



Διατμηματικό Πρόγραμμα
Μεταπτυχιακών Σπουδών
«Ιατρική Χημεία»



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΙΑΤΡΙΚΗ ΧΗΜΕΙΑ»

Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ Lp(a) ΣΤΑ ΠΟΙΟΤΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΚΑΙ ΤΗΝ
ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟΤΗΤΑ ΤΗΣ HDL

ΤΑΤΣΗΣ ΓΕΩΡΓΙΟΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2025

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:

Επιβλέπων καθηγητής:

Κωνσταντίνος Τέλλης, Εργαστηριακό Διδακτικό Προσωπικό (Ε.ΔΙ.Π), Δρ. Βιοχημείας, Τομέας Οργανικής Χημείας και Βιοχημείας, Τμήματος Χημείας, Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Μέλη:

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

Χαράλαμπος Μηλιώνης, Καθηγητής Εσωτερικής Παθολογίας, Τομέας Παθολογίας, Τμήματος Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, Διευθυντής της Α' Παθολογικής Κλινικής του Περιφερικού Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Ιωαννίνων (ΠΓΝΙ)

Πρόλογος - Ευχαριστίες

Η παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή εκπονήθηκε στο Ερευνητικό Εργαστήριο Λιπιδίων και Λιποπρωτεϊνών /Ερευνητικό Κέντρο Αθηροθρόμβωσης/, στον Τομέα Οργανικής Χημείας και Βιοχημείας, του Τμήματος Χημείας, του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, στο πλαίσιο του ΔΠΜΣ «Ιατρική Χημεία», κατά την περίοδο Οκτωβρίου 2022- Ιούνιο 2025.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον επιβλέποντα καθηγητή μου κ. Κωνσταντίνο Τέλλη 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 τον κ. Μηλιώνη Χαράλαμπο, για την άριστη συνεργασία, τις συμβουλές για την ολοκλήρωση τόσο του θεωρητικού αλλά όσο και του κλινικού μέρους της μεταπτυχιακής διατριβής.

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 Τουρνόγλου Μαρία για την καλή συνεργασία κατά τη διάρκεια της διατριβής μου.

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

Πίνακας Συντομεύσεων-Ακρωνυμίων

ABCA1	ATP-binding cassette (ABC) transporter A1	Μεταφορέας A1 κασέτας δέσμευσης του ATP
ABCG1	ATP-binding cassette (ABC) transporter G1	Μεταφορέας G1 κασέτας δέσμευσης του ATP
Akt	Serine/threonine kinase	Κινάση σερίνης/θρεονίνης
ApoA-I:	Apolipoprotein A-I	Απολιποπρωτεΐνη A-I
ApoA-II	Apolipoprotein A-II	Απολιποπρωτεΐνη A-II
ApoA-IV	Apolipoprotein A-IV	Απολιποπρωτεΐνη A-IV
ApoB-100	Apolipoprotein B-100	Απολιποπρωτεΐνη B-100
Apo B-48	Apolipoprotein B-48	Απολιποπρωτεΐνη B-48
ApoC-I	Apolipoprotein C-I	Απολιποπρωτεΐνη C-I
ApoC-II	Apolipoprotein C-II	Απολιποπρωτεΐνη C-II
ApoC-III	Apolipoprotein C-III	Απολιποπρωτεΐνη C-III
ApoE	Apolipoprotein E	Απολιποπρωτεΐνη E
ASOs	Antisense oligonucleotides	Αντινοσηματικά ολιγονουκλεοτίδια
CETP	Cholesteryl ester transfer protein	Πρωτεΐνη μεταφοράς εστέρα χοληστερόλης
ECM	Extracellular matrix	Εξωκυτταρική μήτρα
eNOS	Endothelial NO synthase	Ενδοθηλιακή συνθάση του μονοξειδίου του αζώτου
HDL	High-density lipoprotein	Λιποπρωτεΐνη υψηλής πυκνότητας
HoFH	Homozygous Familial Hypercholesterolaemia	Ομόζυγη οικογενής υπερχοληστερολαιμίας
ICAM	Intracellular adhesion molecule	Διακυτταρικό μόριο προσκόλλησης
IDL	Intermediate density lipoprotein	Λιποπρωτεΐνη ενδιάμεσης πυκνότητας
KIV	Alpha-Ketoisovaleric acid	α-κετοϊσοβαλερικό οξύ
LCAT	Lecithin-cholesterol-acyl-transferase	Λεκιθινο-χοληστερολο-ακυλοτρανσφεράση
LDL	Low-density lipoprotein	Λιποπρωτεΐνη χαμηλής πυκνότητας
LOOH	Lipid hydroperoxides	Υδροϋπεροξειδία των λιπιδίων
Lp(a)	Lipoprotein (a) or “Lp little a”	Λιποπρωτεΐνη (α)

