



Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

Σχολή Θετικών Επιστημών

Τμήμα Χημείας

Δ.Π.Μ.Σ «ΙΑΤΡΙΚΗ ΧΗΜΕΙΑ»

“Ο ρόλος της PCSK9 στην ενεργοποίηση των ενδοθηλιακών κυττάρων HUVECs, και των μονοκυττάρων περιφερικού αίματος από τροποποιημένες μορφές λιποπρωτεϊνών”

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΤΟΥΡΝΟΓΛΟΥ ΜΑΡΙΑ

A.M: 289

ΙΩΑΝΝΙΝΑ, 2024

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:

Επιβλέπων:

Τέλλης Κωνσταντίνος, Μέλος Εργαστηριακού Διδακτικού Προσωπικού (ΕΔΙΠ) Τομέα Οργανικής Χημείας και Βιοχημείας, Τμήματος Χημείας, Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Μέλη:

Τσελέπης Αλέξανδρος, Ομότιμος Καθηγητής Βιοχημείας-Κλινικής Χημείας, Τμήματος Χημείας, Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Χατζημιχαήλ Ελευθερία, Επίκουρη Καθηγήτρια Τομέα Παθολογίας, Τμήματος Ιατρικής, Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

ΠΡΟΛΟΓΟΣ – ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή εκπονήθηκε στο Ερευνητικό Κέντρο Αθηροθρόμβωσης/Ερευνητικό Εργαστήριο Λιπιδίων και Λιποπρωτεϊνών, στον Τομέα Οργανικής Χημείας και Βιοχημείας, του Τμήματος Χημείας, του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, στο πλαίσιο του ΔΠΜΣ «Ιατρική Χημεία», κατά την περίοδο Οκτωβρίου 2021 – Ιουνίου 2024.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον επιβλέποντα καθηγητή μου κ. Τέλλη Κωνσταντίνο που μου έδωσε τη δυνατότητα να συνεργαστώ μαζί του και για όλη την καθοδήγηση και τις συμβουλές που μου παρείχε καθ' όλη τη διάρκεια των σπουδών μου. Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Τσελέπη Αλέξανδρο, για τη βοήθειά του και τις πολύτιμες γνώσεις που μου μετέδωσε, καθώς και την κ. Χατζημιχαήλ Ελευθερία, η οποία δέχθηκε να είναι μέλος της τριμελούς επιτροπής του μεταπτυχιακού μου.

Ακόμα, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τους συναδέλφους μου, την διδάκτωρ Αικατερίνη Τσούκα, την υποψήφια διδάκτωρ Λουίζα Πεχλιβάνη, τον υποψήφιο διδάκτωρ Ιωάννη Κουτσαλιάρη και την μεταπτυχιακή φοιτήτρια Κωνσταντίνα Καραβασίλη, για την πολύτιμη βοήθεια τους και καθοδήγηση καθ' όλη τη διάρκεια της διατριβής μου. Θα ήθελα, επίσης, να τους ευχαριστήσω για την εκμάθηση των εργαστηριακών τεχνικών, την υπομονή και την υποστήριξή τους.

Τέλος, δε θα μπορούσα να μην ευχαριστήσω τους γονείς μου, Γεώργιο και Δήμητρα, για τη στήριξη και την αγάπη που μου έδειξαν όλα αυτά τα χρόνια. Χωρίς αυτούς, δε θα είχα καταφέρει να πραγματοποιήσω τους στόχους μου.

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ

- ACE: μετατρεπτικό ένζυμο αγγειοτενσίνης (Angiotensin Converting Enzyme)
- AP-1: ενεργοποιητική πρωτεΐνη-1 (Activator Protein 1)
- ApoA-I/II: απολιποπρωτεΐνη A τύπου I και II (Apolipoprotein A type I and II)
- Apo-B: απολιποπρωτεΐνη B (Apolipoprotein B)
- ApoB-100: απολιποπρωτεΐνη 100 (Apolipoprotein 100)
- ApoER2: υποδοχέας απολιποπρωτεΐνης E2 (Apolipoprotein E Receptor 2)
- ASCVD: αθηροσκληρωτική καρδιαγγειακή νόσος (Atherosclerotic Cardiovascular Disease)
- BAD: σχετιζόμενος με BCL2 αγωνιστής κυτταρικού θανάτου (Bcl-2 Associated Agonist of Cell Death)
- BAX: Bcl-2-like Protein 4
- Bcl-2: B-cell Lymphoma 2
- bFGF: basic Fibroblast Growth Factor
- BH₄: τετραϋδροβιοπτερίνη (Tetrahydrobiopterin)
- BSA: αλβουμίνη βόειου ορού (Bovine Serum Albumin)
- CAD: στεφανιαία νόσος (Coronary Artery Disease)
- CCR2: C-C Chemokine Receptor type 2
- CD36: cluster of differentiation-36
- CE: εστέρας χοληστερόλης (Cholesterol Ester)
- CM: χυλομικρό (Chylomicron)
- CVD: καρδιαγγειακή πάθηση (Cardiovascular Disease)
- DC: δενδριτικό κύτταρο (Dendritic Cell)
- DMSO: διμεθυλοσουλφοξείδιο (Dimethyl Sulfoxide)
- D-PBS: Dulbecco's Phosphate Bufferd Saline
- EC: ενδοθηλιακό κύτταρο (Endothelial Cell)
- ECGS: αυξητικό συμπλήρωμα ενδοθηλιακών κυττάρων (Endothelial Cell Growth Supplement)
- ECM: υποενδοθηλιακή εξωκυττάρια μήτρα (Extracellular Matrix)

- ED: ενδοθηλιακή δυσλειτουργία (Endothelial Dysfunction)
- EDTA: αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ (Ethylenediaminetetraacetic Acid)
- EGF: Epidermal Growth Factor
- EGF-A: επιδερμικός αυξητικός παράγοντας A (Epidermal Growth Factor A)
- eNOS: ενδοθηλιακή συνθάση του NO (Endothelial Nitric Oxide Synthase)
- ER: ενδοπλασματικό δίκτυο (Endoplasmic Reticulum)
- ET-1: ενδιθηλίνη-1 (Endothelin-1)
- FBS: θερμικά ενεργοποιημένος ορός εμβρύου βοδιού (Heat Activated Fetal Bovine Serum)
- FOXO3: Forkheadbox O3
- FR: ελεύθερη ρίζα (Free Radical)
- GL: γλυκερολιπίδιο (Glycerolipid)
- GPL: γλυκεροφωσφολιπίδιο (Glycerophospholipid)
- HDL: υψηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνη (High Density Lipoprotein)
- HNF1A: ηπατικός πυρηνικός παράγοντας 1A (Hepatocyte Nuclear Factor 1 Homebox A)
- HSC: αιμοποιητικό βλαστοκύτταρο (Hematopoietic Stem Cell)
- HUVEC: ανθρώπινο ενδοθηλιακό κύτταρο ομφάλιου λώρου (Human Umbilical Vein Endothelial Cell)
- ICAM-1: διακυτταρικό μόριο προσκόλλησης 1 (Intercellular Adhesion Molecule 1)
- IDL: λιποπρωτεΐνη ενδιάμεσης πυκνότητας (Intermediate Density Lipoprotein)
- IGD-1: αυξητικός παράγοντας ομοιάζων στην ινσουλίνη-1 (Insulin-like Growth Factor 1)
- IL-1: ιντερλευκίνη-1 (Interleukin-1)
- IL-1β: ιντερλευκίνη-1β (Interleukin-1 beta)
- IL-6: ιντερλευκίνη-6 (Interleukin-6)
- JNK: C-Jun N-terminal Kinase
- LDL: λιποπρωτεΐνη χαμηλής πυκνότητας (Low-Density Lipoprotein)
- LDL-C: χοληστερόλη λιποπρωτεΐνης χαμηλής πυκνότητας (Low-Density Lipoprotein Cholesterol)
- LDLR: υποδοχέας λιποπρωτεΐνης χαμηλής πυκνότητας (Low-Density Lipoprotein Receptor)
- LOX-1: υποδοχέας της Ox-LDL που μοιάζει με τη λεκτίνη (Lectin-like Oxidized Low-Density Lipoprotein Receptor 1)

- LPS: λιποπολυσακχαρίτης (Lipopolysaccharide)
- LRP1: υποδοχέας λιποπρωτεΐνης χαμηλής πυκνότητας 1 (Low-Density Lipoprotein Receptor 1)
- MAPK: ενεργοποιημένη από μιτογόνο πρωτεϊνική κινάση (Mitogen-Activated Protein Kinase)
- MCP-1: χημειοτακτική πρωτεΐνη-1 των μονοκυττάρων (Monocyte Chemoattractant Protein 1)
- mCSF: παράγοντας διέγερσης αποικίας μονοκυττάρων (Microphage Colony-Stimulating Factor)
- MDA: μηλονική διαλδεΰδη (Bis Dimethyl Acetal)
- MM-LDL: ελάχιστα οξειδωμένη λιποπρωτεΐνη χαμηλής πυκνότητας (Minimally Modified Low-Density Lipoprotein)
- MMP: μεταλλοπρωτεΐνάση (Metalloproteinase)
- MSR: υποδοχέας εκκαθαριστής των μακροφάγων (Macrophage Scavenger Receptor)
- MyD88: μυελώδης παράγοντας διαφοροποίησης 88 (Myeloid Differentiation primary response 88)
- NADPH: οξειδάση του δινουκλεοτιδικού φωσφορικού νικοτιναμιδίου αδενίνης (Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate)
- NARC1: ρυθμιζόμενη από νευρωνική απόπτωση κομβερτάση 1 (Neural Apoptosis-Regulated Convertase 1)
- NF-κB: πυρηνικός παράγοντας-ελαφράς-αλύσου-ενισχυτής ενεργοποιημένων B κυττάρων (Nuclear Factor Kappa-light-chain-enhancer of activated B cells)
- NO: μονοξείδιο του αζώτου (Nitric Oxide)
- Ox-HDL: οξειδωμένη λιποπρωτεΐνη υψηλής πυκνότητας (Oxidized High Density Lipoprotein)
- Ox-LDL: οξειδωμένη λιποπρωτεΐνη χαμηλής πυκνότητας (Oxidized Low-Density Lipoprotein)
- PAF-AH: ακετυλο-υδρολάση του παράγοντα ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων (Platelet-Activating Factor-Acetylhydrolase)
- PBS: ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών και φυσιολογικού ορού (Phosphate Bufferd Saline)

- PC: πρωτεΐνη κονβερτάση (Protein Convertase)
- PCSK9: προ-πρωτεΐνη κονβερτάση σουμπτιλισίνη/κεξίνη τύπου 9 (Proprotein Convertase Subtilisin/Kexin type 9)
- PDGF: αυξητικός παράγοντας των αιμοπεταλίων (Platelet-Derived Growth Factor)
- PON: παραοξονάση (Paraoxonase)
- PPAR α / γ : ενεργοποιημένος υποδοχέας πολλαπλασιασμού υπεροξεισωμάτων α και γ (Peroxisome Proliferator-Activated Receptor α and γ)
- RCT: αντίστροφη μεταφορά χοληστερόλης (Reverse Cholesterol Transport)
- ROS: δραστικές μορφές οξυγόνου (Reactive Oxygen Species)
- siRNA: μικρό παρεμβατικό RNA (Small Interfering RNA)
- SMC: λείο μυϊκό κύτταρο (Smooth Muscle Cell)
- SR: υποδοχέας εκκαθαριστής (Scavenger Receptor)
- SR-A: υποδοχέας εκκαθαριστής κατηγορίας A (Scavenger Receptor class A)
- SR-BI: υποδοχέας εκκαθαριστής κατηγορίας B τύπου I (Scavenger Receptor class B type I)
- SREBP-1/2: πρωτεΐνη πρόσδεσης ρυθμιστικού στοιχείου στερόλης 1 και 2 (Sterol Regulatory Element-Binding Protein 1 and 2)
- TAG: τριακυλογλυκερόλη (Triacylglycerol)
- TBA: θειοβαρβιτουρικό οξύ (Thiobarbituric Acid)
- TCA: τριχλωρικό οξύ (Trichloroacetic Acid)
- TF: ιστικός παράγοντας (Tissue Factor)
- TGN: δίκτυο trans-Golgi (Trans-Golgi Network)
- TIMP: ιστικός αναστολέας μεταλλοπρωτεϊνών (Tissue Inhibitors of Metalloproteinase)
- TLR-4: υποδοχέας τύπου toll 4 (Toll-Like Receptor 4)
- TNF α : παράγοντας νέκρωσης όγκου- α (Tumor Necrosis Factor- α)
- VCAM-1: αγγειακό κυτταρικό μόριο προσκόλλησης 1 (Vascular Cell Adhesion Molecule 1)
- VLDL: λιποπρωτεΐνη πολύ χαμηλής πυκνότητας (Very Low-Density Lipoprotein)
- VLDLR: υποδοχέας λιποπρωτεΐνης πολύ χαμηλής πυκνότητας (Very Low-Density Lipoprotein Receptor)
- VSMC: αγγειακό λείο μυϊκό κύτταρο (Vascular Smooth Muscle Cell)
- vWF: παράγοντας von Willebrand (von Willebrand Factor)

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η προ-πρωτεΐνη κονβερτάση σουμπτιλίσίνη/κεξίνη τύπου 9 (PCSK9), εμπλέκεται στην ομοιόσταση της χοληστερόλης. Μετά τη δέσμευση στον υποδοχέα λιποπρωτεΐνης χαμηλής πυκνότητας (LDLR), η PCSK9 επάγει την ενδοκυτταρική της αποικοδόμηση, μειώνοντας έτσι τα επίπεδα χοληστερόλης λιποπρωτεΐνης χαμηλής πυκνότητας (LDL-C) στον ορό. Η PCSK9 έχει, ωστόσο, συσχετιστεί με αγγειακή φλεγμονή στην αθηροσκλήρωση. Πράγματι, εκφράζεται από διάφορους τύπους κυττάρων που εμπλέκονται στην αθηροσκλήρωση, συμπεριλαμβανομένων των ενδοθηλιακών κυττάρων (ECs), των λείων μυϊκών κυττάρων (SMCs) και των μακροφάγων, και ανιχνεύεται μέσα στις ανθρώπινες αθηρωματικές πλάκες. Η βλάβη στα ECs που επενδύουν το τοίχωμα του αγγείου, ξεκινά την έναρξη της ανάπτυξης της πλάκας. Η PCSK9 είναι αυξημένη σε ECs που εκτίθενται σε προ-φλεγμονώδες ερέθισμα, όπως είναι η οξειδωμένη λιποπρωτεΐνη χαμηλής πυκνότητας (Ox-LDL), και αυτή η αύξηση σχετίζεται με τη δυσλειτουργία των κυττάρων αυτών. Τα δυσλειτουργικά ECs γίνονται προ-φλεγμονώδη και παρουσιάζουν διαταραγμένη λειτουργία αγγειακού φραγμού, με αποτέλεσμα την διενδοθηλιακή μετανάστευση των λιποπρωτεϊνών που περιέχουν απολιποπρωτεΐνη Β (Apo-B), η οποία παίζει καθοριστικό ρόλο στην παθογένεση της αθηροσκλήρωσης.

Τα κύτταρα της φλεγμονής και ειδικότερα τα μονοκύτταρα που διαφοροποιούνται σε μακροφάγα εμπλέκονται άμεσα στην ανάπτυξη και την εξέλιξη της αθηροσκλήρωσης. Η καλύτερα κατανοητή παθολογική διαδικασία που προκαλείται από τα μακροφάγα είναι η αδυναμία τους να επεξεργάζονται σωστά τις τροποποιημένες λιποπρωτεΐνες, με αποτέλεσμα τη μετατροπή και το σχηματισμό τους σε αφρώδη κύτταρα, τα οποία είναι ένα επικίνδυνο συστατικό των αθηρωματικών πλακών. Τα βασικά μόρια που εμπλέκονται στην αναγνώριση και επεξεργασία τροποποιημένων λιποπρωτεϊνών είναι οι υποδοχείς εκκαθαριστές (SRs), οι οποίοι έχουν ως κοινό λειτουργικό χαρακτηριστικό την εγκόλπωση των εξωκυτταρικών συστατικών, και την στόχευση τους για λυσοσωμική αποικοδόμηση. Ωστόσο, αυτές οι σχετικά απλές λειτουργίες μπορεί να έχουν πολύπλοκες συνέπειες, καθώς συνδέονται με ποικίλα συγκεκριμένα μονοπάτια σηματοδότησης και με άλλα μονοπάτια μεμβρανικής μεταφοράς. Η Ox-LDL προσλαμβάνεται από τους SRs σε μονοκύτταρα/μακροφάγα, μεταξύ των οποίων κυριότεροι είναι οι υποδοχέας εκκαθαριστής κατηγορίας Α (SR-A), CD36 και ο υποδοχέας της Ox-LDL

που μοιάζει με τη λεκτίνη (LOX-1). Τέλος, υπάρχουν ενδείξεις ότι η PCSK9 συσχετίζεται με τα επίπεδα έκφρασης των υποδοχέων αυτών, αλλά και με τα επίπεδα πρόσληψης της Ox-LDL από μακροφάγα.

Σκοπός της παρούσας μεταπτυχιακής διατριβής είναι η μελέτη της επίδρασης της PCSK9 στην ενεργοποίηση των ανθρώπινων ενδοθηλιακών κυττάρων ομφάλιου λώρου (HUVECs) από τροποποιημένες μορφές λιποπρωτεϊνών, καθώς και η μεμβρανική έκφραση SRs της Ox-LDL σε μονοκύτταρα του περιφερικού αίματος.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	10
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΑΘΗΡΟΣΚΛΗΡΩΣΗ	14
1.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ	14
1.2 ΤΟ ΑΓΓΕΙΑΚΟ ΤΟΙΧΩΜΑ	14
1.3 ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ ΑΘΗΡΟΣΚΛΗΡΩΣΗΣ	16
1.4 ΕΝΔΟΘΗΛΙΑΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ ΚΑΙ ΕΝΔΟΘΗΛΙΟ	19
1.4.1 ECs	19
1.4.2 ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΗ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΚΑΙ ΔΥΣΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΤΟΥ ΕΝΔΟΘΗΛΙΟΥ	19
1.4.3 ΜΟΝΟΚΥΤΤΑΡΑ	21
1.4.4 SRs	22
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΛΙΠΟΠΡΩΤΕΪΝΕΣ	24
2.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ	24
2.2 LDL ΛΙΠΟΠΡΩΤΕΪΝΗ	25
2.3 HDL ΛΙΠΟΠΡΩΤΕΪΝΗ	26
2.4 ΛΙΠΟΠΡΩΤΕΪΝΕΣ ΚΑΙ ΑΘΗΡΟΣΚΛΗΡΩΣΗ	27
2.5 ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΜΕΝΕΣ ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΑ ΛΙΠΟΠΡΩΤΕΪΝΕΣ	28
2.5.1 Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ O _x -LDL ΣΤΗΝ ΑΘΗΡΟΣΚΛΗΡΩΣΗ	29
2.5.2 Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ O _x -HDL ΣΤΗΝ ΑΘΗΡΟΣΚΛΗΡΩΣΗ	32
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: PCSK9	33
3.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ	33
3.2 ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΚΑΙ ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΗΣ PCSK9.....	34
3.3 Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ PCSK9 ΣΤΟΝ LDLR.....	37
3.4 Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ PCSK9 ΣΤΗΝ ΑΘΗΡΟΣΚΛΗΡΩΣΗ	39
3.5 PCSK9 ΚΑΙ ΛΙΠΟΠΡΩΤΕΪΝΕΣ	45

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	46
4.1 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΛΙΠΟΠΡΩΤΕΙΝΩΝ ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ ΤΩΝ ΔΙΑΔΟΧΙΚΩΝ ΥΠΕΡΦΥΓΟΚΕΝΤΡΗΣΕΩΝ	46
4.2 ΠΟΣΟΤΙΚΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΛΙΠΟΠΡΩΤΕΙΝΩΝ LDL ΚΑΙ HDL ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ BCA	50
4.3 ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑ ΡΟΗΣ	51
4.4 ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ LDL ΚΑΙ HDL ΜΕ ΙΟΝΤΑ Cu ²⁺	59
4.5 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ TBARS	61
4.6 ΕΠΙΔΡΑΣΗ TNF α ΚΑΙ O _x -LDL ΣΕ ΜΟΝΟΚΥΤΤΑΡΑ ΠΕΡΙΦΕΡΕΙΑΚΟΥ ΑΙΜΑΤΟΣ	64
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	66
5.1 Η ΔΡΑΣΗ ΤΗΣ PCSK9, ΤΩΝ ΛΙΠΟΠΡΩΤΕΙΝΩΝ ΚΑΙ ΤΩΝ ΟΞΕΙΔΩΜΕΝΩΝ ΜΟΡΦΩΝ ΤΟΥ ΣΤΗΝ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ HUVEC _s , ΜΕΣΩ ΤΗΣ ΜΕΜΒΡΑΝΙΚΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ICAM-1	66
5.2 ΜΕΜΒΡΑΝΙΚΗ ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΩΝ SR _s ΤΗΣ O _x -LDL ΣΕ ΜΟΝΟΚΥΤΤΑΡΑ ΠΕΡΙΦΕΡΙΚΟΥ ΑΙΜΑΤΟΣ, ΚΑΙ Η ΔΡΑΣΗ ΤΗΣ PCSK9	70
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6: ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ	73
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	76

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΑΘΗΡΟΣΚΛΗΡΩΣΗ

1.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η αθηροσκλήρωση είναι μια φλεγμονώδης παθολογική διαδικασία των μεγάλων αρτηριών κατά την οποία αναπτύσσεται η αθηρωματική πλάκα και προκαλείται στένωση των αρτηριών, με αποτέλεσμα να υπάρχει κίνδυνος ρήξης αυτής και δημιουργίας θρόμβου. Αυτό μπορεί να οδηγήσει σε CAD, ισχαιμικό εγκεφαλικό επεισόδιο και άλλες CVDs.^[1, 2] Αρχικά, στα εσωτερικά τοιχώματα των αρτηριών του κυκλοφορικού συστήματος συσσωρεύονται λιπίδια, όπου με την πάροδο του χρόνου οδηγούν στη δημιουργία της αθηρωματικής πλάκας, η οποία αποτελείται από λιπίδια, φλεγμονώδη κύτταρα, SMCs και από συνδετικό ιστό.^[2] Η ανάπτυξη και η εξέλιξη της αθηρωματικής πλάκας επηρεάζεται από μια ποικιλία γενετικών και περιβαλλοντικών παραγόντων. Μια από τις πιο εμφανείς αιτίες είναι τα αυξημένα επίπεδα της κυκλοφορούσας LDL, πλούσιας σε LDL-C, που ακολουθείται από χρόνια φλεγμονή εντός του αρτηριακού τοιχώματος, αλλά και η ενεργοποίηση διαφόρων κυτταρικών διεργασιών, όπως η δυσλειτουργία/ενεργοποίηση και απόπτωση των ECs, ο πολλαπλασιασμός των VSMCs και η μετανάστευσή τους στον έσω χιτώνα, η ενεργοποίηση T-λεμφοκυττάρων και μακροφάγων και ο σχηματισμός αφρωδών κυττάρων.^[1, 3] Το 2003, ανακαλύφθηκε ότι η PCSK9 παίζει κρίσιμο ρόλο στη ρύθμιση της LDL-C, καθιστώντας την έτσι βασικό παράγοντα στους μηχανισμούς πίσω από την ανάπτυξη της αθηρωματικής πλάκας.^[3]

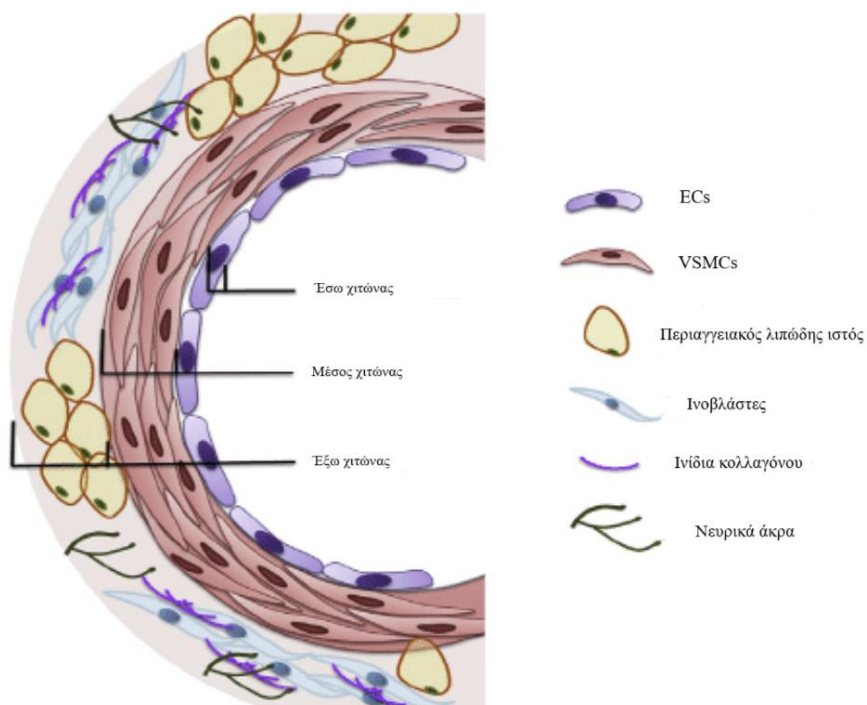
1.2 ΤΟ ΑΓΓΕΙΑΚΟ ΤΟΙΧΩΜΑ

Το αρτηριακό τοίχωμα αποτελείται από τρεις στιβάδες: τον έσω χιτώνα (Tunica Intima), τον μέσο χιτώνα (Tunica Media) και τον έξω χιτώνα (Tunica Adventitia) (Εικόνα 1.2.1). Ο έσω χιτώνας είναι η στιβάδα που βρίσκεται πλησιέστερα στον αυλό. Πρόκειται για τη λεπτότερη στιβάδα του αγγειακού τοιχώματος και αποτελείται από ένα ενιαίο στρώμα ECs, τα οποία στηρίζονται στη βασική μεμβράνη και στην ECM.^[4] Η βασική μεμβράνη, η οποία είναι μέρος της ECM, αποτελείται κυρίως από διαφορετικούς τύπους κολλαγόνου, λαμινίνης,

πρωτεογλυκανών, ινωδονεκτίνης και του vWF και παρέχει μηχανική στήριξη και ένα περιβάλλον αλληλεπίδρασης κυττάρων και μοριακής δραστηριότητας. Ακόμη, το ενδοθήλιο είναι ένας ημιπερατός φραγμός με ενδοκυτταρικές συνδέσεις που ρυθμίζει τη διέλευση μορίων διαμέσου του αγγειακού τοιχώματος και διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην αγγειακή ομοιόσταση.^[5]

Ο μέσο χιτώνας είναι η μεσαία στιβάδα και αποτελείται από οργανωμένες στιβάδες VSMCs ενσωματωμένων στην ECM. Αυτή η μυϊκή στιβάδα είναι υπεύθυνη για τη ρύθμιση των ταλαντώσεων στη ροή του αίματος και τη διατήρηση του αγγειακού τόνου.^[4] Επιπλέον, η ECM λειτουργεί ως φυσικό εμπόδιο και η ακεραιότητά της είναι καίριας σημασίας για την ομαλή λειτουργία του αγγείου, καθώς η διαταραχή της προκαλεί πολλαπλές κυτταρικές αποκρίσεις. Αποτελείται κυρίως από ίνες ελαστίνης, οι οποίες έχουν δομική λειτουργία και εμπλέκονται στη ρύθμιση του πολλαπλασιασμού των SMCs. Άλλα συστατικά της ECM είναι οι ίνες κολλαγόνου, κυρίως τύπου I και III, που βρίσκονται μεταξύ των ινών ελαστίνης.^[6, 7]

Ο έξω χιτώνας είναι ο πιο εξωτερικός χιτώνας του αγγείου, αποτελείται από ινοελαστικό συνδετικό ιστό και είναι πλούσιος σε κολλαγόνο.^[4] Ο έξω χιτώνας συμμετέχει ενεργά τόσο στις ανοσολογικές όσο και στις φλεγμονώδεις αποκρίσεις, στην ανάπτυξη και στην αναδιαμόρφωση των αγγείων, στην κυτταρική σηματοδότηση και στη ρύθμιση του αγγειακού τόνου. Περιέχει, επίσης, το Vasa Vasorum, τον περιαγγειακό λιπώδη ιστό, νευρικά άκρα, λεμφικά αγγεία και διαφορετικούς τύπους κυττάρων, όπως ινοβλάστες, μακροφάγα, δενδριτικά κύτταρα, T και B κύτταρα, μαστοκύτταρα και πλασματοκύτταρα, με αποτέλεσμα ο έξω χιτώνας να διαδραματίζει πολύ σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της λειτουργίας του αγγειακού τοιχώματος.^[6, 3] Ο έσω χιτώνας και ο μέσο χιτώνας διαχωρίζονται από την εσωτερική ελαστική μεμβράνη, ενώ ο μέσω χιτώνας και ο έξω χιτώνας από την εξωτερική ελαστική μεμβράνη.^[4]



Εικόνα 1.2.1: Δομή του υγιούς αρτηριακού τοιχώματος.^[8]

