



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

**ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΟΣ ΤΟΜΕΑΣ
Β' ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ**

ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΠΛΕΙΟΤΡΟΠΙΚΩΝ ΔΡΑΣΕΩΝ ΥΠΟΛΙΠΙΔΑΙΜΙΚΩΝ ΘΕΡΑΠΕΙΩΝ

Ελισάβετ Μουτζούρη
ΙΑΤΡΟΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2015



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

**ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΟΣ ΤΟΜΕΑΣ
Β' ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ**

ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΠΛΕΙΟΤΡΟΠΙΚΩΝ ΔΡΑΣΕΩΝ ΥΠΟΛΙΠΙΔΑΙΜΙΚΩΝ ΘΕΡΑΠΕΙΩΝ

Ελισάβετ Μουτζούρη
ΙΑΤΡΟΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2015

«Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από το Τμήμα Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνωμών του συγγραφέα, Ν. 5343/32, άρθρο 202, παράγραφος 2 (νομική κατοχύρωση του Ιατρικού Τμήματος)»

Ημερομηνία αίτησης της κ. Μουτζούρη Ελισάβετ: 13-4-2009

Ημερομηνία ορισμού Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: 662^α/26-5-2009

Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:

Επιβλέπων

Μηλιώνης Χαράλαμπος Επίκουρος Καθηγητής Παθολογίας του Τμήματος Ιατρικής της Σχολής Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Μέλη

Ελισάφ Μωυσής Καθηγητής Παθολογίας του Τμήματος Ιατρικής της Σχολής Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Τσελέπης Αλέξανδρος Καθηγητής Βιοχημείας του Τμήματος Χημείας της Σχολής Θετικών Επιστημών του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Ημερομηνία ορισμού θέματος: 7-7-2009

«Σύγκριση των πλειοτροπικών δράσεων των υπολιπιδαιμικών φαρμάκων».

ΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ : 771^α/28-11-2014

Γουδέβενος Ιωάννης	Καθηγητής Παθολογίας-Καρδιολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Παν/μίου Ιωαννίνων
Ελισάφ Μωυσής	Καθηγητής Παθολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Παν/μίου Ιωαννίνων
Τσατσούλης Αγαθοκλής	Καθηγητής Παθολογίας-Ενδοκρινολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Παν/μίου Ιωαννίνων
Τσελέπης Αλέξανδρος	Καθηγητής Βιοχημείας Τμήματος Χημείας του Παν/μίου Ιωαννίνων
Μηλιώνης Χαράλαμπος	Αναπληρωτής Καθηγητής Παθολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Παν/μίου Ιωαννίνων
Μπαϊρακτάρη Ελένη	Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Κλινικής Χημείας του Τμήματος Ιατρικής του Παν/μίου Ιωαννίνων
Λυμπερόπουλος Ευάγγελος	Επίκουρος Καθηγητής Παθολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Παν/μίου Ιωαννίνων

Έγκριση Διδακτορικής Διατριβής με βαθμό «ΑΡΙΣΤΑ» στις 18-2-2015

ΠΡΟΕΔΡΟΣ ΤΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

Μηνάς Πασχόπουλος

Καθηγητής Μαιευτικής-Γυναικολογίας

Η Γραμματέας του Τμήματος



ΜΑΡΙΑ ΚΑΠΙΤΟΠΟΥΛΟΥ

Στους γονείς μου Ορέστη και Ειρήνη

Στον αδερφό μου Δημήτρη

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε στο εργαστήριο Βιοχημείας του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων σε συνεργασία με το Ιατρείο Μελέτης των Διαταραχών του Μεταβολισμού των Λιπιδίων του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων.

Κύριος καθοδηγητής μου σε όλη αυτή την προσπάθεια ήταν ο καθηγητής Παθολογίας κος Μωυσής Ελισάφ. Τον ευχαριστώ πολύ για όλη την υποστήριξή του. Ένας εξαιρετικά ευφυής, αλλά και ένας πολύ αξιόλογος άνθρωπος, του οποίου η συμβολή στην επιστημονική και προσωπική μου εξέλιξη ήταν καθοριστική.

Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα καθηγητή μου, κο Μηλιώνη Χαράλαμπο για όλη τη βοήθεια και την ενθάρρυνση που πάντα μου έδινε καθώς και για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε.

Σημαντικότερος ήταν ο ρόλος του καθηγητή της Βιοχημείας κού Αλέξανδρου Τσελέπη. Τον ευχαριστώ ιδιαίτερα για τη δυνατότητα της διενέργειας των απαραίτητων πειραμάτων για την εκπόνηση της διδακτορικής διατριβής στους χώρους των εργαστηρίων με υπερσύγχρονα μέσα. Του εκφράζω επίσης τις ευχαριστίες μου για την προθυμία του να απαντά σε όλα τα ερωτήματα μου κατά τη διεξαγωγή των πειραματικών διαδικασιών.

Πολύ σημαντική ήταν η συμβολή του Δρα και φίλου Κου Τέλλη στην καθοδήγηση των ιδιαίτερα απαιτητικών και περίπλοκων πειραμάτων.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους τους συνεργάτες του Ιατρείου λιπιδίων για την υπέροχη μακροχρόνια συνεργασία, τις αέναες προσπάθειες για τη συλλογή των δειγμάτων και τη συνεχή τους ενθάρρυνση.

Πίνακας περιεχομένων

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1	1
1.0 ΠΑΘΟΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ ΑΘΗΡΟΣΚΛΗΡΩΣΗΣ	1
1.1 Γενικά	1
1.2 Η συνδεδεμένη με λιποπρωτεΐνες φωσφολιπάση A ₂ (lipoprotein associated phospholipase A ₂ , Lp-PLA ₂).....	5
1.2.1 Βιοχημεία	5
1.2.2 Παθοφυσιολογία	6
1.2.3 Γονιδιακοί πολυμορφισμοί.....	8
1.2.4 Μελέτες πρωτογενούς πρόληψης	8
1.2.5 Μελέτες δευτερογενούς πρόληψης	10
1.3 Οξειδωτικό stress	15
1.3.1 Γενικά	15
1.3.2 F ₂ -ισοπροσάνια (isoprostanes).....	18
1.3.3 Οξειδωμένη LDL	19
1.3.4 Οξειδωμένα φωσφολιπίδια	20
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2	25
2.0 ΟΙ ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ ΤΥΠΟΥ TOLL (TOLL-LIKE RECEPTORS, TLRs)	25
2.1 Γενικά	25
2.2 Η δομή και ο εντοπισμός των TLRs.....	27
2.3 Τα εξωγενή προσδέματα των TLRs	28
2.4 Τα ενδογενή προσδέματα των TLRs	32
2.5 Οι πορείες σηματοδότησης μέσω των TLRs	32
2.5.1 MyD88-εξαρτώμενη πορεία	33
2.5.2 MyD88-ανεξάρτητη πορεία	34
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3	37

3.0 ΟΙ ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ ΤΥΠΟΥ TOLL (TOLL-LIKE RECEPTORS, TLRs) ΚΑΙ Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥΣ ΣΤΗΝ ΑΘΗΡΟΣΚΛΗΡΩΣΗ	37
3.1 Γενικά.....	37
3.2 Αλληλεπίδραση των PAMPs με γνωστούς παράγοντες κινδύνου	38
3.3 TLRs: πειραματικά μοντέλα αθηροσκλήρωσης.....	39
3.4 Πολυμορφισμοί των TLRs και αθηροσκλήρωση	40
3.5 TLRs και οξέα στεφανιαία συμβάματα	45
3.6 TLRs και ενδογενή προσδέματα: ο ρόλος των οξειδωτικά τροποποιημένων λιποπρωτεϊνών	45
3.7 Η ενεργοποίηση των TLRs και ο μεταβολισμός της χοληστερόλης	47
3.8 TLRs και μεταβολικό σύνδρομο	48
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4.....	51
4.0 ΣΤΑΤΙΝΕΣ.....	51
4.1 Γενικά.....	51
4.2 Επίδραση στα λιπίδια.....	56
4.3 Ανεπιθύμητες ενέργειες.....	56
4.4 Πλειότροπες δράσεις.....	58
4.4.1 Παθοφυσιολογικός μηχανισμός πλειότροπων δράσεων	60
4.4.2 Επίδραση στην ενδοθηλιακή λειτουργία	63
4.4.3 Επίδραση στο οξειδωτικό stress.....	63
4.4.4 Αντιφλεγμονώδεις δράσεις	64
4.4.5 Επίδραση στη μη αλκοολική λιπώδη νόσο του ήπατος (non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD)	65
4.4.6 Επίδραση στο μεταβολισμό της γλυκόζης	66
4.4.7 Επίδραση στη νεφρική λειτουργία.....	67
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5.....	71
5.0 ΕΖΕΤΙΜΙΜΠΗ.....	71

5.1 Γενικά	71
5.2 Επίδραση στα λιπίδια	72
5.3 Κλινικές μελέτες.....	73
5.4 Πλειότροπες δράσεις.....	76
5.4.1 Επίδραση στην ενδοθηλιακή λειτουργία.....	76
5.4.2 Επίδραση στο οξειδωτικό stress.....	77
5.4.3 Αντιφλεγμονώδεις δράσεις	77
5.4.4 Επίδραση στη μη αλκοολική λιπώδη νόσο του ήπατος (non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD).....	78
5.4.5 Επίδραση στο μεταβολισμό της γλυκόζης.....	79
5.4.6 Επίδραση στη νεφρική λειτουργία	79
ΣΚΟΠΟΣ	81
Πρωτόκολλο 1.....	81
Πρωτόκολλο 2	81
ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	83
Πρωτόκολλο 1.....	83
ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	83
Ασθενείς της μελέτης.....	83
Αναλυτικές μέθοδοι.....	84
Μέτρηση της hsCRP	85
Υπολογισμός παραμέτρων μεταβολισμού της γλυκόζης	85
Προσδιορισμός των επιπέδων της oxLDL.....	86
Προσδιορισμός των επιπέδων των 8-ισοπροστανίων.....	90
Προσδιορισμός της ενζυμικής ενεργότητας της Lp-PLA ₂	93
Προσδιορισμός της μάζας της Lp-PLA ₂	96
Στατιστική ανάλυση	98
Πρωτόκολλο 2.....	99

ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	99
Ασθενείς της μελέτης	99
Προσδιορισμός της μεμβρανικής έκφρασης των TLR2 και TLR4	99
Προσδιορισμός των επιπέδων των ενδοκυττάρων κυτταροκινών IL-6 και IL-1β σε μονοκύτταρα ολικού αίματος με χρήση κυτταρομετρίας ροής	103
Στατιστική ανάλυση	108
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	111
Πρωτόκολλο 1.....	111
Γενικά.....	111
Μεταβολές των λιπιδαιμικών παραμέτρων και της hsCRP	113
Επίδραση της υπολιπιδαιμικής αγωγής σε δείκτες μεταβολισμού της γλυκόζης	117
Επίδραση της υπολιπιδαιμικής αγωγής στα επίπεδα πλάσματος και την κλασματική απέκκριση του ουρικού οξέος, των ηλεκτρολυτών και σε παράμετρους της νεφρικής λειτουργίας.....	120
Επίδραση της υπολιπιδαιμικής αγωγής στα επίπεδα της oxLDL και στα επίπεδα των 8-ισοπροστανίων	124
Επίδραση της υπολιπιδαιμικής αγωγής στην ενεργότητα, τη μάζα και την ειδική ενεργότητα της Lp-PLA ₂ του πλάσματος	127
Ασφάλεια της αγωγής-ανεπιθύμητες ενέργειες.....	129
Πρωτόκολλο 2.....	129
Γενικά.....	129
Επίδραση της υπολιπιδαιμικής αγωγής στη μεμβρανική έκφραση των TLR2 και TLR4 σε μονοκύτταρα ολικού αίματος	133
Επίδραση της υπολιπιδαιμικής αγωγής στα επίπεδα των ενδοκυττάρων κυτταροκινών IL-6 και IL-1β σε μονοκύτταρα ολικού αίματος με χρήση κυτταρομετρίας ροής	136
Ασφάλεια της αγωγής-ανεπιθύμητες ενέργειες.....	139
ΣΥΖΗΤΗΣΗ	141
Πρωτόκολλο 1.....	141

Επίδραση της σιμβαστατίνης, του συνδυασμού σιμβαστατίνης/εζετιμίμπης και της ροσουβαστατίνης στο μεταβολισμό της γλυκόζης.....	141
Επίδραση της σιμβαστατίνης, του συνδυασμού σιμβαστατίνης/εζετιμίμπης και της ροσουβαστατίνης στο μεταβολισμό του ουρικού οξέος, των ηλεκτρολυτών και σε παραμέτρους της νεφρικής λειτουργίας	144
Επίδραση της σιμβαστατίνης, του συνδυασμού σιμβαστατίνης/εζετιμίμπης και της ροσουβαστατίνης στα επίπεδα πλάσματος των 8-ισοπροστανίων, της oxLDL, της μάζας και της ενεργότητας της Lp-PLA ₂	147
Πρωτόκολλο 2	150
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	155
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	157
SUMMARY	161
ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ	165
ΣΥΝΤΟΜΕΥΣΕΙΣ.....	169
ΣΥΝΤΟΜΕΥΣΕΙΣ.....	169
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΑΝΑΦΟΡΕΣ.....	175

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

1.0 ΠΑΘΟΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ ΑΘΗΡΟΣΚΛΗΡΩΣΗΣ

1.1 Γενικά

Η θεωρία ότι η χρόνια χαμηλού βαθμού φλεγμονή διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην έναρξη και στην πρόοδο της αθηροσκλήρωσης επισημάνθηκε πρώτη φορά το 17^ο και το 18^ο αιώνα ιδιαίτερα μετά από τις παρατηρήσεις σημαντικών γερμανών παθολογοανατόμων (1).

Η φλεγμονώδης απάντηση του ξενιστή και η συνεπακόλουθη ενεργοποίηση της κυτταρικής και της χυμικής απόκρισης είναι σημαντικές για την άμυνα του οργανισμού εναντίον των λοιμώξεων και για την επιδιόρθωση των ιστών που υπέστησαν βλάβη. Ωστόσο, η επιμένουσα χρόνια φλεγμονή μπορεί να προκαλέσει την έναρξη και την εξέλιξη εκφυλιστικών χρόνιων νοσημάτων, όπως η αθηροσκλήρωση και η αγγειοπάθεια που συσχετίζεται με αυτοάνοσες παθήσεις, όπως η ρευματοειδής αρθρίτιδα. Αν και η οξεία φλεγμονώδης απάντηση είναι φυσιολογική και απαραίτητη, η χρόνια φλεγμονή αποτελεί μία παρέκκλιση της φυσιολογικής απάντησης.

Σε όλη τη διάρκεια του 19^{ου} και του 20^{ου} αιώνα, οι φυσιολόγοι και παθολόγοι προσπάθησαν να δώσουν τα βασικά χαρακτηριστικά των βιολογικών αλλαγών που διαδραματίζονται στο αγγειακό τοίχωμα κατά την αθηρογένεση.

Το 1958, ο Russell Holman και η ομάδα του περιγράφουν τις λιπώδεις πλάκες (fatty streaks) ως τα πιο πρώιμα σημεία της αθηροσκλήρωσης (2, 3). Μεταγενέστερες μελέτες καταδεικνύουν ότι οι λιπώδεις πλάκες εξελίσσονται σε ινώδεις πλάκες, που μπορούν να επιπλακούν με αιμορραγία, εξέλκωση και θρόμβωση. Παράλληλα αναγνωρίζεται ότι στους περιβάλλοντες ιστούς πυροδοτείται μια βραδέως εξελισσόμενη φλεγμονώδης αντίδραση .

Το 1973, οι Russell Ross και John Glomset περιγράφουν για πρώτη φορά τη συσσώρευση λείων μυϊκών ινών καθώς και τη μετανάστευσή τους για τη δημιουργία της αθηροσκληρωτικής πλάκας (4). Επίσης από τον Russell Ross διερευνάται ο ρόλος της ενδοθηλιακής βλάβης και η είσοδος των μακροφάγων στην αθηροσκληρωτική πλάκα (5, 6). Επιπλέον προσδιορίζεται ο ρόλος των T-λεμφοκυττάρων (7).

Η θεώρηση της αθηροσκλήρωσης ως φλεγμονώδη νόσο υποστηρίζεται και από τους Ira Tabas και Kevin Williams, που επισημαίνουν ότι η αθηρογένεση είναι μια απάντηση στην συσσώρευση λιπιδίων και λιποπρωτεϊνών στο αρτηριακό τοίχωμα, η οποία αποτελεί το εναρκτήριο συμβάν (8). Τις τελευταίες δύο δεκαετίες έχουν ταυτοποιηθεί πολλοί από τους φλεγμονώδεις διαμεσολαβητές της αθηρογένεσης, όπως οι κυτταροκίνες, οι χυμοκίνες και οι αυξητικοί παράγοντες (9).

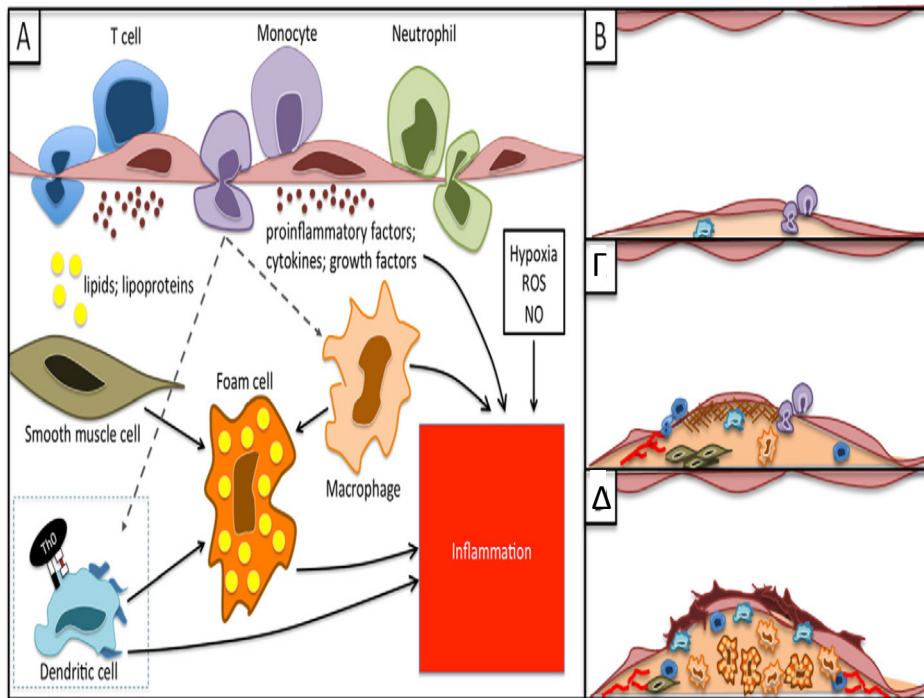
Η φλεγμονή στο κυτταρικό τοίχωμα αποτελεί έναν καταρράκτη που αρχίζει με την ενεργοποίηση των ενδοθηλιακών κυττάρων οδηγώντας στην έκφραση ενδοκυττάρων προσκολλητικών μορίων (intracellular cell adhesion molecules, ICAM), αγγειακών κυτταρικών προσκολλητικών μορίων (vascular cell adhesion molecules, VCAM), σελεκτινών (selectins), ιντεγκρινών (integrins) και την παραγωγή και την απελευθέρωση προφλεγμονωδών κυτταροκινών και χυμοκινών, όπως ο παράγοντας νέκρωσης των όγκων (tumour necrosis factor- α , TNF- α), ιντερλευκίνες (interleukin, IL), οι ιντερφερόνες (interferons, IFNs), και η χημειοτακτική πρωτεΐνη των μονοκυττάρων-1 (monocyte chemoattractant protein-1, MCP-1). Η φλεγμονώδης απάντηση ενισχύεται και από άλλους σημαντικούς παράγοντες, όπως η ιστική υποξία και οι αντιδραστικές ελεύθερες ρίζες (reactive oxygen species, ROS). Όσο αυξάνονται οι διαστάσεις του έσω χιτώνα εξαιτίας της συσσώρευσης των λείων μυϊκών ινών, οι ανάγκες για οξυγόνο και θρεπτικά συστατικά μειώνονται και δημιουργούνται συνθήκες υποξίας. Η κατακράτηση λιποπρωτεϊνών και η τροποποίησή τους προάγει τη δημιουργία ενός εκφυλισμένου πυρήνα πλούσιου σε λιπίδια (lipid-rich degenerative core) που επάγει περαιτέρω την τοπική υποξία. Το αποτέλεσμα είναι η έκφραση αγγειογενετικών γονιδίων, όπως ο αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας (vascular endothelial growth factor, VEGF). Ο VEGF προάγει την αγγειογένεση στις υποξικές περιοχές για την αποκατάσταση της αιμάτωσης διαμέσου της δημιουργίας των vasa vasorum (αγγεία των αγγείων) (10). Τα vasa vasorum εμπλέκονται στην υπερπλασία του έσω χιτώνα, αφού συμβάλλουν στην είσοδο λευκοκυττάρων μέσα στην αθηροσκληρωτική πλάκα, επιτρέπουν την αιμάτωση του αγγειακού τοιχώματος πέρα από τα όρια διάχυσης διαμέσου του αγγειακού αυλού ή αιμορραγούν μέσα στην αθηροσκληρωτική πλάκα (10).

Η απάντηση των T-λεμφοκυττάρων, σε συνθήκες υποξίας είναι επίσης σημαντική για την επαγωγή της αθηροσκλήρωσης, καθώς προάγουν τη φλεγμονώδη αντίδραση και συμβάλλουν στην αστάθεια της πλάκας (11). Τα μακροφάγα σε συνθήκες υποξίας εκκρίνουν πρωτεογλυκάνες που έχουν μεγάλη συγγένεια με την απολιποπρωτεΐνη B100 (apolipoprotein, apo) (12).

Ο ρόλος του ενδογενούς ανοσολογικού συστήματος στην αθηροσκλήρωση και στην καρδιαγγειακή νόσο έχει πρόσφατα αναγνωρισθεί, καθώς όλο και περισσότερα δεδομένα υποστηρίζουν ότι οι επαγόμενες από τους υποδοχείς τύπου Toll (Toll-like receptors, TLRs) οδοί εμπλέκονται στην έναρξη και στην πρόοδο της αθηροσκλήρωσης. Ωστόσο, χρειάζονται περισσότερα δεδομένα για την αποσαφήνιση των κλινικών δυνατοτήτων της θεραπευτικής στόχευσης που αφορούν τους μηχανισμούς αυτούς για την πρόληψη της αθηροσκλήρωσης.

Η φωσφολιπάσης A_2 (phospholipase A_2 , PLA₂) είναι μία υπεροικογένεια ενζύμων που συσχετίζονται με τις λιποπρωτεΐνες και τροποποιούν τα φωσφολιπίδια. Δύο μέλη της υπεροικογένειας των PLA₂, η λιποπρωτεϊνική φωσφολιπάση A_2 (lipoprotein-associated PLA₂, Lp-PLA₂) και η εκκριτική φωσφολιπάση A_2 (secretory PLA₂, sPLA₂), έχουν συσχετισθεί με την αθηροσκλήρωση. Η Lp-PLA₂ παράγεται από φλεγμονώδη κύτταρα, συμπεριλαμβανομένων των μονοκυττάρων, των μακροφάγων, των T-λεμφοκυττάρων, συσχετίζεται με τις λιποπρωτεΐνες [κυρίως με την χαμηλής-πυκνότητας λιποπρωτεΐνη (low density lipoprotein, LDL)], και η έκφρασή της έχει φανεί ότι είναι αυξημένη στις αθηροσκληρωτικές πλάκες. Η Lp-PLA₂ υδρολύει τα οξειδωμένα φωσφολιπίδια οδηγώντας στην παραγωγή φλεγμονωδών προϊόντων.

Η οξείδωση των λιποπρωτεϊνών, καθώς και των λιπιδίων των κυτταρικών μεμβρανών, αποτελεί επίσης ένα από τα σημαντικότερα πρώιμα στάδια στη διαδικασία του σχηματισμού της αθηρωματικής πλάκας (13). Τα σωματίδια της LDL υφίστανται την επίδραση διαφόρων οξειδωτικών παραγόντων και εμφανίζουν συγκεκριμένα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά (14). Η οξειδωμένη LDL (oxidized LDL, oxLDL) επάγει ισχυρά τη φλεγμονή. Συγκεκριμένα, η oxLDL δρα χημειοτακτικά για τα κυκλοφορούντα μονοκύτταρα και τα T-λεμφοκύτταρα (15, 16), αναστέλλει την εξαρτώμενη από τα ενδοθηλιακά κύτταρα αγγειοδιαστολή (endothelial cell-dependent relaxation) (17), διεγείρει την παραγωγή κυτταροκινών από τα κύτταρα της αθηρωματικής πλάκας (18), προάγει το σχηματισμό αυτοαντισωμάτων (19), διεγείρει την παραγωγή ενζύμων που καταστρέφουν τη διάμεση ουσία της πλάκας (matrix) (20) και τέλος είναι άμεσα τοξική για τα κύτταρα του αγγειακού τοιχώματος (21). Επίσης η oxLDL προάγει τη διαφοροποίηση μονοκυττάρων σε μακροφάγα, έτσι συνεισφέροντας στη δημιουργία αφρωδών κυττάρων. Ενώ ενεργοποιεί τους TLRs επάγοντας την παραγωγή προφλεγμονωδών κυτταροκινών.



Εικόνα 1. Φλεγμονώδεις μεσολαβητές στην αθηροσκλήρωση.

(Α) Πολυάριθμοι τύποι κυττάρων παίζουν ρόλο στην αθηρογένεση. Μεταξύ αυτών είναι τα Τ-λεμφοκύτταρα, τα μονοκύτταρα και τα ουδετερόφιλα. Η πρώιμη διήθηση και κατακράτηση των οξειδωμένων λιποπρωτεϊνών στον υπενδοθηλιακό χώρο πυροδοτεί τη φλεγμονώδη διαδικασία. Οι οξειδωμένες λιποπρωτεΐνες προσλαμβάνονται από μακροφάγα και σχηματίζονται τα αφρώδη κύτταρα. Προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες, χυμοκίνες και αυξητικοί παράγοντες επιπλέον προάγουν την αθηρωματική διαδικασία στο αγγειακό τοίχωμα σε συνδυασμό με εξωτερικούς παράγοντες όπως η ιστική υποξία, οι ελεύθερες ρίζες (ROS) και το νιτρικό οξύ (nitric oxide, NO).

(Β) Στα αρχικά στάδια της αθηρογένεσης μονοκύτταρα και δενδριτικά κύτταρα διηθούν το αγγειακό τοίχωμα.

(Γ) Στη συνέχεια τα μονοκύτταρα μετατρέπονται σε μακροφάγα και Τ-λεμφοκύτταρα που διηθούν το αγγειακό τοίχωμα.

(Δ) Όσο αναπτύσσεται η αθηροσκληρωτική πλάκα, αυξάνεται ο αριθμός των μακροφάγων και των αφρωδών κυττάρων, ενώ το μικροπεριβάλλον της περιοχής μεταβάλλεται, καθώς αλλάζει η σύνθεση της ενδοκυττάριας ουσίας ενώ μειώνονται οι λείες μυϊκές ίνες, δημιουργώντας έτσι τις κατάλληλες συνθήκες για τη ρήξη της αθηροσκληρωτικής πλάκας.

1.2 Η συνδεδεμένη με λιποπρωτεΐνες φωσφολιπάση A₂ (lipoprotein associated phospholipase A₂, Lp-PLA₂)

1.2.1 Βιοχημεία

Η Lp-PLA₂ είναι μία ανεξάρτητη από το ασβέστιο φωσφολιπάση A₂ με εξειδίκευση σε μικρού μήκους ανθρακικές αλυσίδες. Είναι μια μονομερής πρωτεΐνη με μοριακό βάρος 45-kDa.

Το γονίδιο της Lp-PLA₂ εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 6p12-21.1 και περιλαμβάνει 12 εξόνια (22). Το cDNA της Lp-PLA₂ κωδικοποιεί μία πρωτεΐνη μεγέθους 441 αμινοξέων. Τα πρώτα 17 αμινοξέα (Met-1 ως Ala-17) πιθανώς είναι υπεύθυνα για την έκκριση του ενζύμου (23). Η πρωτοταγής δομή της Lp-PLA₂ είναι μοναδική και παρουσιάζει μικρή ομοιότητα με ουδέτερες λιπάσες και σερινεστεράσες όσον αφορά μια μικρή περιοχή ομολογίας, το πενταπεπτίδιο GX SXG (Gly-Xaa-Ser-Xaa-Gly) (24, 25).

Το ενεργό κέντρο του ενζύμου, αποτελείται από τρία αμινοξέα που συνδέονται μεταξύ τους με δεσμούς υδρογόνου: την Ser-273, το Asp-296 και την His-351 (26).

Η Lp-PLA₂ έχει την κλασική δομή μιας άλφα/βήτα υδρολάσης. Η τριτοταγής δομή της Lp-PLA₂ δεν είναι γνωστή με ακρίβεια. Με βάση τα χαρακτηριστικά του ενεργού κέντρου (πενταπεπτίδιο GX SXG), καθώς και την ομοιότητα των καταλυτικών χαρακτηριστικών της Lp-PLA₂ με τις διάφορες ουδέτερες λιπάσες και σερινεστεράσες, έχει διατυπωθεί η άποψη ότι η δευτεροταγής δομή του ενζύμου μοιάζει με την αντίστοιχη των ουδέτερων λιπασών (27). Σύμφωνα με αυτό το μοντέλο, η πολυπεπτιδική αλυσίδα του ενζύμου συνίσταται από μία κεντρική β-πτυχωτή επιφάνεια, η οποία αποτελείται από παράλληλα διατεταγμένα β-φύλλα που συνδέονται μεταξύ τους με α-έλικες. Το ενεργό κέντρο βρίσκεται στο καρβοξυλικό άκρο ενός β-φύλλου και αποτελείται από 3 αμινοξέα που συνδέονται μεταξύ τους με δεσμούς υδρογόνου. Πιο συγκεκριμένα, το πυρηνόφιλο αμινοξύ του ενεργού κέντρου (δηλ. η Ser-273) βρίσκεται στο καρβοξυτελικό άκρο ενός από τα κεντρικά β-φύλλα. Στη συνέχεια ακολουθεί μια απότομη αναδίπλωση της πολυπεπτιδικής αλυσίδας, η οποία συνεχίζεται σε μία α-έλικα. Η αναδίπλωση αυτή είναι γνωστή στην βιβλιογραφία ως πυρηνόφιλος «αγκώνας» και σχηματίζεται από το πενταπεπτίδιο GX SXG (28). Η υπόλοιπη πολυπεπτιδική αλυσίδα αναδιπλώνεται κατά τέτοιο τρόπο ώστε τα άλλα δύο αμινοξέα της καταλυτικής τριάδας (το Asp-296 και η His-351) να έρθουν κοντά στην Ser-273 και να συνδεθούν μαζί της με δεσμούς υδρογόνου.

Η Lp-PLA₂ παράγεται και εκκρίνεται πρωταρχικά από τα μακροφάγα, καθώς επίσης και από μονοκύτταρα, Τ-λεμφοκύτταρα, μαστοκύτταρα και ηπατικά κύτταρα (22, 29-31). Η Lp-PLA₂ στο πλάσμα είναι ένα υδρόφοβο μόριο και κυκλοφορεί συνδεδεμένη με λιποπρωτεΐνες, κυρίως LDL (80%) και σε μικρότερο ποσοστό στην HDL (high density lipoprotein) (32, 33). Επίσης, ανάμεσα στα υποκλάσματα της LDL, η Lp-PLA₂ σχετίζεται κυρίως με τα αθηρογόνα μικρά πυκνά LDL σωματίδια (small dense LDL, sdLDL) (34, 35). Επιπλέον, η Lp-PLA₂ είναι συνδεδεμένη με τις VLDL (very low density lipoprotein), τις IDL (intermediate density lipoprotein) και την Lp(a) [lipoprotein (a)] (29).

1.2.2 Παθοφυσιολογία

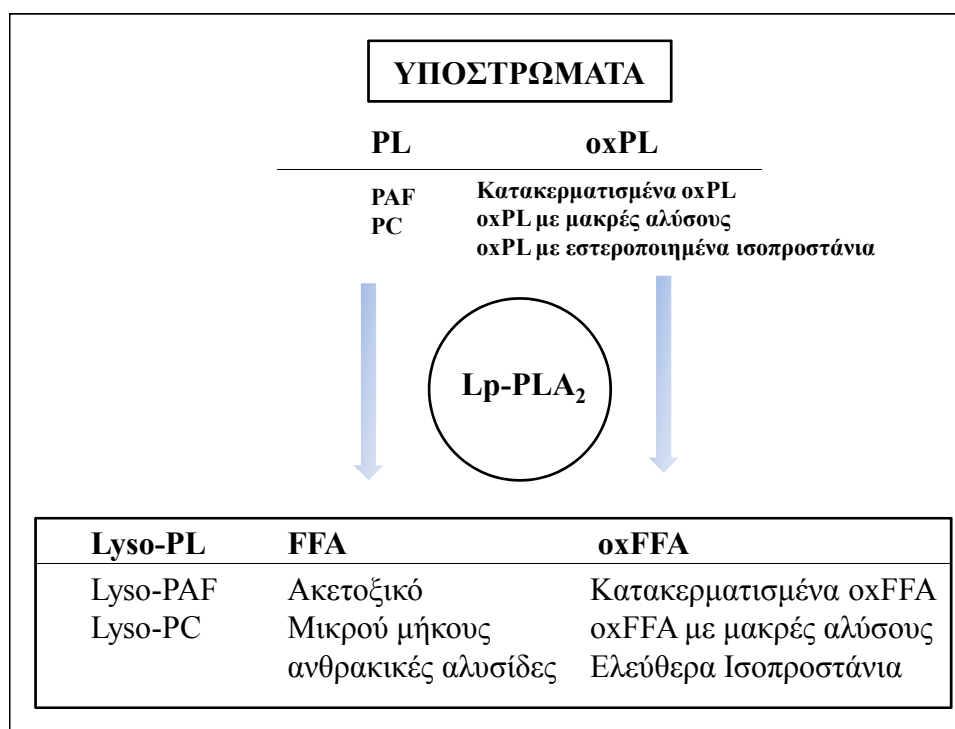
Η Lp-PLA₂ διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο στην αθηρογένεση λόγω της δράσης της στο μεταβολισμό βιοδραστικών φωσφολιπιδίων και οξειδωμένων φωσφολιπιδίων.

Η Lp-PLA₂ ειδικά υδρολύει μικρές ανθρακικές αλυσίδες (μέχρι 9 μεθυλομάδες) στη θέση sn2 του φωσφολιπιδικού υποστρώματος (Εικόνα 2) (36). Το πρώτο υπόστρωμα που περιγράφηκε για την Lp-PLA₂ ήταν ο παράγοντας ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων (platelet-activating factor, PAF) (37, 38), ένα βιολογικά ενεργό φωσφολιπίδιο το οποίο εμπλέκεται στην παθογένεια της αθηροσκλήρωσης (29, 32). Ο PAF υδρολύεται και απενεργοποιείται από την Lp-PLA₂, γι' αυτό το λόγο η Lp-PLA₂ ονομάζεται επίσης PAF-ακετυλοϋδρολάση (PAF-acetylhydrolase) (Εικόνα 2) (29).

Η οξείδωση της LDL έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό φωσφολιπιδίων με βραχείες αλυσούς στην sn2 θέση, γεγονός που ευνοεί την υδρόλυση τους από την Lp-PLA₂. Η αντίδραση αυτή οδηγεί στο σχηματισμό δύο ομάδων βιοενεργών ουσιών, της λυσοφωσφατιδυλχολίνης (lysophosphatidylcholine, lyso-PC) και των οξειδωμένων ελεύθερων λιπαρών οξέων (oxidized free fatty acids, oxFFA), οι οποίες συμμετέχουν ενεργά στην αθηρογένεση (Εικόνα 2). Συγκεκριμένα, η lyso-PC ασκεί τις φλεγμονώδεις και αθηρογόνες δράσεις της στα ενδοθηλιακά κύτταρα (ενεργοποίηση VCAM, ICAM και MCP-1, απελευθέρωση αραχιδονικού οξέος, μείωση της εξαρτώμενης από το NO αγγειοδιαστολής), στα λεία μυϊκά κύτταρα (ενεργοποίηση της MCP-1, προαγωγή του οξειδωτικού stress, κατακράτηση των LDL σωματιδίων), στα μονοκύτταρα/μακροφάγα (απελευθέρωση κυτταροκινών, απελευθέρωση αραχιδονικού οξέος και αύξηση της χημειοταξίας τους), στα Τ-λεμφοκύτταρα (παραγωγή INF-γ και αύξηση της χημειοταξίας τους) και στα ουδετερόφιλα κύτταρα (παραγωγή μυελοϋπεροξειδάσης και ελαστάσης και αύξηση της χημειοταξίας τους) (39). Η άποψη ότι η lyso-PC ευθύνεται σε μεγάλο βαθμό για την ικανότητα της oxLDL

να επάγει την αθηρωματική διαδικασία υποστηρίζεται έμμεσα και από την παρατήρηση ότι τα κατεχοχην sdLDL σωματίδια περιέχουν σημαντικά μεγαλύτερες συγκεντρώσεις αυτού του μορίου σε σύγκριση με τα μεγαλύτερα και λιγότερο αθηρογόνα υποκλάσματα της LDL (35, 40). Πρόσφατα, *in vitro* δεδομένα έδειξαν ότι η απενεργοποίηση της ενδογενούς Lp-PLA₂ πριν από την οξείδωση της LDL εμποδίζει την αύξηση της lyso-PC στην oxLDL και καταργεί την κυτταροτοξική δράση της oxLDL στα μακροφάγα (41).

Τα oxFFA, το δεύτερο προϊόν της αντίδρασης που καταλύεται από την Lp-PLA₂, με τη σειρά τους δρουν χημειοτακτικά για τα μονοκύτταρα/μακροφάγα (39). Επιπρόσθετα, φαίνεται ότι τόσο η lyso-PC όσο και τα oxFFA πιθανά εμπλέκονται και στη μετατροπή μιας σταθερής αθηρωματικής πλάκας σε ασταθή (39, 42). Μία πρόσφατη μελέτη (43) έδειξε ότι υπάρχει αυξημένη έκφραση της Lp-PLA₂ στις αθηρωματικές πλάκες καρωτίδων σε συμπτωματικούς ασθενείς σε σύγκριση με ασυμπτωματικούς ασθενείς.



Εικόνα 2. Μηχανισμός δράσης της Lp-PLA₂

Η Lp-PLA₂ υδρολύει ειδικά μικρού μήκους ανθρακικές αλυσίδες (μέχρι 9 μεθυλομάδες) στη θέση sn2 του φωσφολιπιδικού υποστρώματος. Το πρώτο υπόστρωμα που περιγράφηκε ήταν ο PAF, ο οποίος υδρολύεται σε lyso-PAF και acetate (CH₃CO₂⁻). Επίσης, η Lp-PLA₂ υδρολύει οξειδωμένα φωσφολιπίδια, παράγοντας lyso-PC και oxFFA.

FFA: free fatty acids, ελεύθερα λιπαρά οξέα, lyso-PC: lyso-phosphatidylcholine, λυσοφωσφατιδυλχολίνη, oxFFA: oxidized free fatty acids, οξειδωμένα ελεύθερα λιπαρά οξέα, PC: phosphatidylcholine, φωσφατιδυλχολίνη, PL: phospholipids, φωσφολιπίδια, oxPL: oxidized phospholipids, οξειδωμένα φωσφολιπίδια

1.2.3 Γονιδιακοί πολυμορφισμοί

Πολυμορφισμοί στο γονίδιο της Lp-PLA₂ (PLA2G7), που εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 6p12-21.1, συμβάλλουν σημαντικά στον καθορισμό της ενεργότητας και της μάζας της Lp-PLA₂ (44). Διάφοροι πολυμορφισμοί έχουν περιγραφεί. Η V279F παραλλαγή (αντικατάσταση του αμινοξέος Val από τη Phe στην περιοχή 279 της πρωτεΐνης) συναντάται σε περίπου 30% του ιαπωνικού πληθυσμού και οδηγεί σε απουσία καταλυτικής δραστηριότητας της Lp-PLA₂ στους ομοζυγώτες και σημαντική μείωση αυτής στους ετεροζυγώτες (45, 46). Η επίπτωση του V279F αλληλίου ήταν 11.5% σε 2690 περιπτώσεις με στεφανιαία νόσο (ΣΝ) (<60 ετών) και 12.8% σε 3128 άτομα της ομάδας ελέγχου [odds ratio (OR)=0.80, 95% confidence interval [CI] 0.66-0.97, p=0.02), μετά από προσαρμογή για την ηλικία, το δείκτη μάζας σώματος (body mass index, BMI), την παρουσία διαβήτη, το κάπνισμα και τα επίπεδα γλυκόζης και λιπιδίων.

1.2.4 Μελέτες πρωτογενούς πρόληψης

Διάφορες μελέτες δείχνουν ότι η Lp-PLA₂ εκφράζεται ισχυρά σε μακροφάγα στην ινώδη κάψα, όπως και στον νεκρωτικό πυρήνα της αθηροσκληρωτικής πλάκας (31, 47), ενώ η ένταση της έκφρασης σχετίζεται με την πιθανότητα ρήξης (47, 48). Πρώτοι οι Ostermann et al. (49) ανέφεραν αυξημένη ενεργότητα της Lp-PLA₂ του πλάσματος σε ασθενείς με περιφερική αγγειακή νόσο και σε ασθενείς που είχαν υποστεί οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου (OEM). Την αιτιοπαθογενετική σχέση ανάμεσα στην Lp-PLA₂ και την αθηροσκλήρωση υποστηρίζουν πολλές μελέτες σε ζωικά μοντέλα στα οποία η αναστολή της ενεργότητας του ενζύμου μειώνει την πρόοδο της αθηροσκλήρωσης (50, 51).

Την τελευταία δεκαετία, πλήθος μελετών στην πρωτογενή και δευτερογενή πρόληψη όπως επίσης και μετα-αναλύσεις δείχνουν μία δυνατή συσχέτιση ανάμεσα στην Lp-PLA₂ και τον κίνδυνο για καρδιαγγειακά συμβάματα ανεξάρτητα από το φύλο, την εθνικότητα και την ηλικία (Πίνακας 1) (52, 53). Στις περισσότερες μελέτες η Lp-PLA₂ παρέμεινε ένας

ανεξάρτητος προγνωστικός παράγοντας καρδιαγγειακού κινδύνου. Μία μεγάλη μετα-ανάλυση 32 προοπτικών μελετών με 79036 άτομα έδειξε μία γραμμική συσχέτιση (log-linear) ανάμεσα στην ενεργότητα και τη μάζα της της Lp-PLA₂ με τον καρδιαγγειακό κίνδυνο και το θάνατο από αγγειακά αίτια. Ο σχετικός κίνδυνος (relative risk, RR) μετά από προσαρμογή για συμβατικούς παράγοντες κινδύνου ήταν: 1.10 (95% CI 1.05-1.16) και 1.11 (1.07-1.16) για ΣΝ, 1.08 (0.97-1.20) και 1.14 (1.02-1.27) για ισχαιμικό αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο (ΑΕΕ), 1.16 (1.09-1.24) και 1.13 (1.05-1.22) για θνησιμότητα από αγγειακά αίτια, και 1.10 (1.04-1.17) και 1.10 (1.03-1.18) για θνησιμότητα από μη-αγγειακά αίτια, για την ενεργότητα και τη μάζα της Lp-PLA₂, αντίστοιχα (52).

Η μελέτη WOSCOPS (West of Scotland Coronary Prevention Study) αξιολόγησε την επίδραση της πραβαστατίνης στην πρόληψη καρδιαγγειακών συμβαμάτων σε υπερλιπιδαιμικούς άνδρες (μέση ηλικία 56.8 έτη) για 5 χρόνια. Η μελέτη έδειξε μία ανεξάρτητη συσχέτιση ανάμεσα στα επίπεδα Lp-PLA₂ στο πλάσμα και τον καρδιαγγειακό κίνδυνο (54). Στην μελέτη αυτή, κάθε αύξηση της Lp-PLA₂ κατά 1-σταθερή απόκλιση (standard deviation, SD) αντιστοιχούσε σε 18% αύξηση του καρδιαγγειακού κινδύνου, ανεξάρτητα από άλλους παράγοντες κινδύνου.

Η μελέτη ARIC (Atherosclerosis Risk in Communities) είναι μία μεγάλη προοπτική μελέτη που συμπεριέλαβε 12819 άνδρες και γυναίκες μέσης ηλικίας που παρακολουθήθηκαν για 6 έως 8 χρόνια. Σε μία υπομελέτη της ARIC φάνηκε ότι τα επίπεδα της Lp-PLA₂ πλάσματος ήταν υψηλότερα σε 608 ασθενείς με καρδιαγγειακή νόσο σε σύγκριση με 740 μάρτυρες. Μετά από πολυπαραγοντική ανάλυση, η συσχέτιση ανάμεσα στην Lp-PLA₂ και την καρδιαγγειακή νόσο παρέμεινε αποκλειστικά σε άτομα με LDL-C <130 mg/dL (55).

Στη μελέτη MONICA (MONItoring of Trends and Determinants in Cardiovascular Disease –Augsburg), αύξηση της Lp-PLA₂ πλάσματος κατά 1-SD σχετίστηκε με 40% υψηλότερο κίνδυνο για μελλοντικά στεφανιαία συμβάματα σε 934 άνδρες μέσης ηλικίας, χωρίς ιστορικό καρδιαγγειακής νόσου (56). Μία υπομελέτη ασθενών μαρτύρων (nested case-control) με 246 γυναίκες με χαμηλό καρδιαγγειακό κίνδυνο από τη μελέτη WHS (Women's Health study) (μέση ηλικία 60 έτη) έδειξε ότι οι γυναίκες με υψηλότερο καρδιαγγειακό κίνδυνο είχαν υψηλότερα επίπεδα Lp-PLA₂ πλάσματος, ωστόσο μετά από προσαρμογή για άλλους παράγοντες κινδύνου η συσχέτιση εξαφανίστηκε (57).

Πρόσφατα, μία μελέτη ασθενών-μαρτύρων εξέτασε τη σχέση ανάμεσα στην Lp-PLA₂ και την καρδιαγγειακή νόσο σε ένα μεγάλο δείγμα ασθενών χωρίς καρδιαγγειακή νόσο, που παρακολούθηθηκαν για 14 έτη. Σε αυτή τη μελέτη η ενεργότητα της Lp-PLA₂ συσχετίστηκε σημαντικά με την εμφάνιση οξέων στεφανιαίων συμβαμάτων (58).

Αρνητικά ήταν τα αποτελέσματα της μελέτης EPIC-Norfolk (European Prospective Investigation of Cancer), μιας μεγάλης προοπτικής μελέτης ασθενών-μαρτύρων, που συμπεριέλαβε 1002 ασθενείς που εμφάνισαν θανατηφόρα ή μη θανατηφόρα ΣΝ και 1859 μάρτυρες, σε χρονικό διάστημα 10 ετών (59). Στη μελέτη αυτή η Lp-PLA₂ δεν συσχετίστηκε με αυξημένο καρδιαγγειακό κίνδυνο σε πολυπαραγοντικό μοντέλο που συμπεριέλαβε την περίμετρο μέσης, την φυσική δραστηριότητα, το κάπνισμα, την παρουσία διαβήτη, τη συστολική αρτηριακή πίεση, τα επίπεδα της LDL και της HDL χοληστερόλης και την ορμονική θεραπεία υποκατάστασης στις γυναίκες.

1.2.5 Μελέτες δευτερογενούς πρόληψης

Οι Brilakis et al. αξιολόγησαν 466 άνδρες και γυναίκες με σταθερή ΣΝ που υποβλήθηκαν σε στεφανιογραφία, και έδειξαν ότι τα υψηλά επίπεδα της Lp-PLA₂ πλάσματος ήταν ένας σημαντικός και ανεξάρτητος παράγοντας κινδύνου για μείζονα καρδιαγγειακά συμβάματα [θάνατος, OEM, στεφανιαία επαναγγείωση και ΑΕΕ] για περίοδο παρακολούθησης 4 ετών (60). Στην πολυπαραγοντική ανάλυση φάνηκε ότι η κατά 1-SD αύξηση της μάζας της Lp-PLA₂ συσχετιζόταν με RR=1.30 για μείζονα καρδιαγγειακά συμβάματα (60). Στη μελέτη THROMBO (Thrombogenic factors and recurrent Coronary Events) σε 766 μετά-εμφραγματικούς ασθενείς φάνηκε ότι τα υψηλά επίπεδα ενεργότητας της Lp-PLA₂ ήταν ένας ανεξάρτητος προγνωστικός παράγοντας για καρδιαγγειακά συμβάματα (61).

Τα επίπεδα της μάζας της Lp-PLA₂ μετρήθηκαν σε 3766 ασθενείς με σταθερή καρδιαγγειακή νόσο από τη μελέτη PEACE (Prevention of Events with Angiotensin Converting Enzyme Inhibition) (62). Η παρακολούθηση των ασθενών διήρκεσε κατά μέσο όρο 4.8 χρόνια. Οι ασθενείς με μεγαλύτερα επίπεδα Lp-PLA₂ είχαν σημαντικά αυξημένο κίνδυνο για το πρωτογενές καταληκτικό σημείο (θάνατος, OEM, στεφανιαία επαναγγείωση, νοσηλεία για ασταθή στηθάγχη και ΑΕΕ) (62).

Μία ανεξάρτητη συσχέτιση ανάμεσα στα επίπεδα της μάζας και της ενεργότητας της Lp-PLA₂ πλάσματος, 3 μήνες μετά από ένα οξύ στεφανιαίο σύμβαμα, αναφέρθηκε σε μία

μελέτη κοόρτης 1051 ασθενών με ΣΝ, που παρακολουθήθηκαν για 4 μήνες (63). Σε πολυπαραγοντική ανάλυση, η μάζα και η ενεργότητα της Lp-PLA₂ συσχετίσθηκε σημαντικά με τα καρδιαγγειακά συμβάματα, ανεξάρτητα από παραδοσιακούς παράγοντες κινδύνου, ανεξάρτητα από τη βαρύτητα της στεφανιαίας νόσου, τη θεραπεία με στατίνες, την κυστατίνη C και το B-νατριουρητικό πεπτίδιο (N-terminal B-type natriuretic peptide, N-proBNP). Το hazard ratio (HR) για καρδιαγγειακά συμβάματα ήταν 2.65 (95% CI 1.47-4.76) για το ανώτερο τεταρτημόριο της μάζας της Lp-PLA₂ σε σύγκριση με το κατώτερο τεταρτημόριο και 2.40 (95% CI, 1.35-4.29) για την ενεργότητα της Lp-PLA₂. Μετά από προσαρμογή για την LDL-C η συσχέτιση των καρδιαγγειακών συμβαμάτων με την ενεργότητα της Lp-PLA₂ δεν ήταν πλέον σημαντική.

Στη μελέτη Intermountain Heart Collaborative Study μετρήθηκε η μάζα της Lp-PLA₂ και η υψηλής ευαισθησίας C αντιδρώσα πρωτεΐνη (high sensitivity C reactive protein, hsCRP) σε 1493 ασθενείς που υπεβλήθησαν σε στεφανιογραφία και παρακολουθήθηκαν για 6.7 χρόνια. Στη μελέτη αυτή παρατηρήθηκε μία προοδευτική αύξηση στους καρδιαγγειακούς θανάτους σε ασθενείς με αυξημένα επίπεδα Lp-PLA₂ (64).

Η ενεργότητα της Lp-PLA₂ μετρήθηκε 30 μέρες μετά από ένα οξύ στεφανιαίο σύμβαμα σε 3265 ασθενείς της μελέτης PROVE-IT-TIMI 22 (Pravastatin or Atorvastatin Evaluation and Infection Therapy–Thrombolysis in Myocardial Infarction 22). Οι ασθενείς παρακολουθήθηκαν για 2 χρόνια. Η Lp-PLA₂ συσχετίσθηκε με τα καρδιαγγειακά συμβάματα, ανεξάρτητα από άλλους παράγοντες κινδύνου. Οι ασθενείς που ήταν στο ανώτερο τεταρτημόριο της Lp-PLA₂ είχαν 33% υψηλότερο κίνδυνο για μελλοντικά καρδιαγγειακά συμβάματα (RR 1.33; 95% CI 1.01-1.74) σε σύγκριση με τους ασθενείς που ήταν στο κατώτερο τεταρτημόριο (65).

Στη μελέτη MIRACL (Myocardial Ischemia Reduction With Acute Cholesterol Lowering) οι ερευνητές μελέτησαν τη σχέση ανάμεσα στην Lp-PLA₂ και τα καρδιαγγειακά συμβάματα σε 2587 ασθενείς με πρόσφατο OEM, πριν και μετά από 16 εβδομάδες θεραπείας με ατορβαστατίνη 80 mg ή εικονικό φάρμακο (66). Στη μελέτη αυτή τα επίπεδα της μάζας και της ενεργότητας της Lp-PLA₂ δεν συσχετίζονταν με το πρωτεύον καταληκτικό σημείο της μελέτη (θάνατος, OEM, ασταθής στηθάγχη).

Πίνακας 1. Μελέτες συσχέτισης της Lp-PLA₂ με την καρδιαγγειακή νόσο

Μελέτη	Έτος	Πληθυσμός	Έτη παρακολούθησης	Καταληκτικά σημεία	Αποτελέσματα
Πρωτογενής πρόληψη					
Packard et al.(54)	2000	Υπερχοληστερολαιμικοί άνδρες (ασθενείς=580, μάρτυρες=1160)	4.9	Θάνατος από καρδιαγγειακά αίτια, μη θανατηφόρο OEM, στεφανιαία επαναγγείωση	RR 1.18 (1.05-1.33) για κάθε 1-SD αύξηση
Ballantyne et al.(67)	2004	Φαινομενικά υγιή άτομα μέσης ηλικίας (ασθενείς=608, μάρτυρες=740)	6	Θάνατος, μη θανατηφόρο OEM, στεφανιαία επαναγγείωση	HR 1.15 (0.81-1.63) για Q3 vs Q1
Koenig et al.(68)	2004	Φαινομενικά υγιείς άνδρες μέσης ηλικίας (N=934)	14	Θανατηφόρα και μη θανατηφόρα στεφανιαία συμβάματα	HR 1.21 (1.01-1.45) για κάθε 1-SD αύξηση
Blake et al.(57)	2001	Φαινομενικά υγιείς γυναίκες μέσης ηλικίας (ασθενείς=123, μάρτυρες=123)	3	Θάνατος από καρδιαγγειακά αίτια, μη θανατηφόρο OEM, και AEE	RR 1.17 (0.45-3.05) για Q4 vs Q1

Hatoum et al.(58)	2011	Φαινομενικά υγιείς γυναίκες (ασθενείς=421, μάρτυρες=842)	14	OEM	RR 1.75 (1.09-2.84)
Δευτερογενής πρόληψη					
Brilakis et al.(60)	2005	Ασθενείς που υποβλήθηκαν σε στεφανιογραφία (N=466)	4	Θάνατος, OEM, στεφανιαία επαναγγείωση, και AEE	HR 1.30 (1.06-1.59) για κάθε 1-SD αύξηση
Corsetti et al.(61)	2006	Ασθενείς μετά από OEM (N=766)	2.1	Καρδιαγγειακός θάνατος, OEM και ασταθής στηθάγχη	HR 1.90 (1.31-2.75)
Sabatine et al.(62)	2007	Ασθενείς με σταθερή ΣΝ (N=3766)	4.8	Θάνατος, OEM, στεφανιαία επαναγγείωση, νοσηλεία για ασταθή στηθάγχη και AEE	HR 1.41 (1.17-1.70) για Q4 vs Q1
Gerber et al.(69)	2006	Ασθενείς μετά από OEM (N=271)	1	Θάνατος	HR 7.61 (2.88-20.01) για Q3 vs Q1
Koenig et al.(63)	2006	Ασθενείς που διεγνώσθησαν με ΣΝ τους τελευταίους 3 μήνες (N=1051)	4	Καρδιαγγειακός θάνατος, μη θανατηφόρο OEM και AEE	μάζα: HR 2.09 (1.10-3.96) ενεργότητα: 1.81 (0.94-3.49) για Q3 vs Q1

O'Donogue et al.(65)	2006	Ασθενείς με οξύ στεφανιαίο σύνδρομο [έναρξη (N=3648) και μετά από 30 ημέρες (N=3265)]	2	Θάνατος, ΟΕΜ, νοσηλεία για ασταθή στηθάγχη, στεφανιαία επαναγγείωση και ΑΕΕ	Στις 30 μέρες HR 1.33, (1.01-1.74)
May et al.(64)	2006	Ασθενείς που υποβλήθηκαν σε στεφανιογραφία (N=1493)	6.7	Θάνατος, ΟΕΜ και ΑΕΕ	Καρδιαγγειακός θάνατος HR 2.18 (1.04-4.57) για Q1 vs Q3, HR 1.73 (0.84-3.61) για Q1 vs Q4

1.3 Οξειδωτικό stress

1.3.1 Γενικά

Ως οξειδωτικό stress ορίζεται η διαταραχή και μετατόπιση της ισορροπίας μεταξύ των οξειδωτικών και αντι-οξειδωτικών συστημάτων του οργανισμού προς την κατεύθυνση των πρώτων (70).

Η θεωρία των ελεύθερων ριζών οξυγόνου χρησιμοποιείται συχνά για να εξηγήσει γιατί το οξυγόνο στα βιολογικά συστήματα τροποποιεί δομικά λιποπρωτεϊνικά φωσφολιπίδια, οδηγώντας στη δημιουργία κυτταροτοξικών προϊόντων (70).

Μία ελεύθερη ρίζα είναι ένα μόριο ή ένα άτομο το οποίο έχει ένα ή περισσότερα ασύζευκτα ηλεκτρόνια στην εξωτερική του στιβάδα. Οι ελεύθερες ρίζες προέρχονται είτε από αντιδράσεις οξειδοαναγωγής είτε από διάσπαση ενός ομοιοπολικού δεσμού, τα ηλεκτρόνια του οποίου μετά από την αντίδραση μοιράζονται ένα σε κάθε ομάδα (Πίνακας 2). Η πλειοψηφία των ελεύθερων ριζών που προκαλούν βλάβη στα βιολογικά συστήματα είναι οι ROS (70, 71).

Πίνακας 2. Ελεύθερες ρίζες που εμπλέκονται στο οξειδωτικό stress

Ελεύθερες ρίζες οξυγόνου (Reactive Oxygen Species, ROS)	$O_2^{\cdot -}$ ανιόν σουπεροξειδίου H_2O_2 υπεροξείδιο του υδρογόνου HO_2^{\cdot} Hydrogen dioxy radical OH^{\cdot} ρίζα υδροξυλίου
Ενεργές μορφές αζώτου (Reactive Nitrogen Species, RNS)	NO^{\cdot} Ρίζα οξειδίου του αζώτου $ONO_2^{\cdot -}$ peroxy nitrate anion ONO_2^{\cdot} Peroxinitrate radical
Αλογονομένες ενεργές μορφές (Reactive Halogenated Species, RHS)	$HOCl$ υποχλωριώδες οξύ $NOCl$ Nitrosyl chloride $ClNO_2$ nitryl chloride

Ενεργές μορφές θείου (Reactive Sulfur Species, RSS)	RS· Θειούχες ρίζες
Οργανικές ελεύθερες ρίζες	ROOH organic hydroperoxide RO· Αλκοξυ- ROO· Υπεροξυ-

Υπό φυσιολογικές συνθήκες οι ελεύθερες ρίζες οξυγόνου που παράγονται στα μιτοχόνδρια και στα υπεροξυσώματα δεν «δραπετεύουν» στο κυτταρόπλασμα ή στους ιστούς. Ωστόσο, όταν υπάρχει ιστική υποξία ενδέχεται να εξέλθουν στο κυτταρόπλασμα και έξω από τα κύτταρα. Επίσης, τα μακροφάγα παράγουν ελεύθερες ρίζες οξυγόνου για την καταπολέμηση των βακτηριακών λοιμώξεων. Έτσι τα μακροφάγα μέσω της οξειδάσης της nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH), η οποία καταλύει τη αντίδραση του ελεύθερου οξυγόνου με NADPH προς παραγωγή σουπεροξειδίου και υπεροξειδίου του υδρογόνου, μπορούν να οξειδώσουν μακρομοριακές ενώσεις όταν έρθουν σε επαφή με αυτές (71).

Ο μεταβολισμός του αραχιδονικού οξέος μπορεί επίσης να οδηγήσει στην απελευθέρωση ελευθέρων ριζών οξυγόνου. Η 15-λιποξυγενάση καταλύει την παραγωγή υδροξυ-εικοσατετρανοϊκού οξέος, το οποίο διαμεσολαβεί φλεγμονώδεις αντιδράσεις. Το ένζυμο αυτό βρίσκεται στις λείες μυϊκές ίνες και στα μονοκύτταρα και επάγεται από την IL-4, η οποία παράγεται αποκλειστικά από τα T-λεμφοκύτταρα, τα οποία ανευρίσκονται πολύ συχνά στα αρχικά στάδια αθηροσκληρωτικών πλακών καθώς και σε πλάκες με αυξημένο κίνδυνο ρήξης (71).

Μία άλλη πηγή ελευθέρων ριζών είναι οι ενώσεις θειόλης όπως η κυστεΐνη που δραπετεύουν από λείες μυϊκές ίνες. Αυτές οι ενώσεις καθώς και ενώσεις όπως το σουπεροξειδίο έχουν μικρή δραστηριότητα στην οξείδωση της LDL, αλλά όταν ιόντα χαλκού ή ιόντα σιδήρου είναι παρόντα στην διαδικασία της λιπιδικής υπεροξειδωσής, αυτά δρουν καταλυτικά (70-72).

Η υπεροξειδωση έχει καταστροφικές συνέπειες και εμπλέκεται στην παθογένεση διαφόρων νοσημάτων, όπως η αθηροσκλήρωση. Έτσι οι οργανισμοί διαθέτουν σημαντικά αντιοξειδωτικά συστήματα. Σε αυτά περιλαμβάνονται οι σουπεροξειδική δισμουτάση (superoxide dismutase, SOD), η καταλάση και η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης. Επίσης, τα ιόντα χαλκού και σιδήρου στους ιστούς υπό φυσιολογικές συνθήκες δεσμεύονται από τη

σερουλοπλασμίνη, την τρανσφερίνη και άλλες πρωτεΐνες. Άλλα αντιοξειδωτικά είναι η τοκοφερόλη (βιταμίνη E), το ασκορβικό οξύ (βιταμίνη C), τα καροτενοειδή και η ουμπικινόνη (συνένζυμο Q10) (Πίνακας 3) (70, 71).

Πίνακας 3. Ενδογενείς αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί

Βασικότεροι ενδογενείς αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί
Σουπεροξειδική δισμουτάση (Superoxide Dismutase, SOD)
Καταλάση
Γλουταθειόνη
Βιταμίνη C, Βιταμίνη E, καροτενοειδή
Ουρικό οξύ
Φεριττίνη, Τρανσφερίνη, σερουλοπλασμίνη
Συνένζυμο Q10

Επιπρόσθετα, η σύσταση των LDL σε λιπαρά οξέα καθορίζει το πόσο εύκολα αυτή οξειδώνεται. Όσο περισσότεροι είναι οι διπλοί δεσμοί ενός υδρογονάνθρακα τόσο πιο εύκολα οξειδώνεται. Έτσι τα κορεσμένα λιπαρά οξέα δεν οξειδώνονται, και το ολεϊκό οξύ (C18:1) υπόκειται σε μικρότερη οξείδωση σε σύγκριση με το λινολεϊκό (C18:1) ή το αραχιδονικό (C20:4) και το δοκοσαεξανοϊκό (C22:6) (73).

Η οξείδωση των ακόρεστων λιπαρών οξέων στα φωσφολιπίδια και στους εστέρες χοληστερόλης της LDL οδηγούν στην παραγωγή προϊόντων τα οποία μεταβάλλουν τα χαρακτηριστικά της apoB100, προάγοντας την αθηρογένεση (73).

Η φωσφατιδυλχολίνη συχνά έχει ακόρεστα λιπαρά οξέα στη θέση sn2. Η οξείδωση αυτών των λιπαρών οξέων επιτρέπει στη συνέχεια τη δράση της Lp-PLA₂, η οποία είναι παρούσα στα LDL σωματίδια. Αυτή υδρολύει τον εστερικό δεσμό στη θέση sn2 και αυτό οδηγεί στην παραγωγή τοξικών προϊόντων όπως η lyso-PC.

Ως δείκτες του οξειδωτικού stress χρησιμοποιούνται τα προϊόντα οξείδωσης κυρίως των λιπιδίων και των πρωτεϊνών (Πίνακας 4). Όσον αφορά τα λιπίδια, τα προϊόντα οξείδωσης αυτών προέρχονται από την οξείδωση των ακόρεστων λιπαρών οξέων (74).

Τα υπεροξειδία των λιπιδίων είναι ασταθείς ενώσεις και διασπώνται σε μικρότερα και πιο σταθερά μόρια όπως οι αλδεΐδες και κετόνες, στις οποίες περιλαμβάνονται οι 4-υδροξυ-2-ενενάλη (4-hydroxyonenal, HNE) και η μηλονική διαλδεΐδη (malondialdehyde, MDA) (74).

Πίνακας 4. Δείκτες του οξειδωτικού stress

Βασικότεροι δείκτες οξειδωτικού stress
4-υδροξυ-2-ενενάλη (4-hydroxyonenal, HNE)
Μηλονική Διαλδεΐδη (malondialdehyde, MDA)
F ₂ -ισοπροστάνια
Οξειδωμένη LDL (oxLDL)
OxPL/apoB
MDA-LDL

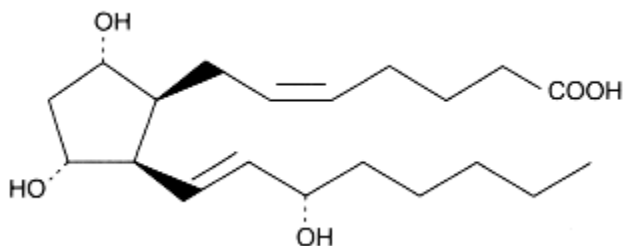
1.3.2 F₂-ισοπροστάνια (isoprostanes)

Τα F₂-ισοπροστάνια σχηματίζονται in vivo από τη λιπιδική υπεροξείδωση των φωσφολιπιδίων που περιέχουν αραχιδονικό οξύ (Εικόνα 3). Τα ισοπροστάνια απελευθερώνονται με υδρόλυση μέσω φωσφολιπασών, κυκλοφορούν στο πλάσμα ενώ εκκρίνονται και στα ούρα (75). Τα F₂-ισοπροστάνια θεωρούνται, σύμφωνα με μελέτες, οι πιο αξιόπιστοι δείκτες για την in vivo μέτρηση του οξειδωτικού stress στον άνθρωπο (74).

Τα F₂-ισοπροστάνια (κυρίως τα 8-iso-PGF_{2α}) φαίνεται να είναι βιολογικά ενεργά στους οργανισμούς και ειδικότερα φαίνεται να συμμετέχουν στην αθηρογένεση (74).

Τα αυξημένα επίπεδα F₂-ισοπροστανίων στα ούρα έχουν συσχετισθεί με καρδιαγγειακούς παράγοντες κινδύνου, όπως η υπερχοληστερολαιμία, ο σακχαρώδης

διαβήτη, το κάπνισμα και η υπερομοκυστεϊναιμία. Αυξημένα επίπεδα F₂-ισοπροστανίων εντοπίζονται σε καρωτιδικές πλάκες και συσχετίζονται με την πιθανότητα ρήξης αυτών. Επίσης, αυξημένα επίπεδα F₂-ισοπροστανίων εμφανίζουν οι ασθενείς με ασταθή στηθάγχη (74).

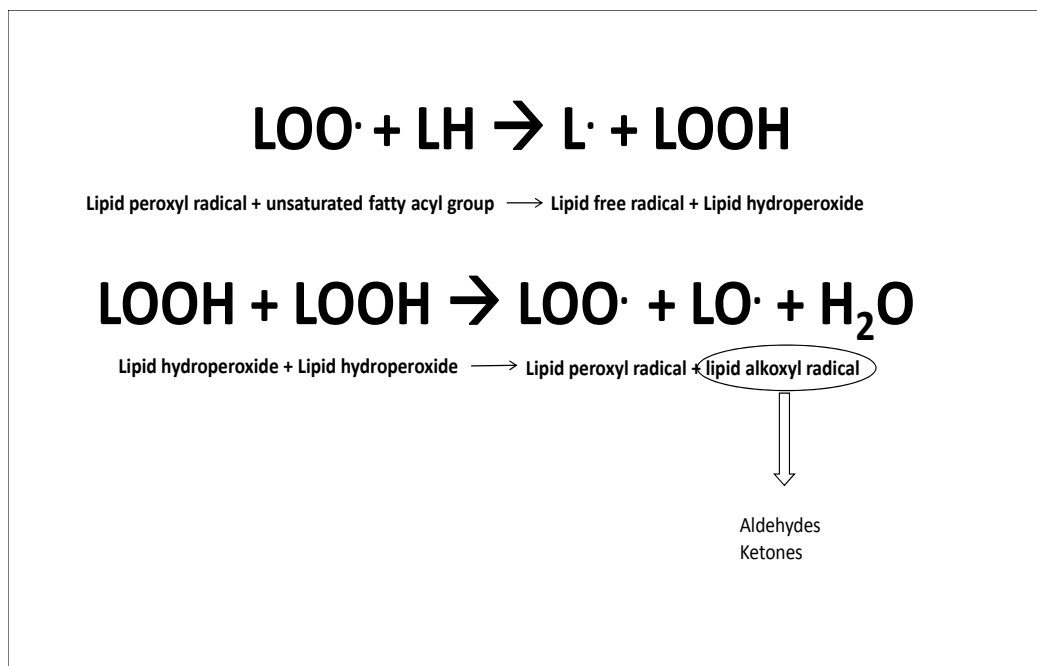


Εικόνα 3. Δομή των F₂-ισοπροστανίων

1.3.3 Οξειδωμένη LDL

Τα LDL σωματίδια αποτελούνται από εστέρες χοληστερόλης, φωσφολιπίδια, ελεύθερη χοληστερόλη, τριγλυκερίδια (triglycerides, TG), και apoB100. Καθώς περνούν στον υπενδοθηλιακό χώρο, τα σωματίδια της LDL εκτίθενται σε οξειδωτικές ουσίες.

Η οξείδωση αρχίζει με την απομάκρυνση ενός ατόμου υδρογόνου από ένα από τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα της LDL από μία αρχική ρίζα X[•]. Η ρίζα L[•] που προκύπτει αντιδρά ταχύτατα με μοριακό οξυγόνο (O₂) για το σχηματισμό μιας ρίζας λιποϋπεροξειδίου, LOO[•]. Στη συνέχεια, η ρίζα του λιποϋπεροξειδίου αποσπά ένα άτομο υδρογόνου από παρακείμενο λιπαρό οξύ, για το σχηματισμό υδρολιποϋπεροξειδίου, LOOH, και μιας νέας ελεύθερης ρίζας, L (Εικόνα 4) (70).



