ή λινολεϊκού οξέος ενώ άλλα περιέχουν παράγωγα αραχιδονικού και λινολεϊκού που έχουν οξυγονωθεί. Η δομή του λιπιδίου στη θέση sn-2 παίζει σημαντικό ρόλο στην αναγνώριση των Ox-PL από τους υποδοχείς. Γενικά, οι διαφορές στην ομάδα του λιπαρού οξέος της θέσης sn-1 των Ox-PL έχουν μικρές επιδράσεις στην δραστικότητα <sup>29</sup>. Τα φωσφολιπίδια που περιέχουν αλκύλιο και ακύλιο συνδέονται με διαφορετικές συγγένειες με τους υποδοχείς Ox-PL.



Εικόνα 2.2 Φωσφολιπίδια που περιέχουν οξειδωμένη φωσφατιδυλοχολίνη (Ox-PL). PC = 1-ακυλ-ο-2lyso-sn-γλυκερο-3-φωσφατιδυλοχολίνη. Μόνο η σύνθεση της θέσης sn-2 παρουσιάζεται για όλα τα Ox-PL εκτός από αυτά που σχηματίζουν έναν αιθερικό δεσμό στη θέση sn-1. Τα ονόματα κατά IUPAC για τα φωσφολιπίδια αυτά παρουσιάζονται στον Πίνακα 1. Ο PAF υποδεικνύει τον παράγοντα ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων. [HAz-PC, εξαδεκυλαζελοϋλ PC] [13-HODE-PC, 1-παλμιτοϋλ-2- (13 (S) -υδροξυ- (9Z, 11E) -οκταδεκα-9,11-διενοϋλ) -δν-γλυκερο-3-φωσφοχολίνη]. (Πηγή<sup>30</sup>)

<i>Sn-2</i> Common Name	Sn-2 IUPAC Name	ldentified/ Synthesized	NMR/MS Characterization
OV	5-oxovaleroyl	123	59, 123
G	glutaryl	123	123
HOOA	5-hydroxy-8-oxooct-6-enoyl	124, 125	124
HOHA	4-hydroxy-7-oxohept-5-enoyl	126, 127	126
KOdiA	7-carboxy-5-oxo-hept-6E- enoyl	128	128
12-HETE	12(S)-hydroxyeicosatetraenoyl	43, 129, 130	129, 130
13-HODE	13(S)-hydroxy-(9Z,11E)- octadeca-9,11-dienoyl	131, 132	59, 132
El	5,6-epoxyisoprostane E <sub>2</sub>	133-135	133
LGE <sub>2</sub>	levuglandin E <sub>2</sub>	136	136
8-isoPGE <sub>2</sub>	8-isoprostaglandin E <sub>2</sub>	137	137
Az	0-(9-carboxyoctanoyl)	75	75
9-HPETE	9-hydroperoxyeicosatetraenoyl	138	138

Πίνακας 2.1 Τα ονόματα της θέσης sn-2 των φωσφολιπιδίων κατά IUPAC (Πηγή<sup>30</sup>)

## 2.4 Οξειδωμένα φωσφολιπίδια και αθηροσκλήρωση

Το οξειδωτικό στρες και η οξείδωση των λιπιδίων θεωρούνται καθοριστικά γεγονότα στην πρόοδο της αθηροσκλήρωσης και των κλινικών επιπλοκών της. Ο ρόλος των προϊόντων οξείδωσης των φωσφολιπιδίων (Ox-PL) στην αθηρογένεση αρχικά βασίστηκε στην απόδειξη ότι οι προαθηρογενείς δραστικότητες της LDL ήπια οξειδωμένες από σίδηρο, μυελοϋπεροξειδάση ή λιποξυγενάση υπήρχαν στο κλάσμα που περιείχε οξειδωμένα φωσφολιπίδια<sup>28</sup>. Επιπλέον μελέτες σχετικά με τη συμμετοχή των οξειδωμένων λιπιδίων στην αθηρογένεση έδειξαν ότι η άπληστη δέσμευση της οξειδωμένης LDL (Ox-LDL) με τη μεσολάβηση κυρίως των υποδοχέων δέσμευσης μακροφάγων SR-A και CD36 προήγαγε τη

συσσώρευση λιπιδίων σε μακροφάγα και σχηματισμό αφρωδών κυττάρων σε αθηροσκληρωτικές πλάκες<sup>31,32</sup>, στο υπερλιπιδαιμικό πλάσμα<sup>29</sup> και σε αρκετές ασθένειες που εμφανίζουν προδιάθεση για καρδιακή προσβολή, συμπεριλαμβανομένου του λύκου και της ρευματοειδούς αρθρίτιδας<sup>33</sup>. Τα οξειδωμένα φωσφολιπίδια είναι επίσης παρόντα in vivo στη λιποπρωτεΐνη (α), σε μεμβράνες αποπτωτικών κυττάρων και σε κύτταρα που υφίστανται οξειδωτικό στρες<sup>28</sup>. Σήμερα αναγνωρίζεται ότι η Ox-LDL και οι κύριοι δραστικοί παράγοντες της, τα Ox-PLs μπορούν να έχουν πολλαπλές προαθηρογόνες επιδράσεις ενεργώντας σε διάφορους τύπους κυττάρων στο αίμα και στον αγγειακό τοίχωμα 34 (Εικόνα 2.3). Ο ρόλος των Ox-PLs στην αθηροσκλήρωση υποστηρίζεται από μελέτες που αποδεικνύουν την παρουσία Ox-PLs σε αθηροσκληρωτικά αγγεία υπερχοληστερολαιμικών ζωικών μοντέλων<sup>35</sup> και στις ανθρώπινες αλλοιώσεις. Διάφορα είδη Ox-PL έχουν τεκμηριωθεί σε διαφορετικά στάδια της αθηροσκλήρωσης σε διάφορες περιοχές των πλακών, συμπεριλαμβανομένων οξειδωτικώς τεμαχισμένων φωσφολιπιδίων που περιέχουν κορεσμένα και ακόρεστα κολοβωμένα κατάλοιπα, φωσφολιπίδ-εστεροποιημένα ισοπροστάνια, φωσφολιπιδικά υδροϋπεροξείδια και άλλα<sup>36</sup>. Οι ποσότητες Ox-PLs αυξάνουν αναλογικά με το φορτίο της πλάκας και σχετίζονται ειδικά με τις ασταθείς και τις ρήξεις προχωρημένων πλακών <sup>37</sup>.

Τα Ox-PLs συμβάλλουν σημαντικά στη φλεγμονή στα νοσούντα αγγεία τόσο με την επαγωγή έκφρασης προφλεγμονωδών κυτοκινών και μορίων προσκόλλησης στα αγγειακά ενδοθηλιακά κύτταρα όσο και με την προαγωγή της προσκόλλησης μονοκυττάρων και με δράση απευθείας στα λευκοκύτταρα <sup>21</sup>. Άλλες δραστικότητες των Ox-PLs που σχετίζονται με την έναρξη, την πρόοδο και την ανάπτυξη επιπλοκών της αθηροσκλήρωσης περιλαμβάνουν διέγερση της παραγωγής ROS, εξασθένηση ενδοθηλιακής εξαρτώμενης αγγειοχαλάρωσης, επαγωγή φαινοτυπικής διαμόρφωσης και μετανάστευσης κυττάρων λείων μυών, ενίσχυση θρομβογενετικής δραστικότητας ενδοθηλιακών κυττάρων, ενεργοποίηση αιμοπεταλίων , διέγερση απόπτωσης λείων μυϊκών κυττάρων και διέγερση ασβεστοποίησης αγγείων. Η ενεργοποίηση της αγγειογένεσης εντός της πλάκας και η αυξημένη παραγωγή μεταλλοπρωτεϊνασών με Ox-PLs συμβάλλει στην αποσταθεροποίηση των στεφανιαία σύνδρομα. Τα Ox-PLs μπορούν να διαμορφώνουν τις λειτουργίες των δενδριτικών κυττάρων

και των Τ-λεμφοκυττάρων και έτσι μπορούν να επηρεάσουν το αποτέλεσμα των ανοσολογικών αντιδράσεων. Υπό ορισμένες συνθήκες, τα Ox-PLs μπορούν επίσης να διεγείρουν τις διαδικασίες προστασίας των ιστών μέσω της αυξημένης ρύθμισης των γονιδίων απόκρισης στο στρες, την εξασθένιση της φλεγμονής και τη διατήρηση της λειτουργίας του ενδοθηλιακού φραγμού<sup>36</sup>.



Εικόνα 2.3 Ο ρόλος των οξειδωμένων φωσφολιπιδίων στην αθηροσκλήρωση (Πηγή<sup>38</sup>)

# Το βιοσύστημα του PAF

#### <u>3.1 Εισαγωγή</u>

Ο PAF (1-Ο-αλκυλ--2-ακετυλο-sn-γλυκερο-3-φωσφοχολίνη, παράγοντας ενεργοποίησης αιμοπεταλίων ) (εικόνα 3.1) είναι ένα βιολογικά δραστικό φωσφο-γλυκερο-αιθερο- λιπίδιο διαμεσολαβητής, με πολλούς φλεγμονώδεις και μη φλεγμονώδεις ρόλους<sup>39-41</sup> . Ο PAF εμπλέκεται σε πολλές φλεγμονώδεις ασθένειες, όπως είναι η θρόμβωση<sup>42</sup>, η πολλαπλή σκλήρυνση<sup>43</sup>, η οξεία πνευμονική βλάβη<sup>44</sup>, το άσθμα<sup>45</sup>, η αναφυλαξία<sup>46</sup> και η αθηρογένεση<sup>47</sup>. Κάτω από μη φλεγμονώδεις συνθήκες ο PAF διαδραματίζει σημαντικό ρόλο σε πολλές φυσιολογικές διαδικασίες όπως η αποικοδόμηση γλυκογόνου στον εμβρυϊκό πνεύμονα<sup>48</sup>, στην γονιμότητα<sup>49</sup>, στην μακροπρόθεσμη ενίσχυση των νευρώνων<sup>50</sup> και αποτελεί διαμεσολαβητή της μνήμης, του αγγειακού τόνου, της απόπτωσης και της αγγειογένεσης<sup>51</sup>.



Εικόνα 3.1 Δομή της 1-Ο-αλκυλ--2-ακετυλο-sn-γλυκερο-3-φωσφοχολίνης (PAF) όπως προτάθηκε από τον Cusack το 1980 στο περιοδικό Nature<sup>52</sup>.

Αν και ο PAF αρχικά θεωρήθηκε ως ένα ξεχωριστό μόριο, πλέον είναι ξεκάθαρο ότι ένας μεγάλος αριθμός φωσφολιπιδίων, όμοιων δομικά με τον PAF, ανήκουν στην οικογένεια PAF. Επιπρόσθετα η οικογένεια PAF συμπεριλαμβάνει και μόρια που έχουν παρόμοια δράση με τον PAF και δρουν μέσω του υποδοχέα του. Τα μόρια αυτά είτε έχουν διαφορετικό σκελετό ή πολική ομάδα ή δεν έχουν αλειφατική ανθρακική αλυσίδα στην sn-1 θέση ή διαθέτουν εντελώς διαφορετική χημική δομή. Μια πρώτη θεωρία που πλέον έχει εδραιωθεί, προτείνει ότι όλα αυτά τα μόρια φαίνεται να ανήκουν σε μια οικογένεια λιπαρών μορίων που έχουν διαφορετική προέλευση, ωστόσο έχουν κοινές βιολογικές δράσεις, προφανώς με διαφορετικούς ρόλους σε ζώα φυτά και μονοκύτταρους οργανισμούς<sup>53</sup>. Ο όρος παράγοντας ενεργοποίησης αιμοπεταλίων (platelet-activating factor) αρχικά χρησιμοποιήθηκε εξαιτίας της πρώτης δράσης του μορίου που παρατηρήθηκε, δηλαδή την ενεργοποίηση και της ικανότητας πολλών άλλων παραγόντων να ενεργοποιούν τα αιμοπετάλια, η αρχική του ονομασία πλέον δεν θεωρείται κατάλληλη.

#### **3.2 Μεταβολισμός του PAF**

#### 3.2.1 Βιοσύνθεση του ΡΑΕ

Διάφορα κύτταρα, συμπεριλαμβανομένων των αιμοπεταλίων, ουδετερόφιλων, μονοκυττάρων/μακροφάγων, λεμφοκυττάρων, βασεόφιλων, ηωσινόφιλων, μαστοκυττάρων και ενδοθηλιακών κυττάρων, παράγουν PAF συστηματικά ή υπό κατάλληλα ερεθίσματα. Ο PAF μπορεί να συντεθεί αυστηρά βάσει δυο εντελώς διαφορετικών ενζυματικών πορειών, της πορείας αναδιαμόρφωσης (remodeling) ή της πορείας de novo<sup>54</sup>.

Η πορεία αναδιαμόρφωσης (εικόνα 3.2) βασίζεται στην δομική τροποποίηση συνδεδεμένων με αιθέρα φωσφολιπιδίων, που περιέχουν χολίνη, που προ υπήρχαν και χρησίμευαν ως δομικά συστατικά των μεμβρανών. Έπειτα από κυτταρική διέγερση η κυτοπλασμική φωσφολιπάση A<sub>2</sub> (cPLA<sub>2</sub>) ενεργοποιείται και συνδέεται στα φωσφολιπίδια των μεμβρανών στα οποία υδρολύει το τμήμα λιπαρού ακυλίου που είναι εστεροποιημένο στη sn-2 θέση. Τα 2lyso-φωσφολιπίδια, που προκύπτουν, χρησιμεύουν ως υπόστρωμα για την lyso-PAFακυλοτρανσφεράση (lyso-PAF AT), ένα ένζυμο που μεταφέρει την ακετυλ-ομάδα από το ακετυλο-συνένζυμο Α (acetyl CoA) στα lyso-φωσφολιπίδια που αποδίδουν PAF. Ανάλογα με τον χημικό δεσμό στην sn-1 θέση, τα δυο ένζυμα της πορείας αναδιαμόρφωσης, c-PLA<sub>2</sub> και lyso-PAF AT, αναγνωρίζουν 3 υποκατηγορίες φωσφατιδυλοχολίνης (PC) ως υποστρώματα, ακυλ-PC (εστερικός δεσμός), αλκυλ-PC (αιθερικός δεσμός) και αλκενυλ-PC (βινυλ- αιθερικός δεσμός). Ο σχηματισμός του PAF μέσω της πορείας αναδιαμόρφωσης μπορεί να συνοδευθεί από την απελευθέρωση πολυακόρεστων λιπαρών οξέων (PUFAs) τα οποία στη συνέχεια μπορούν να μετατραπούν σε διάφορους ισχυρούς βιοδραστικούς εικοσανοειδείς διαμεσολαβητές. Εκτός της άμεσης από-ακυλίωσης των γλυκεροφωσφολιπιδίων της μεμβράνης, ένα άλλο μονοπάτι, για την παραγωγή των 2-lyso-φωσφολιπιδίων, έχει περιγραφεί. Σε αυτό, ο lyso-PAF μπορεί να προκύψει μέσω μιας ανεξάρτητης συνενζύμου A αντίδραση τρανσακυλίωσης μεταξύ αλκυλ-ακυλ-γλυκεροφωσφοχολίνης και ενός lysoφωσφολιπιδικού δέκτη που σχηματίστηκε μέσω της δράσης της PLA<sub>2</sub><sup>55 56</sup>. Αυτή η πορεία με την ανεξάρτητη συνενζύμου Α τρανσακυλάση (Coa IT) συμβάλλει στη ταυτόχρονη σύνθεση του PAF και κινητοποίηση του αραχιδονικού οξέος, μιας και είναι ειδική για τα είδη αλκυλο-χολινοφωσφογλυκερίδια που συνδέονται με το αραχιδονικό οξύ<sup>57</sup>.



Εικόνα 3.2 Πορεία αναδιαμόρφωσης προς σύνθεση του PAF (Πηγή<sup>58</sup>)

Η *de novo πορεία* (εικόνα 3.3) περιλαμβάνει μια αλληλουχία αντιδράσεων, ξεκινώντας με την ακετυλίωση και έπειτα αποφωσφορυλίωση του 1-Ο-αλκυλ-ο-sn-γλυκερο-3-φωσφορικού άλατος, το οποίο είναι ένα ενδιάμεσο, που σχηματίζεται μετά τη δημιουργία του αιθερικού δεσμού. Αυτές οι αντιδράσεις καταλύονται από ένα ακετυλο-συνένζυμο Α: αλκυλ-lyso-γλυκεροφωσφορική ακετυλοτρανσφεράση (ALPA AT) και μια αλκυλ--ακετυλ-γλυκεροφωσφορική φωσφοϋδρολάση, αντίστοιχα. Η παραγόμενη 1-Ο-αλκυλ-2-ακετυλ-γλυκερολη μετατρέπεται σε PAF από μια ειδική χολίνη την 1-αλκυλ-2-ακετυλ-sn-γλυκερο χολινο-φωσφοτρανσφεράση (PAF-CPT).