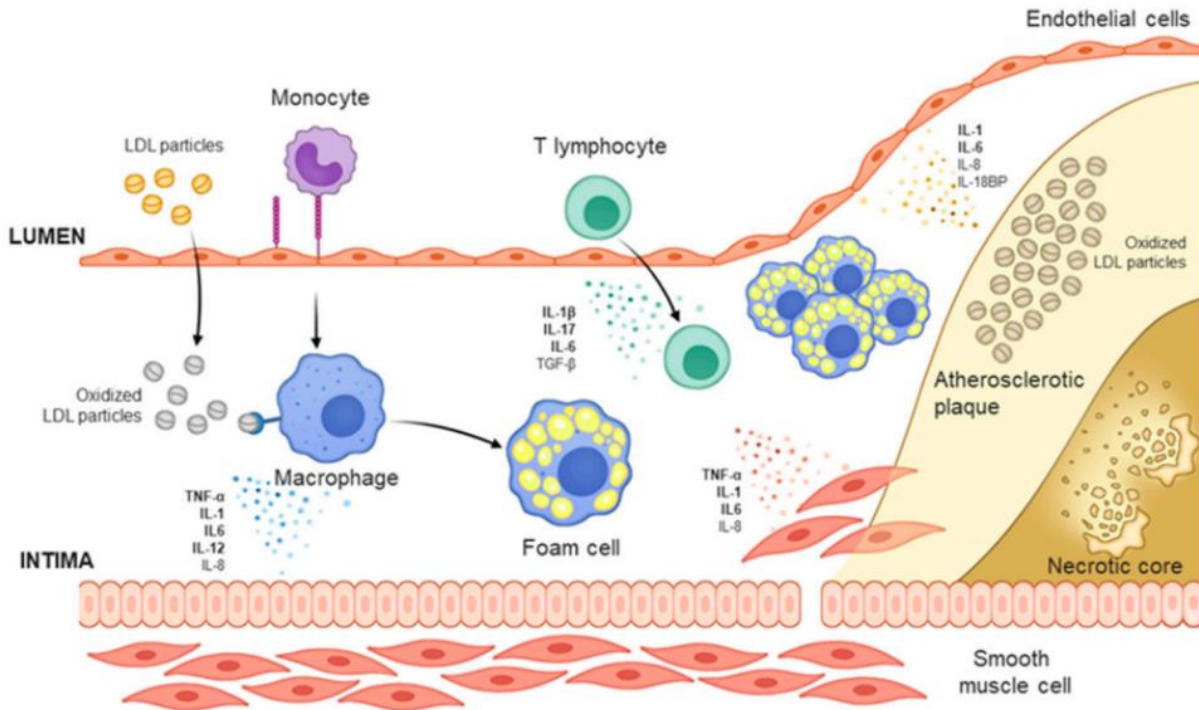
1.3 ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ ΑΘΗΡΟΣΚΛΗΡΩΣΗΣ

Η βλάβη στα ECs που επενδύουν το τοίχωμα του αγγείου, ξεκινά την έναρξη της ανάπτυξης της πλάκας (Εικόνα 1.3.1). Αυτή η ενδοθηλιακή βλάβη προκαλείται από μια μεγάλη ποικιλία ρυθμιστών που προκαλούν οξειδωτικό στρες, όπως η περίσσεια LDL-C, οι τοξίνες του καπνού του τσιγάρου και η υψηλή αρτηριακή πίεση.^[3] Ο τραυματισμός του αγγειακού φραγμού επιτρέπει στην LDL, να μετακινηθεί από το αίμα στον έσω χιτώνα, και να οξειδωθεί από τις FRs. Οι FRs είναι οξειδωτικοί παράγοντες που απελευθερώνονται συνεχώς από βιοχημικές αντιδράσεις μέσα στο σώμα, συμπεριλαμβανομένου του έσω χιτώνα. Τα ECs, ανιχνεύοντας την παρουσία της Ox-LDL, εκκρίνουν MCP-1, η οποία πυροδοτεί τη στρατολόγηση των λευκοκυττάρων, κυρίως μονοκυττάρων και T-λεμφοκυττάρων, στον έσω χιτώνα. Μετά την είσοδο στον έσω χιτώνα, τα μονοκύτταρα διαφοροποιούνται σε μακροφάγα, εκφράζουν υποδοχείς, όπως οι CD36, SR-A και LOX-1, και εσωτερικεύουν την Ox-LDL.^[9] Τα μακροφάγα εγκοιλώνουν τα μόρια Ox-LDL, προκαλώντας μια φαινοτυπική αλλαγή σε αφρώδη κύτταρα, τα

οποία συμβάλλουν στις εναποθέσεις λίπους στο αρτηριακό τοίχωμα, στην προ-φλεγμονώδη απελευθέρωση κυτοκίνης και στην απόπτωση. Αυτή η χρόνια φλεγμονή στο αρτηριακό τοίχωμα οδηγεί σε πρόσθετη διήθηση μονοκυττάρων, ανάπτυξη αφρώδων κυττάρων, εναπόθεση λίπους, και τελικά αρτηριακή απόφραξη και σχηματισμό πλάκας. Η αστάθεια και ο τραυματισμός της πλάκας προκαλούν έμφραγμα του μυοκαρδίου και θρομβολυτικό εγκεφαλικό επεισόδιο.^[10]

Τα T-λεμφοκύτταρα και τα μαστοκύτταρα που υποβάλλονται σε μετανάστευση στον έσω χιτώνα του αγγείου, μαζί με τα αφρώδη κύτταρα, απελευθερώνουν μια ποικιλία κυτοκινών, οι οποίες προάγουν τη φλεγμονή και την παραγωγή των ROS. Επίσης, από τα κύτταρα αυτά απελευθερώνονται αυξητικοί παράγοντες, καθώς οι ROS διεγείρουν τη μετανάστευση των VSMCs και την εναπόθεση του κολλαγόνου, οδηγώντας στην ανάπτυξη της αθηρωματικής πλάκας. Τέλος, τα ROS επάγουν την έκφραση των SRs στα VSMCs και τον μετασχηματισμό τους σε αφρώδη κύτταρα, καθώς και την απελευθέρωση των MMPs, οι οποίες αποικοδομούν το ινώδες τοίχωμα της αθηρωματικής πλάκας, οδηγώντας στη ρήξη αυτής.^[11]

Τα VSMCs είναι ευρέως γνωστά για τον ρόλο τους στην αθηροσκληρωτική εξέλιξη και τη ρύθμιση της φλεγμονής. Όταν συσσωρεύονται εναποθέσεις λίπους στην πλάκα, τα VSMCs μεταναστεύουν και μετατρέπονται σε μόνιμα μακροφάγα για να καταπιούν τα οξειδωμένα είδη, συμβάλλοντας περαιτέρω στην ανάπτυξη και εξέλιξη της αθηροσκληρωτικής βλάβης.^[3] Οι κυτοκίνες που απελευθερώνονται από τα μακροφάγα, τα αφρώδη κύτταρα και τα VSMCs ενεργοποιούν τα T λεμφοκύτταρα, τα οποία ενισχύουν την ενεργοποίηση των μακροφάγων.^[9] Όπως αποδεικνύεται, η οξείδωση και η χρόνια φλεγμονή είναι σημαντικές κινητήριες δυνάμεις της αθηροσκλήρωσης, και επομένως της ASCVD.^[3]



Εικόνα 1.3.1: Δημιουργία αθηρωματικής πλάκας. Τα σωματίδια LDL διεισδύουν βαθιά στο αρτηριακό τοίχωμα, όπου υπόκεινται σε οξειδωτικές τροποποιήσεις. Τα μονοκύτταρα προσκολλώνται στα ECs, τα οποία εκφράζουν μόρια προσκόλλησης και φλεγμονώδεις κυτοκίνες. Τα προσκολλημένα μονοκύτταρα μεταναστεύουν στον υποενδοθηλιακό χώρο και διαφοροποιούνται σε μακροφάγα. Η πρόσληψη της Ox-LDL μέσω των SRs οδηγεί στο σχηματισμό αφρώδων κυττάρων. Τα T λεμφοκύτταρα που υποβάλλονται σε μετανάστευση στον έσω χιτώνα του αγγείου, μαζί με τα αφρώδη κύτταρα, απελευθερώνουν μια ποικιλία κυτοκινών, οι οποίες προάγουν τη φλεγμονή. Ταυτόχρονα, η φλεγμονώδης απόκριση διεγείρει τη μετανάστευση και την αναπαραγωγή των VSMCs, τα οποία συσσωρεύονται στην πλάκα για να σχηματίσουν μία ινώδη πλάκα. Η νέκρωση των μακροφάγων και των αφρώδων κυττάρων που προέρχονται από τα VSMCs, οδηγεί στο σχηματισμό ενός νεκρωτικού πυρήνα και στη συσσώρευση λιπιδίων.^[12]

1.4 ΕΝΔΟΘΗΛΙΑΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ ΚΑΙ ΕΝΔΟΘΗΛΙΟ

1.4.1 ECs

Η ανάπτυξη των λειτουργικών αγγείων είναι ζωτικής σημασίας για την υγεία κάθε κυττάρου του σώματος. Τα ECs, τα οποία καλύπτουν το εσωτερικό όλων των αιμοφόρων και λεμφικών αγγείων, διαδραματίζουν βασικούς ρόλους στην παροχή οξυγόνου και θρεπτικών συστατικών, στη ρύθμιση της ροής του αίματος, στη ρύθμιση της διακίνησης κυττάρων του ανοσοποιητικού και διατήρηση της ομοιόστασης των ιστών.^[13]

Η δυσλειτουργία των αγγειακών ECs είναι σημαντική για την εξέλιξη των περισσότερων χρόνιων παθήσεων, καθώς και της ισχαιμικής καρδιακής νόσου και του εγκεφαλικού, των δύο κορυφαίων παγκόσμιων αιτιών θνησιμότητας.^[13]

1.4.2 ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΗ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΚΑΙ ΔΥΣΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΤΟΥ ΕΝΔΟΘΗΛΙΟΥ

Η φυσιολογική λειτουργία των ECs παίζει καθοριστικό ρόλο στη διατήρηση της αγγειακής ομοιόστασης. Παράγουν διάφορους παράγοντες που ρυθμίζουν τον αγγειακό τόνο, την προσκόλληση των κυκλοφορούντων φλεγμονωδών κυττάρων στο ενδοθήλιο, τον πολλαπλασιασμό των SMCs, την πήξη και τη φλεγμονή του τοιχώματος των αγγείων. Μία από τις πιο σημαντικές λειτουργίες του ενδοθηλίου είναι η διατήρηση της λεπτής ισορροπίας μεταξύ αγγειοδιαστολής και αγγειοσύσπασης, κυρίως μέσω του σχηματισμού NO.^[14] Πιο συγκεκριμένα, το NO προκαλεί αγγειοδιαστολή και είναι υπεύθυνο για την ισορροπία των συσταλτικών παραγόντων που προέρχονται από το ενδοθήλιο, όπως η ET-1 και η θρομβοξάνη A₂, ρυθμίζοντας έτσι τον αγγειακό τόνο. Το NO δεν είναι μόνο το πιο ισχυρό ενδογενές αγγειοδιασταλτικό στο σώμα, αλλά αναστέλλει τη συσσώρευση αιμοπεταλίων, τη φλεγμονή, το οξειδωτικό στρες, τον πολλαπλασιασμό των SMCs και την προσκόλληση των λευκοκυττάρων.^[14] Ωστόσο, η παρουσία παραγόντων κινδύνου κατακλύζει τους αμυντικούς μηχανισμούς του αγγειακού ενδοθηλίου. Η αναστολή της απελευθέρωσης προστατευτικών ουσιών ακολουθείται από απώλεια της ενδοθηλιακής ακεραιότητας και οδηγεί σε ED, η οποία διαδραματίζει βασικό ρόλο στην ανάπτυξη της αθηροσκλήρωσης.^[14] Οι περισσότεροι παράγοντες κινδύνου CVD ενεργοποιούν τα ECs και διεγείρουν την έκφραση χημειοκινών,

κυτοκινών και μορίων προσκόλλησης, τα οποία αλληλεπιδρούν με λευκοκύτταρα και αιμοπετάλια και προάγουν φλεγμονώδεις αποκρίσεις στο τοίχωμα του αγγείου.^[15]

Ένας από τους πιο σημαντικούς υποκείμενους μηχανισμούς για την ανάπτυξη της ED είναι το οξειδωτικό στρες.^[13] Οι περισσότεροι παράγοντες κινδύνου CVD, αυξορρυθμίζουν το ενδοκυτταρικό οξειδωτικό στρες και τις ROS, προκαλώντας μείωση της βιοδιαθεσιμότητας του NO μέσω διάφορων μηχανισμών.^[16] Αρχικά, τα ανιόντα υπεροξειδίου αντιδρούν με το υπάρχον NO, παράγοντας υπεροξυνιτρώδη άλατα και μειώνοντας έτσι τη συγκέντρωσή του. Επιπλέον, οι ROS μειώνουν την παραγωγή NO, μειώνοντας την ενζυμική δραστηριότητα της eNOS, του ενζύμου που είναι υπεύθυνο για τη σύνθεση αυτού.^[17] Στο αγγειακό ενδοθήλιο, το NO συντίθεται από την L-αργινίνη μέσω της eNOS, με την μεταφορά ηλεκτρονίων στην L-αργινίνη. Για να συμβεί αυτό, η eNOS πρέπει να συνδεθεί με έναν βασικό συμπαράγοντα, ο οποίος είναι η BH₄. Αυτό είναι γνωστό ως «σύζευξη» της eNOS. Χωρίς BH₄, η eNOS «αποσυνδέεται» και τα ηλεκτρόνια μεταφέρονται στο οξυγόνο αντί για την L-αργινίνη, δημιουργώντας υπεροξείδιο και όχι NO. Στην αθηροσκλήρωση, τα επίπεδα BH₄ μειώνονται λόγω της οξειδωτικής αποδόμησής τους από υπεροξυνιτρώδη και υπεροξείδιο. Επομένως, σε φυσιολογικές συνθήκες η eNOS είναι υπεύθυνη για την παραγωγή NO, αλλά σε παθολογική μη συζευγμένη κατάσταση μετατρέπεται σε παραγωγό ROS, με αποτέλεσμα το σχηματισμό υπεροξειδίου.^[13]

Η αγγειακή φλεγμονή σχετίζεται σε μεγάλο βαθμό με το ED και παίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη της αθηροσκλήρωσης.^[14] Το υγιές ενδοθήλιο, όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, ελέγχει την αγγειακή φλεγμονή απελευθερώνοντας NO. Ωστόσο, ένα δυσλειτουργικό ενδοθήλιο θα προάγει τη δημιουργία ROS, επιδεινώνοντας την αγγειακή φλεγμονή. Υπάρχει στενή σχέση μεταξύ του οξειδωτικού στρες και της φλεγμονής.^[13] Συγκεκριμένα, το αυξημένο οξειδωτικό στρες αυξορρυθμίζει την έκφραση πολλών μορίων προσκόλλησης, όπως το VCAM-1, το ICAM-1, τις E- και P-σελεκτίνες, τα οποία είναι όλα ευαίσθητα στην οξειδοαναγωγή. Επιπλέον, αυξάνει την έκκριση πολλών κυτοκινών και άλλων φλεγμονωδών μορίων, τα οποία ελέγχονται από μεσολαβητές που είναι ευαίσθητοι στην οξειδοαναγωγή (όπως είναι ο NF-κB).^[14] Ως εκ τούτου, υπάρχει αυξημένη συσσώρευση και προσκόλληση λευκοκυττάρων, κυρίως μακροφάγων και T λεμφοκυττάρων, στα σημεία της διαταραγμένης ενδοθηλιακής λειτουργίας.^[18]

Η αγγειακή φλεγμονή και η αυξημένη παραγωγή ROS προάγουν την τροποποίηση των κυκλοφορούντων σωματιδίων της LDL στην οξειδωμένη τους μορφή, τα οποία παίζουν κρίσιμο ρόλο στην παθοφυσιολογία της αθηροσκλήρωσης. Αφού οι Ox-LDLs φαγοκυτταρωθούν από τα

μακροφάγα, τα μετατρέπουν σε αφρώδη κύτταρα και προάγουν ακόμη περισσότερο τη δημιουργία ROS. Οι Ox-LDLs συμβάλλουν επίσης στην ανάπτυξη της ED καταστρέφοντας τα ECs και ενισχύοντας την έκφραση των μορίων προσκόλλησης (όπως της P-σελεκτίνης) και των κυτοκινών (όπως της MCP-1).^[14]

1.4.3 MONOKΥΤΤΑΡΑ

Η αθηροσκλήρωση είναι ευρέως γνωστό ότι προκαλείται από τη συσσώρευση χοληστερόλης στον αρτηριακό έσω χιτώνα, αλλά επίσης μεσολαβείται εν μέρει μέσω μιας χρόνιας φλεγμονώδους απόκρισης, που αποτελείται από ένα ευρύ φάσμα διείσδυσης κυττάρων του ανοσοποιητικού.^[19] Τα μονοκύτταρα παράγονται συνεχώς από HSCs στον μυελό των οστών, ξεκινώντας κατά τη διάρκεια της εμβρυογένεσης και συνεχίζοντας καθ' όλη τη διάρκεια ζωής σε ανθρώπους και ποντίκια. Αυτά τα κύτταρα είναι βραχύβια και δεν πολλαπλασιάζονται στο αίμα.^[20, 21]

Τα μονοκύτταρα είναι έμφυτα ανοσοενεργά κύτταρα, που μεταναστεύουν από το περιφερικό αίμα στους ιστούς γρήγορα κατά τη διάρκεια της μόλυνσης μέσω υποδοχέων χημειοκίνης και αναγνωρίζουν τα παθογόνα μέσω των αντίστοιχων υποδοχέων αναγνώρισης.^[19] Κατά τη διάρκεια της φλεγμονής, τα κύτταρα αυτά μεταναστεύουν από το αίμα στους λεμφικούς και μη λεμφικούς ιστούς, ως απόκριση σε σήματα που προέρχονται από αυτούς και προκαλούνται, για παράδειγμα, από μόλυνση ή βλάβη τους. Φαγοκυτταρώνουν άλλα κύτταρα και τοξικά μόρια (όπως η Ox-LDL), παράγουν φλεγμονώδεις κυτοκίνες και μπορούν να διαφοροποιηθούν σε φλεγμονώδη DCs, μακροφάγα ή αφρώδη κύτταρα, ανάλογα με το φλεγμονώδες περιβάλλον.^[20]

Η MCP-1 είναι μία χημειοκίνη, η οποία προσελκύει τα μονοκύτταρα και τα T - λεμφοκύτταρα και παίζει πολύ σημαντικό ρόλο στην στρατολόγηση αυτών. Επιπλέον, κατά την παθογένεια της αθηροσκλήρωσης, παρατηρείται υπερέκφραση της MCP-1, στην οποία συνεισφέρουν τα ECs, τα VSMCs και τα μακροφάγα. Ο υποδοχέας της MCP-1 (CCR2), που βρίσκεται πάνω στα μονοκύτταρα/μακροφάγα, παρουσιάζει τεράστια αύξηση κατά τη δημιουργία της πλάκας.^[2, 22]

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, κατά τη διάρκεια της αθηροσκλήρωσης, τα μονοκύτταρα του αίματος στρατολογούνται στον έσω χιτώνα. Μετά την είσοδο τους στον έσω χιτώνα, διαφοροποιούνται σε μακροφάγα, τα οποία μπορούν να προσλάβουν Ox-LDL και άλλα λιπίδια μέσω των SRs και συνεπώς, πιστεύεται ότι, όταν συναντούν εναποθέσεις λίπους, υπόκεινται σε

ενεργοποίηση και συσσώρευση στη σχηματιζόμενη βλάβη. Σε πρώιμο στάδιο της διαδικασίας αυτής, τα μακροφάγα διαφοροποιούνται σε αφρώδη κύτταρα για να σχηματίσουν πρώιμες πλάκες, που ονομάζονται λιπώδεις γραμμώσεις, στον έσω χιτώνα.^[20]

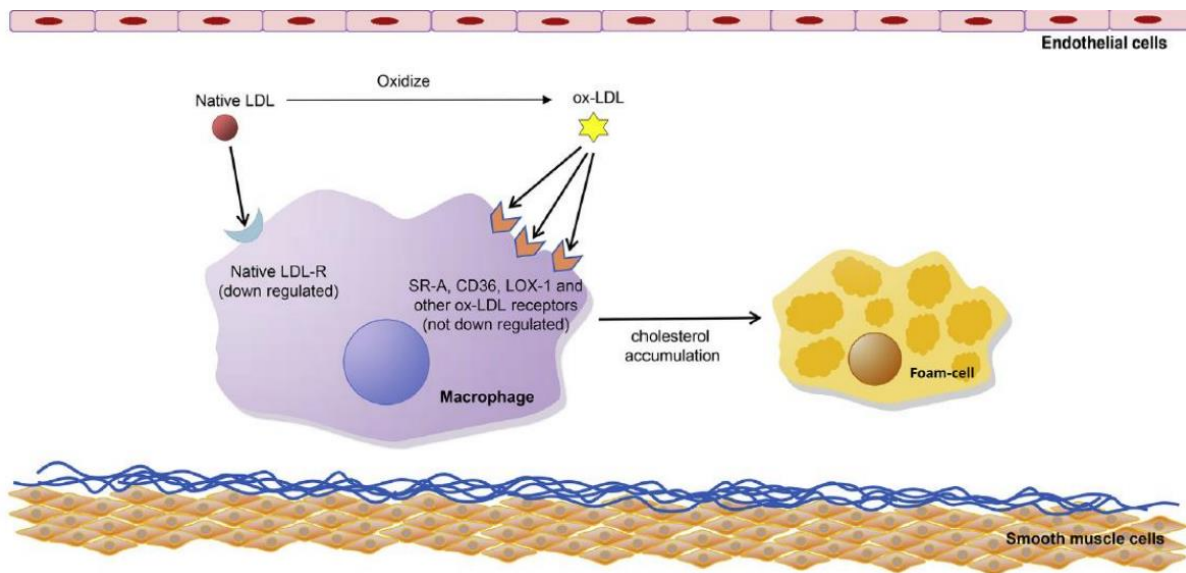
1.4.4 SRs

Μελέτες με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο έχουν αποδείξει ότι η πιο πρώιμη αθηροσκληρωτική βλάβη, η λιπώδης γράμμωση, αποτελείται σχεδόν εξ ολοκλήρου από μακροφάγα φορτωμένα με λιπίδια, εμπλέκοντας έτσι την πρόσληψη λιποπρωτεϊνών από αυτά τα κύτταρα του ανοσοποιητικού, στην εκδήλωση της αθηροσκλήρωσης. Αυτά τα ευρήματα οδήγησαν σε αναζήτηση υποδοχέων λιποπρωτεϊνών διαφορετικών από τον LDLR, που θα μπορούσαν να μεσολαβήσουν στην πρόσληψη χοληστερόλης από τα μακροφάγα. Οι SRs, που περιγράφηκαν για πρώτη φορά από τους Brown και Goldstein, βρέθηκε ότι δεσμεύουν και εσωτερικεύουν τροποποιημένες μορφές LDL μέσω μηχανισμών που δεν αναστέλλονται από την κυτταρική χοληστερόλη, προσδιορίζοντας αυτούς τους υποδοχείς ως πιθανούς ενόχους στη συσσώρευση χοληστερόλης στα μακροφάγα. Ενώ αυτοί οι υποδοχείς μπορούν να εκφραστούν σε μια σειρά κυτταρικών τύπων, εκφράζονται σε μεγάλο βαθμό σε μακροφάγα, αλλά και σε ECs. Μελέτες στο πλαίσιο της φλεγμονής και της ίνωσης του ήπατος έχουν δείξει ότι η λειτουργία των SRs συμβάλλει στη διακίνηση λευκοκυττάρων κατά μήκος του ενδοθηλίου και της πόλωσης των μακροφάγων.^[23]

Από την κλωνοποίηση του πρώτου MSR το 1990, η οικογένεια των SRs επεκτάθηκε για να συμπεριλάβει 8 διαφορετικές υποκατηγορίες δομικά άσχετων υποδοχέων, που μοιράζονται το χαρακτηριστικό της ικανότητας σύνδεσης τροποποιημένων μορφών LDL. Αν και η πρόσληψη τροποποιημένων λιποπρωτεϊνών από τους SRs πιστεύεται ότι είναι βασική στον σχηματισμό αφρωδών κυττάρων, είναι ευρέως αποδεκτό ότι αντιπροσωπεύει ένα από τα κύρια γεγονότα ενεργοποίησης που διεγείρουν τον προφλεγμονώδη φαινότυπο των μακροφάγων. Τα τελευταία χρόνια, έχει γίνει αντιληπτό ότι οι SRs ξεκινούν καταρράκτες σηματοδότησης που ρυθμίζουν την ενεργοποίηση των μακροφάγων, το μεταβολισμό των λιπιδίων και τις φλεγμονώδεις διεργασίες που μπορεί να επηρεάσουν την ανάπτυξη και τη σταθερότητα της αθηρωματικής πλάκας. Επιπλέον, αυτοί οι υποδοχείς έχουν ρόλο στην επαγωγή απόπτωσης, στην κάθαρση των αποπτωτικών κυττάρων και την αναγνώριση παθογόνων που μπορεί να επηρεάσουν διαφορικά

τις πρώιμες και πιο σύνθετες βλάβες. Αυτές οι νέες ιδέες υποδεικνύουν ότι οι ρόλοι των SRs στην αθηροσκλήρωση είναι πιο περίπλοκοι από ότι είχε αρχικά προβλεφθεί.^[23]

Σε αντίθεση με την εγγενή LDL, της οποίας η πρόσληψη από τον LDLR αποτελεί μηχανισμό αρνητικής ανάδρασης, διάφορες μορφές τροποποιημένης LDL προσλαμβάνονται μέσω ενδοκυττάρωσης ή φαγοκυττάρωσης που προκαλείται από SRs με μη ρυθμισμένο τρόπο, οδηγώντας σε σχηματισμό αφρωδών κυττάρων. Η συσσωματωμένη LDL, ένας άλλος λιποπρωτεϊνικός συνδέτης που εμπλέκεται στο σχηματισμό αφρωδών κυττάρων, έχει αναφερθεί ότι προσλαμβάνεται μέσω φαγοκυττάρωσης με τη μεσολάβηση του LDLR και ανεξάρτητα από τον υποδοχέα μονοπάτια, αλλά όχι μέσω των SRs. Τα μακροφάγα εκφράζουν μια ποικιλία SRs, συμπεριλαμβανομένων των SR-A τύπου I και II, CD36, LOX-1, CD68 και του SR-BI (Εικόνα 1.4.4.1). Χρησιμοποιώντας ποντίκια με διπλό knockout SR-A και CD36, διαπιστώθηκε ότι οι SR-A και CD36 είναι οι κύριοι υποδοχείς που μεσολαβούν στην πρόσληψη τροποποιημένων λιποπρωτεϊνών από τα μακροφάγα in vitro.^[24]



Εικόνα 1.4.4.1: Μηχανισμοί πρόσληψης Ox-LDL από μακροφάγα. Η εγγενής LDL δύσκολα μπορεί να προκαλέσει σχηματισμό αφρωδών κυττάρων λόγω της μειορρύθμισης του LDLR. Η Ox-LDL, επάγει τη συσώρευση χοληστερόλης στα μακροφάγα μέσω της ταχείας πρόσληψης από τους SRs.^[25]

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΛΙΠΟΠΡΩΤΕΪΝΕΣ

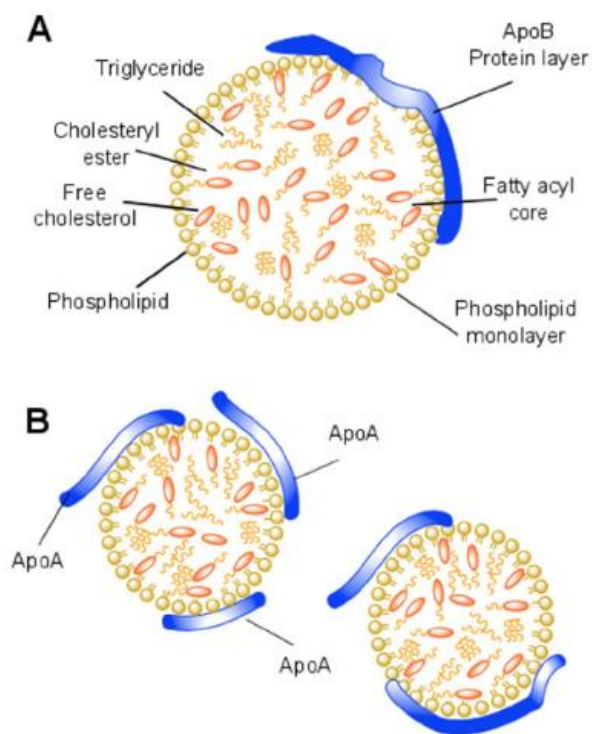
2.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Τα λιπίδια (γνωστά και ως «λίπος») είναι φυσικές ενώσεις που εξυπηρετούν πολυάριθμες βιολογικές λειτουργίες, συμπεριλαμβανομένου του σχηματισμού πλασματικών μεμβρανών ή μορίων σηματοδότησης, αλλά και ως πηγή ενέργειας. Υπάρχουν σε διάφορες μορφές, όπως ελεύθερα λιπαρά οξέα, GLs, GPLs, σφιγγολιπίδια και στερόλες. Καθένας από αυτούς τους υποτύπους λιπιδίων έχει διαφορετικές μοριακές δομές και βασικές ιδιότητες. Ένα κοινό χαρακτηριστικό που μοιράζονται τα λιπίδια ως ομάδα είναι ότι δεν διαλύονται στο νερό και, κατά συνέπεια, πρέπει να μεταφέρονται με πρωτεΐνες στην κυκλοφορία («λιποπρωτεΐνες»).[26]

Οι λιποπρωτεΐνες είναι πολύπλοκες δομές, οι οποίες αποτελούνται από έναν κεντρικό υδρόφοβο πυρήνα, που αποτελείται κυρίως από TAG, CE και χοληστερόλη, και από μια υδρόφιλη μεμβράνη που αποτελείται από GPL, ελεύθερη χοληστερόλη και απολιποπρωτεΐνες.[27] Σε υγιείς ανθρώπους, όταν τα επίπεδα γλυκεριδίων/χοληστερόλης αυξάνονται στο αίμα, κύτταρα όπως τα ηπατοκύτταρα εκκρίνουν λιποπρωτεΐνες που παίζουν ουσιαστικό ρόλο στη μεταφορά, το μεταβολισμό και την αποθήκευση των λιπιδίων. Η σύνδεση των λιπιδίων με τις λιποπρωτεΐνες διευκολύνει την εξισορρόπηση του μεταβολισμού των λιπιδίων και επαναφέρει τα κυκλοφορούντα επίπεδα αδέσμευτων γλυκεριδίων/χοληστερόλης σε πιο φυσιολογικά επίπεδα. Οι λιποπρωτεΐνες ταξινομούνται σε πέντε βασικές κατηγορίες με βάση την πυκνότητα και το μέγεθός τους και είναι οι εξής: 1) CM, 2) VLDL, 3) IDL, 4) LDL, 5) HDL.[28] Οι διάφορες λιποπρωτεΐνες συνεργάζονται με συνοχή ώστε να διατηρηθεί το αγγειακό σύστημα υγιές. Κάθε λιποπρωτεΐνη περιέχει πολυάριθμους τύπους λιπιδιακών ειδών και πρωτεϊνών, η σύνθεση των οποίων ποικίλλει ακόμη και μεταξύ μεμονωμένων λιποπρωτεϊνών του ίδιου τύπου.[26]

2.2 LDL ΛΙΠΟΠΡΩΤΕΪΝΗ

Τα σωματίδια LDL είναι οι κύριοι μεταφορείς της χοληστερόλης στην κυκλοφορία και αποτελούνται από ελεύθερες TAGs, χοληστερόλη, φωσφολιπίδια, CE και Apo-B (Εικόνα 2.2.1). Κατά τη διάρκεια του φυσιολογικού μεταβολισμού, οι LDL απομακρύνονται από την κυκλοφορία μέσω των LDLR στην επιφάνεια των ηπατοκυττάρων.^[28] Αυτοί οι υποδοχείς μεσολαβούν στην ενδοκυττάρωση της LDL, μέσω της αναγνώρισης της ApoB-100 στην επιφάνεια της. Αν και πολλά κύτταρα μπορούν να εκφράσουν τον LDLR, κυρίως τα ηπατοκύτταρα αφαιρούν την LDL από την κυκλοφορία του αίματος.^[29] Ωστόσο, όταν συμβαίνει υπερβολική έκκριση λιποπρωτεϊνών από το ήπαρ και/ή αναποτελεσματική κάθαρση της LDL του πλάσματος, τα επίπεδα της LDL στην κυκλοφορία αυξάνονται. Αρκετές μελέτες έχουν εντοπίσει ότι τα αυξημένα επίπεδα LDL στο πλάσμα έχουν ως αποτέλεσμα την έναρξη και την ανάπτυξη αθηρωματικών πλακών.^[28] Η τροποποίηση της LDL είναι γνωστή ως ένας από τους κύριους λόγους για την αθηροσκλήρωση. Δύο από τις σημαντικές επιπτώσεις αυτών των αλλαγών είναι το οξειδωτικό στρες και η γήρανση στα ECs. Η τροποποιημένη LDL στα ECs προκαλεί τη βλάβη και την τροποποίηση του DNA, και μέχρι στιγμής έχουν αναγνωριστεί διάφορες μορφές τροποποιημένης LDL, συμπεριλαμβανομένης της Ox-LDL.^[29, 30]



Εικόνα 2.2.1: Σχηματική αναπαράσταση λιποπρωτεϊνών. (Α) Απεικόνιση της προτεινόμενης δομής της LDL. (Β) Απεικόνιση της προτεινόμενης δομής της HDL^[31].