Εικόνα 4. Αλυσιδωτή αντίδραση λιπιδικής υπεροξειδωσης (lipid peroxidation chain reaction)

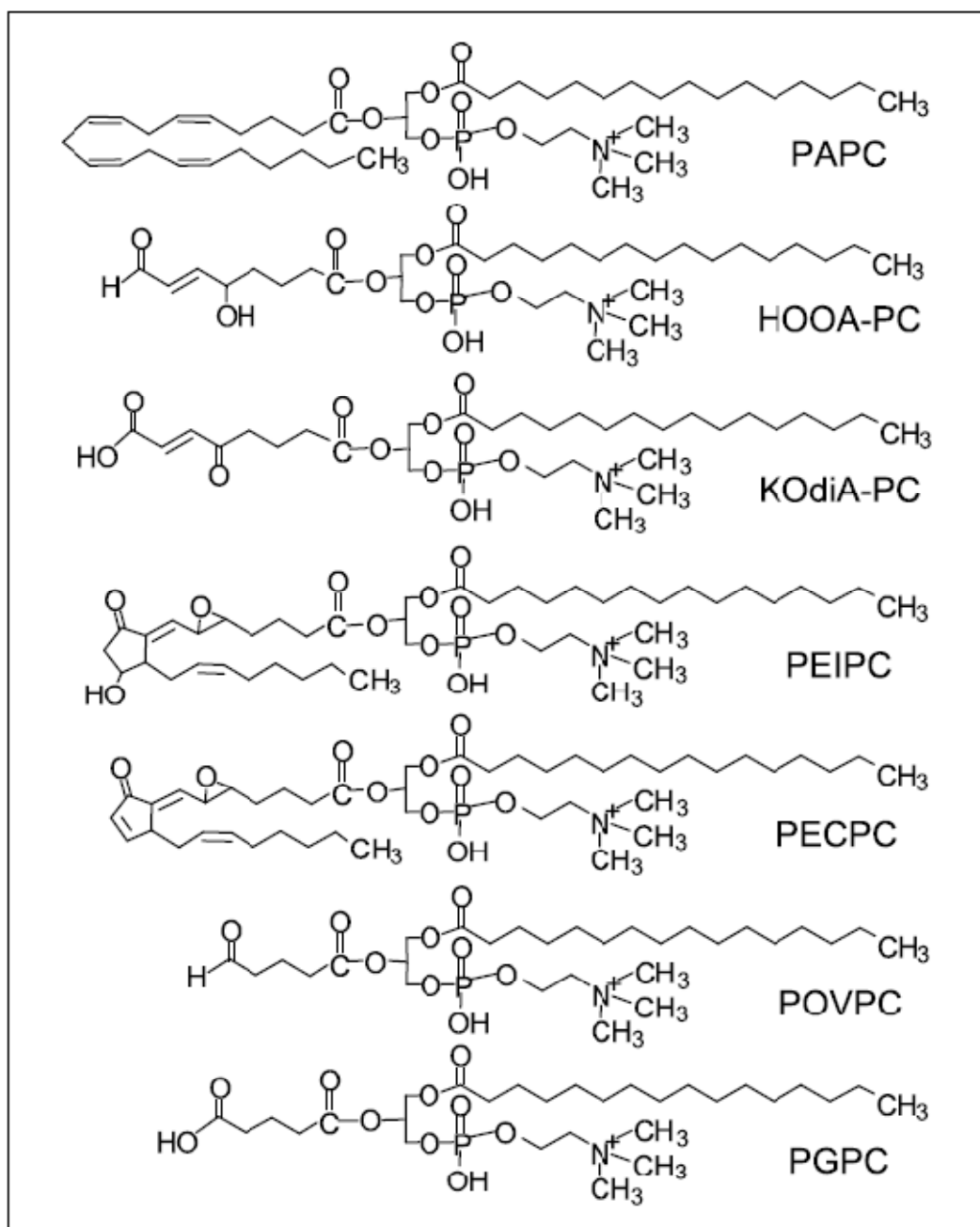
Τα υδρολιποπεροξειδία των λιπιδίων διασπώνται παρουσία μεταλλικών ιόντων σε αλδεΐδες (4-HNE, MDA) και υδρογονάνθρακες. Τα τελικά προϊόντα της οξειδωσης των λιπιδίων της LDL αντιδρούν με την apoB100. Η καρβονυλική ομάδα της MDA αντιδρά με τις e-NH₂ λυσίνες που υπάρχουν στην apoB100 για το σχηματισμό σταθερών ενώσεων, γνωστές ως ενώσεις Schiff (70).

1.3.4 Οξειδωμένα φωσφολιπίδια

Τα φωσφολιπίδια, τα οποία αποτελούν ουσιώδη συστατικά των λιποπρωτεϊνών και των κυτταρικών μεμβρανών, είναι ευαίσθητα στην οξείδωση. Τα οξειδωμένα φωσφολιπίδια παράγονται από την οξείδωση πολυακόρεστων λιπαρών οξέων, τα οποία είναι παρόντα στα φωσφολιπίδια στη θέση sn2. Η οξείδωση των φωσφολιπιδίων διαμεσολαβείται είτε ενζυματικά (λιποξυγενάση, NADPH οξειδάση και η μυελοϋπεροξειδάση) είτε από ROS. Τα οξειδωμένα φωσφολιπίδια περιέχουν δραστικές ομάδες οι οποίες συνδέονται διαμέσου ομοιοπολικών δεσμών με τις λιποπρωτεΐνες, οι οποίες κατόπιν γίνονται δυσλειτουργικές (76).

Η οξείδωση ενός φωσφολιπιδίου οδηγεί στην παραγωγή διαφόρων οξειδωμένων φωσφολιπιδίων είτε με ολόκληρες είτε με κατακερματισμένες αλυσίδες λιπαρών οξέων. Στην εικόνα 5 φαίνονται διάφορα οξειδωμένα φωσφολιπίδια που παράγονται από την

οξειδωτική τροποποίηση του 1-palmitoyl-2-arachidonoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (PAPC), του πιο συχνά ανευρισκόμενου φωσφολιπιδίου στα σωματίδια της LDL, που συνολικά αποκαλούνται oxPAPC. Αυτή η μεγάλη δομική ποικιλία πιθανόν εξηγεί την μεγάλη ποικιλία βιολογικών δράσεων των οξειδωμένων φωσφολιπιδίων (77).



Εικόνα 5. Χημικές δομές μερικών βιολογικά ενεργών οξειδωμένων φωσφολιπιδίων που προέρχονται από το φωσφολιπίδιο 1-palmitoyl-2-arachidonoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (PAPC).

PAPC: 1-palmitoyl-2-arachidonoyl-sn-glycero-3-phosphocholine

HOOA-PC: 5-hydroxy-8-oxo-6-octenoyl- phosphocholine

KODiA-PC: 5-keto-6-octendioic acid ester of 2-lyso-phosphocholine

PEIPC: 1-palmitoyl-2-(5,6-epoxyisoprostane E2)-sn-glycero-3-phosphocholine

PECPC: 1-palmitoyl-2-(5,6-epoxycyclopentenone)-sn-glycero-3-phosphocholine

POVPC: 1-palmitoyl-2-(5-oxovaleroyl)-sn-glycero-3-phosphocholine

PGPC: 1-palmitoyl-2-glutaroyl-sn-glycero-3-phosphocholine

Τα οξειδωμένα φωσφολιπίδια αναγνωρίστηκαν αρχικά σαν ενεργά συστατικά της ελάχιστα οξειδωμένης LDL (minimally modified LDL, mmLDL), ως υπεύθυνα για την ικανότητά της να προάγει τη σύνδεση ενδοθηλιακών κυττάρων με τα μονοκύτταρα (78, 79). Τα οξειδωμένα φωσφολιπίδια συμμετέχουν σε όλα τα στάδια της αθηρωματικής νόσου (80). Είτε σε ελεύθερη μορφή είτε συνδεδεμένα με την apoB100 αναγνωρίζονται από τον υποδοχέα CD36 και έτσι προάγεται ο σχηματισμός αφρωδών κυττάρων (81). Επίσης, τα οξειδωμένα φωσφολιπίδια σε χαμηλές συγκεντρώσεις διεγείρουν τον πολλαπλασιασμό των λείων μυϊκών ινών, ενώ σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις ρυθμίζουν την απόπτωσή τους. Επιπλέον, φαίνεται ότι διεγείρουν την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων. Τα οξειδωμένα φωσφολιπίδια προάγουν, επίσης, μια ανοσολογική απάντηση δημιουργώντας νέους επιτόπους, οι οποίοι αναγνωρίζονται από φυσικά αντισώματα. Ακόμα, επάγουν την προσκόλληση των μονοκυττάρων στα ενδοθηλιακά κύτταρα, ενώ, επίσης, επάγουν την παραγωγή κυτταροκινών και χυμοκινών (15, 82). Τέλος, τα οξειδωμένα φωσφολιπίδια ενεργοποιούν την παραγωγή του ιστικού παράγοντα (tissue factor, TF), μειώνουν την έκφραση της αντιπηκτικής γλυκοπρωτεΐνης θρομβομοδουλίνης και την αντιπηκτική ενεργότητα του αναστολέα του ιστικού παράγοντα (tissue factor pathway inhibitor, TFPI) (77, 83, 84). Τα οξειδωμένα φωσφολιπίδια φαίνεται επίσης ότι οδηγούν στην παραγωγή ROS, προάγοντας το οξειδωτικό stress (85).

Εκτός από τις φλεγμονώδεις δράσεις τους, τα οξειδωμένα φωσφολιπίδια επάγουν διαδικασίες οι οποίες προστατεύουν τα κύτταρα (76, 80). Το καλύτερο παράδειγμα είναι η ικανότητά τους να αναστέλλουν τις δράσεις του λιποπολυσακχαρίτη (lipopolysaccharides, LPS). Τα οξειδωμένα φωσφολιπίδια αναστέλλουν τις δράσεις του LPS σε διάφορους κυτταρικούς τύπους *in vitro*, όπως τα ενδοθηλιακά κύτταρα, μονοκύτταρα και μακροφάγα (86, 87). Επιπλέον, *in vivo* τα οξειδωμένα φωσφολιπίδια φαίνεται ότι προστατεύουν

ενάντια στην LPS-επαγόμενη σήψη (88). Έτσι, φαίνεται ότι τα οξειδωμένα φωσφολιπίδια που παράγονται σε συνθήκες οξείας φλεγμονής λειτουργούν προστατευτικά. Ένας πιθανός μηχανισμός είναι η αναστολή της σύνδεσης της πρωτεΐνης πρόσδεσης του LPS (LPS-binding protein, LBP) με την CD14 (86), η οποία είναι απολύτως απαραίτητη για την ενεργοποίηση του TLR4. Τα οξειδωμένα φωσφολιπίδια συνδέονται με την LBP και τη CD14 και σχηματίζουν σταθερά συμπλέγματα και έτσι αποτρέπουν τη σύνδεση του LPS και την παρουσίασή του στον TLR4.

Ένας άλλος γνωστός προστατευτικός μηχανισμός που ενεργοποιείται από τα οξειδωμένα φωσφολιπίδια είναι η επαγωγή της οξυγονάσης-1 της αίμης (heme oxygenase, HO-1), ενός ενζύμου με κυτταροπροστατευτικές και αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες (89, 90). Η HO-1 καταλύει τον καταβολισμό της αίμης οδηγώντας στην παραγωγή μονοξειδίου του άνθρακα, χολοπρασίνης και ελεύθερου σιδήρου. Το μονοξείδιο του άνθρακα αναστέλλει τη σύνθεση προφλεγμονωδών κυτταροκινών, και ενεργοποιεί αντιφλεγμονώδεις κυτταροκίνες και αναστέλλει την απόπτωση των ενδοθηλιακών κυττάρων (91).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

2.0 ΟΙ ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ ΤΥΠΟΥ TOLL (TOLL-LIKE RECEPTORS, TLRs)

2.1 Γενικά

Το ανοσοποιητικό σύστημα χωρίζεται σε ενδογενές (innate immune system) και επίκτητο (acquired immune system). Το ενδογενές ανοσοποιητικό σύστημα αντιπροσωπεύει την πρώτη γραμμή άμυνας εναντίων των παθογόνων. Αντίθετα, το επίκτητο ανοσοποιητικό σύστημα χαρακτηρίζεται από βραδύτερες διαδικασίες, που διαμεσολαβούνται από τα T- και B- λεμφοκύτταρα, τα οποία εκφράζουν τεράστια ποικιλομορφία αντιγονικών υποδοχέων και έτσι είναι ικανά να απαντούν σε μία μεγάλη ποικιλία αντιγόνων. Αυτό το εξελιγμένο και πολύπλοκο ανοσοποιητικό σύστημα ανευρίσκεται μόνο στα σπονδυλωτά. Πολύ λιγότερη προσοχή από την επιστημονική κοινότητα είχε λάβει το ενδογενές ανοσοποιητικό σύστημα, καθώς ήταν μη-ειδικό και θεωρούνταν ότι οι μόνες λειτουργίες του ήταν η καταστροφή των παθογόνων και η παρουσίαση των αντιγόνων στα κύτταρα του επίκτητου ανοσοποιητικού συστήματος. Ωστόσο, την τελευταία δεκαετία πολλές μελέτες έχουν δείξει ότι το ενδογενές ανοσοποιητικό σύστημα είναι πολύ πιο ειδικό από ότι πίστευαν παλαιότερα και ότι έχει υψηλή ικανότητα στην αναγνώριση και στον διαχωρισμό των ξένων παθογόνων και αυτών του ίδιου οργανισμού. Αυτή η ικανότητα οφείλεται κατά κύριο λόγο σε μία οικογένεια υποδοχέων, που διατηρήθηκε κατά τη διάρκεια της εξέλιξης, γνωστή ως οικογένεια των TLRs. Η ενεργοποίηση του ενδογενούς ανοσοποιητικού συστήματος και των TLRs είναι αναγκαία προϋπόθεση για την επαγωγή του επίκτητου ανοσοποιητικού συστήματος και ιδιαίτερα για την επαγωγή των T-βοηθητικών κυττάρων τύπου 1 (92, 93).

Ο υποδοχέας Toll αρχικά ανακαλύφθηκε στη *Drosophila* ως ένας απαραίτητος υποδοχέας για τη ρύθμιση της πολικότητας του προσθιοπίσθιου άξονα στο πρώιμο έμβρυο εντόμων. Το 1996, ο Hoffmann και οι συνεργάτες του έδειξαν ότι Toll-μεταλλαγμένες μύγες ήταν ιδιαίτερα επιδεκτικές σε μολύνσεις από μύκητες (94). Αυτή η έρευνα έδειξε ότι το ανοσοποιητικό σύστημα, κυρίως το έμφυτο, έχει την ικανότητα να ανιχνεύει την εισβολή μικροοργανισμών. Ένα χρόνο μετά ανακαλύφθηκε το ανθρώπινο ομόλογο της πρωτεΐνης Toll από τους Ruslan Medzhitov και Charles Janeway (95).

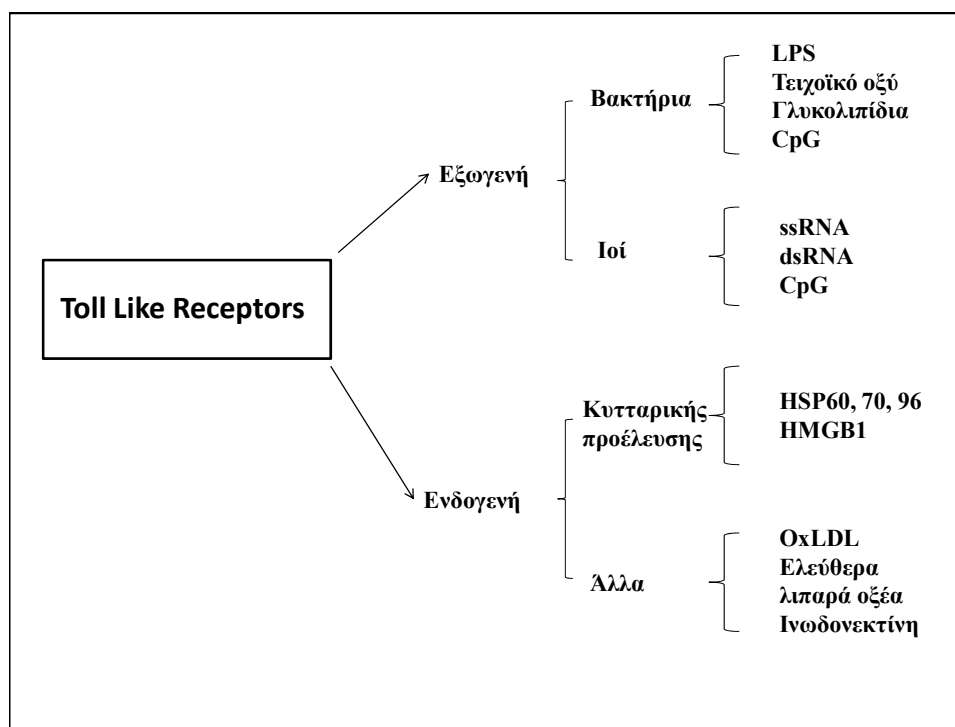
Μέχρι σήμερα στα θηλαστικά έχουν αναγνωρισθεί 13 TLR τύποι, από τους οποίους έχουν αναγνωρισθεί στους ανθρώπους 10 λειτουργικοί τύποι (λειτουργικοί TLRs 11-13 εκφράζονται μόνο στα ποντίκια). Οι TLRs 1-6 εκφράζονται στην κυτταρική επιφάνεια, ενώ οι TLRs 3, 7, 8 και 9 εκφράζονται στο εσωτερικό και κυρίως στα ενδοσώματα και στο ενδοπλασματικό δίκτυο. Ο TLR 10 είναι το πιο πρόσφατο μέλος της οικογένειας των TLRs που έχει αναγνωρισθεί στους ανθρώπους αλλά η λειτουργία του δεν είναι ακόμα αποσαφηνισμένη. Οι άνθρωποι επίσης κωδικοποιούν γονίδιο για τον TLR 11. Ωστόσο, επειδή περιέχει πολλά κωδικόνια τερματισμού, η πρωτεΐνη τελικά δεν εκφράζεται (96-98).

Οι TLRs ανήκουν στους υποδοχείς αναγνώρισης προτύπων (pattern recognition receptors, PRRs), που διαδραματίζουν καθοριστικό ρόλο στο ενδογενές ανοσοποιητικό σύστημα. Οι υποδοχείς αυτοί αναγνωρίζουν ειδικά πρωτεϊνικά μόρια παθογόνων, τα οποία είναι σημαντικά για την επιβίωση των παθογόνων και είναι γνωστά ως μοριακά πρότυπα των παθογόνων (pathogen associated molecular patterns, PAMPs) και επάγουν την ανοσολογική απάντηση (92, 99-101). Τα PAMPs περιέχουν επαναλαμβανόμενες δομές μεταξύ πολλών παθογόνων επιτρέποντας τη φυσική ανοσία να αναγνωρίζει μικροοργανισμούς με περιορισμένο αριθμό PRRs (102).

Τυπικά παραδείγματα των PAMPs περιλαμβάνουν τον LPS των Gram αρνητικών μικροοργανισμών, το τειχοϊκό οξύ (teichoic acid) των Gram θετικών μικροοργανισμών, τα γλυκολιπίδια των μυκοβακτηριδίων, τη ζυμοσάνη του ζυμομύκητα, και το δίκλωνο RNA των ιών (Εικόνα 6).

Πρόσφατα, έχει αποδειχθεί ότι οι TLRs αναγνωρίζουν και αμιγώς ενδογενή πρωτεϊνικά μόρια, τα οποία απελευθερώνονται από τραυματισμένους ιστούς, κατεστραμμένα κύτταρα, πρωτεΐνες εξωκυττάριου υλικού (damaged extracellular matrix proteins) ή οξειδωτικά τροποποιημένες λιποπρωτεΐνες και ονομάζονται μοριακά πρότυπα σχετιζόμενα με βλάβη (damage associated molecular patterns, DAMPs) (Εικόνα 6) (103).

Η αναγνώριση των προσδεμάτων από τους TLRs επάγει τη στρατολόγηση διαφορετικών κυτταροπλασματικών προσαρμογέων και ξεκινά τις οδούς σηματοδότησης οι οποίες τελικά οδηγούν στην ενεργοποίηση μεταγραφικών παραγόντων. Αυτοί οι παράγοντες εμπλέκονται στην έκφραση φλεγμονωδών κυτταροκινών, χυμοκινών, ιντερφερονών τύπου I, συνδιεγερτικών μορίων και άλλων παραγόντων.

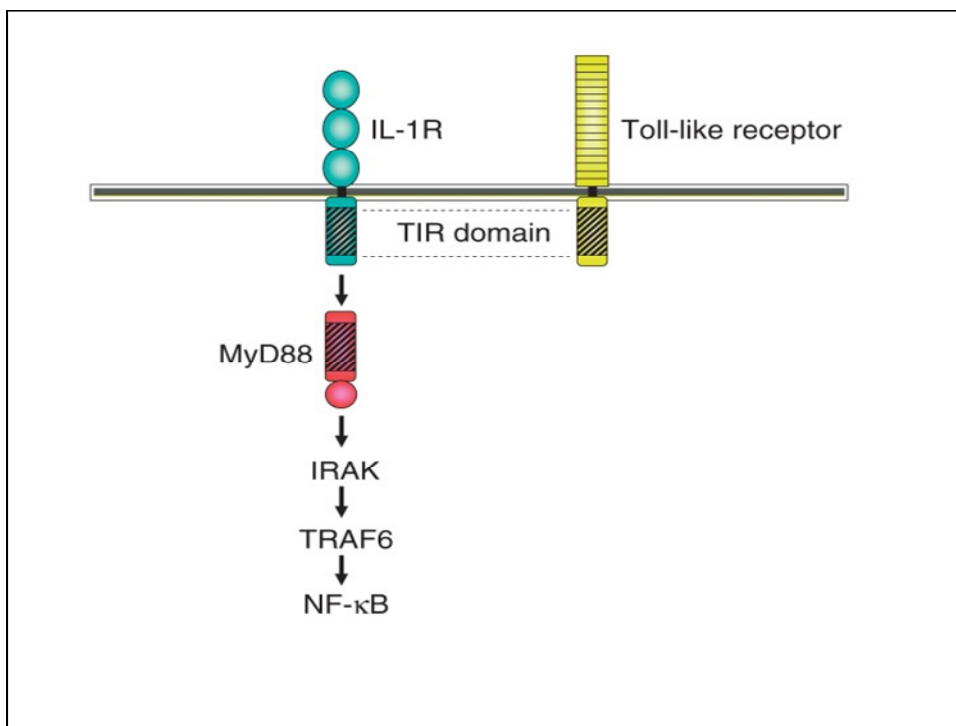


Εικόνα 6. Εξωγενή και ενδογενή προσδέματα των TLRs

2.2 Η δομή και ο εντοπισμός των TLRs

Οι TLRs είναι διαμεμβρανικές γλυκοπρωτεΐνες τύπου I και έχουν τρι-σπονδυλωτή δομή. Η ενδοκυττάρια C-τελική περιοχή εμφανίζει υψηλή ομοιότητα με αυτή του υποδοχέα της IL-1 και είναι γνωστή ως Toll/IL-1 receptor (TIR) περιοχή (Εικόνα 7) (104). Η ενδοκυττάρια περιοχή ενώνεται μέσω μιας διαμεμβρανικής έλικας με την εξωκυττάρια N-τελική περιοχή. Η εξωκυττάρια περιοχή αποτελείται από 19-25 επαναλήψεις λευκίνης (leucine-rich repeats, LRRs) και διαφέρει από αυτήν του IL-1R που περιέχει 3 ομάδες που ομοιάζουν με ανοσοσφαιρίνες (immunoglobulin-like) (Εικόνα 7) (105).

Η εξωκυττάρια περιοχή περιέχει διαφορετικά μοτίβα LRRs, τα οποία είναι υπεύθυνα για την ανίχνευση των PAMPs. Η κυτταροπλασματική TIR περιοχή είναι υπεύθυνη για τη στρατολόγηση διαφόρων προσαρμογέων για την ενεργοποίηση των σηματοδοτικών οδών (103). Οι TLRs συχνά σχηματίζουν ετεροδιμερή ή ομοδιμερή σύμπλοκα ετεροδιμερή (όπως TLR1-TLR2, TLR4-MD-2 ή ομοδιμερή όπως TLR3-TLR3), τα οποία είναι απαραίτητα για την ένωση του προσδέματος και την έναρξη της πορείας σηματοδότησης (106-110).



Εικόνα 7. Η δομή των υποδοχέων της IL-1 και των TLRs

2.3 Τα εξωγενή προσδέματα των TLRs

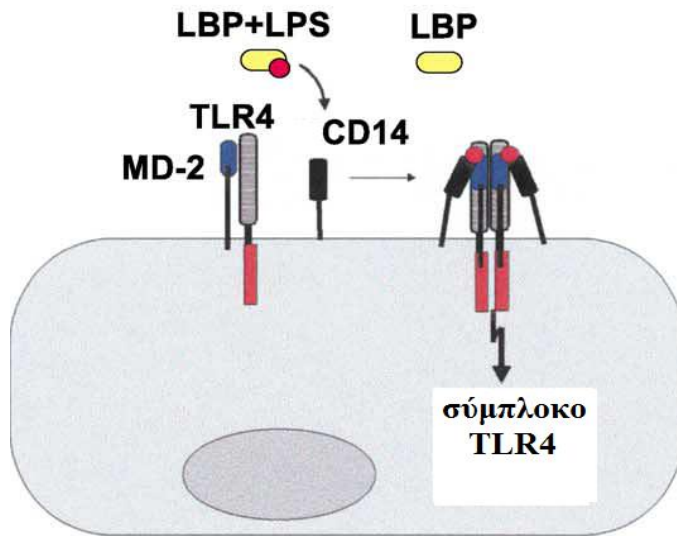
Η οικογένεια των TLRs αναγνωρίζει ένα μεγάλο φάσμα προσδεμάτων από βακτήρια, μύκητες, πρωτόζωα, ιούς και πολλά ενδογενή μόρια (Πίνακας 5). Οι TLRs που βρίσκονται στην κυτταρική επιφάνεια αναγνωρίζουν κυρίως μικροβιακά λιπίδια μεμβράνης (111). Οι TLR1, TLR2, TLR6 και TLR10 αναγνωρίζουν λιποπρωτεΐνες και λιποπεπτίδια από μεγάλο φάσμα παθογόνων που περιλαμβάνει gram-αρνητικά βακτήρια, μυκόπλασμα (112), πεπτιδογλυκάνες και λιποτειχοϊκό οξύ από gram-θετικά βακτήρια (113), λιποαραβινομανόζες από μυκοβακτήρια και LPS από μη-εντεροβακτήρια (114, 115). Ο TLR1 και ο TLR6 σχετίζονται με τον TLR2 και διακρίνουν μικρές διαφορές μεταξύ τριάκυλ- και διάκυλ- λιποπεπτιδίων, αντίστοιχα. Ο TLR4 αναγνωρίζει κυρίως τον LPS, αλλά μπορεί επίσης να αναγνωρίσει μανόζες από τους *Saccharomyces cerevisiae* και *Candida albicans* (116). Ο TLR5 αναγνωρίζει τη βακτηριακή φλαγγελίνη, το κύριο συστατικό του βακτηρίου flagella από gram-θετικά και gram-αρνητικά βακτήρια (117).

Οι ενδοκυττάριοι TLRs αναγνωρίζουν κυρίως νουκλεϊνικά οξέα και τα παράγωγά τους. Ο TLR3 αναγνωρίζει διπλής έλικας RNA (double-stranded RNA, dsRNA) και συμμετέχει στην παραγωγή ανοσίας ενάντια ορισμένων μολύνσεων από ιούς (118). Φυσικοί αγωνιστές

που αποτελούνται από νουκλεϊνικά οξέα, όπως απλής έλικας RNA (single-stranded RNA, ssRNA) ή DNA με μη μεθυλιωμένα CpG μοτίβα, ενεργοποιούν τα κύτταρα του φυσικού ανοσοποιητικού συστήματος μέσω των TLR7/8 και TLR9, αντίστοιχα (119).

Οι TLRs μπορούν επίσης να αναγνωρίσουν συστατικά πρωτόζων όπως *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma brucei*, *Toxoplasma gondii*, *Leishmania major* και *Plasmodium falciparum*. GPI άγκυρες, γλυκοϊνσοιτολφωσφολιπίδια και γονιδιακό DNA από *T. cruzi* αναγνωρίζονται από τους TLR2, TLR4 και TLR9, αντίστοιχα (120).

Ο TLR4 είναι διαφορετικός από τα υπόλοιπα μέλη της οικογένειας των υποδοχέων τύπου Toll διότι απαιτεί τη βοήθεια εξωκυττάρων πρωτεϊνών για να λειτουργήσει ως υποδοχέας για τον LPS (121). Ο LPS αποτελείται από λιπίδιο A (ενδοτοξίνη), πυρήνα ολιγοσακχαρίτη και O-αντιγόνο. Για την αναγνώριση του λιπιδίου A του LPS, απαιτείται το σύμπλοκο TLR4/MD-2/CD14. Η πρωτεΐνη μυελοειδούς διαφοροποίησης 2 (MD-2) ενεργεί ως ένας εξωκυττάριος προσαρμογέας που προσδένεται στο υδροφοβικό τμήμα του LPS και στην εξωκυττάρια περιοχή του TLR4 (103). Η συνέκφραση του MD-2 απαιτείται για τη βέλτιστη επιφανειακή έκφραση (122) και λειτουργία του TLR4 (123, 124). Ο LPS σχηματίζει σύμπλοκο με μια πρόσθετη πρωτεΐνη στον ορό, την LBP, που μετατρέπει τα ολιγομερή μικκύλια του LPS σε μονομερές για παράδοση στο CD14, μια γλυκοζυλοφωσφατιδυλο-ινοσιτολ (GPI) υψηλής συγγένειας μεμβρανική πρωτεΐνη, η οποία μπορεί επίσης να κυκλοφορεί σε διαλυτή μορφή (Εικόνα 8) (105).



Εικόνα 8. Το σύμπλοκο του LPS-υποδοχέα του διμερούς TLR4/MD-2 με το CD14 και τον LPS

Πίνακας 5. Η οικογένεια των TLRs: εξωγενή και ενδογενή προσδέματα

TLR	PAMPS	DAMPS
TLR1	Τριακυλ- λιποπεπτίδια (βακτήρια και μυκοβακτήρια)	
TLR2	Πεπτιδογλυκάνη (Gram-θετικά βακτήρια) Λιποτειχοϊκό οξύ (Gram-θετικά βακτήρια) Λιποπρωτεΐνες/λιποπεπτίδια (παθογόνα) Λιποαραβινομαννάνη (μυκοβακτήρια) Άτυποι LPS (βακτήρια), RSV (ιός) Φωσφολιπομαννάνη (μύκητας) Ασυγκολυτίνη (ιός) Ζυμοσάνη (μύκητες)	HSP 60, 70, 96 Οξειδωμένα φωσφολιπίδια mmLDL HMGB1 Επιφανειοδραστική πρωτεΐνη A
TLR3	dsRNA (ιοί)	
TLR4	LPS (Gram-αρνητικά βακτήρια) Μαννάνη (μύκητας) Γλυκοϊνοσιτολικά φωσφολιπίδια (πρωτόζωα) RSV και MMTV (ιοί)	Ινωδογόνο Hsp 60, 70, 96 Ινωδογόνο Επιπλέον τμήμα A της φιβρονεκτίνης Θειϊκή ηπαρίνη (θραύσματα πολυσακχαριτών) Διαλυτό υαλουρονικό οξύ (ολιγοσακχαρίτες) Β-δεφενσίνη 2 Οξειδωμένα φωσφολιπίδια mmLDL HMGB1 Επιφανειοδραστική πρωτεΐνη A
TLR5	Φλαγγελίνη (βακτήρια)	
TLR6	Διακυλολιποπεπτίδια (βακτήρια)	

	Λιποτειχοϊκό οξύ (Gram-θετικά βακτήρια) Ζυμοσάνη (μύκητες)	
TLR7	ssRNA (ιοί)	
TLR8	ssRNA (ιοί)	
TLR9	dsDNA (ιοί) CpG DNA (βακτήρια, πρωτόζωα, ιοί) Συστατικά ουροπαθογόνων βακτηρίων profiling-like molecule (πρωτόζωα)	

2.4 Τα ενδογενή προσδέματα των TLRs

Υπάρχουν δεδομένα που δείχνουν ότι και ενδογενή μόρια μπορούν να ενεργοποιήσουν τους TLRs και να επάγουν φλεγμονώδεις απαντήσεις (125). Ανάμεσα στα ενδογενή προσδέματα συμπεριλαμβάνονται μόρια όπως οι πρωτεΐνες θερμικού σοκ (heat shock proteins, HSP) 60 και 70, η πρωτεΐνη υψηλής κινητικότητας B1 (high-mobility group protein B1, HMGB1), συστατικά του εξωκυτταρίου υλικού (extracellular matrix) όπως πρωτεογλυκάνηθειϊκής ηπαρίνης (heparin sulfate), ολιγοσφαικαχαρίτες προερχόμενοι από το υαλουρονικό, ινωδονεκτίνη, καθώς επίσης και οι δεφενσίνες, η mmLDL και εξωκυττάρια προϊόντα αποικοδόμησης. Επιπλέον, οι TLR3, TLR7 και TLR9 αναγνωρίζουν ενδογενή νουκλεϊκά οξέα (DNA ή RNA) (126-129) συμπλέγματα χρωματίνης-IgG (130) και επάγουν αυτοάνοσες απαντήσεις.

2.5 Οι πορείες σηματοδότησης μέσω των TLRs

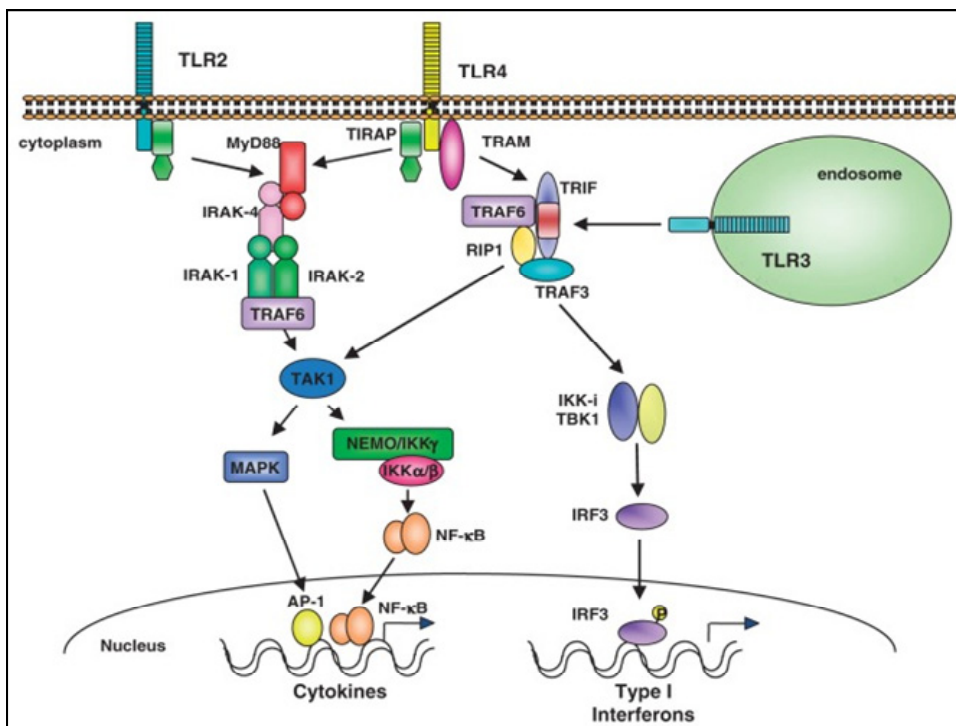
Οι πορείες σηματοδότησης μέσω των TLRs περιέχουν τουλάχιστον μια MyD88-εξαρτώμενη πορεία που είναι κοινή σε όλους τους TLRs και μια MyD88-ανεξάρτητη πορεία που είναι ιδιαίτερη στις πορείες σηματοδότησης μέσω των TLR3 και TLR4 (131).

Τέσσερις ενδοκυτταροπλασματικοί TIR-προσαρμοστές που εμπλέκονται στην πορεία σηματοδότησης των TLRs έχουν αναγνωρισθεί: ο παράγοντας μυελοειδούς διαφοροποίησης

88 (myeloid differentiation factor 88 - MyD88), ο παράγοντας που περιέχει την περιοχή TIR και επάγει την IFN-β (TIR domain-containing adaptor inducing IFN-β, TRIF αλλιώς TICAM1), η πρωτεΐνη προσαρμοστής που περιέχει την περιοχή TIR (TIR domain-containing adaptor protein TIRAP, δομικά σχετίζεται με τον MyD88, γνωστή ως MyD88-adaptor-like MAL protein) και το μόριο του προσαρμοστή που σχετίζεται με τον TRIF (TRIF-related adaptor molecule TRAM, επίσης γνωστό ως TICAM2) (98, 132, 133). Ο MyD88 και ο TRIF μεσολαβούν στην ενεργοποίηση δύο ανεξάρτητων πορειών σηματοδότησης που μπορούν να διακριθούν ως MyD88-εξαρτώμενη πορεία και TRIF-εξαρτώμενη πορεία. Ο TIRAP και ο TRAM ενεργούν ως μόρια που γεφυρώνονται με την πρωτεΐνη TIRAP προσλαμβάνοντας τον MyD88 για τους TLR2 και TLR4 και ο TRAM προσλαμβάνοντας τον TRIF για τον TLR4 (103).

2.5.1 MyD88-εξαρτώμενη πορεία

Ο MyD88 είναι απαραίτητος για τις πορείες σηματοδότησης όλων των μελών της οικογένειας των TLRs. Ο MyD88 προσδένεται στο κυτταροπλασματικό τμήμα των TLRs μέσω αλληλεπίδρασης διαφορετικών TIR περιοχών. Κατά τη διέγερση, οι IRAK-4, -1 (Interleukin-1 receptor-associated kinase -4, -1) και TRAF6 (TNF receptor associated factor) προσλαμβάνονται από τον υποδοχέα, που προκαλεί την αλληλεπίδραση του IRAK-1 με τον MyD88 μέσω των περιοχών “θανάτου». Ο IRAK-4 έπειτα φωσφορυλιώνει τον IRAK-1. Ο φωσφορυλιωμένος IRAK-1, μαζί με τον TRAF6, απομακρύνεται από τον υποδοχέα και μετά ο TRAF6 αλληλεπιδρά με τον TAK1, TAB1 και τον TAB2. Το σύμπλοκο των TRAF6, TAK1, TAB1 και TAB2 σχηματίζει περαιτέρω ένα μεγαλύτερο σύμπλοκο με την Ubc13 και την Uev1A, που προκαλεί την ενεργοποίηση του TAK1. Ο ενεργοποιημένος TAK1 φωσφορυλιώνει το σύμπλοκο IKK, που αποτελείται από IKKα, IKKβ, NEMO/IKKγ και MAP κινάσες όπως η JNK και συνεπώς προκαλεί την ενεργοποίηση μεταγραφικών παραγόντων είτε του NF-κB, είτε του AP-1 (Εικόνα 9) (133).



Εικόνα 9. MyD88-εξαρτώμενη και ανεξάρτητη πορεία σηματοδότησης των TLRs

Αυτή η πορεία σηματοδότησης αποκαλείται ‘MyD88-εξαρτώμενη πορεία’ και είναι απαραίτητη για την έκφραση γονιδίων φλεγμονωδών κυτταροκινών όπως ο TNF- α , η IL-6, η IL-12 και η IL-1 β καθώς και συνδιεγερτικά μόρια (92). Στην περίπτωση των πορειών σηματοδότησης των TLR2 και TLR4, ο TIRAP/MAL απαιτείται επίσης για την ενεργοποίηση της MyD88-εξαρτώμενης πορείας (Εικόνα 9) (134, 135).

2.5.2 MyD88-ανεξάρτητη πορεία

Οι TLR3 και TLR4 ενεργοποιούν την MyD88-ανεξάρτητη πορεία (Εικόνα 9). Ο προσαρμογέας ο TRIF (136, 137), είναι απαραίτητος για την MyD88-ανεξάρτητη πορεία (138, 139). Ο TRIF ενεργοποιεί τον IRF-3, ένα μέλος της οικογένειας μεταγραφικών παραγόντων IRF, για τη στρατολόγηση της IFN- β . Ένας επιπλέον προσαρμοστής, ο TRAM, είναι απαραίτητος στην TLR4-μεσολαβούμενη MyD88-ανεξάρτητη (TRIF-εξαρτώμενη) πορεία (140-142). Ο TRAM ενεργεί ως μια γέφυρα μεταξύ του TLR4 και του TRIF (142). Κατά τη διέγερση, ο TRIF αλληλεπιδρά με τον TBK1 και το IKK α/β , που φωσφορυλιώνει την IRF3, επιτρέποντας τη μετακίνησή της στον πυρήνα και να ενεργοποιήσει τον προαγωγέα της IFN- β (102).

Πρόσφατα, προτάθηκε ότι η IRF3 που ενεργοποιείται κατά την TRIF-εξαρτώμενη πορεία προάγει τη σύνθεση του TNF- α , που στη συνέχεια προσδένεται στον υποδοχέα του για να ξεκινήσει την τελευταία φάση την ενεργοποίησης του NF- κ B με αυτοκρινή τρόπο δράσης (143, 144).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

3.0 ΟΙ ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ ΤΥΠΟΥ TOLL (TOLL-LIKE RECEPTORS, TLRs) ΚΑΙ Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥΣ ΣΤΗΝ ΑΘΗΡΟΣΚΛΗΡΩΣΗ

3.1 Γενικά

Η αντίληψη ότι λοιμώδεις παράγοντες μπορεί να διαδραματίζουν βασικό ρόλο στην αθηρογένεση βασίζεται κυρίως σε μεγάλες πληθυσμιακές μελέτες, που έχουν δείξει συσχέτιση διαφόρων χρόνιων λοιμώξεων με αυξημένο κίνδυνο αθηροσκληρωτικής νόσου (145, 146), καθώς και σε ζωικές μελέτες (147). Επίσης, συχνή η ανεύρεση μικροβιακών αντιγόνων στο ανθρώπινο αθήρωμα (148).

Τα PAMPs διατηρούν την προφλεγμονώδη ικανότητά τους ανεξάρτητα από τη βιωσιμότητα των μικροοργανισμών. Πειραματικές μελέτες έχουν δείξει ότι η χορήγηση κεκαθαρμένων PAMPs ή νεκρών βακτηριδίων διεγείρει την αθηρογένεση (149, 150). Επίσης, PAMPs όπως η πεπτιδογλυκάνη (151), ο LPS (152), και βακτηριδιακό DNA (148) ανευρίσκονται στο ανθρώπινο αθήρωμα. Έτσι είναι πιθανό ότι τα PAMPs, ακόμα και από την φυσιολογική ανθρώπινη χλωρίδα, και όχι οι ίδιοι οι ζωντανοί μικροοργανισμοί ενισχύουν την αθηρογένεση.

Μία υπόθεση είναι ότι τα κυκλοφορούντα μονοκύτταρα φαγοκυτταρώνουν βακτήρια σε σημεία λοίμωξης και μετέπειτα τα «παραδίδουν» στο αναπτυσσόμενο αθήρωμα (153). Εναλλακτικά, τα αρτηριακά κύτταρα εκτίθενται σε PAMPs μέσω παροδικής βακτηριαϊμίας, καθώς έχει παρατηρηθεί ανισχνεύσιμη βακτηριαϊμία μετά από βούρτσισμα των δοντιών. Ωστόσο, είναι πιθανό τα PAMPs να επηρεάζουν τα αρτηριακά κύτταρα μέσω του γαστρεντερικού σωλήνα. Μηχανισμοί, όπως οι στενές εντερικές επιθηλιακές συνάψεις και η ροή βλέννης εμποδίζουν το μεγαλύτερο ποσοστό των προερχόμενων από το έντερο PAMPs. Ωστόσο, στοιχεία υποστηρίζουν ότι πολύ μικρές ποσότητες PAMPs μπορεί να φθάσουν στην κυκλοφορία ακόμα και σε υγιείς ανθρώπους. Έχει παρατηρηθεί ότι η πεπτιδογλυκάνη είναι παρούσα στην ανθρώπινη κυκλοφορία μετά από βακτηριδιακή αποίκιση του εντέρου, αλλά όχι πριν από αυτή (154). Ακόμα, πολλές μελέτες έχουν δείξει ότι ο LPS είναι παρόν, αν και σε πολύ μικρές ποσότητες σε υγιείς ανθρώπους (155-157). Επίσης έχει φανεί ότι ακόμα και μικρές αυξήσεις του LPS στην κυκλοφορία σχετίζονται με 3-

πλάσια αύξηση στον κίνδυνο της αθηροσκλήρωσης, υποστηρίζοντας ότι η υποκλινική ενδοτοξιναιμία μπορεί να σχετίζεται με αθηρογόνες μακροπρόθεσμες επιδράσεις στο αρτηριακό τοίχωμα (155).

3.2 Αλληλεπίδραση των PAMPs με γνωστούς παράγοντες κινδύνου

Έχει φανεί ότι ένας μεγάλος αριθμός διαιτητικών και άλλων παραγόντων μπορεί να αυξήσει την έκθεση σε PAMPs. Η συγκέντρωση πλάσματος του LPS φαίνεται να σχετίζεται και με την αντίσταση στην ινσουλίνη, καθώς σε ασθενείς με διαβήτη έχουν βρεθεί συγκεντρώσεις LPS 75% υψηλότερες από ότι σε ασθενείς χωρίς διαβήτη (156). Διαιτητικοί παράγοντες, επίσης, σχετίζονται με αυξημένα επίπεδα LPS. Ένα πλούσιο σε λίπος γεύμα αυξάνει τη μεταγευματική συγκέντρωση LPS σε υγιή άτομα (158), ενώ 4 εβδομάδες δίαιτας πλούσιας σε λίπη αυξάνουν τις συγκεντρώσεις της ενδοτοξίνης στο πλάσμα σε 2-πλάσιες έως 3-πλάσιες τιμές, σε ποντίκια (159). Επιπρόσθετα, η παχυσαρκία έχει συνδεθεί με την συγκέντρωση του LPS, καθώς παχύσαρκα ποντίκια είχαν μειωμένη ακεραιότητα του εντερικού φραγμού και αυξημένη συγκέντρωση ενδοτοξίνης στην πυλαία κυκλοφορία σε βαθμό 2-πλάσιο ή 3-πλάσιο σε σύγκριση με ομάδα ελέγχου (160). Επίσης, λοιμώδεις παράγοντες έχουν ενοχοποιηθεί για την αποσταθεροποίηση και τη ρήξη της αθηροσκληρωτικής πλάκας και την πρόκληση οξέων στεφανιαίων συμβαμάτων, γεγονός που έχει στηριχθεί κυρίως σε παρατηρήσεις ως προς την εποχιακή κατανομή οξέων στεφανιαίων συμβαμάτων (161, 162), όπως επίσης και σε μελέτες που δείχνουν ότι ο εμβολιασμός κατά της γρίπης και του πνευμονιοκόκου μπορεί να μειώσει τα οξέα στεφανιαία συμβάματα (163-165). Η υπόθεση που έχει διατυπωθεί είναι ότι η συστηματική φλεγμονή που προκαλεί μία λοίμωξη οδηγεί σε διαταραχή της δομής της αθηροσκληρωτικής πλάκας, προκαλώντας αύξηση του αριθμού των φλεγμονωδών κυττάρων (166). Αυξημένος αριθμός μακροφάγων, T-λεμφοκυττάρων, και δενδριτικών κυττάρων έχει παρατηρηθεί, επίσης, στις αθηροσκληρωτικές πλάκες σε μελέτες αυτοψίας σε ασθενείς με συστηματική λοίμωξη (167).

Οι θεραπευτικές προσεγγίσεις με αντιβιοτικά έχουν αποτύχει να δείξουν κάποιο ευεργετικό αποτέλεσμα (168-170). Ο πιο πιθανός λόγος για τις αστοχίες αυτές είναι ότι οι περισσότερες από αυτές τις μελέτες στόχευσαν στην εξάλειψη ενός μόνο τύπου μικροβίου (συνήθως *C. Pneumoniae*), ενώ εικάζεται ότι πολλά διαφορετικά είδη μικροοργανισμών

συντελούν στον αθηροσκληρωτικό κίνδυνο (149). Έτσι μια πιο εύλογη θεραπευτική προσέγγιση είναι όχι η στόχευση των μικροοργανισμών, αλλά ή στόχευση του μηχανισμού μέσω του οποίου προάγουν τις βλαπτικές τους επιδράσεις.

3.3 TLRs: πειραματικά μοντέλα αθηροσκλήρωσης

Οι TLRs και ειδικότερα οι TLR2 και TLR4 συσχετίζονται άμεσα με την αθηροσκληρωτική νόσο, όπως αποδεικνύεται από διάφορες μελέτες κυρίως σε γενετικά τροποποιημένα ζωικά μοντέλα. Σε $apoE^{-/-}$ ποντίκια, η απώλεια της πρωτεΐνης MyD88 (η οποία είναι απαραίτητη για τη σηματοδότηση τόσο του TLR2 όσο και του TLR4) οδηγεί σε μείωση του αθηροσκληρωτικού φορτίου κατά 60%, μείωση της συσσώρευσης μακροφάγων καθώς και της έκκρισης κυτταροκινών (171). Επίσης, $apoE^{-/-}TLR4^{-/-}$ ποντίκια μετά από χορήγηση διαίτας πλούσιας σε χοληστερόλη για 6 μήνες είχαν μειωμένο αθηροσκληρωτικό φορτίο σε σύγκριση με ομάδα ελέγχου (172). Η σημασία του TLR4 στην αθηρογένεση επιβεβαιώνεται επίσης και από μία ακόμα μελέτη σε C3H/HeJ ποντίκια. Αυτά τα ποντίκια έχουν μια σημειακή μετάλλαξη η οποία οδηγεί σε μη λειτουργικό TLR4. Στη μελέτη αυτή, η μετάλλαξη κατέστησε τα ποντίκια ανθεκτικά στην επαγόμενη από διαίτα υψηλή σε χοληστερόλη αθηροσκλήρωση (173). Σε $LDLr^{-/-}$ ποντίκια η εξάλειψη του TLR2 οδήγησε σε αναστολή της αθηροσκλήρωσης (150). Συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε μείωση του αθηροσκληρωτικού φορτίου κατά 50% στην αορτή σε $LDLr^{-/-}/TLR2^{-/-}$ ποντίκια μετά από χορήγηση διαίτας πλούσιας σε χοληστερόλη (150). Ακόμα, $apoE^{-/-}/TLR2^{-/-}$ ποντίκια παρουσιάζουν μειωμένο αθηροσκληρωτικό φορτίο και μειωμένη παραγωγή κυτταροκινών (174).

Οι TLR2 και TLR4 εκφράζονται σε όλους τους κυτταρικούς τύπους που σχετίζονται με την αθηρογένεση, όπως στα μονοκύτταρα (175, 176), ενδοθηλιακά κύτταρα (177), αγγειακά λεία μυϊκά κύτταρα (178) και αιμοπετάλια (179). Πριν από μία περίπου δεκαετία οι Frantz et al έδειξαν ότι τα καρδιακά μυοκύτταρα εκφράζουν τον TLR4 και ότι η έκφραση του αυξάνεται σε ασθενείς με καρδιομυοπάθεια και σε ζωικά μοντέλα με καρδιακή δυσλειτουργία (180).

Στη συνέχεια μελέτες έδειξαν ότι οι TLR2 και TLR4 υπερεκφράζονται στις αθηροσκληρωτικές πλάκες σε σύγκριση με φυσιολογικές αρτηρίες κυρίως σε μακροφάγα και ενδοθηλιακά κύτταρα, καθώς και σε ινοβλάστες στον εξωτερικό χιτώνα (181-184). Ο TLR2 ανευρίσκεται επίσης αυξημένος στα ενδοθηλιακά κύτταρα σε περιοχές μειωμένης

αιματικής ροής, όπου υπάρχει προδιάθεση για ανάπτυξη αθηρωματικής πλάκας, όπως φαίνεται σε LDLr^{-/-} ποντίκια (185). Έχει προταθεί ότι η ενεργοποίηση του TLR2 σε αυτές τις περιοχές μπορεί να ευθύνεται για ρήξη της αθηρωματικής πλάκας και για τα οξεία στεφανιαία συμβάματα μέσω της παραγωγής μεταλλοπρωτεϊνών (186).

Επίσης σε ApoE^{-/-} ποντίκια, η έκφραση των TLR2 και TLR4 στα περιφερικά μονοκύτταρα καθώς και τα επίπεδα πλάσματος ενός ενδογενή διεγέρτη του TLR4 (εξωκυτταρικό τμήμα A [extra cellular domain A, EDA] της ινωδονεκτίνης [fibronectin]), ήταν σημαντικά αυξημένα σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου (187). Όπως έχει φανεί και σε άλλες μελέτες, η έκφραση των TLRs στα λευκοκύτταρα καθορίζεται κυρίως από την έκφρασή τους στα μονοκύτταρα και όχι στα ουδετερόφιλα (176). Ωστόσο, στην παραπάνω πειραματική μελέτη φάνηκε ότι τα μονοκύτταρα στα ApoE^{-/-} ποντίκια εμφάνιζαν μειωμένη ικανότητα για φλεγμονώδη απάντηση μετά από ενεργοποίηση των TLRs, το οποίο παρατηρήθηκε κυρίως στα αρχικά στάδια της αθηροσκλήρωσης (15-25 εβδομάδες) (187). Στα πιο προηγμένα στάδια της αθηροσκληρωτικής νόσου (40 εβδομάδες) τα μονοκύτταρα από τα ApoE^{-/-} ποντίκια φαίνεται ότι απαντούν με ισχυρές φλεγμονώδεις απαντήσεις στην ενεργοποίηση των TLR2 και TLR4 (187). Έτσι λοιπόν, φαίνεται ότι η οξεία ενεργοποίηση των TLRs επάγει ισχυρή φλεγμονώδη απάντηση ωστόσο η συνεχής ενεργοποίηση οδηγεί σε μειωμένη απάντηση (ανοχή), με αποτέλεσμα την αποτροπή της υπερβολικής και καταστροφικής φλεγμονώδους απάντησης. Για παράδειγμα, η ανοχή του TLR4 στον LPS εμποδίζει την παραγωγή προφλεγμονωδών κυτταροκινών σε σηπτικούς ασθενείς (188). Μειωμένες απαντήσεις στην ενεργοποίηση του TLR2 έχουν επίσης παρατηρηθεί (189).

Οι TLR2 και TLR4 συμμετέχουν και σε επιπρόσθετες παθολογικές διαδικασίες των αγγείων όπως η δημιουργία νέου εσωτερικού χιτώνα και η προς τα έξω αναδιαμόρφωση των αγγείων (183, 190-192).

3.4 Πολυμορφισμοί των TLRs και αθηροσκλήρωση

Ενδείξεις ότι οι TLRs συμμετέχουν στην παθογένεση της αθηροσκλήρωσης υπάρχουν και από την αναγνώριση πολυμορφισμών στα γονίδια που κωδικοποιούν τους TLRs (Πίνακας 6). Ωστόσο, τα αποτελέσματα των μελετών αυτών είναι ασαφή.

Από όλες τις μεταλλάξεις των TLRs που έχουν αναγνωρισθεί έως τώρα ο μονονουκλεοτιδικός πολυμορφισμός Asp299Gly (αντικατάσταση Asp με Gly στη θέση 299) του TLR4 έχει μελετηθεί εκτενέστερα. Ο πολυμορφισμός Asp299Gly επηρεάζει τη σύσταση

και τη δομή του εξωκυττάριου τμήματος του TLR4 και συσχετίσθηκε αρχικά με μειωμένο αθηροσκληρωτικό φορτίο στις καρωτίδες (193). Ωστόσο, αυξημένος κίνδυνος οξέος εμφράγματος του μυοκαρδίου βρέθηκε σε άτομα που φέρουν αυτόν το φαινότυπο (184). Επακόλουθες μελέτες έδειξαν αντικρουόμενα αποτελέσματα. Στη μελέτη PRIME, μια μελέτη ασθενών-μαρτύρων ο πολυμορφισμός Asp299Gly δεν φάνηκε να συσχετίζεται με τον καρδιαγγειακό κίνδυνο ή με άλλους φλεγμονώδεις δείκτες (194). Οι Yang et al. επίσης παρατήρησαν ότι ο ίδιος πολυμορφισμός δε συσχετίζεται με στένωση των στεφανιαίων αγγείων (195). Παρομοίως, μελέτες για το συσχετισμό πολυμορφισμών στα γονίδια των TLR2 και TLR9 με τον καρδιαγγειακό κίνδυνο έδειξαν είτε καμία συσχέτιση ή αντικρουόμενα αποτελέσματα (196). Ένας περιορισμός όλων αυτών των μελετών είναι η μεγάλη ποικιλία αλληλόμορφων γονιδίων στις ομάδες ελέγχου.

Πίνακας 6. Μελέτες συσχετίσεις πολυμορφισμών στα γονίδια των TLRs και αθηροσκλήρωσης

Μελέτη	Αριθμός ατόμων	Σχεδιασμός	TLR	Πολυμορφισμός	Odds Ratio	Αποτελέσματα
Αθηροσκλήρωση καρωτιδικών αρτηριών						
Kiechl et al. (193)	810	Αναδρομική	TLR4	Asp299Gly	0.54	Μείωση του αθηροσκληρωτικού φορτίου και του πάχους του μέσω-έσω καρωτιδικού χιτώνα
Netea et al. (197)	493	Αναδρομική	TLR4	Asp299Gly	-	Καμία επίδραση στην πρόοδο της αθηροσκλήρωσης
Norata et al. (198)	1256	Αναδρομική	TLR4	Asp299Gly Thr399Ile	-	Καμία συσχέτιση με το πάχος του μέσω-έσω καρωτιδικού χιτώνα
Labrum et al. (199)	3000	Προοπτική	TLR4	Asp299Gly Thr399Ile	-	Καμία συσχέτιση με το πάχος του μέσω-έσω καρωτιδικού χιτώνα
Αγγειακό Εγκεφαλικό Επεισόδιο						
Lin et al. (200)	457	Αναδρομική	TLR4	Asp299Gly	11.7	Ο πολυμορφισμός αποτελεί παράγοντα κινδύνου για αγγειακά εγκεφαλικά επεισόδια

Στεφανιαία Νόσος						
Ameziane et al. (201)	399	Αναδρομική	TLR4	Asp299Gly	0.53	Ο πολυμορφισμός συσχετίστηκε με χαμηλό κίνδυνο οξέων στεφανιαίων συμβαμάτων
REGRESS trial (202)	885	Προοπτική	TLR4	Asp299Gly	0.74	Ο πολυμορφισμός συσχετίστηκε με χαμηλότερο κίνδυνο καρδιαγγειακών συμβαμάτων σε ασθενείς που έπαιρναν στατίνες
Yang et al. (195)	1400	Αναδρομική	TLR4	Asp299Gly	-	Καμία συσχέτιση
Edfeldt et al. (184)	2774	Αναδρομική	TLR4	Asp299Gly Thr399Ile	1.24	Ο πολυμορφισμός συσχετίστηκε με αυξημένο κίνδυνο οξέων στεφανιαίων συμβαμάτων σε άνδρες αλλά όχι σε γυναίκες
PRIME study (194)	741	Προοπτική	TLR4	Asp299Gly	1.94	Καμία συσχέτιση
Hamann et al. (203)	388	Αναδρομική	TLR2	Asp753Gln	3.1	Αυξημένη συχνότητα σε ασθενείς με επαναστένωση

Holloway et al. (204)	166	Αναδρομική	TLR4	Asp299Gly	0.76	Ο πολυμορφισμός συσχετίστηκε με μειωμένο κίνδυνο οξέων στεφανιαίων συμβαμάτων σε ασθενείς που έπαιρναν στατίνες
Zee et al. (205)	1390	Προοπτική	TLR4	Asp299Gly	0.97	Καμία συσχέτιση
Koch et al. (206)	5264	Αναδρομική	TLR4	Asp299Gly Thr399Ile	0.86	Καμία συσχέτιση

3.5 TLRs και οξέα στεφανιαία συμβάματα

Η ενεργοποίηση των TLRs και η επαγόμενη φλεγμονή μπορεί να αποσταθεροποιήσει την αθηροσκληρωτική πλάκα και να συμβάλλει στην ανάπτυξη των οξέων στεφανιαίων συμβαμάτων σε ασθενείς με ΣΝ (207).

Σε ασθενείς με ασταθή στηθάγχη ή OEM οι TLR2 και TLR4 στα περιφερικά μονοκύτταρα εκφράζονται έως και 2,5 φορές περισσότερο σε σύγκριση με ομάδα ελέγχου ή με ασθενείς με σταθερή στηθάγχη (208-210). Επίσης, η έκφραση των TLR2 και TLR4 στα περιφερικά μονοκύτταρα σε ασθενείς με σταθερή στεφανιαία νόσο συσχετίζεται με τη σοβαρότητα της στεφανιαίας νόσου (211, 212). Η έκφραση του TLR2 στα περιφερικά μονοκύτταρα είναι επίσης αυξημένη σε ασθενείς με ανεύρυσμα αορτής ή περιφερική αρτηριακή νόσο (213).

Στη θεραπεία των οξέων στεφανιαίων συνδρόμων η πιο σημαντική επιδίωξη είναι η αποκατάσταση της κυκλοφορίας του αποφραγμένου αγγείου. Ωστόσο, βλάβη τόσο στα ενδοθηλιακά κύτταρα όσο και στα καρδιακά μυοκύτταρα επέρχεται σαν αποτέλεσμα της επαναιμάτωσης, προκαλώντας μία παράδοξη αύξηση στον κυτταρικό θάνατο και την καρδιακή δυσλειτουργία, το φαινόμενο αυτό ονομάζεται βλάβη ισχαιμίας-επαναιμάτωσης (myocardial I/R injury) και πρωτοπεριγράφηκε από τους Jennings et al το 1960 (214). Οι TLRs φαίνεται να συμμετέχουν στη δυσμενή καρδιακή αναδιαμόρφωση (cardiac remodeling) μετά από βλάβη ισχαιμίας-επαναιμάτωσης (ischemia reperfusion injury) ή οξέος εμφράγματος του μυοκαρδίου. Μελέτες σε πειραματικά ζωικά μοντέλα με σημειακή μετάλλαξη στον TLR4 ή με στοχευμένη διακοπή του TLR4, του TLR2, ή της MyD88 υποστηρίζουν ότι η ενεργοποίηση των TLR είναι δυσπροσαρμοστική (maladaptive) και συνεισφέρει στη δυσλειτουργία της αριστερής κοιλίας και σε αυξημένη θνητότητα μετά από οξύ έμφραγμα μυοκαρδίου (215-222).

3.6 TLRs και ενδογενή προσδέματα: ο ρόλος των οξειδωτικά τροποποιημένων λιποπρωτεϊνών

Όπως αναφέρθηκε πρωτίτερα, διάφορα ενδογενή μόρια φαίνεται ότι προσδένονται και ενεργοποιούν τους TLRs (223). Είναι γνωστό ότι οι οξειδωμένες λιποπρωτεΐνες διαδραματίζουν ουσιώδη ρόλο στη παθογένεια της αθηροσκλήρωσης. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον λοιπόν προκαλούν δεδομένα που δείχνουν ότι οι οξειδωμένες μορφές των

λιποπρωτεϊνών μπορεί να ενεργοποιούν τους TLRs και να επάγουν φλεγμονώδεις απαντήσεις.

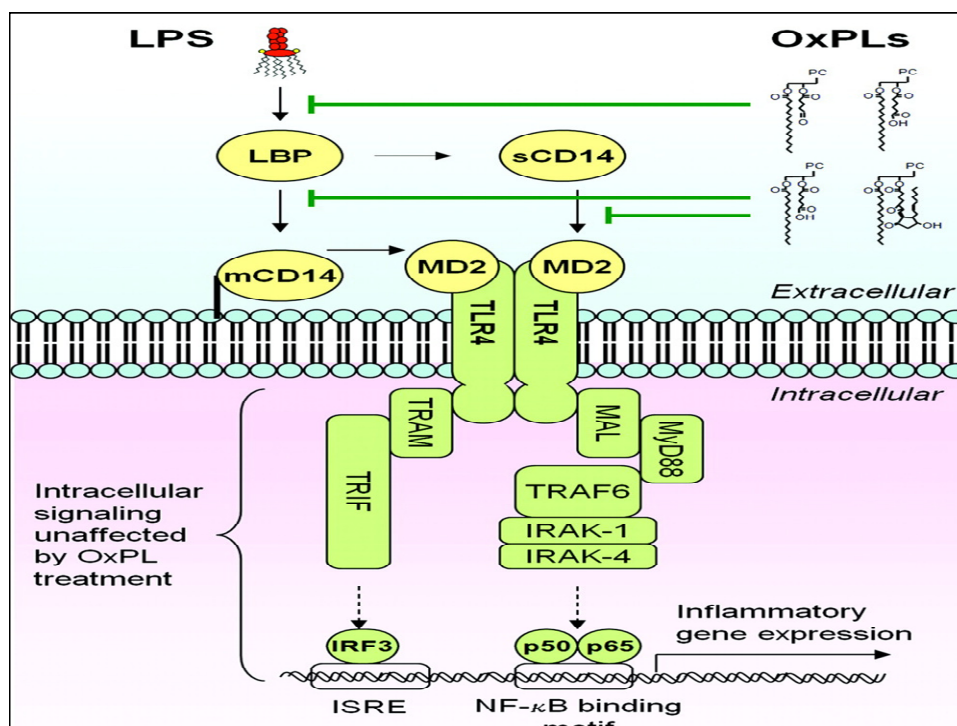
Μελέτες έχουν δείξει ότι η oxLDL και η mmLDL ενεργοποιούν τον TLR4 και στη συνέχεια επάγουν την έκκριση κυτταροκινών (IL-6, IL-1 β και TNF-α) (182, 209, 224-227). Όπως είναι γνωστό, η oxLDL περιέχει πολλά φωσφολιπίδια, απολιποπρωτεΐνες και άλλα πρωτεϊνικά μόρια. Γεννάται λοιπόν το ερώτημα: ποιο ακριβώς μόριο πάνω στην oxLDL και την mmLDL είναι υπεύθυνο για την ενεργοποίηση του TLR4. Κατά τη διάρκεια της οξειδωτικής τροποποίησής της τόσο τα φωσφολιπίδια όσο και η apoB100 υφίστανται ποικιλία χημικών αλλαγών και κυρίως τη οξειδωτική τροποποίηση φωσφολιπιδίων που περιέχουν αλυσίδες πολυακόρεστων λιπαρών οξέων που είναι εστεροποιημένα στη sn2 θέση της φωσφατιδυλχολίνης, όπως το PAPC. Η οξείδωση του PAPC οδηγεί στη δημιουργία διαφόρων οξειδωμένων φωσφολιπιδίων, που ποικίλλουν από εποξισοπροστάνια έως κατακερματισμένα παράγωγα που συνολικά αποκαλούνται oxPAPC. Αυτά είναι τα μόρια που είναι κυρίως υπεύθυνα για τις βιολογικές δράσεις της oxLDL και της mmLDL (78).

In vitro μελέτες δείχνουν ότι η oxPAPC ενεργοποιεί τον TLR4 και επάγει την παραγωγή κυτταροκινών (228, 229). Ωστόσο, αυτό φαίνεται ότι είναι ανεξάρτητο της πρωτεΐνης CD14 (228). Ακόμα, ενδιαφέρον προκαλεί η παρατήρηση ότι τα οξειδωμένα φωσφολιπίδια μπορούν να αναστείλουν την ενεργοποίηση των TLR2 και TLR4 από άλλα προσδέματα (87, 230, 231). Οι υποκείμενοι μηχανισμοί με τους οποίους τα οξειδωμένα φωσφολιπίδια επηρεάζουν την ενεργοποίηση των TLRs δεν είναι πλήρως διευκρινισμένοι, ενώ δύο κύριοι μηχανισμοί έχουν προταθεί: Πρώτον, ότι τα οξειδωμένα φωσφολιπίδια αναστέλλουν την ενεργοποίηση του TLR4 τροποποιώντας το λιπιδιακό περιεχόμενο της κυτταρικής μεμβράνης και αναστέλλοντας έτσι την ενεργοποίηση του συμπλέγματος TLR4-LPS (87, 232). Δεύτερον, ότι τα οξειδωμένα φωσφολιπίδια αναστέλλουν την ενεργοποίηση του TLR2 και του TLR4 δρώντας ανταγωνιστικά με τα πρωτεϊνικά μόρια LBP και MD2 (Εικόνα 10) (233). Η αναστολή αυτή μπορεί να συμβάλλει στην μείωση της οξείας αντίδρασης σε βακτηριδιακά προϊόντα και να επάγει την πιο χρόνια φλεγμονή, που χαρακτηρίζει την αθηροσκληρωτική νόσο.

Δεδομένα που αφορούν τον ρόλο των τροποποιημένων λιποπρωτεϊνών στην ενεργοποίηση του TLR2 είναι αντικρουόμενα. Σε μία μελέτη η oxLDL απέτυχε να επάγει την έκφραση του TLR2 σε περιφερικά μονοκύτταρα ενώ αντίθετα σε μία άλλη μελέτη η oxPAPC ενεργοποίησε τον TLR2 και επήγαγε την παραγωγή IL-8 (87, 209). Επίσης, η mmLDL

φαίνεται ότι ενεργοποιεί και αυξάνει την έκφραση του TLR2 σε ανθρώπινα μονοκύτταρα και μακροφάγα (225).

Συμπερασματικά, τα δεδομένα υποστηρίζουν ότι τα οξειδωτικά τροποποιημένα λιποπρωτεϊνικά μόρια αλληλεπιδρούν με τους TLRs και έτσι επάγουν τη φλεγμονή και την αθηροσκλήρωση ενώ μπορούν να αναστείλουν την ενεργοποίησή τους από άλλα προσδέματα. Ωστόσο, ο υποκείμενος μηχανισμός, τα ακριβή πρωτεϊνικά μόρια που είναι υπεύθυνα, όπως επίσης και η κλινική σημασία, παραμένουν αντικείμενο μελέτης.



Εικόνα 10. Πιθανοί μηχανισμοί επίδρασης των οξειδωμένων φωσφολιπιδίων στην ενεργοποίηση των TLRs

3.7 Η ενεργοποίηση των TLRs και ο μεταβολισμός της χοληστερόλης

Η δημιουργία αφρωδών κυττάρων στο αρτηριακό τοίχωμα αποτελεί βασικό βήμα στην πρόοδο της αθηροσκλήρωσης. Οι TLRs εμπλέκονται άμεσα με τον μεταβολισμό της χοληστερόλης, καθώς έχει φανεί ότι η ενεργοποίηση των TLRs προάγει τη δημιουργία αφρωδών κυττάρων με διάφορους μηχανισμούς (234, 235). Οι TLR3 και TLR4 αλληλεπιδρούν με τους ηπατικούς υποδοχείς-X (liver-X-receptors, LXRs) και έτσι αναστέλλουν τους μηχανισμούς ανάστροφης μεταφοράς της χοληστερόλης (236).

Επιπρόσθετα, η ενεργοποίηση του TLR4 επάγει την έκφραση της ενδοθηλιακής λιπάσης στα μακροφάγα και προάγει την δημιουργία αφρωδών κυττάρων (237). Παραμένει άγνωστο κατά πόσον ενδογενείς προσδέτες του TLR4 μπορούν επίσης να επηρεάσουν το μηχανισμό ανάστροφης μεταφοράς της χοληστερόλης.

Στον αντίποδα, το περιεχόμενο των κυτταρικών μεμβρανών σε χοληστερόλη σχετίζεται άμεσα με την ενεργοποίηση του TLR4 (238). Μακροφάγα από ABCA1^{-/-} ABCG1^{-/-} ποντίκια εμφανίζουν αυξημένη έκφραση TLR4 και έκκριση κυτταροκινών. Αυτό πιθανώς οφείλεται στα αυξημένα επίπεδα χοληστερόλης των κυτταρικών μεμβρανών, ενώ έχει προταθεί ότι η HDL ή η apoA1 μπορεί να επηρεάζουν και να μειώνουν την έκφραση και την ενεργοποίηση του TLR4 (239). Επίσης, μία άλλη μελέτη δείχνει ότι η επαγωγή των LXRs αναστέλλει την οδό TLR4/MyD88 και την επακόλουθη παραγωγή φλεγμονωδών κυτταροκινών (240). In vitro μελέτες δείχνουν ότι η HDL αναστέλλει την LPS επαγόμενη ενεργοποίηση του NF-κβ (241).

Όσον αφορά τον TLR2, φαίνεται ότι δεν συμμετέχει στη δημιουργία αφρωδών κυττάρων αφού σε TLR2^{-/-}apoE^{-/-} ποντίκια δεν υπήρχε καμία διαφορά στη δημιουργία αφρωδών κυττάρων σε σχέση με apoE^{-/-} ποντίκια (174).

3.8 TLRs και μεταβολικό σύνδρομο

Το μεταβολικό σύνδρομο ορίζεται ως συνύπαρξη πολλαπλών μεταβολικών διαταραχών. Τα χαρακτηριστικά του περιλαμβάνουν την παρουσία κοιλιακής παχυσαρκίας, αντίστασης στην ινσουλίνη, υπερτριγλυκεριδαϊμίας, υπέρτασης και χαμηλών επιπέδων της HDL χοληστερόλης. Το μεταβολικό σύνδρομο αποτελεί προγνωστικό παράγοντα καρδιαγγειακής νόσου, ενώ ο επιπολασμός του στο γενικόπληθυσμό και ιδιαίτερα στις δυτικές χώρες είναι τεράστιος (242). Όλες οι επιμέρους συνιστώσες του μεταβολικού συνδρόμου έχουν συσχετισθεί με χαμηλού βαθμού χρόνια φλεγμονή (243, 244), ενοχοποιώντας το σύστημα μη ειδικής ανοσίας στην αιτιοπαθογένεια του συνδρόμου.

Ως αιτιολογικός παράγοντας του μεταβολικού συνδρόμου έχει προταθεί και η αυξημένη διαιτητική πρόσληψη λίπους (245, 246). Φαίνεται ότι δίαιτες πλούσιες σε κορεσμένα λιπαρά οξέα (saturated fatty acids, SFA) συσχετίζονται με αυξημένο κίνδυνο παχυσαρκίας (246), αντίστασης στην ινσουλίνη (245), και αθηροσκλήρωσης (247), ενώ δίαιτες που περιέχουν μακράς αλυσίδας ω-3 πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (ω-3 polyunsaturated fatty acids, PUFA) φαίνεται ότι έχουν προστατευτικό ρόλο(246, 247).

