



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ - ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ – ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ & ΤΜΗΜΑ

ΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΕΦΑΡΜΟΓΩΝ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΩΝ

**ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΡΟΛΟΥ ΤΗΣ $Lp(a)$ ΚΑΙ ΤΩΝ ΣΥΣΤΑΤΙΚΩΝ
ΤΗΣ ΣΤΗΝ ΚΑΡΔΙΑΓΓΕΙΑΚΗ ΝΟΣΟ**

ΠΑΠΑΚΩΣΤΑ ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΑ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2017

Στον Αλέξανδρο

Επιβλέπων καθηγητής και Εξεταστική Επιτροπή:

1. Μωυσής Ελισάφ, καθηγητής Παθολογίας, Διευθυντής της Β' Παθολογικής Κλινικής του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Ιωαννίνων, ως επιβλέπων καθηγητής
2. Αλέξανδρος Τσελέπης, καθηγητής Βιοχημείας, ως μέλος
3. Χαράλαμπος Μηλιώνης, αναπληρωτής καθηγητής Παθολογίας, ως μέλος

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε στα πλαίσια του διατμηματικού μεταπτυχιακού προγράμματος με τίτλο «Ιατρική Χημεία». Εκπονήθηκε στο Ερευνητικό Κέντρο Αθηροθρόμβωσης (ΕΚΑ) του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων κατά τη χρονική περίοδο 2015-2016, υπό την επίβλεψη του διευθυντή της Β' Παθολογικής Κλινικής του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων Κύριο Μωυσή Ελισάφ. Πρόκειται για μία μελέτη διερεύνησης του ρόλου της λιποπρωτεΐνης (α) και των συστατικών της με παράγοντες καρδιαγγειακού κινδύνου που χαρακτηρίζεται από ερευνητική καινοτομία.

Ευχαριστώ θερμά τον επιβλέποντα καθηγητή μου Κύριο Μωυσή Ελισάφ για την άψογη συνεργασία μας, την αμέριστη στήριξη και τον πολύτιμο χρόνο που αφιέρωσε για την εκπόνηση αυτής της διατριβής που διεύρυνε τους επιστημονικούς αλλά και τους προσωπικούς μου ορίζοντες. Εν συνεχεία, ευχαριστώ θερμά τον Κύριο Αλέξανδρο Τσελέπη, Καθηγητή Βιοχημείας, ιδρυτή και πρόεδρο του παρόντος διατμηματικού μεταπτυχιακού προγράμματος διότι σε αυτόν οφείλω το «εὖ ζῆν» της ακαδημαϊκής μου υπόστασης. Επιπλέον ευχαριστώ τον Κύριο Χαράλαμπο Μηλιώνη, Αναπληρωτή Καθηγητή Παθολογίας για τις πολύτιμες συμβουλές, τα εποικοδομητικά σχόλια, την καλοσύνη και τη δωρική του στάση καθ' όλη τη διάρκεια αυτής της μεταπτυχιακής εργασίας.

Ευχαριστώ τον Κύριο Τέλλη Κωνσταντίνο για την ουσιαστική βοήθειά του, τις γόνιμες παρατηρήσεις και τον αλτρουισμό του. Τέλος, ευχαριστώ όλο το προσωπικό του Εξωτερικού Ιατρείου Διαταραχών του Μεταβολισμού των Λιπιδίων και Παχυσαρκίας του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Ιωαννίνων για την άψογη συνεργασία.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ	1
ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΠΙΝΑΚΩΝ - ΕΙΚΟΝΩΝ - ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ	3
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	5
ABSTRACT	6
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	7
1.1. ΚΑΡΔΙΑΓΓΕΙΑΚΗ ΝΟΣΟΣ	7
1.1.1. Ιστορική αναδρομή	8
1.1.2. Επιδημιολογικές μελέτες και ΚΑΝ.....	8
1.2. ΧΟΛΗΣΤΕΡΟΛΗ ΚΑΙ ΛΙΠΟΠΡΩΤΕΪΝΕΣ	9
1.2.1. Απολιποπρωτεΐνες.....	10
1.2.2. Ταξινόμηση λιποπρωτεϊνών.....	12
1.2.3. Χυλομικρά.....	13
1.2.4. Κατάλοιπα χυλομικρών	14
1.2.5. Πολύ χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνες (VLDL)	14
1.2.6. IDL	15
1.2.7. LDL.....	15
1.2.8. HDL	18
1.3 Lp(A)	19
1.3.1 Βιοχημεία της apo(a).....	19
1.3.2 Σύνθεση της Lp(a).....	22
1.3.3 Lp(a) και ΚΑΝ.....	23
1.3.4 Αθηροσκλήρωση και Lp(a): οξειδωμένα φωσφολιπίδια	23
1.3.5 Αθηροσκλήρωση και Lp(a): Λιποπρωτεϊνική φωσφολιπάση A ₂ (LpPLA ₂).....	26
1.3.6 Lp(a), ένας θρομβωτικός, αντι-ινωδολυτικός και φλεγμονώδης παράγοντας κινδύνου	27
1.3.7 Lp(a) και αγγειογένεση	28
1.3.8 Καταβολισμός της Lp(a)	29
1.4 LDLR.....	29
1.4.1 Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9).....	30
1.5 ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΗ ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ ΑΥΞΗΜΕΝΩΝ ΕΠΙΠΕΔΩΝ Lp(A)	32
1.5.1 Μελλοντική χορήγηση ASOs	33
1.5.2 Παραδοσιακές μέθοδοι μείωσης της Lp(a).....	34
1.6 ΣΤΟΧΟΣ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ	34
2. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ	35
2.1 ΠΛΗΘΥΣΜΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ	35
2.1 ΥΠΕΡΦΥΓΟΚΕΝΤΡΙΚΟΣ ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΣ Lp(A) ΑΠΟ ΤΟ ΠΛΑΣΜΑ	36
2.1.1 Όργανα-αντιδραστήρια.....	36
2.1.2 Διαλύματα εργασίας.....	36

2.1.3 Πειραματική διαδικασία	37
Απομόνωση πλάσματος.....	37
Υπερφυγοκεντρική απομόνωση της Lp(a).....	37
2.2 ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ Lp(A) ΜΕ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΣΥΓΓΕΝΕΙΑΣ	38
2.2.1 Αρχή της μεθόδου.....	38
2.2.2 Όργανα – Διαλύματα Εργασίας.....	38
2.2.3 Πειραματική διαδικασία	39
2.3 ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΛΙΠΟΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΣΕ ΠΗΚΤΩΜΑ ΑΓΑΡΟΖΗΣ	41
2.3.1 Αρχή της μεθόδου.....	41
Δείγμα	41
2.3.2 Όργανα – αντιδραστήρια	42
2.3.3 Διαδικασία ηλεκτροφόρησης	43
2.3.4 Χρώση των λιποπρωτεϊνών	44
2.3.5 Έλεγχος της καθαρότητας της Lp(a).....	44
2.4 ΕΝΖΥΜΙΚΟΣ ΦΩΤΟΜΕΤΡΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΟΛΙΚΗΣ ΧΟΛΗΣΤΕΡΟΛΗΣ	45
2.4.1 Αρχή της μεθόδου.....	45
2.4.2 Αντιδραστήρια	46
2.4.3 Εκτέλεση Προσδιορισμού.....	46
2.4.4 Υπολογισμός	47
2.5 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ HDL ΧΟΛΗΣΤΕΡΟΛΗΣ	47
2.5.1 Αρχή της μεθόδου.....	47
ΔΕΙΓΜΑ	47
2.5.2 Αντιδραστήρια	48
2.5.3 Εκτέλεση του προσδιορισμού.....	48
2.6 ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ PCSK9	49
2.6.1 Αρχή της μεθόδου.....	49
2.6.2 Αντιδραστήρια – Όργανα - Διαλύματα εργασίας	50
2.6.3 Λήψη των δειγμάτων και αποθήκευση.....	52
2.6.4 Προετοιμασία των δειγμάτων	52
2.10.5 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ	54
2.6.5 Επεξεργασία των αποτελεσμάτων.....	56
2.7 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΕΝΖΥΜΙΚΗΣ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑΣ Lp-PLA ₂	57
2.7.1 Αρχή της μεθόδου.....	57
2.7.2 Όργανα-αντιδραστήρια.....	58
2.7.3 Διαλύματα εργασίας.....	59
2.7.4 Πειραματική διαδικασία	60
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	63
3.1 ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΟΥ ΠΛΗΘΥΣΜΟΥ ΜΕΛΕΤΗΣ	63
3.2 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΙ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ Lp(A)	64
3.3 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΙ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ HDL.....	65
3.3.1 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑΣ ΤΗΣ Lp-PLA ₂	66
3.4 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΤΩΝ ΜΕΤΡΗΣΕΩΝ	66
3.5 ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ	68

3.5.1. Ανάλυση συσχετίσεων (correlations).....	68
4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	74
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	77

ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΠΙΝΑΚΩΝ - ΕΙΚΟΝΩΝ - ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ

Πίνακας 1. 1. Οι κυριότερες απολιποπρωτεΐνες και οι λειτουργίες τους.....	10
Εικόνα 1.1 Απεικόνιση μιας λιποπρωτεΐνης.....	12
Εικόνα 1.2. Οι κατηγορίες των λιποπρωτεϊνών.....	13
Εικόνα 1.3. Απεικόνιση της δομής της Lp(a)	21
Εικόνα 1.4. Οι μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί στην Lp(a)	22
Εικόνα 1.5. Ένα μοντέλο των ρόλων των οξειδωμένων φωσφολιπιδίων στην εμφάνιση της αθηροσκλήρωσης.	25
Πίνακας 2.1. Περιεχόμενα κιτ Quantikine ELISA.	50
Εικόνα 2.1. Δημιουργία πρότυπων συγκεντρώσεων h-PCSK9 σε Quantikine ELISA τεστ	54
Διάγραμμα 2.1. Τυπική λογαριθμική καμπύλη απορρόφησης-συγκέντρωσης PCSK9.....	57
Πίνακας 3.1 Κλινικά και βιοχημικά χαρακτηριστικά του πληθυσμού της μελέτης.....	63
Διάγραμμα 3.1. Προφίλ έκλουσης της Lp(a) από τη στήλη Lysine-Sepharose 4B.....	64
Εικόνα 3.1. Ηλεκτροφόρηση των κλασμάτων της Lp(a) των έξι πρώτων ατόμων της ομάδας με Lp(a) ≥ 40 mg/dL.....	65
Εικόνα 3.2. Αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης των HDL κλασμάτων.	65
Πίνακας 3.2. Αποτελέσματα των μετρήσεων.....	67
Διάγραμμα 3.2. Συσχέτιση μεταξύ της PCSK9 του πλάσματος και της ολικής χοληστερόλης (TCHOL).....	68
Διάγραμμα 3.3. Συσχετίσεις μεταξύ της PCSK9 του πλάσματος και της non-HDL και της LDL χοληστερόλης.	68
Διάγραμμα 3.4. Συσχετίσεις της PCSK9 στα non-HDL σωματίδια με την ολική, LDL και τη non-HDL χοληστερόλη.....	69
Διάγραμμα 3.5. Αρνητικές συσχετίσεις της PCSK9 του πλάσματος και της PCSK9 στις non-HDL με την ενεργότητα της Lp-PLA ₂ στις HDL λιποπρωτεΐνες και της PCSK9 στις HDL με την HDL χοληστερόλη.....	70
Διάγραμμα 3.6 Θετική στατιστική συσχέτιση της συγκέντρωσης της PCSK9 στο πλάσμα και της PCSK9 στα non-HDL σωματίδια με τη λιποπρωτεΐνη Lp(a).....	71

Διάγραμμα 3.7 Αρνητική συσχέτιση της PCSK9 στα HDLσωματίδια με την ολική, HDL, LDL και τη non-HDL χοληστερόλη.	71
Διάγραμμα 4.1 Συσχετίσεις της ομάδας υγιών μαρτύρων.....	74
Διάγραμμα 4.2 Συσχετίσεις της ομάδας με υψηλά επίπεδα Lp(a).....	75

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η λιποπρωτεΐνη α [Lp(a)], αποτελείται από ένα LDL σωματίδιο συζευγμένο με μία γλυκοπρωτεΐνη, την αποπρωτεΐνη (α), η οποία φέρει μεγάλο βαθμό ομολογίας με το πλασμινογόνο. Κατά συνέπεια, η Lp(a) αποτελεί μια ξεχωριστή λιποπρωτεΐνη μιας και συνδέει το μεταβολισμό των λιπιδίων με το ινωδολυτικό σύστημα ενώ αποτελεί και ανεξάρτητο παράγοντα καρδιαγγειακού κινδύνου. Αντιθέτως η λιποπρωτεΐνη υψηλής πυκνότητας (HDL) θεωρείται αθηροπροστατευτική γιατί επιτελεί ανάστροφη μεταφορά χοληστερόλης, αγγειοδιαστολή, κυτταροπροστασία και επιπλέον έχει αντιοξειδωτικές, αντιφλεγμονώδεις και αντιαιμοπεταλιακές δράσεις. Η λιποπρωτεϊνική φωσφολιπάση A_2 (LpPLA₂), κυκλοφορεί στο πλάσμα συνδεδεμένη στις LDL, HDL και Lp(a) λιποπρωτεΐνες. Η κατανομή της LpPLA₂ μεταξύ των λιποπρωτεϊνών εξαρτάται από το βαθμό γλυκοζυλίωσης και επηρεάζει την ενεργότητα της LpPLA₂, που αποτελεί καρδιαγγειακό προγνωστικό δείκτη. Η Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9) διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στο μεταβολισμό των λιπιδίων, στην αθηροσκλήρωση και στην καρδιαγγειακή νόσο και φαίνεται να συμμετέχει σε αποπτωτικές και φλεγμονώδεις διαδικασίες. Στην παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκε εργαστηριακή απομόνωση της Lp(a) και της HDL σε δύο πληθυσμούς (ομάδα υγείων μαρτύρων και ομάδα με Lp(a) ≥ 40 mg/dL), έγινε προσδιορισμός της ενεργότητας της LpPLA₂ και ποσοτικός προσδιορισμός της PCSK9. Η στατιστική ανάλυση ανέδειξε πολύ ενδιαφέροντα στοιχεία για την πιθανή λειτουργία της Lp(a) και τη σχέση της με τα HDL σωματίδια, την LpPLA₂ και την PCSK9. Υπάρχουν ισχυρές ενδείξεις ότι η Lp(a) φαίνεται να σχετίζεται με υψηλά επίπεδα PCSK9, ενώ τα HDL σωματίδια ενδεχομένως διαδραματίζουν κάποιο ρόλο κλειδί όσον αφορά τον μεταβολισμό ή την κάθαρση της PCSK9.

ABSTRACT

Lipoprotein (a) [Lp(a)] consists of an LDL particle conjugated with a glycoprotein, apoprotein (a) that shares homology with plasminogen therefore it is a unique protein that connects lipid metabolism with the fibrinolytic cascade and it is also an independent cardiovascular risk factor. Antithetically, HDL has an atheroprotective role as it performs reverse cholesterol transport, vasodilatation, cytoprotection as well as antioxidant, anti-inflammatory and antiplatelet actions. Lipoprotein phospholipase A₂ (LpPLA₂) circulates in plasma bound to LDL, HDL and Lp(a), a distribution depended on the level of glycosylation that affects the activity of LpPLA₂ a well known cardiovascular biomarker. Proprotein Convertase Subtilisin / Kexin type 9 (PCSK9) plays a significant role in lipid metabolism, atherosclerosis and cardiovascular disease and it is also involved with apoptotic and inflammatory processes. In this study Lp(a) and HDL were isolated from two populations (healthy control group and group with Lp (a) ≥ 40 mg / dL), followed by LpPLA₂ activity evaluation and quantification of PCSK9. Statistical analysis revealed very interesting facts about the possible function of Lp(a) and its correlation with HDL particles, LpPLA₂ and PCSK9. There is strong evidence that Lp(a) appears to be associated with high levels of PCSK9, while HDL is likely to play a key role in the metabolism or clearance of PCSK9.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1. Καρδιαγγειακή νόσος

Τα καρδιαγγειακά νοσήματα αποτελούν ένα ευρύ φάσμα διαταραχών, οι οποίες αφορούν την καρδιά και τα αιμοφόρα αγγεία και περιλαμβάνουν τη Στεφανιαία νόσο, το Αγγειακό Εγκεφαλικό Επεισόδιο, τη Ρευματική Καρδιοπάθεια, τη Συγγενή Καρδιοπάθεια, τα Ανευρύσματα και το Διαχωρισμό της Αορτής, την Εν τω Βάθει Φλεβοθρόμβωση, την Πνευμονική εμβολή, την Περιφερική αρτηριοπάθεια και άλλα νοσήματα, όπως η αρτηριακή υπέρταση, οι όγκοι καρδιάς, τα εγκεφαλικά ανευρύσματα, η καρδιομυοπάθεια και οι βαλβιδοπάθειες. Η καρδιαγγειακή νόσος (ΚΑΝ) είναι το πρώτο αίτιο θανάτου παγκοσμίως. Έχει εκτιμηθεί ότι 17.5 εκατομμύρια άνθρωποι πεθαίνουν από ΚΑΝ κάθε έτος, που αντιστοιχεί στο 30% των συνολικών θανάτων (1).

Η αθηρωματική νόσος αποτελεί το υποκείμενο αίτιο της καρδιαγγειακής νόσου και αφορά την προοδευτική εναπόθεση λιπώδους περιεχομένου στο αρτηριακό τοίχωμα με αποτέλεσμα τη στένωση του αυλού των αγγείων και τη μείωση της αιμάτωσης των ανάλογων οργάνων. Η αθηρωμάτωση επηρεάζει επίσης το καρωτιδικό σύστημα με αποτέλεσμα τα αγγειακά εγκεφαλικά επεισόδια, τα στεφανιαία αγγεία με αποτέλεσμα τη στεφανιαία νόσο και το έμφραγμα του μυοκαρδίου και βέβαια και τις υπόλοιπες περιφερικές αρτηρίες με τη μορφή της περιφερικής αγγειοπάθειας (2).

1.1.1. Ιστορική αναδρομή

Η άποψη ότι η αθηροσκλήρωση είναι μια φλεγμονώδης νόσος χρονολογείται στη δεκαετία του 1840, από τον αυστριακό παθολόγο Carl von Rokitansky, που πρώτος περιέγραψε φλεγμονώδεις αλλαγές στα αιμοφόρα αγγεία. Ο Γερμανός παθολόγος, Rudolf Virchow το 1856, ταυτοποίησε λιπώδεις εναποθέσεις και φλεγμονώδη κύτταρα στις αθηρωματικές περιοχές, εισάγοντας ένα νέο διαγνωστικό όρο που ονόμασε «παραμορφωτική χρόνια ενδο-αρτηρίτιδα» και διατύπωσε την υπόθεση ότι αυτές οι αλλαγές οφείλονταν στη φλεγμονή του εσωτερικού τοιχώματος των αρτηριών. Το 1901, ο Γερμανός χημικός Adolf Windaus ανακάλυψε ότι η αορτή ασθενών με αθηροσκλήρωση περιέχει περισσότερη χοληστερόλη σε σύγκριση με τα αντίστοιχα επίπεδα χοληστερόλης υγιών αορτών. Το επιτυχές 70ήμερο πρωτόκολλο πειραματικής αθηρωμάτωσης σε κουνέλια με δίαιτα αποκλειστικά με χοληστερόλη από το Ρώσο παθολόγο Nikolai Anitschkov το 1913, υπογράμμισε το ρόλο της χοληστερόλης στην παθολογία της αθηρωματικής νόσου, η οποία πλέον θεωρείται μια νόσος του μεταβολισμού των λιπιδίων με φλεγμονώδεις και ανοσολογικούς μοριακούς πυλώνες (3-6). Ο Νορβηγός παθολόγος Carl Muller το 1939, αναγνώρισε και ταυτοποίησε την οικογενή υπερχοληστερολαιμία (FH), αποδεικνύοντας τόσο τον αυτοσωμικό υπολειπόμενο χαρακτήρα της νόσου, όσο και το γεγονός ότι συνοδεύεται από την πρώιμη εμφάνιση καρδιαγγειακής νόσου.

1.1.2 Επιδημιολογικές μελέτες και KAN

Εντούτοις πέρασαν αρκετές δεκαετίες έως ότου τα αδιάσειστα στοιχεία επιδημιολογικών μελετών, όπως οι μελέτες Framingham και MRFIT (Multiple Risk Factor Intervention Trial), εδραιώσουν την υπόθεση ότι τα υψηλά επίπεδα της χοληστερόλης στο αίμα συνδέονται με υψηλό καρδιαγγειακό κίνδυνο.

Η «μελέτη των επτά χωρών» στα μέσα του 20^{ου} αιώνα που δημοσιεύτηκε το 1980, έδειξε ότι ο δείκτης θνησιμότητας εξαιτίας καρδιακών νοσημάτων ήταν υψηλότερος σε χώρες όπου τα επίπεδα της χοληστερόλης στο αίμα ήταν υψηλά (Φιλανδία, Νορβηγία, ΗΠΑ), σε σύγκριση με τις χώρες της Νότιας Ευρώπης και την Ιαπωνία, όπου παρατηρούνταν γενικά χαμηλότερες τιμές χοληστερόλης (2). Το 1984, η μελέτη LRC-CPPT (Lipid Research Clinics Coronary Primary Prevention Trial) έδειξε ότι μειώνοντας τη χοληστερόλη του πλάσματος κατά 10% με τη χορήγηση χολεστυραμίνης, ο καρδιαγγειακός κίνδυνος μειώνεται περίπου κατά 20%. Δέκα χρόνια μετά, η μελέτη 4S (Scandinavian Simvastatine Survival Study) έδειξε ότι μειώνοντας τη χοληστερόλη του πλάσματος κατά 25% με τη χορήγηση σιμβαστατίνης, μειώνεται ο κίνδυνος θανάτου από καρδιαγγειακά συμβάματα κατά 42% (4,6). Πλέον είναι καθολικά αποδεκτό, ότι τα υψηλά επίπεδα της χοληστερόλης στο αίμα σχετίζονται με υψηλή πιθανότητα εκδήλωσης αθηρωματικής νόσου.

1.2 Χοληστερόλη και λιποπρωτεΐνες

Η χοληστερόλη είναι μία στερόλη 27 ατόμων άνθρακα και αποτελεί δομικό συστατικό των κυτταρικών μεμβρανών των ευκαριωτικών κυττάρων. Αποτελεί το φράγμα μεταξύ κυττάρων και περιβάλλοντος, διαμορφώνει τη ρευστότητα της κυτταρικής μεμβράνης και συμβάλλει στα αρχιτεκτονικά χαρακτηριστικά των κυττάρων. Επιπρόσθετα, αποτελεί το πρόδρομο μόριο στη βιοσύνθεση όλων των στεροειδών ορμονών, των ορμονών του φύλου, των χολικών οξέων και της βιταμίνης D. Επίσης, έχει κρίσιμο ρόλο στο σχηματισμό των ελύτρων μυελίνης και των συναπτικών κυστιδίων (7).

Η χοληστερόλη στον άνθρωπο, μεταφέρεται στην κυκλοφορία του αίματος μέσα σε λιποπρωτεΐνες, καθόσον είναι αδιάλυτη στο νερό. Οι λιποπρωτεΐνες είναι ετερογενή μεγαλομοριακά σύμπλοκα λιπιδίων και ειδικών πρωτεϊνών, των αποπρωτεϊνών ή απολιποπρωτεϊνών (apo), διαμέτρου 6-1000 nm. Είναι σφαιρικά σωματίδια που περιέχουν ένα

υδρόφοβο πυρήνα από ουδέτερα λίπη (εστέρες χοληστερόλης και τριγλυκερίδια) και η επιφάνειά τους είναι πλούσια σε αμφίφιλες πρωτεΐνες, φωσφολιπίδια και ελεύθερη χοληστερόλη. Η κυριότερη λειτουργία των λιποπρωτεϊνών είναι η μεταφορά στη συστηματική κυκλοφορία και η διανομή στους ιστούς χοληστερόλης, τριγλυκεριδίων, φωσφολιπιδίων και λιποδιαλυτών μορίων (βιταμίνες-φάρμακα) (8). Παράλληλα, οι λιποπρωτεΐνες εμπλέκονται σε μεταβολικές οδούς ανεξάρτητες του μεταβολισμού των λιπιδίων. Χαρακτηριστικά, η φλεγμονή επηρεάζει σημαντικά το μεταβολισμό των λιποπρωτεϊνών, ενώ αρκετές μελέτες τις στοχοποιούν ως κρίσιμους μεσολαβητές ανοσολογικών αντιδράσεων και αμυντικών μηχανισμών (7,8,9).

1.2.1 Απολιποπρωτεΐνες

Οι απολιποπρωτεΐνες ελέγχουν το μεταβολισμό των λιποπρωτεϊνών λειτουργώντας ως γέφυρες που τις συνδέουν με τους κυτταρικούς υποδοχείς. Επιπλέον δρουν ως συμπαράγοντες, ενεργοποιητές ή αναστολείς μεταβολικών ενζύμων, διαμεσολαβούν στη δημιουργία των λιποπρωτεϊνών και αποτελούν απαραίτητα στοιχεία της δομικής σταθερότητάς τους (10). Οι σημαντικότερες απολιποπρωτεΐνες, οι λειτουργίες τους και η σχέση τους με τον καρδιαγγειακό κίνδυνο, απεικονίζονται στον πίνακα 1.

Πίνακας 1. 1. Οι κυριότερες απολιποπρωτεΐνες και οι λειτουργίες τους.