2.3 HDL ΛΙΠΟΠΡΩΤΕΪΝΗ

Η HDL είναι η μικρότερη, αλλά και η πυκνότερη κυκλοφορούσα λιποπρωτεΐνη. Τα σωματίδια αυτά φέρουν μεγάλο αριθμό πρωτεϊνών και λιπιδίων, τα οποία συμβάλλουν στον καθορισμό της σύνθετης και λειτουργικής πολυπλοκότητάς τους. Είναι εξαιρετικά πολύπλοκες δομές που υφίστανται δυναμικές αλλαγές στο σχήμα, το μέγεθος και τη σύνθεση μέσω συνεχών αλληλεπιδράσεων με διάφορα ένζυμα και κυτταρικούς υποδοχείς σε διάφορους ιστούς καθ' όλη τη διάρκεια του κύκλου ζωής τους.^[32] Οι κύριες απολιποπρωτεΐνες HDL είναι οι ApoA-I και ApoA-II, και αμφότερες απαιτούνται για τη φυσιολογική βιοσύνθεση της HDL (Εικόνα 2.2.1). Η ApoA-I συντίθεται τόσο στο έντερο όσο και στο ήπαρ, αποτελεί περίπου το 70% της πρωτεΐνης HDL και υπάρχει σε σχεδόν όλα τα σωματίδια HDL, ενώ η ApoA-II συντίθεται μόνο στο ήπαρ, αποτελεί περίπου το 20% της πρωτεΐνης HDL και είναι παρούσα σε περίπου 2/3 των σωματιδίων HDL στους ανθρώπους.^[33]

Ακόμα, η HDL παίζει σημαντικό ρόλο στην RCT, με την οποία η περίσσεια χοληστερόλης απομακρύνεται από τα περιφερειακά αγγεία και μεταφέρεται πίσω στο ήπαρ για απέκκριση. Επίσης, το σωματίδιο αυτό θεωρείται ότι είναι ο κύριος, αν και όχι ο μοναδικός, φορέας χοληστερόλης στη διαδικασία της αντίστροφης μεταφοράς στο ήπαρ, και αυτή η διαδικασία έχει ονομαστεί κεντρομόλος εκροή χοληστερόλης. Η RCT έχει προταθεί ως ο κύριος μηχανισμός με τον οποίο η HDL μειώνει το αθηρωματικό φορτίο.^[34] Ωστόσο, το σωματίδιο αυτό έχει πολλές άλλες ευεργετικές βιολογικές ιδιότητες, οι οποίες ενισχύουν την προστατευτική της δράση έναντι της καρδιαγγειακής νόσου. Αυτές περιλαμβάνουν αντιοξειδωτικές, αντιφλεγμονώδεις, ενδοθηλιακές/αγγειοδιασταλτικές, αντιθρομβωτικές και κυτταροπροστατευτικές λειτουργίες.^[33]

Τέλος, η HDL μπορεί να παρέχει ισχυρή προστασία της LDL in vivo από οξειδωτική βλάβη, που προκαλείται από FRs στον έσω αρτηριακό χιτώνα, αναστέλλοντας τη δημιουργία προφλεγμονωδών οξειδωμένων λιπιδίων, κυρίως λιπιδικών υδροϋπεροξειδίων, που παίζουν σημαντικό ρόλο στην οξείδωση των φωσφολιπιδίων και της χοληστερόλης. Επιπλέον, η HDL περιέχει διάφορα αντιοξειδωτικά ένζυμα, συμπεριλαμβανομένης της PON ή της PAF-AH. Τα ένζυμα αυτά μπορούν να μειώσουν τον σχηματισμό της Ox-LDL, οδηγώντας σε μειωμένη εναπόθεση αυτής στα τοιχώματα των αγγείων. Η HDL αναστέλλει επίσης την έκφραση των μορίων προσκόλλησης στα ECs και έτσι μειώνει τη στρατολόγηση μονοκυττάρων του αίματος στο αρτηριακό τοίχωμα, ενώ έχει την ικανότητα να προάγει την αγγειοχαλάρωση και τον πολλαπλασιασμό του ενδοθηλίου μέσω της διέγερσης αυτού και να παράγει προστακυκλίνη και NO, μειώνοντας έτσι τη διεύδυση φλεγμονωδών κυττάρων και διατηρώντας τη σταθεροποίηση των ECs.^[28]

2.4 ΛΙΠΟΠΡΩΤΕΙΝΕΣ ΚΑΙ ΑΘΗΡΟΣΚΛΗΡΩΣΗ

Η διενδοθηλιακή μετανάστευση των λιποπρωτεϊνών που περιέχουν Apo-B, παίζει καθοριστικό ρόλο στην παθογένεση της αθηροσκλήρωσης. Σύμφωνα με τη «θεωρία της διήθησης», η ανάπτυξη της αθηροσκλήρωσης πυροδοτείται από την είσοδο και την υποενδοθηλιακή κατακράτηση λιποπρωτεΐνης από την κυκλοφορία του αίματος, ιδιαίτερα της LDL και των υπολειμμάτων που περιέχουν Apo-B εντός του αρτηριακού τοιχώματος.^[29] Η HDL πρέπει επίσης να διασχίσει τον ενδοθηλιακό φραγμό στο αρτηριακό τοίχωμα για να ασκήσει τις

αθηροπροστατευτικές ιδιότητες της, μεσολαβώντας στην εκροή χοληστερόλης από μακροφάγα φορτωμένα με λιπίδια. Η αυξημένη εισροή χοληστερόλης σε σχέση με την εκροή μέσω των ECs και η ενισχυμένη δέσμευση στην ECM, έχουν ως αποτέλεσμα τη διατήρηση τόσο των προ-αθηρογόνων (Apo-B-λιποπρωτεΐνες) όσο και των αντι-αθηρογόνων λιποπρωτεϊνών (HDL) στις αθηρωματικές αρτηρίες.^[35] Αν και η μεταφορά λιποπρωτεϊνών είναι κρίσιμη για την έναρξη και την εξέλιξη της αθηροσκλήρωσης, η ροή αυτών προς και έξω από το τοίχωμα της αρτηρίας δεν έχουν διερευνηθεί πλήρως και οι μηχανισμοί με τους οποίους η LDL και η HDL εισέρχονται στον υποενδοθηλιακό χώρο παραμένουν ασαφείς.^[36]

2.5 ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΜΕΝΕΣ ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΑ ΛΙΠΟΠΡΩΤΕΙΝΕΣ

Υπάρχουν ισχυρές ενδείξεις ότι η έκθεση των ECs σε υψηλές συγκεντρώσεις LDL οδηγεί στην ενεργοποίησή τους, ειδικά όταν το λιπίδιο του σωματιδίου LDL έχει τροποποιηθεί οξειδωτικά. Τα σωματίδια LDL του πλάσματος αποτελούν φυσιολογικό συστατικό του αίματος και θεωρούνται πηγή χοληστερόλης για το μεταβολισμό των περιφερικών κυττάρων. Ως τελικό προϊόν του καταβολισμού των πλούσιων σε τριγλυκερίδια σωματιδίων VLDL, αντιπροσωπεύουν συνήθως το 60±70% της συνολικής χοληστερόλης του πλάσματος. Συνήθως υπάρχει μια σημαντική εισροή αυτών των σωματιδίων στον έσω χιτώνα όπου μπορούν να υπάρχουν σε υψηλή συγκέντρωση. Τα εγγενή σωματίδια LDL φαίνεται να είναι αβλαβή έως ότου η συγκέντρωσή τους στο πλάσμα αυξηθεί σε περίπου 4 mmol/l LDL-C ή περισσότερο. Η παρατεταμένη έκθεση των ECs σε υψηλές συγκεντρώσεις LDL ενεργοποιεί ορισμένες μεταβολικές οδούς που διευκολύνουν την προσκόλληση των μονοκυττάρων στο τοίχωμα του αγγείου. Τα μονοκύτταρα δεν θα εγκολλωθούν την φυσική LDL σε μεγάλη ποσότητα ακόμη και όταν η λιποπρωτεΐνη είναι παρούσα σε υψηλή συγκέντρωση, λόγω της μειορύθμισης των υποδοχέων της ApoB/E μόλις ικανοποιηθεί η μεταβολική τους απαίτηση για χοληστερόλη. Το βασικό συμβάν φαίνεται να είναι η οξειδωτική τροποποίηση του σωματιδίου LDL από FRs που δημιουργούνται από τα ECs και τα στρατολογημένα μονοκύτταρα.^[37]

Τέλος, τα μονοκύτταρα διαθέτουν μια ιδιαίτερα ενεργή οδό για την παραγωγή σουπεροξειδίου και υπεροξειδίου του υδρογόνου για τις βακτηριοκτόνες τους ιδιότητες, και αυτές οι ουσίες θα επιτεθούν σε μη προστατευμένα λιπίδια, ειδικά στο πολυακόρεστο λιπαρό

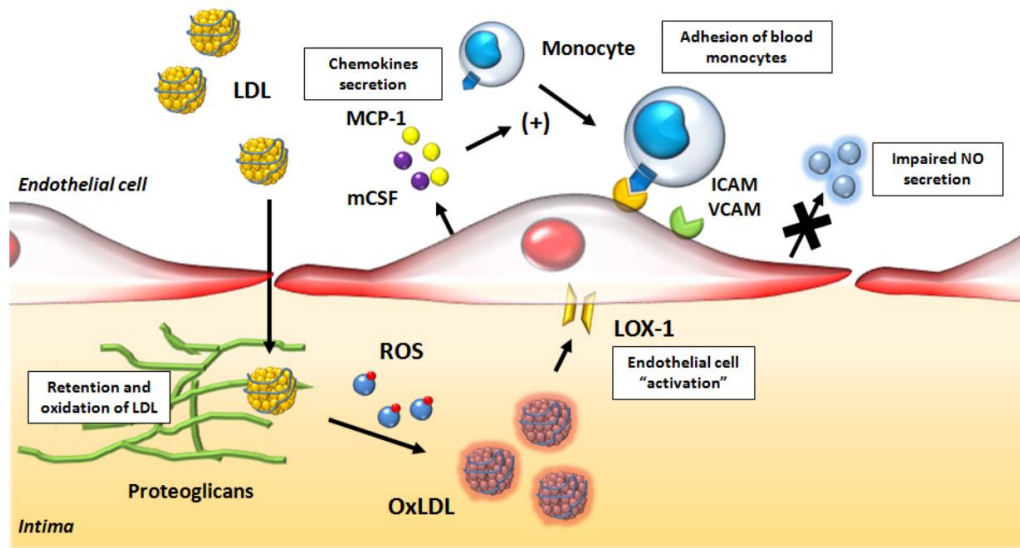
οξύ των εστέρων της LDL-C, αν και το σωματίδιο LDL μπορεί να οξειδωθεί όχι μόνο στα λιπίδια του αλλά και στο πρωτεϊνικό του συστατικό.^[31, 38] Αυτό που θα προκύψει είναι η MM-LDL, οι οποίες έχουν χαμηλή συγγένεια με τους SRs των μακροφάγων που συμβάλλουν στην παραγωγή αφρωδών κυττάρων. Είναι γνωστό ότι η MM-LDL διεγείρει μόρια προσκόλλησης, χημειοκίνες και κυτοκίνες, οδηγώντας σε εξαγγελίωση των κυττάρων στο αρτηριακό τοίχωμα και περαιτέρω οξείδωση της LDL. Επιπλέον, η MM-LDL έχει επίσης βρεθεί ότι επάγει την έκφραση TF στα ECs. Ωστόσο, η εκτεταμένη Ox-LDL διεγείρει τον πολλαπλασιασμό των SMCs και αναγνωρίζεται από τους SRs των μακροφάγων, οδηγώντας στον σχηματισμό αφρωδών κυττάρων, συμβάλλοντας άμεσα στη συσσώρευση λιπώδους πλάκας.^[3]

2.5.1 Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ Ox-LDL ΣΤΗΝ ΑΘΗΡΟΣΚΛΗΡΩΣΗ

Η Ox-LDL, που σχηματίζεται και διατηρείται στον υποενδοθηλιακό χώρο, ενεργοποιεί τα ECs μέσω της επαγωγής των μορίων προσκόλλησης στην επιφάνεια του κυττάρου, τα οποία με τη σειρά τους προκαλούν την προσκόλληση των μονοκυττάρων του αίματος και των T λεμφοκυττάρων.^[39] Τα λευκά αιμοσφαίρια του αίματος που στρατολογούνται, μεταναστεύουν στον εσωτερικό χιτώνα, καθοδηγούμενα από χημειοκίνες. Πράγματι, η Ox-LDL διεγείρει τα ECs και SMCs να εκκρίνουν MCP-1 και mCSF, που επάγουν τη στρατολόγηση των μονοκυττάρων στο ενδοθηλιακό τοίχωμα.^[40, 41, 42]

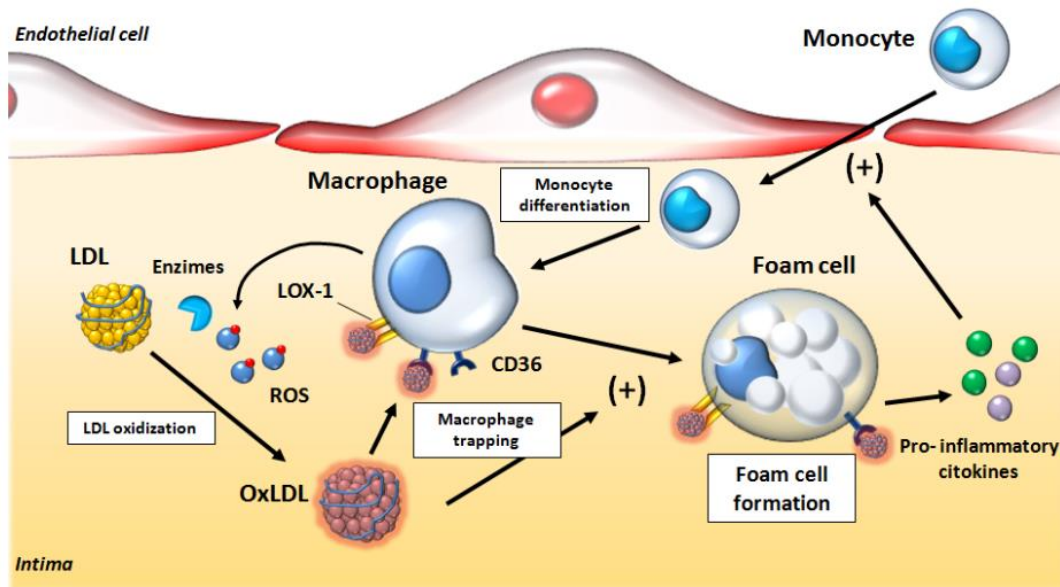
Συγκεκριμένα, τα κυκλοφορούντα σωματίδια LDL μεταφέρονται από τον αγγειακό χώρο στο αρτηριακό τοίχωμα, όπου διατηρούνται στην ECM του υποενδοθηλιακού χώρου, μέσω της δέσμευσης βασικών αμινοξέων της ApoB-100 σε αρνητικά φορτισμένες θεϊκές ομάδες πρωτεογλυκανών. Στη συνέχεια, αφού πραγματοποιηθεί η οξειδωτική τροποποίηση, η Ox-LDL προσλαμβάνεται από τους SRs στην επιφάνεια των ECs, και εισέρχεται στο αγγειακό μέσο.^[43] Ο LOX-1, που προσδιορίζεται ως ο κύριος υποδοχέας της Ox-LDL στα ECs, εκφράζεται σε αρκετές προ-φλεγμονώδεις καταστάσεις και φαίνεται να παίζει σημαντικό ρόλο στην ED που προκαλείται από την Ox-LDL.^[44] Επίσης, η αυξορρύθμιση των μορίων ενδοθηλιακής προσκόλλησης, όπως των ICAM-1 και VCAM-1, μπορεί να προκληθεί από την Ox-LDL με τρόπο εξαρτώμενο από τον LOX-1, ο οποίος διαμεσολαβείται από τον NF-κB.^[45] Επιπλέον, οι ανασταλτικές επιδράσεις της Ox-LDL στην ενδοθηλιακή παραγωγή NO, έχουν συσχετιστεί με τη λειτουργία του LOX-1.^[46, 47] Τέλος, έχει προταθεί ότι η Ox-LDL μπορεί να προκαλέσει

θάνατο των ECs μέσω της ενεργοποίησης των μονοπατιών NF-κB και AP-1, επιδεινώνοντας την ED και προάγοντας της εξέλιξη της αθηρωματικής πλάκας.^[48]



Εικόνα 2.5.1.1: Ο ρόλος της Ox-LDL στην ED.^[43]

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, τα μονοκύτταρα/μακροφάγα και τα SMCs, απορροφούν την Ox-LDL μέσω των SRs, όπως των SR-A, CD36 και LOX-1.^[43] Από τη μία πλευρά, η Ox-LDL προκαλεί αυξορρύθμιση του CD36, μέσω της οδού PPAR-γ, διευκολύνοντας την εγκόλπωση περισσότερης Ox-LDL.^[49, 50] Αυτή η εγκόλπωση ενεργοποιεί τα μακροφάγα, επάγοντας την έκκριση κυτοκινών που στρατολογούν τα κύτταρα του ανοσοποιητικού στον έσω χιτώνα και την έκκριση των ενζύμων μυελοϋπεροξειδάση και 12/15-λιποξυγενάση, τα οποία πιστεύεται ότι συμμετέχουν στην οξείδωση της νέας LDL.^[51] Από την άλλη πλευρά, ενώ η βασική έκφραση του LOX-1 είναι πολύ χαμηλή, μπορεί να πυροδοτηθεί από την επίδραση προφλεγμονωδών κυτοκινών, Ox-LDL ή άλλων ερεθισμάτων. Έτσι, η πρόσληψη Ox-LDL από τα μακροφάγα αυξάνεται σημαντικά, ευνοώντας τον σχηματισμό αφρωδών κυττάρων. Η συσσώρευση Ox-LDL μπορεί να οδηγήσει σε απόπτωση ή νέκρωση των αφρωδών κυττάρων, σχηματίζοντας κυτταρικά υπολείμματα που εναποτίθενται στον πυρήνα της αθηρωματικής πλάκας και συμβάλλοντας στην εξέλιξη της φλεγμονής.^[52, 53]

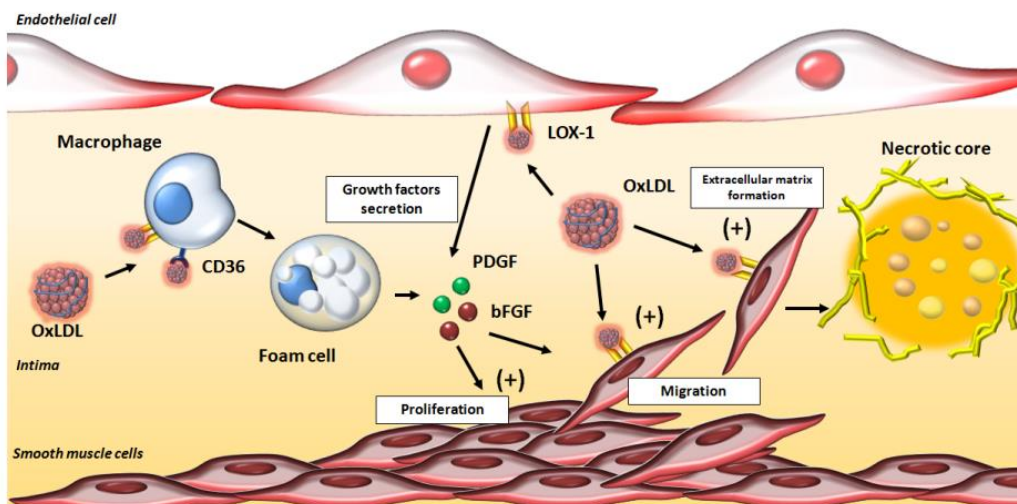


Εικόνα 2.5.1.2: Ο ρόλος της Ox-LDL στο σχηματισμό αφρωδών κυττάρων.^[42]

Η μετανάστευση και ο επακόλουθος πολλαπλασιασμός των SMCs στον έσω χιτώνα είναι μερικά από τα χαρακτηριστικά του αθηρωματικού φαινομένου και παίζουν κρίσιμο ρόλο σε αυτό. Τα SMCs μεταναστεύουν από τον μέσο χιτώνα στον υποενδοθηλιακό χώρο, όπου πολλαπλασιάζονται ως απόκριση σε αυξητικούς παράγοντες. Ο πολλαπλασιασμός των SMCs μπορεί να διεγερθεί από την Ox-LDL, καθώς αυτά τα σωματίδια ενισχύουν την έκφραση και την έκκριση του PDGF και του bFGF από τα ECs και τα μακροφάγα.^[54, 55] Από την άλλη πλευρά, η Ox-LDL επάγει επίσης την έκκριση μιας ποικιλίας άλλων αυξητικών παραγόντων και των υποδοχέων τους, όπως IGF-1 και EGF, όλα με μιτογονικά αποτελέσματα που προκαλούν τον πολλαπλασιασμό των SMCs.^[56]

Η Ox-LDL έχει επίσης αποδειχθεί ότι προκαλεί αλλαγές απευθείας στα SMCs. Συγκεκριμένα, αυξάνει τη μετανάστευση και οδηγεί σε αλλαγές στον φαινότυπο των SMCs, με αποτέλεσμα να παράγουν μεγάλες ποσότητες ECM. Η παραγωγή διάμεσου κολλαγόνου και ελαστίνης οδηγεί στη δημιουργία ενός ινώδους καλύμματος που καλύπτει την αναπτυσσόμενη αθηρωματική πλάκα, σχηματίζοντας έναν “νεκρωτικό πυρήνα” που περιέχει αφρώδη κύτταρα, κυτταρικά υπολείμματα, εξωκυτταρικά λιπίδια και λυσοσωμικά ένζυμα. Έτσι, η Ox-LDL συμμετέχει στην επέκταση του μεγέθους της αθηρωσκληρωτικής βλάβης.^[57, 58]

Επιπλέον, η Ox-LDL επάγει την έκφραση του LOX-1 στα SMCs και μάλιστα, έχει προταθεί ότι πολλές από τις συνέπειες της Ox-LDL μεσολαβούνται από τον υποδοχέα αυτόν.^[56] Μία άλλη σημαντική συνέπεια που προκαλείται από τον LOX-1 είναι η αύξηση της παραγωγής ROS που προκαλείται από την Ox-LDL στα SMCs, η οποία μπορεί να προκαλέσει τον κυτταρικό θάνατο, συμβάλλοντας στην αστάθεια της πλάκας και στη ρήξη αυτής στο τελικό στάδιο της αθηροσκλήρωσης. Συνολικά, τα στοιχεία υποδηλώνουν ότι η Ox-LDL διαδραματίζει κρίσιμο ρόλο στην αστάθεια της πλάκας και ως εκ τούτου στην ανάπτυξη των επιπλοκών της.^[59]



Εικόνα 2.5.1.3: Ο ρόλος της Ox-LDL στον πολλαπλασιασμό και τη μετανάστευση των SMCs.^[42]

2.5.2 Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ Ox-HDL ΣΤΗΝ ΑΘΗΡΟΣΚΛΗΡΩΣΗ

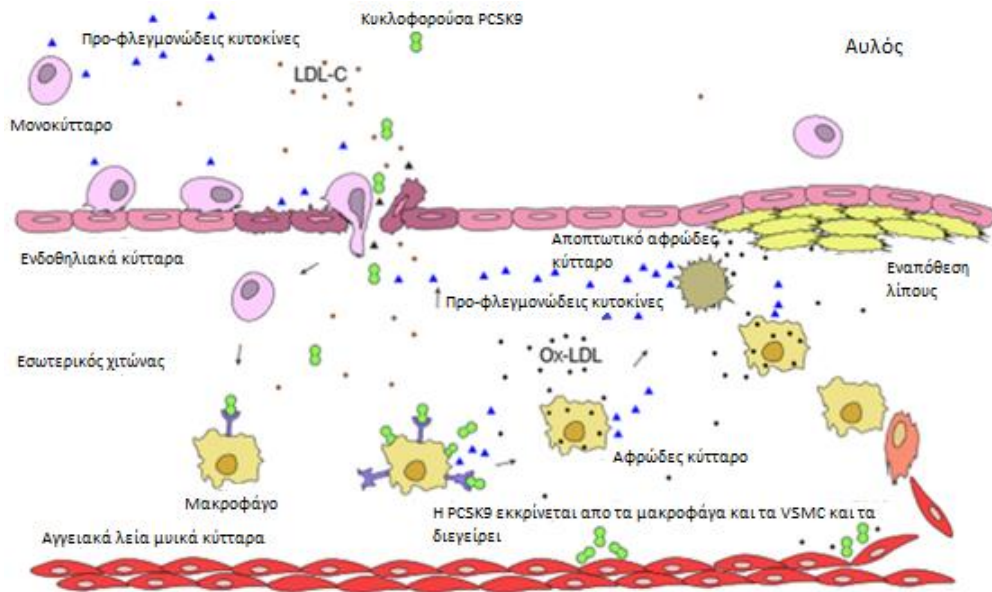
Μια άλλη σημαντική πτυχή του ρόλου της οξειδωσης στην αθηροσκλήρωση είναι η επίδρασή της στην HDL. Την ίδια στιγμή που η LDL εισέρχεται στον έσω χιτώνα, η HDL εισέρχεται επίσης στον έσω χιτώνα και οξειδώνεται από FRs. Ωστόσο, η Ox-HDL δεν προσλαμβάνεται από τα μακροφάγα. Η HDL βοηθά στην πρόληψη της αθηροσκλήρωσης, αφαιρώντας τη χοληστερόλη από τα αφρώδη κύτταρα και περιορίζοντας τις φλεγμονώδεις διεργασίες που χαρακτηρίζουν την αθηροσκλήρωση. Επιπλέον, η HDL απορροφά τις FRs που είναι διαφορετικά διαθέσιμες στην LDL.^[9] Όμως, οι οξειδωτικές τροποποιήσεις της HDL προκαλούν κάποια απώλεια της προστατευτικής της λειτουργίας.^[3]

