

ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ



026000199829





ΑΑ
Αρ. εισ.:.....20.....2004

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ

ΤΟΜΕΑΣ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΟΣ

A
353

**Β' ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ &
ΙΑΤΡΕΙΟ ΔΙΑΤΑΡΑΧΩΝ ΤΟΥ ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΥ ΤΩΝ ΛΙΠΙΔΙΩΝ**

Δ/ντής Καθηγητής Μ. Ελισάφ

**ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑ ΤΗΣ ΡΑΦ-ΑΚΕΤΥΛΟΥΪΔΡΟΛΑΣΗΣ ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ
ΔΙΑΤΑΡΑΧΕΣ ΤΟΥ ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΥ ΤΩΝ ΛΙΠΟΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΠΡΙΝ
ΚΑΙ ΜΕΤΑ ΤΗ ΧΟΡΗΓΗΣΗ ΥΠΟΛΙΠΙΔΑΙΜΙΚΩΝ ΦΑΡΜΑΚΩΝ**

ΤΣΙΜΙΧΟΔΗΜΟΣ ΒΑΣΙΛΕΙΟΣ

ΙΑΤΡΟΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2004



Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από την Ιατρική Σχολή του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα (Νόμος 5343/32, άρθρο 202, §2)



ΑΙΤΗΣΗ: 14-11-1997

ΟΡΙΣΜΟΣ ΤΡΙΜΕΛΟΥΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ 16-12-1997:

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ

Μωυσής Ελισάφ

Αναπληρωτής Καθηγητής Παθολογίας Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

ΜΕΛΗ

Αλέξανδρος Τσελέπης

Επίκουρος Καθηγητής Χημείας Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Ιωάννης Γουδέβενος

Επίκουρος Καθηγητής Καρδιολογίας Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

ΟΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΘΕΜΑΤΟΣ: 22-01-1998

ΚΑΤΑΘΕΣΗ: 19-02-2004

ΟΝΟΜΑ ΠΡΟΕΔΡΟΥ ΤΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΣΧΟΛΗΣ

Επαμεινώντας Τσιάνος

ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Μωυσής Ελισάφ

Καθηγητής Παθολογίας Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Αλέξανδρος Τσελέπης

Αναπληρωτής Καθηγητής Χημείας Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Ιωάννης Γουδέβενος

Αναπληρωτής Καθηγητής Καρδιολογίας Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Επαμεινώντας Τσιάνος

Καθηγητής Παθολογίας Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Δημήτριος Σιδεράς

Καθηγητής Καρδιολογίας Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Αγαθοκλής Τσατσούλης

Καθηγητής Ενδοκρινολογίας Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Σταυρούλα Τσιάρα

Επίκουρος Καθηγήτρια Παθολογίας Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Βαθμός Διατριβής: Άριστα

Η Γραμματεία της Σχολής

Ευαγγελία Τσαγγαλά



Πρόλογος

... παραμένει η διατριβή εκκρινόμενη... 1975-2001.

... εξέλιξη της διατριβής μου... Η πτυχιακή μου εργασία... με τις συμβουλές και το καθήκον...

... καθήκον και ευγνωμοσύνη... Αλεξάνδρα Τσιλιμένη...

Στον Αχιλλέα

... αποκατάσταση της υγείας... του καρπού και καρπού και για αυτό τα λόγια...

... διατριβής... καθήκον και για την κριτική... διατριβής.

... ευχαριστώ... Ευχαριστώ θερμά τους συναδέλφους... Ευχαριστώ θερμά τους συναδέλφους...

... Ευχαριστώ θερμά τους συναδέλφους... Ευχαριστώ θερμά τους συναδέλφους... Ευχαριστώ θερμά τους συναδέλφους...



Πρόλογος

Η παρούσα διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε στο Εξωτερικό Ιατρείο Λιπιδίων του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Ιωαννίνων, καθώς και στο Εργαστήριο Λιποπρωτεϊνών του Τομέα Οργανικής Χημείας και Βιοχημείας του Τμήματος Χημείας κατά το χρονικό διάστημα 1998-2003.

Η επίβλεψη της διδακτορικής μου διατριβής από τον κ. Μωυσή Ελισάφ, Καθηγητή Παθολογίας αποτέλεσε μεγάλη τύχη και εξαιρετική τιμή. Η συνεργασία μου μαζί του όχι μόνο εξασφάλισε τις ευνοϊκότερες προϋποθέσεις για την ολοκλήρωση αυτού του δύσκολου έργου, άλλα επηρέασε και εξακολουθεί να επηρεάζει τη στάση μου απέναντι στην επιστημονική γνώση, στον ασθενή και τη ζωή γενικότερα. Θέλω να τον ευχαριστήσω θερμά για την υπομονή του, καθώς και για τους ορίζοντες που μου άνοιξε με τις συμβουλές και το καθημερινό παράδειγμά του.

Στο τμήμα της διδακτορικής μου διατριβής που αφορούσε τη βασική έρευνα ευτύχησα να έχω καθοδηγητή και συμπαραστάτη τον κ. Αλέξανδρο Τσελέπη, Αναπληρωτή Καθηγητή Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων. Θέλω να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου για την εμπιστοσύνη του απέναντί μου, καθώς και για τον πολύτιμο χρόνο που αφιέρωσε για την εκπαίδευση μου και την επεξεργασία των αποτελεσμάτων. Πιστεύω ότι το ενδιαφέρον μου για τη βασική έρευνα οφείλεται αποκλειστικά στη δική του παρουσία και επιρροή και για αυτό το λόγο τον ευχαριστώ θερμά.

Ευχαριστώ τον Αναπληρωτή Καθηγητή Καρδιολογίας κ. Ιωάννη Γουδέβενο για το ενδιαφέρον και την ηθική υποστήριξη του, καθώς και για την κριτική επεξεργασία των αποτελεσμάτων της παρούσας διατριβής.

Η εκπαίδευση και εξοικείωσή μου με τις τεχνικές της χημικής ανάλυσης των λιποπρωτεϊνών έγινε στο Εργαστήριο Λιποπρωτεϊνών του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων. Ουσιαστική συμβολή σε αυτή τη διαδικασία είχαν οι μεταπτυχιακές φοιτήτριες κ.κ. Σόνια Καραμπίνα και Αφροδίτη Ταμπάκη τις οποίες ευχαριστώ θερμά. Επιπρόσθετα, ευχαριστώ τους μεταπτυχιακούς φοιτητές Λουκά Τσιρώνη, Ιωάννη Μήτσιο και Ευαγγελά Λουρίδα για τη βοήθεια και τις συμβουλές τους.

Η παρακολούθηση των ασθενών και η συλλογή των βιολογικών δειγμάτων έγινε στο Εξωτερικό Ιατρείο Λιπιδίων του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων. Ευχαριστώ θερμά τους συναδέλφους Άννα Κακαφίκα, Γιώργο Μιλτιάδου και Ευάγγελο Λυμπερόπουλο, καθώς και τον κ. Χαράλαμπο Μηλιώνη, Λέκτορα Παθολογίας, για την εξαιρετική συνεργασία και την ουσιαστική συμβολή τους στο κλινικό μέρος αυτής της διατριβής.



Τέλος, θα ήταν παράληψη να μην ευχαριστήσω θερμά την κ. Πανωραία Ντότη, υπεύθυνη νοσηλεύτρια του Εξωτερικού Ιατρείου Λιπιδίων για την ουσιαστική βοήθειά της στη συλλογή των δειγμάτων και τη οργάνωση του αρχείου των ασθενών αυτής της μελέτης.

Βασίλης Τσιμιχόδημος

Ιωάννινα, 2004



ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

I. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	1
II. ΤΑ ΛΙΠΙΔΙΑ ΩΣ ΠΑΡΑΓΩΝ ΚΙΝΔΥΝΟΥ ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΜΦΑΝΙΣΗ ΚΑΡΔΙΑΓΓΕΙΑΚΗΣ ΝΟΣΟΥ	2
II.1 Μεταβολισμός των λιποπρωτεϊνών	2
II.2 Οι LDL ως παράγων κινδύνου	3
II.3 Η μείωση των επιπέδων της HDL χοληστερόλης ως παράγων κινδύνου	5
II.4 Η υπερτριγλυκεριδαμία ως παράγων κινδύνου	8
III. ΠΡΩΤΟΠΑΘΕΙΣ ΔΥΣΛΙΠΙΔΑΙΜΙΕΣ	13
III.1 Ταξινόμηση των πρωτοπαθών δυσλιπιδαιμιών	13
III.2 Οικογενής υπερχοληστερολαμία	14
Γενικά σχόλια	14
Κλινική εικόνα	16
Διάγνωση	18
Θεραπεία	19
III.3 Οικογενής ανεπάρκεια της απολιποπρωτεΐνης B	20
III.4 Οικογενής συνδιασμένη (μικτή) δυσλιπιδαιμία	21
Γενικά σχόλια	21
Κλινική εικόνα	22
Διάγνωση	22
Θεραπεία	22
III.5 Πολυγονική υπερχοληστερολαμία	23
III.6 Οικογενής χυλομικροναμία	24
Γενικά σχόλια	24
Κλινική εικόνα	24
Διάγνωση	25
Θεραπεία	26



III.7 Οικογενής υπερλιποπρωτεϊναιμία τύπου III	26
Γενικά σχόλια	26
Κλινική εικόνα	27
Διάγνωση	28
Θεραπεία	29
III.8 Οικογενής υπερτριγλυκεριδαιμία	29
Γενικά σχόλια	29
Κλινική εικόνα	30
Διάγνωση	31
Θεραπεία	31
 IV. ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΤΩΝ ΔΥΣΛΙΠΙΔΑΙΜΙΩΝ	 32
IV.1 Εισαγωγή	32
IV.2 Φάρμακα για την αντιμετώπιση των δυσλιπιδαιμιών	32
Ρητίνες δέσμευσης χολικών οξέων	32
Στατίνες	33
Πλειοτροπικές δράσεις των στατινών	36
Φιβράτες	40
Πλειοτροπικές δράσεις των φιβρατών	42
Συνδιασμοί υπολιπιδαιμικών φαρμάκων	45
 V. PAF-ΑΚΕΤΥΛΟΪΔΡΟΛΑΣΗ	 46
V.1 Ο παράγοντας ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων (PAF)	46
V.2 Εκκρινόμενη μορφή της PAF-ακετυλοϋδρολάσης	
(PAF-AH του πλάσματος)	48
Δομή	48
Φυσικοχημικές ιδιότητες και εξειδίκευση υποστρώματος	51
Κυτταρική πηγή προέλευσης και ρύθμιση των επιπέδων της PAF-AH του πλάσματος	57
Ο ρόλος της PAF-AH στην αθηρωματική διαδικασία: παθοφυσιολογία	61
Ο ρόλος της PAF-AH στην αθηρωματική διαδικασία: κλινικές μελέτες	67



VI. ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	71
VI.1 Ασθενείς της μελέτης	71
VI.2 Μέθοδοι	73
Καταβύθιση των λιποπρωτεϊνών που περιέχουν απολιποπρωτεΐνη Β και παρασκευή πλάσματος πλούσιου σε HDL	73
Ενζυμικός φωτομετρικός προσδιορισμός της ολικής χοληστερόλης	73
Ενζυμικός φωτομετρικός προσδιορισμός των τριγλυκεριδίων	75
Ενζυμικός φωτομετρικός προσδιορισμός των φωσφολιπιδίων	77
Προσδιορισμός της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών με τη μέθοδο BCA	78
Προσδιορισμός της ενζυμικής ενεργότητας της PAF-AH	79
Απομόνωση των λιποπρωτεϊνικών υποκλασμάτων με ισοπυκνική υπερφυγοκέντρωση βαθμίδωσης πυκνοτήτων (isopycnic density gradient ultracentrifugation)	82
Ανάλυση των μεταλλάξεων του LDL υποδοχέα	84
Μελέτη της επίδρασης των υπολιπιδαιμικών φαρμάκων στην παραγωγή της PAF-AH από καλλιέργειες μονοκυττάρων περιφερικού αίματος	86
Στατιστική ανάλυση	87
VII. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	88
VII.1 Σύγκριση της ενεργότητας της PAF-AH σε ασθενείς με διάφορες μορφές πρωτοπαθούς δυσλιπιδαιμίας	88
VII.2 Σύγκριση των επιπέδων της PAF-AH σε ασθενείς με διάφορες μορφές πρωτοπαθούς υπερχοληστερολαμίας	92
VII.3 Μελέτη της επίδρασης των υπολιπιδαιμικών φαρμάκων στην ενεργότητα της PAF-AH σε ασθενείς με πρωτοπαθείς δυσλιπιδαιμίες	102
VIII. ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	120
IX. ΠΕΡΙΛΗΨΗ	



X. ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΣΤΑ ΑΓΓΛΙΚΑ (SUMMARY)	138
XI. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΕΣ	142
XII. ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ	184
XIII. ΒΡΑΒΕΙΑ	184



I. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η αθηρωμάτωση αποτελεί την κυριότερη αιτία θανάτου στις αναπτυγμένες κοινωνίες. Αν και τα τελευταία χρόνια έχει συντελεσθεί σημαντική πρόοδος στην αναγνώριση των ατόμων υψηλού κινδύνου για την εμφάνιση καρδιαγγειακής νόσου, ένας μεγάλος αριθμός συμβαμάτων παρατηρείται σε άτομα που δεν εμφανίζουν τους «κλασσικούς» προδιαθεσικούς παράγοντες κινδύνου. Επιπρόσθετα, αν και είναι πολύ καλά τεκμηριωμένη η ικανότητα των υπολιπιδαιμικών φαρμάκων να μειώνουν την επίπτωση και τη βαρύτητα της καρδιαγγειακής νόσου, πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι αυτή η μείωση δεν εξηγείται μόνο από την τροποποίηση των επιπέδων των λιπιδαιμικών παραμέτρων. Κατά συνέπεια, είναι προφανές ότι στην παθογένεια της αθηρωματικής νόσου συμβάλλουν και άλλοι παράγοντες που μέχρι σήμερα δεν έχουν μελετηθεί διεξοδικά. Πειραματικές και κλινικές μελέτες έδειξαν ότι η ακετυλοϋδρολάση του παράγοντα ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων (PAF-AH) διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην παθοφυσιολογία της υποξείας φλεγμονής του αρτηριακού τοιχώματος και αποτελεί ανεξάρτητο παράγοντα κινδύνου για την εμφάνιση καρδιαγγειακής νόσου. Σκοπός της παρούσας διδακτορικής διατριβής ήταν η εκτίμηση και σύγκριση των ενεργιοτήτων της PAF-AH σε ασθενείς με διάφορες μορφές πρωτοπαθούς δυσλιπιδαιμίας, καθώς και η μελέτη της επίδρασης των υπολιπιδαιμικών φαρμάκων στις ενεργότητες αυτού του ενζύμου.



II. ΤΑ ΛΙΠΙΔΙΑ ΩΣ ΠΑΡΑΓΩΓΩΝ ΚΙΝΔΥΝΟΥ ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΜΦΑΝΙΣΗ ΚΑΡΔΙΑΓΓΕΙΑΚΗΣ ΝΟΣΟΥ

II.1 Μεταβολισμός των λιποπρωτεϊνών

Το διαιτητικό λίπος, μετά την απορρόφησή του από το γαστρεντερικό σωλήνα, ενσωματώνεται στα πλούσια σε τριγλυκερίδια χυλομικρά¹, τα οποία στην κυκλοφορία προσλαμβάνουν την απολιποπρωτεΐνη C-II (Apo C-II) από τις υψηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνες (HDL)². Τα χυλομικρά καταβολίζονται με τη βοήθεια της λιποπρωτεϊνικής λιπάσης (LPL), η οποία εντοπίζεται στα τριχοειδή των σκελετικών μυών και του λιπώδους ιστού³. Το ένζυμο αυτό υδρολύει τριγλυκερίδια των χυλομικρών με αποτέλεσμα την απελευθέρωση λιπαρών οξέων, τα οποία είτε αποθηκεύονται στο λιπώδη ιστό είτε χρησιμοποιούνται για την κάλυψη των ενεργειακών αναγκών. Τα κατάλοιπα των χυλομικρών που προκύπτουν προσλαμβάνονται από τα παρεγχυματικά κύτταρα του ήπατος⁴. Τα κύτταρα αυτά έχουν μία πρωτεΐνη, η οποία συσχετίζεται με τον υποδοχέα των χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεϊνών (LDL) [LRP ή chylomicron remnant receptor], η οποία συνδέεται με την απολιποπρωτεΐνη E (Apo E)⁴. Το λιπιδικό συστατικό των καταλοίπων των χυλομικρών μετά την είσοδό τους στα ηπατοκύτταρα είτε αποθηκεύεται είτε καταβολίζεται είτε επανεκκρίνεται από τα ηπατοκύτταρα ως ουσιαστικό συστατικό των ενδογενών πλούσιων σε τριγλυκερίδια λιποπρωτεϊνών, δηλαδή των πολύ χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεϊνών (VLDL)⁵.

Η ηπατική παραγωγή λιποπρωτεϊνών εξαρτάται από την παροχή γλυκόζης και λιπαρών οξέων στα ηπατοκύτταρα και επηρεάζεται σημαντικά από ορμονικούς παράγοντες, κυρίως από την ινσουλίνη⁵. Όπως και τα χυλομικρά, οι VLDL καταβολίζονται στην κυκλοφορία από τη λιποπρωτεϊνική λιπάση. Το ένζυμο αυτό ενεργοποιείται από την Apo C-II, ενώ η αποπρωτεΐνη C-III (Apo C-III) αναστέλλει τη δραστηριότητά του⁶. Με την επίδραση της λιποπρωτεϊνικής λιπάσης, οι VLDL μετατρέπονται στις ενδιάμεσης πυκνότητας λιποπρωτεΐνες (IDL), οι οποίες αναφέρονται στη βιβλιογραφία και ως κατάλοιπα (remnants) των VLDL. Οι IDL είναι σχετικά πλούσιες σε χοληστερόλη και ένα μέρος τους προσλαμβάνεται άμεσα από τα ηπατοκύτταρα διαμέσου υποδοχέων που συνδέονται με την Apo E [κατά πάσα πιθανότητα πρόκειται για τους ίδιους υποδοχείς που αναγνωρίζουν την αποπρωτεΐνη B (Apo B) των χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεϊνών (LDL)]. Οι υπόλοιπες IDL υφίστανται την επίδραση της ηπατικής λιπάσης⁷ και μετατρέπονται σε LDL⁸. Οι LDL είναι πλούσιες σε χοληστερόλη και πτωχές σε τριγλυκερίδια, έχουν ως κύρια πρωτεΐνη την Apo B 100 και χρησιμεύουν για τη μεταφορά της χοληστερόλης στο πλάσμα.

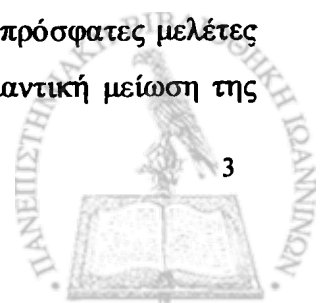


Οι LDL μεταβολίζονται διαμέσου των LDL υποδοχέων, οι οποίοι υπάρχουν κυρίως στα ηπατοκύτταρα και αναγνωρίζουν την απολιποπρωτεΐνη B 100, δηλαδή την πρωτεΐνη που υπάρχει στην επιφάνεια των LDL⁹. Ο αριθμός και η δραστηριότητα των LDL υποδοχέων είναι καθοριστικής σημασίας για τη ρύθμιση της συγκέντρωσης των LDL στο πλάσμα. Έτσι, η μείωση της δραστηριότητας των LDL υποδοχέων έχει ως αποτέλεσμα όχι μόνο τη μείωση του καταβολισμού των LDL, αλλά και την αύξηση της σύνθεσής τους από τα κατάλοιπα των VLDL (IDL), καθόσον μικρότερο κλάσμα αυτών των σωματιδίων καταβλάσσεται διαμέσου των LDL υποδοχέων. Ο αριθμός και η δραστηριότητα των LDL υποδοχέων εξαρτώνται από τα επίπεδα της ελεύθερης χοληστερόλης στα ηπατοκύτταρα¹⁰. Πράγματι, η μείωση της ενδοκυττάριας συγκέντρωσης χοληστερόλης που οφείλεται στη χορήγηση υπολιπιδαιμικών φαρμάκων (είτε στατινών που μειώνουν την ενδοκυττάρια σύνθεση χοληστερόλης είτε ρητινών δέσμευσης χολικών οξέων που διακόπτουν τον εντεροηπατικό κύκλο των χολικών οξέων και αυξάνουν τη μετατροπή της χοληστερόλης σε χολικά οξέα), έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της δραστηριότητας των LDL υποδοχέων και του καταβολισμού των LDL και των καταλοίπων των VLDL.

Οι HDL παράγονται στο ήπαρ και το έντερο ή προέρχονται από τον καταβολισμό των πλούσιων σε τριγλυκερίδια λιποπρωτεϊνών και διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στο μηχανισμό της ανάστροφης μεταφοράς χοληστερόλης¹¹. Σύμφωνα με αυτή τη θεώρηση, οι HDL δεσμεύουν την πλεονάζουσα χοληστερόλη των κυττάρων ή και των αθηρωματικών πλακών. Η μετακίνηση της χοληστερόλης από τα κύτταρα στις αρχέγονες HDL γίνεται διαμέσου των ABCA1 μεταφορέων που εκφράζονται στην επιφάνεια των κυττάρων. Η ελεύθερη χοληστερόλη στη συνέχεια εστεροποιείται με την επίδραση του ενζύμου ακυλοτρανσφεράση της χοληστερόλης (LCAT)¹². Η εστεροποιημένη χοληστερόλη μεταφέρεται διαμέσου του ενζύμου που μεταφέρει εστέρες χοληστερόλης (CETP) σε άλλες πλούσιες σε τριγλυκερίδια λιποπρωτεΐνες και διαμέσου αυτών, είτε στα ηπατοκύτταρα είτε στα περιφερικά κύτταρα για τη στεροειδογένεση¹³. Πρόσφατα δεδομένα έδειξαν ότι οι υποδοχείς SR-B1 διαδραματίζουν καθοριστικό ρόλο στην άμεση μεταφορά εστέρων χοληστερόλης από τις HDL στα ηπατοκύτταρα¹⁴.

II.2 Οι LDL ως παράγων κινδύνου

Οι χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνες (LDL) είναι οι κατ'εξοχήν αθηρωγόνες λιποπρωτεΐνες. Έτσι, η αύξηση των επιπέδων της LDL χοληστερόλης είναι ο πιο σημαντικός παράγοντας κινδύνου για την εμφάνιση πρώιμης καρδιαγγειακής νόσου¹⁵. Επιπρόσθετα, πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι η μείωση των επιπέδων της LDL χοληστερόλης οδηγεί σε σημαντική μείωση της



επίπτωσης της στεφανιαίας νόσου, τόσο σε υγιή άτομα^{16,17}, όσο και κυρίως σε άτομα με εγκατεστημένη καρδιαγγειακή νόσο¹⁸⁻²¹. Οι LDL διεισδύουν στο αγγειακό τοίχωμα και συνδέονται με συστατικά του αγγειακού τοιχώματος και συγκεκριμένα με γλυκοζαμινογλυκάνες, που αποτελούν τμήμα του εξωκυττάριου υλικού του έσω χιτώνα του τοιχώματος των αγγείων. Η καθήλωση αυτή των λιποπρωτεϊνών στον υπενδοθηλιακό χώρο γίνεται διαμέσου της αποπρωτεΐνης Β100²². Στο αγγειακό τοίχωμα οι LDL υφίστανται χημική τροποποίηση του μορίου τους και συγκεκριμένα οξειδωση από ελεύθερες ρίζες οξυγόνου που παράγονται τοπικά²³. Η ελάχιστα τροποποιημένη LDL (minimally modified LDL) στη συνέχεια επάγει την παραγωγή από τα παρακείμενα κύτταρα του τοιχώματος των αγγείων χημειοτακτικών παραγόντων (π.χ. του monocyte chemotactic protein, MCP-1)²⁴, καθώς και αυξητικών παραγόντων (π.χ. των granulocyte and monocyte colony stimulating factors)²⁵, που προάγουν την είσοδο των κυκλοφορούντων μονοπύρηνων στο αγγειακό τοίχωμα και την περαιτέρω διαφοροποίησή τους σε μακροφάγα. Τα μακροφάγα του αγγειακού τοιχώματος επάγουν την οξειδωση των LDL με τελικό αποτέλεσμα την αύξηση του αρνητικού ηλεκτρικού φορτίου της Apo B 100²⁶. Η πλήρως οξειδωμένη LDL, εξαιτίας του αυξημένου αρνητικού φορτίου της, αναγνωρίζεται από ειδικούς υποδοχείς εκκαθαριστές (scavenger) των μακροφάγων²⁷. Σε αντίθεση με τους φυσιολογικούς LDL υποδοχείς, η δραστηριότητα των εκκαθαριστών υποδοχέων δεν εξαρτάται από την ενδοκυττάρια συγκέντρωση χοληστερόλης. Έτσι, μεγάλες ποσότητες LDL εισέρχονται στα μακροφάγα, που γεμίζουν με λίπος και μετατρέπονται σε αφρώδη κύτταρα (foam cells), ο σχηματισμός των οποίων αποτελεί το πρώτο βήμα για τη δημιουργία και την εξέλιξη της αθηρωμάτωσης²⁸. Η οξειδωμένη LDL έχει άμεση χημειοτακτική δράση και αυξάνει την είσοδο των περιφερικών μονοπύρηνων στο αγγειακό τοίχωμα, ενώ, παράλληλα, διεγείρει τη σύνδεσή τους με τα ενδοθηλιακά κύτταρα^{29,30}. Τα μονοκύτταρα που διαπερνούν το ενδοθήλιο παραμένουν στον υπενδοθηλιακό χώρο, καθόσον η οξειδωμένη LDL εμποδίζει την έξοδό τους από το αγγειακό τοίχωμα. Η οξειδωμένη LDL είναι επίσης κυτταροτοξική για τα κύτταρα του τοιχώματος των αγγείων και προάγει την απελευθέρωση λιπιδίων και λυσοσωματικών ενζύμων στον εξωκυττάριο χώρο του έσω χιτώνα, με αποτέλεσμα την επιτάχυνση της αθηρωματικής διαδικασίας³¹⁻³⁴. Επιπρόσθετα, η συσσώρευση οξειδωμένης LDL στα τοιχώματα των αγγείων διαταράσσει τη φυσιολογική λειτουργία του ενδοθηλίου και τη δράση του οξειδίου του αζώτου³⁵⁻³⁷ με αποτέλεσμα συσσώρευση αιμοπεταλίων και λευκοκυττάρων και αγγειόσπασμο^{38,39}. Τα φαινόμενα αυτά διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην παθογένεση των οξέων στεφανιαίων συνδρόμων.

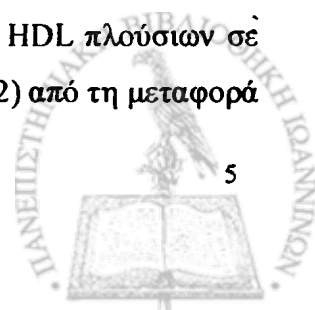
Τα τελευταία έτη έχει δοθεί ιδιαίτερο ενδιαφέρον στα διάφορα υποκλάσματα των LDL που



φαίνεται ότι έχουν διαφορετική αθηρωγόνο δυνατότητα. Οι LDL αποτελούν σύμφωνα με αυτή τη θεώρηση μία ετερογενή ομάδα σωματιδίων με διαφορετικές φυσικοχημικές ιδιότητες⁴⁰. Πράγματι, μελέτες έδειξαν ότι η παρουσία μικρών και πυκνών LDL αυξάνει σημαντικά τον κίνδυνο εμφάνισης πρώιμης αθηρωματικής νόσου σε σύγκριση με την παρουσία μεγαλύτερων και πιο ελαφρών σωματιδίων LDL⁴¹⁻⁴³. Η μεγαλύτερη αθηρωγόνο δυνατότητα των μικρών πυκνών LDL οφείλεται: 1) στην ευκολότερη διείσδυση αυτών των σωματιδίων στο αγγειακό τοίχωμα⁴⁴, 2) στην αυξημένη ευαισθησία τους στην οξείδωση και⁴⁵, 3) στο μειωμένο καταβολισμό τους διαμέσου των φυσιολογικών LDL υποδοχέων⁴⁶, που έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση του χρόνου ημίσειας ζωής τους και την παραμονή τους στο αγγειακό τοίχωμα για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα. Αν και ως ένα βαθμό ο φαινότυπος των LDL καθορίζεται γενετικά^{47,48}, πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι η ετερογένεια των LDL συσχετίζεται με τα επίπεδα των τριγλυκεριδίων του ορού^{49,50}. Πράγματι, σε περιπτώσεις υπερτριγλυκεριδαιμίας που οφείλεται σε διαταραχές του μεταβολισμού των πλούσιων σε τριγλυκερίδια λιποπρωτεϊνών παρατηρείται αύξηση της συγκέντρωσης των αθηρωγόνων μικρών και πυκνών LDL σωματιδίων⁴⁹. Έτσι, πολλοί ασθενείς με πρώιμη καρδιαγγειακή νόσο εμφανίζουν υπερτριγλυκεριδαιμία, μειωμένα επίπεδα HDL χοληστερόλης και μικρές πυκνές LDL. Η συνύπαρξη αυτών των διαταραχών, που συνιστούν τον αθηρωγόνο λιπιδαιμικό φαινότυπο, παρατηρείται συχνά σε ασθενείς με αντίσταση στη δράση της ινσουλίνης, μεταβολικό σύνδρομο, καθώς και σε ασθενείς με σακχαρώδη διαβήτη τύπου II⁵¹. Η εμφάνιση μικρών και πυκνών LDL σε ασθενείς με αυξημένα επίπεδα τριγλυκεριδίων πιθανά οφείλεται στην ετεροανταλλαγή λιπιδίων μεταξύ των διαφόρων λιποπρωτεϊνών. Σε περιπτώσεις αύξησης της συγκέντρωσης των πλούσιων σε τριγλυκερίδια λιποπρωτεϊνών αυξάνεται η μεταφορά τριγλυκεριδίων από αυτά τα σωματίδια στις LDL (που είναι πτωχές σε τριγλυκερίδια) και η μεταφορά εστέρων χοληστερόλης από τις LDL στις πλούσιες σε τριγλυκερίδια λιποπρωτεΐνες (που είναι πτωχές σε χοληστερόλη). Η μετακίνηση αυτή των λιπιδίων οφείλεται στην επίδραση του ενζύμου CETP (cholesterol ester transfer protein)⁵² και έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία LDL πλούσιων σε τριγλυκερίδια και με μικρότερη περιεκτικότητα σε χοληστερόλη. Τα τριγλυκερίδια των LDL στη συνέχεια υδρολύονται από την ηπατική λιπάση με τελικό αποτέλεσμα την εμφάνιση μικρότερων και πυκνότερων LDL σωματιδίων^{53,54}.

II.3 Η μείωση των επιπέδων της HDL χοληστερόλης ως παράγων κινδύνου

Ο αριθμός και η σύσταση των HDL εξαρτάται: 1) από τη σύνθεση μικρών HDL πλούσιων σε φωσφολιπίδια και αποπρωτεΐνες από το ήπαρ και το γαστρεντερικό σωλήνα, 2) από τη μεταφορά



επιφανειακού υλικού πλούσιου σε φωσφολιπίδια, χοληστερόλη και αποπρωτεΐνες, από τις πλούσιες σε τριγλυκερίδια λιποπρωτεΐνες κατά τη διάρκεια του καταβολισμού τους, 3) από τη μεταφορά συστατικών των HDL (κυρίως εστέρων χοληστερόλης) σε άλλες λιποπρωτεΐνες, που εξαρτάται από τη συγκέντρωση των λιποπρωτεϊνών που δέχονται τους εστέρες χοληστερόλης και τη διάρκεια παραμονής τους στο πλάσμα και 4) από τη μεταφορά χοληστερόλης από τους περιφερικούς ιστούς και από άλλες λιποπρωτεΐνες στις HDL².

Οι HDL ταξινομούνται σε δύο κύριες κατηγορίες: τις HDL2, με πυκνότητα 1.063-1.125g/ml και τις HDL3, με πυκνότητα 1.125 - 1.25g/ml⁵⁵. Οι HDL ταξινομούνται επίσης σε δύο κατηγορίες ανάλογα με τις αποπρωτεΐνες που περιέχουν. Έτσι, υπάρχουν Apo AI HDL, δηλαδή σωματίδια που περιέχουν μόνο Apo AI και τα οποία θεωρούνται κατεξοχήν αντιαθηρωγόνα και Apo AI/AII HDL, που περιέχουν Apo AI αλλά και Apo AII⁵⁶.

Πολλές επιδημιολογικές μελέτες έδειξαν ότι υπάρχει αρνητική συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων των υψηλής πυκνότητας λιποπρωτεϊνών (HDL) και του κινδύνου εμφάνισης καρδιαγγειακής νόσου⁵⁷⁻⁵⁹. Έχει διατυπωθεί η άποψη ότι η ευεργητική επίδραση των HDL οφείλεται στο γεγονός ότι οι HDL διαδραματίζουν καθοριστικό ρόλο στο μηχανισμό της ανάστροφης μεταφοράς χοληστερόλης από τους περιφερικούς ιστούς στο ήπαρ⁶⁰. Ωστόσο, οι οδηγίες που είχαν διατυπωθεί για την έγκαιρη διάγνωση και την αντιμετώπιση των διαταραχών του μεταβολισμού των λιπιδίων στηρίζονταν στα επίπεδα της LDL χοληστερόλης⁶¹. Πρόσφατα, οι νέες οδηγίες της Εθνικής Επιτροπής για τη χοληστερόλη των ΗΠΑ συνιστούν τη μέτρηση των επιπέδων της HDL χοληστερόλης (σε συνδυασμό βέβαια με τον προσδιορισμό της ολικής χοληστερόλης) σε όλα τα ενήλικα άτομα⁶². Επιπρόσθετα, τα μειωμένα επίπεδα της HDL χοληστερόλης (<40mg/dl) θεωρούνται ανεξάρτητος παράγοντας κινδύνου για την εμφάνιση καρδιαγγειακής νόσου και πρέπει να λαμβάνονται υπόψη στο σχεδιασμό της διαιτητικής ή και φαρμακευτικής θεραπείας των δυσλιπιδαιμιών⁶². Πολύ πρόσφατα διατυπώθηκε η άποψη ότι η αύξηση της HDL χοληστερόλης πρέπει να αποτελεί στόχο της υπολιπιδαιμικής αγωγής κυρίως σε άτομα υψηλού κινδύνου, σε διαβητικούς ασθενείς, καθώς και σε ασθενείς που πληρούν τα κριτήρια για τη διάγνωση του μεταβολικού συνδρόμου⁶³.

Η αντιαθηρωγόνος δράση των HDL επιβεβαιώνεται και από μελέτες τόσο σε πειραματόζωα όσο και σε ασθενείς με οξεία στεφανιαία σύνδρομα. Οι μελέτες αυτές έδειξαν ότι η έγχυση HDL ή απολιποπρωτεΐνης AI είχε ως αποτέλεσμα την υποστρόφη των αθηρωματικών βλαβών⁶⁴⁻⁶⁷. Η προστατευτική επίδραση των HDL υποστηρίζεται και από τα αποτελέσματα επιδημιολογικών μελετών, οι οποίες έδειξαν ότι τα μειωμένα επίπεδα της HDL χοληστερόλης αυξάνουν σημαντικά τον κίνδυνο εμφάνισης καρδιαγγειακής νόσου, ενώ τα αυξημένα επίπεδα μειώνουν

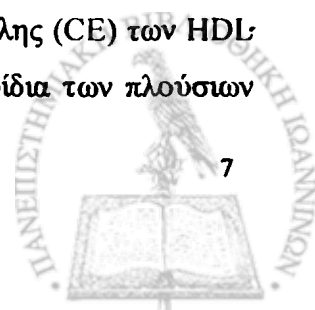


σημαντικά τον κίνδυνο εμφάνισής της⁶⁸.

Δεν υπάρχουν ακόμα επαρκή δεδομένα που να υποστηρίζουν ότι η αύξηση των επιπέδων της HDL χοληστερόλης με μη φαρμακευτικά ή και φαρμακευτικά μέτρα εμποδίζει την εμφάνιση της στεφανιαίας νόσου ή προκαλεί υποστροφή (regression) της ήδη εγκατεστημένης αθηρωσκληρωτικής νόσου. Ωστόσο, υπάρχουν έμμεσες κλινικές ενδείξεις για τον καθοριστικό ρόλο των επιπέδων της HDL χοληστερόλης στην αθηρωσκληρωτική διαδικασία. Πράγματι, στη μελέτη του Helsinki η αύξηση των επιπέδων της HDL χοληστερόλης θεωρήθηκε υπεύθυνη για το 50% της μείωσης της καρδιαγγειακής νοσηρότητας και θνητότητας^{69,70}. Στη μελέτη VA-HIT η χορήγηση της γεμφιπροζύλης σε άτομα με στεφανιαία νόσο που δεν είχαν αυξημένα επίπεδα LDL χοληστερόλης αλλά μειωμένα επίπεδα HDL χοληστερόλης είχε ως αποτέλεσμα μία κατά 22% μείωση των καρδιαγγειακών συμβαμάτων που συσχετιζόνταν με την αύξηση των επιπέδων της HDL χοληστερόλης^{71,72}. Πάντως, πρέπει να τονισθεί ότι στις περισσότερες από αυτές τις μελέτες οι μεταβολές των επιπέδων της HDL χοληστερόλης παρατηρήθηκαν σε συνδυασμό με αντίστοιχες μεταβολές των άλλων λιπιδαιμικών παραμέτρων και καμία μελέτη δεν σχεδιάστηκε για την αντιμετώπιση της πρωτοπαθούς υποαλφαλιποπρωτεϊναιμίας σε άτομα με στεφανιαία νόσο.

Μειωμένα επίπεδα HDL χοληστερόλης παρατηρούνται σε άτομα με ή χωρίς άλλες διαταραχές των λιπιδαιμικών παραμέτρων. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον έχει η συνύπαρξη υπερτριγλυκεριδαιμίας και μειωμένων επιπέδων HDL χοληστερόλης, η οποία παρατηρείται πολύ συχνά στην κλινική πράξη⁷³⁻⁷⁵. Η μείωση των επιπέδων της HDL χοληστερόλης σε υπερτριγλυκεριδαιμικούς ασθενείς οφείλεται στην επίδραση των πλούσιων σε τριγλυκερίδια λιποπρωτεϊνών στο μεταβολισμό των HDL. Η υπερτριγλυκεριδαιμία και η μείωση των επιπέδων της HDL χοληστερόλης είναι οι πιο συχνές διαταραχές των λιπιδίων που παρατηρούνται σε διαβητικούς ασθενείς, καθώς και σε ασθενείς με το μεταβολικό σύνδρομο⁷⁶⁻⁷⁹.

Οι πλούσιες σε τριγλυκερίδια λιποπρωτεΐνες (χυλομικρά, VLDL και τα κατάλοιπά τους) επηρεάζουν πολλαπλά το μεταβολισμό των HDL⁸⁰. Συγκεκριμένα: 1) Οι πλούσιες σε τριγλυκερίδια λιποπρωτεΐνες κατά τη διάρκεια του καταβολισμού τους απελευθερώνουν επιφανειακό υλικό πλούσιο σε φωσφολιπίδια, ελεύθερη χοληστερόλη και αποπρωτεΐνες. Το επιφανειακό αυτό υλικό οργανώνεται σε δισκοειδή σωματίδια, τα οποία στη συνέχεια με την επίδραση του ενζύμου ακυλοτρανσφεράση της χοληστερόλης (LCAT) μετατρέπονται σε σφαιρικά σωματίδια και αποτελούν μία σημαντική πηγή παραγωγής HDL. 2) Παρουσία της πρωτεΐνης που μεταφέρει εστέρες χοληστερόλης (CETP), εστέρες χοληστερόλης (CE) των HDL μεταφέρονται στις πλούσιες σε τριγλυκερίδια λιποπρωτεΐνες, ενώ τριγλυκερίδια των πλούσιων



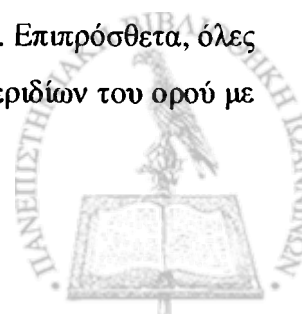
σε τριγλυκερίδια λιποπρωτεϊνών μεταφέρονται στις HDL⁸⁰. Η ηπατική λιπάση υδρολύει στη συνέχεια τα τριγλυκερίδια των HDL, με τελικό αποτέλεσμα τη μείωση του μεγέθους και της πυκνότητας των HDL. Σε περιπτώσεις σημαντικής υπερτριγλυκεριδαϊμίας αυξάνεται η μεταφορά CE από τις HDL στις πλούσιες σε τριγλυκερίδια λιποπρωτεΐνες και μειώνονται τα επίπεδα της HDL χοληστερόλης (κύρια της HDL2). Έτσι, σε ασθενείς με υπερτριγλυκεριδαϊμία επικρατούν οι μικρές και πυκνές HDL3, οι οποίες περιέχουν μικρή ποσότητα χοληστερόλης και σχετικά μεγαλύτερη ποσότητα τριγλυκεριδίων^{80,81}. 3) Οι πλούσιες σε τριγλυκερίδια λιποπρωτεΐνες επηρεάζουν τον καταβολισμό της Apo A1 και επομένως και των HDL. Όπως αναφέρθηκε, υπερτριγλυκεριδαϊμικοί ασθενείς έχουν μικρές πυκνές HDL, οι οποίες πιθανά καταβολίζονται με ταχύτερο ρυθμό σε σχέση με τα μεγαλύτερα HDL σωματίδια. Οι Hogowitz και συνεργάτες έδειξαν ότι, σε άτομα με υπερτριγλυκεριδαϊμία και μειωμένα επίπεδα HDL χοληστερόλης, η Apo A1 είναι χαλαρά συνδεδεμένη με τις HDL που δεν έχουν επαρκή αριθμό εστέρων χοληστερόλης (δηλαδή με μικρές πυκνές HDL) και απεκκρίνεται εύκολα από τους νεφρούς⁸².

II.4 Η υπερτριγλυκεριδαϊμία ως παράγων κινδύνου

Οι διαταραχές του μεταβολισμού των λιπιδίων και, κυρίως, η αύξηση των επιπέδων της ολικής και LDL χοληστερόλης, καθώς και η μείωση των επιπέδων της HDL χοληστερόλης διαδραματίζουν καθοριστικό ρόλο στην παθογένεια της αθηρωσκληρωτικής νόσου. Ωστόσο, υπάρχουν βάσιμες ενδείξεις ότι και η υπερτριγλυκεριδαϊμία είναι πιθανό να συμβάλλει σημαντικά στην αθηρωσκληρωτική διαδικασία.

Παρά τη συστηματική έρευνα των τελευταίων 30 χρόνων, δεν έχει αποσαφηνισθεί ο ρόλος της υπερτριγλυκεριδαϊμίας στην παθογένεια της αθηρωσκληρώσεως και της καρδιαγγειακής νόσου. Πολλές μελέτες έδειξαν θετική συσχέτιση ανάμεσα στα αυξημένα επίπεδα των τριγλυκεριδίων του ορού και στον κίνδυνο εμφάνισης στεφανιαίας νόσου σε άνδρες και γυναίκες, ιδιαίτερα σε ασθενείς με σακχαρώδη διαβήτη τύπου II^{83,84}. Ωστόσο, σε πολυπαραγοντική στατιστική ανάλυση, όταν ληφθούν υπόψη και οι άλλοι προδιαθεσικοί παράγοντες για την εμφάνιση στεφανιαίας νόσου και κυρίως τα επίπεδα της ολικής και HDL χοληστερόλης, η υπερτριγλυκεριδαϊμία δεν φαίνεται πάντα να αποτελεί ανεξάρτητο προδιαθεσικό παράγοντα κινδύνου^{85,86}.

Μία εξήγηση για τα διαφορετικά αποτελέσματα των επιδημιολογικών μελετών είναι ότι η υπερτριγλυκεριδαϊμία οφείλεται σε διαφορετικούς βιολογικούς μηχανισμούς. Επιπρόσθετα, όλες σχεδόν οι μελέτες που προσπαθούν να συσχετίσουν τα επίπεδα των τριγλυκεριδίων του ορού με



την εμφάνιση στεφανιαίας νόσου βασίζονται σε τιμές τριγλυκεριδίων του ορού που προσδιορίζονται μετά νηστεία 12 - 14 ωρών⁸⁷. Ωστόσο, υπάρχουν βιβλιογραφικά δεδομένα που υποστηρίζουν ότι η διαδικασία της αθηρωγένεσης είναι δυνατό να εξελίσσεται μετά τα γεύματα και ότι επιτάχυνση της αθηρωματικής διαδικασίας παρατηρείται και σε νορμολιπαιμικά άτομα που συσσωρεύουν πλούσιες σε τριγλυκερίδια λιποπρωτεΐνες μετά τα γεύματα, οι οποίες προάγουν την εναπόθεση χοληστερόλης στο αγγειακό τοίχωμα⁸⁸⁻⁹⁰. Η υπερτριγλυκεριδαμία διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη παθογένεια της μετά τα γεύματα λιπαμίας. Έχει διατυπωθεί η άποψη ότι σε ασθενείς με αυξημένα επίπεδα τριγλυκεριδίων στον ορό υπάρχει ανταγωνισμός μεταξύ των VLDL και των λιποπρωτεϊνών που αθροίζονται μετά τα γεύματα, όσον αφορά τον καταβολισμό τους από τη λιποπρωτεϊνική λιπάση, με αποτέλεσμα σημαντική επιβράδυνση της κάθαρσης των τριγλυκεριδίων των χυλομικρών και μειωμένο καταβολισμό των λιποπρωτεϊνών που αθροίζονται μετά τα γεύματα^{91,92}. Οι λιποπρωτεΐνες αυτές είναι πιθανά αθηρωγόνες.

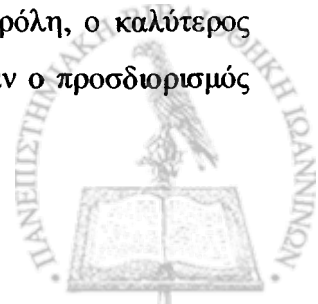
Όπως ήδη αναφέρθηκε, υπάρχει στενή συσχέτιση και αλληλεπίδραση μεταξύ των VLDL και των HDL, καθώς και μεταξύ των επιπέδων των τριγλυκεριδίων του ορού και των επιπέδων της HDL χοληστερόλης. Σε πολυπαραγοντική στατιστική ανάλυση, όταν ληφθούν υπόψη τα επίπεδα της HDL χοληστερόλης, η υπερτριγλυκεριδαμία δεν φαίνεται να αποτελεί σημαντικό προδιαθεσικό παράγοντα κινδύνου για στεφανιαία νόσο⁸⁶. Ωστόσο, πρόσφατα διατυπώθηκε η άποψη ότι τα τριγλυκερίδια του ορού διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην παθογένεια της αθηρωγένεσης, αφού τα επίπεδα της HDL χοληστερόλης και η αποτελεσματικότητα του μηχανισμού της ανάστροφης μεταφοράς χοληστερόλης (από τα περιφερικά κύτταρα στο ήπαρ) εξαρτώνται σε σημαντικό βαθμό από το μεταβολισμό των πλούσιων σε τριγλυκερίδια λιποπρωτεϊνών⁸⁰. Η επίδραση αυτών των λιποπρωτεϊνών στο μεταβολισμό των HDL ασκείται κυρίως μετά τα γεύματα κατά την είσοδο των χυλομικρών στην κυκλοφορία. Έτσι, η ταχεία λιπόλυση των πλούσιων σε τριγλυκερίδια λιποπρωτεϊνών έχει ως αποτέλεσμα τη μεταφορά του πλεονάζοντος υλικού της επιφάνειάς τους, που αποτελείται κυρίως από φωσφολιπίδια, στις HDL και το σχηματισμό μεγάλων HDL₂, οι οποίες αποτελούν το πιο σημαντικό κλάσμα των HDL που καθορίζει την ικανότητα δέσμευσης και μεταφοράς της πλεονάζουσας χοληστερόλης των κυττάρων¹¹. Η μεταφορά αυτή του πλεονάζοντος επιφανειακού υλικού στις HDL είναι επίσης σημαντική και για ένα ακόμη λόγο. Μελέτη *in vitro* έδειξε ότι το υλικό αυτό, αν δεν ενσωματωθεί στις HDL, είναι κυτταροτοξικό στα μακροφάγα και πιθανά διαδραματίζει κάποιον ρόλο στην αθηρωσκληρωτική διαδικασία⁹³. Αντίθετα, σε περιπτώσεις μειωμένου καταβολισμού των πλούσιων σε τριγλυκερίδια λιποπρωτεϊνών, υπάρχει μεγαλύτερη δυνατότητα για αμφίδρομη μεταφορά τριγλυκεριδίων από τις λιποπρωτεΐνες αυτές στις HDL και εστέρων χοληστερόλης



από τις HDL στις πλούσιες σε τριγλυκερίδια λιποπρωτεΐνες. Με αυτό τον τρόπο, η HDL χοληστερόλη μετακινείται στις πλούσιες σε τριγλυκερίδια λιποπρωτεΐνες και οι μεγάλες HDL2 μετατρέπονται στις μικρότερες HDL3, οι οποίες έχουν μειωμένη ικανότητα δέσμευσης και μεταφοράς χοληστερόλης⁹⁴⁻⁹⁶. Επομένως, η ταχεία λιπόλυση των πλούσιων σε τριγλυκερίδια λιποπρωτεϊνών διατηρεί τα επίπεδα των HDL2 και της HDL χοληστερόλης αυξημένα, διότι και προάγει τη σύνθεση μεγάλων HDL2 και εμποδίζει τον καταβολισμό τους⁹⁴⁻⁹⁶.

Επιπλέον, υπάρχουν αρκετά δεδομένα που δείχνουν ότι τουλάχιστον σε ορισμένες περιπτώσεις οι πλούσιες σε τριγλυκερίδια λιποπρωτεΐνες ή τα κατάλοιπά τους είναι αθηρωγόνα⁹⁷. Τρεις παράγοντες φαίνεται ότι επηρεάζουν την αθηρωγόνο δυνατότητα των πλούσιων σε τριγλυκερίδια σωματιδίων: το μέγεθος, η περιεκτικότητα σε εστέρες χοληστερόλης και το είδος των αποπρωτεϊνών που υπάρχουν στο μόριό τους. Έτσι, οι μικρότερες λιποπρωτεΐνες διηθούνται πιο εύκολα στο αγγειακό τοίχωμα και ως εκ τούτου είναι πιο αθηρωγόνες⁹⁸. Η μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε χοληστερόλη έχει ως αποτέλεσμα τη μεταφορά μεγαλύτερης ποσότητας χοληστερόλης στο αγγειακό τοίχωμα. Τέλος, η παρουσία της Apo E διευκολύνει τη σύνδεσή τους με υποδοχείς λιποπρωτεϊνών στα μακροφάγα και το σχηματισμό αφρωδών κυττάρων (foam cells)⁹⁹. Ένα κλασσικό παράδειγμα ενδεικτικό της αθηρωγόνου δυνατότητας των πλούσιων σε τριγλυκερίδια λιποπρωτεϊνών, είναι η υπερλιπιδαιμία τύπου III, στην οποία παρατηρείται συσσώρευση ενός τύπου καταλοίπων των VLDL, που καλούνται β-VLDL, εξαιτίας διαταραχής του μορίου της Apo E, η οποία παρεμβαίνει στη διαμέσου υποδοχέων απομάκρυνση των VLDL και των καταλοίπων τους. Ο μειωμένος καταβολισμός αυτών των λιποπρωτεϊνών έχει ως αποτέλεσμα την παραμονή τους στην κυκλοφορία για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα και τον εμπλουτισμό τους με εστέρες χοληστερόλης¹⁰⁰. Έτσι, τα κατάλοιπα αυτά μετασχηματίζονται σε β-VLDL. Οι ασθενείς με υπερλιπιδαιμία τύπου III εμφανίζουν πρόωμη αθηρωσκληρωτική νόσο, η οποία οφείλεται στην αθηρωγόνο δυνατότητα των β-VLDL¹⁰⁰.

Μία θεώρηση της συσχέτισης της υπερτριγλυκεριδαϊμίας και της αθηρωσκλήρωσης στηρίζεται στην αύξηση της VLDL χοληστερόλης, η οποία παρατηρείται συχνά σε υπερτριγλυκεριδαϊμικούς ασθενείς και οφείλεται στην αυξημένη μεταφορά εστέρων χοληστερόλης στις VLDL. Αν και οι VLDL δεν διηθούνται στο αγγειακό τοίχωμα τόσο γρήγορα όσο οι LDL, περιέχουν Apo E με αποτέλεσμα να έχουν αυξημένη ικανότητα σύνδεσης με υποδοχείς λιποπρωτεϊνών στο αγγειακό τοίχωμα¹⁰¹⁻¹⁰⁴. Αυτή η ιδιότητά τους, η οποία φαίνεται να επιβεβαιώνεται από μία σειρά in vitro μελετών, αυξάνει την αθηρωγόνο δράση τους. Αν λοιπόν η VLDL χοληστερόλη είναι αθηρωγόνος όσο και η LDL χοληστερόλη, ο καλύτερος υπολογισμός του κινδύνου για την εμφάνιση καρδιαγγειακής νόσου θα ήταν ο προσδιορισμός



του αθροίσματος LDL χοληστερόλης + VLDL χοληστερόλης, δηλαδή ο προσδιορισμός της μη HDL (non HDL) χοληστερόλης. Πράγματι, σύμφωνα με τις πρόσφατες οδηγίες για την αντιμετώπιση των δυσλιπιδαιμιών η μείωση της non HDL χοληστερόλης αποτελεί δευτερογενή στόχο της υπολιπιδαιμικής αγωγής σε ασθενείς με υπερτριγλυκεριδαμία (τριγλυκερίδια >200mg/dl)⁶². Εξάλλου, είναι γνωστό ότι τα ολικά επίπεδα της Apo B, που υπάρχει στις LDL καθώς και στις VLDL, είναι πολύ καλός δείκτης του κινδύνου για στεφανιαία νόσο, ιδιαίτερα σε υπερτριγλυκεριδαμικούς ασθενείς¹⁰⁵⁻¹⁰⁷.

Τα τελευταία χρόνια, έχουν απομονωθεί υποομάδες των LDL, οι οποίες έχουν διαφορετική αθηρωγόνο δυνατότητα. Έχει διατυπωθεί η άποψη ότι η παρουσία μικρών πυκνών LDL αυξάνει σημαντικά την πιθανότητα εμφάνισης αθηρωσκληρωτικής και στεφανιαίας νόσου¹⁰⁸. Όπως ήδη αναφέρθηκε, η σημαντική αυτή ετερογένεια των LDL συσχετίζεται με τα επίπεδα των τριγλυκεριδίων του ορού¹⁰⁹.

Η υπερτριγλυκεριδαμία μπορεί επίσης να συσχετίζεται με την εξέλιξη της αγγειακής νόσου, επηρεάζοντας τη θρομβωτική διάθεση. Πρόσφατη μελέτη έδειξε ότι υπάρχει συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων των τριγλυκεριδίων του ορού και των επιπέδων του παράγοντα VII της πήξεως, ο οποίος διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στο σχηματισμό θρόμβου, ίσως διότι οι πλούσιες σε τριγλυκερίδια λιποπρωτεΐνες προάγουν την ενεργοποίησή του¹¹⁰. Επιπρόσθετα, μελέτες έδειξαν ότι οι VLDL ασθενών με υπερτριγλυκεριδαμία αυξάνουν την απελευθέρωση του αναστολέα του ενεργοποιητή του πλασμινογόνου (PAI-1) από ενδοθηλιακά κύτταρα^{111,112}. Ο μηχανισμός αυτός μπορεί να εξηγήσει τη συσχέτιση των αυξημένων επιπέδων των τριγλυκεριδίων του ορού, των αυξημένων επιπέδων του PAI-1 και της συχνότητας εμφάνισης εμφράγματος του μυοκαρδίου¹¹³.

Πέραν των ισχυρών πειραματικών ενδείξεων, πρόσφατες κλινικές μελέτες έδειξαν ότι τα αυξημένα επίπεδα των τριγλυκεριδίων του ορού διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην παθογένεια της αθηρωσκλήρωσης. Προσεκτική ανάλυση των δεδομένων της μελέτης PROCAM έδειξε ότι η συνδυασμένη δράση της υπερτριγλυκεριδαμίας και των χαμηλών επιπέδων της HDL χοληστερόλης σε άτομα με αυξημένη σχέση ολικής προς HDL χοληστερόλη συνοδεύεται από αυξημένο κίνδυνο στεφανιαίας νόσου⁶⁸. Επίσης, προσεκτική ανάλυση της μελέτης του Helsinki έδειξε ότι η μεγαλύτερη μείωση της επίπτωσης της στεφανιαίας νόσου παρατηρήθηκε σε άτομα με υπερλιπιδαιμία τύπου IIB, δηλαδή σε άτομα με αυξημένη χοληστερόλη στον ορό και υπερτριγλυκεριδαμία. Στην ίδια μελέτη διαπιστώθηκε ότι ο κίνδυνος εμφάνισης στεφανιαίας νόσου είναι ιδιαίτερα αυξημένος σε άτομα που έχουν αυξημένη σχέση LDL χοληστερόλη / HDL χοληστερόλη (>5) και αυξημένα τριγλυκερίδια στον ορό (>200mg/dl)⁷⁰. Η ομάδα αυτή των ασθενών φαίνεται ότι ωφελείται ιδιαίτερα από τη θεραπεία με γεμφιπροζίλη. Τέλος, μια

μεταανάλυση πολλών κλινικών μελετών έδειξε ότι η υπερτριγλυκεριδαμία είναι ανεξάρτητος παράγοντας κινδύνου για την εμφάνιση στεφανιαίας νόσου, ιδιαίτερα σε γυναίκες⁸³.

Συμπερασματικά, φαίνεται ότι η υπερτριγλυκεριδαμία είναι, τουλάχιστον σε ορισμένες περιπτώσεις, σημαντικός παράγων κινδύνου για την εμφάνιση αθηροσκληρωτικής νόσου, τόσο διότι οι πλούσιες σε τριγλυκερίδια λιποπρωτεΐνες είναι πιθανά αθηρωγόνες, όσο και εξαιτίας των βιολογικών επακόλουθων της υπερτριγλυκεριδαμίας και συγκεκριμένα της μείωσης των επιπέδων της HDL χοληστερόλης, της παρουσίας μικρών πυκνών LDL και μεγάλων VLDL, της αύξησης της πήκτικότητας και της αυξημένης μεταγευματικής λιπαιμίας.



III. ΠΡΩΤΟΠΑΘΕΙΣ ΔΥΣΛΙΠΙΔΑΙΜΙΕΣ

III.1 Ταξινόμηση των πρωτοπαθών δυσλιπιδαιμιών

Οι δυσλιπιδαιμίες ταξινομούνται σύμφωνα με την ταξινόμηση του Fredrickson, η οποία βασίζεται στη διαφορετική ηλεκτροφορητική κινητικότητα των λιποπρωτεϊνών του πλάσματος (πίνακας 1). Σήμερα η χρήση αυτής της ταξινόμησης τείνει να εγκαταλειφθεί για τους εξής λόγους: 1) δεν λαμβάνει υπόψη τις λιποπρωτεΐνες υψηλής πυκνότητας (HDL), 2) δεν αποτελεί διαγνωστική ταξινόμηση και 3) δεν προσφέρει πληροφορίες σχετικά με την πρόγνωση των ασθενών. Για παράδειγμα, η υπερλιποπρωτεϊναιμία τύπου IIa περιλαμβάνει τόσο την οικογενή υπερχοληστερολαιμία, μια νόσο που αν αφηθεί χωρίς θεραπεία οδηγεί σε πρόωπη στεφανιαία νόσο και θάνατο, όσο και την ήπια πολυγονική υπερχοληστερολαιμία, η οποία μπορεί να είναι τελείως ακίνδυνη όταν απουσιάζουν άλλοι παράγοντες κινδύνου και συχνά συνδυάζεται με υψηλά επίπεδα HDL χοληστερόλης. Μια αιτιολογική ταξινόμηση των συχνότερων πρωτοπαθών δυσλιπιδαιμιών φαίνεται στον πίνακα 2.

Πίνακας 1: Ταξινόμηση των δυσλιπιδαιμιών κατά Fredrickson.

ΤΥΠΟΣ	ΑΥΞΗΜΕΝΕΣ ΛΙΠΟΠΡΩΤΕΪΝΕΣ	ΑΥΞΗΜΕΝΑ ΛΙΠΙΔΙΑ
I	Χυλομικρά	Τριγλυκερίδια και χοληστερόλη
IIa	LDL	Χοληστερόλη
IIβ	VLDL και LDL	Χοληστερόλη και τριγλυκερίδια
III	βVLDL	Τριγλυκερίδια και χοληστερόλη
IV	VLDL	Τριγλυκερίδια
V	Χυλομικρά και VLDL	Τριγλυκερίδια και χοληστερόλη

Πίνακας 2: Ταξινόμηση των συχνότερων πρωτοπαθών δυσλιπιδαιμιών.

A. Αύξηση της LDL χοληστερόλης

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

B. Ήπια ή μέτρια υπερτριγλυκεριδαιμία

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

Γ. Σοβαρή υπερτριγλυκεριδαιμία

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

Δ. Μείωση της HDL χοληστερόλης

1. Οικογενής υποαλφαλιποπρωτεΐναιμία
-

III.2 Οικογενής υπερχοληστερολαιμία

Γενικά σχόλια

Πρόκειται για την πιο συχνή γενετική διαταραχή του μεταβολισμού. Μεταδίδεται με τον αυτοσωμικό επικρατούντα χαρακτήρα. Η συχνότητα των ετεροζυγωτών στο γενικό πληθυσμό είναι 1:500 άτομα, ενώ των ομοζυγωτών 1:10⁶. Η κύρια διαταραχή αφορά μεταλλάξεις του γονιδίου που κωδικοποιεί τον LDL (B100/E) υποδοχέα και εδράζεται στο χρωμόσωμα 19. Μέχρι σήμερα έχουν περιγραφεί περισσότερες από 700 διαφορετικές μεταλλάξεις, οι οποίες έχουν ως αποτέλεσμα τη διαταραχή της λειτουργίας των LDL υποδοχέων. Οι μεταλλάξεις αυτές μπορούν να ταξινομηθούν σε πέντε κύριες κατηγορίες¹⁰⁰:

1. Μεταλλάξεις που επηρεάζουν τη σύνθεση του υποδοχέα.
2. Μεταλλάξεις που επηρεάζουν τη μεταφορά του υποδοχέα από το ενδοπλασματικό δίκτυο στη συσκευή Golgi.



3. Μεταλλάξεις που επηρεάζουν την ικανότητα σύνδεσης του υποδοχέα με την LDL.
4. Μεταλλάξεις που επηρεάζουν την ενδοκύττωση του συμπλέγματος, ενώ η σύνδεση υποδοχέα-LDL γίνεται κανονικά.
5. Μεταλλάξεις που επηρεάζουν την ανακύκλωση του υποδοχέα στην κυτταρική μεμβράνη μετά την απελευθέρωση της LDL στο κυτταρόπλασμα των ηπατοκυττάρων.

Οι μεταλλάξεις αυτές έχουν ως αποτέλεσμα είτε την παρουσία ενός τελείως ανενεργού υποδοχέα (R^{b0}), είτε ενός υποδοχέα που διατηρεί μια μικρή ικανότητα σύνδεσης με την LDL (R^b), είτε, τέλος, ενός υποδοχέα με φυσιολογική ικανότητα σύνδεσης με την LDL αλλά ανεπαρκή για την ενδοκυττάρια μεταφορά της ($R^{b+}i^0$).

Οι ετεροζυγώτες έχουν ένα φυσιολογικό και ένα μεταλλαγμένο αλληλίο του LDL υποδοχέα, με αποτέλεσμα να διατηρούν τη μισή περίπου ικανότητα σύνδεσης των LDL με τους υποδοχείς σε σύγκριση με τα φυσιολογικά άτομα. Οι ομοζυγώτες έχουν δύο μεταλλαγμένα αλληλόμορφα γονίδια και συνεπώς η ικανότητα σύνδεσης των LDL με τους αντίστοιχους υποδοχείς είναι πρακτικά ανύπαρκτη.

Σε ασθενείς με οικογενή υπερχοληστερολαιμία εκτός από το μειωμένο καταβολισμό παρατηρείται και αύξηση της σύνθεσης των LDL. Η αύξηση αυτή οφείλεται στο μειωμένο καταβολισμό των καταλοίπων των VLDL (IDL) από το ήπαρ, που επίσης προσλαμβάνονται διαμέσου των LDL (apoB100/E) υποδοχέων¹¹⁴. Έτσι, περισσότερα IDL σωματίδια μετατρέπονται σε LDL. Το τελικό αποτέλεσμα είναι μια μεγάλη αύξηση των LDL στο πλάσμα. Επιπρόσθετα, πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι οι LDL υποδοχείς ενδέχεται να διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της ηπατικής παραγωγής των VLDL. Πράγματι, πειραματόζωα τα οποία υπερεκφράζουν το μεταγραφικό παράγοντα SREBP-1a εμφανίζουν αυξημένη ηπατική σύνθεση τριγλυκεριδίων και χοληστερόλης, καθώς και ηπατική στεάτωση. Ωστόσο, οι διαταραχές αυτές δεν συνοδεύονται από αύξηση των λιπιδίων του πλάσματος¹¹⁵. Η αναστολή της έκφρασης του γονιδίου του LDL υποδοχέα σε αυτά τα πειραματόζωα συνοδεύεται από σημαντική αύξηση της συγκέντρωσης των λιπιδίων του πλάσματος εξαιτίας της αυξημένης απελευθέρωσης λιποπρωτεϊνών που περιέχουν απολιποπρωτεΐνη Β από το ήπαρ¹¹⁵. Τέλος, μελέτες σε καλλιέργειες ηπατοκυττάρων ποντικού έδειξαν ότι οι LDL υποδοχείς μειώνουν την απελευθέρωση της απολιποπρωτεΐνης Β από το ήπαρ αυξάνοντας τον ενδοκυττάριο καταβολισμό της¹¹⁶.

Κλινική εικόνα

Η κλινική εικόνα της οικογενούς υπερχοληστερολαιμίας χαρακτηρίζεται από υψηλές συγκεντρώσεις ολικής και LDL χοληστερόλης, την παρουσία των χαρακτηριστικών τενόντιων ξανθωμάτων και την σημαντικά αυξημένη επίπτωση πρώιμης καρδιαγγειακής νόσου.

Τα επίπεδα της χοληστερόλης του πλάσματος είναι αυξημένα κατά τη γέννηση στους ασθενείς με οικογενή υπερχοληστερολαιμία¹⁰⁰. Ωστόσο, δεν συνιστάται η μέτρηση της ολικής χοληστερόλης στο αίμα του ομφάλιου λώρου σε όλα ανεξαιρέτως τα νεογνά ως δοκιμασία ελέγχου για την έγκαιρη διάγνωση της οικογενούς υπερχοληστερολαιμίας. Ο βασικότερος λόγος είναι ότι η αύξηση της HDL χοληστερόλης, η οποία είναι η κύρια λιποπρωτεΐνη του νεογνικού πλάσματος, οδηγεί συχνότερα σε αύξηση της ολικής χοληστερόλης στα νεογνά σε σύγκριση με την οικογενή υπερχοληστερολαιμία¹⁰⁰. Επιπρόσθετα, η εφαρμογή αυτής της μεθόδου σε όλα τα νεογνά μπορεί να οδηγήσει σε αυξημένη επίπτωση ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων¹¹⁷. Έτσι, η μέτρηση των επιπέδων της χοληστερόλης στο αίμα του ομφάλιου λώρου συνιστάται μόνο σε νεογνά των οποίων οι γονείς εμφανίζουν οικογενή υπερχοληστερολαιμία.

Το παθογνωμονικό γνώρισμα της οικογενούς υπερχοληστερολαιμίας είναι η παρουσία των τενόντιων ξανθωμάτων¹⁰⁰. Πρόκειται για λευκωπές οζώδεις διογκώσεις, που τυπικά αφορούν τον αχίλλειο τένοντα, καθώς και τους τένοντες της κνήμης, του αγκώνα και της ραχιαίας επιφάνειας των άκρων χειρών. Οφείλονται στη συσσώρευση ιών κολλαγόνου και μακροφάγων πλούσιων σε εστέρες χοληστερόλης και η ιστολογική εικόνα τους μοιάζει με αυτή του αθηρώματος. Τα τενόντια ξανθώματα παρατηρούνται στους ομοζυγώτες στην παιδική ηλικία, ενώ στους ετεροζυγώτες παρατηρούνται σε ηλικία μεγαλύτερη των 20 ετών. Η συχνότητά τους αυξάνει με την πάροδο του χρόνου και τελικά το 75% των ασθενών με οικογενή υπερχοληστερολαιμία εμφανίζει αυτό το κλινικό σημείο. Συχνά τα ξανθώματα φλεγμαίνουν, ιδίως τα ξανθώματα του αχίλλειου τένοντα, ενώ οι ασθενείς εμφανίζουν συμπτώματα τενοντοελυτρίτιδας ή ακόμη και ρήξη των τενόντων. Σε ορισμένους ασθενείς με την έναρξη της υπολιπιδαιμικής θεραπείας παρατηρείται αίσθημα δυσανεξίας στους τένοντες ή και τενοντοελυτρίτιδα. Άλλα χαρακτηριστικά γνωρίσματα της οικογενούς υπερχοληστερολαιμίας είναι η εναπόθεση χοληστερόλης στα βλέφαρα και στον κερατοειδή, με αποτέλεσμα την εμφάνιση ξανθελασμάτων και γεροντότοξου, αντίστοιχα. Τα ξανθελάσματα και το γεροντότοξο δεν αποτελούν ειδικά γνωρίσματα της οικογενούς υπερχοληστερολαιμίας, αλλά παρατηρούνται και σε δυσλιπιδαιμίες άλλης αιτιολογίας ή ακόμη και σε νορμολιπιδαιμικά άτομα. Μεγαλύτερη αξία έχει η ανεύρεση γεροντότοξου σε νεαρά άτομα, αφού στις περισσότερες περιπτώσεις οφείλεται σε οικογενή υπερχοληστερολαιμία.



Στους ομοζυγώτες εκτός από τα τενόντια ξανθώματα παρατηρείται ένας άλλος μοναδικός τύπος ξανθωμάτων. Πρόκειται για τα υποδερματικά επίπεδα ή οζώδη ξανθώματα. Είναι υπερυψωμένες κιτρινωπές πλάκες, οι οποίες παρατηρούνται στα γόνατα, στους αγκώνες, στους γλουτούς και στις μεσοδακτύλιες επιφάνειες των δακτύλων των χεριών. Τέλος, σε ασθενείς με ομόζυγη οικογενή υπερχοληστερολαιμία είναι δυνατόν να παρατηρηθεί αρθρίτιδα των γονάτων, των αγκώνων, των καρπών και των εγγύς μεσοφαλαγγικών αρθρώσεων. Στο αρθρικό υγρό συχνά ανευρίσκονται κρύσταλλοι χοληστερόλης.

Το βασικότερο κλινικό χαρακτηριστικό της οικογενούς υπερχοληστερολαιμίας είναι η αυξημένη επίπτωση πρώιμης καρδιαγγειακής νόσου. Χωρίς θεραπεία το 50% των ανδρών με ετερόζυγη οικογενή υπερχοληστερολαιμία, καθώς και το 15% των γυναικών με ετερόζυγη οικογενή υπερχοληστερολαιμία πεθαίνουν από στεφανιαία νόσο πριν από την ηλικία των 60 ετών^{118,119}. Συνήθως, οι γυναίκες ασθενείς με οικογενή υπερχοληστερολαιμία εμφανίζουν καρδιαγγειακή νόσο 10 έτη αργότερα από τους άνδρες της ίδιας οικογένειας¹²⁰. Η πρόγνωση είναι πολύ χειρότερη για τους ομοζυγώτες, οι οποίοι συνήθως εμφανίζουν καρδιαγγειακή νόσο κατά τα πρώτα έτη της ζωής. Ο λόγος για τον οποίο ορισμένες οικογένειες με οικογενή υπερχοληστερολαιμία εμφανίζουν αυξημένη επίπτωση καρδιαγγειακής νόσου σε σύγκριση με κάποιες άλλες δεν είναι γνωστός. Ο τύπος των μεταλλάξεων του LDL υποδοχέα φαίνεται ότι διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη βαρύτητα της καρδιαγγειακής νόσου κυρίως στους ομοζυγώτες. Ωστόσο, μέχρι σήμερα δεν είναι ξεκάθαρο αν κάτι παρόμοιο ισχύει και για τους ασθενείς με ετερόζυγη οικογενή υπερχοληστερολαιμία¹²¹. Άλλοι παράγοντες που μπορεί να συμβάλλουν στην αύξηση της επίπτωσης και της βαρύτητας της αθηρωματικής νόσου στους ασθενείς με οικογενή υπερχοληστερολαιμία είναι η παχυσαρκία¹²², οι χαμηλές συγκεντρώσεις της HDL χοληστερόλης^{123,124} οι αυξημένες συγκεντρώσεις των τριγλυκεριδίων¹²³ και της λιποπρωτεΐνης (a)^{125,126}, καθώς και η παρουσία του E4 αλληλίου της απολιποπρωτεΐνης E που σχετίζεται με αυξημένη απορρόφηση της χοληστερόλης από το έντερο¹²³.

Εκτός από την πρώιμη εμφάνιση στεφανιαίας νόσου οι ασθενείς με ομόζυγη οικογενή υπερχοληστερολαιμία, καθώς και οι ετεροζυγώτες με πολύ υψηλά επίπεδα χοληστερόλης, εμφανίζουν συχνά και υπερβαλβιδική στένωση της αορτικής βαλβίδας¹²⁷. Αυτή η στένωση οφείλεται σε εναπόθεση χοληστερόλης στο τοίχωμα της αορτής και μπορεί να οδηγήσει σε αιφνίδιο θάνατο. Οι ασθενείς με οικογενή υπερχοληστερολαιμία εμφανίζουν σπανιότερα αθηρωμάτωση των καρωτίδων και των εγκεφαλικών αρτηριών, ενώ περιφερική αρτηριακή νόσος παρατηρείται σχεδόν αποκλειστικά στους ασθενείς με οικογενή υπερχοληστερολαιμία που καπνίζουν¹⁰⁰.



Διάγνωση

Σε κάθε ασθενή με μεμονωμένη αύξηση της ολικής και LDL χοληστερόλης (φαινότυπος ΙΙΑ) και φυσιολογική συγκέντρωση τριγλυκεριδίων νηστείας πρέπει να υποψιαζόμαστε την οικογενή υπερχοληστερολαιμία. Εντούτοις, οι περισσότεροι ασθενείς με φαινότυπο τύπου ΙΙΑ έχουν πολυγονική ή οικογενή μικτή υπερλιπιδαιμία ή νοσήματα που συνδυάζονται με αύξηση των επιπέδων της LDL χοληστερόλης, όπως ο υποθυρεοειδισμός, η αποφρακτική ηπατική νόσος και το νεφρωσικό σύνδρομο. Αφού αποκλεισθούν τα δευτεροπαθή αίτια υπερχοληστερολαιμίας με τον κατάλληλο εργαστηριακό έλεγχο, η διαφορική διάγνωση ανάμεσα στην οικογενή υπερχοληστερολαιμία και τα άλλα αίτια πρωτοπαθούς υπερχοληστερολαιμίας βασίζεται στα ακόλουθα¹²⁸:

1. Στις υψηλές τιμές ολικής χοληστερόλης (350-400 mg/dl) και LDL χοληστερόλης, οι οποίες καθιστούν πιο πιθανή τη διάγνωση της οικογενούς υπερχοληστερολαιμίας, ενώ μέτρια αυξημένες τιμές (ολική χοληστερόλη 280-350 mg/dl) δεν μπορούν να αποκλείσουν τις άλλες πρωτοπαθείς διαταραχές.
2. Στην παρουσία τενόντιων ξανθωμάτων, η οποία είναι σχεδόν παθολογική για την οικογενή υπερχοληστερολαιμία.
3. Στον έλεγχο των λιπιδίων των πρώτου βαθμού συγγενών. Στην οικογενή υπερχοληστερολαιμία οι μισοί πρώτου βαθμού συγγενείς παρουσιάζουν επίσης αυξημένη χοληστερόλη. Η διάγνωση της οικογενούς υπερχοληστερολαιμίας καθίσταται ακόμη πιο πιθανή με την ανεύρεση στο συγγενικό περιβάλλον του ασθενή ενός παιδιού με υπερχοληστερολαιμία.
4. Στην ηλικία έναρξης της υπερχοληστερολαιμίας. Οι ασθενείς με οικογενή υπερχοληστερολαιμία αναφέρουν μακροχρόνιο ιστορικό υπερλιπιδαιμίας ήδη από την παιδική ηλικία, ενώ οι υπόλοιπες διαταραχές συνήθως κάνουν την εμφάνισή τους κατά την 3^η ή 4^η δεκαετία της ζωής.

Στο 10% των ασθενών με ετερόζυγη οικογενή υπερχοληστερολαιμία παρατηρείται ταυτόχρονη αύξηση των τιμών των τριγλυκεριδίων του πλάσματος (φαινότυπος τύπου ΙΙΒ). Σε αυτήν την περίπτωση η νόσος πρέπει να διαφοροδιαγνωσθεί από την οικογενή μικτή υπερλιπιδαιμία.

Η διάγνωση της ομόζυγης οικογενούς υπερχοληστερολαιμίας συνήθως δεν παρουσιάζει ιδιαίτερη δυσκολία. Πολύ συχνά τα παιδιά αυτά εξετάζονται από δερματολόγο εξαιτίας των δερματικών ξανθωμάτων. Αργότερα, η διάγνωση γίνεται όταν εμφανισθεί στηθάγχη ή συγκοπτικό επεισόδιο που οφείλεται σε αορτική στένωση. Οι ασθενείς έχουν πολύ υψηλά επίπεδα χοληστερόλης (>600 mg/dl), ενώ τα επίπεδα των τριγλυκεριδίων είναι φυσιολογικά.



Σε εξειδικευμένα εργαστήρια η χρήση της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) αποκαλύπτει την υπεύθυνη μετάλλαξη του LDL υποδοχέα, ενώ η διάγνωση μπορεί επίσης να στηριχθεί στην άμεση μέτρηση του αριθμού των LDL υποδοχέων σε καλλιέργειες ινοβλαστών δέρματος ή λεμφοκυττάρων περιφερικού αίματος.

Θεραπεία

Ο στόχος της θεραπείας της οικογενούς υπερχοληστερολαιμίας είναι η μείωση των επιπέδων της LDL χοληστερόλης, με σκοπό την επιβράδυνση της εξέλιξης της αθηρωματικής νόσου. Όλοι οι ασθενείς πρέπει να τίθενται σε διαίτα πτωχή σε χοληστερόλη και κεκορεσμένα λίπη και πλούσια σε μονοακόρεστα λίπη και τροφές με υπόλειμμα.

Σε όλους πρακτικά τους ασθενείς με οικογενή υπερχοληστερολαιμία πρέπει να χορηγείται υπολιπιδαιμική φαρμακοθεραπεία με σκοπό τη μείωση των επιπέδων της ολικής και της LDL χοληστερόλης. Τα φάρμακα πρώτης επιλογής είναι οι αναστολείς της HMG-CoA αναγωγάσης (στατίνες)¹²⁹. Ωστόσο, σε ορισμένες περιπτώσεις οι συγκεντρώσεις της χοληστερόλης παραμένουν αυξημένες παρά τη χρήση των μέγιστων επιτρεπόμενων δόσεων των στατινών. Αν και η προσθήκη ρητινών δέσμευσης των χολικών οξέων μπορεί να οδηγήσει σε περαιτέρω μείωση της LDL χοληστερόλης¹³⁰, αυτά τα φάρμακα έχουν σημαντικές παρενέργειες και δεν γίνονται καλά ανεκτά¹³¹. Η προσθήκη υψηλών δόσεων φυτικών στερολών με τη μορφή μαργαρίνης οδηγεί σε μείωση της εντερικής απορρόφησης της χοληστερόλης και οδηγεί σε περαιτέρω μείωση της LDL χοληστερόλης κατά 10-15%¹³². Παρόμοια αποτελέσματα επιτυγχάνονται και με το συνδιασμό των στατινών με νεώτερα φάρμακα (ezetimibe) τα οποία δρουν στην ψηκτροειδή παρυφή των κυττάρων του εντερικού βλεννογόνου και αναστέλλουν την απορρόφηση της χοληστερόλης από το γαστρεντερικό σωλήνα¹³³.

Ιδιαίτερη προσπάθεια απαιτείται για την αντιμετώπιση της οικογενούς υπερχοληστερολαιμίας σε παιδιά¹³⁴. Πρέπει να επισημανθεί ότι δεν συνιστάται διαιτητική παρέμβαση σε παιδιά ηλικίας έως 2 ετών που εμφανίζουν ταχεία ανάπτυξη και επομένως απαιτούν αυξημένη πρόσληψη λίπους. Η διαιτητική παρέμβαση είναι ιδιαίτερα σημαντική σε παιδιά μεγαλύτερης ηλικίας. Μετά την ηλικία των 10 ετών συνιστάται η έναρξη φαρμακοθεραπείας, ιδίως όταν τα επίπεδα της LDL χοληστερόλης είναι μεγαλύτερα από 160 mg/dl. Οι ρητίνες δέσμευσης χολικών οξέων (χολεστουραμίνη και κολεστιπόλη) αποτελούν τα φάρμακα εκλογής για την αντιμετώπιση της οικογενούς υπερχοληστερολαιμίας στα παιδιά. Επιπρόσθετα, πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι οι στατίνες μπορούν να χορηγηθούν με ασφάλεια ακόμη και σε παιδιά μικρότερα των 18 ετών¹³⁵. Στα παιδιά με οικογενή υπερχοληστερολαιμία πρέπει να δοθεί ιδιαίτερη έμφαση στην

υγιεινοδιαιτητική παρέμβαση που περιλαμβάνει τακτική άσκηση, αποφυγή του καπνίσματος και αυστηρό περιορισμό των προσλαμβανόμενων ζωικών λιπών¹³⁴.