Απολιποπρωτεΐνη	Χρωμόσωμα	M.B. (kDa)	Λιποπρωτεΐνη	Κύριες λειτουργίες	Συσχέτιση με καρδιαγγειακό κίνδυνο
A-I	11	28.3	Χυλομικρά, HDL	Δέχεται χοληστερόλη. Πρόσδεση των HDL στον SR-B1. Συμπαράγοντας της LCAT	NAI
A-II	1	17.3	Χυλομικρά, HDL	Δέχεται χοληστερόλη. Πρόσδεση των HDL στον SR-B1 . Συμπαράγοντας της LCAT. Ρυθμίζει τη δράση των LPL, HL	OXI
A-IV	11	44.0	Χυλομικρά, HDL	Πρόσδεση των HDL στον SR-B1 . Ενεργοποίηση της LCAT. Αυξάνει την	OXI

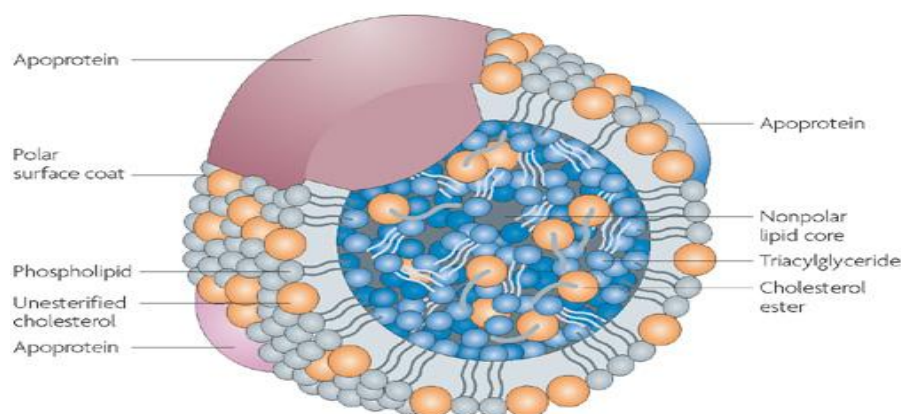
				M.T.P.	
A-V	11	41.0	Χυλομικρά, VLDL, HDL	Ενεργοποίηση της LPL. Συναρμολόγηση χυλομικρών.	OXI
a	6	200.0- 800.0	Lp(a)	Δομικό στοιχείο της Lp(a). Παρεμποδίζει την ινωδόλυση	NAI
B-48	2	241.1	Χυλομικρά, κατάλοιπα χυλομικρών	Συναρμολόγηση και έκκριση των χυλομικρών από το λεπτό έντερο	OXI
B-100	2	513.0	VLDL, LDL, IDL, Lp(a)	Δομικό στοιχείο των VLDL, IDL, LDL και Lp(a). Πρόσδεση των LDL στον LDLR	NAI
C-I	19	7.6	Χυλομικρά, VLDL, LDL IDL,HDL	Ενεργοποίηση της LCAT και της LPL. Αναστολέας της CETP	OXI
C-II	19	8.9	Χυλομικρά, VLDL, LDL IDL,HDL	Ενεργοποίηση της LCAT και της LPL	OXI
Απολιποπρωτεΐνη	Χρωμόσωμα	M.B. (kDa)	Λιποπρωτεΐνη	Κύριες λειτουργίες	Συσχέτιση με καρδιαγγειακό κίνδυνο
C-III	11	8.8	Χυλομικρά, VLDL, LDL IDL,HDL	Αναστολέας της LPL και της HL. Ρυθμιστής πρόσληψης πλούσιων σε TRG λιποπρωτεϊνών από τους LRP.	NAI
D	3	33.0	HDL	Άγνωστη. Βρίσκεται αυξημένη σε κακοήθεις όγκους. Πιθανός νευροπροστατευτικός ρόλος.	OXI
E	19	34.1	Κατάλοιπα χυλομικρών VLDL, LDL	Πρόσδεση σε LRP, LDLR και apoE υποδοχείς.	Φαινότυπος NAI
F ή LTIP	12	29.0	HDL, LDL	Αναστολή της CETP. Διαμεσολαβεί στη μεταφορά χοληστερόλης.	OXI
J ή Clusterin	8	32.4-57.8	HDL	Άγνωστη	ΠΙΘΑΝΗ

* HDL, high-density lipoprotein, VLDL, Very-low-density lipoprotein, LDL, Low-density lipoprotein, IDL, Intermediate-density lipoprotein, SR-B1, Scavenger Receptor class B type 1, LCAT, Lecithin cholesterol acyltransferase, LPL, Lipoprotein lipase, HL, Hepatic lipase, MTP, Microsomal triglyceride transfer protein, CETP, Cholesteryl ester transfer protein, LDLR, Low-Density Lipoprotein Receptor, LRP, Lipoprotein receptor-related protein, TRG, Triglycerides.

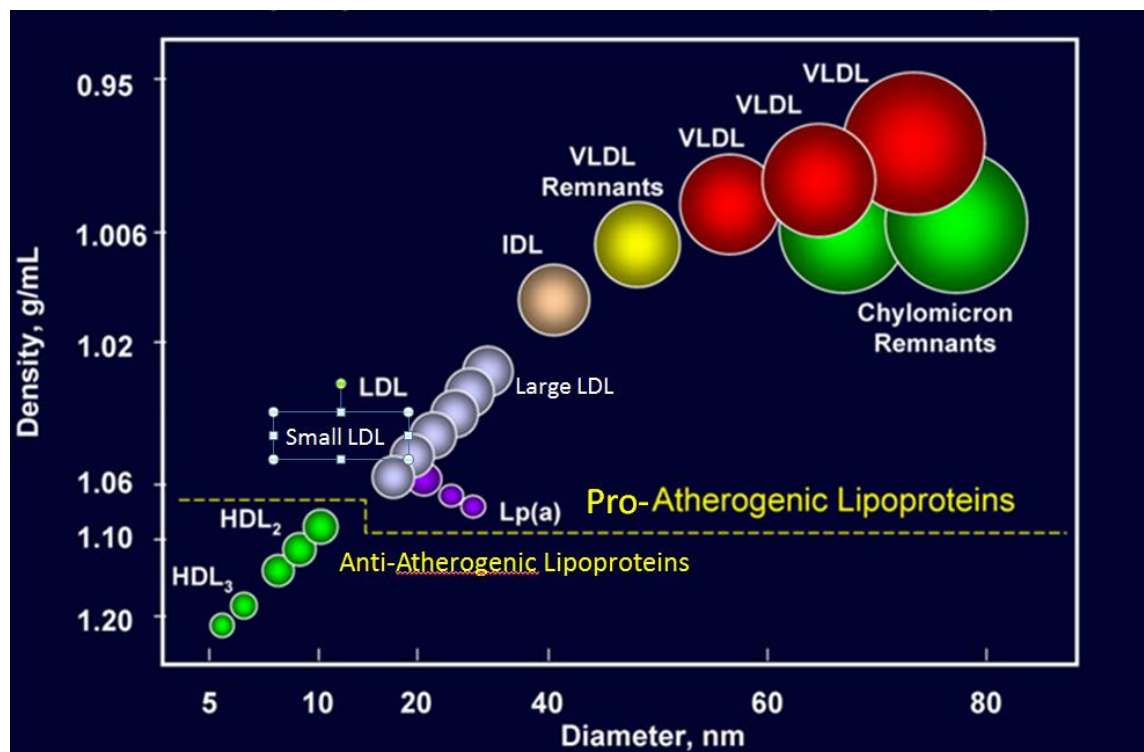
1.2.2 Ταξινόμηση λιποπρωτεϊνών

Οι λιποπρωτεΐνες ταξινομούνται σε επτά κατηγορίες με βάση την πυκνότητά τους, η οποία καθορίζεται κυρίως από το ποσοστό σε τριγλυκερίδια, το ηλεκτρικό φορτίο ή την κύρια απολιποπρωτεΐνη που περιέχουν. Οι κατηγορίες είναι τα χυλομικρά, τα κατάλοιπα των χυλομικρών, οι λιποπρωτεΐνες πολύ χαμηλής πυκνότητας (Very Low Density Lipoproteins – VLDL), οι λιποπρωτεΐνες ενδιάμεσης πυκνότητας (Intermediate Density Lipoproteins – IDL), οι λιποπρωτεΐνες χαμηλής πυκνότητας (Low Density Lipoproteins – LDL), οι λιποπρωτεΐνες υψηλής πυκνότητας (High Density Lipoproteins – HDL) και η λιποπρωτεΐνη (α) [Lipoprotein a – Lp(a)]. Τα κατάλοιπα των χυλομικρών και των VLDL, τα LDL και τα Lp(a) σωματίδια είναι μόρια που ευοδώνουν την αθηρωμάτωση, ενώ τα HDL σωματίδια θεωρούνται αντι-αθηρογόνα (11). Τονίζεται ότι τα λιποπρωτεϊνικά σωματίδια δεν είναι ακέραιες μονάδες, αλλά δυναμικές δομές που μεταβάλλονται διαρκώς, λόγω της συνεχούς ετεροανταλλαγής λιπιδίων.

Εικόνα 1.1 Απεικόνιση μιας λιποπρωτεΐνης.



Εικόνα 1.2. Οι κατηγορίες των λιποπρωτεϊνών.



1.2.3 Χυλομικρά

Τα χυλομικρά είναι τα μεγαλύτερα λιποπρωτεϊνικά σωματίδια (διάμετρος 100 - 400 nm), με τη μικρότερη πυκνότητα και περιέχουν 98% λιπίδια. Συντίθενται στο ενδοπλασματικό δίκτυο των ενδοθηλιακών κυττάρων του τοιχώματος του λεπτού εντέρου και μεταφέρονται στη συστηματική κυκλοφορία μέσω της λέμφου. Η κύρια λειτουργία τους είναι η μεταφορά εξωγενών λιπιδίων και χοληστερόλης στους περιφερικούς ιστούς και στο ήπαρ αντίστοιχα, ενώ θεωρούνται υπεύθυνα και για τη μεταφορά των λιποδιαλυτών βιταμινών. Η κύρια απολιποπρωτεΐνη των χυλομικρών είναι η apoB-48, αλλά περιέχουν και τις απολιποπρωτεΐνες A-I, A-II, A-IV, A-V, C-II, C-III και E. Τα χυλομικρά προσλαμβάνουν τις απολιποπρωτεΐνες C-II και E από τις HDL. Η apoC-II ενεργοποιεί την Λιποπρωτεϊνική Λιπάση, η οποία υδρολύει τα τριγλυκερίδια των λιποπρωτεϊνών στους σκελετικούς μύες και στο λιπώδη ιστό, απελευθερώνοντας λιπαρά οξέα (12).

1.2.4 Κατάλοιπα χυλομικρών

Όταν τα τριγλυκερίδια των χυλομικρών μειωθούν, η apoC-II επιστρέφει στις HDL. Τα νέα σωματίδια καλούνται κατάλοιπα των χυλομικρών και έχουν διάμετρο 30-50 nm. Οι απολιποπρωτεΐνες B-48 και E είναι απαραίτητες για την αναγνώριση των καταλοίπων από τα παρεγχυματικά κύτταρα του ήπατος (13). Εκεί υφίστανται ενδοκύττωση και λυσοσωμική υδρόλυση, απελευθερώνοντας γλυκερόλη και λιπαρά οξέα που είτε χρησιμοποιούνται για την κάλυψη ενεργειακών αναγκών ή αποθηκεύονται.

1.2.5 Πολύ χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνες (VLDL)

Είναι σωματίδια διαμέτρου 40 με 70 nm, αποτελούνται από 45–65% τριγλυκερίδια, 15-20% φωσφολιπίδια και 20-30% χοληστερόλη. Η κύρια απολιποπρωτεΐνη τους είναι η B-100 αλλά περιέχουν και τις απολιποπρωτεΐνες C-I, C-II, C-III και E. Οι VLDL είναι υπεύθυνες για τη μεταφορά των λιποδιαλυτών βιταμινών. Η αρχέγονη VLDL που εκκρίνεται από το ήπαρ δεν έχει apoC-II, αλλά την προσλαμβάνει από τις HDL στη συστηματική κυκλοφορία, όπως και τα χυλομικρά. Η βιογένεση των VLDL λαμβάνει χώρα στον αυλό του ενδοπλασματικού δικτύου και περιλαμβάνει δύο βήματα. Η νεο-μεταφρασμένη apoB-100 μεταναστεύει στη μεμβράνη του αδρού ER και προσλαμβάνει επιπλέον λιπίδια, σχηματίζοντας την αρχέγονη VLDL. Η αρχέγονη VLDL εκκρίνεται από τα ηπατοκύτταρα και έχει πολύ μικρό χρόνο ημιζωής στο αίμα (3-4 ώρες). Αρωγός αυτού του σταδίου είναι η Microsomal Triglyceride Transfer Protein (MTP). Η πρόσληψη λιπιδίων από την apoB εξαρτάται από τη διαθεσιμότητα σε τριγλυκερίδια (TRG). Αν δεν υπάρχουν αρκετά λιπίδια η apoB-100 καταβολίζεται στα πρωτεοσώματα. Βασικό ρόλο στον καταβολισμό των apoB-100 διαδραματίζουν τα επίπεδα των λιπαρών οξέων, η παροχή γλυκόζης και η ινσουλίνη (13). Στο δεύτερο στάδιο της σύνθεσης των VLDL, η αρχέγονη VLDL συγχωνεύεται με πλούσια σε TRG σωματίδια που υπάρχουν στο κυτοσόλιο δημιουργώντας την ώριμη VLDL. Οι

ώριμες VLDL θεωρούνται υπεύθυνες κυρίως για τη μεταφορά TRG στους περιφερικούς ιστούς (8, 11).

1.2.6 IDL

Στην κυκλοφορία, τα TRG των VLDL υδρολύονται με τη δράση της Λιποπρωτεϊνικής Λιπάσης (LPL) και της Ηπατικής Λιπάσης (HL) σε γλυκερόλη και λιπαρά οξέα. Τα λιπαρά οξέα μεταφέρονται στη συστηματική κυκλοφορία συνδεδεμένα με λευκωματίνη και είτε χρησιμοποιούνται από τους ιστούς άμεσα για ενεργειακούς σκοπούς ή αποθηκεύονται στο λιπώδη ιστό. Έτσι το μέγεθος και η πυκνότητα των VLDL μειώνεται οπότε προκύπτουν τα κατάλοιπα των VLDL, τα οποία καλούνται IDL και είναι πλούσια σε χοληστερόλη. Τα σωματίδια αυτά έχουν διάμετρο 25–35 nm, περιέχουν apoB-100 και apoE και ευοδώνουν τη διαδικασία της αθηρωμάτωσης. Ένα μέρος των IDL προσλαμβάνεται άμεσα από τα ηπατοκύτταρα μέσω των apoE υποδοχέων, ενώ οι υπόλοιπες υφίστανται την δράση της ηπατικής λιπάσης και μετατρέπονται σε LDL (14).

1.2.7 LDL

Οι χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνες έχουν διάμετρο 22.5-27.5 nm. Οι LDL προέρχονται από τις VLDL και τις IDL και είναι πλούσιες σε χοληστερόλη (περίπου 70% του λιπιδικού τους περιεχομένου). Ο κύριος ρόλος τους είναι η μεταφορά χοληστερόλης στα κύτταρα, η σύνθεση στεροειδών ορμονών καθώς και των ορμονών του φύλου. Η κύρια απολιποπρωτεΐνη των LDL είναι η apoB-100, ενώ σε μικρότερο βαθμό απαντώνται επίσης οι apoC-I, apoC-II και apoC-III. Τα LDL σωματίδια μεταβολίζονται μέσω των LDL υποδοχέων (LDLR) σε ποσοστό 75% στα ηπατοκύτταρα και 25% σε εξωηπατικούς ιστούς.

Ο αριθμός και η δραστηριότητα των LDLR εξαρτώνται από τα επίπεδα της ελεύθερης χοληστερόλης στα ηπατοκύτταρα με αντιστρόφως ανάλογη συσχέτιση. Δηλαδή, υψηλά επίπεδα χοληστερόλης έχουν ως αποτέλεσμα τη μειωμένη έκφραση των LDLR, ενώ χαμηλά επίπεδα χοληστερόλης αυξάνουν τη σύνθεση των LDLR. Γενετικοί και περιβαλλοντικοί παράγοντες επίσης επηρεάζουν τη δραστηριότητα των LDLR (8, 13, 14).

1.2.7.1 Οξείδωση των LDL

Οι μικρές πυκνές LDL (sdLDL) θεωρούνται πιο αθηρογόνες από τα μεγαλύτερα LDL σωματίδια επειδή έχουν μειωμένη συγγένεια για τους LDLR και παραμένουν για περισσότερο χρόνο στην κυκλοφορία. Αποτελούν εξαιρετικά αθηρογόνα μόρια γιατί λόγω του μικρού μεγέθους τους εισέρχονται και συσσωρεύονται στον υπενδοθηλιακό χώρο, όπου υφίστανται οξειδωτική τροποποίηση (oxidized LDL, oxLDL). Αυξάνουν την έκφραση φλεγμονωδών κυτταροκινών, προκαλώντας τη μετανάστευση μακροφάγων στο αγγειακό τοίχωμα με αποτέλεσμα τη δυσλειτουργία του αγγειακού ενδοθηλίου. Σημαντική συμβολή στη δυσλειτουργία του αγγειακού ενδοθηλίου διαδραματίζει η δημιουργία ελευθέρων ριζών, η μείωση της έκφρασης και της δραστηριότητας του μονοξειδίου του αζώτου (NO), η αύξηση της σύνθεσης ενδοθηλίνης, καθώς επίσης και η μείωση του πολλαπλασιασμού, της μετανάστευσης και της επιβίωσης των πρόδρομων ενδοθηλιακών κυττάρων (EPC). Επιπλέον, οι oxLDL προκαλούν αύξηση της υψηλής ευαισθησίας C αντιδρώσας πρωτεΐνης (hsCRP), του MCP-1 (Monocyte Chemoattractant Protein 1), του CD40 (Cluster of differentiation 40) των μακροφάγων και των ενδοθηλιακών κυττάρων, των CR3 (Complement receptor 3) υποδοχέων και των προσκολλητικών μορίων VCAM-1 (Vascular cell adhesion protein 1), ICAM-1 (Intercellular Adhesion Molecule 1) και της E-Selectin. Επίσης, η oxLDL αυξάνει την παραγωγή των μεταλλοπρωτεϊνών που παράγονται από τα μακροφάγα προκαλώντας την αποσταθεροποίηση των αθηρωματικών πλακών και την αύξηση της μετανάστευσης και του πολλαπλασιασμού των λείων μυϊκών κυττάρων. Η oxLDL διαταράσσει την ομοιοστασία του ασβεστίου και προκαλεί αυξημένη παραγωγή αλκαλικής φωσφατάσης και μειωμένη έκφραση οστεοπροτεγερίνης (33). Η οστεοπροτεγερίνη (OPG) είναι μια διαλυτή πρωτεΐνη που παράγεται από τους

οστεοβλάστες καθώς και από τα ενδοθηλιακά και λεία μυϊκά κύτταρα των αγγείων. Έχει αντιστεοκλαστική δράση ως διαλυτός παραπλανητικός (decoy) υποδοχέας του ενεργοποιητή των οστεοκλαστών RANKL (receptor activator of nuclear factor- κ B ligand). Ταυτόχρονα φαίνεται ότι διαδραματίζει σημαντικό ρυθμιστικό ρόλο στην αγγειακή επασβέστωση. Αξίζει να σημειωθεί ότι η OPG, ως έμμεσος αναστολέας των οστεοκλαστών, ασκεί προστατευτική δράση ενάντια στην αγγειακή επασβέστωση (65). Τέλος, η oxLDL προκαλεί αύξηση της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων, αύξηση της έκφρασης του Αναστολέα του Ενεργοποιητή του Πλασμινογόνου, της θρομβοξάνης A_2 και του Ιστικού Παράγοντα, καθώς επίσης και μείωση της έκφρασης του Ενεργοποιητή του Πλασμινογόνου και της δραστηριότητας της Θρομβομοντουλίνης, δημιουργώντας ένα υπερπηκτικό περιβάλλον και συνεπώς αυξημένο κίνδυνο θρόμβωσης (15, 16, 17).

Επιπλέον, η oxLDL προάγει την έκφραση προσκολλητικών μορίων και την απελευθέρωση χημειοτακτικών παραγόντων από τα ενδοθηλιακά κύτταρα που με τη σειρά τους προάγουν την προσέλευση λευκοκυττάρων στις αθηρωματικές πλάκες. Η έκθεση στην oxLDL ενεργοποιεί τα δενδριτικά κύτταρα που προκαλούν τον πολλαπλασιασμό των T κυττάρων και την παραγωγή της Ιντερλευκίνης 1 (IL1). Η oxLDL δρα επίσης ως νεοαντιγόνο και προκαλεί αυξημένη παραγωγή αντισωμάτων από τα λεμφοκύτταρα και προάγει τη χημειοταξία των μονοκυττάρων, των ουδετερόφιλων, των ηωσινόφιλων και των T-κυττάρων στο αρτηριακό τοίχωμα (2). Τα ενεργοποιημένα μακροφάγα εκκρίνουν πληθώρα φλεγμονωδών κυτταροκινών (όπως τις ιντερλευκίνες 1 β , 6 και 8) και τον παράγοντα νέκρωσης όγκων α (TNF α) (18). Επιπρόσθετα, η oxLDL επάγει την απόπτωση των μακροφάγων και τη δημιουργία ασταθών αθηρωματικών πλακών.

Η σημαντικότερη αθηρογόνος δράση της οξειδωτικής τροποποίησης των LDL σωματιδίων έγκειται στην αναγνώριση τους από τους Scavenger υποδοχείς αντί των LDLR. Με τη διαδικασία αυτή διαταράσσεται η ομοιόσταση της χοληστερόλης και παρά το γεγονός ότι μεγάλες ποσότητες χοληστερόλης συσσωρεύονται στα περιφερικά κύτταρα, δεν αναστέλλεται επαρκώς η σύνθεση της. Τελικό αποτέλεσμα αυτής της διαταραχής είναι η πρόσληψη μεγάλων ποσοτήτων χοληστερόλης από τα μακροφάγα που

εκφράζουν τους Scavenger υποδοχείς και η δημιουργία αφρωδών κυττάρων στις αθηροσκληρωτικές περιοχές (2).

1.2.8 HDL

Οι λιποπρωτεΐνες υψηλής πυκνότητας έχουν διάμετρο από 7.5-10 nm. Παράγονται στο ήπαρ και το έντερο ή προέρχονται από τον καταβολισμό των πλούσιων σε TRG λιποπρωτεϊνών. Διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στο μηχανισμό της ανάστροφης μεταφοράς χοληστερόλης από τους περιφερικούς ιστούς στο ήπαρ. Η κύρια απολιποπρωτεΐνη των HDL είναι η A-I αλλά επίσης απαντώνται η apoA-II, η apoA-IV, η apoC-I, η apoC-II, η apoC-III και η apoE. Σε αντίθεση με τις άλλες λιποπρωτεΐνες που περιέχουν ένα μόριο από την κύρια απολιποπρωτεΐνη, οι HDL δύνανται να περιέχουν πολλά apoA-I μόρια.

Η μετακίνηση της χοληστερόλης από τα κύτταρα στις αρχέγονες HDL γίνεται κυρίως δια μέσου των ABCA1 (ATP-binding cassette transporter) μεταφορέων που εκφράζονται στην επιφάνεια των κυττάρων. Ακολουθεί εστεροποίηση της ελεύθερης χοληστερόλης με τη δράση του ενζύμου ακυλοτρανσφεράση της χοληστερόλης (LCAT) και η μεταφορά των εστέρων χοληστερόλης με τη βοήθεια του ενζύμου Cholesterol Ester Transfer Protein (CETP) σε άλλες πλούσιες σε TRG λιποπρωτεΐνες. Μέσω αυτής της οδού η εστεροποιημένη χοληστερόλη είτε καταλήγει στα ηπατοκύτταρα ή στους περιφερικούς ιστούς. Οι υποδοχείς SR-B1 (Scavenger Receptor class B type I) διαδραματίζουν καθοριστικό ρόλο στην άμεση μεταφορά εστέρων χοληστερόλης από τις HDL στα ηπατοκύτταρα (13).

Η HDL θεωρείται αθηροπροστατευτική γιατί επιτελεί ανάστροφη μεταφορά χοληστερόλης, αγγειοδιαστολή, κυτταροπροστασία των ενδοθηλιακών κυττάρων και μακροφάγων, ενώ επίσης έχει αντιοξειδωτικές, αντιφλεγμονώδεις και αντιαιμοπεταλιακές δράσεις. Επιπρόσθετα, προσφέρει προστασία από λοιμώξεις και έχει ευνοϊκή επίδραση στην ομοιοστασία των υδατανθράκων (19).

1.3 Lp(a)

Η λιποπρωτεΐνη α [Lp(a)], αποτελεί μια ξεχωριστή λιποπρωτεΐνη μιας και συνδέει το μεταβολισμό των λιπιδίων με το σύστημα πήξης του αίματος (20). Αποτελείται από ένα σωματίδιο LDL με μία επιπλέον απολιποπρωτεΐνη την apo(a), η οποία είναι μια μεγάλη υδρόφιλη γλυκοπρωτεΐνη που συνδέεται ομοιοπολικά με την apoB-100 με δισουλφιδικό δεσμό. Το γονίδιο της apo(a) (LPA gene) έχει χαρτογραφηθεί στη ζώνη q27 του έκτου ανθρώπινου χρωμοσώματος και παρουσιάζει μεγάλο βαθμό ομοιότητας με το γονίδιο του πλασμινογόνου (16). Η παρουσία της Lp(a) στους ανθρώπους και τους πιθήκους υποδηλώνει ότι το γονίδιο του πλασμινογόνου υπέστη διπλασιασμό και ανακατανομή των περιοχών Kringle περίπου πριν από 33 εκατομμύρια χρόνια (21).

Το μέγεθος της Lp(a) εμφανίζει μεγάλη ετερογένεια γιατί υπάρχουν πολλές ισομορφές της apo(a) ώστε το μοριακό βάρος της πρωτεΐνης να κυμαίνεται από 200 έως 800 kDa. Πληθυσμιακές μελέτες κατέγραψαν μεγάλες διακυμάνσεις των επιπέδων Lp(a) στο πλάσμα, με σαφή εθνολογική κατανομή, από 0.1 έως και 300 mg/dL. Η καυκάσια φυλή δεν ακολουθεί τον κανόνα της κανονικής κατανομής (22), ενώ η μαύρη φυλή ακολουθεί σχεδόν κανονική κατανομή με μέση τιμή συγκεντρώσεων Lp(a) δύο με τρεις φορές μεγαλύτερη της μέσης τιμής στην λευκή φυλή.

1.3.1 Βιοχημεία της apo(a)

Οι περιοχές Kringle είναι δομές 80 - 90 αμινοξέων (aminoacids, a.a.) με τρεις βρόγχους χωρίς ελικοειδή δευτεροταγή δομή με μικρές περιοχές β-κλώνων που σταθεροποιούνται σε τριτοταγή δομή από την παρουσία τριών δισουλφιδικών δεσμών (23, 24). Τα Kringles απαντώνται σε πολλές πρωτεάσες που συμμετέχουν στο μηχανισμό πήξης και ινωδόλυσης αλλά και σε

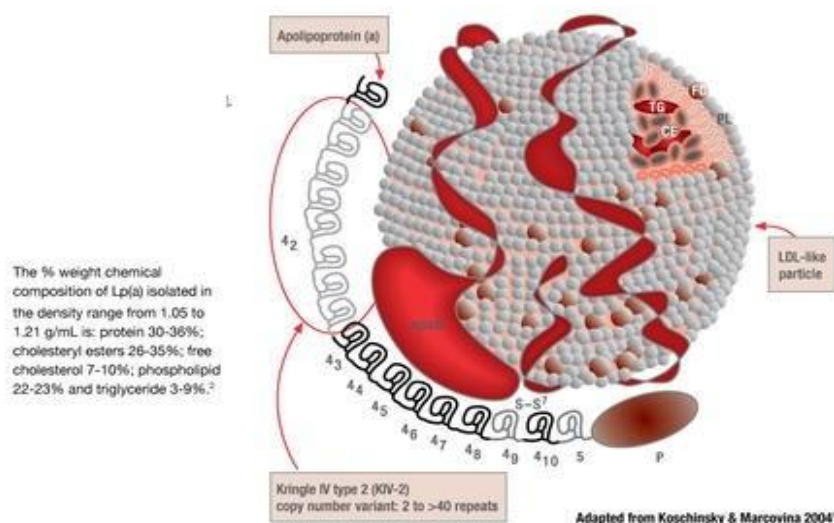
αυξητικούς παράγοντες. Η αρo(a) έχει δέκα διαφορετικούς τύπους Kringle που μοιάζουν με τα Kringle τύπου IV του πλασμινογόνου, KIV1 έως KIV10. Οι περιοχές KIV1 και KIV3 έως KIV10 είναι ίδιες σε όλες τις ισομορφές αρo(a).