MAPK	Mitogen-activated protein kinase	Ενεργοποιούμενη από μιτογόνα πρωτεϊνική κινάση
RNS	Reactive nitrogen species	Δραστικές μορφές αζώτου
OxPLs	Oxidized phospholipids	Οξειδωμένα φωσφολιπίδια
PCSK9	Proprotein convertase subtilisin kexin type-9	Προπρωτεΐνη κονβερτάση σουμπτιλίσίνη / κεξίνη 9
PI3K	phosphatidylinositol 3-kinases	Κινάση της φωσφοτιδυλινοσιτόλης-3
PON	Paraoxonase	Παραξονάση
PPARs	Peroxisome proliferator activated receptors	Πυρηνικοί υποδοχείς ενεργοποίησης υπεροξεισωμάτων
RCT	Reverse cholesterol transport	Αντίστροφη μεταφορά χοληστερόλης
ROS	Reactive oxygen species	Δραστικές μορφές οξυγόνου
S1P3R	Sphingosine 1-phosphate receptor 3	Υποδοχέας 3 της 1-φωσφορικής σφιγγοσίνης
SNP	Single-nucleotide polymorphism	Μονονουκλεοτιδικός πολυμορφισμός
SR-B1	Scavenger Receptor BI	Υποδοχέας σαρωτής τύπου B1
TFPI:	Tissue factor pathway inhibitor	Αναστολέας της οδού του ιστικού παράγοντα
t-PA	Tissue-type plasminogen activator	Ενεργοποιητής του ιστικού πλασμινογόνου
TNF- α	Tumor necrosis factor α	Παράγοντας νέκρωσης όγκων α
TRL	Triglyceride-Rich Lipoprotein	Πλούσιες σε τριγλυκερίδια λιποπρωτεΐνης
u-PA	Urokinase-type plasminogen activator	Ενεργοποιητής πλασμινογόνου ουροκινάσης
VCAM-1	Vascular cell Adhesion molecule 1	Αγγειακό μόριο. προσκόλλησης-1
VLDL	Very low density lipoprotein	Πολύ χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνη

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1	10
ΛΙΠΟΠΡΩΤΕΪΝΕΣ	10
1.1 Εισαγωγή	10
1.2 Κατηγορίες Λιποπρωτεϊνών-Δομή	11
1.3 Χυλομικρά (Chylomicron, CM)	11
1.5 IDL (Intermediate Density Lipoprotein)	14
1.7 LDL (Low Density Lipoprotein)	16
1.7.1 Οξειδωτικά τροποποιημένες μορφές της LDL.....	18
1.8 HDL (High Density Lipoprotein)	20
1.8.1 Η λειτουργικότητα της HDL	27
1.8.3 Δυσλειτουργικότητα της HDL.....	31
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2.....	38
Lp(a) ΚΑΙ ΑΘΗΡΟΣΚΛΗΡΩΣΗ	38
2.1 Δομικά χαρακτηριστικά της Lp(a).....	38
2.2 Μεταβολισμός της Lp(a).	40
2.3 Μηχανισμοί δράσης της Lp(a) και καρδιαγγειακός κίνδυνος.....	41
2.4 Αλληλεπίδραση μεταξύ Lp(a) και HDL	44
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3:.....	46
ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ	46
3.1 Πληθυσμός της μελέτης.....	46
3.2 Απομόνωση λιποπρωτεϊνών	47
3.3 Προσδιορισμός πρωτεΐνης με την μέθοδο BCA.....	52
3.4 Οξειδωτική τροποποίηση των HDL και LDL με ιόντα Cu^{2+}	54
3.5 Προσδιορισμός ενεργοτήτων παραοξονάσης και αρυλεστεράσης του ενζύμου παραξονάση 1 (PON1)	56
3.3 Ηλεκτροφόρηση λιποπρωτεϊνών ορού ή πλάσματος με Lipoprint System	59
3.3.1 Ηλεκτροφόρηση και κατανομή των σωματιδίων της LDL ορού σε υποκλάσματα.	59
3.3.2 Ηλεκτροφόρηση και κατανομή των σωματιδίων της HDL ορού σε υποκλάσματα.	62
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4.....	66
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	66
4.1 Χαρακτηριστικά του πληθυσμού της μελέτης.....	66
4.2 Αντιοξειδωτική ικανότητα της HDL	67

4.2.1 Οξειδωτική ευαισθησία των λιποπρωτεϊνικών κλασμάτων LDL και HDL των ομάδων μελέτης.....	67
4.2.2 Προσδιορισμός της ενζυμικής ενεργότητας της παραξονάσης-1 ορού.....	72
4.3 Ηλεκτροφόρηση και κατανομή των σωματιδίων της LDL με το Lipoprint System	73
4.3 Ηλεκτροφόρηση και κατανομή των σωματιδίων της HDL με Lipoprint System .	75
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5.....	78
Συζήτηση -Συμπεράσματα.....	78
5.1 Συζήτηση.....	78
5.2 Συμπεράσματα.....	80
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	81