De Novo



Εικόνα 3.3 De novo πορεία σύνθεσης του PAF (Πηγή<sup>58</sup>)

Αργότερα αποδείχθηκε μια πορεία αναδιαμόρφωσης που δεν οφείλεται σε φλεγμονώδεις παράγοντες, ως πορεία σχηματισμού του PAF<sup>59</sup>. Η πορεία αυτή στηρίχτηκε σε μια νέα ανεξάρτητη-Ca<sup>+</sup> δραστικότητα lyso-PAF AT που παρατηρήθηκε στα πνευμόνια ποντικιών, καταλυόμενη από την LPCAT1. Ανάλογα με την συγκέντρωση του υποστρώματος, η LPCAT1 αναγνωρίζει ένα ευρύ πεδίο ακυλ-συνενζύμων Α ως υποστρώματα, από ακετυλ-συνένζυμο Α έως παλμιτοϋλ-συνένζυμο Α.

Έρευνες για τον ρόλο της LPCAT1 στην βιοσύνθεση του PAF έδειξαν ότι η LPCAT1 δεν ενεργοποιείται ούτε ρυθμίζεται από φλεγμονώδη ερεθίσματα σε σχέση με την lyso-PAF AT/LPCAT2. Επομένως, η LPCAT1 μπορεί να σχετίζεται με την μη-φλεγμονώδη παραγωγή του PAF. Τα ένζυμα που συμμετέχουν σε κάθε πορεία αναδιαμόρφωσης εκφράζονται διαφορετικά ανάλογα με τον τύπου του κυττάρου. Όπως αναφέρεται και σε προηγούμενο σημείο είχε προταθεί ότι ο PAF κατά κύριο λόγο βιοσυντίθεται από την κυτοπλασμική PLA<sub>2</sub> και την lyso-PAF AT/LPCAT2 στην φλεγμονώδη πορεία αναδιαμόρφωσης, ενώ στην νέα πορεία αναδιαμόρφωσης, που δεν σχετίζεται με φλεγμονή, συμμετέχουν κυρίως η PLA<sub>2</sub> και η LPCAT1.

Η πορεία αναδιαμόρφωσης παίζει σημαντικό ρόλο στην φλεγμονώδη απόκριση του PAF την ίδια στιγμή που η κλασική υπόθεση χρήζει αναθεώρησης καθώς τα φυσιολογικά επίπεδα του PAF, σε διάφορους ιστούς και στο αίμα, πιθανόν να καθορίζονται εκτός από την πορεία de novo και από τη νέα μη φλεγμονώδη πορεία αναδιαμόρφωσης.



Εικόνα 3.4 Στο πάνω τμήμα, η κλασσική υπόθεση όπου ο PAF παράγεται μέσω της οδού de novo υπό μη φλεγμονώδεις συνθήκες, ενώ βιοσυντίθεται μέσω της οδού αναδιαμορφώσεως υπό φλεγμονώδεις

συνθήκες. Στο κάτω τμήμα, Βρέθηκε μια νέα συνθετική οδός PAF, η οποία διαμεσολαβείται από μερικές PLA<sub>2</sub>s και LPCAT1. Αν και αυτή η οδός είναι μια οδός αναδιαμορφώσεως, δεν είναι φλεγμονώδης. Έτσι χαρακτηρίστηκε ως μη φλεγμονώδες μονοπάτι αναδιαμόρφωσης (που υποδεικνύεται με κεφαλή βέλους). (Πηγή<sup>59</sup>)

## 3.2.2 Καταβολισμός του ΡΑΕ

Το σημαντικότερο ένζυμο για τον περιορισμό της βιοδραστικότητας του PAF και των μορίων όπως ο PAF, είναι μια PAF-ειδική ακετυλοϋδρολάση (PAF AH), μια ανεξάρτητη των ιόντων ασβεστίου φωσφολιπάση A2(PLA2)60 , η οποία κόβει το κοντό τμήμα της ακυλ- αλυσίδας στη θέση sn-2 και σχηματίζει τον βιολογικά ανενεργό lyso-PAF<sup>61</sup>. Δύο κύριες μορφές της PAF-AH έχουν περιγραφεί, η εκκρινόμενη (πλάσματος) και η ενδοκυττάρια (κυτοσολική)62 . Η εκκρινόμενη (πλάσματος) PAF-AH αναφέρεται και ως GVIIA PLA<sub>2</sub>, λόγω της ιεραρχικής της θέσης στην VIIA υπεροικογένεια των PLA263. Η PAF-AH κυκλοφορεί στο πλάσμα στην ενεργό της μορφή συνδεδεμένη με τις λιποπρωτεΐνες και λόγω αυτής της ιδιότητας της ονομάζεται λιποπρωτεϊνική φωσφολιπάση A<sub>2</sub> (Lp-PLA<sub>2</sub>)<sup>64</sup>. Εναλλακτικά, μια ανεξάρτητη συνενζύμου Α PAF τρανσακετυλάση (TA), μεταφέρει την ακέτυλ-ομάδα κυρίως σε lyso-πλασμαλογόνα και άλλα lyso-φωσφολιπίδια<sup>65</sup>, μετατρέποντας τον lyso-PAF και ανάλογα του σε PAF. Το προαναφερθέν ένζυμο φαίνεται να έχει τρεις διαφορετικές καταλυτικές δράσεις<sup>66</sup>. Μπορεί να μεταφέρει την ακετυλ-ομάδα από τον PAF σε lyso-φωσφολιπίδια (TAL δράση), στη σφιγγοσίνη (TAS δράση) ή μπορεί να δράσει ως ακετυλοϋδρολάση, μετατρέποντας τον PAF σε lyso-PAF (AH δράση). Επιπλέον η λεκιθίνη: ακυλ-τρανσφεράση χοληστερόλης (LCAT), μεταφέρει την ακετυλ-ομάδα στα lyso-PC<sup>67</sup> εμφανίζει υδρολυτική δραστικότητα. Τέλος, η φωσφολιπάση C ή οι lysoφωσφολιπάσες Ι και ΙΙ καταβολίζουν τον ΡΑΕ. Ωστόσο ο συνολικός ρόλος των ενζύμων αυτών στην αποικοδόμηση του PAF δεν φαίνεται να είναι σημαντικός.

#### 3.3 Παθοφυσιολογία του PAF

Ο PAF συμμετέχει σε πολλές παθοφυσιολογικές συνθήκες ασκώντας ποικίλες δράσεις σε κύτταρα και ιστούς<sup>40 68</sup>. Η ποικιλία αυτή προκύπτει από το γεγονός ότι ένας μεγάλος αριθμός ερεθισμάτων, κυρίως θρομβωτικών και φλεγμονωδών, πυροδοτούν την παραγωγή του PAF μέσω των βιοσυνθετικών πορειών του. Η πληθώρα των δράσεων του PAF εξαρτάται επίσης από την ευρεία έκφραση του υποδοχέα του και την πολλαπλότητα των οδών μεταγωγής σήματος που επάγονται από τον PAF στα κύτταρα<sup>42</sup>.

Ο PAF είναι ένας φυσιολογικός διαμεσολαβητής της φλεγμονής, της αναπαραγωγής, της μνήμης, του αγγειακού τόνου, της απόπτωσης και της αγγειογένεσης. Η ακατάλληλη σηματοδότηση προλαμβάνεται από τις PAF AH<sup>62</sup>, που εξαλείφουν την δραστικότητα του PAF, καθώς και από ειδικού αναστολείς του PAF που μπλοκάρουν τις δράσεις του. Όταν οι οδοί απενεργοποίησης του PAF για κάποιο λόγο υποχωρήσουν, η υπερβολική σηματοδότηση του μέσω ειδικών υποδοχέων οδηγεί σε καταστάσεις που σχετίζονται με πολλές ασθένειες, όπως αλλεργία, άσθμα, αθηροσκλήρωση, διαβήτη, καρκίνο κ.α<sup>40 68</sup>.

#### <u>3.3.1 Ο PAF στην αθηροσκλήρωση</u>

Η αθηροσκλήρωση είναι μια χρόνια φλεγμονώδης νόσος που μπορεί να οδηγήσει σε σοβαρά κλινικά επεισόδια μέσω της ρήξης των αθηρωματικών πλακών και την θρόμβωση. Γνωστοί παράγοντες κινδύνου όπως ο διαβήτης, το κάπνισμα, οξειδωμένη LDL και η συστηματική φλεγμονή<sup>47</sup> έχουν ως κοινό χαρακτηριστικό τα αυξημένα επίπεδα PAF και λιπιδίων παρόμοια με τον PAF.

Ο PAF παίζει σημαντικό ρόλο σε κρίσιμα σημεία της αθηρογένεσης μεταξύ των οποίων η θρόμβωση, η φλεγμονή και η οξείδωση<sup>47 69</sup>. Ο PAF προάγει την οξείδωση<sup>70</sup> διεγείροντας μονοκύτταρα/μακροφάγα και ουδετερόφιλα να παράγουν ανιόντα σουπεροξειδίου και περοξείδια υδρογόνου που προκαλούν την οξείδωση της LDL. Επιπλέον ο PAF παράγεται στη διάρκεια της οξείδωσης της LDL<sup>71 72</sup> ενώ η PAF-AH προλαμβάνει την LDL από την οξείδωση της<sup>72 73</sup>.

Ο PAF συντίθεται από ενδοθηλιακά κύτταρα, τα οποία υπέστησαν φλεγμονή, και εκτίθεται στην επιφάνεια τους παροτρύνοντας την προσκόλληση λευκοκυττάρων στα ενδοθηλιακά κύτταρα<sup>40</sup>. Επίσης ο PAF αυξάνει την διαπερατότητα του ενδοθηλίου<sup>74</sup> επιτρέποντας μακρομόρια όπως η LDL, ox-LDL και κύτταρα να μεταναστεύσουν στον υπενδοθηλιακό χώρο. Τα αιμοπετάλια που έχουν προσκολληθεί στο ενδοθήλιο συνθέτουν PAF, ο οποίος παραμένει συνδεδεμένος εκεί και προκαλεί την προσκόλληση ουδετερόφιλων πάνω στο ενδοθήλιο [38]. Τα λευκοκύτταρα που έχουν προσκολληθεί ενεργοποιούνται από τις συντονισμένη δράση του PAF και της P-σελεκτίνης<sup>40</sup> και οδηγούνται υπενδοθηλιακά όπου λαμβάνουν φαινότυπο μακροφάγου. Τα μονοκύτταρα/μακροφάγα παράγουν κυτοκίνες και προσλαμβάνουν λιπίδια προς σχηματισμό αφρωδών κυττάρων. Ο PAF επίσης επάγει την σχάση της αθηρωματικής πλάκας μιας και τα ένζυμα αυτά αποικοδομούν συστατικά της εξωκυττάριας ύλης του έσω χιτώνα<sup>47</sup>.

#### 3.4 Λιποπρωτεινική φωσφολιπάση A2 (Lp-PLA2) ή PAF-ακετυλοϋδρολάση.

Οι ρυθμιζόμενες φλεγμονώδεις αποκρίσεις λειτουργούν αμυντικά και ομοιοστατικά, ενώ οι μη ρυθμιζόμενες αποκρίσεις έχουν επιβλαβή χαρακτήρα και επηρεάζουν την ομοιόσταση. Μόριο- κλειδί στη ρυθμιζόμενη και μη φλεγμονή είναι ο παράγοντας ενεργοποίησης αιμοπεταλίων (PAF)<sup>40,75</sup>, ο οποίος δομικά αναγνωρίζεται ως 1-αλκυλ--2-ακετυλ-sn-γλυκερο-3φωσφοχολίνη (Εικόνα 3.5 A), και στο λιγότερο φαρμακολογικά ενεργό ακυλ- ανάλογο του, την 1-ακυλ--2-ακετυλ-sn-γλυκερο-3-φωσφοχολίνη (Εικόνα 3.5 B). Αρκετά δομικά ανάλογα του PAF, που καλούνται PAF- μιμητικά μόρια, έχουν αναφερθεί και φαίνεται να συμμετέχουν στην φλεγμονή. Ωστόσο, όλα αυτά τα μόρια υδρολύονται στους βιολογικά ανενεργούς λυσο-PAF/λυσοφωσφατιδυλοχολίνη (Iyso-PC) μεταβολίτες από μια οικογένεια ενζύμων καλούμενη PAF ακετυλοϋδρολάση (PAF-AH)<sup>40,75–77</sup> (Εικόνα 3.6). Το ένζυμο της οικογένειας αυτής που βρίσκεται σε αφθονία και έχει μελετηθεί σε μεγαλύτερο βαθμό είναι η PAF-AH του πλάσματος (επίσης καλούμενη λιποπρωτεϊνική φωσφολιπάση A<sub>2</sub>, PLA<sub>2</sub>). Η πλειονότητα του ενζύμου του πλάσματος, περίπου 2/3, κυκλοφορεί στο πλάσμα συνδεδεμένο με τις LDL, ενώ το υπόλοιπο σχετίζεται με τις HDL και άλλες λιποπρωτεϊνες <sup>78</sup>. Η PAF-AH του πλάσματος καταλύει την υδρόλυση της ακετυλ- ομάδας (στην περίπτωση του PAF και ακυλ- PAF) ή άλλων υποκαταστατών της θέσης sn-2 που υπάρχουν στα οξειδωμένα φωσφολιπίδια, συμπεριλαμβανομένων και των PAF μιμητικών μορίων.



Εικόνα 3.5 Χημική δομή του PAF. Α: Αλκυλ- ανάλογο. Β: Ακυλ- ανάλογο. Ο αλκυλ- PAF έχει ένα μηυδρολυόμενο αιθερικό δεσμό στην sn-1 θέση με εξαδέκυλο ή οκταδέκυλο ομάδα και μια κοντή αλυσίδα ακετυλ ομάδας στην θέση sn-2. Το ακυλ- ανάλογο έχει μια ομάδα στην sn-1 θέση που είναι ευαίσθητη στην υδρόλυση. Το υπόλοιπο μόριο έχει κοινά χαρακτηριστικά. Το ακυλ- ανάλογο είναι κατά αρκετές φορές λιγότερο δραστικό από το αντίστοιχο αλκυλ- ανάλογο (Πηγή<sup>79</sup>)

Τρεις μορφές ισοενζύμων της PAF-AH έχουν χαρακτηριστεί ως σήμερα. Το ένα ανήκει στην υποοικογένεια PLA<sub>2</sub> της ομάδας VII που είναι η μορφή του πλάσματος, ενώ τα άλλα δυο ένζυμα ανήκουν στην ομάδα VIII και είναι ενδοκυτταρικά <sup>76,80,81</sup>. Αυτός ο εντοπισμός των ενζύμων δεν είναι αυστηρός, καθώς η PAF-AH του πλάσματος έχει βρεθεί ενδοκυτταρικά, και οι ενδοκυτταρικές ισομορφές της έχουν ανιχνευθεί ως κυκλοφορούν PAF-AH.



Εικόνα 3.6 Αποδόμηση του PAF σε lyso-PAF και οξειδωμένης PC σε lyso-PC από την PAF-AH. n=14-16  $(Πηγή^{82})$ 

# <u>3.4.1 Δομή της Lp-PLA<sub>2</sub> του πλάσματος</u>

Η ανθρώπινη Lp-PLA<sub>2</sub> του πλάσματος παράγεται ως μια πρωτεΐνη αποτελούμενη από 441 αμινοξέα. Μετά την αποκοπή ενός υδρόφοβου σηματοδοτικού πεπτιδίου με τη θέση σχάσης να βρίσκεται ανάμεσα στα κατάλοιπα Ala-17/Val-18 , η Lp-PLA<sub>2</sub> του πλάσματος εκκρίνεται στην κυκλοφορία. Η πρωτοταγής δομή της Lp-PLA<sub>2</sub>, είναι μοναδική, με την εξαίρεση μιας συναινετικής αλληλουχίας Gly-His-Ser-Phe-Gly στο καταλυτικό κέντρο του ενζύμου παρόμοια με αυτή που απαντάται στις σερινοεστεράσες και τις λιπάσες. Τα αμινοξέα Ser-273 της αλληλουχίας Gly-His-Phe-Gly και Asp-296 και His-351 συγκροτούν την καταλυτική τριάδα του ενζύμου<sup>83</sup>. Ο γραμμικός προσανατολισμός και η απόσταση των αμινοξέων Ser-273, Asp-296 και His351 είναι σύμφωνη με μια διαμόρφωση α/β υδρολάσης<sup>84</sup>. Τα χαρακτηριστικά αυτά υποδεικνύουν ότι η Lp-PLA<sub>2</sub> είναι δομικά και μηχανιστικά διαφορετική από τις άλλες PLA<sub>2</sub>, λόγω της ευρείας εξειδίκευσης υποστρώματος του ενζύμου αυτού. Η Lp-PLA<sub>2</sub> είναι Ν-γλυκοζυλιωμένη σε δύο κατάλοιπα ασπαραγίνης , Asp-423 και Asp-433 , και περιέχει 9 kDa ετερογενείς υδατανθρακικές αλυσίδες, στις οποίες περιλαμβάνεται και το σιαλικό οξύ<sup>64 85 86</sup>.

Οι παραπάνω παρατηρήσεις επιβεβαιώθηκαν από την κρυσταλλική δομή του ενζύμου που αναλύθηκε με περίθλαση ακτινών X σε ανάλυση 1.5Å<sup>87</sup> (Εικόνα 3.7).