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: PCSK9

3.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η δυσλειτουργία των ECs είναι ένας παθολογικός μεσολαβητής της ανάπτυξης, της εξέλιξης και των κλινικών εκδηλώσεων της αθηροσκληρωτικής νόσου. Η φλεγμονή σχετίζεται με τη δυσλειτουργία των ECs, αλλά οι υπεύθυνοι μηχανισμοί δεν είναι καλά χαρακτηρισμένοι. Υπάρχουν ουσιαστικές ενδείξεις ότι, η PCSK9 είναι αυξημένη σε προ-φλεγμονώδεις καταστάσεις, κάτι το οποίο σχετίζεται με δυσμενή καρδιαγγειακά συμβάντα. Επιπλέον, η PCSK9 είναι αυξημένη σε ECs που εκτίθενται σε προ-φλεγμονώδες ερέθισμα, και αυτή η αύξηση σχετίζεται με τη δυσλειτουργία των κυττάρων αυτών. Επίσης, έχει αποδειχθεί ότι, η PCSK9 είναι ένας αιτιώδης σύνδεσμος μεταξύ της φλεγμονής και της δυσλειτουργίας των ECs, ένας ισχυρός παράγοντας αθηροσκληρωτικής νόσου.^[60]

Η συμμετοχή της PCSK9 στη σύνθετη διαδικασία οξειδωσης κατά τη διάρκεια της αθηρογένεσης δεν έχει μελετηθεί επαρκώς. Η PCSK9 είναι γνωστό ότι προκαλεί τη διέγερση ενός συνόλου χημειοκινών και κυτοκινών, ειδικά από μακροφάγα. Αυτή η διέγερση έχει ως αποτέλεσμα την αυξημένη διήθηση και την ενεργοποίηση των μονοκυττάρων. Τα μακροφάγα και τα VSMCs εκκρίνουν επίσης PCSK9 εντός της πλάκας, συμβάλλοντας σε αυξημένη φλεγμονή και εναπόθεση λίπους. Συλλογικά, η προ-φλεγμονώδης διέγερση εντός της πλάκας οδηγεί τη στρατολόγηση και τη διήθηση περισσότερων κυκλοφορούντων μονοκυττάρων, τροφοδοτώντας τον κύκλο (Εικόνα 3.1.1).^[3]



Εικόνα 3.1.1: Συμμετοχή της PCSK9 στην ανάπτυξη αθηρωματικής πλάκας.^[3]

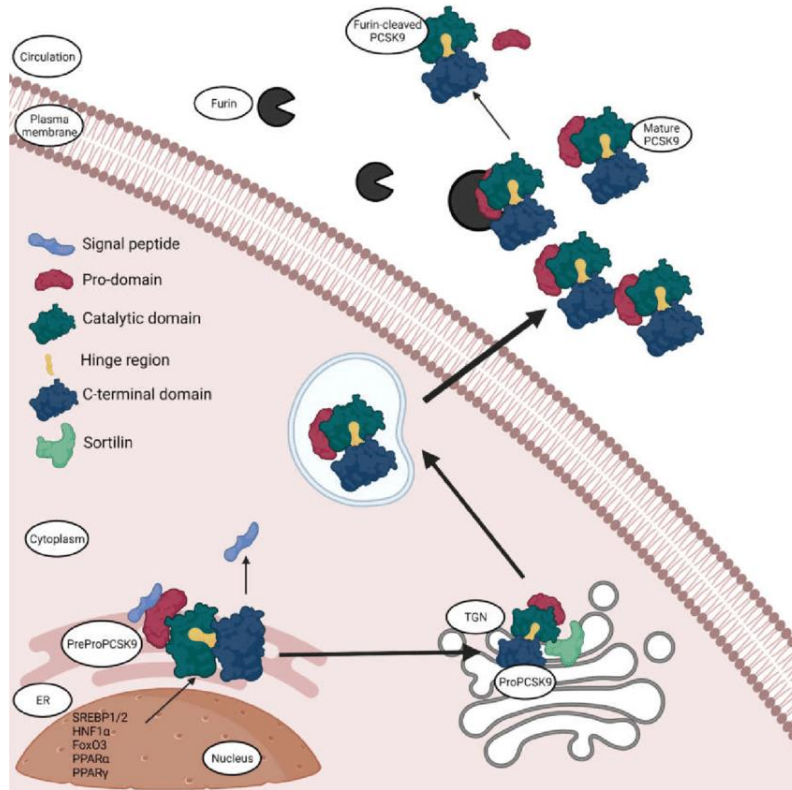
3.2 ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΚΑΙ ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΗΣ PCSK9

Η PCSK9, είναι μια διαλυτή πρωτεάση που έχει μελετηθεί ευρέως στον τομέα της ομοιόστασης της χοληστερόλης και στην καρδιαγγειακή βιολογία μετά την ανακάλυψή της το 2003. Είναι μέρος της οικογένειας εκκριτικών πρωτεασών σερίνης που ονομάζονται PCs, και αρχικά είχε ονομαστεί ως NARC1. Είναι ενδιαφέρον ότι τα επίπεδα της PCSK9 στην κυκλοφορία, αυξάνονται βιολογικά αργά τη νύχτα και μειώνονται αργά το απόγευμα, ακολουθώντας έναν ημερήσιο ρυθμό. Επιπλέον, τα συνολικά επίπεδα PCSK9 στην κυκλοφορία επηρεάζονται από το φύλο, καθώς οι γυναίκες έχουν υψηλότερα επίπεδα σε σύγκριση με τους άνδρες, υποδηλώνοντας ότι ορμόνες, όπως τα οιστρογόνα, εμπλέκονται στην έκφραση και την έκκριση της PCSK9. Εκτός από το φύλο, έχει επίσης αποδειχθεί ότι ο δείκτης μάζας σώματος, τα επίπεδα χοληστερόλης και τριγλυκεριδίων του πλάσματος και η αρτηριακή πίεση ρυθμίζουν τη συνολική συγκέντρωση της PCSK9.^[61]

Η πιο γνωστή λειτουργία της PCSK9 είναι η επίδρασή της στον LDLR, στον οποίο μπορεί να συνδεθεί και να διευκολύνει τη λυσοσωμική αποικοδόμησή του.^[61] Επομένως, η PCSK9 είναι ένα ένζυμο ικανό να ρυθμίζει τα επίπεδα της LDL-C στον ορό μέσω της αποικοδόμησης του

LDLR, και άρα ο αποκλεισμός της PCSK9 με συγκεκριμένους αναστολείς προκαλεί σημαντική μείωση στα επίπεδα της LDL-C στο αίμα τόσο σε υγιείς εθελοντές όσο και σε άτομα με υπερχοληστερολαιμία, με ή χωρίς συν-θεραπεία με στατίνες.^[1]

Το γονίδιο PCSK9, που βρίσκεται στο χρωμόσωμα 1p32, έχει μήκος 22 kb και περιλαμβάνει 12 εξόνια και 11 εσώνια, που κωδικοποιούν μια πρωτεάση 692 αμινοξέων. Η πρωτεάση αυτή δομείται μέσα στο ER ως γλυκοπρωτεΐνη. Διάφοροι μεταγραφικοί παράγοντες και συμπαράγοντες ρυθμίζουν την έκφραση του γονιδίου PCSK9, όπως η SREBP-1/2, ο HNF1A, ο FOXO3, και οι PPAR α και PPAR γ . Η συντιθέμενη PCSK9 έχει τη μορφή ανενεργού ζυμογόνου, που ονομάζεται PreProPCSK9, το οποίο αργότερα υφίσταται μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις για να σχηματίσει μια ώριμη πρωτεΐνη 62 kDa. Το PreProPCSK9 έχει πέντε τμήματα: ένα πεπτίδιο σήματος, μια N-τερματική περιοχή (προ-περιοχή), την καταλυτική περιοχή, την C-τερματική περιοχή, και ένα μικρό πεπτίδιο που χρησιμεύει ως σύνδεσμος μεταξύ της καταλυτικής και τερματικής περιοχής. Η ωρίμανση ή ο σχηματισμός της ενεργής PCSK9 απαιτεί τρία βήματα, όπου αρχικά η πρωτεΐνη υφίσταται αυτοκαταλυτική διάσπαση στο ER για να χάσει το πεπτίδιο σήματος, και γίνεται Pro-PCSK9. Η Pro-PCSK9 στη συνέχεια μεταφέρεται στο TGN, όπου αλληλεπιδρά με την πρωτεΐνη Sortilin, υφίσταται πρωτεόλυση για να σχηματιστεί μια προ-περιοχή 13 kDa και ένα ώριμο ετεροδιμερές PCSK9 62 kDa, και η ώριμη PCSK9 μεταφέρεται σε ενδοσώματα και εκκρίνεται στην κυκλοφορία. Κανονικά, η ώριμη PCSK9 έχει την προ-περιοχή της μη ομοιοπολικά συνδεδεμένη, αν και στην κυκλοφορία μπορεί να συναντήσει φουρίνη, η οποία στη συνέχεια διασπά την προ-περιοχή και απελευθερώνει ένα μικρότερο πεπτίδιο στην κυκλοφορία που είναι λιγότερο ενεργό από το ετεροδιμερές της PCSK9. Αυτή η μορφή είναι ελαφρώς λιγότερο ενεργή και έχει τη μισή συγγένεια με τον LDLR καθώς και μικρότερο χρόνο ημιζωής, σε σύγκριση με την ανέπαφη μορφή ετεροδιμερούς. Αυτή η διάσπαση μπορεί να συμβεί μόνο στην κυκλοφορία (**Εικόνα 3.2.1**).^[61, 62]



Εικόνα 3.2.1: Σύνθεση και έκκριση της PCSK9.^[56]

Τα ηπατοκύτταρα είναι η κύρια πηγή της PCSK9, που εκκρίνεται στην κυκλοφορία. Αν και η πλειονότητα των μελετών που σχετίζονται με την PCSK9 έχουν εστιάσει στην έκφρασή της στο ήπαρ και στην τοπική της λειτουργία στον LDLR, έχει αποδειχθεί ότι εκφράζεται επίσης σε άλλα κύτταρα και ιστούς, όπως στους νεφρούς, στους πνεύμονες, στο έντερο, στο κεντρικό νευρικό σύστημα, αλλά και στα αιμοφόρα κύτταρα. Συγκεκριμένα, η έκφραση της PCSK9 υπάρχει στους δύο συστατικούς κυτταρικούς τύπους που ρυθμίζουν την αγγειακή λειτουργία, δηλαδή στα ECs και στα VSMCs, καθώς και σε φλεγμονώδη κύτταρα, όπως τα μακροφάγα, το οποίο υποδηλώνει ότι η PCSK9 ρυθμίζει την αθηροσκλήρωση όχι μόνο επηρεάζοντας τα επίπεδα LDL-C στον ορό, αλλά επίσης επηρεάζοντας τις κυτταρικές διεργασίες στο αγγειακό τοίχωμα, για να επιδεινώσει την αθηροσκλήρωση. Η σοβαρότητα της αθηροσκλήρωσης συσχετίζεται θετικά με τα κυκλοφορούντα επίπεδα PCSK9.^[1, 63]

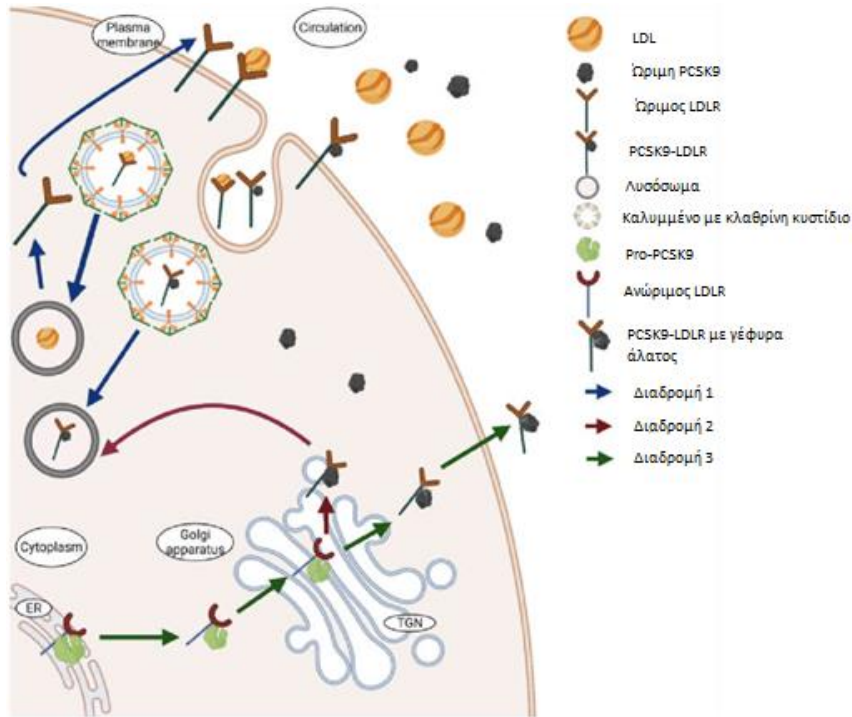
3.3 Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ PCSK9 ΣΤΟΝ LDLR

Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, ο κύριος ρόλος της ώριμης PCSK9 είναι να μειώνει τα επίπεδα του LDLR που εκφράζονται στο ήπαρ ή στους περιφερικούς ιστούς, αποτρέποντας έτσι έμμεσα την πρόσληψη της LDL από τα ηπατοκύτταρα και τους ιστούς. Η PCSK9 συμβάλλει στην αποικοδόμηση του LDLR μέσω δύο διαφορετικών οδών: της ενδοκυτταρικής και εξωκυτταρικής οδού. Η δεύτερη οδός, εξαρτάται από την PCSK9 που κυκλοφορεί. Τυπικά, ο LDLR στην επιφάνεια των κυττάρων συνδέεται με την κυκλοφορούσα LDL και μεταφέρει το σωματίδιο της χοληστερόλης, μέσω κοιλοτήτων επικαλυμμένων με κλαθρίνη, για αποικοδόμηση από τα λυσοσώματα. Ο υποδοχέας στη συνέχεια ανακυκλώνεται πίσω στην επιφάνεια. Παρουσία PCSK9, σχηματίζεται ένας δεσμός μεταξύ της περιοχής EGF-A του LDLR και της καταλυτικής περιοχής της PCSK9. Το όξινο pH των κυστιδίων αυξάνει την αλληλεπίδραση μεταξύ PCSK9 και LDLR. Επομένως, στα ενδοσώματα/λυσοσώματα, η PCSK9 εξακολουθεί να είναι συνδεδεμένη με το πρόσδεμά της και ο LDLR δεν μπορεί να λάβει τη σωστή διαμόρφωση που απαιτείται για την ανακύκλωσή του στην κυτταρική επιφάνεια και έτσι αποικοδομείται στο λυσόσωμα (Εικόνα 3.3.1, Διαδρομή 1).^[1, 61] Στην περίπτωση αυτή, η ικανότητα της PCSK9 να προάγει την αποικοδόμηση του LDLR είναι ανεξάρτητη από την καταλυτική της δράση, υποδεικνύοντας ότι η PCSK9 λειτουργεί ως συνοδός, ένας τρόπος δράσης που είναι μοναδικός μεταξύ των πρωτεασών σερίνης.^[61]

Η PCSK9 διευκολύνει επίσης την ενδοκυτταρική αποικοδόμηση του ώριμου LDLR που υπάρχει στο TGN, πριν φτάσει στην κυτταρική επιφάνεια. Στη συσκευή Golgi, ο LDLR γλυκοζυλιώνεται και μετατρέπεται στην ώριμη μορφή του. Σε αυτό το σημείο, η καταλυτική περιοχή της ώριμης PCSK9 μπορεί να δεσμεύσει τον ώριμο LDLR και να τον κατευθύνει ξανά στα λυσοσώματα για αποικοδόμηση (Εικόνα 3.3.1, Διαδρομή 2).^[1, 61]

Από την άλλη πλευρά, η PCSK9 αλληλεπιδρά με τον LDLR με μη καταστροφικούς τρόπους. Η Pro-PCSK9 συνδέεται επίσης με τον LDLR στο ER και μεταφέρει το σύμπλεγμα στη συσκευή Golgi, όπου τόσο η PCSK9 όσο και ο LDLR υφίστανται ωρίμανση. Η ώριμη PCSK9 συνδέεται με τον LDLR με μια πρόσθετη γέφυρα άλατος, και αυτό το σύμπλεγμα απελευθερώνεται από το κύτταρο για να αυξήσει τον αριθμό των υποδοχέων στην κυτταρική επιφάνεια (Εικόνα 3.3.1, Διαδρομή 3). Ωστόσο, αυτή η δραστηριότητα συνοδού δεν είναι κρίσιμη για τη μεταφορά του LDLR στις κυτταρικές επιφάνειες και συμβαίνει λιγότερο συχνά από τη δραστηριότητα

υποβάθμισης, δεδομένου ότι ακόμη και απουσία PCSK9, ο LDLR μεταφέρεται στην κυτταρική μεμβράνη χωρίς κανένα εμπόδιο.^[61]



Εικόνα 3.3.1: Αλληλεπιδράσεις μεταξύ της PCSK9 και του LDLR.^[61]

Η λειτουργία της PCSK9 δεν περιορίζεται μόνο στη ρύθμιση του LDLR, αλλά επηρεάζει επίσης τη λυσοσωμική αποικοδόμηση διαφόρων υποδοχέων που σχετίζονται δομικά με αυτόν. Υποδοχείς, όπως ο VLDLR, ο LRP1 και ο ApoER2, περιέχουν επίσης τομείς EGF-A που επιτρέπουν την αλληλεπίδραση με την PCSK9. Ωστόσο, είναι πιθανό η αλληλεπίδραση PCSK9 με αυτούς τους υποδοχείς να μην οδηγεί στην αποδόμησή τους, ή τουλάχιστον όχι σε όλους τους ιστούς. Επίσης, η έκφραση της PCSK9 από ECs, SMCs, καρδιομυοκύτταρα μαζί με διάφορα ανοσοκύτταρα, οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η PCSK9 παίζει σημαντικό ρόλο σε παθολογίες του καρδιαγγειακού συστήματος.^[61, 62]

3.4 Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ PCSK9 ΣΤΗΝ ΑΘΗΡΟΣΚΛΗΡΩΣΗ

Η απορρύθμιση της φυσιολογικής αιμοδυναμικής διατηρητικής τάσης, τα υψηλά επίπεδα κυκλοφορίας προ-φλεγμονωδών μεσολαβητών (Ox-LDL, TNF α , IL-1 β), η υπερβολική παραγωγή ROS, και η κυτταρική απόπτωση, μπορούν να συμβάλουν στην αλλοίωση της ακεραιότητας του ενδοθηλίου και στην προώθηση μιας σειράς γεγονότων που οδηγούν σε προχωρημένη αθηροσκλήρωση. Υπό φυσιολογικές συνθήκες, το αρτηριακό τοίχωμα υπόκειται συνεχώς σε αλλαγές αιμοδυναμικής διατηρητικής τάσης και τα κυτταρικά συστατικά του ανταποκρίνονται με δομικές και λειτουργικές προσαρμοστικές δράσεις.^[1] Γενικά, μια υψηλή διατηρητική τάση θεωρείται αθηροπροστατευτική επειδή αναστέλλει την προσκόλληση των φλεγμονωδών κυττάρων στο τοίχωμα του αγγείου, ρυθμίζει την παραγωγή NO και την παραγωγή ή ενεργοποίηση προ-θρομβωτικών παραγόντων.^[64] Αντίθετα, η χαμηλή διατηρητική τάση που εμφανίζεται συνήθως σε περιοχές αρτηριακής κάμψης, στην κυρτή θέση και σε διακλαδώσεις, συμβάλλει στην αυξημένη έκφραση μεταγραφικών παραγόντων, όπως η AP-1 και ο NF- κ B, τα οποία προάγουν την έκφραση πρωτεϊνών που εμπλέκονται σε μια προ-οξειδωτική και προ-φλεγμονώδη κατάσταση.^[1] Έχει διαπιστωθεί ότι τα ECs εκφράζουν υψηλά επίπεδα PCSK9 υπό συνθήκες χαμηλής διατηρητικής τάσης ή/και παρουσία φλεγμονωδών μεσολαβητών, όπως αυτοί που εμπλέκονται στην οδό NF- κ B /TLR-4 ή στην οδό Ox-LDL/ LOX-1.^[64, 65]

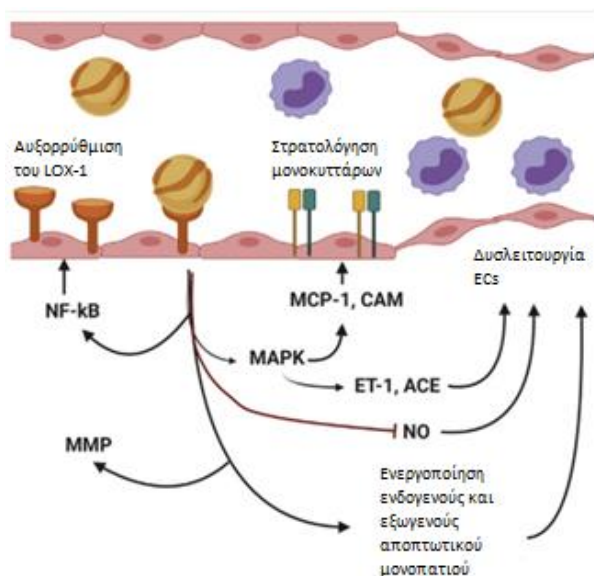
Η PCSK9 ασκεί προ-φλεγμονώδη αποτελέσματα ανεξάρτητα από την κυκλοφορία της LDL-C, ενισχύοντας την τοπική παραγωγή κυτοκίνης μέσω της ενεργοποίησης του NF- κ B.^[66] Ο NF- κ B ελέγχει τη μεταγραφή πολλών γονιδίων που έχουν ρόλο στη φλεγμονή και την αθηροσκλήρωση, συμπεριλαμβανομένων των κυτοκινών, των χημειοκινών, των μορίων προσκόλλησης, των πρωτεϊνών οξειδίας φάσης, των ρυθμιστών της απόπτωσης και του κυτταρικού πολλαπλασιασμού.^[48] Η οδός σηματοδότησης TLR4/NF- κ B, έχει βρεθεί ότι είναι η κύρια οδός που μεσολαβεί στην επαγόμενη από PCSK9 έκφραση της προ-φλεγμονώδους κυτοκίνης. Ο TLR4 διεγείρει την ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα NF- κ B, ο οποίος είναι υποχρεωμένος να παράγει πολλά προ-φλεγμονώδη γονίδια, συμπεριλαμβανομένων των TNF α , IL-1, IL-6 και MCP-1. Λειτουργώντας κυρίως μέσω της ρύθμισης της φλεγμονώδους απόκρισης, ο NF- κ B είναι ένας ευαίσθητος μεταγραφικός παράγοντας οξειδοαναγωγής που μπορεί να ενεργοποιηθεί από μια ποικιλία ερεθισμάτων, συμπεριλαμβανομένων της Ox-LDL, των ROS, των TLRs, των κυτοκινών και των βακτηριακών προϊόντων όπως ο LPS.^[65] Η

υπερέκφραση της PCSK9 προκαλεί την μετατόπιση του NF-κB στον πυρήνα, αυξάνοντας τα επίπεδα mRNA των προ-φλεγμονωδών κυτοκινών και την έκφραση του TLR4.^[1] Επομένως, ο NF-κB έχει σημαντικό ρόλο σηματοδότησης στο φλεγμονώδες ερέθισμα που προκαλείται από την έκφραση της PCSK9, και η PCSK9 επιταχύνει τη φλεγμονή της αθηρωματικής πλάκας μέσω της ενεργοποίησης της οδού TLR4/NF-κB.^[67] Σύμφωνα με μια μελέτη, η αυξορρύθμιση και μειορρύθμιση της PCSK9, αντίστοιχα, αύξησε και μείωσε την επαγόμενη από την Ox-LDL έκφραση των προ-φλεγμονωδών κυτοκινών συμπεριλαμβανομένων των TNFα, IL-1β και MCP-1. Αυτό το αποτέλεσμα σχετίζεται με την αυξορρύθμιση της έκφρασης του TLR4 που προκαλείται από την Ox-LDL, ακολουθούμενη από πυρηνική μετατόπιση του NF-κB.^[65] Η PCSK9 μπορεί να αυξήσει τις προ-φλεγμονώδεις κυτοκίνες πιθανότατα μέσω της δέσμευσης στην C-τερματική περιοχή του TLR4, οδηγώντας σε αυξορρύθμιση της έκφρασης του TLR4 και ενεργοποίηση της οδού σηματοδότησης TLR4/NF-κB.^[68]

Οι TLRs είναι κυτταρικοί υποδοχείς που αναγνωρίζουν παθογόνα και ρυθμίζουν την έκφραση των προφλεγμονωδών κυτοκινών, αλλά και τις πρώιμες ανοσολογικές αποκρίσεις στη μόλυνση. Μεταξύ των TLRs, ο TLR4 δρα ως υποδοχέας για τον LPS και ενεργοποιεί τον NF-κB για να προάγει μια φλεγμονώδη απόκριση. Επίσης, η σύνθεση της PCSK9 ρυθμίζεται από το μονοπάτι σηματοδότησης του TLR4, μέσω της ενεργοποίησης των πρωτεϊνών MyD88 και NF-κB, και η διαλυτή PCSK9 μπορεί να λειτουργήσει ως φλεγμονώδης μεσολαβητής μέσω δέσμευσης και αναγνώρισης του TLR4, όπως φαίνεται και στην **Εικόνα 3.4.2.A**.^[69]

Ο NF-κB, η MAPK και το κατεστραμμένο μιτοχονδριακό DNA έχουν σημαντικούς ρόλους στην πρόσληψη Ox-LDL που προκαλείται από την PCSK9.^[67] Υπάρχει μια ισχυρή σχέση και ένας αμφίδρομος βρόχος θετικής ανάδρασης μεταξύ της έκφρασης PCSK9, της σύνθεσης LOX-1, της παραγωγής ROS και μιας προ-φλεγμονώδους κατάστασης.^[1] Η δέσμευση Ox-LDL-LOX-1 προκαλεί ED μέσω πολλαπλών οδών. Η ενεργοποίηση του LOX-1 από την Ox-LDL ενεργοποιεί την MAPK, η οποία διεγείρει την έκφραση της MCP-1 και την προσκόλληση των μονοκυττάρων μέσω της αυξορρύθμισης των μορίων κυτταρικής προσκόλλησης, όπως το VCAM-1. Συλλογικά, αυτές οι επιδράσεις προάγουν τη μετανάστευση και τη διαφοροποίηση των μονοκυττάρων σε μακροφάγα. Επιπλέον, η ενεργοποίηση της MAPK διεγείρει την παραγωγή αγγειοσυσταλτικών παραγόντων, όπως το ACE και την ET-1. Από την άλλη, η Ox-LDL παρεμβαίνει στην έμφυτη ικανότητα των ECs να παράγουν NO, αυξορρυθμίζοντας τη δραστηριότητα της NADPH και μειορρυθμίζοντας την eNOS. Η αυξορρύθμιση της οξειδάσης

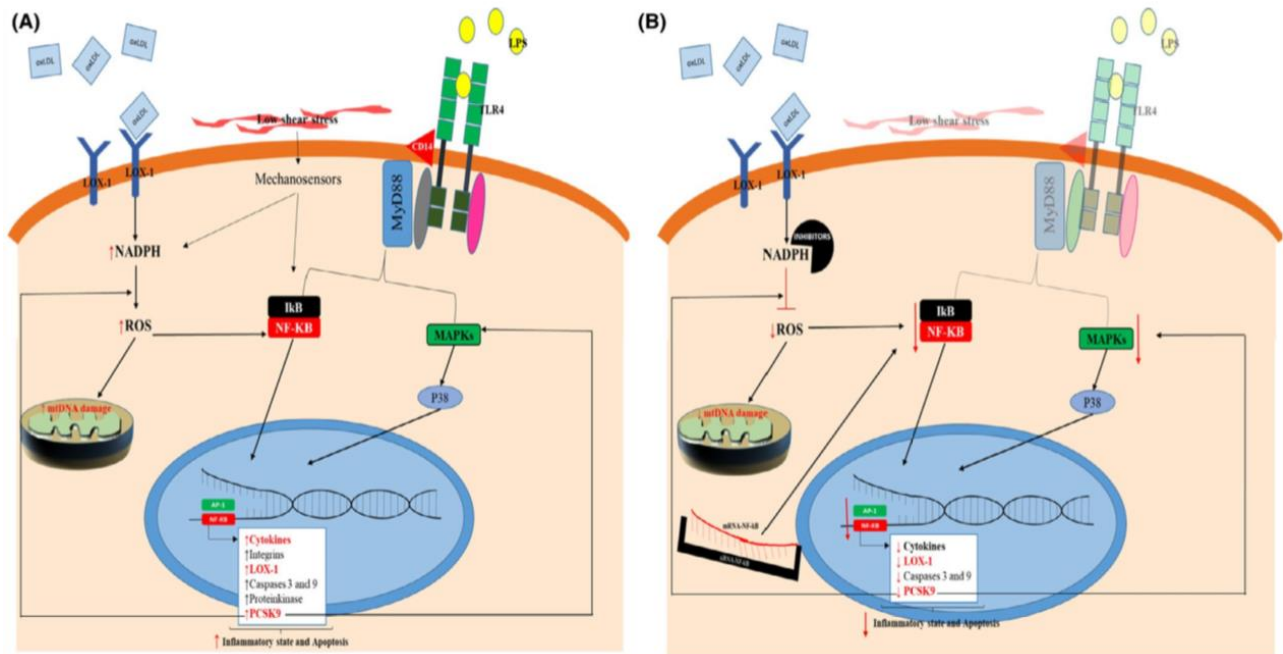
του NADPH προάγει την παραγωγή ROS, τα οποία αντιδρούν με το διαθέσιμο NO και παράγονται υπεροξυνιτρόδη ανιόντα. Τα ανιόντα αυτά με τη σειρά τους, παράγουν νιτρικά και υδροξείδια, τα οποία τελικά προκαλούν αυξημένα επίπεδα FRs και κυτταρική υποξία. Αυτή η διαδικασία προάγει περαιτέρω την ED, μέσω της απορρύθμισης της ομοιόστασης του αγγειακού τόνου (Εικόνα 3.4.1).^[70]