Περίληψη

Η Lp(a) είναι μια λιποπρωτεΐνη που συνδέει το μεταβολισμό των λιπιδίων με το ινωδολυτικό σύστημα και αποτελεί έναν ανεξάρτητο παράγοντα καρδιαγγειακού κινδύνου. Αντίθετα, η HDL έχει αθηροπροστατευτική δράση, συμβάλλοντας στην απομάκρυνση της χοληστερόλης, την αγγειοδιαστολή και την προστασία των κυττάρων, ενώ διαθέτει αντιοξειδωτικές, αντιφλεγμονώδεις και αντιαιμοπεταλιακές ιδιότητες. Η ποικιλόμορφη σύνθεση της HDL συμβάλλει στην αθηροπροστατευτική της δράση, επιτρέποντας την απομάκρυνση της χοληστερόλης από αφρώδη κύτταρα και την πρόληψη του σχηματισμού αθηρωματικής πλάκας. Η λειτουργία της στην αντίστροφη μεταφορά χοληστερόλης (RCT) εξαρτάται από διαφορετικούς υποδοχείς, με τη μικρή προ-β HDL να αλληλεπιδρά με το ABCA1 και την α-HDL με το ABCG1. Επιπλέον, η HDL προάγει την παραγωγή μονοξειδίου του αζώτου (NO), έχει αντιοξειδωτικές, αντιφλεγμονώδεις και αντι-αποπρωτικές δράσεις. Το μέγεθος των σωματιδίων HDL επηρεάζει τη λειτουργικότητά τους, με τις μικρότερες HDL να έχουν ισχυρότερη αντιφλεγμονώδη και αντιοξειδωτική δράση, ενώ σε περιπτώσεις μεταβολικών διαταραχών, φαίνεται αντιστρέφεται αυτή η σχέση. Η αθηροσκλήρωση είναι μια προοδευτική φλεγμονώδης νόσος που χαρακτηρίζεται από τη συσσώρευση λιπιδίων και ινωδών στοιχείων στις αρτηρίες. Η Lp(a) συμβάλλει στην αθηρωμάτωση και έχει αντι-ινωδολυτική δράση, με την apo(a) να δεσμεύει οξειδωμένα φωσφολιπίδια (OxPL), τα οποία βρίσκονται κυρίως στην Lp(a). Τα OxPLs προάγουν τη φλεγμονή και την αθηροθρόμβωση, ενώ τα αυξημένα επίπεδά τους σχετίζονται με αυξημένο κίνδυνο εμφράγματος και αγγειακού εγκεφαλικού επεισοδίου. Γενετικοί πολυμορφισμοί, όπως οι SNP rs3798220 και rs10455872, συνδέονται με υψηλά επίπεδα OxPL στην apo(a). Σκοπός της παρούσας μεταπτυχιακής διατριβής είναι η μελέτη της Lp(a) και του ρόλου αυτής στα ποιοτικά χαρακτηριστικά και τη λειτουργικότητα της HDL. Ειδικότερα στη μελέτη μας έγινε διερεύνηση των μεταβολών της αντιοξειδωτικής ικανότητας της HDL, καθώς και της κατανομής των σωματιδίων της HDL (small, large, intermediate) στο κυκλοφορικό μεταξύ των ατόμων που περιέχουν υψηλά επίπεδα λιποπρωτεΐνης (a) (ομάδα μελέτης Lp(a)>50mg/dl) και χαμηλά επίπεδα (ομάδα αναφοράς Lp(a)<10mg/dl) αντίστοιχα.

Abstract

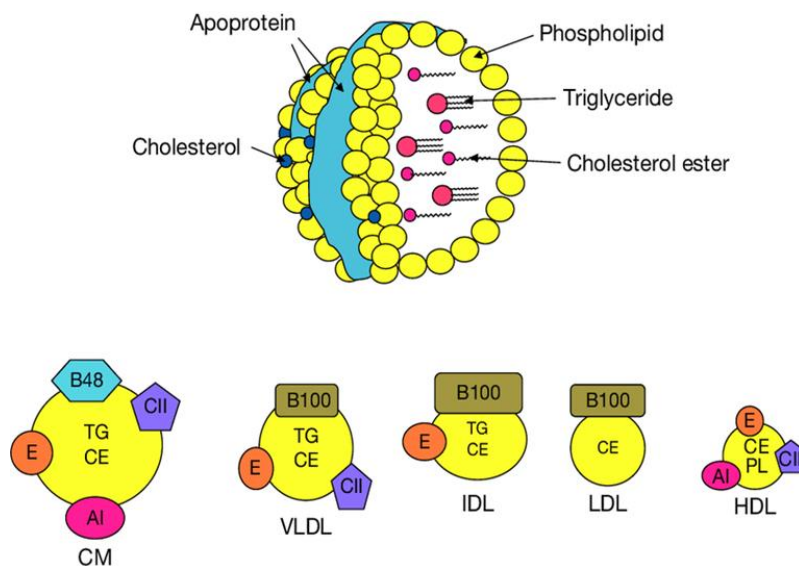
Lp(a) is a lipoprotein that links lipid metabolism with the fibrinolytic system and constitutes an independent cardiovascular risk factor. In contrast, HDL exerts an atheroprotective effect by contributing to cholesterol removal, vasodilation, and cellular protection, while also possessing antioxidant, anti-inflammatory, and antiplatelet properties. The diverse composition of HDL contributes to its atheroprotective role by enabling the removal of cholesterol from foam cells and preventing the formation of atherosclerotic plaque. Its function in reverse cholesterol transport (RCT) depends on different receptors, with small pre- β HDL interacting with ABCA1 and α -HDL with ABCG1. Moreover, HDL promotes the production of nitric oxide (NO) and exhibits antioxidant, anti-inflammatory, and anti-apoptotic actions. The particle size of HDL influences its functionality, with smaller HDL particles having stronger anti-inflammatory and antioxidant effects, although this relationship appears to reverse in cases of metabolic disorders. Atherosclerosis is a progressive inflammatory disease characterized by the accumulation of lipids and fibrous elements in the arteries. Lp(a) contributes to atherogenesis and has an anti-fibrinolytic effect, with apo(a) binding oxidized phospholipids (OxPL), which are mainly found on Lp(a). OxPLs promote inflammation and atherothrombosis, and elevated levels are associated with an increased risk of myocardial infarction and stroke. Genetic polymorphisms, such as SNPs rs3798220 and rs10455872, are associated with high levels of OxPL on apo(a). The aim of this master's thesis is to study Lp(a) and its role in the qualitative characteristics and functionality of HDL. This was carried out by examining two populations consisting of healthy individuals and patients with elevated Lp(a) levels. The study focused on plasma samples from these populations and compared the behavior of various HDL particles (small, large, intermediate), as well as the activity of the enzyme paraoxonase-1 (PON-1).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