Σε ασθενείς με ομόζυγη οικογενή υπερχοληστερολαιμία η φαρμακοθεραπεία είναι γενικά αναποτελεσματική, εξαιτίας της αδυναμίας αύξησης του αριθμού των LDL υποδοχέων (εξαιρέση αποτελεί η χορήγηση υψηλών δόσεων ατορβαστατίνης ή σιμβαστατίνης). Η θεραπεία εκλογής είναι η LDL-αφαίρεση¹³⁶, ενώ σε λίγες περιπτώσεις έχει επιχειρηθεί μεταμόσχευση ήπατος¹³⁷ ή πυλαιο-συστηματική αναστόμωση. Τα νεώτερα φάρμακα που δρούν στα κύτταρα της ψηκτροειδούς παρυφής του εντέρου και αναστέλλουν την απορρόφηση της χοληστερόλης (ezetimibe) αποτελούν μια εναλλακτική λύση για την αντιμετώπιση αυτών των ασθενών¹³³.

Η οικογενής υπερχοληστερολαιμία είναι πιθανά μια από τις πρώτες γενετικές διαταραχές που θα αντιμετωπισθεί με γονιδιακή θεραπεία¹³⁸.

III.3 Οικογενής ανεπάρκεια της απολιποπρωτεΐνης Β

Το 4% περίπου των ασθενών με κλινικοεργαστηριακή εικόνα οικογενούς υπερχοληστερολαιμίας έχει φυσιολογικούς LDL υποδοχείς, αλλά εμφανίζει μειωμένη σύνδεση των LDL σωματιδίων με τους LDL υποδοχείς¹³⁹. Σε αυτές τις περιπτώσεις η υπεύθυνη διαταραχή οφείλεται σε διαταραχή του μορίου της απολιποπρωτεΐνης Β 100, η οποία εμποδίζει τη σύνδεσή της με τους LDL υποδοχείς¹⁴⁰. Στις περισσότερες περιπτώσεις η διαταραχή αυτή οφείλεται σε μετάλλαξη στη θέση 3500, στην οποία η γουανίνη αντικαθίσταται από αδενίνη¹⁴⁰, ενώ σπανιότερα μπορεί να παρατηρηθούν μεταλλάξεις και σε άλλες θέσεις του γονιδίου της απολιποπρωτεΐνης Β 100¹⁴⁰.

Οι ασθενείς με ανεπάρκεια της απολιποπρωτεΐνης Β εμφανίζουν φυσιολογικά επίπεδα λιπιδαιμικών παραμέτρων ή ποικίλου βαθμού υπερλιπιδαιμία. Πολλοί ασθενείς εμφανίζουν τα τυπικά κλινικά και εργαστηριακά ευρήματα της οικογενούς υπερχοληστερολαιμίας. Ωστόσο, η κλινική εικόνα είναι συνήθως πιο ήπια και οι επιπλοκές λιγότερο σοβαρές σε σύγκριση με τους ασθενείς με οικογενή υπερχοληστερολαιμία. Η διαφορά αυτή οφείλεται εν μέρει στο γεγονός ότι τα αθηρογόνα κατάλοιπα των λιποπρωτεϊνών καταβολίζονται κανονικά, αφού συνδέονται διαμέσου της απολιποπρωτεΐνης Ε με τους ηπατικούς υποδοχείς¹⁴¹. Επιπρόσθετα, κινητικές μελέτες του μεταβολισμού των λιπιδίων έδειξαν ότι σε αυτούς τους ασθενείς ο ρυθμός παραγωγής των LDL είναι μικρότερος σε σύγκριση με τους ασθενείς με οικογενή υπερχοληστερολαιμία¹⁴¹.

Η αντιμετώπιση αυτών των ασθενών δεν διαφέρει από την αντίστοιχη των ασθενών με οικογενή υπερχοληστερολαιμία.



III.4 Οικογενής συνδιασμένη (μικτή) δυσλιπιδαιμία

Γενικά σχόλια

Η μικτή δυσλιπιδαιμία, δηλαδή η συνύπαρξη υπερχοληστερολαιμίας και υπερτριγλυκεριδαμίας, οφείλεται κυρίως στην ταυτόχρονη αύξηση των συγκεντρώσεων των LDL και των VLDL. Πρόκειται για μια συχνή διαταραχή του μεταβολισμού των λιπιδίων η οποία απαντάται στο 30% των ασθενών με έμφραγμα του μυοκαρδίου, καθώς και στο 2% του γενικού πληθυσμού¹⁴². Η μικτή δυσλιπιδαιμία εμφανίζει συχνά οικογενή κατανομή και σε αυτές τις περιπτώσεις αναφέρεται ως οικογενής συνδιασμένη δυσλιπιδαιμία. Αν και η οικογενής συνδιασμένη δυσλιπιδαιμία θεωρούνταν κλασσικά ως μια μονογονική διαταραχή του μεταβολισμού των λιπιδίων¹⁴³, σήμερα είναι γνωστό ότι η νόσος οφείλεται στη συνύπαρξη διαταραχών πολλών γονιδίων ή στην αλληλεπίδραση των διαταραχών ενός γονιδίου με περιβαλλοντικούς παράγοντες¹⁴⁴. Γονίδια τα οποία ενδέχεται να διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην παθογένεια της νόσου είναι το γονίδιο της λιποπρωτεϊνικής λιπάσης, τα γονίδια των απολιποπρωτεϊνών C-II και C-III, το γονίδιο της CETP, καθώς και τα γονίδια που ρυθμίζουν το μεταβολισμό των ελεύθερων λιπαρών οξέων στο λιπώδη ιστό και τους μύες¹⁴⁴. Οι διαταραχές του μεταβολισμού των λιποπρωτεϊνών που παρατηρούνται σε ασθενείς με οικογενή συνδιασμένη δυσλιπιδαιμία συνίστανται σε αυξημένη ηπατική παραγωγή των λιποπρωτεϊνών που περιέχουν απολιποπρωτεΐνη Β (VLDL-1 και VLDL-2), καθώς και σε διαταραχή της μεταβολικής κάθαρσης των υπολειμάτων των VLDL (IDL) και των χυλομικρών¹⁴⁵. Επιπρόσθετα, εξαιτίας της διαταραχής του καταβολισμού των πλούσιων σε λιποπρωτεϊνών, καθώς και εξαιτίας της υπερέκφρασης του γονιδίου της CETP οι ασθενείς με οικογενή συνδιασμένη δυσλιπιδαιμία εμφανίζουν χαμηλή συγκέντρωση HDL και υψηλές συγκεντρώσεις των μικρών πυκνών υποκλασμάτων των LDL^{146,147}. Τέλος, εκτός από τις διαταραχές του μεταβολισμού των λιπιδίων, αυτοί οι ασθενείς εμφανίζουν συχνά και αντίσταση των περιφερικών ιστών στη δράση της ινσουλίνης, καθώς και άλλα χαρακτηριστικά του μεταβολικού συνδρόμου (υπερουριχαιμία, κεντρογενή παχυσαρκία, υπέρταση)¹⁴⁸. Η οικογενής συνδιασμένη δυσλιπιδαιμία εκδηλώνεται κλινικά με ένα από τους ακόλουθους φαινότυπους: μεμονωμένη αύξηση της ολικής και LDL χοληστερόλης (τύπος IIA), μεμονωμένη αύξηση των τριγλυκεριδίων (τύπος IV) ή συνύπαρξη υπερχοληστερολαιμίας και υπερτριγλυκεριδαμίας (τύπος IIB). Πρέπει να αναφερθεί ότι στον ίδιο ασθενή συχνά παρατηρείται μεταβολή της φαινοτυπικής έκφρασης της νόσου στο χρόνο, ακόμη και χωρίς φαρμακευτική παρέμβαση. Οι μισοί πρώτου βαθμού συγγενείς των ασθενών εμφανίζουν επίσης υπερλιπιδαιμία. Η επίπτωση της καρδιαγγειακής νόσου σε ασθενείς με οικογενή συνδιασμένη δυσλιπιδαιμία είναι σχεδόν διπλάσια από αυτή των υγιών μαρτύρων⁵⁰. Η

αύξηση αυτή οφείλεται τόσο στη διαταραχή του μεταβολισμού των λιπιδίων όσο και στη συνύπαρξη και άλλων χαρακτηριστικών του μεταβολικού συνδρόμου σε αυτούς τους ασθενείς¹⁴⁹.

Κλινική εικόνα

Η υπερλιπιδαιμία δεν ανιχνεύεται στην παιδική ηλικία, αλλά εμφανίζεται στο τέλος της εφηβείας. Παρατηρείται συνήθως ήπια ή μέτρια αύξηση των λιπιδαιμικών παραμέτρων, ενώ ο φαινότυπος μπορεί να μεταβάλλεται από εξέταση σε εξέταση ή μετά την έναρξη διαιτητικής ή φαρμακευτικής θεραπείας. Επιπρόσθετα, σε ασθενείς με οικογενή συνδυασμένη υπερλιπιδαιμία δεν παρατηρούνται τενόντια ξανθώματα¹⁰⁰.

Οι ασθενείς έχουν ένα ιδιαίτερα βεβαρημένο οικογενειακό ιστορικό πρώιμης στεφανιαίας νόσου, ενώ το 10% των ασθενών με οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου πάσχει από οικογενή συνδυασμένη υπερλιπιδαιμία. Τα επίπεδα της Apo B-100 του ορού είναι αυξημένα¹⁰⁰.

Διάγνωση

Η διάγνωση της νόσου δεν είναι εύκολη, εξαιτίας του φαινοτυπικού πολυμορφισμού. Εντούτοις, η διάγνωση της οικογενούς συνδυασμένης υπερλιπιδαιμίας είναι πιθανή σε ενήλικες ασθενείς με θετικό οικογενειακό ιστορικό πρώιμης καρδιαγγειακής νόσου και αυξημένα επίπεδα λιπιδαιμικών παραμέτρων, ιδιαίτερα όταν παρατηρείται μεταβολή των λιπιδίων κατά τη διάρκεια της παρακολούθησης και υπερλιπιδαιμία στο 50% των πρώτου βαθμού ενήλικων συγγενών. Η διαφορική διάγνωση πρέπει να γίνει από την οικογενή υπερχοληστερολαιμία, την πολυγονική υπερχοληστερολαιμία και την οικογενή υπερτριγλυκεριδαιμία. Σε ασθενείς με οικογενή συνδυασμένη υπερλιπιδαιμία πολύ συχνά παρατηρείται αύξηση της apo B-100, της ινσουλίνης και του ουρικού οξέος, καθώς και σακχαρώδης διαβήτης.

Θεραπεία

Η αντιμετώπιση της οικογενούς συνδυασμένης υπερλιπιδαιμίας περιλαμβάνει:

1. Την αναγνώριση και αντιμετώπιση εκείνων των καταστάσεων που επιδεινώνουν την υπερλιπιδαιμία (σακχαρώδης διαβήτης, υποθυρεοειδισμός, παχυσαρκία, φάρμακα που επηρεάζουν το μεταβολισμό των λιποπρωτεϊνών).
2. Υπολιπιδαιμική διαίτα και σωματική άσκηση
3. Φαρμακευτική αγωγή, ανάλογα με τη διαταραχή που επικρατεί κατά τη στιγμή της διάγνωσης. Συγκεκριμένα, συνιστάται η χορήγηση φιβρατών για την αντιμετώπιση της



υπερτριγλυκεριδαϊμίας¹⁵⁰ και στατινών για τη θεραπεία της υπερχοληστερολαιμίας¹⁵¹. Σε ασθενείς με μκττή δυσλιπιδαιμία μπορεί να χορηγηθούν φμπράτες (ιδιαίτερα τα νεότερα φάρμακα αυτής της ομάδας, που παράλληλα με τη μείωση των τριγλυκεριδίων μειώνουν και τα επίπεδα της LDL χοληστερόλης) ή στατίνες σε υψηλές δόσεις (που προκαλούν σημαντική μείωση των τριγλυκεριδίων) ή ακόμη και συνδυασμός των παραπάνω φαρμάκων. Πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι τόσο οι στατίνες όσο και οι φμπράτες προκαλούν σημαντική μείωση της ενεργότητας της CETP και κατά συνέπεια μείωση των συγκεντρώσεων των μικρών πυκνών υποκλασμάτων των LDL^{150,152}. Η ανάπτυξη ειδικών αναστολέων της CETP αποτελεί αντικείμενο εντατικής έρευνας και οι ουσίες αυτές ενδέχεται να αποτελέσουν τη θεραπεία του μέλλοντος για τους ασθενείς με οικογενή συνδυασμένη δυσλιπιδαιμία¹⁵³.

III.5 Πολυγονική υπερχοληστερολαιμία

Πρόκειται για την πιο συχνή αιτία αύξησης της ολικής και LDL χοληστερόλης στο γενικό πληθυσμό. Υπολογίζεται ότι το 5% του πληθυσμού έχει επίπεδα χοληστερόλης που ξεπερνούν την 95^η θέση της καμπύλης κατανομής των επιπέδων της. Από τα άτομα αυτά το 5% έχει οικογενή υπερχοληστερολαιμία, το 10% οικογενή συνδυασμένη υπερλιπιδαιμία και το υπόλοιπο 85% πολυγονική υπερχοληστερολαιμία¹⁰⁰.

Η πολυγονική υπερχοληστερολαιμία δεν οφείλεται σε μεταλλάξεις σε ένα συγκεκριμένο γονίδιο, αλλά σε μια πολύπλοκη αλληλεπίδραση πολλαπλών γενετικών και περιβαλλοντικών παραγόντων. Έτσι, σε ένα συγκεκριμένο γενετικό υπόστρωμα (που χαρακτηρίζεται από υπερπαραγωγή apo B100, από την παρουσία του αλληλόμορφου γονιδίου E4, από ελαττωμένο καταβολισμό των LDL κ.α) επενεργούν συγκεκριμένοι περιβαλλοντικοί παράγοντες (δίαιτα πλούσια σε κεκορεσμένα λίπη, παχυσαρκία κτλ) με αποτέλεσμα την αύξηση της ολικής και LDL χοληστερόλης¹⁰⁰.

Η διαφορική διάγνωση της πολυγονικής υπερχοληστερολαιμίας από την οικογενή υπερχοληστερολαιμία και την οικογενή συνδυασμένη υπερλιπιδαιμία θα στηριχθεί: 1) Στην απουσία τενόντιων ξανθωμάτων, τα οποία ανευρίσκονται στην πλειοψηφία των ασθενών με οικογενή υπερχοληστερολαιμία και 2) στη μελέτη των πρώτου βαθμού συγγενών των ασθενών. Στην πολυγονική υπερχοληστερολαιμία μόνο το 10% αυτών των συγγενών εμφανίζει αυξημένες τιμές λιπιδίων, ενώ αντίθετα το 50% των συγγενών των ασθενών με οικογενή υπερχοληστερολαιμία ή οικογενή συνδυασμένη υπερλιπιδαιμία εμφανίζει αύξηση των λιπιδίων του ορού.

Σε όλους τους ασθενείς με πολυγονική υπερχοληστερολαιμία πρέπει να δίνονται σαφείς υγιεινοδιαιτητικές οδηγίες. Εάν τα επίπεδα των λιπιδίων παραμείνουν αυξημένα, πρέπει να χορηγούνται υπολιπιδαιμικά φάρμακα (συνήθως στατίνες) πάντα βέβαια σε συνδυασμό με την εκτίμηση του συνολικού κινδύνου για την εμφάνιση πρώιμης καρδιαγγειακής νόσου.

III.6 Οικογενής χυλομικροναϊμία

Γενικά σχόλια

Πρόκειται για μια σπάνια γενετική διαταραχή (η συχνότητά της είναι περίπου $1:10^6$), η οποία κληρονομείται με αυτοσωμικό υπολειπόμενο χαρακτήρα. Η κύρια υποκείμενη γενετική διαταραχή αφορά την ανεπάρκεια ή την πλήρη απουσία είτε της λιποπρωτεϊνικής λιπάσης¹⁵⁴, η οποία είναι απαραίτητη για τον καταβολισμό των τριγλυκεριδίων των χυλομικρών και των VLDL, είτε σπανιότερα της αποπρωτεϊνής C-II^{100,155}, η οποία είναι το απαραίτητο συνένζυμο για την ενεργοποίηση της λιποπρωτεϊνικής λιπάσης. Στα φυσιολογικά άτομα, τα χυλομικρά καταβολίζονται γρήγορα από τη λιποπρωτεϊνική λιπάση και έτσι δεν υπάρχουν στο πλάσμα μετά από 12ωρη νηστεία. Αντίθετα σε ασθενείς που είναι ομοζυγώτες ως προς την ανεπάρκεια αυτού του ενζύμου, τα χυλομικρά ανευρίσκονται στο πλάσμα αρκετές ημέρες μετά την κατανάλωση ενός λιπαρού γεύματος. Η οικογενής χυλομικροναϊμία χαρακτηρίζεται από την παρουσία πολύ υψηλών συγκεντρώσεων τριγλυκεριδίων πλάσματος νηστείας (πάνω από 1000mg/dl). Στην παιδική ηλικία η αύξηση αυτή οφείλεται αποκλειστικά στη συσσώρευση χυλομικρών (φαινότυπος τύπου I), δεδομένου ότι η ηπατική λιπάση καταβολίζει τις μικρές συγκεντρώσεις των VLDL οι οποίες παρατηρούνται στα παιδιά¹⁰⁰. Με την πάροδο της ηλικίας οι συγκεντρώσεις των VLDL αυξάνονται και έτσι η υπερτριγλυκεριδαιμία στους ενήλικες με ανεπάρκεια της λιποπρωτεϊνικής λιπάσης οφείλεται στη συνδιασμένη αύξηση των χυλομικρών και των VLDL (φαινότυπος τύπου V)¹⁵⁶.

Κλινική εικόνα

Η νόσος εκδηλώνεται συνήθως στην παιδική ηλικία με υποτροπιάζοντα κοιλιακά άλγη, τα οποία οφείλονται σε επεισόδια οξείας παγκρεατίτιδας. Κατά τη διέλευση των χυλομικρών από τη μικροκυκλοφορία του παγκρέατος, αυτά εκτίθενται σε μικρές ποσότητες παγκρεατικής λιπάσης με αποτέλεσμα την απελευθέρωση τοπικά ελεύθερων λιπαρών οξέων και λυσολεκιθίνης. Αυτά τα λιπαρά οξέα δρουν τοξικά στις κυτταρικές μεμβράνες και αυξάνουν την τοπική απελευθέρωση λιπάσης με αποτέλεσμα τη δημιουργία ενός φαύλου κύκλου που οδηγεί σε φλεγμονή του παγκρεατικού ιστού¹⁰⁰. Τη στιγμή της διάγνωσης ο ορός του ασθενούς είναι



λιπαιμικός και η συγκέντρωση των τριγλυκεριδίων συνήθως ξεπερνάει τα 1000 ή 2000 mg/dl. Πρέπει να αναφερθεί ότι πολλές φορές η αμυλάση του ορού είναι μέσα στα φυσιολογικά όρια ή είναι οριακά αυξημένη, πιθανά εξαιτίας παρεμβολής των λιποπρωτεϊνικών σωματιδίων στον εργαστηριακό προσδιορισμό της¹⁵⁷. Σε αυτές τις περιπτώσεις η μέτρηση της αμυλάσης σε διαδοχικές αραιώσεις του ορού ή στα ούρα βοηθά σημαντικά στη διάγνωση. Εξάλλου, η παρουσία λιπαιμικού ορού σε ασθενή με οξύ κοιλιακό άλγος πρέπει πάντα να εγείρει την υποψία ύπαρξης οξείας παγκρεατίτιδας ανεξάρτητα από τα επίπεδα της αμυλάσης του ορού. Υποτροπιάζοντα επεισόδια οξείας παγκρεατίτιδας μπορούν να οδηγήσουν στη δημιουργία ψευδοκύστης ή και ανεπάρκειας της εξωκρινούς και της ενδοκρινούς μοίρας του παγκρέατος¹⁰⁰. Το άλλο χαρακτηριστικό κλινικό γνώρισμα της νόσου είναι η εμφάνιση των εξανθηματικών (erythematous) ξανθωμάτων. Πρόκειται για μικρές κιτρινωπές κηλίδες που περιβάλλονται από ερυθρηματώδη άλω και ανευρίσκονται στους γλουτούς, στη ράχη και στις εκτατικές επιφάνειες των άκρων (σημεία πίεσης). Οφείλονται στην εναπόθεση μεγάλων ποσοτήτων λιπιδίων στα ιστικά μακροφάγα του δέρματος και συνήθως συνδυάζονται με τιμές τριγλυκεριδίων ορού μεγαλύτερες από 2000 mg/dl¹⁰⁰.

Η εναπόθεση χυλομικρών στα μακροφάγα του δικτυοενδοθηλιακού συστήματος μπορεί να προκαλέσει ηπατομεγαλία, σπληνομεγαλία και διήθηση του μυελού των οστών από μακροφάγα γέματα με λίπος. Η ξαφνική αύξηση του μεγέθους του ήπατος ή του σπληνός, καθώς και η δημιουργία σπληνικών εμφράκτων είναι δύο άλλα αίτια κοιλιακού άλγους σε ασθενείς με χυλομικροναμία, ενώ επίσης έχουν περιγραφεί περιπτώσεις πανκυτταροπενίας εξαιτίας υπερσπληνισμού¹⁰⁰.

Κατά την οφθαλμοσκόπηση ο βυθός των οφθαλμών παρουσιάζεται ωχρός, ενώ τα αγγεία του αμφιβληστροειδή λευκά (lipaemia retinalis).

Τέλος, πρέπει να αναφερθεί ότι η δυσλιπιδαιμία τύπου I δεν συνδυάζεται με αυξημένη επίπτωση πρώιμης αθηρωματικής αγγειακής νόσου.

Διάγνωση

Η διάγνωση της οικογενούς χυλομικροναϊμίας τίθεται, όπως αναφέρθηκε, από την παρουσία λιπαιμικού ορού ή πλάσματος σε αιμοληψία μετά νηστεία τουλάχιστον 12 ωρών. Αν μάλιστα η συλλογή του δείγματος γίνει παρουσία EDTA ως αντυπηκτικού και το δείγμα διατηρηθεί στους 4°C όλη τη νύχτα, μια λευκωπή κρεμώδης στοιβάδα εμφανίζεται στο άνω μέρος, ενώ το υποκείμενο πλάσμα είναι διαυγές. Κατά την ηλεκτροφόρηση των λιποπρωτεϊνών σε γέλη αγαρόζης παρατηρείται η χαρακτηριστική μπάντα των χυλομικρών (φαινότυπος τύπου I). Η

διάγνωση επιβεβαιώνεται με την αδυναμία αύξησης της ενεργότητας της λιποπρωτεϊνικής λιπάσης μετά ενδοφλέβια έγχυση ηπαρίνης. Η ηπαρίνη, σε φυσιολογικά άτομα, απελευθερώνει τη λιποπρωτεϊνική λιπάση από τις θέσεις δέσμευσής της στα τριχοειδή, με αποτέλεσμα την αύξηση της συγκέντρωσης και της ενεργότητάς της στο πλάσμα.

Η ηλεκτροφόρηση των αποπρωτεϊνών της VLDL με την οποία ανιχνεύεται η φυσιολογική μάντα της Apo CII μπορεί να αποκλείσει ή να επιβεβαιώσει την ανεπάρκεια αυτής της αποπρωτεΐνης. Στην τελευταία περίπτωση η μετάγγιση φυσιολογικού πλάσματος στον ασθενή έχει ως αποτέλεσμα τη δραματική μείωση των συγκεντρώσεων των τριγλυκεριδίων του ορού¹⁰⁰. Επίσης πρέπει να σημειωθεί η παρεμβολή της σοβαρής υπερτριγλυκεριδαϊμίας στις βιοχημικές μετρήσεις στον ορό. Τυπικό παράδειγμα είναι η ψευδοϋπονατρίαμια αυτών των ασθενών, που παρατηρείται συχνότερα όταν ο προσδιορισμός του νατρίου γίνεται με φασματοφωτομετρία.

Θεραπεία

Στους ασθενείς με οικογενή χυλομικροναϊμία πρέπει να καταβάλλεται κάθε προσπάθεια για να διατηρηθούν τα τριγλυκερίδια νηστείας κάτω από 1000mg/dl, ώστε να μειωθεί ο κίνδυνος εμφάνισης οξείας παγκρεατίτιδας. Έτσι, συνιστάται ο σημαντικός περιορισμός της κατανάλωσης λίπους (<20gr ημερησίως), που πρακτικά σημαίνει μια ελεύθερη λίπους διαίτα, προκειμένου να αποφευχθεί η δημιουργία χυλομικρών. Οι υδατάνθρακες και οι πρωτεΐνες πρέπει να υποκαταστήσουν τα λίπη ως πηγή ενέργειας σε μη παχύσαρκους ασθενείς. Επίσης, η διαίτα πρέπει να συμπληρώνεται με λιποδιαλυτές βιταμίνες. Σε περίπτωση πλήρους ανεπάρκειας της λιποπρωτεϊνικής λιπάσης η φαρμακευτική αγωγή δεν έχει κανένα ρόλο. Πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι η χορήγηση υψηλών δόσεων αντιοξειδωτικών ουσιών σε ασθενείς με χυλομικροναϊμία, αν και δεν επηρεάζει σημαντικά τις συγκεντρώσεις των τριγλυκεριδίων, μπορεί να μειώσει την πιθανότητα εμφάνισης οξείας παγκρεατίτιδας¹⁵⁸.

III.7 Οικογενής υπερλιποπρωτεϊναιμία τύπου III (δυσβηταλιποπρωτεϊναιμία)

Γενικά σχόλια

Πρόκειται για μια γενετική διαταραχή του μεταβολισμού των λιποπρωτεϊνών, η οποία χαρακτηρίζεται από τη συσσώρευση λιποπρωτεϊνικών καταλοίπων (remnants) στο πλάσμα και την ανάπτυξη πρόωπης αθηρωματικής νόσου. Οι ασθενείς με δυσβηταλιποπρωτεϊναιμία εμφανίζουν αυξημένα επίπεδα χοληστερόλης και τριγλυκεριδίων στο πλάσμα. Το κύριο διαγνωστικό χαρακτηριστικό της νόσου είναι η παρουσία στην ηλεκτροφόρηση των λιποπρωτεϊνών σε αγαρόζη μιας ευρείας ζώνης (β-VLDL) που αντιστοιχεί στις πλούσιες σε



χοληστερόλη και τριγλυκερίδια παθολογικές λιποπρωτεΐνες, εξαιτίας της συσσώρευσης των καταλοίπων των χυλομικρών και των VLDL στο πλάσμα¹⁵⁹.

Η κύρια μοριακή διαταραχή της νόσου αφορά την παρουσία ελαττωματικής ως προς την ικανότητα σύνδεσης με τους λιποπρωτεϊνικούς υποδοχείς απολιποπρωτεΐνης Ε (ΑpoE). Η ΑpoE βρίσκεται φυσιολογικά στα κατάλοιπα των χυλομικρών και των VLDL (IDL) και συνδέεται με τους ηπατικούς υποδοχείς με αποτέλεσμα την πρόσληψη αυτών των καταλοίπων από το ήπαρ. Υπάρχουν τρεις κύριες ισομορφές της ΑPOE (E2,E3,E4) που διαφέρουν ως προς την ικανότητα σύνδεσής τους με τους υποδοχείς^{160,161}. Οι ισομορφές αυτές προκύπτουν από την απλή αντικατάσταση αμινοξέων στις θέσεις 112 και 158 του μορίου της. Από τις ισομορφές αυτές, η E2 έχει μειωμένη ικανότητα σύνδεσης με τον υποδοχέα. Έτσι, οι ασθενείς που εκφράζουν την υπερλιπιδαιμία τύπου III είναι ομοζυγώτες ως προς την E2 (E2E2). Η παρουσία αυτής της γενετικής διαταραχής έχει ως αποτέλεσμα τη μειωμένη πρόσληψη των καταλοίπων των χυλομικρών και των IDL από το ήπαρ και συνεπώς τη συσσώρευσή τους στο πλάσμα¹⁶⁰.

Πρέπει να αναφερθεί ότι η συχνότητα του γονοτύπου E2E2 στο γενικό πληθυσμό είναι 1:100, ενώ η επίπτωση της υπερλιπιδαιμίας τύπου III εκτιμάται σε 1:10000. Δηλαδή μόνο το 1% των ομοζυγωτών E2E2 εκφράζουν κλινικά τη νόσο¹⁶². Στην πραγματικότητα μάλιστα οι περισσότεροι από τους ομοζυγώτες E2E2 έχουν φυσιολογικά ή και μειωμένα επίπεδα λιπιδαιμικών παραμέτρων. Χρειάζεται δηλαδή η παρουσία μιας επιπρόσθετης διαταραχής που θα αυξήσει την παραγωγή των λιποπρωτεϊνικών καταλοίπων και η οποία σε συνδυασμό με τον ελαττωμένο καταβολισμό τους θα προκαλέσει τη φαινοτυπική εκδήλωση της νόσου. Οι πιο συχνές διαταραχές που διαδραματίζουν καθοριστικό ρόλο στην κλινική εμφάνιση της υπερλιπιδαιμίας τύπου III είναι η παχυσαρκία, η αυξημένη πρόσληψη θερμίδων, ο σακχαρώδης διαβήτης, ο υποθυρεοειδισμός, η εμμηνόπαυση, ο αλκοολισμός, καθώς και άλλες γενετικές διαταραχές του μεταβολισμού των λιπιδίων¹⁶³.

Κλινική εικόνα

Η νόσος εκδηλώνεται κλινικά μετά την ηλικία των 20 ετών και μάλιστα πολύ νωρίτερα στους άνδρες σε σύγκριση με τις γυναίκες, στις οποίες η νόσος μπορεί να εμφανισθεί μετά την εμμηνόπαυση.

Το χαρακτηριστικό κλινικό γνώρισμα είναι η παρουσία δυο χαρακτηριστικών τύπων ξανθωμάτων: τα ταινιοειδή ξανθώματα των παλαμών και τα οζώδη ξανθώματα. Τα ταινιοειδή παλαμιαία (striata palmaris) ξανθώματα αντιστοιχούν σε κιτρινωπό ή πορτοκαλόχρωο



αποχρωματισμό των πτυχών των παλαμών και των δακτύλων των χεριών και μπορεί να είναι επίπεδα ή υπεγεργμένα¹⁰⁰.

Τα οζώδη (tuberous) και τα οζώδο-εξανθηματικά (tuberoeruptive) είναι μεγάλα (>2 cm) δερματικά ξανθώματα, που συνήθως εμφανίζονται στους αγκώνες και στα γόνατα, χωρίς να είναι ασυνήθιστη η παρουσία τους στις θέσεις πίεσης των ποδιών από τα υποδήματα. Στην τελευταία αυτή περίπτωση και όταν ανευρίσκονται στην πτέρνα πρέπει να διαφοροδιαγνωσθούν από τα υποδερματικά ξανθώματα του αχίλλειου τένοντα που εμφανίζονται στην οικογενή υπερχοληστερολαιμία. Τα οζώδη ξανθώματα μπορούν επίσης να εμφανισθούν στη ραχιαία επιφάνεια των αρθρώσεων των δακτύλων των χεριών, ιδίως σε χειρώνακτες και σπάνια στο μυελό των οστών ή στο θώρακα, οπότε αποτελούν τυχαίο ακτινολογικό εύρημα¹⁰⁰.

Παρόμοια ξανθώματα μπορούν επίσης να εμφανισθούν σε ορισμένες δευτεροπαθείς διαταραχές του μεταβολισμού των λιπιδίων, όπως σε αποφρακτική ηπατική νόσο, παραπρωτεΐναιμίες και συστηματικό ερυθματώδη λύκο.

Οι ασθενείς με υπερλιπιδαιμία τύπου III παρά τα σχετικά χαμηλά επίπεδα της LDL χοληστερόλης έχουν αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης πρώιμης αθηρωματικής νόσου, εξαιτίας της παρουσίας των εξαιρετικά αθηρογόνων β-VLDL¹⁶⁴. Η αθηρωμάτωση σε αυτούς τους ασθενείς δεν αφορά μόνο τα στεφανιαία αγγεία, αλλά κυρίως τα περιφερικά αγγεία, όπως τις έσω καρωτίδες, την κοιλιακή αορτή και τους κλάδους της Έτσι, η νόσος συχνά επιπλέκεται με οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου, αγγειακά εγκεφαλικά επεισόδια, διαλείπουσα χωλότητα και γάγγραινα των κάτω άκρων¹⁶⁴.

Τέλος, όπως ήδη αναφέρθηκε, στους ασθενείς αυτούς συχνά συνυπάρχει παχυσαρκία, σακχαρώδης διαβήτης και υποθυρεοειδισμός.

Διάγνωση

Ο γιατρός πρέπει να υποψιασθεί τη νόσο σε ασθενείς με υπερλιπιδαιμία, που εμφανίζουν τα χαρακτηριστικά ξανθώματα. Επίσης, η διάγνωση της νόσου είναι πιθανή σε ασθενείς με αυξημένα επίπεδα χοληστερόλης και τριγλυκεριδίων του πλάσματος, όταν οι απόλυτες συγκεντρώσεις τους σε mmol/l είναι ίσες (σε mg/dl η συγκέντρωση των τριγλυκεριδίων είναι σχεδόν διπλάσια από τη συγκέντρωση της χοληστερόλης). Όπως ήδη αναφέρθηκε, κατά την ηλεκτροφόρηση των λιποπρωτεϊνών παρατηρείται μια ευρεία προ-β ζώνη (β-VLDL). Οι ασθενείς με υπερλιποπρωτεΐναιμία τύπου III είναι ομοζυγώτες E2/E2, ενώ η διάγνωση επιβεβαιώνεται με τον προσδιορισμό του λόγου της VLDL χοληστερόλης προς τα ολικά τριγλυκερίδια του ορού. Ένας λόγος μεγαλύτερος από 0.3 (όταν οι μονάδες μέτρησης των



λιπιδίων εκφράζονται σε mg/dl) ή 0.68 (όταν οι μονάδες μέτρησης των λιπιδίων εκφράζονται σε mmol/l) επιβεβαιώνει τη διάγνωση της υπερλιπιδαιμίας τύπου III, ενώ ένας λόγος μεγαλύτερος από 0.25 ή 0.57, αντίστοιχα, θεωρείται σχεδόν διαγνωστικός. Πρέπει να σημειωθεί ότι για τον προσδιορισμό της VLDL χοληστερόλης απαιτείται απομόνωση των VLDL με υπερφυγοκέντρηση¹⁰⁰.

Τέλος, πρέπει πάντα να προσδιορίζονται τα επίπεδα της θυρεοειδοτρόπου ορμόνης και της γλυκόζης για την αποκάλυψη δευτερογενών αιτιών που οδηγούν στην κλινική έκφραση της νόσου.

Θεραπεία

Μεγάλη έμφαση πρέπει να δοθεί στην αντιμετώπιση των παραγόντων που συμβάλλουν στην κλινική εκδήλωση της νόσου. Έτσι είναι ουσιαστικής σημασίας η απώλεια βάρους σε παχύσαρκους ασθενείς, η ρύθμιση του σακχάρου σε διαβητικούς ασθενείς και η χορήγηση θυροξίνης σε ασθενείς με υποθυρεοειδισμό.

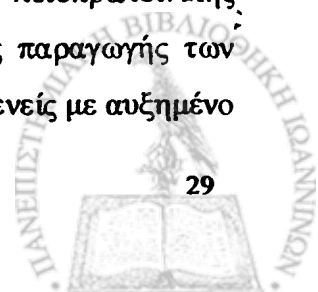
Αν παρά τα παραπάνω μέτρα η υπερλιπιδαιμία επιμένει, τότε πρέπει να χορηγηθεί υπολιπιδαιμική αγωγή. Τα φάρμακα πρώτης επιλογής είναι οι φιβράτες, που βελτιώνουν σημαντικά το λιπιδαιμικό προφίλ αυτών των ασθενών, ενώ συχνά συμβάλλουν και στην υποστροφή των ξανθωμάτων. Εναλλακτικά φάρμακα αποτελούν οι στατίνες και το νικοτινικό οξύ, ενώ σε ορισμένους ασθενείς με βαριά υπερλιπιδαιμία απαιτείται η χορήγηση συνδυασμού υπολιπιδαιμικών φαρμάκων.

III.8 Οικογενής υπερτριγλυκεριδαιμία (υπερλιπιδαιμία τύπου IV)

Γενικά σχόλια

Πρόκειται για μια σχετικά συχνή διαταραχή του μεταβολισμού των λιποπρωτεϊνών, η οποία χαρακτηρίζεται από αύξηση της συγκέντρωσης των πολύ χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεϊνών (VLDL) και των τριγλυκεριδίων και κληρονομείται με τον αυτοσωμικό επικρατούντα χαρακτήρα¹⁶⁵.

Η παθογένεια αυτής της διαταραχής δεν είναι γνωστή. Η αύξηση των τριγλυκεριδίων πιθανά οφείλεται σε διάφορες γενετικά ετερογενείς διαταραχές. Κινητικές μελέτες του μεταβολισμού των λιπιδίων σε ασθενείς με υπερλιπιδαιμία τύπου IV έδειξαν μειωμένο καταβολισμό των VLDL, που δεν οφείλεται απαραίτητα σε μειωμένη δραστηριότητα της λιποπρωτεϊνικής λιπάσης^{166,167}. Η μείωση αυτή σε συνδυασμό με μια αύξηση της ηπατικής παραγωγής των πλούσιων σε τριγλυκερίδια λιποπρωτεϊνών¹⁶⁸, που παρατηρείται συχνά σε ασθενείς με αυξημένο



σωματικό βάρος, σακχαρώδη διαβήτη ή αλκοολισμό, έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της συγκέντρωσης των VLDL και των τριγλυκεριδίων στο πλάσμα. Η αύξηση αυτή οφείλεται κυρίως σε αύξηση του μεγέθους των VLDL, παρά σε αύξηση του αριθμού των VLDL σωματιδίων. Έτσι, η συγκέντρωση της αποπρωτεΐνης Β, η οποία αποτελεί ένα αξιόπιστο δείκτη του αριθμού των σωματιδίων, δεν είναι αυξημένη.

Κλινική εικόνα

Η νόσος αποκαλύπτεται συνήθως μετά την ενηλικίωση, όταν σε τυχαίο εργαστηριακό έλεγχο ρουτίνας ανευρίσκεται μεμονωμένη μέτρια αύξηση των τριγλυκεριδίων του ορού, συνήθως της τάξης των 200-500 mg/dl. Συχνά η διαταραχή αυτή εντάσσεται στα πλαίσια του μεταβολικού συνδρόμου. Σε αυτές τις περιπτώσεις συνυπάρχουν και άλλες μεταβολικές διαταραχές και συγκεκριμένα διαταραχή της ανοχής γλυκόζης, υπερινσουλιναιμία, υπερουριχαιμία και υπέρταση.

Η παρουσία ξανθωμάτων δεν αποτελεί χαρακτηριστικό γνώρισμα αυτής της διαταραχής. Αν και η οικογενής υπερτριγλυκεριδαμία θεωρούνταν αρχικά σαν μια σχετικά αθώα κατάσταση, η οποία δεν συνδέεται με αυξημένη επίπτωση αθηρωμάτωσης¹⁶⁹, πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι οι ασθενείς με αυτή τη διαταραχή παρουσιάζουν αυξημένο καρδιαγγειακό κίνδυνο^{50,149}. Συγκεκριμένα, ο κίνδυνος για την εμφάνιση καρδιαγγειακών συμβαμάτων στους ασθενείς με οικογενή υπερτριγλυκεριδαμία ήταν παρόμοιος με τον κίνδυνο των ασθενών με οικογενή συνδιασμένη δυσλιπιδαιμία, ενώ τα επίπεδα των τριγλυκεριδίων συσχετιζόνταν με την καρδιαγγειακή νοσηρότητα και θνητότητα⁵⁰. Τα ευρήματα αυτά επιβεβαιώθηκαν και σε μεταγενέστερες μελέτες, οι οποίες όμως απέδωσαν τον αυξημένο κίνδυνο των ασθενών με οικογενή υπερτριγλυκεριδαμία στη συνύπαρξη των άλλων χαρακτηριστικών του μεταβολικού συνδρόμου¹⁴⁹.

Σε ασθενείς με ήπια ή μέτρια υπερτριγλυκεριδαμία, η παρουσία περιβαλλοντικών παραγόντων, που είτε αυξάνουν την ηπατική παραγωγή των VLDL είτε μειώνουν ακόμη περισσότερο τον καταβολισμό τους, μπορεί να προκαλέσει σημαντική αύξηση των τριγλυκεριδίων σε επίπεδα μεγαλύτερα από 1000 mg/dl. Τέτοιοι παράγοντες είναι ο αρρυθμιστος σακχαρώδης διαβήτης, η παχυσαρκία, η κατάχρηση οινοπνεύματος, ο υποθυρεοειδισμός και φάρμακα, όπως τα οιστρογόνα, η ταμοξιφαίνη, η ιντερφερόνη και οι β-αποκλειστές. Στις περιπτώσεις αυτές παρατηρείται μετάπτωση της υπερλιπιδαιμίας τύπου IV σε τύπου V, με αύξηση τόσο των VLDL όσο και των χυλομικρών. Οι ασθενείς με υπερλιπιδαιμία τύπου V έχουν αυξημένο κίνδυνο



εμφάνισης οξείας παγκρεατίτιδας. Η διόρθωση του υπεύθυνου προδιαθεσικού παράγοντα έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση των τριγλυκεριδίων στα αρχικά μέτρια αυξημένα επίπεδα.

Διάγνωση

Η διάγνωση της οικογενούς υπερτριγλυκεριδαμίας τίθεται σε ασθενή με μέτρια αύξηση των τριγλυκεριδίων του ορού, φυσιολογικά επίπεδα LDL χοληστερόλης και οικογενειακό ιστορικό υπερτριγλυκεριδαμίας. Η γνώση του λιπιδαιμικού προφίλ των πρώτου βαθμού συγγενών μπορεί να βοηθήσει σημαντικά στη διαφορική διάγνωση από την οικογενή συνδυασμένη υπερλιπιδαιμία. Πράγματι, σε αντίθεση με την τελευταία, στην οποία παρατηρείται σημαντική φαινοτυπική μεταβλητότητα, οι μισοί πρώτου βαθμού συγγενείς ασθενών με οικογενή υπερτριγλυκεριδαμία εμφανίζουν υψηλά επίπεδα τριγλυκεριδίων, αλλά φυσιολογικά επίπεδα LDL χοληστερόλης.

Η ηλεκτροφόρηση των λιποπρωτεϊνών αποκαλύπτει αύξηση της προ-β τανίας (τύπος IV), ενώ δεν παρατηρούνται χυλομικρά στο υπερκείμενο του πλάσματος που έχει μείνει στο ψυγείο όλη τη νύχτα.

Θεραπεία

Το πρώτο βήμα για την αντιμετώπιση αυτής της διαταραχής είναι η διόρθωση όλων εκείνων των παραγόντων που συμβάλλουν στην αύξηση των τριγλυκεριδίων. Συγκεκριμένα, ουσιαστικής σημασίας είναι η μείωση της κατανάλωσης οινοπνεύματος, η ρύθμιση του σακχάρου, η υποθερμιδική διαίτα στους παχύσαρκους ασθενείς, η χορήγηση θυρεοειδικών ορμονών σε ασθενείς με υποθυρεοειδισμό, η υπολιπιδαιμική διαίτα και η διακοπή των φαρμάκων που επηρεάζουν το μεταβολισμό των πλούσιων σε τριγλυκερίδια λιποπρωτεϊνών.

Συνιστάται η χορήγηση φαρμάκων σε ασθενείς με σημαντικού βαθμού υπερτριγλυκεριδαμία, οι οποίοι έχουν αυξημένο κίνδυνο για την εμφάνιση οξείας παγκρεατίτιδας, καθώς και σε ασθενείς υψηλού κινδύνου για την εμφάνιση στεφανιαίας νόσου (θετικό οικογενειακό ιστορικό πρώιμης καρδιαγγειακής νόσου, χαμηλή HDL χοληστερόλη κ.τ.λ.). Οι φμπράτες είναι τα φάρμακα πρώτης επιλογής, ενώ εναλλακτικό φάρμακο είναι το νικοτινικό οξύ.

IV. ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΤΩΝ ΔΥΣΛΙΠΙΔΑΙΜΙΩΝ

IV.1 Εισαγωγή

Για τη διάγνωση των δυσλιπιδαιμιών απαιτείται ο επανειλημμένος προσδιορισμός των τιμών των λιπιδαιμικών παραμέτρων μετά από νηστεία τουλάχιστον 12 ωρών. Σε ασθενείς με δυσλιπιδαιμία πρέπει να αποκλεισθεί η πιθανότητα ύπαρξης δευτεροπαθών διαταραχών του μεταβολισμού των λιπιδίων με τη λήψη προσεκτικού ιστορικού και τον κατάλληλο εργαστηριακό έλεγχο. Οι ασθενείς με διαταραχές των τιμών των λιπιδαιμικών παραμέτρων εμφανίζουν αυξημένα επίπεδα ολικής και LDL χοληστερόλης (υπερχοληστερολαιμία), αυξημένα επίπεδα τριγλυκεριδίων (υπερτριγλυκεριδαιμία), ή μικτές διαταραχές του μεταβολισμού των λιπιδίων με αυξημένα επίπεδα ολικής και LDL χοληστερόλης, υπερτριγλυκεριδαιμία και μείωση των επιπέδων της HDL χοληστερόλης.

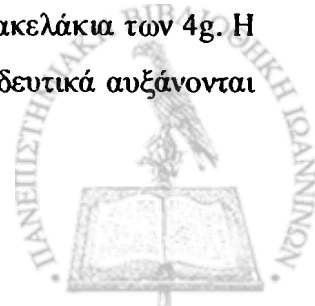
Τα μη φαρμακευτικά μέτρα αποτελούν τον ακρογωνιαίο λίθο για την αντιμετώπιση της δυσλιπιδαιμίας, ακόμη και στις περιπτώσεις εκείνες στις οποίες κρίνεται απαραίτητη η χορήγηση υπολιπιδαιμικών φαρμάκων.

IV.2 Φάρμακα για την αντιμετώπιση των δυσλιπιδαιμιών

Ρητίνες δέσμωσης χολικών οξέων

Τα φάρμακα πρώτης επιλογής για την αντιμετώπιση της υπερχοληστερόλαιμίας είναι οι ρητίνες δέσμωσης χολικών οξέων και οι αναστολείς του ενζύμου HMG-CoA αναγωγή (στατίνες)¹⁷⁰. Οι ρητίνες δέσμωσης των χολικών οξέων (χολεστυραμίνη, κολεστιπόλη) δεσμεύουν τα χολικά οξέα στο γαστρεντερικό σωλήνα. Έτσι, διακόπτεται ο εντεροηπατικός κύκλος των χολικών οξέων και η επανείσοδος τους διαμέσου της πυλαίας κυκλοφορίας στα ηπατοκύτταρα. Με αυτό το μηχανισμό τα φάρμακα μειώνουν τη συγκέντρωση των χολικών οξέων στο κυτταρόπλασμα των ηπατοκυττάρων. Η μείωση αυτή έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της μετατροπής της χοληστερόλης σε χολικά οξέα και τη μείωση της ενδοκυττάριας συγκέντρωσης χοληστερόλης. Η μείωση της ενδοκυττάριας συγκέντρωσης χοληστερόλης στη συνέχεια είναι υπεύθυνη για την αύξηση του αριθμού και της δραστηριότητας των LDL υποδοχέων στην επιφάνεια των ηπατοκυττάρων, η οποία έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση του καταβολισμού των αθηρωγόνων LDL και επομένως τη μείωση των επιπέδων της ολικής και LDL χοληστερόλης^{171,172}.

Τα φάρμακα αυτά προκαλούν μια σημαντική δοσοεξαρτώμενη μείωση των τιμών της ολικής και LDL χοληστερόλης. Στη χώρα μας κυκλοφορεί μόνο η χολεστυραμίνη σε φακελάκια των 4g. Η έναρξη της θεραπείας γίνεται με μικρές δόσεις (8g) που στη συνέχεια προοδευτικά αυξάνονται



σε 8-16g X 2 (μέγιστη δόση 32g). Το φάρμακο πρέπει να χορηγείται κοντά στα κύρια γεύματα αφού διαλυθεί πολύ καλά σε νερό, χυμούς φρούτων ή αναψυκτικά. Αν και οι ρητίνες δέσμευσης χολικών οξέων είναι φθηνά και αποτελεσματικά φάρμακα, δεν γίνονται καλά ανεκτές από την πλειοψηφία των ασθενών, ιδιαίτερα όταν χορηγηθούν σχετικά υψηλές δόσεις, διότι προκαλούν σοβαρές ανεπιθύμητες ενέργειες από το γαστρεντερικό σωλήνα (μετεωρισμό, δυσκοιλιότητα, ναυτία, αίσθημα πλήρωσης στο επιγάστριο)¹⁷³. Επιπρόσθετα, τα φάρμακα αυτά αυξάνουν τα επίπεδα των τριγλυκεριδίων¹⁷⁴ και μειώνουν την απορρόφηση πολλών φαρμάκων που χορηγούνται ταυτόχρονα (διουρητικά, προπρανολόλη, δακτυλίτιδα, κουμαρινικά αντιπηκτικά, θυροειδικές ορμόνες, στατίνες, κ.λ.π). Για αυτό το λόγο η χολεστυραμίνη πρέπει να χορηγείται είτε 4 ώρες πριν είτε 1 ώρα μετά τη χορήγηση άλλων φαρμάκων, έτσι ώστε να μην επηρεάζεται η απορρόφησή τους. Οι ρητίνες δέσμευσης χολικών οξέων συνδυάζονται με άλλα υπολιπιδαιμικά φάρμακα και κυρίως με στατίνες. Η χορήγηση αυτού του συνδυασμού προκαλεί σημαντική μείωση των τιμών της ολικής και LDL χοληστερόλης. Σε αυτές τις περιπτώσεις η χολεστυραμίνη πρέπει να χορηγείται πριν το κύριο γεύμα (μεσημέρι ή βράδυ) και η στατίνη πριν τη νυχτερινή κατάκλιση. Η παρατεταμένη χορήγηση των ρητινών δέσμευσης χολικών οξέων έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση της απορρόφησης των λιποδιαλυτών βιταμινών και του φυλλικού οξέος. Για αυτό το λόγο συνιστάται η χορήγηση συμπληρώματος φυλλικού οξέος σε παιδιά με γενετικές διαταραχές του μεταβολισμού των λιπιδίων. Πρέπει να αναφερθεί ότι οι ρητίνες δέσμευσης χολικών οξέων αποτελούν τα μοναδικά υπολιπιδαιμικά φάρμακα που χορηγούνται σε παιδιά. Οι ρητίνες δεν πρέπει να χορηγούνται σε ασθενείς με πλήρη απόφραξη των χοληφόρων, σε ασθενείς με υπερλιπιδαιμία τύπου III, καθώς και σε ασθενείς με βαριά υπερτριγλυκεριδαμία (τριγλυκερίδια > 500mg/dl). Τα φάρμακα αυτά πρέπει να χορηγούνται με μεγάλη προσοχή σε διαβητικούς ασθενείς, οι οποίοι συχνά έχουν αυξημένα επίπεδα τριγλυκεριδίων καθώς και δυσκοιλιότητα που οφείλεται σε αυτόνομη νευροπάθεια.

Στατίνες

Οι στατίνες αναστέλλουν συναγωνιστικά τη δραστηριότητα του ενζύμου HMG-CoA αναγωγάση και έτσι μειώνουν την ενδοκυττάρια σύνθεση χοληστερόλης. Η μείωση της σύνθεσης της χοληστερόλης και κατ' επέκταση η μείωση της συγκέντρωσης της χοληστερόλης στο κυτταρόπλασμα των ηπατοκυττάρων έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση του αριθμού και της δραστηριότητας των LDL υποδοχέων στην επιφάνεια των ηπατοκυττάρων και επομένως την αύξηση του καταβολισμού των LDL σωματιδίων¹⁷⁵. Τα φάρμακα αυτά προκαλούν σημαντική μείωση της ολικής και LDL χοληστερόλης (30-70%, ανάλογα με το φάρμακο και τη δοσολογία),

μια μικρότερη αλλά δοσοεξαρτώμενη μείωση των τριγλυκεριδίων και μια μικρή αύξηση της HDL χοληστερόλης (κατά 5-10%)¹⁷⁶. Η μείωση των τριγλυκεριδίων οφείλεται στη μείωση της σύνθεσης των VLDL από τα ηπατοκύτταρα, καθώς και στην αύξηση του καταβολισμού των πλούσιων σε τριγλυκερίδια λιποπρωτεϊνών εξαιτίας της αύξησης του αριθμού και της δραστηριότητας των LDL υποδοχέων. Ο μηχανισμός διαμέσου του οποίου οι στατίνες αυξάνουν τα επίπεδα της HDL χοληστερόλης δεν είναι απόλυτα ξεκαθαρισμένος. Ωστόσο, είναι πιθανό ότι τα φάρμακα αυτά επάγουν τη φωσφορυλίωση των πυρηνικών υποδοχέων PPAR-α και έτσι επηρεάζουν την έκφραση διαφόρων γονιδίων τα οποία συσχετίζονται με το μεταβολισμό των HDL¹⁷⁷. Τέλος, η επίδραση των στατινών στην κατανομή των υποκλασμάτων της LDL ποικίλει ανάλογα με το φάρμακο, καθώς επίσης και ανάλογα με το είδος της υποκείμενης διαταραχής του μεταβολισμού των λιπιδίων¹⁵¹. Όπως είναι γνωστό, η σύνθεση της χοληστερόλης εμφανίζει κερκαδιανό ρυθμό και είναι μέγιστη τις πρώτες πρωινές ώρες. Έτσι, οι στατίνες πρέπει να χορηγούνται σε μία δόση πριν τη νυχτερινή κατάκλιση, εκτός από τη λοβαστατίνη η οποία χορηγείται σε 1-2 δόσεις μαζί με τα γεύματα δεδομένου ότι η τροφή αυξάνει την απορρόφησή της από το έντερο¹⁷⁵. Τα φάρμακα αυτά είναι καλά ανεκτά και έχουν πολύ λίγες ανεπιθύμητες ενέργειες. Συγκεκριμένα προκαλούν μια μικρή παροδική ασυμπτωματική δοσοεξαρτώμενη αύξηση της τρανσαμινασών σε ένα μικρό ποσοστό ασθενών (2-5%)¹⁷⁸. Στις περισσότερες περιπτώσεις τα επίπεδα της τρανσαμινασών επιστρέφουν στα φυσιολογικά επίπεδα με τη διακοπή των φαρμάκων ή τη μείωση της δόσης χωρίς να παρατηρηθεί μόνιμη βλάβη του ήπατος. Οι μικρές αυξήσεις των τρανσαμινασών φαίνεται ότι οφείλονται σε μεταβολές του ηπατικού μεταβολισμού και όχι στην τοξική επίδραση των φαρμάκων, αφού παρόμοιες μεταβολές των ηπατικών ενζύμων παρατηρούνται μετά τη χορήγηση όλων των υπολιπιδαιμικών φαρμάκων, ακόμα και των ρητινών δέσμευσης των χολικών οξέων οι οποίες δεν εισέρχονται στη συστηματική κυκλοφορία. Εξάλλου πρέπει να αναφερθεί ότι οι ασθενείς με υπερλιπιδαιμία και ιδιαίτερα οι ασθενείς με αυξημένο σωματικό βάρος εμφανίζουν πολύ συχνά λιπώδη διήθηση του ήπατος και απρόβλεπτες διακυμάνσεις των ηπατικών ενζύμων¹⁷⁸. Η μη αλκοολική στεατοηπατίτιδα δεν αποτελεί αντένδειξη για τη χορήγηση των στατινών, αφού η βελτίωση της δυσλιπιδαιμίας μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση της εναπόθεσης λίπους στα ηπατοκύτταρα και τη μείωση των τρανσαμινασών. Σημαντικές αυξήσεις των τρανσαμινασών μετά τη χορήγηση των στατινών (>3 φορές τις ανώτερες φυσιολογικές τιμές) είναι εξαιρετικά σπάνιες και παρατηρούνται συχνότερα σε ασθενείς που πίνουν μεγάλη ποσότητα αλκοολούχων ποτών ή έχουν υποκείμενη ηπατική νόσο. Σε αυτές τις περιπτώσεις απαιτείται η άμεση διακοπή της χορήγησης των στατινών. Πρέπει να αναφερθεί ότι η χορήγηση αυτών των φαρμάκων



αντενδείκνυται σε άτομα με οξεία ή χρόνια ηπατική νόσο ή σε αλκοολικούς ασθενείς. Σε ασθενείς που παίρνουν στατίνες συνιστάται τακτικός έλεγχος των ηπατικών ενζύμων (π.χ. κάθε 6 εβδομάδες για 3 μήνες, κάθε 8 εβδομάδες για 1 χρόνο και στη συνέχεια δύο φορές το χρόνο). Όπως αναφέρθηκε οι σημαντικές αυξήσεις των τρανσαμινασών (>3 φορές τις ανώτερες φυσιολογικές τιμές) απαιτούν άμεση διακοπή της θεραπείας. Μετά την αποκατάσταση στα φυσιολογικά επίπεδα των παραμέτρων της ηπατικής βιολογίας είναι δυνατόν να χορηγηθεί προσεκτικά ένα άλλο φάρμακο της ίδιας κατηγορίας σε μικρές δόσεις¹⁷⁸.

Η μυοσίτιδα είναι η πιο σημαντική ανεπιθύμητη ενέργεια των στατινών. Πράγματι, οι στατίνες προκαλούν πολύ σπάνια μυοσίτιδα που χαρακτηρίζεται από σημαντική αύξηση του μυϊκών ενζύμων ή και ραβδομύωση¹⁷⁹. Η μυοσίτιδα φαίνεται ότι συσχετίζεται με τη δόση του φαρμάκου και πιθανά με το βαθμό μείωσης των τιμών των λιπιδαιμικών παραμέτρων. Οι ασθενείς πρέπει να ενημερώνονται να διακόπτουν το φάρμακο και να προσέρχονται στο γιατρό σε περιπτώσεις εμφάνισης πόνου, αδυναμίας και ευαισθησίας στους μύς. Σε περιπτώσεις σημαντικής αύξησης των μυϊκών ενζύμων (>5-10 φορές τις ανώτερες φυσιολογικές τιμές), η θεραπεία με στατίνες πρέπει να διακόπτεται. Ο κίνδυνος εμφάνισης μυοσίτιδας ή και ραβδομύωσης είναι μεγαλύτερος σε ηλικιωμένα άτομα, σε άτομα με έκπτωση της νεφρικής λειτουργίας, σε ασθενείς με υποθυρεοειδισμό, σε ασθενείς με ηλεκτρολυτικές διαταραχές (π.χ. υποκαλιαιμία που οφείλεται στη χορήγηση διουρητικών), καθώς και σε άτομα που ταυτόχρονα λαμβάνουν άλλα φάρμακα και συγκεκριμένα κυκλοσπορίνη, ιτρακοναζόλη, μακρολίδια, κουμαρινικά αντιπηκτικά, νικοτινικό οξύ και φιμπράτες (ιδιαίτερα γεμφιπροζίλη)¹⁷⁹.

Σε όλους τους ασθενείς που παίρνουν στατίνες πρέπει να προσδιορίζονται τα μυϊκά ένζυμα (κυρίως της CPK) ανά τακτά χρονικά διαστήματα και να διακόπτεται άμεσα η χορήγησή τους όταν παρατηρηθεί σημαντική αύξηση της CPK, καθώς και συμπτώματα που συσχετίζονται με βλάβη των μυών (ευαισθησία, αδυναμία ή πόνος στους μύς)¹⁷⁹.

Άλλες ανεπιθύμητες ενέργειες των στατινών είναι γαστρεντερικές διαταραχές, πονοκέφαλος, εξανθήματα και διαταραχές του ύπνου. Οι στατίνες δεν πρέπει να χορηγούνται σε παιδιά, καθώς και σε έγκυες γυναίκες ή γυναίκες που θηλάζουν. Επίσης δεν πρέπει να χορηγούνται σε γυναίκες της αναπαραγωγικής ηλικίας, εκτός εάν εξασφαλισθεί αποτελεσματική μέθοδος αντισύλληψης.

Τα βιοχημικά και φαρμακοκινητικά χαρακτηριστικά των στατινών ποικίλουν ανάλογα με το φάρμακο¹⁷⁵. Η ατορβαστατίνη και η ροσουβαστατίνη έχουν μεγαλύτερο χρόνο ημίσειας ζωής σε σύγκριση με τα υπόλοιπα φάρμακα και η ιδιότητα αυτή μπορεί να συσχετίζεται με τη μεγαλύτερη αποτελεσματικότητά τους. Η πραβαστατίνη, η ροσουβαστατίνη και λιγότερο η φλουβαστατίνη είναι υδρόφιλα φάρμακα. Οι υδρόφιλες στατίνες δεν περνούν τον

αματεγκεφαλικό φραγμό. Έχει διατυπωθεί η άποψη ότι τα φάρμακα αυτά (και κυρίως η πραβαστατίνη) έχουν λιγότερες ανεπιθύμητες ενέργειες από το ΚΝΣ και κυρίως αϋπνίες. Η σιμβαστατίνη και η φλουβαστατίνη έχουν ελάχιστη νεφρική απέκκριση. Έτσι, τα φάρμακα αυτά μπορούν να χορηγηθούν σε ασθενείς με έκπτωση της νεφρικής λειτουργίας. Ιδιαίτερη αναφορά πρέπει να γίνει στον διαμέσου του κυτοχρώματος P450 3A4 μεταβολισμό των περισσότερων φαρμάκων αυτής της ομάδας (εκτός της φλουβαστατίνης που μεταβολίζεται διαμέσου του κυτοχρώματος P450 2C9, της ροσουβαστατίνης η οποία μεταβολίζεται με γλυκουρονίωση και της πραβαστατίνης που μεταβολίζεται διαμέσου άλλων οδών). Η ταυτόχρονη χορήγηση στατινών και άλλων φαρμάκων που επίσης μεταβολίζονται διαμέσου του κυτοχρώματος P450 3A4 έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση του ηπατικού μεταβολισμού των στατινών, την αύξηση των επιπέδων τους στο πλάσμα και επακόλουθα την εμφάνιση ανεπιθύμητων ενεργειών και κυρίως μυοπάθειας. Φάρμακα που επίσης μεταβολίζονται διαμέσου αυτής της οδού και προκαλούν αύξηση των επιπέδων των στατινών στο πλάσμα είναι το νικοτινικό οξύ, η ερυθρομυκίνη και τα υπόλοιπα μακρολίδια, η σιμεθιδίνη, η μεθοτρεξάτη, ορισμένα αντιμυκητιασικά φάρμακα (π.χ. ιτρακοναζόλη) και η κυκλοσπορίνη¹⁷⁵.

Πλειοτροπικές δράσεις των στατινών

Οι μελέτες πρωτογενούς και δευτερογενούς πρόληψης της καρδιαγγειακής νόσου έδειξαν ότι η χορήγηση φαρμακευτικής υπολιπιδαιμικής αγωγής και συγκεκριμένα η χορήγηση στατινών είχε ως αποτέλεσμα σημαντική μείωση της καρδιαγγειακής νοσηρότητας και θνητότητας. Η μείωση αυτή οφείλεται κυρίως στη μείωση των επιπέδων της LDL χοληστερόλης δηλαδή στη μείωση των LDL, που θεωρούνται οι κατεξοχήν αθηρωγόνες λιποπρωτείνες. Ωστόσο, υπάρχουν βάσιμες ενδείξεις ότι η μείωση των καρδιαγγειακών συμβαμάτων που παρατηρείται μετά τη χορήγηση των στατινών οφείλεται επίσης σε επιπρόσθετες δράσεις αυτών των φαρμάκων που δεν συσχετίζονται άμεσα με την υπολιπιδαιμική τους δράση. Οι δράσεις αυτές ονομάζονται πλειοτροπικές. Πράγματι, η ανάλυση των αποτελεσμάτων ορισμένων μελετών παρέμβασης, όπως της μελέτης WOSCOPS¹⁸⁰, της μελέτης CARE¹⁸ και της μελέτης AFCAPS¹⁷ έδειξε ότι η μείωση της καρδιαγγειακής νοσηρότητας και θνητότητας ήταν εμφανής ήδη από τον πρώτο χρόνο της φαρμακευτικής αγωγής. Αντίθετα, όταν επιχειρήθηκε μείωση των επιπέδων της ολικής χοληστερόλης με άλλες μεθόδους, π.χ. με χειρουργική παράκαμψη του ειλεού, σημαντική μείωση των καρδιαγγειακών συμβαμάτων παρατηρήθηκε 5 τουλάχιστον έτη μετά τη χειρουργική επέμβαση. Επίσης στη μελέτη LRC η χορήγηση χολεστουραμίνης είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση της LDL χοληστερόλης και των καρδιαγγειακών συμβαμάτων, η οποία



ήταν στατιστικά σημαντική 4-5 έτη μετά την έναρξη της θεραπευτικής αγωγής¹⁸¹. Η γρήγορη επομένως μείωση των καρδιαγγειακών συμβαμάτων μετά τη χορήγηση στατινών μπορεί να οφείλεται σε επιπρόσθετες δράσεις αυτών των φαρμάκων. Τα ευρήματα αυτά επιβεβαιώνονται και από τα αποτελέσματα της μελέτης MIRACL, η οποία έδειξε ότι η θεραπεία με στατίνες μετά από οξύ στεφανιαίο επεισόδιο μείωσε την πιθανότητα υποτροπής ήδη από την 16η εβδομάδα της αγωγής¹⁸². Επίσης, η προσεκτική ανάλυση των αποτελεσμάτων της μελέτης WOSCOPS έδειξε 1) ότι η επίπτωση των καρδιαγγειακών συμβαμάτων που παρατηρήθηκε κατά τη διάρκεια της μελέτης ήταν σαφώς μικρότερη από αυτή που αναμένονταν από τα δεδομένα της μελέτης του Framingham και 2) ότι οι ασθενείς που πήραν αγωγή με πραβαστατίνη και οι οποίοι είχαν παρόμοια επίπεδα LDL χοληστερόλης με ασθενείς που πήραν θεραπεία με εικονικό φάρμακο είχαν πολύ λιγότερα καρδιαγγειακά συμβάματα κατά τη διάρκεια της παρακολούθησης. Τα δεδομένα αυτά ενισχύουν την άποψη ότι οι στατίνες ασκούν την ευεργετική τους επίδραση και διαμέσου άλλων μηχανισμών¹⁸⁰.

Αντιοξειδωτική δράση των στατινών: όπως είναι γνωστό, η οξείδωση των LDL στο αγγειακό τοίχωμα διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο στην παθογένεια της αθηρωματικής νόσου. Οι στατίνες μειώνουν την ευαισθησία στην οξείδωση των LDL¹⁸³. Η αντιοξειδωτική δράση τους μπορεί να συσχετίζεται με την υπολιπιδαιμική τους δράση, καθώς τα φάρμακα αυτά μειώνουν τη χοληστερόλη και τα λιπαρά οξέα των λιποπρωτεϊνών και επομένως μειώνουν το υπόστρωμα που είναι διαθέσιμο για οξείδωση¹⁸³. Επιπρόσθετα, η αύξηση της δραστηριότητας των LDL υποδοχέων έχει ως αποτέλεσμα το γρήγορο και αποτελεσματικό καταβολισμό των LDL και επομένως και των μικρών πυκνών LDL, σωματιδίων που είναι ευαίσθητα στην οξειδωτική τροποποίηση¹⁸⁴.

Η αντιοξειδωτική δράση των στατινών μπορεί επίσης να οφείλεται σε μεταβολίτες που έχουν ισχυρή αντιοξειδωτική δράση (ατορβαστατίνη, φλουβαστατίνη)^{185,186}, καθώς και στην ικανότητά τους να συνδέονται με φωσφολιπίδια των LDL (φλουβαστατίνη, λοβαστατίνη) και να εμποδίζουν τη διάχυση των ελευθέρων ριζών που δημιουργούνται κατά τη διάρκεια οξειδωτικού stress¹⁸⁷. Τέλος, πρέπει να αναφερθεί ότι οι στατίνες μειώνουν την παραγωγή ελεύθερων ριζών οξυγόνου από τα ενδοθηλιακά κύτταρα.

Ευνοϊκή επίδραση των στατινών στο ενδοθήλιο: είναι γνωστό ότι η ενδοθηλιακή δυσλειτουργία αποτελεί μια από τις πρώτες εκδηλώσεις της αθηρωμάτωσης και παρουσιάζεται πριν η νόσος γίνει εμφανής αγγειογραφικά¹⁸⁸. Ένα βασικό χαρακτηριστικό της δυσλειτουργίας του ενδοθηλίου είναι η μειωμένη σύνθεση, απελευθέρωση και δραστηριότητα του μονοξειδίου του αζώτου που παράγεται από τα ενδοθηλιακά κύτταρα. Η ουσία αυτή διαδραματίζει σαφή

αντιαθηρογόνο ρόλο δεδομένου ότι προκαλεί χάλαση του αγγειακού τοιχώματος¹⁸⁹, αναστέλλει τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων¹⁹⁰ και τον πολλαπλασιασμό των λείων μυκών τινών του αγγειακού τοιχώματος¹⁹¹ και παρεμποδίζει τις αλληλεπιδράσεις των λευκοκυττάρων με τα ενδοθηλιακά κύτταρα¹⁹². Σε ασθενείς με υπερχοληστερολαιμία η διαταραχή της αγγειοκινητικής λειτουργίας του ενδοθηλίου συσχετίζεται με τα επίπεδα της ολικής και LDL χοληστερόλης. Η πλασμαφαίρεση βελτιώνει την εξαρτώμενη από το ενδοθήλιο χάλαση του αγγειακού τοιχώματος, εύρημα που υποδηλώνει ότι η μείωση της LDL χοληστερόλης αντιπροσωπεύει τον βασικό μηχανισμό διαμέσου του οποίου οι στατίνες βελτιώνουν την ενδοθηλιακή λειτουργία. Ωστόσο, σε κάποιες μελέτες η χορήγηση των στατινών βελτίωσε την λειτουργία του ενδοθηλίου πριν παρατηρηθεί σημαντική μεταβολή των επιπέδων των λιπιδίων του πλάσματος¹⁹³. Κατά συνέπεια, πιθανά οι στατίνες βελτιώνουν τη λειτουργία των ενδοθηλιακών κυττάρων και διαμέσου μηχανισμών που δεν συσχετίζονται με την υπολιπιδαιμική τους δράση. Πράγματι, πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι οι στατίνες αυξάνουν άμεσα την έκφραση της συνθετάσης του νιτρικού οξειδίου (NOS) από τα ενδοθηλιακά κύτταρα και επομένως την παραγωγή του αγγειοδιασταλτικού παράγοντα του ενδοθηλίου¹⁹⁴, ενώ ταυτόχρονα αναστέλλουν το σχηματισμό ελεύθερων ριζών οξυγόνου από τα ενδοθηλιακά κύτταρα¹⁹⁵. Επιπρόσθετα, οι στατίνες αναστέλλουν την παραγωγή της ενδοθηλίνης I¹⁹⁶ και της αγγειοτενσίνης II¹⁹⁷, οι οποίες ανταγωνίζονται τη δράση του αγγειοδιασταλτικού παράγοντα του ενδοθηλίου.

Αντιφλεγμονώδης δράση των στατινών: πολλές κλινικές και πειραματικές μελέτες έδειξαν ότι η φλεγμονή στο αγγειακό τοίχωμα διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην εξέλιξη της αθηρωματικής νόσου¹⁹⁸. Υπάρχουν βάσιμες κλινικές και πειραματικές ενδείξεις ότι οι στατίνες έχουν ισχυρές αντιφλεγμονώδεις δράσεις και περιορίζουν τη χαμηλού βαθμού "low grade" φλεγμονή του αγγειακού τοιχώματος. Καθοριστικό ρόλο στις φλεγμονώδεις διεργασίες του αγγειακού τοιχώματος διαδραματίζουν τα γεμάτα με λίπος μακροφάγα που εκκρίνουν φλεγμονώδεις διαβιβαστές (π.χ. τον παράγοντα νέκρωσης των όγκων, την ιντερφερόνη γ, την ιντερλευκίνη 6 κλπ.) που επηρεάζουν τη λειτουργία των παρακείμενων ενδοθηλιακών κυττάρων και T λεμφοκυττάρων¹⁹⁹. Τα κύτταρα αυτά προέρχονται από τα περιφερικά μονοκύτταρα τα οποία συνδέονται με τα ενδοθηλιακά κύτταρα διαμέσου των CD11β υποδοχέων που εκφράζονται στην επιφάνεια των μονοκυττάρων και των προσκολλητικών μορίων που εκφράζονται στην επιφάνεια των ενδοθηλιακών κυττάρων (P-σελεκτίνη, ICAM-1, MCP-1)¹⁹⁹. Οι στατίνες μειώνουν την έκφραση και λειτουργία αυτών των υποδοχέων και την ικανότητα σύνδεσης των λευκοκυττάρων με τα ενδοθηλιακά κύτταρα²⁰⁰⁻²⁰². Αν και η μείωση της συγκέντρωσης της LDL χοληστερόλης μπορεί να αντιπροσωπεύει το βασικό μηχανισμό



διαμέσου του οποίου οι στατίνες μειώνουν την φλεγμονή του αγγειακού τοιχώματος πρόσφατες πειραματικές μελέτες έδειξαν ότι η επίδραση των στατινών στις παραμέτρους της φλεγμονής είναι ανεξάρτητη από τις υπολιπιδαιμικές τους δράσεις²⁰³.

Η άμεση εκτίμηση της βαρύτητας της φλεγμονής του αγγειακού τοιχώματος είναι ιδιαίτερα δύσκολη και απαιτεί ιστολογική εξέταση. Έτσι, πρόσφατα προτάθηκε η χρησιμοποίηση διαφόρων πρωτεϊνών οξείας φάσης (hs-CRP, IL-6, SAA) ως αντιπροσωπευτικών δεικτών της έντασης της υποξείας φλεγμονής του αγγειακού τοιχώματος²⁰⁴. Πράγματι, μελέτες έδειξαν ότι τα επίπεδα της hs-CRP αποτελούν ανεξάρτητο παράγοντα κινδύνου για την εμφάνιση καρδιαγγειακών συμβαμάτων, τόσο σε ασθενείς με ήδη εγκατεστημένη στεφανιαία νόσο²⁰⁵, όσο και σε ασυμπτωματικά άτομα²⁰⁶. Κατά συνέπεια, η ικανότητα των στατινών να μειώνουν τα επίπεδα της hs-CRP αποτελεί έμμεση ένδειξη για τις αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες αυτών των φαρμάκων. Για παράδειγμα, η ανάλυση των αποτελεσμάτων της μελέτης CARE έδειξε ότι ασθενείς με αυξημένα επίπεδα C-αντιδρώσας πρωτεΐνης (CRP) και αμυλοειδούς Α είχαν αυξημένο κίνδυνο για την εμφάνιση μείζονων καρδιαγγειακών συμβαμάτων (μη θανατηφόρο έμφραγμα ή θάνατος που οφείλεται σε στεφανιαία νόσο)²⁰⁵. Η χορήγηση πραβαστατίνης είχε ως αποτέλεσμα μια εντυπωσιακή κατά 52% μείωση των καρδιαγγειακών συμβαμάτων στην ομάδα των ασθενών με αυξημένα επίπεδα αυτών των φλεγμονωδών δεικτών πριν από την έναρξη της υπολιπιδαιμικής αγωγής. Αντίθετα, η χορήγηση του φαρμάκου προκάλεσε μία πολύ μικρότερη κατά 25% μείωση των καρδιαγγειακών επεισοδίων σε άτομα με φυσιολογικά επίπεδα CRP και α-αμυλοειδούς²⁰⁵. Η διαφορά αυτή δεν οφείλονταν στα διαφορετικά επίπεδα των λιπιδαιμικών παραμέτρων πριν την έναρξη της αγωγής, αλλά πολύ πιθανά στην ικανότητα των στατινών να μειώνουν τα επίπεδα της CRP, μια μείωση που δεν συσχετίζεται με τις μεταβολές των τιμών των λιπιδαιμικών παραμέτρων.

Σταθεροποίηση των αθηρωματικών πλακών: τα οξέα στεφανιαία σύνδρομα οφείλονται σε ρήξη των μαλακών και εύθρυπτων αθηρωματικών πλακών^{207,208}. Οι πλάκες αυτές προκαλούν μικρή ή μέτρια στένωση του αυλού, περιέχουν μεγάλη ποσότητα λίπους, λεπτή ινώδη κάψα και μεγάλο αριθμό ενεργοποιημένων μακροφάγων. Η μείωση των επιπέδων της LDL χοληστερόλης μετά τη χορήγηση στατινών ενδεχόμενα συμβάλλει στη σταθερότητα των αθηρωματικών πλακών μειώνοντας το μέγεθός τους και μεταβάλλοντας τις φυσικοχημικές ιδιότητες του λιπιδιακού πυρήνα τους²⁰⁹. Ωστόσο, οι μεταβολές στο μέγεθος των πλακών μετά τη χορήγηση αυτών των φαρμάκων είναι μικρές, απαιτούν μεγάλο διάστημα θεραπείας²¹⁰ και κατά συνέπεια δεν μπορούν να εξηγήσουν επαρκώς την ταχεία και πολύ σημαντική μείωση των οξέων στεφανιαίων συμβαμάτων που παρατηρείται μετά τη χορήγηση τους. Έτσι, φαίνεται ότι η

αύξηση της σταθερότητας των αθηρωματικών πλακών μετά τη χορήγηση στατινών οφείλεται κατά κύριο λόγο στη μείωση του αριθμού των μακροφάγων της πλάκας, καθώς και στη μείωση της δραστηριότητας των μεταλοπρωτεϊνών, δηλαδή των πρωτεολυτικών ενζύμων που παράγονται από τα ενεργοποιημένα μακροφάγα του αγγειακού τοιχώματος και διασπών την ινώδη κάψα που περιβάλλει την αθηρωματική πλάκα²¹¹.

Αντιθρομβωτικές δράσεις των στατινών: κατά τη διάρκεια της ρήξης των αθηρωματικών πλακών παρατηρείται ενεργοποίηση των μηχανισμών πήξης με αποτέλεσμα θρόμβωση. Πολλές μελέτες έδειξαν ότι τα αιμοπετάλια ασθενών με υπερχοληστερολαιμία έχουν αυξημένη ικανότητα συσσώρευσης σε PAF και ADP²¹². Η χορήγηση στατινών είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση της ικανότητας συσσώρευσης των αιμοπεταλίων και της παραγωγής θρομβοξάνης, η οποία συσχετιζόταν με τη μείωση των επιπέδων της LDL χοληστερόλης²¹³. Πράγματι, οι στατίνες μειώνουν τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων, αφού μεταβάλλουν τη συγκέντρωση της χοληστερόλης στις μεμβράνες των αιμοπεταλίων, με αποτέλεσμα τη μεταβολή της ρευστότητας των κυττάρικών μεμβρανών²¹⁴.

Αν και οι στατίνες δεν φαίνεται να επηρεάζουν τα επίπεδα του ινωδογόνου, αυξάνουν την ινωδολυτική δραστηριότητα, αφού αυξάνουν την δραστηριότητα του ιστικού ενεργοποιητή του πλασμινογόνου (tPA)²¹⁵ και μειώνουν τη δραστηριότητα του αναστολέα του ενεργοποιητή του πλασμινογόνου (PAI-1)²¹⁶.

Όπως είναι γνωστό, ο ιστικός παράγοντας (TF), ο οποίος ανιχνεύεται στα γεμάτα με λίπος μακροφάγα των αθηρωματικών πλακών, διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο στη διαδικασία της ενεργοποίησης του μηχανισμού της πήξης. Πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι οι λιπόφιλες στατίνες μειώνουν την έκφραση και την ενεργότητα του ιστικού παράγοντα σε καλλιέργειες ανθρώπινων μακροφάγων²¹¹. Επιπρόσθετα, οι στατίνες μπορεί να επηρεάζουν άμεσα την διαδικασία της πήξης δεδομένου ότι επηρεάζουν το ρυθμό ενεργοποίησης του ινωδογόνου, της προθρομβίνης και των παραγόντων V και VI²¹⁷. Τέλος, η σταθεροποίηση των αθηρωματικών πλακών μετά τη χορήγηση στατινών αποτελεί ένα σημαντικό ανασταλτικό παράγοντα για την ενεργοποίηση του μηχανισμού της πήξης.

Φιβράτες

Οι φιβράτες αποτελούν τα φάρμακα πρώτης επιλογής για την αντιμετώπιση της υπερτριγλυκεριδαιμίας. Τα φάρμακα αυτά μειώνουν τα επίπεδα των τριγλυκεριδίων (κατά 20-50%) και αυξάνουν τα επίπεδα της HDL χοληστερόλης (κατά 10-30%)²¹⁸. Οι φιβράτες μειώνουν τα επίπεδα της LDL χοληστερόλης σε ασθενείς με αυξημένα επίπεδα LDL χοληστερόλης πριν



την έναρξη της θεραπείας²¹⁸. Σημαντικές μειώσεις των τιμών της LDL χοληστερόλης παρατηρούνται μετά τη χορήγηση των νεωτέρων φαρμάκων αυτής της ομάδας και κυρίως μετά τη χορήγηση της φενοφιβράτης και της συπροφιβράτης και όχι μετά τη χορήγηση της γεμφιπροζίλης²¹⁸. Ωστόσο, οι φιβράτες αυξάνουν τα επίπεδα της LDL χοληστερόλης σε ασθενείς με πρωτοπαθή υπερτριγλυκεριδαμία που εμφανίζουν χαμηλά επίπεδα LDL χοληστερόλης²¹⁸. Τα φάρμακα αυτά αυξάνουν τη διάμετρο των LDL, δηλαδή μειώνουν τις μικρές πυκνές LDL, οι οποίες έχουν μεγάλη αθηρωγόνο δυνατότητα²¹⁹. Οι φιβράτες προκαλούν αυτές τις μεταβολές στα επίπεδα των λιπιδίων αφού επιδρούν στο μεταβολισμό των λιποπρωτεϊνών με 5 τουλάχιστον διαφορετικούς μηχανισμούς:

1. αύξηση του ενδοαγγειακού καταβολισμού των πλούσιων σε τριγλυκερίδια λιποπρωτεϊνών. Αυτή η αύξηση οφείλεται τόσο στην αύξηση της δραστηριότητας της λιποπρωτεϊνικής λιπάσης²²⁰, όσο και στη μείωση της ηπατικής παραγωγής της απολιποπρωτεΐνης C-III η οποία αναστέλλει τη δράση αυτού του ενζύμου²²¹
2. αύξηση της πρόσληψης και της οξείδωσης των λιπαρών οξέων από τα ηπατοκύτταρα, η οποία οδηγεί σε μείωση της ηπατικής σύνθεσης των τριγλυκεριδίων και κατά συνέπεια σε μείωση της παραγωγής των VLDL²²²
3. αύξηση του καταβολισμού των LDL σωματιδίων. Η χορήγηση των φιβρατών προκαλεί μείωση των συγκέντρωσης των μικρών, πυκνών LDL σωματιδίων, καθώς και αύξηση των μεγαλύτερων και αραιότερων σωματιδίων που καταβολίζονται αποτελεσματικότερα από τους LDL υποδοχείς²¹⁹
4. μείωση της ετεροανταλλαγής εστέρων χοληστερόλης και τριγλυκεριδίων μεταξύ των HDL και των πλούσιων σε τριγλυκερίδια λιποπρωτεϊνών. Αυτή η μείωση οφείλεται στη μείωση της συγκέντρωσης των VLDL, καθώς και στη μείωση της ενεργότητας της CETP¹⁴⁶
5. αύξηση της παραγωγής των HDL και ενεργοποίηση της οδού της ανάστροφης μεταφοράς χοληστερόλης²²³

Οι επίδραση των φιβρατών στο μεταβολισμό των λιποπρωτεϊνών οφείλεται, τουλάχιστον έως ένα βαθμό, σε μεταβολές στη μεταγραφή γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες, οι οποίες επηρεάζουν το μεταβολισμό των λιπιδίων. Συγκεκριμένα, οι φιβράτες ενεργοποιούν ειδικούς μεταγραφικούς παράγοντες που ανήκουν στην ομάδα των ορμονικών πυρηνικών υποδοχέων, οι οποίοι ονομάζονται PPAR-α (peroxisome proliferator-activated receptors-α)²²⁴. Η επίδραση των φιβρατών σε αυτούς τους υποδοχείς ελαττώνει την έκφραση του γονιδίου που κωδικοποιεί την απολιποπρωτεΐνης C-III (η οποία αναστέλλει τη δράση της λιποπρωτεϊνικής λιπάσης)²²⁵ και παράλληλα αυξάνει την έκφραση των γονιδίων που κωδικοποιούν τη λιποπρωτεϊνική λιπάση²²⁶

και τις απολιποπρωτεΐνες AI και AII^{227,228}. Έτσι τα φάρμακα αυτά αυξάνουν τα επίπεδα των HDL και τον καταβολισμό των πλούσιων σε τριγλυκερίδια λιποπρωτεϊνών. Τέλος, οι φιβράτες επάγουν την έκφραση των γονιδίων ειδικών διαμεμβρανικών μεταφορέων στα μακροφάγα και τα ηπατοκύτταρα (SR-B1/CLA-1 και ABCA1) και έτσι αυξάνουν τη διαδικασία της ανάστροφης μεταφοράς χοληστερόλης^{229,230}.