Εικόνα 3.7 Δομή της Lp-PLA<sub>2</sub> (Πηγή<sup>88</sup>)

## 3.4.2 Το φάσμα των υποστρωμάτων της PAF-AH

Ένα χαρακτηριστικό γνώρισμα της PAF-AH, σε αντίθεση με άλλες PLA<sub>2</sub>s, είναι η απουσία απαίτησης ασβεστίου για την πλήρη ενζυμική του δραστηριότητα, η οποία της επιτρέπει να είναι συστατικά δραστική. Ένα άλλο χαρακτηριστικό της PAF-AH είναι η ανικανότητά του να υδρολύει άθικτα λιπαρά οξέα μακράς αλυσίδας στη θέση sn-2 των φωσφολιπιδίων. Αυτό επιτρέπει στην PAF-AH του πλάσματος να κυκλοφορεί χωρίς να προκαλεί οποιαδήποτε βλάβη στα κυτταρικά συστατικά ή στις λιποπρωτεΐνες <sup>40,80</sup>. Με καλύτερη κατανόηση της βιολογίας του PAF και της διαδικασίας της φλεγμονής, είναι πλέον σαφές ότι η εξειδίκευση του υποστρώματος της PAF-AH είναι πολύ χαλαρωμένη πέρα από τον PAF σε μια σειρά σχετικών μορίων. Ένα ακραίο παράδειγμα περιλαμβάνει πολύπλοκα φωσφολιπίδια όπως

υδροπεροξείδια φωσφολιπιδίων μακράς αλυσίδας και PC που περιέχουν ισοπροστάνιο<sup>89</sup> (Εικόνα 3.8).



Εικόνα 3.8 Χημική δομή μιας F<sub>2</sub> εστεροποιημένης PC με ισοπροστάνιο. Μια ογκώδης sn-2 ομάδα που προέρχεται από το αραχιδονικό οξύ υπάρχει στο φωσφολιπίδιο. Η PAF-AH το αναγνωρίζει ως υπόστρωμα, ωστόσο είναι αδύναμος προσδέτης για τον PAF-R. (Πηγή<sup>79</sup>)

Τέτοια τροποποιημένα φωσφολιπίδια έχουν ταυτοποιηθεί σε οξειδωμένες LDLs <sup>13,90,91</sup>. σε μοντέλα οξειδωτικής προσβολής, όπως το αλκοολικό αίμα<sup>92</sup>, το αίμα των καπνιστών<sup>93</sup> και οι ηλεκτροαρνητικές LDL<sup>94</sup> και σε μοντέλα δερματικής φλεγμονής<sup>95</sup>. Σημαντικά μεταξύ αυτών των λιπιδίων είναι τα οξειδωτικά κολοβωμένα φωσφολιπίδια βουτανοϋλ / βουτενοϋλ PAF / PC<sup>12</sup>, αζελαοϋλ PAF / PC<sup>96,97</sup>, παλμιτοϋλ γλουταροϋλ PC, παλμιτοϋλ οξοβαλερύλ PC<sup>82</sup>, KOdiA PC (1- (παλμιτοϋλ) -2- (5-κετο-6-οκτενο-διολ) φωσφατιδυλχολίνη)<sup>83</sup> και πολλά άλλα<sup>89</sup> (Πίνακας 3.1). Αν και ο PAF αναγνωρίζεται από τον υποδοχέα PAF (PAF-R) σε υπονανομοριακές συγκεντρώσεις<sup>90,98</sup>, ορισμένα από τα προαναφερθέντα μόρια προσδένονται επίσης στον PAF-R με ποικίλες συγγένειες για να ενεργοποιήσουν τον PAF-R, επομένως μόρια όπως τα PAF μιμητικά / παρόμοια με τον PAF λιπίδια<sup>90,97–99</sup>. Εντούτοις, αυτά τα οξειδωμένα φωσφολιπίδια συσσωρεύονται κατά τη διάρκεια της οξειδωτικής προσβολής, καθώς σχηματίζονται μη ενζυμικά, οδηγώντας σε υπερβολικές φλεγμονώδεις αποκρίσεις οι οποίες περιορίζονται επίσης από τη δράση της PAF-AH<sup>80,83,90</sup>.
Πίνακας 3.1 Η οξειδωτική προσβολή μέσω ελευθέρων ριζών παράγει ένα πλήθος κολοβωμένων φωσφολιπιδίων. Η οξειδωτικά τροποποιημένη LDL και αποπτωτικά κύτταρα είναι πλούσια σε τέτοιου είδους φωσφολιπίδια. Όλα αυτά είναι ευαίσθητα στην PAF-AH και επίσης αναγνωρίζουν τον PAF-R με ποικίλες δραστικότητες. (Πηγή<sup>79</sup>)



#### 3.4.3 Αθηροσκλήρωση και φλεγμονή

Η συχνότητα εμφάνισης καρδιαγγειακής νόσου σε άτομα χωρίς υπερχοληστερολαιμία κατά το πρόσφατο παρελθόν αποτελεί έναν αναμφισβήτητο λόγο να εξετάσουμε πέρα από τους παραδοσιακούς παράγοντες κινδύνου της αθηροσκλήρωσης. Επίσης, η αποτυχία των παραγόντων μείωσης των λιπιδίων να μειώσουν αποτελεσματικά τον κίνδυνο που σχετίζεται με την CVD γενικά έχει ωθήσει την επιστημονική κοινότητα να διερευνήσει την αθηροσκλήρωση σε μια νέα διάσταση, δηλαδή τη φλεγμονή<sup>100-102</sup>. Ένα κοινό χαρακτηριστικό των διαφόρων παραγόντων που προκαλούν αθηροσκλήρωση είναι το οξειδωτικό στρες<sup>103</sup>. Τα μόρια λιπιδίων που φέρουν PUFA εστεροποιημένα σε φωσφολιπίδια είναι ενεργειακά ευνοούμενοι στόχοι για οξείδωση. Έτσι, τα σωματίδια LDL που γενικά υπονοούνται στο CVD οξειδώνονται και δεν είναι πλέον φυσικά στο σώμα. Είναι η φύση του ανθρώπινου σώματος να καθαρίζει αποτελεσματικά μόρια ξένης φύσης. Το έμφυτο ανοσοποιητικό σύστημα ρυθμίζει αυτό το καθήκον τοποθετώντας μια φλεγμονώδη απόκριση<sup>92,93</sup>. Για την αποτελεσματική εξάλειψη της οξειδωμένης LDL, προσλαμβάνονται μονοκύτταρα / μακροφάγα. Κατά τη διάρκεια αυτής της φάσης η παγιδευμένη LDL υφίσταται περαιτέρω οξείδωση που οδηγεί σε ενδοθηλιακή δυσλειτουργία, σχηματισμό αφρωδών κυττάρων<sup>93</sup> και θέτει σε κίνηση έναν καταρράκτη γεγονότων που οδηγούν στο σχηματισμό αθηροσκληρωτικής βλάβης. Τα μακροφάγα, μια παραγωγική πηγή του PAF-AH, μπορεί να έχουν ζωτικό ρόλο στη μείωση των αποκρίσεων που μεσολαβούν από το PAF-R με την υδρόλυση των προσδεμάτων PAF-R και άλλων οξειδωμένων φωσφολιπιδίων κατά τη διάρκεια αυτών των συμβάντων <sup>104</sup>.

Όπως φαίνεται στην εικόνα 3.9, η PAF-AH είναι ενδεχομένως εμπλεκόμενη σε αρκετά κρίσιμα στάδια στην έναρξη και πρόοδο της αθηροσκλήρωσης. Από την στιγμή που η PAF-AH αποδομεί τον PAF και παρόμοια με τον PAF μόρια που παράγονται κατά την οξείδωση της LDL και την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων, προστατεύει το ενδοθήλιο από την προσκόλληση και μετανάστευση των λευκοκυττάρων στον έσω χιτώνα του αρτηριακού τοιχώματος <sup>105</sup>. Επιπλέον μπορεί να προστατεύει τα λεία μυϊκά κύτταρα από το να ενεργοποιηθούν από αυτά τα βιοδραστικά φωσφολιπίδια. Εν αντιθέσει, τα λυσοφωσφολιπίδια που παράγονται από την βράση της PAF-AH κατά την υδρόλυση του PAF και παρόμοιων με τον PAF μορίων (Εικόνα 3.6)

μπορεί να είναι επιβλαβή για τα αγγεία. Η φύση των υποδοχέων για τέτοιου είδους μόρια βρίσκεται ακόμα υπό έρευνα.



Εικόνα 3.9 Ο ρόλος της PAF-AH στον σχηματισμό αθηροσκληρωτικών πλακών. Η PAF-AH επηρεάζεται από την οξείδωση της LDL, έτσι το χρώμα αλλάζει από πορτοκαλί (ενεργό) στη φυσική LDL σε κίτρινο (λιγότερο ενεργό) στη MM-LDL και γκρι (ανενεργό) στην Ox-LDL. Συντομογραφίες: MM-LDL, ελάχιστα οξειδωμένη LDL. Ox-LDL, οξειδωμένη LDL. (Πηγή<sup>82</sup>)

#### <u>3.4.4 Το υπόστρωμα και τα παράγωγα δράσης της PAF-AH</u>

Ο PAF και τα κολοβωμένα οξειδωμένα φωσφολιπίδια, συμπεριλαμβανομένων των PAF μιμητικών μορίων, συγκαταλέγονται μεταξύ των κοινά ταυτοποιημένων υποστρωμάτων της PAF-AH του πλάσματος<sup>70-72,74,106,107</sup>. Ο PAF είναι ένας πρώτος μεσολαβητής της φλεγμονής που παράγεται γρήγορα με κατάλληλα προφλεγμονώδη ερεθίσματα<sup>36,70</sup>. Ο PAF ενεργοποιεί μια ποικιλία κυττάρων του έμφυτου ανοσοποιητικού συστήματος και ενισχύει τη μεταναστευτική και συγκολλητική συμπεριφορά αυτών των κυττάρων, επιτρέποντάς τους να μεταναστεύσουν μέσω του ενδοθηλιακού φράγματος του PAF μέσω της παράπλευρης σηματοδότησης <sup>108,109</sup>. Όντας ισχυρός, ο PAF ασκεί τις επιδράσεις του σε υπονανομοριακές συγκεντρώσεις μέσω ενός υποδοχέα συζευγμένης με πρωτεΐνη G (GPCR) της κυτταρικής επιφάνειας<sup>12,90</sup>. Έτσι, όχι μόνο η σύνθεση του PAF, αλλά και η μετέπειτα υδρόλυση του στο βιολογικά ανενεργό προϊόν, lyso-PAF / lyso-PC, με τη δράση της PAF-AH είναι ένας σημαντικός μηχανισμός που χρησιμοποιείται για την πρόληψη μιας υπερβολικής φλεγμονώδους απόκρισης<sup>110</sup>.

Το οξειδωτικό στρες οδηγεί σε μια ανεξέλεγκτη μη-ενζυμική χημική προσβολή των PUFA στα φωσφολιπίδια που δημιουργούν μια ομάδα PAF μιμητικών μορίων και άλλων οξειδωμένων φωσφολιπιδίων<sup>12,90</sup>. Σε μια θάλασσα από διάφορα άλλα προϊόντα οξείδωσης που παράγονται κατά την οξείδωση LDL, τα είδη βουτανοϋλίου και βουτενοϋλίου (Πίνακας 3.1) αντιπροσωπεύουν το μεγαλύτερο μέρος της δραστικότητας του PAF και αυτά τα PAF μιμητικά μόρια ταυτοποιήθηκαν να έχουν έως και το 1/10 της ισχύς του PAF<sup>12</sup>.

Τα οξειδωμένα φωσφολιπίδια θα μπορούσαν να είναι τμήμα της κυτταρικής μεμβράνης ή των λιποπρωτεϊνικών σωματιδίων. Και στις δύο περιπτώσεις, η παρακολούθηση της αποτελεσματικής απομάκρυνσής του από τη δράση της PAF-AH είναι σημαντική λόγω της βλάβης που προκαλεί σχηματίζοντας γραμμώσεις στις μεμβράνες<sup>111</sup>. Λαμβάνοντας υπόψη τις προφλεγμονώδεις ιδιότητες των υποστρωμάτων της PAF-AH, φαίνεται υψηλής σημασίας το ένζυμο να είναι το μέγιστο δραστικό για την προστασία των κυττάρων από την ανεξέλεγκτη οξειδωτική / φλεγμονώδη βλάβη. Από την άποψη αυτή, δεν αποτελεί έκπληξη το γεγονός ότι το ένζυμο είναι συστατικά ενεργό. Επιπλέον, η υπερέκφραση του ενζύμου παρέχει κυτταρική επιβίωση, το οποίο διαφορετικά θα υπέστη κυτταρικό θάνατο ως απάντηση στην οξειδωτική προσβολή<sup>112</sup>. Σύμφωνα με το σκεπτικό ότι αυτό το ένζυμο έχει προστατευτικό ρόλο,

ορισμένες μορφές της PAF-AH αλλάζουν ακόμη και την υποκυτταρική τους θέση για να επιτρέψουν ενδεχομένως την απομάκρυνση των PAF / PAF μιμητικών μορίων στην θέση της προέλευσής τους.

Η lyso-PC, το προϊόν της δράσης της PAF-AH όταν τα προϊόντα οξείδωσης του ακυλ- PAF / διακυλ-ο φωσφολιπιδίου είναι τα υποστρώματα, έχει κερδίσει μεγάλη προσοχή στο παρελθόν<sup>113</sup>. Αν και ο ακυλ- PAF είναι ένας μέτριος προσδέτης του PAF-R (είναι μόνο μερικές φορές λιγότερο δραστικό από το αντίστοιχο αλκυλ-), το υδρολυτικό του προϊόν, η lyso-PC, δεν είναι ένας αποτελεσματικός αγωνιστής PAF-R. Εντούτοις, πιστεύεται ότι η lyso-PC διαθέτει ποικίλες δραστικότητες όπως επαγωγή της σύνθεσης κυτοκίνης<sup>114</sup>, αυξημένη μετανάστευση μονοκυττάρων<sup>115</sup>, χημειοπροσέλκυση λείων μυϊκών κυττάρων<sup>116</sup> κ.α, και όλες οι διαδικασίες αυτές είναι δυνητικά προαθηρογενείς. Προς το παρόν, μια προφλεγμονώδης (επομένως προαθηρογόνος) ιδιότητα αποδίδεται επίσης στο lyso-PC / lyso-PAF που δεν αμφισβητεί μόνο την αντιφλεγμονώδη φύση της PAF-AH αλλά και την προφλεγμονώδη φύση των PAF / PAF μιμητικών μορίων<sup>117,118</sup>. Ωστόσο, ο χαρακτηρισμός "προφλεγμονώδης" δεν μπορεί να αποδοθεί στη lyso-PC για δύο απλούς λόγους. Πρώτον, η κανονική συγκέντρωση της lyso-PC στον ορό είναι μεταξύ 140 και 150 Μ, και αυτή η τιμή μπορεί να αυξηθεί κατά 40-50% λόγω της οξείδωσης των φωσφολιπιδίων ή μπορεί να φθάσει σε χιλιοστομοριακά επίπεδα στην περίπτωση των υπερλιπιδαιμικών ατόμων<sup>119,120</sup>. Το μεγαλύτερο μέρος αυτής της lyso-PC δεσμεύεται σε αλβουμίνη και σε σωματίδια λιποπρωτεϊνών. Εντούτοις, είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι η βέλτιστη συγκέντρωση της lyso-PC που απαιτείται για την πρόκληση των αναφερόμενων βιολογικών αποκρίσεων κυμαίνεται από 10-50 Μ. Έτσι, η συγκέντρωση της lyso-PC στο πλάσμα είναι ήδη υψηλότερη από την περιοχή δράσης της και η περαιτέρω προσθήκη lyso-PC θα πρέπει λογικά να είναι αναποτελεσματική.