Πρόσφατα στοιχεία δείχνουν ότι οι TLRs έχουν την ικανότητα να αναγνωρίζουν και να ενεργοποιούνται από ενδογενή λιπαρά οξέα, πιθανώς λόγω της δομικής ομοιότητας που παρουσιάζουν με ορισμένα PAMPs. Η ενεργοποίηση των TLR2 και TLR4 από τα μικροβιακά προσδέματά τους μεσολαβείται από τα τμήματα κορεσμένων λιπαρών οξέων αυτών (saturated fatty acyl moieties) (248, 249). Στη *Salmonella* και στην *Escherichia coli* το λιπίδιο A (Lipid A), το ενδοτοξικό τμήμα της LPS, είναι εξακυλιωμένο με SFAs (λαουρικό, μυριστικό και παλμιτικό). Τόσο το αποακυλιωμένο λιπίδιο A (deacylated lipid A) και οι μορφές που είναι ακυλιωμένες με ακόρεστα λιπαρά οξέα αποτυγχάνουν να ενεργοποιήσουν τον TLR4, και στην πραγματικότητα δρουν σαν ανταγωνιστές (250).

Τα ελεύθερα SFAs επάγουν TLR2- και TLR4-εξαρτώμενες απαντήσεις σε διάφορους κυτταρικούς τύπους. Με τη χρήση επιμολυσμένων (transfected) RAW 264.7 μακροφάγων, οι Lee et al. (251, 252) έχει δειχθεί ότι πολλά SFAs, και κυρίως το λαουρικό οξύ [lauric acid (C12 : 0)], ενεργοποιούν το μονοπάτι του TLR4-MγD88 και οδηγούν σε ενεργοποίηση του NF-κB, καθώς και την οδό TLR4-TRIF. Αντίθετα, πολλά ω-3 και ω-6 PUFAs εξασθενούν την επαγόμενη από το λαουρικό οξύ και τον LPS ενεργοποίηση των TLR (252, 253).

Σε μία μελέτη, οι Shi et al. (254) έδειξαν ότι η έλλειψη του TLR4 προστατεύει από την εμφάνιση αντίστασης στην ινσουλίνη. Εκτός από τις επιδράσεις τους στα μακροφάγα και στα λιποκύτταρα, τα κορεσμένα λιπαρά οξέα ενεργοποιούν τον TLR4 στον υποθάλαμο, με αποτέλεσμα να προκαλούνται κεντρικές φλεγμονώδεις απαντήσεις που οδηγούν σε ανορεξιογόνα σήματα (255). Ένας αριθμός μελετών δείχνει ότι TLR4^{-/-} ποντίκια προστατεύονται από την εμφάνιση παχυσαρκίας και αντίστασης στην ινσουλίνη που επάγεται από τη χορήγηση διαίτας πλούσιας σε λίπος, (256-258).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

4.0 ΣΤΑΤΙΝΕΣ

4.1 Γενικά

Οι στατίνες αρχικά απομονώθηκαν και αναγνωρίστηκαν ως δευτερογενείς μεταβολίτες των μυκήτων (259). Αναστέλλουν το κύριο βήμα στη σύνθεση της χοληστερόλης, δηλαδή τη μετατροπή του 3-υδροξυ-3-μεθυλ-γλουταρύλ-συνένζυμου Α (3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A, HMG-CoA) σε 1-μεβαλονικό οξύ, αφού συνδέονται στο ενεργό μέρος της HMG-CoA αναγωγάσης (Εικόνα 11) (260-263). Αυτό οδηγεί σε μείωση της παραγωγής της χοληστερόλης στο ήπαρ, σε υπερέκφραση των LDL υποδοχέων, και αυξημένη κάθαρση της LDL-C. Τα βιοχημικά και φαρμακοκινητικά χαρακτηριστικά των στατινών ποικίλουν ανάλογα με το φάρμακο (264).

Οι στατίνες έχουν μία κοινή αλυσίδα HMG-like (φαρμακοφόρο ομάδα), η οποία συνδέεται με επιπλέον ομάδες που διαφοροποιούν μεταξύ τους τις διάφορες στατίνες (Εικόνα 12). Αυτές οι διαφορετικές αλυσίδες επηρεάζουν τις φαρμακευτικές ιδιότητες των στατινών, συμπεριλαμβανομένου (1) της συγγένειας με το ενεργό μέρος της HMG-CoA αναγωγάσης, (2) του ρυθμού διήθησης στους ηπατικούς και μη ηπατικούς ιστούς, (3) τη διαθεσιμότητα στη συστηματική κυκλοφορία (4) τις οδούς μεταβολισμού και απέκκρισης.

Οι στατίνες μπορούν να χωρισθούν σε 2 ομάδες σύμφωνα με τη δομή τους. Επιπλέον του HMG-like τμήματος, οι στατίνες τύπου 1 (λοβαστατίνη, πραβαστατίνη και σιμβαστατίνη) διαθέτουν ένα δακτύλιο δεκαλίνης (Εικόνα 12). Η ίδια δομή είναι παρούσα στην κομπακτίνη, την πρώτη στατίνη που αναγνωρίστηκε και δεν είναι πλέον σε κλινική χρήση. Οι στατίνες τύπου 2 (ροσουβαστατίνη, ατορβαστατίνη, σεριβαστατίνη, φλουβαστατίνη) περιέχουν μία φλουορο-φαινυλ και μια μεθυλ-εθυλ ομάδα που δεν είναι παρούσες στις τύπου 1 (261).

Η σύνδεση των στατινών τύπου 1 με την HMG-CoA αναγωγάση συμπεριλαμβάνουν αλληλεπιδράσεις με δεσμούς υδρογόνου όπως και αλληλεπιδράσεις με το δακτύλιο δεκαλίνης. Αντίθετα, η μεθυλ-εθυλ ομάδα των στατινών τύπου 2 λειτουργικά αντικαθιστά το δακτύλιο δεκαλίνης, ενώ επιπλέον υπάρχουν αλληλεπιδράσεις ανάμεσα στη φλουορο-φαινυλ ομάδα και την Arg στη θέση 590 της HMG-CoA αναγωγάσης. Επιπλέον αυτών, η ροσουβαστατίνη και η ατορβαστατίνη παρουσιάζουν δεσμούς υδρογόνου ανάμεσα στο

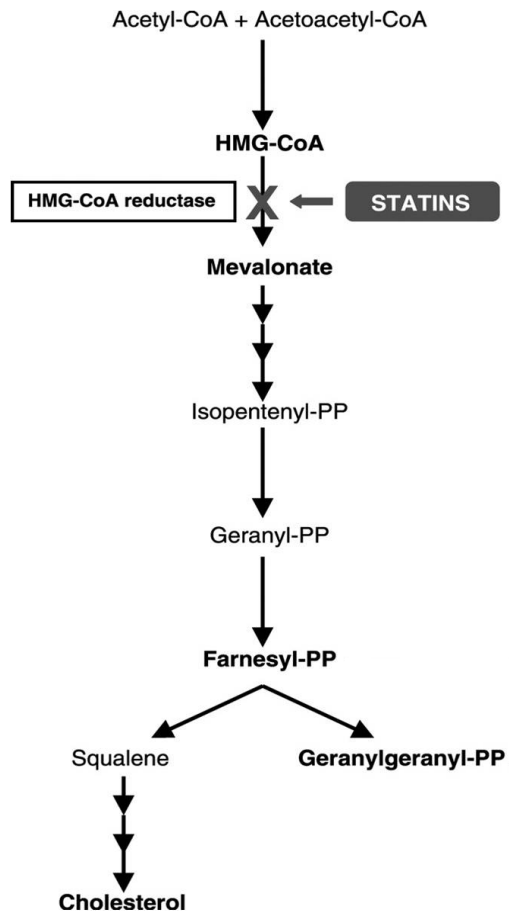
άτομο οξυγόνου της σουλφόνης για τη ροσουβαστατίνη και στο άτομο οξυγόνου του καρβονυλίου για την ατορβαστατίνη. Η ροσουβαστατίνη είναι μοναδική ανάμεσα στις στατίνες γιατί δημιουργεί πολικές αλληλεπιδράσεις ανάμεσα στη ηλεκτροαρνητική ομάδα σουλφόνης και στο κατάλοιπο Arg στη θέση 568.

Η ροσουβαστατίνη παρουσιάζει μεγάλη συγγένεια με τον ενεργό μέρος της HMG-CoA αναγωγάσης, με σταθερά αναστολής [inhibition constant (Ki)] περίπου 0.1 nM. Η ροσουβαστατίνη έχει IC₅₀ (half maximal inhibitory concentration (IC₅₀) 5 nM, σημαντικά μικρότερο από αυτά της ατορβαστατίνης (8 nM), σεριβαστατίνης (10 nM), σιμβαστατίνης (11 nM), φλουβαστατίνης (28 nM) και πραβαστατίνης (44 nM) (265).

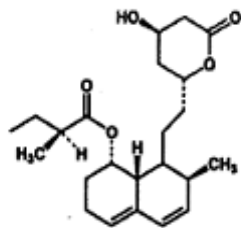
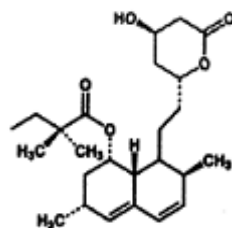
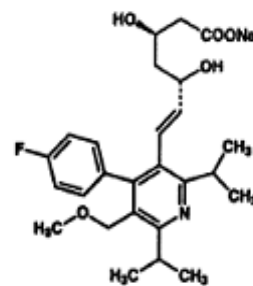
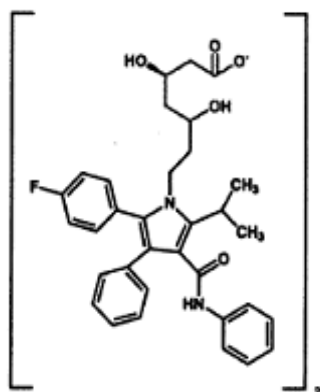
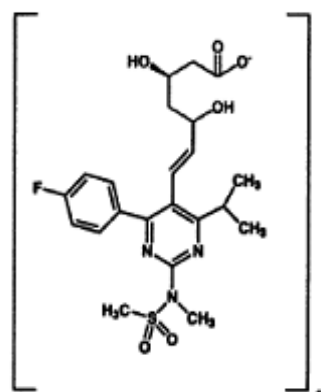
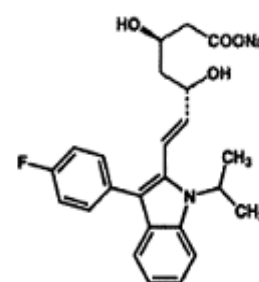
Από τις διαθέσιμες στατίνες, η ροσουβαστατίνη έχει το μεγαλύτερο χρόνο ημίσειας ζωής, περίπου 20 ώρες, σε σύγκριση με 14 ώρες για την ατορβαστατίνη, και 1-2 ώρες για τις φλουβαστατίνη, πραβαστατίνη και σιμβαστατίνη (Πίνακας 7) (266).

Η πραβαστατίνη, η ροσουβαστατίνη και λιγότερο η φλουβαστατίνη είναι υδρόφιλα φάρμακα. Οι λιπόφιλες στατίνες λόγω της φύσης τους διηθούν περισσότερο τους εξωηπατικούς ιστούς. Μελέτες έδειξαν ότι οι στατίνες προσλαμβάνονται από τα ηπατοκύτταρα μέσω παθητικής διάχυσης αλλά και ενεργού μεταφοράς, με τον τελευταίο μηχανισμό να υπερισχύει στις χαμηλές συγκεντρώσεις (267, 268). Μελέτες σε ποντίκια έδειξαν ότι μετά από ενδοφλέβια χορήγηση η ροσουβαστατίνη προσλαμβάνεται από το ήπαρ με σημαντικά μεγαλύτερο ρυθμό από ότι τα άλλα όργανα, (0.9, 0.2, και 0.02 ml/min/gram για το ήπαρ, νεφρό και άλλους ιστούς, αντίστοιχα) (268). Η πραβαστατίνη ένα επίσης υδρόφιλο μόριο δείχνει ηπατική εκλεκτικότητα, ενώ η σιμβαστατίνη δείχνει υψηλή πρόσληψη από το ήπαρ, το σπλήνα και τα επινεφρίδια (Πίνακας 7).

Οι στατίνες χορηγούνται σε μία δόση πριν τη νυχτερινή κατάκλιση, εκτός από τη λοβαστατίνη η οποία χορηγείται σε 1-2 δόσεις με τα γεύματα δεδομένου ότι η τροφή αυξάνει την απορρόφησή της από το έντερο (264).



Εικόνα 11. Μηχανισμός δράσης των στατινών

**Compactin****Simvastatin****Cerivastatin****Atorvastatin****Rosuvastatin****Fluvastatin**

Εικόνα 12. Στατίνες τύπου 1 και στατίνες τύπου 2

Πίνακας 7. Φαρμακοκινητικές ιδιότητες των στατινών

Παράμετρος	Ροσουβαστατίνη	Ατορβαστατίνη	Σιμβαστατίνη	Πραβαστατίνη	Φλουβαστατίνη	Πιταβαστατίνη	Λοβαστατίνη
T_{max} (ώρες)	3	2-3	1.3-2.4	0.9-1.6	0.4-2.1	0.6-0.8	2-4
Βιοδιαθεσιμότητα	20	12	5	18	24	80	5
Λιπόφιλο μόριο	OXI	NAI	NAI	OXI	NAI	NAI	NAI
T_{1/2}	19	15	2-3	1.3-2.8	1.2	10-11	2-9
Μεταβολισμός	Ελάχιστα από τα CYP2C9 και CYP2C19 Απέκκριση από τη χολή	CYP3A4	CYP3A4	Απέκκριση από τη χολή και τα ούρα	CYP2C9	Ελάχιστα από τα CYP2C8 και CYP2C9	CYP3A4

4.2 Επίδραση στα λιπίδια

Οι στατίνες προκαλούν σημαντική μείωση της ολικής χοληστερόλης (total cholesterol, TC) και της LDL-C (30-60%, ανάλογα με το φάρμακο και τη δοσολογία), μια μικρότερη αλλά δοσοεξαρτώμενη μείωση των TG και μια μικρή αύξηση της HDL-C (κατά 5-10%) (269, 270). Η μείωση των TG οφείλεται στη μείωση της σύνθεσης των VLDL από τα ηπατοκύτταρα, καθώς και στην αύξηση του καταβολισμού των πλούσιων σε TG λιποπρωτεϊνών εξαιτίας της αύξησης του αριθμού και της δραστηριότητας των LDL υποδοχέων. Η επίδραση των στατινών στην κατανομή των υποκλασμάτων της LDL ποικίλει ανάλογα με το φάρμακο, καθώς επίσης και ανάλογα με το είδος της υποκείμενης διαταραχής του μεταβολισμού των λιπιδίων (271). Η ροσουβαστατίνη, μία από τις νεώτερες στατίνες έχει φανεί εξαιρετικά αποτελεσματική στη βελτίωση των λιπιδίων και στην επίτευξη των στόχων της LDL-C ενώ το προφίλ παρενεργειών της είναι παρόμοιο με τις άλλες στατίνες (272-274). Η ροσουβαστατίνη αποτελεί την πιο αποτελεσματική στατίνη όσον αφορά τη μείωση της LDL-C (275). Σε δόση 10 mg/ημέρα μειώνει την LDL-C κατά περίπου 45%, ενώ στη δόση των 40 mg/ημέρα μειώνει τα επίπεδα της LDL-C περίπου κατά 60% (276, 277). Η μέγιστη συνιστώμενη ημερήσια δόση της ροσουβαστατίνης δεν πρέπει να υπερβαίνει τα 40 mg. Η ροσουβαστατίνη σε δόση 40 mg/ημέρα μειώνει επίσης τα TG περίπου κατά 20-30%, την nonHDL-C κατά 42-51% και την apoB κατά 37-45%, ενώ αυξάνει σημαντικά τα επίπεδα της HDL-C κατά περίπου 10% (276).

4.3 Ανεπιθύμητες ενέργειες

Τα φάρμακα αυτά είναι καλά ανεκτά και έχουν πολύ λίγες ανεπιθύμητες ενέργειες. Συγκεκριμένα, προκαλούν μια μικρή παροδική ασυμπτωματική δοσοεξαρτώμενη αύξηση των τρανσαμινασών σε ένα μικρό ποσοστό ασθενών (2-5%) (278). Στις περισσότερες περιπτώσεις τα επίπεδα της τρανσαμινασών επιστρέφουν στα φυσιολογικά επίπεδα με τη διακοπή των φαρμάκων ή τη μείωση της δόσης χωρίς να παρατηρηθεί μόνιμη βλάβη του ήπατος. Εξάλλου, πρέπει να αναφερθεί ότι οι ασθενείς με υπερλιπιδαιμία και ιδιαίτερα οι ασθενείς με αυξημένο σωματικό βάρος εμφανίζουν πολύ συχνά λιπώδη διήθηση του ήπατος και απρόβλεπτες διακυμάνσεις των ηπατικών ενζύμων (278). Σημαντικές αυξήσεις των τρανσαμινασών μετά τη χορήγηση των στατινών [>3 φορές τις ανώτερες φυσιολογικές τιμές (upper limit of normal, ULN)] είναι εξαιρετικά σπάνιες και παρατηρούνται συχνότερα σε ασθενείς που καταναλώνουν μεγάλη ποσότητα αλκοολούχων ποτών ή έχουν υποκείμενη

ηπατική νόσο. Σε αυτές τις περιπτώσεις απαιτείται η άμεση διακοπή της χορήγησης των στατινών. Πρέπει να αναφερθεί ότι η χορήγηση των στατινών αντενδείκνυται σε άτομα με οξεία ή χρόνια ηπατική νόσο ή σε αλκοολικούς ασθενείς. Σε ασθενείς που παίρνουν στατίνες συνιστάται τακτικός έλεγχος των ηπατικών ενζύμων. Όπως αναφέρθηκε οι σημαντικές αυξήσεις των τρανσαμινασών (>3 φορές ULN) απαιτούν άμεση διακοπή της θεραπείας. Μετά την αποκατάσταση στα φυσιολογικά επίπεδα των παραμέτρων της ηπατικής βιολογίας είναι δυνατόν να χορηγηθεί προσεκτικά ένα άλλο φάρμακο της ίδιας κατηγορίας σε μικρές δόσεις (278).

Η μυοσίτιδα είναι η πιο σημαντική ανεπιθύμητη ενέργεια των στατινών. Πράγματι, οι στατίνες προκαλούν πολύ σπάνια μυοσίτιδα που χαρακτηρίζεται από σημαντική αύξηση του μυϊκών ενζύμων ή και ραβδομυόλυση (279). Η μυοσίτιδα φαίνεται ότι συσχετίζεται με τη δόση του φαρμάκου και πιθανά με το βαθμό μείωσης των τιμών των λιπιδαιμικών παραμέτρων. Οι ασθενείς πρέπει να ενημερώνονται να διακόπτουν το φάρμακο και να προσέρχονται στο γιατρό σε περιπτώσεις εμφάνισης πόνου, αδυναμίας και ευαισθησίας στους μυς. Σε περιπτώσεις σημαντικής αύξησης των μυϊκών ενζύμων, (>5-10 φορές ULN) η θεραπεία με στατίνες πρέπει να διακόπτεται. Ο κίνδυνος είναι ιδιαίτερα αυξημένος σε άτομα με έκπτωση της νεφρικής λειτουργίας, σε ασθενείς με υποθυρεοειδισμό, σε ασθενείς με ηλεκτρολυτικές διαταραχές (π.χ. υποκαλιαιμία που οφείλεται στη χορήγηση διουρητικών), καθώς και σε άτομα που ταυτόχρονα λαμβάνουν άλλα φάρμακα και συγκεκριμένα κυκλοσπορίνη, ιτρακοναζόλη, μακρολίδια, κουμαρινικά αντιπηκτικά και φιμπράτες (ιδιαίτερα γεμφιμπροζίλη) (279).

Σε όλους τους ασθενείς που παίρνουν στατίνες πρέπει να προσδιορίζονται τα μυϊκά ένζυμα [κυρίως η κινάση της κρεατίνης (creatinine kinase, CK) ανά τακτά χρονικά διαστήματα και να διακόπτεται άμεσα η χορήγησή τους όταν παρατηρηθεί σημαντική αύξηση της CK, καθώς και συμπτώματα που συσχετίζονται με βλάβη των μυών (ευαισθησία, αδυναμία ή πόνος στους μυς) (279).

Άλλες ανεπιθύμητες ενέργειες των στατινών είναι γαστρεντερικές διαταραχές, πονοκέφαλος, εξανθήματα και διαταραχές του ύπνου. Οι στατίνες δεν πρέπει να χορηγούνται σε παιδιά <8 ετών, καθώς και σε έγκυες γυναίκες ή γυναίκες που θηλάζουν (280). Επίσης, δεν πρέπει να χορηγούνται σε γυναίκες της αναπαραγωγικής ηλικίας, εκτός εάν εξασφαλισθεί αποτελεσματική μέθοδος αντισύλληψης.

Όπως αναφέρθηκε, η πραβασατίνη, η ροσουβασατίνη και λιγότερο η φλουβασατίνη είναι υδρόφιλα φάρμακα. Οι υδρόφιλες στατίνες δεν περνούν τον

αιματεγκεφαλικό φραγμό. Έχει διατυπωθεί η άποψη ότι τα φάρμακα αυτά (και κυρίως η πραβαστατίνη) έχουν λιγότερες ανεπιθύμητες ενέργειες από το κεντρικό νευρικό σύστημα (π.χ. λιγότερες αϋπνίες). Η ατορβαστατίνη και η φλουβαστατίνη έχουν ελάχιστη νεφρική απέκκριση. Έτσι, τα φάρμακα αυτά μπορούν να χορηγηθούν σε ασθενείς με έκπτωση της νεφρικής λειτουργίας.

Ιδιαίτερη αναφορά πρέπει να γίνει στον μεταβολισμό διαμέσου του κυτοχρώματος P450 3A4 των περισσότερων φαρμάκων αυτής της ομάδας (εκτός της φλουβαστατίνης που μεταβολίζεται διαμέσου του κυτοχρώματος P450 2C9, της ροσουβαστατίνης η οποία μεταβολίζεται με γλυκουρονίωση και της πραβαστατίνης που μεταβολίζεται διαμέσου άλλων οδών). Η ταυτόχρονη χορήγηση στατινών και άλλων φαρμάκων που μεταβολίζονται επίσης διαμέσου του κυτοχρώματος P450 3A4 έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση του ηπατικού μεταβολισμού των στατινών, την αύξηση των επιπέδων τους στο πλάσμα και επακόλουθα την εμφάνιση ανεπιθύμητων ενεργειών και κυρίως μυοπάθειας. Φάρμακα που μεταβολίζονται επίσης διαμέσου αυτής της οδού και προκαλούν αύξηση των επιπέδων των στατινών στο πλάσμα είναι το νικοτινικό οξύ, η ερυθρομυκίνη και τα υπόλοιπα μακρολίδια, η σιμεθιδίνη, η μεθοτρεξάτη, ορισμένα αντιμυκητιασικά φάρμακα (π.χ. ιτρακοναζόλη) και η κυκλοσπορίνη (264).

Η ροσουβαστατίνη παρουσιάζει ελάχιστο μεταβολισμό μέσω του κυτοχρώματος P450 (CYP), συμπεριλαμβανομένου ελάχιστου μεταβολισμού μέσω του CYP 3A4, το ισοένζυμο που εμπλέκεται σε μια μεγάλη ποικιλία φαρμακευτικών επιδράσεων (266, 281). Επώαση ανθρώπινων ηπατικών κυττάρων με ροσουβαστατίνη για 48 ώρες οδήγησε σε μικρό ρυθμό μεταβολισμού, ο οποίος αποδόθηκε στο ισοένζυμο CYP 2C9 και λιγότερο στο CYP 2C19. Κανένας σημαντικός μεταβολισμός από το CYP 3A4 δεν παρατηρήθηκε (266, 281). Ο ελάχιστος μεταβολισμός της ροσουβαστατίνης από το σύστημα CYP τη διαφοροποιεί από στατίνες όπως η σιμβαστατίνη και η ατορβαστατίνη, που μεταβολίζονται εκτενώς από το CYP 3A4.

4.4 Πλειότροπες δράσεις

Η έκφραση «πλειότροπος» αναφέρεται συνήθως στη γενετική, και στις πολλαπλές δράσεις ενός γονιδίου. Όσον αφορά στην θεραπεία της δυσλιπιδαιμίας, η φράση έχει γίνει ταυτόσημη με τις κλινικές δράσεις υπολιπιδαιμικών φαρμάκων, που είναι ανεξάρτητες της υπολιπιδαιμικής τους δράσης. Οι στατίνες ως τα πιο συχνά συνταγογραφούμενα φάρμακα

στον κόσμο, έχουν εκτενώς μελετηθεί για επιδράσεις ανεξάρτητες της μείωσης των λιπιδίων. Στους ανθρώπους οι ευεργετικές πλειοτροπικές δράσεις των στατινών περιλαμβάνουν από τη βελτίωση της οστικής πυκνότητας μέχρι τη μείωση της εμφάνισης νόσου Alzheimer. Όσον αφορά στις πλειότροπες δράσεις αυτών στο καρδιαγγειακό σύστημα πολλές μελέτες έχουν δείξει ότι οι στατίνες διαθέτουν τέτοιες δράσεις ανεξάρτητες από τη μείωση των λιπιδίων.

Κλινικές μελέτες που εξέτασαν την υπόθεση των λιπιδίων (“lipid hypothesis”), ότι δηλαδή η μείωση των επιπέδων της χοληστερόλης πλάσματος οδηγεί σε μείωση της στεφανιαίας νόσου, διεξήχθησαν για πρώτη φορά την δεκαετία του 1970 και 1980 (282-285). Τα αποτελέσματα ήταν γενικά θετικά και οδήγησαν με αυξημένη πεποίθηση στο συμπέρασμα ότι η στεφανιαία νόσος μπορεί να μειωθεί με την υπολιπιδαιμική θεραπεία. Ωστόσο, οριστικές αποδείξεις ότι η υπολιπιδαιμική θεραπεία μπορεί να μειώσει την καρδιαγγειακή θνητότητα και να βελτιώσει την ολική θνητότητα ήρθε μετά τη δημοσίευση μελετών που αποτέλεσαν ορόσημα στην πρωτογενή και δευτερογενή πρόληψη (286-290).

Από ιστορική σκοπιά, η υπόθεση ότι οι στατίνες μπορεί να μειώσουν την επίπτωση της στεφανιαίας νόσου σε βαθμό μεγαλύτερο από ότι θα αναμενόταν για την μείωση των λιπιδίων πρώτη φορά υποστηρίχθηκε από τα αποτελέσματα της μελέτης WOSCOPS (291). Σε μία ανάλυση της μελέτης συνέκριναν άτομα στην ομάδα της πραβαστατίνης με άτομα στην ομάδα του εικονικού φαρμάκου με τα ίδια επίπεδα LDL-C και βρήκαν ότι τα άτομα που ελάμβαναν πραβαστατίνη είχαν μικρότερο καρδιαγγειακό κίνδυνο (291). Έτσι οι ερευνητές υποστήριξαν ότι η μείωση της χοληστερόλης δεν εξηγεί πλήρως τα ευεργετικά αποτελέσματα της πραβαστατίνης στη μείωση του καρδιαγγειακού κινδύνου. Παρόμοια ήταν τα ευρήματα μιας υποανάλυσης της μελέτης AFCAPS/ TexCAPS (Air Force/Texas Coronary Atherosclerosis Prevention Study) (292). Ωστόσο, στη μελέτη αυτή μετά από διόρθωση για τα επίπεδα των apoB και A1, η διαφορά στα ποσοστά για άτομα στην ομάδα της λοβαστατίνης ή στην ομάδα του εικονικού φαρμάκου εκμηδενίστηκε. Οι πλειότροπες δράσεις των στατινών υποστηρίχθηκαν και από τα αποτελέσματα της μελέτης PROVE-IT (Pravastatin or Atorvastatin Evaluation and Infection Therapy), στην οποία ελέγχθηκε η ισοδυναμία ανάμεσα στην πραβαστατίνη 40 mg και ατορβαστατίνη 80 mg σε ασθενείς με πρόσφατο οξύ στεφανιαίο σύνδρομο. Στην μελέτη αυτή, η ατορβαστατίνη μείωσε τα κλινικά συμβάματα κατά 16% περισσότερο σε σχέση με την πραβαστατίνη. Επίσης, η μείωση στα κλινικά συμβάματα στην μελέτη αυτή ήταν εμφανή ήδη από τις 30 πρώτες ημέρες της θεραπείας (293), εύρημα το οποίο πολλοί απέδωσαν σε πλειότροπες δράσεις

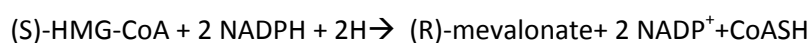
της ατορβαστατίνης. Το εύρημα αυτό επίσης παρατηρήθηκε και στην μελέτη MIRACL (Myocardial Ischemia Reduction with Aggressive Cholesterol Lowering) (294).

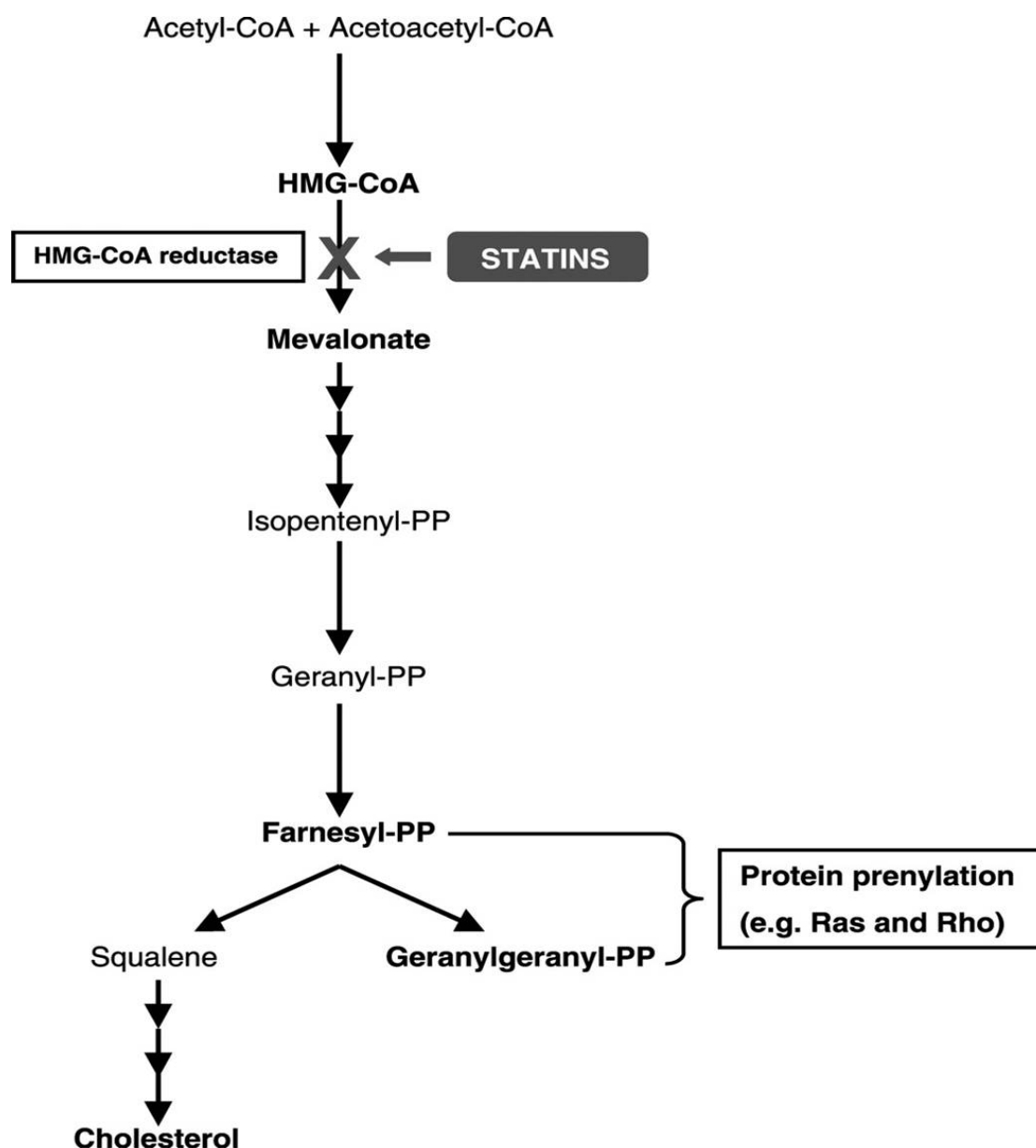
Άλλες υπολιπιδαιμικές θεραπείες όπως τα δεσμευτικά χολικών οξέων (bile acid sequestrants), η νιασίνη (niacin), και οι φιμπράτες έχουν δείξει ότι μειώνουν τα στεφανιαία συμβάματα σε παρόμοιο βαθμό με τις στατίνες αν γίνει διόρθωση για τη μείωση της χοληστερόλης, αν και αυτό μόνο έμμεσα αποδεικνύει την έλλειψη πλειότροπων δράσεων των στατινών. Οι υποστηρικτές των πλειότροπων δράσεων των στατινών υποστηρίζουν ότι στις μελέτες με στατίνες, η μείωση των συμβαμάτων εμφανίζεται πιο γρήγορα από ότι σε μελέτες με άλλα υπολιπιδαιμικά φάρμακα. Στις μελέτες MIRACL και PROVE-IT, σημαντικά ωφέλη, κυρίως μέσω μείωσης της επίπτωσης ασταθούς στηθάγχης, φάνηκαν μέσα στον πρώτο μήνα της θεραπείας ενώ σε μελέτες με άλλα υπολιπιδαιμικά χρειάστηκαν χρόνια για να χωρισθούν οι καμπύλες Kaplan-Meier. Οι μελέτες MIRACL και PROVE-IT, ωστόσο, συμπεριέλαβαν ασθενείς με οξέα στεφανιαία συμβάματα και ως εκ τούτου είχαν πολύ περισσότερα συμβάματα.

4.4.1 Παθοφυσιολογικός μηχανισμός πλειότροπων δράσεων

Αναστέλλοντας την HMG-CoA αναγωγή, οι στατίνες αναστέλλουν επίσης τη σύνθεση σημαντικών ισοπρενοϊδών (isoprenoid intermediates), όπως το φαρνεσυλ-πυροφωσφορικό (farnesylpyrophosphate, FPP) και το γερανυλ-γερανυλ-πυροφωσφορικό (geranylgeranylpyrophosphate, GGPP), που βρίσκονται εκατέρωθεν στο μονοπάτι του 1-μεβαλονικού οξέος (Εικόνα 13) (295). Το όνομα του μονοπατιού προέρχεται από το μεβαλονικό, ένα καρβοξυλικό οξύ, που είναι ο πρόδρομος όλων των ισοπρενοϊδών και στερολών.

Το μεβαλονικό, παράγεται από το ακετυλ-συνένζυμο A (acetyl coenzyme A) και το ακετο-ακετυλ-συνένζυμο A (acetoacetyl coenzyme A) μέσω του ενδιάμεσου HMG-CoA. Η αφαίρεση 4 ηλεκτρονίων από το HMG-CoA στο μεβαλονικό είναι το βασικό βήμα στο μονοπάτι αυτό. Η αντίδραση αυτή καταλύεται από την HMG-CoA αναγωγή [HMG-CoA reductase] (296):





Εικόνα 13. Μονοπάτι του 1-μεβαλονικού οξέος

Τα ισοπρενοΐδη είναι απαραίτητα για τη διατήρηση διαφόρων σημαντικών λειτουργιών (μεμβρανική διαλυτότητα, κυτταρικό πολλαπλασιασμό) σε ανώτερα φυτά, μύκητες και ζώα (295, 297). Τα ισοπρενοΐδη (FPP, GGPP) χρησιμοποιούνται ως προσδέτες (attachments) για τη μετα-μεταγραφική τροποποίηση ενδοκυττάρων πρωτεϊνών που εμπλέκονται στην ενδοκυττάρια μεταγωγή σήματος όπως οι πυρηνικές λαμίνες, και οι μικρές GTP πρωτεΐνες (298). Η ισοπρενυλίωση αυτών των μορίων είναι σημαντική για τη σωστή τοποθέτησή τους στη μεμβράνη και για την ενεργότητά τους.

Η υπεροικογένεια των μικρών GTP πρωτεϊνών αποτελείται από περισσότερα από 100 μέλη, τα οποία γενικά ομαδοποιούνται με βάση κοινά δομικά χαρακτηριστικά σε 5 υποοικογένειες: (1) Ras, (2) Rho/Rac/cdc42, (3) Arf/Sar1, (4) Rab, και (5) Ran. Όλες είναι μονομερείς G πρωτεΐνες χαμηλού μοριακού βάρους (20- έως 30-kDa) που έχουν εξαιρετική ειδικότητα για τη ρύθμιση της κυτταρικής δομής και του κυτταροσκελετικού ανασχηματισμού (299). Στα πλαίσια της καρδιαγγειακής νόσου, οι υποοικογένειες Arf/Sar1, Rab, και Ran παραμένουν υπομελετημένες. Αντίθετα, η πρωτεΐνη Ras, η πρώτη μικρή GTP πρωτεΐνη που συνδέθηκε με την καρδιαγγειακή νόσο, είναι η πιο εκτενώς μελετημένη. Μετά τη Ras, ακολουθεί η οικογένεια Rho/Rac/cdc42 και από τα γνωστά 20 Rho γονιδιακά προϊόντα τα εκτενέστερα μελετημένα είναι οι πρωτεΐνες Rac1 και RhoA. Οι πρωτεΐνες Rho και Ras συμμετέχουν στη ρύθμιση του κυτταροσκελετού της ακτίνης, του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, της έκφρασης διαφόρων γονιδίων, της σύσπασης των λείων μυϊκών ινών, της ενεργότητας των διαύλων ιόντων, της ενδοθηλιακής διαπερατότητας, της παραγωγής ROS, του μεταβολισμού φωσφολιπιδίων κ.α. Οι περισσότερες small GTP πρωτεΐνες (Rho, Rac, Rab, Rap) χρησιμοποιούν GGPP, ενώ μόνο λίγες το FPP (Ras) (300).

Επομένως, είναι πιθανό ότι μαζί με την μείωση της χοληστερόλης, η αναστολή των ενδοκυττάρων -εξαρτημένων από τα ισοπρενοϊδή- πρωτεϊνών συνεισφέρει στις βιολογικές δράσεις των στατινών. Ωστόσο, οι ακριβείς GTPάσες-στόχοι που αναστέλλουν οι στατίνες, ειδικά σε κλινικές δόσεις δεν έχουν καθορισθεί. Δεδομένου ότι οι στατίνες διαφέρουν ως προς τη λιποφιλικότητα τους (lipophilicity), το χρόνο ημιζωής και την ικανότητά τους (potency) (301), έχουν και διαφορετικές ικανότητες για την εξω-ηπατική αναστολή της HMG-CoA αναγωγάσης. Αυτές οι διαφορές στην διαπερατότητα των ιστών και στο μεταβολισμό μπορεί να ευθύνονται για κάποιες από τις διαφορές στις ανεπιθύμητες ενέργειές τους (301, 302) αλλά και για τυχόν διαφορές στις πλειοτροπικές τους δράσεις. Οι λιπόφιλες στατίνες, όπως η σιμβαστατίνη και η φλουβαστατίνη θεωρείται ότι έχουν μεγαλύτερη δυνατότητα να εισέλθουν παθητικά στα αγγειακά κύτταρα σε σύγκριση με τις υδρόφιλες στατίνες, όπως η πραβαστατίνη και η ροσουβαστατίνη. Όπως είναι αναμενόμενο με βάση την υδρόφιλη ή λιπόφιλη φύση των μορίων, οι σχετικά υδρόφιλες στατίνες δείχνουν μεγαλύτερη εκλεκτικότητα για τα ηπατοκύτταρα σε σχέση με άλλα κύτταρα, όπως ινοβλάστες και σκελετικά μυϊκά κύτταρα (266, 281).

Η παρατήρηση ότι οι υδρόφιλες στατίνες έχουν παρόμοιες πλειοτροπικές δράσεις με τις λιπόφιλες θέτει υπό αμφισβήτηση αν όντως υπάρχουν δράσεις των στατινών ανεξάρτητες από τη μείωση της χοληστερόλης. Νεώτερα δεδομένα υποστηρίζουν ότι κάποιες από τις λεγόμενες πλειότροπες δράσεις των στατινών ουσιαστικά

διαμεσολαμβάνονται από την αναστολή της ηπατικής HMG-CoA αναγωγής, οδηγώντας σε μείωση των κυκλοφορούντων επιπέδων των ισοπρενοϊδών (303). Αυτή η υπόθεση εξηγεί γιατί οι υδρόφιλες στατίνες, όπως η πραβαστατίνη και η ροσουβαστατίνη, είναι ικανές να επάγουν ωφέλιμες επιδράσεις στο αγγειακό τοίχωμα ανεξάρτητες από τη μείωση της χοληστερόλης χωρίς να εισέρχονται απευθείας στα αγγειακά κύτταρα.

4.4.2 Επίδραση στην ενδοθηλιακή λειτουργία

Οι στατίνες βελτιώνουν την ενδοθηλιακή λειτουργία, όπως φαίνεται από την αύξηση της ενδοθηλιοεξαρτώμενης αγγειοδιαστολής, όπως καθορίζεται με τη βοήθεια υπερηχογραφίας υψηλής ευκρίνειας μετά από διέγερση του ενδοθηλίου (flow mediated vasodilatation) (304-307). Είναι ευρέως γνωστό ότι η ενδοθηλιακή δυσλειτουργία χαρακτηρίζεται από μία ανισορροπία μεταξύ του NO και των ROS οδηγώντας σε μειωμένη βιοδιαθεσιμότητα του NO στο ενδοθήλιο (308). Οι στατίνες επάγουν την έκφραση και την ενεργότητα της συνθάσης του NO του ενδοθηλίου (endothelial NO synthase, eNOS) (309, 310), ενώ αναστέλλουν το σχηματισμό ROS από τα ενδοθηλιακά κύτταρα (311-313).

Οι ευεργετικές ιδιότητες των στατινών στο ενδοθήλιο οφείλονται εν μέρει και στη μείωση της παραγωγής των 8-ισοπροστανίων, αφού τα επίπεδα των 8-ισοπροστανίων συσχετίζονται με τα επίπεδα της ασύμμετρης διμεθυλαργινίνης (asymmetric dimethylarginine, ADMA), έναν αναστολέα της eNOS (306).

4.4.3 Επίδραση στο οξειδωτικό stress

Η θεραπεία με στατίνες φαίνεται ότι μειώνει την ευαισθησία στην οξείδωση των LDL σωματιδίων και κατ' επέκταση τα επίπεδα της oxLDL (304, 314), που αποτελεί ένα ανεξάρτητο παράγοντα κινδύνου για καρδιαγγειακή νόσο. Επίσης μειώνει τα επίπεδα των αυτοαντισωμάτων κατά της oxLDL όπως και τα ανοσοσυμπλέγματα της oxLDL (315, 316). Οι στατίνες μειώνουν την παραγωγή διαφόρων δεικτών του οξειδωτικού στρες στο αγγειακό τοίχωμα. Μελέτες έχουν δείξει ότι εμποδίζουν την αγγειακή παραγωγή των ανιόντων σουπεροξειδίου (317-320).

Η θεραπεία με στατίνες αυξάνει επίσης την ενεργότητα της παραοξονάσης-1, μίας εστεράσης που είναι παρούσα στο πλάσμα στην HDL, η οποία μπορεί να επιβραδύνει την

οξειδωση της LDL χοληστερόλης και να μειώσει τις προφλεγμονώδεις ιδιότητες της oxLDL, σε άντρες με εγκατεστημένη καρδιαγγειακή νόσο και χαμηλή HDL (321, 322).

Επιπλέον, η αγγειακή παραγωγή ROS μειώνεται μετά τη θεραπεία με στατίνες (312, 319, 323). Οι στατίνες μειώνουν την εξαρτώμενη από την NADPH παραγωγή των ROS, ενώ αυξάνουν την έκφραση της HO-1, η οποία έχει κεντρικό ρόλο στους προστατευτικούς κυτταρικούς μηχανισμούς (324, 325).

Η επίδραση των στατινών στα επίπεδα των 8-ισοπροστανίων, έναν άλλο δείκτη οξειδωτικού στρες έχει ελεγχθεί σε ζωικά μοντέλα καθώς και σε υπερχοληστερολαιμικούς ασθενείς με αντικρουόμενα αποτελέσματα (305, 319, 326, 327).

4.4.4 Αντιφλεγμονώδεις δράσεις

Οι στατίνες μειώνουν την hsCRP, η οποία θεωρείται ένας ανεξάρτητος προγνωστικός παράγοντας καρδιαγγειακού κινδύνου (304, 315, 328-330). Η ικανότητα των στατινών να μειώνουν τα επίπεδα της hsCRP αποτελεί έμμεση ένδειξη για τις αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες αυτών των φαρμάκων. Για παράδειγμα, η ανάλυση των αποτελεσμάτων της μελέτης CARE έδειξε ότι ασθενείς με αυξημένα επίπεδα hsCRP και αμυλοϊδούς Α είχαν αυξημένο κίνδυνο για την εμφάνιση μείζονων καρδιαγγειακών συμβαμάτων (μη θανατηφόρο OEM ή θάνατος που οφείλεται σε ΣΝ) (331). Η χορήγηση πραβαστατίνης είχε ως αποτέλεσμα μια εντυπωσιακή μείωση των καρδιαγγειακών συμβαμάτων κατά 52% στην ομάδα των ασθενών με αυξημένα επίπεδα αυτών των φλεγμονωδών δεικτών πριν την έναρξη της υπολιπιδαιμικής αγωγής. Αντίθετα, η χορήγηση του φαρμάκου προκάλεσε μία πολύ μικρότερη μείωση των καρδιαγγειακών επεισοδίων κατά 25% σε άτομα με φυσιολογικά επίπεδα hsCRP και αμυλοϊδούς Α (331). Η διαφορά αυτή δεν οφειλόταν στα διαφορετικά επίπεδα των λιπιδαιμικών παραμέτρων πριν την έναρξη της αγωγής, αλλά πολύ πιθανά στην ικανότητα των στατινών να μειώνουν τα επίπεδα της hsCRP.

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον έχουν τα αποτελέσματα της μελέτης JUPITER (Justification for the Use of statins in Prevention: an Intervention Trial Evaluating Rosuvastatin) (332, 333), η οποία διακόπηκε μετά από μόλις 1.9 έτη παρακολούθησης. Σε αυτή τη μελέτη πρωτογενούς πρόληψης συμμετείχαν άτομα με χαμηλά επίπεδα LDL-C (<130 mg/dL) και αυξημένα επίπεδα hsCRP (≥ 2 mg/L) τα οποία τυχαιοποιήθηκαν σε ροσουβαστατίνη 20 mg την ημέρα ή εικονικό φάρμακο. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της μελέτης JUPITER, η ροσουβαστατίνη μείωσε κατά 44% το πρωτογενές καταληκτικό σημείο (μη θανατηφόρο OEM, μη

θανατηφόρο ΑΕΕ, νοσηλεία για ασταθή στηθάγχη, επέμβαση επαναιμάτωσης και θάνατο από καρδιαγγειακά αίτια) σε σύγκριση με το εικονικό φάρμακο. Αναλυτικά, η ροσουβαστατίνη μείωσε κατά 54% την εμφάνιση OEM, κατά 48% την εμφάνιση ισχαιμικού ΑΕΕ, κατά 47% τις επεμβάσεις επαναιμάτωσης ή την πιθανότητα εμφάνισης ασταθούς στηθάγχης και κατά 20% τη θνητότητα οποιασδήποτε αιτιολογίας. Τα δεδομένα αυτά υποδεικνύουν ότι η αντιφλεγμονώδης δράση των στατινών πιθανά μεταφράζεται σε κλινικό όφελος.

Εκτός της hsCRP, οι στατίνες μειώνουν επίσης και άλλους δείκτες φλεγμονής όπως ο παράγοντας von Willebrand (vWF), το ινωδογόνο (fibrinogen), το αμυλοϊδές Α (amyloid A) και την Lp-PLA₂ (315, 334, 335).

Ανεξάρτητα της μείωσης της χοληστερόλης, οι στατίνες μειώνουν την έκφραση και τα επίπεδα στο πλάσμα διαφόρων προφλεγμονωδών κυτταροκινών, όπως ο TNF-α (335-339), η IL-6 (330, 336, 338), η IL-8 (336), η IFN-γ (337), η CD40 (340, 341), ο διαλυτός CD40 συνδέτης (soluble CD40 ligand, sCD40L) (330, 341), και η κυκλοοξυγενάση-2 (cyclooxygenase, COX-2) (336).

4.4.5 Επίδραση στη μη αλκοολική λιπώδη νόσο του ήπατος (non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD)

Πολλές μελέτες έχουν δείξει ευεργετικά αποτελέσματα των στατινών στην πρόοδο της NAFLD (342-347). Ωστόσο, οι περισσότερες μελέτες έχουν λίγους ασθενείς, δεν έχουν ομάδα ελέγχου και είναι μικρής χρονικής διάρκειας.

Σε μία πιλοτική μελέτη, η ατορβαστατίνη μείωσε τα επίπεδα των τρανσαμινασών και βελτίωσε την υπερηχογραφική απεικόνιση της NAFLD (346). Η ατορβαστατίνη επίσης αξιολογήθηκε σε μία άλλη πιλοτική μελέτη με 22 ασθενείς με αυξημένα ηπατικά ένζυμα και υπερηχογραφική διάγνωση NAFLD. Όλοι οι ασθενείς έλαβαν ατορβαστατίνη (10-80 mg) για 12 μήνες. Μετά από 6 μήνες, 8 από τους 22 ασθενείς είχαν φυσιολογικά επίπεδα τρανσαμινασών. Στους 12 μήνες το 20% των υπολοίπων 14 ασθενών παρουσίασε φυσιολογικά ηπατικά ένζυμα (347).

Σε μία άλλη μελέτη χορηγήθηκε ροσουβαστατίνη σε 23 ασθενείς με δυσλιπιδαιμία και βιοχημικά και υπερηχογραφικά ευρήματα συμβατά με NAFLD (348). Μετά από 8 μήνες θεραπείας με ροσουβαστατίνη 10 mg, όλοι οι ασθενείς είχαν φυσιολογικά επίπεδα τρανσαμινασών.

Πρόσφατα, μία post hoc ανάλυση της μελέτης GREACE (Greek Atorvastatin and Coronary Heart Disease Evaluation) αξιολόγησε τη θεραπεία με στατίνες (κυρίως ατορβαστατίνη) σε ασθενείς με NAFLD, της οποίας η διάγνωση έγινε με το συνδυασμό των επιπέδων τρανσαμινασών (<3 φορές ULN), το ιστορικό, κλινική εξέταση και υπερηχογραφική διάγνωση (349). Η μελέτη συμπεριέλαβε 437 ασθενείς με αυξημένα ηπατικά ένζυμα, από τους οποίους οι 227 έλαβαν θεραπεία με στατίνες. Τα καρδιαγγειακά συμβάματα ήταν σημαντικά χαμηλότερα στην ομάδα της στατίνης (10 % vs 30%, $p < 0.0001$). Οι ασθενείς που έλαβαν στατίνη εμφάνισαν σημαντική βελτίωση των ηπατικών ενζύμων αντίθετα με την άλλη ομάδα, στην οποία φάνηκε περαιτέρω αύξηση των ηπατικών ενζύμων, κατά τη διάρκεια των 3 χρόνων παρακολούθησης (349).

4.4.6 Επίδραση στο μεταβολισμό της γλυκόζης

Τα δεδομένα για τις επιδράσεις των στατινών στο μεταβολισμό της γλυκόζης είναι αντικρουόμενα. Στη μελέτη JUPITER φάνηκε μια σημαντική αύξηση στην επίπτωση διαβήτη τύπου 2 ανάμεσα σε υγιείς ενήλικες που έλαβαν ροσουβαστατίνη 20 mg έναντι εικονικού φαρμάκου για 1.9 χρόνια (3% έναντι 2.4%, $p = 0.01$) (350). Αντίθετα, στη μελέτη WOSCOPS φάνηκε ότι σε σύγκριση με το εικονικό φάρμακο η πραβαστατίνη μείωσε κατά 30% τον κίνδυνο για την εμφάνιση διαβήτη τύπου 2 ($p = 0.042$) μετά από 5 χρόνια (351).

Μία μετα-ανάλυση 13 μελετών με συνολικά 91140 ασθενείς χωρίς διαβήτη (352) έδειξε ότι η θεραπεία με στατίνες (ατορβαστατίνη 10 mg, πραβαστατίνη 40 mg, σιμβαστατίνη 40 mg ή ροσουβαστατίνη 20 mg) συσχετίζεται με 9% κίνδυνο εμφάνισης διαβήτη σε 4 χρόνια (OR=1.09, 95% CI 1.02-1.17), με μικρό βαθμό ετερογένειας ανάμεσα στις μελέτες ($I^2 = 11\%$). Μία άλλη μετα-ανάλυση έδειξε ότι η διαβητογόνος επίδραση των στατινών μπορεί να είναι δοσοεξαρτώμενη (353). Η θεραπεία με υψηλές δόσεις στατινών (σιμβαστατίνη 80 mg ή ατορβαστατίνη 80 mg) συσχετίσθηκε με υψηλότερη επίπτωση εμφάνισης διαβήτη (OR=1.12), χωρίς ετερογένεια ανάμεσα στις μελέτες ($I^2 = 0\%$). Παρόμοια ήταν και τα αποτελέσματα μιας post-hoc ανάλυσης της μελέτης SPARCL (Stroke Prevention by Aggressive Reduction in Cholesterol Levels) (354). Η επίπτωση του διαβήτη τύπου 2 ήταν 8.71% στους ασθενείς που έλαβαν ατορβαστατίνη 80 mg και 6.06% στους ασθενείς που έλαβαν εικονικό φάρμακο (adjusted HR=1.37, 95% CI: 1.08-1.75, $p = 0.011$).

Οι μηχανισμοί που εξηγούν την αυξημένη επίπτωση διαβήτη δεν έχουν επαρκώς διευκρινιστεί. Ανεξάρτητοι προγνωστικοί παράγοντες της εμφάνισης διαβήτη φαίνονται να είναι τα αυξημένα επίπεδα γλυκόζης νηστείας, το BMI, η αρτηριακή πίεση και τα TG

νηστείας (354). Επιπλέον, ενώ κάποιες στατίνες έχουν συσχετισθεί με αύξηση των επιπέδων της γλυκοζυλιωμένης αιμοσφαιρίνης (glycosylated hemoglobin, HbA_{1c}) σε ασθενείς που λαμβάνουν υψηλές δόσεις, άλλες στατίνες έχουν συσχετισθεί με ουδέτερη ή ευνοϊκή επίδραση στα επίπεδα γλυκόζης σε ασθενείς με ή χωρίς διαβήτη (355). Ανάλυση δεδομένων μιας post-hoc ανάλυσης της μελέτης PROVE-IT TIMI 22 έδειξε ότι, ανάμεσα σε 3382 ασθενείς χωρίς ιστορικό διαβήτη τα επίπεδα της HbA_{1c} αυξήθηκαν κατά 0.12% σε ασθενείς που έλαβαν πραβαστατίνη 40 mg και κατά 0.30% σε αυτούς που έλαβαν ατορβαστατίνη 80 mg ($p < 0.0001$) (65). Παρομοίως, σε μία μελέτη διαβητικών ασθενών που τυχαιοποιήθηκαν σε ατορβαστατίνη 10 mg, πραβαστατίνη 10 mg ή πιταβαστατίνη 2 mg ($n=279$) έδειξε ότι μόνο η ατορβαστατίνη αύξησε τα επίπεδα γλυκόζης και την HbA_{1c} (356). Αφού δεν υπήρχει καμία συσχέτιση ανάμεσα στα επίπεδα της HbA_{1c} και των μεταβολών της LDL-C, ο μηχανισμός που υπόκειται των επιδράσεων στο μεταβολισμό της γλυκόζης είναι ανεξάρτητος των επιδράσεων στα λιπίδια. Αντίθετα με την αρνητική επίδραση της ατορβαστατίνη, η πιταβαστατίνη φαίνεται να έχει ευεργετικό ή ουδέτερο αποτέλεσμα στο μεταβολισμό της γλυκόζης (357, 358).

4.4.7 Επίδραση στη νεφρική λειτουργία

Ο ρόλος των στατινών στην πρωτογενή πρόληψη καρδιαγγειακής νόσου σε ασθενείς με χρόνια νεφρική νόσο (XNN) δεν έχει αποσαφηνιστεί. Δεν υπάρχουν μεγάλες κλινικές μελέτες που να δείχνουν ότι οι στατίνες στην πρωτογενή πρόληψη μειώνουν τον καρδιαγγειακό κίνδυνο σε αυτούς τους ασθενείς. Φαίνεται ότι οι στατίνες είναι αποτελεσματικές και ασφαλείς στη δευτερογενή πρόληψη (359, 360). Σε μία post-hoc ανάλυση της μελέτης ALLIANCE (analysis of the Aggressive Lipid Lowering Initiation Abates New Cardiac Events), η θεραπεία με ατορβαστατίνη μείωσε το σχετικό κίνδυνο για καρδιαγγειακά συμβάματα κατά 28% σε ασθενείς με XNN και κατά 11% σε ασθενείς χωρίς XNN (361). Σε μία υποανάλυση της μελέτης TNT (Treating to New Targets) φάνηκε ότι η θεραπεία με ατορβαστατίνη 80 mg μείωσε το σχετικό κίνδυνο για μεγάλα καρδιαγγειακά συμβάματα κατά 32% σε ασθενείς με XNN και κατά 15% σε ασθενείς με φυσιολογικά επίπεδα ρυθμού σπειραματικής διήθησης (estimated glomerular filtration rate, eGFR) (362).

Η μελέτη SHARP (Study of Heart and Renal Protection) συμπεριέλαβε 9270 ασθενείς με XNN (μέση ηλικία 62 ετών) από τους οποίους οι 3023 ήταν σε αιμοκάθαρση, με τιμές κρεατινίνης ≥ 1.7 mg/dl (150 $\mu\text{mol/l}$) για τους άνδρες και 1.5 mg/dl (130 $\mu\text{mol/l}$) για τις γυναίκες (363). Οι ασθενείς δεν είχαν ιστορικό OEM ή επέμβασης επαναγγείωσης. 5800

(63%) ήταν άνδρες, 2094 (23%) είχαν διαβήτη και 1393 (15%) είχαν ιστορικό καρδιαγγειακής νόσου (στηθάγχη, ΑΕΕ ή περιφερική αγγειακή νόσος). Η μέση συστολική/διαστολική αρτηριακή πίεση ήταν 139/79 mmHg. 6347 ασθενείς είχαν μέσο όρο eGFR 26.6 ml/min/1.73 m². Οι ασθενείς τυχαιοποιήθηκαν (4:4:1) σε συνδυασμό εξετιμίμπης 10 mg με σιμβαστατίνη 20 mg, εικονικό φάρμακο ή σιμβαστατίνη 20 mg. Το πρωταρχικό τελικό καταληκτικό σημείο ήταν τα μεγάλα καρδιαγγειακά συμβάματα (OEM, θάνατος από καρδιαγγειακό αίτιο, ισχαιμικό ΑΕΕ, επεμβάσεις επαναγγείωσης). Η μέση διάρκεια της μελέτης ήταν 4.9 χρόνια. Στους ασθενείς της ομάδας του συνδυασμού σιμβαστατίνης/εξετιμίμπης φάνηκε μείωση των καρδιαγγειακών συμβαμάτων κατά 17% σε σύγκριση με την ομάδα του εικονικού φαρμάκου (RR=0.83 95% CI: 0.74-0.94, p=0.0021) (363).

Μελέτες δείχνουν ότι η ροσουβαστατίνη βελτιώνει παραμέτρους της νεφρικής λειτουργίας (κρεατινίνη ορού και eGFR) (364, 365). Αυτές οι ευεργετικές ιδιότητες ήταν ανεξάρτητες της ηλικίας, του φύλου, της παρουσίας διαβήτη ή υπέρτασης, του προθεραπευτικού eGFR, ή την παρουσία πρωτεϊνουρίας και δεν σχετιζόνταν με τη μείωση της χοληστερόλης. Οι Verma et al έδειξαν ότι μικρής διάρκειας θεραπεία με ροσουβαστατίνη 10 mg μπορεί να αυξήσει το eGFR κατά 11% σε ασθενείς με ΧΝΝ (eGFR < 60 mL/min/1.73 m²) (366). Σε ασθενείς με υπερλιπιδαιμία που έλαβαν ροσουβαστατίνη 10 έως 20 mg/μέρα για 12 έως 20 εβδομάδες δεν φάνηκε καμία αλλαγή σε παραμέτρους της νεφρικής λειτουργίας (κρεατινίνη, eGFR) (329, 367, 368).

Η παρουσία πρωτεϊνουρίας είναι ένας δείκτης νεφρικής νόσου ενώ υπάρχουν δεδομένα ότι η μείωση της πρωτεϊνουρίας καθυστερεί την πρόοδο της ΧΝΝ (369, 370). Φαίνεται ότι οι στατίνες μπορεί να έχουν θετική επίδραση στην πρωτεϊνουρία (371). Τα δεδομένα, ωστόσο, είναι αντικρουόμενα. Κάποιες μελέτες έχουν δείξει σημαντική μείωση της πρωτεϊνουρίας μετά τη θεραπεία με στατίνες, ακόμα και σε ασθενείς με φυσιολογική αρτηριακή πίεση και χωρίς μικροαλβουμινουρία (372-374). Μία μετα-ανάλυση 15 μελετών με 1384 ασθενείς έδειξε ότι οι στατίνες μειώνουν την αλβουμινουρία και την πρωτεϊνουρία σε 13 από τις 15 μελέτες (373). Μια άλλη μετα-ανάλυση 6 τυχαιοποιημένων κλινικών μελετών που συμπεριέλαβε 311 ασθενείς έδειξε ότι οι στατίνες σε σύγκριση με το εικονικό φάρμακο μειώνουν σημαντικά την πρωτεϊνουρία (375). Σε αντίθεση, άλλες μελέτες έχουν δείξει ότι οι στατίνες δεν είχαν καμία επίδραση (376) ή ακόμα και ότι μεγάλες δόσεις στατινών μπορεί να αυξήσουν την πρωτεϊνουρία (377). Επίσης, έχει προταθεί ότι διαφορετικές στατίνες μπορεί να διαφέρουν στις επιδράσεις τους στην πρωτεϊνουρία (378).

Υψηλές δόσεις ροσουβαστατίνης έχουν συσχετισθεί με θετική στο dipstick πρωτεΐνουρία (379). Προκλινικά δεδομένα δείχνουν ότι η επίπτωση dipstick-θετικής πρωτεΐνουρίας ανάμεσα σε ασθενείς που λαμβάνουν ροσουβαστατίνη 80 mg/μέρα (μία δόση που δεν έχει εγκριθεί) είναι 12% (379). Μία μεγάλη ανάλυση δεδομένων σε 10 000 ασθενείς που συμμετείχαν σε μελέτες φάσης II/III με τη ροσουβαστατίνη (5 έως 40 mg/μέρα) έδειξαν ότι αυτή η στατίνη μπορεί να σχετίζεται με την ανάπτυξη dipstick-θετικής πρωτεΐνουρίας ή αιματουρίας με ένα δοσοεξαρτώμενο τρόπο αλλά με σχετικά χαμηλές συχνότητες (<1.2% και <1.8%, αντίστοιχα) οι οποίες είναι συγκρίσιμες με τα ποσοστά άλλων στατινών ή εικονικού φαρμάκου (365). Συνδυασμός αιματουρίας και πρωτεΐνουρίας παρατηρήθηκε μόνο στο 0.1% των ατόμων που λάμβαναν ροσουβαστατίνη 40mg/μέρα (365). Οι πρωτεΐνες που απεκκρίνονται είχαν μοριακό βάρος μικρότερο της αλβουμίνης, ένα εύρημα που συνηγορεί υπέρ σωληναριακής και όχι σπειραματικής προέλευσης της εν λόγω πρωτεΐνουρίας (365). Η ροσουβαστατίνη προκαλεί σημαντική αύξηση στην έκκριση α-1 μικροσφαιρίνης στα ούρα, η οποία αποτελεί ένα δείκτη σωληναριακής λειτουργίας, με δοσοεξαρτώμενο μηχανισμό, ενώ δεν έχει καμία επίδραση στην ουρική απέκκριση πρωτεϊνών που αποτελούν δείκτες σπειραματικής λειτουργίας σε ασθενείς με δυσλιπιδαιμία (367, 368).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

5.0 ΕΖΕΤΙΜΙΜΠΗ

5.1 Γενικά

Μετά την κατάποση η εξετιμίμπη απορροφάται γρήγορα και μεταβολίζεται στο λεπτό έντερο και στο ήπαρ στο γλυκουρονίδιο της. Και τα δύο μόρια (η εξετιμίμπη και το γλυκουρονίδιο της) υπόκεινται σε συνεχή εντεροηπατική ανακύκλωση με χρόνο ημίσειας ζωής περίπου 24 ώρες (380). Η εξετιμίμπη και ο μεταβολίτης της δρουν στη ψυκτροειδή μικρολαχνωτή παρυφή του λεπτού εντέρου, όπου εκλεκτικά αναστέλλουν την απορρόφηση της χοληστερόλης από τον εντερικό αυλό στα εντερικά κύτταρα (381). Αυτή η δράση οφείλεται στην εκλεκτική αναστολή της πρωτεΐνης μεταφοράς στερολών Niemann-Pick C1-like 1 (NPC1L1), η οποία σε φυσιολογικές συνθήκες διευκολύνει την εντερική απορρόφηση της χοληστερόλης και των φυτικών στερολών (382). Η χορήγηση της εξετιμίμπης, διαμέσου της αναστολής της απορρόφησης της χοληστερόλης, μειώνει την ποσότητα της χοληστερόλης που μεταφέρεται στο ήπαρ (διαμέσου των χυλομικρών και των καταλοίπων των χυλομικρών) και τελικά μειώνει την περιεκτικότητα σε χοληστερόλη των αθηρογόνων χυλομικρών, VLDL και LDL. Επιπρόσθετα, η μειωμένη συγκέντρωση της χοληστερόλης στα ηπατοκύτταρα οδηγεί σε αύξηση του αριθμού και της δραστηριότητας των LDL υποδοχέων και σε αύξηση του καταβολισμού των LDL σωματιδίων με τελικό αποτέλεσμα τη μείωση των επιπέδων της LDL-C (383).

Η πρωτεΐνη NPC1L1 αποτελείται από περίπου 1300 κατάλοιπα (384). Εντοπίζεται στη μεμβράνη, αλλά και σε ενδοκυττάρια διαμερίσματα (385). Οι Yu et al. βρήκαν ότι η NPC1L1 μεταφέρεται στην μεμβράνη όταν δεν υπάρχει χοληστερόλη και ότι μόνο όταν εντοπίζεται στη μεμβράνη μπορεί να απορροφήσει χοληστερόλη (386). Η χοληστερόλη περνάει στο εσωτερικό του κυττάρου (ενδοκυττάρωση) μαζί με την πρωτεΐνη NPC1L1. Η εξετιμίμπη πιθανά επιδρά στην αμινοπεπτιδάση N (CD13), μια πρωτεΐνη της μεμβράνης των κυττάρων στην ψυκτροειδή παρυφή του εντερικού τοιχώματος. Παρεμποδίζει τη εσωτερίκευση της NPC1L1, και ως εκ τούτου την πρόσληψη της χοληστερόλης (387).

Η εξετιμίμπη είναι ιδιαίτερα αποτελεσματική όταν συγχρηγείται με φάρμακα που αναστέλλουν την ηπατική παραγωγή χοληστερόλης, δηλ. τις στατίνες. Πράγματι, η αναστολή της εντερικής απορρόφησης της χοληστερόλης από την εξετιμίμπη οδηγεί σε

αυξημένη ηπατική παραγωγή χοληστερόλης, η οποία αναστέλλεται αποτελεσματικά από τις στατίνες. Η μέγιστη συγκέντρωση του φαρμάκου στον ορό επιτυγχάνεται κατά προσέγγιση 1-2 ώρες μετά τη χορήγησή του, ενώ ο χρόνος ημίσειας ζωής της εξετιμίμπης είναι 22 ώρες.

Η εξετιμίμπη χορηγείται σε μία δόση των 10 mg το πρωί ή και το βράδυ χωρίς να επηρεάζεται από τη συγχορήγηση φαγητού (388). Η εξετιμίμπη δεν επηρεάζει την απορρόφηση των λιπαρών οξέων, των TG, των λιποδιαλυτών βιταμινών ή των χολικών οξέων, ούτε τα επίπεδα άλλων συγχορηγούμενων φαρμάκων. Ωστόσο, πρέπει να επισημανθεί ότι η γεμφιπροζίλη και η φαινοφιμπράτη αυξάνουν τα επίπεδα της εξετιμίμπης στον ορό.

5.2 Επίδραση στα λιπίδια

Η μονοθεραπεία με εξετιμίμπη μειώνει τα επίπεδα της LDL-C κατά 7 έως 18% (389-391). Η μείωση της χοληστερόλης με τη χορήγηση εξετιμίμπης ποικίλλει από άτομο σε άτομο και από μελέτη σε μελέτη. Σε δύο πρόσφατες μελέτες η επίδραση της εξετιμίμπης στα επίπεδα της LDL-C κυμάνθηκε από -60% έως +13% και από -45% έως +11% (392). Το γεγονός αυτό πιθανά οφείλεται στη διαφορετική απορρόφηση της χοληστερόλης από το γαστρεντερικό σωλήνα (393). Επιπρόσθετα, γενετική ποικιλομορφία στην πρωτεΐνη NPC1L1 συμβάλλει στο μέγεθος της ανταπόκρισης στην εξετιμίμπη (393). Η HDL-C συνήθως αυξάνεται κατά 1.3 έως 6.2%, ωστόσο αυτή η αλλαγή συνήθως δεν είναι στατιστικά σημαντική (394). Τα TG μειώνονται κατά 1.7 έως 9.4%, και πάλι αυτή η μείωση δεν είναι πάντα στατιστικά σημαντική (394). Η μείωση των TG με την εξετιμίμπη είναι μεγαλύτερη σε άτομα με υψηλές αρχικές τιμές TG (395, 396).

Η εξετιμίμπη ως μονοθεραπεία μειώνει την apoB περίπου κατά 10 έως 15% (394, 397). Τα επίπεδα της apoA1, που αντιπροσωπεύουν την κύρια απολιποπρωτεΐνη των HDL σωματιδίων, αυξάνουν κατά 2.5 έως 6.5% με την εξετιμίμπη (396).

Μελέτες που αξιολόγησαν την εξετιμίμπη μαζί με στατίνες δείχνουν ενίσχυση της υπολιπιδαιμικής δράσης των τελευταίων με την προσθήκη εξετιμίμπης. Έτσι, η LDL-C μειώνεται επιπλέον από -13.8 έως -25.1% και τα TG από -7.5 έως -14% (398-400). Η αποτελεσματικότητα της εξετιμίμπης μαζί με σιμβαστατίνη σε σύγκριση με μονοθεραπεία με ροσουβαστατίνη ελέγχθηκε σε μία μετα-ανάλυση 14 κλινικών μελετών (401). Σύμφωνα με αυτή, η μέση ποσοστιαία μείωση της LDL-C, των TG και της apoB ήταν μεγαλύτερη με το

συνδυασμό εζετιμίμπης/σιμβαστατίνης σε σύγκριση με την αντίστοιχη δόση ροσουβαστατίνης, ενώ η αύξηση της HDL-C ήταν συγκρίσιμη ανάμεσα στις δύο θεραπείες (401).

Η μονοθεραπεία με εζετιμίμπη οδηγεί σε αντισταθμιστική αύξηση της ενεργότητας της HMG-CoA αναγωγάσης (402). Σε μία μελέτη η μονοθεραπεία με εζετιμίμπη μείωσε την κλασματική απορρόφηση της χοληστερόλης κατά 54%, ενώ η σύνθεση της χοληστερόλης αυξήθηκε κατά 89% ($p < 0.001$ έναντι εικονικού φαρμάκου) (403). Ο λόγος λανθοστερόλης προς χοληστερόλη (ένας δείκτης της ενεργότητας της HMG-CoA αναγωγάσης) αυξήθηκε κατά 72% ($p < 0.001$ vs. placebo). Ωστόσο, ο συνδυασμός της εζετιμίμπης με στατίνη αναστέλλει την αύξηση της *de novo* ηπατικής σύνθεσης της χοληστερόλης.

5.3 Κλινικές μελέτες

Πολλές μελέτες έχουν δείξει ότι η εζετιμίμπη μειώνει επιτυχώς την LDL-C (389-391, 397, 404) και επομένως ενδέχεται να μειώνει και την επίπτωση της καρδιαγγειακής νόσου (Πίνακας 8).