Οι φιβράτες αυξάνουν τη συγκέντρωση της χοληστερόλης στα ηπατοκύτταρα και την επίπτωση της χολολιθίασης²³¹. Προκαλούν επίσης μία μικρή αύξηση των ηπατικών ενζύμων σε ένα μικρό ποσοστό ασθενών. Η πιο σημαντική ανεπιθύμητη ενέργεια είναι η μυοσίτιδα, η οποία παρατηρείται κυρίως σε ηλικιωμένα άτομα με έκπτωση της νεφρικής λειτουργίας, καθώς και όταν οι φιβράτες χορηγούνται σε συνδυασμό με στατίνες. Χρειάζεται μεγάλη προσοχή στη χορήγηση αυτών των φαρμάκων σε ασθενείς με νεφρική ανεπάρκεια, διότι οι φιβράτες απεκκρίνονται από τους νεφρούς με αποτέλεσμα την αύξηση των επιπέδων τους στο πλάσμα. Οι φιβράτες εκτοπίζουν την ουαρφαρίνη από τις θέσεις σύνδεσής της με αλβουμίνη. Έτσι, σε ασθενείς στους οποίους ταυτόχρονα χορηγούνται φιβράτες και κουμαρινικά αντιπηκτικά συνιστάται η κατά 30% μείωση της δόσης της ουαρφαρίνης. Επίσης οι φιβράτες εκτοπίζουν τα υπογλυκαιμικά φάρμακα από τις θέσεις σύνδεσης τους με αλβουμίνη με αποτέλεσμα υπογλυκαιμία. Άλλες ανεπιθύμητες ενέργειες των φιβρατών περιλαμβάνουν εξανθήματα, γαστρεντερικές διαταραχές και διαταραχές της στύσης (μετά τη χορήγηση κλοφιμπράτης). Οι φιβράτες δεν πρέπει να χορηγούνται σε ασθενείς με νεφρική ή ηπατική νόσο.

Πρέπει επίσης να αναφερθεί ότι ορισμένα από τα φάρμακα αυτής της ομάδας έχουν επιπρόσθετες μεταβολικές δράσεις²³¹. Συγκεκριμένα όλα τα φάρμακα (εκτός από τη γεμφμπροζίλη) μειώνουν τα επίπεδα του ινωδογόνου, ενώ η φενοφιβράτη μειώνει τα επίπεδα του ουρικού οξέος, εξαιτίας μιας σημαντικής αύξησης της κλασματικής απέκκρισής του. Τέλος, υπάρχουν περιορισμένες αναφορές ότι ορισμένα από τα φάρμακα αυτής της ομάδας μειώνουν τα επίπεδα της Lp(a), ιδιαίτερα σε άτομα με αυξημένα επίπεδα πριν από την έναρξη της θεραπείας.

Πλειοτροπικές δράσεις των φιβρατών

Οι φιβράτες, εκτός από την ευνοϊκή επίδρασή τους στα επίπεδα των λιπιδαιμικών παραμέτρων του ορού, διαθέτουν και μια σειρά από επιπρόσθετες δράσεις που ενδεχόμενα συμβάλλουν στην ικανότητα αυτών των φαρμάκων να αναστέλλουν την πρόοδο της αθηρωμάτωσης και να μειώνουν την καρδιαγγειακή νοσηρότητα και θνητότητα. Οι δράσεις αυτές ονομάζονται πλειοτροπικές και δεν είναι τόσο καλά μελετημένες όσο οι αντίστοιχες των στατινών.



Αντιοξειδωτικές δράσεις των φιβρατών: η οξείδωση των λιποπρωτεϊνών διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην παθογένεια της αθηρωματικής νόσου. Μελέτες έδειξαν ότι η χορήγηση φιβρατών αυξάνει την αντίσταση των λιποπρωτεϊνικών σωματιδίων (τόσο των VLDL, όσο και των LDL) στην οξειδωτική τροποποίηση^{186,232}. Αυτή η δράση των φιβρατών οφείλεται στην ικανότητά τους να μειώνουν τα επίπεδα των λιπιδίων και έτσι να περιορίζουν τη συγκέντρωση του υποστρώματος που είναι διαθέσιμο για οξείδωση. Επιπρόσθετα, η μείωση των μικρών πυκνών LDL σωματιδίων, τα οποία εμφανίζουν αυξημένη ευαισθησία στην οξείδωση, καθώς και η μεταβολή της σύστασης των λιπαρών οξέων των λιποπρωτεϊνών (αύξηση των μονοακόρεστων και μείωση των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων) μετά τη χορήγηση αυτών των φαρμάκων πιθανά συμβάλλουν στην ικανότητά τους να μειώνουν την οξείδωση των VLDL και των LDL^{233,234}.

Μεγάλες επιδημιολογικές μελέτες έδειξαν ότι τα HDL σωματίδια διαδραματίζουν σημαντικό αντιαθηρογόνο ρόλο⁵⁷. Αυτή η ιδιότητά τους οφείλεται τόσο στη συμμετοχή τους στο μηχανισμό της ανάστροφης μεταφοράς της χοληστερόλης⁶⁰, όσο και στην ικανότητά τους να προστατεύουν τα LDL σωματίδια από την οξειδωτική τροποποίηση²³⁵. Οι αντιοξειδωτικές ιδιότητες των HDL οφείλονται εν μέρει σε δύο ένζυμα που μεταφέρονται με αυτά τα σωματίδια: την παραοξονάση (PON)²³⁶ και την ακετυλοϋδρολάση του παράγοντα ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων (PAF-AH)²³⁷. Σε συνθήκες οξειδωτικού stress η ενεργότητα αυτών των δύο ενζύμων μειώνεται σημαντικά, ενώ τα HDL σωματίδια χάνουν τις αντιοξειδωτικές τους ικανότητες και μετατρέπονται σε σωματίδια που επάγουν τη φλεγμονή του αγγειακού τοιχώματος²³⁸. Μελέτες έδειξαν ότι η χορήγηση των φιβρατών αυξάνει την ενεργότητα της PON1 των HDL με αποτέλεσμα τη βελτίωση των αντιοξειδωτικών τους δράσεων²³⁹. Επιπρόσθετα, αυτά τα φάρμακα προστατεύουν τα HDL σωματίδια από την οξειδωτική τροποποίηση και έτσι συμβάλλουν στη διατήρηση της ικανότητάς τους να αναστέλλουν την αθηρωματική διαδικασία²⁴⁰.

Ευνοϊκή επίδραση των φιβρατών στο ενδοθήλιο: όπως είναι γνωστό η ενδοθηλιακή δυσλειτουργία αντιπροσωπεύει μια από τις πρωιμότερες εκδηλώσεις της αθηρωμάτωσης και εκδηλώνεται πριν η νόσος γίνει εμφανής αγγειογραφικά¹⁸⁸. Πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι οι φιβράτες βελτιώνουν όλες τις παραμέτρους της ενδοθηλιακής λειτουργίας τόσο στα πειραματόζωα²⁴¹, όσο και σε ασθενείς με πρωτοπαθείς δυσλιπιδαιμίες^{242,243}. Η επαγωγή της παραγωγής του νιτρικού οξειδίου²⁴⁴, καθώς και η αναστολή της σύνθεσης της ενδοθηλίνης-1²⁴¹ είναι οι κύριοι μηχανισμοί διαμέσου των οποίων οι φιβράτες βελτιώνουν τη λειτουργία του ενδοθηλίου. Επιπρόσθετα, η αύξηση της ευαισθησίας στη δράση της ινσουλίνης²⁴², η μείωση του οξειδωτικού stress²⁴⁵ και της φλεγμονής του αγγειακού τοιχώματος²⁴², καθώς και η μείωση

των κυκλοφορούντων ελεύθερων λιπαρών οξέων που παρατηρείται μετά τη χορήγηση των φιβρατών²⁴⁶ πιθανά διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην ικανότητα των «φιβρατών να αναστέλλουν την ενδοθηλιακή δυσλειτουργία. Πράγματι, σε μια πρόσφατη μελέτη, η βελτίωση των παραμέτρων της λειτουργίας του ενδοθηλίου μετά τη χορήγηση φενοφιβράτης συσχετιζόταν με τη μείωση των επιπέδων της ινσουλίνης και της hs-CRP²⁴².

Αντιφλεγμονώδεις δράσεις των φιβρατών: αρκετές μελέτες των τελευταίων δεκαετιών έδειξαν ότι η αθηρωμάτωση είναι μία φλεγμονώδης νόσος¹⁹⁹. Η ικανότητα των φιβρατών να τροποποιούν τη φλεγμονώδη αντίδραση του αγγειακού τοιχώματος αντιπροσωπεύει την καλύτερα μελετημένη πλειοτροπική δράση αυτών των φαρμάκων. Πρέπει να επισημανθεί ότι σε όλους τους τύπους των κυττάρων που συμμετέχουν στο σχηματισμό των αθηρωματικών πλακών έχει παρατηρηθεί έκφραση των PPAR-α υποδοχέων, διαμέσου των οποίων ασκούν τις περισσότερες βιολογικές δράσεις τους οι φιβράτες²⁴⁷. Έτσι, η ενεργοποίηση των PPAR-α υποδοχέων στα αφρώδη κύτταρα των αθηρωματικών πλακών οδηγεί σε επαγωγή της έκφρασης των υποδοχέων ABC-A1²³⁰ και SR-B1²²⁹ και κατά συνέπεια σε επιτάχυνση της διαδικασίας εξόδου της χοληστερόλης από αυτά τα κύτταρα. Η μείωση της χοληστερόλης των μακροφάγων των αθηρωματικών πλακών πιστεύεται ότι οδηγεί σε μείωση της ενεργοποίησής τους (μείωση της παραγωγής κυτταροκινών, μεταλλοπρωτεϊνών κτλ), με αποτέλεσμα τη μείωση της έντασης της φλεγμονής του αγγειακού τοιχώματος¹⁹⁹. Επιπρόσθετα, οι φιβράτες αναστέλλουν την έκφραση των προσκολλητικών μορίων ICAM-1²⁴⁸, VCAM-1²⁴⁹ και MCP-1²⁵⁰ στα ενδοθηλιακά κύτταρα, και έτσι μειώνουν τη διείσδυση των λευκοκυττάρων στον υπενδοθηλιακό χώρο, ενώ παράλληλα παρεμποδίζουν την επαγόμενη από τη θρομβίνη βιοσύνθεση της ενδοθηλίνης-1²⁵¹, η οποία διαθέτει πολυάριθμες ιδιότητες που προάγουν της αθηρωματική διαδικασία. Τέλος, η χορήγηση των φιβρατών σε ασθενείς με δυσλιπιδαιμία συνοδεύεται από σημαντική μείωση των συγκεντρώσεων των πρωτεϊνών οξείας φάσης (ινωδογόνο, hs-CRP, IL-6)²⁴², γεγονός που αντικατοπτρίζει τη μείωση της έντασης της φλεγμονής του αγγειακού τοιχώματος.

Αντιθρομβωτικές δράσεις των φιβρατών: η διαδικασία της θρόμβωσης διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο στην παθογένεια των οξέων στεφανιαίων συμβαμάτων¹⁹⁸. Μελέτες έδειξαν ότι οι φιβράτες προκαλούν σημαντική μείωση της συγκέντρωσης του ινωδογόνου, η οποία συνοδεύεται από μείωση του ιξώδους του αίματος, καθώς και βελτίωση της προσκολλητικότητας των ερυθρών αιμοσφαιρίων²⁵². Επιπρόσθετα, τα φάρμακα αυτής της κατηγορίας μειώνουν την παραγωγή του ιστικού παράγοντα από τα μακροφάγα των αθηρωματικών πλακών με αποτέλεσμα την αναστολή της ενεργοποίησης της διαδικασίας της



πήξης²⁵³. Τέλος, οι φιβράτες μειώνουν την έκφραση των υποδοχέων του παράγοντα ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων και του ιστικού παράγοντα στα αιμοπετάλια^{254,255} και έτσι μειώνουν σημαντικά την συγκολλητικότητα αυτών των κυττάρων.

Μέχρι σήμερα δεν υπάρχουν σαφή δεδομένα αναφορικά με το ρόλο που διαδραματίζουν οι φιβράτες στην παραγωγή του αναστολέα του ενεργοποιητή του πλασμινόγόνου (PAI-1). Ωστόσο, μια πρόσφατη μελέτη έδειξε ότι η φενοφιβράτη προκαλεί σημαντική αναστολή της παραγωγής αυτού του μορίου από καλλιέργειες ενδοθηλιακών κυττάρων²⁵⁶.

Συνδυασμοί υπολιπιδαιμικών φαρμάκων

Σε πολλούς ασθενείς με μικτή δυσλιπιδαιμία είναι απαραίτητη η χορήγηση συνδυασμού υπολιπιδαιμικών φαρμάκων (π.χ. ρητίνη δέσμευσης χολικών οξέων + στατίνη, στατίνη + φιβράτη)²⁵⁷. Πολλές μελέτες έδειξαν ότι η χορήγηση συνδυασμού υπολιπιδαιμικών φαρμάκων προκαλεί σημαντική βελτίωση του λιπιδαιμικού προφίλ σε ασθενείς με μικτή δυσλιπιδαιμία²⁵⁸. Ωστόσο, υπάρχει αυξημένος κίνδυνος ανεπιθύμητων ενεργειών και κυρίως μυοσίτιδας (μετά τη χορήγηση του συνδυασμού φιβρατών με στατίνες)²⁵⁹. Σε ασθενείς με μικτή δυσλιπιδαιμία είναι δυνατό επίσης να χορηγηθούν στατίνες σε υψηλές δόσεις, σε δόσεις δηλαδή μεγαλύτερες από αυτές που χρησιμοποιούνται για την αντιμετώπιση της υπερχοληστερολαιμίας. Η χορήγηση υψηλών δόσεων στατινών έχει ως αποτέλεσμα όχι μόνο μία σημαντική μείωση των τιμών της ολικής και LDL χοληστερόλης, αλλά και μία σημαντική μείωση των τιμών των τριγλυκεριδίων του ορού, η οποία συσχετίζεται με τη δόση των φαρμάκων και με τα αρχικά επίπεδα των τριγλυκεριδίων. Πράγματι πολλές μελέτες έδειξαν ότι η χορήγηση υψηλών δόσεων στατινών προκαλεί σημαντική βελτίωση του λιπιδαιμικού προφίλ ασθενών με μικτή δυσλιπιδαιμία με αποτέλεσμα την επίτευξη των στόχων της υπολιπιδαιμικής αγωγής με μονοθεραπεία και επομένως με λιγότερες ανεπιθύμητες ενέργειες, με μικρότερο κόστος και με καλύτερη συμμόρφωση των ασθενών.

V. PAF-ΑΚΕΤΥΛΟΪΔΡΟΛΑΣΗ

V.1 Ο παράγοντας ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων (PAF)

Ο παράγοντας ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων (PAF) είναι ένα αιθερικό φωσφολιπίδιο με πολυάριθμες βιολογικές δράσεις. Περιγράφηκε για πρώτη φορά στις αρχές της δεκαετίας του '70 σαν ένας φλεγμονώδης μεσολαβητής, ο οποίος εκκρίνεται από τα ενεργοποιημένα λευκοκύτταρα κατά τη διάρκεια της αλλεργικής αντίδρασης²⁶⁰⁻²⁶². Οφείλει την ονομασία του στην ιδιότητα του να επάγει την έκκριση βιοδραστικών ουσιών από τα αιμοπετάλια, καθώς και τη συσσώρευση αυτών των κυττάρων²⁶³. Η χημική δομή του PAF, όπως προσδιορίστηκε από τους Δημόπουλο και συνεργάτες^{264,265} είναι η εξής: 1-O-αλκυλο-2-ακετυλο-sn-γλυκερο-3-φωσφοχολίνη. Ωστόσο, ο όρος «PAF» χρησιμοποιείται σήμερα για να περιγράψει μια ομάδα φωσφατιδυλοχολινών με παραπλήσια χημική δομή και ιδιότητες που η βιολογική τους δραστηριότητα διαφέρει ανάλογα με το μήκος των λιπαρών οξέων στις θέσεις 1 και 2 του σκελετού της γλυκερόλης²⁶⁶.

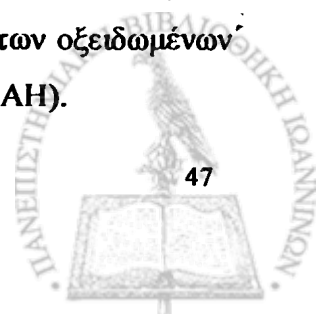
In vitro πειράματα έδειξαν ότι διάφοροι τύποι ανθρώπινων κυττάρων έχουν την ικανότητα να παράγουν PAF τόσο σε βασικές συνθήκες όσο και μετά από κατάλληλα ερεθίσματα. Τέτοια κύτταρα είναι τα ενδοθηλιακά κύτταρα²⁶⁷, τα πολυμορφοπύρρηνα ουδετερόφιλα²⁶⁸, τα ηωσινόφιλα, τα μακροφάγα²⁶⁹, τα μονοκύτταρα, τα αιμοπετάλια, τα μαστοκύτταρα, καθώς και τα σπερματοζωάρια²⁷⁰. Η παραγωγή του PAF στα κύτταρα αυτά γίνεται διαμέσου δύο βασικών ενζυμικών οδών: της οδού ανάπλασης (remodeling pathway) και της οδού η οποία είναι υπεύθυνη για την «εκ νέου» σύνθεση του PAF (de novo pathway). Η οδός της ανάπλασης του PAF περιλαμβάνει τις εξής αντιδράσεις: αρχικά με τη δράση μιας ενδοκυττάριας φωσφολιπάσης A_2 ή μιας ανεξάρτητης από το συνένζυμο A ακυλοτρανσφεράσης υδρολύεται ο εστερικός δεσμός στη θέση 2 της 1-O-αλκυλο-2-ακυλο-sn-γλυκερο-3-φωσφοχολίνης με αποτέλεσμα το σχηματισμό 1-O-αλκυλο-2-λυσσο-sn-γλυκερο-3-φωσφοχολίνης (lyso-PAF). Ο lyso-PAF που παράγεται με αυτό τον τρόπο ακετυλιώνεται με τη δράση μιας acetylCoA-lysoPAF ακετυλοτρανσφεράσης με αποτέλεσμα το σχηματισμό 1-O-αλκυλο-2-ακετυλο-sn-γλυκερο-3-φωσφοχολίνης (PAF)^{271,272}. Η οδός αυτή θεωρείται υπεύθυνη για την παραγωγή του PAF μετά από κατάλληλη κυτταρική ενεργοποίηση, ενώ αντίθετα δεν συνεισφέρει σημαντικά στη βασική, συνεχή παραγωγή του μορίου. Η δεύτερη ενζυμική οδός, η οποία είναι υπεύθυνη για την «εκ νέου» σύνθεση του PAF περιλαμβάνει τις εξής αντιδράσεις: το αρχικό υπόστρωμα 1-O-αλκυλο-2-λυσσο-sn-γλυκερο-3-φωσφορικό οξύ ακετυλιώνεται στη θέση 2 με τη δράση μιας acetylCoA ακετυλοτρανσφεράσης με αποτέλεσμα τη δημιουργία 1-O-αλκυλο-2-ακετυλο-sn-γλυκερο-3-φωσφορικού οξέος. Στη συνέχεια, με τη δράση μιας φωσφοϋδρολάσης, απομακρύνεται η



φωσφορική ομάδα από τη θέση 3 της γλυκερόλης και στη θέση της τοποθετείται μια ομάδα φωσφοχολίνης. Η τελευταία αντίδραση καταλύεται από μια CDP-φωσφοχολινοτρανσφεράση, η οποία μεταφέρει την ομάδα της φωσφοχολίνης από την CDP-χολίνη στη θέση 3 της γλυκερόλης²⁷³. Η «εκ νέου» οδός είναι υπεύθυνη για τη βασική, συνεχή παραγωγή του PAF χωρίς να απαιτείται κυτταρική ενεργοποίηση.

Ο PAF, ο οποίος παράγεται από τα διάφορα κύτταρα είτε παραμένει στο κυτταρόπλασμα όπου δρα ως ενδοκυττάριος αγγελιοφόρος²⁷⁴ είτε εκκρίνεται στο μεσοκυττάριο υγρό. Εκεί, δρώντας ως παρακρινές μόριο ενεργοποιεί τα γειτονικά κύτταρα (π.χ. τα αιμοπετάλια, τα μακροφάγα, τα λεία μυϊκά κύτταρα κτλ) επάγοντας βιολογικά φαινόμενα, όπως την προσκόλληση των αιμοπεταλίων, τη βιοσύνθεση εικοσανοειδών, την παραγωγή ελευθέρων ριζών οξυγόνου κ.α.²⁷⁵ ²⁷⁶ Εξαίρεση σε αυτό τον κανόνα αποτελούν τα ενδοθηλιακά κύτταρα²⁷⁷. Ο PAF που παράγεται σε αυτά τα κύτταρα δεν εκκρίνεται στο μεσοκυττάριο υγρό, αλλά μεταφέρεται στην επιφάνεια του κυττάρου όπου αλληλεπιδρώντας με τα πολυμορφοπύρρηνα ουδετερόφιλα κύτταρα επάγει την προσκόλλησή τους στο ενδοθήλιο και στη συνέχεια το χημειωτακτισμό τους με αποτέλεσμα τη διείσδυση τους στον υπενδοθηλιακό χώρο²⁷⁸.

Ο PAF ασκεί τις βιολογικές του δράσεις διαμέσου ενός ειδικού διαμεμβρανικού υποδοχέα²⁷⁹, ο οποίος εμφανίζει 7 διαμεμβρανικές περιοχές. Εξαιτίας αυτής της διαμόρφωσης, η οποία προσομοιάζει με σερπαντίνα, ο υποδοχέας του PAF κατατάσσεται στην οικογένεια των υποδοχέων «σερπαντινών». Η σύνδεση του PAF με τον υποδοχέα του έχει ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση G πρωτεϊνών, διαμέσου των οποίων εξασφαλίζεται η ενδοκυττάρια μετάδοση του ερεθίσματος. Διάφορα φωσφολιπίδια (κυρίως οξειδωμένα φωσφολιπίδια τα οποία προέρχονται από την οξείδωση των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων των φωσφολιπιδίων των λιποπρωτεϊνών και των κυτταρικών μεμβρανών), εξαιτίας της δομικής τους ομοιότητας με τον PAF, έχουν την ικανότητα να συνδέονται με τον υποδοχέα του και έτσι να αναπαράγουν αρκετές από τις βιολογικές του δράσεις (PAF-like phospholipids)²⁸⁰. Η μεγάλη βιολογική δραστηριότητα του PAF και των PAF-like οξειδωμένων φωσφολιπιδίων, καθώς και η ικανότητα τους να ασκούν τις δράσεις τους σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις (της τάξης των 10^{-12} ως 10^{-9} M) επιβάλλει την ακριβή ρύθμιση των επιπέδων τους στο πλάσμα και τους ιστούς. Η διατήρηση των επιπέδων του PAF στα φυσιολογικά επίπεδα γίνεται με τη ρύθμιση τόσο του ρυθμού παραγωγής του όσο και του ρυθμού του καταβολισμού του. Αντίθετα τα οξειδωμένα φωσφολιπίδια παράγονται με ανεξέλεγκτο τρόπο γεγονός που καθιστά τον καταβολισμό τους ως τον μοναδικό τρόπο ρύθμισης της βιολογικής τους δραστηριότητας. Ο καταβολισμός του PAF και των οξειδωμένων φωσφολιπιδίων γίνεται κυρίως με τη δράση της PAF-ακετυλοϋδρολάσης (PAF-AH).



Ο όρος PAF-ακετυλοϋδρολάση περιγράφει μια οικογένεια ενζύμων τα οποία έχουν την ικανότητα να αποικοδομούν τόσο τον PAF όσο και διάφορα οξειδωμένα φωσφολιπίδια υδρολύοντας τον εστερικό δεσμό στη θέση 2 της γλυκερόλης. Η οικογένεια αυτή περιλαμβάνει διάφορα ενδοκυττάρια ισοένζυμα, καθώς και την PAF-ακετυλοϋδρολάση του πλάσματος.

V.2 Εκκρινόμενη μορφή της PAF-ακετυλοϋδρολάσης (PAF-AH του πλάσματος)

Δομή

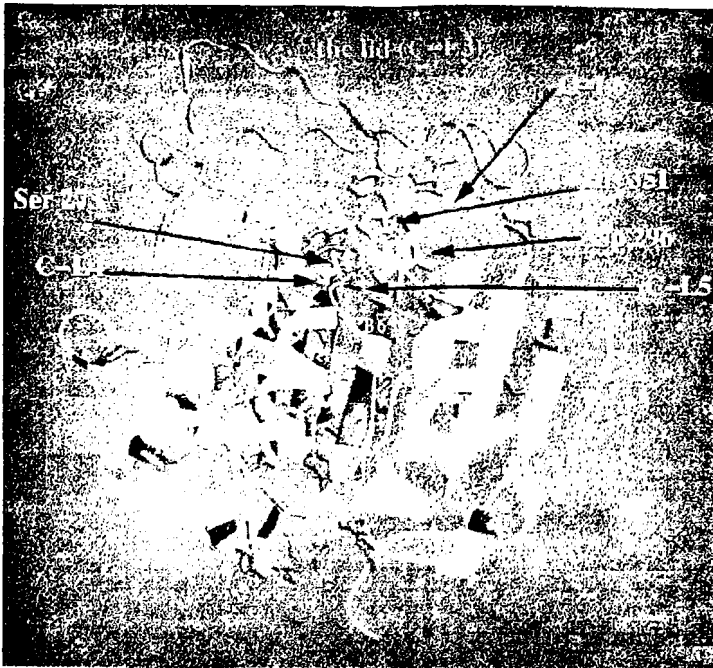
Η PAF-ακετυλοϋδρολάση του πλάσματος περιγράφηκε για πρώτη φορά από τους Farr και συνεργάτες²⁸¹, οι οποίοι παρατήρησαν ότι ο PAF χάνει τη βιολογική του δραστηριότητα όταν επωασθεί παρουσία ορού κουνελιού. Στη συνέχεια οι Blank και συνεργάτες²⁸² διαπίστωσαν ότι η απενεργοποίηση του PAF οφείλεται στην υδρόλυση του εστερικού δεσμού στη θέση 2 του σκελετού της γλυκερόλης, η οποία έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία του βιολογικά αδρανούς λυσο-PAF. Το ένζυμο που καταλύει την αντίδραση αυτή ονομάστηκε ακετυλοϋδρολάση του παράγοντά των αιμοπεταλίων (PAF-ακετυλοϋδρολάση, EC 3.1.1.47). Η πρωτοταγής δομή του ενζύμου προσδιορίστηκε για πρώτη φορά το 1995, οπότε και έγινε δυνατή η κλωνοποίηση του^{283,284}. Το cDNA της PAF-AH κωδικοποιεί μία πρωτεΐνη μεγέθους 441 αμινοξέων. Τα πρώτα 17 αμινοξέα (Met-1 ως Ala-17) αποτελούν πιθανά το σηματοδοτικό πεπτίδιο που είναι υπεύθυνο για την έκκριση του ενζύμου δεδομένου ότι δεν έχουν βρεθεί στην ώριμη πρωτεΐνη αλλά ούτε και στα ενδοκυττάρια ισοένζυμα. Στην ώριμη πρωτεΐνη δεν ανευρίσκονται επίσης ούτε τα επόμενα 24 αμινοξέα (Val-18 ως Lys-41), τα οποία είτε αποτελούν προπεπτίδιο είτε η απομάκρυνση τους είναι πειραματικό σφάλμα που συντελείται κατά τη διάρκεια της απομόνωσης του ενζύμου. Το υπολογιζόμενο με βάση την αλληλουχία των αμινοξέων μοριακό βάρος είναι 45,4 kDa και συμφωνεί απόλυτα με το μοριακό βάρος που υπολογίστηκε για το απομονωμένο ένζυμο σε SDS-PAGE²⁸⁵. Η αλληλουχία των αμινοξέων της PAF-AH είναι μοναδική και δεν παρουσιάζει ομοιότητες με την αλληλουχία άλλων γνωστών πρωτεϊνών. Εξάίρεση αποτελεί το πενταπεπτίδιο GX SXG το οποίο παρατηρείται σε ουδέτερες λιπάσες και εστεράσες^{286,287}, με την κεντρική σερίνη να αποτελεί το πυρηνόφιλο αμινοξύ του ενεργού κέντρου.

Το ενεργό κέντρο του ενζύμου, όπως προσδιορίστηκε με θεσηκατευθυνόμενη μεταλαξιγένεση (site directed mutagenesis) αποτελείται από τρία αμινοξέα που συνδέονται μεταξύ τους με δεσμούς υδρογόνου: την Ser-273 (η οποία αποτελεί το κεντρικό αμινοξύ στο πενταπεπτίδιο GX SXG), το Asp-296 και την His-351²⁸⁸. Η εξελικτική διατήρηση αυτών των αμινοξέων (τα



ίδια αμινοξέα αποτελούν το ενεργό κέντρο στην PAF-AH του βοδιού, του σκύλου, του κοτόπουλου και του ποντικού) υπογραμμίζει τη σημασία τους για τη λειτουργία του ενζύμου. Η δευτεροταγής δομή της PAF-AH δεν είναι γνωστή με ακρίβεια. Με βάση τα χαρακτηριστικά του ενεργού κέντρου (πενταπεπτίδιο GX SXG), καθώς και την ομοιότητα των καταλυτικών χαρακτηριστικών της PAF-AH με τις διάφορες ουδέτερες λιπάσες και σερινεστεράσες έχει διατυπωθεί η άποψη ότι η δευτεροταγής δομή του ενζύμου μοιάζει με αυτή των ουδέτερων λιπασών²⁸⁹. Σύμφωνα με αυτό το μοντέλο η πολυπεπτιδική αλυσίδα του ενζύμου συνίσταται από μία κεντρική β-πτυχωτή επιφάνεια η οποία αποτελείται από παράλληλα διατεταγμένα β-φύλλα που συνδέονται μεταξύ τους με α-έλικες. Το ενεργό κέντρο βρίσκεται στο καρβοξυλικό άκρο ενός β-φύλλου και αποτελείται από 3 αμινοξέα που συνδέονται μεταξύ τους με δεσμούς υδρογόνου. Πιο συγκεκριμένα το πυρηνόφιλο αμινοξύ του ενεργού κέντρου (στην προκειμένη περίπτωση η Ser-273) βρίσκεται στο καρβοξυτελικό άκρο ενός από τα κεντρικά β-φύλλα. Στη συνέχεια ακολουθεί μια απότομη αναδίπλωση της πολυπεπτιδικής αλυσίδας, η οποία συνεχίζεται σε μία α-έλικα. Η αναδίπλωση αυτή είναι γνωστή στη βιβλιογραφία ως πυρηνόφιλος «αγκώνας» και σχηματίζεται από το πενταπεπτίδιο GX SXG²⁹⁰. Η υπόλοιπη πολυπεπτιδική αλυσίδα αναδιπλώνεται κατά τέτοιο τρόπο ώστε τα άλλα δύο αμινοξέα της καταλυτικής τριάδας (το Asp-296 και η His-351) να έρθουν κοντά στην Ser-273 και να συνδεθούν μαζί της με δεσμούς υδρογόνου (εικόνα 1). Στα ένζυμα της ομάδας των ουδέτερων λιπασών (π.χ. παγκρεατική λιπάση) το ενεργό κέντρο βρίσκεται σε μια υδρόφοβη πτυχή του μορίου, η οποία καλύπτεται από α-έλικες ή θηλειές όταν το ένζυμο βρίσκεται σε ανενεργό μορφή²⁸⁶. Κατά την επαφή του ενζύμου με μια λιπιδιακή επιφάνεια η διαμόρφωση της πολυπεπτιδικής αλυσίδας αλλάζει και έτσι το ενεργό κέντρο εκτίθεται στο υπόστρωμα. Υπέρ αυτού του μοντέλου της δευτεροταγούς δομής της PAF-AH, σύμφωνα με το οποίο το μεγαλύτερο μέρος της πολυπεπτιδικής αλυσίδας συμμετέχει στη διαμόρφωση του κεντρικού πυρήνα του ενζύμου, συνηγορεί η παρατήρηση ότι η απομάκρυνση 21 αμινοξέων από το καρβοξυτελικό άκρο του μορίου ή 54 αμινοξέων από το αμινοτελικό άκρο (στα οποία δεν περιλαμβάνονται τα αμινοξέα της καταλυτικής τριάδας) οδηγεί σε πλήρη απώλεια της ενζυμικής δραστηριότητας²⁸⁸. Παρόλα αυτά, πρόσφατα δεδομένα τα οποία αφορούν την εξειδίκευση υποστρώματος της PAF-AH, καθώς και τον τρόπο με τον οποίο το ένζυμο συνδέεται με τα διάφορα υποστρώματα αμφισβητούν τη λειτουργική και άρα και τη δομική ομοιότητα της PAF-AH με τις ουδέτερες λιπάσες της ομάδας της παγκρεατικής λιπάσης²⁹¹. Η δομή του μακρομορίου της PAF-AH συμπληρώνεται με την παρουσία N-γλυκοζυλιώσεων, δηλαδή υδατανθρακικών αλυσίδων που συνδέονται με τις ασπαραγίνες της πολυπεπτιδικής αλυσίδας^{284,292}.





Εικόνα 1. Προτεινόμενη τρισδιάστατη δομή της PAF-AH

Οι αλυσίδες αυτές είναι του σύμπλοκου τύπου και περιέχουν υπολείμματα σιαλικού οξέος. Με βάση την αλληλουχία των αμινοξέων της PAF-AH οι πιθανές θέσεις γλυκοζυλίωσης είναι τα αμινοξέα Asn-423 και Asn-433, τα οποία βρίσκονται κοντά στο καρβοξυτελικό άκρο. Η παρουσία των υδατανθρακικών αλυσίδων δεν είναι απαραίτητη για την έκκριση του ενζύμου από τα μακροφάγα, δεν επηρεάζει την ευαισθησία του στις πρωτεάσες και δεν μεταβάλλει την ενζυμική ενεργότητα. Αντίθετα, μελέτες έδειξαν ότι η γλυκοζυλίωση διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη σύνδεση του ενζύμου με τα λιποπρωτεϊνικά σωματίδια, αφού αναστέλλει τη σύνδεσή του με τις HDL²⁹².

Πρόσφατα διαπιστώθηκε ότι το γονίδιο της PAF-AH βρίσκεται στο χρωμόσωμα 6 και είναι οργανωμένο σε 12 εξόνια^{283,284}. Το πρώτο εξόνιο κωδικοποιεί 127 νουκλεοτίδια μιας μη μεταφραζόμενης αλληλουχίας του 5'-άκρου. Το δεύτερο εξόνιο κωδικοποιεί 34 επιπρόσθετα νουκλεοτίδια αυτής της αλληλουχίας, την αλληλουχία για το σηματοδοτικό πεπτιδίο, καθώς και τα πρώτα 19 αμινοξέα της ώριμης πρωτεΐνης. Τέλος, τα 10 επόμενα εξόνια κωδικοποιούν το υπόλοιπο τμήμα της ώριμης πρωτεΐνης. Ο προαγωγός του γονιδίου της PAF-AH περιγράφηκε πρόσφατα δίνοντας έτσι τη δυνατότητα για πληρέστερη κατανόηση της ρύθμισης της παραγωγής του ενζύμου²⁹³. Η αλληλουχία των νουκλεοτιδίων μεγέθους 3.5 Kb στο 5' άκρο από το σημείο έναρξης της μεταγραφής περιέχει πολλαπλές θέσεις σύνδεσης για το μεταγραφικό παράγοντα Sp1, επτά αλληλουχίες σύνδεσης του παράγοντα MS2, μια θέση σύνδεσης για τον παράγοντα Pu.1, μία για τον MS1, καθώς και 11 STAT αλληλουχίες. Ο παράγοντας MS1 εκφράζεται μόνο στα μονοκύτταρα, ενώ ο Pu.1 στα μονοκύτταρα και τα Β κύτταρα^{294,295} επιβεβαιώνοντας έτσι

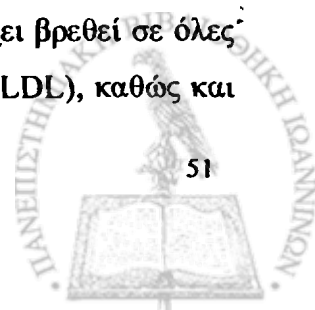


την άποψη ότι η PAF-AH του πλάσματος παράγεται αποκλειστικά από τα κύτταρα της μυελοειδούς σειράς. Επιπρόσθετα, ο παράγοντας MS2 εκφράζεται μόνο στα διαφοροποιημένα μακροφάγα και όχι στα μονοκύτταρα^{295,296}. Η ύπαρξη θέσεων πρόσδεσης για αυτό τον παράγοντα στον προαγωγό της PAF-AH εξηγεί το γιατί η παραγωγή του ενζύμου εξαρτάται από το βαθμό διαφοροποίησης των κυττάρων (βλέπε «κυτταρική πηγή προέλευσης και ρύθμιση των επιπέδων της PAF-AH του πλάσματος»). Σημαντικό ρόλο στην εξαρτώμενη από το βαθμό διαφοροποίησης του κυττάρου παραγωγή του ενζύμου μπορεί να διαδραματίζει και ο μεταγραφικός παράγοντας DIF (differentiation-induced factor), ο οποίος μπορεί να συνδεθεί στις STAT ακολουθίες του προαγωγού της PAF-AH²⁹⁷. Τέλος, οι ακολουθίες αυτές μπορεί να συμμετέχουν στο μηχανισμό ρύθμισης της έκφρασης του γονιδίου του ενζύμου από προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες, όπως η ιντερφερόνη-γ (IFN-γ)²⁹⁸.

Στον Ιαπωνικό πληθυσμό έχει περιγραφεί μια σημειακή μετάλλαξη του γονιδίου της PAF-AH του πλάσματος, η οποία κληρονομείται με τον αυτοσωμικό υπολειπόμενο χαρακτήρα και οδηγεί στην ομόζυγη της μορφή, σε πλήρη εξάλειψη της ενζυμικής ενεργότητας του πλάσματος²⁹⁹. Η μετάλλαξη αυτή συνίσταται σε αντικατάσταση μιας γουανίνης από θυμίνη (G→T) στη θέση 994 του ένατου εξονίου, η οποία στο επίπεδο της πρωτεΐνης μεταφράζεται σε αντικατάσταση μιας βαλίνης από φαινυλαλανίνη στη θέση 279 του ώρμου ενζύμου (Val²⁷⁹→Phe). Αν και αρχικά θεωρήθηκε ότι η μετάλλαξη αυτή απαντάται αποκλειστικά στον Ιαπωνικό πληθυσμό (στο 27% των Ιαπώνων στην ετερόζυγη μορφή και στο 4% στην ομόζυγη μορφή), πρόσφατες μελέτες έδειξαν την ύπαρξη αυτής της μετάλλαξης και σε άλλους πληθυσμούς της κεντρικής Ασίας³⁰⁰. Ένας άλλος πολυμορφισμός του γονιδίου της PAF-AH που έχει παρατηρηθεί στους Ιάπωνες και προκαλεί πλήρη εξάλειψη της ενζυμικής ενεργότητας του πλάσματος (Gln²⁸¹→Arg) αφορά επίσης το χρωμόσωμα 9 και συνίσταται σε αντικατάσταση μιας αδενίνης από γουανίνη (A→G) στη θέση 1001³⁰¹. Τέλος, στη λευκή φυλή έχουν περιγραφεί δύο άλλοι πολυμορφισμοί του γονιδίου της PAF-AH (Ile¹⁹⁸→Thr, εξόνιο 7, θέση 593, T→C και Ala³⁷⁹→Val, εξόνιο 11, θέση 1136, T→C), οι οποίοι ενδεχόμενα επηρεάζουν τη λειτουργικότητα του ενζύμου του πλάσματος, καθώς και ένας πολυμορφισμός (Arg⁹²→His, εξόνιο 4, θέση 275, G→A) με άγνωστη μέχρι σήμερα λειτουργική σημασία³⁰²⁻³⁰⁴.

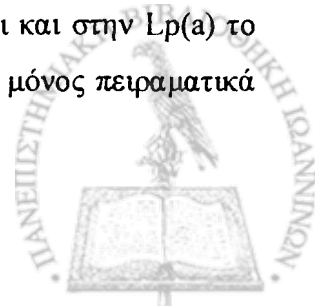
Φυσικοχημικές ιδιότητες και εξειδίκευση υποστρώματος

Η PAF-AH του πλάσματος είναι ένα υδρόφοβο μόριο το οποίο κυκλοφορεί συνδεδεμένο με τα λιποπρωτεϊνικά σωματίδια³⁰⁵. Ενζυμική ενεργότητα που υδρολύει τον PAF έχει βρεθεί σε όλες τις λιποπρωτεΐνες που περιέχουν την απολιποπρωτεΐνη B₁₀₀ (VLDL, IDL και LDL), καθώς και



στις λιποπρωτεΐνες υψηλής πυκνότητας (HDL)³⁰⁶. Η ενεργότητα αυτή εκφρασμένη ανα mg ολικής πρωτεΐνης είναι υψηλότερη στην LDL σε σύγκριση με τις VLDL και IDL. Αντίθετα, αν η ενεργότητα εκφραστεί ανά mg απολιποπρωτεΐνης B₁₀₀ (apoB₁₀₀) τότε όλες αυτές οι λιποπρωτεΐνες έχουν παραπλήσια ενζυμική ενεργότητα³⁰⁶. Τέλος, πρόσφατα δεδομένα έδειξαν ότι η ειδική ενεργότητα του ενζύμου (δηλαδή η ενεργότητα ανά μονάδα μάζας του ενζύμου) είναι παρόμοια σε όλο το φάσμα των λιποπρωτεϊνών³⁰⁷. Η κατανομή του ενζύμου στα υποκλάσματα των λιποπρωτεϊνών δεν είναι ομοιόμορφη. Έτσι, τόσο στις LDL όσο και στις HDL το μεγαλύτερο ποσοστό του ενζύμου ανιχνεύεται στα μικρά, πυκνά λιποπρωτεϊνικά σωματίδια³⁰⁸.

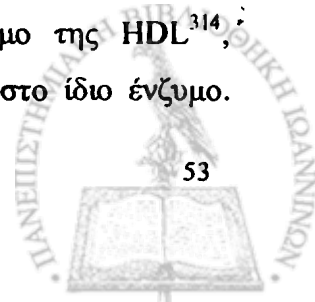
Ο τρόπος με τον οποίο η PAF-AH συνδέεται με τις λιποπρωτεΐνες χαμηλής πυκνότητας δεν ήταν γνωστός μέχρι πρόσφατα. Παρόλα αυτά το γεγονός ότι κατά την απομόνωση του ενζύμου απομονώνεται και ένα τμήμα από το καρβοξυτελικό άκρο της apoB₁₀₀, καθώς και το ότι σε άτομα με υπό- ή α-βηταλιποπρωτεϊναιμία το ένζυμο συνδέεται αποκλειστικά με τις HDL συνηγορούν υπέρ μιας αλληλεπίδρασης του ενζύμου με την apoB₁₀₀. Πρόσφατα με θεσηκατευθυνόμενη μεταλαξίγνεση (site directed mutagenesis) διαπιστώθηκε ότι τα αμινοξέα του ενζύμου που παίρνουν μέρος σε αυτή τη σύνδεση είναι η Tyr-205, καθώς και η Trp-115 και η Leu-116³⁰⁹. Ενδιαφέρον παρουσιάζει η παρατήρηση ότι η εισαγωγή των δύο τελευταίων αμινοξέων στις αντίστοιχες θέσεις της PAF-AH του ποντικού, η οποία συνδέεται αποκλειστικά με την HDL, οδηγεί στο σχηματισμό ενός ενζύμου το οποίο έχει την ικανότητα να συνδέεται με την ανθρώπινη LDL. Το τμήμα της απολιποπρωτεΐνης B 100 που συμμετέχει στη σύνδεση με το ένζυμο βρίσκεται στο καρβοξυτελικό άκρο της. Ειδικότερα, φαίνεται ότι τα αμινοξέα 4119-4279 διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη σύνδεση των LDL σωματιδίων με την PAF-AH³⁰⁹. Μια άλλη λιποπρωτεΐνη η οποία επίσης έχει υψηλά επίπεδα ενεργότητας της PAF-AH είναι η λιποπρωτεΐνη Lp(a)³¹⁰. Το σωματίδιο της Lp(a) αποτελείται βασικά από ένα σωματίδιο LDL, στην απολιποπρωτεΐνη B του οποίου βρίσκεται συνδεδεμένη με ένα δισουλφιδικό δεσμό η απολιποπρωτεΐνη (a)³¹¹. Έχει αναφερθεί ότι η Lp(a) περιέχει 7 φορές μεγαλύτερη ενεργότητα PAF-AH ανά mg πρωτεΐνης σε σύγκριση με την LDL³¹⁰. Ωστόσο, η ενεργότητα της Lp(a) μπορεί να συμβάλει σημαντικά στη διαμόρφωση της συνολικής ενεργότητας της PAF-AH του πλάσματος μόνο όταν τα επίπεδα αυτής της λιποπρωτεΐνης είναι σημαντικά αυξημένα³¹². Ανοσοκαταβύθιση της Lp(a) με αντισώματα κατά της απολιποπρωτεΐνης B οδηγεί σε πλήρη απώλεια της ενζυμικής ενεργότητας. Αντίθετα, η χρησιμοποίηση αντισωμάτων κατά της apo(a) δεν επηρεάζει την δραστηριότητα της PAF-AH, γεγονός που υποδηλώνει ότι και στην Lp(a) το ένζυμο συνδέεται με την απολιποπρωτεΐνη B. Έτσι λοιπόν μέχρι σήμερα ο μόνος πειραματικά



επιβεβαιωμένος τρόπος σύνδεσης της PAF-AH με τα σωματίδια της LDL είναι διαμέσου της απολιποπρωτεΐνης Β. Παρόλα αυτά, διάφορες παρατηρήσεις δείχνουν ότι πιθανά αυτός ο τρόπος σύνδεσης δεν είναι ο μοναδικός. Οι παρατηρήσεις αυτές προέρχονται από πειράματα ενσωμάτωσης απομονωμένου ενζύμου PAF-AH σε LDL σωματίδια των οποίων η ενδογενής PAF-AH είχε απενεργοποιηθεί με DFP, έναν αναστολέα ο οποίος συνδέεται μη αντιστρεπτά στο ενεργό κέντρο και εμποδίζει την υδρόλυση του υποστρώματος. Στα πειράματα αυτά το απομονωμένο ένζυμο συνδέθηκε στα λιποπρωτεϊνικά σωματίδια παρά την ύπαρξη του ενδογενούς (απενεργοποιημένου) ενζύμου³⁰⁵. Κατά συνέπεια, είτε η απολιποπρωτεΐνη Β περιέχει περισσότερες της μίας θέσεις πρόσδεσης του ενζύμου είτε το απομονωμένο ένζυμο συνδέεται με κάποιο άλλο σημείο του σωματιδίου. Η ικανότητα της PAF-AH να συνδέεται (και μάλιστα μη αντιστρεπτά) με κυστιδία φωσφολιπιδίων²⁹¹ οδηγεί στην υπόθεση ότι το ένζυμο μπορεί να συνδεθεί με τη στιβάδα των φωσφολιπιδίων της LDL.

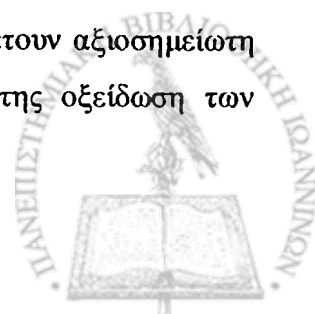
Μια άλλη κατηγορία λιποπρωτεϊνών οι οποίες περιέχουν σημαντικά ποσά PAF-AH είναι οι HDL. Ποσοτικά οι HDL περιέχουν το 30% της ενεργότητας του πλάσματος³⁰⁵, αν και η κατανομή του ενζύμου φαίνεται να επηρεάζεται από τον τρόπο απομόνωσης των λιποπρωτεϊνών. Συγκεκριμένα, εάν η απομόνωση γίνει με υπερφυγοκέντρηση βαθμίδωσης πυκνοτήτων ένα τμήμα της PAF-AH της LDL αποσυνδέεται από τα LDL σωματίδια και μεταναστεύει στην περιοχή πυκνοτήτων της HDL με αποτέλεσμα την υπερεκτίμηση της ενζυμικής ενεργότητας που αυτή περιέχει³¹³.

Η ταυτόχρονη παρουσία της PAF-AH στις HDL και LDL αποτελεί ένα περίεργο φαινόμενο δεδομένου ότι τα δύο σωματίδια δεν έχουν κοινή μεταβολική πορεία. Παρόλα αυτά, μελέτες έδειξαν ότι το ένζυμο μπορεί να ανταλλάσσεται μεταξύ των δύο σωματιδίων και μάλιστα κατά τρόπο εξαρτώμενο από το pH³⁰⁵. Συγκεκριμένα σε όξινο pH το μεγαλύτερο ποσοστό του ενζύμου μεταφέρεται στις HDL (και μάλιστα σε έναν υποπληθυσμό των HDL που περιέχει αποπρωτεΐνη Ε), ενώ σε αλκαλικό περιβάλλον συμβαίνει το αντίθετο, δηλαδή η μεταφορά της PAF-AH στις LDL. Ωστόσο, η μεταφορά αυτή φαίνεται ότι επηρεάζεται από τον τρόπο απομόνωσης των λιποπρωτεϊνών. Έτσι σε όξινο pH οι HDL περιέχουν σχεδόν όλη την ενεργότητα της PAF-AH του πλάσματος όταν ο διαχωρισμός των λιποπρωτεϊνών γίνει με υπερφυγοκέντρηση βαθμίδωσης πυκνοτήτων. Αντίθετα, όταν ο διαχωρισμός αυτός γίνει με FPLC, οι HDL περιέχουν το 25% περίπου της συνολικής ενζυμικής ενεργότητας του πλάσματος³¹³. Με βάση αυτές τις παρατηρήσεις, καθώς και το γεγονός ότι τα αντισώματα που σχηματίστηκαν κατά του ενζύμου της LDL αναγνωρίζουν και το ένζυμο της HDL³¹⁴, διατυπώθηκε η άποψη ότι οι ενεργότητες των δύο σωματιδίων οφείλονται στο ίδιο ένζυμο.



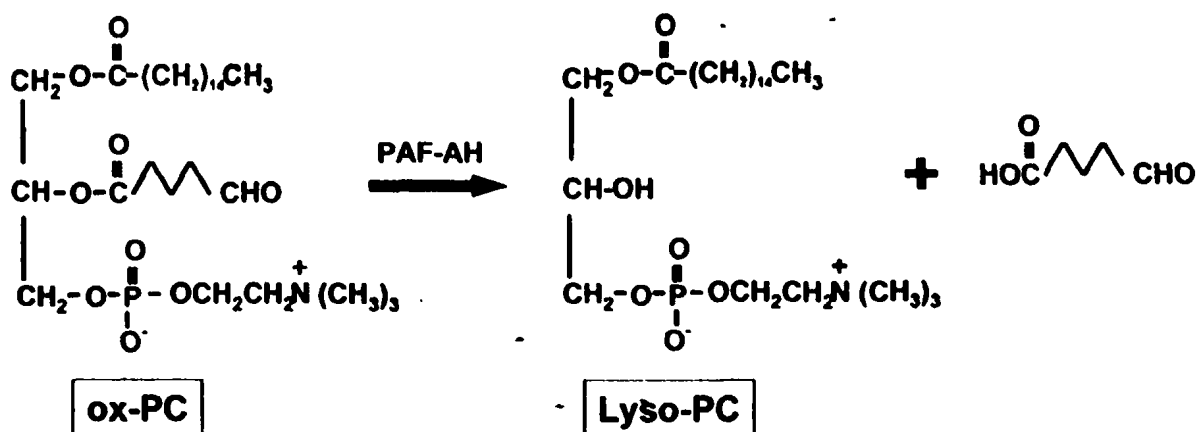
Εντούτοις, νεώτερες μελέτες αμφισβητούν την ύπαρξη PAF-AH στην HDL και αποδίδουν την ικανότητα των HDL σωματιδίων να υδρολύουν τον PAF σε ένα άλλο ένζυμο που ονομάζεται παραοξονάση-1 (PON-1)³¹⁵.

Το βέλτιστο pH για τη λειτουργία της PAF-AH του πλάσματος είναι 7-7.5, χωρίς ωστόσο η ενεργότητα του ενζύμου να μεταβάλλεται σημαντικά όταν το pH του διαλύματος κυμαίνεται μεταξύ 5 και 9²⁸⁵. Σε αντίθεση με τις άλλες φωσφολιπάσες το ένζυμο δεν χρειάζεται ιόντα ασβεστίου για τη δράση του και δεν επηρεάζεται από την παρουσία EDTA στο διάλυμα της αντίδρασης²⁸⁵. Η PAF-AH αναστέλλεται μη αντιστρεπτά από τον αναστολέα των σερινοεστερασών DFP (diisopropylfluorophosphate), το DENP (diethyl p nitrophenyl phosphate) και το PMSF (phenylmethylsulphonylfluoride)²⁸⁵, ενώ πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι ένας νέος υδατοδιαλυτός αναστολέας των σερινοεστερασών το Refabloc (4-[2-aminoethyl]benzenesulfonyl fluoride) αναστέλλει επίσης την ενεργότητα του ενζύμου με μη αντιστρεπτό τρόπο³¹⁶. Αντίθετα, το ένζυμο δεν επηρεάζεται από τον κλασσικό αναστολέα των φωσφολιπασών A₂ pBPB (p-bromophenylbromide), ούτε από το αντιδραστήριο Ellman το οποίο αναστέλλει την LCAT (lecithin-cholesterol acyltransferase)²⁸⁵. Τα παραπάνω χαρακτηριστικά αποδεικνύουν ότι η PAF-AH του πλάσματος είναι ένα ξεχωριστό ένζυμο και ότι η ενζυμική ενεργότητα που βρίσκεται στα λιποπρωτεϊνικά σωματίδια και υδρολύει τον PAF δεν οφείλεται σε κάποια από τις γνωστές φωσφολιπάσες A₂ ή την LCAT. Ωστόσο, το βασικό χαρακτηριστικό της PAF-AH του πλάσματος που την ξεχωρίζει από τα υπόλοιπα μέλη της οικογένειας των φωσφολιπασών A₂ και την καθιστά μοναδική είναι η εξειδίκευση της απέναντι στα διάφορα υποστρώματα (substrate specificity). Πράγματι, οι πρώτες μελέτες έδειξαν ότι το ένζυμο, σε αντίθεση με τις άλλες φωσφολιπάσες A₂, εμφανίζει σημαντική εξειδίκευση για τα φωσφολιπίδια τα οποία περιέχουν λιπαρά οξέα βραχείας αλυσίδας στη θέση 2 του σκελετού της γλυκερόλης (εικόνα 2). Έτσι, το καλύτερο υπόστρωμα για το ένζυμο είναι ο PAF, ο οποίος περιέχει ακετυλομάδα στη θέση 2 (2 άτομα άνθρακα), ενώ η διαδοχική αύξηση του αριθμού των ατόμων άνθρακα στο λιπαρό οξύ της θέσης 2 προκαλεί προοδευτική μείωση της ταχύτητας υδρόλυσης του υποστρώματος, η οποία καθίσταται πρακτικά μηδενική για λιπαρά οξέα με περισσότερα από 6 άτομα άνθρακα²⁸⁵. Ωστόσο, μεταγενέστερες μελέτες έδειξαν ότι η προσθήκη μιας πολικής ομάδας (καρβοξυλικής ή αλδεϋδικής) στο ω- άκρο των λιπαρών οξέων με περισσότερα από 6 άτομα άνθρακα που βρίσκονται εστεροποιημένα στη θέση 2 οδηγεί στο σχηματισμό φωσφολιπιδίων τα οποία αποτελούν κατάλληλο υπόστρωμα για την PAF-AH³¹⁷. Τα φωσφολιπίδια αυτά, τα οποία περιέχουν πολικές ομάδες στη θέση 2, διαθέτουν αξιοσημείωτη βιολογική δραστηριότητα και σχηματίζονται in vivo κατά τη διάρκεια της οξείδωσης των



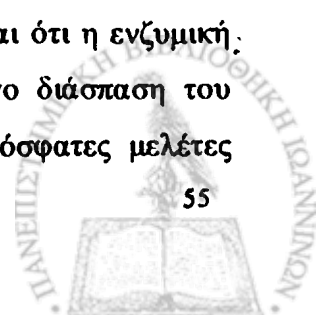
φωσφολιπιδίων των λιποπρωτεϊνών και των κυτταρικών μεμβρανών που περιέχουν πολυακόρεστα λιπαρά οξέα στη θέση 2³¹⁷. Έτσι, έχει διατυπωθεί η άποψη ότι η αυστηρή εξειδίκευση υποστρώματος της PAF-AH της δίνει τη δυνατότητα να κυκλοφορεί στο πλάσμα σε ενεργό μορφή και να συμμετέχει στο μεταβολισμό του PAF και των οξειδωμένων φωσφολιπιδίων, χωρίς ωστόσο να διασπά τα ακέραια φωσφολιπίδια των λιποπρωτεϊνών και των κυτταρικών μεμβρανών που δεν έχουν υποστεί οξειδωτική τροποποίηση³¹⁷.

Σε αντίθεση με την εξειδίκευση της PAF-AH για τα λιπαρά οξέα της θέσης 2, το ένζυμο δεν επηρεάζεται από το είδος του δεσμού στη θέση 1 (αιθερικός ή εστερικός) ή το είδος της πολικής ομάδας στη θέση 3, αφού η αντικατάσταση της χολίνης από αιθανολαμίνη, γλυκερόλη σερίνη ή υδρογόνο δεν επηρεάζει σημαντικά την ταχύτητα της ενζυμικής αντίδρασης²⁸⁵. Σύμφωνα με τους ίδιους ερευνητές ένα άλλο χαρακτηριστικό της PAF-AH είναι ότι το ένζυμο διασπά αποτελεσματικότερα το υπόστρωμα (π.χ PAF) όταν αυτό είναι σε μυκηλλιακή παρά σε μονομερή μορφή, τονίζοντας έτσι την αναγκαιότητα ύπαρξης μιας διαχωριστικής επιφάνειας λιπιδίων-νερού για την παρουσίαση του υποστρώματος στο ενεργό κέντρο του ενζύμου²⁸⁵.



Εικόνα 2. Η βασική αντίδραση που καταλύεται από την PAF-AH.

Η θεώρηση αυτή εξηγεί γιατί η ταχύτητα της ενζυμικής αντίδρασης αυξάνεται όταν αυτή γίνεται παρουσία λιποπρωτεϊνικών σωματιδίων. Επιπρόσθετα, πειράματα με απομονωμένη LDL και HDL καθώς και μελέτες σε ασθενείς με συγγενείς διαταραχές του μεταβολισμού των λιπιδίων (αθηταλιποπρωτεϊναμία και νόσο Tangier) έδειξαν ότι η PAF-AH των LDL υδρολύει αποτελεσματικότερα τον PAF σε σύγκριση με το ένζυμο των HDL, καθώς και ότι η ενζυμική ενεργότητα των LDL είναι σχεδόν αποκλειστικά υπεύθυνη για την *in vivo* διάσπαση του φλεγμονώδους αυτού μεσολαβητή^{305,314}. Σε αντίθεση με τα παραπάνω, πρόσφατες μελέτες



έδειξαν ότι η PAF-AH υδρολύει υποστρώματα που βρίσκονται στην υδατική φάση του διαλύματος (και όχι σε κάποια λιπιδιακή επιφάνεια)²⁹¹ και η ιδιότητα της αυτή εξηγεί σε σημαντικό βαθμό την εξειδίκευσή της κατά των φωσφολιπιδίων που περιέχουν στη θέση 2 λιπαρά οξέα βραχείας αλυσίδας ή λιπαρά οξέα με πολική ομάδα στο ω- άκρο, δεδομένου ότι αυτά έχουν μεγαλύτερη διαλυτότητα στο νερό. Έτσι, με βάση αυτή τη θεώρηση, τα απαραίτητα χαρακτηριστικά που πρέπει να έχει ένα φωσφολιπίδιο για να αποτελεί υπόστρωμα της PAF-AH είναι η ικανή διαλυτότητα στο νερό, καθώς και μια σχετικά υδρόφοβη ομάδα στη θέση 1 (όσο αυτό επιτρέπεται από την προϋπόθεση για καλή διαλυτότητα στο νερό)³⁰⁷. Σε αντίθεση με τα ευρήματα των προηγούμενων μελετών, οι ερευνητές αυτοί έδειξαν ότι η αύξηση του μήκους της αλυσίδας του λιπαρού οξέος στη θέση 2 δεν μεταβάλλει σημαντικά το ρυθμό της υδρόλυσης, καθώς αυτή συνοδεύεται από την ύπαρξη μιας σχετικά υδρόφοβης ομάδας στη θέση 1 του σκελετού της γλυκερόλης, καθώς και ότι η σύνδεση του ενζύμου στις λιποπρωτεΐνες δεν επηρεάζει τα καταλυτικά του χαρακτηριστικά³⁰⁷.

Πειράματα από δύο ανεξάρτητες ερευνητικές ομάδες έδειξαν ότι κάτω από ορισμένες συνθήκες είναι δυνατό να παρατηρηθεί πλήρης εξάλειψη της ενζυμικής δραστηριότητας της PAF-AH του πλάσματος. Έτσι, η οξειδωση των LDL σωματιδίων (ένα φαινόμενο το οποίο παρατηρείται in vivo και διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην παθογένεια της αθηρωμάτωσης) οδηγεί σε πλήρη αδρανοποίηση της PAF-AH που αυτά περιέχουν³¹⁸. Το φαινόμενο αυτό είναι μη αναστρέψιμο και παρουσιάζει σημαντική συσχέτιση με τις παραμέτρους της οξειδωσης [μεταβολή της ηλεκτροφορητικής κινητικότητας των σωματιδίων και παραγωγή TBARS (thiobarbituric acid-reactive substances)]. Παρόμοια αναστολή της ενεργότητας του ενζύμου παρατηρείται όταν τα LDL σωματίδια εκτείνονται στην επίδραση ελευθέρων ριζών οξυγόνου³¹⁹. Και στις δύο περιπτώσεις η Km του ενζύμου για το υπόστρωμα δεν μεταβάλλεται σημαντικά (γεγονός που δείχνει ότι η συγγένεια του ενζύμου για το υπόστρωμα παρέμεινε σταθερή), ενώ αντίθετα παρατηρείται σημαντική μείωση της Vmax, η οποία υποδηλώνει μείωση των διαθέσιμων ενεργών μορίων του ενζύμου. Η παθοφυσιολογική σημασία αυτών των παρατηρήσεων δεν είναι ξεκαθαρισμένη. Ωστόσο, η άθροιση του PAF και των οξειδωμένων φωσφολιπιδίων κατά τη διάρκεια της οξειδωσης των λιποπρωτεϊνών³²⁰, καθώς και η ενδεχόμενη συνεργική δράση του PAF με τις ελεύθερες ρίζες οξυγόνου³²¹ μπορεί να αυξήσει σημαντικά την ένταση της φλεγμονώδους διεργασίας είτε αυτή αφορά το τοίχωμα των αγγείων, είτε άλλα σημεία του οργανισμού.

Τέλος, αξίζει να σημειωθεί ότι εκτός από την κλασσική της δράση σαν υδρολάση φωσφολιπιδίων με λιπαρά οξέα βραχείας αλυσίδας, η PAF-AH του πλάσματος διαθέτει επίσης



δραστικότητα φωσφολιπάσης $A_1^{285,307}$ και τρανσακετυλάσης³²². Ωστόσο, η βιολογική σημασία αυτών των δράσεων, καθώς και η ενδεχόμενη συμμετοχή τους στην παθοφυσιολογία διαφόρων νοσημάτων δεν έχουν καθορισθεί με ακρίβεια.

Κυτταρική πηγή προέλευσης και ρύθμιση των επιπέδων της PAF-AH του πλάσματος

Οι αρχικές μελέτες στις οποίες εξετάστηκε η προέλευση της PAF-AH του πλάσματος έδειξαν ότι μια σειρά από κύτταρα όπως τα μακροφάγα³²³, τα αιμοπετάλια^{324,325}, τα ενεργοποιημένα μαστοκύτταρα³²⁶ και τα ηπατοκύτταρα^{327,328} έχουν την ικανότητα να παράγουν και να εκκρίνουν το ένζυμο του πλάσματος. Έτσι, αν και η συμβολή του κάθε κυτταρικού τύπου στη διαμόρφωση της συνολικής ενεργότητας της PAF-AH του πλάσματος δεν ήταν γνωστή με ακρίβεια, με βάση τα αποτελέσματα αυτών των μελετών θεωρήθηκε ότι τα μακροφάγα και τα ηπατοκύτταρα αποτελούν τις βασικές πηγές προέλευσης του ενζύμου. Παρόλα αυτά, η μεταγενέστερη κλωνοποίηση του γονιδίου της PAF-AH και η χρήση τεχνικών μοριακής βιολογίας (Northern blot ανάλυση με τη χρήση ραδιοσημασμένου cDNA) έδειξαν ότι τα ηπατοκύτταρα δεν περιέχουν mRNA του ενζύμου²⁸³. Αντίθετα, υψηλές ποσότητες mRNA της PAF-AH του πλάσματος βρέθηκαν σε ιστούς οι οποίοι χαρακτηρίζονται από αυξημένη συγκέντρωση ιστικών μακροφάγων (όπως ο θύμος, οι αμυγδαλές, ο πλακούντας και ο σπλήνας), γεγονός που υπογραμμίζει τη σημασία του συστήματος μονοκυττάρων-μακροφάγων στην παραγωγή του ενζύμου²⁸³. Οι παρατηρήσεις αυτές επιβεβαιώθηκαν πρόσφατα από μια μελέτη που έγινε σε Ιαπωνικό πληθυσμό και βασίσθηκε στην ύπαρξη μιας μετάλλαξης η οποία οδηγεί σε πλήρη απώλεια της δραστικότητας του ενζύμου ($Val^{279} \rightarrow Phe$). Συγκεκριμένα οι Asano και συνεργάτες έδειξαν ότι στους ασθενείς οι οποίοι έχουν υποβληθεί σε μεταμόσχευση του μυελού των οστών η ενεργότητα του ενζύμου στο πλάσμα εξαρτάται από το γονότυπο του δότη και όχι του δέκτη³²⁹. Έτσι, οι ασθενείς οι οποίοι ήταν ομόζυγοι για τον άγριο (wild) τύπο του ενζύμου (έλλειψη της μετάλλαξης, φυσιολογική ενζυμική δραστικότητα) και έλαβαν μόσχευμα από δότες ετερόζυγους για τη μετάλλαξη $Val^{279} \rightarrow Phe$ παρουσίαζαν 50% μικρότερη ενεργότητα του ενζύμου σε σύγκριση με τον υγιή πληθυσμό, ενώ ένας ασθενής που έλαβε μόσχευμα από δότη ομόζυγο για τη μετάλλαξη $Val^{279} \rightarrow Phe$ παρουσίασε μη ανιχνεύσιμα επίπεδα ενεργότητας της PAF-AH του πλάσματος³²⁹. Κατά συνέπεια, από τα παραπάνω δεδομένα προκύπτει ότι το ένζυμο του πλάσματος προέρχεται από κύτταρα του αιμοποιητικού συστήματος και μάλιστα από τα κύτταρα της μυελοειδούς σειράς. Τέλος, αναφορικά με την παραγωγή του ενζύμου από τα ηπατοκύτταρα, πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι τα κύτταρα αυτά παράγουν σημαντικές ποσότητες PAF-AH μετά από κατάλληλο ερεθισμό αλλά το μεγαλύτερο μέρος αυτής της

ενζυμικής ενεργότητας εκκρίνεται στη χολή και όχι στο πλάσμα³³⁰. Αντίθετα τα κύτταρα Kupffer του ήπατος (τα οποία ανήκουν στο σύστημα μονοκυττάρων-μακροφάγων) μετά από ερεθισμό με ενδοτοξίνη εκκρίνουν το μεγαλύτερο ποσοστό του παραγόμενου ενζύμου στο πλάσμα³³⁰.

Η μεγάλη δραστηριότητα του PAF και των οξειδωμένων φωφολιπιδίων και η ικανότητά τους να επάγουν βιολογικά φαινόμενα σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις επιβάλλουν την αυστηρή ρύθμιση των επιπέδων της PAF-AH του πλάσματος. Ένας από τους βασικότερους παράγοντες που παρεμβαίνουν στο ρυθμό παραγωγής του ενζύμου από τα κύτταρα του συστήματος μονοκυττάρων-μακροφάγων είναι ο βαθμός διαφοροποίησης αυτών των κυττάρων. Πράγματι, μελέτες έδειξαν ότι ενώ τα μονοκύτταρα του περιφερικού αίματος συνθέτουν αμελητέα ποσά ενζυμικής ενεργότητας, η ανάπτυξη τους σε καλλιέργεια και η προοδευτική διαφοροποίησή τους σε μακροφάγα προκαλεί σημαντική αύξηση του mRNA της PAF-AH, καθώς και της ενδοκυττάριας και εκκρινόμενης ενζυμικής ενεργότητας³³¹. Αυτή η εξαρτώμενη από το βαθμό διαφοροποίησης του κυττάρου αύξηση της σύνθεσης της PAF-AH φαίνεται ότι ρυθμίζεται στο επίπεδο της μεταγραφής του γονιδίου του ενζύμου. Μόλις πρόσφατα οι Wu και συνεργάτες έδειξαν ότι ο προαγωγός του γονιδίου της PAF-AH περιέχει ειδικές θέσεις σύνδεσης για τους μεταγραφικούς παράγοντες Sp1 και Sp3³³². Τα επίπεδα αυτών των παραγόντων αυξάνονται κατά τη διαφοροποίηση των μονοκυττάρων σε μακροφάγα και έτσι αυξάνεται η δραστηριότητα του προαγωγού της PAF-AH και κατά συνέπεια η παραγωγή και έκκριση του ενζύμου³³². Ωστόσο, παρά τις ισχυρές ενδείξεις για το ρόλο της διαφοροποίησης των κυττάρων στο ρυθμό σύνθεσης του ενζύμου, οι *in vitro* συνθήκες των κυτταροκαλλιιεργειών δεν αντικατοπτρίζουν πάντα με ακρίβεια το *in vivo* περιβάλλον των ιστικών μακροφάγων. Έτσι, ορισμένες μελέτες έδειξαν ότι ακόμα και πλήρως διαφοροποιημένα ιστικά μακροφάγα, όπως τα κύτταρα Kupffer του ήπατος, παράγουν μικρά ποσά PAF-AH σε βασικές συνθήκες και ότι ο ρυθμός παραγωγής αυξάνεται μόνο μετά από κατάλληλο ερεθισμό³³³.

Η παραγωγή της PAF-AH του πλάσματος υπόκειται επίσης σε ορμονική ρύθμιση. Έτσι, η προγεστερόνη και η δεξαμεθαζόνη³³⁴ προκαλούν σημαντική αύξηση της παραγωγής του ενζύμου από τα μακροφάγα του φθαρού, ενώ αντίθετα τα οιστρογόνα και η βιταμίνη D προκαλούν μείωση της παραγωγής του ενζύμου³³⁴⁻³³⁶. Μάλιστα, έχει διατυπωθεί η άποψη ότι οι ορμονικές αυτές επιδράσεις διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην κήση και την έναρξη του τοκετού δεδομένου ότι μια από τις φυσιολογικές δράσεις του PAF είναι η αύξηση της συσπαστικότητας του μυομητρίου. Έτσι, ενώ σε όλη τη διάρκεια της κήσης τα επίπεδα της PAF-AH είναι αυξημένα, η απότομη μείωση της ενεργότητας του ενζύμου πριν τον τοκετό

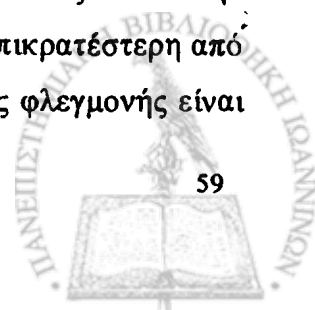


οδηγεί σε αύξηση των επιπέδων του PAF, σύσπαση του μυομητρίου και έναρξη του τοκετού^{337,338}.

Μια άλλη κατηγορία ουσιών που επηρεάζουν την παραγωγή της PAF-AH του πλάσματος είναι οι κυτταροκίνες που ευοδώνουν τη φλεγμονή, οι οποίες εκκρίνονται κατά τη διάρκεια των αντιδράσεων οξείας φάσης. Έτσι, η επώαση μακροφάγων παρουσία ενδοτοξίνης, καθώς και η προσθήκη στο υλικό της καλλιέργειας ιντερφερόνης γ (IFN- γ), παράγοντα νέκρωσης των όγκων (TNF- α) ή των ιντερλευκινών 1, 6 και 8 (IL-1, IL-6 και IL-8) προκαλεί ισχυρή αναστολή της παραγωγής και της έκκρισης της PAF-AH του πλάσματος^{293,339,340}. Ο μόνος διαβιβαστής της φλεγμονής που προκαλεί αύξηση της σύνθεσης του ενζύμου σε κυτταροκαλλιέργειες μακροφάγων και ηπατοκυττάρων είναι ο PAF^{293,328}. Αύξηση της σύνθεσης και έκκρισης της PAF-AH παρατηρήθηκε και μετά από προσθήκη στο υλικό της καλλιέργειας των αυξητικών παραγόντων της μυελοειδούς σειράς GM-CSF και G-CSF³⁴¹. Ωστόσο, πρόσφατα δεδομένα αμφισβητούν το ρόλο αυτών των μορίων στη ρύθμιση της παραγωγής του ενζύμου²⁹³. Οι παραπάνω παρατηρήσεις επιβεβαιώθηκαν και από διάφορες κλινικές μελέτες οι οποίες έδειξαν ότι ασθενείς με υψηλά επίπεδα κυτταροκινών (πχ ασθενείς με σήψη³⁴², νόσο του Crohn³⁴³, ρευματοειδή αρθρίτιδα³⁴⁴ ή συστηματικό ερυθματώδη λύκο³⁴⁵) παρουσιάζουν σημαντικά χαμηλότερη ενεργότητα της PAF-AH του πλάσματος σε σύγκριση με υγιείς μάρτυρες.

Σε αντίθεση με τα παραπάνω δεδομένα τα οποία υποστηρίζουν τον ανασταλτικό ρόλο των διαβιβαστών της φλεγμονής στην παραγωγή του ενζύμου του πλάσματος, μελέτες *in vivo* χορήγησης των ουσιών αυτών σε διάφορα είδη τρωκτικών κατέληξαν σε ακριβώς αντίθετα συμπεράσματα. Έτσι, τόσο η χορήγηση ενδοτοξίνης Gram αρνητικών μικροβίων όσο και η χορήγηση IL-1 ή TNF- α οδήγησαν σε αύξηση της έκφρασης του γονιδίου της PAF-AH και κατά συνέπεια σε αύξηση της ενεργότητας του ενζύμου στο πλάσμα^{330,333,346,347}. Η εντόπιση των κυττάρων (μακροφάγων) που υπερπαραγάγουν το ένζυμο σε αυτές τις μελέτες ήταν συνάρτηση του τρόπου χορήγησης της ενδοτοξίνης. Έτσι, όταν η ενδοτοξίνη χορηγήθηκε στη μεσεντέρια φλέβα η αύξηση του mRNA του ενζύμου αφορούσε κυρίως τα κύτταρα Kupffer του ήπατος. Αντίθετα, η συστηματική χορήγηση της ενδοτοξίνης οδήγησε σε ένα πιο διάχυτο πρότυπο διέγερσης της παραγωγής του ενζύμου που αφορούσε τον πνεύμονα, το ήπαρ, το σπλήνα, τους νεφρούς και το θύμο³⁴⁶.

Μέχρι σήμερα έχουν προταθεί διάφορες θεωρίες οι οποίες επιχειρήσαν να εξηγήσουν τα αντικρουόμενα αποτελέσματα μεταξύ των *in vivo* και *in vitro* μελετών που εξέτασαν την επίδραση των παραγόντων της φλεγμονής στην παραγωγή της PAF-AH. Η επικρατέστερη από αυτές βασίζεται στην παραδοχή ότι η *in vivo* χορήγηση των αγωνιστών της φλεγμονής είναι



δυνατό να ενεργοποιήσει διάφορους μεταβολικούς δρόμους, οι οποίοι δεν μπορούν να αναπαραχθούν σε συνθήκες κυτταροκαλλιέργειας. Έτσι, η αρχική αναστολή της παραγωγής της PAF-AH του πλάσματος από τη χορήγηση ενδοτοξίνης (η οποία έχει διαπιστωθεί σε καλλιέργειες μακροφάγων), μπορεί στο πειραματόζωο να συνοδεύεται από αύξηση των ιστικών συγκεντρώσεων του PAF, ο οποίος στη συνέχεια διεγείρει την παραγωγή του ενζύμου³⁴⁸. Η άποψη αυτή υποστηρίζεται έμμεσα από την παρατήρηση ότι η αύξηση της ενεργότητας της PAF-AH του πλάσματος στα τρωκτικά μετά την *in vivo* χορήγηση ενδοτοξίνης μπορεί να ανασταλλεί εν μέρει με τη σύγχρονη χορήγηση ανταγωνιστών του υποδοχέα του PAF³⁴⁶. Επιπρόσθετα, στη διαμόρφωση της τελικής ενεργότητας της PAF-AH του πλάσματος *in vivo* μπορεί να συμβάλλουν και οι επαγόμενες από τις κυτταροκίνες ποιοτικές και ποσοτικές μεταβολές των λιποπρωτεϊνών³⁴⁹, οι οποίες όπως είναι γνωστό αποτελούν τους κύριους φορείς του ενζύμου στο πλάσμα.

Δεδομένου ότι τα αιμοποιητικά κύτταρα, τα οποία αποτελούν τη βασική πηγή προέλευσης του ενζύμου του πλάσματος, δεν παράγουν λιποπρωτεΐνες, είναι προφανές ότι η PAF-AH παράγεται ανεξάρτητα από τα λιποπρωτεϊνικά σωματίδια και ενσωματώνεται σε αυτά σε κάποια φάση του μεταβολισμού τους. Μελέτες σε ασθενείς με συγγενείς διαταραχές του μεταβολισμού των λιπιδίων έδειξαν ότι η παρουσία των λιποπρωτεϊνών δεν είναι απαραίτητη προϋπόθεση για την παραγωγή του ενζύμου. Έτσι, τόσο οι ασθενείς με αβηταλιποπρωτεϊναιμία, όσο και οι ασθενείς με νόσο Tangier (οι οποίοι παρουσιάζουν σχεδόν πλήρη έλλειψη των λιποπρωτεϊνών που περιέχουν απολιποπρωτεΐνη Β και των HDL αντίστοιχα) έχουν φυσιολογική ενεργότητα της PAF-AH στο πλάσμα^{314,350}. Παρόλα αυτά, η παραγωγή και η έκκριση του ενζύμου από τα μακροφάγα αυξάνεται όταν αυτά επωασθούν παρουσία ανθρώπινου ορού³²³. Αν και το ακριβές στοιχείο του ορού που διεγείρει την παραγωγή του ενζύμου δεν είναι γνωστό, πιθανολογείται ότι πρόκειται για τα λιποπρωτεϊνικά σωματίδια³⁵¹. Η άποψη αυτή υποστηρίζεται από το γεγονός ότι ο ορός που προέρχεται από ασθενείς με δυσλιπιδαιμία προκαλεί σημαντικά μεγαλύτερη αύξηση της παραγωγής του ενζύμου σε σύγκριση με ορό από νορμολιπιδαιμικά άτομα³⁵².

Αν και η επίδραση των λιπιδίων στην παραγωγή της PAF-AH του πλάσματος δεν έχει καθορισθεί με σαφήνεια φαίνεται ότι ο μεταβολισμός των λιποπρωτεϊνών συμβάλλει σημαντικά στη διαμόρφωση της ενεργότητας του πλάσματος επηρεάζοντας τον καταβολισμό του ενζύμου. Πράγματι, μια πρόσφατη μελέτη έδειξε ότι ο ρυθμός καταβολισμού των λιποπρωτεϊνών που περιέχουν απολιποπρωτεΐνη Β είναι ο σημαντικότερος ρυθμιστικός παράγοντας της ενεργότητας της PAF-AH του πλάσματος³⁵³.