Εικόνα 3.4.1: Καθοδική Μεσολαβητής Ενεργοποίησης LOX-1 σε ECs.^[70]

Επιπλέον στα ECs, η αλληλεπίδραση μεταξύ Ox-LDL και LOX-1 και η επακόλουθη αύξηση των επιπέδων των ROS, είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση της βλάβης του μιτοχondριακού DNA (προ-αποπτωτικό ερέθισμα) και την ενεργοποίηση του NF-κB, ο οποίος διεγείρει την έκφραση του TNFα, των μορίων προσκόλλησης και του LOX-1 στα ECs. Εκτός από την Ox-LDL, η χαμηλή διατμητική τάση και τα φλεγμονώδη ερεθίσματα (όπως ο LPS) συνέβαλαν στην ενεργοποίηση και μετατόπιση του NF-κB στον πυρήνα. Η οδός LPS/TLR4 συμβάλλει επίσης στην ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα AP-1. Στον πυρήνα, ο NF-κB και ο AP-1 ενεργοποιούν την έκφραση προ-αποπτωτικών και προ-φλεγμονωδών μεσολαβητών, καθώς και τη σύνθεση του mRNA της PCSK9. Η PCSK9, με τη σειρά της, προάγει την ενεργοποίηση του NF-κB και του AP-1 μέσω ενός μηχανισμού θετικής ανάδρασης (Εικόνα 3.4.2 A). Μελέτες in vivo και in vitro έχουν δείξει ότι σε ECs, η χρήση αναστολέων οξειδάσης του NADPH ή NF-κB

knockout με τη χρήση μικρού παρεμβατικού RNA (siRNA), μειώνει την παραγωγή των ROS και LOX-1, αλλά μειώνει και τα επίπεδα έκφρασης της PCSK9, που υποδηλώνει τη συμμετοχή αυτών των οδών στην τοπική σύνθεση του ενζύμου (Εικόνα 3.4.2 Β).^[1]



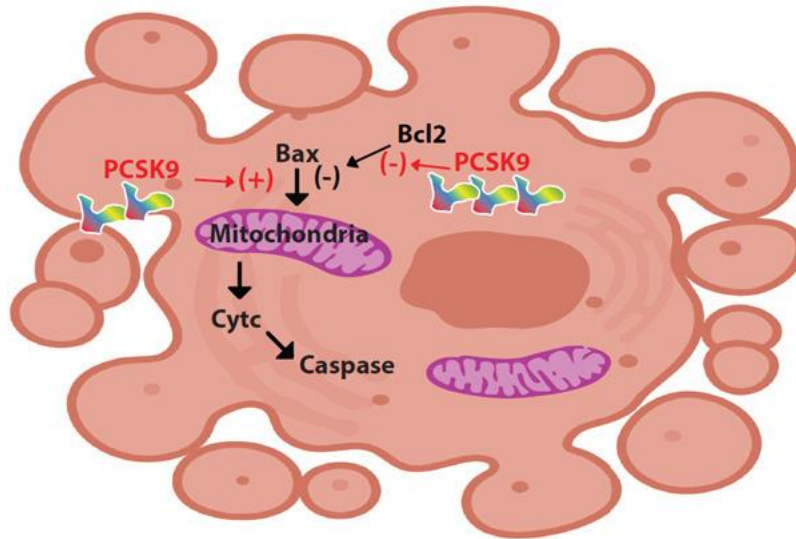
Εικόνα 3.4.2: Α. Οδοί σηματοδότησης TLR4/NF-κB και LPS/TLR4. Β. Χρήση αναστολέων οξειδάσης NADPH ή siRNA για NF-κB.^[1]

Επίσης έχει αναφερθεί μια σχέση μεταξύ PCSK9 και απόπτωσης σε ECs.^[1] Η απόπτωση των ECs προάγει την ED, η οποία αποτελεί θεμέλιο για την ανάπτυξη της αθηροσκλήρωσης.^[9] Συγκεκριμένα, η PCSK9 επάγει την απόπτωση των ECs μέσω της μιτοχondριακής οδού Bcl-2/Bax-κασπάση9-κασπάση3 και της οδού σηματοδότησης p38/JNK/MAPK.^[61] Επίσης, η PCSK9 ρυθμίζει την έκφραση του επαγωγέα απόπτωσης (Bax), και του αναστολέα απόπτωσης (Bcl-2), όπου η ισορροπία μεταξύ αυτών των δύο πρωτεϊνών είναι το κλειδί για την πρόληψη ή την ενεργοποίηση της απόπτωσης. Επιπλέον, η Ox-LDL αυξάνει τα επίπεδα του προ-αποπτωτικού παράγοντα Bax της ενδογενούς αποπτωτικής οδού και αναστέλλει τον αντι-αποπτωτικό παράγοντα Bcl-2, το οποίο οδηγεί σε ενεργοποίηση της κασπάσης 3 και της κασπάσης 9, προκαλώντας απόπτωση των κυττάρων.^[70] Υπάρχουν ενδείξεις ότι, η «σίγαση» του γονιδίου της PCSK9 από το siRNA αναστρέφει τις αποπτωτικές επιδράσεις της Ox-LDL και

αναστέλλει την απόπτωση στα ECs. Ως εκ τούτου, προτείνεται ότι η PCSK9 αυξάνει την απόπτωση των HUVECs μέσω της οδού Bcl/Bax-κασπάση 9-κασπάση 3 (Εικόνα 3.4.3).^[64] Αυτά τα αποτελέσματα διαμεσολαβούνται από τον LOX-1, καθώς η προεπεξεργασία των κυττάρων με αντινοσηματικό mRNA του LOX-1 μειώνει σημαντικά την επαγόμενη από την Ox-LDL ενεργοποίηση των κασπασών καθώς και το ποσοστό των αποπτωτικών κυττάρων. Αυτά τα ευρήματα υποδεικνύουν ότι η Ox-LDL μέσω του υποδοχέα της LOX-1 ρυθμίζει τη δραστηριότητα και την έκφραση των σχετικών παραγόντων στην απόπτωση.^[71]

Επίσης, η «σίγαση» του γονιδίου της PCSK9 από το siRNA, αναστέλλει την απόπτωση καθώς δεν μπορεί να φωσφορυλιωθεί το p38 και το JNK (και τα δύο μέλη της οδού σηματοδότησης MAPK), επιτρέποντας έτσι την ενεργοποίηση του αναστολέα απόπτωσης Bcl-2. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι τα p38 και JNK είναι επίσης υπεύθυνα για τη φωσφορυλίωση BAX και BAD, που ενεργοποιούν τον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο. Έτσι, η PCSK9 μπορεί να προάγει την ενεργοποίηση του καταρράκτη σηματοδότησης MAPK και την απόπτωση των ECs.^[69] Επιπλέον, η Ox-LDL αυξορρυθμίζει την έκφραση της μεμβρανικής πρωτεΐνης Fas, διευκολύνοντας έτσι την απόπτωση που προκαλείται από την πρωτεΐνη αυτή, μέσω της εξωγενούς αποπτωτικής οδού. Η εμπλοκή της Ox-LDL σε εγγενείς και εξωγενείς αποπτωτικές οδούς επιδεινώνει περαιτέρω την ED, προκαλώντας ενδοθηλιακή απόπτωση (Εικόνα 3.4.3). Η απόπτωση των ECs έχει ως αποτέλεσμα αυξημένη αγγειακή διαπερατότητα σε κύτταρα και λιπίδια, πολλαπλασιασμό των SMCs και αυξημένη πήξη, συμβάλλοντας έτσι στην ανάπτυξη αθηροσκληρωτικών βλαβών.^[70]

Οι MMPs είναι μια οικογένεια ενζύμων αποικοδόμησης της θεμέλιας ουσίας, που εμπλέκονται στην αγγειακή αναδιαμόρφωση και συμβάλλουν στον καθορισμό της σταθερότητας της αθηρωματικής πλάκας. Η έκφραση και η δραστηριότητά τους είναι αυξημένες στις αθηρωματικές πλάκες. Η Ox-LDL αυξάνει την έκφραση των MMP-1, MMP-3 και MMP-9 στα ECs, χωρίς να επηρεάζει την έκφραση του TIMPs, υποδηλώνοντας μια επαγόμενη από Ox-LDL ανισορροπία μεταξύ MMPs και TIMPs. Η ενεργοποίηση του LOX-1, μεσολαβεί στη διαμόρφωση των MMPs από την Ox-LDL (Εικόνα 3.4.3).^[71]



Εικόνα 3.4.3: Απόπτωση ECs επαγόμενη από PCSK9.^[67]

Τα μονοκύτταρα/μακροφάγα είναι επίσης απαραίτητα για την ανάπτυξη της αθηροσκλήρωσης, όπως έχει ήδη αναφερθεί. Η PCSK9 μπορεί να είναι ένας νέος σημαντικός παράγοντας, στον καθορισμό του ρόλου των διαφορετικών SRs στην πρόσληψη της Ox-LDL στο προ-φλεγμονώδες περιβάλλον. Μια φλεγμονώδης κατάσταση μπορεί να αυξήσει την έκφραση της PCSK9 στα μακροφάγα σε μεταγραφικό επίπεδο, και υπάρχουν ενδείξεις ότι τα επίπεδα της πρωτεΐνης αυτής σχετίζονται με τα επίπεδα έκφρασης τόσο των SRs, όσο και της πρόσληψης της Ox-LDL από τα μακροφάγα. Συγκεκριμένα έχει αποδειχθεί ότι, τα υψηλά επίπεδα PCSK9 μπορεί να διεγείρουν την μεμβρανική έκφραση των SRA, CD36 και LOX-1 στα μακροφάγα, αλλά και να ενισχύσουν την πρόσληψη της Ox-LDL, κάτι το οποίο συμβάλει στη διαδικασία της αθηροσκλήρωσης. Επίσης αξίζει να σημειωθεί πως η αύξηση της έκφρασης του LOX-1, έχει παρατηρηθεί ως η πιο κυρίαρχη μεταξύ όλων των SRs.^[72] Ωστόσο, η μελέτη της επίδρασης της PCSK9 καθώς και η επαγωγή με Ox-LDL στην ενεργοποίηση των μεμβρανικών SRs της σε μονοκύτταρα περιφερικού αίματος δεν έχει ερευνηθεί επαρκώς.^[73, 76]

3.5 PCSK9 ΚΑΙ ΛΙΠΟΠΡΩΤΕΪΝΕΣ

Κλινικές μελέτες έχουν δείξει ότι τα επίπεδα PCSK9 στο πλάσμα συσχετίζονται θετικά με τα επίπεδα LDL. Αυτή η συσχέτιση θα μπορούσε να αποδοθεί στην κύρια λειτουργία της PCSK9 που είναι η επαγωγή της υποβάθμισης του LDLR, όπως αναφέρθηκε παραπάνω, αλλά θα μπορούσε επίσης να αποδοθεί και στη σχέση της PCSK9 με τα κυκλοφορούντα σωματίδια LDL. Πράγματι, μελέτες έχουν δείξει ότι περίπου το 30% έως 40% της PCSK9 του πλάσματος σχετίζεται με την LDL μέσω μιας αλληλεπίδρασης πρωτεΐνης-πρωτεΐνης με την ApoB-100.^[73] Επιπλέον, η αλληλεπίδραση της PCSK9 με λιποπρωτεΐνες που περιέχουν Apo-B οδηγεί στην καταστολή της αποικοδόμησης της απολιποπρωτεΐνης αυτής μέσω της οδού αυτοφαγοςώματος/λυσοςώματος. Παράλληλα, μελέτες έχουν δείξει ότι η αλληλεπίδραση της PCSK9 με την ApoB-100 παίζει σημαντικό ρόλο στο μεταβολισμό της τελευταίας, με τρόπο ανεξάρτητο από τον LDLR.^[74] Μια άλλη μελέτη έδειξε ότι η απομάκρυνση των λιποπρωτεϊνών που περιέχουν ApoB-100 από το πλάσμα, μείωσε τα επίπεδα της PCSK9 στο πλάσμα κατά 50%, κάτι που υποστηρίζει τα παραπάνω αποτελέσματα.^[73]

Υπάρχουν αντικρουόμενα αποτελέσματα όσον αφορά τη συσχέτιση της PCSK9 με τα σωματίδια HDL. Ορισμένες κλινικές μελέτες έχουν δείξει ότι τα επίπεδα PCSK9 στο πλάσμα συσχετίζονται θετικά με τα επίπεδα HDL, ενώ άλλες απέτυχαν να δείξουν τέτοια συσχέτιση. Προηγούμενα δεδομένα έχουν δείξει ότι η PCSK9 σχετίζεται με λιποπρωτεΐνες που περιέχουν Apo-B, όπως η LDL και η Lp(a), αλλά όχι με την HDL. Αντίθετα, μια πιο πρόσφατη μελέτη προτείνει ότι ο κύριος φορέας της PCSK9 στο πλάσμα είναι τα σωματίδια HDL.^[73]

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

4.1 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΛΙΠΟΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ ΤΩΝ ΔΙΑΔΟΧΙΚΩΝ ΥΠΕΡΦΥΓΟΚΕΝΤΡΗΣΕΩΝ

ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Ο διαχωρισμός των λιποπρωτεϊνών του πλάσματος με υπερφυγοκεντρήσεις, βασίζεται στις διαφορές στην πυκνότητα που αυτές εμφανίζουν. Η διαφορετική πυκνότητα των λιποπρωτεϊνικών σωματιδίων οφείλεται σε διαφορές στο λιπιδιακό περιεχόμενο, το οποίο έχει ως αποτέλεσμα σημαντικές διαφορές στη χημική τους σύσταση και συνεπώς στην πυκνότητα. Έτσι, επιτυγχάνεται η επίπλευση τους σε διαφορετικές στοιβάδες. Οι λιποπρωτεΐνες που απομονώνονται με τις αντίστοιχες πυκνότητές τους είναι οι εξής:

- VLDL + IDL: $d = 0.096 - 1.019 \text{ g/mL}$
- LDL: $d = 1.019 - 1.063 \text{ g/mL}$
- HDL: $d = 1.063 - 1.210 \text{ g/mL}$

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ – ΟΡΓΑΝΑ

- Αντιβιοτικό Πενικιλίνη/Στεπτομυκίνη
- Titriplex III (Merck)
- KBr (Merck). Ξηραίνεται στους $100 \text{ }^\circ\text{C}$ σε κλίβανο για 24 ώρες και διατηρείται σε ξηραντήρα.
- Φυγόκεντρος Πάγκου (Hermle, Z320)
- Υπερφυγόκεντρος (17, Beckman)
- Κεφαλή Υπερφυγοκέντρου (NVT – 65, Beckman)
- Σωλήνες Υπερφυγοκέντρου (Quickseal, Beckman)
- Μembrάνη Διαπίδυσης (Sigma). Ενεργοποιείται σε PBS pH = 7.4 για 3 ώρες και κατακρατά οποιοδήποτε συστατικό έχει μοριακό βάρος μεγαλύτερο από 12 kDa.
- Φίλτρα Διήθησης $0.20 \text{ }\mu\text{M}$ (Corning)

ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

- **Διάλυμα 10% EDTA, pH = 7.0:** 12.8247 g EDTA·2Na·2H₂O (Titriplex III) διαλύονται σε 90 ml dH₂O. Το pH ρυθμίζεται σε 7.0 και ο όγκος συμπληρώνεται στα 100 ml με dH₂O. Το διάλυμα διατηρείται στους 4 °C.
- **Διάλυμα KBr πυκνότητας 1.019 g/mL:** 14.92 g KBr διαλύονται σε dH₂O μέχρι τελικό όγκο 500 ml. Στο διάλυμα αυτό προστίθενται 5 μl/ml 10% EDTA και 1.25 μl/ml πενικιλίνη-στρεπτομυκίνη και διατηρείται στους 4 °C.
- **Διάλυμα KBr πυκνότητας 1.063 g/ml:** 45.99 g KBr διαλύονται σε dH₂O μέχρι τελικό όγκο 500 ml. Στο διάλυμα αυτό προστίθενται 5 μl/ml 10% EDTA και 1.25 μl/ml πενικιλίνη-στρεπτομυκίνη και διατηρείται στους 4 °C.
- **Διάλυμα KBr πυκνότητας 1.210 g/ml:** 159.03 g KBr διαλύονται σε dH₂O μέχρι τελικού όγκου 500 ml. Στο διάλυμα αυτό προστίθενται 5 μl/ml 10% EDTA και 1.25 μl/ml πενικιλίνη-στρεπτομυκίνη και διατηρείται στους 4 °C.
- **Ρυθμιστικό διάλυμα 10 mM PBS, pH = 7.4:** 8.1816 g NaCl, 1.3800 g NaH₂PO₄·H₂O και 1.7795 g Na₂HPO₄·2H₂O διαλύονται σε 800 ml dH₂O και, αφού ρυθμιστεί το pH = 7.4, συμπληρώνεται ο όγκος στο 1L με dH₂O. Το διάλυμα διατηρείται στους 4 °C.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΠΟΡΕΙΑ

Απομόνωση του πλάσματος

Η συλλογή του αίματος γίνεται σε πλαστικά σωληνάκια τα οποία περιέχουν αντιπηκτικό 10% EDTA, pH = 7 σε αναλογία 100 μl για κάθε 10 ml αίματος. Ακολουθεί μέτρηση του βάρους τους και ζυγοστάθμιση αυτών με νερό και, στη συνέχεια, φυγοκέντρηση σε φυγόκεντρο πάγκου για 20 min στα 3100 rpm σε θερμοκρασία δωματίου, ώστε να καταβυθιστούν τα κύτταρα του αίματος. Αφού τελειώσει η φυγοκέντρηση, χρησιμοποιώντας μια πιπέτα συλλέγεται το πλάσμα, μετρείται ο όγκος του, και προστίθενται σε αυτό 5 μl/ml πλάσματος EDTA και 1.25 μl/ml πλάσματος αντιβιοτικά πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη.

1^η Υπερφυγοκέντρωση - Απομόνωση VLDL και IDL

Αφού μετρηθεί ο όγκος του πλάσματος σε ml, πολλαπλασιάζεται με τον συντελεστή 0.0212. Ο αριθμός που προκύπτει ισούται με τα gr στερεού KBr που πρέπει να προστεθούν στο πλάσμα, ώστε η πυκνότητά του να γίνει 1.019 g/ml. Αφού προστεθεί η απαιτούμενη μάζα και πραγματοποιηθεί ήπια ανάδευση μέχρι διάλυσης, το πλάσμα μεταφέρεται σε σωληνάκια υπερφυγοκέντρου. Αυτά συμπληρώνονται μέχρι πληρώσεως με διάλυμα KBr πυκνότητας 1.019 g/ml και, στη συνέχεια, ζυγοσταθμίζονται με ακρίβεια. Τα σωληνάκια τοποθετούνται αντιδιαμετρικά στην κεφαλή της υπερφυγοκέντρου, όπου πραγματοποιείται φυγοκέντρωση είτε στα 40000 rpm για 10 ώρες στους 14 °C είτε στα 45000 rpm για 8 ώρες στους 14 °C. Μετά το πέρας της 1^{ης} υπερφυγοκέντρωσης, οι VLDL και IDL έχουν συγκεντρωθεί στην πάνω επιφάνεια του σωλήνα, διαχωρισμένες από τα υπόλοιπα συστατικά του πλάσματος. Ακολουθεί συλλογή των VLDL, IDL με σύριγγα από το πάνω μέρος του σωλήνα, με μικρές κυκλικές κινήσεις, οι οποίες, στη συνέχεια, απορρίπτονται. Έπειτα συλλέγεται το υπόλοιπο του πλάσματος που περιέχει τις LDL, HDL καθώς και τα υπόλοιπα συστατικά του, και μετρείται ο όγκος του.

2^η Υπερφυγοκέντρωση - Απομόνωση LDL

Αφού μετρηθεί ο όγκος του πλάσματος της 1^{ης} υπερφυγοκέντρωσης σε ml, πολλαπλασιάζεται με τον συντελεστή 0.060. Ο αριθμός που προκύπτει ισούται με τα gr στερεού KBr που πρέπει να προστεθούν στο πλάσμα ώστε η πυκνότητά του να αυξηθεί σε 1.063 g/ml. Αφού προστεθεί η απαιτούμενη μάζα και πραγματοποιηθεί ήπια ανάδευση μέχρι διάλυσης, το πλάσμα μεταφέρεται σε σωληνάκια υπερφυγοκέντρου. Αυτά συμπληρώνονται μέχρι πληρώσεως με διάλυμα KBr πυκνότητας 1.063 g/ml και, στη συνέχεια, ζυγοσταθμίζονται με ακρίβεια. Τα σωληνάκια τοποθετούνται αντιδιαμετρικά στην κεφαλή της υπερφυγοκέντρου, όπου πραγματοποιείται φυγοκέντρωση όπως περιεγράφηκε παραπάνω. Μετά το πέρας της 2^{ης} υπερφυγοκέντρωσης, η LDL έχει συγκεντρωθεί στην πάνω επιφάνεια του σωλήνα διαχωρισμένη από τα υπόλοιπα συστατικά του πλάσματος και, έτσι, απομονώνεται προσεκτικά με μια σύριγγα.

3^η Υπερφυγοκέντρωση – Έκπλυση της LDL και Απομόνωση της HDL

Η απομονωμένη LDL υπερφυγοκεντρείται ακόμα μία φορά, ώστε να καθαριστεί όσο το δυνατόν περισσότερο από την αλβουμίνη του πλάσματος. Η LDL μοιράζεται σε σωληνάκια υπερφυγοκέντρου, ο όγκος των οποίων συμπληρώνεται με διάλυμα KBr 1.063 g/ml. Τα σωληνάκια ζυγοσταθμίζονται και υπερφυγοκεντρώνονται, όπως έχει ήδη περιγραφεί. Μετά το τέλος της 3^{ης} υπερφυγοκέντρωσης, η καθαρή από αλβουμίνη LDL έχει συγκεντρωθεί στην πάνω επιφάνεια του σωλήνα και, έτσι, συλλέγεται προσεκτικά με μία σύριγγα.

Παράλληλα, για την απομόνωση της HDL, μετρείται ο όγκος από το υπόλοιπο πλάσμα και πολλαπλασιάζεται με τον συντελεστή 0.2199. Ο αριθμός που προκύπτει ισούται με τα gr στερεού KBr που πρέπει να προστεθούν στο πλάσμα, ώστε η πυκνότητα να αυξηθεί σε 1.210 g/ml. Το πλάσμα μοιράζεται σε σωληνάκια υπερφυγοκέντρου και ο όγκος τους συμπληρώνεται με διάλυμα KBr πυκνότητας 1.210 g/ml. Ακολουθεί, ζυγοστάθμιση, υπερφυγοκέντρωση και απομόνωση της HDL με τη χρήση σύριγγας.

4^η Υπερφυγοκέντρωση – Έκπλυση της HDL

Η απομονωμένη HDL υπερφυγοκεντρείται ακόμα μία φορά, ώστε να καθαριστεί όσο το δυνατόν περισσότερο από την αλβουμίνη του πλάσματος. Η HDL μοιράζεται σε σωληνάκια υπερφυγοκέντρου, ο όγκος των οποίων συμπληρώνεται με διάλυμα KBr 1.210 g/ml. Τα σωληνάκια ζυγοσταθμίζονται και υπερφυγοκεντρώνονται. Μετά το τέλος της τέταρτης υπερφυγοκέντρωσης, η καθαρή από αλβουμίνη HDL έχει συγκεντρωθεί στην πάνω επιφάνεια του σωλήνα και, έτσι, συλλέγεται προσεκτικά με μία σύριγγα.

Διαπίδυση

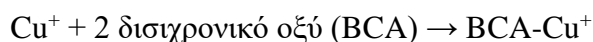
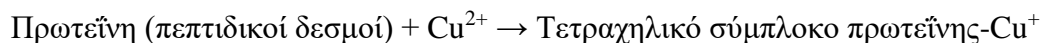
Μετά την απομόνωση των LDL και HDL, πραγματοποιείται διαπίδυση αυτών, ώστε να απομακρυνθεί το EDTA και να μην δεσμεύσει τον χαλκό που χρησιμοποιείται κατά την οξείδωση, καθώς και το KBr. Έτσι, οι LDL και HDL μεταφέρονται σε μεμβράνη διαπίδυσης και τοποθετούνται σε ποτήρι ζέσεως που περιέχει διακοσιαπλάσιο όγκο ρυθμιστικού διαλύματος 10 mM PBS pH = 7.4, σε σχέση με τον όγκο τους. Η διαπίδυση γίνεται στους 4 °C υπό συνεχή

ανάδευση. Μετά από 5 ώρες, το PBS αντικαθίσταται με καινούργιο και η διαπίδυση συνεχίζεται για άλλες 19 ώρες. Μετά το τέλος της διαπίδυσης, οι LDL και HDL συλλέγονται προσεκτικά με μία σύριγγα και διατηρούνται στους 4 °C με άζωτο.

4.2 ΠΟΣΟΤΙΚΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΛΙΠΟΠΡΩΤΕΙΝΩΝ LDL ΚΑΙ HDL ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ BCA

ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Τα ιόντα Cu^{2+} ανάγονται αρχικά από τις πρωτεΐνες, σε αλκαλικό περιβάλλον, προς ιόντα Cu^+ , κάθε ένα από τα οποία σχηματίζει στη συνέχεια έγχρωμο, υδατοδιαλυτό σύμπλοκο με 2 μόρια δισιχρονικού οξέος, σύμφωνα με την παρακάτω αντίδραση, το προϊόν της οποίας απορροφά στα 562 nm.



ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ – ΟΡΓΑΝΑ

Ο προσδιορισμός γίνεται με τη χρήση εμπορικής συσκευασίας Kit, το οποίο περιλαμβάνει τα παρακάτω:

- **Αντιδραστήριο A:** Μείγμα ανθρακικού νατρίου, διττανθρακικού νατρίου, δισιχρονικού οξέος και ταρταρικού νατρίου σε 0.2 N NaOH.
- **Αντιδραστήριο B:** Διάλυμα 4% CuSO_4
- Πρότυπο διάλυμα 2 mg/ml BSA σε 0.9% NaCl και 0.05% NaN_3
- Πλακίδιο ELISA 96 θέσεων (Sarstedt)
- Οκτακάναλη πολυπιπέτα σταθερού όγκου 200 μl (Costar)
- Μετρητής microELISA (Spectra MAX 190, Molecular Devices)

ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

- **Διάλυμα εργασίας:** Προκύπτει από την ανάμιξη των αντιδραστηρίων Α και Β σε κατ' όγκο αναλογία 50:1. Το αντιδραστήριο παρασκευάζεται λίγο πριν την χρήση του.
- **Πρότυπα διαλύματα BSA:** Παρασκευάζονται με κατάλληλη αραίωση του διαλύματος 2 mg/ml BSA, έτσι ώστε να προκύψουν τα διαλύματα 0.25, 0.50, 0.75, 1.0, 1.25 και 1.5 mg/mL BSA. Τα πρότυπα διαλύματα BSA διατηρούνται στους $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΠΟΡΕΙΑ

Σε πλακίδιο ELISA 96 θέσεων τοποθετούνται 20 μl από κάθε πρότυπο διάλυμα BSA (πρότυπη καμπύλη), καθώς και 20 μl του κάθε δείγματος προς ανάλυση. Στη συνέχεια, προστίθενται 200 μl του διαλύματος εργασίας σε κάθε θέση της πλάκας. Η πλάκα καλύπτεται με αυτοκόλλητη μεμβράνη, ανακινείται ήπια και επωάζεται στους $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ για 30 λεπτά. Έπειτα, εισάγεται στον μετρητή microELISA όπου καταγράφεται η απορρόφηση στα 562 nm.