Στη μελέτη ARBITER 6-HALT (Arterial Biology for the Investigation of the Treatment Effects of Reducing Cholesterol 6 - HDL and LDL Treatment Strategies) στρατολογήθηκαν άτομα που λάμβαναν στατίνη και τυχαιοποιήθηκαν να πάρουν θεραπεία με εζετιμίμπη ή νιασίνη. Η νιασίνη πέτυχε σημαντική μείωση του πάχους του έσω-μέσου καρωτιδικού χιτώνα (carotid intima media thickness, CIMT). Αντίθετα, παρά το ότι η εζετιμίμπη μείωσε περισσότερο την LDL-C, η θεραπεία με εζετιμίμπη συσχετίστηκε με αύξηση του CIMT. Επιπλέον, η επίπτωση μεγάλων καρδιαγγειακών συμβαμάτων ήταν μικρότερη στην ομάδα της νιασίνης από ότι στην ομάδα της εζετιμίμπης (405). Η μελέτη ENHANCE (Ezetimibe and Simvastatin in Hypercholesterolemia Enhances Atherosclerosis Regression) έδειξε ότι η χορήγηση εζετιμίμπης σε δόση 10 mg, επιπρόσθετα σε 80 mg σιμβαστατίνης απέτυχε να μειώσει σημαντικά το CIMT σε ασθενείς με οικογενή υπερχοληστερολαιμία, σε σύγκριση με την ομάδα της μονοθεραπείας με σιμβαστατίνη, παρότι οι LDL-C και hsCRP μειώθηκαν επιπλέον με την προσθήκη εζετιμίμπης (406). Ωστόσο, στη μελέτη ENHANCE οι ασθενείς ελάμβαναν για αρκετό καιρό θεραπεία με στατίνη, πριν την προσθήκη εζετιμίμπης. Αυτό μπορεί εν μέρει να εξηγήσει γιατί δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές αλλαγές στο CIMT με την προσθήκη εζετιμίμπης (406). Σε πλήρη αντίθεση, η μελέτη SANDS (Stop Atherosclerosis in Native Diabetics Study) έδειξε ότι η προσθήκη εζετιμίμπης σε θεραπεία με στατίνη σχετίζεται με αποτροπή της αύξησης του CIMT (410). Επίσης, στη μελέτη VYCTOR (Vytorin

on Carotid Intima-Media Thickness and Overall Arterial Rigidity) ο συνδυασμός της εξετιμίμπης με τη σιμβαστατίνη οδήγησε σε παρόμοια μείωση στο cIMT σε σύγκριση με υψηλή δόση πραβαστατίνης ή σιμβαστατίνης σε 90 ασθενείς υψηλού καρδιαγγειακού κινδύνου (407). Στη μελέτη SEAS (Simvastatin and Ezetimibe in Aortic Stenosis) ο συνδυασμός εξετιμίμπης μαζί με σιμβαστατίνη 40 mg/ημέρα μείωσε την ανάγκη για χειρουργική επέμβαση αορτοστεφανιαίας παράκαμψης (coronary artery bypass grafting), αλλά δεν επηρέασε το πρωτεύον καταληκτικό σημείο (σύνθετο καταληκτικό σημείο καρδιαγγειακών συμβαμάτων και αντικατάστασης αορτικής βαλβίδας) (408). Η μελέτη SHARP, που δημοσιεύθηκε πρόσφατα, εκτίμησε την αποτελεσματικότητα του συνδυασμού σιμβαστατίνης 20 mg με εξετιμίμπη σε 9000 ασθενείς με χρόνια νεφρική νόσο στον κίνδυνο εμφάνισης καρδιαγγειακών συμβαμάτων σε σύγκριση με εικονικό φάρμακο (392). Στα περίπου 5 χρόνια της παρακολούθησης, οι ασθενείς της ομάδας του συνδυασμού είχαν κατά 17% μικρότερο κίνδυνο εμφάνισης του πρωτεύοντος καταληκτικού σημείου (RR=0.83, 95% CI: 0.74-0.94, p=0.0021) σε σύγκριση με την ομάδα του εικονικού φαρμάκου (363). Περισσότερα και πιο ξεκάθαρα δεδομένα για την επίδραση της εξετιμίμπης στην καρδιαγγειακή νοσηρότητα και θνητότητα θα προκύψουν με την ολοκλήρωση της μελέτης IMPROVE-IT (IMProved Reduction of OuTCHOLomes: Vytorin Efficacy International Trial) σε 18000 ασθενείς με οξέα στεφανιαία συμβάματα που συγκρίνει τη μονοθεραπεία με σιμβαστατίνη 40 mg με το συνδυασμό σιμβαστατίνης 40 mg με εξετιμίμπη (409).

Πίνακας 8. Κλινικές μελέτες με την εξετιμίμπη

Μελέτη	Κύρια έκβαση
SEAS (408)	Η σιμβαστατίνη και η εξετιμίμπη μείωσαν την επίπτωση καρδιαγγειακών συμβαμάτων, αλλά όχι των συμβαμάτων που οφείλονται στην στένωση της αορτικής βαλβίδας
SANDS (410)	Τόσο η στατίνη όσο και η εξετιμίμπη βελτίωσαν τον πάχος του έσω-μέσου καρωτιδικού χιτώνα σε ασθενείς με διαβήτη τύπου 2

VYCTOR (407)	Τόσο η στατίνη όσο και η εξετιμίμπη βελτίωσαν τον πάχος του έσω-μέσου καρωτιδικού χιτώνα
Van der Graaf (2008)(411)	Ο συνδυασμός σιμβαστατίνης/εξετιμίμπης για 53 εβδ. σε ασθενείς με οικογενή υπερχοληστερολαιμία είναι ασφαλής και καλά ανεκτός και μειώνει περισσότερο την LDL-C σε σύγκριση με τη σιμβαστατίνη σαν μονοθεραπεία
EXPLORER(412)	Ο συνδυασμός ροσουβαστατίνης/εξετιμίμπης μειώνει περισσότερο την LDL-C σε σύγκριση με τη ροσουβαστατίνη σαν μονοθεραπεία σε ασθενείς που δε μπορούν να πετύχουν τους LDL στόχους
Masuda et al. (413)	Η εξετιμίμπη μειώνει τη μεταγευματική αύξηση χοληστερόλης και τριγλυκεριδίων σε ασθενείς με δυσλιπιδαιμία τύπου IIb
Gagne et al. (414)	Η εξετιμίμπη μαζί με σιμβαστατίνη ή ατορβαστατίνη σε ασθενείς με οικογενή υπερχοληστερολαιμία σχετίζεται με μεγαλύτερη μείωση της LDL-C από ότι η μονοθεραπεία με στατίνες

5.4 Πλειότροπες δράσεις

5.4.1 Επίδραση στην ενδοθηλιακή λειτουργία

Οι Settergren et al διεξήγαγαν μία μελέτη σε 39 ασθενείς με διαταραχές ανοχής της γλυκόζης και στεφανιαία νόσο, οι οποίοι τυχαιοποιήθηκαν σε συμβαστατίνη 80 mg ή συνδυασμό εζετιμίμπης 10 mg με συμβαστατίνη 10 mg. Μετρήθηκε η ενδοθηλιοεξαρτώμενη αγγειοδιαστολή με τη βοήθεια υπερηχογραφίας υψηλής ευκρίνειας μετά από πρόκληση διέγερσης του ενδοθηλίου (flow mediated vasodilatation, FMD) πριν και μετά από 6 εβδομάδες θεραπείας. Η αύξηση στο FMD ήταν συγκρίσιμη και στις 2 ομάδες, όπως και οι αλλαγές στην LDL-C και hsCRP (415). Σε μία παρόμοια μελέτη, οι Araujo et al συνέκριναν το FMD σε υπερχοληστερολαιμικούς ασθενείς, τους οποίους στρατολόγησαν στις ακόλουθες 2 ομάδες: σε συμβαστατίνη 80 mg και σε συνδυασμό εζετιμίμπης 10 mg με συμβαστατίνη 10 mg ημερησίως. Το FMD βελτιώθηκε και στις 2 ομάδες χωρίς σημαντική διαφορά μεταξύ τους (416).

Σε μία άλλη μελέτη μετρήθηκε το FMD σε συνθήκες νηστείας και μετά από χορήγηση πλούσιου σε λίπος γεύματος σε 19 άνδρες ασθενείς με μεταβολικό σύνδρομο που τυχαιοποιήθηκαν σε συμβαστατίνη 80 mg ή συνδυασμό εζετιμίμπης 10 mg με συμβαστατίνη 10 mg. Η ενδοθηλιακή λειτουργία σε συνθήκες νηστείας ήταν συγκρίσιμη και στις 2 θεραπείες, ενώ οι μετρήσεις μετά τη χορήγηση πλούσιου σε λίπος γεύματος ήταν σημαντικά καλύτερες με το συνδυασμό ($7.7 \pm 1.6\%$ vs. $4.3 \pm 0.6\%$) (417).

Οι Westerweel et al χρησιμοποίησαν ενδοθηλιακά προγονικά κύτταρα για να καθορίσουν την ενδοθηλιακή λειτουργία σε παχύσαρκους ασθενείς με μεταβολικό σύνδρομο που έλαβαν χαμηλή δόση στατίνης με εζετιμίμπη ή μονοθεραπεία με στατίνη σε υψηλή δόση. Τα ενδοθηλιακά προγονικά κύτταρα αυξήθηκαν συγκρίσιμα και στις 2 ομάδες (418).

Σε μία άλλη μελέτη 60 δυσλιπιδαιμικοί ασθενείς τυχαιοποιήθηκαν σε συμβαστατίνη 40 mg, συνδυασμό εζετιμίμπης 10 mg με συμβαστατίνη 10 mg ή εικονικό φάρμακο. Πριν και μετά τη θεραπεία μετρήθηκαν η ενεργότητα της Rho-associated coiled-coil containing protein kinase (ROCK) και το FMD. Στην μελέτη αυτή μόνο η συμβαστατίνη μείωσε την ενεργότητα της ROCK και βελτίωσε το FMD, παρά το ότι τόσο η LDL-C όσο και η hsCRP μειώθηκαν το ίδιο και στις 2 ομάδες. Η μείωση της ενεργότητας της ROCK με τη συμβαστατίνη 40 mg παρέμεινε σημαντική και μετά από έλεγχο για την LDL-C ($p=0.01$) και συσχετιζόταν με τη βελτίωση της ενδοθηλιακής λειτουργίας ($r^2=-0.78$, $p<0.01$) (419).

Μια άλλη μελέτη εκτίμησε το FMD σε 22 ασθενείς με καρδιακή ανεπάρκεια, στους οποίους χορηγήθηκε ροσουβαστατίνη 10 mg ή εξετιμίμπη 20 mg. Ενώ η μείωση της LDL-C ήταν συγκρίσιμη ανάμεσα στις 2 ομάδες, μόνο η ροσουβαστατίνη βελτίωσε την ενδοθηλιακή λειτουργία (420).

Γενικά, η επίδραση της εξετιμίμπης στην ενδοθηλιακή λειτουργία είναι αντιφατική. Φαίνεται ότι η εξετιμίμπη δείχνει ευεργετικά αποτελέσματα κυρίως σε ασθενείς με μεταβολικό σύνδρομο και διαταραχές της γλυκόζης. Αυτός ο πληθυσμός παρουσιάζει μεγάλη συχνότητα ινσουλινοαντίστασης, μια διαταραχής που σχετίζεται θετικά με την ενδοθηλιακή δυσλειτουργία (421).

5.4.2 Επίδραση στο οξειδωτικό stress

Μια μελέτη έδειξε ότι η εξετιμίμπη μπορεί να μειώσει τα επίπεδα στον ορό των οξυστερολών κατά 50%, όταν χορηγηθεί μετά από γεύμα που περιείχε οξειδωμένη χοληστερόλη (422). Σε μία άλλη μελέτη, η εξετιμίμπη 10 mg παρέτεινε τον χρόνο της οξείδωσης της LDL τόσο ως μονοθεραπεία (από 144±18 min σε 195±16 min, $p<0.001$) όσο και μαζί με συμβαστατίνη (από 55.9±16.5 σε 82.7±11.6, $p<0.0001$) (423). Επιπλέον, έχει φανεί ότι τα μακροφάγα εκφράζουν την πρωτεΐνη NPC1L1 και ότι η εξετιμίμπη μπορεί να μειώσει την πρόσληψη της οξειδωμένης LDL-C σε αυτά κατά περίπου 50% (424).

5.4.3 Αντιφλεγμονώδεις δράσεις

Φαίνεται ότι η μονοθεραπεία με εξετιμίμπη δεν μειώνει σημαντικά τα επίπεδα της hsCRP του ορού (425). Ωστόσο, ο συνδυασμός της με στατίνη προκαλεί περαιτέρω μείωση της hsCRP σε σύγκριση με μονοθεραπεία με στατίνη (398, 426-428). Όλες οι μελέτες συγχρόνησης της εξετιμίμπης με διάφορες στατίνες έδειξαν σημαντικά μεγαλύτερη μείωση της hsCRP στην ομάδα που πήρε συνδυασμένη αγωγή σε σύγκριση με τη μονοθεραπεία με στατίνες (429-434). Αντίθετα, η μονοθεραπεία με εξετιμίμπη δεν φαίνεται να επηρεάζει σημαντικά τη συγκέντρωση της hsCRP (425, 435). Τα παραπάνω ευρήματα επιβεβαιώθηκαν και από μία πρόσφατη μετα-ανάλυση σε 1372 ασθενείς που βρίσκονταν σε μονοθεραπεία με εξετιμίμπη, καθώς και σε 3899 ασθενείς που πήραν εξετιμίμπη ενώ βρίσκονταν ήδη σε θεραπεία με στατίνη (427). Συγκεκριμένα, η μονοθεραπεία με εξετιμίμπη οδήγησε σε μία κατά 6% μεγαλύτερη μείωση της hsCRP σε σύγκριση με το

εικονικό φάρμακο, ωστόσο αυτή η διαφορά δεν ήταν στατιστικά σημαντική ($p=0.09$). Αντίθετα, η προσθήκη της εξετιμίμπης στη θεραπεία με στατίνη οδήγησε σε μία κατά 10% μεγαλύτερη μείωση της hsCRP σε σύγκριση με την ομάδα της μονοθεραπείας με στατίνη ($p<0.001$).

Σε μία δική μας μελέτη η μονοθεραπεία με εξετιμίμπη μείωσε την ολική Lp-PLA₂ ενεργότητα και μάζα πλάσματος (334, 397). Ωστόσο, το φάρμακο ταυτόχρονα μείωσε την HDL-σχετιζόμενη Lp-PLA₂ ενεργότητα (334). Αυτό μπορεί να σχετίζεται με τη μείωση των επιπέδων της HDL-C που παρατηρήθηκε σε αυτή τη μελέτη. Επίσης, η Lp-PLA₂ ενεργότητα βελτιώθηκε σημαντικά με το συνδυασμό εξετιμίμπης με ορλιστάτη σε σύγκριση με το καθένα ως μονοθεραπεία (395).

5.4.4 Επίδραση στη μη αλκοολική λιπώδη νόσο του ήπατος (non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD)

Δεδομένα από ζωικά πειραματικά μοντέλα, αλλά και από κλινικές μελέτες κυρίως πιλοτικές, δείχνουν ότι η εξετιμίμπη έχει ευνοϊκές επιδράσεις στη λιπώδη διήθηση του ήπατος (436-441). Σε μία πιλοτική μελέτη με μικρό αριθμό ασθενών με NAFLD ($n=8$) η χορήγηση εξετιμίμπης για 12 μήνες μείωσε σημαντικά τα επίπεδα των ηπατικών ενζύμων, χωρίς όμως να σημειωθεί υπερηχογραφική βελτίωση (442). Η χορήγηση εξετιμίμπης για 6 μήνες σε ασθενείς με NASH οδήγησε σε σημαντική βελτίωση της ηπατικής βιολογίας, όπως επιβεβαιώθηκε με ηπατική βιοψία (443). Σε μια άλλη μελέτη, η χορήγηση εξετιμίμπης μαζί με σιμβαστατίνη σε 19 ασθενείς με NAFLD και διαβήτη τύπου 2 οδήγησε σε σημαντική βελτίωση της ηπατικής βιολογίας (444). Οι Park et al έδειξαν ότι η χορήγηση εξετιμίμπης για 24 μήνες βελτίωσε την ηπατική ιστολογία και βιολογία, χωρίς ωστόσο να σημειωθεί σημαντική βελτίωση στο βαθμό ίνωσης, στα επίπεδα αδιπονεκτίνης, λεπτίνης ή ρεισιτινίνης (445). Στη μελέτη αυτή η εξετιμίμπη μείωσε τα επίπεδα του μυριστικού οξέος, του παλμιτικού οξέος, του παλμιτολεϊκού οξέος, του ολεϊκού οξέος και του γ-λινολεϊκού οξέος (445).

Τα ευεργετικά αποτελέσματα της εξετιμίμπης στην ηπατική στεάτωση οφείλονται αφενώς μεν στη μείωση της συσσώρευσης λιπιδίων αλλά και στις αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες (445).

Μία άλλη θεωρία υποστηρίζει ότι η εξετιμίμπη ασκεί τις ευεργετικές της δράσεις στην NAFLD μέσω βελτίωσης της ινσουλινοαντίστασης και του μεταβολισμού της γλυκόζης (446, 447).

Η πρωτεΐνη NCP1L1 εκφράζεται ισχυρά στο λεπτό έντερο αλλά και στο ήπαρ. Στο ήπαρ η λειτουργία της πρωτεΐνης δεν έχει επαρκώς διευκρινισθεί ενώ φαίνεται ότι επηρεάζει την συσσώρευση ελεύθερης χοληστερόλης (438).

5.4.5 Επίδραση στο μεταβολισμό της γλυκόζης

Η χορήγηση της εξετιμίμπης φαίνεται ότι μπορεί να έχει ευεργετικές επιδράσεις στην αντίσταση στην ινσουλίνη, όπως υποστηρίζουν μελέτες σε ζωικά μοντέλα αλλά και σε ανθρώπους (109, 436, 446, 447). Οι Hiramitsu et al. έδειξαν ότι η χορήγηση εξετιμίμπης σε υπερχοληστερολαιμικούς ιαπωνέζους ασθενείς μείωσε στατιστικά σημαντικά τα επίπεδα της ινσουλίνης και της HbA_{1c}, ενώ αύξησε τα επίπεδα της αδιπονεκτίνης, μιας ορμόνης που συσχετίζεται αντίστροφα με την αντίσταση στην ινσουλίνη (447). Σε μια πρόσφατα δημοσιευμένη μελέτη η εξετιμίμπη μείωσε σημαντικά τα επίπεδα του δείκτη HOMA-IR (homeostasis model assessment of insulin resistance, μοντέλο εκτίμησης της ομοιοστασίας της γλυκόζης) σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου (446). Έτσι, φαίνεται ότι ο συνδυασμός της εξετιμίμπης με μία στατίνη μπορεί να αντισταθμίσει τις ενδεχομένως αρνητικές επιδράσεις των στατινών στο μεταβολισμό της γλυκόζης (448).

5.4.6 Επίδραση στη νεφρική λειτουργία

Σε μία μελέτη των Nakamura et al, η δρατικότητα της εξετιμίμπης στη μείωση των επιπέδων της ADMA αξιολογήθηκε σε ασθενείς με ΧΝΝ. Η ADMA αναστέλλει τη συνθάση του NO και επιταχύνει την πρόοδο της αθηροσκλήρωσης (449), ενώ παίζει ρόλο και στην πρόοδο της νεφρικής νόσου (450). Η θεραπεία με εξετιμίμπη για 6 μήνες μείωσε τα επίπεδα ορού της ασύμμετρης διμεθυλαργινίνης και μείωσε και την πρωτεϊνουρία σε 10 μη διαβητικούς ασθενείς με τελικού σταδίου ΧΝΝ (451). Επιπλέον, η εξετιμίμπη επιπρόσθετα στη χορήγηση πιταβαστατίνης οδήγησε σε σημαντική μείωση της πρωτεϊνουρίας σε σύγκριση με τη μονοθεραπεία με πιταβαστατίνη (452).

Σε μία άλλη μελέτη, η εξετιμίμπη χορηγήθηκε σε 56 ασθενείς με μεταμόσχευση νεφρού που λάμβαναν ήδη συμβαστατίνη. Μία ομάδα 28 ατόμων που έπαιρναν θεραπεία

με στατίνη χρησιμοποιήθηκε ως ομάδα ελέγχου. Επιπρόσθετα της βελτίωσης του λιπιδαιμικού προφίλ, η μέση κάθαρση κρεατινίνης παρέμεινε σταθερή στους ασθενείς που πήραν εξετιμίμπη αλλά μειώθηκε σημαντικά στην ομάδα ελέγχου, υποδεικνύοντας την προστατευτική δράση της εξετιμίμπης στη νεφρική λειτουργία σε ασθενείς με μεταμόσχευση νεφρού (453).

ΣΚΟΠΟΣ

Πρωτόκολλο 1

Σκοπός της μελέτης ήταν να συγκριθούν για πρώτη φορά οι πλειότροπες δράσεις τριών διαφορετικών υπολιπιδαιμικών φαρμάκων, της σιμβαστατίνης 40 mg, του συνδυασμού σιμβαστατίνης με εζετιμίμη 10/10 mg και της ροσουβαστατίνης 10mg/ημέρα σε υπερχοληστερολαιμικούς ασθενείς.

Μετρήθηκαν παράμετροι μεταβολισμού της γλυκόζης, της νεφρικής λειτουργίας, της φλεγμονής και του οξειδωτικού stress. Η διάρκεια της θεραπευτικής αγωγής ήταν 3 μήνες.

Πρωτόκολλο 2

Σκοπός της μελέτης ήταν η σύγκριση της επίδρασης της σιμβαστατίνης 40 mg και του συνδυασμού σιμβαστατίνης με εζετιμίμη 10/10 mg στην έκφραση των υποδοχέων τύπου Toll και στην ενδοκυττάρια παραγωγή κυτταροκινών πριν και μετά από διέγερση με λιποπολυσακχαρίτη σε περιφερικά μονοκύτταρα σε υπερχοληστερολαιμικούς ασθενείς.

Η διάρκεια της θεραπευτικής αγωγής ήταν 3 μήνες.

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Πρωτόκολλο 1.

ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Ασθενείς της μελέτης

Συμπεριελήφθησαν 153 ασθενείς που παρακολουθήθηκαν στο ιατρείο Μελέτης των Διαταραχών του Μεταβολισμού των Λιπιδίων του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων.

Τα κριτήρια αποκλεισμού από τη μελέτη ήταν: προηγούμενο ιστορικό αθηροσκληρωτικής νόσου (ΟΕΜ, ασταθής στηθάγχη, ισχαιμικό ΑΕΕ, περιφερική αγγειακή νόσος, επέμβαση στεφανιαίας αγγειοπλαστικής (percutaneous trans luminal coronary angioplasty, PTCA), προηγηθείσα αορτοστεφανιαία παράκαμψη, διαγνωσμένος διαβήτης (γλυκόζη νηστείας >125 mg/dL), διαταραχή της ηπατικής, της νεφρικής ή της θυρεοειδικής λειτουργίας (συγκέντρωση αμινοτρανσφερασών στον ορό του ασθενή μεγαλύτερη από το 3πλάσιο της ανώτερης φυσιολογικής τιμής (upper limit normal, ULN), δηλαδή >120 IU/L, φυσιολογικές τιμές 5-40 IU/L, κρεατινίνη ορού >1.7 mg/dL και TSH >5μIU/L, φυσιολογικές τιμές 0.5-4.8 μIU/L). Επιπλέον, από τη μελέτη αποκλείσθηκαν άτομα που έπαιρναν φάρμακα τα οποία θα μπορούσαν να επηρεάσουν τόσο το μεταβολισμό των λιπιδίων όσο και την ηπατική ή τη νεφρική λειτουργία, καθώς επίσης αντιφλεγμονώδη, ανοσοκατασταλτικά φάρμακα και αναστολείς του CYP3A4. Ασθενείς με υπέρταση συμμετείχαν μόνο αν ήταν σε σταθερή αντιυπερτασική φαρμακευτική αγωγή για τουλάχιστον 3 μήνες και η αρτηριακή τους πίεση ήταν ελεγχόμενη (συστολική αρτηριακή πίεση <140 mmHg και διαστολική αρτηριακή πίεση <90 mmHg). Καμία αλλαγή της φαρμακευτικής αγωγής δεν έγινε κατά τη διάρκεια της μελέτης. Ασθενείς που έπαιρναν υπολιπιδαιμικά φάρμακα ή που τα είχαν σταματήσει σε διάστημα μικρότερο από 12 εβδομάδες πριν την έναρξη της μελέτης αποκλείσθηκαν. Από τη μελέτη αποκλείσθηκαν, επίσης, και άτομα που ανέφεραν αλλεργία ή ανεπιθύμητες αντιδράσεις σε στατίνες ή την εζετιμίμη. Γυναίκες που λάμβαναν ορμονοθεραπεία ή αντισυλληπτικά αποκλείσθηκαν, ενώ στη μελέτη δε συμμετείχε καμία γυναίκα με σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών.

Μετά τον αρχικό έλεγχο, στα άτομα της μελέτης δόθηκαν υγιεινοδιαιτητικές οδηγίες για 3 μήνες. Στο τέλος αυτής της περιόδου πραγματοποιήθηκε ένας πλήρης αρχικός

εργαστηριακός έλεγχος και οι ασθενείς που εξακολουθούσαν να έχουν επίπεδα LDL-C μεγαλύτερα των στόχων που έχουν καθοριστεί από την NCEP-III για την LDL-C τυχαιοποιήθηκαν σε θεραπεία με 1) σιμβαστατίνη 40 mg, 2) σιμβαστατίνη/εζετιμίμπη 10/10 mg ή 3) ροσουβαστατίνη 10 mg. Μετά από 3 μήνες φαρμακευτικής αγωγής επαναλήφθηκε ο εργαστηριακός έλεγχος.

Αναλυτικές μέθοδοι

Τα δείγματα αίματος συλλέχθηκαν μετά από 12ωρη νηστεία. Ο διαχωρισμός του ορού έγινε μετά από φυγοκέντρηση στις 3000 στροφές για 15 λεπτά και τα δείγματα καταψύχθηκαν στους -80°C.

Ο προσδιορισμός της γλυκόζης των λιπιδαιμικών παραμέτρων και των ηλεκτρολυτών του ορού έγινε σε αυτόματο αναλυτή OLYMPUS AU 640 (Olympus Diagnostica, Hamburg, Germany). Η TC και τα TG στο πλάσμα προσδιορίστηκαν με ενζυματικές μεθόδους. Για τον προσδιορισμό της TC αρχικά το ποσοστό της χοληστερόλης που είναι εστεροποιημένο υδρολύεται σε ελεύθερη χοληστερόλη και λιπαρά οξέα και στη συνέχεια η χοληστερόλη μετατρέπεται σε χολεστερόνη και υπεροξειδίο, το οποίο μετράται ποσοτικά με το σχηματισμό χρωμογόνου στα 510nm. Για τη μέτρηση των TG γίνεται αρχικά υδρόλυση των TG σε γλυκερόλη και λιπαρά οξέα και στη συνέχεια γίνεται ποσοτικός προσδιορισμός της γλυκερόλης σε 3 στάδια.

Η μέθοδος προσδιορισμού της χοληστερόλης των HDL λιποπρωτεϊνών περιλαμβάνει 2 στάδια. Στο πρώτο στάδιο αντισώματα ανθρώπινης apoB δεσμεύουν όλες τις άλλες λιποπρωτεΐνες εκτός της HDL και τις απενεργοποιούν ως προς τη δράση των ενζύμων που ακολουθούν. Στο δεύτερο στάδιο με την προσθήκη των ενζύμων εστεράση της χοληστερόλης και οξειδάση της χοληστερόλης προσδιορίζεται η χοληστερόλη της HDL με την μέθοδο που προαναφέρθηκε για την ολική χοληστερόλη.

Η τιμή της LDL-C υπολογίστηκε από τον τύπο του Friedewald: $LDL-C = T - (HDL-C + TG/5)$ σε δείγματα τα οποία συλλέχθηκαν μετά από 12ωρη νηστεία και η τιμή των TG ήταν <400 mg/dL. Οι συγκεντρώσεις της LDL-C ατόμων με TG>400 mg/dL δεν προσδιορίστηκαν.

Επίσης υπολογίστηκε η τιμή της nonHDL-C από την εξίσωση: $nonHDL-C = TC - HDL-C$.

Ο προσδιορισμός των τιμών των apoA1, B και E και της Lp(a) στον ορό έγινε με ανοσονεφελόμετρία σε νεφελόμετρο PROSPECT (Dade Behring, Liederbach, Germany) χρησιμοποιώντας ειδικά αντισώματα για κάθε απολιποπρωτεΐνη.

Για τον έλεγχο της ακρίβειας και της αξιοπιστίας των μεθόδων προσδιορισμού (εσωτερικός ποιοτικός έλεγχος) της TC, των TG και της HDL-C χρησιμοποιήθηκαν οι οροί ελέγχου Decision[®] (Levels 1,2,3) της Beckman (Fullerton, CA).

Μέτρηση της hsCRP

Ο προσδιορισμός των επιπέδων hsCRP ορού έγινε με χρήση ανοσονεφελομετρίας (Dade Behring, Marburg, Germany). Το εύρος αναφοράς της μεθόδου είναι 0.175 to 55 mg/L.

Υπολογισμός παραμέτρων μεταβολισμού της γλυκόζης

Η γλυκόζη προσδιορίστηκε με τη μέθοδο της εξοκινάσης: Παρουσία εξοκινάσης και ATP, η γλυκόζη μετατρέπεται αρχικά σε 6-P-γλυκόζη και στη συνέχεια παρουσία αφυδρογονάσης της 6-P-γλυκόζης και NADP⁺ σε 6-P-γλυκονικό. Μετράται η αύξηση της απορρόφησης στα 340nm (NADH).

Η ινσουλίνη προσδιορίστηκε με ανοσοενζυμική μέθοδο με φθορίζον προϊόν, η οποία χρησιμοποιεί την τεχνική των μικροσωματιδίων (Microparticle enzyme immunoassay, ABBOTT Diagnostics, Abbott Park, Illinois).

Ο δείκτης HOMA-IR προσδιορίστηκε με τον τύπο: ινσουλίνη νηστείας (mU/L) x γλυκόζη νηστείας (mg/dL)/405.

Ο δείκτης HOMA-B (HOMA of β-cell function, μοντέλο λειτουργίας των β-κυττάρων) προσδιορίστηκε με τον τύπο: $(360 \times \text{ινσουλίνη νηστείας [mU/L]}) / (\text{γλυκόζη νηστείας (mg/dL)} - 63)$.

Η HbA_{1c} προσδιορίστηκε με δοκιμασία αναστολής συγκόλλησης latex (Randox Laboratories Ltd., Crumlin, United Kingdom).

Προσδιορίστηκαν τα επίπεδα του ορού και η κλασματική απέκκριση στα ούρα του ουρικού οξέος, των ηλεκτρολυτών και οι παράμετροι της νεφρικής λειτουργίας. Ο προσδιορισμός των ηλεκτρολυτών του ορού έγινε σε αυτόματο αναλυτή OLYMPUS AU 640 (Olympus Diagnostica, Hamburg, Germany).

Για τον ποσοτικό προσδιορισμό του ουρικού οξέος στον ορό και στα ούρα χρησιμοποιήθηκε η αντίδραση ουρικής-περοξιδάσης. Δείγματα ούρων φυγοκεντρήθηκαν

σε 2000 στροφές για 10 λεπτά. Η αλβουμίνη ούρων μετρήθηκε με νεφελομετρία σε νεφελόμετρο PROSPECT (Dade Behring, Liederbach, Germany). Η κρεατινίνη ορού μετρήθηκε με την τροποποιημένη μέθοδο Jaffé. Η απέκκριση αλβουμίνης στα ούρα εκφράστηκε με το λόγο αλβουμίνης/κρεατινίνης ούρων. Η κλασματική απέκκριση (fractional excretion (FE)) του ουρικού οξέος, του νατρίου, καλίου, ασβεστίου, φωσφόρου, χλωρίου και μαγνησίου υπολογίστηκε με τον τύπο: $\%FE_x = [(U_x * Scr)/(S_x * Ucr)] * 100\%$ όπου S_x και U_x αντιπροσωπεύουν τις συγκεντρώσεις ορού και ούρων του ηλεκτρολύτη x , και Scr και Ucr αντιπροσωπεύουν τις συγκεντρώσεις ορού και ούρων της κρεατινίνης, αντίστοιχα.

Η εκτιμώμενη κάθαρση της κρεατινίνης (estimated creatinine clearance [eCl_{Cr}]) υπολογίστηκε με τον τύπο Cockcroft-Gault $[(140 - \text{ηλικία}) \times \text{Βάρος} \times (0.85 \text{ για γυναίκες})] / [\text{κρεατινίνη ορού (mg/dL)} \times 72]$. Η $eGFR$ προσδιορίστηκε με τον τύπο MDRD (Modification of Diet in Renal Disease): $[186 \times \text{κρεατινίνη ορού}^{-1.154} \times \text{ηλικία}^{-0.203} \times (0.742 \text{ για γυναίκες})]$.

Προσδιορισμός των επιπέδων της oxLDL

Αρχή μεθόδου: Ο προσδιορισμός των επιπέδων oxLDL με ELISA στηρίζεται στην άμεση τεχνική τύπου σάντουιτς, στην οποία δύο μονοκλωνικά αντισώματα κατευθύνονται έναντι διαφορετικών αντιγονικών επιτόπων της οξειδωμένης apoB100. Κατά τη διάρκεια της επώασης η oxLDL που υπάρχει στο δείγμα αντιδρά με anti-oxLDL αντίσωμα το οποίο είναι ακινητοποιημένο στον πυθμένα κάθε θέσης του πλακιδίου. Μετά την έκπλυση, η οποία απομακρύνει τα μη αντιδρώντα συστατικά του πλάσματος ή ορού, ένα επισημασμένο με υπεροξειδάση anti-human αντίσωμα έναντι της apoB100 αναγνωρίζει την oxLDL που είναι ακινητοποιημένη στη στερεή επιφάνεια. Μετά από δεύτερη επώαση και έκπλυση η οποία απομακρύνει το επισημασμένο αντίσωμα που δεν έχει αντιδράσει γίνεται η ανίχνευση του προσδεμένου επισημασμένου αντισώματος με την προσθήκη της 3,3',5,5'-τετραμεθυλ-βενζιδίνης (TMB). Η αντίδραση διακόπτεται με την προσθήκη οξέος δίνοντας ένα έγχρωμο προϊόν το οποίο απορροφά στα 450 nm.

Υλικά και όργανα:

- Πλακίδιο ELISA καλυμμένο με mouse μονοκλωνικό anti-oxLDL αντίσωμα. Το πλακίδιο είναι σταθερό για 2 μήνες μετά το άνοιγμά του.

- Δευτερογενές αντίσωμα (Enzyme conjugate 11X) (μονοκλωνικό mouse anti-αροB αντίσωμα επισημασμένο με υπεροξειδάση αγριοραπανιού). Το διάλυμα αυτό μετά την παρασκευή του είναι σταθερό για ένα μήνα στους 2-8 °C.

- Πολυπιπέτα μεταβαλλόμενου όγκου 20-200 μl Costar.

- Μετρητής microELISA (SpectraMAX 190, Molecular Devices).

Διαλύματα εργασίας:

- Πρότυπα διαλύματα (human oxLDL). Η ανασύσταση των προτύπων διαλυμάτων γίνεται σε 1 ml ddH₂O. Τα διαλύματα αυτά μετά την παρασκευή τους είναι σταθερά για μία εβδομάδα στους 2-8 °C ή για 4 εβδομάδες στους -20 °C.

- Πρότυπο διάλυμα 0U/L. Έτοιμο προς χρήση. Έχει χρώμα κίτρινο. Το διάλυμα αυτό είναι σταθερό για μία εβδομάδα στους 2-8 °C ή για 4 εβδομάδες στους -20 °C.

- Controls (L, H). Η ανασύσταση των control δειγμάτων γίνεται σε 1 ml ddH₂O. Τα διαλύματα αυτά μετά την παρασκευή τους είναι σταθερά για μία εβδομάδα στους 2-8 °C.

- Διάλυμα δευτερογενούς αντισώματος (Enzyme conjugate buffer). Το διάλυμα αυτό έχει χρώμα μπλε.

- Διάλυμα προσδιορισμού. Έτοιμο προς χρήση. Έχει χρώμα κόκκινο.

- Ρυθμιστικό διάλυμα (Sample buffer) 4X. 50 ml αυτού του διαλύματος αναμιγνύονται με 150 ml ddH₂O. Το διάλυμα αυτό έχει κίτρινο χρώμα. Το διάλυμα αυτό μετά την παρασκευή του είναι σταθερό για ένα μήνα στους 2-8 °C.

- Διάλυμα έκλυσης 21X. 40 ml αυτού αναμιγνύονται με 800 ml ddH₂O. Το διάλυμα αυτό μετά την παρασκευή του είναι σταθερό για ένα μήνα στους 2-8 °C.

- Υπόστρωμα TMB. Το διάλυμα αυτό είναι άχρωμο και είναι φωτοευαίσθητο.

- Διάλυμα διακοπής της αντίδρασης (0.5 M H₂SO₄). Έτοιμο προς χρήση.

- Διάλυμα εργασίας δευτερογενούς αντισώματος. Ανάλογα με τον αριθμό των λωρίδων που χρησιμοποιούνται το διάλυμα αυτό παρασκευάζεται ως εξής:

Αριθμός λωρίδων	Δευτερογενές αντίσωμα, μl	Διάλυμα δευτερο- γενούς αντισώματος, ml
4	350	3.5
6	500	5.0
8	700	7.0
10	900	9.0
12	1200	12

Πειραματική πορεία: Όλα τα αντιδραστήρια αφήνονται να αποκτήσουν θερμοκρασία δωματίου πριν τη χρήση τους.

- Αραίωση δειγμάτων. Κάθε δείγμα αραιώνεται σε δύο βήματα. Χρησιμοποιούνται σωληνάκια πολυστυρενίου χωρητικότητας 5 ml για την αρραίωση των δειγμάτων. Ο ορός αραιώνεται αρχικά 1/81 [5 ml ορός + 400 ml ρυθμιστικό διάλυμα (sample buffer)]. Ακολουθεί δεύτερη αρραίωση 1/6561 [5 ml του 1/81 αραιωμένου δείγματος + 400 ml ρυθμιστικό διάλυμα (sample buffer)]. Το 1/81 αραιωμένο δείγμα είναι σταθερό για 4 ημέρες στους 2-8 °C ενώ το 1/6561 αραιωμένο δείγμα είναι σταθερό για 1 ημέρα.

- Προσθέτουμε 25 ml από το κάθε standard, control και αραιωμένο δείγμα σε κάθε θέση του πλακιδίου.

- 100 ml από το διάλυμα προσδιορισμού προστίθενται σε κάθε θέση του πλακιδίου.

- Επιάζουμε σε αναδευτήρα για 2h σε θερμοκρασία δωματίου.

- Ακολουθεί έκπλυση 6 φορές με το διάλυμα έκπλυσης με τη βοήθεια χειροκίνητου πλυστικού μηχανήματος και το υγρό έκπλυσης αποχύνεται με αναστροφή του πλακιδίου. Η έκπλυση γίνεται ώστε να απομακρυνθεί η περίσσεια της oxLDL που δεν έχει δεσμευτεί σε κάθε θέση του πλακιδίου ELISA.

- Ακολουθεί προσθήκη 100 μl του διαλύματος εργασίας δευτερογενούς αντισώματος.

- Επώαση σε αναδευτήρα για 1h σε θερμοκρασία δωματίου.

- Ακολουθεί έκπλυση 6 φορές με το διάλυμα έκπλυσης με τη βοήθεια χειροκίνητου πλυστικού μηχανήματος και το υγρό έκλυσης αποχύνεται με αναστροφή του πλακιδίου. Η έκπλυση γίνεται ώστε να απομακρυνθεί η περίσσεια του δευτερογενούς αντισώματος που δεν έχει δεσμευτεί σε κάθε θέση του πλακιδίου ELISA.

- Ακολουθεί η προσθήκη 200 μl του υποστρώματος TMB.

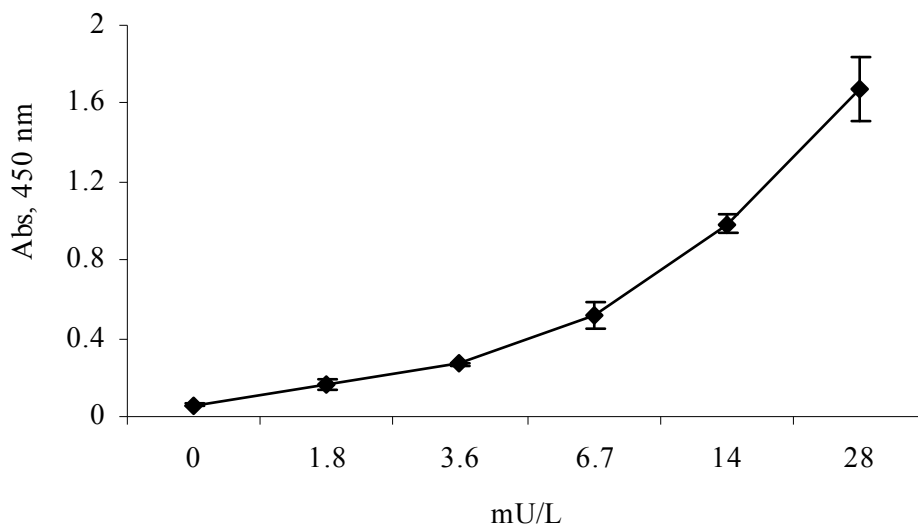
- Επωάζουμε για 15 min σε θερμοκρασία δωματίου χωρίς ανάδευση.

- Προσθέτουμε 50 μl από το διάλυμα διακοπής της αντίδρασης, που είναι 0.5 M H₂SO₄.

- Μέτρηση της απορρόφησης στα 450 nm. Η μέτρηση γίνεται μέσα σε 30 min από την προσθήκη του διαλύματος διακοπής της αντίδρασης.

Υπολογισμός των αποτελεσμάτων: Σε ημιλογαριθμικό χαρτί (linear-log) η πρότυπη καμπύλη είναι υπερβολή (Εικόνα 14). Με βάση αυτή την καμπύλη και τις απορροφήσεις των δειγμάτων λαμβάνοντας υπόψη τις αραιώσεις των δειγμάτων υπολογίζονται κάθε φορά οι συγκεντρώσεις των επιπέδων oxLDL στον ορό. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε U/L.

Πρότυπη καμπύλη



Εικόνα 14. Χαρακτηριστική πρότυπη καμπύλη για την oxLDL

Προσδιορισμός των επιπέδων των 8-ισοπροστανίων

Αρχή της μεθόδου: Η μέτρηση των 8-ισοπροστανίων έγινε με ανταγωνιστική ανοσοενζυμική μέθοδο (competitive enzyme immunoassay) (Cayman chemical 8-Isoprostane EIA Kit 516351). Η μέθοδος βασίζεται στον ανταγωνισμό μεταξύ των 8-ισοπροστανίων του δείγματος και 8-ισοπροστανίων σημασμένων με ακετυλοχοληστεράση για ορισμένο αριθμό θέσεων ειδικού αντιορού για ισοπροστάνια από κουνέλι. Τα συμπλέγματα αντιορού-8-ισοπροστανίων (σημασμένων ή ελεύθερων) συνδέονται με μονοκλωνικό αντίσωμα που βρίσκεται στη στερεά φάση. Η ποσότητα σημασμένων 8-ισοπροστανίων ποσοτικοποιείται χρωματομετρικά (412 nm) μετά από προσθήκη υποστρώματος για την ακετυλοχοληστεράση (Ellman's reagent). Η απορρόφηση που εμφανίζουν τα δείγματα είναι ευθέως ανάλογη των σημασμένων 8-ισοπροστανίων και αντιστρόφως ανάλογη με τη συγκέντρωση των 8-ισοπροστανίων του δείγματος (ελεύθερων).

Υλικά και όργανα:

- Πλακίδιο ELISA καλυμμένο με mouse μονοκλωνικό 8-isoprostane αντίσωμα: Το πλακίδιο είναι σταθερό για 12 μήνες στους -20°C .

- 8-isoprostane tracer: Ανασύσταση με 6 ml EIA Buffer. Αφήνεται σε ηρεμία για 5 min ακολουθεί ήπια ανάδευση. Σταθερό στους 4°C για 1 μήνα.

- Δευτερογενές αντίσωμα (8-isoprostane antiserum): Ανασύσταση με 6 ml EIA Buffer. Αφήνεται σε ηρεμία για 5 min ακολουθεί ήπια ανάδευση. Είναι σταθερό στους 4°C για 1 μήνα.

- Πολυπιπέτα μεταβαλλόμενου όγκου 20-200 μl Costar.

- Μετρητής microELISA (SpectraMAX 190, Molecular Devices).

Διαλύματα εργασίας:

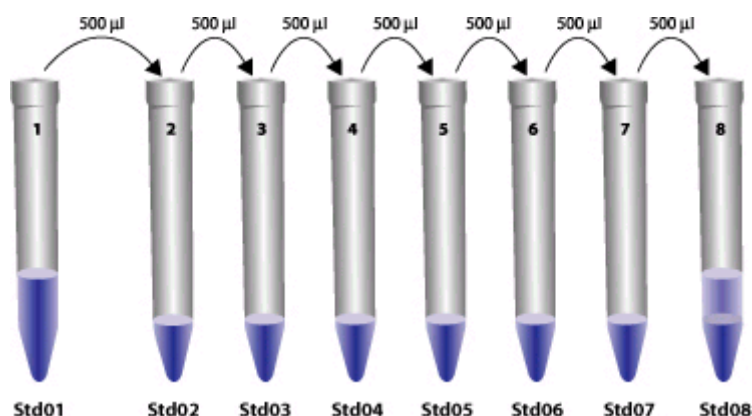
- EIA Buffer: Ανασύσταση 1 vial σε 90 ml ddH₂O. Προσθέτουμε στο vial περίπου 9 ml νερού και μεταφέρουμε το περιεχόμενο σε corning των 50 ml σταδιακά χωρίς ανάδευση για 5 min. Ακολουθεί ήπια ανάδευση. Είναι σταθερό στους 4°C για 4 ημέρες.

- Wash buffer: 1,25 ml του συμπυκνωμένου wash buffer διαλύεται σε 500 ml αποσταγμένου νερού. Προστίθεται 250 μl tween 20. Ανάδευση με μαγνητάκι. Σταθερό στους 4°C για 1 εβδομάδα.

- Ellman's reagent: Παρασκευάζεται 5 min πριν τη χρήση. Η ανασύσταση γίνεται με 20 ml ddH₂O. Είναι σταθερό στο σκοτάδι, στους 4°C , για 4 ημέρες.

- Πρότυπα: Αραίωση του 50 ng/ml 8-isoprostane EIA Standard σε 5 ng/ml. Μεταφέρουμε 100 μl από το 50 ng/ml 8-isoprostane EIA Standard σε ένα erpendorf που περιέχει 900 μl ddH₂O. Ακολουθεί ανάδευση.

- Ετοιμασία προτύπων: Χρησιμοποιήθηκαν 8 erpendorfs. Προσθέτουμε στο 1^ο 900 μl EIA Buffer και στα υπόλοιπα από 750 μl. Προσθέτουμε 100 μl από το 5 ng/ml 8-isoprostane EIA Standard στο 1^ο erpendorf και στη συνέχεια μεταφέρουμε και πάντα μετά από ανάδευση, 500 μl από τον έναν σωλήνα στον άλλον όπως φαίνεται στο σχήμα. Τα πρότυπα μπορούν να φυλαχτούν για περισσότερο από 24 h στους 4°C



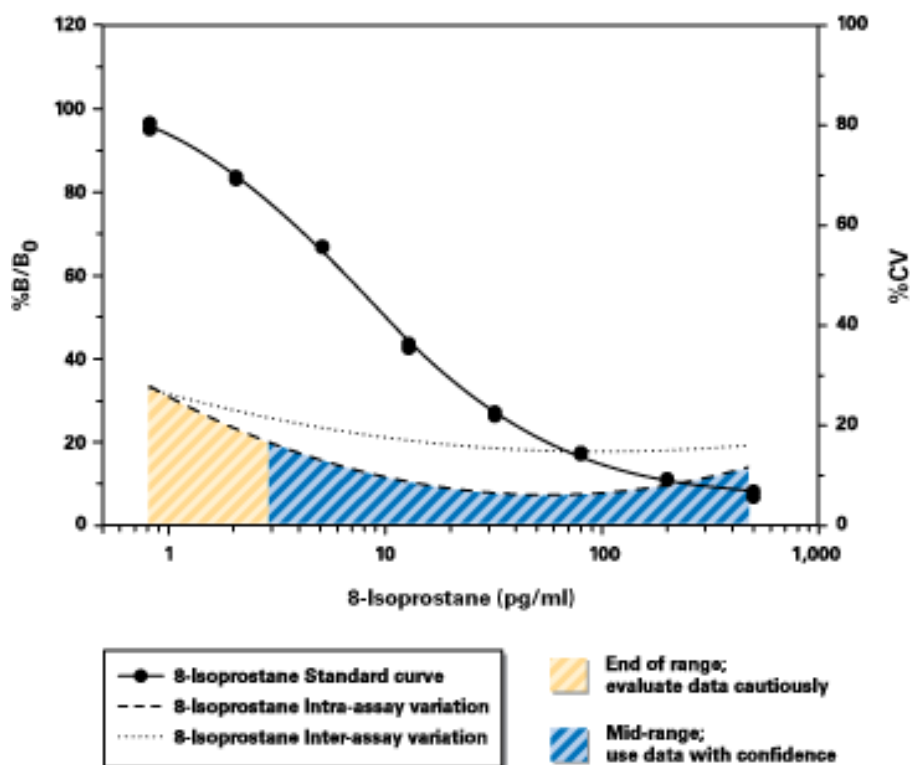
Εικόνα 15. Ετοιμασία προτύπων διαλυμάτων.

Πειραματική πορεία: Όλα τα αντιδραστήρια αφήνονται να αποκτήσουν θερμοκρασία δωματίου πριν τη χρήση τους.

- Ετοιμασία πλάκας και καταγραφή των θέσεων σε χαρτί.
- Τοποθετούμε στα wells τα αντιδραστήρια με την ακόλουθη σειρά:
 - 1)EIA Buffer: Προσθέτουμε 100 µl στη θέση NSB και 50 µl στη θέση Βο.
 - 2)Standard: Προσθέτουμε 50 µl στα wells S_8 έως S_1 από τα αντίστοιχα standards με το ίδιο tip.
 - 3)Δείγματα: Προσθέτουμε 50 µl από τα δείγματα στα wells όπως φαίνονται στο χαρτί θέσεων.
 - 4)Tracer: 50 µl σε κάθε well εκτός από το TA κ BI (blank).
 - 5)Antiserum: 50 µl σε κάθε well εκτός από το TA , BI (blank) και NSB.
- Καλύπτουμε την πλάκα με μεμβράνη και επωάζουμε για 18 h σε 4°C.
- Ξεπλύνουμε 5 φορές με Wash Buffer το περιεχόμενο της πλάκας.
- Προσθέτουμε 200 µl αντιδραστηρίου Ellman's.
- Μέτρηση της απορρόφησης στα 405 nm στη συσκευή ELISA reader.

Υπολογισμός των αποτελεσμάτων: Η πρότυπη καμπύλη όπως φαίνεται και στην εικόνα 16 είναι λογαριθμική και η συγκέντρωση είναι αντιστρόφως ανάλογη της απορρόφησης. Στον άξονα των y , παρίσταται ο επι τοις εκατό λόγος των απορροφήσεων Β

προς B_0 (%B/ B_0), ενώ στον άξονα των x οι αντίστοιχες συγκεντρώσεις. Για τους υπολογισμούς των δειγμάτων λαμβάνεται υπόψη το ευθύγραμμο τμήμα. Τιμές μεγαλύτερες του 500 pg/ml χρειάζεται ξανά μέτρηση μετά από αραιώση σε EIA Buffer. Κατά την διάρκεια της ανάπτυξης του χρώματος λαμβάνουμε υπόψη οι τιμές απορρόφησης όταν το B_0 βρίσκεται μεταξύ των ορίων 0,2-0,8.



Εικόνα 16. Χαρακτηριστική πρότυπη καμπύλη για τα 8-ισοπροστάνια

Προσδιορισμός της ενζυμικής ενεργότητας της Lp-PLA₂

Αρχή της μεθόδου: ο υπολογισμός της ενζυμικής ενεργότητας της Lp-PLA₂ βασίζεται στη μέτρηση των ραδιοσημασμένων οξικών ομάδων που απελευθερώνονται κατά την επίδραση του ενζύμου σε PAF, ο οποίος έχει προηγουμένως σημανθεί με ραδιενεργό τρίτιο στη θέση 2 του σκελετού της γλυκερόλης ($[^3\text{H}]$ -PAF). Οι οξικές ομάδες παραμένουν στο υπερκείμενο, μετά την καταβύθιση με TCHOLA (trichloroacetic acid, τριχλωροξικό οξύ) του παραγόμενου lyso-PAF, καθώς και του $[^3\text{H}]$ -PAF που δεν διασπάσθηκε και η β ακτινοβολία που εκπέμπουν μετράται σε ειδικό μετρητή σπινθηρισμού. Τέλος, με τη βοήθεια ειδικών μαθηματικών τύπων οι μετρούμενες κρούσεις μετατρέπονται σε ενζυμική ενεργότητα, η

οποία εκφράζεται ως ο αριθμός των ημολ του ραδιενεργού PAF που διασπάσθηκαν από το ένζυμο στη μονάδα του χρόνου από μια συγκεκριμένη ποσότητα δείγματος.

Υλικά και όργανα:

- PAF [(1-O-εξαδεκύλο-2-ακέτυλο-σν-γλύκερο-3-φωσφοχολίνη, MB: 523.7 g/mol), Sigma]. Τα 25 mg σκόνης διαλύονται σε 2.387 ml αιθανόλης 80% δίνοντας διάλυμα 20 mM το οποίο διατηρείται στους -20°C.

- ³H]-PAF [(1-O-εξαδεκύλο-2-[³H]ακέτυλο-σν-γλύκερο-3-φωσφοχολίνη, 0.25 mCi/0.5 ml, 10 Ci/mmol), DuPont New England Nuclear, Boston, MA, USA].

- Υγρό σπινθηρισμού

Διαλύματα εργασίας:

- Ρυθμιστικό διάλυμα HEPES, pH 7.4: παρασκευάζεται με την ανάμιξη 4.2 mM (1.0009 g/L) HEPES, 137 mM (8.0063 g/L) NaCl, 2.6 mM (0.1939 g/L) KCl και 2 mM (0.7445 g/L) EDTA. Το pH ρυθμίζεται με τη βοήθεια pHμέτρου στο 7.4 και το διάλυμα φυλάσσεται στους 4°C

- BSA 2.5 mg/mL: 25 mg BSA διαλύονται σε 10 mL αποσταγμένου νερού. Το διάλυμα φυλάσσεται στους -20°C.

- BSA 100 mg/mL: 1 g BSA διαλύεται σε 10 mL αποσταγμένου νερού. Το διάλυμα φυλάσσεται στους -20°C.

- ³H]-PAF 100 μM. Σε πλαστικό σωληνάκι πολυπροπυλενίου αναμιγνύονται 100 μL PAF 20 μM και 30 μL [³H]-PAF. Τα φωσφολιπίδια εξατμίζονται μέχρι ξηρού σε ρεύμα αζώτου και το διάλυμα αναδιασπείρεται σε 1 mL BSA 2.5 mg/mL. Το μίγμα αναδεύεται σε vortex και στη συνέχεια επωάζεται στους 37°C για 30 λεπτά. Το διάλυμα φυλάσσεται στους -20°C.

- TCHOLA 20%: 20 g TCHOLA διαλύονται σε 100 mL αποσταγμένου νερού. Το διάλυμα διατηρείται στους 4°C.

Πειραματική πορεία: για τη μέτρηση της ενεργότητας της Lp-PLA₂ χρησιμοποιούνται συνήθως 50 μL πλάσματος ή απομονωμένης HDL (αραιωμένα 1/50 v/v και 1/3 v/v, αντίστοιχα με HEPES pH 7.4). Για τη μέτρηση της ενζυμικής ενεργότητας των λιποπρωτεϊνικών υποκλασμάτων χρησιμοποιείται συνήθως τέτοιος όγκος δείγματος ώστε

να περιέχει 4 μg πρωτεΐνης του υποκλάσματος. Σε κάθε περίπτωση τα δείγματα τοποθετούνται σε πλαστικό σωληνάκι erpendorf και ο όγκος συμπληρώνεται με Heres pH 7.4 μέχρι τα 90 μL. Στη συνέχεια προστίθενται 10 μL [³H]-PAF 100 μM και τα δείγματα, αφού αναδευθούν ήπια, τοποθετούνται σε υδατόλουτρο όπου επώζονται για 10 min στους 37°C. Στο τέλος αυτού του χρονικού διαστήματος η αντίδραση της Lp-PLA₂ με το υπόστρωμα τερματίζεται με την προσθήκη 20 μL BSA 100 mg/mL (η οποία δεσμεύει την περίσσεια του PAF που δεν αντέδρασε, καθώς και το lyso-PAF) και την τοποθέτηση των δειγμάτων, αφού αναδευθούν ισχυρά με vortex, σε πάγο για 15 min. Τέλος, αφού προστεθούν 80 μL TCHOLA 20% τα δείγματα αναδεύονται και πάλι με vortex και τοποθετούνται σε πάγο για άλλα 30 min. Στη συνέχεια τα σωληνάκια φυγοκεντρώνονται σε μικροφυγόκεντρο για erpendorfs (5 min στις 10.000 rpm) προκειμένου να καταβυθισθούν οι πρωτεΐνες. 100 μL από το υπερκείμενο που προκύπτει μετά την καταβύθιση τοποθετούνται σε ειδικό σωληνάκι μαζί με 2 mL υγρού σπινθηρισμού και αφού αναδευθούν ισχυρά μεταφέρονται στο μετρητή σπινθηρισμού για μέτρηση της β ακτινοβολίας που εκπέμπουν. Ίδια πειραματική διαδικασία με αυτή που ακολουθείται στα προς μέτρηση δείγματα εφαρμόζεται και για δύο σωληνάκια τα οποία περιέχουν 90 μL Heres. Ο μέσος όρος των κρούσεων που αποδίδουν αυτά τα σωληνάκια αντιστοιχεί στο τυφλό (δείγμα ελέγχου) της μέτρησης και χρησιμοποιείται κατά τη μετατροπή των κρούσεων των δειγμάτων σε ενζυμική ενεργότητα. Επιπρόσθετα, μαζί με τα δείγματα τοποθετούνται στο μετρητή σπινθηρισμού και δύο σωληνάκια τα οποία περιέχουν υγρό σπινθηρισμού, καθώς και 10 μL [³H]-PAF 100 μM. Το πηλίκο του μέσου όρου των κρούσεων που προέρχονται από αυτά τα σωληνάκια (standard) δια του αριθμού των nmol [³H]-PAF 100 μM που περιέχονται στο καθένα αποτελούν την ειδική ενεργότητα (E.E) του διαλύματος του PAF, δηλαδή των αριθμό των κρούσεων που αποδίδει κάθε nmol [³H]-PAF 100 μM στις συγκεκριμένες πειραματικές συνθήκες. Η ενεργότητα της Lp-PLA₂ εκφράζεται ως nmol του ραδιενεργού PAF που διασπάται στη μονάδα του χρόνου (min) από μία δεδομένη ποσότητα δείγματος και υπολογίζεται από τον παρακάτω γενικό τύπο:

$$\text{Ενεργότητα Lp-PLA}_2 = 2 * (\text{cpm}_6 - \text{cpm}_7) * 1000 / \text{E.E} * \alpha * \beta$$

όπου: cpm_6 είναι οι κρούσεις που αποδίδουν τα 100 μL κάθε δείγματος

cpm_7 είναι οι κρούσεις που αποδίδουν τα 100 μL τυφλού

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

α είναι ο χρόνος επώασης του δείγματος σε λεπτά

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

Προσδιορισμός της μάζας της Lp-PLA₂

Αρχή της μεθόδου: Το diaDexus PLAC™ test είναι ένας κλασικός ανοσοπροσδιορισμός ELISA τύπου sandwich, στον οποίο χρησιμοποιούνται δύο ειδικά μονοκλωνικά αντισώματα για τον άμεσο προσδιορισμό της συγκέντρωσης της Lp-PLA₂ στο ολικό πλάσμα.

Υλικά και όργανα:

- Πλακίδιο ELISA αντίδρασης 96 θέσεων.
- 12 ταινίες επικαλυμμένες με το ειδικό Ab.
- Standards (0, 50, 100, 250, 100 ng/mL).
- Πολυπιπέτα μεταβαλλόμενου όγκου 20-200 μl Costar.
- Μετρητής microELISA (SpectraMAX 190, Molecular Devices).

Διαλύματα εργασίας:

- Buffer προσδιορισμού (23 mL, άχρωμο) .
- Conjugate (23 mL, κόκκινο χρώμα).
- TMB (11 mL, 3,3',5,5' -τετραμεθυλβενζιδίνη).
- Διάλυμα HCl 1N (11 mL, stop solution).

Πειραματική πορεία: Ο προσδιορισμός γίνεται σε θερμοκρασία δωματίου. Όλα τα αντιδραστήρια αφήνονται σε θερμοκρασία δωματίου πριν τη χρήση τους.

- Τοποθετούμε 200 μL από το ρυθμιστικό διάλυμα σε κάθε φρεάτιο.
- Τοποθετούμε 10 μL των standards, των δειγμάτων και των controls στα φρεάτια και αναμιγνύουμε με την πιπέτα.
- Τοποθετούμε τις πλάκες σε πλακέτα ανάδευσης για να αναμιχθούν.
- Επωάζουμε στους 20-26°C για 2 h.

- Στο τέλος του χρόνου επώασης αποχύνουμε τα δείγματα. Ξεπλένουμε τα φρεάτια 4 φορές με 300 μL /φρεάτιο απιονισμένο νερό.

- Στραγγίζουμε την πλάκα πάνω σε καθαρή πετσέτα και στη συνέχεια προχωρούμε στο επόμενο βήμα (δεν επιτρέπεται να στεγνώσουν τα φρεάτια).

- Τοποθετούμε 200 μL conjugate σε κάθε φρεάτιο.

- Αναδεύουμε την πλάκα για 15-20 sec.

- Επωάζουμε σε θερμοκρασία δωματίου για 60 min.

- Τα τελευταία 15 min της επώασης βγάζουμε το TMB από το ψυγείο σε θερμοκρασία δωματίου.

- Στο τέλος της επώασης αποχύνουμε τα δείγματα και ξεπλένουμε την πλάκα 4 φορές με απιονισμένο νερό.

- Στραγγίζουμε το πλακίδιο προσέχοντας να μη στεγνώσουν τελείως τα φρεάτια.

- Προσθέτουμε 100 μL από το TMB σε κάθε φρεάτιο.

- Αναδεύουμε ελαφρά για 10-15 sec.

- Επωάζουμε σε θερμοκρασία δωματίου για 20 min στο σκοτάδι.

- Σταματάμε την αντίδραση με την προσθήκη 100 μL HCl 1N (το μπλε χρώμα γίνεται κόκκινο).

- Μετράμε την απορρόφηση στα 450 nm μέσα σε 15 min από τη διακοπή της αντίδρασης.

Υπολογισμός των αποτελεσμάτων: Με βάση τις απορροφήσεις των πρότυπων δειγμάτων σχεδιάζουμε με τη βοήθεια ηλεκτρονικού υπολογιστή μία καμπύλη από σημείο σε σημείο (point-to-point) που στον άξονα χ έχει τη συγκέντρωση της Lp-PLA₂ των προτύπων (σε ng/mL) και στον άξονα ψ έχει τις απορροφήσεις των προτύπων. Με βάση αυτή την καμπύλη και τις απορροφήσεις των δειγμάτων το πρόγραμμα του υπολογιστή υπολογίζει κάθε φορά τη συγκέντρωση της μάζας της Lp-PLA₂ (σε ng/mL).

Στατιστική ανάλυση

Για όλες τις παραμέτρους της μελέτης έγινε προκαταρκτική ανάλυση ώστε να αποκλεισθεί η περίπτωση παραβίασης των παραδοχών της κανονικής κατανομής των παραμέτρων. Η δοκιμασία των Shapiro-Wilk χρησιμοποιήθηκε για την εκτίμηση της κανονικής κατανομής των παραμέτρων. Τα δεδομένα εκφράζονται ως μέση τιμή \pm σταθερή απόκλιση (SD), εκτός από τις μεταβλητές, οι οποίες δεν ακολουθούν κανονική κατανομή και οι οποίες εκφράζονται ως διάμεση τιμή (εύρος). Οι συσχετίσεις μεταξύ των μεταβλητών της μελέτης εκτιμήθηκαν με τη χρησιμοποίηση του Pearson product-moment correlation coefficient (r) ή του Spearman's rank order correlation (ρ) για τις κανονικές και μη-κανονικές μεταβλητές, αντίστοιχα. Οι συγκρίσεις των παραμέτρων της μελέτης πριν και μετά τη θεραπεία πραγματοποιήθηκαν με τη χρησιμοποίηση του Student's t-test για εξαρτημένες μεταβλητές. Για να συγκριθούν οι ποσοστιαίες μεταβολές των παραμέτρων που επιτεύχθηκαν χρησιμοποιήθηκε η δοκιμασία ANCOVA (analysis of covariance, ανάλυση της συμμεταβλητότητας). Η σημαντικότητα ορίσθηκε για τιμή του $p < 0.05$. Όλες οι αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν με προσωπικό υπολογιστή και τη χρησιμοποίηση του λογισμικού SPSS 15.0.

Πρωτόκολλο 2.

ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Ασθενείς της μελέτης

Συμμετείχαν 60 υπερχοληστερολαιμικοί ασθενείς που παρακολουθήθηκαν στο ιατρείο μελέτης των Διαταραχών του Μεταβολισμού των Λιπιδίων του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων και 30 άτομα που αποτέλεσαν την ομάδα ελέγχου.

Τα κριτήρια αποκλεισμού από τη μελέτη ήταν ίδια με τα προαναφερθέντα στο πρωτόκολλο 1.

Μετά τον αρχικό έλεγχο, στα άτομα της μελέτης δόθηκαν υγιεινοδιαιτητικές οδηγίες για 3 μήνες. Στο τέλος αυτής της περιόδου πραγματοποιήθηκε ένας πλήρης αρχικός εργαστηριακός έλεγχος και οι ασθενείς που εξακολουθούσαν να έχουν επίπεδα LDL-C μεγαλύτερα των στόχων που έχουν καθοριστεί από την NCEP-III για την LDL-C τυχαιοποιήθηκαν σε 1) σιμβαστατίνη 40 mg ή 2) σιμβαστατίνη/εζετιμίμη 10/10 mg. Μετά από 3 μήνες φαρμακευτικής αγωγής επαναλήφθηκε ο εργαστηριακός έλεγχος.

Στην ομάδα ελέγχου συμπεριλήφθηκαν 30 άτομα με φυσιολογικά επίπεδα λιπιδίων σταθμισμένα ως προς την ηλικία, το φύλο και το βάρος [LDL-C<130 mg/dL, HDL- C>40 mg/dL, TG<150 mg/dL].

Προσδιορισμός της μεμβρανικής έκφρασης των TLR2 και TLR4

Αρχή της μεθόδου: Η κυτταρομετρία ροής είναι μια μέθοδος που μετράει ταυτόχρονα πολλαπλά χαρακτηριστικά κυττάρων με γρήγορη ταχύτητα. Ένα κυτταρόμετρο ροής μπορεί να μας δώσει πληροφορίες για έναν κυτταρικό πληθυσμό ως προς:

- το σχετικό του μέγεθος (forward scatter-FSC)
- τη σχετική κοκκίωση ή εσωτερική πολυπλοκότητα (side scatter-SSC)
- τη σχετική ένταση φθορισμού

Το Becton Dickinson FACScalibur είναι ένα σύστημα κυτταρομέτρου ροής που αναγνωρίζει τρία φθοριοχρώματα (FITC fluorescein isothiocyanate, PE phycoerythrin και PerCP peridinin-chlorophyll-protein complex). Έχει ως πηγή φωτός μια ακτίνα laser Αργού, η

οποία παράγει φως ισχύος 15mW και μήκους κύματος 488nm επιτρέποντας τις δύο παραμέτρους σκέδασης (FSC και SSC) και τα κανάλια φθορισμού να ανιχνευθούν. Η ακτίνα του laser προμηθεύει μια περιοχή φωτός αρκετά μεγάλη για τα περισσότερα είδη κυττάρων ώστε να υπάρχει πλήρης φωτισμός εντός της ακτίνας και να δίνει μια ομοιόμορφη διέγερση όλων των κυττάρων τα οποία περιέχονται στο δείγμα. Η εστιασμένη ακτίνα laser αλληλεπιδρά με τα φθορίζοντα αντισώματα με τα οποία έχει επισημανθεί ένα κύτταρο, με αποτέλεσμα να δημιουργούνται ταυτόχρονα σκεδασμένο φως καθώς και σήματα φθορισμού. Με τα κατάλληλα φθορίζοντα αντισώματα έχουμε τη δυνατότητα να μελετήσουμε διάφορα κύτταρα και την αλληλεπίδρασή τους με τα αντισώματα αυτά. Στο κυτταρόμετρο τα κύτταρα διαχωρίζονται με βάση το μέγεθος και την κοκκίωση τους. Επίσης, το καθένα από τα αντισώματα έχει επισημανθεί με μια φθορίζουσα ουσία η οποία εκπέμπει σε ένα χαρακτηριστικό μήκος κύματος (FITC = 530nm/30, PE = 585nm/42 και PerCP = 650nm). Όμως, όλες οι φθορίζουσες ουσίες με τις οποίες είναι επισημασμένα τα αντισώματα που χρησιμοποιούνται στη κυτταρομετρία διεγείρονται στο ίδιο μήκος κύματος (488nm). Το σήμα της πρόσθιας σκέδασης (FSC), που αναγνωρίζει το μέγεθος των κυττάρων, συλλέγεται με τη δίοδο της πρόσθιας σκέδασης. Η πλάγια σκέδαση (SSC) που αναγνωρίζει την κοκκίωση των κυττάρων αλλά και οι παράμετροι του φθορισμού συλλέγονται από καθρέφτες που βρίσκονται σε γωνία 90° από την ακτίνα του laser.

Ένα κυτταρόμετρο χρειάζεται συνδυασμένο σύστημα ρευστών για να επικεντρωθούν στα κύτταρα για αναγνώριση, οπτικών για να παράγουν και να συγκεντρώσουν σημάδια φωτός και ηλεκτρονικών για να μετατρέψουν τα οπτικά σήματα σε ανάλογα ηλεκτρονικά σήματα και να τα ψηφιοποιήσουν για ανάλυση στον υπολογιστή και ανάλυση του παλμού τάσης.

Χρησιμοποιήθηκαν αντισώματα, όπως το CD14-FITC (που αναγνωρίζει τα μονοκύτταρα), το CD282-PE (που αναγνωρίζει τον TLR2) και το CD284-PE (που αναγνωρίζει τον TLR4). Με αυτό τον τρόπο μελετάται η μεμβρανική έκφραση των υποδοχέων σε μονοκύτταρα περιφερικού φλεβικού αίματος με χρήση κυτταρομετρίας ροής.

Υλικά και όργανα:

- Φυγόκεντρος πάγκου (HermLe, Z 320)
- CD14-FITC (Becton Dickinson)
- CD282-PE ,αντιστοιχεί στον TLR2 (eBioscience)

- CD284-PE ,αντιστοιχεί στον TLR4 (eBioscience)
- Σωληνάκια πολυστυρενίου των 5ml (12x75mm, Becton Dickinson)
- Επωαστικός θάλαμος 37°C
- Cell Quest πρόγραμμα (Becton Dickinson)
- Κυτταρόμετρο ροής FACScalibur (Flow Cytometer, Becton Dickinson)

Διαλύματα εργασίας:

•Διάλυμα λύσης των κυττάρων. Το διάλυμα αυτό περιέχει 0,834g NH₄Cl, 0,0036g K₂EDTA και 0,10g KHCO₃ τα οποία διαλυτοποιούνται σε dH₂O. Το pH του διαλύματος ρυθμίζεται στο 7,4 και τοποθετείται σε ογκομετρική φιάλη των 100 mL. Στη συνέχεια η ογκομετρική φιάλη συμπληρώνεται μέχρι τα 100 mL με dH₂O. Κατά τη διάρκεια του πειράματος φυλάσσεται σε πάγο. Το διάλυμα αυτό παρασκευάζεται λίγο πριν τη χρήση του.

•Ρυθμιστικό διάλυμα 10mM PBS, pH 7,4. Το διάλυμα αυτό περιέχει 8,1816g NaCl, 1,3800g NaH₂PO₄·H₂O και 1,7795g Na₂HPO₄·2H₂O τα οποία διαλυτοποιούνται σε 800 mL dH₂O και αφού ρυθμιστεί το pH στο 7,4 συμπληρώνεται ο όγκος στο 1 L με dH₂O. Το διάλυμα διατηρείται σε θερμοκρασία δωματίου.

Πειραματική διαδικασία:

Αρχικά συλλέγονται 10 ml περιφερικού φλεβικού αίματος σε VACUTAINER σωληνάκια της Becton Dickinson που περιέχουν αντιπηκτικό K₂EDTA 18,0 mg. Στη συνέχεια ακολουθεί η παρακάτω πορεία πριν την ανάλυση στο κυτταρόμετρο ροής όπου βλέπουμε την μεμβρανική έκφραση των υποδοχέων TLR2 και TLR4 σε μονοκύτταρα. Η διαδικασία αυτή πρέπει να έχει ολοκληρωθεί εντός τριών ωρών από τη συλλογή αίματος.

•Σε δύο ειδικά σωληνάκια κυτταρομέτρου της Becton Dickinson τοποθετούμε από 3μL από τα κατάλληλα αντισώματα CD14-CD282 και CD14-CD284 για μελέτη της μεμβρανικής έκφρασης των υποδοχέων TLR2 και TLR4 στα μονοκύτταρα για κάθε δείγμα.