# <u>3.4.5 «Φτιάχνοντας» και «σπάζοντας» τον PAF και τα PAF μιμητικά μόρια: Ένας αμφίδρομος</u> κύκλος του PAF και των PAF μιμητικών μορίων

Παρά το γεγονός ότι η lyso-PC δεν είναι προαθηρογόνος και η PAF-AH δεν αποτελεί αληθινό παράγοντα κινδύνου, το αν ο PAF-AH είναι φίλος ή εχθρός, εξακολουθεί να αποτελεί αντικείμενο συζητήσεων<sup>121,82</sup>. Είναι πιθανόν ότι τα συντριπτικά επίπεδα του ακυλ- PAF και των μιμητικών μορίων του μπορεί να έχουν κάποιο ρόλο στη μείωση της ενεργοποίησης του PAF-R. Στην πραγματικότητα, τα ενδοθηλιακά κύτταρα παράγουν κυρίως ακυλ- PAF όταν διεγείρονται με προφλεγμονώδεις αγωνιστές<sup>122,123</sup>. Σε κάθε κύτταρο που εμπλέκεται στη βιοσύνθεση του PAF, ο ακυλ- PAF αποτελεί ένα σημαντικό μέρος της ομάδας PAF υπό κανονικές συνθήκες και ο αλκυλ- ΡΑΕ αντιπροσωπεύει ένα πολύ μικρό κλάσμα. Αυτό ισχύει επίσης και σε συστήματα χωρίς κύτταρα που υφίστανται οξείδωση, όπως η οξείδωση της LDL<sup>12</sup>. Ο ακυλ- PAF μπορεί επίσης να δεσμεύσει και να ενεργοποιήσει τον PAF-R σε υψηλή συγκέντρωση και υδρολύεται από την ίδια PAF-AH που επίσης υδρολύει τον αλκυλ- PAF<sup>36,70,72</sup>. Η διαφορά στη σχετική αφθονία των δύο ειδών του PAF υπόκειται στη διαθεσιμότητα των προδρόμων μορίων. Πιστεύεται τώρα ότι ο PAF (ακυλ- και αλκυλ-) παράγεται συνεχώς σε βασικά επίπεδα ανεξάρτητα από ένα ερέθισμα που οφείλεται στην αναδιαμόρφωση μεμβράνης<sup>124</sup>. Όμως, η συνεχής σύνθεση PAF εξουδετερώνεται από την ιδιοσυστατική αποικοδόμηση από την PAF-ΑΗ<sup>117</sup> . Επίσης, αξίζει να σημειωθεί ότι ο ακυλ- ΡΑΓ είναι πολύ λιγότερο ισχυρός από τον αλκυλ- PAF και κατά την πρόσδεση στον PAF-R υποτίθεται ότι αδρανοποιεί τα κύτταρα. Αυτό είναι εμφανές από την παρατήρηση ότι η επεξεργασία με PLA1 ενός λιπιδικού εκχυλίσματος που έχει δραστικότητα που μοιάζει με του PAF αυξάνει τη δραστικότητά του αρκετές φορές μετά την απομάκρυνση των διακυλ-- PC συμπεριλαμβανομένων του ακυλ- PAF<sup>12</sup>.

Αυτά τα δύο χαρακτηριστικά είναι μεταξύ των ποικίλων αξιόλογων μηχανισμών που χρησιμοποιεί η φύση για να εξασφαλίσει την ομοιόσταση. Έτσι, ο ακυλ- PAF και τα ακυλ- PAF μιμητικά μόρια μπορούν να δράσουν ως βιολογικοί ανταγωνιστές του PAF-R υπό κανονικές συνθήκες για να διατηρήσουν τα ευαίσθητα σε PAF κύτταρα αδρανή. Η σύνθεση και η διάσπαση του αλκυλ- και του ακυλ- PAF μπορεί να θεωρηθεί ως ένας αμφίδρομος κύκλος του PAF (Εικόνα 3.10) που περιλαμβάνει δύο διαφορετικούς κύκλους ο καθένας από τους οποίους παράγει το αντίστοιχο είδος PAF. Ο ρυθμός των αντιδράσεων που παράγουν ακυλ- PAF είναι

υψηλότερος από εκείνον του αλκυλ- PAF. Έτσι, είναι προφανές ότι υπό κανονικές συνθήκες, οι δύο πορείες του κύκλου του PAF λειτουργούν με διαφορετικούς ρυθμούς. Λαμβάνοντας υπόψη την ισχύ του αλκυλ- PAF που δρα σε υπονανομοριακές συγκεντρώσεις έπειτα από ένα κατάλληλο προφλεγμονώδες ερέθισμα, είναι προφανές ότι ο ρυθμός παραγωγής του αλκυλ-PAF αυξάνεται σε μικρό βαθμό ενώ ο αυξημένος ρυθμός παραγωγής ακυλ- PAF είναι απίθανο να κάνει σημαντική διαφορά ως προς την ενεργοποίηση του PAF-R (Εικόνα 3.10). Έτσι, η τεράστια αφθονία του ακυλ- PAF τον καθιστά εφικτό ως τον προφανή στόχο της δράσης της PAF-AH. Υπό κανονικές συνθήκες, αν και η PAF-AH εμπλέκεται στην υδρόλυση του ακυλ- PAF, χαμηλά επίπεδα αλκυλ- PAF μπορεί να συνδέονται παροδικά με τον PAF-R. Ωστόσο, αυτά τα χαμηλά επίπεδα είναι απίθανο να προκαλέσουν φλεγμονώδη αντίδραση. Κατά την προφλεγμονώδη διέγερση, ο ρυθμός της σύνθεσης του ακυλ- PAF αυξάνεται όπως και η σύνθεση του αλκυλ- PAF.



Εικόνα 3.10 Αμφίδρομος κύκλος του PAF. Τα κύτταρα σε κατάσταση ηρεμίας σχηματίζουν μικρές ποσότητες αλκυλ- PAF (μικρότερο κύκλο) και σχετικά περισσότερο ακυλ- PAF (μεγαλύτερο κύκλο) από αλκυλ- / ακυλ- PC και διακυλ- PC, αντίστοιχα, μέσω δράσης PLA<sub>2</sub>. Μία μη ειδική συνθετάση PAF /

ακετυλοτρανσφεράση καταλύει τον σχηματισμό του ακυλ- PAF και αλκυλ- PAF. Η συνεχής υδρόλυση και των δύο αναλόγων από την PAF-AH καθιστά τον PAF μη ανιχνεύσιμο σε κύτταρα σε κατάσταση ηρεμίας. Με προφλεγμονώδη διέγερση, η σχετική αφθονία του αλκυλ- / ακυλ- PAF ανεβαίνει. Αυτή η αυξημένη ποσότητα PAF μπορεί να μην είναι επιρρεπής για αποτελεσματική υδρόλυση από την PAF-AH που τελικά οδηγεί στη συσσώρευση του PAF. Αν και ο ακυλ- PAF μπορεί να δράσει ως ανταγωνιστής PAF-R, η παροδική αυξημένη συσσώρευση του αλκυλ- PAF έναντι των βασικών επιπέδων μπορεί να προκαλέσει φλεγμονώδη αντίδραση. Κάτω από συνθήκες οξειδωτικής προσβολής, η οξειδωτική επίθεση (διακεκομμένες γραμμές) μπορεί να απενεργοποιήσει την PAF-AH, οδηγώντας σε δημιουργία κολοβωμένων οξειδωμένων φωσφολιπιδίων, όλα τα οποία είναι υποστρώματα της PAF-AH και μερικά από τα οποία είναι επίσης εξαιρετικά PAF-R προσδέματα (μιμητικά PAF). Ως εκ τούτου, η PAF-AH είναι ένας πραγματικός τερματιστής σήματος και είναι απίθανο να είναι ένας παράγοντας κινδύνου.(Πηγή<sup>79</sup>)

Τώρα η PAF-AH είναι απασχολημένη με την υδρόλυση συντριπτικών επιπέδων ακυλ- PAF, αφήνοντας τον αλκυλ- PAF να δεσμεύεται αποτελεσματικά με τον PAF-R, με αποτέλεσμα μια παροδική φλεγμονώδη αντίδραση. Κάτω από συνθήκες οξειδωτικής προσβολής, η οξειδωτική επίθεση που προκαλείται από ελεύθερες ρίζες δημιουργεί πληθώρα οξειδωμένων φωσφολιπιδίων, όλα από τα οποία είναι υποστρώματα της PAF-AH και μερικά από τα οποία είναι επίσης εξαιρετικά προσδέματα του PAF-R (μιμητικά PAF μόρια). Αυτά τα οξειδωμένα φωσφολιπίδια ενισχύουν τις φλεγμονώδεις αποκρίσεις. Η αποτυχία της PAF-AH για την αποτελεσματική υδρόλυση του PAF και των PAF μιμητικών μορίων λόγω της χαμηλής τους αφθονίας εν μέσω μίας ομάδας άφθονων αλκυλ- PAF και ακυλ- PAF μιμητικών μορίων μπορεί να οδηγήσει σε μία υπερβολική αλλά περιττή φλεγμονώδη απόκριση. Αυτό είναι εμφανές στα μοντέλα φλεγμονής των ποντικών, όπου πρέπει να χορηγηθούν τεράστιες ποσότητες ανασυνδυασμένης PAF-AH (περίπου 10 φορές έναντι των επιπέδων ενδογενούς PAF-AH) προκειμένου να παραχθεί ένας μη φλεγμονώδης φαινότυπος<sup>110,125</sup>. Μια ειδική συνθετάση PAF δεν έχει ακόμη περιγραφεί<sup>126</sup>. Έτσι, προτείνετε ότι η ασάφεια δεν αφορά τη φύση των προϊόντων που σχηματίζονται από την υδρολυτική δράση της PAF-AH ή τα αυξημένα επίπεδα

PAF-AH κατά τη διάρκεια των CVD, αλλά μάλλον την ετερογενή ομάδα μορίων που μπορούν να δράσουν ως αγωνιστές / ανταγωνιστές του PAF-R και ως υποστρώματα για την PAF-AH. Παραμένουμε εντελώς ενημερωμένοι για τη βιολογία αυτού του αινιγματικού μορίου.

#### 3.4.6 Δράση τρανσακετυλάσης της λιποπρωτεϊνικής φωσφολιπάσης A2 (PAF-AH)

Μελέτες έχουν δείξει ότι η PAF-AH είναι υπεύθυνη για τις δραστηριότητες ακετυλοϋδρολάσης και τρανσακετυλάσης<sup>127</sup>. Αυτή η δράση υπάρχει στην LDL και μεταφέρει οξικές ομάδες καθώς και μικρής αλυσίδας λιπαρά οξέα από τον PAF και τα αιθερικά και εστερικά ανάλογα του, στα αιθερικά-εστερικά λυσοφωσφολιπίδια<sup>127</sup>. Τέτοια δραστικότητα τρανσακετυλάσης μπορεί να υπερβαίνει την δραστικότητα ακετυλυδρολάσης παρουσία εξωγενώς προστιθέμενης συγκέντρωσης lyso-PLs ή παρουσία οξειδωτικών συνθηκών. Λόγω της σχετιζόμενης με LDL PAF-AH, μπορεί να σχηματιστεί παροδικά βιοενεργότητα τύπου PAF κατά την πρώτη ώρα της οξείδωσης LDL. Η βιοδραστικότητα του PAF συμβαίνει παρουσία εξωγενούς lyso-PAF, χωρίς χημική απενεργοποίηση της PAF-AH, ειδικά στο προ-αθηρογόνο μικρό, πυκνό υποκλάσμα LDL<sup>120</sup>.

Η ενζυμική μεταφορά οξικού από τα ανενεργά εστερικά ανάλογα σε lyso-PAF μπορεί επίσης να είναι υπεύθυνη για τον σχηματισμό εξωκυττάριας δραστικότητας PAF. Αυτό συμβαίνει επιπρόσθετα με το σχηματισμό εξωκυττάριας δραστικότητας PAF μέσω της χημικής υπεροξείδωσης των PLs με PUFAs εστεροποιημένα στη θέση sn-2 των μορίων. Η δράση τρανσακετυλάσης δεν έχει διευκρινιστεί πλήρως, έχει όμως ανιχνευθεί πρόσφατα στο αρτηριακό τοίχωμα, γεγονός που υποδηλώνει ότι διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην ρύθμιση των επιπέδων του PAF και των λυσοφωσφολιπιδίων κατά την αθηρογένεση.

## Μεθοδολογίες

# Προετοιμασία και ομογενοποίηση αρτηριακών τοιχωμάτων

### <u>Αρχή της μεθόδου</u>

Τα τεμάχια των αρτηριακών τοιχωμάτων (αορτές, μαστικές) που πάρθηκαν από ασθενείς που υποβλήθηκαν σε αορτοστεφανιαία παράκαμψη, μεταφέρονται σε άζωτο και στη συνέχεια φυλάσσονται στους -80°C. Τα τεμάχια ομογενοποιούνται στους 4°C σε διάλυμα ομογενοποίησης χρησιμοποιώντας υπερήχους (sonication). Το ομογενοποίημα φυγοκεντρείται και το υπερκείμενο περιέχει την ενζυμική δραστικότητα.

### <u>Αντιδραστήρια – Όργανα</u>

- Ηπαρίνη (Sigma-Aldrich), (Heparin sodium salt, Grade I-a: From Porcine Intestinal Mucosa) 56,5mg
- Chaps, (Sigma) MB=614,89 g/mol
- Αναστολείς πρωτεϊνασών: αντιπαΐνη (1mg), λουπεπτίνη (0,5mg)
- Συσκευή υπερήχων (sonication)
- Ψυχόμενη φυγόκεντρος για eppendorfs, Sigma 2K15 Bench Top refrigerated ultracentrifuge

### <u>Διαλύματα εργασίας</u>

- Ρυθμιστικό διάλυμα Hepes-EDTA, pH 7,4 : 1,0009gr Hepes (4,2mM), 8,0063gr NaCl (137mM), 0,1939gr KCl (2,6mM) και 0,7445gr Titriplex III (2mM EDTA) διαλύονται σε 1L dH<sub>2</sub>O. Το pH ρυθμίζεται στο 7,4 και το διάλυμα διατηρείται στους 4°C
- Διάλυμα Hepes-EDTA-Ηπαρίνη: Στο ρυθμιστικό διάλυμα Hepes-EDTA προσθέτω
  0,16mg/ml ηπαρίνη

- Διάλυμα Hepes-EDTA-Chaps : Στο ρυθμιστικό διάλυμα Hepes-EDTA προσθέτω 10mM
  Chaps
- Αναστολείς πρωτεϊνασών, αντιπαΐνη (1mg), λουπεπτίνη (0,5mg) : διαλύονται σε 1000μl
  διαλύματος Hepes-EDTA, pH 7,4 αντίστοιχα
- Διάλυμα Hepes-EDTA-Chaps-Αναστολείς πρωτεϊνασών : Στο διάλυμα Hepes-EDTA-Chaps
  προσθέτω 1μl/ml λουπεπτίνη και 1μl/ml αντιπαΐνη

### Πειραματική διαδικασία

Σε κάθε δείγμα αρτηρίας προστίθεται 0.5 ml διαλύματος Hepes-EDTA-Ηπαρίνη. Στη συνέχεια τα eppendorfs αναδεύονται ισχυρά σε Vortex και τοποθετούνται σε θερμοκρασία 4°C (παγόλουτρο). Ακολουθεί φυγοκέντρηση, σε φυγόκεντρο για eppendorfs, στις 12000 rpm για 2 min στους 7°C. Μετά το τέλος της φυγοκέντρησης, το υπερκείμενο απορρίπτεται και στο ίζημα προστίθεται 400μl από το διάλυμα Hepes-EDTA-Chaps-Αναστολείς πρωτεϊνασών και ακολουθεί ομογενοποίηση του στους 4°C χρησιμοποιώντας υπερήχους (sonication). Το ομογενοποίημα φυγοκεντρείται στην μικροφυγόκεντρο για eppendorfs, στις 12000rpm για 2 min στους 4°C και παραλαμβάνεται το υπερκείμενο συνολικού όγκου ~350μl το οποίο περιέχει την ενζυμική δραστικότητα της PAF-AH. Το υπερκείμενο καθώς και το ίζημα φυλάσσονται στους -80°C.

# Προσδιορισμός των πρωτεϊνών με τη μέθοδο BSA.

### <u>Αρχή της μεθόδου</u>

Τα ιόντα Cu<sup>2+</sup> ανάγονται αρχικά από τις πρωτεΐνες, σε αλκαλικό περιβάλλον, προς ιόντα Cu<sup>+</sup>, 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 <sup>2+</sup>  $\xrightarrow{OH-}$  Τετραχηλικό σύμπλοκο πρωτεΐνης -Cu <sup>1+</sup> Cu <sup>1+</sup> + 2 δισιχρονικό οξύ ( BSA)  $\longrightarrow$  BSA-Cu <sup>1+</sup> (μωβ χρώμα)

### <u>Αντιδραστήρια - Όργανα</u>

Ο προσδιορισμός γίνεται με την χρήση εμπορικής συσκευασίας BCA Protein Assay Kit που περιλαμβάνει τα παρακάτω:

- Αντιδραστήριο Α: Το αντιδραστήριο Α είναι μείγμα ανθρακικού νατρίου, διττανθρακικού νατρίου, δισιχρονικού οξεός 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)
- Οκτακάναλη πολυπιπέτα σταθερού όγκου 200μl (Costar)
- Μετρητής microELISA (Spectra MAX190, Molecular Devices)

### Διαλύματα εργασίας

 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, 1.5 mg/ml
 BSA. Τα πρότυπα διαλύματα διατηρούνται στους -20° C

### <u>Πειραματική διαδικασία</u>

Σε πλακίδιο ELISA 96 θέσεων τοποθετούνται 20μl από κάθε πρότυπο διάλυμα BSA (πρότυπη καμπύλη) καθώς και 10μl από ομογενοποιημένο δείγμα αρτηρίας. Στη συνέχεια προστίθενται με πολυπιπέτα 200μl του διαλύματος εργασίας σε κάθε θέση της πλάκας. Η πλάκα καλύπτεται με μεμβράνη, ανακινείται ήπια και επωάζεται στους 37°C για 30 min. Έπειτα εισάγεται στον μετρητή microElisa όπου καταγράφεται η απορρόφηση στα 562nm.