ΛΙΠΟΠΡΩΤΕΪΝΕΣ

1.1 Εισαγωγή

Οι λιποπρωτεΐνες αποτελούν πολύτιμα διαγνωστικά εργαλεία της σύγχρονης κλινικής πρακτικής και οι προσδιορισμοί τους σε βιολογικά δείγματα είναι αναμφίβολα κεντρικό αντικείμενο των εργαστηρίων Βιοχημείας. Οι λιποπρωτεΐνες είναι ετερογενή μεγαλομοριακά σύμπλοκα λιπιδίων και ειδικών πρωτεϊνών, των αποπρωτεϊνών ή απολιποπρωτεϊνών (Apo), διαμέτρου 6-1000 nm, που διασφαλίζουν τη μεταφορά στη συστηματική κυκλοφορία και τη διανομή στους ιστούς λιπιδίων (χοληστερόλη, τριγλυκερίδια, φωσφολιπίδια) και λιποδιαλυτών μορίων (βιταμίνες και ορισμένα φάρμακα). Οι λιποπρωτεΐνες είναι πολύπλοκα σωματίδια που έχουν έναν κεντρικό υδρόφοβο πυρήνα από μη πολικά λιπίδια, κυρίως εστέρες χοληστερόλης και τριγλυκερίδια. Το λιποπρωτεϊνικό αυτό σύμπλοκο έχει σφαιρική δομή, που διευκολύνει τη διαλυτότητά του στο υδατικό περιβάλλον του πλάσματος [1]. Αυτός ο υδρόφοβος πυρήνας περιβάλλεται από μια υδρόφιλη μεμβράνη που αποτελείται από φωσφολιπίδια, ελεύθερη χοληστερόλη και απολιποπρωτεΐνες (Εικόνα 1.1).



Εικόνα 1.1 Δομή Λιποπρωτεϊνών

1.2 Κατηγορίες Λιποπρωτεϊνών-Δομή

Οι λιποπρωτεΐνες διαχωρίζονται α) με βάση την πυκνότητά τους (density, d), με τη μέθοδο της υπερφυγοκέντρωσης σε 5 κλάσματα, τα χυλομικρά τις VLDL, τις IDL, τις LDL και τις HDL (Πίνακας 1.2.1) και β) με βάση το φορτίο τους, με τη μέθοδο της ηλεκτροφόρησης σε 4 λιποπρωτεϊνικά κλάσματα, τα χυλομικρά, τις β-λιποπρωτεΐνες, τις προ-β-λιποπρωτεΐνες και τις α-λιποπρωτεΐνες [2].

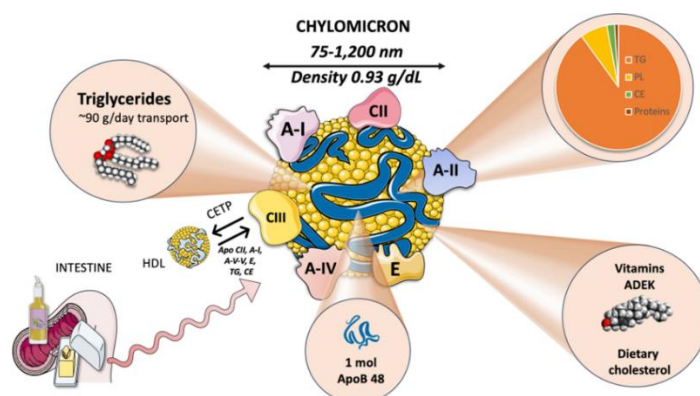
Πίνακας 1.2: Κατηγορίες και χαρακτηριστικά λιποπρωτεϊνικών σωματιδίων

Λιποπρωτεΐνη	Πυκνότητα(g/ml)	Μέγεθος(nm)	Κύρια Λιπίδια
Χυλομικρά	<0.930	75-1200	Τριγλυκερίδια
Υπολείμματα Χυλομικρών	0.930-1.006	30-80	Τριγλυκερίδια Χοληστερόλη
VLDL	0.930-1.006	30-80	Τριγλυκερίδια
IDL	1.006-1.019	25-35	Τριγλυκερίδια Χοληστερόλη
LDL	1.019-1.063	18-25	Χοληστερόλη
Lp(a)	1.055-1.085	~30	Χοληστερόλη Φωσφολιπίδια
HDL	1.063-1.210	5-12	Χοληστερόλη