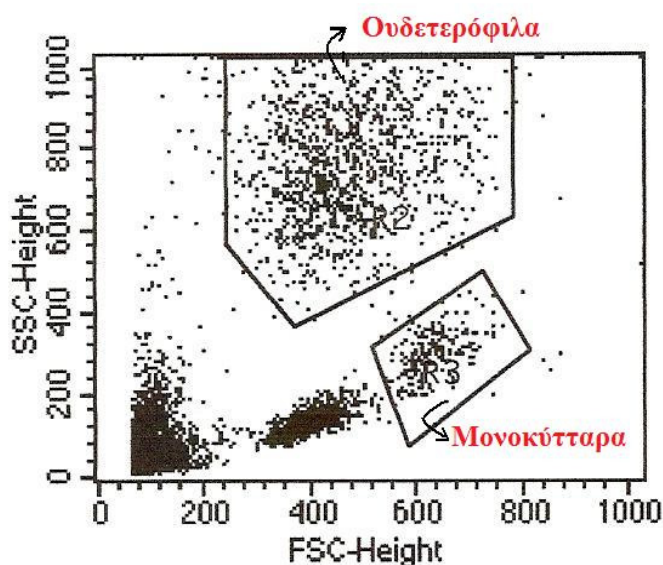
•Προσθέτουμε από 30 μL αίματος στο κάθε σωληνάκι και κάνουμε μικρή ανάδευση.

•Επωάζουμε για 10 min στους 37°C.

- Προσθέτουμε 2 mL διαλύματος λύσης των κυττάρων και τοποθετούμε τα δείγματα στο σκοτάδι για 20 min.
- Το δείγμα φυγοκεντρείται στις 2000rpm για 5 min σε φυγόκεντρο πάγκου.
- Το υπερκείμενο αποχύνεται και προσθέτουμε 500μL PBS.
- Ακολουθεί vortex και ανάλυση με κυτταρομετρία ροής.

Υπολογισμός των αποτελεσμάτων: Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέση ένταση φθορισμού (mean fluorescence intensity, MFI) καθώς και ως % ποσοστό των CD14⁺ μονοκυττάρων που εκφράζουν τον TLR2 και τον TLR4 (%Gated).

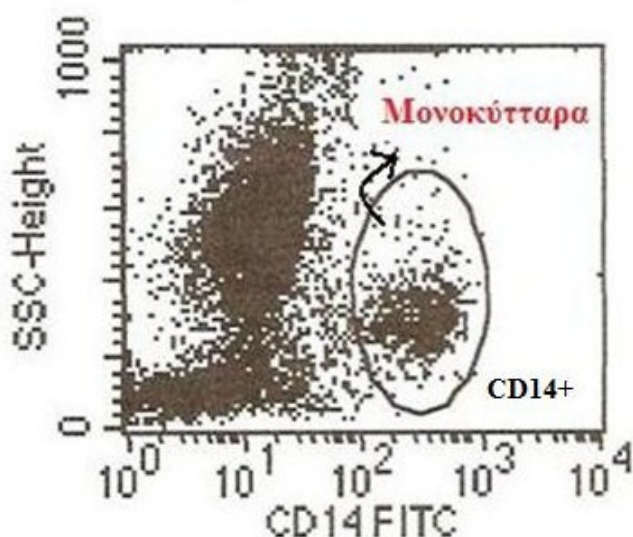
Μια αντιπροσωπευτική εικόνα του πληθυσμού των μονοκυττάρων και των ουδετερόφιλων σε ολικό πληθυσμό κυττάρων με βάση το μέγεθος ή FSC και την κοκκίωση ή SSC, όπως αυτή λαμβάνεται από το κυτταρόμετρο, φαίνεται παρακάτω (Εικόνα 17).



Εικόνα 17. Αντιπροσωπευτική εικόνα πληθυσμού κυττάρων αίματος όπου διακρίνονται τα μονοκύτταρα και τα ουδετερόφιλα όπου έχουν επισημανθεί με βάση το μέγεθος και την κοκκίωση σε κυτταρόμετρο ροής.

Προσδιορισμός των επιπέδων των ενδοκυττάρων κυτταροκινών IL-6 και IL-1β σε μονοκύτταρα ολικού αίματος με χρήση κυτταρομετρίας ροής

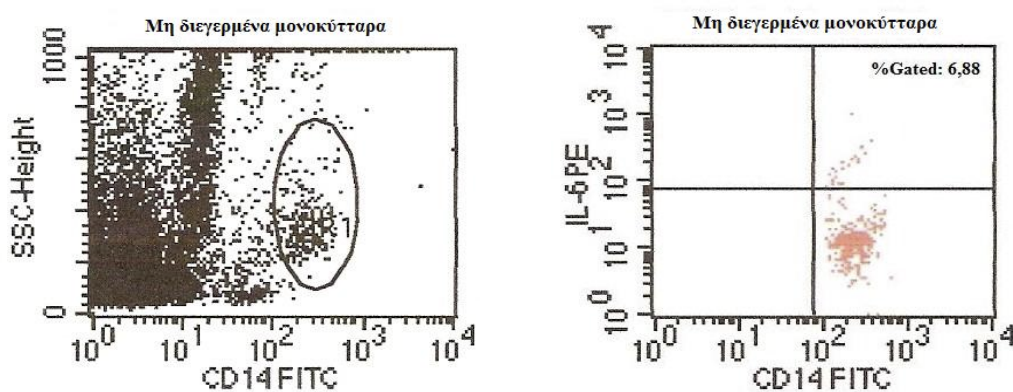
Αρχή της μεθόδου: Το αίμα συλλέγεται σε VACUTAINER σωληνάκια της Becton Dickinson που περιέχουν νατριούχο ηπαρίνη. Η μέθοδος αυτή δεν μπορεί να πραγματοποιηθεί όταν το αίμα συλλέγεται σε σωληνάκια που περιέχουν ως αντιπηκτικό λιθιούχο ηπαρίνη (άλας λιθίου) ή EDTA ή ACD και αυτό επειδή όταν το αίμα ληφθεί σε σωληνάκια με αυτά τα αντιπηκτικά, τα μονοκύτταρα δεν ανταποκρίνονται στον LPS. Η ενεργοποίηση πραγματοποιείται παρουσία της brefeldin A (BFA). Η BFA είναι ένας μεταβολίτης που παράγεται από τον μύκητα *Penicillium brefeldianum*. Αναστέλλει την ενδοκυττάρια μεταφορά εκκριτικών πρωτεϊνών ώστε τα αντιγόνα και οι κυτταροκίνες που παράγονται κατά την ενεργοποίηση των κυττάρων να παραμένουν μέσα στο κύτταρο. Ο LPS προστίθεται για διέγερση των μονοκυττάρων. Το FACS Lysing διάλυμα προορίζεται για τη λύση των ερυθροκυττάρων διατηρώντας παράλληλα τα λευκοκύτταρα ενώ το FACS Permeabilizing διάλυμα χρησιμοποιείται για να επιτευχθεί η διαπερατότητα των κυτταρικών μεμβρανών πριν από την ενδοκυττάρια ανοσοφθορισμική χρώση με μονοκλωνικά αντισώματα. Επειδή χρησιμοποιούμε το CD14 παρουσία και απουσία του LPS παρατηρούμε μόνο τον πληθυσμό των μονοκυττάρων που παράγει τις κυτταροκίνες που μελετάμε. Μια αντιπροσωπευτική εικόνα του πληθυσμού των μονοκυττάρων όπως αυτή λαμβάνεται από το κυτταρόμετρο έπειτα από την ενδοκυττάρια χρώση φαίνεται στην Εικόνα 18.



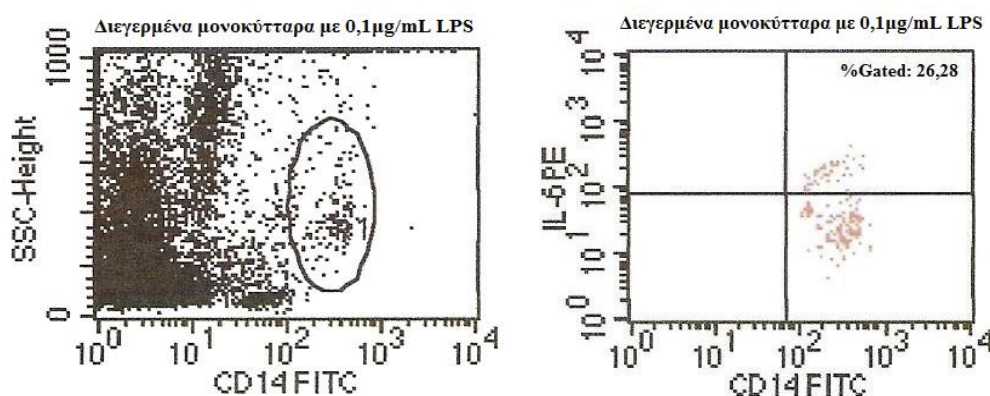
Εικόνα 18. Η ταυτοποίηση των μονοκυττάρων σε ολικό πληθυσμό λευκοκυττάρων παρουσία του CD14 με κυτταρομετρία ροής.

Με αυτό τον τρόπο, μελετάται η ενδοκυττάρια παραγωγή κυτταροκινών στα μονοκύτταρα έπειτα από διέγερση με ένα από τα κυριότερα προσδέματα του TLR4, τον λιποπολυσακχαρίτη καθώς και απουσία του προσδέματος. Στο συγκεκριμένο πείραμα μελετήθηκε η παραγωγή της IL-1 β και της IL-6.

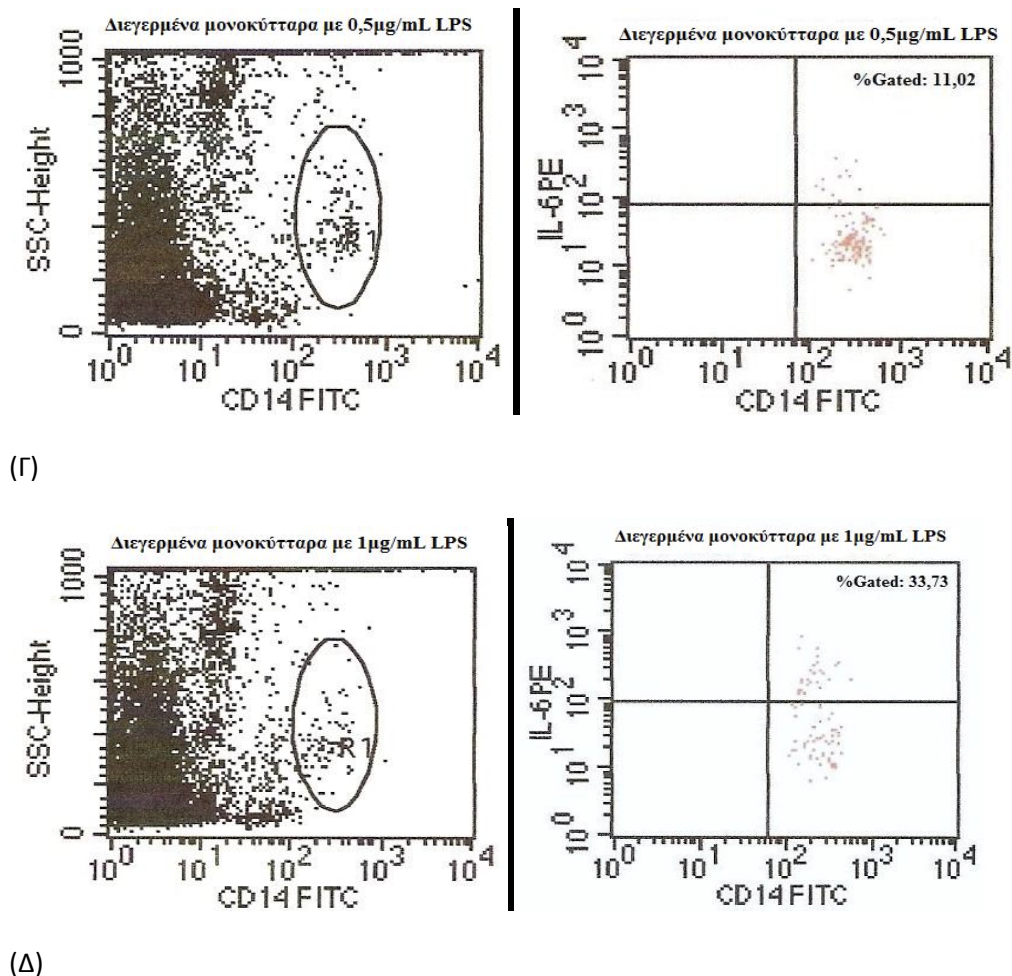
Σε αρχικά πειράματα ελέγξαμε σε φυσιολογικά κύτταρα την επίδραση διαφορετικών δόσεων LPS. Οι συγκεντρώσεις του LPS που χρησιμοποιήσαμε ήταν 0,1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ και 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Όπως παρουσιάζεται στην παρακάτω εικόνα παρατηρήσαμε ότι χρησιμοποιώντας μικρότερη συγκέντρωση LPS η έκφραση των κυτταροκινών αυξάνει σε μεγαλύτερο ποσοστό στα CD14 $^{+}$ μονοκύτταρα σε σχέση με τις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις. Για το λόγο αυτό η συγκέντρωση που χρησιμοποιήσαμε για τη διέγερση των μονοκυττάρων ήταν 0,1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Εικόνα 19).



(A)



(B)



Εικόνα 19. Αντιπροσωπευτικές κυτταρομετρικές εικόνες της σύνθεσης IL-6 σε φυσιολογικά μονοκύτταρα χρησιμοποιώντας διαφορετικές συγκεντρώσεις LPS, (Α) μη διεγερμένα μονοκύτταρα, (Β) διεγερμένα μονοκύτταρα με 0,1µg/mL LPS, (Γ) διεγερμένα μονοκύτταρα με 0,5µg/mL και (Δ) διεγερμένα μονοκύτταρα με 1µg/mL.

Υλικά και όργανα:

- Φυγόκεντρος πάγκου (HermLe, Z 320)
- CD14-FITC (Pharmingen, Becton Dickinson)
- IL-6-PE (Becton Dickinson)
- IL-1β-PE (Becton Dickinson)
- Σωληνάκια πολυστυρενίου των 5ml (12x75mm, Becton Dickinson)
- Cell Quest πρόγραμμα (Becton Dickinson)

- Κυτταρόμετρο ροής FACScalibur (Becton Dickinson)
- Θρεπτικό υλικό RPMI 1640 (Fluka)
- Υδατόλουτρο 37°C
- Brefeldin A (Sigma)
- Επωαστικός θάλαμος 37°C με 7% CO₂
- FACS Lysing Solution 10X (Becton Dickinson)
- FACS Permeabilizing Solution 10X (Becton Dickinson)
- BSA – Albumin from bovine serum (Sigma)

Διαλύματα εργασίας:

- Διάλυμα LPS 50μg/mL. Αναμιγνύονται σε ένα erpendorf 5μL LPS αρχικής συγκέντρωσης 5mg/mL με 495μL PBS.

- Διάλυμα brefeldin (BFA) 5mg/mL. Η εμπορική του συσκευασία περιέχει 5mg ουσίας τα οποία αναμιγνύονται με 1mL αιθανόλης.

- FACS Lysing solution 1X. Αναμιγνύονται 1mL του 10X με 9mL ddH₂O.

- FACS Permeabilizing solution 1X. Αναμιγνύονται 1mL του 10X με 9mL ddH₂O.

- Wash buffer PBS/0,1% BSA. Διαλυτοποιούνται 50mg BSA σε 50mL PBS. Το διάλυμα διατηρείται στους 4°C.

- Διάλυμα παραφορμαδεΐδης 1%. Θερμαίνουμε 1,6 L PBS στους 80°C και προσθέτουμε 60 g παραφορμαδεΐδης υπό ανάδευση. Αναμιγνύουμε μέχρι το διάλυμα να γίνει διαυγές. Προσθέτουμε 200 μL 1M CaCl₂ και 200 μL 1M MgCl₂ μέχρι τα 2 L. Παράλληλα αναδεύουμε το θερμό διάλυμα για να αποφευχθεί η δημιουργία ιζήματος. Αφήνεται να ψυχθεί, ρυθμίζεται το pH στο 7,4 και συμπληρώνεται με PBS μέχρι τα 2 L. Το διάλυμα φυλάσσεται στους -20°C.

Πειραματική διαδικασία:

Παίρνουμε δυο σωληνάκια πολυστηρενίου για κάθε δείγμα. Το ένα θα είναι το διεγερμένο με LPS και το άλλο το μη διεγερμένο. Στο καθένα βάζουμε από 1 mL RPMI, 6 mL BFA και στο ένα σωληνάκι 4 μL LPS. Έπειτα προσθέτουμε στο κάθε σωληνάκι από 1 mL περιφερικού αίματος.

- Τοποθετούμε τα δείγματα σε επωαστικό θάλαμο 37°C με 7% CO₂ για 4 ώρες.

- Παίρνουμε δύο νέα σωληνάκια (διεγερμένο και μη διεγερμένο). Στο καθένα τοποθετούμε από 10 μL CD14-FITC και 500 μL αίματος από το ενεργοποιημένο με LPS και το μη διεγερμένο σωληνάκι, αντίστοιχα. Επιάζουμε στο σκοτάδι για 15-30 min σε θερμοκρασία δωματίου.

- Προσθέτουμε 2 mL FACS Lysing Solution 1X και επιάζουμε στο σκοτάδι για 10 min σε θερμοκρασία δωματίου.

- Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 2000 στροφές για 5 min και απομάκρυνση του υπερκείμενου.

- Προσθέτουμε 500 μL FACS Permeabilizing Solution και επιάζουμε στο σκοτάδι για 10 min σε θερμοκρασία δωματίου.

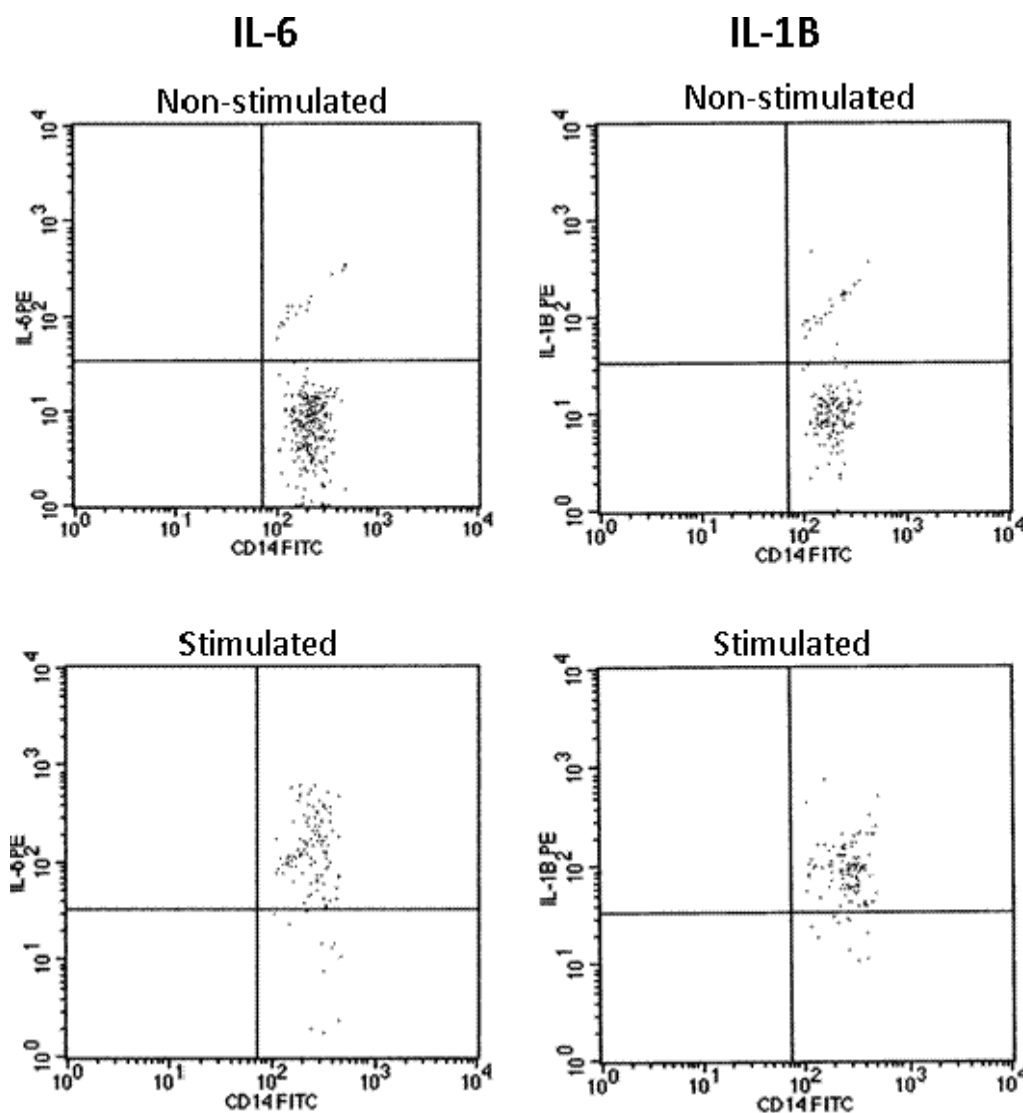
- Προσθέτουμε 2 mL wash buffer, φυγοκεντρούμε στις 2000 στροφές για 5 min και απομακρύνουμε το υπερκείμενο.

- Προσθέτουμε 10 μL IL-1β (ή IL-6) σε 50 μL RPMI και επιάζουμε στο σκοτάδι για 30 min σε θερμοκρασία δωματίου.

- Προσθέτουμε 2 mL wash buffer, φυγοκεντρούμε στις 2000 στροφές για 5 min και απομακρύνουμε το υπερκείμενο.

- Προσθέτουμε 500 μL παραφορμαλδεΐδης 1% και ακολουθεί ανάλυση στο κυτταρόμετρο.

Υπολογισμός των αποτελεσμάτων: Τα δείγματα αναλύθηκαν με βάση την έκφρασή τους στο CD14 και στην IL-6 ή την IL-1β. Όπως φαίνεται στην αντιπροσωπευτική εικόνα μετά από την επίδραση με LPS υπήρχε ένας πληθυσμός που ήταν θετικός τόσο για το CD14 όσο και για την IL-6 ή την IL-1β. Η μέση ένταση φθορισμού των μονοκυττάρων που εκφράζουν τόσο το CD14 όσο και την IL-6 ή την IL-1β (η περιοχή που είναι πάνω δεξιά στο ιστόγραμμα) αυξάνεται όταν προστεθεί ο LPS (Εικόνα 20).



Εικόνα 20. Αντιπροσωπευτικές κυτταρομετρικές εικόνες της ενδοκυττάριας παραγωγής (Α) της IL-6 σε μη διεγερμένα CD14-θετικά μονοκύτταρα, (Β) της IL-6 σε διεγερμένα CD14-θετικά μονοκύτταρα με 0.1 μg/mL LPS, (Γ) της IL-1β σε μη διεγερμένα CD14-θετικά μονοκύτταρα και (Δ) της IL-1β σε διεγερμένα CD14-θετικά μονοκύτταρα με 0.1 μg/mL LPS υπερχοληστερολαιμικών ασθενών

Στατιστική ανάλυση

Για όλες τις παραμέτρους της μελέτης έγινε προκαταρκτική ανάλυση ώστε να αποκλεισθεί η περίπτωση παραβίασης των παραδοχών της κανονικής κατανομής των παραμέτρων. Η δοκιμασία των Shapiro-Wilk χρησιμοποιήθηκε για την εκτίμηση της κανονικής κατανομής των παραμέτρων. Τα δεδομένα εκφράζονται ως μέση τιμή ± σταθερή απόκλιση (SD), εκτός από τις μεταβλητές, οι οποίες δεν ακολουθούν κανονική κατανομή και οι οποίες εκφράζονται ως διάμεση τιμή (εύρος). Οι συσχετίσεις μεταξύ των μεταβλητών της

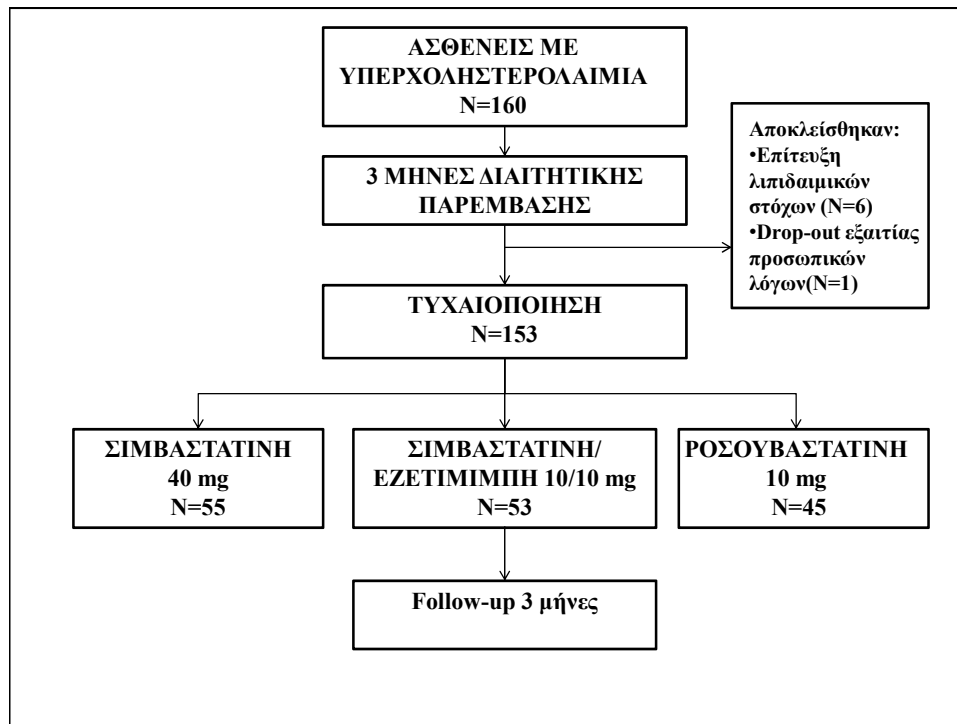
μελέτης εκτιμήθηκαν με τη χρησιμοποίηση του Pearson product-moment correlation coefficient (r) ή του Spearman's rank order correlation (ρ) για τις κανονικές και μη-κανονικές μεταβλητές, αντίστοιχα. Οι συγκρίσεις των παραμέτρων της μελέτης πριν και μετά τη θεραπεία πραγματοποιήθηκαν με τη χρησιμοποίηση του Student's t-test για εξαρτημένες μεταβλητές. Για να συγκριθούν οι ποσοστιαίες μεταβολές των παραμέτρων που επιτεύχθηκαν με τη σιμβαστατίνη και το συνδυασμό της σιμβαστατίνης με εζετιμίμπη χρησιμοποιήθηκε η δοκιμασία ANCOVA (analysis of covariance, ανάλυση της συμμεταβλητότητας). Η σημαντικότητα ορίστηκε για τιμή του $p < 0.05$. Όλες οι αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν με προσωπικό υπολογιστή και τη χρησιμοποίηση του λογισμικού SPSS 15.0.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Πρωτόκολλο 1

Γενικά

Αρχικά, 160 ασθενείς συμμετείχαν στη μελέτη. Μετά από 12 εβδομάδες διαιτητικής παρέμβασης, 153 ασθενείς συνέχισαν να πληρούν τα κριτήρια εισόδου και τυχαιοποιήθηκαν να πάρουν θεραπεία με 1) σιμβαστατίνη 40 mg (n=55) 2) σιμβαστατίνη/εζετιμίμη 10/10 mg (n=53) ή 3) ροσουβαστατίνη 10 mg (n=45) για 3 μήνες. Όλοι οι ασθενείς που τυχαιοποιήθηκαν ολοκλήρωσαν τη μελέτη (Εικόνα 21). Τα χαρακτηριστικά των ασθενών της μελέτης φαίνονται στον Πίνακα 9. Δεν υπήρχαν στατιστικά σημαντικές διαφορές ανάμεσα στις ομάδες. Τα αρχικά επίπεδα των 8-ισοπροστανίων, της oxLDL και της ενεργότητας και μάζας της Lp-PLA₂ δεν διέφεραν ανάμεσα στις ομάδες. Οι τιμές του βάρους, της περιμέτρου μέσης και της αρτηριακής πίεσης δεν μεταβλήθηκαν σε καμία ομάδα μετά το πέρας της θεραπείας.



Εικόνα 21. Διάγραμμα ροής των ασθενών της μελέτης

Πίνακας 9. Δημογραφικά, ανθρωπομετρικά χαρακτηριστικά και λιπιδαιμικές παράμετροι των ασθενών που συμμετείχαν στη μελέτη πριν την έναρξη θεραπείας

Παράμετρος	Σιμβαστατίνη 40 mg (n=55)	Σιμβαστατίνη/εζετιμίμη 10/10 mg (n=53)	Ροσουβαστατίνη 10 mg (n=45)	P
Άνδρες, n	18	21	17	NS
Ηλικία, έτη	58 ± 8	60 ± 8	52 ± 16	NS
Καπνιστές, %	6	5	6	NS
BMI, kg/m ²	29 ± 8	29 ± 8	29 ± 9	NS
Περίμετρος μέσης, cm	97 ± 10	99 ± 10	99 ± 10	NS
Συστολική ΑΠ (mmHg)	130 ± 10	130 ± 9	128 ± 10	NS
Διαστολική ΑΠ (mmHg)	80 ± 7	80 ± 9	81 ± 8	NS
TC, mg/dL	256 ± 41	263 ± 39	274 ± 41	NS
LDL-C, mg/dL	176 ± 34	177 ± 33	182 ± 33	NS
TG, mg/dL	111 (55-241)	123 (48-237)	141 (52-327)	NS
HDL-C, mg/dL	58 ± 13	60 ± 12	61 ± 13	NS
ΑpoA1, mg/dL	155 ± 25	163 ± 28	156 ± 26	NS
ΑpoB, mg/dL	110 ± 20	115 ± 25	124 ± 40	NS
ΑpoE, mg/L	45 ± 11	45 ± 12	42 ± 11	NS
Lp(a), mg/dL	12.9 (2.3-89.8)	9.6 (2.4-89)	11.7 (2.44-44.2)	NS
hsCRP, mg/L	2.2 (0.4-13)	2.4 (0.5-14.7)	2.6 (0.3-11)	NS

Φαρμακευτική αγωγή πριν τη θεραπεία				
ARBs, n	1	3	2	NS
ARBs ή ACEIs και θειαζιδικό διουρητικό, n	7	7	7	NS
B-αναστολείς, n	2	2	3	NS

Η τιμή P αντιπροσωπεύει την ανάλυση των διαφορών μεταξύ των τριών ομάδων της μελέτης. Οι τιμές εκφράζονται ως μέση τιμή \pm σταθερή απόκλιση (mean \pm standard Deviation, SD), εκτός από τα τριγλυκερίδια και την λιποπρωτεΐνη a [lipoprotein (a), Lp(a)] που δεν ακολουθούν κανονική κατανομή και εκφράζονται ως διάμεση τιμή (εύρος).

BMI: body mass index, δείκτης μάζας σώματος, ΑΠ: αρτηριακή πίεση, TC: total cholesterol, ολική χοληστερόλη, LDL-C: low density lipoprotein cholesterol, χοληστερόλη των υψηλής πυκνότητας λιποπρωτεϊνών, TG: triglycerides, τριγλυκερίδια, HDL-C: high density lipoprotein cholesterol, χοληστερόλη των υψηλής πυκνότητας λιποπρωτεϊνών, ACEIs: angiotensin converting enzyme inhibitors, αναστολείς του μετατρεπτικού ένζυμου της αγγειοτενσίνης, ARBs: angiotensin receptor blockers, αναστολείς των υποδοχέων της αγγειοτενσίνης, NS: non significant, όχι στατιστικά σημαντική διαφορά

Για τη μετατροπή των επιπέδων της χοληστερόλης από mg/dL σε mmol/L πολλαπλασιάζουμε με 0.0259. Για τη μετατροπή των τριγλυκεριδίων από mg/dL σε mmol/L πολλαπλασιάζουμε με 0.0113.

Μεταβολές των λιπιδαιμικών παραμέτρων και της hsCRP

Όπως φαίνεται και στον πίνακα 10, τα επίπεδα των TC, LDL-C, TG, apoB και apoE μειώθηκαν στατιστικά σημαντικά σε όλες τις ομάδες ($p < 0.001$). Τα επίπεδα των HDL-C, apoA1 και Lp(a) δεν μεταβλήθηκαν σε καμία ομάδα. Δεν υπήρχαν διαφορές ανάμεσα στις τρεις ομάδες. Τα επίπεδα της hsCRP μειώθηκαν στατιστικά σημαντικά και στις τρεις ομάδες, χωρίς να υπάρχει διαφορά ανάμεσα στις ομάδες.

Πίνακας 10. Επίδραση των υπολιπιδαιμικών φαρμάκων στις λιπιδαιμικές παραμέτρους και στα επίπεδα της hsCRP

Παράμετρος	Αρχικά	3 μήνες	Μεταβολή (%)
TC, mg/dL			
Σιμβαστατίνη 40 mg	256±41	176±31	-31.2 [†]
Σιμβαστατίνη/εζετιμίμπη 10/10 mg	263±39	171±24	-34.9 [†]
Ροσουβαστατίνη 10 mg	274±41	185±26	-32.5 [†]
LDL-C, mg/dL			
Σιμβαστατίνη 40 mg	176±34	99±26	-43.7 [†]
Σιμβαστατίνη/εζετιμίμπη 10/10 mg	177±33	91±20	-48.6 [†]
Ροσουβαστατίνη 10 mg	182±33	99±24	-45.6 [†]
TG,mg/dL			
Σιμβαστατίνη 40 mg	111 (55-241)	93 (54-200)	-16.2 [†]
Σιμβαστατίνη/εζετιμίμπη 10/10 mg	123 (48-237)	94 (41-174)	-23.6 [†]

Ροσουβαστατίνη 10 mg	141 (52-327)	104 (41-239)	-25.7 [‡]
HDL-C, mg/dL			
Σιμβαστατίνη 40 mg	58±13	59±14	1.7
Σιμβαστατίνη/εζετιμίμη 10/10 mg	60±12	61±12	1.7
Ροσουβαστατίνη 10 mg	61±13	63±14	3.2
ApoA1, mg/dL			
Σιμβαστατίνη 40 mg	155±25	159±27	2.6
Σιμβαστατίνη/εζετιμίμη 10/10 mg	163±28	166±26	1.8
Ροσουβαστατίνη 10 mg	156±26	157±35	0.6
ApoB, mg/dL			
Σιμβαστατίνη 40 mg	110±20	72±19	-34.5 [‡]

Σιμβαστατίνη/εζετιμίμπη 10/10 mg	115±25	70±14	-39.1 [‡]
Ροσουβαστατίνη 10 mg	124±40	75±23	-39.5 [‡]
ApoE, mg/L			
Σιμβαστατίνη 40 mg	45±11	37±10	-17.8 [‡]
Σιμβαστατίνη/εζετιμίμπη 10/10 mg	45±12	35±9	-22.2 [‡]
Ροσουβαστατίνη 10 mg	42±11	35±8	-16.7 [‡]
Lp(a), mg/dL			
Σιμβαστατίνη 40 mg	12.9 (2.3-89.8)	11.7 (2.3-94.1)	-9.3
Σιμβαστατίνη/εζετιμίμπη 10/10 mg	9.6 (2.4-89)	9.3 (2.3-63)	-3.1
Ροσουβαστατίνη 10 mg	11.7 (2.44-44.2)	8.5 (2.44-56)	-27.3
hsCRP, mg/L			

Σιμβαστατίνη 40 mg	2.2 (0.4-13)	1.7 (0.2-11.2)	-22.7*
Σιμβαστατίνη/εζετιμίμη 10/10 mg	2.4 (0.5-14.7)	2.1 (0.4-10.5)	-12.5*
Ροσουβαστατίνη 10 mg	2.6 (0.3-11)	2.2 (0.3-5.4)	-15.4*

Τα δεδομένα εκφράζονται ως μέση τιμή ± σταθερή απόκλιση (SD), εκτός από τις τιμές των TG, της hsCRP και της Lp(a) οι οποίες εκφράζονται ως διάμεση τιμή (εύρος).

* $p < 0.05$, [†] $p < 0.01$ και [‡] $p < 0.001$ σε σύγκριση με τις αντίστοιχες τιμές πριν τη θεραπεία.

Apo: apolipoprotein, απολιποπρωτεΐνη, HDL-C: high density lipoprotein cholesterol, χοληστερόλη των υψηλής πυκνότητας λιποπρωτεϊνών, hsCRP: high sensitivity C reactive protein, υψηλής ευαισθησίας C αντιδρώσα πρωτεΐνη, LDL-C: low density lipoprotein cholesterol, χοληστερόλη των χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεϊνών, Lp(a): lipoprotein (a), λιποπρωτεΐνη (α).

Για τη μετατροπή των επιπέδων της χοληστερόλης από mg/dL σε mmol/L πολλαπλασιάζουμε με 0.0259. Για τη μετατροπή των τριγλυκεριδίων από mg/dL σε mmol/L πολλαπλασιάζουμε με 0.0113.

Επίδραση της υπολιπιδαιμικής αγωγής σε δείκτες μεταβολισμού της γλυκόζης

Μετά από 3 μήνες θεραπείας ο δείκτης HOMA-IR και τα επίπεδα ινσουλίνης αυξήθηκαν στατιστικά σημαντικά και στις τρεις ομάδες ($p < 0.05$ σε σύγκριση με τις αρχικές τιμές). Μετά από διόρθωση για τις αρχικές τιμές δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικά διαφορές ανάμεσα στις ομάδες (Πίνακας 11).

Η αλλαγή στο δείκτη HOMA-IR ήταν ανεξάρτητη από τα αρχικά επίπεδα του δείκτη HOMA-IR, την ηλικία, το φύλο, την περίμετρο μέσης, το BMI, τη hsCRP ή τα επίπεδα και τις αλλαγές των λιπιδαιμικών παραμέτρων.

Τα επίπεδα των HOMA-B, HbA_{1c} και γλυκόζης δεν μεταβλήθηκαν σε καμία ομάδα.

Πίνακας 11. Επίδραση των υπολιπιδαιμικών φαρμάκων στους δείκτες μεταβολισμού της γλυκόζης

Παράμετρος	Αρχικά	3 μήνες	Μεταβολή (%)
Γλυκόζη νηστείας, mg/dL			
Σιμβαστατίνη 40 mg	92±11	95±11	3.2
Σιμβαστατίνη/εζετιμίμπη 10/10 mg	94±9	96±10	2.1
Ροσουβαστατίνη 10 mg	96±9	98±11	2.1
Ινσουλίνη νηστείας, μU/mL			
Σιμβαστατίνη 40 mg	4.8 (4.6-7.0)	6.1 (5.3-8.0)	27*
Σιμβαστατίνη/εζετιμίμπη 10/10 mg	4.4 (4.8-9.0)	6.0 (5.8-9.6)	36*
Ροσουβαστατίνη 10 mg	5.8 (5.2-9.0)	7.0 (6.0-10)	21*
HOMA-IR			
Σιμβαστατίνη 40 mg	1.1 (1.1-1.6)	1.4 (1.2-1.9)	27*

Σιμβαστατίνη/εζετιμίμη 10/10 mg	1.0 (1.1-2.3)	1.5 (1.4-2.5)	50*
Ροσουβαστατίνη 10 mg	1.4 (1.2-2.1)	1.6 (1.5-2.6)	14*
HOMA-B			
Σιμβαστατίνη 40 mg	71 (22-180)	65 (21-170)	-8.4
Σιμβαστατίνη/εζετιμίμη 10/10 mg	62 (19-234)	70 (17-155)	-12.9
Ροσουβαστατίνη 10 mg	55 (18-352)	74 (17-237)	-34.5
HbA1c, %			
Σιμβαστατίνη 40 mg	6.0±0.3	5.9±0.5	-1.7
Σιμβαστατίνη/εζετιμίμη 10/10 mg	6.0±0.3	5.8±0.3	-3.3
Ροσουβαστατίνη 10 mg	5.9±0.1	5.8±0.4	-1.7

Τα δεδομένα εκφράζονται ως μέση τιμή ± σταθερή απόκλιση (SD), εκτός από τις τιμές της ινσουλίνης, και των HOMA-IR και HOMA-B οι οποίες εκφράζονται ως διάμεση τιμή (εύρος).

* $p < 0.05$, [†] $p < 0.01$ και [‡] $p < 0.001$ σε σύγκριση με τις αντίστοιχες τιμές πριν τη θεραπεία

HbA1c: glucosylated hemoglobin, γλυκοζυλιωμένη αιμοσφαιρίνη, HOMA-IR: homeostasis model assessment of insulin resistance, μοντέλο εκτίμησης της ομοιοστασίας της γλυκόζης, HOMA-B: HOMA of β -cell function, μοντέλο λειτουργίας των β -κυττάρων

Επίδραση της υπολιπιδαιμικής αγωγής στα επίπεδα πλάσματος και την κλασματική απέκκριση του ουρικού οξέος, των ηλεκτρολυτών και σε παράμετρος της νεφρικής λειτουργίας

Τα επίπεδα του ουρικού οξέος μειώθηκαν στατιστικά σημαντικά και στις τρεις θεραπευτικές ομάδες, χωρίς στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ τους (σιμβαστατίνη 40 mg: -5.7%, σιμβαστατίνη/εζετιμίμπη 10/10 mg: -3.8%, και ροσουβαστατίνη 10 mg: -3.8%; $p < 0.05$ σε σύγκριση με τις αρχικές τιμές; $p = NS$ για τη σύγκριση ανάμεσα στις ομάδες). Η κλασματική απέκκριση του ουρικού οξέος αυξήθηκε και στις τρεις ομάδες, χωρίς όμως η διαφορά να είναι στατιστικά σημαντική (σιμβαστατίνη 40 mg: +6.8%, σιμβαστατίνη/εζετιμίμπη 10/10 mg: +6.8%, και ροσουβαστατίνη 10 mg: +5.9%; $p = NS$ σε σύγκριση με τις αρχικές τιμές; $p = NS$ για τη σύγκριση ανάμεσα στις ομάδες) (Πίνακας 12).

Η επίδραση των υπολιπιδαιμικών φαρμάκων της μελέτης στη νεφρική λειτουργία, όπως καθορίστηκε από τα επίπεδα της κρεατινίνης ορού, την κάθαρση κρεατινίνης, τον εκτιμώμενο ρυθμό σπειραματικής διήθησης και το λόγο αλβουμίνης/κρεατινίνης ούρων φαίνονται στον πίνακα 12. Καμία στατιστικά σημαντική διαφορά δεν παρατηρήθηκε σε καμία παράμετρο ($p = NS$ για τη σύγκριση ανάμεσα στις ομάδες). Καμία στατιστικά σημαντική διαφορά δεν παρατηρήθηκε στα επίπεδα ορού και την κλασματική απέκκριση των ηλεκτρολυτών σε καμία ομάδα.

Σε μονοπαραγοντική ανάλυση, οι αλλαγές στα επίπεδα του ουρικού οξέος συσχετιζόνταν με τα αρχικά επίπεδα του ουρικού οξέος ($r = -0.378$, $p < 0.001$), την ηλικία ($r = -0.185$, $p < 0.05$) και τις αλλαγές στην κλασματική απέκκριση του ουρικού οξέος ($r = -0.343$, $p < 0.001$).

Πίνακας 12. Επίδραση των υπολιπιδαιμικών φαρμάκων στα επίπεδα ορού και την κλασματική απέκκριση ούρων του ουρικού οξέος, των ηλεκτρολυτών και σε παραμέτρους της νεφρικής λειτουργίας

Παράμετρος	Σιμβαστατίνη 40 mg (n=55)		Σιμβαστατίνη/εξετιμίμπη 10/10 mg (n=53)		Ροσουβαστατίνη 10 mg (n=45)	
	Αρχικά	3 μήνες	Αρχικά	3 μήνες	Αρχικά	3 μήνες
Ουρικό οξύ (mg/dL)	5.2 ± 1.2	4.9 ± 1.5*	5.3 ± 1.7	5.1 ± 1.4*	5.3 ± 1.3	5.1 ± 1.3*
Na ⁺ (mEq/L)	140 ± 2	140 ± 2	140 ± 2	140 ± 2	140 ± 2	140 ± 2
K ⁺ (mEq/L)	4.3 ± 0.3	4.2 ± 0.1	4.5 ± 0.5	4.5 ± 0.2	4.4 ± 0.3	4.4 ± 0.3
Mg ²⁺ (mg/dL)	1.7 ± 0.1	1.7 ± 0.1	1.7 ± 0.1	1.7 ± 0.1	1.7 ± 0.1	1.7 ± 0.2
Ca (mg/dL)	9.6 ± 0.3	9.9 ± 0.4	9.7 ± 1	10.1 ± 0.4	9.9 ± 0.4	9.9 ± 0.4
Cl ⁻ (mEq/L)	104 ± 3	104 ± 3	103 ± 3	103 ± 3	103 ± 3	105 ± 2
PO ₄ ³⁻ (mg/dL)	3.2 ± 0.3	3.4 ± 0.4	3.3 ± 0.4	3.4 ± 0.4	3.3 ± 0.5	3.4 ± 0.4
FEουρικού οξέος (%)	7.3 ± 3.4	7.8 ± 4.0	7.4 ± 3.7	7.9 ± 3.3	6.7 ± 3.8	7.1 ± 4.6
FE _{Na} ⁺ (%)	0.6 (0.1-0.9)	0.7 (0.2-2.0)	0.5 (0.1-1.7)	0.8 (0.2-1.7)	0.7 (0.2-1.4)	0.6 (0.2-1.4)

FEK ⁺ (%)	12.0 ± 5.8	11.7 ± 3.9	11.2 ± 5.6	13.0 ± 5.9	11.6 ± 6.0	10.2 ± 4.5
FEMg ²⁺ (%)	2.3 ± 0.8	2.5 ± 0.8	2.2 ± 0.8	2.5 ± 0.9	2.4 ± 1.2	2.4 ± 1.2
FECa (%)	0.6 (0.1-1.3)	0.7 (0.1-1.7)	0.9 (0.4-1.8)	0.8 (0.3-1.9)	0.9 (0.1-1.5)	0.9 (0.2-1.8)
FECI ⁻ (%)	1.0 ± 0.5	1.2 ± 0.6	± 0.6	1.3 ± 0.6	1.0 ± 0.5	1.2 ± 0.7
FEPO ₄ ³⁻ (%)	11.4 ± 5.2	10.0 ± 5.1	10.8 ± 4.5	10.2 ± 4.3	14.6 ± 6.2	13.1 ± 6.3
sCre (mg/dL)	1.0 ± 0.1	0.9 ± 0.2	0.9 ± 0.2	1.0 ± 0.2	1.0 ± 0.2	1.0 ± 0.2
eCl _{tr} (mL/min)	82.7 ± 27.8	84.9 ± 33.0	86.3 ± 17.5	83.3 ± 17.6	77.9 ± 17.7	75.0 ± 18.0
eGFR-MDRD (mL/min/1.73 m ²)	71.6 ± 11.7	73.3 ± 20.3	76.8 ± 11.7	73.2 ± 12.6	71.2 ± 9.3	67.3 ± 9.7
Αλβουμίνη/κρεατινίνη ούρων (mg/g)	7.3 (2.5-34.4)	8.3 (2.0-80.3)	4.8 (2.0-14.5)	4.4 (2.3-14.1)	5.6 (2.3-56.0)	4.9 (2.1-21.1)

Τα δεδομένα εκφράζονται ως μέση τιμή ± σταθερή απόκλιση (SD), εκτός από τις τιμές των FeNa⁺, FeCa και το λόγο αλβουμίνης/κρεατινίνη ούρων, οι οποίες εκφράζονται ως διάμεση τιμή (εύρος).

*p<0.05 σε σύγκριση με τις αρχικές τιμές

sCr: serum creatinine, κρεατινίνη ορού, eCl_r: estimated creatinine clearance, εκτιμώμενη κάθαρση κρεατινίνης, eGFR-MDRD: estimated glomerular filtration rate, εκτιμώμενος ρυθμός σπειραματικής διήθησης, FE: fractional excretion, κλασματική απέκκριση.

Για τη μετατροπή των επιπέδων του ουρικού οξέος από mg/dL σε mmol/L πολλαπλασιάζουμε με 59.48, για τη μετατροπή του Mg²⁺ από mg/dL σε mmol/L πολλαπλασιάζουμε με 0.411, για τη μετατροπή του Ca από mg/dL σε mmol/L πολλαπλασιάζουμε με 0.25 και του PO₄³⁻ από mg/dL σε mmol/L πολλαπλασιάζουμε με 0.323. Για τη μετατροπή της κρεατινίνης ορού από mg/dL σε mmol/L πολλαπλασιάζουμε με 88.4.

Επίδραση της υπολιπιδαιμικής αγωγής στα επίπεδα της oxLDL και στα επίπεδα των 8-ισοπροστανίων

Σε όλες τις ομάδες τα επίπεδα των 8-ισοπροστανίων στο πλάσμα μειώθηκαν στατιστικά σημαντικά (10%, 8% και 6% στην ομάδα της σιμβαστατίνης, σιμβαστατίνης/εζετιμίμπης και ροσουβαστατίνης, αντίστοιχα, $p < 0.05$ σε σύγκριση με τις αρχικές τιμές, $p = NS$ για τη σύγκριση ανάμεσα στις ομάδες) (Πίνακας 13). Τα μεταθεραπευτικά επίπεδα των 8-ισοπροστανίων δε συσχετίζονταν με αλλαγές στις λιπιδαιμικές παραμέτρους. Στην μονοπαραγοντική ανάλυση, τα μεταθεραπευτικά επίπεδα των 8-ισοπροστανίων συσχετίζονταν με τις αρχικές τιμές των 8-ισοπροστανίων ($r = 0.38$, $p < 0.001$, $r = 0.37$, $p < 0.001$, $r = 0.37$, $p < 0.001$ στην ομάδα της σιμβαστατίνης, σιμβαστατίνης/εζετιμίμπης και ροσουβαστατίνης, αντίστοιχα), τις αρχικές τιμές της μάζας της Lp-PLA₂ ($r = 0.26$, $p = 0.04$, $r = 0.26$, $p = 0.05$, $r = 0.26$, $p = 0.04$ στην ομάδα της σιμβαστατίνης, σιμβαστατίνης/εζετιμίμπης και ροσουβαστατίνης, αντίστοιχα), και την ηλικία ($r = 0.34$, $p < 0.001$, $r = 0.35$, $p < 0.001$; $r = 0.35$, $p = 0.003$ στην ομάδα της σιμβαστατίνης, σιμβαστατίνης/εζετιμίμπης και ροσουβαστατίνης, αντίστοιχα). Σε πολυπαραγοντική ανάλυση μόνο η ηλικία παρέμεινε ανεξάρτητος προγνωστικός παράγοντας και στις τρεις ομάδες ($\beta = 0.33$, $p = 0.01$, $\beta = 0.33$, $p = 0.01$, $\beta = 0.33$, $p = 0.01$ στην ομάδα της σιμβαστατίνης, σιμβαστατίνης/εζετιμίμπης και ροσουβαστατίνης, αντίστοιχα).

Τα επίπεδα της oxLDL μειώθηκαν σημαντικά σε όλες τις θεραπευτικές ομάδες (41%, 40% και 39% στην ομάδα της σιμβαστατίνης, σιμβαστατίνης/εζετιμίμπης και ροσουβαστατίνης αντίστοιχα, $p < 0.001$ σε σύγκριση με τις αρχικές τιμές, $p = NS$ για τη σύγκριση ανάμεσα στις ομάδες) (Πίνακας 13).

Η μείωση των επιπέδων της oxLDL συσχετιζόταν θετικά με τη μείωση στα επίπεδα της LDL-C σε όλες τις ομάδες ($r = 0.51$, $p < 0.01$, $r = 0.52$, $p < 0.01$ και $r = 0.55$, $p < 0.01$ στην ομάδα της σιμβαστατίνης, σιμβαστατίνης/εζετιμίμπης και ροσουβαστατίνης, αντίστοιχα). Η μείωση των επιπέδων της oxLDL συσχετιζόταν θετικά με τα αρχικά επίπεδα της oxLDL ($r = 0.43$, $p < 0.01$, $r = 0.44$, $p < 0.01$, $r = 0.44$, $p < 0.01$ στην ομάδα της σιμβαστατίνης, σιμβαστατίνης/εζετιμίμπης και ροσουβαστατίνης, αντίστοιχα), τα αρχικά επίπεδα της apoB ($r = 0.33$, $p < 0.01$, $r = 0.33$, $p < 0.01$, $r = 0.33$, $p < 0.01$ στην ομάδα της σιμβαστατίνης, σιμβαστατίνης/εζετιμίμπης και ροσουβαστατίνης, αντίστοιχα) και τα αρχικά επίπεδα της LDL-C ($r = 0.30$, $p < 0.05$, $r = 0.30$, $p < 0.05$, $r = 0.30$, $p < 0.05$ στην ομάδα της σιμβαστατίνης, σιμβαστατίνης/εζετιμίμπης και ροσουβαστατίνης, αντίστοιχα). Στην πολυπαραγοντική ανάλυση μόνο τα αρχικά επίπεδα της oxLDL ($\beta = 0.48$, $p < 0.001$, $\beta = 0.53$, $p < 0.001$,

beta=0.58, $p < 0.001$ στην ομάδα της συμβασταίνης, συμβασταίνης/εξετιμίμπης και ροσουβασταίνης, αντίστοιχα) και τα αρχικά επίπεδα της apoB (beta=0.33, $p=0.02$, beta=0.33, $p=0.03$, beta=0.33, $p=0.02$ στην ομάδα της συμβασταίνης, συμβασταίνης/εξετιμίμπης και ροσουβασταίνης, αντίστοιχα) παρέμειναν σημαντικά.

Πίνακας 13. Επίδραση των υπολιπιδαιμικών φαρμάκων στα επίπεδα των 8-ισοπροστανίων και της oxLDL

Παράμετρος	Αρχικά	3 μήνες	Μεταβολή (%)
8-ισοπροστάνια, pg/mL			
Σιμβαστατίνη 40 mg	48 ± 10	43 ± 6	-10*
Σιμβαστατίνη/εζετιμίμπη 10/10 mg	49 ± 7	45 ± 8	-8*
Ροσουβαστατίνη 10 mg	51 ± 8	48 ± 8	-6*
oxLDL, U/L			
Σιμβαστατίνη 40 mg	86 ± 19	51 ± 11	-41 [‡]
Σιμβαστατίνη/εζετιμίμπη 10/10 mg	91 ± 19	55 ± 11	-40 [‡]
Ροσουβαστατίνη 10 mg	89 ± 19	54 ± 10	-39 [‡]

Οι τιμές εκφράζονται ως μέση τιμή ± σταθερή απόκλιση (mean ± standard Deviation [SD])

*p<0.05, †p<0.01 και ‡p<0.001 σε σύγκριση με τις αντίστοιχες τιμές πριν τη θεραπεία

oxLDL: oxidized low-density cholesterol, οξειδωμένη LDL

Επίδραση της υπολιπιδαιμικής αγωγής στην ενεργότητα, τη μάζα και την ειδική ενεργότητα της Lp-PLA₂ του πλάσματος

Η ενεργότητα και η μάζα της Lp-PLA₂ μειώθηκαν στατιστικά σημαντικά σε όλες τις θεραπευτικές ομάδες (36%, 31% και 38% και 36%, 32% και 32% στην ομάδα της συμβαστατίνης, συμβαστατίνης/εζετιμίμπης και ροσουβαστατίνης, αντίστοιχα, $p < 0.001$ σε σύγκριση με τις αρχικές τιμές, $p = NS$ για τη σύγκριση ανάμεσα στις ομάδες) (Πίνακας 14). Οι μεταθεραπευτικές αλλαγές στην ενεργότητα και μάζα της Lp-PLA₂ συσχετίζονταν ανεξάρτητα με τις αλλαγές στα επίπεδα της LDL-C σε όλες τις ομάδες (ενεργότητα της Lp-PLA₂: $r = 0.45$, $p < 0.05$, $r = 0.48$, $p < 0.01$ και $r = 0.46$, $p < 0.05$, μάζα της Lp-PLA₂: $r = 0.48$, $p < 0.05$, $r = 0.50$, $p < 0.05$ και $r = 0.51$, $p < 0.05$ στην ομάδα της συμβαστατίνης, συμβαστατίνης/εζετιμίμπης και ροσουβαστατίνης, αντίστοιχα).

Πίνακας 14. Επίδραση των υπολιπιδαιμικών φαρμάκων στην ενεργότητα και τη μάζα της Lp-PLA₂ του πλάσματος

Παράμετρος	Αρχικά	3 μήνες	Μεταβολή (%)
<i>Μάζα Lp-PLA₂ πλάσματος, μg/L</i>			
Σιμβαστατίνη 40 mg	397 ± 47	254 ± 30	-36 [‡]
Σιμβαστατίνη/εζετιμίμπη 10/10 mg	374 ± 62	253 ± 35	-32 [‡]
Ροσουβαστατίνη 10 mg	345 ± 52	235 ± 41	-32 [‡]
<i>Ενεργότητα Lp-PLA₂ πλάσματος, nmol/mL/min</i>			
Σιμβαστατίνη 40 mg	66 ± 14	42 ± 8	-36 [‡]
Σιμβαστατίνη/εζετιμίμπη 10/10 mg	65 ± 13	45 ± 9	-31 [‡]
Ροσουβαστατίνη 10 mg	66 ± 14	41 ± 9	-38 [‡]

Οι τιμές εκφράζονται ως μέση τιμή ± σταθερή απόκλιση (mean ± standard Deviation [SD]).

*p<0.05, †p<0.01 και ‡p<0.001 σε σύγκριση με τις αντίστοιχες τιμές πριν τη θεραπεία

Lp-PLA₂: lipoprotein-associated phospholipase A₂, λιποπρωτεϊνική φωσφολιπάση A₂

Ασφάλεια της αγωγής-ανεπιθύμητες ενέργειες

Κανένας από τους ασθενείς δεν διέκοψε τη μελέτη. Η συμμόρφωση στη θεραπεία ήταν >80% σε όλους τους ασθενείς, χωρίς διαφορές ανάμεσα στις ομάδες. Και τα τρία θεραπευτικά σχήματα ήταν καλά ανεκτά σε όλη τη διάρκεια της μελέτης. Κανένας ασθενής δεν εμφάνισε αύξηση των ηπατικών ενζύμων(>3 φορές ULN) ή της φωσφοκινάσης της κρεατίνης (> 5-10 φορές ULN). Κανένας ασθενής δεν ανέφερε μυϊκούς πόνους ή άλλες ανεπιθύμητες ενέργειες.

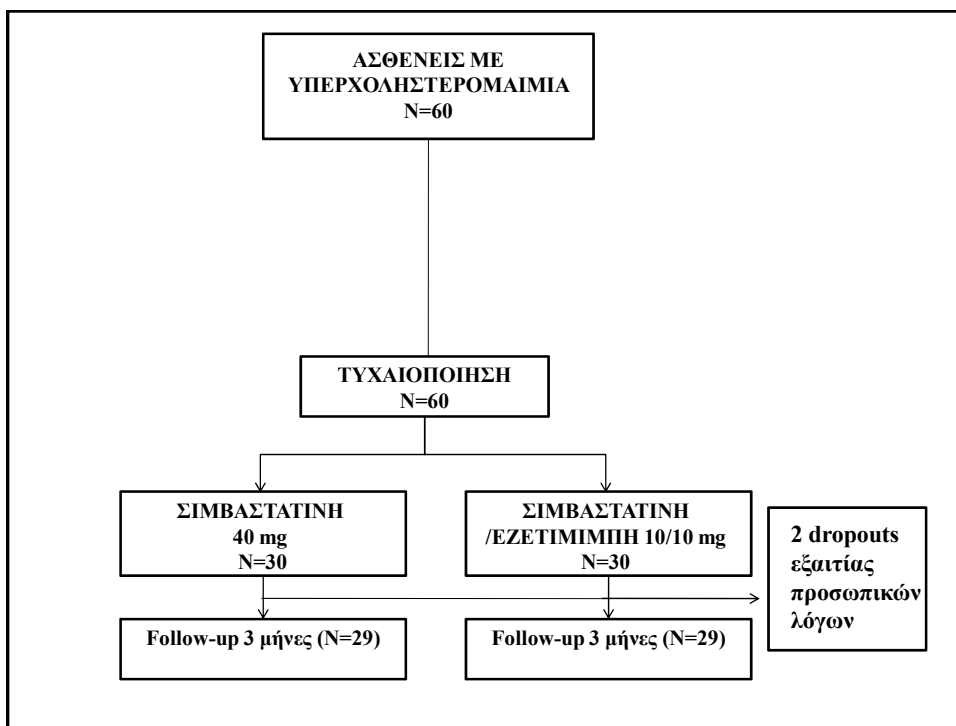
Πρωτόκολλο 2

Γενικά

Στη μελέτη συμμετείχαν 90 άτομα, 60 υπερχοληστερολαιμικοί ασθενείς οι οποίοι τυχαιοποιήθηκαν να πάρουν θεραπεία με 1) σιμβαστατίνη 40 mg και σε 2) σιμβαστατίνη/εζετιμίμπη 10/10 mg για 3 μήνες και 30 άτομα με φυσιολογικά επίπεδα λιπιδίων σταθμισμένα ως προς την ηλικία, το φύλο και το βάρος που αποτέλεσαν την ομάδα ελέγχου (Εικόνα 22). Τα χαρακτηριστικά των ατόμων της μελέτης φαίνονται στον Πίνακα 15. Δεν υπήρχαν στατιστικά σημαντικές διαφορές ανάμεσα στις ομάδες υπερχοληστερολαιμικών ασθενών.

Σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου οι υπερχοληστερολαιμικοί ασθενείς είχαν αυξημένα επίπεδα TC, LDL-C και apoB. Οι τιμές του βάρους, της περιμέτρου μέσης και της αρτηριακής πίεσης δεν μεταβλήθηκαν σε καμία ομάδα μετά το πέρας της θεραπείας.

Τα επίπεδα των TC, LDL- C και apoB levels μειώθηκαν στατιστικά σημαντικά και στις 2 ομάδες θεραπείας, χωρίς διαφορά μεταξύ των ομάδων. Οι υπερχοληστερολαιμικοί ασθενείς είχαν μεγαλύτερα προθεραπευτικά επίπεδα ox-LDL σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου (Πίνακας 15). Τα αρχικά επίπεδα oxLDL συσχετίζονταν θετικά με τα αρχικά επίπεδα της TC ($r=0.47$, $p<0.001$), της LDL-C ($r=0.515$, $p<0.001$) και της apoB ($r=0.566$, $p<0.001$). Παρομοίως, ο λόγος ox-LDL/apoB ήταν σημαντικά υψηλότερος και στις 2 θεραπευτικές ομάδες σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου (Πίνακας 15). Τα επίπεδα oxLDL μειώθηκαν στατιστικά σημαντικά μετά από 3 μήνες θεραπείας και στις 2 θεραπευτικές ομάδες, χωρίς διαφορά μεταξύ τους ($p<0.001$ και για τις 2 θεραπευτικές ομάδες σε σύγκριση με τις αρχικές τιμές) (Πίνακας 15).



Εικόνα 22. Διάγραμμα ροής των ασθενών της μελέτης

Πίνακας 15. Δημογραφικά, ανθρωπομετρικά και βιοχημικά χαρακτηριστικά των ασθενών πριν και μετά τη θεραπεία και της ομάδας ελέγχου

	Ομάδα Ελέγχου (n=30)	Σιμβασατατίνη (n=30)		Σιμβασατατίνη/Εξετιμίμπτη (n=30)	
		Αρχικά	3 μήνες	Αρχικά	3 μήνες
TC (mg/dL)	160 ± 35	260 ± 45*	179 ± 35 [†]	271 ± 35*	171 ± 21 [†]
TG (mg/dL)	101 (45- 140)	112 (58-129)	106 (58-132)	119 (67-142)	108 (48-147)
HDL-C (mg/dL)	60 ± 10	60 ± 12	60 ± 11	61 ± 14	59 ± 11
LDL-C (mg/dL)	101 ± 20	174 ± 41*	96 ± 33 [†]	179 ± 26*	91 ± 15 [†]
ApoA1 (mg/dL)	161 ± 19	161 ± 25	161 ± 19	160 ± 30	163 ± 25
ApoB (mg/dL)	72 ± 21	113 ± 32*	71 ± 23 [†]	124 ± 20*	71 ± 13 [†]
ApoE (mg/dL)	40 ± 8	43 ± 10	39 ± 8	47 ± 13	38 ± 11
Lp(a) (mg/dL)	7.0 (2.4-40.4)	7.5 (2.3-21.3)	7.3 (2.4-35.4)	4.7 (2.4-54.1)	5.1 (2.4-63.1)
OxLDL (U/L)	42.5 ± 13.8	87.0 ± 26*	56.4 ± 22.5 [†]	97.2 ± 23.8*	59.2 ± 18.1 [†]

Ox-LDL/ΑροΒ (U/mg)	0.05 ± 0.01	0.08 ± 0.03*	0.07 ± 0.02*	0.08 ± 0.02*	0.08 ± 0.01*
--------------------	-------------	--------------	--------------	--------------	--------------

Οι τιμές εκφράζονται ως μέση τιμή ± σταθερή απόκλιση (mean ± standard Deviation [SD]), εκτός από τα τριγλυκερίδια και την λιποπρωτεΐνη α [lipoprotein (a), Lp(a)] που δεν ακολουθούν κανονική κατανομή και εκφράζονται ως διάμεση τιμή (εύρος).

*p<0.05 σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου και †p<0.001 σε σύγκριση με τις αντίστοιχες τιμές πριν τη θεραπεία.

Αρο: apolipoprotein, απολιποπρωτεΐνη, BMI: body mass index, δείκτης μάζας σώματος, TC: total cholesterol, ολική χοληστερόλη, LDL-C: low density lipoprotein cholesterol, χοληστερόλη των υψηλής πυκνότητας λιποπρωτεϊνών, TG: triglycerides, τριγλυκερίδια, HDL-C: high density lipoprotein cholesterol, χοληστερόλη των υψηλής πυκνότητας λιποπρωτεϊνών, ox-LDL: oxidized LDL, οξειδωμένη LDL.

Για τη μετατροπή των επιπέδων της χοληστερόλης από mg/dL σε mmol/L πολλαπλασιάζουμε με 0.0259. Για τη μετατροπή των τριγλυκεριδίων από mg/dL σε mmol/L πολλαπλασιάζουμε με 0.011

Επίδραση της υπολιπιδαιμικής αγωγής στη μεμβρανική έκφραση των TLR2 και TLR4 σε μονοκύτταρα ολικού αίματος

Η μεμβρανική έκφραση των υποδοχέων TLR2 και TLR4 στα μονοκύτταρα και στις δύο θεραπευτικές ομάδες (εκφραζόμενη ως MFI) καθώς και ως % ποσοστό των CD14-θετικών μονοκυττάρων που εκφράζουν τον TLR2 και τον TLR4 (%Gated)] ήταν σημαντικά μεγαλύτερη σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου (Πίνακας 16).

Τόσο η σιμβαστατίνη 40 mg όσο και ο συνδυασμός σιμβαστατίνης/εζετιμίμπης 10/10 mg για 3 μήνες μείωσαν στατιστικά σημαντικά την έκφραση των TLR2 και TLR4, χωρίς στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ τους. Τα μεταθεραπευτικά επίπεδα των TLR2 και TLR4 δεν διέφεραν από τα αντίστοιχα της ομάδας ελέγχου (Πίνακας 16) (Εικόνα 23, 24).

Η προθεραπευτική έκφραση των TLR2 και TLR4 συσχετιζόταν θετικά με τα προθεραπευτικά επίπεδα της oxLDL ($r=0.470$ και $r=0.490$, αντίστοιχα, $p<0.01$) και με το λόγο oxLDL/apoB ($r=0.410$ και $r=0.420$, αντίστοιχα, $p<0.05$).

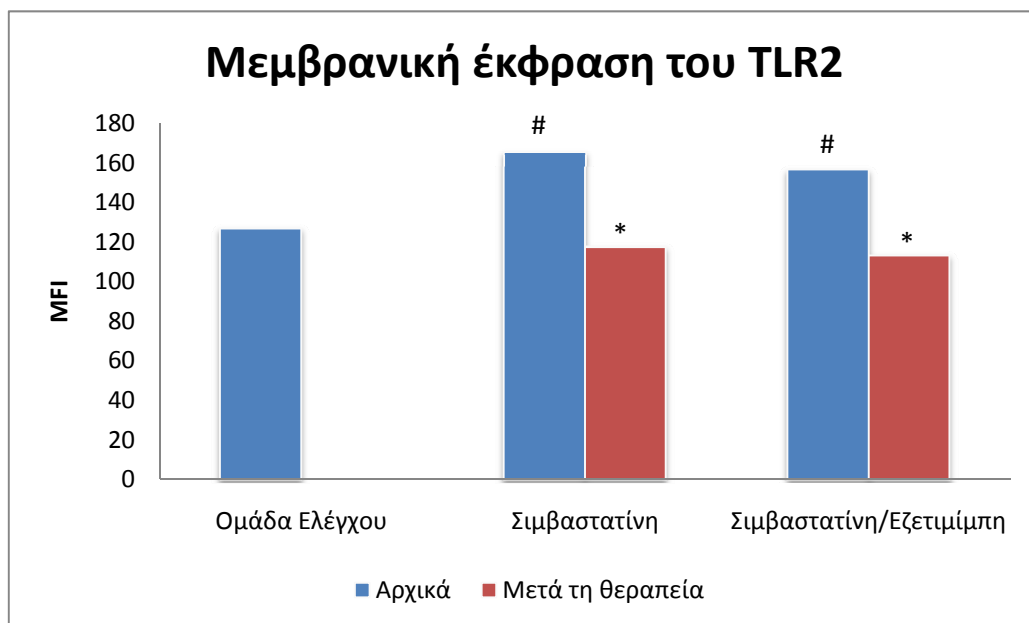
Πίνακας 16. Μεμβρανική έκφραση των TLR2, TLR4 σε μονοκύτταρα υπερχοληστερολαιμικών ασθενών και της ομάδας ελέγχου

	Ομάδα Ελέγχου	Σιμβασατατίνη 40 mg		Σιμβασατατίνη/Εξεπιμίπη 10/10 mg	
		Αρχικά	3 μήνες	Αρχικά	3 μήνες
TLR2 (MFI)	126.9 ± 34.5	165.6 ± 30.0*	117.5 ± 29.0 [‡]	156.5 ± 22.7*	113.2 ± 32.1 [‡]
TLR2/CD14 (%)	60 ± 12	84 ± 12*	59 ± 9.0 [‡]	79 ± 13*	55 ± 14 [‡]
TLR4 (MFI)	41.9 ± 10.9	67.5 ± 13.4*	50.9 ± 12.6 [‡]	64.9 ± 14.9*	48.4 ± 14.0 [‡]
TLR4/CD14 (%)	66 ± 13	82 ± 16*	65 ± 12 [‡]	89 ± 10*	67 ± 11 [‡]

Οι τιμές εκφράζονται ως μέση τιμή ± σταθερή απόκλιση (mean ± standard Deviation [SD]).

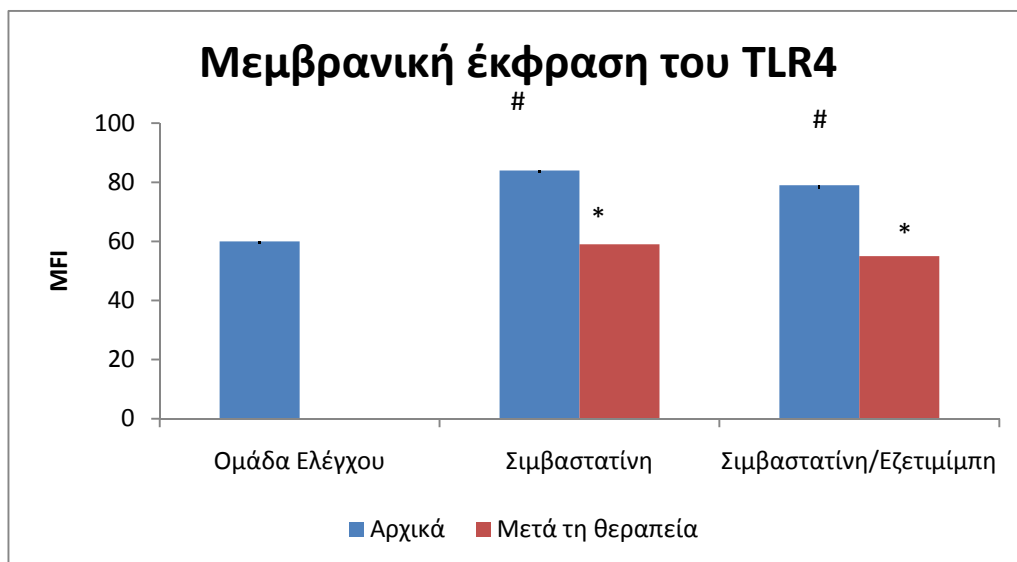
* $p < 0.02$ σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου, [‡] $p < 0.01$ σε σύγκριση με τις αντίστοιχες τιμές πριν τη θεραπεία.