Τέλος, αν και οι μηχανισμοί που ρυθμίζουν την κατανομή της PAF-AH μεταξύ των διάφορων λιποπρωτεϊνικών σωματιδίων δεν έχουν μελετηθεί επαρκώς, φαίνεται ότι ο βαθμός γλυκοζυλίωσης της πρωτεΐνης του ενζύμου διαδραματίζει σημαντικό ρόλο, δεδομένου ότι το γλυκοζυλιωμένο ένζυμο συνδέεται αποκλειστικά με τις λιποπρωτεΐνες που περιέχουν απολιποπρωτεΐνη Β και όχι με τις HDL²⁹².

Ο ρόλος της PAF-AH στην αθηρωματική διαδικασία: παθοφυσιολογία

Είναι γνωστό ότι ένα από τα πρώτα στάδια που παρατηρούνται κατά τη δημιουργία της αθηρωματικής πλάκας είναι ο σχηματισμός των αφρωδών κυττάρων (foam cells)¹⁹⁹. Τα κύτταρα αυτά είναι στην πραγματικότητα μακροφάγα του αγγειακού τοιχώματος (ή και λεία μυϊκά κύτταρα) που έχουν φαγοκυτταρώσει λιποπρωτεϊνικά σωματίδια (κυρίως LDL σωματίδια) και τα οποία εκκρίνουν στη συνέχεια μια πληθώρα διαβιβαστών, οι οποίοι επάγουν τη φλεγμονώδη διαδικασία στο τοίχωμα των αρτηριών¹⁹⁹. Μελέτες έδειξαν ότι στο φαινόμενο της φαγοκυττάρωσης των λιποπρωτεϊνών από τα μακροφάγα δεν συμμετέχει ο κλασσικός LDL υποδοχέας αλλά ένας διαφορετικός υποδοχέας, ο οποίος ονομάστηκε υποδοχέας-καθαριστής (scavenger receptor)³⁵⁴. Αυτός ο υποδοχέας εκφράζεται συνεχώς στην επιφάνεια των ενεργοποιημένων μακροφάγων και η λειτουργικότητά του, σε αντίθεση με τον κλασσικό LDL υποδοχέα, δεν επηρεάζεται από τα ενδοκυττάρια επίπεδα χοληστερόλης^{354,355}. Ένα παράδοξο φαινόμενο που παρατηρήθηκε κατά τη διάρκεια της μελέτης του μηχανισμού του σχηματισμού των αφρωδών κυττάρων είναι ότι η LDL δεν προσλαμβάνεται από τα μακροφάγα στη φυσική της μορφή³⁵⁶. Το γεγονός αυτό οδήγησε στη διατύπωση της άποψης ότι τα σωματίδια της LDL πρέπει να υποστούν κάποια μετατροπή για να αναγνωρισθούν από τον υποδοχέα-καθαριστή³⁵⁶. Μέχρι σήμερα έχουν περιγραφεί αρκετοί τρόποι χημικής τροποποίησης της LDL, οι οποίοι αυξάνουν τη συγγενεία της με τους υποδοχείς-καθαριστές των μακροφάγων *in vitro*^{357,358}. Ωστόσο, η *in vivo* παρουσία αυτών των τροποποιημένων μορφών των LDL σωματιδίων, καθώς και η σημασία τους στην παθογένεια της αθηρωματικής νόσου αμφισβητούνται. Εξαίρεση αποτελεί η οξειδωμένη LDL (ox-LDL). Με αυτό τον όρο περιγράφονται τα σωματίδια της LDL τα οποία έχουν υποστεί την επίδραση διαφόρων οξειδωτικών παραγόντων και τα οποία εμφανίζουν συγκεκριμένα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά (κατακερματισμός της απολιποπρωτεΐνης B₁₀₀, αύξηση της ηλεκτοφορητικής κινητικότητας, αύξηση της πυκνότητας κτλ)^{359,360}. Οι ενδείξεις για την *in vivo* παρουσία αυτών των σωματιδίων^{361,362}, ο αυξημένος καταβολισμός τους από τα μακροφάγα³⁵⁸, καθώς και η αξιοσημείωτη βιολογική τους δραστηριότητα οδήγησαν στη διατύπωση της οξειδωτικής υπόθεσης της αθηρωμάτωσης, δηλαδή

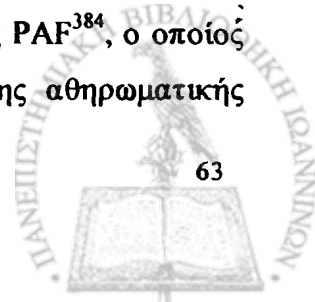
της υπόθεσης σύμφωνα με τη οποία η οξείδωση των λιποπρωτεϊνών, καθώς και των λιπιδίων των κυτταρικών μεμβρανών, αποτελεί ένα από τα σημαντικότερα πρώιμα στάδια στη διαδικασία του σχηματισμού της αθηρωματικής πλάκας³⁶³⁻³⁶⁵. Αν και ο υπεύθυνος μηχανισμός για την in vivo οξείδωση της LDL δεν είναι σαφώς καθορισμένος³⁶⁶, οι προφλεγμονώδεις ιδιότητες των οξειδωμένων λιποπρωτεϊνικών σωματιδίων έχουν μελετηθεί διεξοδικά. Συγκεκριμένα, η ox-LDL δρα χημειοτακτικά για τα κυκλοφορούντα μονοκύτταρα και τα T-λεμφοκύτταρα^{24,367,368}, αναστέλλει την εξαρτώμενη από τα ενδοθηλιακά κύτταρα αγγειοδιαστολή (endothelial cell-dependent relaxation)³⁶⁹, διεγείρει την παραγωγή κυτταροκινών από τα κύτταρα της αθηρωματικής πλάκας³⁷⁰, προάγει το σχηματισμό αυτοαντισωμάτων³⁶¹, διεγείρει την παραγωγή ενζύμων που καταστρέφουν τη διάμεση ουσία της πλάκας (matrix)³⁷¹ και τέλος είναι άμεσα τοξική για τα κύτταρα του αγγειακού τοιχώματος³⁷².

Η άποψη ότι η PAF-AH του πλάσματος διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην παθογένεια της αθηρωμάτωσης βασίστηκε στην παρατήρηση ότι κατά τη διάρκεια της οξείδωσης της LDL παρατηρείται εκτεταμένη ενζυμική υδρόλυση των φωσφολιπιδίων της και σχηματισμός λυσοφωσφατιδυλοχολίνης³⁷³. Με βάση το μοριακό βάρος του ενζύμου, την εξειδίκευση του απέναντι σε διάφορα υποστρώματα και την εκλεκτική του αναστολή από αναστολείς των σερινεστερασών οι Steinbrecher και Pritchard κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι η PAF-AH πλάσματος είναι το ένζυμο που ευθύνεται για την υδρόλυση των φωσφολιπιδίων η οποία παρατηρείται κατά τη διάρκεια της οξείδωσης της LDL³⁷⁴. Επιπρόσθετα, λαμβάνοντας υπόψη την εξειδίκευση υποστρώματος του ενζύμου, διατύπωσαν την άποψη ότι κατά τη διάρκεια της οξείδωσης της LDL τα φωσφολιπίδια που περιέχουν ακόρεστα λιπαρά οξέα στη θέση 2 της γλυκερόλης υφίστανται σχάση του διπλού δεσμού με αποτέλεσμα το σχηματισμό οξειδωμένων λιπαρών οξέων στη θέση 2 ή λιπαρών οξέων βραχείας αλυσίδας, τα οποία αποτελούν κατάλληλο υπόστρωμα για την PAF-AH³⁷⁴. Με αυτό το μηχανισμό εξηγείται γιατί η υδρόλυση των φωσφολιπιδίων παρατηρείται αποκλειστικά στην οξειδωμένη LDL και όχι στα λιποπρωτεϊνικά σωματίδια, τα οποία δεν έχουν υποστεί την επίδραση οξειδωτικών παραγόντων. Η παθοφυσιολογική σημασία των παραπάνω παρατηρήσεων έγινε κατονοητή λίγο αργότερα όταν διαπιστώθηκε ότι τα οξειδωμένα φωσφολιπίδια της LDL διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην ικανότητά της να επάγει την αθηρωματική διαδικασία³⁷⁵. Πράγματι, αν και η ανεξέλεγκτη οξείδωση των λιπιδίων των λιποπρωτεϊνών και των κυτταρικών μεμβρανών των κυττάρων της αθηρωματικής πλάκας οδηγεί στο σχηματισμό πολυάριθμων προϊόντων με άγνωστη δομή, μελέτες έδειξαν ότι τα οξειδωμένα φωσφολιπίδια συμμετέχουν ενεργά στην παθοφυσιολογία της αθηρωμάτωσης³⁷⁵. Ένα από τα πιο σημαντικά ευρήματα των αρχικών μελετών που εξέτασαν τις



δράσεις αυτών των λιπιδίων ήταν ότι η χρήση των ειδικών αναστολέων του υποδοχέα του PAF καταργεί πλήρως τη βιολογική τους δραστηριότητα^{280,376,377}. Έτσι, το γεγονός ότι τα οξειδωμένα φωσφολιπίδια δρουν διαμέσου του υποδοχέα του PAF, καθώς και η ικανότητά τους να αναπαράγουν τις δράσεις αυτού του φλεγμονώδους διαβιβαστή οδήγησε στο χαρακτηρισμό τους ως λιπίδια που μοιάζουν με τον PAF (PAF-like lipids)^{280,376,378}. Τέτοια λιπίδια παράγονται κατά την οξείδωση όλων των λιποπρωτεϊνών που περιέχουν απολιποπρωτεΐνη Β³⁰⁶, καθώς και κατά την οξείδωση των λιπιδίων των κυτταρικών μεμβρανών³⁷⁹. Πρόσφατες μελέτες επιβεβαίωσαν την *in vivo* παρουσία τους στο πλάσμα³⁸⁰, καθώς και στις αθηρωματικές πλάκες πειραματόζων με γενετική προδιάθεση για την εμφάνιση αθηρωμάτωσης³⁸¹.

Η αυστηρή εκλεκτικότητα του υποδοχέα του PAF για την ακετυλομάδα στη θέση 2 του μορίου, καθώς και η ικανότητα της PAF-AH του πλάσματος να υδρολύει αυτά τα οξειδωμένα φωσφολιπίδια καταστρέφοντας τη βιολογική τους δραστηριότητα³⁷⁶ οδήγησε στην υπόθεση ότι τα φωσφολιπίδια αυτά έχουν βραχείες ή οξειδωμένες αλυσίδες λιπαρών οξέων εστεροποιημένες στη θέση 2. Πράγματι, η διερεύνηση της δομής αυτών των λιπιδίων με συνδυασμό υγρής χρωματογραφίας / φασματομετρίας μάζας (liquid chromatography / mass spectrometry) οδήγησε στην ταυτοποίηση των 1-παλμιτοϋλ-2-(5 οξοβαλερυλ) sn-γλυκερο-3-φωσφοχολίνη και 1-παλμιτοϋλ-2-(5 γλουταρυλ) sn-γλυκερο-3-φωσφοχολίνη ως των πιο δραστικών οξειδωμένων φωσφολιπιδίων³⁸¹. Ωστόσο, λίγο αργότερα, μια άλλη ερευνητική ομάδα διατύπωσε τη άποψη ότι τα φωσφολιπίδια με αιθερικό δεσμό στη θέση 1 διαθέτουν μεγαλύτερη δραστηριότητα έναντι αυτών που περιέχουν εστερικό δεσμό, προτείνοντας παράλληλα ότι τα C-4 ανάλογα του PAF (βουτενοϋλ και βουτανοϋλ) είναι τα οξειδωμένα φωσφολιπίδια με τη μεγαλύτερη βιολογική δραστηριότητα³⁸². Τα παράγωγα αυτά προέρχονται από την οξειδωτική τροποποίηση των σχετικά σπάνιων φωσφολιπιδίων που περιέχουν αιθερικό δεσμό στη θέση 1 και ένα πολυακόρεστο οξύ (π.χ. αραχιδονικό) στη θέση 2³⁸². Η μεγάλη σημασία των οξειδωμένων φωσφολιπιδίων στο σχηματισμό της αθηρωματικής πλάκας βασίζεται στο γεγονός ότι σε αντιδιαστολή με τον PAF, ο οποίος παράγεται και καταβολίζεται με αυστηρά ελεγχόμενο τρόπο, η παραγωγή αυτών των φωσφολιπιδίων είναι τελείως ανεξέλεγκτη. Κατά συνέπεια, ο μόνος τρόπος ελέγχου της βιολογικής δραστηριότητας αυτών των μορίων είναι η ενζυματική τους διάσπαση. Η θεωρία σύμφωνα με την οποία η PAF-AH του πλάσματος διαδραματίζει σημαντικό αντιαθηρογόνο ρόλο βασίζεται ακριβώς στην ικανότητά της να καταβολίζει τα οξειδωμένα φωσφολιπίδια και να μειώνει τις προαθηρογόνες δράσεις τους *in vitro*^{237,306,376,383}. Επιπρόσθετα, μελέτες έδειξαν ότι κατά την οξείδωση των LDL σωματιδίων σχηματίζεται σε αυτά αυθεντικός PAF³⁸⁴, ο οποίος επάγει τη φλεγμονώδη διεργασία και κατά συνέπεια το σχηματισμό της αθηρωματικής

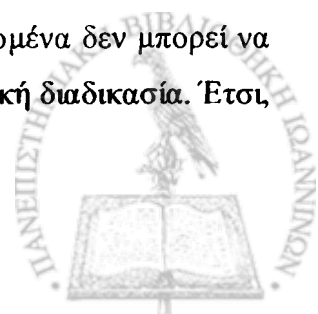


πλάκας³⁸⁵. Έτσι, η ικανότητα της PAF-AH να διασπά αυτό το φλεγμονώδη διαβίβαστη συμβάλλει περαιτέρω στον αντιαθηρογόνο ρόλο του ενζύμου.

Σε πλήρη πλήρη αντιδιαστολή με την παραπάνω θεώρηση βρίσκεται η άποψη ότι η PAF-AH του πλάσματος ευοδώνει την αθηρωματική διαδικασία. Η άποψη αυτή βασίζεται στην υπόθεση ότι τα προϊόντα της αντίδρασης που καταλύεται από το ένζυμο (δηλαδή η λυσοφωσφατιδυλχολίνη και τα οξειδωμένα λιπαρά οξέα) είναι πιο τοξικά από ότι τα οξειδωμένα φωσφολιπίδια και επάγουν το σχηματισμό της αθηρωματικής πλάκας. Πράγματι, μελέτες έδειξαν ότι η λυσοφωσφατιδυλχολίνη συμμετέχει στην αντιγονικότητα της ox-LDL³⁸⁶, προάγει τη σύνθεση αυξητικών παραγόντων από τα κύτταρα του αρτηριακού τοιχώματος³⁸⁷, δρα ως μιτογόνος παράγοντας για τα μακροφάγα και τα λεία μυϊκά κύτταρα³⁸⁸, επάγει τη σύνθεση προσκολλητικών μορίων από τα ενδοθηλιακά κύτταρα³⁸⁹, δρα χημειοτακτικά για τα μακροφάγα³⁶⁷ κ.α. Η θεώρηση ότι η λυσοφωσφατιδυλχολίνη ευθύνεται σε μεγάλο βαθμό για την ικανότητα της ox-LDL να επάγει την αθηρωματική διαδικασία υποστηρίζεται έμμεσα και από την παρατήρηση ότι τα κατεξοχήν αθηρογόνα μικρά πυκνά LDL σωματίδια περιέχουν σημαντικά μεγαλύτερες συγκεντρώσεις αυτού του μορίου σε σύγκριση με τα μεγαλύτερα και λιγότερο αθηρογόνα υποκλάσματα της LDL³⁹⁰. Ο μηχανισμός διαμέσου του οποίου η λυσοφωσφατιδυλχολίνη ασκεί τις βιολογικές δράσεις της δεν είναι γνωστός. Κάποιες από τις ιδιότητες του μορίου έχουν αποδοθεί στην ικανότητά του να συνδέεται και να ενεργοποιεί τον υποδοχέα του PAF^{391,392}. Ωστόσο, η σύνδεση αυτή της λυσοφωσφατιδυλχολίνης στον υποδοχέα του PAF (παρά το ότι το μόριο της εξαιτίας της έλλειψης της ακετυλομάδας στη θέση 2 δεν διαθέτει τα απαραίτητα δομικά χαρακτηριστικά για τη σύνδεση με αυτό τον υποδοχέα), σε συνδυασμό με την παρατήρηση ότι η PAF-AH καταστρέφει τη βιολογική δραστηριότητα του μορίου, οδήγησαν στη διατύπωση της άποψης ότι η λυσοφωσφατιδυλχολίνη δεν εμφανίζει σημαντική βιολογική δραστηριότητα και ότι η ικανότητά της να ευοδώνει τη φλεγμονώδη διαδικασία *in vitro* οφείλεται ουσιαστικά στην παρουσία προσμίξεων οξειδωμένων φωσφολιπιδίων κατά τη διαδικασία της απομόνωσης του μορίου³⁹³.

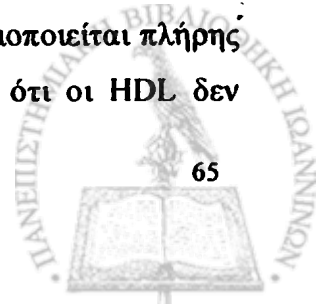
Το δεύτερο προϊόν της αντίδρασης που καταλύεται από την PAF-AH του πλάσματος είναι τα οξειδωμένα ελεύθερα λιπαρά οξέα. Αν και ο βιολογικός τους ρόλος δεν είναι καλά μελετημένος, τα μόρια αυτά μπορεί να επάγουν την αθηρωματική διαδικασία δρώντας χημειοτακτικά για τα μονοκύτταρα³⁹⁴ ή συμμετέχοντας στην τροποποίηση της απολιποπρωτεΐνης Β 100 της LDL κατά τρόπο που την καθιστά αναγνωρίσιμη από τους υποδοχείς καθαριστές των μακροφάγων³⁹⁵.

Από τα παραπάνω είναι προφανές ότι με τα μέχρι τώρα πειραματικά δεδομένα δεν μπορεί να καθορισθεί ο ακριβής ρόλος της PAF-AH του πλάσματος στην αθηρωματική διαδικασία. Έτσι,



τόσο ο αντιαθηρογόνο ρόλος του ενζύμου όσο και η ικανότητά του να επάγει την αθηρωματική διαδικασία διαμέσου του σχηματισμού τοξικών μεταβολιτών υποστηρίζονται από πληθώρα μελετών και μοιάζουν να είναι πέρα από κάθε αμφισβήτηση. Ωστόσο, η αδυναμία των *in vitro* μελετών να αναπαράγουν τις πραγματικές συνθήκες που επικρατούν στην αθηρωματική πλάκα και γενικότερα στο σύνολο του ανθρώπινου οργανισμού αποτελούν σημαντικούς περιοριστικούς παράγοντες για την εξαγωγή ασφαλών συμπερασμάτων. Για παράδειγμα, ο PAF και τα οξειδωμένα φωσφολιπίδια ασκούν τις βιολογικές δράσεις τους σε συγκεντρώσεις πολύ μικρότερες από ότι η λυσοφωσφατιδυλχολίνη, γεγονός που δεν μπορεί να αναπαραχθεί σε συνθήκες κυτταροκαλλιέργειας και που έμμεσα υποστηρίζει τον αντιαθηρογόνο ρόλο του ενζύμου. Επιπρόσθετα, η *in vivo* παρουσία μορίων, όπως η αλβουμίνη και η HDL, που μπορούν και δεσμεύουν τόσο τα οξειδωμένα φωσφολιπίδια όσο και τα προϊόντα της διασπάσής τους από την PAF-AH του πλάσματος²³⁵, καθιστά προβληματική την αναγωγή των αποτελεσμάτων των *in vitro* πειραμάτων στο σύνολο του ανθρώπινου οργανισμού.

Σε αντιδιαστολή με την PAF-AH του πλάσματος (ο όρος αντικατοπτρίζει κυρίως το ποσοστό της ενζυμικής ενεργότητας που βρίσκεται συνδεδεμένο στις λιποπρωτεΐνες που περιέχουν απολιποπρωτεΐνη Β) της οποίας ο ρόλος στην αθηρωματική διαδικασία δεν είναι γνωστός με ακρίβεια, η PAF-AH των HDL διαθέτει σημαντικές αντιαθηρογόνες ιδιότητες και προστατεύει από την εμφάνιση καρδιαγγειακής νόσου. Έτσι, αν και ποσοτικά η ενεργότητα των HDL σωματιδίων αποτελεί μικρό μόνο ποσοστό της συνολικής ενεργότητας του πλάσματος³⁰⁵, μελέτες έδειξαν ότι η ικανότητα της HDL να προστατεύει την LDL από την οξείδωση²³⁵, καθώς και να μειώνει τη βιολογική δραστηριότητα της ήδη οξειδωμένης LDL²³⁷ οφείλεται σε πολύ μεγάλο βαθμό στην ιδιότητά της να υδρολύει τον PAF και τα οξειδωμένα φωσφολιπίδια. Επιπρόσθετα, πειράματα σε διαγονιδιακά ποντίκια με γενετική προδιάθεση για την εμφάνιση αθηρωμάτωσης έδειξαν ότι η υπερέκφραση του γονιδίου της PAF-AH οδηγεί σε αύξηση της ενεργότητας του ενζύμου των HDL, η οποία συνοδεύεται από μείωση της προσκόλλησης των μακροφάγων στο αγγειακό τοίχωμα, καθώς και από σημαντική μείωση του αριθμού των αθηρωματικών βλαβών^{396,397}. Πρέπει ωστόσο να σημειωθεί ότι ο όρος PAF-AH των HDL περιλαμβάνει δυνητικά τρία διαφορετικά ένζυμα, τα οποία έχουν την ικανότητα να υδρολύουν τον PAF και τα οξειδωμένα φωσφολιπίδια *in vitro*: την παραοξονάση-Ι (PON-1)³¹⁵, την λεκιθινο-χοληστερολ-ακυλοτρανσφεράση (LCAT)^{398,399} και τέλος την ίδια την PAF-AH. Η συνεισφορά του καθενός από αυτά τα ένζυμα στην διάσπαση των οξειδωμένων φωσφολιπιδίων τόσο σε *in vivo* συνθήκες όσο και στα *in vitro* πειράματα στα οποία χρησιμοποιείται πλήρης απομονωμένη HDL δεν είναι γνωστή. Πρόσφατα διατυπώθηκε η άποψη ότι οι HDL δεν



περιέχουν πραγματική PAF-AH και ότι η ικανότητά τους να υδρολύουν τον PAF οφείλεται αποκλειστικά στην PON-1³¹⁵. Η θεώρηση αυτή υποστηρίζεται έμμεσα και από δεδομένα σύμφωνα με τα οποία οι πολυμορφισμοί της PON-1 επηρεάζουν σημαντικά την υδρολυτική ικανότητα των HDL κατά του PAF⁴⁰⁰. Σε πλήρη αντιδιαστολή με τα παραπάνω δεδομένα βρίσκεται η πρόσφατη μελέτη του Marathe και των συνεργατών του σύμφωνα με την οποία η PON-1 δεν έχει ιδιότητες ακετυλοϋδρολάσης του PAF και ότι η ικανότητά της να υδρολύει αυτό το φλεγμονώδη διαβιβαστή οφείλεται σε πειραματικό σφάλμα και συγκεκριμένα στην παρουσία προσμίξεων PAF-AH κατά την πειραματική απομόνωση της PON-1⁴⁰¹. Υπέρ αυτής της άποψης συνηγορεί το γεγονός ότι διαγονιδιακά ποντίκια τα οποία έχουν υποστεί καταστροφή του γονιδίου της PON-1 εμφανίζουν φυσιολογική ενεργότητα PAF-AH στις HDL⁴⁰². Η πιο πειστική όμως απόδειξη της παραπάνω θεωρίας προέρχεται από Ιάπωνες ασθενείς ομόζυγους για τη μετάλλαξη Val²⁷⁹→Phe, η οποία προκαλεί πλήρη εξάλειψη της ενεργότητας της PAF-AH τόσο στο πλάσμα όσο και στις HDL. Συγκεκριμένα, τα HDL σωματίδια αυτών των ασθενών, αν και έχουν φυσιολογική ενεργότητα της PON-1, δεν έχουν καμία υδρολυτική δράση τόσο κατά του PAF όσο και κατά των οξειδωμένων φωσφολιπιδίων⁴⁰¹.

Αν και ο αντιαθηρογόνος ρόλος της PAF-AH των HDL είναι σαφώς καθορισμένος, λίγα είναι γνωστά για την παθοφυσιολογία του ενζύμου που βρίσκεται συνδεδεμένο με αυτά τα σωματίδια. Αν και η κυτταρική πηγή προέλευσης της PAF-AH των HDL δεν είναι γνωστή, πιθανολογείται ότι τα μακροφάγα διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην παραγωγή του ενζύμου. Πρόσφατες μελέτες σε διαγονιδιακά ποντίκια έδειξαν ότι η υπερέκφραση του γονιδίου της απολιποπρωτεΐνης AI προκαλεί σημαντική αύξηση της ενεργότητας του ενζύμου των HDL⁴⁰³, χωρίς ωστόσο να έχουν επισημανθεί οι υπεύθυνοι μηχανισμοί για αυτό το φαινόμενο. Αντίθετα, κατά τη διάρκεια των αντιδράσεων οξείας φάσης, στην οποία σύμφωνα με ορισμένους ερευνητές τα αντιαθηρογόνα HDL σωματίδια μετατρέπονται σε σωματίδια που ευοδώνουν την αθηρωματική διαδικασία, παρατηρείται σημαντική μείωση της ενεργότητας της PAF-AH των HDL, η οποία συνοδεύεται από αντίστοιχη μείωση της ικανότητας των HDL να προστατεύουν την LDL από την οξείδωση²³⁸. Μια σημαντική παρατήρηση όσον αφορά τη ρύθμιση των επιπέδων της PAF-AH των HDL είναι ότι η γλυκοζυλιωμένη μορφή του ενζύμου συνδέεται αποκλειστικά με τα LDL σωματίδια, ενώ αντίθετα η ενζυμική απομάκρυνση των υδατανθρακικών αλυσίδων από το μόριο του ενζύμου αποκαθιστά την ικανότητά του να συνδέεται με τις HDL²⁹². Η μελλοντική ταυτοποίηση των μηχανισμών που οδηγούν στην παραγωγή της γλυκοζυλιωμένης ή μη μορφής του ενζύμου από τα μακροφάγα θα βοηθήσει



σημαντικά στην κατανόηση της κατανομής του ενζύμου μεταξύ των λιποπρωτεϊνικών σωματιδίων.

Οι διαφορές στη βιολογική συμπεριφορά του ενζύμου των HDL σε σύγκριση με το ένζυμο των λιποπρωτεϊνών που περιέχουν απολιποπρωτεΐνη Β (αν υποθεθεί ότι το τελευταίο διαδραματίζει ευοδωτικό ρόλο στη διαδικασία της αθηρωμάτωσης) δεν μπορούν να εξηγηθούν με ευκολία. Αν και οι διαφορές στο μικροπεριβάλλον των σωματιδίων μπορούν θεωρητικά να ευθύνονται για αντίστοιχες διαφορές στις ιδιότητες του ενζύμου, πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι η σύνδεση της PAF-AH με τις λιποπρωτεΐνες δεν μεταβάλλει σημαντικά τις ιδιότητες της. Ωστόσο, η παρουσία στα HDL σωματίδια δύο άλλων ενζύμων (PON-1 και LCAT) που μπορεί να συμμετέχουν στο μεταβολισμό των οξειδωμένων φωσφολιπιδίων ή των προϊόντων της διάσπασης τους από την PAF-AH, καθώς και η δυνατότητα απομάκρυνσης των τοξικών αυτών προϊόντων από τις HDL διαμέσου της διάχυσης τους στο πλάσμα ή της σύνδεσής τους σε μόρια όπως η αλβουμίνη, μπορεί να συμβάλλουν σημαντικά στην τελική διαμόρφωση της αντιαθηρογόνου δράσης του ενζύμου των HDL σωματιδίων.

Ο ρόλος της PAF-AH στην αθηρωματική διαδικασία: κλινικές μελέτες

Ο σημαντικός παθοφυσιολογικός ρόλος της PAF-AH του πλάσματος στα πειραματικά μοντέλα της αθηρωμάτωσης οδήγησε στο σχεδιασμό κλινικών δοκιμών, οι οποίες είχαν ως στόχο να αποσαφηνίσουν το ρόλο του ενζύμου στην παθογένεια της καρδιαγγειακής νόσου στον άνθρωπο. Μελέτες σε υγιή άτομα έδειξαν ότι η ενεργότητα της PAF-AH του πλάσματος αυξάνεται προοδευτικά με την πάροδο της ηλικίας και ότι οι άνδρες εμφανίζουν σημαντικά υψηλότερη ενεργότητα του ενζύμου σε σύγκριση με τις γυναίκες της ίδιας ηλικιακής ομάδας^{404,405}. Αυτές οι διαφορές μεταξύ των δύο φύλων, οι οποίες αποδίδονται στην κατασταλτική επίδραση των οιστρογόνων στην παραγωγή του ενζύμου³³⁴, τείνουν να εξαλειφθούν μετά την ηλικία των 50 ετών και έτσι οι μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες εμφανίζουν παραπλήσια ενζυμική ενεργότητα με τους άνδρες της ίδιας ηλικίας^{404,405}. Η PAF-AH του πλάσματος συσχετίζεται με τα επίπεδα των λιπιδαιμικών παραμέτρων. Έτσι, στις περισσότερες μελέτες η ενεργότητα του ενζύμου στο πλάσμα παρουσίασε θετική συσχέτιση με τα επίπεδα της ολικής και LDL χοληστερόλης, καθώς και με τις συγκεντρώσεις της απολιποπρωτεΐνης Β^{353,405-407}. Αντίθετα, η θετική συσχέτιση με τα επίπεδα των τριγλυκεριδίων και η αρνητική συσχέτιση της PAF-AH με τις τιμές της HDL χοληστερόλης που παρατηρήθηκαν σε ορισμένες μελέτες⁴⁰⁶ δεν αποτελούν σταθερό εύρημα. Οι παράγοντες που συμβάλλουν στη διαμόρφωση των επιπέδων της PAF-AH in vivo δεν είναι γνωστοί με ακρίβεια. Ωστόσο, η σύγκριση των ενζυμικών

ενεργιοτήτων των παιδιών με αυτές των γονέων τους σε μια μελέτη στην οποία συμμετείχαν 60 οικογένειες έδειξε ότι το 60% της διακύμανσης της ενεργότητας της PAF-AH που παρατηρείται σε υγιή άτομα (inter-individual variation) οφείλεται σε γενετικούς παράγοντες³⁵³. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της ίδιας μελέτης, οι κληρονομικοί παράγοντες οι οποίοι καθορίζουν την ενεργότητα του ενζύμου του πλάσματος είναι τελείως ανεξάρτητοι από αυτούς που καθορίζουν τα επίπεδα της LDL χοληστερόλης. Τέλος, στη διαμόρφωση της ενεργότητας της PAF-AH του πλάσματος συμβάλλει σημαντικά και ο ρυθμός απομάκρυνσης του ενζύμου από την κυκλοφορία, ο οποίος εξαρτάται σε πολύ μεγάλο βαθμό από την ταχύτητα της μεταβολικής κάθαρσης των LDL σωματιδίων³⁵³. Αυτή η υπόθεση υποστηρίζεται από το γεγονός ότι οι ασθενείς με διαταραχές του μεταβολισμού των λιπιδίων που χαρακτηρίζονται από μείωση της κάθαρσης των LDL (οικογενής υπερχοληστερολαιμία) παρουσιάζουν σημαντικά υψηλότερη ενεργότητα της PAF-AH στο πλάσμα σε σύγκριση με υγιείς μάρτυρες³⁹⁰, καθώς επίσης και από την παρατήρηση ότι το ένζυμο συσχετίζεται εκλεκτικά με τα μικρά πυκνά LDL σωματίδια³⁰⁸ τα οποία παρουσιάζουν μειωμένη συγγένεια για τους LDL υποδοχείς και κατά συνέπεια μεγαλύτερο χρόνο παραμονής στην κυκλοφορία⁴⁰⁸.

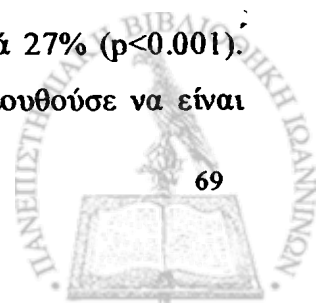
Οι κλινικές δοκιμές οι οποίες εξέτασαν το ρόλο της PAF-AH του πλάσματος στην παθογένεια της καρδιαγγειακής νόσου δεν κατέληξαν σε σαφή και σταθερά συμπεράσματα. Έτσι, κάποιες μελέτες έδειξαν ότι οι ασθενείς με παράγοντες κινδύνου για την εμφάνιση καρδιαγγειακής νόσου [υπέρταση⁴⁰⁹, οικογενή υπερχοληστερολαιμία³⁹⁰], καθώς και οι ασθενείς με ήδη εγκατεστημένη στεφανιαία νόσο^{406,410,411} ή ισοδύναμα στεφανιαίας νόσου [αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο⁴¹², περιφερική αρτηριοπάθεια⁴¹³ ή σακχαρώδη διαβήτη⁴¹⁴] εμφανίζουν σημαντικά υψηλότερη ενεργότητα της PAF-AH στο πλάσμα σε σύγκριση με υγιή άτομα της ίδιας ηλικίας και φύλου, ένα εύρημα που ενισχύει το ρόλο του ενζύμου στη διαδικασία της αθηρωμάτωσης. Αντίθετα, άλλες μελέτες απέτυχαν να αναδείξουν διαφορές μεταξύ των ασθενών και των υγιών μαρτύρων⁴¹⁵. Τέλος μελέτες στον ιαπωνικό πληθυσμό έδειξαν ότι η ελάττωση της ενεργότητας της PAF-AH εξαιτίας της μετάλλαξης Val²⁷⁹→Phe αποτελεί ανεξάρτητο παράγοντα κινδύνου για την εμφάνιση ισχαιμικής καρδιοπάθειας⁴¹⁶, αγγειακού εγκεφαλικού επεισοδίου^{233,417}, καθώς και για την απόφραξη των μηροϊγνυακών μοσχευμάτων που τοποθετήθηκαν σε ασθενείς με περιφερική αρτηριακή νόσο⁴¹⁸, εύρημα που υποστηρίζει τον αντιαθηρογόνο ρόλο του ενζύμου. Οι διαφορές στο σχεδιασμό, τη μεθοδολογία και τα κριτήρια επιλογής των ασθενών και των μαρτύρων σε αυτές τις μελέτες καθιστά αδύνατη τη μεταξύ τους σύγκριση, καθώς και την εξαγωγή ασφαλών συμπερασμάτων. Ωστόσο, οι διαφορές μεταξύ των αποτελεσμάτων των μελετών που υποστηρίζουν τον ευοδωτικό ρόλο της PAF-AH του πλάσματος στην αθηρωματική



διαδικασία και αυτών στον Ιαπωνικό πληθυσμό που έδειξαν ότι η μετάλλαξη Val²⁷⁹→Phe αποτελεί ανεξάρτητο παράγοντα κινδύνου για την εμφάνιση καρδιαγγειακής νόσου μπορούν ενδεχόμενα να εξηγηθούν από το γεγονός ότι η μετάλλαξη αυτή επηρεάζει και την ενζυμική ενεργότητα των HDL⁴⁰¹. Έτσι, ο αυξημένος καρδιαγγειακός κίνδυνος που συνοδεύει αυτή τη μετάλλαξη μπορεί να οφείλεται στη μείωση της ενεργότητας του αντιαθηρογόνου ενζύμου των HDL και όχι στις μεταβολές του ενζύμου του πλάσματος (το οποίο στην πραγματικότητα μπορεί να διαδραματίζει ευοδωτικό ρόλο στη διαδικασία της αθηρωμάτωσης)³⁵¹. Τέλος, πρέπει να αναφερθεί ότι σημαντικό πρόβλημα στην αξιολόγηση αυτών των μελετών αποτελεί ο αναδρομικός τους χαρακτήρας, ο οποίος εμποδίζει την ανάδειξη οποιασδήποτε αιτιολογικής συσχέτισης μεταξύ των επιπέδων του ενζύμου στο πλάσμα και του κινδύνου εμφάνισης καρδιαγγειακής νόσου.

Σύγχυση προέκυψε επίσης και από τα αποτελέσματα των μελετών οι οποίες εξέτασαν τα επίπεδα της PAF-AH κατά τη διάρκεια οξέων καρδιαγγειακών συμβαμάτων. Έτσι σε άλλες μελέτες παρατηρήθηκε ελλειψωμένη ενζυμική ενεργότητα στους ασθενείς σε σύγκριση με τους υγιείς μάρτυρες⁴¹⁹, ενώ αντίθετα κάποιες μελέτες έδειξαν διαφορές μόνο στην ενεργότητα του ενζύμου των HDL και όχι στη συνολική ενεργότητα της PAF-AH στο πλάσμα⁴²⁰. Ωστόσο, οι δυσκολίες στον ακριβή χαρακτηρισμό των οξέων στεφανιαίων συνδρόμων, καθώς και οι σημαντικές ποιοτικές και ποσοτικές διαταραχές των λιποπρωτεϊνών που συνοδεύουν αυτά τα σύνδρομα και οι οποίες ενδεχόμενα επηρεάζουν την ενεργότητα της PAF-AH, καθιστούν την ερμηνεία των αποτελεσμάτων αυτών των μελετών εξαιρετικά δύσκολη.

Τέλος, πρέπει να επισημανθεί ότι υπάρχουν δύο μεγάλες προοπτικές, τυχαιοποιημένες, διπλές-τυφλές μελέτες, οι οποίες εξέτασαν το ρόλο της PAF-AH του πλάσματος στην αθηρωματική διαδικασία. Η πρώτη από αυτές αφορούσε έναν υποπληθυσμό της μελέτης WOSCOPS (West of Scotland Coronary Prevention Study). Στην υπομελέτη αυτή συμπεριλήφθησαν συνολικά 508 άνδρες, οι οποίοι εμφάνισαν καρδιαγγειακά συμβάματα κατά τη διάρκεια της αρχικής μελέτης, καθώς και 1160 άνδρες με παρόμοια δημογραφικά χαρακτηριστικά οι οποίοι δεν εμφάνισαν καρδιαγγειακή νόσο⁴²¹. Σκοπός της μελέτης ήταν η αξιολόγηση της προγνωστικής σημασίας των δεικτών της φλεγμονής για την εμφάνιση καρδιαγγειακών συμβαμάτων. Η μονοπαραγοντική ανάλυση των δεδομένων έδειξε ότι η μάζα (και κατά συνέπεια η ενεργότητα) της PAF-AH του πλάσματος αποτελεί ανεξάρτητο παράγοντα κινδύνου για την εμφάνιση καρδιαγγειακής νόσου. Συγκεκριμένα, η αύξηση της μάζας του ενζύμου κατά μία σταθερή απόκλιση συνοδεύονταν από αύξηση του κινδύνου για την εμφάνιση καρδιαγγειακών συμβαμάτων κατά 27% ($p < 0.001$). Επιπρόσθετα, η προγνωστική σημασία των επιπέδων της PAF-AH εξακολουθούσε να είναι



σημαντική, ακόμα και όταν συμπεριλαμβάνονταν στο πολυπαραγοντικό μοντέλο ανάλυσης και άλλοι κλασσικοί παράγοντες κινδύνου, όπως η ηλικία, η αρτηριακή πίεση, τα επίπεδα των λιπιδαιμικών παραμέτρων, καθώς οι τιμές των δεικτών της φλεγμονής (C-αντιδρώσα πρωτεΐνη, ινωδογόνο και αριθμός των λευκών αιμοσφαιρίων). Στην πολυπαραγοντική ανάλυση, η αύξηση της μάζας του ενζύμου κατά μία σταθερή απόκλιση είχε σαν αποτέλεσμα την αύξηση του σχετικού κινδύνου για την εμφάνιση καρδιαγγειακής νόσου κατά 18% ($p < 0.005$)⁴²¹.

Η δεύτερη προοπτική μελέτη, η οποία εξέτασε την προγνωστική σημασία των επιπέδων της PAF-AH για την εμφάνιση καρδιαγγειακής νόσου (Womens' Health Study) αφορούσε 28.263 υγιείς γυναίκες μέσης ηλικίας και η μέση παρακολούθηση ήταν 3 έτη⁴²². Αν και οι γυναίκες οι οποίες εμφάνισαν καρδιαγγειακά συμβάματα κατά τη διάρκεια της παρακολούθησης είχαν σημαντικά υψηλότερη ενεργότητα της PAF-AH στο πλάσμα κατά την έναρξη της μελέτης σε σύγκριση με τις γυναίκες που δεν εμφάνισαν παρόμοια επεισόδια, η πολυπαραγοντική ανάλυση των δεδομένων έδειξε ότι η PAF-AH του πλάσματος δεν αποτελεί ανεξάρτητο παράγοντα κινδύνου για την εμφάνιση καρδιαγγειακής νόσου⁴²².

Αν και οι διαφορές στους πληθυσμούς των δύο παραπάνω μελετών είναι προφανείς, οι διαφορές στα αποτελέσματά τους αναφορικά με τον προγνωστικό και ενδεχόμενα παθογενετικό ρόλο της PAF-AH του πλάσματος στην εμφάνιση καρδιαγγειακών συμβαμάτων δεν είναι εύκολο να εξηγηθούν. Με βάση τα παραπάνω είναι προφανές ότι απαιτούνται περισσότερες προοπτικές μελέτες προκειμένου να αποσαφηνισθεί η συμβολή του ενζύμου του πλάσματος στην παθογένεια της αθηρωματικής νόσου.

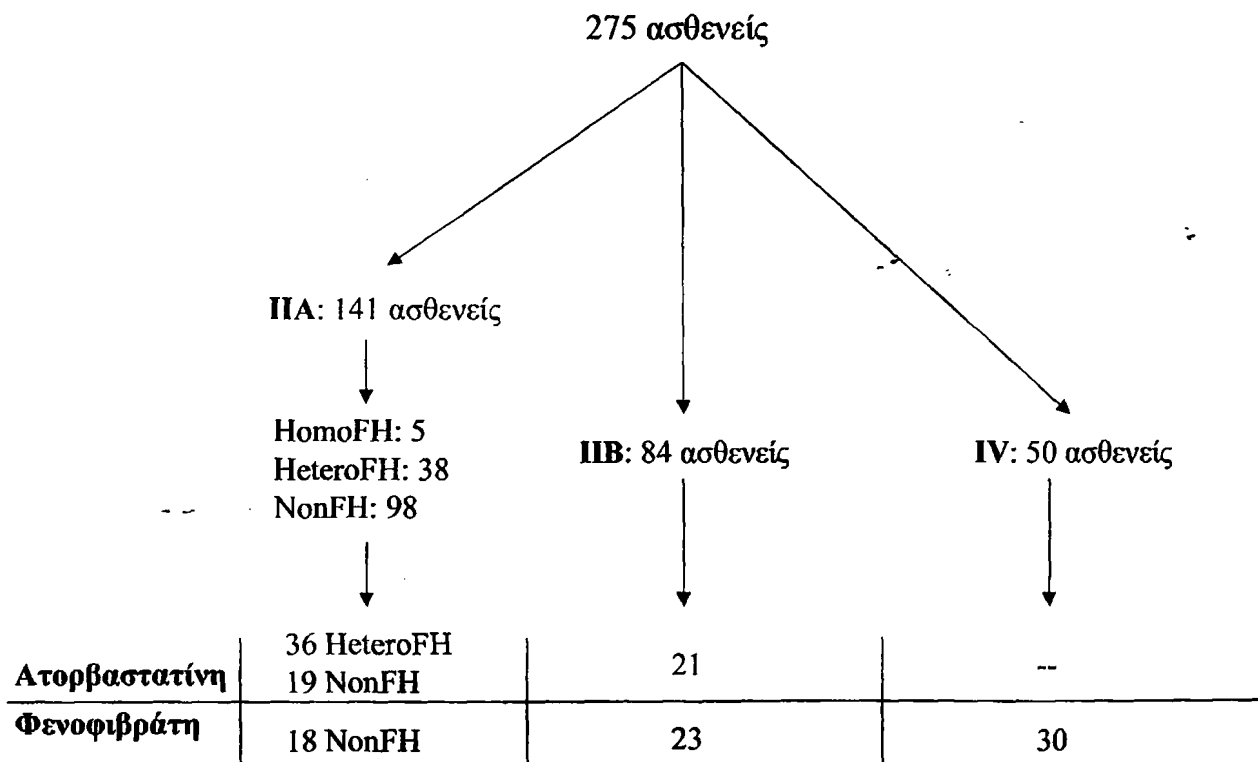


VI. ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

VI.1 Ασθενείς της μελέτης

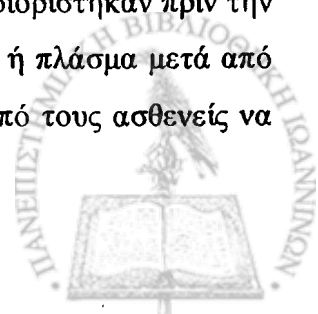
Στη μελέτη συμμετείχαν συνολικά 275 ασθενείς με πρωτοπαθή δυσλιπιδαιμία οι οποίοι παρακολουθούνταν στο Εξωτερικό Ιατρείο Λιπιδίων του Περιφερειακού Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων. Η στρατολόγηση και ένταξή τους στη μελέτη διήρκεσε συνολικά περίπου 3 χρόνια (1998-2001). Τα δευτεροπαθή αίτια δυσλιπιδαιμίας (σακχαρώδης διαβήτης, υποθυρεοειδισμός, νεφρική ή ηπατική νόσος, αλκοολισμός κ.α) αποκλείστηκαν με βάση το ιστορικό, τη φυσική εξέταση και τον κατάλληλο εργαστηριακό έλεγχο. Από τη μελέτη αποκλείστηκαν επίσης οι ασθενείς οι οποίοι έπαιρναν φάρμακα τα οποία επηρεάζουν το μεταβολισμό των λιποπρωτεϊνών (διουρητικά, β-αποκλειστές, υπολιπιδαιμικά φάρμακα, ορμόνες κ.α). Κανένας ασθενής δεν ήταν υπερτασικός (ΑΠ > 140/90 mmHg σε διαδοχικές μετρήσεις). Επιπρόσθετα, κανένας ασθενής δεν παρουσίαζε κλινικά, εργαστηριακά ή ηλεκτροκαρδιογραφικά ευρήματα στεφανιαίας νόσου. Μετά τον αρχικό έλεγχο και την ένταξή τους στη μελέτη όλοι οι ασθενείς τέθηκαν σε δίαιτα χαμηλή σε ολικό λίπος και χοληστερόλη (NCEP step 1 diet) για χρονικό διάστημα τουλάχιστο 3 μηνών. Στο τέλος αυτής της περιόδου όσοι ασθενείς εξακολουθούσαν να έχουν αυξημένες τιμές λιπιδίων εντάχθηκαν στη μελέτη. Ανάλογα με τα επίπεδα των λιπιδίων πριν την έναρξη της υπολιπιδαιμικής αγωγής οι ασθενείς χωρίστηκαν σε 3 ομάδες: την ομάδα των ασθενών με πρωτοπαθή υπερχοληστερολαιμία ή δυσλιπιδαιμία τύπου IIa (n=141), την ομάδα των ασθενών με μικτή δυσλιπιδαιμία ή δυσλιπιδαιμία τύπου IIb (n=84), καθώς και την ομάδα των ασθενών με πρωτοπαθή υπερτριγλυκεριδαμία ή δυσλιπιδαιμία τύπου IV (n=50). Επιπρόσθετα, οι ασθενείς με υπερλιπιδαιμία τύπου IIa χωρίστηκαν σε 3 ομάδες ανάλογα με το είδος της υποκείμενης διαταραχής του μεταβολισμού των λιπιδίων: την ομάδα των ασθενών με ομόζυγη οικογενή υπερχοληστερολαιμία (HomoFH, n=5), την ομάδα των ασθενών με ετερόζυγη οικογενή υπερχοληστερολαιμία (HeteroFH, n=38), καθώς και την ομάδα των ασθενών με πολυγονική υπερχοληστερολαιμία (NonFH, n=98). Η διάγνωση της οικογενούς υπερχοληστερολαιμίας έγινε σύμφωνα με τα πρόσφατα δημοσιευμένα κλινικά κριτήρια⁴²³ και επιβεβαιώθηκε με τον κατάλληλο γενετικό έλεγχο. Κανένας ασθενής με πρωτοπαθή μη οικογενή υπερχοληστερολαιμία δεν εμφάνισε τενόντια ξανθώματα ή οικογενειακό ιστορικό δυσλιπιδαιμίας. Επιπρόσθετα, η γενετική ανάλυση, η οποία περιέλαβε μελέτη της αλληλουχίας των βάσεων σε όλα τα εξόνια του LDL υποδοχέα, απέκλεισε τη διάγνωση της οικογενούς υπερχοληστερολαιμίας σε αυτούς τους ασθενείς. Με βάση τα αποτελέσματα του γενετικού ελέγχου όλοι οι ασθενείς με ομόζυγη

οικογενή υπερχοληστερολαμία (HomoFH, n=5) εμφάνισαν τη μετάλλαξη G(1775)A στο εξόνιο 12 του LDL υποδοχέα. Μεταξύ των ασθενών με ετερόζυγη οικογενή υπερχοληστερολαμία (HeteroFH, n=38) 11 εμφάνισαν τη μετάλλαξη G(1646)A στο εξόνιο 11, 8 τη μετάλλαξη G(1775)A στο εξόνιο 12, 7 τη μετάλλαξη C(858)A στο εξόνιο 6, 6 τη μετάλλαξη G(1285)A στο εξόνιο 9, 5 τη μετάλλαξη T(81)G στο εξόνιο 2 και τέλος 1 ασθενής εμφάνισε τη μετάλλαξη T(517)C στο εξόνιο 4 του LDL υποδοχέα. Για την εκτίμηση της επίδρασης των υπολιπιδαιμικών φαρμάκων στις ενεργότητες της PAF-AH οι ασθενείς έλαβαν ατορβαστατίνη (20 mg) ή φενοφιβράτη (200 mg) σε μία ημερήσια δόση πριν τη βραδινή κατάκλιση. Συνολικά ατορβαστατίνη έλαβαν 55 ασθενείς με δυσλιπιδαιμία τύπου ΙΙΑ (36 HeteroFH και 19 NonFH), καθώς και 21 ασθενείς με δυσλιπιδαιμία τύπου ΙΙΒ. Φενοφιβράτη έλαβαν 18 ασθενείς με δυσλιπιδαιμία τύπου ΙΙΑ (όλοι NonFH), 23 ασθενείς με δυσλιπιδαιμία τύπου ΙΙΒ και 30 ασθενείς με δυσλιπιδαιμία τύπου ΙV. Ο σχεδιασμός της μελέτης φαίνεται στην εικόνα 3.



Εικόνα 3. Σχεδιασμός της μελέτης

Τα επίπεδα των λιπιδίων και οι ενζυμικές ενεργότητες της PAF-AH προσδιορίστηκαν πριν την έναρξη της αγωγής καθώς και μετά από 16 εβδομάδες θεραπείας σε ορό ή πλάσμα μετά από ολονύχτια νηστεία 14 ωρών. Κατά τη διάρκεια της μελέτης ζητήθηκε από τους ασθενείς να



κρατήσουν σταθερές τις διαιτητικές τους συνήθειες (NCEP step 1 diet). Η πρόσληψη ολικού λίπους και χοληστερόλης αξιολογήθηκε δύο φορές κατά τη διάρκεια της μελέτης με τη βοήθεια ειδικού ερωτηματολογίου. Η συμμόρφωση στη θεραπεία εκτιμήθηκε επίσης με ειδικό ερωτηματολόγιο, καθώς και με καταμέτρηση των δισκίων του φαρμάκου σε κάθε επίσκεψη των ασθενών. Έ τέλος, οι ομάδες ελέγχου της μελέτης επιλέχθηκαν από μια ομάδα 150 υγιών νορμολιπιδαιμικών ατόμων έτσι ώστε τα δημογραφικά τους χαρακτηριστικά να ταιριάζουν με αυτά των ασθενών.

VI. 2 Μέθοδοι

Καταβύθιση των λιποπρωτεϊνών που περιέχουν απολιποπρωτεΐνη Β και παρασκευή πλάσματος πλούσιου σε HDL:

Αρχή της μεθόδου: η μέθοδος βασίζεται στο γεγονός ότι το αντιδραστήριο καταβύθισης, το οποίο περιέχει θειϊκή δεξτράνη και $MgCl_2$, σχηματίζει γρηγορότερα σύμπλοκα με τις λιποπρωτεΐνες που περιέχουν απολιποπρωτεΐνη Β σε σύγκριση με τις HDL. Έτσι, το πλήρες πλάσμα αφού επωασθεί για συγκεκριμένο χρονικό διάστημα με το αντιδραστήριο καταβύθισης, στη συνέχεια φυγοκεντρείται με αποτέλεσμα την εκλεκτική καταβύθιση των λιποπρωτεϊνών που περιέχουν απολιποπρωτεΐνη Β, ενώ οι HDL παραμένουν στο υπερκείμενο.

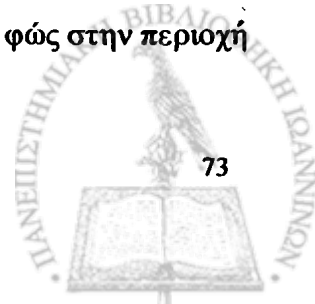
Υλικά και όργανα:

- φυγόκεντρος πάγκου (1500 rpm)
- αντιδραστήριο καταβύθισης (Sigma Diagnostics)

Πειραματική πορεία: 500 μl πλάσματος αναμιγνύονται με 50 μl αντιδραστηρίου καταβύθισης. Το διάλυμα που προκύπτει αναδεύεται ισχυρά με vortex και αφού επωασθεί για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου φυγοκεντρείται σε φυγόκεντρο πάγκου για 5 λεπτά στις 1500 rpm. Η φυγοκέντρηση οδηγεί σε καταβύθιση των λιποπρωτεϊνών που περιέχουν απολιποπρωτεΐνη Β και έτσι οι HDL απομονώνονται στο υπερκείμενο το οποίο αναρροφάται προσεκτικά με αυτόματη πιπέτα.

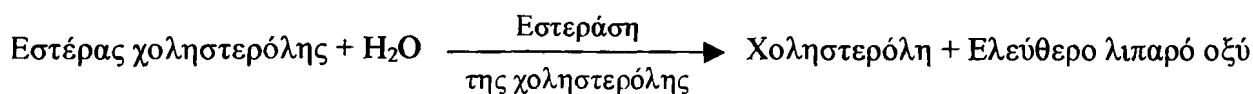
Ενζυμικός φωτομετρικός προσδιορισμός της ολικής χοληστερόλης:

Αρχή της μεθόδου: η μέθοδος στηρίζεται στην παραγωγή H_2O_2 μετά την επίδραση εξειδικευμένου οξειδωτικού ενζύμου (οξειδάση της χοληστερόλης). Το H_2O_2 παρουσία υπεροξειδάσης οξειδώνει τα παράγωγα της φαινόλης σε παράγωγα κινόνης, τα οποία εξαιτίας της παρουσίας συζυγών διπλών δεσμών είναι χρωμογόνα και απορροφούν το φως στην περιοχή

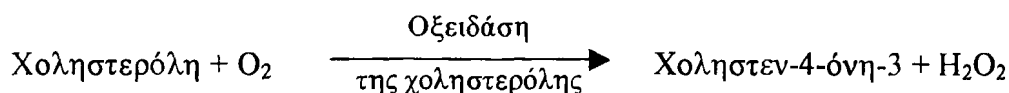


του ορατού φάσματος. Ο ενζυμικός φωτομετρικός προσδιορισμός της ολικής χοληστερόλης βασίζεται στην παρακάτω ακολουθία αντιδράσεων:

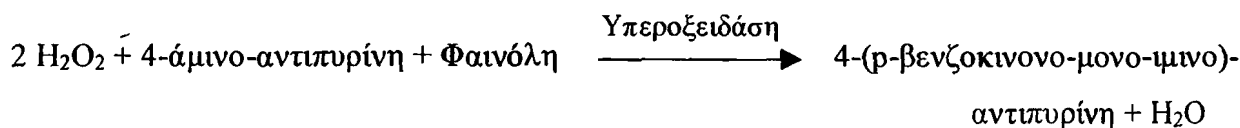
A) Υδρόλυση της εστεροποιημένης χοληστερόλης



B) Οξειδωση της χοληστερόλης



Γ) Αντίδραση δημιουργίας χρωμογόνου

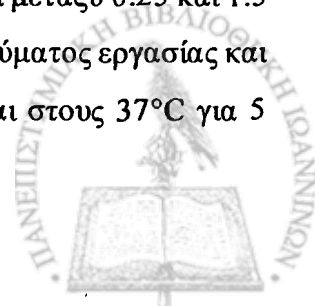


Υλικά και όργανα:

- Μετρητής Microelisa.
- Πλάκα αντίδρασης 96 θέσεων.
- Διάλυμα R1: περιέχει ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 0.1 mM pH 6.9, φαινόλη 15 mM και χολικό νάτριο 3.75 mM.
- Διάλυμα R2: περιέχει 4-άμινο-αντιπυρίνη 0.5 mM, χολικό νάτριο 2.5 mM, εστεράση της χοληστερόλης (>125 U/lit), οξειδάση της χοληστερόλης (>200 U/lit) και υπεροξειδάση (>1000 U/lit).
- Διάλυμα R3: πρότυπο διάλυμα χοληστερόλης 200 mg/ml.

Διάλυμα εργασίας: σχηματίζεται από την ανάμιξη συγκεκριμένου όγκου του αντιδραστηρίου R2 (kit) και 25 ml του αντιδραστηρίου R1. Το διάλυμα αναδεύεται ήπια σε θερμοκρασία δωματίου για 15 λεπτά. Διατηρείται στους 4 °C και είναι σταθερό για 3 μήνες περίπου.

Πειραματική πορεία: στην πλάκα αντίδρασης 96 θέσεων τοποθετούνται 10 μl από κάθε δείγμα. Παράλληλα σε ξεχωριστή στήλη της πλάκας τοποθετούνται τα πρότυπα διαλύματα χοληστερόλης (20 μl) τα οποία σχηματίζονται με την ανάμιξη κατάλληλων όγκων απεσταγμένου νερού και του διαλύματος R3 έτσι ώστε η συγκέντρωσή τους να κυμαίνεται μεταξύ 0.25 και 1.5 mg χοληστερόλης/ml. Στη συνέχεια στα δείγματα προστίθενται 200 μl διαλύματος εργασίας και η πλάκα, αφού ανακινηθεί ήπια, μεταφέρεται σε κλίβανο όπου επωάζεται στους 37°C για 5



λεπτά. Μετά την επώαση η πλάκα μεταφέρεται στο μετρητή microelisa όπου φωτομετρείται στα 492 nm. Στη συνέχεια, με βάση τις απορροφήσεις των προτύπων διαλυμάτων κατασκευάζεται σε ηλεκτρονικό υπολογιστή η πρότυπη καμπύλη συγκέντρωσης-απορρόφησης. Τέλος, με τη βοήθεια της εξίσωσης η οποία περιγράφει αυτή την καμπύλη γίνεται η αναγωγή της απορρόφησης των δειγμάτων σε συγκέντρωση χοληστερόλης.

Ενζυμικός φωτομετρικός προσδιορισμός της ελεύθερης χοληστερόλης: η μέθοδος είναι παρόμοια με αυτή του προσδιορισμού της ολικής χοληστερόλης (βλέπε παραπάνω) με τη διαφορά ότι παραλείπεται η υδρόλυση της εστεροποιημένης χοληστερόλης. Με αυτό τον τρόπο μόνο η ελεύθερη χοληστερόλη αντιδρά για το σχηματισμό H_2O_2 και την παραγωγή χρωμογόνου.

Προσδιορισμός της εστεροποιημένης χοληστερόλης: γίνεται υπολογιστικά με βάση τον τύπο:

$$\text{Εστέρες χοληστερόλης} = (\text{Ολική χοληστερόλη} - \text{Ελεύθερη χοληστερόλη}) * 1.67$$

Ο συντελεστής 1.67 αντιπροσωπεύει τη συνεισφορά των λιπαρών οξέων στη μάζα της εστεροποιημένης χοληστερόλης.

Προσδιορισμός της HDL χοληστερόλης: η μέθοδος είναι παρόμοια με τη μέθοδο που χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό της ολικής χοληστερόλης. Ωστόσο, σε αυτή την περίπτωση αντί για πλήρες πλάσμα χρησιμοποιείται πλάσμα πλούσιο σε HDL, το οποίο παρασκευάζεται με την καταβύθιση των λιποπρωτεϊνών που περιέχουν απολιποπρωτεΐνη Β.

Προσδιορισμός της LDL χοληστερόλης: γίνεται υπολογιστικά με τον τύπο του Friedewald⁴²⁴:

$$\text{LDL χοληστερόλη} = \text{Ολική χοληστερόλη} - \text{HDL χοληστερόλη} - (\text{Τριγλυκερίδια} / 5)$$

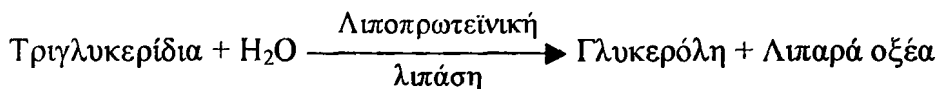
Σε αυτή την εξίσωση ο λόγος τριγλυκερίδια / 5 αντιπροσωπεύει τη χοληστερόλη των VLDL. Απαραίτητη προϋπόθεση για τη χρησιμοποίηση αυτού του τύπου είναι η συγκέντρωση των τριγλυκεριδίων να είναι μικρότερη από 400 mg/dl.

Ενζυμικός φωτομετρικός προσδιορισμός των τριγλυκεριδίων:

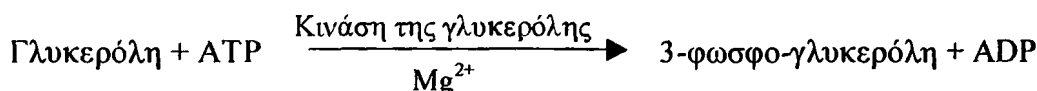
Αρχή της μεθόδου: βασίζεται στην παραγωγή H_2O_2 μετά την επίδραση εξειδικευμένου οξειδωτικού ενζύμου (οξειδάση της φωσφογλυκερόλης). Το H_2O_2 παρουσία υπεροξειδάσης οξειδώνει τα παράγωγα της φαινόλης σε παράγωγα κινόνης, τα οποία εξαιτίας της παρουσίας συζυγών διπλών δεσμών είναι χρωμογόνα και απορροφούν το φως στην περιοχή του ορατού

φάσματος. Ο ενζυμικός φωτομετρικός προσδιορισμός των τριγλυκεριδίων βασίζεται στην παρακάτω ακολουθία αντιδράσεων:

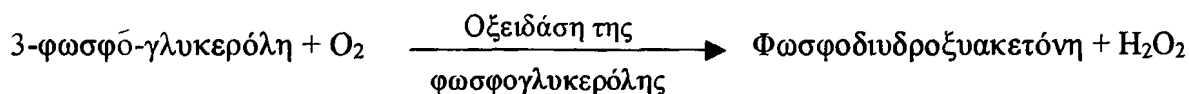
A) Υδρόλυση των τριγλυκεριδίων



B) Φωσφορυλίωση της γλυκερόλης



Γ) Οξειδωση της φωσφογλυκερόλης



Δ) Παραγωγή χρωμογόνου



Υλικά και όργανα:

- Μετρητής Microelisa.
- Πλάκα αντίδρασης 96 θέσεων.
- Διάλυμα R1: περιέχει γλυκερόλη 2.29 mM.
- Διάλυμα R2: διάλυμα tris base pH 7.6, παραχλωροφαινόλη 2.7 mM και μαγνήσιο 4 mM.
- Διάλυμα R3: περιέχει 4-αμινο-αντιπυρίνη 0.4 mM, λιπάση (>1000 U/l), κινάση της γλυκερόλης (>200 U/l), οξειδάση της φωσφογλυκερόλης (>2000 U/l), υπεροξειδάση (>200 U/l) και ATP 0.8 mM.
- Διάλυμα R4: πρότυπο διάλυμα τριγλυκεριδίων 200 mg/ml.

Διάλυμα εργασίας: σχηματίζεται από την ανάμιξη συγκεκριμένου όγκου του αντιδραστήριου R3 (kit) και 25 ml του αντιδραστήριου R2. Το διάλυμα αναδεύεται ήπια σε θερμοκρασία δωματίου για 15 λεπτά. Διατηρείται στους 4 °C και είναι σταθερό για 1 μήνα περίπου.

Πειραματική πορεία: στην πλάκα αντίδρασης 96 θέσεων τοποθετούνται 50 μl από κάθε δείγμα. Παράλληλα σε ξεχωριστή στήλη της πλάκας τοποθετούνται τα πρότυπα διαλύματα

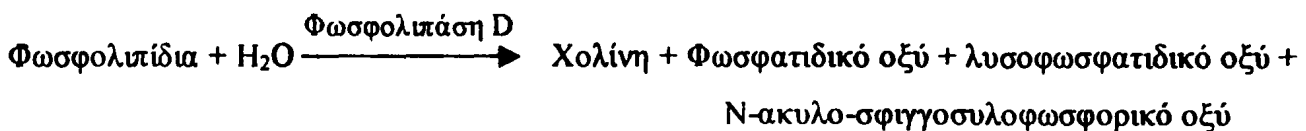


τριγλυκεριδίων (20 μ l) τα οποία σχηματίζονται με την ανάμιξη κατάλληλων όγκων απεσταγμένου νερού και του διαλύματος R4 έτσι ώστε η συγκέντρωσή τους να κυμαίνεται μεταξύ 0.25 και 1.5 mg τριγλυκεριδίων/ml. Στη συνέχεια στα δείγματα προστίθενται 200 μ l διαλύματος εργασίας και η πλάκα, αφού ανακινηθεί ήπια, μεταφέρεται σε κλίβανο όπου επωάζεται στους 37°C για 5 λεπτά. Μετά την επώαση η πλάκα μεταφέρεται στο μετρητή microelisa όπου φωτομετρείται στα 492 nm. Στη συνέχεια, με βάση τις απορροφήσεις των προτύπων διαλυμάτων κατασκευάζεται σε ηλεκτρονικό υπολογιστή η πρότυπη καμπύλη συγκέντρωσης-απορρόφησης. Τέλος, με τη βοήθεια της εξίσωσης η οποία περιγράφει αυτή την καμπύλη γίνεται η αναγωγή της απορρόφησης των δειγμάτων σε συγκέντρωση τριγλυκεριδίων.

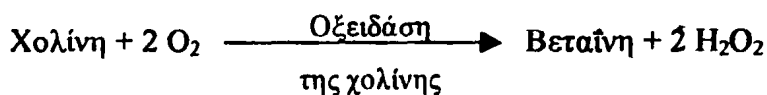
Ενζυμικός φωτομετρικός προσδιορισμός των φωσφολιπιδίων:

Αρχή της μεθόδου: τα φωσφολιπίδια υδρολύονται από τη φωσφολιπάση D και η παραγόμενη χολίνη υπολογίζεται ποσοτικά με βάση την αντίδραση Trinder. Ο ενζυμικός φωτομετρικός προσδιορισμός των φωσφολιπιδίων βασίζεται στην παρακάτω ακολουθία αντιδράσεων:

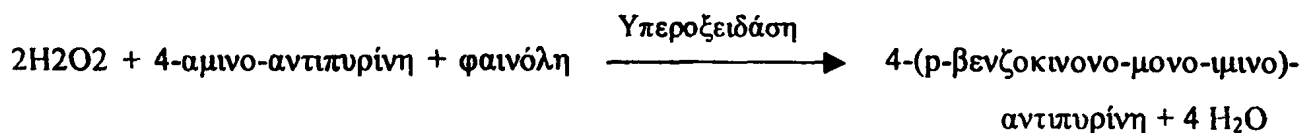
A) Υδρόλυση των φωσφολιπιδίων



B) Οξείδωση της χολίνης



Γ) Παραγωγή χρωμογόνου



Υλικά και όργανα:

- Μετρητής Microelisa.
- Πλάκα αντίδρασης 96 θέσεων.
- Διάλυμα R1: πρότυπο διάλυμα φωσφολιπιδίων 3.10 mg/ml.

- Διάλυμα R2: διάλυμα tris base pH 7.6, φαινόλη 10 mM και επιφανειοδραστική ουσία 3 mM.
- Διάλυμα R3: περιέχει 4-αμινο-αντιπυρίνη 0.5 mM, φωσφολιπάση D (>600 U/lit), οξειδάση της χολίνης (>2000 U/lit) και υπεροξειδάση (>1000 U/lit).

Διάλυμα εργασίας: σχηματίζεται με την ανάμιξη συγκεκριμένου όγκου διαλύματος R3 και 25 ml διαλύματος R2. Το διάλυμα αναδεύεται ήπια σε θερμοκρασία δωματίου για 15 λεπτά. Φυλάσσεται στους 4 °C και είναι σταθερό για 4 εβδομάδες περίπου.

Πειραματική πορεία: στην πλάκα αντίδρασης 96 θέσεων τοποθετούνται 10 μl από κάθε δείγμα. Παράλληλα σε ξεχωριστή στήλη της πλάκας τοποθετούνται τα πρότυπα διαλύματα φωσφολιπιδίων (20 μl) τα οποία σχηματίζονται με την ανάμιξη κατάλληλων όγκων απεσταγμένου νερού και του διαλύματος R1 έτσι ώστε η συγκέντρωσή τους να κυμαίνεται μεταξύ 0.3835 και 3.10 mg φωσφολιπιδίων/ml. Στη συνέχεια στα δείγματα προστίθενται 200 μl διαλύματος εργασίας και η πλάκα, αφού ανακινηθεί ήπια, μεταφέρεται σε κλίβανο όπου επωάζεται στους 37°C για 10 λεπτά. Μετά την επώαση η πλάκα μεταφέρεται στο μετρητή microelisa όπου φωτομετρείται στα 492 nm. Στη συνέχεια, με βάση τις απορροφήσεις των προτύπων διαλυμάτων κατασκευάζεται σε ηλεκτρονικό υπολογιστή η πρότυπη καμπύλη συγκέντρωσης-απορρόφησης. Τέλος, με τη βοήθεια της εξίσωσης η οποία περιγράφει αυτή την καμπύλη γίνεται η αναγωγή της απορρόφησης των δειγμάτων σε συγκέντρωση φωσφολιπιδίων.

Προσδιορισμός της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών με τη μέθοδο BCA:

Αρχή της μεθόδου: τα ιόντα του Cu^{2+} ανάγονται υπό την επίδραση των πρωτεϊνών σε αλκαλικό περιβάλλον σε ιόντα Cu^+ . Κάθε ιόν Cu^+ σχηματίζει έγχρωμο υδατοδιαλυτό σύμπλοκο με 2 μόρια δισιχρονικού οξέος, το οποίο απορροφά το φως στα 560 nm.

Υλικά και όργανα:

- Μετρητής Microelisa.
- Πλάκα αντίδρασης 96 θέσεων.
- Πρότυπο διάλυμα BSA 2 mg/ml σε NaCl 0.9% και NaN_3 0.05%.
- Αντιδραστήριο A: είναι μίγμα ανθρακικού νατρίου, διττανθρακικού νατρίου, δισιχρονικού οξέος και ταταρικού οξέος σε NaOH 0.2N.
- Αντιδραστήριο B: είναι διάλυμα CuSO_4 4%

Διάλυμα εργασίας: παρασκευάζεται αμέσως πριν τη χρήση του με την ανάμιξη των αντιδραστηρίων A και B σε αναλογία 50:1.



Πειραματική πορεία: στην πλάκα αντίδρασης 96 θέσεων τοποθετούνται 10 μl δείγματος. Παράλληλα σε ξεχωριστή στήλη της πλάκας τοποθετούνται τα πρότυπα διαλύματα BSA(20 μl) τα οποία σχηματίζονται με την ανάμιξη κατάλληλων όγκων απεσταγμένου νερού και BSA 2 mg/ml έτσι ώστε η συγκέντρωσή τους να κυμαίνεται μεταξύ 0.25 και 1.5 mg BSA/ml. Στη συνέχεια στα δείγματα προστίθενται 200 μl διαλύματος εργασίας και η πλάκα, αφού ανακινηθεί ήπια, μεταφέρεται σε κλίβανο όπου επωάζεται στους 37°C για 30 λεπτά. Μετά την επώαση η πλάκα μεταφέρεται στο μετρητή microelisa όπου φωτομετρείται στα 560 nm. Στη συνέχεια, με βάση τις απορροφήσεις των προτύπων διαλυμάτων κατασκευάζεται σε ηλεκτρονικό υπολογιστή η πρότυπη καμπύλη συγκέντρωσης-απορρόφησης. Τέλος, με τη βοήθεια της εξίσωσης η οποία περιγράφει αυτή την εξίσωση γίνεται η αναγωγή της απορρόφησης των δειγμάτων σε συγκέντρωση πρωτεΐνης.

Προσδιορισμός της συγκέντρωσης των απολιποπρωτεϊνών: ο προσδιορισμός των τιμών των απολιποπρωτεϊνών στο πλάσμα έγινε με ανοσονεφελομετρία σε νεφελόμετρο BN100 (Dade, Behring, Liederbach, Germany) χρησιμοποιώντας ειδικά αντισώματα για κάθε απολιποπρωτεΐνη. Οι συντελεστές διακύμανσης (CV) intra-assay και inter-assay της μεθόδου είναι 2.2% και 5.7% αντίστοιχα για την apoA1 και 1.9% και 2.4% αντίστοιχα για την apoB. Τέλος, η Lp(a) μετρήθηκε με ανοσοενζυμική μέθοδο (sandwich-ELISA assay, Macra Lp(a), Temuro Medical Corporation Diagnostic Division, Elktron, MD) με τη χρήση ενός μονοκλωνικού και ενός πολυκλωνικού αντισώματος [anti-apo(a)]. Στο πρώτο στάδιο το πρώτο μονοκλωνικό αντίσωμα (αντίσωμα επίστρωσης) το οποίο δεν παρουσιάζει διασταυρούμενη αντίδραση με το πλασμινογόνο συνδέεται με την περιοχή klinge IV της apo(a) και στη συνέχεια συνδέεται με την apo(a) το δεύτερο πολυκλωνικό αντίσωμα το οποίο δεν παρουσιάζει διασταυρούμενη αντίδραση με apo B-100. Οι συντελεστές διακύμανσης (CV) intra-assay και inter-assay της μεθόδου είναι μικρότεροι από 6% και 10.3% αντίστοιχα.

Προσδιορισμός της ενζυμικής ενεργότητας της PAF-AH:

Αρχή της μεθόδου: ο υπολογισμός της ενζυμικής ενεργότητας της PAF-AH βασίζεται στη μέτρηση των ραδιοσημασμένων οξικών ομάδων που απελευθερώνονται κατά την επίδραση του ενζύμου σε PAF, ο οποίος έχει προηγουμένως σημασθεί με ραδιενεργό τρίτιο στη θέση 2 του σκελετού της γλυκερόλης²¹⁵. Οι οξικές ομάδες παραμένουν στο υπερκείμενο, μετά την καταβύθιση με TCA του παραγόμενου lyso-PAF καθώς και του [³H]-PAF που δεν διασπάστηκε και η β ακτινοβολία που εκπέμπουν μετράται σε ειδικό μετρητή σπινθηρισμού. Τέλος, με τη

βοήθεια ειδικών μαθηματικών τύπων οι μετρούμενες κρούσεις μετατρέπονται σε ενζυμική ενεργότητα, η οποία εκφράζεται ως ο αριθμός των nmol του ραδιενέργου PAF που διασπάσθηκαν από το ένζυμο στη μονάδα του χρόνου από μια συγκεκριμένη ποσότητα δείγματος.

Υλικά και όργανα:

- PAF [(1-O-εξαδεκυλο-2-ακετυλο-sn-γλυκερο-3-φωσφοχολίνη, MB: 523.7 g/mol), Sigma]. Τα 25 mg σκόνης διαλύονται σε 2.387 ml αιθανόλης 80% δίνοντας διάλυμα 20 mM το οποίο διατηρείται στους -20°C.
- [³H]-PAF {(1-O-εξαδεκυλο-2-[³H]ακετυλο-sn-γλυκερο-3-φωσφοχολίνη, 0.25 mCi/0.5 ml, 10 Ci/mmol), DuPont New England Nuclear, Boston, MA, USA}.
- Υγρό σπινθηρισμού

Διαλύματα εργασίας:

- Ρυθμιστικό διάλυμα HEPES, pH 7.4: παρασκευάζεται με την ανάμιξη 4.2 mM (1.0009 g/l) HEPES, 137 mM (8.0063 g/l) NaCl, 2.6 mM (0.1939 g/l) KCl και 2 mM (0.7445 g/l) EDTA. Το pH ρυθμίζεται με τη βοήθεια pHμέτρου στο 7.4 και το διάλυμα φυλάσσεται στους 4°C
- BSA 2.5 mg/ml: 25 mg BSA διαλύονται σε 10 ml απεσταγμένου νερού. Το διάλυμα φυλάσσεται στους -20°C.
- BSA 100 mg/ml: 1 g BSA διαλύεται σε 10 ml απεσταγμένου νερού. Το διάλυμα φυλάσσεται στους -20°C.
- [³H]-PAF 100 μM. Σε πλαστικό σωληνάκι πομπροπυλενίου αναμιγνύονται 100 μl PAF 20 μM και 30 μl [³H]-PAF. Τα φωσfolιπίδια εξατμίζονται μέχρι ξηρού σε ρεύμα αζώτου και το διάλυμα αναδιασπείρεται σε 1 ml BSA 2.5 mg/ml. Το μίγμα αναδεύεται σε vortex και στη συνέχεια επωάζεται στους 37°C για 30 λεπτά. Το διάλυμα φυλάσσεται στους -20°C.
- TCA 20%: 20 g TCA διαλύονται σε 100 ml απεσταγμένου νερού. Το διάλυμα διατηρείται στους 4°C.

Πειραματική πορεία: για τη μέτρηση της ενεργότητας της PAF-AH χρησιμοποιούνται συνήθως 50 μl πλάσματος ή απομονωμένης HDL (αραιωμένα 1/50 v/v και 1/3 v/v, αντίστοιχα με HEPES pH 7.4). Για τη μέτρηση της ενζυμικής ενεργότητας των λιποπρωτεϊνικών υποκλασμάτων χρησιμοποιείται συνήθως τέτοιος όγκος δείγματος ώστε να περιέχει 4 μg πρωτεΐνης του υποκλάσματος. Σε κάθε περίπτωση τα δείγματα τοποθετούνται σε πλαστικό σωληνάκι erpendorf και ο όγκος συμπληρώνεται με HEPES pH 7.4 μέχρι τα 90 μl. Στη συνέχεια προστίθενται 10 μl



[³H]-PAF 100 μM και τα δείγματα, αφού αναδευτούν ήπια, τοποθετούνται σε υδατόλουτρο όπου επωάζονται για 10 λεπτά στους 37°C. Στο τέλος αυτού του χρονικού διαστήματος η αντίδραση της PAF-AH με το υπόστρωμα τερματίζεται με την προσθήκη 20 μl BSA 100 mg/ml (η οποία δεσμεύει την περίσσεια του PAF που δεν αντέδρασε, καθώς και τον lyso-PAF) και την τοποθέτηση των δειγμάτων, αφού αναδευτούν ισχυρά με vortex, σε πάγο για 12 λεπτά. Τέλος, αφού προστεθούν 80 μl TCA 20% τα δείγματα αναδεύονται και πάλι με vortex και τοποθετούνται σε πάγο για άλλα 30 λεπτά. Στη συνέχεια τα σωληνάκια φυγοκεντρώνονται σε μικροφυγόκεντρο για erpendorfs (5 λεπτά στις 10.000 στροφές) προκειμένου να καταβυθισθούν οι πρωτεΐνες. 100 μl από το υπερκείμενο που προκύπτει μετά την καταβύθιση τοποθετούνται σε ειδικό σωληνάκι μαζί με 2 ml υγρού σπινθηρισμού και αφού αναδευθούν ισχυρά μεταφέρονται στο μετρητή σπινθηρισμού για μέτρηση της β ακτινοβολίας που εκπέμπουν. Η ίδια πειραματική διαδικασία με αυτή που ακολουθείται στα προς μέτρηση δείγματα εφαρμόζεται και για δύο σωληνάκια τα οποία περιέχουν 90 μl Herpes. Ο μέσος όρος των κρούσεων που αποδίδουν αυτά τα σωληνάκια αντιστοιχεί στο τυφλό (δείγμα ελέγχου) της μέτρησης και χρησιμοποιείται κατά τη μετατροπή των κρούσεων των δειγμάτων σε ενζυμική ενεργότητα. Επιπρόσθετα, μαζί με τα δείγματα τοποθετούνται στο μετρητή σπινθηρισμού και δύο σωληνάκια τα οποία περιέχουν υγρό σπινθηρισμού, καθώς και 10 μl [³H]-PAF 100 μM. Το πηλίκο του μέσου όρου των κρούσεων που προέρχονται από αυτά τα σωληνάκια (standard) δια του αριθμού των nmol [³H]-PAF 100 μM που περιέχονται στο κάθε σωληνάκι αποτελούν την ειδική ενεργότητα (E.E) του διαλύματος του PAF, δηλαδή των αριθμό των κρούσεων που αποδίδει κάθε nmol [³H]-PAF 100 μM στις συγκεκριμένες πειραματικές συνθήκες. Η ενεργότητα της PAF-AH εκφράζεται ως nmol του ραδιενεργού PAF που διασπάται στη μονάδα του χρόνου (min) από μία δεδομένη ποσότητα δείγματος και υπολογίζεται από τον παρακάτω γενικό τύπο:

$$\text{Ενεργότητα PAF-AH} = 2 * (cpm_{\delta} - cpm_{\tau}) * 1000 / E.E * \alpha * \beta$$

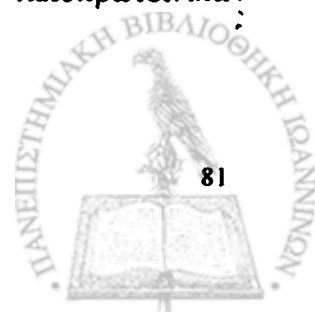
όπου: cpm_{δ} είναι οι κρούσεις που αποδίδουν τα 100 μl κάθε δείγματος

cpm_{τ} είναι οι κρούσεις που αποδίδουν τα 100 μl τυφλού

E.E είναι η ειδική ενεργότητα του διαλύματος του [³H]-PAF 100 μM (standard / 10)

α είναι ο χρόνος επώασης του δείγματος σε λεπτά

β είναι τα μl του πλάσματος και της HDL ή τα μg πρωτεΐνης των λιποπρωτεϊνικών υποκλασμάτων



Απομόνωση των λιποπρωτεϊνικών υποκλασμάτων με ισοπυκνική υπερφυγοκέντρωση βαθμίδωσης πυκνοτήτων (isopycnic density gradient ultracentrifugation):

Αρχή της μεθόδου: με την υπερφυγοκέντρωση επιτυγχάνεται η δημιουργία μιας συνεχούς βαθμίδωσης πυκνοτήτων. Με αυτό τον τρόπο οι λιποπρωτεΐνες διαχωρίζονται στα επιμέρους υποκλάσματά τους τα οποία κατανέμονται στο σωληνάκι της υπερφυγοκέντρου ανάλογα με την πυκνότητά τους.