Η αρo(a) περιέχει μία ακόμη περιοχή Kringle που εμφανίζει μεγάλο βαθμό ομολογίας με την περιοχή Kringle τύπου V του πλασμινογόνου και είναι ίδια σε όλες τις ισομορφές αρo(a), καθώς επίσης και μία περιοχή πρωτεάσης που είναι καταλυτικώς ανενεργή εξαιτίας είτε, της αντικατάστασης της ARG561-VAL562 (Arg-Αργινίνη, Val-Βαλίνη) σε SER561-ILE562 (Ser-Σερίνη, Ile-Ισολευκίνη), ή στην έλλειψη εννέα αμινοξέων που παρατηρείται στην περιοχή της πρωτεάσης της αρo(a) σε σχέση με την αντίστοιχη περιοχή του πλασμινογόνου. Αυτές οι μεταλλάξεις δεν επιτρέπουν στους ενεργοποιητές του πλασμινογόνου (t-PA και u-PA) να μετατρέψουν το πλασμινογόνο σε πλασμίνη (25, 26, 27).

Από τους δέκα τύπους KIV που απαντώνται στην αρo(a) οι εννέα είναι παρόντες σε ένα μόνο αντίγραφο σε όλες τις ισομορφές της αρo(a), ενώ η KIV2 κωδικοποιείται από μεταβλητό αριθμό εν σειρά επαναλαμβανόμενων αντιγράφων δημιουργώντας πληθώρα αλληλίων LPA διαφορετικού μεγέθους και ισομορφών αρo(a) στον ανθρώπινο πληθυσμό. Υπάρχουν αλληλία που κωδικοποιούν από ένα ως 34 αντίγραφα KIV2 ώστε να υπάρχουν ισομορφές αρo(a) που περιέχουν από 10 ως 43 περιοχές KIV2, με μάζα από 200 ως 800 kDa (26, 28). Η συγκέντρωση της Lp(a) στο πλάσμα είναι αντιστρόφως ανάλογη με το μέγεθος της ισομορφής της αρo(a) (29).

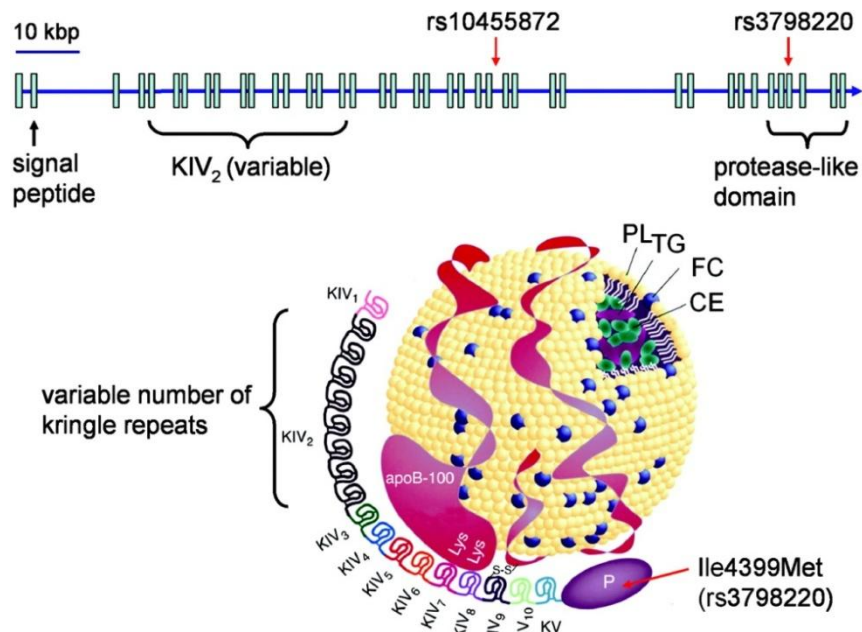
Ο βιολογικός ρόλος των περιοχών Kringle είναι οι αλληλεπιδράσεις πρόσδεσης συνήθως με υποστρώματα που περιέχουν λυσίνη (Lys) και για το λόγο αυτό ονομάζονται σημεία πρόσδεσης λυσίνης (Lysine Binding Sites, LBS). Από τα Kringle τύπου IV της αρo(a) μόνο τα KIV5-KIV8 και KIV10 περιέχουν LBS. Όλοι οι υπόλοιποι KIV τύποι έχουν ανενεργά LBS λόγω αμινοξικών αντικαταστάσεων. Τα LBS των KIV5-8 έχει αποδειχθεί ότι έχουν χαμηλότερη συγγένεια για τη λυσίνη απ' ότι το KIV10 και ονομάζονται ασθενή και ισχυρά LBS, αντίστοιχα. Η αλληλεπίδραση της αρoB-100 με την αρo(a), στο Lp(a) σωματίδιο, καθιστά τα LBS KIV5-8 μη διαθέσιμα με αποτέλεσμα η πρόσδεση λυσίνης στην Lp(a) να επιτελείται αποκλειστικά από το KIV10 (26, 28).

Εικόνα 1.3. Απεικόνιση της δομής της Lp(a)



Η συγκέντρωση της Lp(a) στο πλάσμα είναι αντιστρόφως ανάλογη με τον αριθμό των KIV2 επαναλήψεων και παρουσιάζει θετική συσχέτιση με τους μονονουκλεοτιδικούς πολυμορφισμούς (Single Nucleotide Polymorphisms, SNPs) rs10455872 και rs3788220.

Εικόνα 1.4. Οι μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί στην Lp(a)



1.3.2 Σύνθεση της Lp(a)

Η σύνθεση του σωματιδίου Lp(a) περιλαμβάνει δύο στάδια. Πρώτα ορισμένες περιοχές της apoB αλληλεπιδρούν με την apo(a) μη ομοιοπολικά ώστε να πλησιάσουν τα δύο μόρια. Το δεύτερο στάδιο περιλαμβάνει το σχηματισμό ενός δισουλφιδικού δεσμού μεταξύ της Cys4057 (Cys-Κυστεΐνη) στο KIV9 της apo(a) και της Cys4326 της apoB. Συγχρόνως, οι μη-ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις των LBS των KIV7 και KIV8 της apo(a) με τις Lys680 (Lys, Λυσίνη) και Lys690 της apoB, συμβάλλουν στην σταθεροποίηση του σωματιδίου. Η τοποθεσία της σύνθεσης της Lp(a) αποτελεί αντικείμενο αμφιλεγόμενων συζητήσεων. Έχει παρατηρηθεί να συντίθεται Lp(a) και ενδοκυττάρια και εξωκυττάρια αλλά και στην κυτταρική μεμβράνη, σε διαφορετικά κυτταρικά συστήματα (30).

1.3.3 Lp(a) και KAN

Η Lp(a) είναι μια αινιγματική πρωτεΐνη και ανεξάρτητος παράγοντας καρδιαγγειακού κινδύνου. Η μελέτη της Κοπεγχάγης έδειξε ότι άτομα με επίπεδα Lp(a) μεγαλύτερα από 50 mg/dL έχουν διπλάσιο με τριπλάσιο κίνδυνο να υποστούν έμφραγμα του μυοκαρδίου. Μία ανάλυση 36 μελετών έδειξε ότι άτομα με αυξημένη Lp(a) διατρέχουν μεγαλύτερο καρδιαγγειακό κίνδυνο. Η επίδραση της συγκέντρωσης της Lp(a) στον κίνδυνο εμφάνισης ισχαιμικού εγκεφαλικού επεισοδίου ήταν ασθενέστερη αλλά εξίσου σημαντική. Αξίζει να σημειωθεί ότι ο καρδιαγγειακός κίνδυνος δεν μειώθηκε μετά από διόρθωση των επιπέδων των άλλων λιπιδικών παραμέτρων, ένα εύρημα που υποδηλώνει ότι η Lp(a) αποτελεί ανεξάρτητο παράγοντα καρδιαγγειακού κινδύνου. Επιπρόσθετα, επίπεδα Lp(a) πάνω από 90 mg/dL τριπλασιάζουν τον κίνδυνο στένωσης της αορτικής βαλβίδας (31). Μελέτες μενδέλειας τυχαιοποίησης υποδεικνύουν ότι η Lp(a) αποτελεί ανεξάρτητο παράγοντα κινδύνου για έμφραγμα του μυοκαρδίου, αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο, περιφερική αρτηριοπάθεια (peripheral arterial disease – PAD) καθώς και για ασβέστωση της αορτικής βαλβίδας. Δεν έχουν πραγματοποιηθεί κλινικές μελέτες που να συσχετίζουν τη μείωση των επιπέδων Lp(a) με τη μείωση των συμβαμάτων της KAN, επειδή δεν υπάρχουν φάρμακα που να μειώνουν μόνο την Lp(a) χωρίς να επηρεάζουν τους υπόλοιπους λιπιδαιμικούς δείκτες (24). Περιβαλλοντικοί και διαιτητικοί παράγοντες έχουν ελάχιστη επίδραση στα επίπεδα της Lp(a) πλάσματος, ενώ δεν έχει ανακαλυφθεί ακόμη η φυσιολογική λειτουργία αυτής της λιποπρωτεΐνης.

1.3.4 Αθηροσκλήρωση και Lp(a): οξειδωμένα φωσφολιπίδια

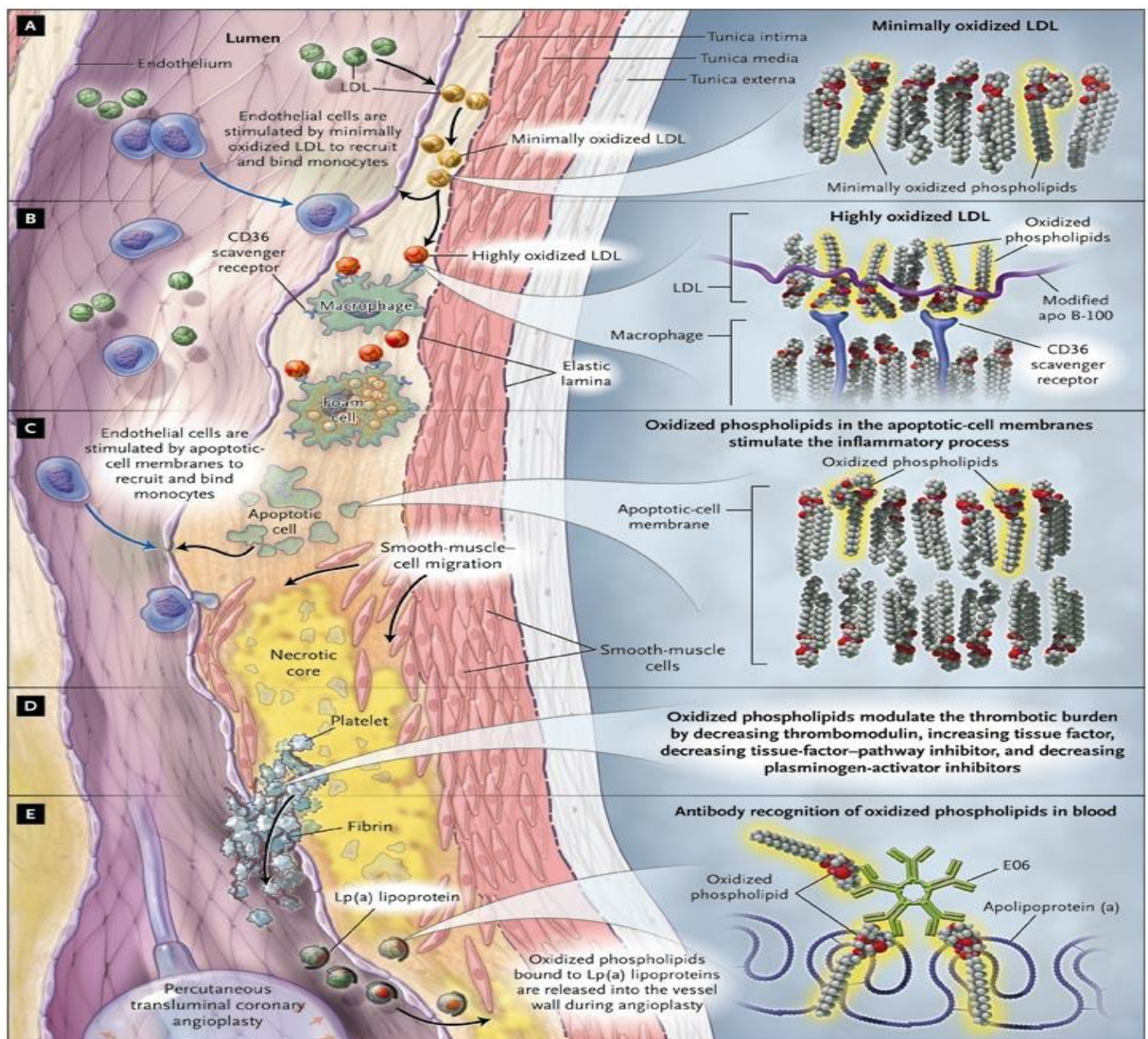
Η αθηροσκλήρωση είναι μια προοδευτική φλεγμονώδης νόσος με τελικό αποτέλεσμα τη συσσώρευση λιπιδίων και ινωδών στοιχείων στις αρτηρίες. Η υπενδοθηλιακή κατακράτηση της Lp(a) η οποία θεωρείται παράγοντας που ευοδώνει την αθηρωμάτωση με επιπρόσθετη αντι-

ινοδωλυτική δράση, έχει εξαιρετικά δυσμενείς συνέπειες στην αγγειακή λειτουργία (32). Η αρο(a) συμβάλλει στην αθηρογόνο δράση της Lp(a) μέσω της ιδιότητάς της να δεσμεύει οξειδωμένα φωσφολιπίδια (Oxidized Phospholipids, OxPL). Το 85% των OxPL στον άνθρωπο που συνδέονται με τις λιποπρωτεΐνες του πλάσματος ευρίσκονται στην Lp(a), ενώ το υπόλοιπο ποσοστό κυκλοφορεί δεσμευμένο στις λιποπρωτεΐνες που περιέχουν αρο-B και στα HDL σωματίδια. Θεωρείται ότι τα OxPLs δεσμεύονται στην αρο(a) τόσο με ομοιοπολικές όσο και με μη-ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις (33).

Τα OxPL ευοδώνουν τη φλεγμονή, προκαλούν αθηροθρόμβωση και βρίσκονται σε αφθονία στις ασταθείς αθηρωματικές πλάκες (34). Στο πλάσμα, τα OxPLs μεταφέρονται ως επί το πλείστον με την Lp(a). Μελέτες έδειξαν ότι τα αυξημένα επίπεδα OxPL στις αροB (OxPL/αροB) αποτελούν προγνωστικό δείκτη θανάτου, εμφράγματος του μυοκαρδίου και αγγειακού εγκεφαλικού επεισοδίου (35). Ο πολυμορφισμός SNP rs3798220, που προκαλεί την αντικατάσταση Ile (Ισολευκίνη) από Met (Μεθειονίνη) στη θέση 4399 στην περιοχή της πρωτεάσης αλλά και ο πολυμορφισμός SNP rs10455872 στο ιντρόνιο 25, συσχετίζονται με υψηλά επίπεδα OxPL στην αρο(a), ενώ άτομα με αυτές τις μεταλλάξεις ευνοούνται σε μεγαλύτερο βαθμό από τη χορήγηση ασπιρίνης όσον αφορά την πρόληψη της στεφανιαίας νόσου (26). Μεταλλάξεις στην περιοχή KIV10 της αρο(a) όπου ευρίσκεται το ισχυρό Lysine Binding Site (LBS), αφαιρούν από την Lp(a) την ικανότητα να δεσμεύει OxPLs, αλλά ο ακριβής μηχανισμός αυτής της διαδικασίας παραμένει άγνωστος (32). Τα OxPLs ενεργοποιούν ένα μεγάλο αριθμό μορίων που εμπλέκονται στη διαδικασία της αθηροσκλήρωσης, όπως οι μεταγραφικοί παράγοντες Peroxisome Proliferator Activator Receptor γ (PPAR- γ) και ο ηπατικός X υποδοχέας α (LXR- α). Ο PPAR- γ και ο LXR- α αυξάνουν την έκφραση των Scavenger υποδοχέων των μακροφάγων επομένως προάγουν τη δημιουργία αφρωδών κυττάρων στα τοιχώματα των αγγείων και επίσης αυξάνουν την ικανότητα της πρωτεΐνης ATP binding cassette 1 (ABCA1) να δέχεται χοληστερόλη (36).

Εικόνα 1.5. Ένα μοντέλο των ρόλων των οξειδωμένων φωσφολιπιδίων στην εμφάνιση της αθηροσκλήρωσης.

Η χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνη (LDL) κατακρατείται στον υπενδοθηλιακό χώρο και οξειδώνεται (Πίνακας Α). Ακολουθεί η μετανάστευση των φλεγμονώδων κυττάρων στο τοίχωμα του αγγείου, που προσλαμβάνουν την οξειδωμένη LDL ή την Lp(a) μέσω εκκαθαριστών υποδοχέων και μετατρέπονται σε αφρώδη κύτταρα (Πίνακας Β). Τα αποπτωτικά κύτταρα προκαλούν τη μετανάστευση φλεγμονώδων κυττάρων εντός του αγγειακού τοιχώματος (Πίνακας C). Τα οξειδωμένα φωσφολιπίδια ευοδώνουν τη θρομβωτική διαδικασία μέσω της μείωσης της έκφρασης της Θρομβομοντουλίνης, του Αναστολέα του Ιστικού Παράγοντα (TFPI) και του Αναστολέα του Ενεργοποιητή του Πλασμινογόνου (PAI), καθώς επίσης και μέσω της αύξησης της έκφρασης του Ιστικού Παράγοντα (Πίνακας Δ). Η τροποποιημένη Lp(a), που συσσωρεύεται στις αθηρωματικές βλάβες, ανιχνεύεται σε υψηλότερα επίπεδα στο αίμα μετά από αγγειοπλαστική με τη χρήση του Ε06, ενός αντισώματος που αναγνωρίζει τα οξειδωμένα φωσφολιπίδια (Πίνακας Ε).



(Πηγή: N Engl J Med. 2005;353:9)

1.3.5 Αθηροσκλήρωση και Lp(a): Λιποπρωτεϊνική φωσφολιπάση A₂ (LpPLA₂)

Η Lp(a) οξειδώνεται όπως και η LDL και από την υδρόλυση των οξειδωμένων φωσφολιπιδίων της παράγεται λυσοφωσφατιδυλοχολίνη (lyso-phosphatidylcholine, lysoP-C), μια αντίδραση που καταλύεται από το ενδογενές ένζυμο λιποπρωτεϊνική φωσφολιπάση A₂ (Lipoprotein phospholipase A₂ - LpPLA₂), με ταυτόχρονη απελευθέρωση οξειδωμένων λιπαρών οξέων (35). Η lyso P-C διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη δημιουργία της αθηρωματικής πλάκας και θεωρείται φωσφολιπίδιο που ευοδώνει την αθηρωμάτωση.

Η πρόσδεση των OxPL στην Lp(a) πιθανά αποτελεί ενδογενή φυσική ανοσολογική αντίδραση απομάκρυνσής τους από διερρηγμένες πλάκες ή αποπτωτικές περιοχές, μια διαδικασία που ευνοεί τον καταβολισμό τους από την LpPLA₂ (37).

Η LpPLA₂ είναι μια πρωτεΐνη 45 kDa και φέρει τη χαρακτηριστική πενταμινοξική αλληλουχία (Gly-His-Ser-Phe-Gly) στο καταλυτικό της κέντρο, που απαντάται στις σερίνο-εστεράσες και στις λιπάσες. Η LpPLA₂ εκφράζεται στους νεκρωτικούς πυρήνες των αθηρωματικών πλακών, ειδικά στις ασταθείς ή διερρηγμένες πλάκες και πιθανά διαδραματίζει κάποιο ρόλο στις φλεγμονώδεις και στις αποπτωτικές διαδικασίες (38,39). Κυκλοφορεί στο αίμα κυρίως δεσμευμένη στα LDL σωματίδια (περίπου 70 με 80%), αλλά δεσμεύεται επίσης στις HDL, στις VLDL, στις IDL και στην Lp(a). Η LpPLA₂ που μεταφέρεται από την Lp(a) έχει περίπου διπλάσια μάζα και επταπλάσια ενεργότητα σε σύγκριση με την LpPLA₂ που μεταφέρεται με τις LDL.

Η μελέτη Progressa έδειξε ότι τα υψηλά επίπεδα της LpPLA₂ συσχετίζονται με αυξημένο ρυθμό στένωσης της αορτικής βαλβίδας στα αρχικά στάδια της νόσου. Η LpPLA₂ προάγει την έκτοπη μετάλλωση (mineralization) της αορτικής βαλβίδας πιθανά μέσω της απόπτωσης και της οστεογόνου διαφοροποίησης (osteogenic transition) των κυττάρων (40).

Στη μελέτη Stability, το φάρμακο darapladib που είναι αναστολέας της LpPLA₂, απέτυχε να μειώσει τον κίνδυνο θανάτου, εμφράγματος του μυοκαρδίου ή εγκεφαλικού επεισοδίου, σε ασθενείς με σταθερή στεφανιαία νόσο. Ομοίως, στη μελέτη SOLID –TIMI 52, το darapladib απέτυχε να μειώσει τον κίνδυνο σοβαρών καρδιαγγειακών συμβαμάτων σε ασθενείς με πρόσφατο οξύ στεφανιαίο σύνδρομο. Στη μελέτη VISTA-16, το varespladib (άλλος αναστολέας της LpPLA₂) αύξησε τον κίνδυνο εμφράγματος του μυοκαρδίου σε ασθενείς με οξύ στεφανιαίο σύνδρομο, συμβάλλοντας στον πρόωρο τερματισμό της μελέτης. Η αποτυχία αυτών των αναστολέων να βελτιώσουν τα καρδιαγγειακά επεισόδια αντανακλά τα γνωσιολογικά κενά σχετικά με τη δράση της παθοβιολογίας της LpPLA₂ (41). Αποτελέσματα μετα-αναλύσεων 32 μελετών με 79.036 συμμετέχοντες έδειξαν ότι η μάζα και η ενεργότητα της LpPLA₂ αποτελούν καρδιαγγειακούς προγνωστικούς δείκτες (35, 38).

1.3.6 Lp(a), ένας θρομβωτικός, αντι-ινωδολυτικός και φλεγμονώδης παράγοντας κινδύνου

Άλλοι μηχανισμοί με τους οποίους η Lp(a) συμβάλλει στην αθηρογένεση και στην εμφάνιση ΚΑΝ είναι είτε μέσω της δημιουργίας ενός θρομβωτικού περιβάλλοντος με την πρόσδεσή της στον TFPI (Tissue Factor Pathway Inhibitor) ή μέσω της αλληλεπίδρασης της apo(a) με τους υποδοχείς του πλασμινογόνου με αποτέλεσμα τη μειωμένη παραγωγή πλασμίνης (42).

Πρόσφατα πειραματικά δεδομένα αποδεικνύουν ότι η Lp(a) συμβάλλει στη δυσλειτουργία του ενδοθηλίου μέσω μιας διαδικασίας μετασχηματισμού του κυτταροσκελετού, η οποία οφείλεται στην αλληλεπίδραση της Lp(a) με την ακτίνη και τη μυοσίνη. Επιπλέον, η Lp(a) προκαλεί αναστολή της έκφρασης της συνθάσης του μονοξειδίου του αζώτου (eNOs). Επίσης, η Lp(a) προκαλεί αύξηση της διαπερατότητας του ενδοθηλίου που έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της εναπόθεσης σωματιδίων LDL και Lp(a) στο αρτηριακό τοίχωμα (32, 33). Αξίζει να σημειωθεί ότι η Lp(a) συμβάλλει στη δυσλειτουργία του ενδοθηλίου και μέσω της απορρύθμισης των ελαφρών

αλυσίδων της μυοσίνης μέσω του Rho/Rho kinase μονοπατιού σηματοδότησης ή ακόμα και με τη διαταραχή της ομοιοστασίας του ασβεστίου που έχει ως αποτέλεσμα αυξημένη παραγωγή αλκαλικής φωσφατάσης και της πρωτεΐνης Matrix gla protein (MGP) και μειωμένη έκφραση οστεοποντίνης (33,42,66). Το δυσλειτουργικό ενδοθήλιο έχει ως αποτέλεσμα αυξημένη παραγωγή ελευθέρων ριζών που με τη σειρά τους συμβάλλουν στην οξειδωτική τροποποίηση των λιποπρωτεϊνών.

Τα φλεγμονώδη μόρια διαδραματίζουν καθοριστικό ρόλο στη δημιουργία και στην αύξηση των αθηροσκληρωτικών περιοχών. Όταν το αγγειακό τοίχωμα υποστεί βλάβη, τα ενδοθηλιακά κύτταρα εκκρίνουν χημειοτακτικές ουσίες που προκαλούν τη μετανάστευση μονοκυττάρων και τη διαφοροποίηση τους σε μακροφάγα. Τα ενεργοποιημένα μακροφάγα εκκρίνουν τις κυτταροκίνες IL-1β, IL-6, IL-8 και TNFα που είναι κατεξοχήν φλεγμονώδη μόρια μιας και συμβάλλουν στην επιτάχυνση της αθηρωματικής βλάβης και στην ασβεστοποίηση των στεφανιαίων αγγείων και της αορτικής βαλβίδας (13). Πειραματικά μοντέλα έχουν αποδείξει ότι η Lp(a) προκαλεί την έκφραση προσκολλητικών μορίων, όπως τα προσκολλητικά μόρια ICAM, VCAM και E-Selectin, καθώς επίσης και αυξημένη σύνθεση προσταγλανδινών (29).

1.3.7 Lp(a) και αγγειογένεση

Αγγειογένεση ονομάζεται η δημιουργία νέων αιμοφόρων αγγείων και διαδραματίζει καίριο ρόλο στη δημιουργία αλλά και στην εξέλιξη της αθηροσκλήρωσης. Βασικός ρυθμιστής αυτής της διαδικασίας είναι οι μεταλλοπρωτεάσες και η πλασμίνη που αποδομούν το extracellular matrix (ECM), ώστε να λάβει χώρα η αγγειακή αναγέννηση.

Η Lp(a) παρεμβαίνει στην αγγειογένεση μέσω της μείωσης της έκφρασης του μετασχηματικού αυξητικού παράγοντα β (TGF-β) και μέσω της πρόσδεσής της στους υποδοχείς του πλασμινογόνου (αΜβ2) με αποτέλεσμα την αναστολή της παραγωγής πλασμίνης (29, 37). Παράλληλα η Lp(a) προάγει

τη διαφοροποίηση των μακροφάγων τύπου M1, τα οποία εκκρίνουν την χημειοκίνη CXCL10 (IP10) που ενεργοποιεί τα λεμφοκύτταρα T-helper-1 (Th1) και τα Natural Killer (NK) κύτταρα. Η χημειοκίνη CXCL10 θεωρείται ισχυρός αναστολέας της αγγειογένεσης (42).