1.3 Χυλομικρά (Chylomicron, CM)

Τα χυλομικρά είναι οι μεγαλύτερες σε μέγεθος λιποπρωτεΐνες, η διάμετρος των σωματιδίων τους κυμαίνονται από 75-1.200 nm, και είναι ορατά σε οπτικό μικροσκόπιο. Σχηματίζονται από τα εντεροκύτταρα κατά την πρόσληψη της τροφής από τα διατροφικά λιπίδια, είναι πλούσια σε τριγλυκερίδια (TG), χοληστερόλη και λιπαρά οξέα, και σκοπός τους είναι η μεταφορά των διατροφικών αυτών τριγλυκεριδίων και της χοληστερόλης στους περιφερικούς ιστούς και το ήπαρ. Η βασική δομική πρωτεΐνη των CM είναι η apoB-48 και εκτός από τα TG τα οποία αποτελούν το μεγαλύτερο μέρος του λιπιδικού πυρήνα των χυλομικρών, όπως φαίνεται και στην Εικόνα 1.2, τα CM όπως και οι άλλες λιποπρωτεΐνες μεταφέρουν επίσης φωσφολιπίδια και εστεροποιημένη χοληστερόλη [3]. Η κατανομή των CM με βάση της πυκνότητα κατά τον διαχωρισμό των λιποπρωτεϊνών με υπερφυγοκέντρωση

πυκνοτήτων είναι όπως φαίνεται και στον πίνακα 1.1. κάτω από 0,93 g/ml και η οποία οφείλεται τόσο στο χαμηλό ποσοστό πρωτεΐνης (μόλις 2%) όσο και στο μεγάλο ποσοστό λιπιδίων που μεταφέρει. Επίσης, αξίζει να σημειωθεί ότι όλες οι λιποδιαλυτές βιταμίνες στη διατροφή μεταφέρονται από χυλομικρά .



Εικόνα 1.2 Βασική δομή και ιδιότητες των χυλομικρών [3]

Επιπρόσθετα, τα σωματίδια των CM περιέχουν λειτουργικές για τη μεταβολική τους πορεία πρωτεΐνες, τις απολιποπρωτεΐνες, όπως είναι οι: apoB48, apoA-I, apoA-II, apoA-V, apoC-II, apoC-III και apoE. Η βασική δομική απολιποπρωτεΐνη των CM όπως ήδη αναφέραμε είναι η ApoB-48 και η οποία είναι η μοναδική για κάθε σωματίδιο χυλομικρού (1 μόριο apoB-48/σωματίδιο CM) και παίζει σημαντικό ρόλο στη διαμόρφωση των CM στα εντεροκύτταρα. Ειδικότερα, κατά τον σχηματισμό των CM στα εντεροκύτταρα, τα TG με την επανεστεροποίηση των διατροφικών λιπαρών οξέων μεταφέρονται στην apoB-48 με τη δράση της μικροσωμικής πρωτεΐνης μεταφοράς τριγλυκεριδίων (MTTP) κατά μήκος του ενδοπλασματικού δικτύου (ER) και της συσκευής Golgi . Αξίζει να σημειωθεί ότι πρόσφατα έχει δείχθει ότι ένα μικρό ποσοστό των σωματιδίων CM (apoB-48) τα οποία εκκρίνονται από τα εντεροκύτταρα είναι σε μέγεθος ανάλογο με αυτών των VLDL. Τα αρχικά σχηματισθέντα σωματίδια των CM που εκκρίνονται στην κυκλοφορία περιέχουν εκτός από την apoB-48 και apoA-I. Αξίζει να σημειωθεί ότι το 30% περίπου της apoA-I (δομική πρωτεΐνη των HDL) των σωματιδίων της HDL προέρχεται από την apoA-I των CM. Οι απολιποπρωτεΐνες, apoCII, ApoCIII, και apoE των CM, οι οποίες βρίσκονται στην επιφάνεια των CM προσλαμβάνονται από την HDL [4], [5] και παίζουν σημαντικό ρόλο στη μεταβολική τους πορεία. Ειδικότερα, η apoC-II και η apoA-V αντίστοιχα ενεργοποιούν τη δράση