### Επεξεργασία των αποτελεσμάτων

Με βάση τις απορροφήσεις των πρότυπων δειγμάτων σχεδιάζεται με την βοήθεια ηλεκτρονικού υπολογιστή, η βέλτιστη ευθεία που έχει στον άξονα των Χ την συγκέντρωση των προτύπων σε BSA και στον άξονα τον Υ τις απορροφήσεις των προτύπων. Από την εξίσωση της πρότυπης καμπύλης:

### Απορρόφηση = a x συγκέντρωση + b

Όπου a και b οι συντελεστές της ευθείας γραμμής, και από τις απορροφήσεις των δειγμάτων υπολογίζονται τα mg/ml πρωτεΐνης που περιέχουν τα δείγματα.

# Δραστικότητα PAF τρανσακετυλάσης

### <u>Αρχή μεθόδου</u>

Η μέτρηση της δραστικότητας της τρανσακετυλάσης προσδιορίζεται με την μέθοδο εξαγωγής λιπιδίων κατά Bligh – Dyer. Στη συνέχεια τα ολικά λιπίδια υποβάλλονται σε TLC πάνω σε πλάκες silica gel G και αφήνονται να αναπτυχθούν σε ειδικό θάλαμο. Τα λιπίδια αναγνωρίζονται με σύντομη έκθεση σε ιώδιο. Οι ζώνες που αντιστοιχούν στα Rf των PAF και lyso-PAF ξύνονται, συλλέγονται, καθαρίζονται και ετοιμάζονται για υποβολή τους στο φασματογράφο μάζας (MS).

### <u>Αντιδραστήρια – Όργανα</u>

- Πρότυπο διάλυμα BSA 2,5mg/ml
- Διάλυμα Tris-HCl 10mM 0,05% EDTA ph 7,4
- (C16:0) PAF (1-Ο-εξαδέκυλο-2-ακετυλο-sn-γλυκερο-3-φωσφοχολίνη)10mg, MW 523,7 g/mol (Sigma)
- Lyso-PAF C-16-d4 (1-Ο-εξαδεκυλο-(7,7,8,8-d4)-sn-γλυκερο-3-φωσφοχολίνη) 500μg, MW
  485,7 g/mol (Sigma)
- Πιπέτες Pasteur
- Πλάκες silica gel G για TLC.
- Υδατόλουτρο 37°C
- Eppendorfs
- Μικροφυγόκεντρος για Eppendorf

### <u>Διαλύματα εργασίας</u>

- Διάλυμα PAF c-16 10mM: Τα 10mg PAF C-16 σε σκόνη διαλύονται σε 1,9ml αιθανόλης 80%. Το διάλυμα αποθηκεύεται στους -20°C
- Διάλυμα lyso-PAF C-16-d4 2mM : Στα 500μg προστίθενται 500μl αιθανόλης 80%. Το διάλυμα αποθηκεύεται στους -20°C

- Διάλυμα εργασίας PAF C-16: 64μl από τον PAF C-16: 10mM εξατμίζονται σε ροή αζώτου και στη συνέχεια προστίθενται 400μl 2,5gr/ml BSA.
- Διάλυμα εργασίας lyso-PAF C-16-d4: 120μl από τον lyso-PAF C-16-d4 2mM εξατμίζονται σε ροή αζώτου και στη συνέχεια προστίθενται 400μl 2,5gr/ml BSA.

Τα διαλύματα εργασίας PAF και lyso-PAF επωάζονται για 30 min στους 37°C ώστε να γίνει η κατάλληλη δέσμευση και όσο το δυνατόν πιο ποσοτικά , με την BSA. Μετά το πέρας των 30 min ακολουθεί ανάδευση στο Vortex και διατήρηση των δυο διαλυμάτων στους -20°C

#### Πειραματική Διαδικασία

Η αντίδραση γίνεται σε σωλήνες eppendorf όπου φέρονται 100μl από το υπερκείμενο του δείγματος (αορτής ή μαστικής) και προστίθενται: 20μl από το διάλυμα εργασίας του PAF, 20μl από το διάλυμα εργασίας του lyso-PAF και 260μl διάλυμα Tris-HCl 10mM – 0,05% EDTA ph 7,4. Οι συγκεντρώσεις στο τελικό διάλυμα είναι: 80μΜ PAF, 30μΜ lyso-PAF και 250μg/ml BSA σε όγκο διαλύματος 400μl. Ακολουθεί επώαση στους 37°C για 60 min σε υδρόλουτρο. Η αντίδραση σταματά με προσθήκη 1ml MeOH και τα δείγματα μεταφέρονται σε πάγο. Ακολουθεί εξαγωγή των λιπιδίων σύμφωνα με την μέθοδο Bligh and Dyer\* (για την μέθοδο Bligh & Dyer τα δείγματα μεταφέρονται από eppendorfs σε γυάλινους σωλήνες όσο το δυνατόν ποσοτικά). Σε κάθε σωλήνα προστίθεται 1ml χλωροφόρμιο και 500μl νερό, έπειτα ανάδευση στο Vortex περίπου 1 min και τέλος φυγοκέντρηση στις 2000 rpm για 10 min. Με το τέλος της φυγοκέντρησης, συλλέγεται η φάση με το χλωροφόρμιο χρησιμοποιώντας μια πιπέτα Pasteur (στο σημείο αυτό μπορεί να επαναληφθεί το προηγούμενο βήμα για ποσοτική συλλογή των λιπιδίων στην χλωροφορμική φάση). Ακολουθεί εξάτμιση της χλωροφορμικής φάσης μέχρι ξηρού σε ροή αζώτου υπό ήπιες συνθήκες, επαναιώρηση προσθέτοντας 200μl + 300μl χλωροφόρμιο και ανάδευση σε Vortex. Στη συνέχεια τα ολικά λιπίδια υποβάλλονται σε TLC πάνω σε πλάκες silica gel G χρησιμοποιώντας ως διάλυμα ανάπτυξης χλωροφόρμιομεθανόλη-νερό (65:35:6 v/v/v) και παραμένουν στο θάλαμο ανάπτυξης για περίπου 45-55 min. Τα λιπίδια αναγνωρίζονται έπειτα από έκθεση της πλάκας σε θάλαμο ιωδίου. Οι περιοχές σημειώνονται και ξύνονται από την πλάκα. Τα ξύσματα πλέον χωρίζονται σε PAF και lyso-PAF κάθε δείγματος. Ακολουθεί επαναιώρηση των ξυσμάτων σε χλωροφόρμιο-μεθανόλη-νερό

(1/2/1,8 ml), ανάδευση σε Vortex περίπου 1 min, φυγοκέντρηση στις 2000 rpm για 10min και συλλογή της χλωροφορμικής φάσης. Στη συνέχεια προστίθενται στη χλωροφορμική φάση 1ml χλωροφόρμιο και 1ml νερό και ακολουθεί ανάδευση σε Vortex και φυγοκέντρηση στις 2000 rpm για 10 min. Η χλωροφορμική φάση συλλέγεται και εξατμίζεται μέχρι ξηρού σε ροή αζώτου υπό ήπιες συνθήκες. Τέλος προστίθενται 200μl μεθανόλης, το δείγμα φέρεται και πάλι στην ροή αζώτου για να δημιουργηθεί ένα στρώμα αζώτου και αποφευχθεί η οξείδωση των λιπιδίων, πωματίζεται, σφραγίζεται με parafilm και αποθηκεύεται στους -20°C.

# Προσδιορισμός της ενεργότητας της PAF-ακέτυλουδρολάσης (Lp-PLA<sub>2</sub>)

### <u>Αρχή μεθόδου</u>

Η ενεργότητα της PAF-ακετυλοϋδρολάσης προσδιορίζεται με την μέθοδο ιζηματοποίησης με τριχλωροξεικό οξύ (TCA). Η μέτρηση της ενεργότητας PAF-AH πραγματοποιείται έμμεσα με την μέτρηση των ραδιοσημασμένων οξικών ομάδων που ελευθερώνονται κατά την υδρόλυση του υποστρώματος [<sup>3</sup>H]-PAF από το ένζυμο. Οι ομάδες αυτές παραμένουν στο υπερκείμενο κατά την καταβύθιση με TCA του παραγόμενου lyso-PAF καθώς και του [<sup>3</sup>H]-PAF που δεν διασπάστηκε, οι οποίοι βρίσκονται δεσμευμένοι σε BSA που μετουσιώνεται και καταβυθίζεται από το TCA. Η β ακτινοβολία που εκπέμπουν αυτές οι ομάδες μετριέται σε ειδικό μετρητή σπινθηρισμού και τέλος, με τη βοήθεια ειδικών μαθηματικών τύπων οι μετρούμενες κρούσεις μετατρέπονται σε ενζυμική ενεργότητα, η οποία εκφράζεται ως ο αριθμός των nmol του ραδιενεργού PAF που διασπάστηκαν από το ένζυμο στη μονάδα του χρόνου από μια συγκεκριμένη ποσότητα δείγματος.

### Αντιδραστήρια – Όργανα

- PAF (1-Ο-εξαδέκυλο-2-ακετυλο-sn-γλυκερο-3-φωσφοχολίνη), MW 523,7 g/mol (Sigma)
- [<sup>3</sup>H]-PAF [(1-Ο-εξαδέκυλο-2-[<sup>3</sup>H]-ακετυλο-sn-γλυκερο-3-φωσφοχολίνη), 0,25 mCi/0,5 ml, 10Ci/mmol) DuPont New England Nuclear, Boston,MA,USA]
- Τριχλωροξεικό οξύ (TCA,Merk)
- Αλβουμίνη βοδινού ορού ελεύθερη λιπαρών οξέων (FFA BSA, Sigma)
- Υδατόλουτρο 37°C
- Eppendorfs
- Μικροφυγόκεντρος για Eppendorf
- Φιαλίδια σπινθηρισμού χωρητικότητας 4ml
- Υγρό σπινθηρισμού, (Scintilation liquid Optiphase Hisafe 3)
- Μετρητής υγρού σπινθηρισμού, Packard (Tricarb 2100 TR)

### <u>Διαλύματα εργασίας</u>

- Διάλυμα 20mM PAF : 25mg σκόνης PAF διαλύονται σε 2,387ml 80% αιθανόλης. Το διάλυμα διατηρείται στους -20°C
- Διάλυμα 20% TCA : 20gr TCA διαλύονται σε 100ml dH<sub>2</sub>O. Το διάλυμα διατηρείται στους 4°C
- Διάλυμα 2,5mg/ml BSA : 25mg BSA διαλύονται σε 10ml φυσιολογικό ορό. Το διάλυμα διατηρείται στους -20°C
- Διάλυμα 100mg/ml BSA : 1gr BSA διαλύεται σε 10ml φυσιολογικό ορό. Το διάλυμα διατηρείται στους -20°C
- *Ρυθμιστικό διάλυμα Hepes, pH 7,4*: 1,0009gr Hepes (4,2mM), 8,0063gr NaCl (137mM), 0,1939gr KCl (2,6mM) και 0,7445gr Titriplex III (2mM EDTA) διαλύονται σε 1L dH<sub>2</sub>O. Το pH ρυθμίζεται στο 7,4 και το διάλυμα διατηρείται στους 4°C

 Διάλυμα 1000μΜ [<sup>3</sup>H]-PAF : Για τη μέτρηση της ενεργότητας PAF-AH στο πλάσμα, αναμιγνύονται σε πλαστικό σωληνάκι πολυπροπυλενίου 50μl από το διάλυμα 20mM PAF με 15μL από το πρότυπο διάλυμα [<sup>3</sup>H]-PAF. Εξατμίζεται η αιθανόλη μέχρι ξηρού σε ρεύμα αζώτου υπό ήπιες συνθήκες και το μίγμα PAF- [<sup>3</sup>H]-PAF αναδιασπείρεται σε 1ml του διαλύματος 2,5mg/ml BSA. Το μίγμα επωάζεται στους 37°C για 30 min ώστε ο PAF και ο [<sup>3</sup>H]-PAF να δεσμευτούν ποσοτικά στην BSA. Μετά το πέρας των 30 min αναδεύεται ισχυρά σε Vortex και διατηρείται στους -20°C

### Πειραματική διαδικασία

#### Προετοιμασία δειγμάτων

Ως πηγή του ενζύμου χρησιμοποιούνται:

- 50μΙ πλάσματος (αραιωμένο 1/50 v/v με ρυθμιστικό διάλυμα Hepes pH 7,4), τα οποία αναμιγνύονται με ρυθμιστικό διάλυμα Hepes pH 7,4 μέχρι τελικού όγκου 90μΙ
- 30 μΙ υπερκείμενου δείγματος μετά από ομογενοποίηση αρτηριακού τοιχώματος, τα οποία αναμιγνύονται με ρυθμιστικό διάλυμα Hepes pH 7,4 μέχρι τελικού όγκου 90μΙ
- Παράλληλα ετοιμάζεται και δείγμα ελέγχου (τυφλό) όπου περιέχει 90μl Hepes pH 7,4

#### Πειραματική Πορεία

Τα eppendorfs με τα δείγματα τοποθετούνται σε υδατόλουτρο στους 37°C. Η ενζυμική αντίδραση ξεκινά με την προσθήκη 10μl διαλύματος σε κάθε δείγμα καθώς και στα δείγματα του τυφλού. Μετά από ήπια ανάδευση ακολουθεί επώαση στο υδατόλουτρο, για 10min. Η τελική συγκέντρωση του [<sup>3</sup>H]-PAF στο μίγμα της αντίδρασης είναι 100μM. Μόλις συμπληρωθεί ο απαραίτητος χρόνος επώασης, η ενζυμική αντίδραση σταματά με την προσθήκη 20μl διαλύματος 100mg/ml BSA το οποίο βρίσκεται σε παγόλουτρο. Στη συνέχεια τα eppendorfs αναδεύονται ισχυρά σε Vortex και τοποθετούνται σε θερμοκρασία 4C (παγόλουτρο) για 15 min

τουλάχιστον. Έπειτα προστίθενται 80μl διαλύματος 20% TCA, το οποίο βρίσκεται σε παγόλουτρο, τα eppendorfs αναδεύονται ισχυρά σε Vortex και τοποθετούνται σε παγόλουτρο για τουλάχιστον 30 min. Ακολουθεί φυγοκέντρηση, σε μικροφυγόκεντρο για eppendorfs, στις 10000 rpm (7200xg) για 3,5 min ώστε να καταβυθιστούν οι πρωτεΐνες. Στη συνέχεια 100μl από το υπερκείμενο μεταφέρονται σε σωληνάκι σπινθηρισμού, προστίθενται 2ml υγρού σπινθηρισμού, το σωληνάκι αναδεύεται καλά και τοποθετείται στο μετρητή υγρού σπινθηρισμού. Η μέτρηση γίνεται για 3 min και τα αποτελέσματα δίνονται σε κρούσεις, cpm.

#### Υπολογισμός της ειδικής ενεργότητας

Ειδική ενεργότητα είναι ο αριθμός των κρούσεων που αποδίδει κάθε nmol [<sup>3</sup>H]-PAF 100μM (cpm/nmol). Για τον υπολογισμό της ειδικής ενεργότητας σε σωληνάκι σπινθηρισμού τοποθετούνται 10μl διαλύματος 1000μM [<sup>3</sup>H]-PAF και προστίθενται 2ml υγρού σπινθηρισμού – αυτό θεωρείται το πρότυπο δείγμα. Το σωληνάκι αναδεύεται καλά και τοποθετείται στο μετρητή υγρού σπινθηρισμού όπου μετρούνται οι κρούσεις. Έτσι τα 10μl [<sup>3</sup>H]-PAF 100μM περιέχουν 10nmol [<sup>3</sup>H]-PAF, άρα:

Ειδική Ενεργότητα =  $\frac{cpm}{10}$ 

#### Υπολογισμός ενζυμικής ενεργότητας

Στο μετρητή υγρού σπινθηρισμού μετρούνται οι κρούσεις των 100μl του δείγματος (cpm<sub>δ</sub>) και του δείγματος ελέγχου (cpm<sub>τ</sub>). Πριν από την μέτρηση υπήρχε συνολικός όγκος 200μl, ο οποίος δίνει 2 x cpm<sub>δ</sub> κρούσεις από τις οποίες αφαιρούνται οι κρούσεις που οφείλονται στο δείγμα ελέγχου (τυφλό) 2 x cpm<sub>τ</sub>. Άρα οι καθαρές κρούσεις που οφείλονται στο δείγμα είναι 2 x (cpm<sub>δ</sub> - cpm<sub>τ</sub>). Έτσι η ενεργότητα της PAF-AH υπολογίζεται από τον παρακάτω τύπο:

### Eνεργότητα PAF-AH = $[2 \times (cpm_{\delta} - cpm_{\tau}) \times 1000] / E.E \times \alpha \times \beta$

#### <u>Όπου</u> :

cpm<sub>δ</sub> : είναι οι κρούσεις που αποδίδουν τα 100μl κάθε δείγματος

cpm<sub>τ</sub> : είναι οι κρούσεις που αποδίδουν τα 100μl τυφλού

**Ε.Ε** : είναι η ειδική ενεργότητα του διαλύματος του [<sup>3</sup>H]-PAF

**1000** : είναι ο συντελεστής για την μετατροπή των μg πρωτεΐνης σε mg, ή των μl διαλύματος που χρησιμοποιήθηκε ως πηγή ενζύμου σε ml

α : είναι τα μg πρωτεΐνης ή τα μl εναιωρήματος

**β** : είναι ο χρόνος επώασης του δείγματος σε min

Έτσι η ενεργότητα της PAF-AH εκφράζεται ως nmol του [<sup>3</sup>H]-PAF που αποικοδομούνται ανά mg πρωτεΐνης ή ανά ml διαλύματος που χρησιμοποιήθηκε ως πηγή ενζύμου ανά λεπτό.