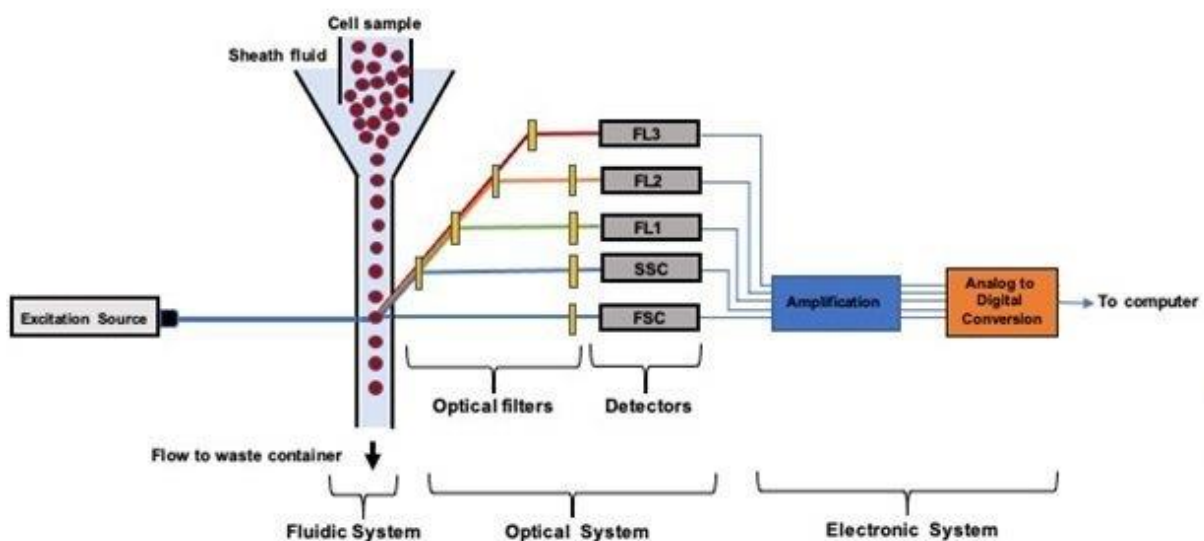
Με βάση τις απορροφήσεις των προτύπων δειγμάτων σχεδιάζεται, με τη βοήθεια ηλεκτρονικού υπολογιστή, η βέλτιστη ευθεία που έχει στον άξονα των X την συγκέντρωση των προτύπων σε BSA και στον άξονα των Y τις απορροφήσεις των προτύπων. Από την εξίσωση της πρότυπης καμπύλης και από τις απορροφήσεις των δειγμάτων υπολογίζονται τα mg/ml πρωτεΐνης που περιέχουν τα δείγματα.

4.3 ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑ ΡΟΗΣ

ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Η κυτταρομετρία ροής (Flow Cytometry) είναι μία ποσοτική, γρήγορη και αυτοματοποιημένη τεχνική, η οποία αρχικά μετρά και στη συνέχεια αναλύει πολλαπλά φυσικά ή χημικά χαρακτηριστικά μεμονωμένων σωματιδίων, όπως κυττάρων, καθώς αυτά ρέουν σε μια ρευστή ουσία μέσω μιας δέσμης φωτός. Οι ιδιότητες οι οποίες μετρώνται περιλαμβάνουν το σχετικό μέγεθος ενός σωματιδίου, τη σχετική κοκκίωση ή εσωτερική πολυπλοκότητα, και τη σχετική ένταση φθορισμού. Το κυτταρόμετρο ανιχνεύει και μετρά το ποσοστό φθορίζουσας

χρώσης των κυττάρων εξαιτίας αντισωμάτων, που είναι συζευγμένα με χρωστικές ουσίες και δεσμεύουν ειδικές πρωτεΐνες είτε στην επιφάνεια των κυττάρων είτε στο εσωτερικό τους, και αποτελείται από μία ή περισσότερες πηγές Laser για την παροχή ενέργειας διέγερσης. Το κυτταρόμετρο αποτελείται από πέντε βασικές συνιστώσες: ένα ρευστό υγρό (sheath fluid) που μεταφέρει και διευθετεί τα κύτταρα με τέτοιο τρόπο ώστε να περνούν ένα – ένα από τη δέσμη φωτός, ένα σύστημα μέτρησης της σύνθετης αντίστασης, το οποίο αποτελείται από lasers που φωτίζουν τα σωματίδια και οδηγούν σε σήματα φωτός, ένα σύστημα μετατροπής της πρόσθιας και πλάγιας σκέδασης καθώς και των σημάτων φθορισμού σε ηλεκτρικά σήματα, ένα σύστημα λογαριθμικής ή γραμμικής ενίσχυσης, και τέλος έναν ηλεκτρονικό υπολογιστή που αναλύει τα σήματα (Εικόνα 4.3.1).



Εικόνα 4.3.1: Αρχή λειτουργίας της κυτταρομετρίας ροής.

Δύο ανιχνευτές μετρούν δύο ανεξάρτητες του φθορισμού φυσικές παραμέτρους των σωματιδίων, την πρόσθια σκέδαση (Forward Scatter), η οποία είναι ανάλογη του μεγέθους του σωματιδίου και την πλάγια σκέδαση (Side Scatter), η οποία είναι ανάλογη της κοκκίωσης του σωματιδίου. Τα προς μέτρηση δείγματα θα πρέπει να βρίσκονται σε μορφή εναιωρήματος, ενώ

τα προς εξέταση κύτταρα επισημαίνονται με ένα ή περισσότερα ειδικά κατά περίπτωση μονοκλωνικά αντισώματα, τα οποία έχουν επισημανθεί με κατάλληλες φθορίζουσες ουσίες με στόχο την πρόσδεση των αντισωμάτων στα αντίστοιχα αντιγόνα στην επιφάνεια των κυττάρων. Η ένταση φθορισμού, καθώς και οι δείκτες σκέδασης καταγράφονται για κάθε κύτταρο και οι πληροφορίες αναλύονται με πρόγραμμα υπολογιστή. Οι φθορίζουσες ουσίες, οι οποίες χρησιμοποιούνται και διεγείρονται από laser 488 nm, είναι η ισοθειοκυανική φλουοροσκεΐνη (Fluorescein Isothiocyanate), η φυκοερυθρίνη (Phycocerythrin) και το πρωτεϊνικό σύμπλοκο peridinin-χλωροφύλλης (Peridinin Chlorophyll Protein Complex), οι οποίες εκπέμπουν σε μήκη κύματος 530 nm, 585 nm και 650 nm, αντίστοιχα. Τα αποτελέσματα αναπαρίστανται ως σημειακό γράφημα κυτταροδιαγράμματος (dot plot), το οποίο παρουσιάζει τις τιμές δύο διαφορετικών χαρακτηριστικών ενός κυτταρικού πληθυσμού, είτε ως ιστόγραμμα έντασης φθορισμού (histogram), στο οποίο η απεικόνιση της έντασης φθορισμού είναι ανάλογη του αριθμού των φθοριζόντων αντισωμάτων στην επιφάνεια του κυτταρικού πληθυσμού, είτε ως ισομετρικό διάγραμμα (isometric plot).

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ – ΟΡΓΑΝΑ

- BSA (EC Number 232-936-2, Sigma)
- D – PBS 10X (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline, Gibco)
- DMSO (C₂H₆OS, 78.13 g/mol, Carloerba – 44510)
- ECGS (Sigma-Aldrich)
- FBS (Gibco)
- Water for injection (WFI)
- Αιματοκυτόμετρο (Haemocytometer chamber ή πλάκα Neubauer)
- Ανάστροφο μικροσκόπιο (A. Krüss Optronic)
- Αντιβιοτικά Πενικιλίνη/Στρεπτομυκίνη (Pen/Str, 10.000 U/ml/10.000 µg/ml 100X, PAA)
- Αποστειρωμένα βαθμονομημένα σωληνάρια των 15 και 50 ml (Corning)
- Αποστειρωμένα πλαστικά πλακίδια κυτταρικής καλλιέργειας 6-θέσεων (Corning)
- Αποστειρωμένα πλαστικά σιφόνια των 5, 10 και 25 ml (Sarstedt)
- Αποστειρωμένα πλαστικά τρυβλία κυτταρικής καλλιέργειας (Corning)

- Αποστειρωμένες Πιπέτες Pasteur 3.5 ml (Sarstedt)
- Διάλυμα Θρυψίνης/EDTA (Biochrom)
- Επωαστικός θάλαμος ατμόσφαιρας 5% CO₂ (Nuair)
- Ηπαρίνη (5.000 iu/ml, LEO)
- Θρεπτικό υλικό Medium 199 (M199, μη πλήρες, Gibco)
- Κολλαγόνο (Collagen type I, BD Biosciences)
- Μονοκλωνικό αντίσωμα FITC mouse anti-human CD31 (BD Biosciences)
- Μονοκλωνικό αντίσωμα PE mouse anti-human CD54 (BD Biosciences)
- Οξικό οξύ 17.5 N (CH₃COOH, Riedel-de Haën)
- Σωληνάκια κυτταρομέτρου ροής (Becton Dickinson)
- Φίλτρα διήθησης 0.2 μm (Corning)
- Φυγόκεντρος πάγκου (Hettich Rotofix 32a)

ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

- **Ρυθμιστικό διάλυμα PBS (1X, pH = 7.4):** Ποσότητα διαλύματος D – PBS (10X) αραιώνεται 1:10 σε WFI προς παρασκευή διαλύματος PBS (1X). Το διάλυμα αποθηκεύεται σε θερμοκρασία δωματίου.
- **Διάλυμα 50 μg/ml κολλαγόνου:** Ποσότητα διαλύματος 17.5 N CH₃COOH αραιώνεται προς παρασκευή διαλύματος 0.02 N CH₃COOH, το οποίο στη συνέχεια χρησιμοποιείται για την αραιώση του εμπορικά διαθέσιμου κολλαγόνου για παρασκευή διαλύματος κολλαγόνου τελικής συγκέντρωσης 50 μg/ml. Το διάλυμα αποθηκεύεται στους 4 °C.
- **Πλήρες θρεπτικό μέσο M199:** Από την εμπορικά διαθέσιμη συσκευασία αφαιρούνται 26 ml και στη συνέχεια προστίθενται 120 ml FBS, 30 mg ECGS (διάλυση σε αυθαίρετη ποσότητα M199 και αποστείρωση με τη χρήση φίλτρου διήθησης 0.2 μm), 300 μl ηπαρίνη και 6 ml διαλύματος πενικιλίνης/στρεπτομυκίνης. Το διάλυμα αποθηκεύεται στους 4 °C.
- **Διάλυμα παγώματος (7.5% v/v DMSO):** Κατάλληλος όγκος DMSO διαλύεται σε FBS. Το διάλυμα αποθηκεύεται στους 4 °C.
- **Διάλυμα BSA (0.1% w/v BSA):** Το διάλυμα μοιράζεται σε όγκους των 5 ml, τα οποία αποθηκεύονται στους – 20 °C.

- **FBS απεμπλουτισμένο από λιποπρωτεΐνες:** Παρασκευάζεται με υπερφυγοκέντρωση του εμπορικά διαθέσιμου FBS σε πυκνότητα 1.210 g/ml για 24 ώρες στους 4 °C στα 40000 rpm και κατόπιν για επιπλέον 12 ώρες στους 4 °C στα 40000 rpm. Στη συνέχεια, το απεμπλουτισμένο FBS υφίσταται διαπίδυση σε διάλυμα PBS (1X, pH = 7.4) και πραγματοποιείται προσδιορισμός της ολικής χοληστερόλης, χρησιμοποιώντας την αντίστοιχη εμπορική συσκευασία Kit. Η ολική χοληστερόλη στο απεμπλουτισμένο FBS πρέπει να είναι < 10% της ολικής χοληστερόλης του εμπορικά διαθέσιμου FBS.
- **Διάλυμα επίδρασης 5% FBS/M199 και 1% Pen/Str/M199:** Παρασκευάζεται με προσθήκη κατάλληλων όγκων απεμπλουτισμένου από λιποπρωτεΐνες FBS και Pen/Str σε μη πλήρες θρεπτικό υλικό. Το διάλυμα διατηρείται στους 4 °C.
- **Διάλυμα 10% FBS/M199:** Παρασκευάζεται με προσθήκη κατάλληλου όγκου απεμπλουτισμένου από λιποπρωτεΐνες FBS σε μη πλήρες θρεπτικό υλικό. Το διάλυμα διατηρείται στους 4 °C.
- **Διάλυμα 5% FBS/M199:** Παρασκευάζεται με προσθήκη κατάλληλου όγκου απεμπλουτισμένου από λιποπρωτεΐνες FBS σε μη πλήρες θρεπτικό υλικό. Το διάλυμα διατηρείται στους 4 °C.
- **Διάλυμα TNF – α:** Recombinant Human TNF α , της R&D, συγκέντρωσης 1 mg/ml σε αποστερωμένο PBS με 0.1% BSA. Το διάλυμα αποθηκεύεται στους – 20 °C.
- **Πρότυπη PCSK9:** Recombinant Human Proprotein Convertase 9/PCSK9, της Cayman Chemical, συγκέντρωσης 200 μ g/ml. Αποθηκεύεται στους – 20 °C.
- **LDL και HDL:** Απομονωμένες υπερφυγοκεντρικά, όπως περιεγράφηκε παραπάνω, σε συγκέντρωση 0.3 mg/ml.
- **Ox-LDL και Ox-HDL:** Οξειδωμένη μορφή των LDL και HDL, όπως περιεγράφηκε παραπάνω, σε συγκέντρωση 0.3 mg/ml.

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκαν τα HUVECs, τα οποία αντιπροσωπεύουν μια ευρέως χρησιμοποιούμενη πηγή πρωτογενών ECs για in vitro μελέτες του αγγειακού συστήματος και της αγγειογένεσης. Τα HUVECs είναι σχετικά εύκολο να απομονωθούν αποφεύγοντας τη μόλυνση από άλλους τύπους κυττάρων και ο ομφάλιος λώρος είναι άμεσα διαθέσιμος ως απορριπτόμενα βιολογικά απόβλητα μετά τη γέννηση του παιδιού. Επιπλέον, ο αυλός της

ομφαλικής φλέβας έχει επαρκή χωρητικότητα, επιτρέποντάς του να διασωληνώνεται εύκολα και το ενδοθήλιο μπορεί να αποκολληθεί με ενζυματική πέψη.

Τα HUVECs έχει αναφερθεί ότι εκφράζουν πολλούς σημαντικούς ενδοθηλιακούς δείκτες και μόρια σηματοδότησης που σχετίζονται με τη ρύθμιση της αγγειακής ομοιόστασης. Επιπλέον, ανταποκρίνονται σε διάφορα φυσιολογικά και παθοφυσιολογικά ερεθίσματα, π.χ. υψηλή συγκέντρωση γλυκόζης, χορήγηση LPS ή διατμητική τάση.^[75]

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΠΟΡΕΙΑ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ ΚΥΤΤΑΡΩΝ HUVECs

Απόψυξη κυττάρων

- 1) Σε τρυβλίο κυτταρικής καλλιέργειας επιστρώνεται 1 ml κολλαγόνου 50 µg/ml και, στη συνέχεια, επωάζεται για 20 min στον επωαστικό κλίβανο (37 °C, 5% CO₂).
- 2) Φιαλίδιο που περιέχει HUVECs, το οποίο είναι αποθηκευμένο σε υγρό N₂, τοποθετείται στους 37 °C ώστε να πραγματοποιηθεί γρηγορότερα η απόψυξη των κυττάρων. Αφού ξεπαγώσουν, μεταφέρονται σε βαθμονομημένο σωληνάριο, το οποίο περιέχει 9 ml πλήρους θρεπτικού υλικού και αναδιασπείρονται ώστε να κατανεμηθούν ομοιόμορφα.
- 3) Τα κύτταρα φυγοκεντρώνονται στα 1500 rpm για 5 min, απομακρύνεται το υπερκείμενο υγρό και, στη συνέχεια, επαναιωρούνται σε 5 ml πλήρους θρεπτικού υλικού.
- 4) Μετά το πέρας των 20 min, το τρυβλίο εκπλένεται 2 φορές με 5 ml PBS (1X).
- 5) Τα κύτταρα μεταφέρονται από το βαθμονομημένο σωληνάριο στο τρυβλίο, το οποίο τοποθετείται στον επωαστικό κλίβανο (37 °C, 5% CO₂).
- 6) Κάθε 2 ημέρες πραγματοποιείται αλλαγή θρεπτικού υλικού μέχρι να καλυφθεί πλήρως (70 – 90%) η επιφάνεια του τρυβλίου κυτταρικής καλλιέργειας (confluent). Η αλλαγή του θρεπτικού υλικού πραγματοποιείται, αρχικά, με απομάκρυνση των μη προσκολλημένων κυττάρων, διπλή έκπλυση του τρυβλίου με 5 ml PBS (1X) και, τέλος, προσθήκη 5 ml πλήρους θρεπτικού υλικού.

Ανακαλλιέργεια HUVECs (split)

Μετά το πέρας 2 ηµέρων και αφού τα κύτταρα έχουν αναπτυχθεί στο 70 – 90% της επιφάνειας του τρυβλίου, πραγματοποιείται ανακαλλιέργεια αυτών ως εξής:

- 1) Σε πλακίδια κυτταρικής καλλιέργειας 6 θέσεων προσθέτουμε 650 μl κολλαγόνου 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ σε κάθε θέση και τα πλακίδια επωάζονται για 20 min στον επωαστικό κλίβανο (37°C , $5\%\text{CO}_2$).
- 2) Απομακρύνονται από το τρυβλίο τα μη προσκολλημένα κύτταρα και, στη συνέχεια, πραγματοποιείται έκπλυση αυτού 2 φορές με 5 ml PBS (1X).
- 3) Τα κύτταρα επωάζονται με 1 ml διαλύματος θρυψίνης/EDTA για 1.5 min στον επωαστικό κλίβανο (37°C , $5\%\text{CO}_2$).
- 4) Για την απενεργοποίηση της θρυψίνης προστίθενται 5 ml πλήρους θρεπτικού υλικού και τα κύτταρα συλλέγονται σε βαθμονομημένο σωληνάριο.
- 5) Πραγματοποιείται μέτρηση των κυττάρων, τοποθετώντας 10 μl εναιωρήματός τους σε κάθε εσοχή της πλάκας Neubauer.
- 6) Τα κύτταρα φυγοκεντρούνται στα 1500 rpm για 5 min και, στη συνέχεια αφού απομακρυνθεί το υπερκείμενο υγρό, επαναδιασπείρονται σε 5 ml πλήρους θρεπτικού υλικού.
- 7) Μετά το πέρας των 20 min, τα πλακίδια κυτταρικής καλλιέργειας 6 θέσεων εκπλένονται 2 φορές με 2 ml PBS (1X).
- 8) Σε κάθε θέση επιστρώνονται 80000 – 120000 κύτταρα, ανάλογα με τις πειραματικές ανάγκες, σε τελικό όγκο 2 ml.
- 9) Πραγματοποιούνται αλλαγές θρεπτικού υλικού ανά 2 ημέρες μέχρι να καλυφθεί το 70 – 90% της επιφάνειας του τρυβλίου (confluent).
- 10) Μόλις καλυφθούν με κύτταρα όλες οι θέσεις του πλακιδίου, ακολουθεί η επίδραση των υπό μελέτη ουσιών.

Μελέτη της επίδρασης της PCSK9 στην ενεργοποίηση των HUVECs από τροποποιημένες μορφές λιποπρωτεϊνών

- 1) Τα πλακίδια κυτταρικής καλλιέργειας 6 θέσεων εκπλένονται 2 φορές με 2 ml PBS (1X).
- 2) Προστίθεται 1.5 ml διαλύματος επίδρασης 5% και 1% σε κάθε θέση του πλακιδίου.
- 3) Προστίθενται οι LDL, HDL, Ox-LDL, Ox-HDL και PCSK9 στις αντίστοιχες συγκεντρώσεις τους, καθώς και ο TNF – α ως θετικό control, και τα κύτταρα επωάζονται για 6 ώρες στον επωαστικό κλίβανο (37°C , $5\%\text{CO}_2$).

- 4) Μετά το πέρας των 6 ωρών, απομακρύνονται τα μη προσκολλημένα κύτταρα και πραγματοποιούνται 2 εκπλύσεις κάθε θέσης με 2 ml PBS (1X).
- 5) Σε κάθε θέση του πλακιδίου προστίθενται 600 µl διαλύματος θρυψίνης/EDTA και επωάζεται για 1.5 min στους 37 °C.
- 6) Πραγματοποιείται απενεργοποίηση της θρυψίνης με 2 ml 10% FBS/M199 και τα κύτταρα συλλέγονται σε βαθμονομημένο σωληνάριο. Το ελαιώρημα των κυττάρων φυγοκεντρείται στα 1500 rpm για 5 min.
- 7) Αφαιρείται το υπερκείμενο υγρό, πραγματοποιείται επαναδιασπορά των κυττάρων με 500 µl 10% FBS/M199 ανά συνθήκη και, στη συνέχεια, μετρούνται τα κύτταρα, όπως περιεγράφηκε παραπάνω.
- 8) Τα κύτταρα κάθε συνθήκης αραιώνονται σε 100000, προστίθενται 200 µL κρούου 5% FBS/M199 και, έπειτα, 5 µl anti-CD31-FITC και 5 µL anti-CD54-PE.
- 9) Τα κύτταρα επωάζονται στους 4 °C για 30 min και ακολουθεί φυγοκέντρηση αυτών στα 1500 rpm για 5 min.
- 10) Απομακρύνεται το υπερκείμενο υγρό και πραγματοποιείται έκπλυση των κυττάρων με 200 µL 5% FBS/M199. Η διαδικασία αυτή επαναλαμβάνεται συνολικά 3 φορές.
- 11) Μετά την τελευταία έκπλυση, πραγματοποιείται επαναδιασπορά των κυττάρων με 500 µL 5% FBS/M199.
- 12) Πραγματοποιείται η κυτταρομετρική ανάλυση των δειγμάτων και, τέλος, ακολουθεί η επεξεργασία των αποτελεσμάτων όπου υπολογίζεται η μέση ένταση φθορισμού (MFI) του CD54 στα ενεργοποιημένα κύτταρα. Η κυτταρομετρική ανάλυση λαμβάνει χώρα στα 10000 συμβάντα.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΠΟΡΕΙΑ – ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΟΥ ΟΡΓΑΝΟΥ

- 1) Άνοιγμα του κυτταρομέτρου ροής 15 – 20 min πριν τη μέτρηση.
- 2) Έκπλυση οργάνου με WFI για 5 min.
- 3) Εισαγωγή ρυθμίσεων αντίστοιχου πρωτοκόλλου.
- 4) Μέτρηση δειγμάτων.
- 5) Έκπλυση του οργάνου μετά το τέλος των μετρήσεων με FACs Clean solution, FACs Rinse Solution και WFI για 10 min το κάθε διάλυμα.

- 6) Απόχυση δοχείου αποβλήτων.
- 7) Συμπλήρωση δοχείου με FACS Flow Sheath Fluid.

4.4 ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ LDL ΚΑΙ HDL ΜΕ ΙΟΝΤΑ Cu^{2+}

ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Η οξειδωτική τροποποίηση των LDL και HDL επιτυγχάνεται με την επώασή τους, σε κατάλληλες συνθήκες, με ιόντα Cu^{2+} στους 37 °C. Κατά τη διάρκεια της διαδικασίας αυτής, λόγω της υπεροξειδωσης των ενδογενών πολυακόρεστων λιπαρών οξέων, σχηματίζονται συζυγή διένια στις λιποπρωτεΐνες.

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ – ΟΡΓΑΝΑ

- LDL/HDL: Απομονώνονται φυγοκεντρικά, όπως περιγράφηκε παραπάνω, και διατηρούνται στους 4 °C με N_2
- CuSO_4 (M.B.: 249.69 g/mol, Sigma – Aldrich)
- Γυάλινα σωληνάκια χωρητικότητας 15 ml
- Πλακίδιο ELISA 96 θέσεων (Sarstedt)
- Μετρητής microELISA (Spectra MAX 190, Molecular Devices)

ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

- **Ρυθμιστικό διάλυμα 10 mM PBS, pH = 7.4:** Το διάλυμα παρασκευάζεται όπως έχει ήδη περιγραφεί
- **Διάλυμα 10% EDTA, pH = 7.0:** Το διάλυμα παρασκευάζεται όπως έχει ήδη περιγραφεί.
- **Διάλυμα 20 mM CuSO_4 :** 0.4993g CuSO_4 διαλύονται σε 100 ml dH_2O , δίνοντας διάλυμα 20 mM CuSO_4 . Το διάλυμα διατηρείται στους 4 °C.
- **Διάλυμα 0.2 mM CuSO_4 :** Το διάλυμα αυτό προκύπτει από το διάλυμα 20 mM CuSO_4 με αραιώση 1:100. Το διάλυμα διατηρείται στους 4 °C.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΠΟΡΕΙΑ

Οξείδωση των LDL και HDL

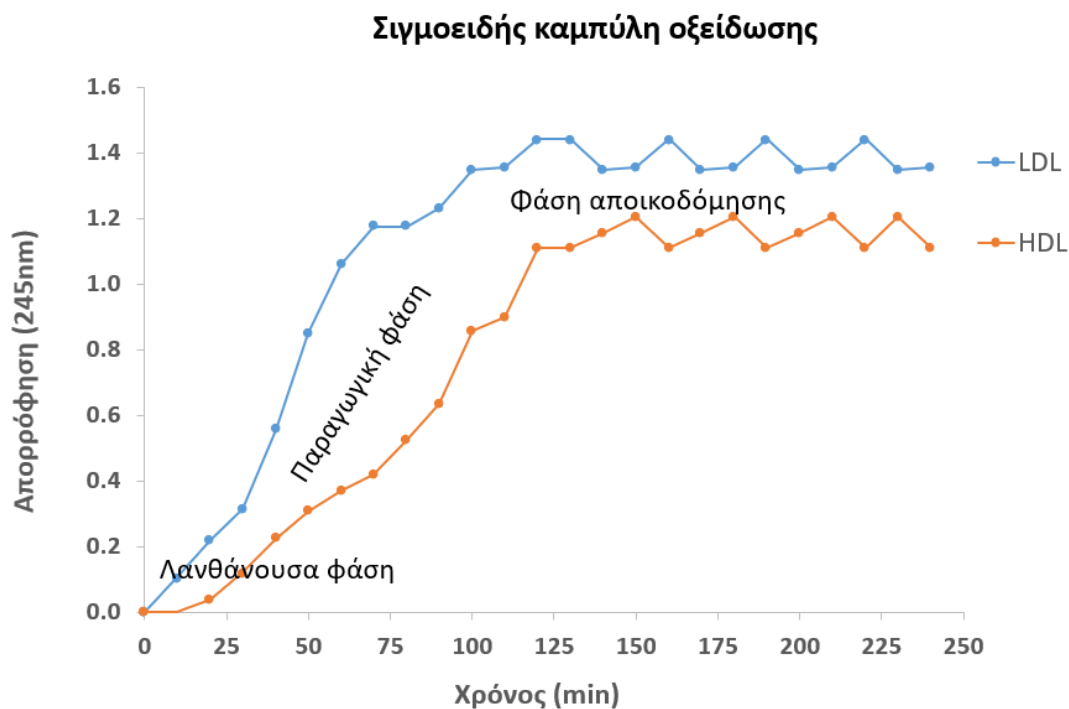
Οι LDL και HDL αραιώνονται στο 1 mg πρωτεΐνης/ml με την προσθήκη κατάλληλου όγκου 10 mM PBS pH = 7.4. Η οξείδωση αρχίζει με την προσθήκη διαλύματος 0.2 mM CuSO₄, τέτοιου όγκου ώστε η τελική συγκέντρωση μέσα στα σωληνάκια να είναι 20 μM. Στη συνέχεια, αυτά τοποθετούνται σε υδατόλουτρο στους 37 °C για 5 – 6 ώρες και πραγματοποιείται τακτική, ήπια ανάδευση.

Τερματισμός της οξείδωσης

Η οξείδωση των LDL και HDL σταματά με την προσθήκη 5 μl 10% EDTA pH = 7.0/ml LDL ή HDL, δίνοντας τελική συγκέντρωση EDTA 0.05%. Οι οξειδωμένες LDL και HDL είτε χρησιμοποιούνται αμέσως είτε διατηρούνται στους 4 °C και καταναλώνονται εντός δύο εβδομάδων.

Προσδιορισμός του βαθμού οξείδωσης των LDL και HDL

Ο βαθμός της οξειδωτικής τροποποίησης των λιποπρωτεϊνών υπολογίζεται με τη μέτρηση της περιεκτικότητας σε TBARS, καθώς και με παρακολούθηση της οξείδωσης στα 234 nm με καταγραφή της σιμοειδούς καμπύλης παραγωγής των συζυγών διενίων (Εικόνα 4.4.1). Η διαδικασία αυτή πραγματοποιείται σε πλακίδιο ELISA 96 θέσεων, το οποίο τοποθετείται σε μετρητή microELISA, με αραιώση των LDL και HDL στα 100 μg πρωτεΐνης/ml και ο τελικός όγκος σε κάθε πηγαδάκι να είναι 300 μl.



Εικόνα 4.4.1: Τυπική καμπύλη οξείδωσης των LDL και HDL.

4.5 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ TBARS

ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Η καρβονυλικές ενώσεις αντιδρούν και συμπλέκονται με το θειοβαρβιτουρικό οξύ, δίνοντας έγχρωμα σύμπλοκα προϊόντα, τα οποία προσδιορίζονται φωτομετρικά στα 532 nm.