1.3.8 Καταβολισμός της Lp(a)

Αν και η διαδικασία με την οποία η Lp(a) καταβολίζεται παραμένει άγνωστη, υπάρχουν ισχυρά πειραματικά δεδομένα ότι οι υποδοχείς LDLR, VLDLR, low density lipoprotein receptor – related protein 1 (LRP1), megalin/GP330, Scavenger receptor class B τύπου 1 (SR-B1), καθώς και οι υποδοχείς του πλασμινογόνου, συμμετέχουν σε αυτή τη διαδικασία (43). Αρκετές μελέτες υποδεικνύουν ότι το ήπαρ διαδραματίζει πρωταρχικό ρόλο στον καταβολισμό της Lp(a), ενώ οι νεφροί φαίνεται ότι έχουν δευτερεύοντα ρόλο. Οι υποδοχείς LDLR, LRP-1 και SR-B1 εκφράζονται ως επί το πλείστον στο ήπαρ, άρα είναι εύλογη η υπόθεση ότι οι υποδοχείς VLDLR και megalin/GP330 ελέγχουν τον καταβολισμό της Lp(a) σε μικρότερο βαθμό (32).

1.4 LDLR

Οι LDLR εκφράζονται κυρίως στο ήπαρ. Αναγνωρίζουν την apoB-100 και την apoE και διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην πρόσληψη των LDL, των καταλοίπων των χυλομικρών, των IDL και πιθανόν και της Lp(a) από τα ηπατοκύτταρα. Το λιποπρωτεϊνικό σωματίδιο εισέρχεται στο ηπατοκύτταρο μέσω ενδοκύττωσης κυστιδίων επενδεδυμένων με κλαθρίνη και στη συνέχεια αποδομείται από τις λυσοσωμιακές υδρολάσες με την ταυτόχρονη απελευθέρωση χοληστερόλης και την ανακύκλωση του υποδοχέα στην κυτταρική μεμβράνη. Οι LDLRs ανακυκλώνονται περίπου 100 φορές.

Όταν τα επίπεδα χοληστερόλης στα ηπατοκύτταρα αυξηθούν, η ενεργότητα του ενζύμου HMGCoA αναγωγάση μειώνεται, παύει η βιοσύνθεση χοληστερόλης και η έκφραση των LDLRs διακόπτεται (2). Έτσι, ο αριθμός των LDLR ρυθμίζεται από τη συγκέντρωση της χοληστερόλης στο ηπατοκύτταρο. Όταν η συγκέντρωση είναι χαμηλή, ο μεταγραφικός παράγοντας Sterol Regulatory Element Binding Protein (SREBP) μεταφέρεται από το ενδοπλασματικό δίκτυο στη συσκευή Golgi, όπου με τη δράση πρωτεασών αποκόπτεται ένα τμήμα του και επέρχεται η ενεργοποίησή του. Στη συνέχεια, ο SREBP μετακινείται στον πυρήνα του κυττάρου και προκαλεί την έκφραση του γονιδίου που κωδικοποιεί τους LDLR. Όταν τα επίπεδα χοληστερόλης στο ηπατοκύτταρο είναι υψηλά, ο SREBP παραμένει ανενεργός στο ενδοπλασματικό δίκτυο (30).

1.4.1 Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9)

Το γονίδιο της PCSK9 εδρεύει στο βραχύ σκέλος του χρωμοσώματος 1p32. Πρόκειται για μία πρωτεΐνη 692 αμινοξέων (aminoacids, a.a.) που εκφράζεται στο ήπαρ, στο λεπτό έντερο, στο κεντρικό νευρικό σύστημα (ΚΝΣ) αλλά και στις αθηρωματικές πλάκες (44). Η PCSK9 συντίθεται ως διαλυτό ζυμογόνο (προ PCSK9) και η δομή της περιέχει ένα πεπτίδιο σήματος (1-30 a.a.), μία κύρια περιοχή (31-152 a.a.), ένα καταλυτικό κέντρο (153-452 a.a.) και ένα καρβοξυτελικό άκρο (453-692 a.a.) πλούσιο σε His και Cys (45). Αρχικά, το πεπτίδιο σήματος αποσπάται και η PCSK9 αυτοκαταλύεται στη θέση 152 (Asp 151 ↓ Gln 152) στο ενδοπλασματικό δίκτυο. Αυτή η διάσπαση είναι απαραίτητη για τη σωστή αναδίπλωση της πρωτεΐνης και την έκκριση της.

Έπειτα, η εξωκυττάρια PCSK9 προσδένεται στην πρώτη EGF επαναληπτική περιοχή του LDLR (EGF-A) στην κυτταρική μεμβράνη των ηπατοκυττάρων και επηρεάζει τη δραστηριότητα των LDLR μέσω δύο οδών: μιας ενδοκυττάριας και μιας εξωκυττάριας. Στην πρώτη περίπτωση, το σύμπλοκο PCSK9/LDLR εισέρχεται στα λυσοσώματα και ο LDLR αποδομείται. Στη δεύτερη περίπτωση, η PCSK9 εκκρίνεται από τα ηπατοκύτταρα, συνδέεται

με τους LDLR και το σύμπλοκο PCSK9/LDLR εισέρχεται στα λυσοσώματα με τελικό αποτέλεσμα την αποδόμηση των LDLR όπως και προηγούμενα. Αυτή η οδός απαιτεί την έκφραση της ARH adaptor protein (44).

Εντός του όξινου περιβάλλοντος των ενδοσωμάτων η συγγένεια της πρωτεΐνης PCSK9 και του LDLR αυξάνεται σημαντικά, εγκαθιστώντας μια πιο ισχυρή σύνδεση μεταξύ τους (κατά 150–170 φορές) αποτρέποντας την ανακύκλωση του LDLR. Επομένως, η παρουσία της πρωτεΐνης PCSK9 αυξάνει την αποδόμηση των LDLR, μειώνοντας τη συγκέντρωσή τους στην επιφάνεια του ηπατοκυττάρου, με αποτέλεσμα τη μείωση της ηπατικής πρόσληψης των LDL σωματιδίων και την αύξηση των επιπέδων της LDL χοληστερόλης στο πλάσμα (46).

Ένα ενδιαφέρον σημείο είναι ότι η σύνθεση της PCSK9 ρυθμίζεται σε μεταγραφικό επίπεδο από τους SREBPs. Όταν τα επίπεδα χοληστερόλης στα ηπατοκύτταρα είναι χαμηλά, ενεργοποιούνται οι SREBPs οι οποίοι επάγουν τόσο τη σύνθεση PCSK9 όσο και τη σύνθεση των LDLR (47).

Η PCSK9 παρουσιάζει δομική ομοιότητα με τη Ρεζιστίνη (Resistin) ή Adipocyte Specific Hormone που διαδραματίζει σημαντικό στην αντίσταση στην ινσουλίνη, στην αθηροσκλήρωση, στην KAN και σε άλλες παθήσεις (48).

Η σπουδαιότητα της PCSK9 επισημάνθηκε με τη ανακάλυψη σημειακών μεταλλάξεων στο γονίδιο της. Στην περίπτωση των Loss Of Function (LOF) μεταλλάξεων έχουμε υποχοληστερολαιμία και μειωμένο καρδιαγγειακό κίνδυνο, ενώ στην περίπτωση των Gain Of Function (GOF) μεταλλάξεων παρατηρείται υπερχοληστερολαιμία και πρώιμη KAN (49). Αξίζει να σημειωθεί ότι σε ασθενείς με οικογενή υπερχοληστερολαιμία (F.H.) με PCSK9 GOF μετάλλαξη, τα επίπεδα πλάσματος της Lp(a) βρίσκονται σημαντικά αυξημένα (50).

Η PCSK9 φαίνεται ότι επηρεάζει αρκετές μεταβολικές οδούς στις οποίες συμπεριλαμβάνονται η βιοσύνθεση χοληστερόλης και η ανταπόκριση στο stress και στα χημικά ερεθίσματα. Επίσης, η PCSK9 συμμετέχει σε αποπτωτικές και φλεγμονώδεις διαδικασίες (45, 51). Η ενεργότητα της PCSK9 επεκτείνεται και σε άλλους στόχους πέραν των LDLR, όπως οι LDL Related

Receptors, οι VLDLR, οι apoER2 (LRP8) και LRP1, το ένζυμο BACE1 (β-site Amyloid Precursor Protein [APP]-cleaving enzyme 1), καθώς και οι ηπατικοί υποδοχείς CD81. Σε πειραματικό επίπεδο η PCSK9 φαίνεται ότι προσφέρει προστασία από λοίμωξη από τον ιό HCV, αφού μειώνει την έκφραση του υποδοχέα CD81 στα ηπατοκύτταρα και άρα μειώνει τις πύλες εισόδου του ιού στον οργανισμό (51).

1.5 Θεραπευτική αντιμετώπιση αυξημένων επιπέδων Lp(a)

Ενώ οι στατίνες δεν μειώνουν τα επίπεδα της Lp(a), τα νεότερα λιπιδαιμικά φάρμακα φαίνεται ότι προκαλούν σημαντική μείωση των επιπέδων της στο αίμα (13). Οι αναστολείς του CETP δρουν μέσω της αύξησης των επιπέδων HDL-C. Το Anacetrapid που βρίσκεται στη φάση III των κλινικών μελετών, μειώνει τη συγκέντρωση της Lp(a) στο πλάσμα κατά 36%. Ο μηχανισμός επίτευξης αυτής της μείωσης παραμένει άγνωστος. Μια θεωρία για την ανωτέρω μείωση έχει προταθεί από τους Sharma και συν. το 2015 (36). Έχει διατυπωθεί η άποψη ότι ίσως η κάθαρση της Lp(a) να επιτελείται από τον SR-B1, άρα τα Lp(a) και τα HDL σωματίδια ανταγωνίζονται όσον αφορά την πρόσδεση τους στους SR-B1, προκαλώντας μείωση στο ποσοστό των HDL σωματιδίων που καταβολίζονται, αύξηση των επιπέδων της HDL χοληστερόλης του πλάσματος και μείωση τελικά της Lp(a) (36).

Το Mipomersen είναι ένα ASO (antisense oligonucleotide) κατά της apoB. Τα ASOs είναι φάρμακα που έχουν στόχο το mRNA μιας πρωτεΐνης, προκαλώντας αποσιώπηση (silencing) του γονιδίου που κωδικοποιεί τη συγκεκριμένη πρωτεΐνη - στόχο. Αποτελούνται από μικρές νουκλεοτιδικές αλληλουχίες συμπληρωματικές του mRNA της πρωτεΐνης για την οποία είναι επιθυμητή η παύση της μετάφρασης. Το σύμπλοκο φαρμάκου/mRNA συνήθως αποδομείται από το ένζυμο Rnase H του κυττάρου (52, 53). Το Mipomersen προκαλεί μείωση της συγκέντρωσης της Lp(a) περίπου 40-50%.

Η λομιταπίδη, ένας αναστολέας της Microsomal Triglyceride Transfer Protein (MTP), προκαλεί σημαντική μείωση των επιπέδων της Lp(a), αλλά έχει αρκετές ανεπιθύμητες ενέργειες. Το mipomersen και η λομιταπίδη έχουν εγκριθεί για τη θεραπεία της HoFH (ομόζυγης οικογενούς υπερχοληστερολαιμίας) αλλά δυστυχώς και τα δυο αυτά φάρμακα προκαλούν λιπώδη διήθηση του ήπατος (54).

Οι αναστολείς της PCSK9 αποτελούν μία πολλά υποσχόμενη φαρμακευτική προσέγγιση στη μείωση των επιπέδων της Lp(a). Το Evinacumab και το Alirocumab που είναι μονοκλωνικά αντισώματα κατά της PCSK9, που ήδη κυκλοφορούν και μειώνουν την Lp(a) κατά 27% και 30%, αντίστοιχα. Αξίζει να σημειωθεί ότι στις κλινικές δοκιμές, οι αναστολείς της PCSK9 δεν εμφανίζουν παρενέργειες (55, 56).

Τα μέχρι τώρα επιστημονικά δεδομένα υποδεικνύουν ότι η πιο θεαματική μείωση στα επίπεδα της Lp(a) έχει επιτευχθεί με το ASO δεύτερης γενιάς, Isis – APO(a)_{RX} που βρίσκεται στη φάση II των κλινικών μελετών. Το φάρμακο δρα παρεμβαίνοντας στη σύνθεση της apo(a) στο ήπαρ και μειώνει τα επίπεδα της Lp(a) περίπου κατά 80%. Αξίζει να σημειωθεί επίσης ότι στη δόση των 300mg το φάρμακο μειώνει τα OxPL/apo(a) > 80% και τα OxPL/apoB > 60%. Δεν παρατηρήθηκε επίδραση του φαρμάκου στα OxPL/apoA-1, OxPL/PLG (plasminogen) και στη μάζα της LpPLA₂ (24).

1.5.1 Μελλοντική χορήγηση ASOs

Η έρευνα που επιτελείται στις μέρες μας όσον αφορά τη σύνθεση GalNac conjugates, υπόσχεται ασφαλή και στοχευμένο μηχανισμό εισόδου των ASOs στον οργανισμό. Τα πειραματικά δεδομένα αποδεικνύουν ότι τα GalNac conjugates ενισχύουν τη δράση των ASOs κατά δέκα με είκοσι φορές. Ο τρόπος δράσης αυτών των μορίων επιτελείται μέσω της εκλεκτικής τους πρόσδεσης, στους υποδοχείς ασιαλογλυκοπρωτεΐνης 1 και 2 που απαντώνται σε αφθονία αλλά εκφράζονται εκλεκτικά στα ηπατοκύτταρα. Μέσω ενδοκύττωσης σωματιδίων επενδεδυμένων με κλαθρίνη, το σύμπλοκο

GalNac/ASO εισέρχεται στο εσωτερικό του κυττάρου απελευθερώνοντας το ASO και με ασφαλή τρόπο επιτυγχάνεται η αποσιώπηση του mRNA του στόχου, ελαχιστοποιώντας τυχόν τοξικές δράσεις των ASOs. Αυτή η μέθοδος ενδέχεται στο μέλλον να αυξήσει τις περιόδους μεταξύ δόσεων ή ακόμη να δημιουργήσει ASOs διαθέσιμα από του στόματος (57, 58).

1.5.2 Παραδοσιακές μέθοδοι μείωσης της Lp(a)

Οι αποτελεσματικότεροι εγκεκριμένοι τρόποι μείωσης της συγκέντρωσης της Lp(a) στο πλάσμα ασθενών μετρίου και υψηλού κινδύνου, είναι η αφαίρεση (lipid apheresis) και η χορήγηση νιασίνης που μειώνουν τα επίπεδα της Lp(a) κατά 20-30%. Η νιασίνη μειώνει την έκφραση του LPA γονιδίου σε τρανσγονιδιακά ποντίκια (LPA-YAC) αλλά και σε καλλιέργειες ηπατοκυττάρων (26). Η Ευρωπαϊκή Εταιρεία Αθηροσκλήρωσης συνιστά τη χορήγηση νιασίνης σε ασθενείς μετρίου ή υψηλού κινδύνου που έχουν επίπεδα Lp(a) πάνω από 50 mg/dL. Οι γαστρεντερικές ανεπιθύμητες ενέργειες της νιασίνης μετριάζονται με τα καινούργια σκευάσματα αργής αποδέσμευσης. Δυστυχώς δύο μεγάλες μελέτες (AIM-HIGH και HPS2THRIVE) απέτυχαν να αποδείξουν καρδιαγγειακό όφελος με τη χορήγηση νιασίνης σε συνδυασμό με στατίνη (59).

Αξίζει να σημειωθεί ότι τα οιστρογόνα, η ασπιρίνη, η ταμοξιφαίνη, η L-καρνιτίνη και η χορήγηση θυροξίνης σε ασθενείς με υποθυρεοειδισμό μπορούν να προκαλέσουν μικρές μειώσεις των επιπέδων της Lp(a) (13).

1.6 Στόχος μεταπτυχιακής εργασίας

Το 1949 ο Gofman με την ομάδα του στο παν/μιο της Καλιφόρνια πρότεινε μία νέα μέθοδο ποσοτικού προσδιορισμού των λιποπρωτεϊνών του πλάσματος χρησιμοποιώντας την υπερφυγόκεντρο (60). Έκτοτε αποτελεί την πιο χρησιμοποιούμενη μέθοδο διαχωρισμού των λιποπρωτεϊνών. Στην παρούσα εργασία στόχος ήταν η υπερφυγοκεντρική απομόνωση της

λιποπρωτεΐνης (a) (61-63) και η απομόνωση της HDL με αντιδραστήριο καταβύθισης. Η Lp(a) και η HDL ελέγχθηκαν για την καθαρότητά τους με το κιτ hydragel lipo + Lp(a) της sebia, μετρήθηκε η ενεργότητα της LpPLA₂ και στη συνέχεια ακολούθησε ποσοτικός προσδιορισμός της PCSK9 και στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων.

2. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

2.1 Πληθυσμός της μελέτης

Τον πληθυσμό της παρούσας μελέτης αποτέλεσαν άτομα που επισκέφτηκαν το εξωτερικό ιατρείο διαταραχών του μεταβολισμού των λιπιδίων του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων. Τα βασικά κριτήρια στην επιλογή των ατόμων που συμμετείχαν, ήταν τα επίπεδα πλάσματος της Lp(a) ≥ 40 mg/dL ή ≤ 10 mg/dL. Ο ποσοτικός προσδιορισμός της Lp(a) πραγματοποιήθηκε στο βιοχημικό εργαστήριο του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων με τη μέθοδο της νεφελομετρίας.

Όλοι οι ασθενείς της ομάδας με Lp(a) ≥ 40 mg/dL ελάμβαναν την ίδια υπολιπιδαιμική αγωγή για τουλάχιστον 3 μήνες πριν τη λήψη του αίματος. Εξαιρέθηκαν από τη μελέτη άτομα με παράγοντες που επηρεάζουν τις συγκεντρώσεις της Lp(a) πλάσματος (χρόνια νεφρική ανεπάρκεια, σακχαρώδης διαβήτης, κατάχρηση οινόπνεύματος ή κίρρωση του ήπατος, οξύ στεφανιαίο σύνδρομο ή αγγειοπλαστική των στεφανιαίων αγγείων ή αορτοστεφανιαία παράκαμψη κατά τους 3 προηγούμενους μήνες πριν την αιμοληψία καθώς και λήψη οιστρογονικών σκευασμάτων, νικοτινικού οξέος, φιβράτης και N-ακετυλοκυστεΐνης).

2.1 Υπερφυγοκεντρικός διαχωρισμός Lp(a) από το πλάσμα

2.1.1 Όργανα-αντιδραστήρια

- Φυγόκεντρος πάγκου (HermLe, Z320).
- Υπερφυγόκεντρος (L7, Beckman).
- Σωλήνες υπερφυγόκεντρου (Optiseal, Beckman).
- Κεφαλή υπερφυγόκεντρου (NVT-65, Beckman).
- **Garamycin** (Gentamycin sulfate, Schering-Plough), Το διάλυμα περιέχει 40 mg θεικής γενταμυκίνης /mL, σε φιαλίδια 2mL.
- **KBr** (Merck). Το KBr ξηραίνεται στους 100 °C για μία ημέρα και διατηρείται σε ξηραντήρα.

2.1.2 Διαλύματα εργασίας

- **Διάλυμα 10% EDTA:** 12,8247 g $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Titriplex III) διαλυτοποιούνται σε 90 mL d H_2O . Ρυθμίζεται το pH στο 7 και ο όγκος συμπληρώνεται στα 100 mL, με d H_2O . Το διάλυμα διατηρείται στους 4 °C.
- **Διάλυμα KBr πυκνότητας 1.107 g/mL:** 38.75 g KBr διαλυτοποιούνται σε d H_2O μέχρι τελικού όγκου 250 mL. Το διάλυμα περιέχει 5 $\mu\text{L/mL}$ 10% EDTA και 1.25 $\mu\text{L/mL}$ garamycin και διατηρείται στους 4 °C.

2.1.3 Πειραματική διαδικασία

Απομόνωση πλάσματος

Σαράντα mL αίματος από τον ίδιο δότη (με συγκέντρωση Lp(a) μεγαλύτερη από 40 mg/dL) συλλέγονται σε πλαστικά σωληνάρια καθένα από τα οποία περιέχει 100 μ L αντιπηκτικού EDTA 10%. Το κάθε σωληνάριο φυγοκεντρείται στις 3100 rpm (1500xg) για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου ώστε να διαχωριστεί το πλάσμα. Στη συνέχεια το πλάσμα συλλέγεται με αυτόματη πιπέτα και προστίθεται σε αυτό 5 μ L/mL EDTA 10% για την αποφυγή οξειδωτικής τροποποίησης των λιποπρωτεϊνικών σωματιδίων και 1.25 μ L/mL αντιβιοτικού garamycin. Το πλάσμα διατηρείται στους 4 °C βαθμούς, το πολύ για 4 μέρες.

Υπερφυγοκεντρική απομόνωση της Lp(a)

Μετρείται ο όγκος του πλάσματος σε mL και πολλαπλασιάζεται με συντελεστή 0.1461. Ο αριθμός που προκύπτει ισούται με τα γραμμάρια στερεού KBr που προστίθεται στο πλάσμα ώστε η πυκνότητά του να γίνει 1.107 g/mL. Το πλάσμα μοιράζεται σε σωληνάρια υπερφυγόκεντρου, ο όγκος των οποίων συμπληρώνεται με διάλυμα KBr πυκνότητας 1.107 g/mL. Τα σωληνάρια αφού ζυγοσταθμιστούν, σφραγίζονται και τοποθετούνται σε υπερφυγόκεντρο, όπου φυγοκεντρούνται με τη χρήση ρότορα NVT65 στις 40000 στροφές για 10 ώρες στους 14 °C. Μετά τη λήξη της υπερφυγοκέντρωσης, με σύριγγα λιποπρωτεϊνών, συλλέγονται τα λιποπρωτεϊνικά κλάσματα (VLDL, LDL, Lp(a) και ένα μέρος της HDL) από το άνω τμήμα του σωληναρίου καθώς και το υποκείμενο από τη βάση. Έτσι επιτυγχάνεται ένας αρχικός διαχωρισμός των λιποπρωτεϊνών του πλάσματος από ένα μέρος της HDL καθώς και από το σύνολο του πλασμινογόνου και των άλλων πρωτεϊνών του πλάσματος. Το είδος των απομονωμένων λιποπρωτεϊνών όσο και το υπόλειμμα ελέγχονται με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης.

2.2 Καθαρισμός της Lp(a) με χρωματογραφία συγγένειας

2.2.1 Αρχή της μεθόδου

Η αρχή της μεθόδου βασίζεται στη βιολογική συγγένεια την οποία παρουσιάζει η Lp(a) με τη λυσίνη, η οποία βρίσκεται κατάλληλα ακινητοποιημένη πάνω σε πολυμερές υλικό Sepharose 4B. Λόγω της συγγένειας και της εκλεκτικής αλληλο-αναγνώρισης του ακινητοποιημένου δεσμευτή (L-λυσίνη) και του σωματιδίου στόχου [Lp(a)], το αντίστοιχο σύμπλοκο σχηματίζεται επί της στήλης. Αντίθετα, άλλα μόρια τα οποία δεν εμφανίζουν συγγένεια με τη λυσίνη δεν αναγνωρίζονται και περνούν αδέσμευτα. Η μέθοδος η οποία περιγράφεται πιο κάτω βασίζεται σε αυτή των Doucet και συν (67).

2.2.2 Όργανα – Διαλύματα Εργασίας

- **Μεμβράνη διαπίδυσης** (Sigma). Η μεμβράνη ενεργοποιείται σε dH₂O για 3 ώρες και κατακρατά οποιοδήποτε συστατικό έχει μοριακό βάρος μεγαλύτερο από 12 kDa.
- **Περισταλτική αντλία** (Gibson, Minipuls 3).
- **Αυτόματος συλλέκτης κλασμάτων** (fraction collector).
- **Lysine Sepharose 4B** (Pharmacia Biotech). Η Lysine Sepharose 4B είναι L-λυσίνη ακινητοποιημένη στο πολυμερές υλικό Sepharose 4B, ενεργοποιημένη σε βρωμιούχο κυάνιο (cyanogen bromide activated sepharose). Η δεσμευτική της ικανότητα ανέρχεται σε 0.6 mg πλασμινογόνου [βιολογικό ανάλογο της Lp(a)] ανά mL πηκτώματος (gel).

- **Ρυθμιστικό διάλυμα 20 mM φωσφορικών, pH 7.4.** Για την παρασκευή του διαλύματος, 7.6020 g $\text{Na}_2\text{PO}_3 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ και 3.5598 g $\text{Na}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ διαλύονται σε 1 L dH_2O . Το διάλυμα περιέχει και 0.02 % (0.2 g/L) NaN_3 . Το pH ρυθμίζεται στο 7.4 και το διάλυμα διατηρείται στους 4 °C.
- **Ρυθμιστικό διάλυμα 200 mM ε-αμινοκαπροϊκού (ε-ACA), pH 7.4.** Για την παρασκευή του διαλύματος 26.24 g ε-ACA, 7.6020 g $\text{Na}_2\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 3.5598 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ και 0.2 g NaN_3 διαλύονται σε 1L dH_2O . Επιπλέον το διάλυμα αυτό περιέχει και 0.15 M (8.7660 g/L) NaCl . Το pH ρυθμίζεται στο 7.4 και το διάλυμα διατηρείται στους 4 °C.
- **Ρυθμιστικό διάλυμα αναγέννησης - εξισορρόπησης της στήλης, pH 7.4.** Διάλυμα 200 mM ε-ACA σε ρυθμιστικό διάλυμα 50 mM φωσφορικών (19.005 g $\text{Na}_3\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 8.8995 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ και 0.5 g NaN_3 διαλύονται σε 1L dH_2O), ενώ περιέχει και 1M (58.44 g/L) NaCl . Η παρασκευή του γίνεται όπως έχει περιγραφεί πιο πάνω. Χρησιμοποιείται κάθε πέμπτη πειραματική διαδικασία για την εξισορρόπηση - αναγέννηση του υλικού της στήλης.
- **Διάλυμα συντήρησης.** Όταν η στήλη πρόκειται να χρησιμοποιηθεί μετά από μεγάλο χρονικό διάστημα, το υλικό της διατηρείται σε διάλυμα 20 % αιθανόλης.
- **Ρυθμιστικό διάλυμα HEPES, pH 7.4.** Για την παρασκευή διαλύονται 1.0009 g Hepes, 8.0063 g NaCl , 0.1939 g KCl και 0.7445 g Titriplex III σε 1 L dH_2O . Το pH ρυθμίζεται στο 7.4 και το διάλυμα διατηρείται στους 4 °C.

2.2.3 Πειραματική διαδικασία

2.2.3.1 Πλήρωση της στήλης

Σε τέσσερα κωνικά σωληνάρια των 50 mL προτίθενται 16 mL ελαιωρήματος Lysine SepHarose 4B και ο όγκος συμπληρώνεται με dH_2O μέχρι τα 50 mL. Τα σωληνάρια φυγοκεντρούνται στις 1000 rpm για 10 λεπτά. Με το πέρας της φυγοκέντρωσης το υπερκείμενο απορρίπτεται και η

διαδικασία επαναλαμβάνεται άλλες 4 φορές. Στη συνέχεια, το υλικό που απομένει στη στήλη εναιωρείται σε 6-10 mL διαλύματος 20 mM των φωσφορικών.