MFI: mean fluorescence intensity, μέση ένταση φθορισμού, TLR: toll like receptors, υποδοχείς τύπου toll



Εικόνα 23. Η μεμβρανική έκφραση του TLR2 στα μονοκύτταρα υπερχοληστερολαιμικών ασθενών πριν και μετά από 3 μήνες θεραπείας και στην ομάδα ελέγχου

$p < 0.05$ σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου , * $p < 0.01$ σε σύγκριση με τις αρχικές τιμές



Εικόνα 24. Η μεμβρανική έκφραση του TLR4 στα μονοκύτταρα υπερχοληστερολαιμικών ασθενών πριν και μετά από 3 μήνες θεραπείας και στην ομάδα ελέγχου

$p < 0.05$ σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου , * $p < 0.01$ σε σύγκριση με τις αρχικές τιμές

Επίδραση της υπολιπιδαιμικής αγωγής στα επίπεδα των ενδοκυττάρων κυτταροκινών IL-6 και IL-1β σε μονοκύτταρα ολικού αίματος με χρήση κυτταρομετρίας ροής

Τα προθεραπευτικά ενδοκυττάρια επίπεδα της IL-6 και της IL-1β σε μη διεγερμένα μονοκύτταρα δεν διέφεραν ανάμεσα στην ομάδα ελέγχου και στις ομάδες των υπερχοληστερολαιμικών ασθενών (Πίνακας 17).

Μετά την ενεργοποίηση με LPS, τα ενδοκυττάρια επίπεδα της IL-6 και της IL-1β αυξήθηκαν στατιστικά σημαντικά σε όλες τις ομάδες (Πίνακας 17).

Τα ενδοκυττάρια επίπεδα της IL-6 και της IL-1β σε διεγερμένα μονοκύτταρα ήταν στατιστικά σημαντικά χαμηλότερα και στις δύο θεραπευτικές ομάδες σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου (Πίνακας 17).

Τα προθεραπευτικά ενδοκυττάρια επίπεδα της IL-6 και της IL-1β σε διεγερμένα μονοκύτταρα συσχετιζόνταν αρνητικά με τα προθεραπευτικά επίπεδα της oxLDL levels ($r = -0.331$ και $r = -0.340$, $p < 0.026$), όπως και με το λόγο oxLDL/apoB ($r = 0.300$ και $r = 0.310$, $p < 0.05$).

Οι υπολιπιδαιμικές θεραπείες δεν είχαν καμία επίδραση στα ενδοκυττάρια επίπεδα της IL-6 και της IL-1β σε μη διεγερμένα μονοκύτταρα (Πίνακας 17).

Σε διεγερμένα μονοκύτταρα και οι δύο θεραπείες μείωσαν στατιστικά σημαντικά τα ενδοκυττάρια επίπεδα της IL-6 και της IL-1β σε σύγκριση με τις αρχικές τιμές, χωρίς διαφορά ανάμεσα στις δύο θεραπευτικές ομάδες (Πίνακας 17) (Εικόνα 25, 26).

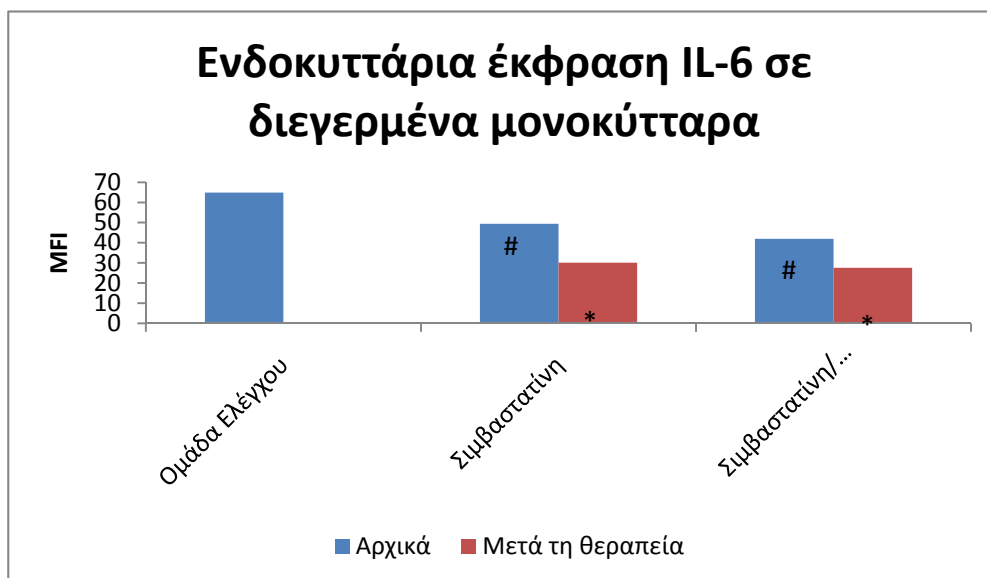
Πίνακας 17. Ενδοκυττάρια έκφραση της IL-6 και της IL-1β, πριν και μετά από ενεργοποίηση με LPS σε υπερχοληστερολαιμικούς ασθενείς και στην ομάδα ελέγχου

	Ομάδα Ελέγχου		Σιμβαστατίνη 40 mg				Σιμβαστατίνη/Εξετιμίπη 10/10 mg			
	Μη διεγερμένα μονοκύτταρα	Διεγερμένα μονοκύτταρα	Μη διεγερμένα		Διεγερμένα μονοκύτταρα		Μη διεγερμένα		Διεγερμένα μονοκύτταρα	
			Αρχικά	3 μήνες	Αρχικά	3 μήνες	Αρχικά	3 μήνες	Αρχικά	3 μήνες
IL-6 (MFI)	10.8±4.3	64.9±20.7 [#]	12.3±2.6	13.1±4.4	49.4±16.3 ^{**}	30.1±12.9 [‡]	11.1±5.2	10.4±3.8	41.9±17.1 ^{**†}	27.6±13.2 [‡]
IL-6/CD14 (%)	6.3±2.1	44.1±11.3 [#]	5.8±1.9	6.1±2.5	31.3±10.1 ^{**}	19.4±9.5 [‡]	6.4±2.4	6.0±1.5	28.1±9.9 ^{**†}	16.5±7.8 [‡]
IL-1β (MFI)	18.0±6.0	115.9±30.6 [#]	19.9±8.5	24.6±8.8	69.4±26.4 ^{**}	44.7±19.9 [‡]	20.5±8.7	22.4±9.8	58.8±25.6 ^{**†}	36.4±17.1 [‡]
IL-1β/CD14 (%)	16.2±5.1	79.1±20.0 [#]	18.1±6.4	20.5±7.3	60.0±17.8 ^{**}	38.1±12.9 [‡]	19.3±9.4	17.4±8.6	57.5±14.5 ^{**†}	35.2±10.2 [‡]

Οι τιμές εκφράζονται ως μέση τιμή ± σταθερή απόκλιση (mean ± standard Deviation [SD]).

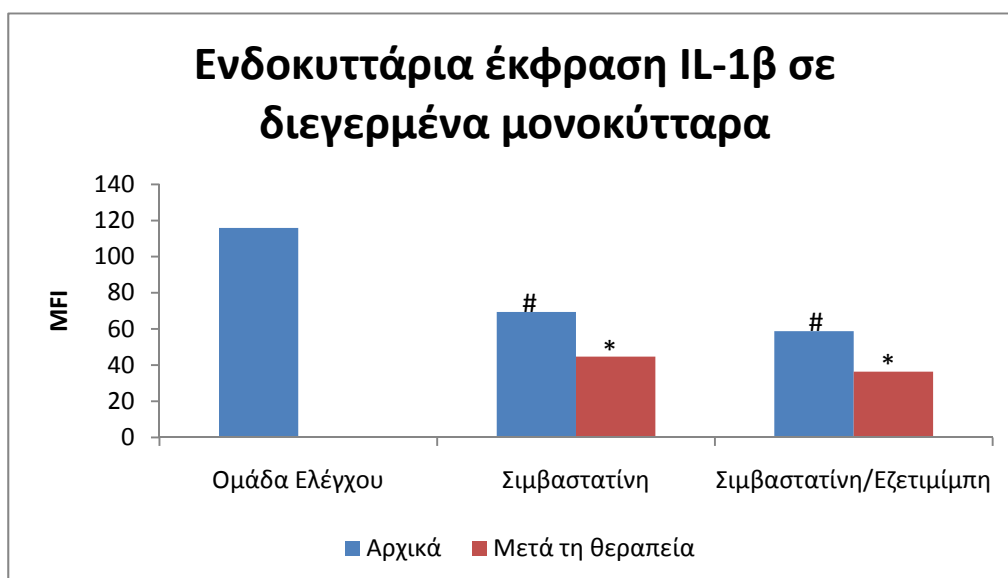
[#]p<0.001 σε σύγκριση με μη διεγερμένα μονοκύτταρα της ομάδας ελέγχου, *p<0.01 σε σύγκριση με μη διεγερμένα μονοκύτταρα της ίδιας ομάδας, [†]p<0.01 σε σύγκριση με διεγερμένα μονοκύτταρα της ομάδας ελέγχου, [‡]p<0.05 σε σύγκριση με τις αρχικές τιμές διεγερμένων μονοκυττάρων της ίδιας ομάδας.

IL-6: interleukin 6, IL-1β: interleukin 1β, ιντερλευκίνη 1β, MFI: mean fluorescence intensity, μέση ένταση φθορισμού.



Εικόνα 25. Ενδοκυττάρια παραγωγή IL-6 σε διεγερμένα μονοκύτταρα υπερχοληστερολαιμικών ασθενών πριν και μετά τη θεραπεία και στην ομάδα ελέγχου

[#] $p < 0.01$ σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου * $p < 0.05$ σε σύγκριση με τις αρχικές τιμές



Εικόνα 26. Ενδοκυττάρια παραγωγή IL-1β σε διεγερμένα μονοκύτταρα υπερχοληστερολαιμικών ασθενών πριν και μετά τη θεραπεία και στην ομάδα ελέγχου

[#] $p < 0.01$ σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου * $p < 0.05$ σε σύγκριση με τις αρχικές τιμές

Ασφάλεια της αγωγής-ανεπιθύμητες ενέργειες

Η συμμόρφωση στη θεραπεία ήταν >80% σε όλους τους ασθενείς, χωρίς διαφορές ανάμεσα στις ομάδες. Και τα δύο θεραπευτικά σχήματα ήταν καλά ανεκτά σε όλη τη διάρκεια της μελέτης. Κανένας ασθενής δεν εμφάνισε αύξηση των ηπατικών ενζύμων(> 3 φορές ULN) ή της φωσφοκινάσης της κρεατίνης (> 5-10 φορές ULN). Κανένας ασθενής δεν ανέφερε μυϊκούς πόνους ή άλλες ανεπιθύμητες ενέργειες. Δύο ασθενείς αποσύρθηκαν από τη μελέτη για προσωπικούς λόγους.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Πρωτόκολλο 1

Επίδραση της συμβαστατίνης, του συνδυασμού συμβαστατίνης/εζετιμίμπης και της ροσουβαστατίνης στο μεταβολισμό της γλυκόζης

Η παρούσα μελέτη είναι η πρώτη μελέτη που συνέκρινε τις επιδράσεις της συμβαστατίνης 40 mg, του συνδυασμού συμβαστατίνης με εζετιμίμπη 10/10 mg και της ροσουβαστατίνης 10 mg στο μεταβολισμό της γλυκόζης. Στην μελέτη μας και οι τρεις θεραπευτικές προσεγγίσεις οδήγησαν σε παρόμοια αύξηση του δείκτη HOMA-IR και των επιπέδων ινσουλίνης σε σύγκριση με τις αρχικές τιμές σε ασθενείς με υπερχοληστερολαιμία.

Μεγάλες κλινικές μελέτες καθώς και μετα-αναλύσεις έδειξαν ότι η θεραπεία με στατίνες πιθανόν συσχετίζεται με ανεπιθύμητες ενέργειες στο μεταβολισμό της γλυκόζης (350, 352, 454-456). Ωστόσο, φαίνεται ότι η επίδραση στο μεταβολισμό της γλυκόζης εξαρτάται από το είδος της στατίνης (351, 456).

Στη μελέτη JUPITER 17802 ασθενείς με LDL-C<130 mg/dL και hsCRP>2 mg/L τυχαιοποιήθηκαν να πάρουν θεραπεία με ροσουβαστατίνη 20 mg ή εικονικό φάρμακο (350). Μετά από 1.9 έτη παρακολούθησης, η ροσουβαστατίνη μείωσε στατιστικά σημαντικά το πρωτεύον καταληκτικό σημείο (OEM, ΑΕΕ, επέμβαση επαναγγείωσης, νοσηλεία για ασταθή στηθάγχη ή θάνατο από καρδιαγγειακά αίτια) κατά 44%. Ωστόσο, η θεραπεία με ροσουβαστατίνη συσχετίστηκε με σημαντική αύξηση στην επίπτωση νεοεμφανιζόμενου διαβήτη σε σύγκριση με την ομάδα του εικονικού φαρμάκου (350). Σε παλαιότερη μελέτη της ερευνητικής μας ομάδας έχουμε δείξει ότι η ροσουβαστατίνη σε υπερχοληστερολαιμικούς προδιαβητικούς ασθενείς οδήγησε σε δοσοεξαρτώμενη αύξηση του δείκτη HOMA-IR και των επιπέδων της ινσουλίνης (457, 458). Μια πρόσφατα δημοσιευμένη μελέτη έδειξε ότι η ροσουβαστατίνη σε δόση 40 mg ημερησίως για 6 εβδομάδες αύξησε στατιστικά σημαντικά τα επίπεδα της ινσουλίνης σε σύγκριση με τις αρχικές τιμές (459). Ωστόσο, άλλες μελέτες δεν έχουν δείξει σημαντική συσχέτιση της θεραπείας με ροσουβαστατίνη με ανεπιθύμητες ενέργειες στο μεταβολισμό της γλυκόζης (460-462). Επιπλέον, μια άλλη μελέτη αξιολόγησε την επίδραση της θεραπείας με ροσουβαστατίνη 10 mg ή με ατορβαστατίνη 20 mg καθημερινά στο μεταβολισμό της

γλυκόζης σε μη διαβητικούς υπερχοληστερολαιμικούς ασθενείς για 12 εβδομάδες. Σε αυτή τη μελέτη η ροσουβαστατίνη μείωσε στατιστικά σημαντικά το δείκτη HOMA-IR και τα επίπεδα της ινσουλίνης σε σύγκριση με τις αρχικές τιμές και την ομάδα της ατορβαστατίνης (462).

Τα δεδομένα όσον αφορά την επίδραση της σιμβαστατίνης στο μεταβολισμό της γλυκόζης είναι αντικρουόμενα. Αναδρομική ανάλυση της μελέτης HPS (Heart Protection Study) έδειξε ουδέτερη επίδραση της θεραπείας με σιμβαστατίνη 40 mg στην επίπτωση νεοεμφανιζόμενου διαβήτη σε σύγκριση με το εικονικό φάρμακο (463). Παρομοίως, τα αποτελέσματα της μελέτης PIOSTAT (PIOglitazone and STATin) συνηγορούν υπέρ μιας ουδέτερης επίδρασης της σιμβαστατίνης στο μεταβολισμό της γλυκόζης (464). Σε μια τυχαιοποιημένη μελέτη σε προδιαβητικούς υπέρβαρους υπερχοληστερολαιμικούς ασθενείς, η σιμβαστατίνη δεν μετέβαλλε τα επίπεδα του δείκτη HOMA-IR (465). Αντίθετα, κάποιες μελέτες έχουν δείξει αρνητική επίδραση της θεραπείας με σιμβαστατίνη στο μεταβολισμό της γλυκόζης σε μη διαβητικούς υπερχοληστερολαιμικούς ασθενείς (466, 467). Μία πρόσφατη μετα-ανάλυση αξιολόγησε την επίδραση διαφορετικών στατινών στο μεταβολισμό της γλυκόζης σε 1146 ασθενείς και έδειξε ότι η σιμβαστατίνη ενδέχεται να επιδεινώνει την αντίσταση στην ινσουλίνη (456).

Ο μηχανισμός μέσω του οποίου οι στατίνες ασκούν τις επιδράσεις τους στον μεταβολισμό της γλυκόζης δεν είναι γνωστός. Φαίνεται ότι οι επιδράσεις αυτές οφείλονται κατά κύριο λόγο στην επαγόμενη από τις στατίνες αναστολή της παραγωγής διαφόρων μεταβολικών προϊόντων στην οδό του μεβαλονικού οξέος, όπως τα ισοπρενοϊδή (FPP ή GGPP). Τα ισοπρενοϊδή επάγουν την έκφραση της μεμβρανικής πρωτεΐνης GLUT4 (membrane transport protein glucose transporter 4) σε 3T3-L1 λιποκύτταρα, συμβάλλοντας έτσι στην πρόσληψη της γλυκόζης από τα λιποκύτταρα (468). Επιπλέον, πιθανόν οι μικρές GTP πρωτεΐνες δρουν ρυθμιστικά στην επαγόμενη από τη γλυκόζη έκκριση της ινσουλίνης από τα β-κύτταρα των νησιδίων του παγκρέατος (469). Οι στατίνες, αναστέλλοντας την HMG-CoA αναγωγή, μειώνουν την παραγωγή των ισοπρενοϊδών και επακόλουθα τις μικρές GTP πρωτεΐνες.

Ωστόσο, η λιπόφιλη φύση ορισμένων στατινών ενδέχεται να επηρεάζει τις επιδράσεις τους στο μεταβολισμό των υδατανθράκων. Συγκεκριμένα, έχει προταθεί ότι οι λιπόφιλες στατίνες αναστέλλουν την επαγόμενη από τη γλυκόζη ενεργοποίηση και τη σηματοδότηση των διαύλων ασβεστίου τύπου L και την έκκριση της ινσουλίνης από τα β-κύτταρα (470). Ωστόσο, αυτό φαίνεται αντίθετο με τις αρνητικές επιδράσεις της ροσουβαστατίνης, η οποία

είναι ένα υδρόφιλο μόριο. Οι Freeman και συν. κατέδειξαν τον προστατευτικό ρόλο της πραβαστατίνης, μιας υδρόφιλης στατίνης, στην εμφάνιση διαβήτη σε μία post-hoc ανάλυση της μελέτης WOSCOPS (351). Στην πολυπαραγοντική ανάλυση (multivariate Cox model), τα αρχικά επίπεδα του BMI, των TG και της γλυκόζης ήταν σημαντικοί προγνωστικοί παράγοντες για την εμφάνιση σακχαρώδη διαβήτη. Η θεραπεία με πραβαστατίνη παρέμεινε, επίσης, σημαντικός προγνωστικός παράγοντας (multivariate HR=0.70, 95% CI: 0.50-0.99, p=0.042) (351).

Στην παρούσα μελέτη δεν παρατηρήθηκε καμία διαφορά ανάμεσα στη θεραπεία με σιμβαστατίνη 40 mg και με ροσουβαστατίνη 10 mg ημερησίως στους δείκτες του μεταβολισμού της γλυκόζης.

Όπως αναφέρθηκε, η εξετιμίμπη μειώνει την εντερική απορρόφηση της χοληστερόλης, αναστέλλοντας την πρωτεΐνη NPC1L1. Η χορήγηση της εξετιμίμπης φαίνεται ότι μπορεί να έχει ευνοϊκές επιδράσεις στην αντίσταση στην ινσουλίνη, όπως υποστηρίζουν μελέτες σε ζωικά μοντέλα, αλλά και σε ανθρώπους (109, 436, 446, 447). Οι Hiramitsu et al. έδειξαν ότι η χορήγηση εξετιμίμπης σε υπερχοληστερολαιμικούς Ιάπωνες ασθενείς μείωσε στατιστικά σημαντικά τα επίπεδα της ινσουλίνης και της HbA_{1c}, ενώ αύξησε τα επίπεδα της αδιπονεκτίνης, μιας ορμόνης που συσχετίζεται αρνητικά με την εμφάνιση αντίστασης στην ινσουλίνη (447). Σε μια πρόσφατα δημοσιευμένη μελέτη, η εξετιμίμπη μείωσε σημαντικά τα επίπεδα του δείκτη HOMA-IR σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου (446). Έτσι, φαίνεται ότι ο συνδυασμός της εξετιμίμπης με μία στατίνη μπορεί να αντισταθμίσει τις ενδεχομένως αρνητικές επιδράσεις των στατινών στο μεταβολισμό της γλυκόζης. Οι Dagli et al. έδειξαν ότι ο συνδυασμός χαμηλής δόσης πραβαστατίνης (10 mg/ημερησίως) με εξετιμίμπη (10 mg) οδήγησε σε σημαντική μείωση της αντίστασης στην ινσουλίνη σε σύγκριση με τη θεραπεία με υψηλή δόση πραβαστατίνης (40 mg) (448). Αντίθετα, οι Her et al έδειξαν ότι ο συνδυασμός ατορβαστατίνης 5 mg με εξετιμίμπη 5 mg δεν επηρέασε τα επίπεδα του δείκτη HOMA-IR, της ινσουλίνης ή της HbA_{1c} σε σύγκριση με ατορβαστατίνη 20 mg ή ροσουβαστατίνη 10 mg ημερησίως για 8 εβδομάδες σε 90 υπερχοληστερολαιμικούς ασθενείς. Σε αυτήν τη μελέτη, παρατηρήθηκε μια μικρή, ωστόσο στατιστικά σημαντική, αύξηση στα επίπεδα της HbA_{1c} στην ομάδα της μονοθεραπείας με ατορβαστατίνη (461). Παρομοίως, σε μία άλλη κλινική μελέτη σε προδιαβητικούς υπερχοληστερολαιμικούς ασθενείς, ο συνδυασμός σιμβαστατίνης με εξετιμίμπη δεν επέφερε καμία επίδραση σε παραμέτρους του μεταβολισμού της γλυκόζης (471). Ειδικότερα, δεν παρατηρήθηκε καμία αλλαγή του δείκτη HOMA-IR καθώς και της περιοχής κάτω από την καμπύλη (area under

the curve, AUC) των επιπέδων της ινσουλίνης και της αδιπονεκτίνης τόσο στην ομάδα που έλαβε μονοθεραπεία με συμβαστατίνη 20 mg όσο και στην ομάδα που πήρε θεραπεία συνδυασμού συμβαστατίνης 20 mg με εζετιμίμη 10 mg (471).

Στη μελέτη μας δεν παρατηρήσαμε καμία στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στις ομάδες της μονοθεραπείας με στατίνη και στην ομάδα του συνδυασμού συμβαστατίνης με εζετιμίμη.

Επίδραση της συμβαστατίνης, του συνδυασμού συμβαστατίνης/εζετιμίμης και της ροσουβαστατίνης στο μεταβολισμό του ουρικού οξέος, των ηλεκτρολυτών και σε παραμέτρους της νεφρικής λειτουργίας

Η παρούσα μελέτη είναι η πρώτη μελέτη που συνέκρινε τις επιδράσεις της συμβαστατίνης 40 mg, του συνδυασμού συμβαστατίνης με εζετιμίμη 10/10 mg και της ροσουβαστατίνης 10 mg στα επίπεδα του ουρικού οξέος. Στην μελέτη μας και οι τρεις θεραπευτικές προσεγγίσεις πέτυχαν παρόμοια μείωση των επιπέδων του ουρικού οξέος σε ασθενείς με υπερχοληστερολαιμία.

Πρόσφατες επιδημιολογικές μελέτες έδειξαν μια ανεξάρτητη συσχέτιση ανάμεσα στα αυξημένα επίπεδα ουρικού οξέος στον ορό και τον καρδιαγγειακό κίνδυνο (472-474). Η αιτιολογική σχέση ανάμεσα στα επίπεδα του ουρικού οξέος και τον καρδιαγγειακό κίνδυνο πρώτη φορά υποστηρίχθηκε από μια post-hoc ανάλυση της μελέτης LIFE (Losartan Intervention For Endpoint reduction) (473). Σε αυτή την ανάλυση, τα επίπεδα του ουρικού οξέος συσχετίστηκαν σημαντικά με τα καρδιαγγειακά συμβάματα ($p < 0.0001$), κυριότερα στις γυναίκες. Επιπλέον, υπάρχουν στοιχεία που υποστηρίζουν ότι η μείωση του ουρικού οξέος ενδέχεται να συνεισφέρει στη μείωση του καρδιαγγειακού κινδύνου (473). Στη μελέτη LIFE το 29% της υπεροχής της λοσαρτάνης σε σύγκριση με την ατενολόλη στο πρωτεύον καταληκτικό σημείο της μελέτης αποδόθηκε στη μείωση των επιπέδων του ουρικού οξέος (473). Άλλες μελέτες έχουν δείξει ότι τα επίπεδα του ουρικού οξέος αποτελούν ανεξάρτητο παράγοντα καρδιαγγειακού κινδύνου και μπορεί να έχουν και προγνωστική αξία (472, 474). Αν και οι ακριβείς παθοφυσιολογικοί μηχανισμοί μέσω των οποίων το ουρικό οξύ συμμετέχει στην παθογένεση της αθηροσκλήρωσης δεν είναι γνωστοί, η υπερουριχαιμία από μόνη της φαίνεται ότι διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην ενδοθηλιακή δυσλειτουργία, την προσκόλληση των αιμοπεταλίων και στο οξειδωτικό stress (475, 476).

Οι στατίνες επιδρούν στα επίπεδα του ουρικού οξέος ανεξάρτητα από τις υπολιπιδαιμικές τους ιδιότητες, και αυτή η δράση συμπεριλαμβάνεται στις πλειότερες τους δράσεις (477). Ωστόσο, δεν γνωρίζουμε αν όλες οι στατίνες επιφέρουν τις ίδιες επιδράσεις στα επίπεδα του ουρικού οξέος. Η ατορβαστατίνη φαίνεται από πολλές μελέτες ότι έχει υποουριχαιμική δράση, διαμέσου της αύξησης της κλασματικής απέκκρισης του ουρικού οξέος (472, 478-480). Στη μελέτη GREACE, σε ασθενείς με στεφανιαία νόσο, η χορήγηση ατορβαστατίνης συσχετίστηκε με σημαντική μείωση του ουρικού οξέος ($p < 0.0001$). Κάθε 1 mg/dL μείωση των επιπέδων του ουρικού οξέος συσχετίστηκε με μείωση του HR=0.76 (95% CI: 0.62-0.89; $p=0.001$) των καρδιαγγειακών συμβαμάτων (472). Ωστόσο, σε αυτή τη μελέτη η ατορβαστατίνη βελτίωσε σημαντικά την νεφρική λειτουργία. Σε μία πρόσφατα δημοσιευμένη post-hoc ανάλυση της μελέτης ATTEMPT (Assessing The Treatment Effect in Metabolic syndrome without Perceptible diabetes), σε 1123 άτομα με υπερχοληστερολαιμία και μεταβολικό σύνδρομο, η θεραπεία με ατορβαστατίνη μείωσε σημαντικά τα επίπεδα του ουρικού οξέος κατά 5.6%, ενώ αύξησε το eGFR κατά 3.5% (481).

Τα στοιχεία για την επίδραση των άλλων στατινών στα επίπεδα του ουρικού οξέος δεν είναι σαφή (479, 482, 483). Σε μία πρόσφατα δημοσιευμένη μελέτη, που είχε ως σκοπό να δείξει τη μη-ανωτερότητα της πιταβαστατίνης 2 mg έναντι της ατορβαστατίνης 10 mg και της ροσουβαστατίνης 2.5 mg στην ασφάλεια και στη μείωση των επιπέδων της LDL-C, η ατορβαστατίνη και η ροσουβαστατίνη μείωσαν σημαντικά τα επίπεδα του ουρικού οξέος σε σύγκριση με τις αρχικές τιμές (από 5.2 ± 1.2 mg/dL σε 5.0 ± 1.1 mg/dL και από 5.4 ± 1.5 mg/dL σε 5.2 ± 1.5 mg/dL, $p < 0.05$, αντίστοιχα) (480). Στη μελέτη ATOROS (ATORvastatin and ROSuvastatin), η χορήγηση ατορβαστατίνης για 24 εβδομάδες συγκρίθηκε με τη χορήγηση ροσουβαστατίνης σε ασθενείς με υπερχοληστερολαιμία. Σε αυτή τη μελέτη οι παράμετροι της νεφρικής λειτουργίας δεν επηρεάστηκαν σε καμία ομάδα, ενώ η ατορβαστατίνη και όχι η ροσουβαστατίνη οδήγησε σε σημαντική μείωση των επιπέδων του ουρικού οξέος (329). Στοιχεία για την επίδραση της θεραπείας με εζετιμίμπη σε συνδυασμό με τη χορήγηση στατίνης στα επίπεδα του ουρικού οξέος δεν έχουν αναφερθεί έως σήμερα στη βιβλιογραφία.

Η αντίσταση στην ινσουλίνη συσχετίζεται με την υπερουριχαιμία (484). Έτσι φάρμακα που βελτιώνουν την αντίσταση στην ινσουλίνη, όπως η μετφορμίνη, επίσης μειώνουν τα επίπεδα του ουρικού οξέος (476). Στη μελέτη μας οι μεταβολές στα επίπεδα του ουρικού οξέος δεν συσχετιζονταν ούτε με τις αρχικές τιμές ούτε με τις τιμές μετά τη θεραπευτική παρέμβαση του δείκτη HOMA-IR (485).

Οι υποκείμενοι μηχανισμοί την επαγώμενης από τις στατίνες μείωσης του ουρικού οξέος δεν έχουν διευκρινισθεί. Το ουρικό οξύ εκκρίνεται αρχικά από τους νεφρούς, όπου διηθεται στο σπείραμα και επαναροφάται πλήρως στο εγγύς σωληνάριο, κατόπιν απεκκρίνεται (περίπου 50% του αρχικά διηθημένου φορτίου) και επαναροφάται. Αυξημένες συγκεντρώσεις του ουρικού οξέος είναι συνεπώς αποτέλεσμα είτε αυξημένης παραγωγής είτε μειωμένης νεφρικής απέκκρισης. Προτείνεται ότι οι στατίνες αυξάνουν την νεφρική αιματική ροή, αυξάνοντας κατά συνέπεια τη νεφρική απέκκριση του ουρικού οξέος (486). Στη μελέτη μας, δεν παρατηρήθηκε καμία σημαντική μεταβολή των νεφρικών παραμέτρων σε καμία από τις τρεις ομάδες. Ωστόσο, υπήρχε μία τάση αύξησης της κλασματικής απέκκρισης του ουρικού οξέος. Επίσης, οι μεταβολές στα επίπεδα του ουρικού οξέος συσχετίζονταν με τις μεταβολές στην κλασματική του απέκκριση και στις τρεις ομάδες. Αυτό μπορεί να οφείλεται είτε σε άμεση δράση των στατινών στη νεφρική απέκκριση του ουρικού οξέος είτε να είναι συνέπεια της μείωσης της χοληστερόλης. Η μείωση των επιπέδων του ουρικού οξέος στη μελέτη μας ήταν ανεξάρτητη από τις μεταβολές στα επίπεδα των λιπιδίων.

Στην παρούσα μελέτη δείξαμε ότι ο συνδυασμός της σιμβαστατίνης με την εζετιμίμπη μειώνει τα επίπεδα του ουρικού οξέος στον ίδιο βαθμό με τη μονοθεραπεία με σιμβαστατίνη ή τη μονοθεραπεία με ροσουβαστατίνη. Αυτή είναι η πρώτη αναφορά στη βιβλιογραφία σε σχέση με τη μείωση του ουρικού οξέος με τη χορήγηση συνδυασμού σιμβαστατίνης με εζετιμίμπη. Ωστόσο, δεν μπορούμε να ξέρουμε κατά πόσον η υποουριχαιμική επίδραση του συνδυασμού οφείλεται στη μικρή δόση στατίνης ή στην εζετιμίμπη, εφόσον δεν υπήρχε ομάδα με μονοθεραπεία εζετιμίμπης. Δεν υπάρχουν πολλά βιβλιογραφικά δεδομένα σχετικά με την επίδραση της εζετιμίμπης στα επίπεδα του ουρικού οξέος. Παλαιότερες μελέτες της ομάδας μας κατέδειξαν ουδέτερη επίδραση της μονοθεραπείας με εζετιμίμπη στα επίπεδα του ουρικού οξέος σε υπέρβαρους και παχύσαρκους ασθενείς αλλά και σε υπερχοληστερολαιμικούς ασθενείς (395, 396).

Υπάρχουν δεδομένα μελετών που συσχετίζουν τη θεραπεία με στατίνες με τη βελτίωση της νεφρικής λειτουργίας (472, 487-489). Ωστόσο, τα ευεργετικά αποτελέσματα των στατινών στη νεφρική λειτουργία ενδεχομένως δεν αποτελούν ιδιότητα όλων των στατινών. Οι επιδράσεις της ροσουβαστατίνης στους νεφρούς ποικίλλουν (367, 488, 490). Υπάρχουν μελέτες που έχουν συσχετίσει τη ροσουβαστατίνη με δυσμενείς επιδράσεις στη νεφρική λειτουργία (491). Συγκεκριμένα, η ροσουβαστατίνη έχει αναφερθεί ότι μπορεί να οδηγήσει στην εμφάνιση πρωτεϊνουρίας, σωληναριακής προέλευσης, κυρίως με αυξημένη

απέκκριση της α -1 μικροσφαιρίνης (367). Η θεραπεία με την εξετιμίμπη φαίνεται ότι έχει ευνοϊκές επιδράσεις στη νεφρική λειτουργία, αν και τα δεδομένα είναι πολύ λίγα (451, 453). Σε μία αναδρομική μελέτη από την ομάδα μας, ο συνδυασμός της εξετιμίμπης με στατίνη συσχετίστηκε με βελτίωση της νεφρικής λειτουργίας (396). Άλλη μελέτη έδειξε ότι ο συνδυασμός της εξετιμίμπης με σιμβαστατίνη σε υπερχοληστερολαιμικούς ασθενείς, οδήγησε σε σημαντική μείωση των επιπέδων της κρεατινίνης ορού σε ασθενείς με προθεραπευτικές τιμές κρεατινίνης ορού μεγαλύτερες από 1.0 mg/dL (88 micromol/L) (492). Στη δική μας μελέτη και τα τρία θεραπευτικά σχήματα είχαν ουδέτερη επίδραση στις παραμέτρους της νεφρικής λειτουργίας, αλλά και στο λόγο αλβουμίνης ούρων/κρεατινίνη ορού. Αυτό μπορεί να οφείλεται στη μικρή διάρκεια της θεραπείας. Επιπρόσθετα, οι ασθενείς μας είχαν φυσιολογικά αρχικά επίπεδα των παραμέτρων της νεφρικής λειτουργίας και πολύ μικρή απέκκριση αλβουμίνης στα ούρα. Καμία από τις θεραπείες δεν επηρέασε τα επίπεδα των ηλεκτρολυτών.

Επίδραση της σιμβαστατίνης, του συνδυασμού σιμβαστατίνης/εξετιμίμπης και της ροσουβαστατίνης στα επίπεδα πλάσματος των 8-ισοπροστανίων, της oxLDL, της μάζας και της ενεργότητας της Lp-PLA₂

Στην παρούσα μελέτη φάνηκε ότι 12 εβδομάδες θεραπείας με σιμβαστατίνη 40 mg, σιμβαστατίνη/εξετιμίμπη 10/10 mg ή ροσουβαστατίνη 10 mg ημερησίως σε ασθενείς με υπερχοληστερολαιμία οδηγούν σε σημαντική μείωση στον ίδιο βαθμό των επιπέδων των 8-ισοπροστανίων, της oxLDL, της μάζας και της ενεργότητας της Lp-PLA₂.

Το οξειδωτικό stress διαδραματίζει βασικό ρόλο στην αθηροσκλήρωση, επάγοντας την ενδοθηλιακή δυσλειτουργία και τις προφλεγμονώδεις διεργασίες που οδηγούν στο σχηματισμό αλλά και τη ρήξη της αθηρωματικής πλάκας (29, 493). Η επίδραση των ελευθέρων ριζών οξυγόνου στα φωσφολιπίδια της κυτταρικής μεμβράνης ή στα φωσφολιπίδια των LDL σωματιδίων του πλάσματος επάγει την απελευθέρωση των 8-ισοπροστανίων (494). Τα επίπεδα της oxLDL και των 8-ισοπροστανίων αποτελούν τους καλύτερους διαθέσιμους δείκτες για τον προσδιορισμό του οξειδωτικού stress (493). Τόσο τα υψηλά επίπεδα της oxLDL όσο και των 8-ισοπροστανίων έχουν συσχετισθεί με αυξημένο καρδιαγγειακό κίνδυνο (495).

Η Lp-PLA₂ είναι μία ανεξάρτητη από το ασβέστιο φωσφολιπάση A₂ που κυκλοφορεί στο πλάσμα συνδεδεμένη με λιποπρωτεϊνικά μόρια (29). Η Lp-PLA₂ συμμετέχει στην αθηρογένεση καθώς υδρολύει οξειδωμένα φωσφολιπίδια και οδηγεί το σχηματισμό οξειδωμένων ελεύθερων λιπαρών οξέων και λυσοφωσφατιδυλχολίνης, τα οποία επάγουν μια σειρά προφλεγμονωδών διεργασιών. Μεγάλες επιδημιολογικές μελέτες δείχνουν ότι η Lp-PLA₂ αποτελεί προγνωστικό παράγοντα καρδιαγγειακών συμβαμάτων, ενώ αποτελεί και πιθανό θεραπευτικό στόχο (29, 496).

Όπως αναφέρθηκε, οι στατίνες διαθέτουν πλειότροπες δράσεις, οι οποίες είναι ανεξάρτητες της μείωσης των επιπέδων των λιπιδίων (497, 498). Ωστόσο, το κατά πόσον υπάρχουν διαφορές σε αυτές τις δράσεις ανάμεσα σε διαφορετικές στατίνες, και ειδικότερα μεταξύ των λιπόφιλων και των υδρόφιλων στατινών αποτελεί σημαντικό θέμα διαμάχης στη βιβλιογραφία. Έχει προταθεί ότι οι λιπόφιλες στατίνες (όπως η σιμβαστατίνη και η φλουβαστατίνη) έχουν αυξημένη ιστική απορρόφηση και έτσι αναστέλλουν δραστικότερα την εξω-ηπατική HMG-CoA αναγωγή σε σύγκριση με τις υδρόφιλες στατίνες (όπως η πραβαστατίνη και η ροσουβαστατίνη), προσδίδοντάς τους, έτσι, περισσότερες πλειότροπες δράσεις (499). Αρκετές μελέτες έχουν συγκρίνει λιπόφιλες με υδρόφιλες στατίνες στην κλινική πράξη με αντικρουόμενα αποτελέσματα (500-503).

Ένας σημαντικός αριθμός κλινικών και πειραματικών μελετών έχει αναδείξει τις ευνοϊκές επιδράσεις της σιμβαστατίνης και της ροσουβαστατίνης στα επίπεδα της oxLDL και των 8-ισοπροστανίων σε ασθενείς με υπερχοληστερολαιμία (498, 504, 505). Επιπλέον, η ομάδα και άλλοι ερευνητές έχουμε δείξει ότι αυτές οι στατίνες μειώνουν σημαντικά τα επίπεδα της ενεργότητας και της μάζας της Lp-PLA₂ (334, 506). Στην παρούσα μελέτη η θεραπεία με σιμβαστατίνη ή ροσουβαστατίνη δε διέφερε στις αντιοξειδωτικές και τις αντιφλεγμονώδεις δράσεις για παρόμοιες μειώσεις των επιπέδων της LDL-C. Και οι δύο στατίνες μείωσαν σημαντικά και στον ίδιο βαθμό τα επίπεδα των 8-ισοπροστανίων, της oxLDL και της ενεργότητας και μάζας της Lp-PLA₂.

Ο συνδυασμός εξετιμίμπης με χαμηλή δόση στατίνης οδηγεί σε παρόμοια μείωση της LDL-C σε σύγκριση με τη μονοθεραπεία της ίδιας στατίνης σε υψηλή δόση (507). Αν η εξετιμίμπη διαθέτει παρόμοιες πλειοτροπικές δράσεις με τις στατίνες ή αν αντίθετα η προσθήκη εξετιμίμπης αναστέλλει τις πλειότροπες δράσεις των στατινών αποτελεί σημείο προβληματισμού στη βιβλιογραφία (508). Κάποιες μελέτες έχουν δείξει ότι η εξετιμίμπη σε συνδυασμό με στατίνη διαθέτει πλειότροπες δράσεις, καθώς έχει αναφερθεί ότι ο συνδυασμός μειώνει διάφορους φλεγμονώδεις δείκτες, όπως η hsCRP, ο TNF-α, η MCP-1

και οι ιντερλευκίνες (338, 509). Σε παλαιότερη μελέτη της ομάδας μας δείξαμε ότι η εξετιμίμπη σε μονοθεραπεία μείωσε τα επίπεδα της oxLDL και των 8-ισοπροστανίων σε υπερχοληστερολαιμικούς ασθενείς (510). Σε αυτή τη μελέτη η θεραπεία με εξετιμίμπη για 12 εβδομάδες μείωσε σημαντικά τα επίπεδα της oxLDL (κατά 20.8%, $p < 0.001$ σε σύγκριση με τις αρχικές τιμές) σε 30 υπερχοληστερολαιμικούς ασθενείς. Τα επίπεδα των 8-ισοπροστανίων μειώθηκαν, επίσης, στατιστικά σημαντικά σε μία υποομάδα των ασθενών με «υψηλά επίπεδα οξειδωτικού stress» (510). Παρόμοια ήταν τα αποτελέσματα και άλλων μελετών (511, 512). Όσον αφορά το συνδυασμό εξετιμίμπης με στατίνη, τρεις πρόσφατα δημοσιευμένες μελέτες σε ασθενείς με στεφανιαία νόσο έδειξαν ότι ο συνδυασμός μείωσε περισσότερο τα επίπεδα της oxLDL σε σύγκριση με υψηλή δόση στατίνης ως μονοθεραπεία (513-515). Μια πρόσφατη τυχαίοποιημένη ελεγχόμενη με εικονικό φάρμακο μελέτη αξιολόγησε την επίδραση σιμβαστατίνης 40 mg σε σύγκριση με τη χορήγηση σιμβαστατίνης 40 mg σε συνδυασμό με εξετιμίμπη 10 mg ημερησίως για 2 μήνες στους δείκτες της φλεγμονής, στην ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων και στο οξειδωτικό stress σε ασθενείς με ΣΝ. Στην ομάδα του συνδυασμού μειώθηκαν περισσότερο τα επίπεδα των 8-ισοπροστανίων σε σύγκριση με τη μονοθεραπεία με σιμβαστατίνη, μια δράση που είναι ανεξάρτητη της υπολιπιδαιμικής δράσης (516). Όσον αφορά την Lp-PLA₂, έχουμε δείξει ότι η μονοθεραπεία με εξετιμίμπη μειώνει την ενεργότητα και μάζα της Lp-PLA₂ (334). Σε μία άλλη μελέτη, αξιολογήθηκε η επίδραση της ατορβαστατίνης 20 mg/ημερησίως έναντι του συνδυασμού ατορβαστατίνης/εξετιμίμπης 5/5 mg στη μάζα της Lp-PLA₂ σε 82 υπερχοληστερολαιμικούς ασθενείς. Σε αυτή τη μελέτη ο συνδυασμός μείωσε σημαντικά τη μάζα της Lp-PLA₂ σε σύγκριση με τις αρχικές τιμές. Ωστόσο, η ατορβαστατίνη μείωσε περισσότερο την μάζα της Lp-PLA₂ για παρόμοιες μειώσεις των επιπέδων της LDL-C (517).

Καμία άλλη μελέτη μέχρι σήμερα δεν έχει εκτιμήσει την επίδραση της χορήγησης του συνδυασμού σιμβαστατίνης/εξετιμίμπης 10/10 mg σε σύγκριση με τη χορήγηση σιμβαστατίνης 40 mg ή ροσουβαστατίνης 10 mg στις παραμέτρους του οξειδωτικού stress και της φλεγμονής. Τα επίπεδα της oxLDL στο πλάσμα μειώθηκαν σημαντικά στον ίδιο βαθμό και από τις τρεις θεραπείες. Η μείωση των επιπέδων της oxLDL ήταν παράλληλη με τη μείωση των επιπέδων της LDL-C. Επιπλέον, σημαντική μείωση των επιπέδων των 8-ισοπροστανίων παρατηρήθηκε και στις τρεις ομάδες, χωρίς σημαντικές διαφορές μεταξύ τους. Η μείωση των 8-ισοπροστανίων ήταν ανεξάρτητη της υπολιπιδαιμικής δράσης των φαρμάκων. Επιπλέον, και οι τρεις θεραπείες μείωσαν σημαντικά την ενεργότητα και τη μάζα της Lp-PLA₂, χωρίς σημαντικές διαφορές μεταξύ τους.

Πρωτόκολλο 2

Η παρούσα μελέτη δείχνει ότι η μεμβρανική έκφραση των TLR2 και TLR4 σε μονοκύτταρα ασθενών με υπερχοληστερολαιμία είναι σημαντικά αυξημένη σε σύγκριση με φυσιολογικά άτομα. Κατά τη διάρκεια της τελευταίας δεκαετίας, μια σειρά πειραματικών και κλινικών μελετών υποδεικνύουν το σημαντικό ρόλο της ενεργοποίησης του ανοσοποιητικού συστήματος στην παθοφυσιολογία της αθηροσκλήρωσης και ειδικότερα το σπουδαίο ρόλο των TLRs (187, 518, 519). Επιπλέον, τα μονοκύτταρα τόσο άμεσα όσο και έμμεσα μέσω της έκκρισης κυτταροκινών συμμετέχουν ενεργά στην αθηρογένεση (520). Η παρατήρηση μας ότι η μεμβρανική έκφραση TLR2 και TLR4 στα μονοκύτταρα είναι αυξημένη σε ασθενείς με υπερχοληστερολαιμία σε σύγκριση με φυσιολογικά άτομα υποστηρίζει την άποψη ότι τα μονοκύτταρα των υπερχοληστερολαιμιών ασθενών είναι ενεργοποιημένα ακόμα και πριν εμφανιστεί κλινικά καρδιαγγειακή νόσος.

Στη μελέτη μας δεν βρέθηκε κάποια συσχέτιση ανάμεσα στη μεμβρανική έκφραση των TLRs και στα επίπεδα της LDL-C. Ωστόσο, παρατηρήθηκε σημαντική θετική συσχέτιση ανάμεσα στην έκφραση των TLRs και τα επίπεδα της oxLDL, όπως και με το λόγο oxLDL/apoB υποδεικνύοντας ότι η oxLDL μπορεί να συμβάλλει στην αυξημένη έκφραση των TLRs στους υπερχοληστερολαιμικούς ασθενείς. Αυτή η υπόθεση συμφωνεί με τα αποτελέσματα δημοσιευμένων μελετών που έδειξαν ότι οι οξειδωτικά τροποποιημένες λιποπρωτεΐνες επάγουν την έκφραση των TLR2 και TLR4 (209). Ένας άλλος παράγοντας που πιθανόν μπορεί να συνεισφέρει στην αυξημένη έκφραση των TLR2 και TLR4 είναι η αντίσταση στην ινσουλίνη, καθώς φαίνεται ότι η ινσουλίνη καταστέλλει την έκφραση των TLR2 και TLR4, ενώ άλλες μελέτες έχουν δείξει ότι οι διαβητικοί ασθενείς έχουν αυξημένη έκφραση TLR2 και TLR4 στα περιφερικά μονοκύτταρα (521-524). Οι ασθενείς της παρούσας μελέτης είχαν αυξημένη περίμετρο μέσης, αλλά όχι αυξημένα επίπεδα γλυκόζης, ενώ η παρουσία διαβήτη ήταν κριτήριο αποκλεισμού.

Πρόσφατα δεδομένα υποστηρίζουν ότι η χορήγηση γεύματος με υψηλή περιεκτικότητα λίπους ή υδατανθράκων επάγει την έκφραση των TLR2 και TLR4 παράλληλα με την αύξηση του LPS και της πρωτεΐνης πρόσδεσης του LPS, LBP, καθώς και των δεικτών φλεγμονής και οξειδωτικού stress (525, 526). Ωστόσο, οι ασθενείς μας είχαν λάβει διαιτητικές οδηγίες για την υιοθέτηση δίαιτας χαμηλής περιεκτικότητας σε λίπος.

Η παρούσα μελέτη έδειξε, επίσης, ότι τόσο η θεραπεία με σιμβαστατίνη 40 mg όσο και με το συνδυασμό σιμβαστατίνης/εζετιμίμπης 10/10 mg ημερησίως για 3 μήνες μειώνει

στον ίδιο βαθμό τη μεμβρανική έκφραση των TLR2 και TLR4 σε περιφερικά μονοκύτταρα. Τα αποτελέσματα της μελέτης επιβεβαιώνουν προηγούμενες παρατηρήσεις από πειραματικές μελέτες που έδειξαν ότι οι στατίνες έχουν ανοσοτροποιοτικές επιδράσεις, οι οποίες εντάσσονται στις πλειότροπες δράσεις τους (527-531). Σε μία μελέτη, σε ανθρώπινα μονοκύτταρα η σιμβαστατίνη και η ατορβαστατίνη μείωσαν την LPS-επαγόμενη έκφραση του TLR4 (530). Αντίθετα, άλλοι ερευνητές έχουν δείξει ότι η χορήγηση στατινών δεν επηρεάζει την έκφραση του TLR4 (528). Τα διαφορετικά αποτελέσματα μπορεί να οφείλονται στη χορήγηση διαφορετικών στατινών ή σε διαφορετικές πειραματικές συνθήκες. Επίσης, φαίνεται ότι η επίδραση των στατινών εξαρτάται και από τον φαινότυπο του TLR4. Συγκεκριμένα, υπάρχει συνέργεια ανάμεσα στο φαινότυπο TLR4-299G και την αποτελεσματικότητα των στατινών στη μείωση του καρδιαγγειακού κινδύνου (202, 528). Δεδομένα όσον αφορά την επίδραση των στατινών στην έκφραση του TLR2 είναι ελλιπή, κυρίως γιατί ο ρόλος του TLR2 στην αθηροσκλήρωση δεν ήταν σαφής μέχρι πρόσφατα (150, 532-535). Ωστόσο, σε συμφωνία με τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης, έχει αναφερθεί ότι η θεραπεία με υψηλή δόση σιμβαστατίνης μειώνει την έκφραση του TLR2, όπως και του TLR4 σε περιφερικά μονοκύτταρα σε ανθρώπινο μοντέλο ενδοτοξιναιμίας (536).

Ο συνδυασμός χαμηλής δόσης στατίνης μαζί με εξετιμίμπη είναι μία ασφαλής και αποτελεσματική θεραπευτική προσέγγιση για τη μείωση της LDL-C (537). Ωστόσο, δεν είναι σαφές αν ο συνδυασμός σιμβαστατίνης με εξετιμίμπη έχει τις ίδιες πλειότροπες δράσεις με τη μονοθεραπεία με υψηλότερη δόση στατίνης (416, 516, 538, 539). Η παρούσα μελέτη αξιολόγησε για πρώτη φορά την επίδραση του συνδυασμού σιμβαστατίνης με εξετιμίμπη 10/10 mg έναντι της σιμβαστατίνης 40 mg στην έκφραση των TLR2 και TLR4. Τα αποτελέσματα μας δείχνουν ότι τα δύο θεραπευτικά σχήματα δεν διαφέρουν όσον αφορά τη μείωση των TLR2 και TLR4. Επιπλέον, και οι δύο θεραπείες μείωσαν τα επίπεδα της oxLDL. Κατά συνέπεια, οι επιδράσεις των υπολιπιδαιμικών θεραπειών στην έκφραση των TLRs μπορεί εν μέρει να οφείλονται στη μείωση της oxLDL. Πράγματι, η εξετιμίμπη φαίνεται ότι ασκεί πλειότροπες δράσεις (392) και σύμφωνα παλαιότερα δημοσιευμένα αποτελέσματα της ομάδας μας, η εξετιμίμπη μειώνει το οξειδωτικό stress και τα επίπεδα της oxLDL (510). Επίσης, έχει αποδειχθεί ότι η εξετιμίμπη ως μονοθεραπεία αλλά και ο συνδυασμός της με σιμβαστατίνη έχει αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες, καθώς μειώνει τα επίπεδα της hsCRP (416, 540) και άλλων δεικτών της φλεγμονής, όπως η Ip-PLA₂ (334, 541, 542) και οι ιντερλευκίνες [59].

Ο TLR4 είναι ο υποδοχέας του LPS (543). Η πρόσδεση του LPS στον TLR4 επάγει την παραγωγή κυτταροκινών μέσω περίπλοκων σηματοδοτικών οδών που καταλήγουν στην ενεργοποίηση του NF-κΒ (95, 544, 545). Στην παρούσα μελέτη εκτιμήθηκε η επίδραση του LPS στα ενδοκυττάρια επίπεδα της IL-6 και της IL-1β σε CD14-θετικά περιφερικά μονοκύτταρα. Αυτές οι δύο κυτταροκίνες διαδραματίζουν θεμελιώδη ρόλο στην αθηρογένεση (546). Μετά την ενεργοποίηση με LPS, η ενδοκυττάρια έκφραση των IL-6 και IL-1β αυξήθηκε σημαντικά σε όλες τις ομάδες. Ωστόσο, αυτή η αύξηση ήταν σημαντικά μικρότερη στην ομάδα των υπερχοληστερολαιμικών ασθενών, παρά τα υψηλότερα επίπεδα oxLDL και τη μεγαλύτερη μεμβρανική έκφραση του TLR4. Η oxLDL αλληλεπιδρά με τους TLRs με διάφορους τρόπους, αν και οι υποκείμενοι μηχανισμοί δεν έχουν διευκρινισθεί ακόμα (547). Τα oxLDL σωματίδια είναι εμπλουτισμένα με οξειδωμένα φωσφολιπίδια που παίζουν σημαντικό ρόλο στην αθηρογένεση, μολονότι οι μηχανισμοί παραμένουν ασαφείς (82, 548). Διάφορες μελέτες έχουν δείξει ότι τα οξειδωμένα φωσφολιπίδια, όπως το oxPAPC, είναι προσδέτες για τον TLR4, ενώ αναστέλλουν την ενεργοποίηση του από τον LPS (87, 233, 549, 550), χωρίς και πάλι οι μηχανισμοί να πλήρως γνωστοί (547). Η επαγόμενη από τα οξειδωμένα φωσφολιπίδια αναστολή της ενεργοποίησης του TLR4 από τον LPS μπορεί να εξηγήσει τα σημαντικά χαμηλότερα ενδοκυττάρια επίπεδα της IL-6 και της IL-1β σε διεγερμένα μονοκύτταρα στους υπερχοληστερολαιμικούς ασθενείς, παρά την αυξημένη μεμβρανική έκφραση του TLR4, αφού αυτοί οι ασθενείς έχουν αυξημένα oxLDL επίπεδα. Σε αυτό το συμπέρασμα οδηγεί και η αρνητική συσχέτιση ανάμεσα στα επίπεδα της oxLDL και στα επίπεδα των ενδοκυττάρων κυτταροκινών, που παρατηρήθηκε στην παρούσα μελέτη.

Η παρούσα μελέτη έδειξε, επίσης, ότι τα ενδοκυττάρια επίπεδα της IL-6 και IL-1β σε LPS-διεγερμένα μονοκύτταρα μειώνονται στον ίδιο βαθμό τόσο από τη μονοθεραπεία με σιμβαστατίνη όσο και από το συνδυασμό σιμβαστατίνης/εζετιμίμπης. Αυτά τα αποτελέσματα είναι σύμφωνα με άλλες μελέτες που δείχνουν ότι οι στατίνες μειώνουν την LPS-επαγόμενη παραγωγή κυτταροκινών (528, 536). Πειραματικά δεδομένα δείχνουν ότι οι στατίνες αναστέλλουν τη σύνθεση διαφόρων μεταβολικών προϊόντων στην οδό του μεβαλονικού, όπως τα ισοπρενοϊδή (GGPP και FPP) όπου και οφείλονται οι ποικίλες πλειότροπες δράσεις τους (551, 552). Έτσι, πειραματικές μελέτες έχουν δείξει ότι οι στατίνες μειώνουν την έκφραση των TLR αναστέλλοντας την παραγωγή των ισοπρενοϊδών (528, 530, 535). Το εύρημα σύμφωνα με το οποίο ο συνδυασμός χαμηλής δόσης σιμβαστατίνης με εζετιμίμπη οδηγεί σε παρόμοια μείωση της ενδοκυττάριας παραγωγής της IL-6 και της IL-1β σε διεγερμένα μονοκύτταρα με την σιμβαστατίνη δείχνει ότι πιθανόν η εζετιμίμπη επηρεάζει την έκφραση και τις σηματοδοτικές οδούς των TLRs. Αυτή η

παρατήρηση είναι σύμφωνη με προηγούμενα δεδομένα που δείχνουν ότι η εξετιμίμπη και ο συνδυασμός της εξετιμίμπης με σιμβαστατίνη μειώνει την παραγωγή των TNF-α, IL-6, IL-1β και MCP-1 σε ασθενείς με υπερχοληστερολαιμία (338). Στο πλαίσιο αυτό, μια πρόσφατη μελέτη έδειξε ότι η μονοθεραπεία με εξετιμίμπη για 4 εβδομάδες μείωσε σημαντικά της ενεργότητα της Rho-κινάσης σε υγιή άτομα (553).

Συμπερασματικά, η υψηλή δόση σιμβαστατίνης και ο συνδυασμός χαμηλής δόσης σιμβαστατίνης με εξετιμίμπη μειώνουν σε παρόμοιο βαθμό την μεμβρανική έκφραση των TLR2 και TLR4 και την LPS-επαγόμενη ενδοκυττάρια έκφραση των IL-6 και IL-1β σε περιφερικά μονοκύτταρα υπερχοληστερολαιμικών ασθενών. Η παθοφυσιολογική και η κλινική σημασία αυτών των ευρημάτων απαιτεί περαιτέρω διερεύνηση.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

- Η σιμβαστατίνη 40 mg, ο συνδυασμός σιμβαστατίνης/εζετιμίμπης 10/10 mg και η ροσουβαστατίνη 10 mg μειώνουν σημαντικά τα επίπεδα των 8-ισοπροστανίων, της oxLDL καθώς και τη μάζα και ενεργότητα της Lp-PLA2 σε παρόμοιο βαθμό.

- Οι 3 παραπάνω θεραπείες δε διαφέρουν ως προς τις δράσεις τους στο μεταβολισμό της γλυκόζης.

- Η σιμβαστατίνη 40 mg, ο συνδυασμός σιμβαστατίνης/εζετιμίμπης 10/10 mg και η ροσουβαστατίνη 10 mg μειώνουν συγκρίσιμα τα επίπεδα του ουρικού οξέος.

- Η σιμβαστατίνη 40 mg σε σύγκριση με το συνδυασμό σιμβαστατίνης /εζετιμίμπης 10/10 mg μείωσαν παρόμοια τα επίπεδα μεμβρανικής έκφρασης των TLR2, TLR4 και την LPS-επαγόμενη ενδοκυττάρια παραγωγή ιντερλευκίνης -1β και -6 σε περιφερικά μονοκύτταρα υπερχοληστερολαιμικών ασθενών.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Εισαγωγή: Οι στατίνες διαθέτουν δράσεις, οι οποίες είναι ανεξάρτητες της υπολιπιδαιμικής τους δράσης. Σε αυτές συμπεριλαμβάνονται κυρίως αντιφλεγμονώδεις και αντιοξειδωτικές δράσεις, καθώς επίσης και επιδράσεις στο μεταβολισμό τους ουρικού οξέος και στο μεταβολισμό της γλυκόζης.

Σκοπός: Σκοπός αυτής της διδακτορικής διατριβής ήταν η σύγκριση των επιδράσεων διαφορετικών στατινών ή του συνδυασμού μιας στατίνης με την εζετιμίμπη, με τις ίδιες υπολιπιδαιμικές δράσεις, σε παραμέτρους του οξειδωτικού stress, της φλεγμονής καθώς και παραμέτρους του μεταβολισμού του ουρικού οξέους και του μεταβολισμού της γλυκόζης σε υπερχοληστερολαιμικούς ασθενείς.

Μέθοδοι: Πρωτόκολλο 1 Στη μελέτη συμμετείχαν 153 υπερχοληστερολαιμικοί ασθενείς που τυχαιοποιήθηκαν σε σιμβαστατίνη 40 mg ή σε σιμβαστατίνη/εζετιμίμπη 10/10 mg ή σε ροσουβαστατίνη 10 mg ημερησίως.

Μετρήσαμε (πριν και μετά από 12 εβδομάδες θεραπείας):

- Παραμέτρους του οξειδωτικού stress:

1) 8-Epi prostaglandin F2 alpha (8-epiPGF2a)

2) Oxidized LDL (oxLDL)

- Παραμέτρους της φλεγμονής:

1) Lipoprotein associated phospholipase A2 (Lp-PLA2) activity and mass

- Παραμέτρους του μεταβολισμού της γλυκόζης:

1) Homeostasis model assessment of insulin resistance (HOMA-IR)

2) Ινσουλίνη νηστείας

3) Γλυκόζη νηστείας

4) Γλυκοζυλιωμένη αιμοσφαιρίνη (HbA_{1c})

5) HOMA of β-cell function (HOMA-B)

- Παραμέτρους του μεταβολισμού του ουρικού οξέους:

1) Επίπεδα του ουρικού οξέος,

2) Κλασματική απέκκριση του ουρικού οξέος

Πρωτόκολλο 2: Στη μελέτη συμμετείχαν 60 ασθενείς που τυχαιοποιήθηκαν σε σιμβαστατίνη 40 mg ή σε σιμβαστατίνη/εζετιμίμη 10/10 mg ημερησίως.

Μετρήσαμε (πριν και μετά από 12 εβδομάδες θεραπείας):

1) Τη μεμβρανική έκφραση των TLR2 και TLR4 σε περιφερικά μονοκύτταρα,

2) Την επαγόμενη από λιποπολυσακχαρίτη ενδοκυττάρια έκκριση των ιντερλευκινών 1β και 6.

Αποτελέσματα: *Πρωτόκολλο 1:* Παρατηρήθηκε μια σημαντική μείωση στα επίπεδα πλάσματος των 8-ισοπροστανίων και της oxLDL σε όλες τις ομάδες [10%, 8% και 6% ($p < 0.05$ σε σύγκριση με τις αρχικές τιμές) και 41%, 40% και 39% ($p < 0.001$ σε σύγκριση με τις αρχικές τιμές) για την ομάδα της σιμβαστατίνης, σιμβαστατίνης/εζετιμίμης και ροσουβαστατίνης, αντίστοιχα]. Σε όλες τις ομάδες παρατηρήθηκε μια σημαντική μείωση της μάζας και ενεργότητας της Lp-PLA₂ (36%, 31% και 38% και 36%, 32% και 32% για την ομάδα της σιμβαστατίνης, σιμβαστατίνης/εζετιμίμης και ροσουβαστατίνης, αντίστοιχα, $p < 0.001$ σε σύγκριση με τις αρχικές τιμές). Δεν παρατηρήθηκαν διαφορές ανάμεσα στις ομάδες.

Και οι 3 θεραπείες σχετίστηκαν με σημαντική αύξηση του δείκτη HOMA-IR και των επιπέδων ινσουλίνης νηστείας ($p < 0.05$ σε σύγκριση με τις αρχικές τιμές). Δεν παρατηρήθηκαν διαφορές ανάμεσα στις ομάδες. Δεν σημειώθηκαν αλλαγές στα επίπεδα της γλυκόζης νηστείας, της HbA_{1c} και του δείκτη HOMA-B.

Σημαντική μείωση των επιπέδων του ουρικού οξέος παρατηρήθηκε σε όλες τις ομάδες (σιμβαστατίνη 40 mg: -5.7%, σιμβαστατίνη/εζετιμίμη 10/10 mg: -3.8% και ροσουβαστατίνη 10 mg: -3.8%; $p < 0.05$ σε σύγκριση με τις αρχικές τιμές, $p = NS$ για τη σύγκριση ανάμεσα στις 3 θεραπευτικές ομάδες). Η κλασματική έκκριση του ουρικού οξέος αυξήθηκε, ωστόσο στατιστικά μη σημαντικά, σε όλες τις ομάδες (σιμβαστατίνη/εζετιμίμη 10/10 mg: +6.8%, σιμβαστατίνη 40 mg: +6.8% και ροσουβαστατίνη 10 mg: +5.9%). Η μείωση των επιπέδων του ουρικού οξέος συσχετιζόταν με τη με την αύξηση της κλασματικής απέκκρισης του ουρικού οξέος. Οι παράμετροι της νεφρικής λειτουργίας παρέμειναν αμετάβλητοι σε όλες τις ομάδες.

Πρωτόκολλο 2: Οι υπερχοληστερολαιμικοί ασθενείς είχαν υψηλότερα επίπεδα μεμβρανικής έκφρασης TLR2 και TLR4 σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου ($p < 0.02$). Τόσο η θεραπεία με σιμβαστατίνη όσο και η θεραπεία με το συνδυασμό

σιμβαστατίνης/εζετιμίμπης οδήγησαν σε σημαντική μείωση της έκφρασης των TLR2 και 4 ($p < 0.01$ σε σύγκριση με τις αρχικές τιμές), χωρίς διαφορές ανάμεσα στις 2 ομάδες. Επιπλέον και οι 2 θεραπείες οδήγησαν σε συγκρίσιμες μειώσεις των επιπέδων έκφρασης της LPS-επαγόμενης ιντερλευκίνης-1 β και IL-6 ($p < 0.05$ σε σύγκριση με τις αρχικές τιμές).

Συμπεράσματα: *Πρωτόκολλο 1:* Η σιμβαστατίνη 40 mg, ο συνδυασμός σιμβαστατίνης/εζετιμίμπης 10/10 mg και η ροσουβαστατίνη 10 mg μειώνουν σημαντικά τα επίπεδα των 8-ισοπροστανίων, της oxLDL καθώς και τη μάζα και ενεργότητα της Lp-PLA2 σε παρόμοιο βαθμό.

Οι 3 παραπάνω θεραπείες δε διαφέρουν ως προς τις δράσεις τους στο μεταβολισμό της γλυκόζης.

Η σιμβαστατίνη 40 mg, ο συνδυασμός σιμβαστατίνης/εζετιμίμπης 10/10 mg και η ροσουβαστατίνη 10 mg μειώνουν συγκρίσιμα τα επίπεδα του ουρικού οξέος.

Πρωτόκολλο 2: Η σιμβαστατίνη 40 mg σε σύγκριση με το συνδυασμό σιμβαστατίνης με εζετιμίμπη 10/10 mg μείωσαν παρόμοια τα επίπεδα μεμβρανικής έκφρασης των TLR2, TLR4 και την LPS-επαγόμενη ενδοκυττάρια παραγωγή ιντερλευκίνης -1 β και -6 σε περιφερικά μονοκύτταρα υπερχοληστερολαιμικών ασθενών.

SUMMARY

Introduction: Statins may exhibit effects, which are independent of their lipid-lowering effects. Among them are anti-inflammatory, anti-oxidant effects, uric-acid lowering effects as well as effects on glucose metabolism. Whether different statins at equivalent doses (depending on their lipophilicity) or the combination of low-dose statin with ezetimibe have comparable pleiotropic effects is unknown

Aim: The aim of this thesis was to compare the effects of different statins or the combination of a statin with ezetimibe at equivalent low-density lipoprotein cholesterol lowering doses on several inflammatory, oxidative stress, uric acid and glycemic parameters in subjects with hypercholesterolemia.

Methods: *Protocol 1.* We enrolled one hundred and fifty three (n = 153) hypercholesterolemic subjects who were randomized to receive simvastatin 40 mg or simvastatin/ezetimibe 10/10 mg or rosuvastatin 10 mg daily.

We measured (at baseline and following 12 weeks of treatment):

- Oxidative Stress parameters:

- 1) Plasma 8-Epi prostaglandin F2 alpha (8-epiPGF2a)
- 2) Oxidized LDL (oxLDL)

- Inflammatory parameters:

- 1) Lipoprotein associated phospholipase A2 (Lp-PLA2) activity and mass

- Glucose metabolism parameters

- 1) Homeostasis model assessment of insulin resistance (HOMA-IR),
- 2) Fasting insulin levels,
- 3) Fasting plasma glucose (FPG),
- 4) Glycosylated hemoglobin (HbA_{1c}),
- 5) HOMA of β -cell function (HOMA-B)

- Uric acid metabolism parameters

- 1) Serum uric acid levels,

2) Fractional excretion of uric acid,

3) Renal function parameters

Protocol 2: We enrolled sixty (n = 60) hypercholesterolemic subjects who were randomized to receive either simvastatin 40 mg or simvastatin/ezetimibe 10/10 mg daily.

We measured (at baseline and following 12 weeks of treatment):

-TLR2 and TLR4 membrane expression in monocytes, LPS-induced intracellular production of IL-1 β and IL-6 in both patient groups, as well as in 30 age- and sex-matched normolipidemic controls.

Results: *Protocol 1:* A significant reduction in plasma 8-isoprostane and oxLDL levels was observed in all treatment groups [by 10%, 8% and 6% (p < 0.05 compared with baseline) and 41%, 40% and 39% (p < 0.001 compared with baseline) in simvastatin, simvastatin/ezetimibe and rosuvastatin groups, respectively]. In all treatment groups a significant reduction in total plasma Lp-PLA2 activity and mass was observed (by 36%, 31% and 38% and 36%, 32% and 32% for simvastatin, simvastatin/ezetimibe and rosuvastatin, respectively, p < 0.001 compared with baseline). No intergroup differences were observed.

All 3 treatment regimens were associated with significant increases in HOMA-IR and fasting insulin levels (p < 0.05 compared with baseline). No significant difference was observed between groups. No change in FPG, HbA_{1c} and HOMA-B levels compared with baseline were noted in any of the 3 treatment groups.

A significant reduction of serum uric acid levels was seen in all treatment groups (simvastatin/ezetimibe 10/10 mg: -3.8%, simvastatin 40 mg: -5.7% and rosuvastatin 10 mg: -3.8%; p < 0.05 compared with baseline; p = NS for comparison between groups). Fractional excretion of uric acid non-significantly increased in all groups (simvastatin/ezetimibe 10/10 mg: +6.8%, simvastatin 40 mg: +6.8% and rosuvastatin 10 mg: +5.9%). The reduction in serum uric acid levels correlated with the increase in fractional excretion of uric acid and baseline uric acid levels. Renal function parameters as well as serum levels and fractional excretions of electrolytes remained unchanged in all groups.

Protocol 2: Hypercholesterolemic patients exhibited higher TLR2 and TLR4 membrane expression compared with controls (p < 0.02). LPS induced a significant increase in the intracellular levels of IL-1 β and IL-6 in all groups however both patient groups exhibited significantly lower levels compared with controls. Three months of treatment with either simvastatin or its combination with ezetimibe resulted in a significant reduction of TLR2 and

TLR4 expression ($p < 0.01$ compared with baseline values) with no intergroup differences. Furthermore, in both groups the post-treatment values of LPS-induced IL-1 β and IL-6 production were significantly lower compared with baseline ($p < 0.05$ for all comparisons).

Conclusions: Simvastatin 40 mg, simvastatin/ezetimibe 10/10 mg and rosuvastatin 10 mg significantly reduced 8-epiPGF2a, oxLDL and Lp-PLA2 activity and mass to a similar extent.

To the extent that simvastatin 40 mg, rosuvastatin 10 mg and simvastatin/ezetimibe 10/10 mg are associated with adverse effects on insulin resistance, they appear to be of the same magnitude.

Simvastatin/ezetimibe 10/10 mg, simvastatin 40 mg and rosuvastatin 10 mg exhibit a similar uric acid lowering effect.

Protocol 2: A high simvastatin dose or the combination of a low-dose simvastatin with ezetimibe reduce to a similar extent TLR2, TLR4 membrane expression and LPS induced IL-6 and IL-1 β production in monocytes of hypercholesterolemic patients.

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ

1.**Moutzouri E**, Liberopoulos EN, Tellis CC, Milionis HJ, Tselepis AD, Elisaf MS. Comparison of the effect of simvastatin versus imvastatin/ezetimibe versus rosuvastatin on markers of inflammation and oxidative stress in subjects with hypercholesterolemia. Atherosclerosis. 2013

2.**Moutzouri E**, Tellis CC, Rousouli K, Liberopoulos EN, Milionis HJ, Elisaf MS, Tselepis AD. Effect of simvastatin or its combination with ezetimibe on Toll-like receptor expression and lipopolysaccharide - Induced cytokine production in monocytes of hypercholesterolemic patients. Atherosclerosis. 2012

3.**Moutzouri E**, Liberopoulos EN, Florentin M, Liamis G, Elisaf MS Effects of Statin Monotherapy Versus Statin Plus Ezetimibe Combination on Serum Uric Acid Levels. J Cardiovasc Pharmacol Ther. 2012

4.**Moutzouri E**, Liberopoulos E, Mikhailidis DP, Kostapanos MS, Kei AA, Milionis H, Elisaf M Comparison of the effects of simvastatin vs. rosuvastatin vs. simvastatin/ezetimibe on parameters of insulin resistance.. Int J Clin Pract. 2011

ΠΕΡΙΛΗΨΕΙΣ ΣΕ ΔΙΕΘΝΗ ΣΥΝΕΔΡΙΑ

1. 79th European Atherosclerosis Society Congress, Gothenburg, Sweden 26.06.2011–29.06.2011 POSTER presentation “Comparison of the effects of simvastatin versus rosuvastatin versus simvastatin/ezetimibe on parameters of carbohydrate metabolism”.