της LpL ενώ η apoC-III και apoC-I την αναστέλλουν. Μετά τη δράση της LpL και την πρόσληψη των τριγλυκεριδίων των χυλομικρών από τους περιφερειακούς ιστούς έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό μικρότερων σωματιδίων CM που ονομάζονται κατάλοιπα χυλομικρών (chylomicron remnants). Αυτά τα εναπομείναντα κατάλοιπα μεταφέρονται στο ήπαρ προσλαμβάνόμενα από υποδοχείς των ηπατοκυττάρων οι οποίοι αναγνωρίζουν την apoE και την apoB-48. Η apoE των καταλοίπων των CM αναγνωρίζεται επίσης από τους LDL υποδοχείς των ηπατοκυττάρων και των περιφερικών κυττάρων, και συνεπώς τα κατάλοιπα των CM μπορούν να καταβολιστούν και μέσω των LDL υποδοχέων. Σε σύγκριση με τα χυλομικρά αυτά τα σωματίδια είναι εμπλουτισμένα με χοληστερόλη και πολλές μελέτες έχουν δείξει και έχουν χαρακτηριστεί από την βιολογική τους δράση ως προαθηρογόνα. Νεότερα δεδομένα απέδειξαν ότι σημαντικό ρόλο στην αποικοδόμηση των τριγλυκεριδίων των CM από την LpL διαδραματίζουν η ApoC-III και η πρωτεΐνη Angiopoietin-like 3 (Angptl3), οι οποίες αποτελούν αναστολείς της LpL, ειδικότερα, η ApoC-III αναστέλλει την πρόσληψη των καταλοίπων των CM από το ήπαρ. Πρόσφατα, τόσο η ApoC-III όσο και η Angptl3 αποτελούν νέους στόχους της υπολιπιδαιμικής αγωγής για τη μείωση των επιπέδων των τριγλυκεριδίων στο πλάσμα. Επίσης τα χαμηλά επίπεδα HDL χοληστερόλης έχειδειχθεί ότι έχουν αρνητική συσχέτιση σε καταστάσεις υπερτριγλυκεριδαϊμίας και αυτό οφείλεται στην αλληλένδετη αλληλεπίδραση της HDL στο μεταβολισμό των CM μέσω της CETP η οποία μεταφέρει τα TG και τη χοληστερόλη των CM στην HDL όπως αναφέρεται αναλυτικά παρακάτω [6], [7], [8]

1.4 VLDL (Very Low Density Lipoprotein)

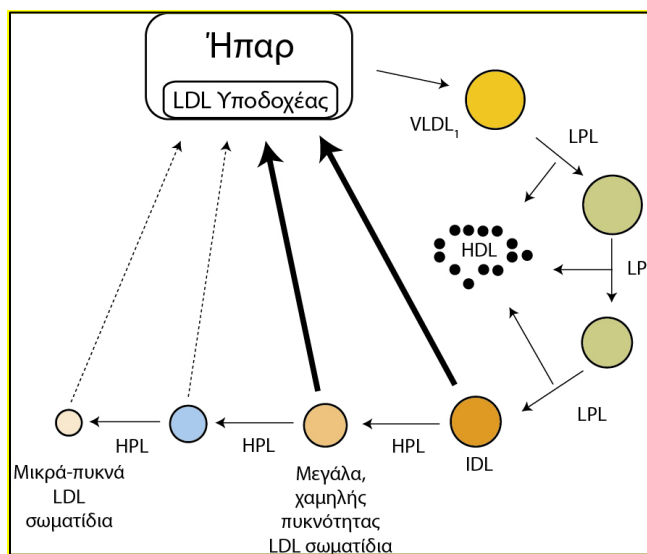
Οι πολύ χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνες, είναι λιποπρωτεϊνικά σωματίδια διαμέτρου 30 έως 70 nm τα οποία παράγονται στο ήπαρ και είναι πλούσια σε τριγλυκερίδια. Η βασική δομική πρωτεΐνη των VLDL είναι η apoB-100. Το μέγεθός τους μπορεί να ποικίλλει ανάλογα με την ποσότητα των τριγλυκεριδίων που μεταφέρονται στο σωματίδιο [1]. Ο σκοπός τους είναι η μεταφορά των τριγλυκεριδίων και της χοληστερόλης από το ήπαρ και τη συστηματική κυκλοφορία στους περιφερικούς ιστούς για τις ενεργειακές και λειτουργικές τους ανάγκες. Σημαντικό ρόλο στον σχηματισμό των VLDL διαδραματίζει η μικροσωμιακή πρωτεΐνη μεταφοράς τριγλυκεριδίων (microsomal triglyceride transfer protein, MTP). Η MTP μεταφέρει, κυρίως, τα τριγλυκερίδια και μικρές ποσότητες εστεροποιημένης