# Προσδιορισμός της μάζας της Lp-PLA2

### <u>Αρχή της μεθόδου</u>

To diaDexus PLACR Test είναι ένας κλασσικός ανοσοπροσδιορισμός ELISA τύπου σάντουιτς στον οποίο χρησιμοποιούνται 2 ειδικά μονοκλωνικά αντισώματα που έχουν περιγραφεί από τους Caslake et al. Για τον άμεσο προσδιορισμό συγκέντρωσης της Lp-PLA<sub>2</sub> στο ανθρώπινο πλάσμα και ορό.

### Αντιδραστήρια όργανα

Ο προσδιορισμός γίνεται και με την χρήση εμπορικής συσκευασίας diaDexus PLAC<sup>R</sup> Test kit που περιλαμβάνει τα παρακάτω:

- Πλακίδιο ELISA καλυμμένο με mouse μονοκλωνικό anti-Lp-PLA<sub>2</sub> (2C10) αντίσωμα
- Πρότυπα διαλύματα 1,2,3,4,5,6 (0,50,100,250,1000 ng/ml)
- Διάλυμα έκλυσης 20Χ 5ml αυτού αναμιγνύονται με 95 ml dH<sub>2</sub>O
- Δευτερογενές αντίσωμα (Conjugate) (μονοκλωνικό mouse anti-LpPLA<sub>2</sub> (4b4) αντίσωμα επισημασμένο με υπεροξειδάση αγριοραπανιού). Το διάλυμα αυτό έχει χρώμα πορτοκαλί.
- Υπόστρωμα TMB (3,3',5,5'- τετραμεθυλοβενζιδίνη)
- Διάλυμα διακοπής της αντίδρασης (1N HCL)
- Πολυπιπέτα μεταβαλλόμενου όγκου 20-200μl Costar
- Μετρητής micro ELISA (SpectraMAX 190, Molecular Devices)

### Πειραματική διαδικασία

Όλα τα αντιδραστήρια αφήνονται να αποκτήσουν θερμοκρασία δωματίου πριν την χρήση τους.

- Προστίθενται 20 μl από το κάθε calibrator, control και δείγμα (ομογενοποιημένο δείγμα αρτηρίας) σε κάθε θέση του πλακιδίου
- Επώαση για 10 ± 2 min σε θερμοκρασία δωματίου
- Προσθήκη 200ml Conjugate σε κάθε θέση του πλακιδίου
- Επώαση για 3h σε θερμοκρασία δωματίου
- Στο τέλος του χρόνου επώασης αποχύνονται τα δείγματα. Ακολουθεί έκπλυση του πλακιδίου 4 φορές με 300μl/well με το διάλυμα έκπλυσης
- Ακολουθεί προσθήκη 100 μl του υποστρώματος TMB
- Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 20 min στο σκοτάδι
- Προστίθενται 100 ml από το διάλυμα διακοπής της αντίδρασης

Η μέτρηση γίνεται μέσα σε 15 λεπτά από την προσθήκη του διαλύματος διακοπής της αντίδρασης.

### Επεξεργασία των αποτελεσμάτων

Με τη βοήθεια του λειτουργικού προγράμματος του microELISA απεικονίζεται η πρότυπη καμπύλη με τις απορροφήσεις των προτύπων στα 450nm στον άξονα ψ και τις συγκεντρώσεις της Lp-PLA<sub>2</sub> (ng/ml) στον άξονα x. Με βάση αυτή την καμπύλη και τις απορροφήσεις των δειγμάτων υπολογίζονται κάθε φορά οι συγκεντρώσεις της μάζας της Lp-PLA<sub>2</sub>.

Οι τιμές απορρόφησης που λαμβάνονται για κάθε πρότυπο δείγμα φαίνονται στον πίνακα.\*\*\*

Lp-PLA <sub>2</sub> (ng/ml)	Απορρόφηση στα 450nm
0	0.048
50	0.348
100	0.623
250	1.269
500	1.868
1000	2.402

### Έκφραση αποτελεσμάτων

Με βάση την πρότυπη καμπύλη και τις απορροφήσεις των δειγμάτων υπολογίζονται οι συγκεντρώσεις της μάζας της Lp-PLA<sub>2</sub> και τα αποτελέσματα εκφράζονται σε ng/ml υγρού βάρους ιστού για τα ομογενοποιημένα δείγματα αρτηρίας.

# Ιστορικό ασθενούς

Για το σχολιασμό των αποτελεσμάτων θα ληφθεί πλήρης ιστορικό των ασθενών (λιπιδαιμικό προφίλ, εξετάσεις αίματος), των οποίων τα δείγματα εξετάστηκαν, από την κλινική ώστε να ληφθούν υπόψιν παράγοντες που επηρεάζουν τις τιμές που εξετάζονται στο παρών πείραμα.

### Αποτελέσματα

### Χαρακτηριστικά πληθυσμού μελέτης

Στη μελέτη χρησιμοποιήθηκαν δείγματα αθηρωματικών αορτών και υγειών μαστικών αρτηριών από 8 ασθενείς με στεφανιαία νόσο που υποβλήθηκαν σε αορτοστεφανιαία παράκαμψη.

Στα δείγματα μετρήθηκε η ενεργότητα της δράσης τρανσακετυλάσης της Lp-PLA<sub>2</sub> στο αρτηριακό τοίχωμα καθώς έγινε και συσχετισμός με την ενεργότητα δράσης ακετυλοϋδρολάσης και μάζας της Lp-PLA<sub>2</sub> στο αρτηριακό τοίχωμα σύμφωνα με προηγούμενη σχετική μελέτη. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται με σχήματα και αντιπροσωπευτικούς πίνακες όλων των πειραματικών διαδικασιών.

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η εκτίμηση των επιπέδων της Lp-PLA<sub>2</sub> και των δυο δράσεων της (ακετυλοϋδρολάσης και τρανσακετυλάσης) και ο παθοφυσιολογικός ρόλος της στην αθηρογένεση καθώς έχουν προταθεί τόσο προαθηρογόνες όσο και αντιαθηρογόνες δράσεις της. Ιδιαίτερα στην συγκεκριμένη εργασία, εκτενέστερη μελέτη έγινε στην δράση τρανσακετυλάσης της λιποπρωτεϊνικής φωσφολιπάσης A<sub>2</sub>.

# <u>Δημιουργία πρότυπης καμπύλης στο LC/MS-MS για τον προσδιορισμό της</u> συγκέντρωσης του PAF-d4.

Η PAF ακετυλοϋδρολάση (PAF-AH ή Lp-PLA<sub>2</sub>) κατέχει τόσο την δραστικότητα ακετυλοϋδρολάσης όσο και αυτήν της τρανσακετυλάσης. Η δράση της τρανσακετυλάσης (CoA independent PAF transacetylase, TA), μεταφέρει μικρών αλυσίδων λιπαρά οξέα από τον PAF και τα κοντινά του αιθερικά- και εστερικά- ανάλογα σε αιθερ/εστερ lyso-φωσφολιπίδια. Επομένως η ενζυμική μεταφορά οξικού από ανενεργά εστερικά ανάλογα σε lyso-PAF ή lysoανάλογα του PAF πιθανόν να είναι υπεύθυνη για το σχηματισμό εξωκυττάριας

βιοδραστικότητας του PAF, ενός λιπιδίου που συμμετέχει στην αθηροσκλήρωση σε πολλά σημεία της και με ποικίλους τρόπους.

Η αντίδραση που μελετήθηκε στην παρούσα εργασία είναι η παρακάτω:

#### Aκέτυλο-PC + Lyso-PAF (ή ανάλογα) $\rightarrow$ Lyso-PC + PAF (ή ανάλογα)

Πιο συγκεκριμένα στα δείγματα ομογενοποιημένης αρτηρίας προστέθηκε PAF (ως δότης της ακετυλ-ομάδας) και lyso-PAF δευτεριωμένος (lyso-PAF C-16-d4). Ως προϊόν της αντίδρασης αναμένεται δευτεριωμένος PAF (PAF C-16-d4) τον οποίο και προσδιορίσαμε στο φασματογράφο μάζας LC/MS-MS Orbitrap.

Σε πρώτο στάδιο κατασκευάστηκε η πρότυπη καμπύλη (εικόνα 5.1) στην οποία χρησιμοποιήθηκαν διάφορες συγκεντρώσεις PAF-C16 (0,5 ,1, 2, 3, 4 ppm). Σε αυτές υπολογίστηκε η ένταση απορρόφησης του οργάνου σε μια μικρή περιοχή της κλίμακας m/z ανάμεσα στα 545 και τα 554. Η επιλογή αυτού του εύρους έγινε προς απόκλιση όσο περισσοτέρων παράσιτων κορυφών που πιθανόν να έδιναν μεγαλύτερη απορρόφηση από τη ζητούμενη του PAF-d4 στα 550-551 m/z (MW PAF: 523,7 + 23 (MW Na) + 4D = 550.7) (υπάρχει πιθανότητα να εμφανισθούν κορυφές και στα 548 , 549 που αντιστοιχούν στο PAF-d2 ή PAFd3, καθώς η ανταλλαγή υδρογόνου με δευτερίου είναι δυνατή)



Εικόνα 5.1 Πρότυπη καμπύλη έντασης απορρόφησης/ συγκέντρωση PAF ( η τιμή στα 3ppm αποκλείστηκε λόγω μεγάλης απόκλισης).

Σε επόμενο στάδιο τα ομογενοποιημένο δείγματα μετά την εξαγωγή λιπιδίων κατά Bligh-Dyer και το διαχωρισμό σε πλάκες TLC, από όπου προήλθαν τα κλάσματα lyso-PAF και PAF, οδηγήθηκαν στο φασματογράφο μάζας και ορισμένα από τα φάσματα παραθέτονται παρακάτω. Για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης του PAF-d4, υπολογίσθηκαν οι εκάστοτε συγκεντρώσεις του PAF-d4 τόσο στα φάσματα των κλασμάτων lyso-PAF όσο και στα φάσματα των κλασμάτων PAF και στο τέλος οι τιμές προστέθηκαν. Αυτό συνέβη έπειτα από παρατήρηση στα τυφλά δείγματα, ότι ο PAF και ο lyso-PAF δεν διαχωρίζονται πλήρως και στα φάσματα και των δυο κλασμάτων υπάρχει συγκέντρωση PAF-d4 (εικόνες 5.2 και 5,3).



Εικόνα 5.2 Φάσμα μάζας περιοχής PAF τυφλού δείγματος.



Εικόνα 5.3 Φάσμα μάζας περιοχής lyso-PAF τυφλού δείγματος.



Εικόνα 5.4 Φάσμα μάζας περιοχής PAF δείγματος αθηρωματικής αορτής.



Εικόνα 5.5 Φάσμα μάζας περιοχής lyso-PAF δείγματος αθηρωματικής αορτής.





Εικόνα 5.7 Φάσμα μάζας περιοχής lyso-PAF δείγματος μαστικής αρτηρίας.

#### Επίπεδα ενεργότητας τρανσακετυλάσης της Lp-PLA<sub>2</sub> στο αρτηριακό τοίχωμα

Η λιποπρωτεϊνική φωσφολιπάση A<sub>2</sub>, μέλος της υπεροικογένειας ενζύμων που ονομάζονται φωσφολιπάσες A<sub>2</sub>, βρίσκεται στο ανθρώπινο πλάσμα κυρίως συνδεδεμένη με την χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνη (LDL). Η σχέση της Lp-PLA<sub>2</sub> με τα καρδιαγγειακά, κ όχι μόνο, νοσήματα έχει μελετηθεί σε πολλές έρευνες ωστόσο ο ακριβής ρόλος του ενζύμου στο πλάσμα και στο αρτηριακό τοίχωμα είναι ακόμα υπό διερεύνηση.

Πειραματικά μετρήθηκε η ενεργότητα της δράσης τρανσακετυλάσης του ενζύμου Lp-PLA<sub>2</sub> και έγινε συσχετισμός με τα επίπεδα και την ενεργότητα της δράσης ακετυλοϋδρολάσης ,

σύμφωνα με σχετική έρευνα. Τα δείγματα αρτηριακού τοιχώματος (αορτή και μαστική αρτηρία) που συλλέχθηκαν κατά την επέμβαση, εκπλύθηκαν με διάλυμα HEPES-EDTA pH=7,4, ομογενοποιήθηκαν με υπερήχους στον πάγο με διάλυμα ομογενοποίησης HEPES-EDTA-CHAPS και ακολούθησε φυγοκέντρηση για την απομάκρυνση του ιζήματος το οποίο φυλάχθηκε στους -20°C. Στο υπερκείμενο έγινε προσδιορισμός ολικής πρωτεΐνης και στη συνέχεια μετρήθηκε η ενεργότητα της δράσης τρανσακετυλάσης του ενζύμου στο φασματογράφο μάζας (LC/MS-MS).



Σχήμα 5.1 Επίπεδα ενεργότητας της δραστικότητας τρανσακετυλάσης της Lp-PLA<sub>2</sub> στο αρτηριακό τοίχωμα. p<0.01 σε σύγκριση με τις μαστικές

Σύμφωνα με τα παραπάνω αποτελέσματα παρατηρούμε ότι η ενεργότητα της δράσης τρανσακετυλάσης της Lp-PLA<sub>2</sub> είναι υψηλότερη στις αορτές (1.319 ± 0,623 pmol/min/mg υγρού βάρους ιστού) σε σχέση με τις μαστικές (0,901 ± 0,486 pmol/min/mg υγρού βάρους ιστού) (p<0,01) (σχήμα 5.1).



Σχήμα 5.2 Επίπεδα ενεργότητας της δραστικότητας ακετυλοϋδρολάσης της Lp-PLA<sub>2</sub> στο αρτηριακό τοίχωμα. p<0.04 σε σύγκριση με τις μαστικές

Προηγούμενη μελέτη έδειξε ότι η ενεργότητα δράσης ακετυλοϋδρολάσης της Lp-PLA<sub>2</sub> ήταν υψηλότερη στις μαστικές (0,224 ± 0,149 nmol/min/mg πρωτεΐνης) σε σχέση με τις αορτές (0,125 ± 0,079 nmol/min/mg πρωτεΐνης) (σχήμα 5.2). Η μάζα του ενζύμου ήταν κατά πολύ υψηλότερη στις αορτές (2,353 ± 3,743 ng/mg πρωτεΐνης) σε σχέση με τις μαστικές (0,061 ng/mg πρωτεΐνης)(σχήμα 5.3).



Σχήμα 5.3 Επίπεδα μάζας της Lp-PLA2 στο αρτηριακό τοίχωμα. p<0.05 σε σύγκριση με τις μαστικές

Τα στοιχεία της προηγούμενης μελέτης χρησιμοποιήθηκαν, ωστόσο στην παρούσα μελέτη επιλέχθηκε η αναγωγή των ενεργοτήτων να γίνει ανά mg υγρού βάρους ιστού. Επομένως τα αποτελέσματα της προηγούμενης μελέτης προσαρμόστηκαν στη παρούσα, με μια σχέση μετατροπής των mg πρωτεΐνης σε mg υγρού βάρους ιστού. Από το βάρος των ιστών και την πρωτεΐνη κάθε δείγματος προτάθηκε μια ημιποσοτική σχέση πρωτεΐνης/βάρους ιστού και υπολογίστηκε ένας <u>συντελεστής 0,0068 ± 0,002</u>. Κάθε αποτέλεσματα εκφράστηκαν σε pmol/min/mg υγρού βάρους ιστού για την ενεργότητα και pg/mg πρωτεΐνης για την μάζα αντίστοιχα. Έτσι υπολογίστηκε η ενεργότητα δράσης ακετυλοΰδρολάσης της Lp-PLA<sub>2</sub> στις μαστικές (1,543 ± 0,149 pmol/min/mg υγρού βάρους ιστού) και στις αορτές (0,854 ± 0,079 pmol/min/mg υγρού βάρους ιστού) σε και στις μαστικές (0,420 pg/mg υγρού βάρους ιστού) (σχήμα 5.5).



Σχήμα 5.4 Επίπεδα ενεργότητας της δραστικότητας ακετυλοϋδρολάσης της Lp-PLA<sub>2</sub> στο αρτηριακό τοίχωμα. p<0.04 σε σύγκριση με τις μαστικές



Σχήμα 5.4 Επίπεδα μάζας της Lp-PLA2 στο αρτηριακό τοίχωμα. p<0.05 σε σύγκριση με τις μαστικές

# ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6

### <u>ΣΥΖΗΤΗΣΗ</u>

Φαίνεται ότι πολλά στοιχεία του συστήματος του PAF εμπλέκονται ενδεχομένως στη παθοφυσιολογία του ανθρώπινου αρτηριακού τοιχώματος. Παράγοντες όπως οι δραστικότητες της PAF ακετυλοϋδρολάσης και της PAF τρανσακετυλάσης μελετήθηκαν στη εργασία αυτή, στην οποία χρησιμοποιήθηκαν αορτές με αθηροσκληρωτικές βλάβες και εσωτερικές μαστικές αρτηρίες απαλλαγμένες από βλάβες από τους ίδιους ασθενείς. Τα δείγματα αυτά κρίθηκαν κατάλληλα για τη διερεύνηση της συμβολής των δράσεων της PAF ακετυλοϋδρολάσης και της τρανσακετυλάσης στην πρόοδο της αθηροσκλήρωσης.