2. 80th European Atherosclerosis Society Congress, Milan, Italy 25.05.2012-28.05.2012, POSTER presentation WITH DISCUSSION (MODERATED POSTER) “Simvastatin and its combination with ezetimibe decrease Toll-Like receptors and lipopolysaccharide induced cytokine production in monocytes of hypercholesterolemic subjects”.

3. 80th European Atherosclerosis Society Congress, Milan, Italy 25.05.2012-28.05.2012, POSTER presentation “Effects of statin monotherapy versus statin plus ezetimibe combination on markers of oxidative stress”.

ΣΥΝΤΟΜΕΥΣΕΙΣ

ACEIs: angiotensin converting enzyme inhibitors, αναστολείς του μετατρεπτικού ένζυμου της αγγειοτενσίνης,

ADMA: asymmetric dimethylarginine, ασύμμετρη διμεθυλαργινίνη

AFCAPS/ TexCAPS: Air Force/Texas Coronary Atherosclerosis Prevention Study

Apo: apolipoprotein, απολιποπρωτεΐνη

ARBITER 6-HALTS: Arterial Biology for the Investigation of the Treatment Effects of Reducing Cholesterol 6-HDL and LDL Treatment Strategies)

ARBs: angiotensin receptor blockers, αναστολείς των υποδοχέων της αγγειοτενσίνης,

ARIC: Atherosclerosis Risk in Communities

ATOROS: ATOrvastatin and ROSuvastatin

ATTEMPT: Assessing The Treatment Effect in Metabolic syndrome without Perceptible diabeTes

AUC: area under the curve, περιοχή κάτω από την καμπύλη

BMI: body mass index, δείκτης μάζας σώματος,

BFA: brefeldin A, μπρεφελδίνη A

CI: confidence interval, διάστημα εμπιστοσύνης

cIMT: carotid intima media thickness, πάχος έσω-μέσου καρωτιδικού χιτώνα

CK: creatinine kinase, κινάση της κρεατίνης

COX-2: cyclooxygenase, κυκλοοξυγενάση-2

DAMPS: damage associated molecular patterns, μοριακά πρότυπα σχετιζόμενα με βλάβη

dsRNA: double-stranded RNA, διπλής έλικας RNA

eCl_{Cr}: estimated creatinine clearance, εκτιμώμενη κάθαρση κρεατίνης

EDA: extra cellular domain A, εξωκυτταρικό τμήμα A

eGFR : estimated glomerular filtration rate, ρυθμός σπειραματικής διήθησης

ENHANCE: Ezetimibe and Simvastatin in Hypercholesterolemia Enhances Atherosclerosis Regression

eNOS: endothelial NO synthase, ενεργότητα της συνθάσης του NO του ενδοθηλίου

EPIC-Norfolk: European Prospective Investigation of Cancer

FE: fractional excretion, κλασματική απέκκριση

FFA: free fatty acids, ελεύθερα λιπαρά οξέα,

FMD: flow mediated vasodilatation, ενδοθηλιοεξαρτώμενη αγγειοδιαστολή με τη βοήθεια υπερηχογραφίας υψηλής ευκρίνειας μετά από πρόκληση διέγερσης του ενδοθηλίου

FPP: farnesylpyrophosphate, φαρνεσυλ-πυροφωσφορικό

GGPP: geranylgeranylpyrophosphate, γερανυλ-γερανυλ-πυροφωσφορικό

GLUT4: membrane transport protein glucose transporter 4, μεμβρανικός μεταφορέας γλυκόζης 4

GREACE: Greek Atorvastatin and Coronary Heart Disease Evaluation

HbA_{1c}: glycosylated haemoglobin, γλυκοζυλιωμένη αιμοσφαιρίνη

HDL: high density lipoprotein, υψηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνη

HDL-C: high density lipoprotein cholesterol, χοληστερόλη των υψηλής πυκνότητας λιποπρωτεϊνών,

HMGB1: high-mobility group protein B1, πρωτεΐνη υψηλής κινητικότητας B1

HMG-CoA: 3-hydroxy- 3-methylglutaryl coenzyme A, 3-υδροξυ-3μεθυλ-γλουταρύλ-συνένζυμο A

HNE: 4-hydroxynonenal, 4-υδροξυ-2-ενενάλη

HO-1: heme oxygenase-1, οξυγονάση-1 της αίμης

HOMA-IR: homeostasis model assessment of insulin resistance, μοντέλο εκτίμησης της ομοιοστασίας της γλυκόζης

HPS: Heart Protection Study

HR: hazard ratio

hsCRP: high sensitivity C reactive protein, υψηλής ευαισθησίας C αντιδρώσα πρωτεΐνη

HSP: heat shock proteins, πρωτεΐνες θερμικού σοκ

ICAM: intracellular cell adhesion molecules, ενδοκυττάρια προσκολλητικά μόρια

IDL: intermediate density lipoprotein, ενδιάμεσης πυκνότητας λιποπρωτεΐνη

IFNs: interferons, ιντερφερόνες

IMPROVE-IT; IMProved Reduction of OuTCHOLomes: Vytorin Efficacy International Trial

IRAK: Interleukin-1 receptor-associated kinase

LBP: LPS-binding protein, πρωτεΐνη πρόσδεσης του LPS

LDL: low density lipoprotein, χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνη

LDL-C: low density lipoprotein cholesterol, χοληστερόλη των υψηλής πυκνότητας λιποπρωτεϊνών,

LIFE: Losartan Intervention For Endpoint reduction

Lp(a): lipoprotein (a), λιποπρωτεΐνη (α)

Lp-PLA₂: lipoprotein-associated PLA₂, λιποπρωτεϊνική φωσφολιπάση A₂

LPS: lipopolysaccharide, λιποπολυσακχαρίτης

LXRs: liver-X-receptors, ηπατικοί υποδοχείς-X

Lyso-PC: lysophosphatidylcholine, λυσοφωσφατιδυλχολίνη

MCP-1: monocyte chemoattractant protein-1, χημειοελκτική πρωτεΐνη των μονοκυττάρων-1

MDA: malondialdehyde, μηλονική διαλδεΐδη

MDRD: Modification of Diet in Renal Disease

MFI: mean fluorescence intensity, μέση ένταση φθορισμού,

MIRACL: Myocardial Ischemia Reduction With Acute Cholesterol Lowering

MIRACL: Myocardial Ischemia Reduction with Aggressive Cholesterol Lowering

MM-LDL: minimally modified LDL, ελάχιστα οξειδωμένη LDL

MONICA: MONItoring of Trends and Determinants in Cardiovascular Disease – Augsburg)

MyD88: myeloid differentiation factor 88, παράγοντας μυελοειδούς διαφοροποίησης
88

NADPH: nicotinamide adenine dinucleotide phosphate

NAFLD: non-alcoholic fatty liver disease, μη αλκοολική λιπώδη νόσο του ήπατος

NO: nitric oxide, νιτρικό οξύ

NPC1L1: Niemann–Pick C1-like 1, πρωτεΐνη μεταφοράς στερολών

N-proBNP: N-terminal *B-type* natriuretic peptide, N- τελικό Β-νατριουρητικό πεπίδιο

NS: non significant, όχι στατιστικά σημαντική διαφορά

OR: odds ratio

oxFFA: oxidized free fatty acids, οξειδωμένα ελεύθερα λιπαρά οξέα

oxLDL: oxidized LDL, οξειδωμένη LDL

oxPL: oxidized phospholipids, οξειδωμένα φωσφολιπίδια

PAF : platelet-activating factor, παράγοντας ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων

PAMPs: pathogen associated molecular patterns, μοριακά πρότυπα των παθογόνων

PAPC: 1-palmitoyl-2-arachidonoyl-sn-glycero-3-phosphocholine

PC: phosphatidylcholine, φωσφατιδυλχολίνη,

PEACE: Prevention of Events with Angiotensin Converting Enzyme Inhibition

PIOSTAT: PIOglitazone and STATin

PL: phospholipids, φωσφολιπίδια,

PLA₂: phospholipase A₂, φωσφολιπάση A₂

PROVE-IT-TIMI 22: Pravastatin or Atorvastatin Evaluation and Infection Therapy–Thrombolysis in Myocardial Infarction 22

PRRs: pattern recognition receptors, υποδοχείς αναγνώρισης προτύπων

PUFA : ω-3 polyunsaturated fatty acids, μακράς αλυσίδας ω-3 πολυακόρεστα λιπαρά οξέα

- ROCK: Rho-associated coiled-coil containing protein kinase
- ROS: reactive oxygen species, αντιδραστικές ελεύθερες ρίζες
- RR: relative risk, σχετικός κίνδυνος
- SANDS: Stop Atherosclerosis in Native Diabetics Study
- sCD40L: soluble CD40 ligand, διαλυτός CD40 συνδέτης
- sCr: serum creatinine, κρεατινίνη ορού,
- SD: standard deviation, σταθερή απόκλιση
- sdLDL: small dense LDL, μικρά πυκνά LDL
- SEAS: Simvastatin and Ezetimibe in Aortic Stenosis
- SFA: saturated fatty acids, κορεσμένα λιπαρά οξέα
- SHARP: Study of Heart and Renal Protection
- SOD: superoxide dismutase, σουπεροξειδική δισμουτάση
- SPARCL: Stroke Prevention by Aggressive Reduction in Cholesterol Levels
- sPLA₂: secretory PLA₂, εκκριτική φωσφολιπάση A₂
- ssRNA: single-stranded RNA, απλής έλικας RNA
- TC: total cholesterol, ολική χοληστερόλη
- TF: tissue factor, ιστικός παράγοντας
- TFPI: tissue factor pathway inhibitor, αναστολέας του ιστικού παράγοντα
- TG: triglycerides, τριγλυκερίδια
- THROMBO: Thrombogenic factors and recurrent Coronary Events
- TICAM: TIR domain-containing adaptor inducing IFN-β, παράγοντας που περιέχει την περιοχή TIR και επάγει την IFN-β (αλλιώς TRIF)
- TIRAP: TIR domain-containing adaptor protein, πρωτεΐνη προσαρμοστής που περιέχει την περιοχή TIR
- TNF-α: tumour necrosis factor α, παράγοντας νέκρωσης των όγκων α
- TRAF: TNF receptor associated factor
- ULN: upper limit of normal, ανώτερες φυσιολογικές τιμές

VCAM: vascular cell adhesion molecules, αγγειακά κυτταρικά προσκολλητικά μόρια

VEGF: vascular endothelial growth factor, αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας
TLR: Toll-like receptors, υποδοχείς τύπου Toll

VLDL: very low density lipoprotein, πολύ χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνη

VYCTOR: Vytorin on Carotid Intima-Media Thickness and Overall Arterial Rigidity

WHS: Women's Health study

WOSCOPS: West of Scotland Coronary Prevention Study

AEE: αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο

ΑΠ: αρτηριακή πίεση,

HOMA-B: HOMA of β -cell function, μοντέλο λειτουργίας των β -κυττάρων

NO: nitric oxide, νιτρικό οξύ

OEM: οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου

ΣΝ: στεφανιαία νόσος

TNT: Treating to New Targets

ΧΝΝ: χρόνια νεφρική νόσος

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΑΝΑΦΟΡΕΣ

1. Duguid JB. Pathogenesis of atherosclerosis. *Lancet*. 1949;2(6586):925-7.
2. Strong JP, Mc GH, Jr., Tejada C, Holman RL. The natural history of atherosclerosis; comparison of the early aortic lesions in New Orleans, Guatemala, and Costa Rica. *The American journal of pathology*. 1958;34(4):731-44.
3. Holman RL, Mc GH, Jr., Strong JP, Geer JC. Observations on the natural history of atherosclerosis. *The Journal of the Louisiana State Medical Society : official organ of the Louisiana State Medical Society*. 1958;110(11):361-9.
4. Ross R, Glomset JA. Atherosclerosis and the arterial smooth muscle cell: Proliferation of smooth muscle is a key event in the genesis of the lesions of atherosclerosis. *Science*. 1973;180(4093):1332-9.
5. Ross R, Glomset JA. The pathogenesis of atherosclerosis (second of two parts). *N Engl J Med*. 1976;295(8):420-5.
6. Ross R, Glomset JA. The pathogenesis of atherosclerosis (first of two parts). *N Engl J Med*. 1976;295(7):369-77.
7. Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature*. 1993;362(6423):801-9.
8. Williams KJ, Tabas I. The response-to-retention hypothesis of early atherogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1995;15(5):551-61.
9. Hansson GK, Hermansson A. The immune system in atherosclerosis. *Nature immunology*. 2011;12(3):204-12.
10. Barker SG, Tilling LC, Miller GC, Beesley JE, Fleetwood G, Stavri GT, et al. The adventitia and atherogenesis: removal initiates intimal proliferation in the rabbit which regresses on generation of a 'neoadventitia'. *Atherosclerosis*. 1994;105(2):131-44.
11. Pejnovic N, Vratimos A, Lee SH, Popadic D, Takeda K, Akira S, et al. Increased atherosclerotic lesions and Th17 in interleukin-18 deficient apolipoprotein E-knockout mice fed high-fat diet. *Molecular immunology*. 2009;47(1):37-45.
12. Asplund A, Friden V, Stillemark-Billton P, Camejo G, Bondjers G. Macrophages exposed to hypoxia secrete proteoglycans for which LDL has higher affinity. *Atherosclerosis*. 2011;215(1):77-81.
13. Chisolm GM, Steinberg D. The oxidative modification hypothesis of atherogenesis: an overview. *Free Radic Biol Med*. 2000;28(12):1815-26.
14. Morel DW, DiCorleto PE, Chisolm GM. Endothelial and smooth muscle cells alter low density lipoprotein in vitro by free radical oxidation. *Arteriosclerosis*. 1984;4(4):357-64.
15. Cushing SD, Berliner JA, Valente AJ, Territo MC, Navab M, Parhami F, et al. Minimally modified low density lipoprotein induces monocyte chemotactic protein 1 in human endothelial cells and smooth muscle cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990;87(13):5134-8.
16. McMurray HF, Parthasarathy S, Steinberg D. Oxidatively modified low density lipoprotein is a chemoattractant for human T lymphocytes. *J Clin Invest*. 1993;92(2):1004-8.

17. Ohgushi M, Kugiyama K, Fukunaga K, Murohara T, Sugiyama S, Miyamoto E, et al. Protein kinase C inhibitors prevent impairment of endothelium-dependent relaxation by oxidatively modified LDL. *Arterioscler Thromb.* 1993;13(10):1525-32.
18. Thomas CE, Jackson RL, Ohlweiler DF, Ku G. Multiple lipid oxidation products in low density lipoproteins induce interleukin-1 beta release from human blood mononuclear cells. *J Lipid Res.* 1994;35(3):417-27.
19. Palinski W, Rosenfeld ME, Yla-Herttuala S, Gurtner GC, Socher SS, Butler SW, et al. Low density lipoprotein undergoes oxidative modification in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1989;86(4):1372-6.
20. Xu XP, Meisel SR, Ong JM, Kaul S, Cercek B, Rajavashisth TB, et al. Oxidized low-density lipoprotein regulates matrix metalloproteinase-9 and its tissue inhibitor in human monocyte-derived macrophages. *Circulation.* 1999;99(8):993-8.
21. Hessler JR, Morel DW, Lewis LJ, Chisolm GM. Lipoprotein oxidation and lipoprotein-induced cytotoxicity. *Arteriosclerosis.* 1983;3(3):215-22.
22. Stafforini DM, Elstad MR, McIntyre TM, Zimmerman GA, Prescott SM. Human macrophages secrete platelet-activating factor acetylhydrolase. *J Biol Chem.* 1990;265(17):9682-7.
23. Stafforini DM, Prescott SM, McIntyre TM. Human plasma platelet-activating factor acetylhydrolase. Purification and properties. *J Biol Chem.* 1987;262(9):4223-30.
24. Chapus C, Rovey M, Sarda L, Verger R. Minireview on pancreatic lipase and colipase. *Biochimie.* 1988;70(9):1223-34.
25. McIntyre TM, Prescott SM, Stafforini DM. The emerging roles of PAF acetylhydrolase. *J Lipid Res.* 2009;50 Suppl:S255-9.
26. Tjoelker LW, Eberhardt C, Unger J, Trong HL, Zimmerman GA, McIntyre TM, et al. Plasma platelet-activating factor acetylhydrolase is a secreted phospholipase A2 with a catalytic triad. *J Biol Chem.* 1995;270(43):25481-7.
27. Derewenda ZS, Derewenda U. The structure and function of platelet-activating factor acetylhydrolases. *Cell Mol Life Sci.* 1998;54(5):446-55.
28. Derewenda ZS, Derewenda U. Relationships among serine hydrolases: evidence for a common structural motif in triacylglyceride lipases and esterases. *Biochem Cell Biol.* 1991;69(12):842-51.
29. Tselepis AD, John Chapman M. Inflammation, bioactive lipids and atherosclerosis: potential roles of a lipoprotein-associated phospholipase A2, platelet activating factor-acetylhydrolase. *Atheroscler Suppl.* 2002;3(4):57-68.
30. Asano K, Okamoto S, Fukunaga K, Shiomi T, Mori T, Iwata M, et al. Cellular source(s) of platelet-activating-factor acetylhydrolase activity in plasma. *Biochem Biophys Res Commun.* 1999;261(2):511-4.
31. Hakkinen T, Luoma JS, Hiltunen MO, Macphee CH, Milliner KJ, Patel L, et al. Lipoprotein-associated phospholipase A(2), platelet-activating factor acetylhydrolase, is expressed by macrophages in human and rabbit atherosclerotic lesions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1999;19(12):2909-17.
32. Tellis CC, Tselepis AD. The role of lipoprotein-associated phospholipase A2 in atherosclerosis may depend on its lipoprotein carrier in plasma. *Biochim Biophys Acta.* 2009;1791(5):327-38.

33. Rallidis LS, Tellis CC, Lekakis J, Rizos I, Varounis C, Charalampopoulos A, et al. Lipoprotein-associated phospholipase a(2) bound on high-density lipoprotein is associated with lower risk for cardiac death in stable coronary artery disease patients: a 3-year follow-up. *J Am Coll Cardiol*. 2012;60(20):2053-60.
34. Gazi I, Lourida ES, Filippatos T, Tsimihodimos V, Elisaf M, Tselepis AD. Lipoprotein-associated phospholipase A2 activity is a marker of small, dense LDL particles in human plasma. *Clin Chem*. 2005;51(12):2264-73.
35. Karabina SA, Liapikos TA, Grekas G, Goudevenos J, Tselepis AD. Distribution of PAF-acetylhydrolase activity in human plasma low-density lipoprotein subfractions. *Biochim Biophys Acta*. 1994;1213(1):34-8.
36. Stafforini DM. Biology of platelet-activating factor acetylhydrolase (PAF-AH, lipoprotein associated phospholipase A2). *Cardiovasc Drugs Ther*. 2009;23(1):73-83.
37. Tjoelker LW, Wilder C, Eberhardt C, Stafforini DM, Dietsch G, Schimpf B, et al. Anti-inflammatory properties of a platelet-activating factor acetylhydrolase. *Nature*. 1995;374(6522):549-53.
38. Quarck R, De Geest B, Stengel D, Mertens A, Lox M, Theilmeier G, et al. Adenovirus-mediated gene transfer of human platelet-activating factor-acetylhydrolase prevents injury-induced neointima formation and reduces spontaneous atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation*. 2001;103(20):2495-500.
39. Zalewski A, Macphee C. Role of lipoprotein-associated phospholipase A2 in atherosclerosis: biology, epidemiology, and possible therapeutic target. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005;25(5):923-31.
40. Karabina SA, Elisaf M, Bairaktari E, Tzallas C, Siamopoulos KC, Tselepis AD. Increased activity of platelet-activating factor acetylhydrolase in low-density lipoprotein subfractions induces enhanced lysophosphatidylcholine production during oxidation in patients with heterozygous familial hypercholesterolaemia. *Eur J Clin Invest*. 1997;27:595-602.
41. Carpenter KL, Dennis IF, Challis IR, Osborn DP, Macphee CH, Leake DS, et al. Inhibition of lipoprotein-associated phospholipase A2 diminishes the death-inducing effects of oxidised LDL on human monocyte-macrophages. *FEBS Lett*. 2001;505(3):357-63.
42. Zalewski A, Nelson JJ, Hegg L, Macphee C. Lp-PLA2: a new kid on the block. *Clin Chem*. 2006;52(9):1645-50.
43. Mannheim D, Herrmann J, Versari D, Gossel M, Meyer FB, McConnell JP, et al. Enhanced expression of Lp-PLA2 and lysophosphatidylcholine in symptomatic carotid atherosclerotic plaques. *Stroke*. 2008;39(5):1448-55.
44. Suchindran S, Rivedal D, Guyton JR, Milledge T, Gao X, Benjamin A, et al. Genome-wide association study of Lp-PLA(2) activity and mass in the Framingham Heart Study. *PLoS Genet*. 2010;6(4):e1000928.
45. Stafforini DM, Satoh K, Atkinson DL, Tjoelker LW, Eberhardt C, Yoshida H, et al. Platelet-activating factor acetylhydrolase deficiency. A missense mutation near the active site of an anti-inflammatory phospholipase. *J Clin Invest*. 1996;97(12):2784-91.
46. Ishihara M, Iwasaki T, Nagano M, Ishii J, Takano M, Kujiraoka T, et al. Functional impairment of two novel mutations detected in lipoprotein-associated phospholipase A2 (Lp-PLA2) deficiency patients. *J Hum Genet*. 2004;49(6):302-7.

47. Kolodgie FD, Burke AP, Skorija KS, Ladich E, Kutys R, Makuria AT, et al. Lipoprotein-associated phospholipase A2 protein expression in the natural progression of human coronary atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2006;26(11):2523-9.

48. Herrmann J, Mannheim D, Wohlerl C, Versari D, Meyer FB, McConnell JP, et al. Expression of lipoprotein-associated phospholipase A(2) in carotid artery plaques predicts long-term cardiac outcome. *Eur Heart J.* 2009;30(23):2930-8.

49. Ostermann G, Ruhling K, Zabel-Langhennig R, Winkler L, Schlag B, Till U. Plasma from atherosclerotic patients exerts an increased degradation of platelet-activating factor. *Thrombosis research.* 1987;47(3):279-85.

50. Wang WY, Zhang J, Wu WY, Li J, Ma YL, Chen WH, et al. Inhibition of lipoprotein-associated phospholipase A2 ameliorates inflammation and decreases atherosclerotic plaque formation in ApoE-deficient mice. *PLoS One.* 2011;6(8):e23425.

51. Hu MM, Zhang J, Wang WY, Wu WY, Ma YL, Chen WH, et al. The inhibition of lipoprotein-associated phospholipase A2 exerts beneficial effects against atherosclerosis in LDLR-deficient mice. *Acta Pharmacol Sin.* 2011;32(10):1253-8.

52. Thompson A, Gao P, Orfei L, Watson S, Di Angelantonio E, Kaptoge S, et al. Lipoprotein-associated phospholipase A(2) and risk of coronary disease, stroke, and mortality: collaborative analysis of 32 prospective studies. *Lancet.* 2010;375(9725):1536-44.

53. Suzuki T, Solomon C, Jenny NS, Tracy R, Nelson JJ, Psaty BM, et al. Lipoprotein-associated phospholipase A(2) and risk of congestive heart failure in older adults: the Cardiovascular Health Study. *Circ Heart Fail.* 2009;2(5):429-36.

54. Packard CJ, O'Reilly DS, Caslake MJ, McMahon AD, Ford I, Cooney J, et al. Lipoprotein-associated phospholipase A2 as an independent predictor of coronary heart disease. West of Scotland Coronary Prevention Study Group. *N Engl J Med.* 2000;343(16):1148-55.

55. Ballantyne CM, Hoogeveen RC, Bang H, Coresh J, Folsom AR, Chambless LE, et al. Lipoprotein-associated phospholipase A2, high-sensitivity C-reactive protein, and risk for incident ischemic stroke in middle-aged men and women in the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) study. *Arch Intern Med.* 2005;165(21):2479-84.

56. Koenig W, Meisinger C, Baumert J, Khuseynova N, Lowel H. Systemic low-grade inflammation and risk of coronary heart disease: results from the MONICA/KORA Augsburg cohort studies. *Gesundheitswesen.* 2005;67 Suppl 1:S62-7.

57. Blake GJ, Dada N, Fox JC, Manson JE, Ridker PM. A prospective evaluation of lipoprotein-associated phospholipase A(2) levels and the risk of future cardiovascular events in women. *J Am Coll Cardiol.* 2001;38(5):1302-6.

58. Hatoum IJ, Cook NR, Nelson JJ, Rexrode KM, Rimm EB. Lipoprotein-associated phospholipase A2 activity improves risk discrimination of incident coronary heart disease among women. *Am Heart J.* 2011;161(3):516-22.

59. Rana JS, Arsenault BJ, Despres JP, Cote M, Talmud PJ, Ninio E, et al. Inflammatory biomarkers, physical activity, waist circumference, and risk of future coronary heart disease in healthy men and women. *Eur Heart J.* 2011;32(3):336-44.

60. Brilakis ES, McConnell JP, Lennon RJ, Elesber AA, Meyer JG, Berger PB. Association of lipoprotein-associated phospholipase A2 levels with coronary artery disease risk factors, angiographic coronary artery disease, and major adverse events at follow-up. *Eur Heart J.* 2005;26(2):137-44.

61. Corsetti JP, Rainwater DL, Moss AJ, Zareba W, Sparks CE. High lipoprotein-associated phospholipase A2 is a risk factor for recurrent coronary events in postinfarction patients. *Clin Chem*. 2006;52(7):1331-8.

62. Sabatine MS, Morrow DA, O'Donoghue M, Jablonksi KA, Rice MM, Solomon S, et al. Prognostic utility of lipoprotein-associated phospholipase A2 for cardiovascular outcomes in patients with stable coronary artery disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2007;27(11):2463-9.

63. Koenig W, Twardella D, Brenner H, Rothenbacher D. Lipoprotein-associated phospholipase A2 predicts future cardiovascular events in patients with coronary heart disease independently of traditional risk factors, markers of inflammation, renal function, and hemodynamic stress. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2006;26(7):1586-93.

64. May HT, Horne BD, Anderson JL, Wolfert RL, Muhlestein JB, Renlund DG, et al. Lipoprotein-associated phospholipase A2 independently predicts the angiographic diagnosis of coronary artery disease and coronary death. *Am Heart J*. 2006;152(5):997-1003.

65. O'Donoghue M, Morrow DA, Sabatine MS, Murphy SA, McCabe CH, Cannon CP, et al. Lipoprotein-associated phospholipase A2 and its association with cardiovascular outcomes in patients with acute coronary syndromes in the PROVE IT-TIMI 22 (PRavastatin Or atorVastatin Evaluation and Infection Therapy-Thrombolysis In Myocardial Infarction) trial. *Circulation*. 2006;113(14):1745-52.

66. Ryu SK, Mallat Z, Benessiano J, Tedgui A, Olsson AG, Bao W, et al. Phospholipase A2 enzymes, high-dose atorvastatin, and prediction of ischemic events after acute coronary syndromes. *Circulation*. 2012;125(6):757-66.

67. Ballantyne CM, Hoogeveen RC, Bang H, Coresh J, Folsom AR, Heiss G, et al. Lipoprotein-associated phospholipase A2, high-sensitivity C-reactive protein, and risk for incident coronary heart disease in middle-aged men and women in the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) study. *Circulation*. 2004;109(7):837-42.

68. Koenig W, Khuseynova N, Lowel H, Trischler G, Meisinger C. Lipoprotein-associated phospholipase A2 adds to risk prediction of incident coronary events by C-reactive protein in apparently healthy middle-aged men from the general population: results from the 14-year follow-up of a large cohort from southern Germany. *Circulation*. 2004;110(14):1903-8.

69. Gerber Y, McConnell JP, Jaffe AS, Weston SA, Killian JM, Roger VL. Lipoprotein-associated phospholipase A2 and prognosis after myocardial infarction in the community. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2006;26(11):2517-22.

70. Frei B, Stocker R, Ames BN. Antioxidant defenses and lipid peroxidation in human blood plasma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1988;85(24):9748-52.

71. Yoshida H, Kisugi R. Mechanisms of LDL oxidation. *Clin Chim Acta*. 2010;411(23-24):1875-82.

72. Ziouzenkova O, Sevanian A, Abuja PM, Ramos P, Esterbauer H. Copper can promote oxidation of LDL by markedly different mechanisms. *Free radical biology & medicine*. 1998;24(4):607-23.

73. Steinberg D, Lewis A. Conner Memorial Lecture. Oxidative modification of LDL and atherogenesis. *Circulation*. 1997;95(4):1062-71.

74. Tsimikas S. Measures of oxidative stress. *Clinics in laboratory medicine*. 2006;26(3):571-90, v-vi.

75. Basu S. F2-isoprostanes in human health and diseases: from molecular mechanisms to clinical implications. *Antioxid Redox Signal*. 2008;10(8):1405-34.

76. Berliner J, Leitinger N, Watson A, Huber J, Fogelman A, Navab M. Oxidized lipids in atherogenesis: formation, destruction and action. *Thromb Haemost*. 1997;78(1):195-9.

77. Bochkov VN. Inflammatory profile of oxidized phospholipids. *Thromb Haemost*. 2007;97(3):348-54.

78. Watson AD, Leitinger N, Navab M, Faull KF, Horkko S, Witztum JL, et al. Structural identification by mass spectrometry of oxidized phospholipids in minimally oxidized low density lipoprotein that induce monocyte/endothelial interactions and evidence for their presence in vivo. *The Journal of biological chemistry*. 1997;272(21):13597-607.

79. Watson AD, Subbanagounder G, Welsbie DS, Faull KF, Navab M, Jung ME, et al. Structural identification of a novel pro-inflammatory epoxyisoprostane phospholipid in mildly oxidized low density lipoprotein. *J Biol Chem*. 1999;274(35):24787-98.

80. Navab M, Hama SY, Reddy ST, Ng CJ, Van Lenten BJ, Laks H, et al. Oxidized lipids as mediators of coronary heart disease. *Curr Opin Lipidol*. 2002;13(4):363-72.

81. Greenberg ME, Sun M, Zhang R, Febbraio M, Silverstein R, Hazen SL. Oxidized phosphatidylserine-CD36 interactions play an essential role in macrophage-dependent phagocytosis of apoptotic cells. *The Journal of experimental medicine*. 2006;203(12):2613-25.

82. Leitinger N. Oxidized phospholipids as triggers of inflammation in atherosclerosis. *Molecular nutrition & food research*. 2005;49(11):1063-71.

83. Bochkov VN, Mechtcheriakova D, Lucerna M, Huber J, Malli R, Graier WF, et al. Oxidized phospholipids stimulate tissue factor expression in human endothelial cells via activation of ERK/EGR-1 and Ca(++)/NFAT. *Blood*. 2002;99(1):199-206.

84. Ohkura N, Hiraishi S, Itabe H, Hamuro T, Kamikubo Y, Takano T, et al. Oxidized phospholipids in oxidized low-density lipoprotein reduce the activity of tissue factor pathway inhibitor through association with its carboxy-terminal region. *Antioxid Redox Signal*. 2004;6(4):705-12.

85. Rouhanizadeh M, Hwang J, Clempus RE, Marcu L, Lassegue B, Sevanian A, et al. Oxidized-1-palmitoyl-2-arachidonoyl-sn-glycero-3-phosphorylcholine induces vascular endothelial superoxide production: implication of NADPH oxidase. *Free radical biology & medicine*. 2005;39(11):1512-22.

86. Bochkov VN, Kadl A, Huber J, Gruber F, Binder BR, Leitinger N. Protective role of phospholipid oxidation products in endotoxin-induced tissue damage. *Nature*. 2002;419(6902):77-81.

87. Walton KA, Cole AL, Yeh M, Subbanagounder G, Krutzik SR, Modlin RL, et al. Specific phospholipid oxidation products inhibit ligand activation of toll-like receptors 4 and 2. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2003;23(7):1197-203.

88. Ma Z, Li J, Yang L, Mu Y, Xie W, Pitt B, et al. Inhibition of LPS- and CpG DNA-induced TNF-alpha response by oxidized phospholipids. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology*. 2004;286(4):L808-16.

89. Alcaraz MJ, Fernandez P, Guillen MI. Anti-inflammatory actions of the heme oxygenase-1 pathway. *Curr Pharm Des*. 2003;9(30):2541-51.

90. Ishikawa K, Navab M, Leitinger N, Fogelman AM, Lusis AJ. Induction of heme oxygenase-1 inhibits the monocyte transmigration induced by mildly oxidized LDL. *J Clin Invest.* 1997;100(5):1209-16.
91. Brouard S, Otterbein LE, Anrather J, Tobiasch E, Bach FH, Choi AM, et al. Carbon monoxide generated by heme oxygenase 1 suppresses endothelial cell apoptosis. *The Journal of experimental medicine.* 2000;192(7):1015-26.
92. Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell.* 2006;124:783–801.
93. Pasare C, Medzhitov R. Toll-like receptors and acquired immunity. *Semin Immunol.* 2004;16:23–6.
94. Lemaitre B, Michaut L, Reichhart J-M, Hoffmann JA. The dorsoventral regulatory gene cassette *spatzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell.* 1996;86:973–83.
95. Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CA, Jr. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature.* 1997;388(6640):394-7.
96. Kiyoshi Takeda, Akira S. TLR signaling pathways. *Seminars in Immunology.* 2004;16:3–9.
97. Takeda K, Akira S. Toll-like receptors. *Curr Protoc Immunol.* 2007;14:12.
98. Kawai T, Akira S. TLR signaling. *Semin Immunol.* 2007;19(1):24-32
99. Janeway CA. Jr., Medzhitov R. Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol.* 2002;20:197–216.
100. Medzhitov R. Recognition of microorganisms and activation of the immune response. *Nature* 2007;449:819–26.
101. Beutler BA. TLRs and innate immunity. *Blood.* 2009;113:1399–407.
102. Uematsu S, Akira S. Toll-like receptors and innate immunity. *J Mol Med.* 2006;84:712–25.
103. Montero Vega MT, Martin AdA. Toll-like receptors: a family of innate sensors of danger that alert and drive immunity. *Allergol et Immunopathol.* 2008;36(6):347-57.
104. Kumar H, Kawai T, Akira S. Toll-like receptors and innate immunity. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 2009;30;388(4):621-5.
105. Takeda K, Kaisho T, Akira S. Toll-like receptors. *Annu Rev Immunol.* 2003;21:335-76.
106. Jin MS, Lee JO. Structures of the Toll-like receptor family and its ligand complexes. *Immunity.* 2008;29:182–91.
107. Jin MS, Kim SE, Heo JY, Lee ME, Kim HM, Paik SG, Lee H, Lee JO. Crystal structure of the TLR1–TLR2 heterodimer induced by binding of a tri-acylated lipopeptide. *Cell* 2007;130:1071–82.
108. Kim HM, Park BS, Kim JI, Kim SE, Lee J, Oh SC, Enkhbayar P, Matsushima N, Lee H, Yoo OJ, Lee JO. Crystal structure of the TLR4–MD-2 complex with bound endotoxin antagonist Eritoran. *Cell.* 2007;130:906–17.
109. Park BS, Song DH, Kim HM, Choi BS, Lee H, Lee JO. The structural basis of lipopolysaccharide recognition by the TLR4–MD-2 complex. *Nature.* 2009;458:1191–5

110.Liu L, Botos I, Wang Y. Structural basis of Toll-like receptor 3 signaling with double-stranded RNA. *Science* 2008;320:379–81.

111.Brightbill HD, Libraty DH, Krutzik SR, Yang RB, Belisle JT, Bleharski JR, et al. Host defense mechanisms triggered by microbial lipoproteins through toll-like receptors. *Science*. 1999;285(5428):732-6.

112.Aliprantis AO, Yang RB, Weiss DS, Godowski P, Zychlinsky A. The apoptotic signaling pathway activated by Toll-like receptor-2. *Embo J*. 2000;19(13):3325-36.

113.Lehner MD, Morath S, Michelsen KS, Schumann RR, Hartung T. Induction of cross-tolerance by lipopolysaccharide and highly purified lipoteichoic acid via different Toll-like receptors independent of paracrine mediators. *J Immunol*. 2001;166(8):5161-7

114.Werts C, Tapping RI, Mathison JC, Chuang TH, Kravchenko V, Saint Girons I, et al. Leptospiral lipopolysaccharide activates cells through a TLR2-dependent mechanism. *Nat Immunol*. 2001;2(4):346-52.

115.Netea MG, Kullberg BJ, Galama JM, Stalenhoef AF, Dinarello CA, Van der Meer JW. Non-LPS components of *Chlamydia pneumoniae* stimulate cytokine production through Toll-like receptor 2-dependent pathways. *Eur J Immunol*. 2002;32(4):1188-95

116.Tada H, Nemoto E, Shimauchi H, Watanabe T, Mikami T, Matsumoto T, et al. *Saccharomyces cerevisiae*- and *Candida albicans*- derived mannan induced production of tumor necrosis factor alpha by human monocytes in a CD14- and Toll-like receptor 4-dependent manner. *Microbiol Immunol*. 2002;46(7):503-12

117.Hayashi F, Smith KD, Ozinsky A, Hawn TR, Yi EC, Goodlett DR, et al. The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature*. 2001;410(6832):1099-103

118.Matsumoto M, Seya T. TLR3: Interferon induction by double- stranded RNA including poly(I:C). *Adv Drug Deliv Rev*. 2008;60(7):805-12.

119.Seya T, Shingai M, Uirusu. MM. Toll-like receptors that sense viral infection. 2004;54(1):1-8.

120.Gazzinelli RT, Ropert C, Campos M. Role of the Toll/ interleukin-1 receptor signaling pathway in host resistance and pathogenesis during infection with protozoan parasites. *Immunol Rev*. 2004;201:9–25.

121.Michael U. Martina, Wesche H. Summary and comparison of the signaling mechanisms of the Toll/interleukin-1 receptor family. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2002;1592:265–80.

122. da Silva J, Correia KS, Christen U, Tobias PS, Ulevitch RJ. Lipopolysaccharide is in close proximity to each of the proteins in its membrane receptor complex: transfer from CD14 to TLR4 and MD-2. *J Biol Chem*. 2001;276 21129-35.

123.Yang H, Young DW, Gusovsky F, Chow C. Cellular events mediated by lipopolysaccharide-stimulated toll-like receptor 4. MD-2 is required for activation of mitogen-activated protein kinases and Elk-1. *J Biol Chem*. 2000;275:20861-6.

124. Viriyakosol S, Tobias PS, Kitchens RL, Kirkland TN. MD-2 binds to bacterial lipopolysaccharide. *J Biol Chem*. 2001 Oct 12;276(41):38044-51.

125.Miyake K. Innate immune sensing of pathogens and danger signals by cell surface Toll-like receptors. *Semin Immunol*. 2007;19(1):3-10.

126.Krug A. Nucleic acid recognition receptors in autoimmunity. *Handb Exp Pharmacol.* 2008(183):129-51.

127.Marshak-Rothstein A. Toll-like receptors in systemic sutoimmune disease. *Nat Rev Immunol* 2006;6:823–35.

128.Krug A. Nucleic acid recognition receptors in autoimmunity. *Handb Exp Pharmacol.* 2008;183:129-51.

129.Green NM, Moody KS, Debatis M, Marshak-Rothstein A. Activation of autoreactive B cells by endogenous TLR7 and TLR3 RNA ligands. *J Biol Chem.* 2012;287(47):39789-99.

130.Leadbetter EA, Rifkin IR, Hohlbaum AM, Beaudette BC, Shlomchik MJ, Marshak-Rothstein A. Chromatin-IgG complexes activate B cells by dual engagement of IgM and Toll-like receptors. *Nature.* 2002;416(6881):603-7.

131.Akira S, Takeda K, Kaisho T. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nat Immunol.* 2001;2:675–80.

32.Brikos C, O'Neill LA. Signalling of toll-like receptors. *Handb Exp Pharmacol.* 2008;183:21-50.

133.Takeda K, Akira S. Microbial recognition by Toll-like receptors. *Journal of Dermatological Science.* 2004;34:73-82.

134.Hornig T, Barton GM, Flavell RA, Medzhitov R. The adaptor molecule TIRAP provides signalling specificity for Toll-like receptors. *Nature.* 2002;420:329–33.

135.Yamamoto M, Sato S, Hemmi H, Sanjo H, Uematsu S, Kaisho T, Hoshino K, Takeuchi O, Kobayashi M, Fujita T, Takeda K, Akira S Essential role for TIRAP in activation of the signalling cascade shared by TLR2 and TLR4. *Nature.* 2002;420:324–9.

136.Yamamoto M, Sato S, Mori K, Hoshino K, Takeuchi O, Takeda K, Akira S. Cutting edge: a novel Toll/IL-1 receptor domain-containing adapter that preferentially activates the IFNbeta promoter in the Toll-like receptor signaling. *J Immunol.* 2002;169:6668–667.

137.Oshiumi H, Matsumoto M, Funami K, Akazawa T, Seya T. TICAM-1, an adaptor molecule that participates in Toll-like receptor 3-mediated interferon-beta induction. *Nat Immunol.* 2003;4:161–7.

138.Yamamoto M, Sato S, Hemmi H, Hoshino K, Kaisho T, Sanjo H, Takeuchi O, Sugiyama M, Okabe M, Takeda K, Akira S. Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent tolllike receptor signaling pathway. *Science.* 2003;301:640–6.

139.Hoebe K, Du X, Georgel P, Janssen E, Tabeta K, Kim SO, Goode J, Lin P, Mann N, Mudd S, Crozat K, Sovath S, Han J,Beutler B. Identification of Lps2 as a key transducer of MyD88-independent TIR signalling. *Nature.* 2003;424:743–8.

140.Yamamoto M, Sato S, Hemmi H, Uematsu S, Hoshino K, Kaisho T, Takeuchi O, Takeda K, Akira S. TRAM is specifically involved in the Toll-like receptor 4-mediated MyD88-independent signaling pathway. *Nat Immunol.* 2003;4:1144–50.

141.Bin LH, Xu LG, HB S. TIRP, a novel Toll/interleukin-1 receptor (TIR) domain-containing adapter protein involved in TIR signaling. *J Biol Chem.* 2003;278:24526–32.

142.Oshiumi H, Sasai M, Shida K, Fujita T, Matsumoto M, Seya T. TIR-containing adapter molecule (TICAM)-2, a bridging adapter recruiting to toll-like receptor 4 TICAM-1 that induces interferon-beta. *J Biol Chem.* 2003;278:49751–62.

143.Covert MW, Leung TH, Gaston JE, Baltimore D. Achieving stability of lipopolysaccharide-induced NF-kappaB activation. *Science*. 2005;309(5742):1854-7.

144.Kawai T, Akira S. Signaling to NF-kappaB by Toll-like receptors. *Trends Mol Med* 2007;13(11):460-9.

145.Kiechl S, Egger G, Mayr M, Wiedermann CJ, Bonora E, Oberhollenzer F, et al. Chronic infections and the risk of carotid atherosclerosis: prospective results from a large population study. *Circulation*. 2001;103(8):1064-70.

146.Espinola-Klein C, Rupprecht HJ, Blankenberg S, Bickel C, Kopp H, Rippin G, et al. Impact of infectious burden on extent and long-term prognosis of atherosclerosis. *Circulation*. 2002;105(1):15-21.

147.Lalla E, Lamster IB, Hofmann MA, Bucciarelli L, Jerud AP, Tucker S, et al. Oral infection with a periodontal pathogen accelerates early atherosclerosis in apolipoprotein E-null mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2003;23(8):1405-11.

148.Ott SJ, El Mokhtari NE, Musfeldt M, Hellmig S, Freitag S, Rehman A, et al. Detection of diverse bacterial signatures in atherosclerotic lesions of patients with coronary heart disease. *Circulation*. 2006;113(7):929-37.

149.Lehr HA, Sagban TA, Ihling C, Zahringer U, Hungerer KD, Blumrich M, et al. Immunopathogenesis of atherosclerosis: endotoxin accelerates atherosclerosis in rabbits on hypercholesterolemic diet. *Circulation*. 2001;104(8):914-20.

150.Mullick AE, Tobias PS, Curtiss LK. Modulation of atherosclerosis in mice by Toll-like receptor 2. *J Clin Invest*. 2005;115(11):3149-56.

151.Laman JD, Schoneveld AH, Moll FL, van Meurs M, Pasterkamp G. Significance of peptidoglycan, a proinflammatory bacterial antigen in atherosclerotic arteries and its association with vulnerable plaques. *Am J Cardiol*. 2002;90(2):119-23.

152.Juvonen J, Juvonen T, Laurila A, Alakarppa H, Lounatmaa K, Surcel HM, et al. Demonstration of *Chlamydia pneumoniae* in the walls of abdominal aortic aneurysms. *J Vasc Surg*. 1997;25(3):499-505.

153.May AE, Redecke V, Gruner S, Schmidt R, Massberg S, Miethke T, et al. Recruitment of *Chlamydia pneumoniae*-infected macrophages to the carotid artery wall in noninfected, nonatherosclerotic mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2003;23(5):789-94.

154.Lehtonen L, Eerola E, Oksman P, Toivanen P. Muramic acid in peripheral blood leukocytes of healthy human subjects. *J Infect Dis*. 1995;171(4):1060-4.

155.Wiedermann CJ, Kiechl S, Dunzendorfer S, Schratzberger P, Egger G, Oberhollenzer F, et al. Association of endotoxemia with carotid atherosclerosis and cardiovascular disease: prospective results from the Bruneck Study. *J Am Coll Cardiol*. 1999;34(7):1975-81.

156.Creely SJ, McTernan PG, Kusminski CM, Fisher f M, Da Silva NF, Khanolkar M, et al. Lipopolysaccharide activates an innate immune system response in human adipose tissue in obesity and type 2 diabetes. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2007;292(3):E740-7.

157.Erridge C, Spickett CM, Webb DJ. Non-enterobacterial endotoxins stimulate human coronary artery but not venous endothelial cell activation via Toll-like receptor 2. *Cardiovasc Res*. 2007;73(1):181-9.

158. Erridge C, Attina T, Spickett CM, Webb DJ. A high-fat meal induces low-grade endotoxemia: evidence of a novel mechanism of postprandial inflammation. *Am J Clin Nutr.* 2007;86(5):1286-92.

159. Cani PD, Amar J, Iglesias MA, Poggi M, Knauf C, Bastelica D, et al. Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. *Diabetes.* 2007;56(7):1761-72.

160. Brun P, Castagliuolo I, Di Leo V, Buda A, Pinzani M, Palu G, et al. Increased intestinal permeability in obese mice: new evidence in the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2007;292(2):G518-25.

161. Spencer FA, Goldberg RJ, Becker RC, Gore JM. Seasonal distribution of acute myocardial infarction in the second National Registry of Myocardial Infarction. *J Am Coll Cardiol.* 1998;31(6):1226-33.

162. Spielberg C, Falkenhahn D, Willich SN, Wegscheider K, Voller H. Circadian, day-of-week, and seasonal variability in myocardial infarction: comparison between working and retired patients. *Am Heart J.* 1996;132(3):579-85.

163. Naghavi M, Barlas Z, Siadaty S, Naguib S, Madjid M, Casscells W. Association of influenza vaccination and reduced risk of recurrent myocardial infarction. *Circulation.* 2000;102(25):3039-45.

164. Lavalley P, Perchaud V, Gautier-Bertrand M, Grabli D, Amarenco P. Association between influenza vaccination and reduced risk of brain infarction. *Stroke.* 2002;33(2):513-8.

165. Vila-Corcoles A, Ochoa-Gondar O, Rodriguez-Blanco T, Gutierrez-Perez A, Vila-Rovira A, Gomez F, et al. Clinical effectiveness of pneumococcal vaccination against acute myocardial infarction and stroke in people over 60 years: the CAPAMIS study, one-year follow-up. *BMC Public Health.* 2012;12:222.

166. Naghavi M, Wyde P, Litovsky S, Madjid M, Akhtar A, Naguib S, et al. Influenza infection exerts prominent inflammatory and thrombotic effects on the atherosclerotic plaques of apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation.* 2003;107(5):762-8.

167. Madjid M, Vela D, Khalili-Tabrizi H, Casscells SW, Litovsky S. Systemic infections cause exaggerated local inflammation in atherosclerotic coronary arteries: clues to the triggering effect of acute infections on acute coronary syndromes. *Tex Heart Inst J.* 2007;34(1):11-8.

168. Liu C, Waters DD. Chlamydia pneumoniae and atherosclerosis: from Koch postulates to clinical trials. *Prog Cardiovasc Dis.* 2005;47(4):230-9.

169. Grayston JT, Kronmal RA, Jackson LA, Parisi AF, Muhlestein JB, Cohen JD, et al. Azithromycin for the secondary prevention of coronary events. *N Engl J Med.* 2005;352(16):1637-45.

170. Cannon CP, Braunwald E, McCabe CH, Grayston JT, Muhlestein B, Giugliano RP, et al. Antibiotic treatment of Chlamydia pneumoniae after acute coronary syndrome. *N Engl J Med.* 2005;352(16):1646-54.

171. Bjorkbacka H, Kunjathoor VV, Moore KJ, Koehn S, Ordija CM, Lee MA, et al. Reduced atherosclerosis in MyD88-null mice links elevated serum cholesterol levels to activation of innate immunity signaling pathways. *Nat Med.* 2004;10(4):416-21.

172. Michelsen KS, Wong MH, Shah PK, Zhang W, Yano J, Doherty TM, et al. Lack of Toll-like receptor 4 or myeloid differentiation factor 88 reduces atherosclerosis and alters plaque phenotype in mice deficient in apolipoprotein E. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101(29):10679-84.

173. Ishida BY, Blanche PJ, Nichols AV, Yashar M, Paigen B. Effects of atherogenic diet consumption on lipoproteins in mouse strains C57BL/6 and C3H. *J Lipid Res.* 1991;32(4):559-68.

174. Liu X, Ukai T, Yumoto H, Davey M, Goswami S, Gibson FC, 3rd, et al. Toll-like receptor 2 plays a critical role in the progression of atherosclerosis that is independent of dietary lipids. *Atherosclerosis.* 2008;196(1):146-54.

175. Visintin A, Mazzoni A, Spitzer J.H., Wyllie D.H., Dower S.K., Segal D.M. Regulation of Toll-like receptors in human monocytes and dendritic cells. *J Immunol.* 2001;166:249-55

176. Sabroe I, Jones EC, Usher LR, Whyte MK, Dower SK. Toll-like receptor (TLR)2 and TLR4 in human peripheral blood granulocytes: a critical role for monocytes in leukocyte lipopolysaccharide responses. *J Immunol.* 2002;168(9):4701-10.

177. Faure E, Equils O, Sieling PA, Thomas L, Zhang FX, Kirschning CJ, et al. Bacterial lipopolysaccharide activates NF-kappaB through toll-like receptor 4 (TLR-4) in cultured human dermal endothelial cells. Differential expression of TLR-4 and TLR-2 in endothelial cells. *J Biol Chem.* 2000;275(15):11058-63.

178. Sasu S, LaVerda D, Qureshi N, Golenbock DT, Beasley D. Chlamydia pneumoniae and chlamydial heat shock protein 60 stimulate proliferation of human vascular smooth muscle cells via toll-like receptor 4 and p44/p42 mitogen-activated protein kinase activation. *Circ Res.* 2001;89(3):244-50.

179. Ward JR, Bingle L, Judge HM, Brown SB, Storey RF, Whyte MK, et al. Agonists of toll-like receptor (TLR)2 and TLR4 are unable to modulate platelet activation by adenosine diphosphate and platelet activating factor. *Thromb Haemost.* 2005;94(4):831-8.

180. Frantz S, Kobzik L, Kim YD, Fukazawa R, Medzhitov R, Lee RT, et al. Toll4 (TLR4) expression in cardiac myocytes in normal and failing myocardium. *J Clin Invest.* 1999;104(3):271-80.

181. Edfeldt K, Swedenborg J, Hansson GK, Yan ZQ. Expression of toll-like receptors in human atherosclerotic lesions: a possible pathway for plaque activation. *Circulation.* 2002;105(10):1158-61.

182. Xu XH, Shah PK, Faure E, Equils O, Thomas L, Fishbein MC, et al. Toll-like receptor-4 is expressed by macrophages in murine and human lipid-rich atherosclerotic plaques and upregulated by oxidized LDL. *Circulation.* 2001;104(25):3103-8.

183. Vink A, Schoneveld AH, van der Meer JJ, van Middelaar BJ, Sluijter JP, Smeets MB, et al. In vivo evidence for a role of toll-like receptor 4 in the development of intimal lesions. *Circulation.* 2002;106(15):1985-90.

184. Edfeldt K, Bennet AM, Eriksson P, Frostegard J, Wiman B, Hamsten A, et al. Association of hypo-responsive toll-like receptor 4 variants with risk of myocardial infarction. *Eur Heart J.* 2004;25(16):1447-53.

185. Mullick AE, Soldau K, Kiosses WB, Bell TA, 3rd, Tobias PS, Curtiss LK. Increased endothelial expression of Toll-like receptor 2 at sites of disturbed blood flow exacerbates early atherogenic events. *The Journal of experimental medicine.* 2008;205(2):373-83.

186. Monaco C, Gregan SM, Navin TJ, Foxwell BM, Davies AH, Feldmann M. Toll-like receptor-2 mediates inflammation and matrix degradation in human atherosclerosis. *Circulation.* 2009;120(24):2462-9.

187. Schoneveld AH, Hofer I, Sluiter JP, Laman JD, de Kleijn DP, Pasterkamp G. Atherosclerotic lesion development and Toll like receptor 2 and 4 responsiveness. *Atherosclerosis*. 2008;197(1):95-104.
188. Calvano JE, Agnese DM, Um JY, Goshima M, Singhal R, Coyle SM, et al. Modulation of the lipopolysaccharide receptor complex (CD14, TLR4, MD-2) and toll-like receptor 2 in systemic inflammatory response syndrome-positive patients with and without infection: relationship to tolerance. *Shock*. 2003;20(5):415-9.
189. Siedlar M, Frankenberger M, Benkhart E, Espevik T, Quirling M, Brand K, et al. Tolerance induced by the lipopeptide Pam3Cys is due to ablation of IL-1R-associated kinase-1. *J Immunol*. 2004;173(4):2736-45.
190. Schoneveld AH, Oude Nijhuis MM, van Middelaar B, Laman JD, de Kleijn DP, Pasterkamp G. Toll-like receptor 2 stimulation induces intimal hyperplasia and atherosclerotic lesion development. *Cardiovasc Res*. 2005;66(1):162-9.
191. Hollestelle SC, De Vries MR, Van Keulen JK, Schoneveld AH, Vink A, Strijder CF, et al. Toll-like receptor 4 is involved in outward arterial remodeling. *Circulation*. 2004;109(3):393-8.
192. Shishido T, Nozaki N, Takahashi H, Arimoto T, Niizeki T, Koyama Y, et al. Central role of endogenous Toll-like receptor-2 activation in regulating inflammation, reactive oxygen species production, and subsequent neointimal formation after vascular injury. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006;345(4):1446-53.
193. Kiechl S, Lorenz E, Reindl M, Wiedermann CJ, Oberhollenzer F, Bonora E, et al. Toll-like receptor 4 polymorphisms and atherogenesis. *N Engl J Med*. 2002;347(3):185-92.
194. Morange PE, Tired L, Saut N, Luc G, Arveiler D, Ferrieres J, et al. TLR4/Asp299Gly, CD14/C-260T, plasma levels of the soluble receptor CD14 and the risk of coronary heart disease: The PRIME Study. *Eur J Hum Genet*. 2004;12(12):1041-9.
195. Yang IA, Holloway JW, Ye S. TLR4 Asp299Gly polymorphism is not associated with coronary artery stenosis. *Atherosclerosis*. 2003;170(1):187-90.
196. Hamann L, Glaeser C, Hamprecht A, Gross M, Gomma A, Schumann RR. Toll-like receptor (TLR)-9 promoter polymorphisms and atherosclerosis. *Clin Chim Acta*. 2006;364(1-2):303-7.
197. Netea MG, Hijmans A, van Wissen S, Smilde TJ, Trip MD, Kullberg BJ, et al. Toll-like receptor-4 Asp299Gly polymorphism does not influence progression of atherosclerosis in patients with familial hypercholesterolaemia. *Eur J Clin Invest*. 2004;34(2):94-9.
198. Norata GD, Garlaschelli K, Ongari M, Raselli S, Grigore L, Benvenuto F, et al. Effect of the Toll-like receptor 4 (TLR-4) variants on intima-media thickness and monocyte-derived macrophage response to LPS. *J Intern Med*. 2005;258(1):21-7.
199. Labrum R, Bevan S, Sitzer M, Lorenz M, Markus HS. Toll receptor polymorphisms and carotid artery intima-media thickness. *Stroke*. 2007;38(4):1179-84.
200. Lin YC, Chang YM, Yu JM, Yen JH, Chang JG, Hu CJ. Toll-like receptor 4 gene C119A but not Asp299Gly polymorphism is associated with ischemic stroke among ethnic Chinese in Taiwan. *Atherosclerosis*. 2005;180(2):305-9.
201. Ameziane N, Beillat T, Verpillat P, Chollet-Martin S, Aumont MC, Seknadji P, et al. Association of the Toll-like receptor 4 gene Asp299Gly polymorphism with acute coronary events. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2003;23(12):e61-4.

202.Boekholdt SM, Agema WR, Peters RJ, Zwinderman AH, van der Wall EE, Reitsma PH, et al. Variants of toll-like receptor 4 modify the efficacy of statin therapy and the risk of cardiovascular events. *Circulation*. 2003;107(19):2416-21.

203.Hamann L, Gomma A, Schroder NW, Stamme C, Glaeser C, Schulz S, et al. A frequent toll-like receptor (TLR)-2 polymorphism is a risk factor for coronary restenosis. *J Mol Med (Berl)*. 2005;83(6):478-85.

204.Holloway JW, Yang IA, Ye S. Variation in the toll-like receptor 4 gene and susceptibility to myocardial infarction. *Pharmacogenet Genomics*. 2005;15(1):15-21.

205.Zee RY, Hegener HH, Gould J, Ridker PM. Toll-like receptor 4 Asp299Gly gene polymorphism and risk of atherothrombosis. *Stroke*. 2005;36(1):154-7.

206.Koch W, Hoppmann P, Pfeufer A, Schomig A, Kastrati A. Toll-like receptor 4 gene polymorphisms and myocardial infarction: no association in a Caucasian population. *Eur Heart J*. 2006;27(21):2524-9.

207.Libby P, Ridker PM, Hansson GK. Inflammation in atherosclerosis: from pathophysiology to practice. *J Am Coll Cardiol*. 2009;54(23):2129-38.

208.Methe H, Kim JO, Kofler S, Weis M, Nabauer M, Koglin J. Expansion of circulating Toll-like receptor 4-positive monocytes in patients with acute coronary syndrome. *Circulation*. 2005;111(20):2654-61.

209.Pasini AF, Anselmi M, Garbin U, Franchi E, Stranieri C, Nava MC, et al. Enhanced levels of oxidized low-density lipoprotein prime monocytes to cytokine overproduction via upregulation of CD14 and toll-like receptor 4 in unstable angina. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2007;27(9):1991-7.

210.Ashida K, Miyazaki K, Takayama E, Tsujimoto H, Ayaori M, Yakushiji T, et al. Characterization of the expression of TLR2 (toll-like receptor 2) and TLR4 on circulating monocytes in coronary artery disease. *J Atheroscler Thromb*. 2005;12(1):53-60.

211.Mizoguchi E, Orihara K, Hamasaki S, Ishida S, Kataoka T, Ogawa M, et al. Association between Toll-like receptors and the extent and severity of coronary artery disease in patients with stable angina. *Coron Artery Dis*. 2007;18(1):31-8.

212.Shiraki R, Inoue N, Kobayashi S, Ejiri J, Otsui K, Honjo T, et al. Toll-like receptor 4 expressions on peripheral blood monocytes were enhanced in coronary artery disease even in patients with low C-reactive protein. *Life sciences*. 2006;80(1):59-66.

213.Kuwahata S, Fujita S, Orihara K, Hamasaki S, Oba R, Hirai H, et al. High expression level of Toll-like receptor 2 on monocytes is an important risk factor for arteriosclerotic disease. *Atherosclerosis*. 2010;209(1):248-54.

214.Jennings RB, Sommers HM, Smyth GA, Flack HA, Linn H. Myocardial necrosis induced by temporary occlusion of a coronary artery in the dog. *Arch Pathol*. 1960;70:68-78.

215.Sakata Y, Dong JW, Vallejo JG, Huang CH, Baker JS, Tracey KJ, et al. Toll-like receptor 2 modulates left ventricular function following ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2007;292(1):H503-9.

216.Chong AJ, Shimamoto A, Hampton CR, Takayama H, Spring DJ, Rothnie CL, et al. Toll-like receptor 4 mediates ischemia/reperfusion injury of the heart. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2004;128(2):170-9.

217.Kim SC, Ghanem A, Stapel H, Tiemann K, Knuefermann P, Hoeft A, et al. Toll-like receptor 4 deficiency: smaller infarcts, but no gain in function. *BMC Physiol*. 2007;7:5.

218.Oyama J, Blais C, Jr., Liu X, Pu M, Kobzik L, Kelly RA, et al. Reduced myocardial ischemia-reperfusion injury in toll-like receptor 4-deficient mice. *Circulation*. 2004;109(6):784-9.

219.Feng Y, Zhao H, Xu X, Buys ES, Raheer MJ, Bopassa JC, et al. Innate immune adaptor MyD88 mediates neutrophil recruitment and myocardial injury after ischemia-reperfusion in mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2008;295(3):H1311-H8.

220.Shishido T, Nozaki N, Yamaguchi S, Shibata Y, Nitobe J, Miyamoto T, et al. Toll-like receptor-2 modulates ventricular remodeling after myocardial infarction. *Circulation*. 2003;108(23):2905-10.

221.Riad A, Jager S, Sobirey M, Escher F, Yaulema-Riss A, Westermann D, et al. Toll-like receptor-4 modulates survival by induction of left ventricular remodeling after myocardial infarction in mice. *J Immunol*. 2008;180(10):6954-61.

222.Favre J, Musette P, Douin-Echinard V, Laude K, Henry JP, Arnal JF, et al. Toll-like receptors 2-deficient mice are protected against postischemic coronary endothelial dysfunction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2007;27(5):1064-71.

223.Johnson GB, Brunn GJ, Platt JL. Activation of mammalian Toll-like receptors by endogenous agonists. *Critical reviews in immunology*. 2003;23(1-2):15-44.

224.Miller YI, Viriyakosol S, Binder CJ, Feramisco JR, Kirkland TN, Witztum JL. Minimally modified LDL binds to CD14, induces macrophage spreading via TLR4/MD-2, and inhibits phagocytosis of apoptotic cells. *The Journal of biological chemistry*. 2003;278(3):1561-8.

225.Chavez-Sanchez L, Madrid-Miller A, Chavez-Rueda K, Legorreta-Haquet MV, Tesoro-Cruz E, Blanco-Favela F. Activation of TLR2 and TLR4 by minimally modified low-density lipoprotein in human macrophages and monocytes triggers the inflammatory response. *Human immunology*. 2010;71(8):737-44.

226.Bae YS, Lee JH, Choi SH, Kim S, Almazan F, Witztum JL, et al. Macrophages generate reactive oxygen species in response to minimally oxidized low-density lipoprotein: toll-like receptor 4- and spleen tyrosine kinase-dependent activation of NADPH oxidase 2. *Circulation research*. 2009;104(2):210-8, 21p following 8.

227.Estruch M, Bancells C, Beloki L, Sanchez-Quesada JL, Ordonez-Llanos J, Benitez S. CD14 and TLR4 mediate cytokine release promoted by electronegative LDL in monocytes. *Atherosclerosis*. 2013;229(2):356-62.

228.Walton KA, Hsieh X, Gharavi N, Wang S, Wang G, Yeh M, et al. Receptors involved in the oxidized 1-palmitoyl-2-arachidonoyl-sn-glycero-3-phosphorylcholine-mediated synthesis of interleukin-8. A role for Toll-like receptor 4 and a glycosylphosphatidylinositol-anchored protein. *The Journal of biological chemistry*. 2003;278(32):29661-6.

229.Yeh M, Leitinger N, de Martin R, Onai N, Matsushima K, Vora DK, et al. Increased transcription of IL-8 in endothelial cells is differentially regulated by TNF-alpha and oxidized phospholipids. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2001;21(10):1585-91.

230.Subbanagounder G, Leitinger N, Schwenke DC, Wong JW, Lee H, Rizza C, et al. Determinants of bioactivity of oxidized phospholipids. Specific oxidized fatty acyl groups at the sn-2 position. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2000;20(10):2248-54.

231.Eligini S, Brambilla M, Banfi C, Camera M, Sironi L, Barbieri SS, et al. Oxidized phospholipids inhibit cyclooxygenase-2 in human macrophages via nuclear factor-

kappaB/IkappaB- and ERK2-dependent mechanisms. *Cardiovascular research*. 2002;55(2):406-15.

232.Riedemann NC, Ward PA. Oxidized lipid protects against sepsis. *Nature medicine*. 2002;8(10):1084-5.

233.Erridge C, Kennedy S, Spickett CM, Webb DJ. Oxidized phospholipid inhibition of toll-like receptor (TLR) signaling is restricted to TLR2 and TLR4: roles for CD14, LPS-binding protein, and MD2 as targets for specificity of inhibition. *The Journal of biological chemistry*. 2008;283(36):24748-59.

234.Funk JL, Feingold KR, Moser AH, Grunfeld C. Lipopolysaccharide stimulation of RAW 264.7 macrophages induces lipid accumulation and foam cell formation. *Atherosclerosis*. 1993;98(1):67-82.

235.Kazemi MR, McDonald CM, Shigenaga JK, Grunfeld C, Feingold KR. Adipocyte fatty acid-binding protein expression and lipid accumulation are increased during activation of murine macrophages by toll-like receptor agonists. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2005;25(6):1220-4.

236.Castrillo A, Joseph SB, Vaidya SA, Haberland M, Fogelman AM, Cheng G, et al. Crosstalk between LXR and toll-like receptor signaling mediates bacterial and viral antagonism of cholesterol metabolism. *Molecular cell*. 2003;12(4):805-16.

237.Yasuda T, Hirata K, Ishida T, Kojima Y, Tanaka H, Okada T, et al. Endothelial lipase is increased by inflammation and promotes LDL uptake in macrophages. *Journal of atherosclerosis and thrombosis*. 2007;14(4):192-201.

238.Sun Y, Ishibashi M, Seimon T, Lee M, Sharma SM, Fitzgerald KA, et al. Free cholesterol accumulation in macrophage membranes activates Toll-like receptors and p38 mitogen-activated protein kinase and induces cathepsin K. *Circulation research*. 2009;104(4):455-65.

239.Yvan-Charvet L, Welch C, Pagler TA, Ranalletta M, Lamkanfi M, Han S, et al. Increased inflammatory gene expression in ABC transporter-deficient macrophages: free cholesterol accumulation, increased signaling via toll-like receptors, and neutrophil infiltration of atherosclerotic lesions. *Circulation*. 2008;118(18):1837-47.

240.Joseph SB, Castrillo A, Laffitte BA, Mangelsdorf DJ, Tontonoz P. Reciprocal regulation of inflammation and lipid metabolism by liver X receptors. *Nature medicine*. 2003;9(2):213-9.

241.Duenas AI, Aceves M, Fernandez-Pisonero I, Gomez C, Orduna A, Crespo MS, et al. Selective attenuation of Toll-like receptor 2 signalling may explain the atheroprotective effect of sphingosine 1-phosphate. *Cardiovascular research*. 2008;79(3):537-44.

242.Malik S, Wong ND, Franklin SS, Kamath TV, L'Italien GJ, Pio JR, et al. Impact of the metabolic syndrome on mortality from coronary heart disease, cardiovascular disease, and all causes in United States adults. *Circulation*. 2004;110(10):1245-50.

243.Devaraj S, Singh U, Jialal I. Human C-reactive protein and the metabolic syndrome. *Curr Opin Lipidol*. 2009;20(3):182-9.

244.Qatanani M, Lazar MA. Mechanisms of obesity-associated insulin resistance: many choices on the menu. *Genes Dev*. 2007;21(12):1443-55.

245.Rivellese AA, De Natale C, Lilli S. Type of dietary fat and insulin resistance. *Ann N Y Acad Sci*. 2002;967:329-35.

246. Moussavi N, Gavino V, Receveur O. Could the quality of dietary fat, and not just its quantity, be related to risk of obesity? *Obesity*. 2008;16(1):7-15.
247. Brousseau ME, Schaefer EJ. Diet and coronary heart disease: clinical trials. *Current atherosclerosis reports*. 2000;2(6):487-93.
248. Brightbill HD, Libraty DH, Krutzik SR, Yang RB, Belisle JT, Bleharski JR, et al. Host defense mechanisms triggered by microbial lipoproteins through toll-like receptors. *Science*. 1999;285(5428):732-6.
249. Muller SD, Muller MR, Huber M, Esche Uv U, Kirschning CJ, Wagner H, et al. Triacyl-lipopeptide adjuvants: TLR2-dependent activation of macrophages and modulation of receptor-mediated cell activation by altering acyl-moieties. *Int Immunopharmacol*. 2004;4(10-11):1287-300.
250. Munford RS, Hall CL. Detoxification of bacterial lipopolysaccharides (endotoxins) by a human neutrophil enzyme. *Science*. 1986;234(4773):203-5.
251. Lee JY, Zhao L, Youn HS, Weatherill AR, Tapping R, Feng L, et al. Saturated fatty acid activates but polyunsaturated fatty acid inhibits Toll-like receptor 2 dimerized with Toll-like receptor 6 or 1. *J Biol Chem*. 2004;279(17):16971-9.
252. Lee JY, Sohn KH, Rhee SH, Hwang D. Saturated fatty acids, but not unsaturated fatty acids, induce the expression of cyclooxygenase-2 mediated through Toll-like receptor 4. *J Biol Chem*. 2001;276(20):16683-9.
253. Lee JY, Ye J, Gao Z, Youn HS, Lee WH, Zhao L, et al. Reciprocal modulation of Toll-like receptor-4 signaling pathways involving MyD88 and phosphatidylinositol 3-kinase/AKT by saturated and polyunsaturated fatty acids. *J Biol Chem*. 2003;278(39):37041-51.
254. Shi H, Kokoeva MV, Inouye K, Zemel I, Yin H, Flier JS. TLR4 links innate immunity and fatty acid-induced insulin resistance. *J Clin Invest*. 2006;116(11):3015-25.
255. Milanski M, Degasperi G, Coope A, Morari J, Denis R, Cintra DE, et al. Saturated fatty acids produce an inflammatory response predominantly through the activation of TLR4 signaling in hypothalamus: implications for the pathogenesis of obesity. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2009;29(2):359-70.
256. Tsukumo DM, Carvalho-Filho MA, Carvalheira JB, Prada PO, Hirabara SM, Schenka AA, et al. Loss-of-function mutation in Toll-like receptor 4 prevents diet-induced obesity and insulin resistance. *Diabetes*. 2007;56(8):1986-98.
257. Poggi M, Bastelica D, Gual P, Iglesias MA, Gremeaux T, Knauf C, et al. C3H/HeJ mice carrying a toll-like receptor 4 mutation are protected against the development of insulin resistance in white adipose tissue in response to a high-fat diet. *Diabetologia*. 2007;50(6):1267-76.
258. Davis JE, Gabler NK, Walker-Daniels J, Spurlock ME. Tlr-4 deficiency selectively protects against obesity induced by diets high in saturated fat. *Obesity*. 2008;16(6):1248-55.
259. Alberts AW, Chen J, Kuron G, Hunt V, Huff J, Hoffman C, et al. Mevinolin: a highly potent competitive inhibitor of hydroxymethylglutaryl-coenzyme A reductase and a cholesterol-lowering agent. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1980;77(7):3957-61.
260. Istvan ES. Structural mechanism for statin inhibition of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase. *Am Heart J*. 2002;144(6 Suppl):S27-32.
261. Istvan ES, Deisenhofer J. Structural mechanism for statin inhibition of HMG-CoA reductase. *Science*. 2001;292(5519):1160-4.

262. Manzoni M, Rollini M. Biosynthesis and biotechnological production of statins by filamentous fungi and application of these cholesterol-lowering drugs. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2002;58(5):555-64.

263. Louis-Flamberg P, Peishoff CE, Bryan DL, Leber J, Elliott JD, Metcalf BW, et al. Slow binding inhibition of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase. *Biochemistry.* 1990;29(17):4115-20.

264. Moghadasian MH. Clinical pharmacology of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors. *Life Sci.* 1999;65(13):1329-37.

265. Holdgate GA, Ward WH, McTaggart F. Molecular mechanism for inhibition of 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA (HMG-CoA) reductase by rosuvastatin. *Biochem Soc Trans.* 2003;31(Pt 3):528-31.