χοληστερόλης από τα σημεία βιοσύνθεσής τους στις περιοχές του ενδοπλασματικού δικτύου στις οποίες βρίσκεται η apoB-100. Ανάλογα με τη διαθέσιμη ποσότητα ελεύθερων λιπαρών οξέων και συνεπώς τριγλυκεριδίων που διαθέτει το ήπαρ, αυτό μπορεί να βιοσυνθέσει δύο διαφορετικού μεγέθους σωματίδια, τα μικρά VLDL2 σωματίδια και τα μεγάλα VLDL1 σωματίδια. Τα VLDL1 σωματίδια είναι πλούσια σε τριγλυκερίδια και βιοσυντίθενται σε μεγάλες ποσότητες όταν υπάρχει περίσσεια λιπαρών οξέων στο ήπαρ, φαινόμενο το οποίο παρατηρείται σε διάφορες παθολογικές καταστάσεις, όπως στο μεταβολικό σύνδρομο. Μετά τη βιοσύνθεσή τους, οι VLDL εκκρίνονται από το ηπατοκύτταρο στο πλάσμα, όπου ακολουθούν έναν μεταβολικό δρόμο ανάλογο με αυτόν της βιοσύνθεσης των χυλομικρών. Στην κυκλοφορία, τα τριγλυκερίδια των VLDL υδρολύονται με τη δράση της LpL και τη HL σε γλυκερόλη και λιπαρά οξέα όπως αναφέραμε προηγουμένως για τα CM, τα οποία είτε χρησιμοποιούνται άμεσα από τους διάφορους ιστούς για ενεργειακούς σκοπούς είτε επανεστεροποιούνται μετά την είσοδό τους στα λιποκύτταρα και αποθηκεύονται στο λιπώδη ιστό. Με την υδρόλυση των τριγλυκεριδίων, τα σωματίδια των VLDL γίνονται μικρότερα σε μέγεθος και πυκνότερα, οπότε ονομάζονται κατάλοιπα VLDL (VLDL remnants). Ένα μέρος των καταλοίπων των VLDL απομακρύνεται από την κυκλοφορία είτε μέσω του υποδοχέα των VLDL είτε μέσω της πρωτεΐνης LRP (LDL receptor related protein). Η μεγαλύτερη ποσότητα των καταλοίπων VLDL συνεχίζουν να αποικοδομούνται στο πλάσμα με τη δράση της LpL. Από τα κατάλοιπα των VLDL2 θα παραχθούν τα σωματίδια των IDL. Με τη μείωση του ποσοστού των TG η σύνθεση των σωματιδίων της VLDL μεταβάλλεται, η διάμετρος μειώνεται, ενώ η πυκνότητά τους αυξάνεται με αποτέλεσμα τον σχηματισμό των λιποπρωτεϊνικών σωματιδίων ενδιάμεσης πυκνότητας (IDL).

1.5 IDL (Intermediate Density Lipoprotein)

Οι ενδιάμεσης πυκνότητας λιποπρωτεΐνες (IDL) σχηματίζονται όπως αναφέραμε προηγουμένως από τα VLDL τα οποία έχουν αποθέσει τα τριγλυκερίδια στον μυϊκό και λιπώδη ιστό. Η πυκνότητά των σωματιδίων αυτών κυμαίνεται μεταξύ 1,006 έως 1,019 g/ml. Η αύξηση της πυκνότητας οφείλεται στην αύξηση της συγκέντρωσης των εστέρων χοληστερόλης μετά τη δράση της LpL και τη μείωση των τριγλυκεριδίων της VLDL. Σε φυσιολογικές συνθήκες, οι IDL παραμένουν ελάχιστα στο πλάσμα. Ένα μέρος από τις IDL παραλαμβάνεται από το ήπαρ μέσω των

υποδοχέων της LDL, ενώ το μεγαλύτερο ποσοστό των IDL στο πλάσμα, με την επίδραση της HL, μετατρέπεται σε σωματίδια LDL. Κατά τη διάρκεια της αποικοδόμησης των τριγλυκεριδίων των IDL από την HL, οι IDL αποδίδουν στην HDL τις apoC-II, apoC-III και apoE, ενώ παράλληλα παραλαμβάνουν από τις HDL εστέρες της χοληστερόλης σε ανταλλαγή με τριγλυκερίδια (με τη δράση της CETP). Η HL διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη μετατροπή των IDL σε μεγάλα-ελαφριά σωματίδια LDL, καθώς και στη μετατροπή των μεγάλων-ελαφριών LDL σωματιδίων σε μικρά-πυκνά LDL σωματίδια (small-dense LDL). Αξίζει να σημειώσουμε ότι η HL συμμετέχει στην εκκαθάριση των καταλοίπων (remnants) των χυλομικρών και των VLDL. Σε αντίθεση με τις VLDL2, η αποικοδόμηση των πλουσιότερων σε τριγλυκερίδια VLDL1 καταλήγει στον σχηματισμό μικρών και πυκνών LDL σωματιδίων (small dense LDL), εξαιτίας της παρατεταμένης δράσης της HL. Με αποτέλεσμα τα μικρά-πυκνά σωματίδια της LDL να έχουν μικρότερη συγγένεια με τον υποδοχέα της LDL, και συνεπώς μεγαλύτερο χρόνο ημιζωής (παραμονής) στο πλάσμα σε σύγκριση με τα μεγάλα χαμηλής πυκνότητας σωματίδια της LDL (Εικόνα 1.3).



Εικόνα 1.3 Ο ρόλος της HL στον σχηματισμό των μικρών-πυκνών LDL σωματιδίων [9].

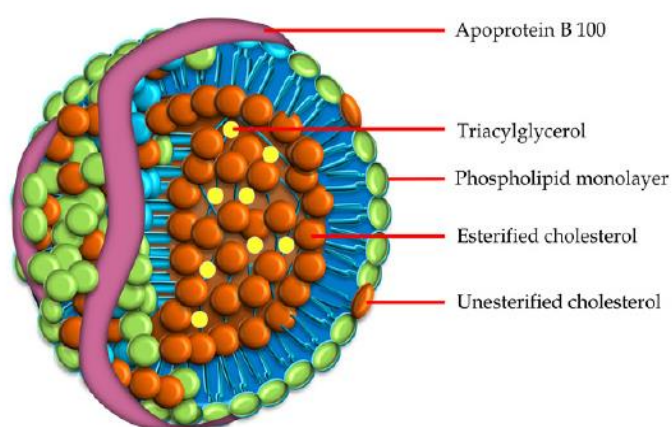
Η HL συγκρατεί στην κυτταρική μεμβράνη των ηπατοκυττάρων τα κατάλοιπα των παραπάνω λιποπρωτεϊνών, διευκολύνοντας έτσι την αποικοδόμησή τους. Εκτός από τη συμβολή της στον μεταβολισμό των apoB, η HL υδρολύει τα τριγλυκερίδια και τα φωσφολιπίδια των HDL2, μετατρέποντάς τα σε μικρότερα, τα HDL3 σωματίδια (βλ. μεταβολισμό HDL). Η παρατεταμένη δράση της HL στις HDL3 οδηγεί στην παραγωγή