Υλικά και όργανα:

- Πυκνόμετρο.
- Υπερφυγόκεντρος (Beckman L7 με ρότορα SW 41).
- Garamycin (Gentamycin sulfata, Schering Plough). Το διάλυμα περιέχει 40 mg θειικής γενταμικίνης ανά ml.
- KBr. Το KBr ξηραίνεται στους 100°C για 24 ώρες και διατηρείται σε ξηραντήρα.
- Μεμβράνη διαπίδυσης (Sigma). Η μεμβράνη έχει όριο αποκλεισμού μεγαλύτερο από 12.000 και ενεργοποιείται με τοποθέτηση σε απεσταγμένο νερό για 3 ώρες.
- Φίλτρα διήθησης 0.20 μ (Corning)

Διαλύματα εργασίας:

- EDTA 10%. Titriplex III, pH 7.0. 12.8247 g EDTANa₂·2H₂O διαλύονται σε 90 ml απεσταγμένο νερό. Το pH ρυθμίζεται στο 7.4 και ο όγκος συμπληρώνεται με απεσταγμένο νερό μέχρι τα 100 ml. Το διάλυμα διατηρείται στους 4°C.
- Διάλυμα NaCl 1.006 g/ml: 9 g NaCl, 0.4 g EDTA και 100 μl Garamycin διαλύονται σε 1 lt απεσταγμένου νερού. Το pH ρυθμίζεται στο 7.4 και το διάλυμα διηθείται υπο κενό σε φίλτρα διήθησης 20 μ. Η ακριβής πυκνότητα επιβεβαιώνεται με μέτρηση σε πυκνόμετρο και το διάλυμα διατηρείται στους 4°C.
- Διάλυμα NaCl-KBr 1.357 g/ml: παρασκευάζεται με τη διάλυση 153 g NaCl, 354 g KBr, 0.4 g EDTA και 10 μl Garamycin σε 1 lt απεσταγμένου νερού. Το pH ρυθμίζεται στο 7.4 και το διάλυμα διηθείται υπο κενό σε φίλτρα διήθησης 20 μ. Η ακριβής πυκνότητα επιβεβαιώνεται με μέτρηση σε πυκνόμετρο και το διάλυμα διατηρείται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.
- Διαλύματα NaCl-KBr 1.019 g/ml, 1.063 g/ml και 1.240 g/ml: παρασκευάζονται με την ανάμιξη κατάλληλων όγκων των διαλυμάτων NaCl 1.006 g/ml και NaCl-KBr 1.357 g/ml με βάση την παρακάτω εξίσωση:



$$d_x * (V_A + V_B) = (V_A * d_A) + (V_B * d_B)$$

όπου: d_x η επιθυμητή πυκνότητα του τελικού διαλύματος

V_A και d_A ο όγκος και η ακριβής πυκνότητα του διαλύματος NaCl 1.006 g/ml

V_B και d_B ο όγκος και η ακριβής πυκνότητα του διαλύματος NaCl-KBr 1.357 g/ml

Μετά την παρασκευή του διαλύματος ακολουθεί η μέτρηση της ακριβούς πυκνότητάς του σε πυκνόμετρο. Τυχόν αποκλίσεις από την επιθυμητή τελική πυκνότητα διορθώνονται με την προσθήκη κατάλληλων όγκων των διαλυμάτων NaCl 1.006 g/ml και NaCl-KBr 1.357 g/ml.

Τα διαλύματα φυλάσσονται στους 4°C.

Πειραματική πορεία: 10 ml αίματος από ασθενείς με συγκεντρώσεις $Lp(a)$ μικρότερες από 0.8 mg/ml (μεγαλύτερες συγκεντρώσεις αυτής της λιποπρωτεΐνης επηρεάζουν την κατανομή της PAF-AH στα λιποπρωτεϊνικά υποκλάσματα) τοποθετούνται σε πλαστικό σωληνάκι το οποίο περιέχει 1.2 ml ACD ως αντυπηκτικό. Τα σωληνάκια φυγοκεντρούνται στις 3100 rpm για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου προκειμένου να διαχωρισθεί το πλάσμα από τα έμμορφα συστατικά του αίματος. Στο πλάσμα που αναρροφάται με αυτόματη πιπέτα από το υπερκείμενο προστίθενται EDTA 10% και Garamycin σε τελικές συγκεντρώσεις 5 και 1.25 μ l/ml πλάσματος, αντίστοιχα. Το EDTA δρα ως χηλικός παράγοντας δεσμεύοντας τα δισθενή κατιόντα και έτσι αποτρέπει την οξειδωση των λιποπρωτεϊνών του πλάσματος, ενώ η γενταμυκίνη εμποδίζει την ανάπτυξη μικροβιακών παραγόντων. 3 ml από το πλάσμα που έχει απομονωθεί με αυτό τον τρόπο αναμιγνύονται με 0.966 g στερεού KBr. Ακριβώς 3 ml από το διάλυμα που προκύπτει από την παραπάνω ανάμιξη μεταφέρονται με πιπέτα Pasteur στο σωλήνα της υπερφυγοκέντρου, στον πυθμένα του οποίου έχουν ήδη τοποθετηθεί 2 ml διαλύματος NaCl-KBr 1.240 g/ml. Μετά το πλάσμα επιστοιβάζονται διαδοχικά με όργανο αυτόματης ροής (Autodensity flow, Buchler Instruments) 2 ml διαλύματος NaCl-KBr 1.063 g/ml, 2.5 ml διαλύματος NaCl-KBr 1.019 g/ml και τέλος 2.5 ml διαλύματος NaCl-KBr 1.006 g/ml. Οι σωλήνες της φυγοκέντρου, αφού πρώτα ζυγοσταθμισθούν, τοποθετούνται στο ρότορα και ακολουθεί φυγοκέντρωση στις 44.000 rpm για 44 ώρες. Αμέσως μετά το τέλος της φυγοκέντρωσης συλλέγονται διαδοχικά από την κορυφή προς τον πυθμένα κάθε σωλήνα 30 κλάσματα όγκου 400 ml το καθένα. Τέλος, αφού προσδιοριστεί πρώτα η συγκέντρωση της πρωτεΐνης κάθε υποκλάσματος, ακολουθεί ανασύσταση των κλασμάτων προκειμένου να σχηματιστούν τα λιποπρωτεϊνικά υποκλάσματα. Η ανασύσταση γίνεται με τον παρακάτω τρόπο: κλάσματα 1 και 2 (VLDL+IDL, $d < 1.019$ g/mL), 3 και 4 (LDL-1, $d = 1.019-1.023$ g/mL), 5 και 6 (LDL-2, $d = 1.023-1.029$ g/mL), 7 και 8 (LDL-3,

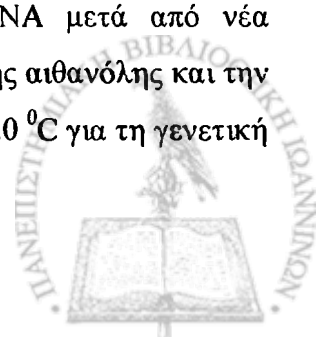
d=1.029-1.039 g/mL), 9 και 10 (LDL-4, d =1.039-1.050 g/mL), 11 και 12 (LDL-5, d =1.050-1.063 g/mL), 13 έως 16 (HDL-2, d=1.063-1.100 g/mL), 17 έως 22 (HDL-3, d=1.100-1.167 g/mL), 23 και 24 (VHDL, d=1.167-1.190 g/mL).

Προκειμένου να επιτευχθεί η απομάκρυνση της περίσσειας των αλάτων τα λιποπρωτεϊνικά υποκλάσματα υποβάλλονται σε διαπύδιση έναντι 2 x 5 lt PBS 10 mM + EDTA 0.05%, pH 7.4 για 24 ώρες, με αλλαγή του διαλύματος διαπύδισης κάθε 6 ώρες. Ακολουθεί διήθηση των υποκλασμάτων σε φίλτρο 20μ και φύλαξή τους στους 4°C.

Παρόμοια πειραματική πορεία ακολουθείται και όταν για το διαχωρισμό των υποκλασμάτων των λιποπρωτεϊνών υψηλής πυκνότητας χρησιμοποιείται απομονωμένη HDL και όχι πλήρες πλάσμα. Η ανασύσταση των υποκλασμάτων σε αυτή την περίπτωση μπορεί να γίνει με τον παρακάτω τρόπο: κλάσματα 13 έως 15 (HDL2b, d=1.063-1.091 g/mL), 16 και 17 (HDL2a, d=1.091-1.100 g/mL), 18 και 19 (HDL3a, d=1.100-1.133 g/mL), 20 και 21 (HDL3b, d=1.133-1.156 g/mL), 22 και 23 (HDL3c, d=1.156-1.179 g/mL).

Ανάλυση των μεταλλάξεων του LDL υποδοχέα:

Το γενετικό υλικό (DNA) απομονώθηκε από λευκά αιμοσφαίρια⁴²⁵. Μετά το διαχωρισμό των έμμορφων συστατικών από το πλάσμα, προστέθηκε υπέρτονο διάλυμα λύσης των ερυθρών αιμοσφαιρίων (ammonium chloride + ammonium hydrogen carbonate) για 20 λεπτά. Μετά από φυγοκέντρηση για 5 λεπτά (3500 rpm) και αφαίρεση του υπερκείμενου απομονώθηκαν τα λευκά αιμοσφαίρια στον πυθμένα του δοκιμαστικού σωλήνα. Η λύση των λευκοκυττάρων έγινε με την προσθήκη πρωτεάσης και διαλύματος σαπυνοποίησης των μεμβρανών (NaCl, Tris pH8, EDTA και SDS), μετά από ανάμιξη και επώαση στους 37 °C για 24 ώρες. Ακολούθως, η προσθήκη του αντιδραστηρίου SEVAC (phenol/chloroform/iso-amyl alcohol 25:24:1) στα ήδη λυμένα λευκοκύτταρα και η φυγοκέντρηση του μίγματος για 5 λεπτά (3,500 rpm) οδήγησε στην καθίζηση των προϊόντων διάσπασης των πρωτεϊνών και των μεμβρανών. Η αναρρόφηση του υπερκείμενου είχε ως αποτέλεσμα την απομόνωση του DNA. Η προσθήκη διαλύματος chloroform/iso-amyl alcohol 24:1, η ανάμιξη και η εκ νέου φυγοκέντρηση για 5 λεπτά (13,000 rpm) συνέβαλε στη δέσμευση μικρής ποσότητας φαινόλης που πιθανώς να παρέμεινε στο διάλυμα από το προηγούμενο στάδιο και η παραμονή της στο υπερκείμενο θα μπορούσε να αναστείλει τη DNA πολυμεράση στο στάδιο του πολλαπλασιασμού του DNA. Η προσθήκη κρύας αιθανόλης 99.7% είχε ως αποτέλεσμα την καθίζηση του DNA μετά από νέα φυγοκέντρηση για 15 λεπτά (13.000 rpm). Το DNA μετά την αφαίρεση της αιθανόλης και την αποξήρανση του διαλύθηκε σε απεσταγμένο νερό και φυλάχθηκε στους -20 °C για τη γενετική



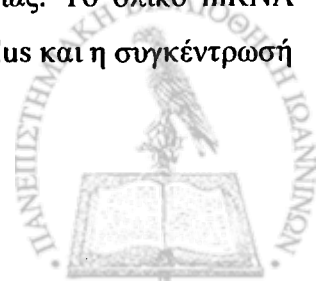
ανάλυση. Στην συνέχεια, με τη χρήση της μεθόδου της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) έγινε πολλαπλασιασμός του προαγωγού (promotor) και όλων των εξονίων (exons) του γονιδίου του LDLR⁴²⁶. Το μίγμα πριν την PCR αποτελούνταν από 50 ng του DNA, 100 mM από κάθε νουκλεοτίδιο (dNTP), 0.1 μl (1 unit) του ενζύμου της DNA πολυμεράσης (Taq-polymerase), 2.5 μl του 10X ρυθμιστικού διαλύματος της DNA πολυμεράσης (10X Taq Buffer) και 5 pmole για κάθε εκκινητή (δεξιός και αριστερός εκκινητής) ειδικού για κάθε εξόνιο του γονιδίου του LDLR.

Η PCR έγινε σε 30 κύκλους. Ο κάθε κύκλος αποτελούνταν από 3 στάδια (φάσεις): στάδιο αποδιάταξης της διπλής έλικας του DNA (denaturation phase) στους 96 °C για 1 λεπτό, στάδιο σύνδεσης των εκκινητών με το πρότυπο DNA (annealing phase) στους 68° C για 1 λεπτό και στάδιο επιμήκυνσης (elongation phase) στους 72° C για 1 λεπτό. Χρησιμοποιήθηκε ο ανακυκλωτής θερμοκρασίας MJR PTC-100 Programmable Thermal Cycler. Η ανάλυση των μεταλλάξεων έγινε είτε με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης μετά τη δράση περιοριστικών ενζύμων (για μεταλλάξεις που έχουν περιγραφεί προηγούμενα σε Έλληνες ασθενείς⁴²⁷) είτε με την ανεύρεση της αλληλουχίας των βάσεων του γενετικού κώδικα με τη χρησιμοποίηση του γενετικού αναλυτή ABI PRISM 310. Οι μεταλλάξεις T517C και G1285A ανιχνεύθηκαν με τη βοήθεια περιοριστικών ενζύμων. Η μετάλλαξη T517C ανιχνεύθηκε μετά από επώαση με το περιοριστικό ένζυμο Bstul στους 60 °C για 3 ώρες και στη συνέχεια με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 2% στα 120 Volt για 1 ώρα και βαφή με βρωμιούχο αιθίδιο (ethidium bromide) σε τελική συγκέντρωση 0.005%. Μετά από τη φωτογράφιση των ηλεκτροφορητικών ζωνών σε υπεριώδη ακτινοβολία, η παρουσία της μετάλλαξης αντιστοιχούσε σε 3 ζώνες μεγέθους 357, 256 και 100 βάσεων, αντίστοιχα. Αντίθετα, η απουσία της μετάλλαξης αντιστοιχούσε σε 1 ζώνη 357 βάσεων. Η μετάλλαξη G1285A ανιχνεύθηκε μετά από επώαση με το περιοριστικό ένζυμο NlaIII στους 37 °C για 3 ώρες και στη συνέχεια με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 2.5% στα 120 Volt για 1 ώρα και βαφή με βρωμιούχο αιθίδιο σε τελική συγκέντρωση 0.005%. Μετά από τη φωτογράφιση των ηλεκτροφορητικών ζωνών σε υπεριώδη ακτινοβολία, η παρουσία της μετάλλαξης αντιστοιχούσε σε 3 ζώνες μεγέθους 273, 151 και 122 βάσεων, αντίστοιχα. Αντίθετα, η απουσία της μετάλλαξης αντιστοιχούσε σε 1 ζώνη 273 βάσεων. Η ανεύρεση της αλληλουχίας των βάσεων του γενετικού κώδικα έγινε με τη χρησιμοποίηση του γενετικού αναλυτή ABI PRISM 310. Τα προϊόντα μετά την πρώτη PCR μεταφέρονταν σε ειδικά φίλτρα που περιείχαν μεμβράνη πολυσουλφαμίνης (Ultrafree-MC centrifugal filter-MILLIPORE) για την απομάκρυνση της περίσσειας εκκινητών, νουκλεοτιδίων και ιόντων που δεν χρησιμοποιήθηκαν. Στην συνέχεια έγινε δεύτερη PCR με το εξής μίγμα: 30-90 ng από το

απεσταγμένο προϊόν της πρώτης PCR, 4 μl από έτοιμο διάλυμα που περιείχε σεσημασμένα νουκλεοτίδια με φθορίζουσες ουσίες και DNA πολυμεράση ('Terminator Ready Reaction Mix' της εταιρίας PE Applied Biosystems) και 5 pmole του ενός μόνο εκκινητή (δεξιός εκκινητής) που ήταν ειδικός για το υπό μελέτη εξόνιο. Η PCR έγινε σε 25 κύκλους. Ο κάθε κύκλος αποτελούνταν από 3 στάδια (φάσεις): στάδιο αποδιάταξης της διπλής έλικας του DNA στους 96 °C για 30 δευτερόλεπτα, στάδιο σύνδεσης των εκκινητών με το πρότυπο DNA στους 52 °C για 15 δευτερόλεπτα και στάδιο επιμήκυνσης στους 60 °C για 4 λεπτά. Στη συνέχεια η ηλεκτροφόρηση των προϊόντων στο γενετικό αναλυτή ABI PRISM 310 (χρήση φωτός Laser) είχε ως αποτέλεσμα την ανεύρεση της αλληλουχίας των βάσεων του κάθε εξονίου του LDLR. Η οικογενής ανεπάρκεια της apo B100 αποκλείστηκε με βάση το πρωτόκολλο των Tybjaerg-Hansen και συνεργατών⁴²⁸.

Μελέτη της επίδρασης των υπολιπιδαιμικών φαρμάκων στην παραγωγή της PAF-AH από καλλιέργειες μονοκυττάρων περιφερικού αίματος:

Τα μονοκύτταρα απομονώθηκαν από το περιφερικό αίμα των ασθενών της μελέτης. Τα κύτταρα αναπτύχθηκαν και καλλιεργήθηκαν σε ειδικές πλάκες κυτταροκαλλιέργειας 24 θέσεων για τον προσδιορισμό της ενεργότητας της PAF-AH (1×10^6 κύτταρα / θέση) ή σε πλάκες 6 θέσεων (3×10^6 κύτταρα / θέση) για την απομόνωση του mRNA. Το καλλιεργητικό υλικό ήταν RPMI και περιείχε L-γλουταμίνη, γενταμικίνη (40μg/ml) και 10% ανθρώπινο ορό. Η PAF-AH του ορού του καλλιεργητικού μέσου αδρανοποιήθηκε πλήρως με επώαση με 1mM Pefablock. Η μελέτη της παραγωγής και έκκρισης της PAF-AH από τα κύτταρα της καλλιέργειας έγινε σε τακτά χρονικά διαστήματα κατά τη διάρκεια των 2 πρώτων 24ώρων, τόσο σε βασικές συνθήκες, όσο και μετά την προσθήκη διαφόρων συγκεντρώσεων φενοφιβράτης ή ατορβαστατίνης στο καλλιεργητικό μέσο. Για τον προσδιορισμό της εκκρινόμενης και ολικής ενζυμικής ενεργότητας γίνονταν ανάκτηση του υπερκείμενου των κυτταροκαλλιεργειών (εκκρινόμενη ενεργότητα), ενώ τα κύτταρα ξεπλένονταν 2 φορές με PBS και στη συνέχεια απομακρύνονταν από τους δίσκους καλλιέργειας και λύονταν με την προσθήκη 0.2 ml ειδικού διαλύματος που περιείχε 1% EDTA και 0.1% Triton X-100. Τόσο το υπερκείμενο, όσο και το κυτταρόλυμα κάθε καλλιέργειας φυγοκεντρούνταν (500 X g για 10 λεπτά, στους 4 °C) και φυλάσσονταν στους 4 °C. Η μέτρηση της ενζυμικής ενεργότητας της PAF-AH γίνονταν μέσα σε 2 ημέρες από τη συλλογή των δειγμάτων. Η βιωσιμότητα των κυττάρων στις συνθήκες της κυτταροκαλλιέργειας εκτιμήθηκε με τη χρώση trypan blue και τη μέτρηση της συγκέντρωσης της γαλακτικής δεϋδρογενάσης στο μέσο της καλλιέργειας. Το ολικό mRNA απομονώθηκε από τα κύτταρα της καλλιέργειας με τη βοήθεια του RNA Plus και η συγκέντρωσή



του προσδιορίστηκε με φασματοφωτομετρία στα 260 nm. Η σύνθεση του cDNA έγινε με 5 μg του ολικού mRNA παρουσία oligo(dT) (2 μg) και 500 μU αντίστροφης μεταγραφάσης SuperScript Mo-MuLV. Η αντίγνωση και ο ποσοτικός προσδιορισμός του mRNA της PAF-AH έγινε με RT-PCR παρουσία δύο ειδικών ολιγονουκλεοτιδίων, AHPAF2 (TCTTGGAAACACACTGGCTTATGGGC) και AHPAF6R (GGACTGAACCCCTGATTGTAA) και συγκρίθηκε με την ενίσχυση του υποδοχέα του PAF ή της ακτίνης.

Στατιστική ανάλυση

Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων της μελέτης έγινε σε ηλεκτρονικό υπολογιστή με τη βοήθεια κατάλληλου λογισμικού (Statistica, version 5.5). Η σύγκριση των λιπιδαιμικών παραμέτρων και των ενεργοτήτων της PAF-AH μεταξύ των ομάδων της μελέτης έγινε με ανάλυση της μεταβλητότητας σε μία διεύθυνση (one-way ANOVA), η οποία συνοδεύθηκε από τη δοκιμασία των ελαχίστων διαφορών (LSD test, least significance differences test) για τις συγκρίσεις των ομάδων ανά ζεύγη. Οι αντίστοιχες συγκρίσεις για τις μεταβλητές που δεν ακολουθούν κανονική κατανομή [π.χ Lp(a)] έγιναν με Kruskal-Wallis ANOVA και Mann-Whitney U test. Οι μεταβολές των μέσων τιμών των λιπιδίων και της PAF-AH μετά τη χορήγηση υπολιπιδαιμικής αγωγής (ατορβαστατίνη ή φαινοφιβράτη) αξιολογήθηκαν με τη δοκιμασία Student's paired t-test. Αντίστοιχα, οι μεταβολές της Lp(a) εκτιμήθηκαν με τη δοκιμασία Wilcoxon matched pairs test. Οι συσχετίσεις μεταξύ των επιπέδων των λιπιδίων και των ενζυμικών ενεργοτήτων τόσο πριν την έναρξη της αγωγής, όσο και μετά την ολοκλήρωση της θεραπείας έγιναν με ανάλυση γραμμικής συσχέτισης (linear regression analysis). Τέλος, για τη σύγκριση των ποσοστών μεταξύ των ομάδων των ασθενών χρησιμοποιήθηκε η δοκιμασία χ^2 .

VII. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

VII.1 Σύγκριση της ενεργότητας της PAF-AH σε ασθενείς με διάφορες μορφές πρωτοπαθούς δυσλιπιδαιμίας.

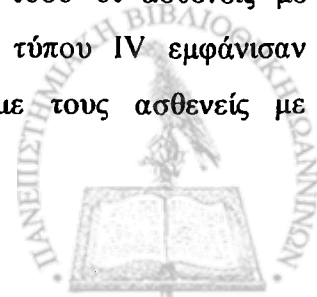
Όλες οι ομάδες των δυσλιπιδαιμικών ασθενών εμφάνισαν σημαντικά υψηλότερες τιμές ολικής χοληστερόλης και τριγλυκεριδίων, καθώς και υψηλότερες συγκεντρώσεις απολιποπρωτεΐνης Β και Ε σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου (πίνακας 3).

Πίνακας 3. Επίπεδα των λιπιδαιμικών παραμέτρων σε ασθενείς με δυσλιπιδαιμία και στην ομάδα ελέγχου.

Παράμετροι	Controls	Τύπου ΙΙΑ	Τύπου ΙΙΒ	Τύπου ΙV	P
Ολική χοληστερόλη (mg/dL)	207±45	317±66 ⁻	306±42 ⁻	239±45 ^{*,§}	0.000
Τριγλυκερίδια (mg/dL)	118±95	134±45 ¹	287±80 [*]	390±177 ^{*,§}	0.000
HDL χοληστερόλη (mg/dL)	49.7±9.6	51.4±14.7	43.7±9.7 [*]	32.8±5.1 ^{*,§}	0.000
LDL χοληστερόλη (mg/dL)	140.1±41.6	239±66 ⁻	199±32 ^{*,*}	137±36 ^{*,§}	0.000
Apo AI (mg/dL)	144±23	150±32	152±24	128±20 ^{*,§}	0.001
Apo B (mg/dL)	100±27	166±36	162±26 ¹	128±21 ^{1,*,§}	0.000
Apo E (mg/dL)	37.8±11.3	48.9±9.5 ¹	60.1±19.8 [*]	63.1±23.9 ^{1,*}	0.000
Lp(a) (mg/dL)	7.9 (2.7-17)	13.2 (7.2-25.5) ¹	12.9 (7-28)	6.6 (2.2-13) ^{*,§}	0.001
PAF-AH πλάσματος (nmol/ml πλάσμα/min)	48.72±13.33	76.58±28.15 ⁺	74.52±16.95 ⁺	65.32±23.22 ^{*,§}	0.000
PAF-AH HDL (nmol/ml πλάσμα/min)	3.24±1.37	3.59±1.55	2.33±1.15 ^{*,*}	1.79±0.48 ^{*,§}	0.000
PAF-AH HDL / PAF-AH πλάσματος	0.07±0.03	0.04±0.02 ⁻	0.03±0.01 ⁻	0.03±0.01 ⁺	0.001
PAF-AH HDL / LDL-C (nmol/mg χοληστερόλης/min)	2.6±1.5	1.5±0.7 ⁺	1.2±0.6 ⁻	1.2±0.5 ⁺	0.001

Τα σύμβολα ⁺, ^{*} και [§] αντιπροσωπεύουν συγκρίσεις με την ομάδα ελέγχου, την ομάδα των ασθενών με δυσλιπιδαιμία τύπου ΙΙΑ και την ομάδα των ασθενών με δυσλιπιδαιμία τύπου ΙΙΒ, αντίστοιχα. Το επίπεδο της στατιστικής σημαντικότητας σε όλες τις περιπτώσεις είναι μικρότερο του 0.001.

Επιπρόσθετα, οι ασθενείς με δυσλιπιδαιμία τύπου ΙΙΑ και ΙΙΒ εμφάνισαν υψηλότερες συγκεντρώσεις LDL χοληστερόλης, απολιποπρωτεΐνης Β και Lp(a) σε σύγκριση τόσο με την ομάδα ελέγχου, όσο και με τους ασθενείς με δυσλιπιδαιμία τύπου ΙV. Διαφορές παρατηρήθηκαν επίσης και στα επίπεδα της HDL χοληστερόλης. Συγκεκριμένα, τόσο οι ασθενείς με δυσλιπιδαιμία τύπου ΙΙΒ, όσο και οι ασθενείς με δυσλιπιδαιμία τύπου ΙV εμφάνισαν χαμηλότερες συγκεντρώσεις HDL χοληστερόλης σε σύγκριση με τους ασθενείς με

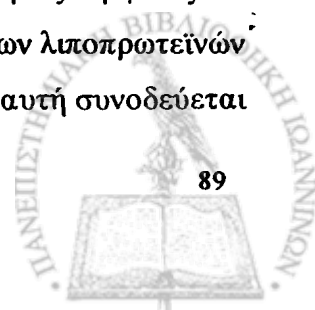


δυσλιπιδαιμία τύπου ΙΙΑ και την ομάδα ελέγχου. Επιπρόσθετα, οι ασθενείς με δυσλιπιδαιμία τύπου ΙV εμφάνισαν σημαντικά χαμηλότερες τιμές HDL χοληστερόλης σε σύγκριση με τους ασθενείς με δυσλιπιδαιμία τύπου ΙΙΒ (πίνακας 3). Τέλος, οι ασθενείς με δυσλιπιδαιμία τύπου ΙV εμφάνισαν χαμηλότερες συγκεντρώσεις απολιποπρωτεΐνης ΑΙ σε σύγκριση με τις υπόλοιπες ομάδες της μελέτης.

Ενεργότητα της PAF-AH: όλες οι ομάδες των δυσλιπιδαιμικών ασθενών εμφάνισαν σημαντικά υψηλότερη ενεργότητα της PAF-AH του πλάσματος σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου (πίνακας 3). Διαφορές στην ενεργότητα της PAF-AH του πλάσματος παρατηρήθηκαν και μεταξύ των ομάδων των ασθενών. Συγκεκριμένα, τόσο οι ασθενείς με δυσλιπιδαιμία τύπου ΙΙΑ, όσο και οι ασθενείς με δυσλιπιδαιμία τύπου ΙΙΒ εμφάνισαν σημαντικά υψηλότερη ενεργότητα στο πλάσμα σε σύγκριση με τους ασθενείς με δυσλιπιδαιμία τύπου ΙV.

Οι ασθενείς με δυσλιπιδαιμία τύπου ΙΙΑ εμφάνισαν παρόμοια ενεργότητα PAF-AH στις HDL με τους υγιείς μάρτυρες (πίνακας 3). Αντίθετα, οι ασθενείς με δυσλιπιδαιμίες που χαρακτηρίζονται από διαταραχές του μεταβολισμού των πλούσιων σε τριγλυκερίδια λιποπρωτεϊνών, δηλαδή οι ασθενείς με δυσλιπιδαιμίες τύπου ΙΙΒ και ΙV, εμφάνισαν σημαντικά χαμηλότερη ενζυμική ενεργότητα στις HDL σε σύγκριση τόσο με τους υγιείς μάρτυρες, όσο και με τους ασθενείς με δυσλιπιδαιμία τύπου ΙΙΑ. Επιπρόσθετα, οι ασθενείς με δυσλιπιδαιμία τύπου ΙV εμφάνισαν χαμηλότερη PAF-AH στις HDL σε σύγκριση με τους ασθενείς με δυσλιπιδαιμία τύπου ΙΙΒ.

Αν ο λόγος της PAF-AH των HDL προς την ενζυμική ενεργότητα του πλάσματος χρησιμοποιηθεί ως ένας αδρός δείκτης της κατανομής του ενζύμου μεταξύ των λιποπρωτεϊνικών σωματιδίων προκύπτει ότι οι ασθενείς με πρωτοπαθείς δυσλιπιδαιμίες εμφανίζουν διαταραχή της κατανομής της ενεργότητας της PAF-AH μεταξύ των λιποπρωτεϊνών που περιέχουν απολιποπρωτεΐνη Β και αυτών που περιέχουν απολιποπρωτεΐνη ΑΙ. Πράγματι, όλες οι ομάδες των δυσλιπιδαιμικών ασθενών εμφάνισαν χαμηλότερες τιμές του λόγου της PAF-AH των HDL προς την ενεργότητα του πλάσματος σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου (πίνακας 3). Ένας αδρός ποσοτικός δείκτης της προστατευτικής ικανότητας της PAF-AH των HDL από τις αθηρογόνες δράσεις των LDL σωματιδίων είναι ο λόγος της ενεργότητας του ενζύμου των HDL προς την LDL χοληστερόλη. Όλες οι ομάδες των δυσλιπιδαιμικών ασθενών εμφάνισαν σημαντικά χαμηλότερες τιμές αυτού του λόγου σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου (πίνακας 3), ενώ δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές στις τιμές αυτού του λόγου μεταξύ των ομάδων των ασθενών. Κατά συνέπεια, οι ασθενείς με πρωτοπαθείς δυσλιπιδαιμίες εμφανίζουν διαταραχές στην κατανομή της ενζυμικής ενεργότητας της PAF-AH μεταξύ των λιποπρωτεϊνών που περιέχουν απολιποπρωτεΐνη Β και των HDL. Επιπρόσθετα, η διαταραχή αυτή συνοδεύεται



από μείωση της ικανότητας του ενζύμου των HDL να προστατεύει από τις αθηρωγόνες δράσεις των LDL.

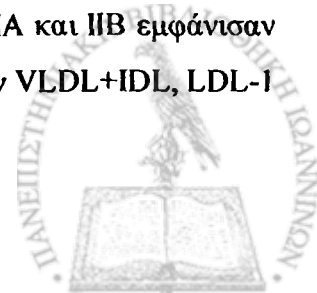
Πίνακας 4. Συσχέτιση των ενεργοτήτων της PAF-AH με τις τιμές των λιπιδαιμικών παραμέτρων.

	PAF-AH πλάσματος		PAF-AH HDL	
	r	P	r	P
Ολική χοληστερόλη	0.70	0.000	NS	NS
Τριγλυκερίδια	0.12	0.014	-0.40	0.000
HDL χοληστερόλη	-0.11	NS	0.42	0.000
LDL χοληστερόλη	0.68	0.000	NS	NS
Απο AI	-0.15	0.003	0.26	0.000
Απο B	0.72	0.000	NS	NS

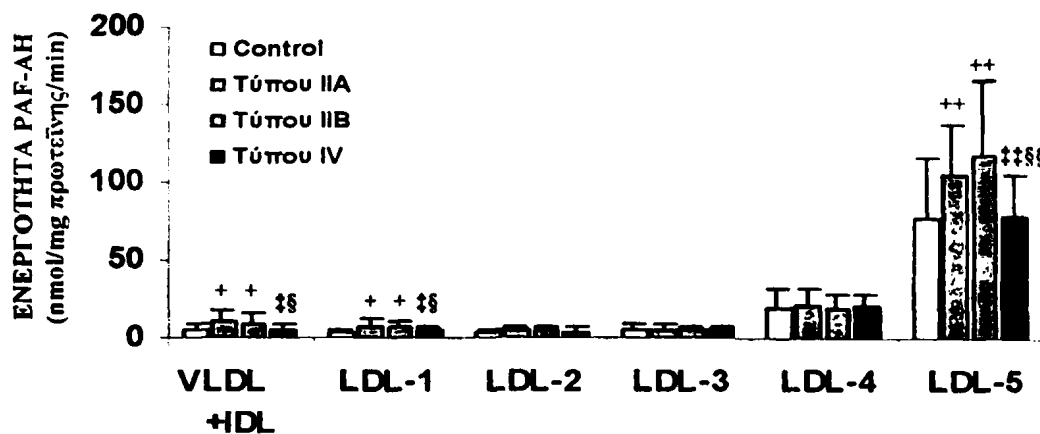
PAF-AH HDL: ενεργότητα της PAF-AH στα σωματίδια των HDL.

Σε όλες τις ομάδες των ασθενών η PAF-AH του πλάσματος εμφάνισε σημαντική θετική συσχέτιση με τις τιμές της ολικής και LDL χοληστερόλης, των τριγλυκεριδίων, καθώς και με τις συγκεντρώσεις της απολιποπρωτεΐνης B (πίνακας 4). Αντίθετα, η PAF-AH του πλάσματος εμφάνισε αρνητική συσχέτιση με τις συγκεντρώσεις της απολιποπρωτεΐνης AI. Τέλος, το ένζυμο των HDL εμφάνισε σημαντική θετική συσχέτιση με τα επίπεδα της HDL χοληστερόλης και της απολιποπρωτεΐνης AI, καθώς και αρνητική συσχέτιση με τα επίπεδα των τριγλυκεριδίων (πίνακας 4).

Ενεργότητα της PAF-AH στα λιποπρωτεϊνικά υποκλάσματα: η κατανομή της ενζυμικής ενεργότητας της PAF-AH (εκφρασμένης ανά mg πρωτεΐνης) στα υποκλάσματα των λιποπρωτεϊνών που περιέχουν απολιποπρωτεΐνη B φαίνεται στην εικόνα 4. Η ενζυμική ενεργότητα εκφρασμένη ανά mg πρωτεΐνης αποτελεί ένα αδρό δείκτη της ενζυμικής ενεργότητας ανά λιποπρωτεϊνικό σωματίδιο δεδομένου ότι κάθε σωματίδιο των λιποπρωτεϊνών που περιέχουν απολιποπρωτεΐνη B περιέχει μόνο ένα μόριο αυτής της απολιποπρωτεΐνης. Σε όλες τις ομάδες των δυσλιπιδαιμικών ασθενών, καθώς και στους υγιείς μάρτυρες το μεγαλύτερο ποσοστό της ενζυμικής ενεργότητας συσχετιζόταν επιλεκτικά με τα μικρά, πυκνά υποκλάσματα της LDL (εικόνα 4). Επιπρόσθετα, οι ασθενείς με δυσλιπιδαιμία τύπου ΙΙΑ και ΙΙΒ εμφάνισαν εμπλουτισμό με ενζυμική ενεργότητα των σωματιδίων των υποκλασμάτων VLDL+IDL, LDL-I



και LDL-5 σε σύγκριση με τα αντίστοιχα υποκλάσματα των ασθενών με δυσλιπιδαιμία τύπου IV και των ατόμων της ομάδας ελέγχου (εικόνα 4).



Εικόνα 4. Ενεργότητα της PAF-AH (ανά mg πρωτεΐνης) στα λιποπρωτεϊνικά υποκλάσματα. $+p<0.05$ και $++p<0.01$ σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου, $†p<0.05$ και $††p<0.01$ σε σύγκριση με την ομάδα των ασθενών με δυσλιπιδαιμία τύπου II A, $‡p<0.05$ και $‡‡p<0.01$ σε σύγκριση με την ομάδα των ασθενών με δυσλιπιδαιμία τύπου II B.

Αντίθετα, η ενζυμική ενεργότητα των υποκλασμάτων LDL-2, LDL-3 και LDL-4 στους ασθενείς με δυσλιπιδαιμία τύπου II A και II B δεν διέφερε σημαντικά από την αντίστοιχη των ασθενών με δυσλιπιδαιμία τύπου IV και των υγιών μαρτύρων. Τέλος, δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές μεταξύ των ασθενών με δυσλιπιδαιμία τύπου IV και των ατόμων της ομάδας ελέγχου στην ενζυμική ενεργότητα (ανά mg πρωτεΐνης) των λιποπρωτεϊνικών υποκλασμάτων.

Όταν η ενζυμική ενεργότητα των λιποπρωτεϊνικών υποκλασμάτων εκφράστηκε ανά ml πλάσματος οι ασθενείς με δυσλιπιδαιμία τύπου II A και II B εμφάνισαν σημαντικά υψηλότερη ενεργότητα σε όλα τα υποκλάσματα των LDL σε σύγκριση τόσο με τους ασθενείς με δυσλιπιδαιμία τύπου IV, όσο και με τους υγιείς μάρτυρες (πίνακας 5). Αντίθετα, δεν παρατηρήθηκαν διαφορές στην ενεργότητα των υποκλασμάτων των LDL μεταξύ των ατόμων της ομάδας ελέγχου και των ασθενών με δυσλιπιδαιμία τύπου IV. Τέλος, οι ασθενείς με δυσλιπιδαιμία τύπου IV και II B εμφάνισαν σημαντικά υψηλότερη ενεργότητα στις VLDL+IDL σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου και τους ασθενείς με δυσλιπιδαιμία τύπου II A.

Η ενζυμική ενεργότητα της PAF-AH των HDL συσχετιζόνταν εκλεκτικά με τα μικρά, πυκνά HDL υποκλάσματα (HDL-3c) σε όλες τις ομάδες των ασθενών, καθώς και στους υγιείς

μάρτυρες. Στην εικόνα 5A παρουσιάζεται ένα αντιπροσωπευτικό προφίλ της κατανομής της ενζυμικής ενεργότητας των HDL υποκλασμάτων στους ασθενείς με δυσλιπιδαιμία τύπου ΙΒ. Οι ασθενείς με δυσλιπιδαιμία τύπου ΙΒ και ΙV εμφάνισαν σημαντικά χαμηλότερη ενεργότητα στο υποκλάσμα HDL-3c σε σύγκριση με τους υγιείς μάρτυρες και τους ασθενείς με δυσλιπιδαιμία τύπου ΙΑ (εικόνα 5B).

Πίνακας 5. Κατανομή της PAF-AH στα υποκλάσματα των λιποπρωτεϊνών που περιέχουν απολιποπρωτεΐνη Β, σε όλες τις ομάδες της μελέτης.

	Ενεργότητα PAF-AH (nmol/ml πλάσμα/min)				p
	Controls	Τύπου ΙΑ	Τύπου ΙΒ	Τύπου ΙV	
VLDL+IDL	0.34 ± 0.13	0.61 ± 0.22	1.33 ± 0.86 ^{+,**}	1.71 ± 1.0 ^{+,**,\$§}	0.01
LDL-1	0.13 ± 0.09	0.40 ± 0.26 ⁺	0.40 ± 0.24 ⁺	0.14 ± 0.07 ^{*,§}	0.04
LDL-2	0.20 ± 0.16	0.47 ± 0.13 ⁺	0.45 ± 0.28 ⁺	0.20 ± 0.08 ^{*,§}	0.05
LDL-3	0.68 ± 0.40	1.27 ± 0.91 ⁺	1.05 ± 0.57 ⁺	0.68 ± 0.37 ^{*,§}	0.05
LDL-4	1.58 ± 1.16	3.82 ± 2.30 ⁺	3.34 ± 2.03 ⁺	1.62 ± 1.20 ^{*,§}	0.05
LDL-5	5.03 ± 2.81	8.41 ± 2.78 ⁺⁺	13.02 ± 6.73 ^{+,**}	4.95 ± 2.49 ^{+,**,\$§}	0.01

⁺p<0.01 και ⁺p<0.05 σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου, ^{**}p<0.01 και ^{*}p<0.05 σε σύγκριση με την ομάδα των ασθενών με δυσλιπιδαιμία τύπου ΙΑ και ^{§§}p<0.01 και [§]p<0.05 σε σύγκριση με την ομάδα των ασθενών με δυσλιπιδαιμία τύπου ΙΒ.

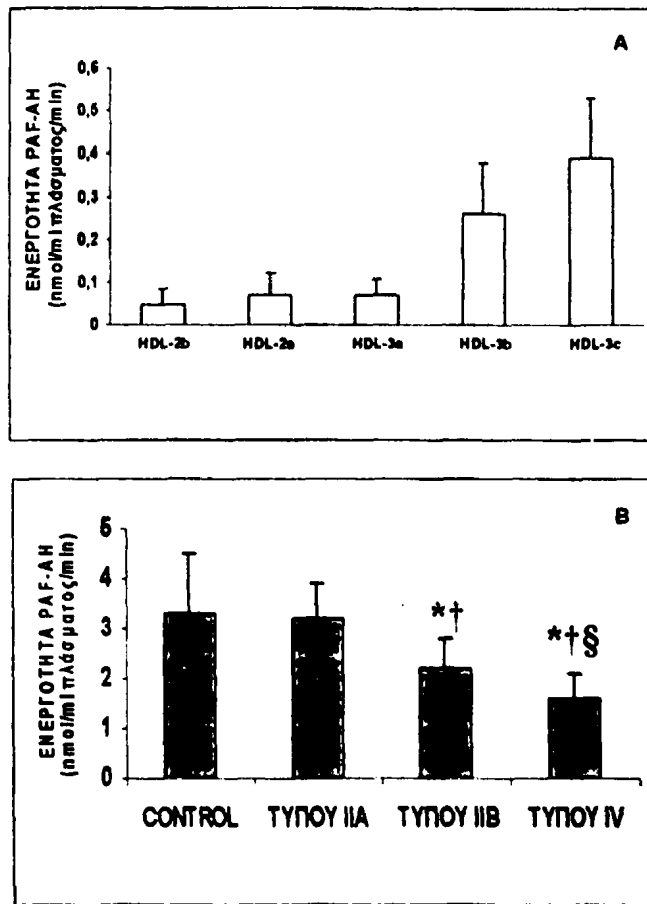
Επιπρόσθετα, οι ασθενείς με δυσλιπιδαιμία τύπου ΙV εμφάνισαν σημαντικά χαμηλότερη ενεργότητα σε αυτό το υποκλάσμα σε σύγκριση με τους ασθενείς με δυσλιπιδαιμία τύπου ΙΒ, ενώ τέλος, δεν παρατηρήθηκαν διαφορές στην ενεργότητα αυτού του υποκλάσματος μεταξύ της ομάδας ελέγχου και των ασθενών με δυσλιπιδαιμία τύπου ΙΑ. Η ενεργότητα της PAF-AH στα υπόλοιπα υποκλάσματα της HDL δεν διέφερε στις διάφορες ομάδες της μελέτης.

VII.2 Σύγκριση των επιπέδων της PAF-AH σε ασθενείς με διάφορες μορφές υπερχοληστερολαιμίας.

Η σύγκριση αφορούσε τις διάφορες υποομάδες των ασθενών με δυσλιπιδαιμία τύπου ΙΑ. Συμμετείχαν 5 ασθενείς με ομόζυγη οικογενή υπερχοληστερολαιμία (HomoFH), 38 ασθενείς με ετερόζυγη οικογενή υπερχοληστερολαιμία (HeteroFH), 38 ασθενείς με πολυγονική υπερχοληστερολαιμία (NonFH), καθώς και 33 υγιείς εθελοντές με φυσιολογικά επίπεδα λιπιδίων



(Controls). Τα χαρακτηριστικά των υπερχοληστερολαιμικών ασθενών, καθώς και των υγιών εθελοντών που αποτέλεσαν την ομάδα ελέγχου παρουσιάζονται στον πίνακα 6.



Εικόνα 5. Α) Αντιπροσωπευτικό προφίλ της κατανομής της PAF-AH στα υποκλάσματα της HDL. Β) Σύγκριση της ενεργότητας της PAF-AH στο υποκλάσμα HDL-3c μεταξύ των ομάδων της μελέτης. * $p < 0.05$ σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου, † $p < 0.05$ σε σύγκριση με την ομάδα των ασθενών με δυσλιπιδαιμία τύπου ΙΙΑ και § $p < 0.05$ σε σύγκριση με την ομάδα των ασθενών με δυσλιπιδαιμία τύπου ΙΙΒ.

Δεν παρατηρήθηκαν διαφορές στο δείκτη μάζας σώματος και την κατανομή του φύλου μεταξύ των ομάδων της μελέτης. Ωστόσο, οι ασθενείς με ομόζυγη οικογενή υπερχοληστερολαιμία είχαν σημαντικά χαμηλότερη ηλικία σε σύγκριση με τις άλλες ομάδες. Τα επίπεδα της ολικής χοληστερόλης, της LDL χοληστερόλης, καθώς και οι συγκεντρώσεις των απολιποπρωτεϊνών Β και Ε ήταν σημαντικά υψηλότερες σε όλες τις ομάδες των ασθενών σε σύγκριση με τους υγιείς μάρτυρες (πίνακας 6). Επιπρόσθετα, διαφορές στις τιμές των παραπάνω παραμέτρων παρατηρήθηκαν και μεταξύ των ομάδων των ασθενών. Συγκεκριμένα, οι ασθενείς με ομόζυγη οικογενή υπερχοληστερολαιμία εμφάνισαν σημαντικά υψηλότερα επίπεδα ολικής και LDL

χοληστερόλης, καθώς και αυξημένες συγκεντρώσεις των απολιποπρωτεϊνών Β και Ε σε σύγκριση με τις άλλες δύο ομάδες των ασθενών, ενώ τέλος, οι ασθενείς με ετερόζυγη οικογενή υπερχοληστερολαιμία παρουσίασαν υψηλότερα επίπεδα αυτών των παραμέτρων σε σύγκριση με τους ασθενείς με μη οικογενή υπερχοληστερολαιμία.

Πίνακας 6. Κλινικά και βιοχημικά χαρακτηριστικά των ασθενών με δυσλιπιδαιμία τύπου ΙΙΑ και της ομάδας ελέγχου.

Παράμετροι	Controls	NonFH	HeteroFH	HomoFH	P
Αριθμός	33	33	38	5	
Φύλο (άνδρες / γυναίκες)	14/19	13/20	15/23	1/4	NS
Καπνιστές / Μη καπνιστές	8/25	10/23	8/30	1/4	NS
Ηλικία (έτη)	40.6±12.9	42.6±5.9	36.5±17.5	23.3±3.1 ^{++*}	0.01
BMI (kg/m ²)	23.9±1.6	24.8±1.4	24.5±0.8	24.1±1.2	NS
Ολική χοληστερόλη (mg/dL)	199±26	303±49 ^{++*}	340±70 ^{++*}	448±32 ^{++*,***,§§§}	0.0000
Τριγλυκερίδια (mg/dL)	119±47	141±42	133±41	138±58	NS
HDL χοληστερόλη (mg/dL)	52.2±10.7	50.1±12.7	46.7±12.9 [*]	36.7±5.7 ^{*,§}	0.05
LDL χοληστερόλη (mg/dL)	124±25	222±50 ^{++*}	262±68 ^{++*,***}	381±23 ^{++*,***,§§§}	0.0000
Apo AI (mg/dL)	155±21	154±28	143±24 [*]	101±25 ^{*,***,§§§}	0.0000
Apo B (mg/dL)	136±25	156±29 ⁺⁺	182±39 ^{++*,***}	229±23 ^{++*,***,§§§}	0.0000
Apo E (mg/dL)	33.3±6.9	48.9±8.5 ⁺⁺⁺	52.7±13.4 ⁺⁺⁺	58.1±23.9 ⁺⁺⁺	0.0000
Lp(a) (mg/dL)	6.0 (0.8-48.0)	11.5 (0.8-111.0) ⁻	11.5 (0.8-42.0) ⁺	15.1 (10.7-22.3) ⁻	0.006

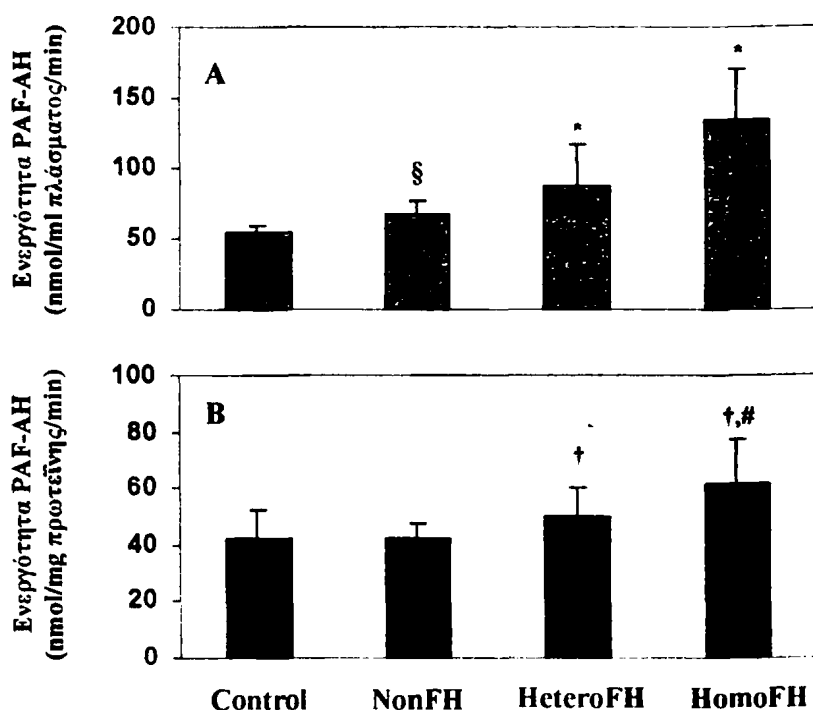
Τα σύμβολα ^{+,++,+++} αντιπροσωπεύουν συγκρίσεις με την ομάδα ελέγχου, οι τιμές του P είναι <0.05, <0.01 και <0.001, αντίστοιχα. Τα σύμβολα ^{*,**,*} αντιπροσωπεύουν συγκρίσεις με την ομάδα των NonFH, οι τιμές του P είναι <0.05, <0.01 και <0.001, αντίστοιχα. Τα σύμβολα ^{§,§§,§§§} αντιπροσωπεύουν συγκρίσεις με την ομάδα των HeteroFH, οι τιμές του P είναι <0.05, <0.01 και <0.001, αντίστοιχα.

Όλες οι ομάδες των ασθενών εμφάνισαν σημαντικά υψηλότερα επίπεδα λιποπρωτεΐνης (a) σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου. Διαφορές στα επίπεδα αυτής της λιποπρωτεΐνης παρατηρήθηκαν και μεταξύ των ομάδων των ασθενών. Έτσι, οι ομοζυγότες εμφάνισαν σημαντικά υψηλότερα επίπεδα Lp(a) σε σύγκριση με τις άλλες δύο ομάδες. Τέλος, οι ομοζυγότες παρουσίασαν χαμηλότερα επίπεδα HDL χοληστερόλης και απολιποπρωτεΐνης A1 σε



σύγκριση με τις άλλες ομάδες της μελέτης, οι οποίες δεν διέφεραν σημαντικά μεταξύ τους στα επίπεδα αυτών των παραμέτρων.

Ενεργότητα της PAF-AH : όπως φαίνεται στην εικόνα 6Α όλες οι ομάδες των ασθενών εμφάνισαν σημαντικά υψηλότερη ενεργότητα της PAF-AH στο πλάσμα σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου. Επιπρόσθετα, οι ασθενείς με ομόζυγη οικογενή υπερχοληστερολαιμία παρουσίασαν σημαντικά υψηλότερη ενεργότητα του ενζύμου στο πλάσμα σε σύγκριση με τους ετεροζυγότες (138.25 ± 35.53 vs 86.19 ± 27.20 nmol/ml plasma/min, $p < 0.001$).



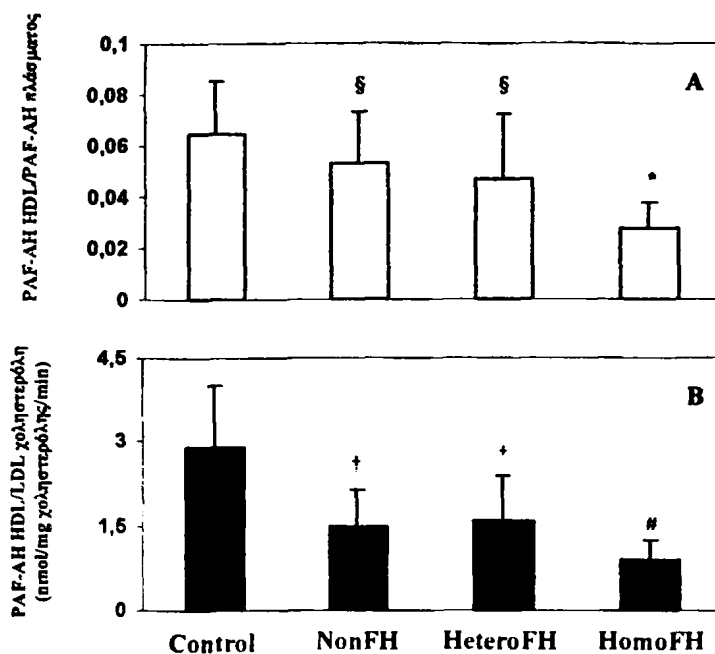
Εικόνα 6. Ενεργότητα της PAF-AH ανά ml πλάσματος (A) και ανά mg απολιποπρωτεΐνης B στους ασθενείς με πρωτοπαθή υπερχοληστερολαιμία. * $p < 0.000$ σε σύγκριση με όλες τις άλλες ομάδες, § $p < 0.03$ σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου, † $p < 0.03$ σε σύγκριση με τους ετεροζυγότες και † $p < 0.001$ σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου και τους ασθενείς με πολυγονική υπερχοληστερολαιμία.

Πρέπει να σημειωθεί ότι οι ενεργότητες του ενζύμου του πλάσματος στους 5 ομοζυγότες που μελετήθηκαν κυμάνθηκαν μεταξύ 100 και 173 nmol/ml plasma/min και ήταν τουλάχιστο διπλάσιες από τη μέση τιμή της ενεργότητας στην ομάδα των υγιών εθελοντών (54.63 ± 26.86 nmol/ml plasma/min). Τέλος, οι ασθενείς με ετερόζυγη οικογενή υπερχοληστερολαιμία εμφάνισαν σημαντικά υψηλότερες τιμές του ενζύμου στο πλάσμα σε σύγκριση με τους ασθενείς με μη οικογενή υπερχοληστερολαιμία (86.19 ± 27.20 vs 64.44 ± 12.13 nmol/ml plasma/min).

Όταν η ενζυμική ενεργότητα του πλάσματος εκφράσθηκε ανά mg αποπρωτεΐνης B οι ασθενείς με οικογενή υπερχοληστερολαιμία εμφάνισαν υψηλότερες τιμές σε σύγκρισή τόσο με τους ασθενείς με πολυγονική υπερχοληστερολαιμία όσο και με τους υγιείς μάρτυρες (εικόνα 6B). Επιπρόσθετα, οι ομοζυγότες εμφάνισαν υψηλότερη ενζυμική ενεργότητα ανά mg αποπρωτεΐνης B σε σύγκριση με τους ετεροζυγότες, ενώ δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές στις τιμές αυτής της παραμέτρου μεταξύ των ασθενών με πολυγονική υπερχοληστερολαιμία και των υγιών μαρτύρων. Είναι γνωστό ότι κάθε σωματίδιο των VLDL, IDL και LDL περιέχει μόνο ένα μόριο απολιποπρωτεΐνης B. Κατά συνέπεια, η ενζυμική ενεργότητα εκφρασμένη ανά mg απολιποπρωτεΐνης B ουσιαστικά αντικατοπτρίζει την ενεργότητα της PAF-AH ανά σωματίδιο αυτών των λιποπρωτεϊνών. Το γεγονός ότι οι ασθενείς με οικογενή υπερχοληστερολαιμία εμφάνισαν υψηλότερη ενεργότητα της PAF-AH ανά mg απολιποπρωτεΐνης B σε σύγκριση με τις άλλες ομάδες της μελέτης αποτελεί μια έμμεση ένδειξη για τον εμπλουτισμό των λιποπρωτεϊνικών σωματιδίων αυτών των ασθενών με ενζυμική ενεργότητα.

Σε αντίθεση με τις υψηλότερες τιμές του ενζύμου του πλάσματος στους υπερχοληστερολαιμικούς ασθενείς το ένζυμο των HDL δεν διέφερε σημαντικά μεταξύ των ομάδων της μελέτης (3.6 ± 1.1 για τους ομοζυγότες ασθενείς, 3.9 ± 1.5 για τους ετεροζυγότες, 3.2 ± 1.5 για τους ασθενείς με μη οικογενή υπερχοληστερολαιμία και τέλος 3.4 ± 1.5 nmol/ml plasma/min για τους ασθενείς της ομάδας ελέγχου). Έτσι, ο λόγος της PAF-AH των HDL προς την ενζυμική ενεργότητα του πλάσματος ήταν χαμηλότερος σε όλες τις ομάδες των ασθενών με υπερχοληστερολαιμία σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου, γεγονός που υποδηλώνει ότι οι υπερχοληστερολαιμικοί ασθενείς εμφανίζουν διαταραχή της κατανομής της ενεργότητας της PAF-AH μεταξύ των λιποπρωτεϊνών που περιέχουν απολιποπρωτεΐνη B και αυτών που περιέχουν αποπρωτεΐνη A1. Αυτή η διαταραχή χαρακτηρίζεται από σημαντική μείωση του λόγου της PAF-AH των HDL προς την ενζυμική ενεργότητα του πλάσματος και είναι συνάρτηση της βαρύτητας της υπερχοληστερολαιμίας (εικόνα 7A). Επιπρόσθετα, όλες οι ομάδες των ασθενών παρουσίασαν σημαντικά χαμηλότερες τιμές αυτού του λόγου της ενεργότητας του ενζύμου των HDL προς την LDL χοληστερόλη σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου (εικόνα 7B), ενώ παρόμοια αποτελέσματα προέκυψαν και για το λόγο της ενεργότητας των HDL προς τη μάζα των LDL. Και στις δύο περιπτώσεις, η μείωση αυτών των λόγων στους υπερχοληστερολαιμικούς ασθενείς εμφάνισε θετική συσχέτιση με τη βαρύτητα της υπερχοληστερολαιμίας.





Εικόνα 7. Λόγος της PAF-AH των HDL προς την PAF-AH του πλάσματος (A) και την LDL χοληστερόλη σε όλες της ομάδες της μελέτης. * $p < 0.01$ σε σύγκριση με όλες τις άλλες ομάδες, [§] $p < 0.05$ σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου, [#] $p < 0.001$ σε σύγκριση με όλες τις άλλες ομάδες και [†] $p < 0.001$ σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου.

Μάζα και χημική σύσταση των λιποπρωτεϊνικών υποκλασμάτων: όλες οι ομάδες των ασθενών εμφάνισαν σημαντικά υψηλότερη μάζα των LDL σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου (πίνακας 7). Επιπρόσθετα, διαφορές στη μάζα των LDL παρατηρήθηκαν και μεταξύ των ομάδων των ασθενών. Έτσι, οι ομοζυγότες εμφάνισαν τις υψηλότερες τιμές της μάζας της LDL (583.6 ± 64.1 mg/dl), οι ετεροζυγότες ενδιάμεσες τιμές (461.5 ± 78.5 mg/dl) και οι ασθενείς με μη οικογενή υπερχοληστερολαιμία τις μικρότερες τιμές της μάζας της LDL (361.6 ± 15.6 mg/dl). Ο διαχωρισμός των λιποπρωτεϊνών στα επιμέρους υποκλάσματά τους έδειξε ότι οι διαφορές αυτές στη μάζα των LDL οφείλονταν κατά κύριο λόγο σε αντίστοιχες διαφορές στη μάζα των υποκλασμάτων LDL-2 και LDL-3 μεταξύ των ομάδων των ασθενών (πίνακας 7). Αντίθετα, οι συγκεντρώσεις των μικρών, πυκνών σωματιδίων των LDL δεν διέφεραν σημαντικά μεταξύ των ομάδων της μελέτης. Όταν η μάζα των LDL υποκλασμάτων εκφράσθηκε σαν επι τοις εκατό ποσοστό της συνολικής μάζας των LDL, το υποκλάσμα LDL-3 ήταν το ποσοτικά επικρατέστερο υποκλάσμα σε όλες τις ομάδες των ασθενών (πίνακας 8).

Πίνακας 7. Συγκεντρώσεις των λιποπρωτεϊνικών υποκλασμάτων στις ομάδες της μελέτης.

	Συγκέντρωση (mg/dL)				P
	Controls	nonFH	HeteroFH	HomoFH	
VLDL+IDL	44.1±24.1	48.8±7.7	42.3±20.5	39.1±12.3	NS
Total LDL	306.8±107.6	361.6±15.6 ⁺⁺	461.5±78.5 ^{+++,*}	583.6±64.1 ^{++++,***,§§}	0.000
LDL-1	27.6±10.6	34.2±9.1	31.1±13.1	53.2±28.4 ^{+,§}	NS
LDL-2	50.4±26.8	56.3±4.9	72.7±19.2	127.5±44.8 ^{!!!,***,§§§}	0.000
LDL-3	111.9±43.9	131.4±5.9	197.9±26.1 ^{+++,*}	244.7±10.3 ^{+++,*}	0.000
LDL-4	82.5±41.4	103.1±11.6	123.8±27.5 ⁺⁺	124.2±8.8 ⁺⁺	0.016
LDL-5	34.3±3.6	36.6±15.1	35.7±8.1	33.9±7.9	NS
Total HDL	318.1±74.6	351.1±55.1	234.3±23.9 ^{++,*}	168.5±36.9 ^{+++,*}	0.000
HDL-2	113.4±54.2	144.1±40.5	68.1±11.6 ^{++,*}	53.6±27.2 ^{++,*}	0.000
HDL-3	165.1±20.6	172.6±27.7	138.7±12.4 ^{++,*}	91.5±13.3 ^{+++,*}	0.000
VHDL	40.8±7.1	34.3±10.9	27.2±5.4 ⁺⁺⁺	23.2±6.7 ^{+++,*}	0.001

Οι τιμές αντιπροσωπεύουν τη μέση τιμή ± σταθερή απόκλιση. Τα σύμβολα ^{+,++,+++} αντιπροσωπεύουν συγκρίσεις με την ομάδα ελέγχου, οι τιμές του P είναι <0.05, <0.01 και <0.001, αντίστοιχα. Τα σύμβολα ^{*,**,*} αντιπροσωπεύουν συγκρίσεις με την ομάδα των NonFH, οι τιμές του P είναι <0.05, <0.01 και <0.001, αντίστοιχα. Τα σύμβολα ^{§,§§,§§§} αντιπροσωπεύουν συγκρίσεις με την ομάδα των HeteroFH, οι τιμές του P είναι <0.05, <0.01 και <0.001, αντίστοιχα.

Ωστόσο, στους ασθενείς με οικογενή υπερχοληστερολαιμία η αναλογία αυτού του υποκλάσματος ήταν σημαντικά μεγαλύτερη σε σύγκριση με τις ομάδες των ασθενών με μη οικογενή υπερχοληστερολαιμία και των υγιών εθελοντών. Αντίθετα, η επι τοις εκατό αναλογία του πυκνού υποκλάσματος LDL-5 ήταν σημαντικά χαμηλότερη στους ασθενείς με οικογενή υπερχοληστερολαιμία σε σύγκριση με τις άλλες ομάδες της μελέτης (πίνακας 8). Τέλος, πρέπει να σημειωθεί ότι δεν παρατηρήθηκαν διαφορές στη χημική σύσταση των επιμέρους υποκλασμάτων των LDL μεταξύ των ομάδων των ασθενών. Σε αντίθεση με τις διαφορές στη μάζα των LDL, η μάζα των VLDL+IDL δεν διέφερε σημαντικά μεταξύ των ομάδων της μελέτης. Οι ασθενείς με οικογενή υπερχοληστερολαιμία εμφάνισαν σημαντικά χαμηλότερα επίπεδα της μάζας των HDL σε σύγκριση με τις άλλες ομάδες της μελέτης (πίνακας 7). Οι διαφορές αυτές οφείλονταν σε αντίστοιχες διαφορές στη μάζα όλων των HDL υποκλασμάτων.



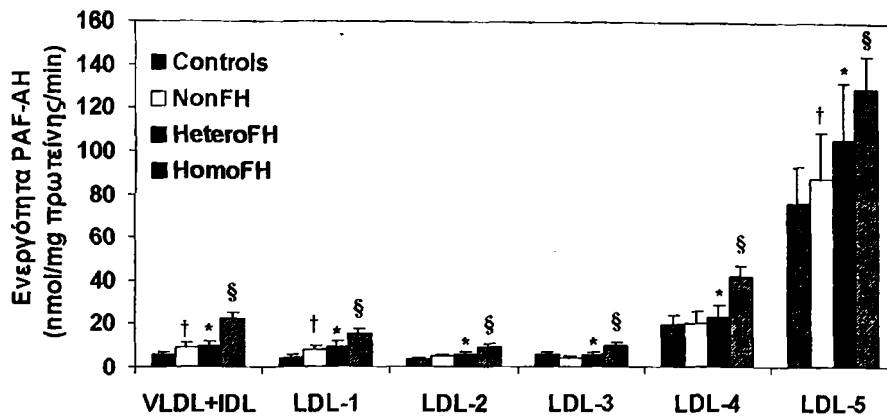
Όταν η μάζα των HDL υποκλασμάτων εκφράσθηκε σαν επι τοις εκατό αναλογία της συνολικής μάζας των HDL το υποκλάσμα HDL-3 ήταν το επικρατέστερο ποσοτικά υποκλάσμα σε όλες τις ομάδες της μελέτης. Τέλος, δεν παρατηρήθηκαν διαφορές μεταξύ των ομάδων αναφορικά με την επι τοις εκατό αναλογία των HDL υποκλασμάτων (πίνακας 7) ή τη χημική τους σύσταση.

Πίνακας 8. Επι τοις εκατό κατανομή της συγκέντρωσης των λιποπρωτεϊνικών υποκλασμάτων.

	% της ολικής μάζας των LDL				P
	Controls	nonFH	HeteroFH	HomoFH	
LDL-1	8.5±4.	9.5±2.8	6.4±1.9	8.8±4.3	NS
LDL-2	17.1±8.9	15.6±1.6	15.5±2.2	21.3±5.4 [§]	NS
LDL-3	36.3±7.6	36.3±1.6	43.3±4.2 ^{*·}	42.2±3.6 ^{*·}	0.012
LDL-4	26.1±9.8	28.4±2.2	26.8±3.4	21.6±3.8	NS
LDL-5	12.1±2.9	10.1±3.7	7.8±1.3 ^{**}	5.9±2.1 ^{***}	0.000

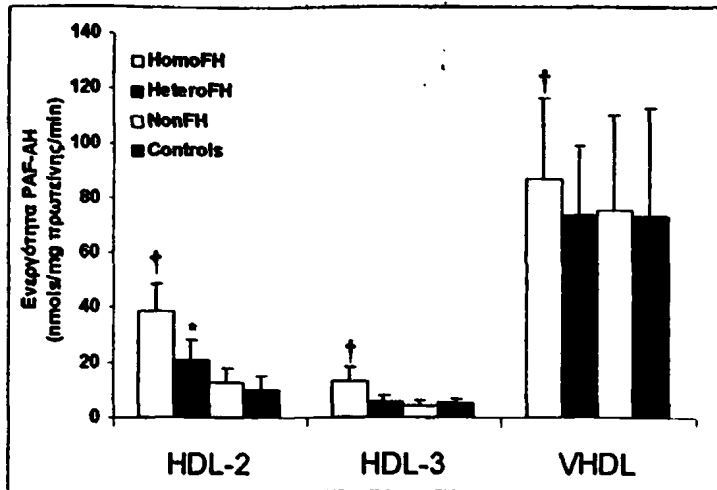
Οι τιμές αντιπροσωπεύουν τη μέση τιμή ± σταθερή απόκλιση. Τα σύμβολα ^{***} αντιπροσωπεύουν συγκρίσεις με την ομάδα ελέγχου, οι τιμές του P είναι <0.05 και <0.001, αντίστοιχα. Τα σύμβολα ^{**} αντιπροσωπεύουν συγκρίσεις με την ομάδα NonFH, οι τιμές του P είναι <0.05 και <0.01, αντίστοιχα. Το σύμβολο [§] αντιπροσωπεύει συγκρίσεις με την ομάδα HeteroFH, οι τιμές του P είναι <0.05.

Ενεργότητα της PAF-AH στα λιποπρωτεϊνικά υποκλάσματα: μεταξύ των λιποπρωτεϊνών που περιέχουν αποπρωτεΐνη B η ενεργότητα της PAF-AH (εκφρασμένη είτε ανά ml πλάσματος, είτε ανά mg πρωτεΐνης) συσχετιζόνταν εκλεκτικά με τα μικρά, πυκνά LDL υποκλάσματα σε όλες τις ομάδες των ασθενών. Όπως φαίνεται στην εικόνα 8 οι ασθενείς με οικογενή υπερχοληστερολαιμία εμφάνισαν σημαντικά υψηλότερη ενεργότητα της PAF-AH σε όλα τα υποκλάσματα της LDL σε σύγκριση με τις άλλες ομάδες της μελέτης. Επιπρόσθετα, οι ομοζυγότες παρουσίασαν υψηλότερη ενεργότητα του ενζύμου σε όλα τα υποκλάσματα των LDL σε σύγκριση με τους ετεροζυγότες. Τέλος, οι ασθενείς με μη οικογενή υπερχοληστερολαιμία παρουσίασαν σημαντικά υψηλότερη ενεργότητα του ενζύμου στα υποκλάσματα VLDL+IDL, LDL-1 και LDL-5 σε σύγκριση με τους ασθενείς της ομάδας ελέγχου. Σε όλες τις ομάδες της μελέτης η συνολική ενεργότητα της PAF-AH του πλάσματος εμφάνισε θετική συσχέτιση με την ενεργότητα των LDL-4 και LDL-5 υποκλασμάτων.



Εικόνα 8. Ενεργότητα της PAF-AH στα υποκλάσματα των λιποπρωτεϊνών που περιέχουν απολιποπρωτεΐνη Β σε όλες τις ομάδες των υπερχοληστερολαιμικών ασθενών. § $p < 0.001$ σε σύγκριση με την ενεργότητα του αντίστοιχου υποκλάσματος σε όλες τις άλλες ομάδες, * $p < 0.01$ σε σύγκριση με την ενεργότητα του αντίστοιχου υποκλάσματος της ομάδας ελέγχου και των ασθενών με πολυγονική υπερχοληστερολαϊμία και † $p < 0.03$ σε σύγκριση με την ενεργότητα του αντίστοιχου υποκλάσματος της ομάδας ελέγχου.

Οι ασθενείς με ομόζυγη οικογενή υπερχοληστερολαϊμία παρουσίασαν σημαντικά υψηλότερη ειδική ενεργότητα της PAF-AH (ενεργότητα εκφρασμένη ανά mg πρωτεΐνης) σε όλα τα υποκλάσματα της HDL σε σύγκριση με τις άλλες ομάδες της μελέτης (εικόνα 9). Επιπρόσθετα, οι ετεροζυγότες παρουσίασαν σημαντικά υψηλότερη ειδική ενζυμική ενεργότητα στο HDL-2 υποκλάσμα σε σύγκριση με τους ασθενείς με μη οικογενή υπερχοληστερολαϊμία και τους ασθενείς της ομάδας ελέγχου. Αυτά τα αποτελέσματα, σε συνδυασμό με την παρατήρηση ότι οι ασθενείς με οικογενή υπερχοληστερολαϊμία εμφανίζουν χαμηλότερα επίπεδα απολιποπρωτεΐνης ΑΙ (δηλαδή της κυριότερης δομικής πρωτεΐνης των HDL) σε σύγκριση με τις άλλες ομάδες της μελέτης, εξηγούν γιατί η ενεργότητα της PAF-AH των HDL είναι παρόμοια σε όλες τις ομάδες της μελέτης όταν εκφραστεί ανά ml πλάσματος. Τέλος, δεν παρατηρήθηκαν διαφορές στη ειδική ενεργότητα των HDL υποκλασμάτων μεταξύ των ασθενών με μη οικογενή υπερχοληστερολαϊμία και των ασθενών της ομάδας ελέγχου.



Εικόνα 9. Ενεργότητα της PAF-AH στα υποκλάσματα της HDL στους ασθενείς με πρωτοπαθή υπερχοληστερολαιμία. † $p < 0.05$ σε σύγκριση με την ενεργότητα των αντίστοιχων υποκλασμάτων όλων των άλλων ομάδων, * $p < 0.05$ σε σύγκριση με την ενεργότητα των αντίστοιχων υποκλασμάτων των ατόμων της ομάδας ελέγχου και των ασθενών με πολυγονική υπερχοληστερολαιμία.

VII.3 Μελέτη της επίδρασης των υπολιπιδαιμικών φαρμάκων στην ενεργότητα της PAF-AH σε ασθενείς με πρωτοπαθείς δυσλιπιδαιμίες

Τα χαρακτηριστικά των ασθενών που έλαβαν ατορβαστατίνη και φενοφιβράτη, καθώς και των αντίστοιχων ομάδων ελέγχου παρουσιάζονται στους πίνακες 9 και 10, αντίστοιχα.

Πίνακας 9. Χαρακτηριστικά των ασθενών με δυσλιπιδαιμία τύπου ΙΙΑ και ΙΙΒ.

	Τύπου ΙΙΑ	Τύπου ΙΙΒ
Αριθμός	55	21
Άνδρες / Γυναίκες	22 / 33	10 / 11
Μέση ηλικία (εύρος), έτη	49 (10-68)	52 (31-69)
BMI, Kg/m ²	24.1±3.6	26.6±4.3
Καπνιστές / Μη καπνιστές	29 / 26	12 / 9

Πίνακας 10. Κλινικά χαρακτηριστικά των ασθενών της μελέτης.

Παράμετροι	Τύπου ΙΙΑ	Τύπου ΙΙΒ	Τύπου ΙV	p
Αριθμός	18	23	30	
Φύλο (άνδρες/γυναίκες)	8/10	14/9	13/17	NS
Καπνιστές / Μη καπνιστές	7/11	10/13	12/18	NS
Ηλικία (έτη)	54.2 ± 10.8	51.5 ± 11.4	51.1 ± 11.7	NS
BMI (kg/m ²)	25.8 ± 3.9	26.6 ± 4.5	28.1 ± 4.4	NS

Επίδραση των υπολιπιδαιμικών φαρμάκων στα επίπεδα των λιπιδίων: η χορήγηση ατορβαστατίνης προκάλεσε σημαντική μείωση των επιπέδων της ολικής και LDL χοληστερόλης, καθώς και των συγκεντρώσεων των απολιποπρωτεϊνών Β και Ε και στις δύο ομάδες των ασθενών (πίνακας 11). Σημαντική μείωση παρατηρήθηκε και στα επίπεδα των τριγλυκεριδίων. Ωστόσο, η μείωση αυτή ήταν μεγαλύτερη στους ασθενείς με δυσλιπιδαιμία τύπου ΙΙΒ (-8.2% και -36.5% για τους ασθενείς με δυσλιπιδαιμία τύπου ΙΙΑ και ΙΙΒ, αντίστοιχα). Τέλος, το φάρμακο



Πίνακας 11. Επίδραση της ατορβαστατίνης στο λιπιδαιμικό προφίλ των ασθενών με διαβητική τύπου IIA και IIB.

	Τύπου IIA			Τύπου IIB		
	Πριν τη Θεραπεία	Μετά τη Θεραπεία	P	Πριν τη Θεραπεία	Μετά τη Θεραπεία	P
Χοληστερόλη, mg/dL	347.5±73.2	260.7±54.6	0.000	318.4±45.4	220.1±43.2	0.000
Τριγλυκερίδια, mg/dL	121.9±45.6	111.9±36.6	0.048	287.9±83.2	182.8±73.3	0.000
HDL χοληστερόλη, mg/dL	50.8±13.1	49.8±11.4	NS	44.1±10.1	47.7±15.8	NS
LDL χοληστερόλη, mg/dL	272.2±71.7	189.7±55.4	0.000	211.6±33.1	132.4±36.9	0.000
ΑποΛι, mg/dL	146.1±27.1	145.4±22.4	NS	154.2±27.6	158.3±37.1	NS
ΑποΒ, mg/dL	179.8±39.7	134.5±34.1	0.000	170.4±31.6	113.1±24.5	0.000
ΑποΕ, mg/dL	49.9±11.1	41.7±8.3	0.000	62.8±15.3	43.2±10.4	0.000
Lp(a), mg/dL	12.0(0.8-50.0)	15.5(1.3-67.0)	NS	13.2(0.8-67.0)	16.1(1.2-41.2)	NS

Οι τιμές αντιπροσωπεύουν τη μέση τιμή ± σταθερή απόκλιση. Για τη σύγκριση των τιμών πριν και μετά τη θεραπεία χρησιμοποιήθηκε το paired t-test. Για τη σύγκριση των τιμών της Lp(a) χρησιμοποιήθηκε το Wilcoxon matched-pairs test. Οι τιμές του P < 0.05 θεωρήθηκαν στατιστικά σημαντικές.

Πίνακας 12. Επίδραση της φενοφιβράτης στο λιπιδαιμικό προφίλ των ασθενών της μελέτης.

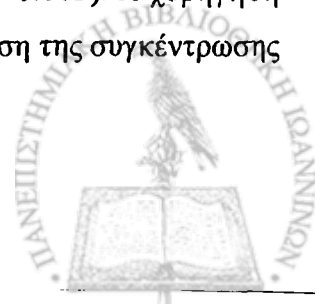
	Τύπου IIA (n=18)			Τύπου IIB (n=23)			Τύπου IV (n=30)		
	Πριν τη Θεραπεία	Μετά τη Θεραπεία	P	Πριν τη Θεραπεία	Μετά τη Θεραπεία	P	Πριν τη Θεραπεία	Μετά τη Θεραπεία	P
Χοληστερόλη	271.4 ± 32.6	217.8 ± 36.3	0.000	296.3 ± 31.9	237.7 ± 34.5	0.000	237.1 ± 38.8	219.6 ± 36.7	<0.01
Τριγλυκερίδια	151.1 ± 34.6	116.1 ± 41.1	0.000	318.3 ± 92.7	177.5 ± 70.6	0.000	395.8 ± 179.3	219.7 ± 104.7	0.000
LDL χοληστερόλη	193.7 ± 31.8	149.9 ± 34.3	0.000	193.5 ± 27.8	157.4 ± 32.3	0.000	127.8 ± 28.5	136.3 ± 34.6	NS
HDL χοληστερόλη	47.5 ± 12.8	46.6 ± 11.7	NS	39.2 ± 5.4	44.8 ± 8.2	<0.001	32.5 ± 5.3	38.8 ± 10.6	<0.01
ΑποΒ	139.6 ± 27.0	107 ± 21.7	0.000	156.3 ± 20.0	126.6 ± 23.2	0.000	127.1 ± 19.3	117 ± 26.9	<0.05
ΑποΛι	142.3 ± 26.2	137.2 ± 19.3	NS	144.5 ± 18.0	159.4 ± 24.2	<0.005	127.3 ± 20.7	139.3 ± 21.6	<0.05
ΑποΕ	4.0 ± 0.9	3.3 ± 0.9	<0.05	6.1 ± 2.6	3.8 ± 1.0	0.000	6.4 ± 2.6	4.6 ± 1.6	0.000

Οι τιμές αντιπροσωπεύουν τη μέση τιμή ± σταθερή απόκλιση. Για τη σύγκριση των τιμών πριν και μετά τη θεραπεία χρησιμοποιήθηκε η δοκιμασία paired t-test και τιμές του p<0.05 θεωρήθηκαν στατιστικά σημαντικές.

δεν προκάλεσε μεταβολή των επιπέδων της HDL χοληστερόλης και της λιποπρωτεΐνης (a), καθώς και της απολιποπρωτεΐνης ΑΙ σε καμία από τις ομάδες των ασθενών.

Η φενοφιβράτη προκάλεσε σημαντική μείωση των επιπέδων της ολικής χοληστερόλης, των τριγλυκεριδίων και των απολιποπρωτεϊνών Β και Ε σε όλες τις ομάδες των ασθενών (πίνακας 12). Επιπρόσθετα, το φάρμακο προκάλεσε μείωση των τιμών της LDL χοληστερόλης στους ασθενείς με δυσλιπιδαιμία τύπου ΙΑ και ΙΒ (κατά 22.2% και 18.1%, αντίστοιχα), αλλά όχι στους ασθενείς με δυσλιπιδαιμία τύπου ΙV. Έτσι, στους ασθενείς με δυσλιπιδαιμία τύπου ΙV η μείωση της ολικής χοληστερόλης οφείλονταν κατά κύριο λόγο στη μείωση των VLDL+IDL σωματιδίων. Τέλος, η χορήγηση της φενοφιβράτης είχε σαν αποτέλεσμα την αύξηση των επιπέδων της HDL χοληστερόλης και της απολιποπρωτεΐνης ΑΙ στους ασθενείς με δυσλιπιδαιμία τύπου ΙΒ και ΙV. Παρόλα αυτά, το φάρμακο δεν τροποποίησε σημαντικά τα επίπεδα αυτών των παραμέτρων στους ασθενείς με δυσλιπιδαιμία τύπου ΙΑ.