266. McTaggart F. Comparative pharmacology of rosuvastatin. *Atheroscler Suppl.* 2003;4(1):9-14.

267. Hsiang B, Zhu Y, Wang Z, Wu Y, Sasseville V, Yang WP, et al. A novel human hepatic organic anion transporting polypeptide (OATP2). Identification of a liver-specific human organic anion transporting polypeptide and identification of rat and human hydroxymethylglutaryl-CoA reductase inhibitor transporters. *J Biol Chem.* 1999;274(52):37161-8.

268. McTaggart F, Buckett L, Davidson R, Holdgate G, McCormick A, Schneck D, et al. Preclinical and clinical pharmacology of Rosuvastatin, a new 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitor. *Am J Cardiol.* 2001;87(5A):28B-32B.

269. Jones P, Kafonek S, Laurora I, Hunninghake D. Comparative dose efficacy study of atorvastatin versus simvastatin, pravastatin, lovastatin, and fluvastatin in patients with hypercholesterolemia (the CURVES study). *Am J Cardiol.* 1998;81(5):582-7.

270. Ara R, Pandor A, Stevens J, Rees A, Rafia R. Early high-dose lipid-lowering therapy to avoid cardiac events: a systematic review and economic evaluation. *Health Technol Assess.* 2009;13(34):1-74, 5-118.

271. Forster LF, Stewart G, Bedford D, Stewart JP, Rogers E, Shepherd J, et al. Influence of atorvastatin and simvastatin on apolipoprotein B metabolism in moderate combined hyperlipidemic subjects with low VLDL and LDL fractional clearance rates. *Atherosclerosis.* 2002;164(1):129-45.

272. Jones PH, Davidson MH, Stein EA, Bays HE, McKenney JM, Miller E, et al. Comparison of the efficacy and safety of rosuvastatin versus atorvastatin, simvastatin, and pravastatin across doses (STELLAR* Trial). *Am J Cardiol.* 2003;92(2):152-60.

273. Strandberg TE, Feely J, Sigurdsson EL. Twelve-week, multicenter, randomized, open-label comparison of the effects of rosuvastatin 10 mg/d and atorvastatin 10 mg/d in high-risk adults: a DISCOVERY study. *Clin Ther.* 2004;26(11):1821-33.

274. Schuster H. The GALAXY Program: an update on studies investigating efficacy and tolerability of rosuvastatin for reducing cardiovascular risk. *Expert Rev Cardiovasc Ther.* 2007;5(2):177-93.

275. LaRosa JC. Low-density lipoprotein cholesterol reduction: the end is more important than the means. *Am J Cardiol.* 2007;100(2):240-2.

276. Rubba P, Marotta G, Gentile M. Efficacy and safety of rosuvastatin in the management of dyslipidemia. *Vasc Health Risk Manag.* 2009;5(1):343-52.

277.Schwartz GG, Bolognese MA, Tremblay BP, Caplan R, Hutchinson H, Raza A, et al. Efficacy and safety of rosuvastatin and atorvastatin in patients with hypercholesterolemia and a high risk of coronary heart disease: a randomized, controlled trial. *Am Heart J*. 2004;148(1):e4.

278.Bolego C, Baetta R, Bellosta S, Corsini A, Paoletti R. Safety considerations for statins. *Curr Opin Lipidol*. 2002;13(6):637-44.

279.Thompson PD, Clarkson P, Karas RH. Statin-associated myopathy. *JAMA*. 2003;289(13):1681-90.

280.Daniels SR, Greer FR. Lipid screening and cardiovascular health in childhood. *Pediatrics*. 2008;122(1):198-208.

281.Chapman MJ, McTaggart F. Optimizing the pharmacology of statins: characteristics of rosuvastatin. *Atheroscler Suppl*. 2002;2(4):33-6; discussion 6-7.

282.A co-operative trial in the primary prevention of ischaemic heart disease using clofibrate. Report from the Committee of Principal Investigators. *Br Heart J*. 1978;40(10):1069-118.

283.The Lipid Research Clinics Coronary Primary Prevention Trial results. I. Reduction in incidence of coronary heart disease. *JAMA*. 1984;251(3):351-64.

284.Frick MH, Elo O, Haapa K, Heinonen OP, Heinsalmi P, Helo P, et al. Helsinki Heart Study: primary-prevention trial with gemfibrozil in middle-aged men with dyslipidemia. Safety of treatment, changes in risk factors, and incidence of coronary heart disease. *N Engl J Med*. 1987;317(20):1237-45.

285.The Lipid Research Clinics Coronary Primary Prevention Trial results. II. The relationship of reduction in incidence of coronary heart disease to cholesterol lowering. *JAMA*. 1984;251(3):365-74.

286.Shepherd J, Cobbe SM, Ford I, Isles CG, Lorimer AR, MacFarlane PW, et al. Prevention of coronary heart disease with pravastatin in men with hypercholesterolemia. West of Scotland Coronary Prevention Study Group. *N Engl J Med*. 1995;333(20):1301-7.

287.Randomised trial of cholesterol lowering in 4444 patients with coronary heart disease: the Scandinavian Simvastatin Survival Study (4S). *Lancet*. 1994;344(8934):1383-9.

288.Sacks FM, Pfeffer MA, Moya LA, Rouleau JL, Rutherford JD, Cole TG, et al. The effect of pravastatin on coronary events after myocardial infarction in patients with average cholesterol levels. Cholesterol and Recurrent Events Trial investigators. *N Engl J Med*. 1996;335(14):1001-9.

289.Downs JR, Clearfield M, Weis S, Whitney E, Shapiro DR, Beere PA, et al. Primary prevention of acute coronary events with lovastatin in men and women with average cholesterol levels: results of AFCAPS/TexCAPS. Air Force/Texas Coronary Atherosclerosis Prevention Study. *JAMA*. 1998;279(20):1615-22.

290.MRC/BHF Heart Protection Study of cholesterol lowering with simvastatin in 20,536 high-risk individuals: a randomised placebo-controlled trial. *Lancet*. 2002;360(9326):7-22.

291.Influence of pravastatin and plasma lipids on clinical events in the West of Scotland Coronary Prevention Study (WOSCOPS). *Circulation*. 1998;97(15):1440-5.

292.Gotto AM, Jr., Whitney E, Stein EA, Shapiro DR, Clearfield M, Weis S, et al. Relation between baseline and on-treatment lipid parameters and first acute major coronary

events in the Air Force/Texas Coronary Atherosclerosis Prevention Study (AFCAPS/TexCAPS). *Circulation*. 2000;101(5):477-84.

293.Cannon CP, Braunwald E, McCabe CH, Rader DJ, Rouleau JL, Belder R, et al. Intensive versus moderate lipid lowering with statins after acute coronary syndromes. *N Engl J Med*. 2004;350(15):1495-504.

294.Schwartz GG, Olsson AG, Ezekowitz MD, Ganz P, Oliver MF, Waters D, et al. Effects of atorvastatin on early recurrent ischemic events in acute coronary syndromes: the MIRACL study: a randomized controlled trial. *JAMA*. 2001;285(13):1711-8.

295.Goldstein JL, Brown MS. Regulation of the mevalonate pathway. *Nature*. 1990;343(6257):425-30.

296.Istvan ES, Palnitkar M, Buchanan SK, Deisenhofer J. Crystal structure of the catalytic portion of human HMG-CoA reductase: insights into regulation of activity and catalysis. *EMBO J*. 2000;19(5):819-30.

297.Edwards PA, Ericsson J. Sterols and isoprenoids: signaling molecules derived from the cholesterol biosynthetic pathway. *Annu Rev Biochem*. 1999;68:157-85.

298.Van Aelst L, D'Souza-Schorey C. Rho GTPases and signaling networks. *Genes Dev*. 1997;11(18):2295-322.

299.Heo WD, Meyer T. Switch-of-function mutants based on morphology classification of Ras superfamily small GTPases. *Cell*. 2003;113(3):315-28.

300.Laufs U, Liao JK. Direct vascular effects of HMG-CoA reductase inhibitors. *Trends Cardiovasc Med*. 2000;10(4):143-8.

301.Illingworth DR, Tobert JA. HMG-CoA reductase inhibitors. *Adv Protein Chem*. 2001;56:77-114.

302.Germershausen JI, Hunt VM, Bostedor RG, Bailey PJ, Karkas JD, Alberts AW. Tissue selectivity of the cholesterol-lowering agents lovastatin, simvastatin and pravastatin in rats in vivo. *Biochem Biophys Res Commun*. 1989;158(3):667-75.

303.Corsini A, Bellosta S, Baetta R, Fumagalli R, Paoletti R, Bernini F. New insights into the pharmacodynamic and pharmacokinetic properties of statins. *Pharmacol Ther*. 1999;84(3):413-28.

304.ter Avest E, Abbink EJ, Holewijn S, de Graaf J, Tack CJ, Stalenhoef AF. Effects of rosuvastatin on endothelial function in patients with familial combined hyperlipidaemia (FCH). *Curr Med Res Opin*. 2005;21(9):1469-76.

305.Sergienko IV, Samoilenko E, Masenko VP, Ezhov MV, Sumarokov AB, Tkachev GA, et al. [Effect of therapy with rosuvastatin on lipid spectrum, factors of inflammation and endothelial function in patients with ischemic heart disease]. *Kardiologiya*. 2006;46(5):4-8.

306.Lu TM, Ding YA, Leu HB, Yin WH, Sheu WH, Chu KM. Effect of rosuvastatin on plasma levels of asymmetric dimethylarginine in patients with hypercholesterolemia. *Am J Cardiol*. 2004;94(2):157-61.

307.Ferreira WP, Bertolami MC, Santos SN, Barros MR, de Matos Barretto RB, Pontes SC, Jr., et al. One-month therapy with simvastatin restores endothelial function in hypercholesterolemic children and adolescents. *Pediatric cardiology*. 2007;28(1):8-13.

308.Landmesser U, Harrison DG. Oxidant stress as a marker for cardiovascular events: Ox marks the spot. *Circulation*. 2001;104(22):2638-40.

309.Laufs U, La Fata V, Plutzky J, Liao JK. Upregulation of endothelial nitric oxide synthase by HMG CoA reductase inhibitors. *Circulation*. 1998;97(12):1129-35.

310.Jantzen F, Konemann S, Wolff B, Barth S, Staudt A, Kroemer HK, et al. Isoprenoid depletion by statins antagonizes cytokine-induced down-regulation of endothelial nitric oxide expression and increases NO synthase activity in human umbilical vein endothelial cells. *J Physiol Pharmacol*. 2007;58(3):503-14.

311.Rikitake Y, Kawashima S, Takeshita S, Yamashita T, Azumi H, Yasuhara M, et al. Anti-oxidative properties of fluvastatin, an HMG-CoA reductase inhibitor, contribute to prevention of atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits. *Atherosclerosis*. 2001;154(1):87-96.

312.Schafer A, Fraccarollo D, Vogt C, Flierl U, Hemberger M, Tas P, et al. Improved endothelial function and reduced platelet activation by chronic HMG-CoA-reductase inhibition with rosuvastatin in rats with streptozotocin-induced diabetes mellitus. *Biochem Pharmacol*. 2007;73(9):1367-75.

313.Haas MJ, Horani MH, Parseghian SA, Mooradian AD. Statins prevent dextrose-induced endothelial barrier dysfunction, possibly through inhibition of superoxide formation. *Diabetes*. 2006;55(2):474-9.

314.Norata GD, Pirillo A, Catapano AL. Statins and oxidative stress during atherogenesis. *J Cardiovasc Risk*. 2003;10(3):181-9.

315.Resch U, Tatzber F, Budinsky A, Sinzinger H. Reduction of oxidative stress and modulation of autoantibodies against modified low-density lipoprotein after rosuvastatin therapy. *Br J Clin Pharmacol*. 2006;61(3):262-74.

316.van Tits LJ, Smilde TJ, van Wissen S, de Graaf J, Kastelein JJ, Stalenhoef AF. Effects of atorvastatin and simvastatin on low-density lipoprotein subfraction profile, low-density lipoprotein oxidizability, and antibodies to oxidized low-density lipoprotein in relation to carotid intima media thickness in familial hypercholesterolemia. *Journal of investigative medicine : the official publication of the American Federation for Clinical Research*. 2004;52(3):177-84.

317.Otto A, Fontaine J, Tschirhart E, Fontaine D, Berkenboom G. Rosuvastatin treatment protects against nitrate-induced oxidative stress in eNOS knockout mice: implication of the NAD(P)H oxidase pathway. *Br J Pharmacol*. 2006;148(4):544-52.

318.Otto A, Fontaine D, Fontaine J, Berkenboom G. Rosuvastatin treatment protects against nitrate-induced oxidative stress. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2005;46(2):177-84.

319.Li W, Asagami T, Matsushita H, Lee KH, Tsao PS. Rosuvastatin attenuates monocyte-endothelial cell interactions and vascular free radical production in hypercholesterolemic mice. *J Pharmacol Exp Ther*. 2005;313(2):557-62.

320.Chen W, Pendyala S, Natarajan V, Garcia JG, Jacobson JR. Endothelial cell barrier protection by simvastatin: GTPase regulation and NADPH oxidase inhibition. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology*. 2008;295(4):L575-83.

321.Bergheanu SC, Van Tol A, Dallinga-Thie GM, Liem A, Dunselman PH, Van der Bom JG, et al. Effect of rosuvastatin versus atorvastatin treatment on paraoxonase-1 activity in men with established cardiovascular disease and a low HDL-cholesterol. *Curr Med Res Opin*. 2007;23(9):2235-40.

322.Manfredini V, Biancini GB, Vanzin CS, Dal Vesco AM, Cipriani F, Biasi L, et al. Simvastatin treatment prevents oxidative damage to DNA in whole blood leukocytes of dyslipidemic type 2 diabetic patients. *Cell biochemistry and function*. 2010;28(5):360-6.

323.Miersch S, Sliskovic I, Raturi A, Mutus B. Antioxidant and antiplatelet effects of rosuvastatin in a hamster model of prediabetes. *Free Radic Biol Med.* 2007;42(2):270-9.

324.Grosser N, Erdmann K, Hemmerle A, Berndt G, Hinkelmann U, Smith G, et al. Rosuvastatin upregulates the antioxidant defense protein heme oxygenase-1. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004;325(3):871-6.

325.Kim KJ, Kim KS, Kim NR, Chin HS. Effects of simvastatin on the expression of heme oxygenase-1 in human RPE cells. *Investigative ophthalmology & visual science.* 2012;53(10):6456-64.

326.Scheffer PG, Schindhelm RK, van Verschuer VM, Groenemeijer M, Simsek S, Smulders YM, et al. No effect of atorvastatin and simvastatin on oxidative stress in patients at high risk for cardiovascular disease. *The Netherlands journal of medicine.* 2013;71(7):359-65.

327.De Caterina R, Cipollone F, Filardo FP, Zimarino M, Bernini W, Lazzarini G, et al. Low-density lipoprotein level reduction by the 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme-A inhibitor simvastatin is accompanied by a related reduction of F2-isoprostane formation in hypercholesterolemic subjects: no further effect of vitamin E. *Circulation.* 2002;106(20):2543-9.

328.Catapano AL, Davidson MH, Ballantyne CM, Brady WE, Gazzara RA, Tomassini JE, et al. Lipid-altering efficacy of the ezetimibe/simvastatin single tablet versus rosuvastatin in hypercholesterolemic patients. *Curr Med Res Opin.* 2006;22(10):2041-53.

329.Milionis HJ, Rizos E, Kostapanos M, Filippatos TD, Gazi IF, Ganotakis ES, et al. Treating to target patients with primary hyperlipidaemia: comparison of the effects of ATORvastatin and ROSuvastatin (the ATOROS study). *Curr Med Res Opin.* 2006;22(6):1123-31.

330.Moura LM, Ramos SF, Zamorano JL, Barros IM, Azevedo LF, Rocha-Goncalves F, et al. Rosuvastatin affecting aortic valve endothelium to slow the progression of aortic stenosis. *J Am Coll Cardiol.* 2007;49(5):554-61.

331.Ridker PM, Rifai N, Clearfield M, Downs JR, Weis SE, Miles JS, et al. Measurement of C-reactive protein for the targeting of statin therapy in the primary prevention of acute coronary events. *N Engl J Med.* 2001;344(26):1959-65.

332.Athyros VG, Tziomalos K, Karagiannis A, Mikhailidis DP. The JUPITER trial results boost the evidence for the use of hsCRP as a treatment target and as part of the assessment of vascular risk: time for new guidelines? *Hellenic J Cardiol.* 2009;50(2):89-91.

333.Ridker PM, Danielson E, Fonseca FA, Genest J, Gotto AM, Jr., Kastelein JJ, et al. Reduction in C-reactive protein and LDL cholesterol and cardiovascular event rates after initiation of rosuvastatin: a prospective study of the JUPITER trial. *Lancet.* 2009;373(9670):1175-82.

334.Saougos VG, Tambaki AP, Kalogirou M, Kostapanos M, Gazi IF, Wolfert RL, et al. Differential effect of hypolipidemic drugs on lipoprotein-associated phospholipase A2. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007;27(10):2236-43.

335.Kleemann R, Princen HM, Emeis JJ, Jukema JW, Fontijn RD, Horrevoets AJ, et al. Rosuvastatin reduces atherosclerosis development beyond and independent of its plasma cholesterol-lowering effect in APOE*3-Leiden transgenic mice: evidence for antiinflammatory effects of rosuvastatin. *Circulation.* 2003;108(11):1368-74.

336. Kim YS, Ahn Y, Hong MH, Kim KH, Park HW, Hong YJ, et al. Rosuvastatin suppresses the inflammatory responses through inhibition of c-Jun N-terminal kinase and Nuclear Factor-kappaB in endothelial cells. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2007;49(6):376-83.
337. Link A, Ayadhi T, Bohm M, Nickenig G. Rapid immunomodulation by rosuvastatin in patients with acute coronary syndrome. *Eur Heart J*. 2006;27(24):2945-55.
338. Krysiak R, Okopien B. The effect of ezetimibe and simvastatin on monocyte cytokine release in patients with isolated hypercholesterolemia. *Journal of cardiovascular pharmacology*. 2011;57(4):505-12.
339. Zhang J, Osawa S, Takayanagi Y, Ikuma M, Yamada T, Sugimoto M, et al. Statins directly suppress cytokine production in murine intraepithelial lymphocytes. *Cytokine*. 2013;61(2):540-5.
340. Chen J, Li D, Schaefer RF, Mehta JL. Inhibitory effect of candesartan and rosuvastatin on CD40 and MMPs expression in apo-E knockout mice: novel insights into the role of RAS and dyslipidemia in atherogenesis. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2004;44(4):446-52.
341. Stach K, Nguyen XD, Lang S, Elmas E, Weiss C, Borggrefe M, et al. Simvastatin and atorvastatin attenuate VCAM-1 and uPAR expression on human endothelial cells and platelet surface expression of CD40 ligand. *Cardiology journal*. 2012;19(1):20-8.
342. Ekstedt M, Franzen LE, Mathiesen UL, Holmqvist M, Bodemar G, Kechagias S. Statins in non-alcoholic fatty liver disease and chronically elevated liver enzymes: a histopathological follow-up study. *J Hepatol*. 2007;47(1):135-41.
343. Duvnjak M, Tomasic V, Gomercic M, Smircic Duvnjak L, Barsic N, Lerotic I. Therapy of nonalcoholic fatty liver disease: current status. *J Physiol Pharmacol*. 2009;60 Suppl 7:57-66.
344. Arendt BM, Allard JP. Effect of atorvastatin, vitamin E and C on nonalcoholic fatty liver disease: is the combination required? *Am J Gastroenterol*. 2011;106(1):78-80.
345. Athyros VG, Tziomalos K, Daskalopoulos GN, Karagiannis A, Mikhailidis DP. Statin-based treatment for cardiovascular risk and non-alcoholic fatty liver disease. Killing two birds with one stone? *Ann Med*. 2011;43(3):167-71.
346. Hatzitolios A, Savopoulos C, Lazaraki G, Sidiropoulos I, Haritanti P, Lefkopoulos A, et al. Efficacy of omega-3 fatty acids, atorvastatin and orlistat in non-alcoholic fatty liver disease with dyslipidemia. *Indian J Gastroenterol*. 2004;23(4):131-4.
347. Gomez-Dominguez E, Gisbert JP, Moreno-Monteagudo JA, Garcia-Buey L, Moreno-Otero R. A pilot study of atorvastatin treatment in dyslipemic, non-alcoholic fatty liver patients. *Aliment Pharmacol Ther*. 2006;23(11):1643-7.
348. Antonopoulos S, Mikros S, Mylonopoulou M, Kokkoris S, Giannoulis G. Rosuvastatin as a novel treatment of non-alcoholic fatty liver disease in hyperlipidemic patients. *Atherosclerosis*. 2006;184(1):233-4.
349. Athyros VG, Tziomalos K, Gossios TD, Griva T, Anagnostis P, Kargiotis K, et al. Safety and efficacy of long-term statin treatment for cardiovascular events in patients with coronary heart disease and abnormal liver tests in the Greek Atorvastatin and Coronary Heart Disease Evaluation (GREACE) Study: a post-hoc analysis. *Lancet*. 2010;376(9756):1916-22.
350. Ridker PM, Danielson E, Fonseca FA, Genest J, Gotto AM, Jr., Kastelein JJ, et al. Rosuvastatin to prevent vascular events in men and women with elevated C-reactive protein. *N Engl J Med*. 2008;359(21):2195-207.

351. Freeman DJ, Norrie J, Sattar N, Neely RD, Cobbe SM, Ford I, et al. Pravastatin and the development of diabetes mellitus: evidence for a protective treatment effect in the West of Scotland Coronary Prevention Study. *Circulation*. 2001;103(3):357-62.

352. Sattar N, Preiss D, Murray HM, Welsh P, Buckley BM, de Craen AJ, et al. Statins and risk of incident diabetes: a collaborative meta-analysis of randomised statin trials. *Lancet*. 2010;375(9716):735-42.

353. Preiss D, Seshasai SR, Welsh P, Murphy SA, Ho JE, Waters DD, et al. Risk of incident diabetes with intensive-dose compared with moderate-dose statin therapy: a meta-analysis. *JAMA : the journal of the American Medical Association*. 2011;305(24):2556-64.

354. Waters DD, Ho JE, DeMicco DA, Breazna A, Arsenault BJ, Wun CC, et al. Predictors of new-onset diabetes in patients treated with atorvastatin: results from 3 large randomized clinical trials. *J Am Coll Cardiol*. 2011;57(14):1535-45.

355. Sattar N, Taskinen MR. Statins are diabetogenic--myth or reality? *Atherosclerosis Supplements*. 2012;13(1):1-10.

356. Yamakawa T, Takano T, Tanaka S, Kadonosono K, Terauchi Y. Influence of pitavastatin on glucose tolerance in patients with type 2 diabetes mellitus. *J Atheroscler Thromb*. 2008;15(5):269-75.

357. Yokote K, Saito Y, Chiba. Influence of statins on glucose tolerance in patients with type 2 diabetes mellitus: subanalysis of the collaborative study on hypercholesterolemia drug intervention and their benefits for atherosclerosis prevention (CHIBA study). *J Atheroscler Thromb*. 2009;16(3):297-8.

358. Teramoto T, Shimano H, Yokote K, Urashima M. New evidence on pitavastatin: efficacy and safety in clinical studies. *Expert opinion on pharmacotherapy*. 2010;11(5):817-28.

359. Seliger SL, Weiss NS, Gillen DL, Kestenbaum B, Ball A, Sherrard DJ, et al. HMG-CoA reductase inhibitors are associated with reduced mortality in ESRD patients. *Kidney international*. 2002;61(1):297-304.

360. Tonelli M, Moye L, Sacks FM, Kiberd B, Curhan G, Cholesterol, et al. Pravastatin for secondary prevention of cardiovascular events in persons with mild chronic renal insufficiency. *Annals of internal medicine*. 2003;138(2):98-104.

361. Koren MJ, Davidson MH, Wilson DJ, Fayyad RS, Zuckerman A, Reed DP, et al. Focused atorvastatin therapy in managed-care patients with coronary heart disease and CKD. *American journal of kidney diseases : the official journal of the National Kidney Foundation*. 2009;53(5):741-50.

362. Shepherd J, Kastelein JJ, Bittner V, Deedwania P, Breazna A, Dobson S, et al. Intensive lipid lowering with atorvastatin in patients with coronary heart disease and chronic kidney disease: the TNT (Treating to New Targets) study. *J Am Coll Cardiol*. 2008;51(15):1448-54.

363. Baigent C, Landray MJ, Reith C, Emberson J, Wheeler DC, Tomson C, et al. The effects of lowering LDL cholesterol with simvastatin plus ezetimibe in patients with chronic kidney disease (Study of Heart and Renal Protection): a randomised placebo-controlled trial. *Lancet*. 2011;377(9784):2181-92.

364. Vidt DG, Harris S, McTaggart F, Ditmarsch M, Sager PT, Sorof JM. Effect of short-term rosuvastatin treatment on estimated glomerular filtration rate. *Am J Cardiol*. 2006;97(11):1602-6.

365.Vidt DG, Cressman MD, Harris S, Pears JS, Hutchinson HG. Rosuvastatin-induced arrest in progression of renal disease. *Cardiology*. 2004;102(1):52-60.

366.Verma A, Ranganna KM, Reddy RS, Verma M, Gordon NF. Effect of rosuvastatin on C-reactive protein and renal function in patients with chronic kidney disease. *Am J Cardiol*. 2005;96(9):1290-2.

367.Kostapanos MS, Milionis HJ, Gazi I, Kostara C, Bairaktari ET, Elisaf M. Rosuvastatin increases alpha-1 microglobulin urinary excretion in patients with primary dyslipidemia. *J Clin Pharmacol*. 2006;46(11):1337-43.

368.Kostapanos MS, Milionis HJ, Saougos VG, Lagos KG, Kostara C, Bairaktari ET, et al. Dose-dependent effect of rosuvastatin treatment on urinary protein excretion. *J Cardiovasc Pharmacol Ther*. 2007;12(4):292-7.

369.Kalaitzidis RG, Bakris GL. Should proteinuria reduction be the criterion for antihypertensive drug selection for patients with kidney disease? Current opinion in nephrology and hypertension. 2009;18(5):386-91.

370.de Zeeuw D. Targeting proteinuria as a valid surrogate for individualized kidney protective therapy. *American journal of kidney diseases : the official journal of the National Kidney Foundation*. 2008;51(5):713-6.

371.Agarwal R. Effects of statins on renal function. *Mayo Clinic proceedings Mayo Clinic*. 2007;82(11):1381-90.

372.Ozsoy RC, Koopman MG, Kastelein JJ, Arisz L. The acute effect of atorvastatin on proteinuria in patients with chronic glomerulonephritis. *Clinical nephrology*. 2005;63(4):245-9.

373.Douglas K, O'Malley PG, Jackson JL. Meta-analysis: the effect of statins on albuminuria. *Annals of internal medicine*. 2006;145(2):117-24.

374.Nakamura T, Ushiyama C, Hirokawa K, Osada S, Shimada N, Koide H. Effect of cerivastatin on urinary albumin excretion and plasma endothelin-1 concentrations in type 2 diabetes patients with microalbuminuria and dyslipidemia. *American journal of nephrology*. 2001;21(6):449-54.

375.Strippoli GF, Navaneethan SD, Johnson DW, Perkovic V, Pellegrini F, Nicolucci A, et al. Effects of statins in patients with chronic kidney disease: meta-analysis and meta-regression of randomised controlled trials. *Bmj*. 2008;336(7645):645-51.

376.Atthobari J, Brantsma AH, Gansevoort RT, Visser ST, Asselbergs FW, van Gilst WH, et al. The effect of statins on urinary albumin excretion and glomerular filtration rate: results from both a randomized clinical trial and an observational cohort study. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*. 2006;21(11):3106-14.

377.Agarwal R. Statin induced proteinuria: renal injury or renoprotection? *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 2004;15(9):2502-3.

378.Alsheikh-Ali AA, Ambrose MS, Kuvin JT, Karas RH. The safety of rosuvastatin as used in common clinical practice: a postmarketing analysis. *Circulation*. 2005;111(23):3051-7.

379.Tiwari A. An overview of statin-associated proteinuria. *Drug Discov Today*. 2006;11(9-10):458-64.

380.Kosoglou T, Statkevich P, Johnson-Levonas AO, Paolini JF, Bergman AJ, Alton KB. Ezetimibe: a review of its metabolism, pharmacokinetics and drug interactions. *Clin Pharmacokinet*. 2005;44(5):467-94.

381.Toth PP, Davidson MH. Cholesterol absorption blockade with ezetimibe. *Curr Drug Targets Cardiovasc Haematol Disord*. 2005;5(6):455-62.

382.Garcia-Calvo M, Lisnock J, Bull HG, Hawes BE, Burnett DA, Braun MP, et al. The target of ezetimibe is Niemann-Pick C1-Like 1 (NPC1L1). *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(23):8132-7.

383.Lammert F, Wang DQ. New insights into the genetic regulation of intestinal cholesterol absorption. *Gastroenterology*. 2005;129(2):718-34.

384.Davies JP, Levy B, Ioannou YA. Evidence for a Niemann-pick C (NPC) gene family: identification and characterization of NPC1L1. *Genomics*. 2000;65(2):137-45.

385.Sane AT, Sinnott D, Delvin E, Bendayan M, Marcil V, Menard D, et al. Localization and role of NPC1L1 in cholesterol absorption in human intestine. *J Lipid Res*. 2006;47(10):2112-20.

386.Yu L, Bharadwaj S, Brown JM, Ma Y, Du W, Davis MA, et al. Cholesterol-regulated translocation of NPC1L1 to the cell surface facilitates free cholesterol uptake. *J Biol Chem*. 2006;281(10):6616-24.

387.Ge L, Wang J, Qi W, Miao HH, Cao J, Qu YX, et al. The cholesterol absorption inhibitor ezetimibe acts by blocking the sterol-induced internalization of NPC1L1. *Cell Metab*. 2008;7(6):508-19.

388.Jankowski P, Loster M, Kawecka-Jaszcz K. Ezetimibe: New perspectives in lipid lowering treatment. *Cardiol J*. 2007;14(3):232-7.

389.Bays HE, Moore PB, Drehobl MA, Rosenblatt S, Toth PD, Dujovne CA, et al. Effectiveness and tolerability of ezetimibe in patients with primary hypercholesterolemia: pooled analysis of two phase II studies. *Clinical therapeutics*. 2001;23(8):1209-30.

390.Knopp RH, Gitter H, Truitt T, Bays H, Manion CV, Lipka LJ, et al. Effects of ezetimibe, a new cholesterol absorption inhibitor, on plasma lipids in patients with primary hypercholesterolemia. *Eur Heart J*. 2003;24(8):729-41.

391.Wierzbicki AS, Doherty E, Lumb PJ, Chik G, Crook MA. Efficacy of ezetimibe in patients with statin-resistant and statin-intolerant familial hyperlipidaemias. *Curr Med Res Opin*. 2005;21(3):333-8.

392.Kalogirou M, Tsimihodimos V, Elisaf M. Pleiotropic effects of ezetimibe: do they really exist? *Eur J Pharmacol*. 2010;633(1-3):62-70.

393.Simon JS, Karnoub MC, Devlin DJ, Arreaza MG, Qiu P, Monks SA, et al. Sequence variation in NPC1L1 and association with improved LDL-cholesterol lowering in response to ezetimibe treatment. *Genomics*. 2005;86(6):648-56.

394.Dujovne CA, Ettinger MP, McNeer JF, Lipka LJ, LeBeaut AP, Suresh R, et al. Efficacy and safety of a potent new selective cholesterol absorption inhibitor, ezetimibe, in patients with primary hypercholesterolemia. *Am J Cardiol*. 2002;90(10):1092-7.

395.Nakou ES, Filippatos TD, Georgoula M, Kiortsis DN, Tselepis AD, Mikhailidis DP, et al. The effect of orlistat and ezetimibe, alone or in combination, on serum LDL and small dense LDL cholesterol levels in overweight and obese patients with hypercholesterolaemia. *Curr Med Res Opin*. 2008;24(7):1919-29.

396.Gazi IF, Daskalopoulou SS, Nair DR, Mikhailidis DP. Effect of ezetimibe in patients who cannot tolerate statins or cannot get to the low density lipoprotein cholesterol target despite taking a statin. *Curr Med Res Opin.* 2007;23(9):2183-92.

397.Kalogirou M, Tsimihodimos V, Gazi I, Filippatos T, Saougos V, Tselepis AD, et al. Effect of ezetimibe monotherapy on the concentration of lipoprotein subfractions in patients with primary dyslipidaemia. *Curr Med Res Opin.* 2007;23(5):1169-76.

398.Bays HE, Ose L, Fraser N, Tribble DL, Quinto K, Reyes R, et al. A multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled, factorial design study to evaluate the lipid-altering efficacy and safety profile of the ezetimibe/simvastatin tablet compared with ezetimibe and simvastatin monotherapy in patients with primary hypercholesterolemia. *Clinical therapeutics.* 2004;26(11):1758-73.

399.Davidson MH, Ballantyne CM, Kerzner B, Melani L, Sager PT, Lipka L, et al. Efficacy and safety of ezetimibe coadministered with statins: randomised, placebo-controlled, blinded experience in 2382 patients with primary hypercholesterolemia. *International journal of clinical practice.* 2004;58(8):746-55.

400.Melani L, Mills R, Hassman D, Lipetz R, Lipka L, LeBeaut A, et al. Efficacy and safety of ezetimibe coadministered with pravastatin in patients with primary hypercholesterolemia: a prospective, randomized, double-blind trial. *Eur Heart J.* 2003;24(8):717-28.

401.Catapano A, Brady WE, King TR, Palmisano J. Lipid altering-efficacy of ezetimibe co-administered with simvastatin compared with rosuvastatin: a meta-analysis of pooled data from 14 clinical trials. *Curr Med Res Opin.* 2005;21(7):1123-30.

402.Gouni-Berthold I, Berthold HK, Gylling H, Hallikainen M, Giannakidou E, Stier S, et al. Effects of ezetimibe and/or simvastatin on LDL receptor protein expression and on LDL receptor and HMG-CoA reductase gene expression: a randomized trial in healthy men. *Atherosclerosis.* 2008;198(1):198-207.

403.Sudhop T, Lutjohann D, Kodal A, Igel M, Tribble DL, Shah S, et al. Inhibition of intestinal cholesterol absorption by ezetimibe in humans. *Circulation.* 2002;106(15):1943-8.

404.Mikhailidis DP, Wierzbicki AS, Daskalopoulou SS, Al-Saady N, Griffiths H, Hamilton G, et al. The use of ezetimibe in achieving low density lipoprotein lowering goals in clinical practice: position statement of a United Kingdom consensus panel. *Curr Med Res Opin.* 2005;21(6):959-69.

405.Villines TC, Stanek EJ, Devine PJ, Turco M, Miller M, Weissman NJ, et al. The ARBITER 6-HALTS Trial (Arterial Biology for the Investigation of the Treatment Effects of Reducing Cholesterol 6-HDL and LDL Treatment Strategies in Atherosclerosis): final results and the impact of medication adherence, dose, and treatment duration. *J Am Coll Cardiol.* 2010;55(24):2721-6.

406.Kastelein JJ, Akdim F, Stroes ES, Zwinderman AH, Bots ML, Stalenhoef AF, et al. Simvastatin with or without ezetimibe in familial hypercholesterolemia. *N Engl J Med.* 2008;358(14):1431-43.

407.Meaney A, Ceballos G, Asbun J, Solache G, Mendoza E, Vela A, et al. The VYtorin on Carotid intima-media thickness and overall arterial rigidity (VYCTOR) study. *Journal of clinical pharmacology.* 2009;49(7):838-47.

408.Rossebo AB, Pedersen TR, Boman K, Brudi P, Chambers JB, Egstrup K, et al. Intensive lipid lowering with simvastatin and ezetimibe in aortic stenosis. *N Engl J Med.* 2008;359(13):1343-56.

409.Cannon CP, Giugliano RP, Blazing MA, Harrington RA, Peterson JL, Sisk CM, et al. Rationale and design of IMPROVE-IT (IMPROved Reduction of Outcomes: Vytorin Efficacy International Trial): comparison of ezetimibe/simvastatin versus simvastatin monotherapy on cardiovascular outcomes in patients with acute coronary syndromes. *Am Heart J.* 2008;156(5):826-32.

410.Fleg JL, Mete M, Howard BV, Umans JG, Roman MJ, Ratner RE, et al. Effect of statins alone versus statins plus ezetimibe on carotid atherosclerosis in type 2 diabetes: the SANDS (Stop Atherosclerosis in Native Diabetics Study) trial. *J Am Coll Cardiol.* 2008;52(25):2198-205.

411.van der Graaf A, Cuffie-Jackson C, Vissers MN, Trip MD, Gagne C, Shi G, et al. Efficacy and safety of coadministration of ezetimibe and simvastatin in adolescents with heterozygous familial hypercholesterolemia. *J Am Coll Cardiol.* 2008;52(17):1421-9.

412.Ballantyne CM, Weiss R, Moccetti T, Vogt A, Eber B, Sosef F, et al. Efficacy and safety of rosuvastatin 40 mg alone or in combination with ezetimibe in patients at high risk of cardiovascular disease (results from the EXPLORER study). *Am J Cardiol.* 2007;99(5):673-80.

413.Masuda D, Nakagawa-Toyama Y, Nakatani K, Inagaki M, Tsubakio-Yamamoto K, Sandoval JC, et al. Ezetimibe improves postprandial hyperlipidaemia in patients with type IIb hyperlipidaemia. *Eur J Clin Invest.* 2009;39(8):689-98.

414.Gagne C, Gaudet D, Bruckert E, Ezetimibe Study G. Efficacy and safety of ezetimibe coadministered with atorvastatin or simvastatin in patients with homozygous familial hypercholesterolemia. *Circulation.* 2002;105(21):2469-75.

415.Settergren M, Bohm F, Ryden L, Pernow J. Cholesterol lowering is more important than pleiotropic effects of statins for endothelial function in patients with dysglycaemia and coronary artery disease. *Eur Heart J.* 2008;29(14):1753-60.

416.Araujo DB, Bertolami MC, Ferreira WP, Abdalla DS, Faludi AA, Nakamura Y, et al. Pleiotropic effects with equivalent low-density lipoprotein cholesterol reduction: comparative study between simvastatin and simvastatin/ezetimibe coadministration. *Journal of cardiovascular pharmacology.* 2010;55(1):1-5.

417.Olijhoek JK, Hajer GR, van der Graaf Y, Dallinga-Thie GM, Visseren FL. The effects of low-dose simvastatin and ezetimibe compared to high-dose simvastatin alone on post-fat load endothelial function in patients with metabolic syndrome: a randomized double-blind crossover trial. *Journal of cardiovascular pharmacology.* 2008;52(2):145-50.

418.Westerweel PE, Visseren FL, Hajer GR, Olijhoek JK, Hoefler IE, de Bree P, et al. Endothelial progenitor cell levels in obese men with the metabolic syndrome and the effect of simvastatin monotherapy vs. simvastatin/ezetimibe combination therapy. *Eur Heart J.* 2008;29(22):2808-17.

419.Liu PY, Liu YW, Lin LJ, Chen JH, Liao JK. Evidence for statin pleiotropy in humans: differential effects of statins and ezetimibe on rho-associated coiled-coil containing protein kinase activity, endothelial function, and inflammation. *Circulation.* 2009;119(1):131-8.

420.Gounari P, Tousoulis D, Antoniadis C, Kampoli AM, Stougiannos P, Papageorgiou N, et al. Rosuvastatin but not ezetimibe improves endothelial function in patients with heart failure, by mechanisms independent of lipid lowering. *Int J Cardiol.* 2010;142(1):87-91.

421.Caballero AE. Endothelial dysfunction in obesity and insulin resistance: a road to diabetes and heart disease. *Obesity research.* 2003;11(11):1278-89.

422. Staprans I, Pan XM, Rapp JH, Moser AH, Feingold KR. Ezetimibe inhibits the incorporation of dietary oxidized cholesterol into lipoproteins. *J Lipid Res.* 2006;47(11):2575-80.

423. Hussein O, Minasian L, Itzkovich Y, Shestatski K, Solomon L, Zidan J. Ezetimibe's effect on platelet aggregation and LDL tendency to peroxidation in hypercholesterolaemia as monotherapy or in addition to simvastatin. *British journal of clinical pharmacology.* 2008;65(5):637-45.

424. Seedorf U, Engel T, Lueken A, Bode G, Lorkowski S, Assmann G. Cholesterol absorption inhibitor Ezetimibe blocks uptake of oxidized LDL in human macrophages. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004;320(4):1337-41.

425. Gazi IF, Mikhailidis DP. Non-low-density lipoprotein cholesterol-associated actions of ezetimibe: an overview. *Expert opinion on therapeutic targets.* 2006;10(6):851-66.

426. Ballantyne CM, Abate N, Yuan Z, King TR, Palmisano J. Dose-comparison study of the combination of ezetimibe and simvastatin (Vytorin) versus atorvastatin in patients with hypercholesterolemia: the Vytorin Versus Atorvastatin (VYVA) study. *Am Heart J.* 2005;149(3):464-73.

427. Pearson TA, Ballantyne CM, Veltri E, Shah A, Bird S, Lin J, et al. Pooled analyses of effects on C-reactive protein and low density lipoprotein cholesterol in placebo-controlled trials of ezetimibe monotherapy or ezetimibe added to baseline statin therapy. *Am J Cardiol.* 2009;103(3):369-74.

428. Sager PT, Capece R, Lipka L, Strony J, Yang B, Suresh R, et al. Effects of ezetimibe coadministered with simvastatin on C-reactive protein in a large cohort of hypercholesterolemic patients. *Atherosclerosis.* 2005;179(2):361-7.

429. Gagne C, Bays HE, Weiss SR, Mata P, Quinto K, Melino M, et al. for the Ezetimibe Study Group. Efficacy and safety of ezetimibe added to ongoing statin therapy for treatment of patients with primary hypercholesterolemia. *Am J Cardiol.* 2002;90:1084-91.

430. Ballantyne CM, Abate N, Yuan Z, King TR, Palmisano J. Dose-comparison study of the combination of ezetimibe and simvastatin (Vytorin) versus atorvastatin in patients with hypercholesterolemia: the Vytorin Versus Atorvastatin (VYVA) study. *Am Heart J.* 2005;149:464-73.

431. Bays HE, Ose L, Fraser N, Tribble DL, Quinto K, Reyes R, et al.; Ezetimibe Study Group. A multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled, factorial design study to evaluate the lipid-altering efficacy and safety profile of the ezetimibe/simvastatin tablet compared with ezetimibe and simvastatin monotherapy in patients with primary hypercholesterolemia. *Clin Ther.* 2004;26:1758-73.

432. Sager PT, Melani L, Lipka L, Strony J, Yang B, Suresh R, et al. Effect of coadministration of ezetimibe and simvastatin on high-sensitivity C-reactive protein. *Am J Cardiol.* 2003;92:1414-8.

433. Sager PT, Capese R, Lipka L, Strony J, Yang B, Suresh R, et al. Effects of ezetimibe coadministered with simvastatin on C-reactive protein in a large cohort of hypercholesterolemic patients. *Atherosclerosis.* 2005;179:361-7.

434. Ballantyne CM, Hourii J, Notarbartolo A, Melani L, Lipka LJ, Suresh R, et al. Effect of ezetimibe coadministered with atorvastatin in 628 patients with primary hypercholesterolemia: a prospective, randomized, double-blind trial. *Circulation.* 2003;107:2409-15.

435. Al Badarin FJ, Kullo IJ, Kopecky SL, Thomas RJ. Impact of ezetimibe on atherosclerosis: is the jury still out? *Mayo Clin Proc.* 2009;84(4):353-61.

436. Deushi M, Nomura M, Kawakami A, Haraguchi M, Ito M, Okazaki M, et al. Ezetimibe improves liver steatosis and insulin resistance in obese rat model of metabolic syndrome. *FEBS Lett.* 2007;581(29):5664-70.

437. Zheng S, Hoos L, Cook J, Tetzloff G, Davis H, Jr., van Heek M, et al. Ezetimibe improves high fat and cholesterol diet-induced non-alcoholic fatty liver disease in mice. *Eur J Pharmacol.* 2008;584(1):118-24.

438. Nomura M, Ishii H, Kawakami A, Yoshida M. Inhibition of Hepatic Neiman-Pick C1-Like 1 Improves Hepatic Insulin Resistance. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2009;297(5):E1030-8.

439. Nozaki Y, Fujita K, Yoneda M, Wada K, Shinohara Y, Takahashi H, et al. Long-term combination therapy of ezetimibe and acarbose for non-alcoholic fatty liver disease. *J Hepatol.* 2009;51(3):548-56.

440. Hughes EA, Tracey I, Singhal S, Patel J. Unexpected beneficial effect in the use of ezetimibe in non-alcoholic fatty liver disease. *Med Hypotheses.* 2006;67(6):1463-4.

441. Chan DC, Watts GF, Gan SK, Ooi EM, Barrett PH. Effect of ezetimibe on hepatic fat, inflammatory markers, and apolipoprotein B-100 kinetics in insulin-resistant obese subjects on a weight loss diet. *Diabetes Care.* 2010;33(5):1134-9.

442. Enjoji M, Machida K, Kohjima M, Kato M, Kotoh K, Matsunaga K, et al. NPC1L1 inhibitor ezetimibe is a reliable therapeutic agent for non-obese patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Lipids Health Dis.* 2010;9:29.

443. Yoneda M, Fujita K, Nozaki Y, Endo H, Takahashi H, Hosono K, et al. Efficacy of ezetimibe for the treatment of non-alcoholic steatohepatitis: An open-label, pilot study. *Hepatol Res.* 2010;40(6):613-21.

444. Abel T, Feher J, Dinya E, Eldin MG, Kovacs A. Safety and efficacy of combined ezetimibe/simvastatin treatment and simvastatin monotherapy in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Med Sci Monit.* 2009;15(12):MS6-11.

445. Park H, Shima T, Yamaguchi K, Mitsuyoshi H, Minami M, Yasui K, et al. Efficacy of long-term ezetimibe therapy in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Journal of gastroenterology.* 2011;46(1):101-7.

446. Yagi S, Akaike M, Aihara K, Iwase T, Ishikawa K, Yoshida S, et al. Ezetimibe ameliorates metabolic disorders and microalbuminuria in patients with hypercholesterolemia. *J Atheroscler Thromb.* 2010;17(2):173-80.

447. Hiramitsu S, Ishiguro Y, Matsuyama H, Yamada K, Kato K, Noba M, et al. The effects of ezetimibe on surrogate markers of cholesterol absorption and synthesis in Japanese patients with dyslipidemia. *J Atheroscler Thromb.* 2010;17(1):106-14.

448. Dagli N, Yavuzkir M, Karaca I. The effects of high dose pravastatin and low dose pravastatin and ezetimibe combination therapy on lipid, glucose metabolism and inflammation. *Inflammation.* 2007;30(6):230-5.

449. Kielstein JT, Frolich JC, Haller H, Fliser D. ADMA (asymmetric dimethylarginine): an atherosclerotic disease mediating agent in patients with renal disease? *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association.* 2001;16(9):1742-5.

450. Fliser D, Kronenberg F, Kielstein JT, Morath C, Bode-Boger SM, Haller H, et al. Asymmetric dimethylarginine and progression of chronic kidney disease: the mild to moderate kidney disease study. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 2005;16(8):2456-61.

451. Nakamura T, Sato E, Fujiwara N, Kawagoe Y, Ueda Y, Suzuki T, et al. Ezetimibe decreases serum levels of asymmetric dimethylarginine (ADMA) and ameliorates renal injury in non-diabetic chronic kidney disease patients in a cholesterol-independent manner. *Pharmacological research : the official journal of the Italian Pharmacological Society*. 2009;60(6):525-8.

452. Nakamura T, Sato E, Fujiwara N, Kawagoe Y, Ueda Y, Suzuki T, et al. Co-administration of ezetimibe enhances proteinuria-lowering effects of pitavastatin in chronic kidney disease patients partly via a cholesterol-independent manner. *Pharmacological research : the official journal of the Italian Pharmacological Society*. 2010;61(1):58-61.

453. Turk TR, Voropaeva E, Kohnle M, Nurnberger J, Philipp T, Kribben A, et al. Ezetimibe treatment in hypercholesterolemic kidney transplant patients is safe and effective and reduces the decline of renal allograft function: a pilot study. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*. 2008;23(1):369-73.

454. Kostapanos MS, Liamis GL, Milionis HJ, Elisaf MS. Do statins beneficially or adversely affect glucose homeostasis? *Current vascular pharmacology*. 2010;8(5):612-31.

455. Mills EJ, Wu P, Chong G, Ghement I, Singh S, Akl EA, et al. Efficacy and safety of statin treatment for cardiovascular disease: a network meta-analysis of 170,255 patients from 76 randomized trials. *QJM : monthly journal of the Association of Physicians*. 2011;104(2):109-24.

456. Baker WL, Talati R, White CM, Coleman CI. Differing effect of statins on insulin sensitivity in non-diabetics: a systematic review and meta-analysis. *Diabetes research and clinical practice*. 2010;87(1):98-107.

457. Kostapanos MS, Milionis HJ, Agouridis AD, Rizos CV, Elisaf MS. Rosuvastatin treatment is associated with an increase in insulin resistance in hyperlipidaemic patients with impaired fasting glucose. *International journal of clinical practice*. 2009;63(9):1308-13.

458. Rizos CV, Milionis HJ, Kostapanos MS, Florentin M, Kostara CE, Elisaf MS, et al. Effects of rosuvastatin combined with olmesartan, irbesartan, or telmisartan on indices of glucose metabolism in Greek adults with impaired fasting glucose, hypertension, and mixed hyperlipidemia: a 24-week, randomized, open-label, prospective study. *Clinical therapeutics*. 2010;32(3):492-505.

459. Thongtang N, Ai M, Otokozawa S, Himbergen TV, Asztalos BF, Nakajima K, et al. Effects of maximal atorvastatin and rosuvastatin treatment on markers of glucose homeostasis and inflammation. *Am J Cardiol*. 2011;107(3):387-92.

460. Kostapanos MS, Milionis HJ, Filippatos TD, Nakou ES, Bairaktari ET, Tselepis AD, et al. A 12-week, prospective, open-label analysis of the effect of rosuvastatin on triglyceride-rich lipoprotein metabolism in patients with primary dyslipidemia. *Clinical therapeutics*. 2007;29(7):1403-14.

461. Her AY, Kim JY, Kang SM, Choi D, Jang Y, Chung N, et al. Effects of atorvastatin 20 mg, rosuvastatin 10 mg, and atorvastatin/ezetimibe 5 mg/5 mg on lipoproteins and glucose metabolism. *J Cardiovasc Pharmacol Ther*. 2010;15(2):167-74.

462. Anagnostis P, Selalmatzidou D, Polyzos SA, Panagiotou A, Slavakis A, Panagiotidou A, et al. Comparative effects of rosuvastatin and atorvastatin on glucose metabolism and adipokine levels in non-diabetic patients with dyslipidaemia: a prospective randomised open-label study. *International journal of clinical practice*. 2011;65(6):679-83.

463. Collins R, Armitage J, Parish S, Sleight P, Peto R, Heart Protection Study Collaborative G. MRC/BHF Heart Protection Study of cholesterol-lowering with simvastatin in 5963 people with diabetes: a randomised placebo-controlled trial. *Lancet*. 2003;361(9374):2005-16.

464. Forst T, Pfutzner A, Lubben G, Weber M, Marx N, Karagiannis E, et al. Effect of simvastatin and/or pioglitazone on insulin resistance, insulin secretion, adiponectin, and proinsulin levels in nondiabetic patients at cardiovascular risk--the PIOSTAT Study. *Metabolism: clinical and experimental*. 2007;56(4):491-6.

465. Bulcao C, Giuffrida FM, Ribeiro-Filho FF, Ferreira SR. Are the beneficial cardiovascular effects of simvastatin and metformin also associated with a hormone-dependent mechanism improving insulin sensitivity? *Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas / Sociedade Brasileira de Biofisica [et al]*. 2007;40(2):229-35.

466. Jula A, Marniemi J, Huupponen R, Virtanen A, Rastas M, Ronnema T. Effects of diet and simvastatin on serum lipids, insulin, and antioxidants in hypercholesterolemic men: a randomized controlled trial. *JAMA : the journal of the American Medical Association*. 2002;287(5):598-605.

467. Koh KK, Quon MJ, Han SH, Lee Y, Ahn JY, Kim SJ, et al. Simvastatin improves flow-mediated dilation but reduces adiponectin levels and insulin sensitivity in hypercholesterolemic patients. *Diabetes care*. 2008;31(4):776-82.

468. Chamberlain LH. Inhibition of isoprenoid biosynthesis causes insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes. *FEBS letters*. 2001;507(3):357-61.

469. Li G, Regazzi R, Roche E, Wollheim CB. Blockade of mevalonate production by lovastatin attenuates bombesin and vasopressin potentiation of nutrient-induced insulin secretion in HIT-T15 cells. Probable involvement of small GTP-binding proteins. *The Biochemical journal*. 1993;289 (Pt 2):379-85.

470. Yada T, Nakata M, Shiraishi T, Takei M. Inhibition by simvastatin, but not pravastatin, of glucose-induced cytosolic Ca²⁺ signalling and insulin secretion due to blockade of L-type Ca²⁺ channels in rat islet beta-cells. *British journal of pharmacology*. 1999;126(5):1205-13.

471. Kater AL, Batista MC, Ferreira SR. Improved endothelial function with simvastatin but unchanged insulin sensitivity with simvastatin or ezetimibe. *Metabolism: clinical and experimental*. 2010;59(6):921-6.

472. Athyros VG, Elisaf M, Papageorgiou AA, Symeonidis AN, Pehlivanidis AN, Bouloukos VI, et al. Effect of statins versus untreated dyslipidemia on serum uric acid levels in patients with coronary heart disease: a subgroup analysis of the GREek Atorvastatin and Coronary-heart-disease Evaluation (GREACE) study. *Am J Kidney Dis*. 2004;43(4):589-99.

473. Hoeggen A, Alderman MH, Kjeldsen SE, Julius S, Devereux RB, De Faire U, et al. The impact of serum uric acid on cardiovascular outcomes in the LIFE study. *Kidney Int*. 2004;65(3):1041-9.

474. Brodov Y, Behar S, Boyko V, Chouraqui P. Effect of the metabolic syndrome and hyperuricemia on outcome in patients with coronary artery disease (from the Bezafibrate Infarction Prevention Study). *Am J Cardiol*. 2010;106(12):1717-20.

475. Coutinho Tde A, Turner ST, Peyser PA, Bielak LF, Sheedy PF, 2nd, Kullo IJ. Associations of serum uric acid with markers of inflammation, metabolic syndrome, and subclinical coronary atherosclerosis. *Am J Hypertens*. 2007;20(1):83-9.

476. Tsouli SG, Liberopoulos EN, Mikhailidis DP, Athyros VG, Elisaf MS. Elevated serum uric acid levels in metabolic syndrome: an active component or an innocent bystander? *Metabolism*. 2006;55(10):1293-301.

477. Lopez-Cuenca A, Roldan V, Marin F. Hypouricemic effect of statins: another pleiotropic benefit? *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2010;139(5):1358-9.

478. Kakafika A, Tsimihodimos V, Elisaf M. Effect of atorvastatin on serum uric acid levels. *Atherosclerosis*. 2001;158(1):255.

479. Milionis HJ, Kakafika AI, Tsouli SG, Athyros VG, Bairaktari ET, Seferiadis KI, et al. Effects of statin treatment on uric acid homeostasis in patients with primary hyperlipidemia. *Am Heart J*. 2004;148(4):635-40.

480. Saku K, Zhang B, Noda K. Randomized head-to-head comparison of pitavastatin, atorvastatin, and rosuvastatin for safety and efficacy (quantity and quality of LDL): the PATROL trial. *Circ J*. 2011;75(6):1493-505.

481. Athyros VG, Karagiannis A, Ganotakis ES, Paletas K, Nicolaou V, Bacharoudis G, et al. Association between the changes in renal function and serum uric acid levels during multifactorial intervention and clinical outcome in patients with metabolic syndrome. A post hoc analysis of the ATTEMPT study. *Curr Med Res Opin*. 2011;27(8):1659-68.

482. Ogata N, Fujimori S, Oka Y, Kaneko K. Effects of three strong statins (atorvastatin, pitavastatin, and rosuvastatin) on serum uric acid levels in dyslipidemic patients. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*. 2010;29(4-6):321-4.

483. Youssef F, Gupta P, Seifalian AM, Myint F, Mikhailidis DP, Hamilton G. The effect of short-term treatment with simvastatin on renal function in patients with peripheral arterial disease. *Angiology*. 2004;55(1):53-62.

484. Yoo TW, Sung KC, Shin HS, Kim BJ, Kim BS, Kang JH, et al. Relationship between serum uric acid concentration and insulin resistance and metabolic syndrome. *Circ J*. 2005;69(8):928-33.

485. Moutzouri E, Liberopoulos E, Mikhailidis DP, Kostapanos MS, Kei AA, Milionis H, et al. Comparison of the effects of simvastatin vs. rosuvastatin vs. simvastatin/ezetimibe on parameters of insulin resistance. *Int J Clin Pract*. 2011;65(11):1141-8.

486. Athyros VG, Mikhailidis DP, Liberopoulos EN, Kakafika AI, Karagiannis A, Papageorgiou AA, et al. Effect of statin treatment on renal function and serum uric acid levels and their relation to vascular events in patients with coronary heart disease and metabolic syndrome: a subgroup analysis of the GREEK Atorvastatin and Coronary heart disease Evaluation (GREACE) Study. *Nephrol Dial Transplant*. 2007;22(1):118-27.

487. Kostapanos MS, Liberopoulos EN, Elisaf MS. Statin pleiotropy against renal injury. *J Cardiometab Syndr*. 2009;4(1):E4-9.

488. Campese VM, Ku E, Bigazzi R, Bianchi S. Do HMG-CoA reductase inhibitors improve kidney function? The saga continues. *J Nephrol*. 2011;24(5):550-3.

489. Shepherd J, Kastelein JJ, Bittner V, Deedwania P, Breazna A, Dobson S, et al. Effect of intensive lipid lowering with atorvastatin on renal function in patients with coronary heart disease: the Treating to New Targets (TNT) study. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2007;2(6):1131-9.

490. Ridker PM, MacFadyen J, Cressman M, Glynn RJ. Efficacy of rosuvastatin among men and women with moderate chronic kidney disease and elevated high-sensitivity C-reactive protein: a secondary analysis from the JUPITER (Justification for the Use of Statins in Prevention-an Intervention Trial Evaluating Rosuvastatin) trial. *J Am Coll Cardiol*. 2010;55(12):1266-73.

491. PLANET I and II: Atorvastatin beats rosuvastatin for protecting kidneys in diabetic and nondiabetic patients. [cited 2010 November 6]; Available from: <http://www.theheart.org/article/1095269.do>.

492. Migdalis I, Efthimiadis A, Pappas S, Alexopoulos D, Vlasserou F, Mikhailidis DP. Clinical experience with ezetimibe/simvastatin in a Mediterranean population. *Curr Med Res Opin*. 2009;25(10):2571-6.

493. Ridker PM, Brown NJ, Vaughan DE, Harrison DG, Mehta JL. Established and emerging plasma biomarkers in the prediction of first atherothrombotic events. *Circulation*. 2004;109(25 Suppl 1):IV6-19.

494. Roberts LJ, Morrow JD. Measurement of F(2)-isoprostanes as an index of oxidative stress in vivo. *Free Radic Biol Med*. 2000;28(4):505-13.

495. Vassalle C, Petrozzi L, Botto N, Andreassi MG, Zucchelli GC. Oxidative stress and its association with coronary artery disease and different atherogenic risk factors. *J Intern Med*. 2004;256(4):308-15.

496. Moutzouri E, Tsimihodimos V, Tselepis AD. Inflammatory biomarkers and cardiovascular risk assessment. Current knowledge and future perspectives. *Curr Pharm Des*. 2013;19(21):3827-40.

497. Lemos PA, Serruys PW, de Feyter P, Mercado NF, Goedhart D, Saia F, et al. Long-term fluvastatin reduces the hazardous effect of renal impairment on four-year atherosclerotic outcomes (a LIPS substudy). *Am J Cardiol*. 2005;95(4):445-51.

498. Kostapanos MS, Milionis HJ, Elisaf MS. An overview of the extra-lipid effects of rosuvastatin. *J Cardiovasc Pharmacol Ther*. 2008;13(3):157-74.

499. McKenney JM. Pharmacologic characteristics of statins. *Clin Cardiol*. 2003;26(4 Suppl 3):III32-8.

500. Sakamoto T, Kojima S, Ogawa H, Shimomura H, Kimura K, Ogata Y, et al. Usefulness of hydrophilic vs lipophilic statins after acute myocardial infarction: subanalysis of MUSASHI-AMI. *Circ J*. 2007;71(9):1348-53.

501. Kai T, Arima S, Taniyama Y, Nakabou M, Kanamasa K. Comparison of the effect of lipophilic and hydrophilic statins on serum adiponectin levels in patients with mild hypertension and dyslipidemia: Kinki Adiponectin Interventional (KAI) Study. *Clin Exp Hypertens*. 2008;30(7):530-40.

502. Kim MC, Ahn Y, Jang SY, Cho KH, Hwang SH, Lee MG, et al. Comparison of clinical outcomes of hydrophilic and lipophilic statins in patients with acute myocardial infarction. *Korean J Intern Med*. 2011;26(3):294-303.

503. Ford JS, Tayek JA. Lipophilicity and cardiovascular outcome in patients with CHF. *Am Heart J*. 2008;156(2):e7; author reply e9.

504.Tavridou A, Efthimiadis A, Efthimiadis I, Manolopoulos VG. Simvastatin-induced changes in circulating oxidized low-density lipoprotein in different types of dyslipidemia. *Heart Vessels*. 2010;25(4):288-93.

505.Puccetti L, Santilli F, Pasqui AL, Lattanzio S, Liani R, Ciani F, et al. Effects of atorvastatin and rosuvastatin on thromboxane-dependent platelet activation and oxidative stress in hypercholesterolemia. *Atherosclerosis*. 2011;214(1):122-8.

506.Agouridis AP, Tsimihodimos V, Filippatos TD, Dimitriou AA, Tellis CC, Elisaf MS, et al. The effects of rosuvastatin alone or in combination with fenofibrate or omega 3 fatty acids on inflammation and oxidative stress in patients with mixed dyslipidemia. *Expert Opin Pharmacother*. 2011;12(17):2605-11.

507.Kostapanos MS, Elisaf MS, Mikhailidis DP. Ezetimibe - a new approach in hypercholesterolemia management. *Pharmacol Rep*. 2012;64(4):997-8.

508.Kalogirou M, Tsimihodimos V, Elisaf M. Pleiotropic effects of ezetimibe: do they really exist? *Eur J Pharmacol*.633(1-3):62-70.

509.Moutzouri E, Tellis CC, Rousouli K, Liberopoulos EN, Milionis HJ, Elisaf MS, et al. Effect of simvastatin or its combination with ezetimibe on Toll-like receptor expression and lipopolysaccharide - induced cytokine production in monocytes of hypercholesterolemic patients. *Atherosclerosis*. 2012;225(2):381-7.

510.Kostapanos MS, Spyrou AT, Tellis CC, Gazi IF, Tselepis AD, Elisaf M, et al. Ezetimibe treatment lowers indicators of oxidative stress in hypercholesterolemic subjects with high oxidative stress. *Lipids*. 2011;46(4):341-8.

511.Yamamoto K, Shibayama S, Takeshita K, Kojima T, Takamatsu J. A novel cholesterol absorption inhibitor, ezetimibe, decreases adipose-derived and vascular PAI-1 expression in vivo. *Thrombosis research*. 2009;124(5):644-5.

512.Kurobe H, Aihara K, Higashida M, Hirata Y, Nishiya M, Matsuoka Y, et al. Ezetimibe monotherapy ameliorates vascular function in patients with hypercholesterolemia through decreasing oxidative stress. *J Atheroscler Thromb*. 2011;18(12):1080-9.

513.Azar RR, Badaoui G, Sarkis A, Azar M, Aydanian H, Harb S, et al. Effect of ezetimibe/atorvastatin combination on oxidized low density lipoprotein cholesterol in patients with coronary artery disease or coronary artery disease equivalent. *Am J Cardiol*. 2010;106(2):193-7.

514.Pesaro AE, Serrano CV, Jr., Fernandes JL, Cavalcanti AB, Campos AH, Martins HS, et al. Pleiotropic effects of ezetimibe/simvastatin vs. high dose simvastatin. *Int J Cardiol*. 2012;158(3):400-4.

515.Uemura Y, Watarai M, Ishii H, Koyasu M, Takemoto K, Yoshikawa D, et al. Atorvastatin 10 mg plus ezetimibe 10mg compared with atorvastatin 20 mg: impact on the lipid profile in Japanese patients with abnormal glucose tolerance and coronary artery disease. *J Cardiol*. 2012;59(1):50-6.

516.Undas A, Machnik A, Potaczek DP, Wypasek E, Zmudka K, Tracz W. Ezetimibe combined with simvastatin compared with simvastatin alone results in a greater suppression of oxidative stress and enhanced fibrinolysis in patients after acute coronary events. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2011;58(2):167-72.

517.Lee SH, Kang SM, Park S, Jang Y, Chung N, Choi D. The effects of statin monotherapy and low-dose statin/ezetimibe on lipoprotein-associated phospholipase A(2). *Clin Cardiol*. 2011;34(2):108-12.

- 518.Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature*. 2002;420(6917):868-74.
- 519.Packard RR, Lichtman AH, Libby P. Innate and adaptive immunity in atherosclerosis. *Semin Immunopathol*. 2009;31(1):5-22.
- 520.Billack B. Macrophage activation: role of toll-like receptors, nitric oxide, and nuclear factor kappa B. *Am J Pharm Educ*. 2006;70(5):102.
- 521.Ghanim H, Mohanty P, Deopurkar R, Sia CL, Korzeniewski K, Abuaysheh S, et al. Acute modulation of toll-like receptors by insulin. *Diabetes Care*. 2008;31(9):1827-31.
- 522.Dasu MR, Devaraj S, Park S, Jialal I. Increased Toll-like Receptor activation and TLR ligands in Recently Diagnosed Type 2 diabetes Subjects. *Diabetes Care*.
- 523.Dasu MR, Devaraj S, Zhao L, Hwang DH, Jialal I. High glucose induces toll-like receptor expression in human monocytes: mechanism of activation. *Diabetes*. 2008;57(11):3090-8.
- 524.Devaraj S, Dasu MR, Park SH, Jialal I. Increased levels of ligands of Toll-like receptors 2 and 4 in type 1 diabetes. *Diabetologia*. 2009;52(8):1665-8.
- 525.Ghanim H, Abuaysheh S, Sia CL, Korzeniewski K, Chaudhuri A, Fernandez-Real JM, et al. Increase in plasma endotoxin concentrations and the expression of Toll-like receptors and suppressor of cytokine signaling-3 in mononuclear cells after a high-fat, high-carbohydrate meal: implications for insulin resistance. *Diabetes Care*. 2009;32(12):2281-7.
- 526.Deopurkar R, Ghanim H, Friedman J, Abuaysheh S, Sia CL, Mohanty P, et al. Differential effects of cream, glucose, and orange juice on inflammation, endotoxin, and the expression of Toll-like receptor-4 and suppressor of cytokine signaling-3. *Diabetes Care*. 2010;33(5):991-7.
- 527.Alves-Filho JC, Cunha FQ. Modulation of toll-like receptor expression: a further effect of statins? *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2006;26(7):e128.
- 528.Hodgkinson CP, Ye S. Statins inhibit toll-like receptor 4-mediated lipopolysaccharide signaling and cytokine expression. *Pharmacogenet Genomics*. 2008;18(9):803-13.
- 529.Chansrichavala P, Chantharaksri U, Sritara P, Chaiyaroj SC. Atorvastatin attenuates TLR4-mediated NF-kappaB activation in a MyD88-dependent pathway. *Asian Pac J Allergy Immunol*. 2009;27(1):49-57.
- 530.Methe H, Kim JO, Kofler S, Nabauer M, Weis M. Statins decrease Toll-like receptor 4 expression and downstream signaling in human CD14+ monocytes. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005;25(7):1439-45.
- 531.Wang Y, Zhang MX, Meng X, Liu FQ, Yu GS, Zhang C, et al. Atorvastatin suppresses LPS-induced rapid upregulation of Toll-like receptor 4 and its signaling pathway in endothelial cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2011;300(5):H1743-52.
- 532.Teusch N, Lombardo E, Eddleston J, Knaus UG. The low molecular weight GTPase RhoA and atypical protein kinase Czeta are required for TLR2-mediated gene transcription. *J Immunol*. 2004;173(1):507-14.
- 533.Oda K, Kitano H. A comprehensive map of the toll-like receptor signaling network. *Mol Syst Biol*. 2006;2:2006 0015.
- 534.Curtiss LK, Tobias PS. The toll of Toll-like receptors, especially toll-like receptor 2, on murine atherosclerosis. *Curr Drug Targets*. 2007;8(12):1230-8.

535.Lin H, Xiao Y, Chen G, Fu D, Ye Y, Liang L, et al. HMG-CoA reductase inhibitor simvastatin suppresses Toll-like receptor 2 ligand-induced activation of nuclear factor kappa B by preventing RhoA activation in monocytes from rheumatoid arthritis patients. *Rheumatol Int.* 2011;31(11):1451-8.

536.Niessner A, Steiner S, Speidl WS, Pleiner J, Seidinger D, Maurer G, et al. Simvastatin suppresses endotoxin-induced upregulation of toll-like receptors 4 and 2 in vivo. *Atherosclerosis.* 2006;189(2):408-13.

537.Guyton JR, Betteridge DJ, Farnier M, Leiter LA, Lin J, Shah A, et al. Achievement of recommended lipid and lipoprotein levels with combined ezetimibe/statin therapy versus statin alone in patients with and without diabetes. *Diab Vasc Dis Res.* 2011;8(2):160-72.

538.Pesaro AE, Serrano CV, Jr., Fernandes JL, Cavalcanti AB, Campos AH, Martins HS, et al. Pleiotropic effects of ezetimibe/simvastatin vs. high dose simvastatin. *Int J Cardiol. Int J Cardiol.* 2012;158(3):400-4.

539.Krysiak R, Zmuda W, Okopien B. The effect of ezetimibe, administered alone or in combination with simvastatin, on lymphocyte cytokine release in patients with elevated cholesterol levels. *J Intern Med.* 2012;271(1):32-42.

540.Florentin M, Liberopoulos EN, Moutzouri E, Rizos CV, Tselepis AD, Elisaf MS. The effect of simvastatin alone versus simvastatin plus ezetimibe on the concentration of small dense low-density lipoprotein cholesterol in subjects with primary hypercholesterolemia. *Curr Med Res Opin.* 2011;27(3):685-92.

541.Lee SH, Kang SM, Park S, Jang Y, Chung N, Choi D. The effects of statin monotherapy and low-dose statin/ezetimibe on lipoprotein-associated phospholipase A. *Clin Cardiol.* 2011;34(2):108-12.

542.Nakou ES, Filippatos TD, Kiortsis DN, Derdemezis CS, Tselepis AD, Mikhailidis DP, et al. The effects of ezetimibe and orlistat, alone or in combination, on high-density lipoprotein (HDL) subclasses and HDL-associated enzyme activities in overweight and obese patients with hyperlipidaemia. *Expert Opin Pharmacother.* 2008;9(18):3151-8.

543.Guha M, Mackman N. LPS induction of gene expression in human monocytes. *Cell Signal.* 2001;13(2):85-94.

544.Akira S, Takeda K. Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol.* 2004;4(7):499-511.

545.Schnare M, Barton GM, Holt AC, Takeda K, Akira S, Medzhitov R. Toll-like receptors control activation of adaptive immune responses. *Nat Immunol.* 2001;2(10):947-50.

546.Tedgui A, Mallat Z. Cytokines in atherosclerosis: pathogenic and regulatory pathways. *Physiol Rev.* 2006;86(2):515-81.

547.Erridge C, Spickett CM. Oxidised phospholipid regulation of Toll-like receptor signalling. *Redox Rep.* 2007;12(1):76-80.

548.Tsimikas S. Oxidative biomarkers in the diagnosis and prognosis of cardiovascular disease. *Am J Cardiol.* 2006;98(11A):9P-17P.

549.Marson A, Lawn RM, Mikita T. Oxidized low density lipoprotein blocks lipopolysaccharide-induced interferon beta synthesis in human macrophages by interfering with IRF3 activation. *J Biol Chem.* 2004;279(27):28781-8.

550.Oskolkova OV, Afonyushkin T, Preinerstorfer B, Bicker W, von Schlieffen E, Hainzl E, et al. Oxidized phospholipids are more potent antagonists of lipopolysaccharide than inducers of inflammation. *J Immunol.*185(12):7706-12.

551.Takemoto M, Liao JK. Pleiotropic effects of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase inhibitors. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2001;21(11):1712-9.

552.Diomede L, Albani D, Sottocorno M, Donati MB, Bianchi M, Fruscella P, et al. In vivo anti-inflammatory effect of statins is mediated by nonsterol mevalonate products. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2001;21(8):1327-32.

553.Nochioka K, Tanaka SI, Miura M, Zhulanqigige DE, Fukumoto Y, Shiba N, et al. Ezetimibe Improves Endothelial Function and Inhibits Rho-Kinase Activity Associated With Inhibition of Cholesterol Absorption in Humans. *Circ J.* 2012.