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ – ΟΡΓΑΝΑ

- LDL, HDL: Απομονώνονται υπερφυγοκεντρικά, όπως έχει περιγραφεί, και διατηρούνται στους 4 °C με N₂

- MDA (bis dimethylacetal, M.B.: 164.20 g/mol, d = 0.997 g/ml, Aldrich)
- Ox-LDL, Ox-HDL: Παρασκευάζονται όπως έχει περιγραφεί παραπάνω και διατηρούνται στους 4 °C με N₂
- TBA (C₄H₄O₂S·H₂O, M.B.: 162.20 g/mol, Serva)
- TCA (M.B.: 163.39 g/mol, Sigma)
- Γυάλινα σωληνάκια χωρητικότητας 15 ml
- Γυάλινες κυψελίδες χωρητικότητας 1 ml
- Φασματοφωτόμετρο (SHIMADZU)
- Φυγόκεντρος πάγκου (Herme, Z 320)

ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

- **Διάλυμα TCA 10%:** 10 g TCA διαλυτοποιούνται σε 100 ml dH₂O.
- **Διάλυμα TBA 0.67%:** 0.7539 g TBA διαλυτοποιούνται σε 80 ml dH₂O υπό θέρμανση. Το διάλυμα αφήνεται να κρυώσει σε θερμοκρασία δωματίου και ο όγκος του συμπληρώνεται στα 100 ml με την προσθήκη dH₂O. Αποθηκεύεται με αέριο N₂.
- **Διάλυμα MDA 6 mM:** Μέρος του πυκνού διαλύματος MDA αραιώνεται 1000 φορές με προσθήκη dH₂O, δίνοντας το επιθυμητό διάλυμα. Διατηρείται στους 4 °C.
- **Πρότυπο διάλυμα 200 μM MDA:** 30 μl διαλύματος 6 mM MDA προστίθενται σε 870 μl dH₂O, δίνοντας διάλυμα 200 μM MDA. Το διάλυμα αυτό παρασκευάζεται λίγο πριν τη χρήση του.
- **Διάλυμα TNF – α:** Recombinant Human TNFα, της R&D, συγκέντρωσης 1 mg/ml σε αποστειρωμένο PBS με 0.1% BSA. Το διάλυμα αποθηκεύεται στους – 20 °C.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΠΟΡΕΙΑ

Προετοιμασία των δειγμάτων

Για τη μέτρηση των TBARS σε διάφορες μορφές LDL και HDL, φυσική LDL/HDL και Ox-LDL/Ox-HDL, μεταφέρεται σε γυάλινο σωληνάκι των 15 ml ποσότητα φυσικής ή οξειδωμένης

LDL/HDL που περιέχει 10 μg πρωτεΐνης. Ο όγκος των δειγμάτων συμπληρώνεται στα 100 μl με την προσθήκη dH₂O.

Προετοιμασία των προτύπων

Σε 6 γυάλινα σωληνάκια προστίθενται 0, 5, 10, 15, 20 και 25 μl διαλύματος 200 μM MDA (0, 1, 2, 3, 4 και 5 nmol MDA αντίστοιχα). Ο όγκος των προτύπων συμπληρώνεται στα 100 μl με την προσθήκη dH₂O.

Κατεργασία των δειγμάτων και των προτύπων

Σε κάθε σωληνάκι, που περιέχει τα δείγματα και τα πρότυπα διαλύματα MDA, προστίθενται 1 ml διαλύματος 10% TCA και 1 ml διαλύματος 0.67% TBA. Τα δείγματα αναδεύονται ισχυρά σε vortex και, αφού σκεπαστούν με αλουμινόχαρτο, τοποθετούνται σε υδρόλουτρο στους 75 °C για 65 min ακριβώς. Στη συνέχεια, τα δείγματα και τα πρότυπα διαλύματα αφήνονται να αποκτήσουν θερμοκρασία δωματίου.

Φωτομέτρηση των δειγμάτων και των προτύπων

Τα δείγματα φυγοκεντρώνονται σε φυγόκεντρο πάγκου στα 3100 rpm για 15 min, ώστε να καταβυθιστούν οι πρωτεΐνες που προκαλούν θόλωμα. Στη συνέχεια, αφαιρείται προσεκτικά από το υπερκείμενο υγρό ποσότητα δείγματος, η οποία μεταφέρεται σε γυάλινη κυψελίδα φωτομέτρου. Πραγματοποιείται μέτρηση της απορρόφηση στα 532 nm.

Επεξεργασία των αποτελεσμάτων

Με βάση τις απορροφήσεις των προτύπων δειγμάτων, σχεδιάζεται γράφημα που περιλαμβάνει την περιεκτικότητα των προτύπων σε MDA ως άξονα των x και τις απορροφήσεις των προτύπων ως άξονα των y. Στη συνέχεια, φέρεται η βέλτιστη ευθεία, που περνάει από τα σημεία, και υπολογίζεται η εξίσωσή της. Από την εξίσωση της πρότυπης καμπύλης και από τις απορροφήσεις των δειγμάτων, υπολογίζονται τα nmol των καρβονυλικών ενώσεων που περιέχουν τα δείγματα. Στην περίπτωση των LDL και HDL, ο αριθμός των nmol πολλαπλασιάζεται με τον συντελεστή 100 και τα αποτελέσματα εκφράζονται σε nmol MDA/mg πρωτεΐνης.

4.6 ΕΠΙΔΡΑΣΗ TNF α , O x -LDL ΚΑΙ PCSK9 ΣΕ ΜΟΝΟΚΥΤΤΑΡΑ ΠΕΡΙΦΕΡΕΙΑΚΟΥ ΑΙΜΑΤΟΣ

ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Η μεμβρανική έκφραση του CD36, μέσω της επίδρασης των TNF α , O x -LDL και PCSK9, σε απομονωμένα μονοκύτταρα περιφερειακού αίματος από υγιείς εθελοντές μελετήθηκε με κυτταρομετρία ροής.

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ – ΟΡΓΑΝΑ

- 5 ml αίματος υγιούς δότης παρουσία ACD
- Θρεπτικό υλικό RPMI 1640
- Επωαστικός θάλαμος ατμόσφαιρας 5% CO₂ (Nuair)
- Μονοκλωνικό αντίσωμα FITC mouse anti-human CD14
- Μονοκλωνικό αντίσωμα PE mouse anti-human CD36
- Σωληνάκια κυτταρομέτρου ροής (Becton Dickinson)
- Φυγόκεντρος πάγκου (Hettich Rotofix 32a)

ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

- **Lysis Buffer:** 0.417 g NH₄Cl, 0.0018 g KEDTA και 0.05 g KHCO₃ διαλύονται σε τελικό όγκο 50 ml.
- **Ρυθμιστικό διάλυμα 10 mM PBS, pH = 7.4:** 8.1816 g NaCl, 1.3800 g NaH₂PO₄·H₂O και 1.7795 g Na₂HPO₄·2H₂O διαλύονται σε 800 ml dH₂O και, αφού ρυθμιστεί το pH = 7.4, συμπληρώνεται ο όγκος στο 1L με dH₂O. Το διάλυμα διατηρείται στους 4 °C.
- **Πρότυπη PCSK9:** Recombinant Human Proprotein Convertase 9/PCSK9, της Cayman Chemical, συγκέντρωσης 200 μg/ml. Αποθηκεύεται στους – 20 °C.
- **O x -LDL:** Οξειδωμένη μορφή της LDL, όπως περιεγράφηκε παραπάνω.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΠΟΡΕΙΑ

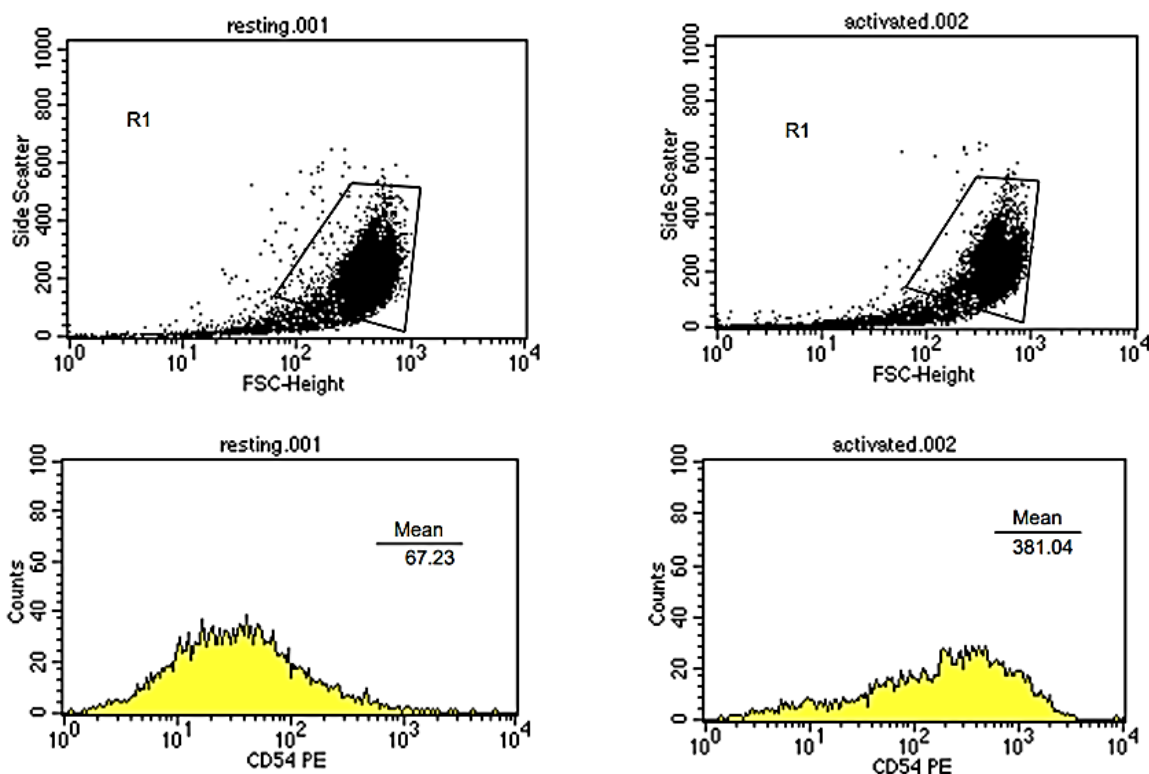
- 1) Ολικό αίμα 0.25 ml, παρουσία ACD, επωάζεται για 20 min στους 4 °C με διάλυμα λύσης ερυθροκυττάρων.
- 2) Ακολουθεί φυγοκέντρωση στα 2000 rpm για 5 min και απόχυση του υπερκείμενου υγρού.
- 3) Πραγματοποιείται έκπλυση των κυττάρων με 2 ml PBS (1X). Τα βήματα 2 και 3 επαναλαμβάνονται συνολικά 3 φορές.
- 4) Μετά το πέρας της τρίτης έκπλυσης, και αφού απομακρυνθεί το υπερκείμενο υγρό, πραγματοποιείται επαναδιασπορά του ιζήματος με την προσθήκη 500 µl RPMI 1640.
- 5) Τα κύτταρα ενεργοποιούνται σε erendorf σε διάφορες συγκεντρώσεις TNF α (0, 1, 2, 5 και 10 ng/ml) και Ox-LDL (0, 20 και 40 µg πρωτεΐνης/ml), παρουσία (+/-) 4 ng/ml PCSK9 αντίστοιχα.
- 6) Τα κύτταρα επωάζονται για 6 ώρες στον επωαστικό κλίβανο (37 °C, 5% CO $_2$).
- 7) Ακολουθεί φυγοκέντρωση στα 2000 rpm για 5 min και απόχυση του υπερκείμενου υγρού.
- 8) Πραγματοποιείται έκπλυση των κυττάρων με 2 ml PBS (1X). Τα βήματα 7 και 8 επαναλαμβάνονται συνολικά 3 φορές.
- 9) Μετά το πέρας της τρίτης έκπλυσης, και αφού απομακρυνθεί το υπερκείμενο υγρό, πραγματοποιείται επαναδιασπορά του ιζήματος με την προσθήκη 100 µl RPMI 1640.
- 10) Τα κύτταρα επωάζονται με anti-CD14-PE και anti-CD36-FITC για 20 min στο σκοτάδι.
- 11) Τέλος, τα κύτταρα αναλύονται στο κυτταρόμετρο ροής. Οι τιμές εκφράστηκαν σε MFI.

Κεφάλαιο 5: Αποτελέσματα

5.1 Η δράση της PCSK9, των λιποπρωτεϊνών και των οξειδωμένων μορφών τους στην ενεργοποίηση των HUVECs, μέσω της μεμβρανικής έκφρασης του ICAM-1

Μελετήθηκε η δράση της recombinant PCSK9 συγκέντρωσης 500 ng/ml και των LDL, Ox-LDL, HDL και Ox-HDL συγκέντρωσης 0.3 mg/ml σε HUVECs σε καλλιέργεια, όπως αναφέρεται στην ενότητα “Υλικά-Μέθοδοι”. Στην **Εικόνα 5.1.1** απεικονίζεται το κυτταρομετρικό προφίλ των HUVECs τόσο σε κατάσταση ηρεμίας (Resting), όσο και όταν αυτά ενεργοποιήθηκαν με TNF α .

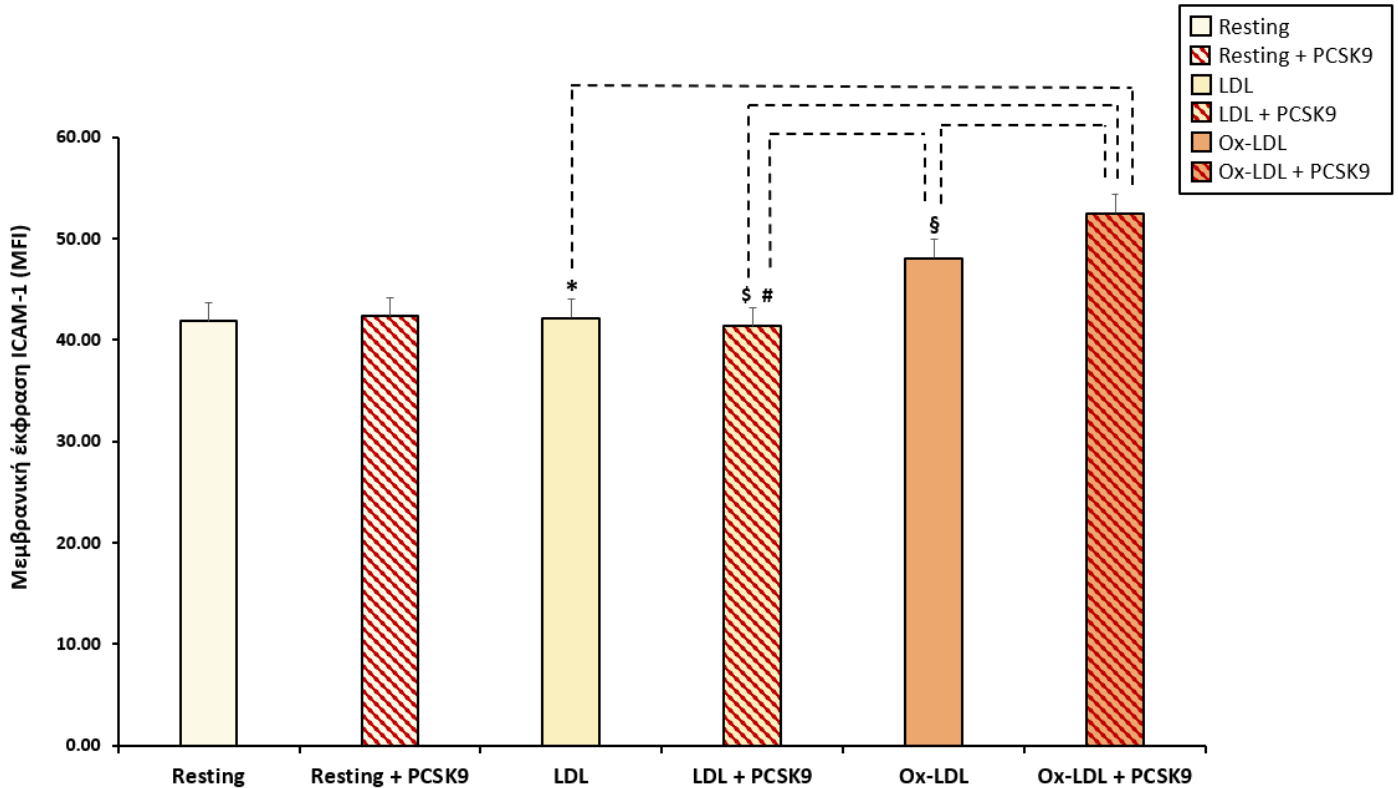
Σύμφωνα με προηγούμενες μελέτες της ερευνητικής μας ομάδας, σαν χρόνος επώασης με τον TNF α χρησιμοποιήθηκαν οι 6 ώρες, ενώ η συγκέντρωση που χρησιμοποιήθηκε ήταν τα 0.5 ng/ml.



Εικόνα 5.1.1: Κυτταρομετρικό προφίλ των HUVECs και μεμβρανική έκφραση του ICAM-1 ως τιμή μέσης έντασης φθορισμού του αντισώματος CD54-PE.

Αρχικά, μελετήθηκε η έκφραση του ICAM-1 επωάζοντας τα κύτταρα με LDL και Ox-LDL (+/-) PCSK9, ώστε να διαπιστωθεί αν η εξωγενής PCSK9 τροποποιεί τη δραστικότητα της λιποπρωτεΐνης σε αυτά. Επίσης, τα κύτταρα επωάστηκαν μόνο με PCSK9, ώστε να διερευνηθεί η πιθανή επίδρασή της.

Η μη οξειδωμένη μορφή της LDL δεν φάνηκε να επιφέρει κάποια αλλαγή στην επαγωγή του ICAM-1, αλλά και η PCSK9 δεν είχε κάποια στατικά σημαντική επίδραση τόσο αυτή καθαυτή στα κύτταρα, όσο και σε συνδυασμό με την LDL. Επιπλέον, στατιστικά σημαντική μεταβολή, και συγκεκριμένα αύξηση, παρατηρήθηκε ανάμεσα στην LDL και την Ox-LDL παρουσία PCSK9 (41.17 ± 18.05 MFI έναντι 52.48 ± 20.98 MFI) καθώς και στην LDL, σε συνδυασμό με την PCSK9, σε σχέση με την Ox-LDL (40.37 ± 18.11 MFI έναντι 48.08 ± 18.87 MFI). Αξίζει να σημειωθεί ότι, παρατηρήθηκε αύξηση στην έκφραση του ICAM-1, αλλά όχι στατιστικά σημαντική, όταν τα κύτταρα επωάστηκαν με την οξειδωτικά τροποποιημένη μορφή της λιποπρωτεΐνης σε σχέση με τη μη τροποποιημένη μορφή. Τέλος, στατιστικά σημαντική αύξηση φάνηκε να υπάρχει και μεταξύ της LDL και Ox-LDL, όταν αυτές συνδυάστηκαν με PCSK9 (40.37 ± 18.11 MFI έναντι 52.48 ± 20.98 MFI), αλλά και η παρουσία της PCSK9 στην Ox-LDL προκάλεσε αύξηση της επαγωγής του ICAM-1 σε σχέση με την Ox-LDL (48.08 ± 18.87 MFI έναντι 52.48 ± 20.98 MFI), όπως φαίνεται και στην **Εικόνα 5.1.2**. Από τα παραπάνω συμπεραίνεται ότι, ενώ η PCSK9 από μόνη της δεν εμφανίζει κάποια επίδραση στην έκφραση του ICAM-1, παρατηρείται, γενικά, μία μεταβολή όταν αυτή συνδυάζεται με τη λιποπρωτεΐνη.

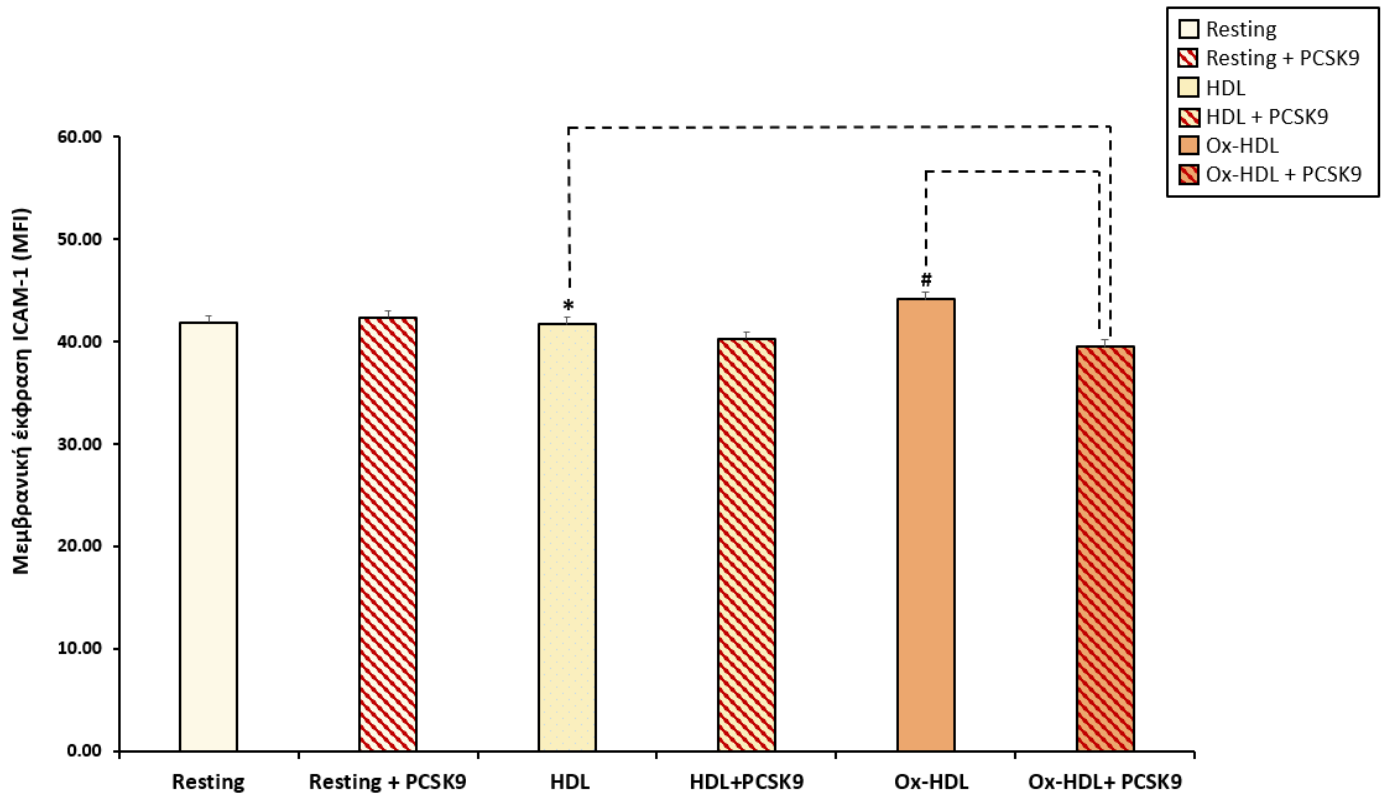


Εικόνα 5.1.2: Η μεμβρανική έκφραση του ICAM-1 σε καλλιέργεια HUVECs, επωάζοντας με LDL, Ox-LDL και PCSK9. Οι τιμές εκφράζονται ως ο μέσος όρος \pm SD (#, * και § $p < 0.05$).

Επιπλέον, μελετήθηκε η έκφραση του ICAM-1 επωάζοντας τα κύτταρα με HDL και Ox-HDL (+/-) PCSK9, ώστε να διαπιστωθεί αν η εξωγενής PCSK9 τροποποιεί τη δραστικότητα της λιποπρωτεΐνης σε αυτά. Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, η επώαση των κυττάρων με PCSK9 δεν προκαλεί κάποια σημαντική μεταβολή στην έκφραση του ICAM-1.

Παρατηρήθηκε ότι, από τη μια πλευρά η μη οξειδωμένη μορφή της HDL δεν προκάλεσε κάποια αλλαγή στην έκφραση του ICAM-1, ενώ από την άλλη η δράση της λιποπρωτεΐνης αυτής δεν φάνηκε να τροποποιείται στατιστικά σημαντικά παρουσία της εξωγενούς PCSK9. Επίσης, και στην περίπτωση αυτή, φάνηκε ότι όταν η HDL τροποποιηθεί οξειδωτικά, η παρουσία της PCSK9 μειώνει στατιστικά σημαντικά την έκφραση του ICAM-1 σε σχέση με τη μη τροποποιημένη λιποπρωτεΐνη (41.68 ± 17.91 MFI έναντι 39.45 ± 18.01 MFI). Ακόμα, υπήρξε μία μικρή αύξηση, αλλά όχι στατιστικά σημαντική, ανάμεσα στην HDL και την οξειδωμένη της

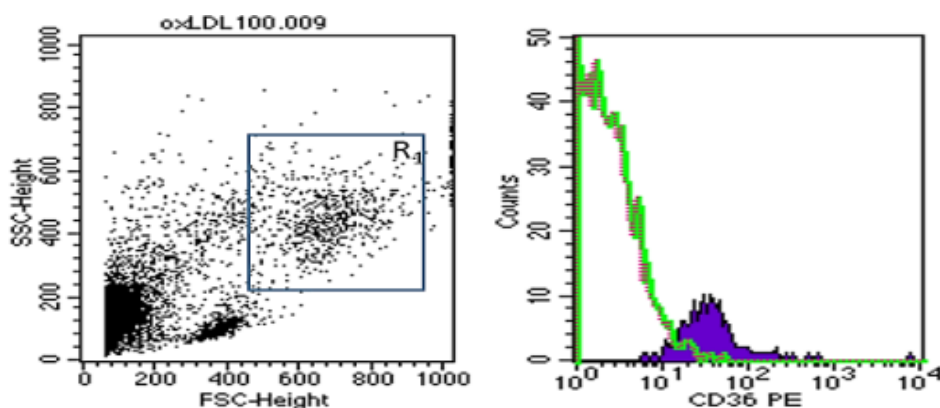
μορφή. Τέλος, η παρουσία της PCSK9 στην Ox-HDL μείωσε στατιστικά σημαντικά την επαγωγή του ICAM-1 συγκριτικά με την Ox-HDL (44.14 ± 17.96 MFI έναντι 39.45 ± 18.01 MFI), όπως φαίνεται και στην **Εικόνα 5.1.3**.



Εικόνα 5.1.3: Η μεμβρανική έκφραση του ICAM-1 σε καλλιέργεια HUVECs, επωάζοντας με HDL, Ox-HDL και PCSK9. Οι τιμές εκφράζονται ως ο μέσος όρος \pm SD (# και * $p < 0.05$).

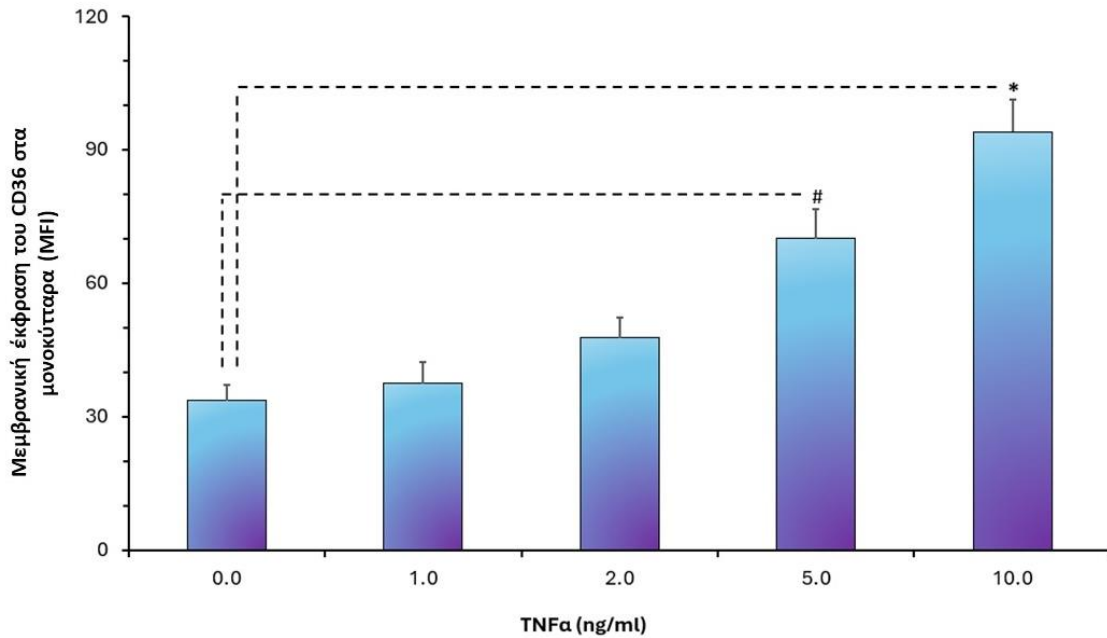
5.2 Μεμβρανική έκφραση των SRs της Ox-LDL σε μονοκύτταρα περιφερικού αίματος, και η δράση της PCSK9

Η μεμβρανική έκφραση του CD36 σε απομονωμένα μονοκύτταρα περιφερικού αίματος από υγιείς εθελοντές μελετήθηκε με κυτταρομετρία ροής, όπως περιγράφηκε και στην ενότητα “Υλικά-Μέθοδοι” (Εικόνα 5.2.1).