Σε στήλη ύψους 16 και διαμέτρου 1.6 εκατοστών (16 x 1.6 cm) και έχοντας κλειστή την περισταλτική αντλία, τοποθετείται λίγο από το διάλυμα 20 mM των φωσφορικών. Στη συνέχεια το υλικό πλήρωσης διαβιβάζεται εντός της στήλης με πιπέτα έτσι ώστε να αποφευχθεί ο σχηματισμός φυσαλίδων αέρα. Ο υπόλοιπος όγκος εντός της στήλης συμπληρώνεται με διάλυμα 20 mM φωσφορικών, ενώ ανοίγεται η περισταλτική αντλία σε ταχύτητα 2.5 mL/min. Μετά την καθίζηση του υλικού της στήλης, ακολουθεί εξισορρόπηση αυτού με 100 mL 20 mM φωσφορικών.

2.2.3.2 Προετοιμασία - τοποθέτηση δείγματος

Οι λιποπρωτεΐνες [VLDL, LDL, Lp(a)] που συλλέγονται μετά την υπερφυγοκέντρηση σε KBr 1.107 g/mL, υποβάλλονται σε διαπίδυση έναντι διαλύματος 20 mM φωσφορικών το οποίο περιέχει και 5 μ L/mL garamycin για την απομάκρυνση του KBr. Στη συνέχεια, τροφοδοτούνται στη στήλη με ρυθμό ροής 0.5 mL/min. Η στήλη αρχικά εκπλένεται με το ρυθμιστικό διάλυμα 20 mM φωσφορικών για την απομάκρυνση όλων των λιποπρωτεϊνών εκτός της Lp(a), η οποία κατακρατείται στην στήλη. Στη συνέχεια η Lp(a) εκλύεται με το ρυθμιστικό διάλυμα 200 mM ϵ -ACA. Η ταχύτητα με την οποία γίνεται η συλλογή των κλασμάτων είναι 0.5 mL/min, ενώ συλλέγονται συνολικά 30 κλάσματα των 2.5 mL κάθε 5 λεπτά. Μετά το τέλος της διαδικασίας η στήλη εξισορροπείται με το ρυθμιστικό διάλυμα 20 mM φωσφορικών και αποθηκεύεται στους 4°C.

Τα κλάσματα που ελήφθησαν με το διάλυμα ϵ -ACA, στα οποία περιέχεται η Lp(a), συνενώνονται και υποβάλλονται σε διαπίδυση για 12 ώρες έναντι ρυθμιστικού διαλύματος 10 mM PBS ή HEPES με pH 7.4 το οποίο περιέχει 5 μ L/mL 10% EDTA και 1.25 μ L/mL garamycin, έτσι ώστε να απομακρυνθεί το ϵ -ACA.

2.2.3.3 Υπερφυγοκεντρική συμπύκνωση της Lp(a)

Τα κλάσματα που συλλέγονται από τη στήλη και που περιέχουν την Lp(a), ενώνονται και τοποθετούνται σε σωλήνες υπερφυγόκεντρου. Οι σωλήνες συμπληρώνονται με διάλυμα 10 mM PBS και αφού ζυγοσταθμιστούν, υπερφυγοκεντρούνται στις 40000 rpm για 10 ώρες, στους 14 °C. Μετά την υπερφυγοκέντρωση η Lp(a) συλλέγεται από τον πυθμένα του σωλήνα, αφού πρώτα απομακρυνθεί το υπερκείμενο με σύριγγα.

Στη συνέχεια τα κλάσματα ελέγχονται για καθαρότητα Lp(a) χρησιμοποιώντας το kit hydragel lipo + Lp(a) της sebia καθώς και για PCSK9, όπως θα περιγραφεί σε επόμενη ενότητα.

2.3 Ηλεκτροφόρηση λιποπρωτεϊνών σε πήκτωμα αγαρόζης

2.3.1 Αρχή της μεθόδου

Γενικά η ηλεκτροφόρηση είναι μια ποιοτική κυρίως μέθοδος διαχωρισμού των πρωτεϊνών με βάση το ηλεκτρικό φορτίο και το μέγεθός τους. Κατά την ηλεκτροφόρηση των λιποπρωτεϊνών μεταναστεύουν και οι πρωτεΐνες του πλάσματος όμως η χρωστική που χρησιμοποιείται δίνει θετική αντίδραση μόνο με λιπίδια.

Δείγμα

Χρησιμοποιείται ορός ή πλάσμα με EDTA καθώς και απομονωμένες λιποπρωτεΐνες. Η συντήρηση των δειγμάτων γίνεται στους 4 °C και το πολύ για τρεις ημέρες. ΠΡΟΣΟΧΗ: Το δείγμα δεν μπορεί να καταψυχθεί γιατί μεταβάλλεται η δομή των λιποπρωτεϊνικών σωματιδίων. Επίσης δεν χρησιμοποιείται δείγμα ηπαρινισμένο γιατί η ηπαρίνη δημιουργεί σύμπλοκα με τις λιποπρωτεΐνες. Στην ηλεκτροφόρηση ενός νορμολιπιδαιμικού ατόμου η Lp(a) εμφανίζει τη χαρακτηριστική εικόνα του παρακάτω σχήματος:

λιποπρωτεΐνη μέτωπο

HDL

Lp(a)

VLDL

LDL

.....αρχή

2.3.2 Όργανα – αντιδραστήρια

- **Συσκευή ηλεκτροφόρησης (Sebia – K20).**
- **Τροφοδοτικό.**
- **Κιτ ηλεκτροφόρησης Hydragel Lipo + Lp(a), της Sebia που περιλαμβάνει:**
 - **10 πλάκες με πήκτωμα αγαρόζης**, τα πηκτώματα του kit είναι έτοιμα για χρήση. Κάθε πήκτωμα περιέχει 0.8% αγαρόζη, pH 7.5. Αποθηκεύονται οριζόντια μέσα στην ειδική τους συσκευασία σε θερμοκρασία 2-8 °C και είναι σταθερά μέχρι την ημερομηνία λήξης που αναγράφεται στην συσκευασία.
 - **Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης (διάλυμα Tris-Βαρβιτουρικού).** Το kit περιέχει 3 φιαλίδια των 75 ml πυκνού ρυθμιστικού διαλύματος. Πριν από την ηλεκτροφόρηση ετοιμάζουμε το ρυθμιστικό διάλυμα εργασίας (pH 8.2) διαλύοντας το περιεχόμενο του σε 1 L dH₂O.
 - **Φιαλίδια συμπυκνωμένης χρωστικής 3% Sudan Black.** Η παρασκευή του διαλύματος χρώσης γίνεται 30 min πριν την χρήση ως εξής: Σε κωνική φιάλη αναμιγνύονται 160 ml καθαρή αιθανόλης (96%), 2 ml Sudan Black και 140 ml αποσταγμένου H₂O με ήπια ανάδευση.

- **Διάλυμα χρώσης.** Σε κωνική φιάλη αναμιγνύονται 160 mL διαλύματος EtOH (απόλυτη αιθανόλη) με 2mL 3% Sudan Black. Στην συνέχεια και ενώ το μίγμα αναδεύεται ισχυρά, προστίθενται 140 mL dH₂O.
- **Διάλυμα έκπλυσης (wash solution).** Χρησιμοποιείται για την έκπλυση του πηκτώματος μετά το στάδιο του αποχρωματισμού. Διάλυμα εργασίας: Διαλύονται 16 ml του πυκνού διαλύματος έκπλυσης (wash solution stock) σε 1 L dH₂O.
- **Ειδική μεμβράνη με θέσεις τοποθέτησης των δειγμάτων.**
- **Διηθητικά χαρτιά.**
- **Διάλυμα αποχρωματισμού (destaining solution).** Τουλάχιστον 15 λεπτά πριν την χρήση ετοιμάζουμε 150 ml διαλύματος αιθανόλης 45% κατ' όγκο.

2.3.3 Διαδικασία ηλεκτροφόρησης

Η πλάκα με το πήκτωμα αγαρόζης τοποθετείται σε επιφάνεια που έχει ήδη καθαριστεί με EtOH 45%. Το πήκτωμα έχει χαραγμένα δύο βέλη τα οποία καθορίζουν τη θέση τοποθέτησης της μεμβράνης των δειγμάτων. Η υγρασία που υπάρχει στην επιφάνεια του πηκτώματος απορροφάται με τη βοήθεια διηθητικού χαρτιού. Έπειτα εφαρμόζεται η μεμβράνη τοποθέτησης των δειγμάτων πάνω στο πήκτωμα αγαρόζης, ώστε τα βέλη της μεμβράνης να συμπίπτουν με τα βέλη της επιφάνειας της πηκτής. Κατά την εφαρμογή θα πρέπει να αποφευχθεί ο σχηματισμός φυσαλίδων αέρα γιατί οι τελευταίες εμποδίζουν τη μετακίνηση των δειγμάτων. Στην συνέχεια με αυτόματη πιπέτα προστίθενται τα δείγματα στις ενδεδειγμένες θέσεις με προσοχή να μην τραυματισθεί η αγαρόζη. Για ορό ή πλάσμα ο όγκος των δειγμάτων δεν πρέπει να είναι πάνω από 10 μ L. Στην περίπτωση που χρησιμοποιηθούν μεγάλες ποσότητες δειγμάτων θα υπάρχει σχηματισμός «ουρών» με

αποτέλεσμα να είναι δύσκολη η ταυτοποίηση των λιποπρωτεϊνών. Μετά από 2 λεπτά απομακρύνουμε τον οδηγό προστασίας του πλαισίου της φόρμας και τοποθετούμε τη φόρμα δειγμάτων στη θέση 4 της συσκευής hydragel k20. Περιστρέφουμε με προσοχή τον κοχλία της συσκευής έτσι ώστε η φόρμα με τα δείγματα να έρθει σε επαφή με την επιφάνεια του πηκτώματος. Τα δείγματα αφήνονται για 7,5 λεπτά ώστε να προσροφηθούν πλήρως από την αγαρόζη. Σε κάθε διαμέρισμα της συσκευής ηλεκτροφόρησης προστίθενται 150 mL Tris-Βαρβιτουρικού και η πηκτή αγαρόζης τοποθετείται αντεστραμμένη πάνω στη γέφυρα της συσκευής, με τα δείγματα προς την κάθοδο. Η συσκευή κλείνεται με το ειδικό σκέπαστρο και συνδέονται τα ηλεκτρόδια με το τροφοδοτικό. Η διάρκεια της ηλεκτροφόρησης είναι 90 λεπτά σε τάση 50 V και ένταση 3 mA για κάθε δείγμα.

2.3.4 Χρώση των λιποπρωτεϊνών

Όταν τελειώσει η διαδικασία της ηλεκτροφόρησης, το πήκτωμα στεγνώνεται σε ρεύμα θερμού αέρα σε θερμοκρασία όχι μεγαλύτερη από 80 °C. Η πλάκα τοποθετείται σε δοχείο χρώσης που περιέχει το διάλυμα της χρωστικής και αφήνεται για 15 λεπτά. Ξεβάφουμε για 5 min στο διάλυμα αποχρωματισμού το οποίο το ετοιμάζουμε 15 min πριν τη χρήση. Τοποθετούμε το gel για 1 λεπτό στο διάλυμα έκπλυσης και στη συνέχεια ξεπλένουμε γρήγορα με αποσταγμένο νερό και στεγνώνουμε με ζεστό αέρα (αερόθερμο). Εάν χρειάζεται καθαρίζουμε την πλαστική πλευρά του στεγνού φιλμ με ένα χαρτί βρεγμένο με 70% αιθανόλη.

2.3.5 Έλεγχος της καθαρότητας της Lp(a)

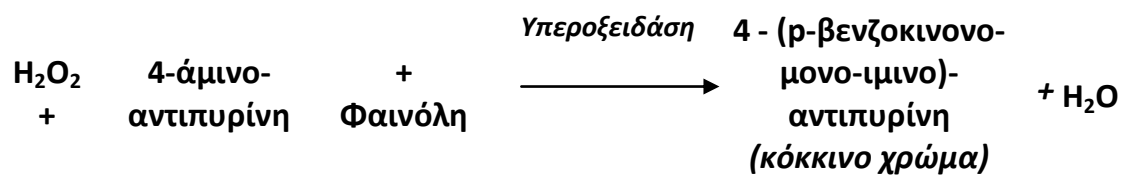
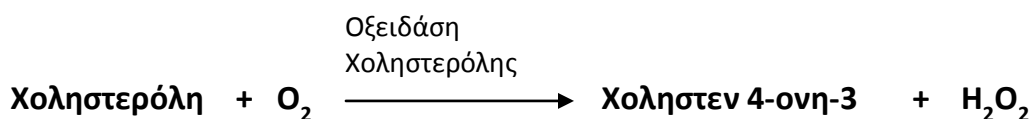
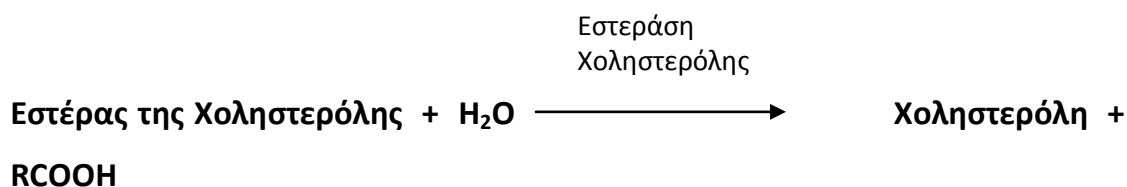
Για να θεωρηθεί καθαρή η απομονωμένη Lp(a) θα πρέπει να δίνει μόνο μία ζώνη στο πήκτωμα αγαρόζης και με μετατόπιση που είναι χαρακτηριστική για την Lp(a), συνεπώς αν εμφανίζονται και άλλες ζώνες, έστω και αχνές, η

απομονωθείσα Lp(a) δεν είναι απόλυτα καθαρή αλλά έχει προσμίξεις και από άλλες λιποπρωτεΐνες.

2.4 Ενζυμικός φωτομετρικός προσδιορισμός της ολικής χοληστερόλης

2.4.1 Αρχή της μεθόδου

Η αρχή του ενζυμικού φωτομετρικού προσδιορισμού φαίνεται παρακάτω:



Δείγμα:

Ορός ή πλάσμα μετά από 12 ώρες νηστεία.

2.4.2 Αντιδραστήρια

R₁, διάλυμα μίγματος αντιδρώντων, ενζύμων και ρυθμιστικού διαλύματος των ανωτέρω αντιδράσεων, περιέχει ρυθμιστικό διάλυμα 100mM φωσφορικών pH 6,5, 5 mM Φαινόλη, 0.25 mM 4-αμινο-αντιπυρίνη, ≥ 150 U/L Εστεράση της χοληστερόλης, ≥ 100 KU/L Οξειδάση της χοληστερόλης, ≥ 5 KU/L Υπεροξειδάση.

R₂, πρότυπο χοληστερόλης, 200 mg/100ml (5.17 mM).

Τα ενζυμικά παρασκευάσματα είναι σταθερά έως την ημερομηνία λήξης τους όταν φυλάσσονται σε θερμοκρασία 2-8 °C.

2.4.3 Εκτέλεση Προσδιορισμού

Προσθέτουμε τα αντιδραστήρια όπως στον παρακάτω πίνακα:

	ΤΥΦΛΟ	ΠΡΟΤΥΠΟ	ΔΕΙΓΜΑ
Πρότυπο (1:10 Φ.Ο)	-	20μl	-
Δείγμα(1:10 Φ.Ο)	-	-	20μl
Αντιδρ. Εργασίας	Σε όλα από 200 μl		
αναδεύουμε και επωάζουμε για 10 min, 25°C ή 5 min, 37°C.			
Μετρούμε τις απορροφήσεις στα 510nm			
A 510nm	0		

Η ένταση του χρώματος παραμένει σταθερή για 60 min (μέτρηση OD στο Elisa Reader).

2.4.4 Υπολογισμός

Ο ενζυμικός προσδιορισμός της συγκέντρωσης της χοληστερόλης δίδεται από την παρακάτω σχέση, όπου A η απορρόφηση στα 510nm :

$$\text{Χοληστερόλη, mg/dL} = 200 \times \frac{A(\text{δείγμα})}{A(\text{πρότυπο})}$$

Παρατήρηση:

Με αυτή τη μέθοδο προσδιορισμού χοληστερόλης έχουμε γραμμικότητα μέχρι 750 mg/dL.

Αν έχουμε τιμές μεγαλύτερες, αραιώνουμε τον ορό με φυσιολογικό ορό, πριν τον προσδιορισμό.

2.5 Προσδιορισμός της HDL Χοληστερόλης

2.5.1 Αρχή της μεθόδου

Τα χυλομικρά, οι πολύ χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνες, (VLDL) και οι χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνες (LDL) καταβυθίζονται με την προσθήκη φωσφοβολφραμικού οξέος και ιόντων μαγνησίου στο δείγμα. Μετά από φυγοκέντρηση παραμένει στο υπερκείμενο μόνο η υψηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνη (HDL), στο οποίο η ποσότητα της χοληστερόλης προσδιορίζεται ενζυμικά.

Δείγμα

Ορός, ή πλάσμα με EDTA.

2.5.2 Αντιδραστήρια

R₁: Φωσφοβολφραμικό οξύ 14 mmol/L

R₂ : Χλωριούχο Μαγνήσιο 1 mmol/L

Πρότυπο διάλυμα: Διάλυμα χοληστερόλης 200 mg/100 ml

Αντιδραστήριο καταβύθισης: Αναμιγνύονται 4 όγκοι R₁ με 1 όγκο R₂ (το διάλυμα είναι σταθερό για 6 εβδομάδες στους 20 – 25°C).

2.5.3 Εκτέλεση του προσδιορισμού

Καταβύθιση χυλομικρών, VLDL, LDL

Σε πλαστικά κωνικά σωληνάκια errendorf αναμιγνύονται:

Δείγμα	:	200 μl
Αντιδραστήριο καταβύθισης :		20 μl

Ακολουθεί ανάδευση και επώαση για 10 min σε θερμοκρασία δωματίου. Έπειτα γίνεται φυγοκέντρηση για 2 λεπτά στις 12000 rpm. Μετά την φυγοκέντρηση παίρνουμε το υπερκείμενο που περιέχει την HDL και προσδιορίζουμε την χοληστερόλη της.

Το υπερκείμενο είναι σταθερό για 5 ημέρες στους 2 – 25 °C.

Προσδιορισμός HDL χοληστερόλης

Τα αντιδραστήρια προσθέτονται σύμφωνα με τον παρακάτω πίνακα:

	Τυφλό	Πρότυπο	Δείγμα
Φ.Ο.	20 μl	-	-
Πρότυπο χοληστερόλης (1:10 Φ.Ο)	-	20 μl	
Υπερκείμενο (HDL χοληστερόλη)	-	-	20 μl
Αντιδραστήριο χοληστερόλης	200μl	200μl	200μl

Ακολουθεί ανάδευση και επώαση για 5 min στους 37 °C

Διαβάζεται η απορρόφηση έναντι τυφλού στα 510nm (ELISA READER)

Υπολογισμός HDL χοληστερόλης (όπου A, απορρόφηση):

$$\frac{(A)_{\text{δείγματος}}}{(A)_{\text{πρωτεΐνης}}} \times 200:10$$

2.6 Ποσοτικός προσδιορισμός PCSK9

2.6.1 Αρχή της μεθόδου

Το Quantikine ELISA τεστ της R&D Systems είναι ένα πρωτόκολλο 4.5 ωρών στερεής φάσεως για τον ποσοτικό προσδιορισμό ανθρώπινης PCSK9 από κυτταρόλυμα, ορό και πλάσμα. Η ανάλυση χρησιμοποιεί τον ενζυμικό ποσοτικό ανοσοπροσδιορισμό με την τεχνική «σάντουιτς». Ένα μονοκλωνικό αντίσωμα ειδικό για ανθρώπινη PCSK9 αποτίθεται σε μία πλάκα αντίδρασης (microplate). Πρότυπα και δείγματα αποτίθενται με πιπέτα στις ειδικές υποδοχές της πλάκας αντίδρασης και η PCSK9 δεσμεύεται από το ακινητοποιημένο αντίσωμα. Μετά την έκπλυση της πλάκας προστίθεται πολυκλωνικό αντίσωμα συζευγμένο με ένζυμο, ειδικό για την PCSK9. Περαιτέρω έκπλυση απομακρύνει το αδέσμευτο αντίσωμα - ένζυμο

αντιδραστήριο και ακολουθεί προσθήκη διαλύματος υποστρώματος ώστε να γίνει ανάπτυξη χρώσης ανάλογη με τη δεσμευμένη ποσότητα της PCSK9. Η χρώση διακόπτεται με το κατάλληλο διάλυμα και μετράται η έντασή της, από την οποία προκύπτει η ποσότητα της PCSK9 του δείγματος.

2.6.2 Αντιδραστήρια – Όργανα - Διαλύματα εργασίας

- Περιεχόμενα στο κιτ:

Πίνακας 2.1. Περιεχόμενα κιτ Quantikine ELISA.

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΟ / ΔΙΑΛΥΜΑ	PART NUMBER	CATALOG # DPC900	CATALOG # SPC900	ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ	ΧΕΙΡΙΣΜΟΣ- ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΣΥΝΤΗΡΗΣΗΣ
Πλάκα αντίδρασης με h-PCSK9	893354	1 πλάκα αντίδρασης	6 πλάκες αντίδρασης	Πλακίδιο πολυστυρένιου με 96 υποδοχές (12 λωρίδες των 8 υποδοχών), επικαλυπτόμενες με μονοκλωνικό αντίσωμα, ειδικό για h- PCSK9	Οι μη χρησιμοποιούμενες υποδοχές επιστρέφονται στη συσκευασία που περιέχει το αφυγραντικό και ο συσκευασία σφραγίζεται. Η σφραγισμένη συσκευασία μπορεί να διατηρηθεί για ένα μήνα στο ψυγείο (2-8°C) και σε συμφωνία με την ημερομηνία λήξης του κιτ.
Πρότυπο (Standard) ανθρώπινης PCSK9	893356	1 φιαλίδιο	6 φιαλίδια	Ανασυνδυασμένη h- PCSK9 σε λυοφιλοποιημένο πρωτεϊνικό ρυθμιστικό διάλυμα με συντηρητικό. Οδηγίες για τον όγκο ανασύστασης του διαλύματος παρέχονται στην ετικέτα του φιαλιδίου .	Μετά την ανασύσταση το διάλυμα διατηρείται για ένα μήνα στους -20 °C και σε συμφωνία με την ημερομηνία λήξης του κιτ.
Πολυκλωνικό αντίσωμα ειδικό για h- PCSK9 (Human PCSK9 Conjugate)	893355	1 φιαλίδιο	6 φιαλίδια	21 mL/φιαλίδιο πολυκλωνικού αντισώματος, ειδικό για h- PCSK9 συζευγμένο με περοξειδάση αγριοραπανιού, με συντηρητικό.	Συντηρείται για ένα μήνα στο ψυγείο σε συμφωνία με την ημερομηνία λήξης του κιτ.
Ρυθμιστικό Διάλυμα RD1-9	895167	1 φιαλίδιο	6 φιαλίδια	11 mL/φιαλίδιο που περιέχει πρωτεϊνικό ρυθμιστικό διάλυμα με συντηρητικό. Μπορεί να περιέχει ίζημα. Το διάλυμα θερμαίνεται σε θερμοκρασία δωματίου και αναδεύεται καλά για να διαλυθεί το ίζημα.	

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΟ / ΔΙΑΛΥΜΑ	PART NUMBER	CATALOG # DPC900	CATALOG # SPC900	ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ	ΧΕΙΡΙΣΜΟΣ- ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΣΥΝΤΗΡΗΣΗΣ
Συμπυκνωμένο ρυθμιστικό διάλυμα αραίωσης RD5P	895151	1 φιαλίδιο	6 φιαλίδια	21 mL/φιαλίδιο με συμπυκνωμένο πρωτεϊνικό ρυθμιστικό διάλυμα. Το διάλυμα χρησιμοποιείται σε αραίωση 1:5	
Ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης	895003	1 φιαλίδιο	6 φιαλίδια	21 mL/φιαλίδιο με 25 φορές συμπυκνωμένο επιφανειοδραστικό ρυθμιστικό διάλυμα με συντηρητικό. Το διάλυμα μπορεί να γίνει κιτρινωπό με το πέρασμα της ώρας.	
Αντιδραστήριο χρώσης A	895000	1 φιαλίδιο	6 φιαλίδια	12 mL/φιαλίδιο με σταθεροποιημένο υπεροξείδιο του υδρογόνου.	
Αντιδραστήριο χρώσης B	895001	1 φιαλίδιο	6 φιαλίδια	12 mL/φιαλίδιο με σταθεροποιημένο χρωμογόνο (τετραμεθυλοβενζιδίνη).	
Διάλυμα τερματισμού αντίδρασης χρώσης	895032	1 φιαλίδιο	6 φιαλίδια	6 mL/φιαλίδιο 2 N Θεικού οξέος.	
Σφραγιστικές ταινίες		4 ταινίες	24 ταινίες	Αυτοκόλλητες ταινίες	

- **Microplate reader**, κατάλληλος για μέτρηση απορρόφησης στα 450 nm, με το μήκος κύματος διόρθωσης να ρυθμίζεται στα 540 nm ή 570 nm.
- **Απιονισμένο ή αποσταγμένο νερό.**
- **Ψεκαστήρας**, πολλαπλός διανομέας ELISA ή αυτόματη συσκευή πλύσης πλακών αντίδρασης.
- **Σωλήνες βαθμονόμησης 100 mL και 500 mL.**
- **Δοκιμαστικοί σωλήνες για την αραίωση των προτύπων και των δειγμάτων .**

- **PCSK9 Controls** (προαιρετικά), R&D Systems, Catalog # QC138.
- **Ρυθμιστικό διάλυμα Cell Lysis 1** (μόνο για αναλύσεις κυττάρων).
- **Σχεδιάγραμμα σε χαρτί της πλάκας αντίδρασης.**

2.6.3 Λήψη των δειγμάτων και αποθήκευση

Cell Culture Supernates: Με υπερφυγοκέντρωση αφαιρούνται τα μεγάλα σωματίδια και η πειραματική διαδικασία ξεκινάει αμέσως ή το δείγμα υποδιαιρείται και αποθηκεύεται στους -20 °C. Να αποφεύγεται η επαναλαμβανόμενη ψύξη-απόψυξη των δειγμάτων.

Cell lysates: Η λύση των κυττάρων πρέπει να γίνει αμέσως πριν την πειραματική διαδικασία.

Ορός: Συλλέγεται το αίμα σε σωληνάριο διαχωρισμού ορού, αφήνεται για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου μέχρι να πήξει και ύστερα φυγοκεντρείται για 15 λεπτά στα 1000 x g. Αφαιρείται ο ορός και η διαδικασία ξεκινάει αμέσως ή το δείγμα υποδιαιρείται και αποθηκεύεται στους -20 °C. Να αποφεύγεται η επαναλαμβανόμενη ψύξη-απόψυξη των δειγμάτων.