Επίδραση των υπολιπιδαιμικών φαρμάκων στη συγκέντρωση και επι τοις εκατό κατανομή των λιποπρωτεϊνικών υποκλασμάτων: Το 3ο υποκλάσμα της LDL (LDL-3) ήταν αυτό με τη μεγαλύτερη συγκέντρωση στους ασθενείς με δυσλιπιδαιμία τύπου ΙΑ πριν την έναρξη της αγωγής με ατορβαστατίνη (πίνακας 13). Το φάρμακο προκάλεσε σημαντική μείωση της συγκέντρωσης των VLDL+IDL, καθώς και της ολικής μάζας των LDL σε αυτή την ομάδα των ασθενών. Ο διαχωρισμός των LDL στα επιμέρους υποκλάσματά τους έδειξε ότι η μείωση της ολικής μάζας των LDL οφείλονταν κατά κύριο λόγο στη μείωση της συγκέντρωσης των αραιών και ενδιάμεσης πυκνότητας υποκλασμάτων (LDL-1 ως LDL-3). Αντίθετα, η συγκέντρωση των μικρών, πυκνών LDL υποκλασμάτων δεν μεταβλήθηκε σημαντικά (πίνακας 13). Κατά συνέπεια, όταν η συγκέντρωση κάθε υποκλάσματος εκφράστηκε σαν επί τοις εκατό ποσοστό της συνολικής μάζας των LDL η ποσοστιαία αναλογία των μικρών, πυκνών υποκλασμάτων εμφάνισε σημαντική αύξηση μετά τη χορήγηση του φαρμάκου (εικόνα 10). Πρέπει να σημειωθεί ότι η χορήγηση της ατορβαστατίνης δεν μετέβαλλε σημαντικά τη χημική σύσταση των υποκλασμάτων της LDL στους ασθενείς με δυσλιπιδαιμία τύπου ΙΑ. Επιπρόσθετα, το φάρμακο δεν επηρέασε τη συγκέντρωση, την κατανομή και τη χημική σύσταση των υποκλασμάτων της HDL σε αυτή την ομάδα των ασθενών. Σε αντίθεση με τους ασθενείς με δυσλιπιδαιμία τύπου ΙΑ, το 4ο υποκλάσμα της LDL (LDL-4) ήταν αυτό με τη μεγαλύτερη συγκέντρωση στους ασθενείς με δυσλιπιδαιμία τύπου ΙΒ (πίνακας 13). Πρίν την έναρξη της αγωγής η μάζα των μικρών, πυκνών υποκλασμάτων της LDL (LDL-4 και LDL-5) εμφάνισε θετική συσχέτιση με τα επίπεδα των τριγλυκεριδίων του ορού ($r=0.72$, $p<0.003$). Η χορήγηση της ατορβαστατίνης σε αυτούς τους ασθενείς προκάλεσε σημαντική μείωση της συγκέντρωσης



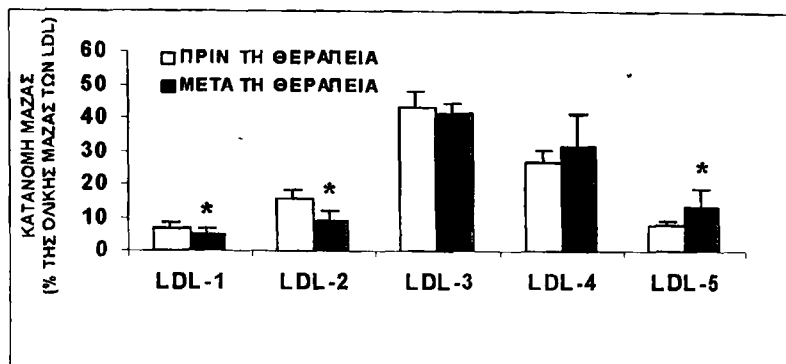
των VLDL+IDL καθώς και της ολικής μάζας των LDL. Η μείωση αυτή οφείλονταν στη μείωση της συγκέντρωσης όλων των υποκλασμάτων της LDL (πίνακας 13). Έτσι, η ποσοστιαία αναλογία των LDL υποκλασμάτων δεν μεταβλήθηκε σημαντικά μετά τη χορήγηση του φαρμάκου (εικόνα 11). Η μείωση της συγκέντρωσης των μικρών πυκνών υποκλασμάτων της LDL στους ασθενείς με δυσλιπιδαιμία τύπου IIB εμφάνισε θετική συσχέτιση με τη μείωση της συγκέντρωσης των τριγλυκεριδίων του ορού ($r=0.63$, $p<0.015$).

Πίνακας 13. Επίδραση της ατορβαστατίνης στη μάζα των λιποπρωτεϊνικών υποκλασμάτων στους ασθενείς με δυσλιπιδαιμία τύπου IIA και IIB.

	Τύπου IIA			Τύπου IIB		
	Πριν τη θεραπεία	Μετά τη θεραπεία	P	Πριν τη θεραπεία	Μετά τη θεραπεία	P
VLDL+IDL	42.3±21.7	25.7±8.5	0.05	121.6±47.6	63.4±21.0	0.005
Ολική LDL	461.2±83.2	340.1±80.1	0.04	428.1±72.6	288.2±68.1	0.000
LDL-1	31.0±13.9	14.1±4.6	0.05	36.8±10.4	23.8±7.7	0.027
LDL-2	72.7±20.4	29.8±7.3	0.012	54.2±14.4	30.9±10.8	0.001
LDL-3	197.9±27.6	140.3±35.1	0.006	127.7±29.7	77.3±24.9	0.000
LDL-4	123.8±29.2	112.6±54.5	NS	154.5±47.1	121.3±55.9	0.05
LDL-5	35.7±8.5	43.1±5.5	NS	54.7±20.8	34.8±9.7	0.009
Ολική HDL	234.1±25.3	228.4±25.7	NS	261.3±60.4	247.6±67.2	NS
HDL-2	68.1±12.3	60.3±12.2	NS	88.3±34.8	83.2±36.6	NS
HDL-3	138.7±13.1	139.2±17.5	NS	143.2±29.5	135.1±34.1	NS
VHDL	27.2±5.8	28.9±8.3	NS	29.7±7.2	29.3±10.4	NS

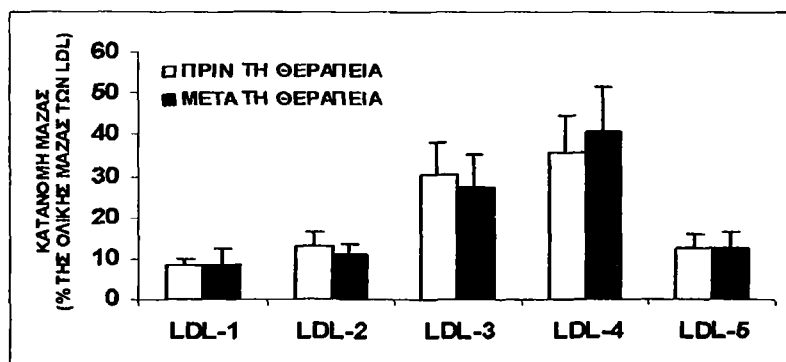
Οι τιμές αντικροσωμαεύουν τη μέση τιμή ± σταθερή απόκλιση. Η δοκιμασία paired t-test χρησιμοποιήθηκε για τη σύγκριση των τιμών πριν και μετά τη θεραπεία και οι τιμές του P <0.05 θεωρήθηκαν στατιστικά σημαντικές.

Σε αντίθεση με τους ασθενείς με δυσλιπιδαιμία τύπου IIA, η χορήγηση της ατορβαστατίνης στους ασθενείς με δυσλιπιδαιμία τύπου IIB προκάλεσε σημαντικές μεταβολές στη χημική σύσταση των λιποπρωτεϊνικών υποκλασμάτων. Συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε σημαντική μείωση της αναλογίας των εστέρων της χοληστερόλης στις VLDL+IDL (από $27.4 \pm 5.3\%$ σε $22.4 \pm 7.5\%$, $p<0.02$), η οποία συνοδεύονταν από αύξηση της αναλογίας των τριγλυκεριδίων (από $35.3 \pm 7.5\%$ σε $43.7 \pm 9.3\%$, $p<0.02$).



Εικόνα 10. Επίδραση της ατορβαστατίνης στην κατανομή της μάζας των υποκλασμάτων της LDL στους ασθενείς με δυσλιπιδαιμία τύπου IIΑ. * $p < 0.05$ σε σύγκριση με τις τιμές πριν την έναρξη της αγωγής.

Έτσι, ο λόγος των εστέρων της χοληστερόλης προς τα τριγλυκερίδια στις VLDL+IDL μειώθηκε σημαντικά μετά τη χορήγηση του φαρμάκου (από 0.84 ± 0.38 σε 0.56 ± 0.30 , $p < 0.03$). Παρόμοια μείωση του λόγου των εστέρων της χοληστερόλης προς τα τριγλυκερίδια παρατηρήθηκε και σε όλα τα υποκλάσματα της LDL. Ωστόσο, οι μεταβολές αυτές ήταν στατιστικά σημαντικές μόνο στα υποκλάσματα LDL-1 και LDL-2 (από 1.68 ± 0.71 σε 1.10 ± 0.64 στο LDL-1, $p < 0.005$ και από 3.29 ± 1.42 σε 1.82 ± 0.99 στο LDL-2, $p < 0.02$).



Εικόνα 11. Επίδραση της ατορβαστατίνης στην κατανομή της μάζας των υποκλασμάτων της LDL στους ασθενείς με δυσλιπιδαιμία τύπου IIΒ.

Το αντίθετο φαινόμενο, δηλαδή αύξηση των εστέρων της χοληστερόλης και μείωση της αναλογίας των τριγλυκεριδίων με αποτέλεσμα αύξηση του λόγου των εστέρων της χοληστερόλης προς τα τριγλυκερίδια, παρατηρήθηκε σε όλα τα υποκλάσματα των HDL.



Ωστόσο, οι μεταβολές αυτές δεν ήταν στατιστικά σημαντικές. Τέλος η χορήγηση του φαρμάκου δεν επηρέασε σημαντικά τη μάζα και την κατανομή των υποκλασμάτων των HDL στους ασθενείς με δυσλιπιδαιμία τύπου ΙΙΒ.

Η επίδραση της φενοφιβράτης στη μάζα και την κατανομή των υποκλασμάτων των λιποπρωτεϊνών που περιέχουν αποπρωτεΐνη Β έχει μελετηθεί διεξοδικά¹⁵⁰. Είναι γνωστό ότι το φάρμακο προκαλεί μείωση της συγκέντρωσης των μικρών πυκνών υποκλασμάτων της LDL, η οποία συνοδεύεται από αύξηση της συγκέντρωσης των υποκλασμάτων ενδιάμεσης πυκνότητας^{150,252,429}. Αυτές οι μεταβολές οφείλονται τόσο στη μείωση της συγκέντρωσης των πλούσιων σε τριγυκερίδια λιποπρωτεϊνών, όσο και στην τροποποίηση της ενεργότητας των ενζύμων τα οποία συμμετέχουν στον ενδοαγγειακό μεταβολισμό των LDL σωματιδίων (CETP)¹⁵⁰. Ωστόσο, ένα από τα βασικότερα χαρακτηριστικά της δράσης των φιβρατών είναι η επίδρασή τους στο μεταβολισμό και τις ενζυμικές ενεργότητες των HDL. Έτσι, στην παρούσα μελέτη επιλέξαμε να επικεντρώσουμε το ενδιαφέρον μας στην επίδραση του φαρμάκου στην κατανομή και την ενεργότητα της PAF-AH των υποκλασμάτων των HDL. Όπως φαίνεται στον πίνακα 14 τα υποκλάσματα HDL-2a και HDL-3a ήταν τα ποσοτικά επικρατέστερα υποκλάσματα των HDL σε όλες τις ομάδες των ασθενών.

Πίνακας 14. Επίδραση της φενοφιβράτης στη συγκέντρωση των υποκλασμάτων της HDL.

	Τύπου ΙΙΑ		Τύπου ΙΙΒ		Τύπου ΙV	
	Πριν τη θεραπεία	Μετά τη θεραπεία	Πριν τη θεραπεία	Μετά τη θεραπεία	Πριν τη θεραπεία	Μετά τη θεραπεία
HDL-2b	55.1±7.1	53.2±9.4	48.9±8.2	47.4±10.1	47.7±11.2	45.2±8.9
HDL-2a	68.9±12.4	69.7±14.2	58.7±10.4 ^a	70.0±11.8 ^d	51.0±12.5 ^{bc}	64.2±8.4 ^d
HDL-3a	72.1±14.7	74.4±10.9	59.9±12.1 ^a	73.8±13.2 ^d	52.9±7.9 ^{bc}	68.1±10.8 ^d
HDL-3b	30.0±8.8	32.3±11.3	31.7±7.5	33.6±10.4	30.6±6.8	34.1±9.4
HDL-3c	29.9±6.9	31.4±9.3	31.8±6.3	29.2±8.0	29.8±9.2	28.4±10.6

^aP<0.03 και ^bP<0.02 σε σύγκριση με την ομάδα των ασθενών με δυσλιπιδαιμία τύπου ΙΙΑ πριν την έναρξη της θεραπείας, ^cP<0.05 σε σύγκριση με την ομάδα των ασθενών με δυσλιπιδαιμία τύπου ΙΙΒ πριν την έναρξη της θεραπείας και ^dP<0.03 σε σύγκριση με τις τιμές πριν της έναρξη της αγωγής.

Τόσο οι ασθενείς με δυσλιπιδαιμία τύπου ΙΙΒ, όσο και οι ασθενείς με δυσλιπιδαιμία τύπου ΙV εμφάνισαν σημαντικά χαμηλότερη συγκέντρωση αυτών των υποκλασμάτων σε σύγκριση με τους υγιείς μάρτυρες και τους ασθενείς με δυσλιπιδαιμία τύπου ΙΙΑ. Επιπρόσθετα, οι ασθενείς με δυσλιπιδαιμία τύπου ΙV εμφάνισαν σημαντικά χαμηλότερη συγκέντρωση αυτών των

υποκλασμάτων σε σύγκριση με τους ασθενείς με δυσλιπιδαιμία τύπου ΙΙΒ. Η χορήγηση φενοφιβράτης προκάλεσε σημαντική αύξηση της μάζας των υποκλασμάτων HDL-2a και HDL-3a στους ασθενείς με δυσλιπιδαιμία τύπου ΙΙΒ και ΙV, χωρίς ωστόσο να επηρεάσει τη συγκέντρωση των υπόλοιπων υποκλασμάτων των HDL. Τέλος, το φάρμακο δεν μετέβαλλε σημαντικά τη μάζα των υποκλασμάτων των HDL στους ασθενείς με δυσλιπιδαιμία τύπου ΙΙΑ.

Επίδραση των υπολιπιδαιμικών φαρμάκων στην ενεργότητα της PAF-AH: όπως φαίνεται στον πίνακα 15 και οι δύο ομάδες των ασθενών που έλαβαν ατορβαστατίνη εμφάνισαν σημαντικά υψηλότερη ενεργότητα της PAF-AH του πλάσματος σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου. Επιπρόσθετα, οι ασθενείς με δυσλιπιδαιμία τύπου ΙΙΑ εμφάνισαν υψηλότερη ενεργότητα σε σύγκριση με τους ασθενείς με δυσλιπιδαιμία τύπου ΙΙΒ (πίνακας 15).

Όταν οι ασθενείς με δυσλιπιδαιμία τύπου ΙΙΑ χωρίστηκαν με βάση την υποκείμενη γενετική διαταραχή του μεταβολισμού των λιπιδίων, οι ασθενείς με οικογενή υπερχοληστερολαιμία παρουσίασαν σημαντικά υψηλότερη ενζυμική ενεργότητα στο πλάσμα (95.7 ± 30.5 nmol/ml plasma/min) σε σύγκριση με τους ασθενείς με μη οικογενή υπερχοληστερολαιμία (70.0 ± 15.2 nmol/ml plasma/min). Οι ασθενείς με δυσλιπιδαιμία τύπου ΙΙΒ εμφάνισαν χαμηλότερη ενεργότητα της PAF-AH των HDL σύγκριση τόσο με την ομάδα ελέγχου, όσο και με την ομάδα των ασθενών με δυσλιπιδαιμία τύπου ΙΙΑ, οι οποίες ωστόσο δεν διέφεραν μεταξύ τους στα επίπεδα αυτής της παραμέτρου. Επιπρόσθετα, δεν παρατηρήθηκαν διαφορές στα επίπεδα της PAF-AH των HDL μεταξύ των ασθενών με οικογενή υπερχοληστερολαιμία και αυτών με μη οικογενή υπερχοληστερολαιμία. Τέλος, ο λόγος της PAF-AH των HDL προς την LDL χοληστερόλη ήταν σημαντικά χαμηλότερος και στις δύο ομάδες των ασθενών σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου.

Η ατορβαστατίνη προκάλεσε σημαντική μείωση της PAF-AH του πλάσματος και στις δύο ομάδες των ασθενών (πίνακας 15). Συγκεκριμένα, στους ασθενείς με δυσλιπιδαιμία τύπου ΙΙΒ η ενζυμική ενεργότητα του πλάσματος μειώθηκε κατά 42.4% και προσέγγισε έτσι τα επίπεδα της PAF-AH της ομάδας ελέγχου, ενώ στους ασθενείς με δυσλιπιδαιμία τύπου ΙΙΑ η ενεργότητα του πλάσματος μειώθηκε μόνο κατά 28.6%. Οι διαφορές μεταξύ των δύο ομάδων στην ανταπόκριση



Πίνακας 15. Επίδραση της αορθασαταίνης στις ενζυμικές ενεργότητες της PAF-AH στους ασθενείς με δυσλιπιδαιμία τύπου IIA και IIB.

	Ομάδα ελέγχου		Τύπου IIA		Τύπου IIB	
	Πριν τη θεραπεία	Μετά τη θεραπεία	Πριν τη θεραπεία	Μετά τη θεραπεία	Πριν τη θεραπεία	Μετά τη θεραπεία
PAF-AH (nmol/mL/min)	43.8 ± 13.0	87.1 ± 29.0**	62.2 ± 22.2 ^{§§} **	73.5 ± 14.8** ^{##}	42.3 ± 9.5 ^{§§} **	
PAF-AH των HDL ₂ (nmol/mL/min)	3.5 ± 1.3	3.8 ± 1.6	3.4 ± 1.2	2.2 ± 1.2** ^{##}	2.4 ± 0.8** ^{##}	
HDL-PAF-AH / LDL χοληστερόλη (nmol/mg/min)	3.20 ± 1.65	1.45 ± 0.74**	1.90 ± 0.97 ^{§§} **	1.05 ± 0.54**	2.01 ± 0.79 ^{§§} **	

[§]P<0.05 και ^{§§}P<0.001 σε σύγκριση με τις τιμές πριν την έναρξη της θεραπείας, *P<0.05 και **P<0.001 σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου, ^{##}P<0.001 και ^{###}P<0.05 σε σύγκριση με την ομάδα των ασθενών με δυσλιπιδαιμία τύπου IIA την ίδια χρονικά στιγμή (πριν ή μετά τη θεραπεία).

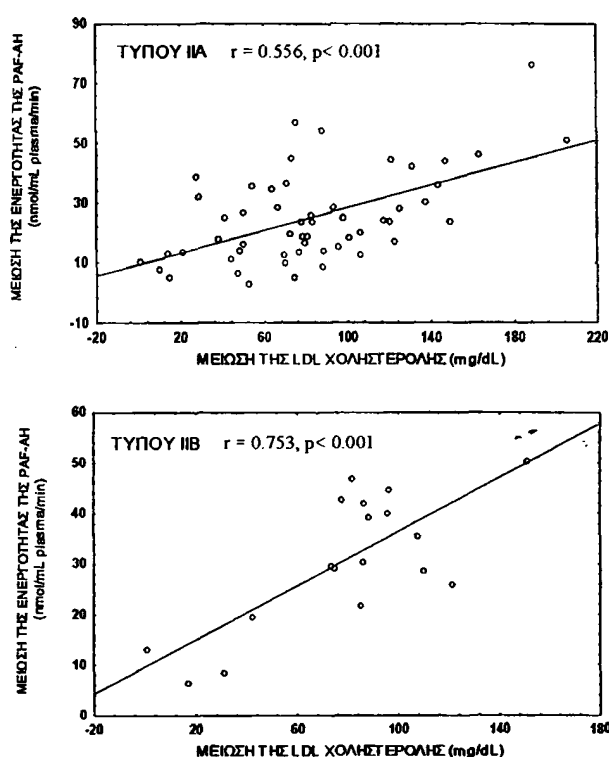
Πίνακας 16. Επίδραση της φenoφιβράτης στις ενεργότητες της PAF-AH στους ασθενείς με δυσλιπιδαιμία τύπου IIA, IIB και IV.

Ομάδα ελέγχου	Τύπου IIA		Τύπου IIB		Τύπου IV	
	Πριν τη θεραπεία	Μετά τη θεραπεία	Πριν τη θεραπεία	Μετά τη θεραπεία	Πριν τη θεραπεία	Μετά τη θεραπεία
PAF-AH πλάσματος, (nmol/mL/min)	48.8±13.3	63.63 ± 23.8**	45.9 ± 12.52 [§]	78.1 ± 19.5**	56.7 ± 18.4 ^{§§} *	66.13 ± 25.16**
HDL-PAF-AH (nmol/mL/min)	3.3±1.3	3.22±0.89	3.13 ± 0.92	2.37 ± 0.79**	2.71 ± 0.76 [§] *	1.78 ± 0.43** ^{##}
HDL-PAF-AH / LDL-C (nmol/mg LDL-C/min)	2.6±1.5	1.4 ± 0.6*	2.1 ± 0.8 [§] *	1.2 ± 0.4*	1.8 ± 0.8 ^{§§} *	1.4 ± 0.5**

Οι μεταβλητές παρουσιάζονται σαν μέση τιμή ± σταθερή απόκλιση. Για τη σύγκριση των τιμών πριν και μετά τη θεραπεία χρησιμοποιήθηκε το paired t-test, ενώ οι συγκρίσεις μεταξύ των ομάδων έγινε με ανάλυση της μεταβλητότητας σε μια διεύθυνση (one-way ANOVA) σε συνδιασμό με τη δοκιμασία των ελαχίστων σημαντικών διαφορών (LSD, least significant differences test). Οι τιμές του P < 0.05 θεωρήθηκαν στατιστικά σημαντικές. [§]P<0.05 και ^{§§}P<0.001 σε σύγκριση με τις τιμές πριν τη θεραπεία, *P<0.05 και **P<0.001 σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου, ^{##}P<0.001 και ^{###}P<0.05 σε σύγκριση με τους ασθενείς με δυσλιπιδαιμία τύπου IIA και ^{###}P<0.05 σε σύγκριση με τους ασθενείς με δυσλιπιδαιμία τύπου IIB.

LDL-C: LDL χοληστερόλη.

Πράγματι, ο διαχωρισμός των ατόμων αυτής της ομάδας ανάλογα με το είδος της υποκείμενης γενετικής διαταραχής έδειξε ότι ενώ η ενεργότητα της PAF-AH του πλάσματος στους ασθενείς με μη οικογενή υπερχοληστερολαμία προσεγγίζει τα επίπεδα της ομάδας ελέγχου μετά τη χορήγηση του φαρμάκου (48.4 ± 12.9 nmol/ml plasma/min), οι ασθενείς με οικογενή υπερχοληστερολαμία εμφανίζουν μικρότερη μείωση της ενζυμικής ενεργότητας, η οποία παραμένει σημαντική υψηλότερη από την αντίστοιχη της ομάδας ελέγχου μετά την ολοκλήρωση της θεραπείας (69.1 ± 22.7 nmol/ml plasma/min). Η μείωση της ενζυμικής ενεργότητας του πλάσματος συσχετίζονταν σημαντικά με τη μείωση των επιπέδων της LDL χοληστερόλης και στις δύο ομάδες των ασθενών (εικόνα 12).



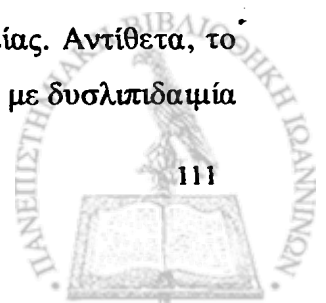
Εικόνα 12. Συσχέτιση της μείωσης της ενεργότητας της PAF-AH με τη μείωση της LDL χοληστερόλης.

Σε αντίθεση με την επίδρασή της στην ενζυμική ενεργότητα του πλάσματος η ατορβαστατίνη δεν επηρέασε σημαντικά την PAF-AH των HDL σε καμία από τις ομάδες της μελέτης. Παρόμοια αποτελέσματα προέκυψαν και όταν οι ασθενείς με δυσλιπιδαιμία τύπου ΙΙΑ χωρίστηκαν σε δύο ομάδες ανάλογα με το είδος της υποκείμενης γενετικής διαταραχής. Ωστόσο, η χορήγηση του φαρμάκου οδήγησε σε σημαντική αύξηση του λόγου της PAF-AH των HDL προς την LDL χοληστερόλη και στις δύο ομάδες των ασθενών (31% στους ασθενείς με

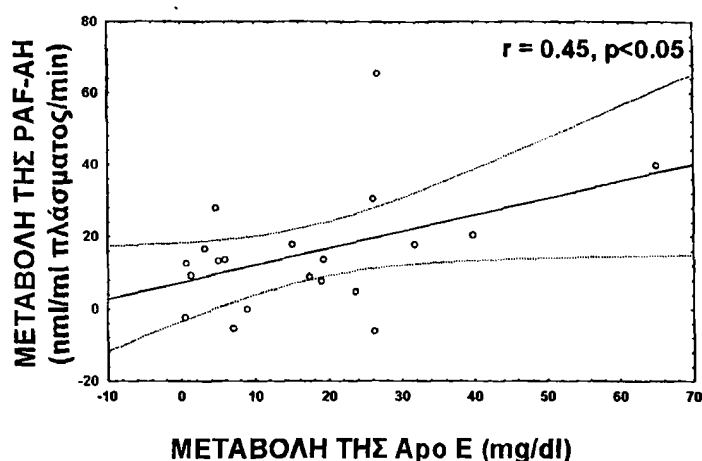
δυσλιπιδαιμία τύπου ΙΙΑ και 91% στους ασθενείς με δυσλιπιδαιμία τύπου ΙΙΒ, $p < 0.0002$ και για τις δύο συγκρίσεις), ενώ παρόμοια αποτελέσματα προέκυψαν και όταν η PAF-AH των HDL εκφράστηκε ανά mg μάζας των LDL ή ανά mg απολιποπρωτεΐνης Β (πίνακας 15).

Όλες οι ομάδες των ασθενών που έλαβαν φενοφιβράτη εμφάνισαν σημαντικά υψηλότερη ενεργότητα της PAF-AH του πλάσματος σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου (πίνακας 16). Επιπρόσθετα, διαφορές παρατηρήθηκαν και μεταξύ των ομάδων των ασθενών. Συγκεκριμένα, οι ασθενείς με δυσλιπιδαιμία τύπου ΙΙΒ εμφάνισαν υψηλότερη ενζυμική ενεργότητα στο πλάσμα σε σύγκριση με τους ασθενείς με δυσλιπιδαιμία τύπου ΙΙΑ και ΙV. Διαφορές παρατηρήθηκαν και στην ενεργότητα της PAF-AH των HDL. Έτσι, οι ασθενείς με δυσλιπιδαιμία τύπου ΙΙΒ και ΙV παρουσίασαν σημαντικά χαμηλότερη ενεργότητα στις HDL σε σύγκριση τόσο με τους ασθενείς με δυσλιπιδαιμία τύπου ΙΙΑ όσο και με τα άτομα της ομάδας ελέγχου. Επιπρόσθετα, οι ασθενείς με δυσλιπιδαιμία τύπου ΙV εμφάνισαν χαμηλότερη ενεργότητα στις HDL σε σύγκριση με τους ασθενείς με δυσλιπιδαιμία τύπου ΙΙΒ. Τέλος, όλες οι ομάδες των ασθενών εμφάνισαν χαμηλότερες τιμές του λόγου της PAF-AH των HDL προς την LDL χοληστερόλη σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου (πίνακας 16).

Η χορήγηση φενοφιβράτης είχε ως αποτέλεσμα τη σημαντική μείωση της PAF-AH του πλάσματος σε όλες τις ομάδες των δυσλιπιδαιμικών ασθενών (πίνακας 16). Συγκεκριμένα, στους ασθενείς με δυσλιπιδαιμία τύπου ΙΙΑ και ΙV η ενζυμική ενεργότητα του πλάσματος μειώθηκε κατά 28% και 22%, αντίστοιχα, προσεγγίζοντας έτσι τις τιμές της ομάδας ελέγχου. Αντίθετα, στους ασθενείς με δυσλιπιδαιμία τύπου ΙΙΒ η ενεργότητα της PAF-AH του πλάσματος (αν και μειώθηκε κατά 27% μετά τη χορήγηση του φαρμάκου) παρέμεινε σημαντικά αυξημένη σε σύγκριση με τις τιμές της ομάδας ελέγχου. Στους ασθενείς με δυσλιπιδαιμία τύπου ΙΙΑ και ΙΙΒ η μείωση της PAF-AH του πλάσματος εμφάνισε σημαντική συσχέτιση με τη μείωση της LDL χοληστερόλης ($r = 0.45$, $p < 0.005$ για τους ασθενείς με δυσλιπιδαιμία τύπου ΙΙΑ και $r = 0.53$, $p < 0.01$ για τους ασθενείς με δυσλιπιδαιμία τύπου ΙΙΒ). Αντίθετα, στους ασθενείς με δυσλιπιδαιμία τύπου ΙV η μείωση της ενζυμικής ενεργότητας του πλάσματος συσχετιζόταν μόνο με τις μεταβολές της συγκέντρωσης της απολιποπρωτεΐνης Ε (εικόνα 13). Σημαντικές μεταβολές παρατηρήθηκαν και στα επίπεδα της PAF-AH των HDL. Συγκεκριμένα, η φενοφιβράτη προκάλεσε σημαντική αύξηση της ενζυμικής ενεργότητας των HDL στους ασθενείς με δυσλιπιδαιμία τύπου ΙΙΒ και ΙV (κατά 14.3% και 28.2%, αντίστοιχα). Ωστόσο, σε αυτές τις ομάδες των ασθενών, οι τιμές της PAF-AH των HDL παρέμειναν χαμηλότερες από τις αντίστοιχες της ομάδας ελέγχου ακόμη και μετά από 16 εβδομάδες θεραπείας. Αντίθετα, το φάρμακο δεν μετέβαλλε σημαντικά την ενεργότητα των HDL στους ασθενείς με δυσλιπιδαιμία



τύπου ΙΙΑ. Τέλος, η φενοφιβράτη προκάλεσε σημαντική αύξηση του λόγου της PAF-AH των HDL προς την LDL χοληστερόλη σε όλες τις ομάδες των ασθενών.

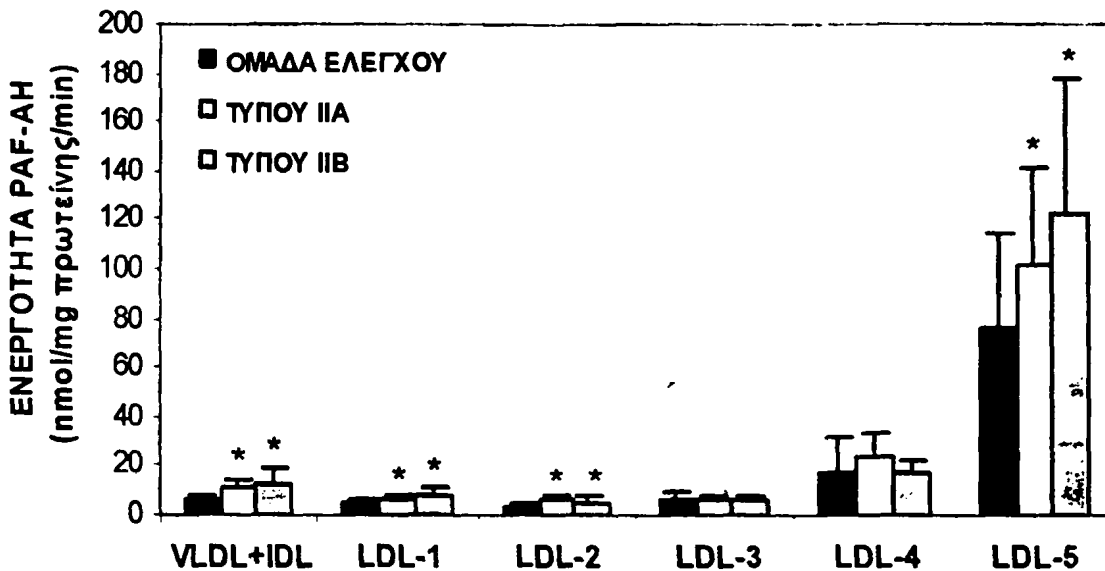


Εικόνα 13. Συσχέτιση της μείωσης της ενεργότητας της PAF-AH του πλάσματος με τη μείωση της συγκέντρωσης της απολιποπρωτεΐνης E στους ασθενείς με δυσλιπιδαιμία τύπου IV.

Επίδραση των υπολιπιδαιμικών φαρμάκων στην ενζυμική ενεργότητα των λιποπρωτεϊνικών υποκλασμάτων: η ενεργότητα της PAF-AH (εκφρασμένη είτε ανά ml πλάσματος είτε ανά mg πρωτεΐνης ή λιποπρωτεϊνικής μάζας) συσχετίζονταν εκλεκτικά με τα μικρά, πυκνά LDL υποκλάσματα και στις δύο ομάδες των ασθενών που έλαβαν ατορβαστατίνη πριν την έναρξη της αγωγής. Στην εικόνα 14 παρουσιάζεται η ενζυμική ενεργότητα των υποκλασμάτων των λιποπρωτεϊνών που περιέχουν αποπρωτεΐνη B, εκφρασμένη ανά mg πρωτεΐνης. Δεν παρατηρήθηκαν διαφορές στην ενζυμική ενεργότητα των λιποπρωτεϊνικών υποκλασμάτων μεταξύ των ασθενών με δυσλιπιδαιμία τύπου ΙΙΑ και αυτών με δυσλιπιδαιμία τύπου ΙΙΒ (εικόνα 14).

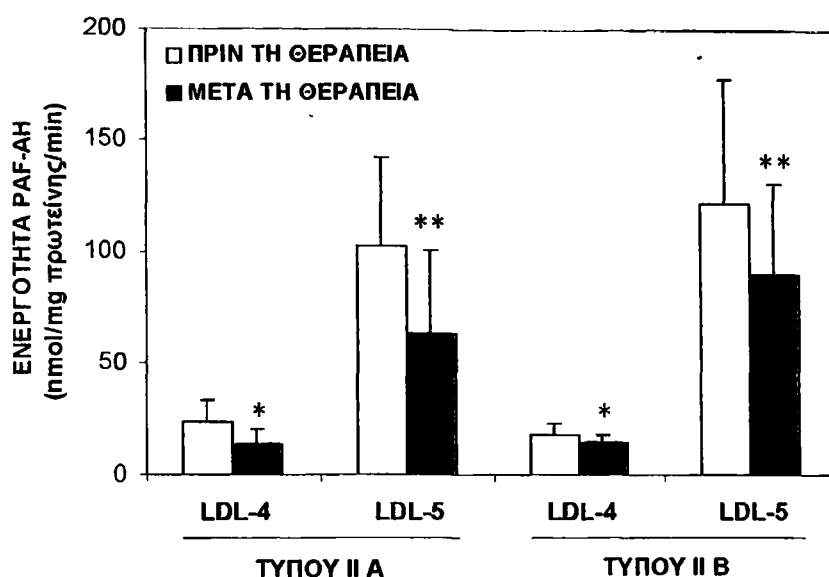
Ωστόσο και οι δύο ομάδες των ασθενών εμφάνισαν σημαντικά υψηλότερη ενεργότητα της PAF-AH στα υποκλάσματα VLDL+IDL, LDL-1, LDL-2 και LDL-5, σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου. Η ατορβαστατίνη προκάλεσε σημαντική μείωση της ενεργότητας της PAF-AH (εκφρασμένης ανά ml πλάσματος) σε όλα τα υποκλάσματα των λιποπρωτεϊνών που περιέχουν αποπρωτεΐνη B και στις δύο ομάδες των ασθενών (πίνακας 17). Αντίθετα όταν η ενζυμική ενεργότητα εκφράστηκε ανά mg πρωτεΐνης η μείωση αφορούσε εκλεκτικά τα μικρά, πυκνά υποκλάσματα της LDL (εικόνα 15). Τέλος, το φάρμακο δεν είχε σημαντική επίδραση στην ενεργότητα της PAF-AH των υποκλασμάτων των HDL σε καμία από τις ομάδες των ασθενών.

Σε όλες τις ομάδες των ασθενών που έλαβαν φενοφιβράτη, καθώς και στους υγιείς μάρτυρες η ενζυμική ενεργότητα της PAF-AH συσχετιζονταν εκλεκτικά με τα μικρά, πυκνά LDL υποκλάσματα. Τόσο οι ασθενείς με δυσλιπιδαιμία τύπου II_B, όσο και οι ασθενείς με δυσλιπιδαιμία τύπου IV εμφάνισαν σημαντικά υψηλότερη ενζυμική ενεργότητα στο υποκλάσμα VLDL+IDL σε σύγκριση με τις ομάδες των υγιών μαρτύρων και των ασθενών με δυσλιπιδαιμία τύπου II_A (πίνακας 18).



Εικόνα 14. Ενεργότητα της PAF-AH στα υποκλάσματα των λιποπρωτεϊνών που περιέχουν απολιποπρωτεΐνη Β στους ασθενείς με δυσλιπιδαιμία τύπου II_A και II_B και στην ομάδα ελέγχου. * $p < 0.001$ σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου.

Επιπρόσθετα, οι ασθενείς με δυσλιπιδαιμία τύπου IV εμφάνισαν υψηλότερη ενεργότητα της PAF-AH σε αυτό το υποκλάσμα σε σύγκριση με τους ασθενείς με δυσλιπιδαιμία τύπου II_B. Διαφορές παρατηρήθηκαν επίσης και στην ενζυμική ενεργότητα των μικρών, πυκνών υποκλασμάτων της LDL. Έτσι, οι ασθενείς με δυσλιπιδαιμία τύπου II_A και II_B εμφάνισαν σημαντικά υψηλότερη ενεργότητα της PAF-AH στα υποκλάσματα LDL-4 και LDL-5 σε σύγκριση με την ομάδα των ασθενών με δυσλιπιδαιμία τύπου IV και την ομάδα ελέγχου. Επιπρόσθετα, οι ασθενείς με δυσλιπιδαιμία τύπου II_B εμφάνισαν υψηλότερη ενζυμική ενεργότητα στο υποκλάσμα LDL-5 σε σύγκριση με τους ασθενείς με δυσλιπιδαιμία τύπου II_A. Η χορήγηση φενοφιβράτης προκάλεσε σημαντική μείωση της ενζυμικής ενεργότητας των υποκλασμάτων VLDL+IDL στους ασθενείς με δυσλιπιδαιμία τύπου II_B και IV (εικόνα 16A).



Εικόνα 15. Επίδραση της ατορβαστατίνης στην ενεργότητα της PAF-AH των μικρών, πυκνών υποκλασμάτων της LDL στους ασθενείς με δυσλιπιδαιμία τύπου II A και II B. * $p < 0.05$ και ** $p < 0.01$ σε σύγκριση με τις τιμές πριν την έναρξη της θεραπείας.

Το φαινόμενο αυτό οφείλονταν αποκλειστικά στη μείωση των VLDL+IDL σωματιδίων και όχι στη μείωση της ενζυμικής ενεργότητας ανά σωματίδιο δεδομένου ότι δεν παρατηρήθηκε παρόμοια μείωση στην ενεργότητα της PAF-AH όταν αυτή εκφράσθηκε ανά mg πρωτεΐνης (5.56 ± 2.8 vs 6.06 ± 2.68 nmol/mg protein/min για τους ασθενείς με δυσλιπιδαιμία τύπου II B και 6.8 ± 4.37 vs 6.28 ± 3.42 nmol/mg protein/min για τους ασθενείς με δυσλιπιδαιμία τύπου IV). Η χορήγηση του φαρμάκου προκάλεσε επίσης σημαντικές μεταβολές στην ενζυμική ενεργότητα των μικρών, πυκνών LDL υποκλασμάτων. Συγκεκριμένα, η χορήγηση φενοφιβράτης οδήγησε σε μείωση της ενεργότητας της PAF-AH στο υποκλάσμα LDL-5 σε όλες τις ομάδες των ασθενών. Επιπρόσθετα, οι ασθενείς με δυσλιπιδαιμία τύπου II A και II B εμφάνισαν μείωση της ενζυμικής ενεργότητας και στο υποκλάσμα LDL-4 μετά τη χορήγηση του φαρμάκου (εικόνα 16B). Τέλος, το φάρμακο δεν επηρέασε σημαντικά την ενζυμική ενεργότητα των αραιών και ενδιάμεσης πυκνότητας υποκλασμάτων της LDL σε καμία από τις ομάδες των ασθενών.

Πίνακας 17. Επίδραση της ατορβαστατίνης στην ενεργότητα της PAF-AH (πεφρασμένης ανά ml πλάσματος) των υποκλασμάτων των λιποπρωτεϊνών που περιέχουν απολιποπρωτεΐνη Β.

	Τύπου IIA			Τύπου IIB		
	Πριν τη θεραπεία	Μετά τη θεραπεία	P	Πριν τη θεραπεία	Μετά τη θεραπεία	P
	VLDL+IDL	0.49±0.22	0.29±0.11	0.05	1.77±0.98	0.90±0.66
LDL-1	0.25±0.16	0.18±0.07	0.05	0.43±0.19	0.23±0.08	0.002
LDL-2	0.62±0.22	0.23±0.07	0.000	0.50±0.29	0.32±0.14	0.001
LDL-3	1.54±0.52	0.73±0.22	0.000	1.20±0.55	0.67±0.45	0.000
LDL-4	4.28±1.36	1.78±0.84	0.000	2.68±1.18	1.83±1.33	0.003
LDL-5	7.84±3.61	4.56±2.24	0.000	16.87±8.3	9.50±4.54	0.000

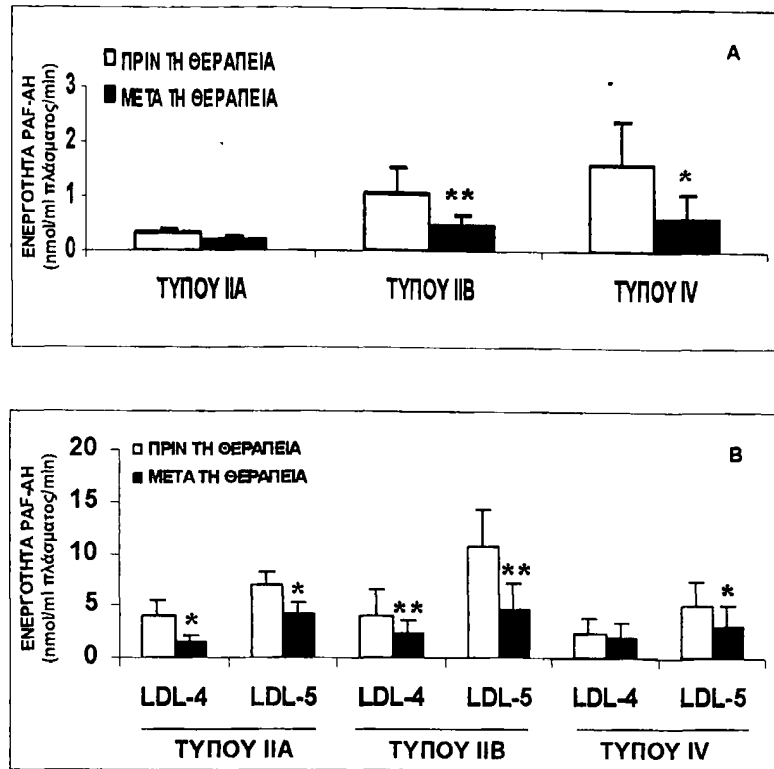
Οι τιμές αντιπροσωπεύουν τη μέση τιμή ± σταθερή απόκλιση. Η δοκιμασία paired t-test χρησιμοποιήθηκε για τη σύγκριση των τιμών πριν και μετά τη θεραπεία και οι τιμές του P <0.05 θεωρήθηκαν στατιστικά σημαντικές.

Πίνακας 18. Σύγκριση των ενεργοτήτων της PAF-AH στα υποκλάσματα των λιποπρωτεϊνών που περιέχουν απολιποπρωτεΐνη Β πριν την έναρξη της αγωγής.

Ομάδα ελέγχου	Ενεργότητα PAF-AH, nmol/ml πλάσμα/min			
	Type IIA	Type IIB	Type IV	P
VLDL+IDL	0.3±0.2	1.0±0.5 ^a	1.6±1.2 ^{a,b}	<0.05
LDL-1	0.1±0.1	0.4±0.3	0.1±0.1	NS
LDL-2	0.2±0.2	0.4±0.3	0.2±0.1	NS
LDL-3	0.5±0.4	0.9±0.6	0.5±0.4	NS
LDL-4	1.5±1.1	3.8±2.4 ^a	1.4±2.4 ^{a,b}	NS
LDL-5	5.0±2.8	10.2±3.6 ^{a,b}	4.9±2.5 ^{a,b}	<0.05

Για τη σύγκριση των τιμών πριν και μετά τη θεραπεία χρησιμοποιήθηκε το paired t-test, ενώ οι συγκρίσεις μεταξύ των ομάδων έγινε με ανάλυση της μεταβλητότητας σε μια διεύθυνση (one-way ANOVA) σε συνδυασμό με τη δοκιμασία των ελαχίστων σημαντικών διαφορών (LSD, least significant differences test). Οι τιμές του P < 0.05 θεωρήθηκαν στατιστικά σημαντικές.

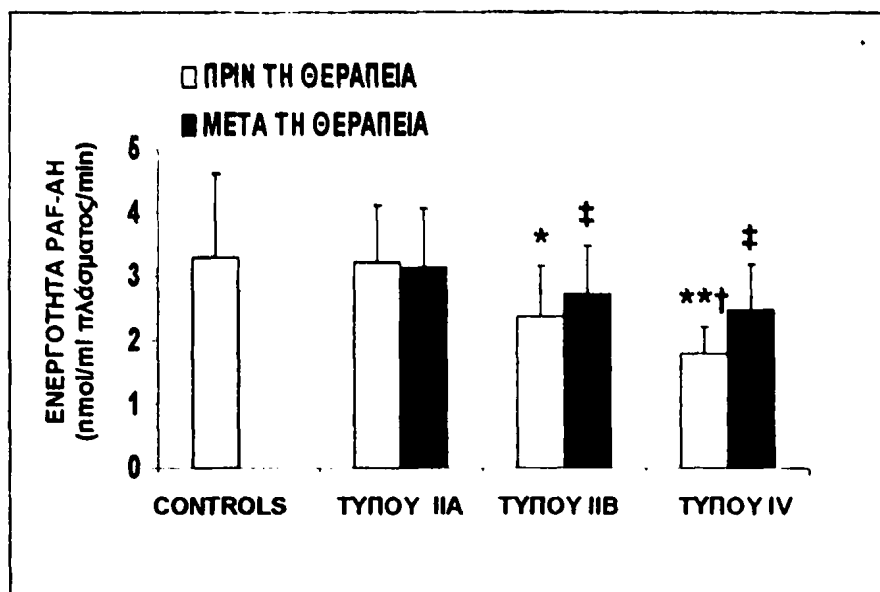
* P<0.05 σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου, ^a p<0.05 σε σύγκριση με τους ασθενείς με δυσλιπιδαιμία τύπου IIA και ^b p<0.05 σε σύγκριση με τους ασθενείς με δυσλιπιδαιμία τύπου IIB.



Εικόνα 16. Επίδραση της φενοφιβράτης στην ενεργότητα της PAF-AH των VLDL+IDL υποκλασμάτων (A), καθώς και των μικρών πυκνών υποκλασμάτων της LDL (B). * $p < 0.05$ και ** $p < 0.01$ σε σύγκριση με τις τιμές πριν την έναρξη της θεραπείας.

Η ενζυμική ενεργότητα της PAF-AH των HDL συσχετίζονταν εκλεκτικά με τα μικρά, πυκνά HDL υποκλάσματα (HDL-3c) σε όλες τις ομάδες των ασθενών, καθώς και στους υγιείς μάρτυρες. Οι ασθενείς με δυσλιπιδαιμία τύπου IIb και IV εμφάνισαν σημαντικά χαμηλότερη ενεργότητα στο υποκλάσμα HDL-3c σε σύγκριση με τους υγιείς μάρτυρες και τους ασθενείς με δυσλιπιδαιμία τύπου IIa (εικόνα 17). Επιπρόσθετα, οι ασθενείς με δυσλιπιδαιμία τύπου IV εμφάνισαν σημαντικά χαμηλότερη ενεργότητα σε αυτό το υποκλάσμα σε σύγκριση με τους ασθενείς με δυσλιπιδαιμία τύπου IIb, ενώ τέλος, δεν παρατηρήθηκαν διαφορές στην ενεργότητα αυτού του υποκλάσματος μεταξύ της ομάδας ελέγχου και των ασθενών με δυσλιπιδαιμία τύπου IIa. Η ενζυμική ενεργότητα των υπόλοιπων υποκλασμάτων της HDL δεν διέφερε σημαντικά μεταξύ των ομάδων της μελέτης. Η χορήγηση φενοφιβράτης προκάλεσε σημαντική αύξηση της ενεργότητας του υποκλάσματος HDL-3c στους ασθενείς με δυσλιπιδαιμία τύπου IIb και IV (εικόνα 17), χωρίς ωστόσο να επηρεάσει την ενζυμική ενεργότητα των άλλων υποκλασμάτων

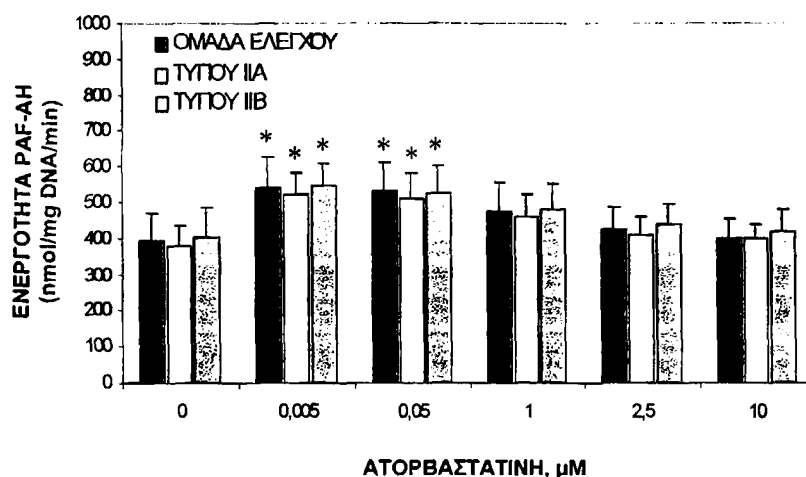
της HDL. Τέλος, το φάρμακο δεν είχε σημαντική επίδραση στην ενζυμική ενεργότητα των υποκλασμάτων της HDL στους ασθενείς με δυσλιπιδαιμία τύπου ΙΙΑ.



Εικόνα 17. Επίδραση της φenoφιβράτης στην ενζυμική ενεργότητα του υποκλάσματος HDL-3c σε όλες τις ομάδες των ασθενών. * $p < 0.05$ και ** $p < 0.01$ σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου, † $p < 0.05$ σε σύγκριση με τους ασθενείς με δυσλιπιδαιμία τύπου ΙΙΒ και † $p < 0.05$ σε σύγκριση με τις τιμές πριν την έναρξη της θεραπείας.

Επίδραση των υπολιπιδαιμικών φαρμάκων στην παραγωγή της PAF-AH από τα μακροφάγα: για τη μελέτη της επίδρασης της ατορβαστατίνης στην παραγωγή και έκκριση του ενζύμου απομονώθηκαν και επώασθηκαν μονοκύτταρα περιφερικού αίματος από 8 άτομα κάθε ομάδας. Οι επώσεις έγιναν για 24 ή 48 ώρες χρησιμοποιώντας διάφορες συγκεντρώσεις ατορβαστατίνης, οι οποίες κυμαίνονταν από 0.005 μέχρι 10 $\mu\text{mol/l}$. Στις καλλιέργειες κυττάρων από άτομα της ομάδας ελέγχου, τα οποία επώασθηκαν απουσία του φαρμάκου παρατηρήθηκε σταθερή αύξηση της ολικής ενεργότητας της PAF-AH (εκκρινόμενης και ενδοκυττάριας) με την πάροδο του χρόνου. Έτσι, στις 24 ώρες η ολική ενεργότητα έφτασε τα 244 ± 66 nmol/mg DNA/hour, ενώ στις 48 ώρες τα 494 ± 97 nmol/mg DNA/hour. Αυτή η αύξηση αφορούσε κυρίως την εκκρινόμενη ενζυμική ενεργότητα η οποία ήταν 146 ± 32 nmol/mg DNA/hour στις 24 ώρες (60% της ολικής) και 395 ± 73 nmol/mg DNA/hour στις 48 ώρες (80% της ολικής). Παρόμοια αποτελέσματα παρατηρήθηκαν και όταν μακροφάγα των ασθενών με δυσλιπιδαιμία τύπου ΙΙΑ και ΙΙΒ επώασθηκαν απουσία φαρμάκου. Η προσθήκη ατορβαστατίνης σε χαμηλές δόσεις (0.005 έως 0.05 $\mu\text{mol/l}$) στο καλλιεργητικό μέσο είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση της

εκκρινόμενης ενζυμικής ενεργότητας στις 48 ώρες σε όλες τις ομάδες της μελέτης. Επιπρόσθετα, παρατηρήθηκε μια μικρή αύξηση της ενδοκυττάριας ενεργότητας, η οποία όμως δεν ήταν στατιστικά σημαντική. Συνολικά, η προσθήκη του φαρμάκου σε χαμηλές δόσεις στις καλλιέργειες των μακροφάγων είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση της ολικής ενεργότητας της PAF-AH κατά $33 \pm 8\%$ σε όλες τις ομάδες των ασθενών ($p < 0.01$). Ωστόσο, σε αντίθεση με τα παραπάνω, η προσθήκη μεγαλύτερων συγκεντρώσεων ατορβαστατίνης στο μέσο της καλλιέργειας δεν επηρέασε σημαντικά την παραγωγή και έκκριση του ενζύμου από τα μακροφάγα (εικόνα 18).



Εικόνα 18. Επίδραση της ατορβαστατίνης στην έκκριση της PAF-AH από τα μακροφάγα. $p < 0.01$ σε σύγκριση με την παραγωγή του ενζύμου πριν την προσθήκη του φαρμάκου.

Προκειμένου να εξετασθεί ο μηχανισμός διαμέσου του οποίου η ατορβαστατίνη σε μικρές συγκεντρώσεις αυξάνει την παραγωγή του ενζύμου από τα μακροφάγα, προσδιορίστηκαν τα επίπεδα του mRNA της PAF-AH πριν και μετά την προσθήκη του φαρμάκου στις κυτταροκαλλιέργειες. Η ατορβαστατίνη δεν προκάλεσε σημαντικές μεταβολές των επιπέδων του mRNA του ενζύμου των μακροφάγων. Κατά συνέπεια, οι χαμηλές συγκεντρώσεις του φαρμάκου αυξάνουν την παραγωγή της PAF-AH δρώντας σε μετα-μεταγραφικό (posttranscriptional) επίπεδο.

Προκειμένου να μελετηθεί η επίδραση της φενοφιβράτης στην παραγωγή και έκκριση της PAF-AH απομονώθηκαν και αναπτύχθηκαν σε καλλιέργεια μονοκύτταρα από 6 ασθενείς κάθε ομάδας. Η επώαση των μακροφάγων των υγιών μαρτύρων σε DMSO απουσία φαρμάκου είχε ως αποτέλεσμα τη σταθερή αύξηση της ολικής ενζυμικής ενεργότητας. Η αύξηση αυτή αφορούσε τόσο την εκκρινόμενη (178 ± 46 και 323 ± 97 nmol/mg DNA/hour στις 24 και 48 ώρες,

αντίστοιχα) όσο και την ενδοκυττάρια ενζυμική ενέργεια (51 ± 18 και 84 ± 36 nmol/mg DNA/hour στις 24 και 48 ώρες, αντίστοιχα). Παρόμοια αποτελέσματα προέκυψαν και όταν μακροφάγα ασθενών και από τις 3 ομάδες της μελέτης (τύπου IIΑ, IIΒ και IV) επώασηκαν απουσία φαρμάκου. Ωστόσο, η προσθήκη φενοφιβράτης στο καλλιεργητικό μέσο, σε συγκεντρώσεις οι οποίες κυμαίνονταν από 50-300 μM , δεν μετέβαλλε σημαντικά το ρυθμό παραγωγής και έκκρισης του ενζύμου σε καμία από τις ομάδες της μελέτης.

VIII. ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Είναι γνωστό ότι οι ασθενείς με διαταραχές του μεταβολισμού των λιπιδίων αντιπροσωπεύουν μια ομάδα υψηλού κινδύνου για την εμφάνιση καρδιαγγειακής νόσου¹⁵. Ωστόσο, η πρόγνωση διαφέρει ανάλογα με τη βαρύτητα και τον τύπο της υπερχοληστερολαιμίας. Η οικογενής υπερχοληστερολαιμία είναι μια συγγενής διαταραχή του μεταβολισμού των λιπιδίων που οφείλεται σε ποσοτικές ή ποιοτικές διαταραχές των LDL υποδοχέων και χαρακτηρίζεται από πολύ υψηλές συγκεντρώσεις ολικής και LDL χοληστερόλης, καθώς και από αυξημένη επίπτωση πρώιμης καρδιαγγειακής νόσου¹⁰⁰. Μέχρι σήμερα δεν υπάρχουν σαφή δεδομένα για την ενεργότητα της PAF-AH στους ασθενείς με οικογενή υπερχοληστερολαιμία, καθώς και για το ρόλο του ενζύμου στην παθογένεια της πρώιμης αθηρωματικής νόσου που χαρακτηρίζει αυτή τη διαταραχή. Έτσι, κάποιες μελέτες έδειξαν ότι οι ασθενείς με ομόζυγη οικογενή υπερχοληστερολαιμία εμφανίζουν μικρότερη ειδική ενεργότητα της PAF-AH (ενεργότητα ανά mg πρωτεΐνης) στα σωματίδια των LDL σε σύγκριση με τους υγιείς μάρτυρες⁴³⁰. Παρόλα αυτά, επειδή ο αριθμός των LDL σωματιδίων στην οικογενή υπερχοληστερολαιμία είναι αυξημένος, η συνολική ενεργότητα της PAF-AH του πλάσματος στους ομοζυγότες ήταν παρόμοια με αυτή της ομάδας ελέγχου⁴³⁰. Σε αντίθεση με τα παραπάνω, μια πιο πρόσφατη μελέτη έδειξε ότι οι ασθενείς με ετερόζυγη οικογενή υπερχοληστερολαιμία εμφανίζουν υψηλότερη ειδική ενεργότητα της PAF-AH στα υποκλάσματα της LDL, καθώς και υψηλότερη ολική ενεργότητα του ενζύμου στο πλάσμα σε σύγκριση με τους υγιείς μάρτυρες³⁹⁰. Αυτά τα αποτελέσματα επιβεβαιώθηκαν και από τη μελέτη των Guerra και συνεργατών οι οποίοι διαπίστωσαν ότι οι ασθενείς με ετερόζυγη οικογενή υπερχοληστερολαιμία έχουν 2 έως 3 φορές υψηλότερη ενεργότητα της PAF-AH στο πλάσμα σε σύγκριση με τα μέλη των οικογενειών τους που δεν εμφανίζουν τη νόσο³⁵³. Στη μελέτη αυτή δείξαμε για πρώτη φορά στη διεθνή βιβλιογραφία ότι τόσο οι ομοζυγότες, όσο και οι ετεροζυγότες με οικογενή υπερχοληστερολαιμία εμφανίζουν υψηλότερα επίπεδα της PAF-AH στο πλάσμα σε σύγκριση με τους υγιείς μάρτυρες. Παρόμοια αύξηση των τιμών του ενζύμου του πλάσματος παρατηρήθηκε και στους ασθενείς με μη οικογενείς διαταραχές του μεταβολισμού της χοληστερόλης (πολυγονική, μη οικογενής υπερχοληστερολαιμία). Ένα άλλο σημαντικό εύρημα της μελέτης μας είναι ότι ο βαθμός της αύξησης της ενεργότητας του ενζύμου του πλάσματος εξαρτάται από τη βαρύτητα της διαταραχής του μεταβολισμού των LDL. Έτσι, οι ομοζυγότες εμφανίζουν πολύ υψηλή ενεργότητα της PAF-AH του πλάσματος, οι ετεροζυγότες εμφανίζουν ενδιάμεσες τιμές, ενώ οι ασθενείς με πολυγονική, μη οικογενή υπερχοληστερολαιμία εμφανίζουν τις μικρότερες τιμές



ενζυμικής ενεργότητας. Αυτές οι διαφορές στην ενεργότητα της PAF-AH του πλάσματος μεταξύ των ασθενών με υπερχοληστερολαιμία και των υγιών ατόμων δεν συνοδεύονταν από αντίστοιχες διαφορές στην ενζυμική ενεργότητα των HDL. Κατά συνέπεια, οι υπερχοληστερολαιμικοί ασθενείς εμφανίζουν διαταραχή στην κατανομή της ενεργότητας της PAF-AH μεταξύ των σωματιδίων των λιποπρωτεϊνών που περιέχουν αποπρωτεΐνη Β και των HDL σωματιδίων. Η διαταραχή αυτή χαρακτηρίζεται από αύξηση της ενζυμικής ενεργότητας των LDL χωρίς ταυτόχρονη αύξηση του ενζύμου στα HDL σωματίδια και η βαρύτητά της είναι συνάρτηση της βαρύτητας της υπερχοληστερολαιμίας.

Οι παθοφυσιολογικοί μηχανισμοί που είναι υπεύθυνοι για την αύξηση της ενεργότητας της PAF-AH του πλάσματος στους ασθενείς με υπερχοληστερολαιμία δεν είναι γνωστοί. Με βάση τα αποτελέσματά μας η αύξηση της ενεργότητας της PAF-AH στους υπερχοληστερολαιμικούς ασθενείς οφείλεται κατά κύριο λόγο στην αύξηση του αριθμού των LDL σωματιδίων, τα οποία αποτελούν και τους κύριους φορείς του ενζύμου στο πλάσμα. Ωστόσο, η αύξηση της ενζυμικής ενεργότητας ανά mg αποπρωτεΐνης Β (η οποία αποτελεί έμμεσο δείκτη του αριθμού των σωματιδίων δεδομένου ότι κάθε σωματίδιο της LDL περιέχει μόνο ένα μόριο αυτής της αποπρωτεΐνης) υποδηλώνει ότι στην αύξηση της ολικής ενεργότητας της PAF-AH του πλάσματος που παρατηρείται στους υπερχοληστερολαιμικούς ασθενείς συμμετέχει και ο μηχανισμός της αύξησης της ενεργότητας ανά σωματίδιο. Και οι δύο αυτοί μηχανισμοί (δηλαδή η αύξηση του αριθμού των σωματιδίων και η αύξηση της ενεργότητας ανά σωματίδιο) μπορούν να αποδοθούν στη διαταραχή της κάθαρσης των LDL σωματιδίων από την κυκλοφορία εξαιτίας της μείωσης του αριθμού των λειτουργικών LDL υποδοχέων, η οποία αποτελεί και την πιο συχνή διαταραχή του μεταβολισμού των λιπιδίων σε ασθενείς με υπερχοληστερολαιμία. Είναι γνωστό ότι η PAF-AH παράγεται ανεξάρτητα από τα λιποπρωτεϊνικά σωματίδια³²⁹ και ενσωματώνεται σε αυτά σε κάποια φάση του μεταβολισμού τους στο πλάσμα. Κατά συνέπεια, ο μεγαλύτερος χρόνος παραμονής των LDL σωματιδίων στην κυκλοφορία στα άτομα με διαταραχές του μεταβολισμού των LDL μπορεί να ευοδώνει τον εμπλουτισμό τους με ενζυμική ενεργότητα. Η άποψη αυτή υποστηρίζεται έμμεσα από το γεγονός ότι σε όλες της ομάδες της μελέτης το μεγαλύτερο ποσοστό της ενζυμικής ενεργότητας συσχετιζόνταν με τα μικρά, πυκνά υποκλάσματα της LDL, τα οποία παρουσιάζουν μειωμένη συγγένεια για τους LDL υποδοχείς⁴⁶ και κατά συνέπεια μεγαλύτερο χρόνο παραμονής στην κυκλοφορία, καθώς και από το γεγονός ότι η ενεργότητα της PAF-AH του πλάσματος συσχετιζόνταν κυρίως με τις ενεργότητες των υποκλασμάτων LDL-4 και LDL-5. Επιπρόσθετα, ο παραπάνω μηχανισμός επιβεβαιώνεται και από τα αποτελέσματα πρόσφατων μελετών οι οποίες έδειξαν ότι ο βασικότερος παράγοντας που

καθορίζει την ενεργότητα της PAF-AH του πλάσματος είναι ο ρυθμός του καταβολισμού των LDL σωματιδίων³⁵³. Ένας άλλος παράγοντας που μπορεί να συμβάλλει στην αύξηση της PAF-AH του πλάσματος στους υπερχοληστερολαιμικούς ασθενείς είναι τα αυξημένα επίπεδα της λιποπρωτεΐνης (a) που παρατηρήθηκαν σε αυτούς τους ασθενείς. Πράγματι, μελέτες έδειξαν ότι τα σωματίδια αυτής της λιποπρωτεΐνης περιέχουν υψηλή ενζυμική ενεργότητα της PAF-AH, η οποία μάλιστα όταν εκφρασθεί ανά mg πρωτεΐνης ξεπερνά και αυτή των LDL σωματιδίων³¹⁰. Ωστόσο, η έλλειψη σημαντικής συσχέτισης μεταξύ της ενεργότητας της PAF-AH του πλάσματος και της συγκέντρωσης της Lp(a) σε όλες τις ομάδες της μελέτης καθιστά μάλλον απίθανη αυτή τη θεώρηση. Επιπρόσθετα, προηγούμενες μελέτες έδειξαν ότι η Lp(a) συμβάλλει στη διαμόρφωση της συνολικής ενεργότητας της PAF-AH του πλάσματος μόνο όταν οι συγκεντρώσεις της στο πλάσμα είναι σημαντικά αυξημένες (>30 mg/dl)³¹². Ωστόσο, τέτοια επίπεδα Lp(a) παρατηρήθηκαν σε ελάχιστους ασθενείς στη μελέτη μας και κατά συνέπεια είναι μάλλον απίθανο η ενζυμική ενεργότητα αυτής της λιποπρωτεΐνης να συμβάλλει καθοριστικά στις διαφορές που παρατηρήθηκαν μεταξύ των ομάδων των ασθενών.

Αν και ο ελαττωμένος ρυθμός του καταβολισμού των LDL σωματιδίων μπορεί ενδεχόμενα να εξηγήσει την αυξημένη ενεργότητα της PAF-AH του πλάσματος στους υπερχοληστερολαιμικούς ασθενείς, τα δεδομένα μας δεν μπορούν να αποκλείσουν το ενδεχόμενο της επαγωγής της παραγωγής του ενζύμου από τα μακροφάγα εξαιτίας των αυξημένων συγκεντρώσεων των LDL. Πράγματι, αν και οι αρχικές μελέτες έδειξαν ότι το ένζυμο παράγεται ανεξάρτητα από τα λιποπρωτεϊνικά σωματίδια και ενσωματώνεται σε αυτά σε κάποια μεταγενέστερη φάση του μεταβολισμού τους στο πλάσμα, ο ρυθμός παραγωγής της PAF-AH από τα μακροφάγα αυξάνεται όταν αυτά επωασθούν παρουσία ανθρώπινου ορού³²³. Το συστατικό του ορού που είναι υπεύθυνο για αυτή την αύξηση της παραγωγής της PAF-AH δεν είναι γνωστό. Ωστόσο, πρόδρομα αποτελέσματα δείχνουν ότι μάλλον πρόκειται για τις λιποπρωτεΐνες και ειδικότερα για τα LDL σωματίδια³⁵¹. Σε συμφωνία με την παραπάνω θεώρηση βρίσκονται και τα αποτελέσματα μελετών οι οποίες έδειξαν ότι ο ορός των ασθενών με υπερχοληστερολαιμία αποτελεί ισχυρότερο ερέθισμα για την παραγωγή του ενζύμου από τα μακροφάγα, σε σύγκριση με τον ορό ατόμων με φυσιολογικά επίπεδα λιπιδίων³⁵². Εκτός από τα μακροφάγα, σημαντικό ρόλο στην παραγωγή του ενζύμου του πλάσματος ενδέχεται να διαδραματίζουν και τα ηπατοκύτταρα³²⁷. Πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι τα αυτά τα κύτταρα συνθέτουν και εκκρίνουν PAF-AH με ταχύτερους ρυθμούς όταν επωασθούν παρουσία PAF³²⁸. Έτσι, η παρουσία ικανών συγκεντρώσεων αμιγούς PAF³²⁰, καθώς και οξειδωμένων φωσφολιπιδίων³⁸¹ (δηλαδή φωσφολιπιδίων που εξαιτίας της δομικής τους ομοιότητας με τον PAF μπορούν και μιμούνται



τις περισσότερες από τις βιολογικές του δράσεις²⁸⁰) στα λιποπρωτεϊνικά σωματίδια των υπερχοληστερολαιμικών ασθενών μπορεί ενδεχόμενα να συμβάλλει στην αύξηση της σύνθεσης της PAF-AH του πλάσματος από τα ηπατοκύτταρα και κατά συνέπεια στην αύξηση της ενζυμικής ενεργότητας του πλάσματος σε αυτούς τους ασθενείς.

Η μελέτη των συγκεντρώσεων των υποκλασμάτων των λιποπρωτεϊνών που περιέχουν απολιποπρωτεΐνη Β έδειξε ότι οι ασθενείς με οικογενή υπερχοληστερολαιμία εμφανίζουν διαταραχή της κατανομής των υποκλασμάτων της LDL, η οποία χαρακτηρίζεται από σχετική αύξηση της αναλογίας των ενδιάμεσης πυκνότητας υποκλασμάτων και μείωση της αναλογίας των μικρών, πυκνών LDL υποκλασμάτων. Αν και η παθοφυσιολογική βάση του φαινομένου δεν είναι καλά μελετημένη φαίνεται ότι για τη διαταραχή αυτή ευθύνεται κατά κύριο λόγο η μείωση του αριθμού των λειτουργικών LDL υποδοχέων στην επιφάνεια των κυττάρων των ασθενών με οικογενή υπερχοληστερολαιμία¹⁰⁰. Έτσι, εκτός από τα μικρά πυκνά LDL σωματίδια τα οποία παρουσιάζουν χαμηλή συγγένεια για τους LDL υποδοχείς και αθροίζονται στην κυκλοφορία σε όλες τις ομάδες των ασθενών⁴⁶, στους ασθενείς με οικογενή υπερχοληστερολαιμία αθροίζονται και τα υποκλάσματα ενδιάμεσης πυκνότητας εξαιτίας της μείωσης του καταβολισμού τους διαμέσου των LDL υποδοχέων. Επιπρόσθετα, κινητικές μελέτες του μεταβολισμού των λιπιδίων έδειξαν ότι στους ασθενείς με οικογενή υπερχοληστερολαιμία παρατηρείται μείωση της μετατροπής των ενδιάμεσης πυκνότητας LDL σωματιδίων σε μικρότερα και πυκνότερα σωματίδια (πιθανά εξαιτίας της καθοριστικής συμβολής των LDL υποδοχέων σε αυτή τη διαδικασία) καθώς και άμεση έκκριση σωματιδίων ενδιάμεσης πυκνότητας από τα ηπατοκύτταρα⁴³¹. Έτσι, το συνολικό αποτέλεσμα των παραπάνω μηχανισμών είναι η διαταραχή της κατανομής των υποκλασμάτων της LDL στους ασθενείς με οικογενή υπερχοληστερολαιμία, η οποία χαρακτηρίζεται από σχετική αύξηση της ποσοστιαίας αναλογίας των ενδιάμεσης πυκνότητας υποκλασμάτων και μείωση της αναλογίας των μικρών πυκνών LDL σωματιδίων.

Εκτός από τους υπερχοληστερολαιμικούς ασθενείς, αυξημένη ενεργότητα της PAF-AH του πλάσματος εμφανίζουν και τα άτομα με άλλες μορφές πρωτοπαθούς δυσλιπιδαιμίας. Έτσι, τόσο οι ασθενείς με δυσλιπιδαιμία τύπου IIb, όσο και οι ασθενείς με δυσλιπιδαιμία τύπου IV εμφάνισαν σημαντικά υψηλότερη ενζυμική ενεργότητα στο πλάσμα σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου. Όπως στους υπερχοληστερολαιμικούς ασθενείς, έτσι και στους ασθενείς με δυσλιπιδαιμίες οι οποίες χαρακτηρίζονται από διαταραχές του μεταβολισμού των πλούσιων σε τριγλυκερίδια λιποπρωτεϊνών το μεγαλύτερο ποσοστό της ενζυμικής ενεργότητας της PAF-AH συσχετιζόνταν εκλεκτικά με τα μικρά, πυκνά υποκλάσματα της LDL. Ωστόσο, οι ασθενείς με υπερτριγλυκεριδαμία παρουσιάζουν επιπρόσθετα και αύξηση της ενζυμικής ενεργότητας στις

VLDL+IDL, ένα φαινόμενο που δεν παρατηρείται (ή παρατηρείται σε μικρό βαθμό) στους ασθενείς με υπερχοληστερολαιμία.

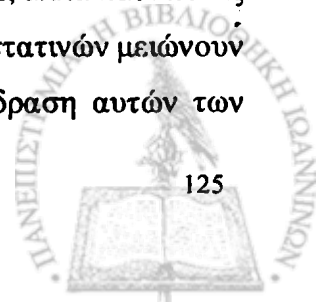
Όπως στους υπερχοληστερολαιμικούς ασθενείς, έτσι και στους ασθενείς με δυσλιπιδαιμία τύπου ΙΙΒ η αύξηση του αριθμού των LDL σωματιδίων, εξαιτίας της διαταραχής του καταβολισμού τους, αποτελεί τον πιο σημαντικό μηχανισμό της αύξησης της ενεργότητας της PAF-AH του πλάσματος. Επιπρόσθετα, η μελέτη της ειδικής ενεργότητας του ενζύμου (δηλαδή της ενεργότητας ανά mg πρωτεΐνης) στα επιμέρους λιποπρωτεϊνικά υποκλάσματα έδειξε ότι οι ασθενείς με δυσλιπιδαιμία τύπου ΙΙΒ εμφανίζουν εμπλουτισμό των υποκλασμάτων VLDL+IDL, LDL-1, LDL-2 και LDL-5 σε ενζυμική ενεργότητα σε σύγκριση με τα αντίστοιχα υποκλάσματα των υγιών ατόμων. Αν και ο υπεύθυνος παθοφυσιολογικός μηχανισμός δεν είναι γνωστός, ο μεγαλύτερος χρόνος παραμονής των λιποπρωτεϊνικών σωματιδίων των δυσλιπιδαιμικών ασθενών στην κυκλοφορία, εξαιτίας της διαταραχής του καταβολισμού τους, θα μπορούσε ενδεχόμενα να συμβάλλει στον εμπλουτισμό τους με PAF-AH. Επιπρόσθετα, όπως και στους ασθενείς με υπερχοληστερολαιμία, η επαγωγή της παραγωγής του ενζύμου εξαιτίας της αύξησης της συγκέντρωσης των σωματιδίων της LDL μπορεί θεωρητικά να διαδραματίζει κάποιο ρόλο στην αύξηση της ενεργότητας της PAF-AH του πλάσματος στους ασθενείς με δυσλιπιδαιμία τύπου ΙΙΒ³⁵¹. Στους υπερτριγλυκεριδαιμικούς ασθενείς με δυσλιπιδαιμία τύπου ΙV ο επικρατέστερος μηχανισμός αύξησης της ενζυμικής ενεργότητας του πλάσματος είναι η αύξηση του αριθμού των σωματιδίων των πλούσιων σε τριγλυκερίδια λιποπρωτεϊνών. Πράγματι, αν και η ενεργότητα αυτών των σωματιδίων σε φυσιολογικές συνθήκες δεν συνεισφέρει σημαντικά στη διαμόρφωση της συνολικής ενεργότητας του πλάσματος, φαίνεται ότι η συσσώρευσή τους στην κυκλοφορία σε καταστάσεις που χαρακτηρίζονται από διαταραχή του μεταβολισμού των πλούσιων σε τριγλυκερίδια λιποπρωτεϊνών οδηγεί σε αύξηση της PAF-AH του πλάσματος (πίνακας 18). Ο παραπάνω μηχανισμός μπορεί επίσης να συμβάλλει, αν και σε μικρότερο βαθμό, στην αύξηση της PAF-AH του πλάσματος στους ασθενείς με δυσλιπιδαιμία τύπου ΙΙΒ δεδομένου ότι και αυτοί οι ασθενείς εμφανίζουν σημαντική διαταραχή του μεταβολισμού των τριγλυκεριδίων.

Ένα ενδιαφέρον εύρημα της μελέτης μας είναι ότι οι ασθενείς με δυσλιπιδαιμίες που χαρακτηρίζονται από διαταραχή του μεταβολισμού των πλούσιων σε τριγλυκερίδια λιποπρωτεϊνών εμφανίζουν χαμηλότερη ενεργότητα της PAF-AH των HDL σε σύγκριση με τους υπερχοληστερολαιμικούς ασθενείς και τους υγιείς μάρτυρες. Επιπρόσθετα, το γεγονός ότι οι ασθενείς με δυσλιπιδαιμία τύπου ΙV εμφανίζουν χαμηλότερη ενζυμική ενεργότητα στις HDL σε σύγκριση με τους ασθενείς με δυσλιπιδαιμία τύπου ΙΙΒ υποδεικνύει ότι αυτή η μείωση είναι



συνάρτηση της βαρύτητας της διαταραχής του μεταβολισμού των τριγλυκεριδίων. Ο παθοφυσιολογικός μηχανισμός που είναι υπεύθυνος για αυτό το φαινόμενο δεν είναι γνωστός. Ωστόσο, η αρνητική συσχέτιση μεταξύ της PAF-AH των HDL και των επιπέδων των τριγλυκεριδίων του πλάσματος (πίνακας 4) αποτελεί μια έμμεση ένδειξη για το ότι η ενζυμική ενεργότητα των HDL συσχετίζεται με κάποιο τρόπο με το μεταβολισμό των πλούσιων σε τριγλυκερίδια λιποπρωτεϊνών.

Μελέτες έδειξαν ότι η συγκέντρωση της LDL χοληστερόλης αποτελεί τον ισχυρότερο ανεξάρτητο παράγοντα κινδύνου για την εμφάνιση καρδιαγγειακής νόσου¹⁵. Ωστόσο, είναι γνωστό ότι οι λιποπρωτεΐνες του πλάσματος αποτελούνται από σωματίδια τα οποία διαφέρουν μεταξύ τους στη σύσταση, την πυκνότητα, το μέγεθος, καθώς και σε άλλες φυσικοχημικές ιδιότητες⁴³². Αυτές οι διαφορές ευθύνονται σε πολύ μεγάλο βαθμό για τις αντίστοιχες διαφορές που παρατηρούνται στη βιολογική συμπεριφορά των λιποπρωτεϊνικών σωματιδίων και κυρίως στην ικανότητά τους να επάγουν την αθηρωματική διαδικασία. Μέχρι σήμερα, ανάλογα με τη χρησιμοποιούμενη μεθοδολογία, οι LDL έχουν διαχωριστεί σε 2-38 υποκλάσματα⁴³³. Με βάση την αναλογία των επιμέρους υποκλασμάτων έχουν αναγνωρισθεί 2 βασικοί τύποι κατανομής των LDL σωματιδίων: ο τύπος A (επικράτηση των μεγάλων, αραιών υποκλασμάτων, μέση διάμετρος σωματιδίων μεγαλύτερη από 25.5 nm) και ο τύπος B (επικράτηση των μικρών, πυκνών υποκλασμάτων, μέση διάμετρος σωματιδίων μικρότερη από 25.5 nm)¹⁰⁸. Πειραματικές μελέτες έδειξαν ότι τα μικρά, πυκνά υποκλάσματα των LDL διαθέτουν μια σειρά από ιδιότητες οι οποίες τα καθιστούν περισσότερο αθηρογόνα σε σύγκριση με τα μεγαλύτερα υποκλάσματα. Έτσι, αυτά τα σωματίδια παραμένουν για μεγαλύτερο χρόνο στην κυκλοφορία (εξαιτίας της μικρότερης συγγένειας τους για τους LDL υποδοχείς)⁴⁶, διεισδύουν ευκολότερα στον υπενδοθηλιακό χώρο⁴⁴, συνδέονται αποτελεσματικότερα με τις πρωτεογλυκάνες της θεμέλιας ουσίας⁴³⁴ και είναι πιο επιρρεπή στην οξειδωτική τροποποίηση (εξαιτίας της μειωμένης περιεκτικότητάς τους σε αντιοξειδωτικές ουσίες) σε σύγκριση με τα μεγαλύτερα και αραιότερα σωματίδια⁴⁵. Αυτή η θεώρηση επιβεβαιώθηκε και από τα αποτελέσματα κλινικών μελετών στις οποίες παρατηρήθηκε ισχυρή συσχέτιση μεταξύ της συγκέντρωσης των μικρών, πυκνών υποκλασμάτων των LDL και του κινδύνου για την εμφάνιση καρδιαγγειακών συμβαμάτων. Έτσι, ο τύπος B της κατανομής των LDL σωματιδίων θεωρείται περισσότερο αθηρογόνος σε σχέση με τον τύπο A^{108,435}. Κατά συνέπεια, η διαμόρφωση του συνολικού καρδιαγγειακού κινδύνου πιθανά δεν επηρεάζεται μόνο από τις ποσοτικές διαταραχές των LDL, αλλά και από τις ποιοτικές μεταβολές τους. Είναι γνωστό ότι τα φάρμακα της κατηγορίας των στατινών μειώνουν αποτελεσματικά τα επίπεδα της LDL χοληστερόλης^{16,20,21}. Ωστόσο, η επίδραση αυτών των



φαρμάκων στην κατανομή των υποκλασμάτων της LDL δεν είναι απόλυτα ξεκαθαρισμένη. Η μελέτη της συγκέντρωσης και της κατανομής των λιποπρωτεϊνικών υποκλάσμάτων στους ασθενείς που έλαβαν ατορβαστατίνη έδειξε ότι η επίδραση του φαρμάκου σε αυτές τις παραμέτρους επηρεάζεται σημαντικά από το είδος της υποκείμενης διαταραχής του μεταβολισμού των λιπιδίων. Έτσι, στους ασθενείς με δυσλιπιδαιμία τύπου ΙΙΑ η ατορβαστατίνη προκάλεσε σημαντική μείωση των αραιών και ενδιάμεσης πυκνότητας υποκλασμάτων της LDL, ενώ στους ασθενείς με δυσλιπιδαιμία τύπου ΙΙΒ παρατηρήθηκε επιπρόσθετα και μια σημαντική μείωση των μικρών, πυκνών υποκλασμάτων. Η παθοφυσιολογική βάση αυτού του φαινομένου δεν είναι γνωστή με ακρίβεια. Η ρύθμιση της κατανομής των υποκλασμάτων της LDL είναι ένα πολύπλοκο φαινόμενο το οποίο περιλαμβάνει τη σύνθεση και τον καταβολισμό των πλούσιων σε τριγλυκερίδια λιποπρωτεϊνών, καθώς και τη σύνθεση στην κυκλοφορία και τον καταβολισμό των LDL σωματιδίων⁴⁰. Σε αυτή τη διαδικασία, οι λεπτομέρειες της οποίας δεν είναι σαφώς καθορισμένες, συμμετέχουν μια σειρά από ένζυμα (λιποπρωτεϊνική λιπάση, ηπατική λιπάση, LCAT) και πρωτεΐνες μεταφοράς (CETP, PLTP κτλ)^{40,436,437}. Έχει διατυπωθεί η άποψη ότι οι διάφοροι υποπληθυσμοί των LDL σωματιδίων έχουν διαφορετική προέλευση και ακολουθούν διαφορετικούς μεταβολικούς δρόμους, καθώς και ότι οι ιδιότητές τους εξαρτώνται σε μεγάλο βαθμό από τη φύση των λιποπρωτεϊνικών σωματιδίων από τα οποία προέρχονται⁴⁰. Τα αποτελέσματά μας υποστηρίζουν έμμεσα αυτή την άποψη δεδομένου ότι η επίδραση της ατορβαστατίνης ήταν διαφορετική στα διάφορα υποκλάσματα των LDL.