Η PAF-AH είναι υπεύθυνη όχι μόνο για τη δραστικότητα της ακετυλοϋδρολάσης αλλά και για τη δραστικότητα της τρανσακετυλάσης. Η τελευταία είναι ικανή να μεταφέρει λιπαρά οξέα βραχείας αλυσίδας από PAF και κοντινά αιθερικά και εστερικά του ανάλογα σε αιθερικά/ εστερικά LysoPLs. Η δραστικότητα της τρανσακετυλάσης περιγράφηκε σε σωματίδια LDL και μπορεί να θεωρηθεί ως μία ενζυμική οδός για σχηματισμό εξωκυτταρικού PAF. Στην παρούσα μελέτη εντοπίσαμε δραστηριότητα τρανσακετυλάσης στις αρτηρίες, υπόθεση που συνάδει με προηγούμενες μελέτες. Στις νοσούσες αορτές, η δραστικότητα της τρανσακετυλάσης ήταν υψηλότερη από ότι στις μαστικές και περίπου στα ίδια επίπεδα με τη δραστικότητα ακετυλοϋδρολάσης. Ωστόσο, αυτή η διαφορά δεν κατέληξε σε στατιστική σημασία. Στις εσωτερικές μαστικές αρτηρίες, η δραστικότητα της τρανσακετυλάσης ήταν στα ίδια επίπεδα με τη δραστικότητα της ακετυλοϋδρολάσης.

Όσον αφορά τον PAF (C16:0), ο σχηματισμός του οφείλεται, εκτός από την υπεροξείδωση, και στην ενζυμική δραστικότητα της PAF τρανσακετυλάσης. Η τρανσακετυλάση μπορεί να μεταφέρει είτε την ακέτυλο ομάδα από την ακετυλο-PC (ή άλλη ομάδα από ανάλογα PC) σε lyso-PAF προς σχηματισμό PAF (η αναλόγων του). Οξειδωτικώς τροποποιημένη φωσφατιδυλοχολίνη, κατά την υδρόλυση από PAF-AH, παράγει lyso-PC η οποία όπως αναφέρθηκε στο κεφάλαιο 2 διαθέτει ποικίλες δραστικότητες όπως επαγωγή της σύνθεσης

κυτοκίνης<sup>114</sup>, αυξημένη μετανάστευση μονοκυττάρων<sup>115</sup>, χημειοπροσέλκυση λείων μυϊκών κυττάρων<sup>116</sup> κ.α, και όλες οι διαδικασίες αυτές είναι δυνητικά προαθηρογενείς.

Σύμφωνα με παλιότερη μελέτη (Tsoukatos D. et al 2001 <sup>120</sup>) το οξειδωτικό στρες που ασκείται μαζί με την πρόσληψη και την ενεργοποίηση των προ-φλεγμονωδών κυττάρων στο μέσο αρτηριοσκληρωτικών αρτηριών μπορεί να εξηγήσει την υψηλότερη συσσώρευση του lyso-PAF στις αορτές. Η θετική συσχέτιση μεταξύ της δραστικότητας της τρανσακετυλάσης και της συσσώρευσης lyso-PAF στις αρτηρίες μπορεί να είναι εξηγείται από την παρουσία υψηλών ποσοτήτων lyso-PAF και από τις συνθήκες στις οποίες ευνοείται η δραστικότητα της τρανσακετυλάσης.

Επιπλέον, η οξειδωτική τροποποίηση της LDL, η μετανάστευση μονοκυττάρων στο τοίχωμα του αγγείου, και κατ' επακόλουθο η ενεργοποίηση μακροφάγων και ο σχηματισμός αφρωδών κυττάρων είναι βασικά σημεία στην παθογένεση της αθηροσκλήρωσης. Αρκετά χαρακτηριστικά του συστήματος PAF που αναφέρθηκαν στο κεφάλαιο 3 δηλώνουν ότι ο PAF παίζει σημαντικό ρόλο σε κρίσιμα σημεία της αθηρογένεσης μεταξύ των οποίων η θρόμβωση, η φλεγμονή και η οξείδωση<sup>47 69</sup>. Ο PAF προάγει την οξείδωση<sup>70</sup> διεγείροντας μονοκύτταρα/μακροφάγα και ουδετερόφιλα να παράγουν ανιόντα σουπεροξειδίου και περοξείδια υδρογόνου που προκαλούν την οξείδωση της LDL.

Τέλος, το ζήτημα του προ- ή αντι-αθηρογόνου ρόλου της PAF-AH παραμένει ανοικτό. Τα in vivo αποτελέσματα σύμφωνα με την μελέτη (Tsoukatos D. et al 2001 <sup>120</sup>) προτείνουν έναν διπλό ρόλο PAF-AH. Οι μη-αθηρογενείς ιδιότητες των μαστικών αρτηριών μπορεί εν μέρει να οφείλονται σε χαμηλό σχηματισμό PAF που ρυθμίζεται από δραστικότητα της PAFακετυλοϋδρολάσης. Ο ρυθμιζόμενος σχηματισμός PAF μπορεί να παίζει αντι-αθηρογόνο ρόλο μέσω της ενεργοποίησης των μακροφάγων. Αυτή η ενεργοποίηση μπορεί στη συνέχεια να απομακρύνει την οξειδωμένη LDL και τα προϊόντα αποικοδόμησης. Στο άρρωστο αρτηριακό τμήμα των αορτών, υπό συνθήκες οξειδωτικού στρες και πιθανόν συσσώρευση lyso-PAF, με ταυτόχρονη οξείδωση και απενεργοποίηση της PAF-AH και συσσώρευση της οξειδωμένης και υδρολυτικά απενεργοποιημένης μορφής του ενζύμου μπορεί να συμβάλει σε μια

ανισορροπία μεταξύ δραστικοτήτων ακετυλοϋδρολάσης και τρανσακετυλάσης μπορεί να συμβάλλει στον μη ρυθμιζόμενο σχηματισμό PAF και στην πρόοδο της αθηροσκλήρωσης.

Σαν επόμενος ερευνητικός στόχος και συνέχεια της παρούσης εργασίας μπορεί να θεωρηθεί μια πιο ολοκληρωμένη έρευνα που θα περιλαμβάνει : i) Μελέτη ιστορικού του ασθενούς (λιπιδαιμικό προφίλ και παράγοντες που επηρεάζουν το οξειδωτικό στρες), ii) έλεγχος ενός αναλόγου του PAF, του αραχιδονοϋλ-PAF και η πιθανή δράση του στην πρόοδο της αθηροσκλήρωσης και σε συσχετισμό με την δράση του PAF.
## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- 1. Tousoulis, D. *et al.* Pathophysiology of atherosclerosis: the role of inflammation. *Curr. Pharm. Des.* **17**, 4089–4110 (2011).
- 2. Libby, P., Ridker, P. M. & Hansson, G. K. Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis. *Nature* **473**, 317–325 (2011).
- 3. Tabas, I., Williams, K. J. & Borén, J. Subendothelial lipoprotein retention as the initiating process in atherosclerosis: Update and therapeutic implications. *Circulation* **116**, 1832–1844 (2007).
- 4. Bayes-Genis, A., Conover, C. A. & Schwartz, R. S. The insulin-like growth factor axis: A review of atherosclerosis and restenosis. *Circ. Res.* **86**, 125–130 (2000).
- 5. Conti, P., Barbacane, R. C. & Reale, M. Chemokines in inflammatory states. *Allergy Asthma Proc.* **20**, 205–208 (1999).
- 6. Bui, Q. T., Prempeh, M. & Wilensky, R. L. Atherosclerotic plaque development. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **41**, 2109–2113 (2009).
- Stemerman, B. Y. M. B. & Ross, R. Published October 1, 1972 EXPERIMENTAL ARTERIOSCLEROSIS I. FIBROUS PLAQUE FORMATION IN PRIMATES, AN ELECTRON MICROSCOPE STUDY. 136, 769–789 (1972).
- 8. Tabas, I. Macrophage death and defective inflammation resolution in atherosclerosis. *Nat. Rev. Immunol.* **10**, 36–46 (2010).
- 9. Falk, E. Why do plaques rupture? *Circulation* **86**, III30-42 (1992).
- 10. Libby, P. Molecular and cellular mechanisms of the thrombotic complications of atherosclerosis. *J. Lipid Res.* **50**, S352–S357 (2009).
- 11. Libby, P. & Ridker, P. M. Inflammation and Atherothrombosis. From Population Biology and Bench Research to Clinical Practice. *J. Am. Coll. Cardiol.* **48**, (2006).
- 12. Deigner, H.-P. & Hermetter, A. Oxidized phospholipids: emerging lipid mediators in pathophysiology. *Curr. Opin. Lipidol.* **19**, 289–294 (2008).

- 13. Watson, A. D. *et al.* Structural identification by mass spectrometry of oxidized phospholipids in minimally oxidized low density lipoprotein that induce monocyte/endothelial interactions and evidence for their presence in vivo. *J. Biol. Chem.* **272**, 13597–13607 (1997).
- 14. Subbanagounder, G. *et al.* Determinants of bioactivity of oxidized phospholipids. Specific oxidized fatty acyl groups at the sn-2 position. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **20**, 2248–2254 (2000).
- 15. Yoshimi, N. *et al.* Oxidized phosphatidylcholine in alveolar macrophages in idiopathic interstitial pneumonias. *Lung* **183**, 109–121 (2005).
- 16. Nakamura, T., Henson, P. M. & Murphy, R. C. Occurrence of oxidized metabolites of arachidonic acid esterified to phospholipids in murine lung tissue. *Anal. Biochem.* **262**, 23–32 (1998).
- 17. Tsimikas, S. *et al.* Oxidized phospholipids, Lp(a) lipoprotein, and coronary artery disease. *N. Engl. J. Med.* **353**, 46–57 (2005).
- Huber, J. *et al.* Oxidized membrane vesicles and blebs from apoptotic cells contain biologically active oxidized phospholipids that induce monocyte-endothelial interactions. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 22, 101–107 (2002).
- Chang, M.-K. *et al.* Apoptotic Cells with Oxidation-specific Epitopes Are Immunogenic and Proinflammatory. *The Journal of Experimental Medicine* 200, 1359–1370 (2004).
- Subbanagounder, G. *et al.* Hydroxy alkenal phospholipids regulate inflammatory functions of endothelial cells. *Vascul. Pharmacol.* 38, 201–209 (2002).
- 21. Bochkov, V. N. Inflammatory profile of oxidized phospholipids. *Thromb. Haemost.* **97,** 348–354 (2007).
- 22. Podrez, E. A. *et al.* Identification of a novel family of oxidized phospholipids that serve as ligands for the macrophage scavenger receptor CD36. *J. Biol. Chem.* **277**, 38503–38516 (2002).
- 23. Gugiu, B. G. et al. Identification of oxidatively truncated ethanolamine

phospholipids in retina and their generation from polyunsaturated phosphatidylethanolamines. *Chem. Res. Toxicol.* **19**, 262–271 (2006).

- Hoff, H. F., O'Neil, J., Wu, Z., Hoppe, G. & Salomon, R. L. Phospholipid hydroxyalkenals: biological and chemical properties of specific oxidized lipids present in atherosclerotic lesions. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 23, 275–282 (2003).
- Schneider, C., Porter, N. A. & Brash, A. R. Routes to 4-Hydroxynonenal: Fundamental Issues in the Mechanisms of Lipid Peroxidation. *The Journal of Biological Chemistry* 283, 15539–15543 (2008).
- 26. Gu, X. *et al.* Oxidatively truncated docosahexaenoate phospholipids: total synthesis, generation, and Peptide adduction chemistry. *J. Org. Chem.* **68**, 3749–3761 (2003).
- 27. Nigam, S. & Schewe, T. Phospholipase A 2 s and lipid peroxidation. **1488**, 167–181 (2000).
- 28. Schewe, T., Halangk, W., Hiebsch, C. & Rapoport, S. M. A lipoxygenase in rabbit reticulocytes which attacks phospholipids and intact mitochondria. *FEBS Lett.* **60**, 149–152 (1975).
- 29. Schewe, T., Wiesner, R. & Rapoport, S. M. Lipoxygenase from rabbit reticulocytes. *Methods Enzymol.* **71 Pt C**, 430–441 (1981).
- 30. Lee, S. *et al.* Role of Phospholipid Oxidation Products in Atherosclerosis. 778–799 (2012). doi:10.1161/CIRCRESAHA.111.256859
- 31. Glass, C. K. & Witztum, J. L. Atherosclerosis. the road ahead. *Cell* **104**, 503–516 (2001).
- 32. Steinberg, D. Atherogenesis in perspective: hypercholesterolemia and inflammation as partners in crime. *Nat. Med.* **8**, 1211–1217 (2002).
- Bryant, R. W., Bailey, J. M., Schewe, T. & Rapoport, S. M. Positional specificity of a reticulocyte lipoxygenase. Conversion of arachidonic acid to 15-S-hydroperoxy-eicosatetraenoic acid. *J. Biol. Chem.* 257, 6050–6055 (1982).
- 34. Berliner, J. A., Leitinger, N. & Tsimikas, S. The role of oxidized phospholipids

in atherosclerosis. *Journal of Lipid Research* **50**, S207-12 (2009).

- Briley-Saebo, K. C. *et al.* Targeted Molecular Probes for Imaging Atherosclerotic Lesions With Magnetic Resonance Using Antibodies That Recognize Oxidation-Specific Epitopes. *Circulation* **117**, 3206–3215 (2008).
- 36. Bochkov, V. N. *et al.* Generation and Biological Activities of Oxidized Phospholipids. *Antioxidants & Redox Signaling* **12**, 1009–1059 (2010).
- van Dijk, R. A. *et al.* Differential expression of oxidation-specific epitopes and apolipoprotein(a) in progressing and ruptured human coronary and carotid atherosclerotic lesions. *Journal of Lipid Research* 53, 2773–2790 (2012).
- 38. Philippova, M., Resink, T., Erne, P. & Bochkov, V. Oxidised phospholipids as biomarkers in human disease. 1–10 (2014). doi:10.4414/smw.2014.14037
- 39. Ishii, S. *et al.* Bronchial hyperreactivity, increased endotoxin lethality and melanocytic tumorigenesis in transgenic mice overexpressing plateletactivating factor receptor. *EMBO J.* **16**, 133–142 (1997).
- 40. Prescott, S. M., Zimmerman, G. A., Stafforini, D. M. & Mcintyre, T. M. PLATELET-ACTIVATING FACTOR AND RELATED LIPID MEDIATORS. *Development* 1–11 (2000).
- 41. Ishii, S. & Shimizu, T. Platelet-activating factor (PAF) receptor and genetically engineered PAF receptor mutant mice. *Prog Lipid Res* **39**, 41–82 (2000).
- 42. Zimmerman, G. A., Mcintyre, T. M., Prescott, S. M. & Stafforini, D. M. The platelet-activating factor signaling system and its regulators in syndromes of inflammation and thrombosis. **30**, (2002).
- Kihara, Y. *et al.* Dual phase regulation of experimental allergic encephalomyelitis by platelet-activating factor. *J. Exp. Med.* **202**, 853–863 (2005).
- 44. Nagase, T. *et al.* Platelet-activating factor mediates acid-induced lung injury in genetically engineered mice. *J. Clin. Invest.* **104**, 1071–1076 (1999).
- 45. Ishii, S. *et al.* Platelet-activating factor receptor develops airway hyperresponsiveness independently of airway inflammation in a murine

asthma model. J. Immunol. 172, (2004).

- 46. Ishii, S. *et al.* Impaired anaphylactic responses with intact sensitivity to endotoxin in mice lacking a platelet-activating factor receptor. *J. Exp. Med.* 187, 1779–1788 (1998).
- Demopoulos, C. A., Karantonis, H. C. & Antonopoulou, S. Platelet activating factor A molecular link between atherosclerosis theories. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **105**, 705–716 (2003).
- 48. Hoffman, D. R., White, R. G., Angle, M. J., Maki, N. & Johnston, J. M. Plateletactivating factor induces glycogen degradation in fetal rabbit lung in utero. *J. Biol. Chem.* **263**, 9316–9319 (1988).
- 49. Cs., K., G., G., G., F. & E., B. Effect of platelet-activating factor on motility and acrosome reaction of human spermatozoa. **9**, 471–476 (1994).
- Chen, C. *et al.* Attenuated LTP in Hippocampal Dentate Gyrus Neurons of Mice Deficient in the PAF Receptor Attenuated LTP in Hippocampal Dentate Gyrus Neurons of Mice Deficient in the PAF Receptor. *System* 384–390 (2011).
- 51. Kulikov, V. I. & Muzya, G. I. Ether lipids and platelet-activating factor: evolution and cellular function. *Biochemistry. (Mosc).* **62**, 1103–1108 (1997).
- 52. Cusack, N. J. Platelet-activating factor. *Nature* **285**, 193 (1980).
- 53. Demopoulos CA. Second International Conference on Platelet-Activating Factor and structurally related alkyl ether-lipids. in (1986).
- 54. Snyder, F. Platelet-activating factor: the biosynthetic and catabolic enzymes. *Biochem. J.* **305 ( Pt 3,** 689–705 (1995).
- Ninio, E., Breton, M., Bidault, J. & Colard, O. Biosynthesis of paf-acether XVII. Regulation by the CoA-independent transacylase in human neutrophils. *FEBS Lett.* 289, 138–140 (1991).
- Snyder, F., Lee, T. C. & Blank, M. L. The role of transacylases in the metabolism of arachidonate and platelet activating factor. *Prog. Lipid Res.* 31, 65–86 (1992).