Πλάσμα: Συλλέγεται το πλάσμα σε σωληνάρια με EDTA ή ηπαρίνη, ως αντιπηκτικό. Φυγοκεντρείται για 15 λεπτά στα 1000 x g, μέσα σε 30 λεπτά από τη συλλογή του αίματος. Η πειραματική διαδικασία μπορεί να ξεκινήσει αμέσως ή το δείγμα υποδιαιρείται και αποθηκεύεται στους -20 °C. Να αποφεύγεται η επαναλαμβανόμενη ψύξη-απόψυξη των δειγμάτων. Δεν έχει διαπιστωθεί η δυνατότητα χρήσης κιτρικού για αυτή την πειραματική διαδικασία.

2.6.4 Προετοιμασία των δειγμάτων

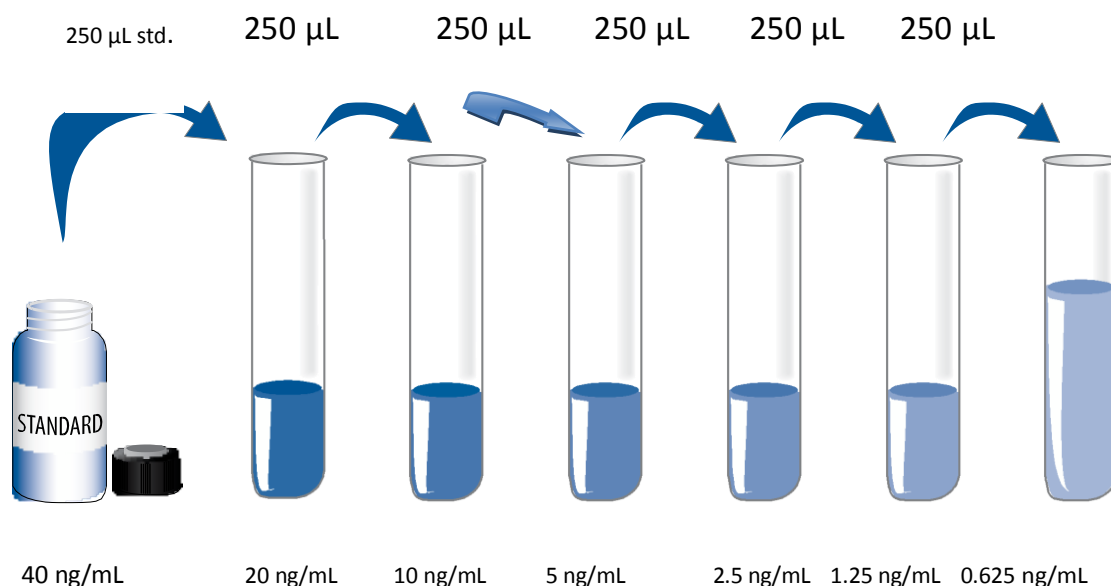
Ο ορός και το πλάσμα απαιτούν 20 φορές αραίωση. Η διαδικασία αραίωσης είναι 20 μ L δείγματος σε 380 μ L Calibrator Diluent RD5P (Αραίωση 1:5, όπως στην παράγραφο προετοιμασίας των αντιδραστηρίων).

Προετοιμασία των αντιδραστηρίων

Όλα τα αντιδραστήρια πρέπει να βρίσκονται σε θερμοκρασία δωματίου πριν από την έναρξη της πειραματικής διαδικασίας.

- **Ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης:** Αν έχουν σχηματιστεί κρύσταλλοι στο φιαλίδιο, αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου και αναδεύεται ελαφρά μέχρι να διαλυθούν οι κρύσταλλοι. 20 mL από το φιαλίδιο προστίθενται σε απιονισμένο ή αποσταγμένο νερό μέχρι τελικού όγκου των 500 mL.
- **Διάλυμα υποστρώματος:** Για την παρασκευή του διαλύματος αναμιγνύονται ίσες ποσότητες από τα αντιδραστήρια χρώσης A και B, 15 λεπτά πριν χρησιμοποιηθούν. Για κάθε πηγαδάκι της πλάκας αντίδρασης θα χρειαστούν 200μL από το μείγμα.
- **Calibrator Diluent RD5P (diluted 1:5).** Για να παρασκευαστούν 100 mL διαλύματος, 20 mL από το φυαλίδιο με το συμπυκνωμένο Calibrator Diluent RD5P, προστίθενται σε 80 mL απιονισμένο νερό (αραίωση 1:5).
- **Standard h-PCSK9.** Γίνεται ανασύσταση της h-PCSK9 με το αραιωμένο Calibrator Diluent RD5P. Η ανασύσταση παράγει Stock διάλυμα 40 ng/mL. Το διάλυμα πρέπει να αναδεύεται μερικές φορές για να εξασφαλιστεί η πλήρης ανασύσταση. Με το πέρας της ανασύστασης το διάλυμα αφήνεται ακίνητο για 15 λεπτά, ενώ πριν από τη χρησιμοποίηση θα πρέπει να αναδεύεται ελαφρά. 250 μL από το αραιωμένο Calibrator Diluent RD5P αποτίθεται με πιπέτα σε κάθε σωληνάριο. Το Stock διάλυμα χρησιμοποιείται για την δημιουργία μιας σειράς διαλυμάτων όπως φαίνεται στο σχήμα 1. Η αδιάλυτη h-PCSK9 Standard (40 ng/mL) χρησιμοποιείται ως η υψηλή συγκέντρωση (standard). Το σκέτο αραιωμένο Calibrator Diluent RD5P χρησιμοποιείται ως το μηδενικό standard (0 ng/mL).

Εικόνα 2.1. Δημιουργία πρότυπων συγκεντρώσεων h-PCSK9 σε Quantikine ELISA τεστ



2.10.5 Πειραματική Διαδικασία

Όλα τα αντιδραστήρια και διαλύματα εργασίας πριν την έναρξη της πειραματικής διαδικασίας πρέπει να βρίσκονται σε θερμοκρασία δωματίου.

- Προετοιμάζονται όλα τα αντιδραστήρια, οι πρότυπες συγκεντρώσεις και τα δείγματα όπως περιγράφηκε στην προηγούμενη ενότητα.
- Απομακρύνονται όλες οι ταινίες από το πλαίσιο της πλάκας αντίδρασης και τοποθετούνται στην αλουμινένια της συσκευασία, όπου περιέχεται το αφυγραντικό. Η συσκευασία σφραγίζεται.
- Το φιαλίδιο με το ρυθμιστικό διάλυμα αραιώσης RD1-9 θερμαίνεται σε θερμοκρασία δωματίου και αναδεύεται ελαφρά για να διαλυθεί τυχόν ίζημα. 100 µL από το RD1-9, αποτίθενται σε κάθε υποδοχή της πλάκας αντίδρασης.
- Προστίθενται 50 µL από το standard (πρότυπο), το κοντρόλ και από το δείγμα (αφού προηγηθεί αραιώση) σε κάθε υποδοχή. Η πλάκα αντίδρασης καλύπτεται με την αυτοκόλλητη ταινία και αφήνεται για επώαση για 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Με το κιτ διατίθεται και ένα σκαρίφημα της

πλάκας, το οποίο χρησιμοποιείται για την καταγραφή των προτύπων και δειγμάτων που εξετάστηκαν, καθώς και για τις θέσεις αυτών.

- Μετά την πάροδο των 2 ωρών αναρροφώνται τα περιεχόμενα των υποδοχών της πλάκας αντίδρασης. Σε κάθε υποδοχή αποτίθενται 400 μL από το ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης με τη βοήθεια ειδικού ψεκαστήρα - πολλαπλού διανομέα ELISA για πλάκα αντίδρασης. Για μέγιστες επιδόσεις είναι απαραίτητη η πλήρης απομάκρυνση του ρυθμιστικού διαλύματος έκπλυσης. Η διαδικασία της έκπλυσης επαναλαμβάνεται ακόμα άλλες τρεις φορές (σύνολο 4 φορές). Μετά την τελευταία έκπλυση, με αναρρόφηση ή απόχυση, απομακρύνεται επιμελώς οποιαδήποτε εναπομείνασα ποσότητα ρυθμιστικού διαλύματος έκπλυσης. Ακολούθως, η πλάκα αντίδρασης αναποδογυρίζεται και αφήνεται πάνω σε διηθητικό χαρτί για να απομακρυνθεί η περίσσεια του ρυθμιστικού διαλύματος έκπλυσης.
- 200 μL h-PCSK9 αποτίθενται σε κάθε υποδοχή, η πλάκα σκεπάζεται με νέα αυτοκόλλητη ταινία και αφήνεται να επωαστεί για δύο ώρες σε θερμοκρασία δωματίου.
- Με το πέρας της επώασης επαναλαμβάνεται η διαδικασία αναρρόφησης/έκπλυσης όπως περιγράφηκε προηγουμένως.
- Προστίθενται 200 μL από το Διάλυμα Υποστρώματος σε κάθε υποδοχή και η πλάκα αφήνεται για επώαση για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Κατά τη διάρκεια της επώασης απαγορεύεται η έκθεση της πλάκας στο φως.
- Έπειτα από 30 λεπτά ακριβώς εναποτίθενται σε κάθε υποδοχή, 50 μL του διαλύματος τερματισμού της αντίδρασης χρώσης με αποτέλεσμα το χρώμα στις υποδοχές να γίνει από μπλε, κίτρινο. Αν το χρώμα σε κάποια υποδοχή γίνει πράσινο ή παραμείνει μπλε, η πλάκα αντίδρασης ανακινείται ελαφρά για να αναμιχθεί καλά το αντιδραστήριο τερματισμού χρώσης.
- Μέσα σε 30 λεπτά προσδιορίζεται η οπτική απορρόφηση για κάθε υποδοχή της πλάκας στα 450 nm, χρησιμοποιώντας microplate reader ή εφόσον υπάρχει η δυνατότητα για διόρθωση μήκους κύματος, στα 540 nm ή 570 nm. Αν δεν υπάρχει η λειτουργία διόρθωσης του μήκους κύματος,

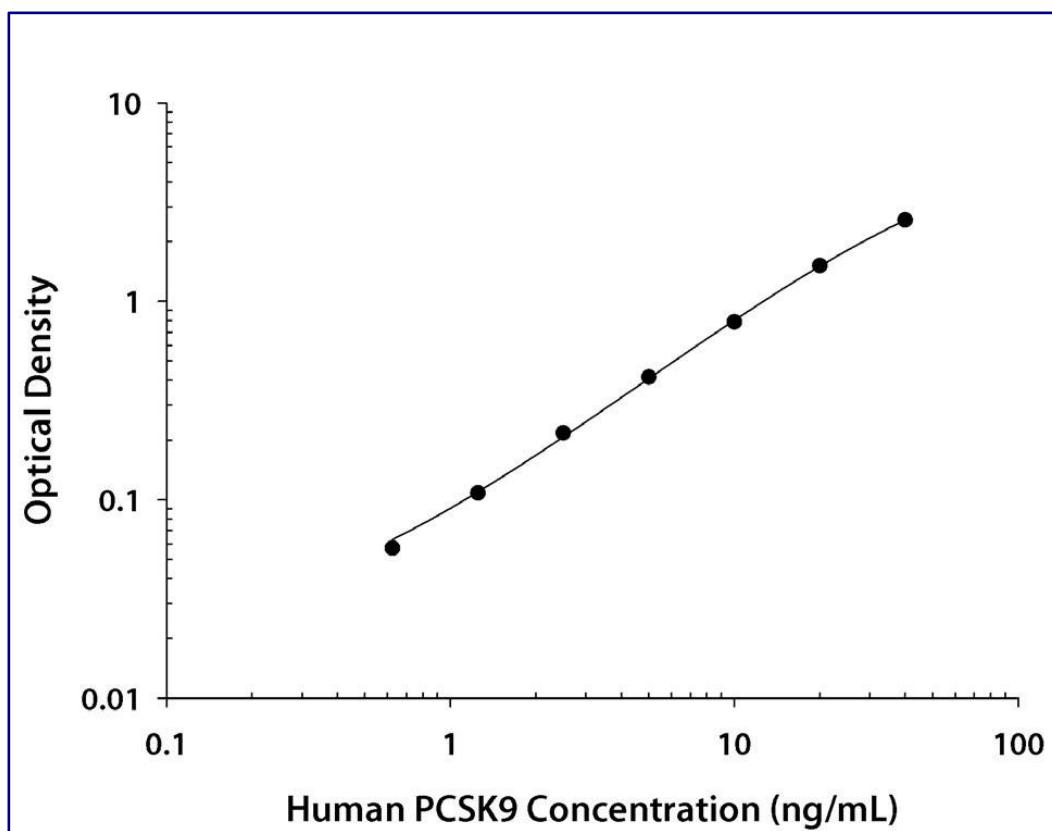
αφαιρούνται οι μετρήσεις στα 540 nm ή 570 nm από τις μετρήσεις στα 450 nm. Αυτή η αφαίρεση θα διορθώσει τυχόν οπτικές ατέλειες της πλάκας αντίδρασης. Μετρήσεις που γίνονται κατευθείαν στα 450 nm, χωρίς διόρθωση μπορεί να είναι υψηλότερες από τις πραγματικές και λιγότερο ακριβείς.

2.6.5 Επεξεργασία των αποτελεσμάτων

Βρίσκεται ο μέσος όρος των δύο μετρήσεων από κάθε πρότυπο, δείγμα ελέγχου (κοντρόλ) και υπό εξέταση δείγμα και αφαιρείται ο μέσος όρος του προτύπου με τη μηδενική οπτική απορρόφηση (O.D.).

Εφόσον υπάρχει κατάλληλο πρόγραμμα σε υπολογιστή, σχεδιάζεται μία καμπύλη προσαρμογής τεσσάρων μεταβλητών (4-PL) και δημιουργείται μία καμπύλη απορρόφησης των προτύπων. Αν δεν διατίθεται ειδικό πρόγραμμα στον υπολογιστή, δημιουργείται γραφικά καμπύλη διαγράμματος ενώνοντας τα σημεία που προκύπτουν από τη μέση τιμή απορρόφησης των πρότυπων διαλυμάτων στον άξονα Y, με τις συγκεντρώσεις τους στον άξονα X. Εάν χρησιμοποιηθούν οι λογάριθμοι των συγκεντρώσεων της h-PCSK9 με τους λογαρίθμους των απορροφήσεών τους, η καμπύλη ευθυγραμμίζεται και η καλύτερη δυνατή ευθεία μπορεί σχηματιστεί με στατιστική ανάλυση παλινδρόμησης (Σχήμα 2). Φυσικά, η κατασκευή του διαγράμματος με τη βοήθεια ειδικού προγράμματος σε ηλεκτρονικό υπολογιστή δίνει πολύ καλύτερα αποτελέσματα. Εάν τα δείγματα είχαν αραιωθεί πριν την πειραματική διαδικασία, η καμπύλη συγκέντρωσης των προτύπων πολλαπλασιάζεται με το συντελεστή αραιώσης.

Διάγραμμα 2.1. Τυπική λογαριθμική καμπύλη απορρόφησης-συγκέντρωσης PCSK9.



2.7 Προσδιορισμός της ενζυμικής ενεργότητας Lp-PLA₂

2.7.1 Αρχή της μεθόδου

Ο προσδιορισμός της ενζυμικής ενεργότητας της Lp-PLA₂ στηρίζεται στη μέτρηση των ραδιοσημανσμένων με [³H] οξικών ομάδων που απελευθερώνονται κατά την υδρόλυση του υποστρώματος [³H] – PAF από το ένζυμο. Κατά την καταβύθιση με τριχλωροξικό οξύ (TCA) οι οξικές ομάδες παραμένουν στο υπερκείμενο του παραγόμενου lyso-PAF και του [³H] – PAF

που δεν διασπάστηκε και η β ακτινοβολία που εκπέμπουν μετράται με μετρητή σπινθηρισμού (68,69). Με τη βοήθεια ειδικών μαθηματικών τύπων ο αριθμός των κρούσεων μετατρέπεται σε ενζυμική ενεργότητα που εκφράζεται ως ο αριθμός των nmoi του ραδιενεργού PAF που διασπάστηκαν από το ένζυμο στη μονάδα του χρόνου από μια συγκεκριμένη γνωστή ποσότητα δείγματος.

2.7.2 Όργανα-αντιδραστήρια

- **PAF** : 1-O-εξαδέκυλο-2-ακετυλο-sn-γλυκερο-3-φωσφοχολίνη, MB: 523.7 g/mol (Sigma).
- **Πρότυπο διάλυμα [^3H]-PAF**: 1-O-εξαδέκυλο-2- [^3H]ακετυλο-sn-γλυκερο-3-φωσφοχολίνη, 0.25 mCi/0.5 mL, 10 Ci/mmol, DuPont New England Nuclear, Boston, MA, USA.
- **Αναδευτήρας.**
- **Υδατόλουτρο (37 °C).**
- **Υγρό σπινθηρισμού** (Scintillation liquid Optiphase Hisafe 3).
- **Μετρητής υγρού σπινθηρισμού** (Packard, Tricarb 2100TR).
- **Μικροφυγόκεντρος για erppendorf.**
- **Υπολογιστικό πρόγραμμα Enzpack.**
- **Τριχλωροξικό οξύ (TCA, Sigma).**
- **Αλβουμίνη βοδινού ορού, ελεύθερη λιπαρών οξέων (BSA, Sigma).**

2.7.3 Διαλύματα εργασίας

- **Ρυθμιστικό διάλυμα HEPES με pH 7.4:** Για την παρασκευή διαλύονται 1.0009 g Hepes, 8.0063 g NaCl, 0.1939 g KCl και 0.7445 g Titriplex III σε 1 L dH₂O. Το pH ρυθμίζεται στο 7.4 και το διάλυμα διατηρείται στους 4 °C.
- **Διάλυμα 20mM PAF.** Διαλύονται 25 mg σκόνης σε 2.387 mL αιθανόλης 80%. Το διάλυμα συντηρείται στους -20 °C.
- **BSA 2.5 mg/mL** (Αλβουμίνη βοδινού ορού, ελεύθερη λιπαρών οξέων). Για την παρασκευή του διαλύματος 25 mg BSA διαλύονται σε 10 mL φυσιολογικού ορού. Το διάλυμα συντηρείται στους -20 °C.
- **BSA 100 mg/mL.** 1 g BSA διαλύεται σε 10 mL φυσιολογικού ορού. Το διάλυμα συντηρείται στους -20 °C.
- **TCA 20%.** 20 g TCA διαλύονται σε 100 mL H₂O. Το διάλυμα συντηρείται στους 4 °C.
- **Διάλυμα C.** Αναμιγνύονται 10μL από το 20mM PAF με 90 μL 80% αιθανόλης.
- **Διάλυμα 25 μM [³H]-PAF.** Σε σωληνάριο πολυπροπυλενίου αναμιγνύονται 12.5 μL από το διάλυμα C με 10 μL από το πρότυπο διάλυμα [³H]-PAF. Εξατμίζονται μέχρι ξηρού σε ρεύμα αζώτου και αναδιασπείρονται σε 1mL BSA 2.5 mg/mL. Το μείγμα αναδεύεται σε VORTEX και επωάζεται στους 37°C για 30 λεπτά. Το διάλυμα συντηρείται στους -20 °C.
- **Διάλυμα 50 μM [³H]-PAF.** Σε σωληνάριο πολυπροπυλενίου αναμιγνύονται 25 μL από το διάλυμα C με 10 μL από το πρότυπο διάλυμα [³H]-PAF. Εξατμίζονται μέχρι ξηρού σε ρεύμα αζώτου και αναδιασπείρονται σε 1mL BSA 2.5 mg/mL. Το μείγμα αναδεύεται σε VORTEX και επωάζεται στους 37 °C για 30 λεπτά. Το διάλυμα συντηρείται στους -20 °C.
- **Διάλυμα 100 μM [³H]-PAF.** Σε σωληνάριο πολυπροπυλενίου αναμιγνύονται 50 μL από το διάλυμα C με 10 μL από το πρότυπο διάλυμα [³H]-PAF. Εξατμίζονται μέχρι ξηρού σε ρεύμα αζώτου και αναδιασπείρονται σε

1mL BSA 2.5 mg/mL. Το μείγμα αναδεύεται σε VORTEX και επωάζεται στους 37 °C για 30 λεπτά . Το διάλυμα συντηρείται στους -20 °C.

● **Διάλυμα 250 μM [³H]-PAF.** Σε σωληνάριο πολυπροπυλενίου αναμιγνύονται 12.5 μL από το PAF 20 mM με 10 μL από το πρότυπο διάλυμα [³H]-PAF. Εξατμίζονται μέχρι ξηρού σε ρεύμα αζώτου και αναδιασπείρονται σε 1mL BSA 2.5 mg/mL. Το μείγμα αναδεύεται σε VORTEX και επωάζεται στους 37 °C για 30 λεπτά. Το διάλυμα συντηρείται στους -20 °C.

● **Διάλυμα 500 μM [³H]-PAF.** Σε σωληνάριο πολυπροπυλενίου αναμιγνύονται 25 μL από το PAF 20 mM με 20 μL από το πρότυπο διάλυμα [³H]-PAF. Εξατμίζονται μέχρι ξηρού σε ρεύμα αζώτου και αναδιασπείρονται σε 1mL BSA 2.5 mg/mL. Το μείγμα αναδεύεται σε VORTEX και επωάζεται στους 37 °C για 30 λεπτά. Το διάλυμα συντηρείται στους -20 °C.

● **Διάλυμα 1000 μM [³H]-PAF.** Σε σωληνάριο πολυπροπυλενίου αναμιγνύονται 50 μL από το PAF 20 mM με 15 μL από το πρότυπο διάλυμα [³H]-PAF. Εξατμίζονται μέχρι ξηρού σε ρεύμα αζώτου και αναδιασπείρονται σε 1mL BSA 2.5 mg/mL. Το μείγμα αναδεύεται σε VORTEX και επωάζεται στους 37 °C για 30 λεπτά . Το διάλυμα συντηρείται στους -20 °C.

2.7.4 Πειραματική διαδικασία

Για την πειραματική διαδικασία ως πηγή του ενζύμου μπορούν να χρησιμοποιηθούν εξίσου:

- 5 μg πρωτεΐνης Lp(a) ή 50 μL από κάθε κλάσμα που συλλέχθηκε από τη στήλη lysine-Sepharose 4B
- 90 μL από κάθε κλάσμα που συλλέχτηκε έπειτα από την αναγωγική διάσπαση της Lp(a)
- 50 μL πλάσματος (αραιωμένου 1/50 v/v με 10 mM HEPES με pH 7.4).

Τα δείγματα αναμιγνύονται με ρυθμιστικό διάλυμα HEPES pH 7.4 μέχρι τελικού όγκου 90μL. Για τη μέτρηση των κινητικών σταθερών του ενζύμου χρησιμοποιούνται διαλύματα [³H]-PAF σε τελικές συγκεντρώσεις από 2.5 έως 100 μM.

Σε σωλήνα erppendorf προστίθενται 90 μL δείγματος. Παράλληλα ετοιμάζεται και ένα δείγμα ελέγχου («τυφλό»), όπου αντί για Lp(a) χρησιμοποιούνται 90 μL διάλυμα HEPES με pH 7.4. Τα erppendorf τοποθετούνται σε υδατόλουτρο. Έπειτα προστίθενται 10 μL [³H]-PAF τόσο στο δείγμα όσο και στο τυφλό. Τα δείγματα επωάζονται για 10 λεπτά στους 37°C και η αντίδραση τερματίζεται με την προσθήκη 20 μL BSA 100 mg/mL. Στη συνέχεια τα erppendorf αναδεύονται ισχυρά σε Vortex και έπειτα τοποθετούνται σε παγόλουτρο για 12 λεπτά τουλάχιστον. Ακολούθως, στα erppendorf προστίθενται 80 μL διαλύματος TCA 20% και υποβάλλονται εκ νέου σε ισχυρή ανάδευση σε Vortex. Έπειτα τοποθετούνται σε παγόλουτρο για άλλα 30 λεπτά. Τα δείγματα φυγοκεντρώνονται σε μικροφυγόκεντρο erppendorf για 5 min στις 10.000 στροφές. Συλλέγονται 100μL από το υπερκείμενο τα οποία τοποθετούνται σε ειδικό σωληνάριο μαζί με 2mL από το υγρό σπινθηρισμού και αφού αναδευτούν ισχυρά μεταφέρονται στο μετρητή σπινθηρισμού. Η μέτρηση διαρκεί 3 min και το αποτέλεσμα δίνεται σε κρούσεις ανά λεπτό (cpm).

Για να υπολογιστεί η ειδική ενεργότητα (E.E.) στο μετρητή σπινθηρισμού, μετρούνται επίσης και οι κρούσεις 10 μL των διαλυμάτων [³H]-PAF 2.5-100 μM για τον υπολογισμό της ειδικής ενεργότητας (E.E.). Έτσι, πχ τα 10 μM [³H]-PAF 2.5 μM περιέχουν 0.25 nmol [³H]-PAF, άρα:

$$E.E. = \text{ΚΡΟΥΣΕΙΣ}/\text{nmol } [^3\text{H}]\text{-PAF} = \text{cpm}_{\text{st}}/0.25$$

Όμοια υπολογίζεται η ειδική ενεργότητα και των υπολοίπων διαλυμάτων [³H]-PAF.

Υπολογισμός της ενζυμικής ενεργότητας

Στο μετρητή υγρού σπινθηρισμού μετρούνται οι κρούσεις των 100 μL του δείγματος (cpm_δ) και του δείγματος ελέγχου (cpm_τ). Πριν από τη μέτρηση

υπήρχε συνολικά όγκος 200 μL , ο οποίος δίνει $2 \times \text{cpm}_\delta$ κρούσεις από τις οποίες αφαιρούνται οι κρούσεις που οφείλονται στο δείγμα ελέγχου (τυφλό) $2 \times \text{cpm}_\tau$. Άρα οι καθαρές κρούσεις που οφείλονται στο δείγμα είναι

$2 \times (\text{cpm}_\delta - \text{cpm}_\tau)$. Έτσι η ενεργότητα της Lp-PLA_2 υπολογίζεται από τον παρακάτω τύπο:

$$\text{ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑ } \text{Lp-PLA}_2 = \frac{2 \times (\text{cpm}_\delta - \text{cpm}_\tau) \times 1000}{\text{Ειδική Ενεργότητα} \times A \times B}$$

Όπου:

cpm_δ είναι οι κρούσεις που αποδίδουν τα 100 mL του δείγματος

cpm_τ είναι οι κρούσεις που αποδίδουν τα 100 mL του «τυφλού»

A είναι τα μg πρωτεΐνης ή τα μL εναιωρήματος

B είναι ο χρόνος επώασης του δείγματος σε λεπτά.