Έχει διατυπωθεί η άποψη ότι η συγκέντρωση των πλούσιων σε τριγλυκερίδια λιποπρωτεϊνών αποτελεί τον πιο σημαντικό παράγοντα που επηρεάζει τη ρύθμιση του μεγέθους και της πυκνότητας των σωματιδίων της LDL^{438,439}. Έτσι, οι ασθενείς με υψηλά επίπεδα τριγλυκεριδίων συνήθως έχουν αυξημένες συγκεντρώσεις των μικρών, πυκνών LDL υποκλασμάτων σε σύγκριση με τους ασθενείς με χαμηλότερες συγκεντρώσεις τριγλυκεριδίων⁴⁴⁰. Μάλιστα, έχει προταθεί η ύπαρξη μιας κριτικής συγκέντρωσης τριγλυκεριδίων (120mg/dl). Πράγματι, μελέτες έδειξαν ότι άτομα με συγκεντρώσεις τριγλυκεριδίων πάνω αυτή την τιμή εμφανίζουν αύξηση των συγκεντρώσεων των μικρών, πυκνών σωματιδίων της LDL⁴⁴⁰. Με βάση τα παραπάνω μπορούμε να υποθέσουμε ότι η διαμέσου της ατορβαστατίνης μείωση της συγκέντρωσης των τριγλυκεριδίων στους ασθενείς με δυσλιπιδαιμία τύπου ΙΙΒ (η οποία οφείλεται σε μείωση της σύνθεσης των VLDL⁴⁴¹, αύξηση της μετατροπής των VLDL σε IDL και LDL¹⁵¹, αύξηση του άμεσου καταβολισμού των VLDL¹⁵¹ ή σε συνδιασμό των παραπάνω μηχανισμών) είναι ουσιαστικά υπεύθυνη για τη μείωση των συγκεντρώσεων των μικρών, πυκνών LDL υποκλασμάτων σε αυτή την ομάδα των ασθενών. Η υπόθεση αυτή υποστηρίζεται έμμεσα από



την ισχυρή θετική συσχέτιση μεταξύ των τιμών των τριγλυκεριδίων και των συγκεντρώσεων των μικρών, πυκνών LDL υποκλασμάτων πριν την έναρξη της θεραπείας ($r=0.72$, $p<0.003$), καθώς και από τη θετική συσχέτιση μεταξύ της μείωσης των τριγλυκεριδίων και των μεταβολών της συγκέντρωσης των πυκνών υποκλασμάτων ($r=0.63$, $p<0.015$) σε αυτή την ομάδα των ασθενών. Ωστόσο, η ταυτόχρονη μείωση των αραιών και ενδιάμεσης πυκνότητας υποκλασμάτων (εξαιτίας της μείωσης της σύνθεσης τους⁴⁴¹ ή/και της αύξησης του διαμέσου των LDL υποδοχέων καταβολισμού τους¹⁵¹) είχε ως αποτέλεσμα να μη μεταβληθεί η κατανομή των LDL υποκλασμάτων στους ασθενείς με δυσλιπιδαιμία τύπου IIB μετά τη χορήγηση του φαρμάκου. Οι μεταβολές της χημικής σύστασης των λιποπρωτεϊνικών υποκλασμάτων μετά τη χορήγηση της ατορβαστατίνης, δηλαδή η αύξηση των τριγλυκεριδίων και η μείωση των εστέρων της χοληστερόλης στα υποκλάσματα των λιποπρωτεϊνών που περιέχουν αποπρωτεΐνη Β, σε συνδιασμό με τη μείωση των τριγλυκεριδίων και την αύξηση των εστέρων της χοληστερόλης στα υποκλάσματα των HDL μπορούν να αποδοθούν στη μείωση της μάζας και της ενεργότητας της CETP¹⁵² που πιθανά οφείλεται στο φάρμακο. Αυτή η πρωτεΐνη μεταφέρει εστέρες χοληστερόλης από τα υποκλάσματα της HDL προς τα υποκλάσματα των λιποπρωτεϊνών που περιέχουν αποπρωτεΐνη Β σε ανταλλαγή με τριγλυκερίδια και η ενεργότητά της είναι αυξημένη στους ασθενείς με δυσλιπιδαιμία τύπου IIB¹⁵². Σημαντική μείωση των τριγλυκεριδίων παρατηρήθηκε και στους ασθενείς με δυσλιπιδαιμία τύπου IIA. Ωστόσο, οι τιμές των τριγλυκεριδίων πριν την έναρξη της θεραπείας σε αυτούς τους ασθενείς ήταν πολύ κοντά στην κριτική συγκέντρωση των 120mg/dl, ενώ οι μεταβολές τους μετά τη χορήγηση του φαρμάκου ήταν μικρές. Το γεγονός αυτό, σε συνδιασμό με τη χαμηλή συγγένεια των μικρών, πυκνών υποκλασμάτων για τον LDL υποδοχέα⁴⁶ είχε ως αποτέλεσμα να μη μεταβληθεί η συγκέντρωση αυτών των σωματιδίων μετά τη χορήγηση της ατορβαστατίνης. Από την άλλη πλευρά, η διαμέσου του LDL υποδοχέα αύξηση της μεταβολικής κάθαρσης των αραιών και ενδιάμεσης πυκνότητας υποκλασμάτων είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση της αναλογίας των μικρών πυκνών LDL υποκλασμάτων μετά τη θεραπεία. Ωστόσο, αυτό το φαινόμενο δεν μπορεί να θεωρηθεί ανεπιθύμητη ενέργεια του φαρμάκου δεδομένου ότι δεν αντιπροσωπεύει πραγματική αύξηση της συγκέντρωσης των μικρών, πυκνών LDL υποκλασμάτων, ενώ παράλληλα η χορήγηση της ατορβαστατίνης είχε σαν αποτέλεσμα τη σημαντική μείωση της ολικής μάζας των LDL στους ασθενείς με δυσλιπιδαιμία τύπου IIA.

Η αύξηση της μάζας των υποκλασμάτων HDL-2a και HDL-3a στους ασθενείς με δυσλιπιδαιμία τύπου IIB και IV μετά τη χορήγηση φενοφιβράτης είναι ένα σύνθετο φαινόμενο το οποίο μπορεί να αποδοθεί στη συνεργική δράση πολλών μηχανισμών, όπως η διαμέσου του φαρμάκου

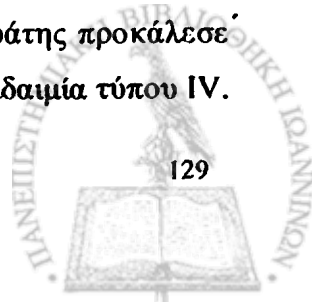
επαγωγή της σύνθεσης και έκκρισης της απολιποπρωτεΐνης A1²²⁸ (η οποία αποτελεί το βασικό δομικό συστατικό αυτών των σωματιδίων), η μείωση της ενεργότητας της CETP¹⁵⁰, καθώς και η αύξηση του καταβολισμού των πλούσιων σε τριγλυκερίδια λιποπρωτεϊνών εξαιτίας της επαγωγής του γονιδίου της λιποπρωτεϊνικής λιπάσης²²⁰ από τη φενοφιβράτη.

Τόσο η ατορβαστατίνη, όσο και η φενοφιβράτη προκάλεσαν σημαντική μείωση της PAF-AH του πλάσματος σε όλες τις ομάδες των ασθενών με πρωτοπαθή δυσλιπιδαιμία. Ωστόσο, ο μηχανισμός διαμέσου του οποίου τα υπολιπιδαιμικά φάρμακα μειώνουν την ενζυμική ενεργότητα του πλάσματος ποικίλει ανάλογα με το φάρμακο και ανάλογα με το είδος της υποκείμενης διαταραχής του μεταβολισμού των λιπιδίων. Έτσι, στους ασθενείς με δυσλιπιδαιμία τύπου ΙΙΑ και ΙΙΒ η χορήγηση της ατορβαστατίνης προκάλεσε μείωση της ενζυμικής ενεργότητας σε όλα τα υποκλάσματα των λιποπρωτεϊνών που περιέχουν αποπρωτεΐνη Β. Το γεγονός ότι το φάρμακο δεν επηρεάζει την παραγωγή του ενζύμου από τα μακροφάγα, τα οποία παριστούν την κύρια κυτταρική πηγή προέλευσης της PAF-AH³²⁹, υποδηλώνει ότι η ατορβαστατίνη μειώνει την ενεργότητα του πλάσματος αυξάνοντας τον καταβολισμό του ενζύμου. Αυτές οι παρατηρήσεις, σε συνδιασμό με τα αποτελέσματα πρόσφατων μελετών που έδειξαν ότι ο ρυθμός του καταβολισμού των LDL σωματιδίων αποτελεί τον πιο σημαντικό παράγοντα που καθορίζει τη διαμόρφωση της συνολικής ενεργότητας της PAF-AH του πλάσματος³⁵³, υποδηλώνουν ότι η αύξηση της μεταβολικής κάθαρσης των LDL αποτελεί τον βασικότερο μηχανισμό διαμέσου του οποίου η ατορβαστατίνη μειώνει την ενεργότητα της PAF-AH του πλάσματος. Ωστόσο, στους ασθενείς με δυσλιπιδαιμία τύπου ΙΙΑ η χορήγηση του φαρμάκου μείωσε μόνο τα επίπεδα των αραιών και ενδιάμεσης πυκνότητας υποκλασμάτων των LDL (τα οποία περιέχουν μικρό ποσοστό της ενζυμικής ενεργότητας) χωρίς να επηρεάσει σημαντικά τις συγκεντρώσεις των πλούσιων σε PAF-AH μικρών, πυκνών υποκλασμάτων. Κατά συνέπεια, η μείωση της ενζυμικής ενεργότητας των υποκλασμάτων LDL-4 και LDL-5 μετά τη χορήγηση της ατορβαστατίνης στους ασθενείς με δυσλιπιδαιμία τύπου ΙΙΑ οφείλονταν αποκλειστικά στη μείωση της PAF-AH ανά σωματίδιο και όχι στη μείωση του αριθμού των σωματιδίων (εικόνα 15). Ο μηχανισμός διαμέσου του οποίου η ατορβαστατίνη μειώνει την ενζυμική ενεργότητα ανά σωματίδιο των μικρών πυκνών LDL υποκλασμάτων δεν είναι γνωστός. Έχει διατυπωθεί η άποψη ότι το μικροπεριβάλλον των λιποπρωτεϊνικών σωματιδίων επηρεάζει σημαντικά τις ιδιότητες της PAF-AH³¹⁴. Έτσι, η διαμέσου του φαρμάκου μεταβολή της χημικής σύστασης των πυκνών υποκλασμάτων της LDL μπορεί θεωρητικά να διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη μείωση της ενζυμικής ενεργότητας των LDL-4 και LDL-5 σωματιδίων. Ωστόσο, η σύγκριση της σύστασης των πυκνών LDL σωματιδίων πριν και μετά τη χορήγηση



του φαρμάκου δεν ανέδειξε σημαντικές διαφορές. Είναι γνωστό ότι η PAF-AH συνδέεται με τα LDL σωματίδια διαμέσου της αλληλεπίδρασης της με το καρβοξυτελικό άκρο της απολιποπρωτεΐνης B³⁰⁹, καθώς και ότι η διαμόρφωση αυτής της απολιποπρωτεΐνης διαφέρει σημαντικά μεταξύ των υποκλασμάτων της LDL⁴⁰⁸. Έτσι, ένας θεωρητικός μηχανισμός που μπορεί να εξηγήσει την μείωση της ενζυμικής ενεργότητας ανά σωματίδιο στα μικρά, πυκνά LDL υποκλασμάτα μετά τη χορήγηση της ατορβαστατίνης είναι η παρεμβολή του φαρμάκου στο μηχανισμό σύνδεσης της PAF-AH με την απολιποπρωτεΐνη B. Ο μηχανισμός αυτός μπορεί να αφορά επιλεκτικά τα μικρά υποκλάσματα των LDL και μπορεί επίσης να συμβάλλει στη μείωση της ειδικής ενζυμικής ενεργότητας (δηλαδή της ενζυμικής ενεργότητας ανά λιποπρωτεϊνικό σωματίδιο) που παρατηρήθηκε στα μικρά, πυκνά υποκλάσματα των ασθενών με δυσλιπιδαιμία τύπου IIb. Σε αυτούς τους ασθενείς η μείωση της PAF-AH των πυκνών LDL υποκλασμάτων οφείλονταν επίσης και στη μείωση του αριθμού των σωματιδίων, δεδομένου ότι η χορήγηση της ατορβαστατίνης μείωσε σημαντικά τη μάζα των LDL-4 και LDL-5 υποκλασμάτων.

Η χορήγηση φενοφιβράτης στους ασθενείς με δυσλιπιδαιμία τύπου IIa και IIb προκάλεσε μείωση της ενζυμικής ενεργότητας μόνο στα μικρά, πυκνά υποκλάσματα των LDL, χωρίς να επηρεάσει την ενεργότητα των μεγαλύτερων και αραιότερων υποκλασμάτων. Επιπρόσθετα, στους ασθενείς με δυσλιπιδαιμία τύπου IIb παρατηρήθηκε επίσης σημαντική μείωση της PAF-AH στις VLDL+IDL. Αν και η διαμέσου του φαρμάκου μείωση της παραγωγής του ενζύμου μπορεί να διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη μείωση της ενεργότητας του πλάσματος, τα αποτελέσματα των πειραμάτων με τα μακροφάγα έδειξαν ότι η φενοφιβράτη δεν μεταβάλλει το ρυθμό παραγωγής και έκκρισης του ενζύμου. Έτσι, οι μεταβολές της PAF-AH του πλάσματος μετά τη χορήγηση του φαρμάκου μπορούν ενεδεχόμενα να εξηγηθούν με βάση την ευοδωτική επίδραση της φενοφιβράτης στο μεταβολισμό των πλούσιων σε τριγλυκερίδια λιποπρωτεϊνών, καθώς και την ικανότητά της να μεταβάλλει την κατανομή των υποκλασμάτων των LDL. Συγκεκριμένα, είναι γνωστό ότι η φενοφιβράτη προκαλεί τροποποίηση του προφίλ των LDL σωματιδίων μειώνοντας τις συγκεντρώσεις των μικρών, πυκνών LDL σωματιδίων (τα οποία περιέχουν το μεγαλύτερο ποσοστό της ενεργότητας της PAF-AH), ενώ παράλληλα αυξάνει τη συγκέντρωση των μεγαλύτερων και αραιότερων υποκλασμάτων (τα οποία περιέχουν μικρό ποσοστό της ενζυμικής ενεργότητας)¹⁵⁰. Έτσι, η μείωση του αριθμού των LDL-4 και LDL-5 σωματιδίων μπορεί ενδεχόμενα να εξηγήσει τη μείωση της ενζυμικής ενεργότητας αυτών των υποκλασμάτων σε όλες τις ομάδες των ασθενών. Η χορήγηση της φενοφιβράτης προκάλεσε σημαντική μείωση της PAF-AH του πλάσματος και στους ασθενείς με δυσλιπιδαιμία τύπου IV.



Ωστόσο, στους ασθενείς αυτούς η μείωση αφορά κυρίως τις πλούσιες σε τριγλυκερίδια λιποπρωτεΐνες και οφείλεται κατά κύριο λόγο στη μείωση του αριθμού των σωματιδίων αυτών των λιποπρωτεϊνών και όχι στη μείωση του ενζύμου ανά σωματίδιο, δεδομένου ότι η ενεργότητα της PAF-AH ανά mg πρωτεΐνης δεν μεταβάλλεται μετά τη χορήγηση του φαρμάκου. Επιπρόσθετα, στη μείωση της συνολικής ενεργότητας της PAF-AH του πλάσματος στους ασθενείς με δυσλιπιδαιμία τύπου IV συμβάλλει και η μείωση της ενεργότητας των μικρών, πυκνών LDL σωματιδίων (εικόνα 16B).

Αν και η ατορβαστατίνη δεν επηρέασε σημαντικά την ενεργότητα της PAF-AH των HDL σε καμία από τις ομάδες της μελέτης, η χορήγηση φενοφιβράτης προκάλεσε σημαντική αύξηση της ενζυμικής ενεργότητας των HDL στους ασθενείς με δυσλιπιδαιμία τύπου IIb και IV. Ο μηχανισμός διαμέσου του οποίου το φάρμακο αυξάνει την PAF-AH των HDL στους ασθενείς με διαταραχές του μεταβολισμού των πλούσιων σε τριγλυκερίδια λιποπρωτεϊνών δεν είναι γνωστός. Η απουσία συσχέτισης μεταξύ της αύξησης της μάζας και της αντίστοιχης αύξησης της ενζυμικής ενεργότητας των HDL, καθώς και το γεγονός ότι η χορήγηση του φαρμάκου αυξάνει επιλεκτικά τα υποκλάσματα των HDL που περιέχουν μικρό ποσοστό της PAF-AH των HDL, χωρίς να επηρεάσει τη συγκέντρωση των πλούσιων σε ενζυμική ενεργότητα HDL-3c υποκλασμάτων υποδηλώνει ότι η αύξηση της ενζυμικής ενεργότητας των HDL δεν συσχετίζεται με την αύξηση της μάζας αυτών των λιποπρωτεϊνών. Επιπρόσθετα, είναι απίθανο η αύξηση αυτή της PAF-AH των HDL να είναι αποτέλεσμα της σύνθεσης νέων μορίων του ενζύμου δεδομένου ότι η φενοφιβράτη δεν μεταβάλλει το ρυθμό παραγωγής της PAF-AH από τα μακροφάγα. Είναι γνωστό ότι κατά τη διάρκεια του καταβολισμού των πλούσιων σε τριγλυκερίδια λιποπρωτεϊνών από τη λιποπρωτεϊνική λιπάση διάφορα επιφανειακά συστατικά τους μεταφέρονται στις HDL². Κατά συνέπεια, η PAF-AH μπορεί να αντιπροσωπεύει ένα από τα συστατικά των πλούσιων σε τριγλυκερίδια λιποπρωτεϊνών, το οποίο κατά τη διάρκεια του καταβολισμού τους αποσπάται από την επιφάνειά τους και μεταφέρεται στις HDL. Ο μηχανισμός αυτός μπορεί να εξηγήσει τα χαμηλά βασικά επίπεδα της PAF-AH των HDL στους ασθενείς με δυσλιπιδαιμίες οι οποίες χαρακτηρίζονται από διαταραχές του μεταβολισμού των τριγλυκεριδίων, καθώς και την αύξηση της ενζυμικής ενεργότητας των HDL μετά τη χορήγηση φενοφιβράτης, η οποία, όπως είναι γνωστό, ευοδώνει τον καταβολισμό των πλούσιων σε τριγλυκερίδια λιποπρωτεϊνών αυξάνοντας τη δραστηριότητα της λιποπρωτεϊνικής λιπάσης. Ο λόγος για τον οποίο η αύξηση της PAF-AH αφορά αποκλειστικά τα πυκνά υποκλάσματα της HDL δεν είναι γνωστός. Ωστόσο, είναι πιθανό ότι οι φυσικοχημικές ιδιότητες αυτών των σωματιδίων να τα καθιστούν καλύτερους «δέκτες» του ενζύμου που αποσπάται από τις πλούσιες σε τριγλυκερίδια λιποπρωτεΐνες.



Η παθοφυσιολογική σημασία της μείωσης της PAF-AH του πλάσματος μετά τη χορήγηση της ατορβαστατίνης και της φενοφιβράτης δεν είναι γνωστή με ακρίβεια. Έτσι, με βάση τα αποτελέσματα των μελετών που εξέτασαν τον παθοφυσιολογικό ρόλο του ενζύμου στη φλεγμονή του αρτηριακού τοιχώματος η PAF-AH μπορεί είτε να διαδραματίζει αντικαθηρογόνο ρόλο (δεδομένου ότι υδρολύει τον PAF³⁸⁵ και τα βιοδραστικά οξειδωμένα φωσφολιπίδια των λιποπρωτεϊνικών σωματιδίων³⁰⁶ και των κυτταρικών μεμβρανών³⁷⁹) είτε να προάγει την αθηρωματική διαδικασία (δεδομένου ότι οδηγεί στο σχηματισμό λυσοφωσφατιδυλχολίνης και οξειδωμένων λιπαρών οξέων, δηλαδή μορίων που ευοδώνουν τη φλεγμονώδη διεργασία του αρτηριακού τοιχώματος^{386,387,389,394}). Αλληλοσυγκρουόμενα αποτελέσματα προέκυψαν και από τις κλινικές μελέτες οι οποίες εξέτασαν το ρόλο του ενζύμου στην παθογένεια της αθηρωμάτωσης. Έτσι, άλλες μελέτες έδειξαν ότι η αύξηση της ενεργότητας του ενζύμου συσχετίζεται με αυξημένη επίπτωση και βαρύτητα της καρδιαγγειακής νόσου^{406,410,412}, ενώ αντίθετα μελέτες στον Ιαπωνικό κυρίως πληθυσμό έδειξαν ότι η πλήρης εξάλειψη της ενεργότητας του ενζύμου εξαιτίας της σημειακής μετάλλαξης G⁹⁹⁴→T αποτελεί ανεξάρτητο παράγοντα κινδύνου για την εμφάνιση στεφανιαίας νόσου, αγγειακών εγκεφαλικών επεισοδίων και περιφερικής αρτηριακής νόσου^{416-418,442}. Ωστόσο, ο μικρός αριθμός των ασθενών που έλαβαν μέρος σε αυτές τις μελέτες, καθώς και ο αναδρομικός τους χαρακτήρας καθιστούν προβληματική την εξαγωγή και γενίκευση οποιονδήποτε συμπερασμάτων. Μέχρι σήμερα δύο μεγάλες, τυχαίοποιημένες, προοπτικές, μελέτες εξέτασαν το ρόλο του ενζύμου στην παθογένεια της αθηρωματικής νόσου. Στη πρώτη από αυτές, η οποία αφορούσε γυναίκες μέσης ηλικίας (Women's Health Study), οι ασθενείς που εμφάνισαν καρδιαγγειακά συμβάματα είχαν υψηλότερη ενεργότητα του ενζύμου στο πλάσμα κατά την έναρξη της μελέτης σε σύγκριση με τα άτομα τα οποία δεν εμφάνισαν αντίστοιχα συμβάματα κατά τη διάρκεια της μελέτης⁴²². Ωστόσο, η πολυπαραγοντική ανάλυση των δεδομένων έδειξε ότι η ενεργότητα της PAF-AH του πλάσματος δεν αποτελεί ανεξάρτητο παράγοντα κινδύνου για την εμφάνιση καρδιαγγειακής νόσου⁴²². Ακριβώς αντίθετα ήταν τα αποτελέσματα της δεύτερης μελέτης (WOSCOPS), η οποία αφορούσε άνδρες μέσης ηλικίας⁴²¹. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης η μάζα (και κατά συνέπεια η ενεργότητα) της PAF-AH είναι ένας ανεξάρτητος παράγοντας κινδύνου για την εμφάνιση καρδιαγγειακών συμβαμάτων⁴²¹. Η αύξηση της μάζας του ενζύμου κατά μια σταθερή απόκλιση σε αυτή τη μελέτη συνοδεύονταν από αύξηση του κινδύνου για την εμφάνιση στεφανιαίων συμβαμάτων κατά 27%⁴²¹. Κατά συνέπεια, η μείωση της PAF-AH του πλάσματος μετά τη χορήγηση της ατορβαστατίνης και της φενοφιβράτης αποτελεί ενδεχόμενα μια νέα

πλειοτροπική δράση αυτών των φαρμάκων, η οποία συμβάλλει στην ικανότητά τους να μειώνουν την επίπτωση και τη βαρύτητα της καρδιαγγειακής νόσου.

Διάφορες επιδημιολογικές και κλινικές μελέτες έδειξαν ότι τα αυξημένα επίπεδα των HDL προστατεύουν από την εμφάνιση καρδιαγγειακής νόσου⁵⁷⁻⁵⁹. Αν και μέχρι σήμερα έχουν διατυπωθεί διάφορες θεωρίες αναφορικά με τους μηχανισμούς αυτής της προστατευτικής δράσης (μεταξύ των οποίων σημαντικότερος είναι ο μηχανισμός της ανάστροφης μεταφοράς της χοληστερόλης⁶⁰), πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι τα ένζυμα τα οποία μεταφέρονται με αυτές τις λιποπρωτεΐνες διαδραματίζουν ένα σημαντικό αντιαθηρογόνο ρόλο²³⁶. Πράγματι, σύμφωνα με τα αποτελέσματα πειραματικών μελετών η PAF-AH των HDL δρα προστατευτικά αναστέλλοντας την οξειδωση των LDL²³⁵ και μειώνοντας την ικανότητα των ήδη οξειδωμένων LDL να επάγουν τη φλεγμονή στο τοίχωμα των αγγείων²³⁷. Τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαιώθηκαν και με πειράματα σε διαγονιδιακά ποντίκια με γενετική προδιάθεση για την εμφάνιση αθηρωμάτωσης. Σε αυτά τα πειραματόζωα η υπερέκφραση του γονιδίου της PAF-AH οδήγησε σε αύξηση της ενεργότητας του ενζύμου των HDL, η οποία συνοδεύονταν από μείωση της προσκόλλησης των μακροφάγων στο αγγειακό τοίχωμα, καθώς και από σημαντική μείωση του αριθμού των αθηρωματικών βλαβών^{396,397}. Επιπρόσθετα, οι διαφορές μεταξύ των αποτελεσμάτων των μελετών που υποστηρίζουν τον ευοδωτικό ρόλο της PAF-AH του πλάσματος στην αθηρωματική διαδικασία και αυτών στον Ιαπωνικό πληθυσμό που έδειξαν ότι η μετάλλαξη G⁹⁹⁴→T αποτελεί ανεξάρτητο παράγοντα κινδύνου για την εμφάνιση καρδιαγγειακής νόσου μπορούν ενδεχόμενα να εξηγηθούν από το γεγονός ότι αυτή η μετάλλαξη επηρεάζει και την ενζυμική ενεργότητα των HDL³⁵¹. Έτσι, ο αυξημένος καρδιαγγειακός κίνδυνος που συνοδεύει αυτή τη μετάλλαξη μπορεί να οφείλεται στη μείωση της ενεργότητας του αντιαθηρογόνου ενζύμου των HDL και όχι στις μεταβολές του ενζύμου του πλάσματος (το οποίο στην πραγματικότητα μπορεί να διαδραματίζει ευοδωτικό ρόλο στη διαδικασία της αθηρωμάτωσης). Κατά συνέπεια, η αύξηση του λόγου της PAF-AH των HDL προς την LDL χοληστερόλη σε όλες τις ομάδες των ασθενών μετά τη χορήγηση και των δύο υπολιπιδαιμικών φαρμάκων (ο οποίος αντιπροσωπεύει έναν αδρό ποσοτικό δείκτη της ικανότητας της PAF-AH των HDL να προστατεύουν από τις αθηρογόνες δράσεις των LDL σωματιδίων), καθώς και η αύξηση της PAF-AH των HDL μετά τη χορήγηση της φενοφιβράτης στους ασθενείς με αυξημένα επίπεδα τριγλυκεριδίων αναμφίβολα συνεισφέρουν στην αντιοξειδωτική ικανότητα των υπολιπιδαιμικών φαρμάκων, καθώς και στην ικανότητά τους να μειώνουν την υποξεία φλεγμονή του αρτηριακού τοιχώματος, η οποία αποτελεί και τη βάση της αθηρωματικής διαδικασίας.



Συμπερασματικά, όλες οι ομάδες των δυσλιπιδαιμικών ασθενών εμφανίζουν σημαντικά υψηλότερα επίπεδα της PAF-AH του πλάσματος σε σύγκριση με τον υγιή πληθυσμό. Επιπρόσθετα, οι ασθενείς με διαταραχές του μεταβολισμού των πλούσιων σε τριγλυκερίδια λιποπρωτεϊνών εμφανίζουν χαμηλότερα επίπεδα PAF-AH των HDL σε σύγκριση με τους υπερχοληστερολαιμικούς ασθενείς και τους υγιείς μάρτυρες. Τόσο η ατορβαστατίνη, όσο και η φενοφιβράτη προκαλούν σημαντική μείωση της PAF-AH του πλάσματος με μηχανισμούς οι οποίοι συσχετίζονται με το φάρμακο και τον τύπο της υποκείμενης διαταραχής του μεταβολισμού των λιπιδίων. Επιπρόσθετα, η φενοφιβράτη προκαλεί σημαντική αύξηση της PAF-AH των HDL στους ασθενείς με αυξημένα επίπεδα τριγλυκεριδίων. Οι ιδιότητες αυτές της ατορβαστατίνης και της φενοφιβράτης ενδεχόμενα αποτελούν νέες πλειοτροπικές δράσεις διαμέσου των οποίων αυτές οι ομάδες των υπολιπιδαιμικών φαρμάκων επιβραδύνουν την εξέλιξη της αθηρωματικής νόσου και μειώνουν σημαντικά την καρδιαγγειακή νοσηρότητα και θνητότητα.

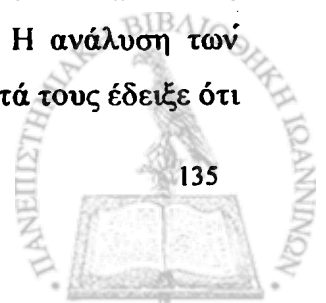
ΙΧ. ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η ακετυλοϋδρολάση του παράγοντα ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων (PAF-AH) είναι μια φωσφολιπάση A_2 που κυκλοφορεί στο πλάσμα συνδεδεμένη με τα λιποπρωτεϊνικά σωματίδια. Στο ανθρώπινο πλάσμα το μεγαλύτερο ποσοστό της ενζυμικής ενεργότητας (>90%) συνδέεται με τα σωματίδια των λιποπρωτεϊνών που περιέχουν απολιποπρωτεΐνη Β, ενώ ένα μικρό ποσοστό της ενζυμικής ενεργότητας βρίσκεται συνδεδεμένο με τις λιποπρωτεΐνες υψηλής πυκνότητας (HDL). Έτσι, ο όρος PAF-AH του πλάσματος χρησιμοποιείται κατά κύριο λόγο για να περιγράψει την ενζυμική ενεργότητα που βρίσκεται στις λιποπρωτεΐνες πολύ χαμηλής (VLDL), ενδιάμεσης (IDL) και χαμηλής πυκνότητας (LDL). Από παθοφυσιολογική άποψη η PAF-AH του πλάσματος μπορεί είτε να διαδραματίζει αντιαθηρογόνο ρόλο δεδομένου ότι υδρολύει τον παράγοντα ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων (PAF), καθώς και τα οξειδωμένα φωσφολιπίδια με βραχεία αλυσίδα στη θέση 2 του σκελετού της γλυκερόλης. Αυτά τα φωσφολιπίδια σχηματίζονται κατά την οξείδωση των φωσφολιπιδίων των λιποπρωτεϊνών και των κυτταρικών μεμβρανών, δρουν διαμέσου του υποδοχέα του PAF και διαθέτουν πολυάριθμες ιδιότητες που προάγουν τη φλεγμονή του αγγειακού τοιχώματος. Ωστόσο, η PAF-AH του πλάσματος μπορεί να ευοδώνει την αθηρωματική διαδικασία δεδομένου ότι οδηγεί στο σχηματισμό λυσοφωσφατιδυλοχολίνης και οξειδωμένων λιπαρών οξέων, δηλαδή μορίων που ενδέχεται να διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην παθογένεια της αθηρωμάτωσης. Παρόμοια σύγχυση προέκυψε και από τα αποτελέσματα των κλινικών μελετών που εξέτασαν το ρόλο του ενζύμου του πλάσματος στην παθογένεια της αθηρωμάτωσης. Έτσι, κάποιες μελέτες έδειξαν ότι οι ασθενείς με καρδιαγγειακή νόσο έχουν αυξημένα επίπεδα του ενζύμου σε σύγκριση με τους υγιείς μάρτυρες, ενώ άλλες μελέτες στον Ιαπωνικό πληθυσμό έδειξαν ότι η εξάλλειψη της ενζυμικής ενεργότητας του πλάσματος αποτελεί προδιαθεσικό παράγοντα για την εμφάνιση καρδιαγγειακών συμβαμάτων. Ωστόσο, η πρόσφατη ανάλυση των αποτελεσμάτων της μελέτης WOSCOPS έδειξε ότι η μάζα της PAF-AH του πλάσματος αποτελεί ανεξάρτητο παράγοντα κινδύνου για την εμφάνιση καρδιαγγειακής νόσου. Σε αντίθεση με το ένζυμο του πλάσματος, η PAF-AH των HDL διαδραματίζει σαφώς αντιαθηρογόνο ρόλο δεδομένου ότι προστατεύει τις LDL από την οξείδωση και μειώνει τη βιολογική δραστηριότητα των ήδη οξειδωμένων HDL. Σκοπός της παρούσας διδακτορικής διατριβής ήταν η εκτίμηση και σύγκριση των ενεργοτήτων της PAF-AH σε ασθενείς με διάφορες μορφές πρωτοπαθούς δυσλιπιδαιμίας, καθώς και η μελέτη της επίδρασης των υπολιπιδαιμικών φαρμάκων στις ενεργότητες του ενζύμου.



Στη μελέτη συμμετείχαν συνολικά 275 ασθενείς με πρωτοπαθή δυσλιπιδαιμία, οι οποίοι παρακολουθούνταν στο Εξωτερικό Ιατρείο Λιπιδίων του Περιφερειακού Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων. Η στρατολόγηση και ένταξη τους στη μελέτη διήρκεσε περίπου 3 έτη. Όλοι οι ασθενείς τέθηκαν σε δίαιτα χαμηλή σε λίπος και χοληστερόλη για τουλάχιστον 3 μήνες. Μετά από αυτό το χρονικό διάστημα όσοι ασθενείς εξακολούθησαν να έχουν αυξημένα επίπεδα λιπιδίων εντάχθηκαν στη μελέτη. Ανάλογα με τα επίπεδα των λιπιδίων οι ασθενείς χωρίστηκαν σε 3 ομάδες: την ομάδα των ασθενών με πρωτοπαθή υπερχοληστερολαιμία ή δυσλιπιδαιμία τύπου ΙΙΑ (n=141), την ομάδα των ασθενών με μικτή δυσλιπιδαιμία ή δυσλιπιδαιμία τύπου ΙΙΒ (n=84) και την ομάδα των ασθενών με πρωτοπαθή υπερτριγλυκεριδαμία ή δυσλιπιδαιμία τύπου ΙV (n=50). Επιπρόσθετα, οι ασθενείς με δυσλιπιδαιμία τύπου ΙΙΑ χωρίστηκαν περαιτέρω ανάλογα με το είδος της υποκείμενης γενετικής διαταραχής του μεταβολισμού των λιπιδίων σε ασθενείς με ομόζυγη οικογενή υπερχοληστερολαιμία (n=5), ασθενείς με ετερόζυγη οικογενή υπερχοληστερολαιμία (n=38) και ασθενείς με πολυγονική, μη οικογενή υπερχοληστερολαιμία (n=98). Από τους ασθενείς της μελέτης 76 έλαβαν ατορβαστατίνη (55 με δυσλιπιδαιμία τύπου ΙΙΑ και 21 με δυσλιπιδαιμία τύπου ΙΙΒ) και 71 φενοφibrάτη (18 με δυσλιπιδαιμία τύπου ΙΙΑ, 23 με δυσλιπιδαιμία τύπου ΙΙΒ και 30 με δυσλιπιδαιμία τύπου ΙV). Τα επίπεδα των λιπιδίων και απολιποπρωτεϊνών, καθώς και οι ενζυμικές ενεργότητες του πλάσματος, των HDL και των λιποπρωτεϊνικών υποκλασμάτων προσδιορίστηκαν πριν την έναρξη της αγωγής, καθώς και μετά από 16 εβδομάδες θεραπείας. Εκατόν πενήντα υγιείς εθελοντές με φυσιολογικά επίπεδα λιπιδίων του πλάσματος αποτέλεσαν την ομάδα ελέγχου.

Όλες οι ομάδες των ασθενών εμφάνισαν σημαντικά υψηλότερη ενεργότητα της PAF-AH του πλάσματος σε σύγκριση με τους υγιείς εθελοντές. Επιπρόσθετα, οι ασθενείς με δυσλιπιδαιμίες τύπου ΙΙΑ και ΙΙΒ εμφάνισαν υψηλότερη ενεργότητα σε σύγκριση με τους ασθενείς με δυσλιπιδαιμία τύπου ΙV. Οι ασθενείς με δυσλιπιδαιμία τύπου ΙΙΑ εμφάνισαν παρόμοια ενεργότητα της PAF-AH των HDL σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου, ενώ οι ασθενείς με δυσλιπιδαιμίες τύπου ΙΙΒ και ΙV εμφάνισαν χαμηλότερη ενεργότητα σε σύγκριση τόσο με την ομάδα ελέγχου, όσο και με την ομάδα των ασθενών με δυσλιπιδαιμία τύπου ΙΙΑ. Τέλος, οι ασθενείς με δυσλιπιδαιμία τύπου ΙV εμφάνισαν χαμηλότερη ενζυμική ενεργότητα στις HDL συγκριτικά με τους ασθενείς με δυσλιπιδαιμία τύπου ΙΙΒ. Όλες οι ομάδες των δυσλιπιδαιμικών ασθενών παρουσίασαν σημαντικά χαμηλότερες τιμές του λόγου της PAF-AH των HDL προς την LDL χοληστερόλη σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου, ενώ δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές στις τιμές αυτού του λόγου μεταξύ των ομάδων των ασθενών. Η ανάλυση των λιποπρωτεϊνών που περιέχουν απολιποπρωτεΐνη Β στα επιμέρους υποκλάσματά τους έδειξε ότι



το μεγαλύτερο ποσοστό της ενζυμικής ενεργότητας συσχετιζόνταν με τα μικρά, πυκνά LDL υποκλάσματα σε όλες τις ομάδες των ασθενών. Οι ασθενείς με δυσλιπιδαιμίες τύπου ΙΙΑ και ΙΙΒ είχαν υψηλότερη ενεργότητα της PAF-AH σε όλα τα υποκλάσματα των LDL σε σύγκριση με την ομάδα των ασθενών με δυσλιπιδαιμία τύπου ΙV και την ομάδα ελέγχου, οι οποίες δεν διέφεραν μεταξύ τους όσον αφορά την ενεργότητα αυτών των υποκλασμάτων. Επιπρόσθετα, οι ασθενείς με δυσλιπιδαιμίες τύπου ΙΙΒ και ΙV εμφάνισαν υψηλότερη ενεργότητα στα υποκλάσματα VLDL+IDL σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου. Ο διαχωρισμός των HDL στα επιμέρους υποκλάσματά τους έδειξε ότι σε όλες τις ομάδες των ασθενών η PAF-AH συσχετιζόνταν εκλεκτικά με το υποκλάσμα HDL-3c. Οι ασθενείς με δυσλιπιδαιμίες τύπου ΙΙΒ και ΙV εμφάνισαν σημαντικά χαμηλότερη ενζυμική ενεργότητα σε αυτό το υποκλάσμα σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου και την ομάδα των ασθενών με δυσλιπιδαιμία τύπου ΙΙΑ, οι οποίες δεν διέφεραν μεταξύ τους. Τέλος, δεν παρατηρήθηκαν διαφορές στην ενεργότητα των υπόλοιπων υποκλασμάτων των HDL μεταξύ των ομάδων των ασθενών.

Όταν οι ασθενείς με δυσλιπιδαιμία τύπου ΙΙΑ χωρίστηκαν ανάλογα με τον τύπο της υποκείμενης γενετικής διαταραχής προέκυψε ότι οι ασθενείς με οικογενή υπερχοληστερολαιμία εμφανίζουν υψηλότερη ενεργότητα της PAF-AH του πλάσματος σε σύγκριση με τους ασθενείς με πολυγονική υπερχοληστερολαιμία. Επιπρόσθετα, οι ομοζυγότες εμφάνισαν υψηλότερη ενεργότητα στο πλάσμα σε σύγκριση με τους ετεροζυγότες. Η ανάλυση των LDL στα επιμέρους υποκλάσματά της έδειξε ότι οι διαφορές αυτές οφείλονταν σε αντίστοιχες διαφορές στην ενεργότητα όλων των υποκλασμάτων. Σε αντίθεση με την PAF-AH του πλάσματος οι ασθενείς με διάφορες μορφές πρωτοπαθούς υπερχοληστερολαιμίας δεν εμφάνισαν διαφορές στην ενζυμική ενεργότητα των HDL. Κατά συνέπεια, ο λόγος του ενζύμου των HDL προς το ένζυμο του πλάσματος, ο οποίος αποτελεί ένα δείκτη της κατανομής του ενζύμου μεταξύ των σωματιδίων που περιέχουν απολιποπρωτεΐνη Β και των HDL ήταν σημαντικά μικρότερος σε όλες τις ομάδες των ασθενών σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου και αυτή η μείωση ήταν συνάρτηση της βαρύτητας της υπερχοληστερολαιμίας.

Τόσο η χορήγηση της ατορβαστατίνης, όσο και η χορήγηση της φενοφιβράτης οδήγησαν σε σημαντική μείωση της ενεργότητας της PAF-AH του πλάσματος σε όλες τις ομάδες των δυσλιπιδαιμικών ασθενών. Ωστόσο, ο υπεύθυνος μηχανισμός διέφερε ανάλογα με το φάρμακο και το είδος της υποκείμενης διαταραχής του μεταβολισμού των λιπιδίων. Έτσι, η ατορβαστατίνη προκάλεσε σημαντική μείωση της PAF-AH σε όλα τα υποκλάσματα των LDL στους ασθενείς με δυσλιπιδαιμία τύπου ΙΙΑ και ΙΙΒ. Αντίθετα, η χορήγηση της φενοφιβράτης προκάλεσε σημαντική μείωση της ενζυμικής ενεργότητας μόνο στα μικρά, πυκνά υποκλάσματα



των LDL σε όλες τις ομάδες των ασθενών. Επιπρόσθετα, ο πιο σημαντικός μηχανισμός της μείωσης της PAF-AH του πλάσματος στους ασθενείς με δυσλιπιδαιμία τύπου IV ήταν η μείωση της ενζυμικής ενεργότητας στα υποκλάσματα VLDL+IDL, φαινόμενο που παρατηρήθηκε (σε μικρότερο βαθμό) στους ασθενείς με δυσλιπιδαιμία τύπου IIB.

Αν και η ατορβαστατίνη δεν επηρέασε σημαντικά την ενζυμική ενεργότητα των HDL σε καμία από τις ομάδες της μελέτης, η χορήγηση της φενοφιβράτης συνοδεύονταν από αύξηση της PAF-AH των HDL στους ασθενείς με δυσλιπιδαιμία τύπου IIB και IV. Αυτή η αύξηση οφείλονταν σε αντίστοιχη αύξηση της ενεργότητας του υποκλάσματος HDL-3c, ενώ η ενζυμική ενεργότητα των υπόλοιπων υποκλασμάτων της HDL δεν μεταβλήθηκε σημαντικά μετά τη χορήγηση του φαρμάκου. Τέλος, η φενοφιβράτη δεν επηρέασε της ενεργότητα της PAF-AH των HDL στους ασθενείς με δυσλιπιδαιμία τύπου IIA. Η χορήγηση τόσο της ατορβαστατίνης, όσο και της φενοφιβράτης συνοδεύονταν από αύξηση του λόγου της PAF-AH των HDL προς την LDL χοληστερόλη σε όλες τις ομάδες των ασθενών.

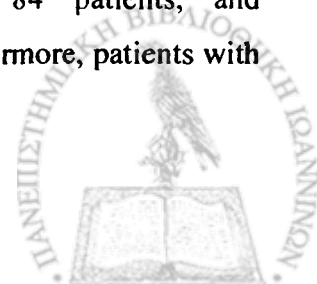
Συμπερασματικά, όλες οι ομάδες των δυσλιπιδαιμικών ασθενών εμφανίζουν σημαντικά υψηλότερη ενεργότητα της PAF-AH στο πλάσμα σε σύγκριση με τον υγιή πληθυσμό. Επιπρόσθετα, οι ασθενείς με δυσλιπιδαιμία τύπου IIB και IV εμφανίζουν χαμηλότερη ενεργότητα του ενζύμου στις HDL σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου, ενώ όλες οι ομάδες των ασθενών εμφανίζουν μείωση της ικανότητας της PAF-AH των HDL να προστατεύει από τις αθηρογόνες ιδιότητες των LDL σωματιδίων. Αυτά τα φαινόμενα ενδεχόμενα συμβάλλουν στην αυξημένη επίπτωση της καρδιαγγειακής νόσου που παρατηρείται στους ασθενείς με πρωτοπαθείς δυσλιπιδαιμίες. Η μείωση της PAF-AH του πλάσματος μετά τη χορήγηση ατορβαστατίνης και φενοφιβράτης, καθώς και η ικανότητα της φενοφιβράτης να αυξάνει την PAF-AH των HDL στους ασθενείς με δυσλιπιδαιμία τύπου IIB και IV αποτελούν νέες πλειοτροπικές δράσεις διαμέσου των οποίων αυτές οι ομάδες των υπολιπιδαιμικών φαρμάκων επιβραδύνουν την εξέλιξη της αθηρωματικής νόσου και μειώνουν σημαντικά την καρδιαγγειακή νοσηρότητα και θνητότητα.

X. SUMMARY

PAF-AH is a calcium independent phospholipase A₂ that circulates in complex with lipoprotein particles. In human plasma, more than 90% of enzymatic activity is associated with low density lipoproteins (LDL) and the remainder with high density lipoproteins (HDL). Thus, the term plasma PAF-AH mainly reflects the LDL-associated proportion of the enzyme. Except for PAF, the enzyme can also effectively hydrolyze oxidized phospholipids with short acyl chains at sn-2 position. These phospholipids are formed during the oxidative modification of LDL and possibly contribute to their proinflammatory properties. From a pathophysiological point of view, PAF-AH may play either an antiatherogenic role (since it degrades PAF and oxidized phospholipids) or a proatherogenic role (since it generates lyso-PC and oxidized fatty acids, molecules that have been reported to exert several proinflammatory properties). The clinical studies that evaluated the role of PAF-AH in the pathogenesis of atherosclerosis failed to reveal consistent results. Thus, other studies have shown that patients with cardiovascular disease exhibit significantly higher plasma enzymatic activity as compared to healthy individuals, whereas recent studies in Japanese patients concluded that the loss of plasma enzymatic activity due to G⁹⁹⁴→T mutation is a risk factor for ischemic events. However, a recent analysis of WOSCOPS data revealed that plasma PAF-AH is an independent risk factor for the development of cardiovascular disease.

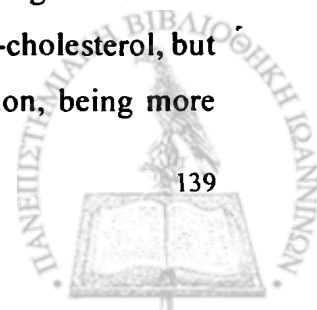
On the other hand, the HDL-associated proportion of the enzyme clearly plays an antiatherogenic role, since it protects LDL from oxidation and diminishes the biological action of oxidized LDL.

The aim of this study was to determine and compare the PAF-AH activities in patients with different forms of primary dyslipidemias and to evaluate the effects of hypolipidemic drugs on plasma and HDL-associated enzymatic activity. Two hundred and seventy-five unrelated patients attending the outpatient Lipid Clinic of the University Hospital of Ioannina were screened. Secondary causes of dyslipidemia were excluded by history, clinical examination and appropriate laboratory tests. All patients instructed to follow a low fat-low cholesterol diet for at least 3 months. At the end of this period, all patients with abnormal lipid levels were included in the study. According to their baseline lipid values patients were subdivided into primary hypercholesterolemia or dyslipidemia type IIA group, consisted of 141 patients, combined hyperlipidemia or dyslipidemia type IIB group, of 84 patients, and hypertriglyceridemia or dyslipidemia type IV group of 50 patients. Furthermore, patients with



primary hypercholesterolemia were divided according to the underlying genetic defect into patients with homozygous familial hypercholesterolemia (HomoFH, n=5), patients with heterozygous familial hypercholesterolemia (HeteroFH, n=38), and patients with polygenic non-familial hypercholesterolemia (NonFH, n=98). Seventy-six patients received atorvastatin (55 type IIA and 21 type IIB patients), whereas 71 patients received fenofibrate (18 patients with type IIA dyslipidemia, 23 patients with type IIB dyslipidemia and 30 patients with type IV dyslipidemia). Serum lipid parameters and enzymatic activities were determined at baseline as well as after 16 weeks of active treatment. PAF-AH was measured in total plasma (for the determination of plasma PAF-AH), in HDL isolated after the precipitation of apoB containing lipoproteins (for the determination of HDL-associated PAF-AH) and in lipoprotein subfractions obtained by density gradient ultracentrifugation.

All patient groups exhibited significantly higher plasma PAF-AH activity as compared to normolipidemic controls. In addition, patients with type IIA and type IIB dyslipidemia exhibited higher enzymatic activity as compared to type IV patients. Both type IIB and IV patients had significantly lower HDL-associated PAF-AH activity as compared to either type IIA or control group. In contrast, type IIA patients exhibited similar HDL-associated enzymatic activity with control individuals. Finally, all patient groups had significantly lower ratios of HDL-associated PAF-AH to LDL-cholesterol compared with control individuals. Subfractionation of apoB-containing lipoproteins revealed that in all study groups the greater proportion of PAF-AH activity was preferentially associated with small, dense LDL subfractions. Type IIA and IIB patients exhibited significantly higher enzymatic activity in all LDL subfractions as compared to type IV patients and control individuals. Additionally, type IIB and IV patients had higher enzymatic activities in VLDL+IDL subfractions as compared to control group. Among HDL subspecies PAF-AH was preferentially associated with dense HDL subfractions in all patient groups. Patients with type IIB and type IV dyslipidemias had significantly lower enzymatic activity in this subfraction as compared to controls, whereas type IIA patients had similar values with normolipidemic individuals. Finally, no differences were observed in PAF-AH activity associated with the other HDL subfractions among study groups. In all patient groups with primary hypercholesterolemia (type IIA dyslipidemia) the plasma PAF-AH activity was significantly elevated compared to controls, the HomoFH having the highest and the NonFH patients the lowest enzyme activity. Gradient ultracentrifugation studies showed that this increase was not only due to the elevation in the plasma LDL-cholesterol, but also to the increase in the PAF-AH specific activity in each LDL subfraction, being more

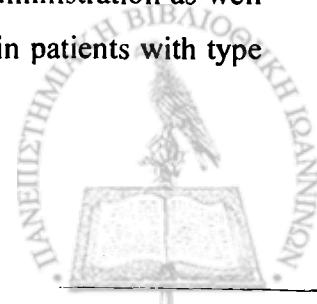


profound in the small-dense LDL-5. Unlike LDL, no difference in HDL-associated PAF-AH activity (expressed per mL of plasma) was observed among all groups. Consequently, an altered distribution of enzymatic activity among apo B- and apo AI-containing lipoproteins was observed in hypercholesterolemic patients, resulting in a significant decrease in the ratio of the HDL-associated PAF-AH to the total plasma enzyme activity compared to controls. This reduction is proportional to the increase of the plasma LDL-cholesterol levels and consequently to the severity of the hypercholesterolemia, being more profound in HomFH patients.

Atorvastatin and fenofibrate administration induced a significant reduction in plasma PAF-AH activity in all groups studied. However, the responsible mechanism for this reduction was different for each drug and was affected by the underlying defect in the lipoproteins metabolism. Specifically, atorvastatin induced a significant decrease in the enzymatic activity associated with all LDL subfractions in type IIA and type IIB patients. In contrast, fenofibrate administration resulted in a significant reduction in PAF-AH activity associated with small, dense LDL subfractions in all patient groups without affecting the enzymatic activity in large and intermediate density subfractions. The reduction in plasma PAF-AH activity in type IV patients after fenofibrate administration was mainly due to the reduction in enzymatic activity associated with VLDL+IDL subfractions. This phenomenon was also observed (although to a lesser extent) in type IIB patients.

Although atorvastatin did not significantly affect HDL-associated PAF-AH activity in type IIA and type IIB patients, fenofibrate induced an increase in HDL-associated enzymatic activity in type IIB and IV patients, whereas it did not affect the enzymatic activity in type IIA patients. This increase was due to an elevation in enzymatic activity associated with dense HDL subfractions whereas the enzymatic activity in the other HDL subspecies was not significantly affected. Finally, fenofibrate and atorvastatin induced a significant increase in the ratio of HDL-associated PAF-AH to LDL-cholesterol in all patient groups.

In conclusion patients with different forms of primary dyslipidemias exhibit significantly higher plasma PAF-AH activity as compared to healthy population. In addition, patients with type IIB and type IV dyslipidemia have lower HDL-associated enzymatic activity as compared to controls, whereas all patient groups possess diminished protective potency of HDL against the LDL proatherogenic properties. These alterations may contribute to the increased incidence of cardiovascular disease in patients with primary dyslipidemias. The reductions in plasma PAF-AH activity in all patient groups after atorvastatin and fenofibrate administration as well as the fenofibrate-induced increase in HDL-associated PAF-AH activity in patients with type



IIb and type IV dyslipidemia represent new additional mechanisms of action of these potent hypolipidemic drugs and may contribute to their antiatherogenic and antiinflammatory functions.



XI. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΕΣ

1. Hussain MM. A proposed model for the assembly of chylomicrons. *Atherosclerosis* 2000;148:1-15.
2. Beisiegel U. Lipoprotein metabolism. *Eur Heart J* 1998;19 Suppl A:A20-3.:A20-A23.
3. Eckel RH. Lipoprotein lipase. A multifunctional enzyme relevant to common metabolic diseases. *N Engl J Med* 1989;320:1060-1068.
4. Cooper AD. Hepatic clearance of plasma chylomicron remnants. *Semin Liver Dis* 1992;12:386-396.
5. Davis RA. Cell and molecular biology of the assembly and secretion of apolipoprotein B-containing lipoproteins by the liver. *Biochim Biophys Acta* 1999;1440:1-31.
6. Goldberg IJ. Lipoprotein lipase and lipolysis: central roles in lipoprotein metabolism and atherogenesis. *J Lipid Res* 1996;37:693-707.
7. Connelly PW. The role of hepatic lipase in lipoprotein metabolism. *Clin Chim Acta* 1999;286:243-255.
8. Eisenberg S, Sehayek E. Remnant particles and their metabolism. *Baillieres Clin Endocrinol Metab* 1995;9:739-753.
9. Brown MS, Goldstein JL. A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science* 1986;232:34-47.
10. Brown MS, Goldstein JL. Lipoprotein receptors in the liver. Control signals for plasma cholesterol traffic. *J Clin Invest* 1983;72:743-747.
11. Eisenberg S. High density lipoprotein metabolism. *J Lipid Res* 1984;25:1017-1058.
12. Fielding CJ, Fielding PE. Molecular physiology of reverse cholesterol transport. *J Lipid Res* 1995;36:211-228.
13. Tall AR. Plasma cholesteryl ester transfer protein and high-density lipoproteins: new insights from molecular genetic studies. *J Intern Med* 1995;237:5-12.
14. Acton SL, Scherer PE, Lodish HF, Krieger M. Expression cloning of SR-BI, a CD36-related class B scavenger receptor. *J Biol Chem* 1994;269:21003-21009.
15. Gordon T, Kannel WB, Castelli WP, Dawber TR. Lipoproteins, cardiovascular disease, and death. The Framingham study. *Arch Intern Med* 1981;141:1128-1131.
16. Influence of pravastatin and plasma lipids on clinical events in the West of Scotland Coronary Prevention Study (WOSCOPS). *Circulation* 1998;97:1440-1445.

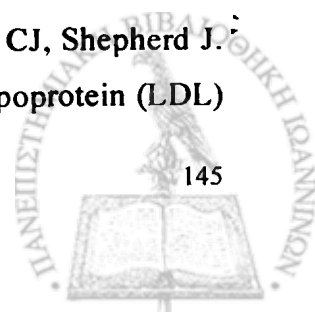


17. Downs JR, Clearfield M, Weis S, Whitney E, Shapiro DR, Beere PA, Langendorfer A, Stein EA, Kruyer W, Gotto AM, Jr. Primary prevention of acute coronary events with lovastatin in men and women with average cholesterol levels: results of AFCAPS/TexCAPS. Air Force/Texas Coronary Atherosclerosis Prevention Study. *JAMA* 1998;279:1615-1622.
18. Sacks FM, Pfeffer MA, Moye LA, Rouleau JL, Rutherford JD, Cole TG, Brown L, Wamica JW, Arnold JM, Wun CC, Davis BR, Braunwald E. The effect of pravastatin on coronary events after myocardial infarction in patients with average cholesterol levels. Cholesterol and Recurrent Events Trial investigators. *N Engl J Med* 1996;335:1001-1009.
19. Athyros VG, Mikhailidis DP, Papageorgiou AA, Mercouris BR, Athyrou VV, Symeonidis AN, Basayannis EO, Demitriadis DS, Kontopoulos AG. Attaining United Kingdom-European Atherosclerosis Society low-density lipoprotein cholesterol guideline target values in the Greek Atorvastatin and Coronary-heart-disease Evaluation (GREACE) Study. *Curr Med Res Opin* 2002;18:499-502.
20. Randomised trial of cholesterol lowering in 4444 patients with coronary heart disease: the Scandinavian Simvastatin Survival Study (4S). *Lancet* 1994;344:1383-1389.
21. MRC/BHF Heart Protection Study of cholesterol lowering with simvastatin in 20,536 high-risk individuals: a randomised placebo-controlled trial. *Lancet* 2002;360:7-22.
22. Boren J, Gustafsson M, Skalen K, Flood C, Innerarity TL. Role of extracellular retention of low density lipoproteins in atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol* 2000;11:451-456.
23. Itabe H. Oxidized low-density lipoproteins: what is understood and what remains to be clarified. *Biol Pharm Bull* 2003;26:1-9.
24. Cushing SD, Berliner JA, Valente AJ, Territo MC, Navab M, Parhami F, Gerrity R, Schwartz CJ, Fogelman AM. Minimally modified low density lipoprotein induces monocyte chemotactic protein 1 in human endothelial cells and smooth muscle cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990;87:5134-5138.
25. Rajavashisth TB, Yamada H, Mishra NK. Transcriptional activation of the macrophage-colony stimulating factor gene by minimally modified LDL. Involvement of nuclear factor-kappa B. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995;15:1591-1598.
26. Osterud B, Bjorklid E. Role of monocytes in atherogenesis. *Physiol Rev* 2003;83:1069-1112.

27. Kunjathoor VV, Febbraio M, Podrez EA, Moore KJ, Andersson L, Koehn S, Rhee JS, Silverstein R, Hoff HF, Freeman MW. Scavenger receptors class A-I/II and CD36 are the principal receptors responsible for the uptake of modified low density lipoprotein leading to lipid loading in macrophages. *J Biol Chem* 2002;277:49982-49988.
28. Boullier A, Bird DA, Chang MK, Dennis EA, Friedman P, Gillotre-Taylor K, Horkko S, Palinski W, Quehenberger O, Shaw P, Steinberg D, Terpstra V, Witztum JL. Scavenger receptors, oxidized LDL, and atherosclerosis. *Ann N Y Acad Sci* 2001;947:214-22.
29. Mine S, Tabata T, Wada Y, Fujisaki T, Iida T, Noguchi N, Niki E, Kodama T, Tanaka Y. Oxidized low density lipoprotein-induced LFA-1-dependent adhesion and transendothelial migration of monocytes via the protein kinase C pathway. *Atherosclerosis* 2002;160:281-288.
30. Reddy S, Hama S, Grijalva V, Hassan K, Mottahedeh R, Hough G, Wadleigh DJ, Navab M, Fogelman AM. Mitogen-activated protein kinase phosphatase 1 activity is necessary for oxidized phospholipids to induce monocyte chemotactic activity in human aortic endothelial cells. *J Biol Chem* 2001;276:17030-17035.
31. Sata M, Walsh K. Endothelial cell apoptosis induced by oxidized LDL is associated with the down-regulation of the cellular caspase inhibitor FLIP. *J Biol Chem* 1998;273:33103-33106.
32. Pirillo A, Zhu W, Norata GD, Zanelli T, Barberi L, Roma P, Catapano AL. Oxidized lipoproteins and endothelium. *Clin Chem Lab Med* 2000;38:155-160.
33. Vieira O, Escargueil-Blanc I, Jurgens G, Borner C, Almeida L, Salvayre R, Negre-Salvayre A. Oxidized LDLs alter the activity of the ubiquitin-proteasome pathway: potential role in oxidized LDL-induced apoptosis. *FASEB J* 2000;14:532-542.
34. Colles SM, Maxson JM, Carlson SG, Chisolm GM. Oxidized LDL-induced injury and apoptosis in atherosclerosis. Potential roles for oxysterols. *Trends Cardiovasc Med* 2001;11:131-138.
35. Holvoet P. Endothelial dysfunction, oxidation of low-density lipoprotein, and cardiovascular disease. *Thromb Haemostasis* 1999;79:287-293.
36. Mukherjee S, Coaxum SD, Maleque M, Das SK. Effects of oxidized low density lipoprotein on nitric oxide synthetase and protein kinase C activities in bovine endothelial cells. *Cell Mol Biol* 2001;47:1051-1058.



37. Jiang F, Gibson AP, Dusting GJ. Endothelial dysfunction induced by oxidized low-density lipoproteins in isolated mouse aorta: a comparison with apolipoprotein-E deficient mice. *Eur J Pharmacol* 2001;424:141-149.
38. Vlasova II. The effect of oxidatively modified low-density lipoproteins on platelet aggregability and membrane fluidity. *Platelets* 2000;11:406-414.
39. Hartwich J, Dembinska-Kiec A, Gruca A, Motyka M, Partyka L, Skrzeczynska J, Bzowska M, Pryjma J, Huber J, Leitinger N, Schmitz G. Regulation of platelet adhesion by oxidized lipoproteins and oxidized phospholipids. *Platelets* 2002;13:141-151.
40. Packard CJ, Shepherd J. Lipoprotein heterogeneity and apolipoprotein B metabolism. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997;17:3542-3556.
41. Superko HR. Small, dense, low-density lipoprotein and atherosclerosis. *Curr Atheroscler Rep* 2000;2:226-231.
42. Lamarche B, Lemieux I, Despres JP. The small, dense LDL phenotype and the risk of coronary heart disease: epidemiology, patho-physiology and therapeutic aspects. *Diabetes Metab* 1999;25:199-211.
43. Austin MA. Small, dense low-density lipoprotein as a risk factor for coronary heart disease. *Int J Clin Lab Res* 1994;24:187-192.
44. Nordestgaard BG, Nielsen LB. Atherosclerosis and arterial influx of lipoproteins. *Curr Opin Lipidol* 1994;5:252-257.
45. Chait A, Brazg RL, Tribble DL, Krauss RM. Susceptibility of small, dense, low-density lipoproteins to oxidative modification in subjects with the atherogenic lipoprotein phenotype, pattern B. *Am J Med* 1993;94:350-356.
46. Toyota Y, Yamamura T, Miyake Y, Yamamoto A. Low density lipoprotein (LDL) binding affinity for the LDL receptor in hyperlipoproteinemia. *Atherosclerosis* 1999;147:77-86.
47. Austin MA, Talmud PJ, Luong LA, Haddad L, Day IN, Newman B, Edwards KL, Krauss RM, Humphries SE. Candidate-gene studies of the atherogenic lipoprotein phenotype: a sib-pair linkage analysis of DZ women twins. *Am J Hum Genet* 1998;62:406-419.
48. Austin MA, Krauss RM. Genetic control of low-density-lipoprotein subclasses. *Lancet* 1986;2:592-595.
49. Griffin BA, Freeman DJ, Tait GW, Thomson J, Caslake MJ, Packard CJ, Shepherd J. Role of plasma triglyceride in the regulation of plasma low density lipoprotein (LDL)



- subfractions: relative contribution of small, dense LDL to coronary heart disease risk. *Atherosclerosis* 1994;106:241-253.
50. Austin MA, McKnight B, Edwards KL, Bradley CM, McNeely MJ, Psaty BM, Brunzell JD, Motulsky AG. Cardiovascular disease mortality in familial forms of hypertriglyceridemia: A 20-year prospective study. *Circulation* 2000;101:2777-2782.
 51. Austin MA, Edwards KL. Small, dense low density lipoproteins, the insulin resistance syndrome and noninsulin-dependent diabetes. *Curr Opin Lipidol* 1996;7:167-171.
 52. Talmud PJ, Edwards KL, Turner CM, Newman B, Palmen JM, Humphries SE, Austin MA. Linkage of the cholesteryl ester transfer protein (CETP) gene to LDL particle size: use of a novel tetranucleotide repeat within the CETP promoter. *Circulation* 2000;101:2461-2466.
 53. Guerin M, Le Goff W, Lassel TS, Van Tol A, Steiner G, Chapman MJ. Atherogenic role of elevated CE transfer from HDL to VLDL(1) and dense LDL in type 2 diabetes : impact of the degree of triglyceridemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001;21:282-288.
 54. Carr MC, Ayyobi AF, Murdoch SJ, Deeb SS, Brunzell JD. Contribution of hepatic lipase, lipoprotein lipase, and cholesteryl ester transfer protein to LDL and HDL heterogeneity in healthy women. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002;22:667-673.
 55. Blanche PJ, Gong EL, Forte TM, Nichols AV. Characterization of human high-density lipoproteins by gradient gel electrophoresis. *Biochim Biophys Acta* 1981;665:408-419.
 56. Cheung MC, Albers JJ. Characterization of lipoprotein particles isolated by immunoaffinity chromatography. Particles containing A-I and A-II and particles containing A-I but no A-II. *J Biol Chem* 1984;259:12201-12209.
 57. Miller GJ, Miller NE. Plasma-high-density-lipoprotein concentration and development of ischaemic heart-disease. *Lancet* 1975;1:16-19.
 58. Miller NE. Associations of high-density lipoprotein subclasses and apolipoproteins with ischemic heart disease and coronary atherosclerosis. *Am Heart J* 1987;113:589-597.
 59. Tall AR. Plasma high density lipoproteins. Metabolism and relationship to atherogenesis. *J Clin Invest* 1990;86:379-384.
 60. von Eckardstein A, Nofer JR, Assmann G. High density lipoproteins and arteriosclerosis. Role of cholesterol efflux and reverse cholesterol transport. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001;21:13-27.



61. National Cholesterol Education Program. Second Report of the Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel II). *Circulation* 1994;89:1333-1445.
62. Executive Summary of The Third Report of The National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, And Treatment of High Blood Cholesterol In Adults (Adult Treatment Panel III). *JAMA* 2001;285:2486-2497.
63. Sacks FM. The role of high-density lipoprotein (HDL) cholesterol in the prevention and treatment of coronary heart disease: expert group recommendations. *Am J Cardiol* 2002;90:139-143.
64. Chiesa G, Monteggia E, Marchesi M, Lorenzon P, Laucello M, Lorusso V, Di Mario C, Karvouni E, Newton RS, Bisgaier CL, Franceschini G, Sirtori CR. Recombinant apolipoprotein A-I(Milano) infusion into rabbit carotid artery rapidly removes lipid from fatty streaks. *Circ Res* 2002;90:974-980.
65. Newton RS, Krause BR. HDL therapy for the acute treatment of atherosclerosis. *Atheroscler Suppl* 2002;3:31-38.
66. Chiesa G, Sirtori CR. Use of recombinant apolipoproteins in vascular diseases: the case of apoA-I. *Curr Opin Investig Drugs* 2002;3:420-426.
67. Nissen SE, Tsunoda T, Tuzcu EM, Schoenhagen P, Cooper CJ, Yasin M, Eaton GM, Lauer MA, Sheldon WS, Grines CL, Halpern S, Crowe T, Blankenship JC, Kerensky R. Effect of recombinant ApoA-I Milano on coronary atherosclerosis in patients with acute coronary syndromes: a randomized controlled trial. *JAMA* 2003;290:2292-2300.
68. Assmann G, Schulte H. Relation of high-density lipoprotein cholesterol and triglycerides to incidence of atherosclerotic coronary artery disease (the PROCAM experience). Prospective Cardiovascular Munster study. *Am J Cardiol* 1992;70:733-737.
69. Frick MH, Elo O, Haapa K, Heinonen OP, Heinsalmi P, Helo P, Huttunen JK, Kaitaniemi P, Koskinen P, Manninen V, . Helsinki Heart Study: primary-prevention trial with gemfibrozil in middle-aged men with dyslipidemia. Safety of treatment, changes in risk factors, and incidence of coronary heart disease. *N Engl J Med* 1987;317:1237-1245.
70. Manninen V, Tenkanen L, Koskinen P, Huttunen JK, Manttari M, Heinonen OP, Frick MH. Joint effects of serum triglyceride and LDL cholesterol and HDL cholesterol

concentrations on coronary heart disease risk in the Helsinki Heart Study. Implications for treatment. *Circulation* 1992;85:37-45.

71. Rubins HB, Robins SJ, Collins D, Fye CL, Anderson JW, Elam MB, Faas FH, Linares E, Schaefer EJ, Schectman G, Wilt TJ, Wittes J. Gemfibrozil for the secondary prevention of coronary heart disease in men with low levels of high-density lipoprotein cholesterol. Veterans Affairs High-Density Lipoprotein Cholesterol Intervention Trial Study Group. *N Engl J Med* 1999;341:410-418.
72. Robins SJ, Rubins HB, Faas FH, Schaefer EJ, Elam MB, Anderson JW, Collins D. Insulin resistance and cardiovascular events with low HDL cholesterol: the Veterans Affairs HDL Intervention Trial (VA-HIT). *Diabetes Care* 2003;26:1513-1517.
73. Edwards KL, Mahaney MC, Motulsky AG, Austin MA. Pleiotropic genetic effects on LDL size, plasma triglyceride, and HDL cholesterol in families. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999;19:2456-2464.
74. Mahaney MC, Blangero J, Comuzzie AG, VandeBerg JL, Stern MP, MacCluer JW. Plasma HDL cholesterol, triglycerides, and adiposity. A quantitative genetic test of the conjoint trait hypothesis in the San Antonio Family Heart Study. *Circulation* 1995;92:3240-3248.
75. Sprecher DL, Feigelson HS, Laskarzewski PM. The low HDL cholesterol/high triglyceride trait. *Arterioscler Thromb* 1993;13:495-504.
76. Rashid S, Watanabe T, Sakaue T, Lewis GF. Mechanisms of HDL lowering in insulin resistant, hypertriglyceridemic states: the combined effect of HDL triglyceride enrichment and elevated hepatic lipase activity. *Clin Biochem* 2003;36:421-429.
77. Borggreve SE, De Vries R, Dullaart RP. Alterations in high-density lipoprotein metabolism and reverse cholesterol transport in insulin resistance and type 2 diabetes mellitus: role of lipolytic enzymes, lecithin:cholesterol acyltransferase and lipid transfer proteins. *Eur J Clin Invest* 2003;33:1051-1069.
78. Ruotolo G, Howard BV. Dyslipidemia of the metabolic syndrome. *Curr Cardiol Rep* 2002;4:494-500.
79. Grundy SM. Hypertriglyceridemia, insulin resistance, and the metabolic syndrome. *Am J Cardiol* 1999;83:25F-29F.
80. Eisenberg S, Gavish D, Oschry Y, Fainaru M, Deckelbaum RJ. Abnormalities in very low, low and high density lipoproteins in hypertriglyceridemia. Reversal toward normal with bezafibrate treatment. *J Clin Invest* 1984;74:470-482.



81. Deckelbaum RJ, Granot E, Oschry Y, Rose L, Eisenberg S. Plasma triglyceride determines structure-composition in low and high density lipoproteins. *Arteriosclerosis* 1984;4:225-231.
82. Horowitz BS, Goldberg IJ, Merab J, Vanni TM, Ramakrishnan R, Ginsberg HN. Increased plasma and renal clearance of an exchangeable pool of apolipoprotein A-I in subjects with low levels of high density lipoprotein cholesterol. *J Clin Invest* 1993;91:1743-1752.
83. Hokanson JE, Austin MA. Plasma triglyceride level is a risk factor for cardiovascular disease independent of high-density lipoprotein cholesterol level: a meta-analysis of population-based prospective studies. *J Cardiovasc Risk* 1996;3:213-219.
84. Jeppesen J, Hein HO, Suadicani P, Gyntelberg F. Triglyceride concentration and ischemic heart disease: an eight-year follow-up in the Copenhagen Male Study. *Circulation* 1998;97:1029-1036.
85. Pasternak RC, Grundy SM, Levy D, Thompson PD. 27th Bethesda Conference: matching the intensity of risk factor management with the hazard for coronary disease events. Task Force 3. Spectrum of risk factors for coronary heart disease. *J Am Coll Cardiol* 1996;27:978-990.
86. LaRosa JC. Triglycerides and coronary risk in women and the elderly. *Arch Intern Med* 1997;157:961-968.
87. Brenner H, Heiss G. The intraindividual variability of fasting triglyceride--a challenge for further standardization. *Eur Heart J* 1990;11:1054-1058.
88. Lupattelli G, Pasqualini L, Siepi D, Marchesi S, Pirro M, Vaudo G, Ciuffetti G, Mannarino E. Increased postprandial lipemia in patients with normolipemic peripheral arterial disease. *Am Heart J* 2002;143:733-738.
89. Roche HM, Gibney MJ. The impact of postprandial lipemia in accelerating atherothrombosis. *J Cardiovasc Risk* 2000;7:317-324.
90. Boquist S, Ruotolo G, Tang R, Bjorkegren J, Bond MG, de Faire U, Karpe F, Hamsten A. Alimentary lipemia, postprandial triglyceride-rich lipoproteins, and common carotid intima-media thickness in healthy, middle-aged men. *Circulation* 1999;100:723-728.
91. Ooi TC, Simo IE, Yakichuk JA. Delayed clearance of postprandial chylomicrons and their remnants in the hypoalphalipoproteinemia and mild hypertriglyceridemia syndrome. *Arterioscler Thromb* 1992;12:1184-1190.

92. Ooi TC, Cousins M, Ooi DS, Steiner G, Uffelman KD, Nakajima K, Simo IE. Postprandial remnant-like lipoproteins in hypertriglyceridemia. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86:3134-3142.
93. Speidel MT, Booyse FM, Abrams A, Moore MA, Chung BH. Lipolyzed hypertriglyceridemic serum and triglyceride-rich lipoprotein cause lipid accumulation in and are cytotoxic to cultured human endothelial cells. High density lipoproteins inhibit this cytotoxicity. *Thromb Res* 1990;58:251-264.
94. James RW, Pometta D. Postprandial lipemia differentially influences high density lipoprotein subpopulations LpAI and LpAI, AII. *J Lipid Res* 1994;35:1583-1591.
95. Patsch JR, Prasad S, Gotto AM, Jr., Bengtsson-Olivecrona G. Postprandial lipemia. A key for the conversion of high density lipoprotein2 into high density lipoprotein3 by hepatic lipase. *J Clin Invest* 1984;74:2017-2023.
96. Patsch JR, Prasad S, Gotto AM, Jr., Patsch W. High density lipoprotein2. Relationship of the plasma levels of this lipoprotein species to its composition, to the magnitude of postprandial lipemia, and to the activities of lipoprotein lipase and hepatic lipase. *J Clin Invest* 1987;80:341-347.
97. Chung BH, Segrest JP. Cytotoxicity of remnants of triglyceride-rich lipoproteins: an atherogenic insult? *Adv Exp Med Biol* 1991;285:341-51.:341-351.
98. Mamo JC, Proctor SD, Smith D. Retention of chylomicron remnants by arterial tissue; importance of an efficient clearance mechanism from plasma. *Atherosclerosis* 1998;141 Suppl 1:S63-9.:S63-S69.
99. Saito M, Eto M, Makino I. Triglyceride-rich lipoproteins from apolipoprotein E3/2 subjects with hypertriglyceridemia enhance cholesteryl ester synthesis in human macrophages. *Atherosclerosis* 1997;129:73-77.
100. Durrington P. Dyslipidaemia. *Lancet* 2003;362:717-731.
101. Baker DP, Van Lenten BJ, Fogelman AM, Edwards PA, Kean C, Berliner JA. LDL, scavenger, and beta-VLDL receptors on aortic endothelial cells. *Arteriosclerosis* 1984;4:248-255.
102. Gustafson S, Ostlund-Lindqvist AM, Vessby B. Uptake and degradation of human very-low-density lipoproteins by rat liver endothelial cells in culture. *Biochim Biophys Acta* 1985;834:308-315.
103. Gustafson S, Vessby B, Ostlund-Lindqvist AM. Apolipoprotein-E-binding proteins of rat liver endothelial cells. *Biochim Biophys Acta* 1988;962:73-80.



104. Gianturco SH, Bradley WA. Pathophysiology of triglyceride-rich lipoproteins in atherothrombosis: cellular aspects. *Clin Cardiol* 1999;22:117-14.
105. Srinivasan SR, Berenson GS. Apolipoproteins B and A-I as predictors of risk of coronary artery disease. *Lancet* 2001;358:2012-2013.
106. Talmud PJ, Hawe E, Miller GJ, Humphries SE. Nonfasting apolipoprotein B and triglyceride levels as a useful predictor of coronary heart disease risk in middle-aged UK men. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002;22:1918-1923.
107. Sniderman AD, Furberg CD, Keech A, Roeters van Lennep JE, Frohlich J, Jungner I, Walldius G. Apolipoproteins versus lipids as indices of coronary risk and as targets for statin treatment. *Lancet* 2003;361:777-780.
108. Austin MA, Breslow JL, Hennekens CH, Buring JE, Willett WC, Krauss RM. Low-density lipoprotein subclass patterns and risk of myocardial infarction. *JAMA* 1988;260:1917-1921.
109. Austin MA. Triglyceride, small, dense low-density lipoprotein, and the atherogenic lipoprotein phenotype. *Curr Atheroscler Rep* 2000;2:200-207.
110. Saigo M, Abe S, Ogawa M, Biro S, Minagoe S, Maruyama I, Toda H, Kiyonaga K, Atsuchi Y, Tahara M, Mawatari K, Tei C. Plasma level of triglyceride-rich lipoprotein remnants is closely associated with the activation of coagulation factor VII in patients with myocardial infarction. *Thromb Res* 2000;100:9-17.
111. Schneider DJ, Sobel BE. Synergistic augmentation of expression of plasminogen activator inhibitor type-I induced by insulin, very-low-density lipoproteins, and fatty acids. *Coron Artery Dis* 1996;7:813-817.
112. Dichtl W, Ares MP, Stollenwerk M, Giachelli CM, Scatena M, Hamsten A, Eriksson P, Nilsson J. In vivo stimulation of vascular plasminogen activator inhibitor-1 production by very low-density lipoprotein involves transcription factor binding to a VLDL-responsive element. *Thromb Haemost* 2000;84:706-711.
113. Ihnken K, Speiser W, Ruf W, Thiel W, Schlepper M, Muller-Berghaus G. High PAI activity with correlation to triglyceride and HDL cholesterol values in patients with coronary artery disease with no difference in survivors of myocardial infarction. *Ann Hematol* 1993;67:237-244.
114. Rader DJ, Cohen J, Hobbs HH. Monogenic hypercholesterolemia: new insights in pathogenesis and treatment. *J Clin Invest* 2003;111:1795-1803.

115. Horton JD, Shimano H, Hamilton RL, Brown MS, Goldstein JL. Disruption of LDL receptor gene in transgenic SREBP-1a mice unmasks hyperlipidemia resulting from production of lipid-rich VLDL. *J Clin Invest* 1999;103:1067-1076.
116. Gillian-Daniel DL, Bates PW, Tebon A, Attie AD. Endoplasmic reticulum localization of the low density lipoprotein receptor mediates presecretory degradation of apolipoprotein B. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99:4337-4342.
117. Leonard JV, Whitelaw AG, Wolff OH, Lloyd JK, Slack J. Diagnosing familial hypercholesterolaemia in childhood by measuring serum cholesterol. *Br Med J* 1977;1:1566-1568.
118. Slack J. Risks of ischaemic heart-disease in familial hyperlipoproteinaemic states. *Lancet* 1969;2:1380-1382.
119. Marks D, Thorogood M, Neil HA, Humphries SE. A review on the diagnosis, natural history, and treatment of familial hypercholesterolaemia. *Atherosclerosis* 2003;168:1-14.
120. Heiberg A, Slack J. Family similarities in the age at coronary death in familial hypercholesterolaemia. *Br Med J* 1977;2:493-495.
121. Sun XM, Patel DD, Knight BL, Soutar AK. Influence of genotype at the low density lipoprotein (LDL) receptor gene locus on the clinical phenotype and response to lipid-lowering drug therapy in heterozygous familial hypercholesterolaemia. The Familial Hypercholesterolaemia Regression Study Group. *Atherosclerosis* 1998;136:175-185.
122. Bhatnagar D, Morgan J, Siddiq S, Mackness MI, Miller JP, Durrington PN. Outcome of case finding among relatives of patients with known heterozygous familial hypercholesterolaemia. *BMJ* 2000;321:1497-1500.
123. Moorjani S, Gagne C, Lupien PJ, Brun D. Plasma triglycerides related decrease in high-density lipoprotein cholesterol and its association with myocardial infarction in heterozygous familial hypercholesterolemia. *Metabolism* 1986;35:311-316.
124. Miltiados G, Cariolou MA, Elisaf M. HDL cholesterol levels in patients with molecularly defined familial hypercholesterolemia. *Ann Clin Lab Sci* 2002;32:50-54.
125. Mbewu AD, Bhatnagar D, Durrington PN, Hunt L, Ishola M, Arrol S, Mackness M, Lockley P, Miller JP. Serum lipoprotein(a) in patients heterozygous for familial hypercholesterolemia, their relatives, and unrelated control populations. *Arterioscler Thromb* 1991;11:940-946.