- 57. Winkler, J. D., Sung, C., Hubbardt, W. C. & Chiltont, F. H. Influence of arachidonic acid in the human neutrophil on indices of phospholipase A2 activity. **831**, 825–831 (1993).
- 58. Montrucchio, G., Alloatti, G. & Camussi, G. Role of platelet-activating factor in cardiovascular pathophysiology. *Physiol. Rev.* **80**, 1669–1699 (2000).
- 59. Harayama, T., Shindou, H., Ogasawara, R., Suwabe, A. & Shimizu, T. Identification of a novel noninflammatory biosynthetic pathway of plateletactivating factor. *J. Biol. Chem.* **283**, 11097–11106 (2008).
- Tselepis, A. D. & Chapman, M. J. Inflammation, bioactive lipids and atherosclerosis: Potential roles of a lipoprotein-associated phospholipase A2, platelet activating factor-acetylhydrolase. *Atheroscler. Suppl.* 3, 57–68 (2002).
- 61. Gora, S. *et al.* The proinflammatory mediator Platelet Activating Factor is an effective substrate for human group X secreted phospholipase A2. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Biol. Lipids* **1761**, 1093–1099 (2006).
- 62. Stafforini, D. M., McIntyre, T. M., Zimmerman, G. A. & Prescott, S. M. Platelet-activating Factor Acetylhydrolases. 17895–17898 (1997).
- 63. Burke, J. E. & Dennis, E. A. Phospholipase A <sub>2</sub> structure/function, mechanism, and signaling. *J. Lipid Res.* **50**, S237–S242 (2009).
- 64. Tellis, C. C. & Tselepis, A. D. The role of lipoprotein-associated phospholipase A2 in atherosclerosis may depend on its lipoprotein carrier in plasma. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Biol. Lipids* **1791**, 327–338 (2009).
- 65. Lee, T. C., Uemura, Y. & Snyder, F. A novel CoA-independent transacetylase produces the ethanolamine plasmalogen and acyl analogs of plateletactivating factor (PAF) with PAF as the acetate donor in HL-60 cells. *J. Biol. Chem.* **267**, 19992–20001 (1992).
- 66. T.C, L. N-Acetylation of Sphingosine by Platelet-Activating Factor : Sphingosine Transacetylase. **311,** 117–122 (1996).
- 67. Liu, M. & Subbaiah, P. V. Hydrolysis and transesterification of plateletactivating factor by lecithin-cholesterol acyltransferase. *Proc. Natl. Acad. Sci.*

*U. S. A.* **91,** 6035–6039 (1994).

- 68. Hanahan, D. J. Platelet activating factor: a biologically active phosphoglyceride. *Annu. Rev. Biochem.* **55**, 483–509 (1986).
- 69. Hirashima, Y. *et al.* Transfection of the plasma-type platelet-activating factor acetylhydrolase gene attenuates glutamate-induced apoptosis in cultured rat cortical neurons. *Brain Res.* **885**, 128–132 (2000).
- 70. Rouis, M., Nigon, F. & Chapman, M. J. PLATELET ACTIVATING FACTOR IS A POTENT STIMULANT OF THE PRODUCTION OF ACTIVE OXYGEN SPECIES BY HUMAN MONOCYTE-DERIVED MACROPHAGES. 1293–1301 (1988).
- Liapikos, T. A. *et al.* Platelet-activating factor formation during oxidative modification of low-density lipoprotein when PAF-acetylhydrolase has been inactivated. *Biochim. Biophys. Acta (BBA)/Lipids Lipid Metab.* **1212**, 353–360 (1994).
- 72. Tsoukatos, D. C. *et al.* Copper-Catalyzed Oxidation Mediates PAF Formation in Human LDL Subspecies. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **17**, 3505 LP-3512 (1997).
- 73. Stafforini, D. M., Zimmerman, G. A., McIntyre, T. M. & Prescott, S. M. The platelet-activating factor acetylhydrolase from human plasma prevents oxidative modification of low-density lipoprotein. *Trans. Assoc. Am. Physicians* **105**, 44–63 (1992).
- Handley, D. A., Arbeeny, C. M., Lee, M. L., Van Valen, R. G. & Saunders, R. N. Effect of platelet activating factor on endothelial permeability to plasma macromolecules. *Immunopharmacology* 8, 137–142 (1984).
- 75. Prescott, S. M., Zimmerman, G. A. & McIntyre, T. M. Platelet-activating factor. *J. Biol. Chem.* **265**, 17381–17384 (1990).
- Stafforini, D. M. Biology of platelet-activating factor acetylhydrolase (PAF-AH, lipoprotein associated phospholipase A2). *Cardiovasc. drugs Ther.* 23, 73–83 (2009).
- 77. Tjoelker, L. W. & Stafforini, D. M. Platelet-activating factor acetylhydrolases in health and disease. *Biochim. Biophys. Acta* **1488**, 102–123 (2000).

- Stafforini, D. M., McIntyre, T. M., Carter, M. E. & Prescott, S. M. Human plasma platelet-activating factor acetylhydrolase. Association with lipoprotein particles and role in the degradation of platelet-activating factor. *J. Biol. Chem.* 262, 4215–4222 (1987).
- 79. Marathe, G. K. *et al.* To hydrolyze or not to hydrolyze: the dilemma of platelet-activating factor acetylhydrolase. *Journal of Lipid Research* **55**, 1847–1854 (2014).
- 80. McIntyre, T. M., Prescott, S. M. & Stafforini, D. M. The emerging roles of PAF acetylhydrolase. *Journal of Lipid Research* **50**, S255-9 (2009).
- 81. Dennis, E. A. The growing phospholipase A2 superfamily of signal transduction enzymes. *Trends Biochem. Sci.* **22**, 1–2 (1997).
- 82. Karabina, S.-A. & Ninio, E. Plasma PAF-acetylhydrolase: an unfulfilled promise? *Biochim. Biophys. Acta* **1761**, 1351–1358 (2006).
- Tjoelker, L. W. *et al.* Protein Chemistry and Structure : Plasma Plateletactivating Factor Acetylhydrolase Is a Secreted Phospholipase A 2 with a Catalytic Triad Plasma Platelet-activating Factor Acetylhydrolase Is a Secreted Phospholipase A 2 with a Catalytic Triad \*. *J. Biol. Chem.* 270, 25481–25487 (1995).
- 84. Derewenda, Z. S. & Ho, Y. S. PAF-acetylhydrolases review. *Biochim. Biophys. Acta* **1441**, 229–236 (1999).
- 85. Tew, D. G. *et al.* Purification, properties, sequencing, and cloning of a lipoprotein-associated, serine-dependent phospholipase involved in the oxidative modification of low-density lipoproteins. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **16**, 591–599 (1996).
- Akiyama, M., Sugatani, J., Suzuki, T., Suzuki, Y. & Miwa, M. Identification of a major PAF acetylhydrolase in human serum/plasma as a 43 kDa glycoprotein containing about 9 kDa asparagine-conjugated sugar chain(s). *J. Biochem.* **123**, 786–789 (1998).
- 87. Samanta, U. & Bahnson, B. J. Crystal structure of human plasma plateletactivating factor acetylhydrolase: Structural implication to lipoprotein binding and catalysis. *J. Biol. Chem.* **283**, 31617–31624 (2008).

- Srinivasan, P. & Bahnson, B. J. Molecular Model of Plasma PAF Acetylhydrolase-Lipoprotein Association: Insights from the Structure. *Pharmaceuticals* 3, 541–557 (2010).
- 89. Stafforini, D. M. *et al.* Release of free F2-isoprostanes from esterified phospholipids is catalyzed by intracellular and plasma platelet-activating factor acetylhydrolases. *J. Biol. Chem.* **281**, 4616–4623 (2006).
- 90. Marathe, G. K. *et al.* Inflammatory platelet-activating factor-like phospholipids in oxidized low density lipoproteins are fragmented alkyl phosphatidylcholines. *J. Biol. Chem.* **274**, 28395–28404 (1999).
- Podrez, E. A. *et al.* A novel family of atherogenic oxidized phospholipids promotes macrophage foam cell formation via the scavenger receptor CD36 and is enriched in atherosclerotic lesions. *J. Biol. Chem.* 277, 38517–38523 (2002).
- 92. Yang, L. *et al.* Chronic Alcohol Exposure Increases Circulating Bioactive Oxidized Phospholipids. *The Journal of Biological Chemistry* **285**, 22211–22220 (2010).
- 93. Lehr, H. A. *et al.* Vitamin C blocks inflammatory platelet-activating factor mimetics created by cigarette smoking. *Journal of Clinical Investigation* **99**, 2358–2364 (1997).
- 94. Chen, C.-H. *et al.* Low-density lipoprotein in hypercholesterolemic human plasma induces vascular endothelial cell apoptosis by inhibiting fibroblast growth factor 2 transcription. *Circulation* **107**, 2102–2108 (2003).
- 95. Marathe, G. K. *et al.* Ultraviolet B radiation generates platelet-activating factor-like phospholipids underlying cutaneous damage. *J. Biol. Chem.* **280**, 35448–35457 (2005).
- 96. Davies, S. S. *et al.* Oxidized alkyl phospholipids are specific, high affinity peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligands and agonists. *J. Biol. Chem.* **276**, 16015–16023 (2001).
- 97. Chen, R., Chen, X., Salomon, R. G. & McIntyre, T. M. Platelet Activation by Low Concentrations of Intact Oxidized LDL Particles Involves the PAF Receptor. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* **29**, 363–371

(2009).

- 98. Marathe, G. K., Zimmerman, G. A., Prescott, S. M. & McIntyre, T. M. Activation of vascular cells by PAF-like lipids in oxidized LDL. *Vascul. Pharmacol.* **38**, 193–200 (2002).
- 99. Smiley, P. L., Stremler, K. E., Prescott, S. M., Zimmerman, G. A. & McIntyre, T. M. Oxidatively fragmented phosphatidylcholines activate human neutrophils through the receptor for platelet-activating factor. *J. Biol. Chem.* 266, 11104–11110 (1991).
- 100. Ross, R. Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N. Engl. J. Med.* **340**, 115–126 (1999).
- Choudhury, R. P., Lee, J. M. & Greaves, D. R. Mechanisms of disease: macrophage-derived foam cells emerging as therapeutic targets in atherosclerosis. *Nat. Clin. Pract. Cardiovasc. Med.* 2, 309–315 (2005).
- 102. Brewer, H. B. The lipid-laden foam cell: an elusive target for therapeutic intervention. *Journal of Clinical Investigation* **105**, 703–705 (2000).
- Rosenson, R. S. & Stafforini, D. M. Modulation of oxidative stress, inflammation, and atherosclerosis by lipoprotein-associated phospholipase A(2). *Journal of Lipid Research* 53, 1767–1782 (2012).
- 104. Elstad, M. R., Stafforini, D. M., McIntyre, T. M., Prescott, S. M. & Zimmerman, G. A. Platelet-activating factor acetylhydrolase increases during macrophage differentiation. A novel mechanism that regulates accumulation of platelet-activating factor. *J. Biol. Chem.* **264**, 8467–8470 (1989).
- 105. Theilmeier, G. *et al.* HDL-associated PAF-AH reduces endothelial adhesiveness in apoE-/- mice. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **14**, 2032–2039 (2000).
- 106. Marathe, G. K., Zimmerman, G. A. & McIntyre, T. M. Platelet-activating factor acetylhydrolase, and not paraoxonase-1, is the oxidized phospholipid hydrolase of high density lipoprotein particles. *J. Biol. Chem.* 278, 3937– 3947 (2003).

- 107. Kriska, T., Marathe, G. K., Schmidt, J. C., McIntyre, T. M. & Girotti, A. W. Phospholipase action of platelet-activating factor acetylhydrolase, but not paraoxonase-1, on long fatty acyl chain phospholipid hydroperoxides. *J. Biol. Chem.* 282, 100–108 (2007).
- Zimmerman, G. A., Prescott, S. M. & McIntyre, T. M. Endothelial cell interactions with granulocytes: tethering and signaling molecules. *Immunol. Today* 13, 93–100 (1992).
- 109. Alon, R. *et al.* A novel genetic leukocyte adhesion deficiency in subsecond triggering of integrin avidity by endothelial chemokines results in impaired leukocyte arrest on vascular endothelium under shear flow. *Blood* **101**, 4437–4445 (2003).
- 110. Tjoelker, L. W. *et al.* Anti-inflammatory properties of a platelet-activating factor acetylhydrolase. *Nature* **374**, 549–553 (1995).
- 111. Greenberg, M. E. *et al.* The lipid whisker model of the structure of oxidized cell membranes. *J. Biol. Chem.* **283**, 2385–2396 (2008).
- 112. Latchoumycandane, C., Marathe, G. K., Zhang, R. & McIntyre, T. M. Oxidatively Truncated Phospholipids Are Required Agents of Tumor Necrosis Factor α (TNFα)-induced Apoptosis. *The Journal of Biological Chemistry* 287, 17693–17705 (2012).
- 113. Huang, Y. H., Schäfer-Elinder, L., Wu, R., Claesson, H.-E. & Frostegård, J. Lysophosphatidylcholine (LPC) induces proinflammatory cytokines by a platelet-activating factor (PAF) receptor-dependent mechanism. *Clinical and Experimental Immunology* **116**, 326–331 (1999).
- 114. Nishi, E. *et al.* Lysophosphatidylcholine induces heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor and interferon-gamma in human T-lymphocytes. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **811,** 519–524 (1997).
- 115. Liu-Wu, Y., Hurt-Camejo, E. & Wiklund, O. Lysophosphatidylcholine induces the production of IL-1beta by human monocytes. *Atherosclerosis* **137**, 351– 357 (1998).
- 116. Chai, Y. C., Howe, P. H., DiCorleto, P. E. & Chisolm, G. M. Oxidized low density lipoprotein and lysophosphatidylcholine stimulate cell cycle entry in

vascular smooth muscle cells. Evidence for release of fibroblast growth factor-2. *J. Biol. Chem.* **271**, 17791–17797 (1996).

- 117. Jeong, Y.-I. The Novel Role of Platelet-Activating Factor in Protecting Mice against Lipopolysaccharide-Induced Endotoxic Shock. **4**, (2009).
- 118. Bochkov, V. N. *et al.* Protective role of phospholipid oxidation products in endotoxin-induced tissue damage. *Nature* **419**, 77–81 (2002).
- 119. Chen, L. *et al.* Oxidative modification of low density lipoprotein in normal and hyperlipidemic patients: effect of lysophosphatidylcholine composition on vascular relaxation. *J. Lipid Res.* **38**, 546–553 (1997).
- 120. Chisolm, G. M. 3rd & Chai, Y. Regulation of cell growth by oxidized LDL. *Free Radic. Biol. Med.* **28**, 1697–1707 (2000).
- 121. Chen, C.-H. Platelet-activating factor acetylhydrolase: is it good or bad for you? *Curr. Opin. Lipidol.* **15**, 337–341 (2004).
- 122. McIntyre, T. M., Zimmerman, G. A., Satoh, K. & Prescott, S. M. Cultured endothelial cells synthesize both platelet-activating factor and prostacyclin in response to histamine, bradykinin, and adenosine triphosphate. *Journal of Clinical Investigation* **76**, 271–280 (1985).
- 123. Whatley, R. E. *et al.* Relative amounts of 1-O-alkyl- and 1-acyl-2-acetyl-snglycero-3-phosphocholine in stimulated endothelial cells. *Prostaglandins* **43**, 21–29 (1992).
- 124. Chen, J. *et al.* Intracellular PAF catabolism by PAF acetylhydrolase counteracts continual PAF synthesis. *J. Lipid Res.* **48**, 2365–2376 (2007).
- 125. Quarck, R. *et al.* Adenovirus-mediated gene transfer of human plateletactivating factor-acetylhydrolase prevents injury-induced neointima formation and reduces spontaneous atherosclerosis in apolipoprotein Edeficient mice. *Circulation* **103**, 2495–2500 (2001).
- Shindou, H. *et al.* A single enzyme catalyzes both platelet-activating factor production and membrane biogenesis of inflammatory cells. Cloning and characterization of acetyl-CoA:LYSO-PAF acetyltransferase. *J. Biol. Chem.* 282, 6532–6539 (2007).

127. Tsoukatos, D. C., Liapikos, T. A., Tselepis, A. D., Chapman, M. J. & Ninio, E. Platelet-activating factor acetylhydrolase and transacetylase activities in human plasma low-density lipoprotein. *Biochem. J.* **357**, 457–64 (2001).