Δηλαδή η ενεργότητα της Lp-PLA_2 εκφράζεται ως nmol του $[^3\text{H}]\text{-PAF}$ που αποικοδομούνται ανά mg πρωτεΐνης ή ανά mL εναιωρήματος ή ανά mg λιποπρωτεϊνικής μάζας, το λεπτό. Οι φαινόμενες τιμές K_m , $V_{\max}$ υπολογίζονται με την εξίσωση Hanes-Dixon's χρησιμοποιώντας το υπολογιστικό πρόγραμμα Enzpack.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΟΥ ΠΛΗΘΥΣΜΟΥ ΜΕΛΕΤΗΣ

Στην παρούσα μελέτη πήραν μέρος 20 άτομα (8 άνδρες/12 γυναίκες) που ελάμβαναν υπολιπιδαιμική αγωγή, με Lp(a) ≥ 40 mg/dL. Στα δείγματα αίματος απομονώθηκε η Lp(a) με υπερφυγοκέντρωση και η HDL με αντιδραστήριο καταβύθισης και μετρήθηκε το ποσοστό της PCSK9 στο ολικό πλάσμα, καθώς και στο κλάσμα της HDL. Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε για την απομόνωση της Lp(a) προκάλεσε την αποδέσμευση της PCSK9 από το Lp(a) σωματίδιο (70,71) δίνοντας ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα και επομένως δεν έγινε δυνατή η μέτρηση της PCSK9 στο κλάσμα της Lp(a).

Στη μελέτη επίσης έλαβαν μέρος και 18 υγιείς μάρτυρες (13 άνδρες/5 γυναίκες) παρόμοιας ηλικίας και δείκτη μάζας – σώματος (BMI) που δεν ελάμβαναν υπολιπιδαιμική αγωγή και είχαν τιμές Lp(a) εντός των φυσιολογικών ορίων ($Lp(a) \leq 10$ mg/dL). Τα κλινικά και βιοχημικά χαρακτηριστικά του πληθυσμού της μελέτης φαίνονται στον πίνακα 3.1.

Πίνακας 3.1 Κλινικά και βιοχημικά χαρακτηριστικά του πληθυσμού της μελέτης

Παράμετρος	Ομάδα ελέγχου (n=18) Μέση τιμή +/- σταθερή απόκλιση	Ασθενείς με Lp(a) ≥ 40 mg/dL (n=20) Μέση τιμή +/- σταθερή απόκλιση
Φύλλο (άνδρες / γυναίκες)	13/5	8/12
Ηλικία (έτη)	46 +/-6	46 +/-8.5
B.M.I. (Kg/m ²)	27 +/- 1.4	27 +/-1.3
PLASMA PCSK9 (ng/mL)	332 +/-77	600 +/-171
HDL PCSK9 (ng/mL)	121 +/-29	172 +/-64
Non-HDLPCSK9 (ng/mL)	215 +/-76	428 +/-139
Ολική χοληστερόλη (mg/dL)	165 +/-54	180 +/-52
HDL χοληστερόλη (mg/dL)	37 +/-11	49 +/-12
Τριγλυκερίδια (mg/dL)	118* (260) ¹	109* (205) ¹
LDL χοληστερόλη (mg/dL)	100 +/-41	109 +/-47
Lp(a) χοληστερόλη (mg/dL)	–	89* (93) ¹

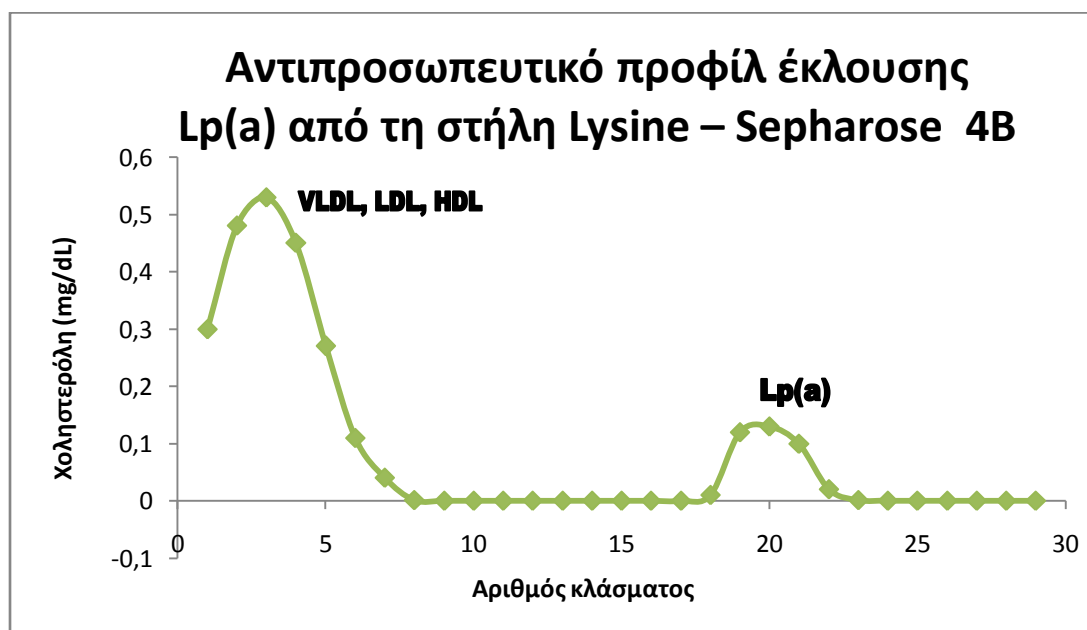
(*) διαμέσος

(¹) εύρος

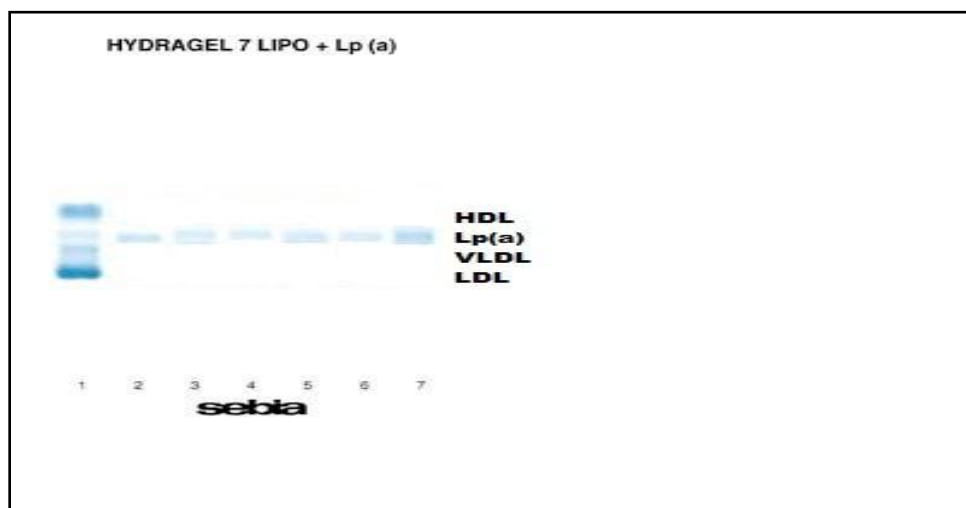
3.2 Απομόνωση και ταυτοποίηση Lp(a)

Όλα τα άτομα που εμφάνιζαν υψηλά επίπεδα Lp(a) είχαν συγκέντρωση Lp(a) πλάσματος ≥ 40 mg/dL. Ο καθορισμός αυτής της συγκέντρωσης έγινε με δεδομένο ότι μόνο με τέτοια ή μεγαλύτερη συγκέντρωση είναι δυνατή η απομόνωση ικανής ποσότητας Lp(a) για τον ποσοτικό προσδιορισμό της PCSK9 στο κλάσμα της Lp(a). Η Lp(a) απομονώθηκε από τα έξι πρώτα άτομα με χρωματογραφία συγγένειας με τη στήλη Lysine – Sepharose 4B, όπως περιγράφεται στη μεθοδολογία. Στα κλάσματα που ελήφθησαν από τη στήλη έγινε προσδιορισμός του περιεχομένου σε χοληστερόλη (γράφημα 3.1) και στη συνέχεια έγινε ηλεκτροφόρηση με το κιτ της SebiaHydragelLipo + Lp(a) για τον έλεγχο της καθαρότητας της Lp(a) (εικόνα 3.1) και ποσοτικός προσδιορισμός της PCSK9. Η μέθοδος αυτή επιτρέπει τον εκλεκτικό διαχωρισμό της Lp(a) από τις υπόλοιπες λιποπρωτεΐνες αλλά επηρεάζει την PCSK9, η οποία αποδεσμεύεται από τα λιποπρωτεϊνικά σωματίδια αφού τα κλάσματα έδωσαν ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα στον ποσοτικό έλεγχο της PCSK9 (71).

Διάγραμμα 3.1. Προφίλ έκλυσης της Lp(a) από τη στήλη Lysine-Sepharose 4B.



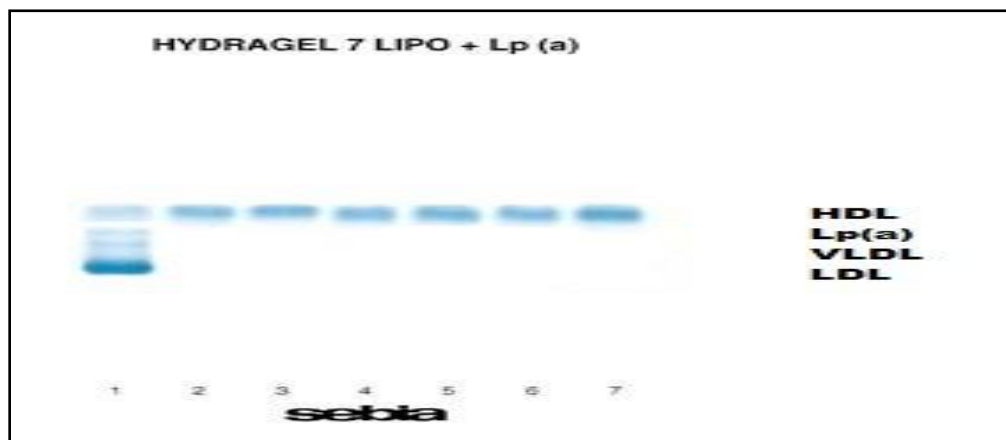
Εικόνα 3.1. Ηλεκτροφόρηση των κλασμάτων της Lp(a) των έξι πρώτων ατόμων της ομάδας με Lp(a) ≥ 40 mg/dL.



3.3 Απομόνωση και ταυτοποίηση των HDL

Η απομόνωση της HDL έγινε με καταβύθιση των apo-B λιποπρωτεϊνών σε φρέσκο πλάσμα, όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο 2. Ακολούθησε ηλεκτροφόρηση των HDL κλασμάτων με το κιτ Hydragellipo + Lpa (εικόνα 3.2). Στα HDL κλάσματα έγινε ποσοτικός προσδιορισμός της PCSK9, οπότε ελέγχθηκε και το αντιδραστήριο καταβύθισης για τυχόν ψευδώς θετική ή αρνητική αντίδραση.

Εικόνα 3.2. Αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης των HDL κλασμάτων.



3.3.1 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑΣ ΤΗΣ Lp-PLA₂

Στα δείγματα του πληθυσμού μελέτης έγινε προσδιορισμός της ενεργότητας του ενζύμου Lp-PLA₂, τόσο στο πλάσμα όσο και στα HDL σωματίδια, με σκοπό να αναζητηθούν τυχόν συσχετίσεις με τα επίπεδα της PCSK9, αλλά και δευτερευόντως με την Lp(a) και τα υπόλοιπα λιποπρωτεϊνικά σωματίδια.

3.4 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΤΩΝ ΜΕΤΡΗΣΕΩΝ

Τα αποτελέσματα των μετρήσεων απεικονίζονται συγκριτικά για τις δυο ομάδες της μελέτης στον κατωτέρω πίνακα 3.2. Στη δεξιά στήλη του πίνακα φαίνονται τα αποτελέσματα της συγκριτικής στατιστικής ανάλυσης t-test των δυο ανεξάρτητων πληθυσμών της μελέτης, από την οποία προκύπτει μεταξύ άλλων που θα αναλυθούν εκτενέστερα σε επόμενο κεφάλαιο ότι στην ομάδα των ατόμων με αυξημένη συγκέντρωση Lp(a) υπάρχει στατιστικά σημαντικά αυξημένη συγκέντρωση της PCSK9 του πλάσματος, της HDL-PCSK9, καθώς και της ενεργότητας της Lp-PLA₂ στα HDL σωματίδια.

Πίνακας 3.2. Αποτελέσματα των μετρήσεων.

Παράμετρος	Ασθενείς με Lp(a)≥40 mg/dL (n=20)			Ομάδα ελέγχου (n=18)			ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ t-TEST (p)
	Μέση τιμή	Τυπική απόκλιση	Διακύ- μανση	Μέση τιμή	Τυπική απόκλιση	Διακύ- μανση	
Ηλικία	46.3	8.50	72.33	46.39	6.20	38.49	0.21
B.M.I. (Kg/m ²)	26.68	1.30	1.68	26.61	1.40	2.05	0.12
PLASMA PCSK9 (ng/mL)	599.65	170.83	29182.35	331.89	29.26	5896.69	< 0,05
HDL PCSK9 (ng/mL)	172.15	63.81	4071.08	120.61	29.26	856.13	< 0,05
Non-HDL PCSK9 (ng/mL)	427.96	138.50	19181.58	215.01	75.46	5693.93	0.16
TCHOL (mg/dL)	180.15	51.87	2690.13	164.67	53.69	2882.24	0.56
HDL-CHOL (mg/dL)	48.85	12.11	146.56	38.67	11.15	124.35	0.85
Non-HDL CHOL (mg/dL)	131.30	46.96	2204.85	126.00	47.48	2254.24	0.64
TG (mg/dL)	109.00 *	48.70	2371.43	118.00 *	63.89	4082.27	0.43
LDL-CHOL (mg/dL)	108.65	47.09	2217.50	99.67	40.71	1657.29	0.94
Lp(a) (mg/dL)	88.50 *	31.17	971.73	0	0	0	N/A
PLASMA Lp-PLA ₂ (nmol/min/mL)	66.13	15.55	241.74	63.33	16.39	268.71	0.27
HDL Lp-PLA ₂ (nmol/min/mL)	2.28	0.90	0.81	3.89	2.27	5.16	< 0,05
Non-HDL Lp-PLA ₂ (nmol/min/mL)	63.86	15.32	234.55	59.94	16.06	257.82	0.33

(*) διαμέσος

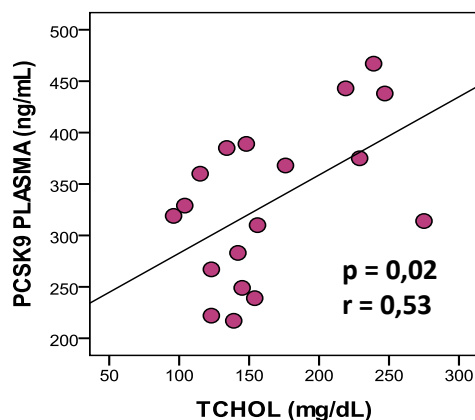
3.5 ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

3.5.1. Ανάλυση συσχετίσεων (correlations)

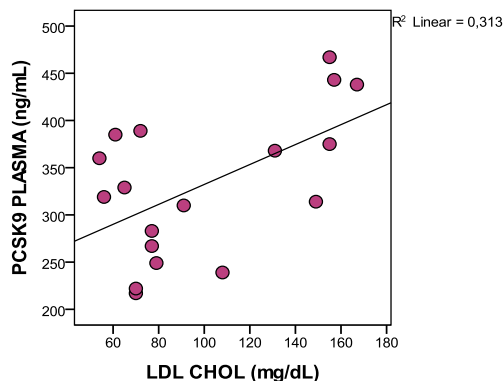
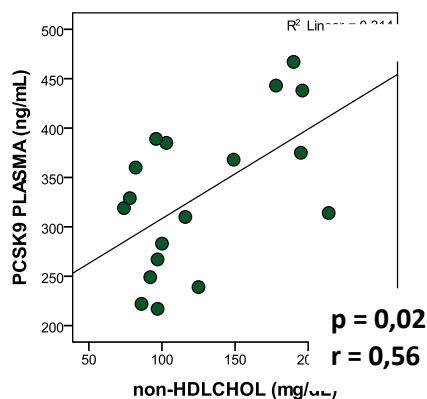
3.5.1.1 Συσχετίσεις ομάδας υγιών μαρτύρων

Πραγματοποιήθηκε στατιστική ανάλυση διαμέσου του ελέγχου των δεικτών στατιστικής συσχέτισης. Στην πρώτη φάση έγινε έλεγχος τυχόν συσχετίσεων μεταξύ των συγκεντρώσεων της PCSK9 του πλάσματος με τις συγκεντρώσεις των υπολοίπων λιπιδίων και λιποπρωτεϊνών. Παρατηρήθηκε θετική συσχέτιση της PCSK9 του πλάσματος με την ολική χοληστερόλη (TCHOL), καθώς και με τη non-HDL και την LDL χοληστερόλη (διαγράμματα 3.2 και 3.3).

Διάγραμμα 3.2. Συσχέτιση μεταξύ της PCSK9 του πλάσματος και της ολικής χοληστερόλης (TCHOL).

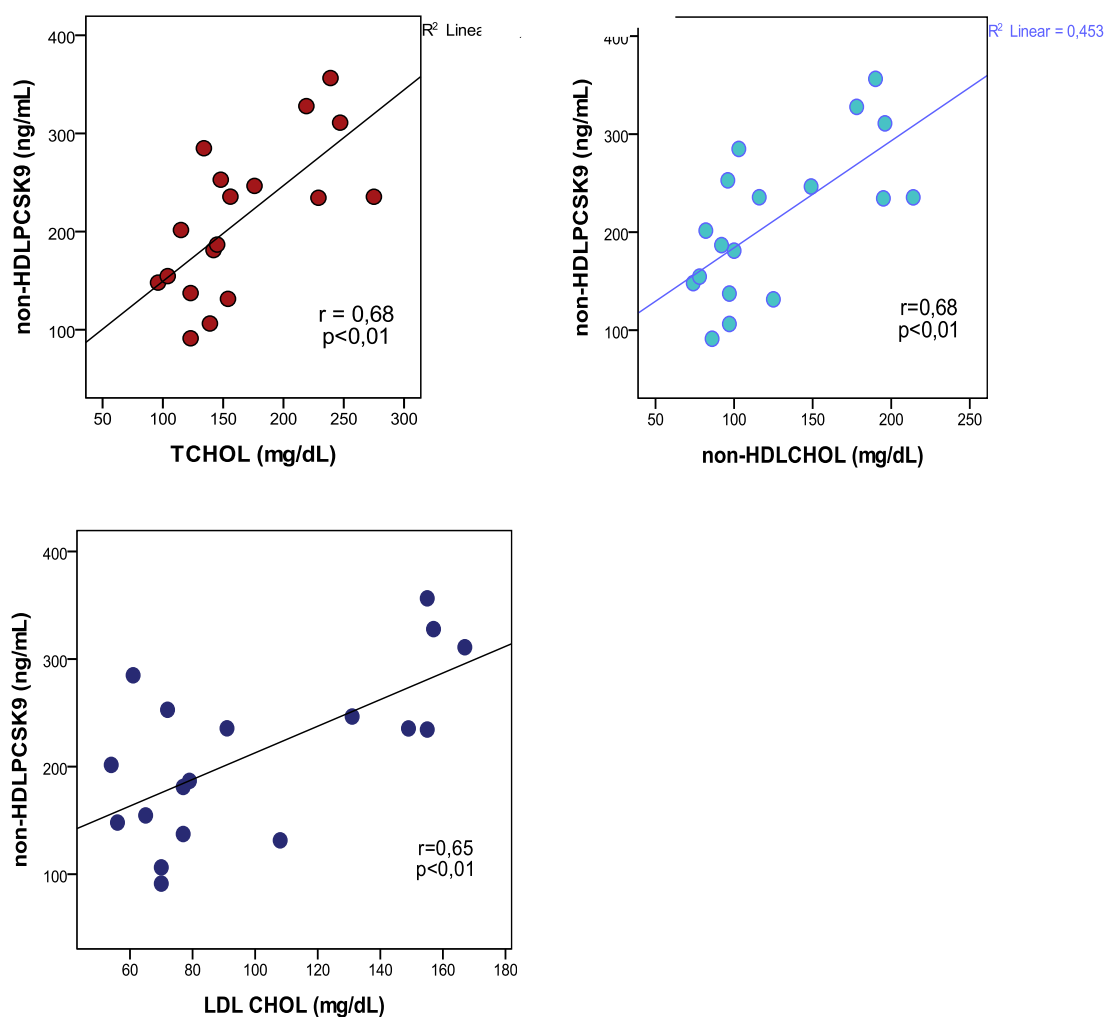


Διάγραμμα 3.3. Συσχετίσεις μεταξύ της PCSK9 του πλάσματος και της non-HDL και της LDL χοληστερόλης.



Παρατηρήθηκαν επίσης θετικές συσχετίσεις μεταξύ της PCSK9 που ανιχνεύεται στα non-HDL σωματίδια (non-HDL PCSK9) με την ολική χοληστερόλη (TCHOL), καθώς και με τη non-HDL και την LDL χοληστερόλη (διάγραμμα 3.4).

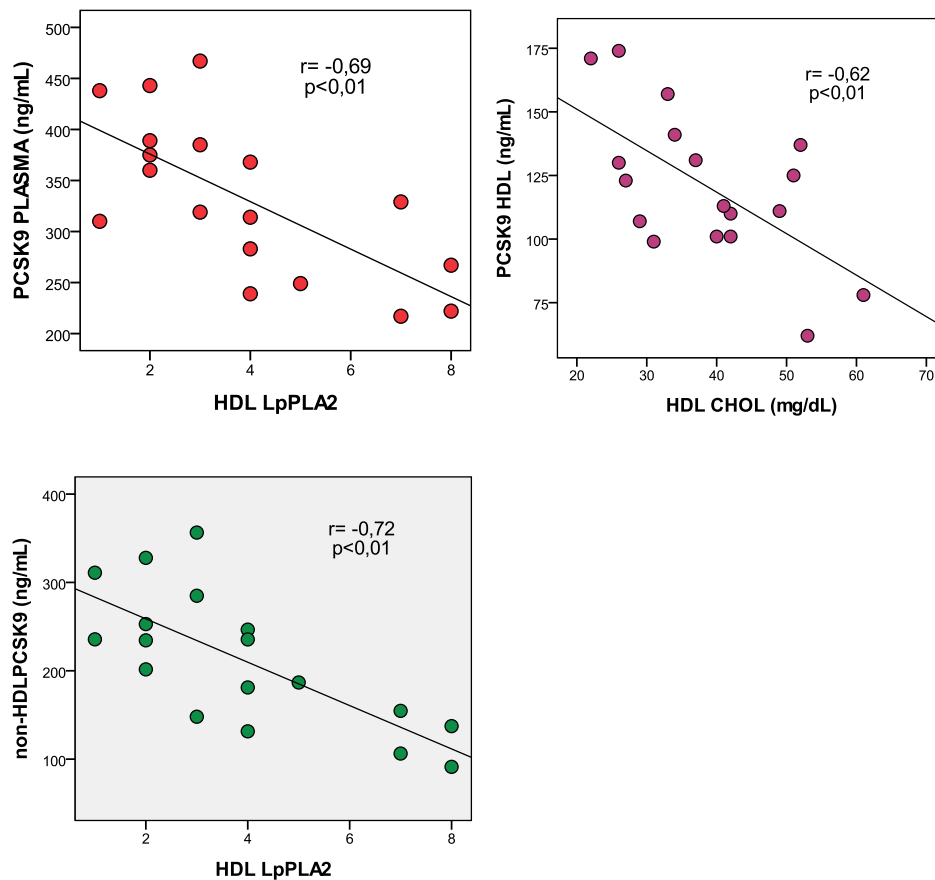
Διάγραμμα 3.4. Συσχετίσεις της PCSK9 στα non-HDL σωματίδια με την ολική, LDL και τη non-HDL χοληστερόλη.



Επιπρόσθετα, παρατηρήθηκαν αρνητικές συσχετίσεις, όπως η συσχέτιση της συγκέντρωσης της PCSK9 στο πλάσμα με την ενεργότητα της Lp-PLA₂ στις HDL και της PCSK9 που ανιχνεύθηκε στα non-HDL σωματίδια με την ενεργότητα της Lp-PLA₂ στις HDL, ενώ παρατηρήθηκε επίσης αρνητική

συσχέτιση μεταξύ της συγκέντρωσης της PCSK9 που ανιχνεύθηκε στα HDL σωματίδια με την HDL χοληστερόλη.

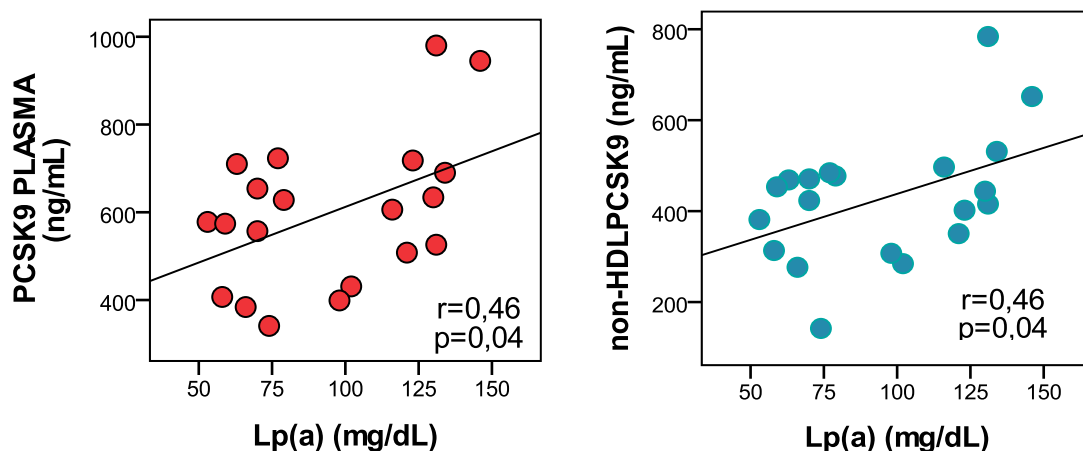
Διάγραμμα 3.5. Αρνητικές συσχετίσεις της PCSK9 του πλάσμα και της PCSK9 στις non-HDL με την ενεργότητα της Lp-PLA₂ στις HDL λιποπρωτεΐνες και της PCSK9 στις HDL με την HDL χοληστερόλη.