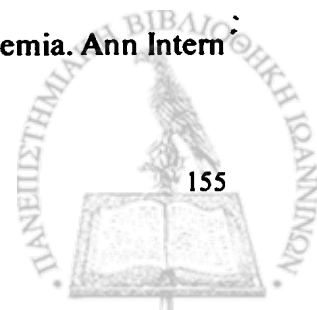


126. Miltiados G, Tsimihodimos V, Bairaktari E, Elisaf M. Lipoprotein(a) levels in patients with homozygous familial hypercholesterolaemia. *Atherosclerosis* 2001;157:255-256.
127. Rallidis L, Naoumova RP, Thompson GR, Nihoyannopoulos P. Extent and severity of atherosclerotic involvement of the aortic valve and root in familial hypercholesterolaemia. *Heart* 1998;80:583-590.
128. Durrington PN. Rigorous detection and vigorous treatment of familial hypercholesterolaemia. *Lancet* 2001;357:574-575.
129. Smilde TJ, van Wissen S, Wollersheim H, Trip MD, Kastelein JJ, Stalenhoef AF. Effect of aggressive versus conventional lipid lowering on atherosclerosis progression in familial hypercholesterolaemia (ASAP): a prospective, randomised, double-blind trial. *Lancet* 2001;357:577-581.
130. Illingworth DR, Bacon S. Treatment of heterozygous familial hypercholesterolemia with lipid-lowering drugs. *Arteriosclerosis* 1989;9:1121-1134.
131. Heinonen TM, Schrott H, McKenney JM, Sniderman AD, Broyles FE, Zavoral JH, Kivel F, Black DM. Atorvastatin, a New HMG-CoA Reductase Inhibitor as Monotherapy and Combined With Colestipol. *J Cardiovasc Pharmacol Ther* 1996;1:117-122.
132. Gylling H, Radhakrishnan R, Miettinen TA. Reduction of serum cholesterol in postmenopausal women with previous myocardial infarction and cholesterol malabsorption induced by dietary sitostanol ester margarine: women and dietary sitostanol. *Circulation* 1997;96:4226-4231.
133. Gagne C, Gaudet D, Bruckert E. Efficacy and safety of ezetimibe coadministered with atorvastatin or simvastatin in patients with homozygous familial hypercholesterolemia. *Circulation* 2002;105:2469-2475.
134. Kwiterovich PO, Jr. Identification and treatment of heterozygous familial hypercholesterolemia in children and adolescents. *Am J Cardiol* 1993;72:30D-37D.
135. de Jongh S, Ose L, Szamosi T, Gagne C, Lambert M, Scott R, Perron P, Dobbelaere D, Saborio M, Tuohy MB, Stepanavage M, Sapre A, Gumbiner B, Mercuri M, van Trotsenburg AS, Bakker HD, Kastelein JJ. Efficacy and safety of statin therapy in children with familial hypercholesterolemia: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial with simvastatin. *Circulation* 2002;106:2231-2237.

136. Park JW, Merz M, Braun P. Effect of HELP-LDL-apheresis on outcomes in patients with advanced coronary atherosclerosis and severe hypercholesterolemia. *Atherosclerosis* 1998;139:401-409.
137. Bilheimer DW, Goldstein JL, Grundy SM, Starzl TE, Brown MS. Liver transplantation to provide low-density-lipoprotein receptors and lower plasma cholesterol in a child with homozygous familial hypercholesterolemia. *N Engl J Med* 1984;311:1658-1664.
138. Grossman M, Raper SE, Kozarsky K, Stein EA, Engelhardt JF, Muller D, Lupien PJ, Wilson JM. Successful ex vivo gene therapy directed to liver in a patient with familial hypercholesterolaemia. *Nat Genet* 1994;6:335-341.
139. Talmud P, Tybjaerg-Hansen A, Bhatnagar D, Mbewu A, Miller JP, Durrington P, Humphries S. Rapid screening for specific mutations in patients with a clinical diagnosis of familial hypercholesterolaemia. *Atherosclerosis* 1991;89:137-141.
140. Myant NB. Familial defective apolipoprotein B-100: a review, including some comparisons with familial hypercholesterolaemia. *Atherosclerosis* 1993;104:1-18.
141. Schaefer JR, Scharnagl H, Baumstark MW, Schweer H, Zech LA, Seyberth H, Winkler K, Steinmetz A, Marz W. Homozygous familial defective apolipoprotein B-100. Enhanced removal of apolipoprotein E-containing VLDLs and decreased production of LDLs. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997;17:348-353.
142. Nikkila EA, Aro A. Family study of serum lipids and lipoproteins in coronary heart-disease. *Lancet* 1973;1:954-959.
143. Goldstein JL, Schrott HG, Hazzard WR, Bierman EL, Motulsky AG. Hyperlipidemia in coronary heart disease. II. Genetic analysis of lipid levels in 176 families and delineation of a new inherited disorder, combined hyperlipidemia. *J Clin Invest* 1973;52:1544-1568.
144. Aouizerat BE, Allayee H, Bodnar J, Krass KL, Peltonen L, de Bruin TW, Rotter JJ, Lusis AJ. Novel genes for familial combined hyperlipidemia. *Curr Opin Lipidol* 1999;10:113-122.
145. Eurlings PM, van der Kallen CJ, Geurts JM, van Greevenbroek MM, de Bruin TW. Genetic dissection of familial combined hyperlipidemia. *Mol Genet Metab* 2001;74:98-104.
146. Mann CJ, Yen FT, Grant AM, Bihain BE. Mechanism of plasma cholesteryl ester transfer in hypertriglyceridemia. *J Clin Invest* 1991;88:2059-2066.



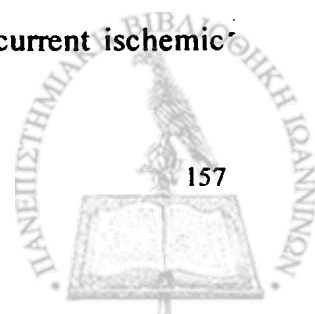
147. Barter PJ, Rye KA. Cholesteryl ester transfer protein, high density lipoprotein and arterial disease. *Curr Opin Lipidol* 2001;12:377-382.
148. Purnell JQ, Kahn SE, Schwartz RS, Brunzell JD. Relationship of insulin sensitivity and ApoB levels to intra-abdominal fat in subjects with familial combined hyperlipidemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001;21:567-572.
149. Hopkins PN, Heiss G, Ellison RC, Province MA, Pankow JS, Eckfeldt JH, Hunt SC. Coronary artery disease risk in familial combined hyperlipidemia and familial hypertriglyceridemia: a case-control comparison from the National Heart, Lung, and Blood Institute Family Heart Study. *Circulation* 2003;108:519-523.
150. Guerin M, Bruckert E, Dolphin PJ, Turpin G, Chapman MJ. Fenofibrate reduces plasma cholesteryl ester transfer from HDL to VLDL and normalizes the atherogenic, dense LDL profile in combined hyperlipidemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1996;16:763-772.
151. Forster LF, Stewart G, Bedford D, Stewart JP, Rogers E, Shepherd J, Packard CJ, Caslake MJ. Influence of atorvastatin and simvastatin on apolipoprotein B metabolism in moderate combined hyperlipidemic subjects with low VLDL and LDL fractional clearance rates. *Atherosclerosis* 2002;164:129-145.
152. Guerin M, Lassel TS, Le Goff W, Farnier M, Chapman MJ. Action of atorvastatin in combined hyperlipidemia : preferential reduction of cholesteryl ester transfer from HDL to VLDL1 particles. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;20:189-197.
153. Okamoto H, Yonemori F, Wakitani K, Minowa T, Maeda K, Shinkai H. A cholesteryl ester transfer protein inhibitor attenuates atherosclerosis in rabbits. *Nature* 2000;406:203-207.
154. Benlian P, De Gennes JL, Foubert L, Zhang H, Gagne SE, Hayden M. Premature atherosclerosis in patients with familial chylomicronemia caused by mutations in the lipoprotein lipase gene. *N Engl J Med* 1996;335:848-854.
155. Breckenridge WC, Little JA, Steiner G, Chow A, Poapst M. Hypertriglyceridemia associated with deficiency of apolipoprotein C-II. *N Engl J Med* 1978;298:1265-1273.
156. Demant T, Gaw A, Watts GF, Durrington P, Buckley B, Imrie CW, Wilson C, Packard CJ, Shepherd J. Metabolism of apoB-100-containing lipoproteins in familial hyperchylomicronemia. *J Lipid Res* 1993;34:147-156.
157. Lesser PB, Warshaw AL. Diagnosis of pancreatitis masked by hyperlipemia. *Ann Intern Med* 1975;82:795-798.



158. Heaney AP, Sharer N, Rameh B, Braganza JM, Durrington PN. Prevention of recurrent pancreatitis in familial lipoprotein lipase deficiency with high-dose antioxidant therapy. *J Clin Endocrinol Metab* 1999;84:1203-1205.
159. Morganroth J, Levy RI, Fredrickson DS. The biochemical, clinical, and genetic features of type III hyperlipoproteinemia. *Ann Intern Med* 1975;82:158-174.
160. Civeira F, Pocovi M, Cenarro A, Casao E, Vilella E, Joven J, Gonzalez J, Garcia-Otin AL, Ordovas JM. Apo E variants in patients with type III hyperlipoproteinemia. *Atherosclerosis* 1996;127:273-282.
161. Ghiselli G, Schaefer EJ, Gascon P, Breser HB, Jr. Type III hyperlipoproteinemia associated with apolipoprotein E deficiency. *Science* 1981;214:1239-1241.
162. Dammerman M, Breslow JL. Genetic basis of lipoprotein disorders. *Circulation* 1995;91:505-512.
163. Rall SC, Jr., Mahley RW. The role of apolipoprotein E genetic variants in lipoprotein disorders. *J Intern Med* 1992;231:653-659.
164. Dobmeyer J, Lohrmann J, Feussner G. Prevalence and association of atherosclerosis at three different arterial sites in patients with type III hyperlipoproteinemia. *Atherosclerosis* 1996;119:89-98.
165. Brunzell JD, Albers JJ, Chait A, Grundy SM, Groszek E, McDonald GB. Plasma lipoproteins in familial combined hyperlipidemia and monogenic familial hypertriglyceridemia. *J Lipid Res* 1983;24:147-155.
166. van Barlingen HH, Kock LA, de Man FH, Erkelens DW, de Bruin TW. In vitro lipolysis of human VLDL: effect of different VLDL compositions in normolipidemia, familial combined hyperlipidemia and familial hypertriglyceridemia. *Atherosclerosis* 1996;121:75-84.
167. Otto C, Pschierer V, Soennichsen AC, Schwandt P, Richter WO. Postprandial hemorrheology and apolipoprotein B metabolism in patients with familial hypertriglyceridemia. *Metabolism* 1997;46:1299-1304.
168. Chait A, Albers JJ, Brunzell JD. Very low density lipoprotein overproduction in genetic forms of hypertriglyceridaemia. *Eur J Clin Invest* 1980;10:17-22.
169. Sniderman AD, Wolfson C, Teng B, Franklin FA, Bachorik PS, Kwiterovich PO, Jr. Association of hyperapobetalipoproteinemia with endogenous hypertriglyceridemia and atherosclerosis. *Ann Intern Med* 1982;97:833-839.



170. Miller NE. Pharmacotherapy of disorders of plasma lipoprotein metabolism. *Am J Cardiol* 1990;66:16A-19A.
171. Ast M, Frishman WH. Bile acid sequestrants. *J Clin Pharmacol* 1990;30:99-106.
172. Ryan JR, Jain A. The effect of colestipol or cholestyramine on serum cholesterol and triglycerides in a long-term controlled study. *J Clin Pharmacol New Drugs* 1972;12:268-273.
173. Iversen SA, Davidson D, Davidson C. The acceptability of resin therapy to patients attending a hospital lipid clinic. *Br J Clin Pharmacol* 1995;40:92-94.
174. Crouse JR, III. Hypertriglyceridemia: a contraindication to the use of bile acid binding resins. *Am J Med* 1987;83:243-248.
175. Moghadasian MH. Clinical pharmacology of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors. *Life Sci* 1999;65:1329-1337.
176. Jones P, Kafonek S, Laurora I, Hunninghake D. Comparative dose efficacy study of atorvastatin versus simvastatin, pravastatin, lovastatin, and fluvastatin in patients with hypercholesterolemia (the CURVES study). *Am J Cardiol* 1998;81:582-587.
177. Martin G, Duez H, Blanquart C, Berezowski V, Poulain P, Fruchart JC, Najib-Fruchart J, Glineur C, Staels B. Statin-induced inhibition of the Rho-signaling pathway activates PPARalpha and induces HDL apoA-I. *J Clin Invest* 2001;107:1423-1432.
178. Bolego C, Baetta R, Bellosa S, Corsini A, Paoletti R. Safety considerations for statins. *Curr Opin Lipidol* 2002;13:637-644.
179. Thompson PD, Clarkson P, Karas RH. Statin-associated myopathy. *JAMA* 2003;289:1681-1690.
180. Shepherd J, Cobbe SM, Ford I, Isles CG, Lorimer AR, MacFarlane PW, McKillop JH, Packard CJ. Prevention of coronary heart disease with pravastatin in men with hypercholesterolemia. West of Scotland Coronary Prevention Study Group. *N Engl J Med* 1995;333:1301-1307.
181. Jacobs DR, Jr., Mebane IL, Bangdiwala SI, Criqui MH, Tyroler HA. High density lipoprotein cholesterol as a predictor of cardiovascular disease mortality in men and women: the follow-up study of the Lipid Research Clinics Prevalence Study. *Am J Epidemiol* 1990;131:32-47.
182. Schwartz GG, Olsson AG, Ezekowitz MD, Ganz P, Oliver MF, Waters D, Zeiher A, Chaitman BR, Leslie S, Stern T. Effects of atorvastatin on early recurrent ischemic



- events in acute coronary syndromes: the MIRACL study: a randomized controlled trial. *JAMA* 2001;285:1711-1718.
183. Norata GD, Pirillo A, Catapano AL. Statins and oxidative stress during atherogenesis. *J Cardiovasc Risk* 2003;10:181-189.
 184. Ohmura H, Mokuno H, Sawano M, Hatsumi C, Mitsugi Y, Watanabe Y, Daida H, Yamaguchi H. Lipid compositional differences of small, dense low-density lipoprotein particle influence its oxidative susceptibility: possible implication of increased risk of coronary artery disease in subjects with phenotype B. *Metabolism* 2002;51:1081-1087.
 185. Nakashima A, Ohtawa M, Iwasaki K, Wada M, Kuroda N, Nakashima K. Inhibitory effects of fluvastatin and its metabolites on the formation of several reactive oxygen species. *Life Sci* 2001;69:1381-1389.
 186. Aviram M, Rosenblat M, Bisgaier CL, Newton RS. Atorvastatin and gemfibrozil metabolites, but not the parent drugs, are potent antioxidants against lipoprotein oxidation. *Atherosclerosis* 1998;138:271-280.
 187. Girona J, La Ville AE, Sola R, Plana N, Masana L. Simvastatin decreases aldehyde production derived from lipoprotein oxidation. *Am J Cardiol* 1999;83:846-851.
 188. Liao JK, Bettmann MA, Sandor T, Tucker JI, Coleman SM, Creager MA. Differential impairment of vasodilator responsiveness of peripheral resistance and conduit vessels in humans with atherosclerosis. *Circ Res* 1991;68:1027-1034.
 189. Ignarro LJ, Buga GM, Wood KS, Byrns RE, Chaudhuri G. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987;84:9265-9269.
 190. Radomski MW, Rees DD, Dutra A, Moncada S. S-nitroso-glutathione inhibits platelet activation in vitro and in vivo. *Br J Pharmacol* 1992;107:745-749.
 191. Garg UC, Hassid A. Nitric oxide-generating vasodilators and 8-bromo-cyclic guanosine monophosphate inhibit mitogenesis and proliferation of cultured rat vascular smooth muscle cells. *J Clin Invest* 1989;83:1774-1777.
 192. Gauthier TW, Scalia R, Murohara T, Guo JP, Lefler AM. Nitric oxide protects against leukocyte-endothelium interactions in the early stages of hypercholesterolemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995;15:1652-1659.
 193. Treasure CB, Klein JL, Weintraub WS, Talley JD, Stillabower ME, Kosinski AS, Zhang J, Boccuzzi SJ, Cedarholm JC, Alexander RW. Beneficial effects of cholesterol-



- lowering therapy on the coronary endothelium in patients with coronary artery disease. *N Engl J Med* 1995;332:481-487.
194. Laufs U, La F, V, Plutzky J, Liao JK. Upregulation of endothelial nitric oxide synthase by HMG CoA reductase inhibitors. *Circulation* 1998;97:1129-1135.
 195. Rikitake Y, Kawashima S, Takeshita S, Yamashita T, Azumi H, Yasuhara M, Nishi H, Inoue N, Yokoyama M. Anti-oxidative properties of fluvastatin, an HMG-CoA reductase inhibitor, contribute to prevention of atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits. *Atherosclerosis* 2001;154:87-96.
 196. Hernandez-Perera O, Perez-Sala D, Navarro-Antolin J, Sanchez-Pascuala R, Hernandez G, Diaz C, Lamas S. Effects of the 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase inhibitors, atorvastatin and simvastatin, on the expression of endothelin-1 and endothelial nitric oxide synthase in vascular endothelial cells. *J Clin Invest* 1998;101:2711-2719.
 197. Park JK, Muller DN, Mervaala EM, Dechend R, Fiebeler A, Schmidt F, Bieringer M, Schafer O, Lindschau C, Schneider W, Ganten D, Luft FC, Haller H. Cerivastatin prevents angiotensin II-induced renal injury independent of blood pressure- and cholesterol-lowering effects. *Kidney Int* 2000;58:1420-1430.
 198. Libby P. Current concepts of the pathogenesis of the acute coronary syndromes. *Circulation* 2001;104:365-372.
 199. Ross R. Atherosclerosis—an inflammatory disease. *N Engl J Med* 1999;340:115-126.
 200. Romano M, Diomedede L, Sironi M, Massimiliano L, Sottocorno M, Polentarutti N, Guglielmotti A, Albani D, Bruno A, Fruscella P, Salmona M, Vecchi A, Pinza M, Mantovani A. Inhibition of monocyte chemotactic protein-1 synthesis by statins. *Lab Invest* 2000;80:1095-1100.
 201. Weber C, Erl W, Weber KS, Weber PC. HMG-CoA reductase inhibitors decrease CD11b expression and CD11b-dependent adhesion of monocytes to endothelium and reduce increased adhesiveness of monocytes isolated from patients with hypercholesterolemia. *J Am Coll Cardiol* 1997;30:1212-1217.
 202. Murphy RT, Foley JB, Mulvihill N, Crean P, Walsh MJ. Impact of preexisting statin use on adhesion molecule expression in patients presenting with acute coronary syndromes. *Am J Cardiol* 2001;87:446-448.

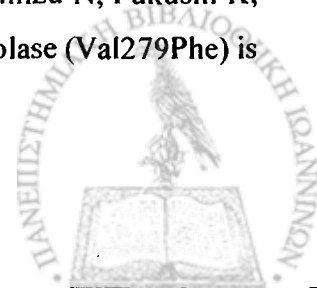
203. Albert MA, Danielson E, Rifai N, Ridker PM. Effect of statin therapy on C-reactive protein levels: the pravastatin inflammation/CRP evaluation (PRINCE): a randomized trial and cohort study. *JAMA* 2001;286:64-70.
204. Gabay C, Kushner I. Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation. *N Engl J Med* 1999;340:448-454.
205. Ridker PM, Rifai N, Pfeffer MA, Sacks F, Braunwald E. Long-term effects of pravastatin on plasma concentration of C-reactive protein. The Cholesterol and Recurrent Events (CARE) Investigators. *Circulation* 1999;100:230-235.
206. Ridker PM, Cushman M, Stampfer MJ, Tracy RP, Hennekens CH. Inflammation, aspirin, and the risk of cardiovascular disease in apparently healthy men. *N Engl J Med* 1997;336:973-979.
207. Fuster V. Elucidation of the role of plaque instability and rupture in acute coronary events. *Am J Cardiol* 1995;76:24C-33C.
208. Libby P. Molecular bases of the acute coronary syndromes. *Circulation* 1995;91:2844-2850.
209. Koh KK. Effects of statins on vascular wall: vasomotor function, inflammation, and plaque stability. *Cardiovasc Res* 2000;47:648-657.
210. Brown BG, Hillger L, Zhao XQ, Poulin D, Albers JJ. Types of change in coronary stenosis severity and their relative importance in overall progression and regression of coronary disease. Observations from the FATS Trial. Familial Atherosclerosis Treatment Study. *Ann N Y Acad Sci* 1995;748:407-417.
211. Aikawa M, Rabkin E, Sugiyama S, Voglic SJ, Fukumoto Y, Furukawa Y, Shiomi M, Schoen FJ, Libby P. An HMG-CoA Reductase Inhibitor, Cerivastatin, Suppresses Growth of Macrophages Expressing Matrix Metalloproteinases and Tissue Factor In Vivo and In Vitro. *Circulation* 2001;103:276-283.
212. Opper C, Clement C, Schwarz H, Krappe J, Steinmetz A, Schneider J, Wesemann W. Increased number of high sensitive platelets in hypercholesterolemia, cardiovascular diseases, and after incubation with cholesterol. *Atherosclerosis* 1995;113:211-217.
213. Huhle G, Abletshauser C, Mayer N, Weidinger G, Harenberg J, Heene DL. Reduction of platelet activity markers in type II hypercholesterolemic patients by a HMG-CoA-reductase inhibitor. *Thromb Res* 1999;95:229-234.



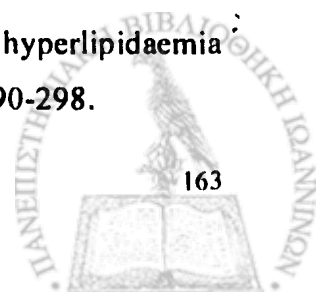
214. Standley PR, Ali S, Bapna C, Sowers JR. Increased platelet cytosolic calcium responses to low density lipoprotein in type II diabetes with and without hypertension. *Am J Hypertens* 1993;6:938-943.
215. Essig M, Nguyen G, Prie D, Escoubet B, Sraer JD, Friedlander G. 3-Hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors increase fibrinolytic activity in rat aortic endothelial cells. Role of geranylgeranylation and Rho proteins. *Circ Res* 1998;83:683-690.
216. Wada H, Mori Y, Kaneko T, Wakita Y, Minamikawa K, Ohiwa M, Tamaki S, Yokoyama N, Kobayashi T, Deguchi K. Hypercoagulable state in patients with hypercholesterolemia: effects of pravastatin. *Clin Ther* 1992;14:829-834.
217. Undas A, Brummel KE, Musial J, Mann KG, Szczeklik A. Simvastatin depresses blood clotting by inhibiting activation of prothrombin, factor V, and factor XIII and by enhancing factor Va inactivation. *Circulation* 2001;103:2248-2253.
218. Watts GF, Dimmitt SB. Fibrates, dyslipoproteinaemia and cardiovascular disease. *Curr Opin Lipidol* 1999;10:561-574.
219. Caslake MJ, Packard CJ, Gaw A, Murray E, Griffin BA, Vallance BD, Shepherd J. Fenofibrate and LDL metabolic heterogeneity in hypercholesterolemia. *Arterioscler Thromb* 1993;13:702-711.
220. Heller F, Harvengt C. Effects of clofibrate, bezafibrate, fenofibrate and probucol on plasma lipolytic enzymes in normolipemic subjects. *Eur J Clin Pharmacol* 1983;25:57-63.
221. Malmendier CL, Lontie JF, Delcroix C, Dubois DY, Magot T, De Roy L. Apolipoproteins C-II and C-III metabolism in hypertriglyceridemic patients. Effect of a drastic triglyceride reduction by combined diet restriction and fenofibrate administration. *Atherosclerosis* 1989;77:139-149.
222. Martin G, Schoonjans K, Lefebvre AM, Staels B, Auwerx J. Coordinate regulation of the expression of the fatty acid transport protein and acyl-CoA synthetase genes by PPARalpha and PPARgamma activators. *J Biol Chem* 1997;272:28210-28217.
223. Berthou L, Duverger N, Emmanuel F, Langouet S, Auwerx J, Guillouzo A, Fruchart JC, Rubin E, Deneffe P, Staels B, Branellec D. Opposite regulation of human versus mouse apolipoprotein A-I by fibrates in human apolipoprotein A-I transgenic mice. *J Clin Invest* 1996;97:2408-2416.



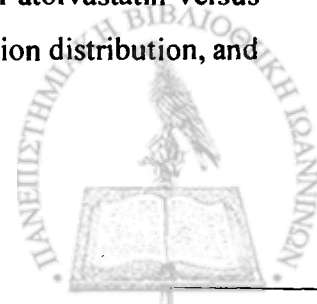
224. Forman BM, Chen J, Evans RM. Hypolipidemic drugs, polyunsaturated fatty acids, and eicosanoids are ligands for peroxisome proliferator-activated receptors α and δ . *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94:4312-4317.
225. Staels B, Vu-Dac N, Kosykh VA, Saladin R, Fruchart JC, Dallongeville J, Auwerx J. Fibrates downregulate apolipoprotein C-III expression independent of induction of peroxisomal acyl coenzyme A oxidase. A potential mechanism for the hypolipidemic action of fibrates. *J Clin Invest* 1995;95:705-712.
226. Schoonjans K, Staels B, Auwerx J. Role of the peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) in mediating the effects of fibrates and fatty acids on gene expression. *J Lipid Res* 1996;37:907-925.
227. Vu-Dac N, Schoonjans K, Kosykh V, Dallongeville J, Fruchart JC, Staels B, Auwerx J. Fibrates increase human apolipoprotein A-II expression through activation of the peroxisome proliferator-activated receptor. *J Clin Invest* 1995;96:741-750.
228. Vu-Dac N, Schoonjans K, Laine B, Fruchart JC, Auwerx J, Staels B. Negative regulation of the human apolipoprotein A-I promoter by fibrates can be attenuated by the interaction of the peroxisome proliferator-activated receptor with its response element. *J Biol Chem* 1994;269:31012-31018.
229. Chinetti G, Gbaguidi FG, Griglio S, Mallat Z, Antonucci M, Poulain P, Chapman J, Fruchart JC, Tedgui A, Najib-Fruchart J, Staels B. CLA-1/SR-BI is expressed in atherosclerotic lesion macrophages and regulated by activators of peroxisome proliferator-activated receptors. *Circulation* 2000;101:2411-2417.
230. Chinetti G, Lestavel S, Bocher V, Remaley AT, Neve B, Torra IP, Teissier E, Minnich A, Jaye M, Duverger N, Brewer HB, Fruchart JC, Clavey V, Staels B. PPAR- α and PPAR- γ activators induce cholesterol removal from human macrophage foam cells through stimulation of the ABCA1 pathway. *Nat Med* 2001;7:53-58.
231. Elisaf M. Effects of fibrates on serum metabolic parameters. *Curr Med Res Opin* 2002;18:269-276.
232. Yoshida H, Ishikawa T, Ayaori M, Shige H, Ito T, Suzukawa M, Nakamura H. Beneficial effect of gemfibrozil on the chemical composition and oxidative susceptibility of low density lipoprotein: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Atherosclerosis* 1998;139:179-187.
233. Yoshida H, Imaizumi T, Fujimoto K, Itaya H, Hiramoto M, Yoshimizu N, Fukushi K, Satoh K. A mutation in plasma platelet-activating factor acetylhydrolase (Val279Phe) is



- a genetic risk factor for cerebral hemorrhage but not for hypertension. *Thromb Haemost* 1998;80:372-375.
234. Vazquez M, Merlos M, Adzet T, Laguna JC. Decreased susceptibility to copper-induced oxidation of rat-lipoproteins after fibrate treatment: influence of fatty acid composition. *Br J Pharmacol* 1996;117:1155-1162.
235. Stafforini DM, Zimmerman GA, McIntyre TM, Prescott SM. The platelet-activating factor acetylhydrolase from human plasma prevents oxidative modification of low-density lipoprotein. *Trans Assoc Am Physicians* 1992;105:44-63.:44-63.
236. Watson AD, Berliner JA, Hama SY, La Du BN, Faull KF, Fogelman AM, Navab M. Protective effect of high density lipoprotein associated paraoxonase. Inhibition of the biological activity of minimally oxidized low density lipoprotein. *J Clin Invest* 1995;96:2882-2891.
237. Watson AD, Navab M, Hama SY, Sevanian A, Prescott SM, Stafforini DM, McIntyre TM, Du BN, Fogelman AM, Berliner JA. Effect of platelet activating factor-acetylhydrolase on the formation and action of minimally oxidized low density lipoprotein. *J Clin Invest* 1995;95:774-782.
238. Van Lenten BJ, Hama SY, de Beer FC, Stafforini DM, McIntyre TM, Prescott SM, La Du BN, Fogelman AM, Navab M. Anti-inflammatory HDL becomes pro-inflammatory during the acute phase response. Loss of protective effect of HDL against LDL oxidation in aortic wall cell cocultures. *J Clin Invest* 1995;96:2758-2767.
239. Balogh Z, Seres I, Harangi M, Kovacs P, Kakuk G, Paragh G. Gemfibrozil increases paraoxonase activity in type 2 diabetic patients. A new hypothesis of the beneficial action of fibrates? *Diabetes Metab* 2001;27:604-610.
240. Chen MF, Wang TD, Yeh HT, Hsu HC, Lee YT. Gemfibrozil treatment potentiates oxidative resistance of high-density lipoprotein in hypertriglyceridemic patients. *Eur J Clin Invest* 2001;31:707-713.
241. Kanie N, Matsumoto T, Kobayashi T, Kamata K. Relationship between peroxisome proliferator-activated receptors (PPARalpha and PPARgamma) and endothelium-dependent relaxation in streptozotocin-induced diabetic rats. *Br J Pharmacol* 2003;140:23-32.
242. Malik J, Melenovsky V, Wichterle D, Haas T, Simek J, Ceska R, Hradec J. Both fenofibrate and atorvastatin improve vascular reactivity in combined hyperlipidaemia (fenofibrate versus atorvastatin trial--FAT). *Cardiovasc Res* 2001;52:290-298.



243. Meco JF, Vila R, Pujol R, Bros R, Domenech P, Fiol C, Pinto X. Improvement in endothelial dysfunction in patients with hypoalphalipoproteinemia and coronary artery disease treated with bezafibrate. *J Cardiovasc Pharmacol* 2001;38:250-258.
244. Xie ML, Gu ZL, Chen KJ, Zhou WX, Guo CY. Effect of lipanthyl on mRNA expression of endothelin-1 and nitric-oxide synthase in atherosclerotic vessel wall in rabbits. *Acta Pharmacol Sin* 2000;21:473-476.
245. Evans M, Anderson RA, Graham J, Ellis GR, Morris K, Davies S, Jackson SK, Lewis MJ, Frenneaux MP, Rees A. Ciprofibrate therapy improves endothelial function and reduces postprandial lipemia and oxidative stress in type 2 diabetes mellitus. *Circulation* 2000;101:1773-1779.
246. Capell WH, DeSouza CA, Poirier P, Bell ML, Stauffer BL, Weil KM, Hernandez TL, Eckel RH. Short-term triglyceride lowering with fenofibrate improves vasodilator function in subjects with hypertriglyceridemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003;23:307-313.
247. Chinetti G, Fruchart JC, Staels B. Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): nuclear receptors at the crossroads between lipid metabolism and inflammation. *Inflamm Res* 2000;49:497-505.
248. Jackson SM, Parhami F, Xi XP, Berliner JA, Hsueh WA, Law RE, Demer LL. Peroxisome proliferator-activated receptor activators target human endothelial cells to inhibit leukocyte-endothelial cell interaction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999;19:2094-2104.
249. Marx N, Sukhova GK, Collins T, Libby P, Plutzky J. PPARalpha activators inhibit cytokine-induced vascular cell adhesion molecule-1 expression in human endothelial cells. *Circulation* 1999;99:3125-3131.
250. Pasceri V, Cheng JS, Willerson JT, Yeh ET, Chang J. Modulation of C-reactive protein-mediated monocyte chemoattractant protein-1 induction in human endothelial cells by anti-atherosclerosis drugs. *Circulation* 2001;103:2531-2534.
251. Delerive P, Martin-Nizard F, Chinetti G, Trottein F, Fruchart JC, Najib J, Duriez P, Staels B. Peroxisome proliferator-activated receptor activators inhibit thrombin-induced endothelin-1 production in human vascular endothelial cells by inhibiting the activator protein-1 signaling pathway. *Circ Res* 1999;85:394-402.
252. Frost RJ, Otto C, Geiss HC, Schwandt P, Parhofer KG. Effects of atorvastatin versus fenofibrate on lipoprotein profiles, low-density lipoprotein subfraction distribution, and



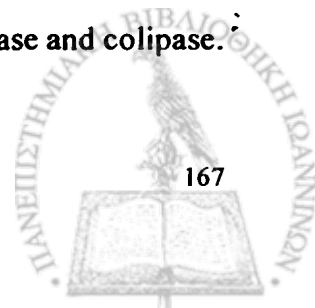
- hemorheologic parameters in type 2 diabetes mellitus with mixed hyperlipoproteinemia. *Am J Cardiol* 2001;87:44-48.
253. Neve BP, Corseaux D, Chinetti G, Zawadzki C, Fruchart JC, Duriez P, Staels B, Jude B. PPARalpha Agonists Inhibit Tissue Factor Expression in Human Monocytes and Macrophages. *Circulation* 2001;103:207-212.
254. Marx N, Mackman N, Schonbeck U, Yilmaz N, Hombach V, V, Libby P, Plutzky J. PPARalpha Activators Inhibit Tissue Factor Expression and Activity in Human Monocytes. *Circulation* 2001;103:213-219.
255. Hourton D, Delerive P, Stankova J, Staels B, Chapman MJ, Ninio E. Oxidized low-density lipoprotein and peroxisome-proliferator-activated receptor alpha down-regulate platelet-activating-factor receptor expression in human macrophages. *Biochem J* 2001;354:225-232.
256. Nilsson L, Takemura T, Eriksson P, Hamsten A. Effects of fibrate compounds on expression of plasminogen activator inhibitor-1 by cultured endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999;19:1577-1581.
257. Boden WE. Therapeutic implications of recent ATP III guidelines and the important role of combination therapy in total dyslipidemia management. *Curr Opin Cardiol* 2003;18:278-285.
258. Vega GL, Ma PT, Cater NB, Filipchuk N, Meguro S, Garcia-Garcia AB, Grundy SM. Effects of adding fenofibrate (200 mg/day) to simvastatin (10 mg/day) in patients with combined hyperlipidemia and metabolic syndrome. *Am J Cardiol* 2003;91:956-960.
259. Wierzbicki AS, Mikhailidis DP, Wray R, Schacter M, Cramb R, Simpson WG, Byrne CB. Statin-fibrate combination: therapy for hyperlipidemia: a review. *Curr Med Res Opin* 2003;19:155-168.
260. Henson PM. Release of vasoactive amines from rabbit platelets induced by sensitized mononuclear leukocytes and antigen. *J Exp Med* 1970;131:287-306.
261. Siraganian RP, Osler AG. Destruction of rabbit platelets in the allergic response of sensitized leukocytes. I. Demonstration of a fluid phase intermediate. *J Immunol* 1971;106:1244-1251.
262. Benveniste J, Henson PM, Cochrane CG. Leukocyte-dependent histamine release from rabbit platelets. The role of IgE, basophils, and a platelet-activating factor. *J Exp Med* 1972;136:1356-1377.



263. Benveniste J, Tence M, Varenne P, Bidault J, Boulet C, Polonsky J. [Semi-synthesis and proposed structure of platelet-activating factor (P.A.F.): PAF-acether an alkyl ether analog of lysophosphatidylcholine]. *C R Seances Acad Sci D* 1979;289:1037-1040.
264. Demopoulos CA, Pinckard RN, Hanahan DJ. Platelet-activating factor. Evidence for 1-O-alkyl-2-acetyl-sn-glycerol-3-phosphorylcholine as the active component (a new class of lipid chemical mediators). *J Biol Chem* 1979;254:9355-9358.
265. Hanahan DJ, Demopoulos CA, Liehr J, Pinckard RN. Identification of platelet activating factor isolated from rabbit basophils as acetyl glyceryl ether phosphorylcholine. *J Biol Chem* 1980;255:5514-5516.
266. Pinckard RN, Jackson EM, Hoppens C, Weintraub ST, Ludwig JC, McManus LM, Mott GE. Molecular heterogeneity of platelet-activating factor produced by stimulated human polymorphonuclear leukocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 1984;122:325-332.
267. Camussi G, Aglietta M, Malavasi F, Tetta C, Piacibello W, Sanavio F, Bussolino F. The release of platelet-activating factor from human endothelial cells in culture. *J Immunol* 1983;131:2397-2403.
268. Mueller HW, O'Flaherty JT, Wykle RL. Biosynthesis of platelet activating factor in rabbit polymorphonuclear neutrophils. *J Biol Chem* 1983;258:6213-6218.
269. Sturk A, ten Cate JW, Hosford D, Mencia-Huerta JM, Braquet P. The synthesis, catabolism, and pathophysiological role of platelet-activating factor. *Adv Lipid Res* 1989;23:219-76.:219-276.
270. McManus LM. Pathobiology of platelet-activating factors. *Pathol Immunopathol Res* 1986;5:104-117.
271. Wykle RL, Malone B, Snyder F. Enzymatic synthesis of 1-alkyl-2-acetyl-sn-glycerol-3-phosphocholine, a hypotensive and platelet-aggregating lipid. *J Biol Chem* 1980;255:10256-10260.
272. Lee TC. Biosynthesis of platelet activating factor. Substrate specificity of 1-alkyl-2-lyso-sn-glycerol-3-phosphocholine:acetyl-CoA acetyltransferase in rat spleen microsomes. *J Biol Chem* 1985;260:10952-10955.
273. Renooij W, Snyder F. Biosynthesis of 1-alkyl-2-acetyl-sn-glycerol-3-phosphocholine (platelet activating factor and a hypotensive lipid) by cholinephosphotransferase in various rat tissues. *Biochim Biophys Acta* 1981;663:545-556.
274. Lynch JM, Henson PM. The intracellular retention of newly synthesized platelet-activating factor. *J Immunol* 1986;137:2653-2661.



275. Shaw JO, Pinckard RN, Ferrigni KS, McManus LM, Hanahan DJ. Activation of human neutrophils with 1-O-hexadecyl/octadecyl-2-acetyl-sn-glycerol-3-phosphorylcholine (platelet activating factor). *J Immunol* 1981;127:1250-1255.
276. Hanahan DJ. Platelet activating factor: a biologically active phosphoglyceride. *Annu Rev Biochem* 1986;55:483-509.
277. McIntyre TM, Zimmerman GA, Satoh K, Prescott SM. Cultured endothelial cells synthesize both platelet-activating factor and prostacyclin in response to histamine, bradykinin, and adenosine triphosphate. *J Clin Invest* 1985;76:271-280.
278. Zimmerman GA, Lorant DE, McIntyre TM, Prescott SM. Juxtacrine intercellular signaling: another way to do it. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1993;9:573-577.
279. Shimizu T, Honda Z, Nakamura M, Bito H, Izumi T. Platelet-activating factor receptor and signal transduction. *Biochem Pharmacol* 1992;44:1001-1008.
280. Heery JM, Kozak M, Stafforini DM, Jones DA, Zimmerman GA, McIntyre TM, Prescott SM. Oxidatively modified LDL contains phospholipids with platelet-activating factor-like activity and stimulates the growth of smooth muscle cells. *J Clin Invest* 1995;96:2322-2330.
281. Farr RS, Cox CP, Wardlow ML, Jorgensen R. Preliminary studies of an acid-labile factor (ALF) in human sera that inactivates platelet-activating factor (PAF). *Clin Immunol Immunopathol* 1980;15:318-330.
282. Blank ML, Lee T, Fitzgerald V, Snyder F. A specific acetylhydrolase for 1-alkyl-2-acetyl-sn-glycero-3-phosphocholine (a hypotensive and platelet-activating lipid). *J Biol Chem* 1981;256:175-178.
283. Tjoelker LW, Wilder C, Eberhardt C, Stafforini DM, Dietsch G, Schimpf B, Hooper S, Le Trong H, Cousens LS, Zimmerman GA. Anti-inflammatory properties of a platelet-activating factor acetylhydrolase. *Nature* 1995;374:549-553.
284. Tew DG, Southan C, Rice SQ, Lawrence MP, Li H, Boyd HF, Moores K, Gloger IS, Macphée CH. 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* 1996;16:591-599.
285. Stafforini DM, Prescott SM, McIntyre TM. Human plasma platelet-activating factor acetylhydrolase. Purification and properties. *J Biol Chem* 1987;262:4223-4230.
286. Chapus C, Rovey M, Sarda L, Verger R. Minireview on pancreatic lipase and colipase. *Biochimie* 1988;70:1223-1234.



287. Cygler M, Schrag JD, Sussman JL, Harel M, Silman I, Gentry MK, Doctor BP. Relationship between sequence conservation and three-dimensional structure in a large family of esterases, lipases, and related proteins. *Protein Sci* 1993;2:366-382.
288. Tjoelker LW, Eberhardt C, Unger J, Trong HL, Zimmerman GA, McIntyre TM, Stafforini DM, Prescott SM, Gray PW. Plasma platelet-activating factor acetylhydrolase is a secreted phospholipase A2 with a catalytic triad. *J Biol Chem* 1995;270:25481-25487.
289. Derewenda ZS, Derewenda U. The structure and function of platelet-activating factor acetylhydrolases. *Cell Mol Life Sci* 1998;54:446-455.
290. Derewenda ZS, Derewenda U. Relationships among serine hydrolases: evidence for a common structural motif in triacylglyceride lipases and esterases. *Biochem Cell Biol* 1991;69:842-851.
291. Min JH, Jain MK, Wilder C, Paul L, Apitz-Castro R, Aspleaf DC, Gelb MH. Membrane-bound plasma platelet activating factor acetylhydrolase acts on substrate in the aqueous phase. *Biochemistry* 1999;38:12935-12942.
292. Tselepis AD, Karabina SA, Stengel D, Piedagnel R, Chapman MJ, Ninio E. N-linked glycosylation of macrophage-derived PAF-AH is a major determinant of enzyme association with plasma HDL. *J Lipid Res* 2001;42:1645-1654.
293. Cao Y, Stafforini DM, Zimmerman GA, McIntyre TM, Prescott SM. Expression of plasma platelet-activating factor acetylhydrolase is transcriptionally regulated by mediators of inflammation. *J Biol Chem* 1998;273:4012-4020.
294. Shapiro LH, Ashmun RA, Roberts WM, Look AT. Separate promoters control transcription of the human aminopeptidase N gene in myeloid and intestinal epithelial cells. *J Biol Chem* 1991;266:11999-12007.
295. Shelley CS, Farokhzad OC, Arnaout MA. Identification of cell-specific and developmentally regulated nuclear factors that direct myeloid and lymphoid expression of the CD11a gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993;90:5364-5368.
296. Chow BK, Ting V, Tufaro F, MacGillivray RT. Characterization of a novel liver-specific enhancer in the human prothrombin gene. *J Biol Chem* 1991;266:18927-18933.
297. Barahmand-pour F, Meinke A, Kieslinger M, Eilers A, Decker T. A role for STAT family transcription factors in myeloid differentiation. *Curr Top Microbiol Immunol* 1996;211:121-8.:121-128.

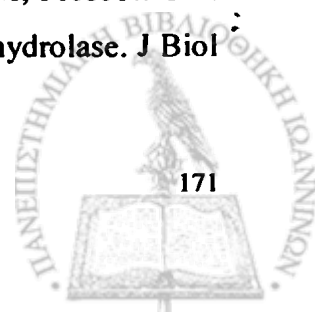


298. Seidel HM, Milocco LH, Lamb P, Damell JE, Jr., Stein RB, Rosen J. Spacing of palindromic half sites as a determinant of selective STAT (signal transducers and activators of transcription) DNA binding and transcriptional activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92:3041-3045.
299. Miwa M, Miyake T, Yamanaka T, Sugatani J, Suzuki Y, Sakata S, Araki Y, Matsumoto M. Characterization of serum platelet-activating factor (PAF) acetylhydrolase. Correlation between deficiency of serum PAF acetylhydrolase and respiratory symptoms in asthmatic children. *J Clin Invest* 1988;82:1983-1991.
300. Balta G, Gurgey A, Kudayarov DK, Tunc B, Altay C. Evidence for the existence of the PAF acetylhydrolase mutation (Val279Phe) in non-Japanese populations: a preliminary study in Turkey, Azerbaijan, and Kyrgyzstan. *Thromb Res* 2001;101:231-234.
301. Yamada Y, Yokota M. Loss of activity of plasma platelet-activating factor acetylhydrolase due to a novel Gln281-->Arg mutation. *Biochem Biophys Res Commun* 1997;236:772-775.
302. Bell R, Collier DA, Rice SQ, Roberts GW, MacPhee CH, Kerwin RW, Price J, Gloger IS. Systematic screening of the LDL-PLA2 gene for polymorphic variants and case-control analysis in schizophrenia. *Biochem Biophys Res Commun* 1997;241:630-635.
303. Kruse S, Mao XQ, Heinzmann A, Blattmann S, Roberts MH, Braun S, Gao PS, Forster J, Kuehr J, Hopkin JM, Shirakawa T, Deichmann KA. The Ile198Thr and Ala379Val variants of plasmatic PAF-acetylhydrolase impair catalytical activities and are associated with atopy and asthma. *Am J Hum Genet* 2000;66:1522-1530.
304. Rubin AH, Smith LJ, Patterson R. The bronchoconstrictor properties of platelet-activating factor in humans. *Am Rev Respir Dis* 1987;136:1145-1151.
305. Stafforini DM, McIntyre TM, Carter ME, Prescott SM. Human plasma platelet-activating factor acetylhydrolase. Association with lipoprotein particles and role in the degradation of platelet-activating factor. *J Biol Chem* 1987;262:4215-4222.
306. Lee C, Sigari F, Segrado T, Horkko S, Hama S, Subbaiah PV, Miwa M, Navab M, Witztum JL, Reaven PD. All ApoB-containing lipoproteins induce monocyte chemotaxis and adhesion when minimally modified. Modulation of lipoprotein bioactivity by platelet-activating factor acetylhydrolase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999;19:1437-1446.

307. Min JH, Wilder C, Aoki J, Arai H, Inoue K, Paul L, Gelb MH. Platelet-activating factor acetylhydrolases: broad substrate specificity and lipoprotein binding does not modulate the catalytic properties of the plasma enzyme. *Biochemistry* 2001;40:4539-4549.
308. Tselepis AD, Dentan C, Karabina SA, Chapman MJ, Ninio E. PAF-degrading acetylhydrolase is preferentially associated with dense LDL and VHDL-1 in human plasma. Catalytic characteristics and relation to the monocyte-derived enzyme. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995;15:1764-1773.
309. Stafforini DM, Tjoelker LW, McCormick SP, Vaitkus D, McIntyre TM, Gray PW, Young SG, Prescott SM. Molecular basis of the interaction between plasma platelet-activating factor acetylhydrolase and low density lipoprotein. *J Biol Chem* 1999;274:7018-7024.
310. Blencowe C, Hermetter A, Kostner GM, Daigner HP. Enhanced association of platelet-activating factor acetylhydrolase with lipoprotein (a) in comparison with low density lipoprotein. *J Biol Chem* 1995;270:31151-31157.
311. Fless GM, ZumMallen ME, Scanu AM. Physicochemical properties of apolipoprotein(a) and lipoprotein(a-) derived from the dissociation of human plasma lipoprotein (a). *J Biol Chem* 1986;261:8712-8718.
312. Karabina SA, Elisaf MC, Goudevenos J, Siamopoulos KC, Sideris D, Tselepis AD. PAF-acetylhydrolase activity of Lp(a) before and during Cu(2+)-induced oxidative modification in vitro. *Atherosclerosis* 1996;125:121-134.
313. McCall MR, La Belle M, Forte TM, Krauss RM, Takanami Y, Tribble DL. Dissociable and nondissociable forms of platelet-activating factor acetylhydrolase in human plasma LDL: implications for LDL oxidative susceptibility. *Biochim Biophys Acta* 1999;1437:23-36.
314. Stafforini DM, Carter ME, Zimmerman GA, McIntyre TM, Prescott SM. Lipoproteins alter the catalytic behavior of the platelet-activating factor acetylhydrolase in human plasma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989;86:2393-2397.
315. Rodrigo L, Mackness B, Durrington PN, Hernandez A, Mackness MI. Hydrolysis of platelet-activating factor by human serum paraoxonase. *Biochem J* 2001;354:1-7.
316. Dentan C, Tselepis AD, Chapman MJ, Ninio E. Pefabloc, 4-[2-aminoethyl]benzenesulfonyl fluoride, is a new, potent nontoxic and irreversible inhibitor of PAF-degrading acetylhydrolase. *Biochim Biophys Acta* 1996;1299:353-357.



317. Stremler KE, Stafforini DM, Prescott SM, McIntyre TM. Human plasma platelet-activating factor acetylhydrolase. Oxidatively fragmented phospholipids as substrates. *J Biol Chem* 1991;266:11095-11103.
318. Dentan C, Lesnik P, Chapman MJ, Ninio E. PAF-acether-degrading acetylhydrolase in plasma LDL is inactivated by copper- and cell-mediated oxidation. *Arterioscler Thromb* 1994;14:353-360.
319. Ambrosio G, Oriente A, Napoli C, Palumbo G, Chiariello P, Marone G, Condorelli M, Chiariello M, Triggiani M. Oxygen radicals inhibit human plasma acetylhydrolase, the enzyme that catabolizes platelet-activating factor. *J Clin Invest* 1994;93:2408-2416.
320. Liapikos TA, Antonopoulou S, Karabina SP, Tsoukatos DC, Demopoulos CA, Tselepis AD. Platelet-activating factor formation during oxidative modification of low-density lipoprotein when PAF-acetylhydrolase has been inactivated. *Biochim Biophys Acta* 1994;1212:353-360.
321. Kubes P, Suzuki M, Granger DN. Modulation of PAF-induced leukocyte adherence and increased microvascular permeability. *Am J Physiol* 1990;259:G859-G864.
322. Tsoukatos DC, Liapikos TA, Tselepis AD, Chapman MJ, Ninio E. Platelet-activating factor acetylhydrolase and transacetylase activities in human plasma low-density lipoprotein. *Biochem J* 2001;357:457-464.
323. Stafforini DM, Elstad MR, McIntyre TM, Zimmerman GA, Prescott SM. Human macrophages secrete platelet-activating factor acetylhydrolase. *J Biol Chem* 1990;265:9682-9687.
324. Suzuki Y, Miwa M, Harada M, Matsumoto M. Release of acetylhydrolase from platelets on aggregation with platelet-activating factor. *Eur J Biochem* 1988;172:117-120.
325. Korth R, Bidault J, Palmantier R, Benveniste J, Ninio E. Human platelets release a paf-acether: acetylhydrolase similar to that in plasma. *Lipids* 1993;28:193-199.
326. Nakajima K, Murakami M, Yanoshita R, Samejima Y, Karasawa K, Setaka M, Nojima S, Kudo I. Activated mast cells release extracellular type platelet-activating factor acetylhydrolase that contributes to autocrine inactivation of platelet-activating factor. *J Biol Chem* 1997;272:19708-19713.
327. Tarbet EB, Stafforini DM, Elstad MR, Zimmerman GA, McIntyre TM, Prescott SM. Liver cells secrete the plasma form of platelet-activating factor acetylhydrolase. *J Biol Chem* 1991;266:16667-16673.



328. Satoh K, Imaizumi T, Kawamura Y, Yoshida H, Hiramoto M, Takamatsu S, Takamatsu M. Platelet-activating factor (PAF) stimulates the production of PAF acetylhydrolase by the human hepatoma cell line, HepG2. *J Clin Invest* 1991;87:476-481.
329. Asano K, Okamoto S, Fukunaga K, Shiomi T, Mori T, Iwata M, Ikeda Y, Yamaguchi K. Cellular source(s) of platelet-activating-factor acetylhydrolase activity in plasma. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;261:511-514.
330. Svetlov SI, Sturm E, Olson MS, Crawford JM. Hepatic regulation of platelet-activating factor acetylhydrolase and lecithin:cholesterol acyltransferase biliary and plasma output in rats exposed to bacterial lipopolysaccharide. *Hepatology* 1999;30:128-136.
331. Elstad MR, Stafforini DM, McIntyre TM, Prescott SM, Zimmerman GA. Platelet-activating factor acetylhydrolase increases during macrophage differentiation. A novel mechanism that regulates accumulation of platelet-activating factor. *J Biol Chem* 1989;264:8467-8470.
332. Wu X, McIntyre TM, Zimmerman GA, Prescott SM, Stafforini DM. Molecular characterization of the constitutive expression of the plasma PAF-acetylhydrolase gene in macrophages. *Biochem J* 2003;375:351-363.
333. Howard KM, Miller JE, Miwa M, Olson MS. Cell-specific regulation of expression of plasma-type platelet-activating factor acetylhydrolase in the liver. *J Biol Chem* 1997;272:27543-27548.
334. Yasuda K, Johnston JM. The hormonal regulation of platelet-activating factor-acetylhydrolase in the rat. *Endocrinology* 1992;130:708-716.
335. Satoh K, Imaizumi T, Yoshida H, Takamatsu S. Effect of 17 beta-estradiol on secretion of platelet-activating factor acetylhydrolase by HepG2 cells. *Metabolism* 1993;42:672-677.
336. Narahara H, Miyakawa I, Johnston JM. The inhibitory effect of 1,25-dihydroxyvitamin D3 on the secretion of platelet-activating factor acetylhydrolase by human decidual macrophages. *J Clin Endocrinol Metab* 1995;80:3121-3126.
337. Narahara H, Nishioka Y, Johnston JM. Secretion of platelet-activating factor acetylhydrolase by human decidual macrophages. *J Clin Endocrinol Metab* 1993;77:1258-1262.
338. Maki N, Hoffman DR, Johnston JM. Platelet-activating factor acetylhydrolase activity in maternal, fetal, and newborn rabbit plasma during pregnancy and lactation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988;85:728-732.

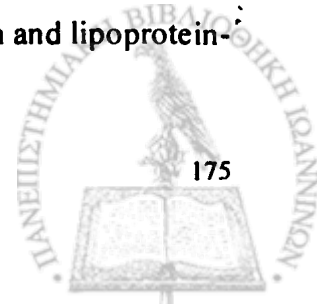


339. Narahara H, Johnston JM. Effects of endotoxins and cytokines on the secretion of platelet-activating factor-acetylhydrolase by human decidual macrophages. *Am J Obstet Gynecol* 1993;169:531-537.
340. Kawano Y, Narahara H, Johnston JM. Inhibitory effect of interleukin-8 on the secretion of platelet-activating factor acetylhydrolase by human decidual macrophages. *J Soc Gynecol Investig* 1999;6:328-332.
341. Dupuis F, Denizot Y, Fixe P, Dulery C, Praloran V. PAF and haematopoiesis. X. Macrophage colony-stimulating factor and granulocyte macrophage colony-stimulating factor enhance platelet-activating factor acetylhydrolase production by human blood-derived macrophages. *Biochim Biophys Acta* 1996;1311:27-32.
342. Graham RM, Stephens CJ, Silvester W, Leong LL, Sturm MJ, Taylor RR. Plasma degradation of platelet-activating factor in severely ill patients with clinical sepsis. *Crit Care Med* 1994;22:204-212.
343. Kald B, Smedh K, Olaison G, Sjudahl R, Tagesson C. Platelet-activating factor acetylhydrolase activity in intestinal mucosa and plasma of patients with Crohn's disease. *Digestion* 1996;57:472-477.
344. Tselepis AD, Elisaf M, Besis S, Karabina SA, Chapman MJ, Siamopoulou A. Association of the inflammatory state in active juvenile rheumatoid arthritis with hypo-high-density lipoproteinemia and reduced lipoprotein-associated platelet-activating factor acetylhydrolase activity. *Arthritis Rheum* 1999;42:373-383.
345. Tetta C, Bussolino F, Modena V, Montrucchio G, Segoloni G, Pescarmona G, Camussi G. Release of platelet-activating factor in systemic lupus erythematosus. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1990;91:244-256.
346. Howard KM, Olson MS. The expression and localization of plasma platelet-activating factor acetylhydrolase in endotoxemic rats. *J Biol Chem* 2000;275:19891-19896.
347. Memon RA, Fuller J, Moser AH, Feingold KR, Grunfeld C. In vivo regulation of plasma platelet-activating factor acetylhydrolase during the acute phase response. *Am J Physiol* 1999;277:R94-R103.
348. Tjoelker LW, Stafforini DM. Platelet-activating factor acetylhydrolases in health and disease. *Biochim Biophys Acta* 2000;1488:102-123.
349. Hardardottir I, Grunfeld C, Feingold KR. Effects of endotoxin and cytokines on lipid metabolism. *Curr Opin Lipidol* 1994;5:207-215.

350. Pritchard PH, Chonn A, Yeung CC. The degradation of platelet-activating factor in the plasma of a patient with familial high density lipoprotein deficiency (Tangier disease). *Blood* 1985;66:1476-1478.
351. Tselepis AD, Chapman MJ. Inflammation, bioactive lipids and atherosclerosis: potential roles of a lipoprotein-associated phospholipase A2, platelet activating factor-acetylhydrolase. *Atheroscler Suppl* 2002;3:57-68.
352. Russwurm S, Krause S, Finkelberg L, Ruhling K, Schauer U, Losche W. Generation of reactive oxygen species and activity of platelet-activating factor acetylhydrolase in human monocyte-derived macrophages. *Thromb Res* 1994;74:505-514.
353. Guerra R, Zhao B, Mooser V, Stafforini D, Johnston JM, Cohen JC. Determinants of plasma platelet-activating factor acetylhydrolase: heritability and relationship to plasma lipoproteins. *J Lipid Res* 1997;38:2281-2288.
354. Krieger M, Acton S, Ashkenas J, Pearson A, Penman M, Resnick D. Molecular flypaper, host defense, and atherosclerosis. Structure, binding properties, and functions of macrophage scavenger receptors. *J Biol Chem* 1993;268:4569-4572.
355. Dejager S, Mietus-Synder M, Pitas RE. Oxidized low density lipoproteins bind to the scavenger receptor expressed by rabbit smooth muscle cells and macrophages. *Arterioscler Thromb* 1993;13:371-378.
356. Brown MS, Goldstein JL. Lipoprotein metabolism in the macrophage: implications for cholesterol deposition in atherosclerosis. *Annu Rev Biochem* 1983;52:223-261.
357. Steinberg D, Parthasarathy S, Carew TE, Khoo JC, Witztum JL. Beyond cholesterol. Modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity. *N Engl J Med* 1989;320:915-924.
358. Henriksen T, Mahoney EM, Steinberg D. Enhanced macrophage degradation of biologically modified low density lipoprotein. *Arteriosclerosis* 1983;3:149-159.
359. Morel DW, DiCorleto PE, Chisolm GM. Endothelial and smooth muscle cells alter low density lipoprotein in vitro by free radical oxidation. *Arteriosclerosis* 1984;4:357-364.
360. Parthasarathy S, Printz DJ, Boyd D, Joy L, Steinberg D. Macrophage oxidation of low density lipoprotein generates a modified form recognized by the scavenger receptor. *Arteriosclerosis* 1986;6:505-510.
361. Palinski W, Rosenfeld ME, Yla-Herttuala S, Gurtner GC, Socher SS, Butler SW, Parthasarathy S, Carew TE, Steinberg D, Witztum JL. Low density lipoprotein



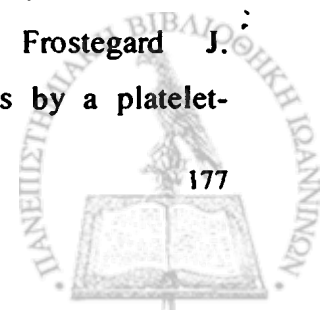
- undergoes oxidative modification in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989;86:1372-1376.
362. Yla-Herttuala S, Palinski W, Rosenfeld ME, Parthasarathy S, Carew TE, Butler S, Witztum JL, Steinberg D. Evidence for the presence of oxidatively modified low density lipoprotein in atherosclerotic lesions of rabbit and man. *J Clin Invest* 1989;84:1086-1095.
363. Chisolm GM, Steinberg D. The oxidative modification hypothesis of atherogenesis: an overview. *Free Radic Biol Med* 2000;28:1815-1826.
364. Witztum JL, Steinberg D. The oxidative modification hypothesis of atherosclerosis: does it hold for humans? *Trends Cardiovasc Med* 2001;11:93-102.
365. Navab M, Berliner JA, Watson AD, Hama SY, Territo MC, Lusis AJ, Shih DM, Van Lenten BJ, Frank JS, Demer LL, Edwards PA, Fogelman AM. The Yin and Yang of oxidation in the development of the fatty streak. A review based on the 1994 George Lyman Duff Memorial Lecture. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1996;16:831-842.
366. Berliner JA, Heinecke JW. The role of oxidized lipoproteins in atherogenesis. *Free Radic Biol Med* 1996;20:707-727.
367. Quinn MT, Parthasarathy S, Fong LG, Steinberg D. Oxidatively modified low density lipoproteins: a potential role in recruitment and retention of monocyte/macrophages during atherogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987;84:2995-2998.
368. McMurray HF, Parthasarathy S, Steinberg D. Oxidatively modified low density lipoprotein is a chemoattractant for human T lymphocytes. *J Clin Invest* 1993;92:1004-1008.
369. Ohgushi M, Kugiyama K, Fukunaga K, Murohara T, Sugiyama S, Miyamoto E, Yasue H. Protein kinase C inhibitors prevent impairment of endothelium-dependent relaxation by oxidatively modified LDL. *Arterioscler Thromb* 1993;13:1525-1532.
370. Thomas CE, Jackson RL, Ohlweiler DF, Ku G. Multiple lipid oxidation products in low density lipoproteins induce interleukin-1 beta release from human blood mononuclear cells. *J Lipid Res* 1994;35:417-427.
371. Xu XP, Meisel SR, Ong JM, Kaul S, Cercek B, Rajavashisth TB, Sharifi B, Shah PK. Oxidized low-density lipoprotein regulates matrix metalloproteinase-9 and its tissue inhibitor in human monocyte-derived macrophages. *Circulation* 1999;99:993-998.
372. Hessler JR, Morel DW, Lewis LJ, Chisolm GM. Lipoprotein oxidation and lipoprotein-induced cytotoxicity. *Arteriosclerosis* 1983;3:215-222.



373. Steinbrecher UP, Parthasarathy S, Leake DS, Witztum JL, Steinberg D. Modification of low density lipoprotein by endothelial cells involves lipid peroxidation and degradation of low density lipoprotein phospholipids. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1984;81:3883-3887.
374. Steinbrecher UP, Pritchard PH. Hydrolysis of phosphatidylcholine during LDL oxidation is mediated by platelet-activating factor acetylhydrolase. *J Lipid Res* 1989;30:305-315.
375. Marathe GK, Harrison KA, Murphy RC, Prescott SM, Zimmerman GA, McIntyre TM. Bioactive phospholipid oxidation products. *Free Radic Biol Med* 2000;28:1762-1770.
376. Smiley PL, Stremier KE, Prescott SM, Zimmerman GA, McIntyre TM. Oxidatively fragmented phosphatidylcholines activate human neutrophils through the receptor for platelet-activating factor. *J Biol Chem* 1991;266:11104-11110.
377. Silva AR, de Assis EF, Caiado LF, Marathe GK, Bozza MT, McIntyre TM, Zimmerman GA, Prescott SM, Bozza PT, Castro-Faria-Neto HC. Monocyte chemoattractant protein-1 and 5-lipoxygenase products recruit leukocytes in response to platelet-activating factor-like lipids in oxidized low-density lipoprotein. *J Immunol* 2002;168:4112-4120.
378. Marathe GK, Zimmerman GA, Prescott SM, McIntyre TM. Activation of vascular cells by PAF-like lipids in oxidized LDL. *Vascul Pharmacol* 2002;38:193-200.
379. Patel KD, Zimmerman GA, Prescott SM, McIntyre TM. Novel leukocyte agonists are released by endothelial cells exposed to peroxide. *J Biol Chem* 1992;267:15168-15175.
380. Schlame M, Haupt R, Wiswedel I, Kox WJ, Rustow B. Identification of short-chain oxidized phosphatidylcholine in human plasma. *J Lipid Res* 1996;37:2608-2615.
381. Watson AD, Leitinger N, Navab M, Faull KF, Horkko S, Witztum JL, Palinski W, Schwenke D, Salomon RG, Sha W, Subbanagounder G, Fogelman AM, Berliner JA. 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* 1997;272:13597-13607.
382. Marathe GK, Davies SS, Harrison KA, Silva AR, Murphy RC, Castro-Faria-Neto H, Prescott SM, Zimmerman GA, McIntyre TM. Inflammatory platelet-activating factor-like phospholipids in oxidized low density lipoproteins are fragmented alkyl phosphatidylcholines. *J Biol Chem* 1999;274:28395-28404.



383. Schmitt A, Negre-Salvayre A, Trolly M, Valdiguie P, Salvayre R. Phospholipid hydrolysis of mildly oxidized LDL reduces their cytotoxicity to cultured endothelial cells. Potential protective role against atherogenesis. *Biochim Biophys Acta* 1995;1256:284-292.
384. Tsoukatos DC, Arborati M, Liapikos T, Clay KL, Murphy RC, Chapman MJ, Ninio E. Copper-catalyzed oxidation mediates PAF formation in human LDL subspecies. Protective role of PAF:acetylhydrolase in dense LDL. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997;17:3505-3512.
385. Subbanagounder G, Leitinger N, Shih PT, Faull KF, Berliner JA. Evidence that phospholipid oxidation products and/or platelet-activating factor play an important role in early atherogenesis : in vitro and In vivo inhibition by WEB 2086. *Circ Res* 1999;85:311-318.
386. Wu R, Huang YH, Elinder LS, Frostegard J. Lysophosphatidylcholine is involved in the antigenicity of oxidized LDL. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998;18:626-630.
387. Kume N, Gimbrone MA, Jr. Lysophosphatidylcholine transcriptionally induces growth factor gene expression in cultured human endothelial cells. *J Clin Invest* 1994;93:907-911.
388. Sakai M, Miyazaki A, Hakamata H, Sasaki T, Yui S, Yamazaki M, Shichiri M, Horiuchi S. Lysophosphatidylcholine plays an essential role in the mitogenic effect of oxidized low density lipoprotein on murine macrophages. *J Biol Chem* 1994;269:31430-31435.
389. Kume N, Cybulsky MI, Gimbrone MA, Jr. Lysophosphatidylcholine, a component of atherogenic lipoproteins, induces mononuclear leukocyte adhesion molecules in cultured human and rabbit arterial endothelial cells. *J Clin Invest* 1992;90:1138-1144.
390. Karabina SA, Elisaf M, Bairaktari E, Tzallas C, Siamopoulos KC, Tselepis AD. Increased activity of platelet-activating factor acetylhydrolase in low-density lipoprotein subfractions induces enhanced lysophosphatidylcholine production during oxidation in patients with heterozygous familial hypercholesterolaemia. *Eur J Clin Invest* 1997;27:595-602.
391. Hirayama T, Ogawa Y, Tobise K, Kikuchi K. Mechanism of endothelium-dependent vasorelaxation evoked by lysophosphatidylcholine. *Hypertens Res* 1998;21:137-145.
392. Huang YH, Schafer-Elinder L, Wu R, Claesson HE, Frostegard J. Lysophosphatidylcholine (LPC) induces proinflammatory cytokines by a platelet-

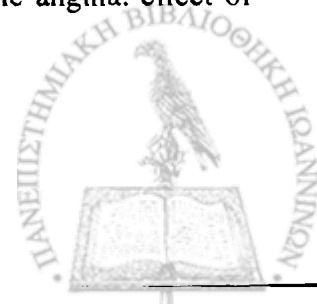


- activating factor (PAF) receptor-dependent mechanism. *Clin Exp Immunol* 1999;116:326-331.
393. Marathe GK, Silva AR, de Castro Faria Neto HC, Tjoelker LW, Prescott SM, Zimmerman GA, McIntyre TM. Lysophosphatidylcholine and lyso-PAF display PAF-like activity derived from contaminating phospholipids. *J Lipid Res* 2001;42:1430-1437.
394. MacPhee CH, Moores KE, Boyd HF, Dhanak D, Ife RJ, Leach CA, Leake DS, Milliner KJ, Patterson RA, Suckling KE, Tew DG, Hickey DM. Lipoprotein-associated phospholipase A2, platelet-activating factor acetylhydrolase, generates two bioactive products during the oxidation of low-density lipoprotein: use of a novel inhibitor. *Biochem J* 1999;338:479-487.
395. Parthasarathy S, Steinbrecher UP, Barnett J, Witztum JL, Steinberg D. Essential role of phospholipase A2 activity in endothelial cell-induced modification of low density lipoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1985;82:3000-3004.
396. Theilmeier G, De Geest B, Van Veldhoven PP, Stengel D, Michiels C, Lox M, Landeloos M, Chapman MJ, Ninio E, Collen D, Himpens B, Holvoet P. HDL-associated PAF-AH reduces endothelial adhesiveness in apoE^{-/-} mice. *FASEB J* 2000;14:2032-2039.
397. Quarck R, De Geest B, Stengel D, Mertens A, Lox M, Theilmeier G, Michiels C, Raes M, Bult H, Collen D, Van Veldhoven P, Ninio E, Holvoet P. Adenovirus-mediated gene transfer of human platelet-activating factor-acetylhydrolase prevents injury-induced neointima formation and reduces spontaneous atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation* 2001;103:2495-2500.
398. Liu M, Subbaiah PV. Hydrolysis and transesterification of platelet-activating factor by lecithin-cholesterol acyltransferase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91:6035-6039.
399. Subramanian VS, Goyal J, Miwa M, Sugatami J, Akiyama M, Liu M, Subbaiah PV. Role of lecithin-cholesterol acyltransferase in the metabolism of oxidized phospholipids in plasma: studies with platelet-activating factor-acetyl hydrolase-deficient plasma. *Biochim Biophys Acta* 1999;1439:95-109.
400. Kakafika AI, Xenofontos S, Tsimihodimos V, Tambaki AP, Lourida ES, Kalaitzidis R, Cariolou MA, Elisaf M, Tselepis AD. The PON1 M55L gene polymorphism is associated with reduced HDL-associated PAF-AH activity in normolipidemic and dyslipidemic populations. *J Lipid Res* 2003;44:1919-1926.

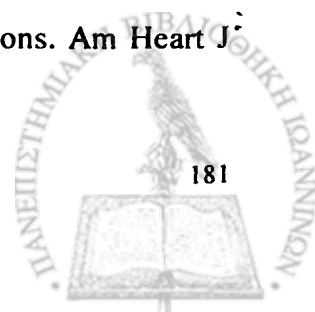


401. Marathe GK, Zimmerman GA, McIntyre TM. Platelet-activating factor acetylhydrolase, and not paraoxonase-I, is the oxidized phospholipid hydrolase of high density lipoprotein particles. *J Biol Chem* 2003;278:3937-3947.
402. Shih DM, Gu L, Xia YR, Navab M, Li WF, Hama S, Castellani LW, Furlong CE, Costa LG, Fogelman AM, Lusis AJ. Mice lacking serum paraoxonase are susceptible to organophosphate toxicity and atherosclerosis. *Nature* 1998;394:284-287.
403. De Geest B, Stengel D, Landeloos M, Lox M, Le Gat L, Collen D, Holvoet P, Ninio E. Effect of overexpression of human apo A-I in C57BL/6 and C57BL/6 apo E-deficient mice on 2 lipoprotein-associated enzymes, platelet-activating factor acetylhydrolase and paraoxonase. Comparison of adenovirus-mediated human apo A-I gene transfer and human apo A-I transgenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;20:E68-E75.
404. Satoh K, Imaizumi T, Yoshida H, Kawamura Y, Takamatsu S, Takamatsu M, Mizuno S. Platelet-activating factor acetylhydrolase in plasma lipoproteins of healthy men and women. *Clin Chim Acta* 1991;202:95-103.
405. Kosaka T, Yamaguchi M, Miyanaga K, Mizuno K. Serum platelet-activating factor acetylhydrolase (PAF-AH) activity in more than 3000 healthy Japanese. *Clin Chim Acta* 2001;312:179-183.
406. Caslake MJ, Packard CJ, Suckling KE, Holmes SD, Chamberlain P, Macphee CH. Lipoprotein-associated phospholipase A(2), platelet-activating factor acetylhydrolase: a potential new risk factor for coronary artery disease. *Atherosclerosis* 2000;150:413-419.
407. Stephens CJ, Graham RM, Yadava OP, Leong LL, Sturm MJ, Taylor RR. Plasma platelet activating factor degradation and serum lipids after coronary bypass surgery. *Cardiovasc Res* 1992;26:25-31.
408. Lund-Katz S, Laplaud PM, Phillips MC, Chapman MJ. Apolipoprotein B-100 conformation and particle surface charge in human LDL subspecies: implication for LDL receptor interaction. *Biochemistry* 1998;37:12867-12874.
409. Satoh K, Imaizumi T, Kawamura Y, Yoshida H, Takamatsu S, Takamatsu M. Increased activity of the platelet-activating factor acetylhydrolase in plasma low density lipoprotein from patients with essential hypertension. *Prostaglandins* 1989;37:673-682.
410. Ostermann G, Lang A, Holtz H, Ruhling K, Winkler L, Till U. The degradation of platelet-activating factor in serum and its discriminative value in atherosclerotic patients. *Thromb Res* 1988;52:529-540.

411. Blankenberg S, Stengel D, Rupprecht HJ, Bickel C, Meyer J, Cambien F, Tiret L, Ninio E. Plasma PAF-acetylhydrolase in patients with coronary artery disease: results of a cross-sectional analysis. *J Lipid Res* 2003;44:1381-1386.
412. Satoh K, Yoshida H, Imaizumi T, Takamatsu S, Mizuno S. Platelet-activating factor acetylhydrolase in plasma lipoproteins from patients with ischemic stroke. *Stroke* 1992;23:1090-1092.
413. Unno N, Nakamura T, Kaneko H, Uchiyama T, Yamamoto N, Sugatani J, Miwa M, Nakamura S. Plasma platelet-activating factor acetylhydrolase deficiency is associated with atherosclerotic occlusive disease in japan. *J Vasc Surg* 2000;32:263-267.
414. Kudolo GB, Bressler P, DeFronzo RA. Plasma PAF acetylhydrolase in non-insulin dependent diabetes mellitus and obesity: effect of hyperinsulinemia and lovastatin treatment. *J Lipid Mediat Cell Signal* 1997;17:97-113.
415. Shohet RV, Anwar A, Johnston JM, Cohen JC. Plasma platelet-activating factor acetylhydrolase activity is not associated with premature coronary atherosclerosis. *Am J Cardiol* 1999;83:109.
416. Yamada Y, Yoshida H, Ichihara S, Imaizumi T, Satoh K, Yokota M. Correlations between plasma platelet-activating factor acetylhydrolase (PAF-AH) activity and PAF-AH genotype, age, and atherosclerosis in a Japanese population. *Atherosclerosis* 2000;150:209-216.
417. Hiramoto M, Yoshida H, Imaizumi T, Yoshimizu N, Satoh K. A mutation in plasma platelet-activating factor acetylhydrolase (Val279-->Phe) is a genetic risk factor for stroke. *Stroke* 1997;28:2417-2420.
418. Unno N, Nakamura T, Mitsuoka H, Saito T, Miki K, Ishimaru K, Sugatani J, Miwa M, Nakamura S. Single nucleotide polymorphism (G994-->T) in the plasma platelet-activating factor-acetylhydrolase gene is associated with graft patency of femoropopliteal bypass. *Surgery* 2002;132:66-71.
419. Serebruany VL, Gurbel PA, Murugesan SR, Lowry DR, Sturm E, Svetlov SI. Depressed plasma platelet-activating factor acetylhydrolase in patients presenting with acute myocardial infarction. *Cardiology* 1998;90:127-130.
420. Tselepis AD, Goudevenos JA, Tambaki AP, Michalis L, Stroumbis CS, Tsoukatos DC, Elisaf M, Sideris DA. Platelet aggregatory response to platelet activating factor (PAF), ex vivo, and PAF-acetylhydrolase activity in patients with unstable angina: effect of c7E3 Fab (abciximab) therapy. *Cardiovasc Res* 1999;43:183-191.



421. Packard CJ, O'Reilly DS, Caslake MJ, McMahon AD, Ford I, Cooney J, Macphee CH, Suckling KE, Krishna M, Wilkinson FE, Rumley A, Lowe GD. Lipoprotein-associated phospholipase A2 as an independent predictor of coronary heart disease. West of Scotland Coronary Prevention Study Group. *N Engl J Med* 2000;343:1148-1155.
422. Blake GJ, Dada N, Fox JC, Manson JE, Ridker PM. A prospective evaluation of lipoprotein-associated phospholipase A(2) levels and the risk of future cardiovascular events in women. *J Am Coll Cardiol* 2001;38:1302-1306.
423. Williams RR, Hunt SC, Schumacher MC, Hegele RA, Leppert MF, Ludwig EH, Hopkins PN. Diagnosing heterozygous familial hypercholesterolemia using new practical criteria validated by molecular genetics. *Am J Cardiol* 1993;72:171-176.
424. Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem* 1972;18:499-502.
425. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 1988;16:1215.
426. Hobbs HH, Brown MS, Goldstein JL. Molecular genetics of the LDL receptor gene in familial hypercholesterolemia. *Hum Mutat* 1992;1:445-466.
427. Traeger-Synodinos J, Mavroidis N, Kanavakis E, Drogari E, Humphries SE, Day IN, Kattamis C, Matsaniotis N. Analysis of low density lipoprotein receptor gene mutations and microsatellite haplotypes in Greek FH heterozygous children: six independent ancestors account for 60% of probands. *Hum Genet* 1998;102:343-347.
428. Tybjaerg-Hansen A, Steffensen R, Meinertz H, Schnohr P, Nordestgaard BG. Association of mutations in the apolipoprotein B gene with hypercholesterolemia and the risk of ischemic heart disease. *N Engl J Med* 1998;338:1577-1584.
429. Lemieux I, Laperriere L, Dzavik V, Tremblay G, Bourgeois J, Despres JP. A 16-week fenofibrate treatment increases LDL particle size in type IIA dyslipidemic patients. *Atherosclerosis* 2002;162:363-371.
430. Napoli C, Postiglione A, Triggiani M, Corso G, Palumbo G, Carbone V, Ruocco A, Ambrosio G, Montefusco S, Malorni A, Condorelli M, Chiariello M. Oxidative structural modifications of low density lipoprotein in homozygous familial hypercholesterolemia. *Atherosclerosis* 1995;118:259-273.
431. Thompson GR, Teng B, Sniderman AD. Kinetics of LDL subfractions. *Am Heart J* 1987;113:514-517.



432. Krauss RM, Burke DJ. Identification of multiple subclasses of plasma low density lipoproteins in normal humans. *J Lipid Res* 1982;23:97-104.
433. Austin MA, Hokanson JE, Brunzell JD. Characterization of low-density lipoprotein subclasses: methodologic approaches and clinical relevance. *Curr Opin Lipidol* 1994;5:395-403.
434. Anber V, Millar JS, McConnell M, Shepherd J, Packard CJ. Interaction of very-low-density, intermediate-density, and low-density lipoproteins with human arterial wall proteoglycans. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997;17:2507-2514.
435. Lamarche B, Tchernof A, Moorjani S, Cantin B, Dagenais GR, Lupien PJ, Despres JP. Small, dense low-density lipoprotein particles as a predictor of the risk of ischemic heart disease in men. Prospective results from the Quebec Cardiovascular Study. *Circulation* 1997;95:69-75.
436. Watson TD, Caslake MJ, Freeman DJ, Griffin BA, Hinnie J, Packard CJ, Shepherd J. Determinants of LDL subfraction distribution and concentrations in young normolipidemic subjects. *Arterioscler Thromb* 1994;14:902-910.
437. Tan CE, Foster L, Caslake MJ, Bedford D, Watson TD, McConnell M, Packard CJ, Shepherd J. Relations between plasma lipids and postheparin plasma lipases and VLDL and LDL subfraction patterns in normolipemic men and women. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995;15:1839-1848.
438. Campos H, Blijlevens E, McNamara JR, Ordovas JM, Posner BM, Wilson PW, Castelli WP, Schaefer EJ. LDL particle size distribution. Results from the Framingham Offspring Study. *Arterioscler Thromb* 1992;12:1410-1419.
439. McNamara JR, Jenner JL, Li Z, Wilson PW, Schaefer EJ. Change in LDL particle size is associated with change in plasma triglyceride concentration. *Arterioscler Thromb* 1992;12:1284-1290.
440. Austin MA, King MC, Vranizan KM, Krauss RM. Atherogenic lipoprotein phenotype. A proposed genetic marker for coronary heart disease risk. *Circulation* 1990;82:495-506.
441. Cuchel M, Schaefer EJ, Millar JS, Jones PJ, Dolnikowski GG, Vergani C, Lichtenstein AH. Lovastatin decreases de novo cholesterol synthesis and LDL Apo B-100 production rates in combined-hyperlipidemic males. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997;17:1910-1917.



442. Unno N, Nakamura T, Mitsuoka H, Uchiyama T, Yamamoto N, Saito T, Sugatani J, Miwa M, Nakamura S. Association of a G994 -->T missense mutation in the plasma platelet-activating factor acetylhydrolase gene with risk of abdominal aortic aneurysm in Japanese. *Ann Surg* 2002;235:297-302.