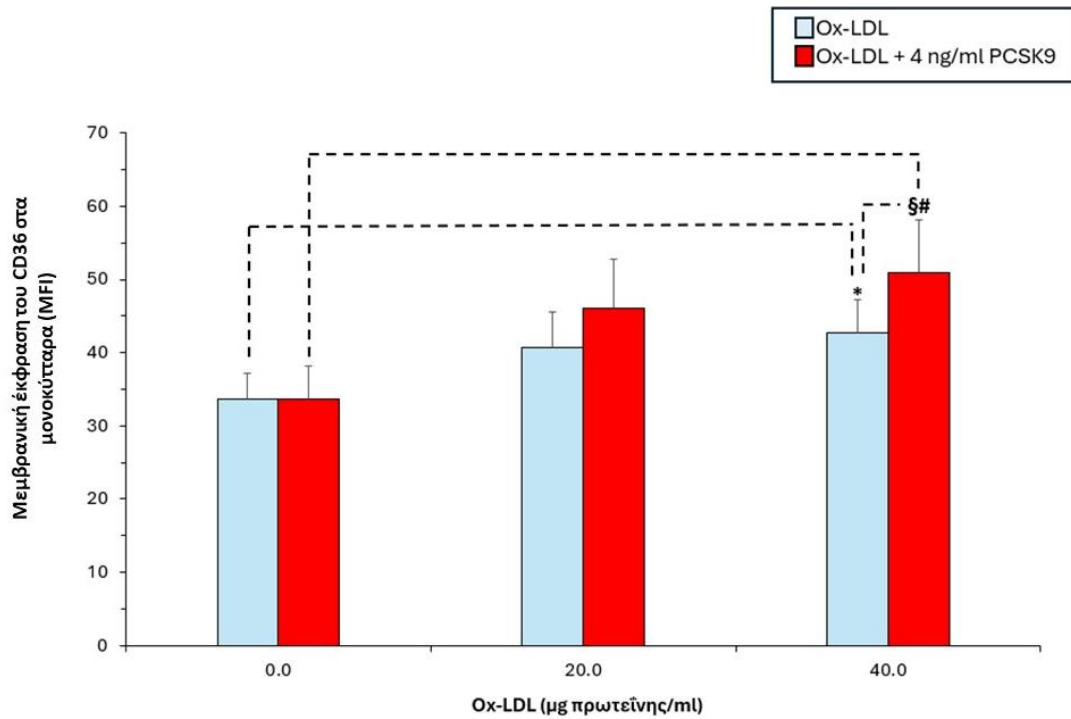
Εικόνα 5.2.1: Αντιπροσωπευτική απεικόνιση ανάλυσης της έκφρασης του CD36 στην επιφάνεια των μονοκυττάρων με κυτταρομετρία ροής.

Τα κύτταρα ενεργοποιήθηκαν σε καλλιέργεια, σε διάφορες συγκεντρώσεις TNFα και Ox-LDL, παρουσία (+/-) PCSK9 αντίστοιχα. Ο TNFα ενεργοποίησε δοσοεξαρτώμενα την μεμβρανική έκφραση του CD36 (94.2 ± 2.1 MFI έναντι 33.2 ± 1.5 MFI για 10 ng/ml και 0 ng/ml TNFα αντίστοιχα, $p < 0.05$), όπως φαίνεται και στην Εικόνα 5.2.2. Οι τιμές εκφράστηκαν σε MFI και αποτελούν το μέσο όρο τριών διαφορετικών πειραμάτων.



Εικόνα 5.2.2: Δοσοεξαρτώμενη επίδραση του TNFα στη μεμβρανική έκφραση του υποδοχέα της OxLDL, CD36 σε μονοκύτταρα περιφερικού αίματος. Οι τιμές εκφράζονται ως ο μέσος όρος \pm SD (* και # $p < 0.05$).

Η Ox-LDL ενεργοποίησε επίσης την μεμβρανική έκφραση του CD36 (42.7 ± 1.2 MFI έναντι 33.2 ± 1.5 MFI για 100 $\mu\text{g/ml}$ και 0 $\mu\text{g/ml}$ Ox-LDL αντίστοιχα, $p < 0.05$), ενώ η παρουσία της PCSK9 αύξησε κατά $18.2 \pm 2.2\%$ ($p < 0.05$) την επαγόμενη με Ox-LDL έκφραση του CD36, όπως φαίνεται στην **Εικόνα 5.2.3**.



Εικόνα 5.2.3: Επίδραση της Ox-LDL και της Ox-LDL παρουσία PCSK9 (4 ng/ml) στη μεμβρανική έκφραση του υποδοχέα της Ox-LDL, CD36 σε μονοκύτταρα περιφερικού αίματος. Οι τιμές εκφράζονται ως ο μέσος όρος \pm SD (#, * και § $p < 0.05$).

Κεφάλαιο 6: Συμπεράσματα – Συζήτηση

Στην παρούσα διατριβή διερευνήθηκε η δράση της PCSK9 και των λιποπρωτεϊνών, τόσο στην τροποποιημένη τους μορφή όσο και στη φυσική, στην ενεργοποίηση των ενδοθηλιακών κυττάρων HUVECs και των μονοκυττάρων περιφερικού αίματος. Οι λιποπρωτεΐνες που μελετήθηκαν είναι οι LDL και HDL, σε φυσική και σε οξειδωμένη μορφή. Επιπλέον, μελετήθηκε και η αλληλεπίδραση της PCSK9 με τα λιποπρωτεϊνικά σωματίδια, ώστε να διαπιστωθεί αν επηρεάζει τη δραστηριότητά τους.

Αρχικά, μελετήθηκε η επίδραση των LDL και Ox-LDL (+/-) PCSK9 στην μεμβρανική έκφραση του ICAM-1 σε καλλιέργεια κυττάρων HUVECs. Τα σωματίδια LDL του πλάσματος αποτελούν φυσιολογικό συστατικό του αίματος και θεωρούνται πηγή χοληστερόλης για το μεταβολισμό των περιφερικών κυττάρων. Τα εγγενή σωματίδια LDL φαίνεται να είναι αβλαβή έως ότου η συγκέντρωσή τους στο πλάσμα αυξηθεί σε περίπου 4 mmol/l LDL-C ή περισσότερο. Η παρατεταμένη έκθεση των ECs σε υψηλές συγκεντρώσεις LDL ενεργοποιεί ορισμένες μεταβολικές οδούς που διευκολύνουν την προσκόλληση των μονοκυττάρων στο τοίχωμα του αγγείου. Το βασικό συμβάν φαίνεται να είναι η οξειδωτική τροποποίηση του σωματιδίου LDL. Υπάρχουν ισχυρές ενδείξεις ότι η Ox-LDL, που σχηματίζεται και διατηρείται στον υποενδοθηλιακό χώρο, ενεργοποιεί τα ECs μέσω της επαγωγής των μορίων προσκόλλησης στην επιφάνεια του κυττάρου. Αφού πραγματοποιηθεί η οξειδωτική τροποποίηση, η Ox-LDL προσλαμβάνεται από τους SRs στην επιφάνεια των ECs, και εισέρχεται στο αγγειακό μέσο. Ο LOX-1, που προσδιορίζεται ως ο κύριος υποδοχέας της Ox-LDL στα ECs, εκφράζεται σε αρκετές προ-φλεγμονώδεις καταστάσεις και φαίνεται να παίζει σημαντικό ρόλο στην ED που προκαλείται από την Ox-LDL. Επίσης, η αυξορρύθμιση των μορίων ενδοθηλιακής προσκόλλησης, όπως των ICAM-1 και VCAM-1, μπορεί να προκληθεί από την Ox-LDL με τρόπο εξαρτώμενο από τον LOX-1, ο οποίος διαμεσολαβείται από τον NF-κB. Επιπλέον, η PCSK9 μεσολαβεί στη φλεγμονή μέσω της επαγωγής της έκφρασης του LOX-1, ο οποίος ενισχύει την πρόσληψη της Ox-LDL.

Από τα παραπάνω αποτελέσματα, διαπιστώθηκε ότι η Ox-LDL πράγματι ενεργοποιεί τα HUVECs, μέσω της επαγωγής της έκφρασης του ICAM-1, σε αντίθεση με το μη τροποποιημένο σωματίδιο που δεν επιφέρει κάποια σημαντική μεταβολή στη μεμβρανική έκφραση του μορίου

προσκόλλησης. Επιπλέον, παρατηρήθηκε ότι η παρουσία PCSK9 ενισχύει σημαντικά την ενεργοποίηση των HUVECs που επάγεται από Ox-LDL, κάτι το οποίο έρχεται σε συμφωνία με όσα συζητήθηκαν παραπάνω.

Στη συνέχεια, μελετήθηκε η επίδραση των HDL και Ox-HDL (+/-) PCSK9 στην μεμβρανική έκφραση του ICAM-1 σε καλλιέργεια κυττάρων HUVECs. Όπως ακριβώς η LDL, έτσι και η HDL εισέρχεται στον έσω χιτώνα και οξειδώνεται από FRs. Ωστόσο, η Ox-HDL δεν προσλαμβάνεται από τα μακροφάγα. Η HDL βοηθά στην πρόληψη της αθηροσκλήρωσης, αφαιρώντας τη χοληστερόλη από τα αφρώδη κύτταρα και περιορίζοντας τις φλεγμονώδεις διεργασίες που χαρακτηρίζουν την αθηροσκλήρωση, αλλά μπορεί επίσης να παρέχει ισχυρή προστασία της LDL in vivo από οξειδωτική βλάβη, που προκαλείται από FRs στον έσω αρτηριακό χιτώνα. Όμως, οι οξειδωτικές τροποποιήσεις της HDL προκαλούν κάποια απώλεια της προστατευτικής της λειτουργίας. Επιπλέον, υπάρχουν αντικρουόμενα αποτελέσματα όσον αφορά τη συσχέτιση της PCSK9 με τα σωματίδια HDL.

Από τα παραπάνω αποτελέσματα, διαπιστώθηκε ότι η Ox-HDL επάγει την έκφραση του ICAM-1, όχι βέβαια στατιστικά σημαντικά, σε σχέση με την HDL, κάτι το οποίο έρχεται σε συμφωνία με το ότι πιθανότατα το σωματίδιο χάνει την προστατευτική του λειτουργία μέσω της οξειδωσής του. Ωστόσο, το μη τροποποιημένο σωματίδιο δεν επιφέρει κάποια σημαντική μεταβολή στη μεμβρανική έκφραση του μορίου προσκόλλησης. Επίσης, παρατηρήθηκε ότι η παρουσία της PCSK9 στην Ox-HDL μείωσε στατιστικά σημαντικά την επαγωγή του ICAM-1 συγκριτικά με την Ox-HDL, όπως το ίδιο ακριβώς συμβαίνει και στην περίπτωση της μη οξειδωτικά τροποποιημένης HDL. Με βάση τα αποτελέσματα αυτά, συμπεραίνεται ότι η πιθανή συσχέτιση της PCSK9 με τα σωματίδια HDL και Ox-HDL, χρήζει περαιτέρω διερεύνησης.

Τέλος, μελετήθηκε η μεμβρανική έκφραση του υποδοχέα της Ox-LDL, CD36, σε απομονωμένα μονοκύτταρα περιφερικού αίματος από υγιείς εθελοντές, και η δράση της PCSK9. Μια φλεγμονώδης κατάσταση μπορεί να αυξήσει την έκφραση της PCSK9 στα μακροφάγα σε μεταγραφικό επίπεδο, και υπάρχουν ενδείξεις ότι τα επίπεδα της πρωτεΐνης αυτής σχετίζονται με τα επίπεδα έκφρασης τόσο των SRs, όσο και της πρόσληψης της Ox-LDL από τα μακροφάγα. Συγκεκριμένα έχει αποδειχθεί ότι, τα υψηλά επίπεδα PCSK9 μπορεί να διεγείρουν την μεμβρανική έκφραση των SR-A, CD36 και LOX-1 στα μακροφάγα, αλλά και να ενισχύσουν την πρόσληψη της Ox-LDL, κάτι το οποίο συμβάλει στη διαδικασία της αθηροσκλήρωσης. Ωστόσο,

η μελέτη της επίδρασης της PCSK9 καθώς και η επαγωγή με Ox-LDL στην ενεργοποίηση των μεμβρανικών SRs της σε μονοκύτταρα περιφερικού αίματος δεν έχει ερευνηθεί επαρκώς.

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκαν τα μονοκύτταρα του περιφερικού αίματος, πριν αυτά προλάβουν να διαφοροποιηθούν σε μακροφάγα. Από τα παραπάνω αποτελέσματα, διαπιστώθηκε ότι τόσο ο TNF α όσο και η Ox-LDL επάγουν την έκφραση του SR της Ox-LDL, ενώ η παρουσία της PCSK9 στην επαγόμενη με Ox-LDL έκφραση του CD36, φαίνεται να αυξάνει ακόμα περισσότερο την έκφραση του υποδοχέα. Οι μηχανισμοί που εμπλέκονται στη ρύθμιση των υποδοχέων είναι υπό διερεύνηση.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Ragusa R., Basta G., Neglia D., De Caterina R., Del Turco S., & Caselli C. PCSK9 and atherosclerosis: Looking beyond LDL regulation. *European Journal of Clinical Investigation*. 2020; 51(4)
2. Falk E. Pathogenesis of Atherosclerosis. *Journal of the American College of Cardiology*. 2006; 47(8): C7-C12
3. Punch E., Klein J., Diaba-Nuhoho P., Morawietz H., & Garelnabi M. Effects of PCSK9 Targeting: Alleviating Oxidation, Inflammation, and Atherosclerosis. *Journal of the American Heart Association*. 2022; 11: e023328
4. Brown B. A., Williams H. & George S. J. Chapter Six – Evidence for the Involvement of Matrix-Degrading Metalloproteinases (MMPs) in Atherosclerosis. *Progress in Molecular Biology and Translational Science*. 2017; 147: 197-237
5. Marchio P., Guerra-Ojeda, S., Vila J. M., Aldasoro M., Victor V. M., & Mauricio M. D. (2019). Targeting Early Atherosclerosis: A Focus on Oxidative Stress and Inflammation. *Oxidative medicine and cellular longevity*. 2019; 8563845.
6. Libby P. & Hansson G. K. Inflammation and Immunity in Diseases of the Arterial Tree: Players and Layers. *Circulation Research*. 2015; 116(2): 307-311
7. Eble J. A. & Niland S. The extracellular matrix of blood vessels. *Current Pharmaceutical Design*. 2009; 15(12): 1385- 1400
8. Zhao Y., Vanhoutte P. M. & Leung, S. W. S. Vascular nitric oxide: Beyond eNOS. *Journal of Pharmacological Sciences*. 2015; 129(2): 83-94
9. Tousoulis D., Kampoli A.-M., Papageorgiou N., Androulakis E., Antoniadis C., Toutouzas K., & Stefanadis C. Pathophysiology of Atherosclerosis: The Role of Inflammation. *Current Pharmaceutical Design*. (2011); 17(37): 4089–4110
10. Hao W. & Friedman A. The LDL-HDL Profile Determines the Risk of Atherosclerosis: A Mathematical Model. *PLoS ONE*. 2014; 9(3): e90497
11. Kattoor A. J., Pothineni N. V. K., Palagiri D. & Mehta J. L. Oxidative Stress in Atherosclerosis. *Current Atherosclerosis Reports*. 2017; 19(42)

12. Ji E. & Lee S. Antibody-Based Therapeutics for Atherosclerosis and Cardiovascular Diseases. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021; 22(11): 5770
13. Trimm E., & Red-Horse K. Vascular endothelial cell development and diversity. *Nature reviews. Cardiology*. 2023; 20(3): 197-210
14. Poredos P., Poredos A. V., & Gregoric I. Endothelial Dysfunction and Its Clinical Implications. *Angiology*. 2021; 72(7): 604–615
15. Tousoulis D., Simopoulou C., Papageorgiou N., Oikonomou E., Hatzis G., Siasos G., Tsiamis, E., & Stefanadis C. Endothelial dysfunction in conduit arteries and in microcirculation. Novel therapeutic approaches. *Pharmacology & Therapeutics*. 2014; 144(3): 253–267
16. Hansson G. K., Robertson A.-K. L., & Söderberg-Nauclér C. Inflammation and Atherosclerosis. *Annual Review of Pathology: mechanisms of disease*. 2006; 1(1): 297–329
17. Shaul P. W. Regulation of Endothelial Nitric Oxide Synthase: Location, Location, Location. *Annual Review of Physiology*. 2002; 64(1): 749–774
18. Schramm A., Matusik P., Osmenda G., & Guzik T. J. Targeting NADPH oxidases in vascular pharmacology. *Vascular Pharmacology*. 2012; 56(5-6): 216–231
19. Zhao Y., Zou W., Du J., & Zhao Y. The origins and homeostasis of monocytes and tissue-resident macrophages in physiological situation. *Journal of cellular physiology*. 2018; 233(10): 6425-6439
20. Woollard K. J., & Geissmann F. Monocytes in atherosclerosis: subsets and functions. *Nature reviews. Cardiology*. 2010; 7(2): 77-86
21. Kim K. W., Ivanov S., & Williams J. W. Monocyte Recruitment, Specification, and Function in Atherosclerosis. *Cells*. 2020; 10(1): 15
22. Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature*. 2002; 420(6917): 868/874
23. Moore K. J. & Freeman M. W. Scavenger receptors in atherosclerosis: beyond lipid uptake. *Atherosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2006; 26(8): 1702-1711
24. Allahverdian S., Pannu P. S., & Francis G. A. Contribution of monocyte-derived macrophages and smooth muscle cells to arterial foam cell formation. *Cardiovascular research*. 2012; 95(2): 165-172
25. Xu L., Yan X., Tang Z., & Feng B. Association between circulating oxidized OxLDL/LDL-C ratio and the severity of coronary atherosclerosis, along with other emerging biomarkers of

- cardiovascular disease in patients with type 2 diabetes. *Diabetes research and clinical practice*. 2022; 191: 110040
26. McNeill E., Channon K. M., & Greaves D. R. Inflammatory cell recruitment in cardiovascular disease: murine models and potential clinical applications. *Clinical Science*. 2010; 118(11): 641–655
 27. Ding W. Y., Proty M. B., Davies I. G., & Lip G. Y. H. Relation between lipoproteins, thrombosis, and atrial fibrillation. *Cardiovascular research*. 2022; 118(3): 716-731
 28. Caballero B., Allen L., & Prentice A. *Encyclopedia of human nutrition || Hyperlipidemia: Overview*. 2005; 2nd edition: 479-490
 29. Lu Y., Cui X., Zhang L., Wang X., Xu Y., Qin Z., Liu G., Wang Q., Tian K. & Lim K. The Functional Role of Lipoproteins in Atherosclerosis: Novel Directions for Diagnosis and Targeting Therapy. *Aging and Disease*. 2022; 13(2): 491-520
 30. Khosravi M., Hosseini-Fard R., & Najafi M. Circulating low density lipoprotein (LDL). *Hormone Molecular Biology and Clinical Investigation*. 2018; 0(0)
 31. Silva G. C., Abbas M., Khemais-Benkhiat S., Burbán M., Ribeiro T. P., Toti F. & Schini-Kerth V. B. Replicative senescence promotes prothrombotic responses in endothelial cells: Role of NADPH oxidase- and cyclooxygenase-derived oxidative stress. *Experimental Gerontology*. 2017; 93: 7–15
 32. Maric S., Lind T. K., Raida M. R., Bengtsson E., Fredrikson G. N., Rogers S., Moulin M., Haertlein M., Forsyth V. T., Wenk M. R., Pomorski T. G., Arnebrant T., Lund, R., & Cárdenas M. Time-resolved small-angle neutron scattering as a probe for the dynamics of lipid exchange between human lipoproteins and naturally derived membranes. *Scientific reports*. 2019; 9(1): 7591
 33. Von Eckardstein A., Nordestgaard B. G., Remaley A. T. & Catapano A. L. High-density lipoprotein revisited: biological functions and clinical relevance. *European Heart Journal*. 2022; 44(16): 1394-1407
 34. Florentin M., Liberopoulos E. N., Wierzbicki A. S., & Mikhailidis D. P. Multiple actions of high-density lipoprotein. *Current Opinion in Cardiology*. 2008; 23(4): 370–378
 35. Zhang X., Sessa W. C., & Fernández-Hernando C. Endothelial Transcytosis of Lipoproteins in Atherosclerosis. *Frontiers in Cardiovascular Medicine*. 2018; 5

36. Bandeali S. & Farmer J. High-Density Lipoprotein and Atherosclerosis: The Role of Antioxidant Activity. *Current Atherosclerosis Reports*. 2012; 14(2): 101–107
37. Nordestgaard B. G. The vascular endothelial barrier — selective retention of lipoproteins. *Current Opinion in Lipidology*. 1996; 7(5): 269–273
38. Frostegard J., Haegerstrand A., Gidlund M. & Nilsson J. Biologically modified LDL increases the adhesive properties of endothelial cells. *Atherosclerosis*. 1991; 90: 119-126
39. Ding Z., Pothineni N. V. K., Goel A., Lüscher T. F., & Mehta J. L. PCSK9 and inflammation: Role of shear stress, pro-inflammatory cytokines and LOX-1 4. *Cardiovascular Research*. 2019
40. Rajavashisth T. B., Andalibi A., Territo M. C., Berliner J. A., Navab M., Fogelman A. M. & Lusis A. J. Induction of endothelial cell expression of granulocyte and macrophage colony-stimulating factors by modified low-density lipoproteins. *Nature*. 1990; 344: 254-257
41. Yla-Herttuala S., Lipton B. A., Rosenfeld M. E., Sarkioja T., Yoshimura T., Leonard E. J., Witztum J. L. & Steinberg D. Expression of monocyte chemoattractant protein 1 in macrophage-rich areas of human and rabbit atherosclerotic lesions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. 1991; 88: 5252-5256
42. Catapano A. L. Maggi F. M. & Tragni E. Low density lipoprotein oxidation, antioxidants, and atherosclerosis. *Current Opinion Cardiology*. 2000; 15: 355-363
43. Leiva E., Wehinger S., Guzman L. & Orrego R. Role of Oxidized LDL in Atherosclerosis. *Hypercholesterolemia: Chapter 3*. 2015: 55-78
44. Chen M., Masaki T. & Sawamura T. LOX-1, the receptor for oxidized low-density lipoprotein identified from endothelial cells: implications in endothelial dysfunction and atherosclerosis. *Pharmacology and Therapeutics*. 2002; 95 :89-100
45. Li D., Chen H., Romeo F., Sawamura T., Saldeen T. & Mehta J. L. Statins modulate oxidized low-density lipoprotein-mediated adhesion molecule expression in human coronary artery endothelial cells: role of LOX-1. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2002; 302: 601-605
46. Cominacini L., Rigoni A., Pasini A. F., Garbin U., Davoli A., Campagnola M., Pastorino A. M., Lo Cascio V., Sawamura T. The binding of oxidized low density lipoprotein (ox-LDL) to ox-LDL receptor-1 reduces the intracellular concentration of nitric oxide in endothelial cells

- through an increased production of superoxide. *Journal of Biological Chemistry*. 2001; 276: 13750-13755
47. Cominacini L., Fratta Pasini A., Garbin U., Pastorino A., Rigoni A., Nava C., Davoli A., Lo Cascio V., Sawamura T. The platelet-endothelium interaction mediated by lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1 reduces the intracellular concentration of nitric oxide in endothelial cells. *Journal of American College of Cardiology*. 2003; 41: 499-507
 48. Valente A. J., Irimpen A. M., Siebenlist U., Chandrasekar B. OxLDL induces endothelial dysfunction and death via TRAF3IP2: Inhibition by HDL3 and AMPK activators. *Free Radical Biology and Medicine*. 2014; 70C: 117-128
 49. Nagy L., Tontonoz P., Alvarez J. G., Chen H. & Evans R. M. Oxidized LDL regulates macrophage gene expression through ligand activation of PPARgamma. *Cell*. 1998; 93: 229-240
 50. Tontonoz P., Nagy L., Alvarez J. G., Thomazy V. A. & Evans R. M. PPARgamma promotes monocyte/macrophage differentiation and uptake of oxidized LDL. *Cell*. 1998; 93: 241-252
 51. Carr A. C., McCall M. R. & Frei B. Oxidation of LDL by myeloperoxidase and reactive nitrogen species: reaction pathways and antioxidant protection. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2000; 20: 1716-1723
 52. Schaeffer D. F., Riazzy M., Parhar K. S., Chen J. H., Duronio V., Sawamura T. & Steinbrecher U. P. LOX-1 augments oxLDL uptake by lysoPC-stimulated murine macrophages but is not required for oxLDL clearance from plasma. *J Lipid Res*. 2009; 50: 1676-1684
 53. Pirillo A., Norata G. D. & Catapano A. L. LOX-1, OxLDL, and atherosclerosis. *Mediators Inflamm*. 2013; 2013: 152786
 54. Stiko-Rahm A., Hultgardh-Nilsson A., Regnstrom J., Hamsten A. & Nilsson J. Native and oxidized LDL enhances production of PDGF AA and the surface expression of PDGF receptors in cultured human smooth muscle cells. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 1992; 12: 1099-1109
 55. Kohno M., Yokokawa K., Yasunari K., Minami M., Kano H., Hanehira T. & Yoshikawa J. Induction by lysophosphatidylcholine, a major phospholipid component of atherogenic lipoproteins, of human coronary artery smooth muscle cell migration. *Circulation*. 1998; 98: 353-359

56. Mitra S., Goyal T. & Mehta J. L. Oxidized LDL, LOX-1 and atherosclerosis. *Cardiovascular Drugs and Therapy*. 2011; 25: 419-429
57. Shen C. M., Mao S. J., Huang G. S., Yang P. C. & Chu, R. M. Stimulation of smooth muscle cell proliferation by ox-LDL- and acetyl LDL-induced macrophage-derived foam cells. *Life Sciences*. 2001; 70: 443-452
58. Maiolino G., Rossitto G., Caielli P., Bisogni V., Rossi G. P. & Calo L. A. The role of oxidized low-density lipoproteins in atherosclerosis: the myths and the facts. *Mediators of Inflammation*. 2013; 2013: 714653
59. Hsieh C. C., Yen M. H., Yen C. H. & Lau, Y. T. Oxidized low density lipoprotein induces apoptosis via generation of reactive oxygen species in vascular smooth muscle cells. *Cardiovascular Research*. 2001; 49: 135-145
60. Miller, G. J. Lipoproteins and the haemostatic system in atherothrombotic disorders. *Best Practice & Research Clinical Haematology*. 1999; 12(3): 555–575
61. Chao T., Chen I., Li Y., Lee P., & Tseng S. Plasma Levels of Proprotein Convertase Subtilisin/Kexin Type 9 Are Elevated in Patients With Peripheral Artery Disease and Associated With Metabolic Disorders and Dysfunction in Circulating Progenitor Cells. *Journal of the American Heart Association*. 2016; 5(5): e003497
62. Sundararaman S. S., Döring Y., & van der Vorst E. P. C. PCSK9: A Multi-Faceted Protein That Is Involved in Cardiovascular Biology. *Biomedicines*. 2021; 9(7): 793
63. Barale C., Melchionda E., Morotti A., & Russo I. PCSK9 Biology and Its Role in Atherothrombosis. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021; 22(11): 5880
64. Roth E. M., & Davidson M. H. PCSK9 Inhibitors: Mechanism of Action, Efficacy, and Safety. *Reviews in Cardiovascular Medicine*. 2018; 19(S1): S31-S46
65. Berk B.C., Min W., Yan C., Surapisitchat J., Liu Y., & Hoefen R. Atheroprotective mechanisms activated by fluid shear stress in endothelial cells. *Drug News Perspect*. 2002; 15(3): 133
66. Wu N.Q., Shi H.W., & Li J.J. Proprotein Convertase Subtilisin/Kexin Type 9 and Inflammation: An Updated Review. *Frontiers in Cardiovascular Medicine*. 2022; 9: 763516
67. Scalise V., Sanguinetti C., Neri T., Cianchetti S., Lai M., Carnicelli V., Celi A., & Pedrinelli R. PCSK9 Induces Tissue Factor Expression by Activation of TLR4/NFκB Signaling. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021; 22: 12640

68. Yurtseven E., Ural D., Baysal K., & Tokgözoğlu L. An Update on the Role of PCSK9 in Atherosclerosis. *J AtherosclerThromb.* 2020; 27: 909-918
69. Momtazi-Borojeni A. A., Sabouri-Rad S, Gotto A. M., Pirro M., Banach M., Awan Z., Sahebkar A. PCSK9 and inflammation: a review of experimental and clinical evidence. *European Heart Journal - Cardiovascular Pharmacotherapy.* 2019
70. Luquero A., Badimon L., & Borrell M. PCSK9 Functions in Atherosclerosis Are Not Limited to Plasmatic LDL-Cholesterol Regulation. *Frontiers in Cardiovascular Medicine.* 2021; 8: 639727
71. Tam J., Thankam F., Agrawal D. K., & Radwan M. M. Critical Role of LOX-1-PCSK9 Axis in the Pathogenesis of Atheroma Formation and Its Instability. *Heart, Lung and Circulation.* 2021; 30(10): 1456–1466
72. Pirillo A., Norata G. D., & Catapano A. L. LOX-1, OxLDL, and Atherosclerosis. *Mediators of Inflammation.* 2013; 2013: 1–12
73. Ding, Z., Liu, S., Wang, X., Theus, S., Deng, X., Fan, Y., Zhou, S., & Mehta, J. L. R. PCSK9 regulates expression of scavenger receptors and ox-LDL uptake in macrophages. *Cardiovascular research.* 2018; 114(8): 1145-1153
74. Tsouka A. N., & Tselepis A. D. Association of PCSK9 with human plasma Lipoproteins. *Journal of Atherosclerosis Prevention and Treatment.* 2021; 12(1): 7–13
75. Kocherova I., Bryja A., Mozdziak P., Angelova Volponi A., Dyszkiewicz-Konwińska M., Piotrowska-Kempisty H., Antosik P., Bukowska D., Bruska M., Izycki D., Zabel M., Nowicki M., & Kempisty B. Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVECs) Co-Culture with Osteogenic Cells: From Molecular Communication to Engineering Prevascularised Bone Graft. *Journal of clinical medicine.* 2019; 8(10): 1602
76. Dafnis. I., Tsouka, A. N., Gkolfinopoulou, C., Tellis, C. C., Chroni, A. & Tselepis, A. D. PCSK9 is minimally associated with HDL but impairs the anti-atherosclerotic HDL effects on endothelial cell activation. *Journal of Lipid Research.* 2022; 63(10): 100272.