3.5.1.2 Συσχετίσεις ομάδας απόρων με αυξημένα επίπεδα Lp(a)

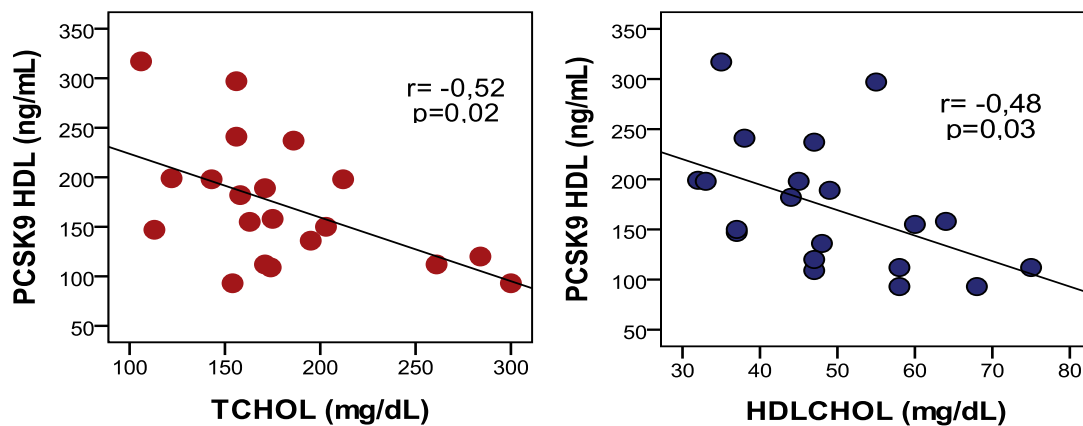
Στον έλεγχο των συσχετίσεων προέκυψε θετική συσχέτιση μεταξύ της συγκέντρωσης της PCSK9 τόσο στο πλάσμα όσο και στα non-HDL σωματίδια με την Lp(a), όπως φαίνεται στο διάγραμμα 3.6

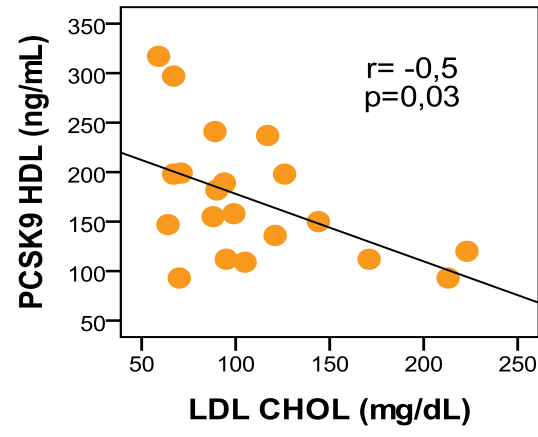
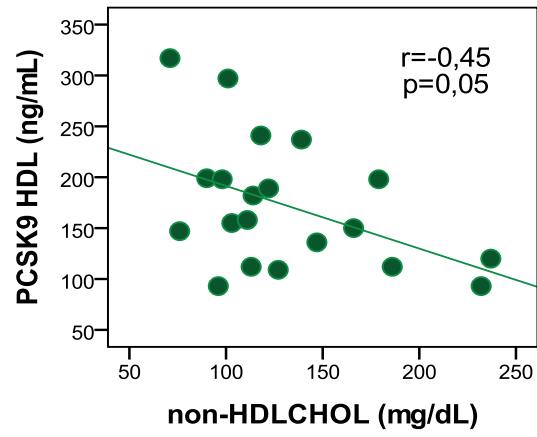
Διάγραμμα 3.6 Θετική στατιστική συσχέτιση της συγκέντρωσης της PCSK9 στο πλάσμα και της PCSK9 στα non-HDL σωματίδια με τη λιποπρωτεΐνη Lp(a).



Πρέπει επίσης να επισημανθεί η αρνητική συσχέτιση μεταξύ της PCSK9 που ανιχνεύθηκε στα HDL σωματίδια με την ολική, HDL, LDL και non-HDL χοληστερόλη, όπως φαίνεται στο διάγραμμα 3.7.

Διάγραμμα 3.7 Αρνητική συσχέτιση της PCSK9 στα HDLσωματίδια με την ολική, HDL, LDL και τη non-HDL χοληστερόλη.

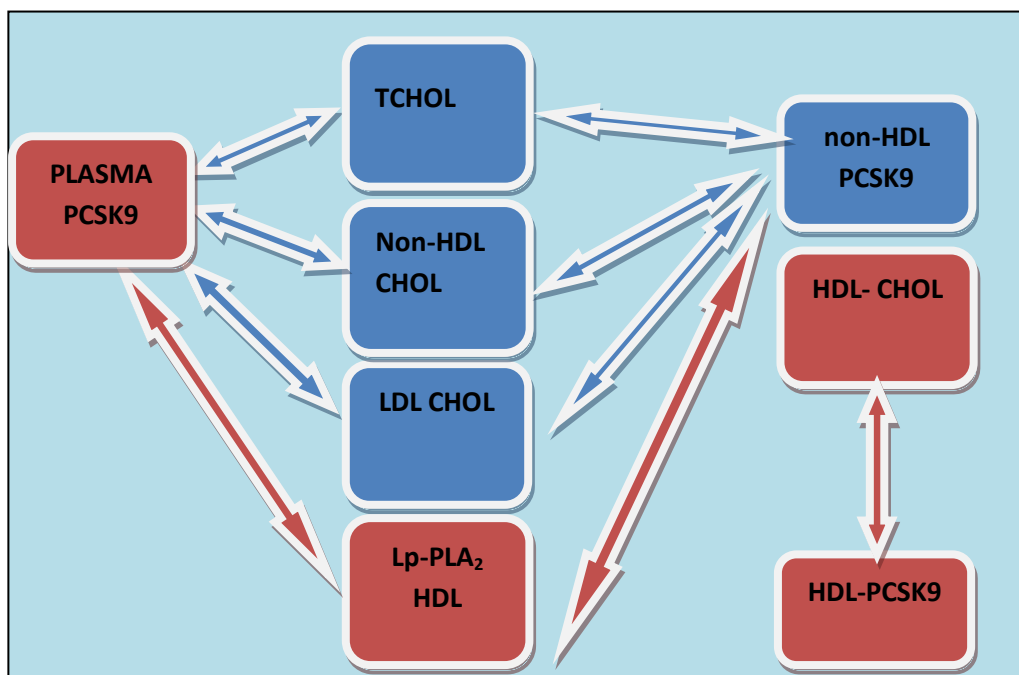




4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Από τη συγκριτική στατιστική ανάλυση των δυο ανεξάρτητων πληθυσμών της μελέτης προκύπτει ότι στην ομάδα των ατόμων με αυξημένα επίπεδα Lp(a) υπάρχει αυξημένη συγκέντρωση της PCSK9 του πλάσματος και της PCSK9 που ανιχνεύθηκε στα HDL σωματίδια και μειωμένη ενεργότητα της Lp-PLA₂ στις HDL λιποπρωτεΐνες (70). Θα πρέπει να επισημανθεί ότι η ομάδα με τα αυξημένα επίπεδα της Lp(a) ελάμβανε θεραπεία με στατίνες, με τη χορήγηση των οποίων παρατηρείται γενικά αύξηση της συγκέντρωσης της PCSK9 (71). Οι συσχετίσεις επαλήθευσαν ήδη γνωστές απόψεις, αλλά δημιούργησαν και καινούργια συμπεράσματα τα οποία χρήζουν περαιτέρω διερεύνησης. Παρακάτω παρατίθεται διάγραμμα με όλες τις στατιστικές συσχετίσεις που προέκυψαν από την πειραματική διαδικασία για την ομάδα ελέγχου. Με τα μπλε βέλη απεικονίζονται οι θετικές συσχετίσεις (αναλογία) και με τα κόκκινα οι αρνητικές (αντίστροφη αναλογία).

Διάγραμμα 4.1 Συσχετίσεις της ομάδας υγιών μαρτύρων.



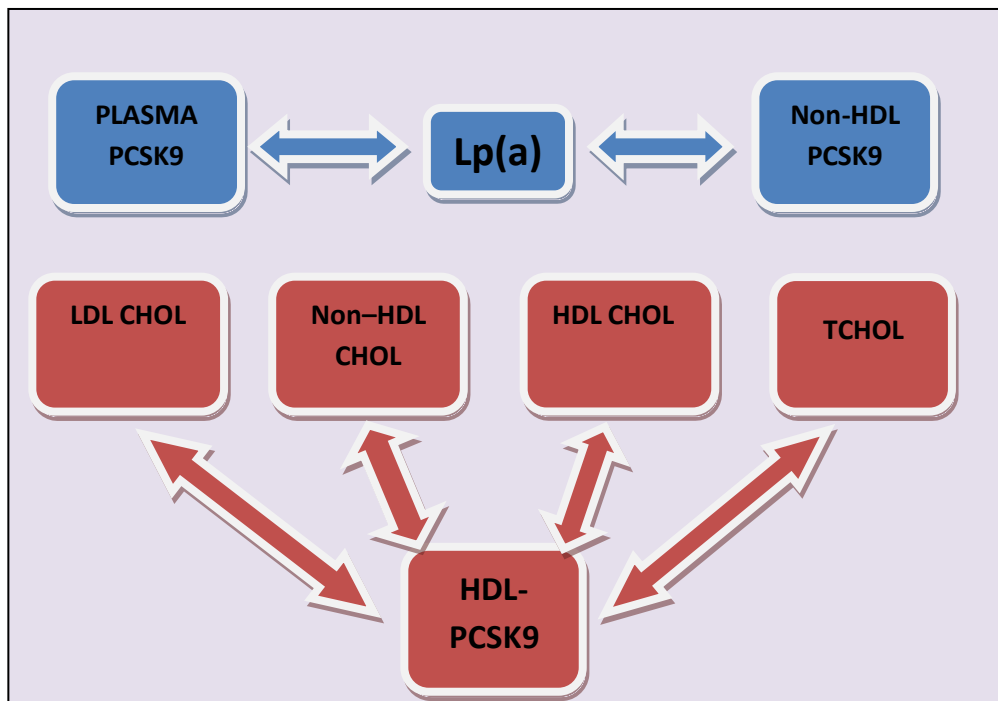
Στην ομάδα ελέγχου παρατηρήθηκε θετική συσχέτιση των τιμών της PCSK9 στο πλάσμα και της PCSK9 των non-HDL σωματιδίων με τις τιμές της ολικής, της LDL και της non-HDL χοληστερόλης.

Επιπρόσθετα, παρατηρήθηκε αρνητική συσχέτιση της συγκέντρωσης της PCSK9 στο πλάσμα με την ενεργότητα της Lp-PLA₂ στα HDL σωματίδια, δηλαδή όσο μεγαλύτερη είναι η συγκέντρωση της PCSK9 στο πλάσμα, τόσο πιο χαμηλή είναι η ενεργότητα της Lp-PLA₂ στα HDL σωματίδια.

Τέλος, αξιοσημείωτη είναι η αρνητική στατιστική συσχέτιση των τιμών της PCSK9 στα HDL σωματίδια με την HDL χοληστερόλη, δηλαδή όσο πιο υψηλή η συγκέντρωση της PCSK9 στις HDL, τόσο πιο χαμηλές είναι οι τιμές της HDL.

Για τις συσχετίσεις της ομάδας με υψηλή συγκέντρωση Lp(a) πλάσματος (≥ 40 mg/dL) παρατίθεται το διάγραμμα 4.2. Με τα μπλε βέλη απεικονίζονται οι θετικές συσχετίσεις (αναλογία), με τα κόκκινα οι αρνητικές (αντίστροφη αναλογία).

Διάγραμμα 4.2 Συσχετίσεις της ομάδας με υψηλά επίπεδα Lp(a).



Όσον αφορά τα συμπεράσματα της ομάδας με τα υψηλά επίπεδα της Lp(a), επαληθεύτηκε η θετική στατιστική συσχέτιση μεταξύ της PCSK9 του πλάσματος και της Lp(a), δηλαδή υψηλή συγκέντρωση της PCSK9 στο πλάσμα σχετίζεται με υψηλές τιμές της Lp(a) (71-74). Η PCSK9 που ανιχνεύθηκε στα HDL σωματίδια εμφάνισε αρνητική συσχέτιση με τη χοληστερόλη, ανεξάρτητα σε ποια σωματίδια ευρίσκεται (ελεύθερη στο πλάσμα ή στα LDL ή στα HDL ή στα non-HDL σωματίδια), ένα γεγονός που υποδεικνύει ότι είναι πιθανό οι HDL λιποπρωτεΐνες να διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στο μεταβολισμό ή στην κάθαρση της PCSK9 (74,75).

Τέλος, το γεγονός ότι παρατηρήθηκε αρνητική συσχέτιση μεταξύ των τιμών της PCSK9 στα HDL σωματίδια και των επιπέδων της HDL χοληστερόλης στο πλάσμα τόσο στην ομάδα των υγείων μαρτύρων όσο και στην ομάδα των ατόμων με τα υψηλά επίπεδα Lp(a), ενισχύει τον πιθανό ρόλο της HDL στο μεταβολισμό της PCSK9 αποτελώντας επιστημονικό πεδίο που χρήζει περαιτέρω έρευνας.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Libby P, Lichtman AH, Hansson GK. Immune Effector Mechanisms Implicated in Atherosclerosis: From Mice to Humans. *Immunity* 2013;38(6):1092-104.
2. McRae F. The role of lipids and lipoproteins in atherosclerosis. NCBI Bookshelf. NBK343489 PMID: 26844337.
3. Libby P. History of Discovery: Inflammation in Atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2012 ;32(9): 2045–2051.
4. Keizer HG. The “Mevalonate hypothesis”: a cholesterol-independent alternative for the etiology of atherosclerosis. *Lipids in Health and Disease* 2012; 11 :149.
5. Forrester J. The Heart Healers: The Misfits, Mavericks, and Rebels Who Created the Greatest Medical Breakthrough of our Lives. St Martin Press, 2015, 1st edition.
6. Gotto AM. Jeremiah Metzger Lecture: Cholesterol, Inflammation and Atherosclerotic Cardiovascular Disease: Is It All LDL? *Trans Am Clin Climatol Assoc.* 2011; 122: 256–289.
7. Lecis C, Segatto M. Cholesterol Homeostasis Imbalance and Brain Functioning: Neurological Disorders and Behavioral Consequences. *Journal of Neurology and Neurological Disorders.* 2014;Vol1:1.
8. Κωτσοβασίλης Κ, Μπέη ΘΑ. Λιποπρωτεΐνες και αθηροσκλήρυνση. *Archives of Hellenic Medicine* 2003; 20(4):384–406.
9. Hoofnagle AN, Heinecke JW. Lipoproteomics: using mass spectrometry-based proteomics to explore the assembly, structure, and function of lipoproteins. *Journal of lipid research.* 2009; 50:1967-1975.
10. Zychlinski AV et al. Absolute quantification of apolipoproteins and 2 associated proteins on human plasma lipoproteins. *J Proteomics* 2014;106:181-90.
11. Feingold KR, Grunfeld C, Introduction to Lipids and Lipoproteins. 2015 Endotext.
12. Julve J et al. Chylomicrons: Advances in biology, pathology, laboratory testing, and therapeutics. *Clin Chim Acta* 2016;455:134-148.

13. Ελισάφ Μ. Διαταραχές του Μεταβολισμού των Λιπιδίων. Παριζιάνος, 2015. 1η έκδοση.
14. Morita SY. Metabolism and Modification of Apolipoprotein B-Containing Lipoproteins Involved in Dyslipidemia and Atherosclerosis. *Biol Pharm Bull.* 2016;39(1):1-24.
15. Li D, Mehta JL. Oxidized LDL, a critical factor in atherogenesis. *Cardiovascular Research* 2005; 68: 353 – 354.
16. Kronenberg F, Utermann G. Lipoprotein(a): resurrected by genetics. *Journal of internal Medecin* 2013; 273(1):6-30
17. Milionis HJ, Mikhailidis DP, Winder AF. Platelets and lipoprotein (a): a brief overview of their role in the pathogenesis of atherothrombosis *Platelets* 1999;10(5):277-84.
18. Scipione CA et al. Mechanistic insights into Lp(a)-induced IL-8 expression: a role for oxidized phospholipid modification of apo(a). *Journal of lipid research* 2015; 56(12):2273-85
19. Kontush A. HDL-mediated mechanisms of protection in cardiovascular disease. *Cardiovascular Research* 2014; 103: 341–349.
20. Rifa N, Warnick GR, Dominiczak RM. *Handbook of Lipoprotein Testing*. AACC press, 2001, 2nd edition.
21. Lamon-Fava S, Diffenderfer MR, Marcovina SM. Lipoprotein(a) metabolism. *Curr Opin Lipidol* 2014; 25:189–19.
22. Bailleul S et al. Lipoprotein (a) in childhood: relation with other Atherosclerosis Risk Factors and Family History of Atherosclerosis. *Clin Chem* 1995;41:241-245.
23. Malaguarnera M, et al. Lipoprotein(a) in Cardiovascular Diseases. *BioMed Res Int* 2014;2013:650989.
24. Tsimikas S et al. Antisense therapy targeting apolipoprotein(a): a randomised, double-blind, placebo-controlled phase 1 study. *The lancet* 2015;86:1472–1483
25. Leibundgut G et al. Determinants of binding of oxidized phospholipids on apolipoprotein (a) and lipoprotein (a). *Journal of Lipid Res* 2013; 54:2815-2830

26. Koschinsky ML, Boffa MB. Lipoprotein(a): truly a prothrombotic factor in cardiovascular disease? *Journal of lipid research*. 2015; pii: jlr.R060582.
27. McConnell JP et al. Lipoprotein(a) mass: A massively misunderstood metric. *Journal of Clin Lipidology* 2014; 8: 550–553.
28. Boffa MB, Koschinsky ML. Update on Lipoprotein(a) as a Cardiovascular Risk Factor and Mediator. *Curr Atheroscler Rep*. 2013;15(10): 360
29. Tsironis L et al. Effect of lipoprotein (a) on platelet activation induced by platelet-activating factor: role of apolipoprotein (a) and endogenous PAF-acetylhydrolase. *Cardiovascular Research* 2004; 63: 130– 138
30. Dieplinger B, Dieplinger H. New Insights into the Assembly and Metabolism of ApoB-Containing Lipoproteins from in vivo Kinetic Studies: Results on Healthy Subjects and Patients with Chronic Kidney Disease, *Lipoproteins - Role in Health and Diseases*, Prof. Gerhard Kostner (Ed.), ISBN: 978-953-51-0773-6, InTech, DOI: 10.5772/51865.
31. Kassner U et al. Lipoprotein(a): An independent causal risk factor for cardiovascular disease and current therapeutic options. *Atherosclerosis Supplements* 2015;18: 263-267
32. Romagnuolo R et al. Lipoprotein(a) Catabolism Is Regulated by Proprotein Convertase Subtilisin/Kexin Type 9 through the Low Density Lipoprotein Receptor. *The Jour Of Biol Chem* 2015; 290 (18): 11649–11662.
33. Yeang C, Cotter B, Tsimikas S. Experimental Animal Models Evaluating the Causal Role of Lipoprotein(a) in Atherosclerosis and Aortic Stenosis. *Cardiovasc Drugs Ther* 2016: pp1-11
34. Tsimikas S et al. Pro-Inflammatory Interleukin-1 Genotypes Potentiate the Risk of Coronary Artery Disease and Cardiovascular Events Mediated by Oxidized Phospholipids and Lipoprotein (a). *Journal of the American College of Cardiology* 2014; 63(17):1724-1734.
35. Hung MY, Witztum JL, Tsimikas S. New Therapeutic Targets for Calcific Aortic Valve Stenosis. *Journal of the American College of Cardiology*. 2014;63(5): 478-480

36. Sharma M et al. Lipoprotein(a) upregulates ABCA1 in liver cells via scavenger receptor-B1 through its oxidised phospholipids. *Journal of Lipid Research* 2015; 56(7):1318-1328
37. Tsimikas S, Tsironis LD, Tselepis AD. New Insights Into the Role of Lipoprotein(a)-Associated Lipoprotein-Associated Phospholipase A₂ in Atherosclerosis and Cardiovascular Disease. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2007;27:2094-2099
38. Telis CC, Tselepis AD. Pathophysiological Role and Clinical Significance of Lipoprotein-Associated Phospholipase A₂ (Lp-PLA₂) Bound to LDL and HDL. *Curr Pharm Des.* 2014;20(40):6256-69.
39. Thompson A et al. Lipoprotein-associated phospholipase A₂ and risk of coronary disease, stroke, and mortality: collaborative analysis of 32 prospective studies. *Lancet.* 2010; 375(9725):1536–1544.
40. Capoulade R et al. Impact of Plasma Lp-PLA₂ Activity on the Progression of Aortic Stenosis. The progressa Study. *JACC Cardiovasc Imaging* 2015;8(1):26-33
- 41 Heistad D, Doshi H. Lipoprotein-Associated Phospholipase A₂ and Aortic Stenosis. *JACC Cardiovascular Imaging* 2015;8(1):34-6.
42. Schmitz G, Orsó E. Lipoprotein(a) hyperlipidemia as cardiovascular risk factor: pathophysiological aspects. *Clin Res Cardiol Suppl* 2015;10:21-25.
- 43 Yang XP et al. Scavenger receptor-BI is a receptor for lipoprotein(a). *J Lipid Res.* 2013;54(9):2450-7.
44. Ελισάφ Μ. Επίδραση Της PCSK9 στο μεταβολισμό των λιπιδίων. *Sanofi newsletter* 2015.
45. Norata GD, Tibolla G, Catapano AL. PCSK9 inhibition for the treatment of hypercholesterolemia: Promises and emerging challenges. *Vascular Pharmacology* 2014;62: 103–111.
46. Κλούρας Ε, Λυπεροπουλος Ε, Ελισάφ Μ. Αναστολή της PCSK9: Μια νέα προσέγγιση στην υπολιπιδαιμική αγωγή. *Arc. of Hel. Medicine* 2015 ;32(1):77-84.
47. Ραλλίδης Λ. Δομή και βιοσύνθεση της proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9). *Sanofi newsletter* 2015.

48. Jamaluddin S et al. Resistin: functional roles and therapeutic considerations for cardiovascular disease. *Br J Pharmacol*. 2012;165(3):622-32.
49. Dragan S, Serban C, Banah M. Proprotein Convertase Subtilisin/Kexin 9 Inhibitors: An Emerging Lipid-Lowering Therapy? *J Cardiovasc Pharmacol Ther*. 2015;20(2):157-68.
50. Ferdinand KC, Nasser SA. PCSK9 Inhibition: Discovery, Current Evidence, and Potential Effects on LDL-C and Lp(a). *Cardiovasc Drugs Ther* 2015; 29(3): 295-308.
51. Ελυσάφ Μ. PCSK9 και φλεγμονή. Sanofi newsletter. 2015.
52. McCloray G, Wood MJ. An overview of the clinical application of antisense oligonucleotides for RNA-targeting therapies. *Current opinion in pharm* 2015; 24:52-58.
53. Thomas GS et al. Mipomersen, an Apolipoprotein B Synthesis Inhibitor, Reduces Atherogenic Lipoproteins in Patients With Severe Hypercholesterolemia at High Cardiovascular Risk. *J Am Coll Cardiol*. 2013;62(23):2178-84.
54. Norata GD, Ballantyne CM, Catapano AL. New therapeutic principles in dyslipidaemia: focus on LDL and Lp(a) lowering drugs. *European Heart Journal* 2013; 34: 1783–1789
55. Raal FJ et al. Reduction in Lipoprotein(a) with PCSK9. Monoclonal Antibody Evolocumab (AMG 145). *Journal of the Ame Col of Card* 2014; 63(13):1278-88.
56. Gaudet D et al. Effect of Alirocumab, a Monoclonal Proprotein Convertase Subtilisin/Kexin 9 Antibody, on Lipoprotein(a) Concentrations (a Pooled Analysis of 150 mg Every Two Weeks Dosing from Phase 2 Trials). *The Amer Jour of Card* 2014;114: 711–715.
57. Graham M et al. Antisense Inhibition of Apolipoprotein(a) to Lower Plasma Lipoprotein(a) Levels in Humans. *Journal of Lipid Research* 2016; 7(3):340-51.
58. Gaziova Z et al. Chemically defined polyethylene glycol siRNA conjugates with enhanced gene silencing effect. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 2014;22: 2320–2326.
59. Lavigne PM, Karas RH. The Current State of Niacin in Cardiovascular Disease Prevention. *Journal of the Amer Col of Card* 2013; 61:440-446

60. Gofman JW, Lindgren FT, Elliot H. Ultracentrifugal studies of lipoproteins of human serum. *J. Biol. Chem.* 1949;179:973–979.
61. Havel RJ, Eder HA, Bragdon JH. The distribution and chemical composition of ultracentrifugally separated lipoproteins in human serum. *J. Clin. Invest.* 1955;34:1345–1353.
62. Doucet C, Huby T, Ruiz J, Chapman MJ, Thillet J. Non-enzymatic glycation of lipoprotein(a) in vitro and in vivo. *Atherosclerosis*.1995;118:135–143.
63. Doucet C, Huby T, Chapman MJ, Thillet J. Lipoprotein[a] in the chimpanzee: relationship of apo[a] phenotype to elevated plasma Lp[a] levels. *J Lipid Res.* 1994;35(2):263-70.
64. Frischmann ME, Kronenberg F, Trenkwalder E et al. In vivo turnover study demonstrates diminished clearance of lipoprotein(a) in hemodialysis patients. *Kidney Int* 2007;71:1036-43.
65. Πατεινάκης Π, Παπαγιάννη Α, Δούμα Σ, Ευστρατιάδης Γ, Μέμμος Δ. Συσχέτιση επιπέδων οστεοπροτεγερίνης με αγγειακές αλλοιώσεις σε ασθενείς υπό χρόνια αιμοκάθαρση. *Ελληνική Νεφρολογία* 2013; 25 (3): 213 – 222.
66. Sun H et al. Lipoprotein(a) Enhances Advanced Atherosclerosis and Vascular Calcification in WHHL Transgenic Rabbits Expressing Human Apolipoprotein(a). *J. Biol. Chem.* 2002; 277(49):47486–47492.
67. Tsimikas S, Tsironis LD, Tselepis AD. New Insights Into the Role of Lipoprotein(a)-Associated Lipoprotein-Associated Phospholipase A2 in Atherosclerosis and Cardiovascular Disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007; 27:2094-2099
68. Tselepis A, Tsoukatos D. A PAF-acetylhydrolase activity in *Tetrahymena pyriformis* cells. *FEBS Lett.* 1991; 288:147-150.
69. Tsironis LD, Katsouras CS, Lourida ES, et al. Reduced PAF acetylhydrolase activity associated with Lp(a) in patients with coronary artery disease. *Atherosclerosis* 2004; 177: 193-201.
70. Constantinides A. et al. Plasma Lipoprotein-associated Phospholipase A2 is inversely correlated with Proprotein Convertase Subtilisin-kexin Type 9. *Arch of Med Research.* 2012;43: 11-14

71. Sahebkar, A., Simental-Mendía, L. E., Guerrero-Romero, F., Golledge, J. and Watts, G. F. (2015), Effect of statin therapy on plasma proprotein convertase subtilisin kexin 9 (PCSK9) concentrations: a systematic review and meta-analysis of clinical trials. *Diabetes Obes Metab.* 2015; 17: 1042–1055
72. Druce I. et al. PCSK9 and triglyceride-rich lipoprotein metabolism. *The Journal of Biomedical Research*, 2015; 29(6):429-436
73. Konerman M. et al. Evidence of dependence of lipoprotein(a) on triglyceride and high-density lipoprotein metabolism. *J Clin Lipidol.* 2012 Jan-Feb;6(1):27-32
74. Tavori H. et al. PCSK9 Association With Lipoprotein(a). *Circ Res.* 2016;119(1):29-35
75. Ferri N. et al. Proprotein Convertase Subtilisin Kexin Type 9 and High-Density Lipoprotein Metabolism: Experimental Animal Models and Clinical Evidence. *Transl Res* 2015; 173, 19-29