μικρών προ-β-HDL σωματιδίων, τα οποία είναι τα περισσότερο δραστικά σωματίδια της HDL ως προς την αντίστροφη μεταφορά χοληστερόλης. Επίσης, όπως συμβαίνει και με τα κατάλοιπα των apoB-λιποπρωτεϊνών, η HL αποτελεί γέφυρα σύνδεσης των HDL στη μεμβράνη των ηπατοκυττάρων, συνεργαζόμενη με έναν ειδικό υποδοχέα εκκαθαριστή γνωστό ως SR-BI.

1.7 LDL (Low Density Lipoprotein)

Οι λιποπρωτεΐνες χαμηλής πυκνότητας (LDL) προέρχονται από σωματίδια VLDL και IDL οι οποίες είναι περαιτέρω εμπλουτισμένες σε χοληστερόλη. Η LDL αποτελείται από ένα φάσμα σωματιδίων που ποικίλλουν σε μέγεθος και πυκνότητα. Η πυκνότητα τους κυμαίνεται από 1.019 έως 1.063 g/ml, το μέγεθος τους από 15 έως 25 nm, περιέχουν περίπου 75% λιπίδια (κυρίως εστεροποιημένη χοληστερόλη και ελάχιστα τριγλυκερίδια) και 25% πρωτεΐνες. Στον ορό ενός φυσιολογικού ατόμου δώδεκα ώρες μετά το γεύμα, τα LDL σωματίδια αντιπροσωπεύουν περίπου το 60% των κυκλοφορούντων λιποπρωτεϊνών. Ο φυσιολογικός ρόλος των LDL είναι η μεταφορά χοληστερόλης από το ήπαρ στους περιφερικούς ιστούς του σώματος. Η κυρίαρχη απολιποπρωτεΐνη των LDL είναι η apoB-100, μοριακού βάρους 550 kDa, και για κάθε σωματίδιο LDL αντιστοιχεί σε ένα μόριο Apo B-100, το οποίο αναγνωρίζεται από τα κύτταρα-στόχους. Οι LDL έχουν την ικανότητα να διέρχονται από τις συνδέσεις των ενδοθηλιακών κυττάρων των τριχοειδών και να προσλαμβάνονται από τα διάφορα κύτταρα μέσω του LDL υποδοχέα. Μετά την πρόσδεση, η LDL εισέρχεται στα κύτταρα όπου, με τη δράση μιας λυσοσωμικής όξινης λιπάσης, οι εστέρες της χοληστερόλης των LDL υδρολύονται ενδοκυττάρια προς ελεύθερη χοληστερόλη. Με βάση τον ρυθμό καταβολισμού τους, οι LDL διακρίνονται σε 2 μορφές. Η πρώτη είναι τα μεγάλα LDL σωματίδια, τα οποία καταβολίζονται γρήγορα, επειδή έχουν μεγάλη συγγένεια για τον LDL υποδοχέα τα οποία προέρχονται είτε απευθείας από το ήπαρ είτε σχηματίζονται στο πλάσμα από τις VLDL2 (μεταβολισμός VLDL). Η δεύτερη μορφή, είναι τα μικρά-πυκνά LDL σωματίδια που προέρχονται από τη λιπόλυση των VLDL1 και τα οποία, όπως προαναφέρθηκε, είναι πλούσια σε τριγλυκερίδια και καταβολίζονται με μικρότερη ταχύτητα. Συνεπώς, η ύπαρξη sdLDL συνδυάζεται με υψηλά επίπεδα τριγλυκεριδίων στο πλάσμα. Σε καταστάσεις διαταραχής των λιπιδίων, υπερτριγλυκεριδαιμία, χαμηλά επίπεδα HDL, παχυσαρκία, διαβήτη τύπου 2 (δηλαδή ασθενείς με μεταβολικό σύνδρομο) λοιμώδεις και φλεγμονώδεις καταστάσεις, η

πυκνότητα και το μέγεθος των σωματιδίων της LDL μεταβάλλεται με αύξηση κυρίως του ποσοστού των μικρών πυκνών σωματιδίων της LDL. Τα μικρά πυκνά σωματίδια LDL θεωρούνται προ-αθηρογόνα καθώς έχουν μειωμένη συγγένεια πρόσδεσης με τον υποδοχέα της LDL (LDLR) με αποτέλεσμα την παρατεταμένη χρονική διάρκεια στην κυκλοφορία και ως εκ τούτου την αύξηση της οξειδωτικής τους τροποποίησης. Επιπλέον, μελέτες έχουν δείξει ότι εισέρχονται πιο εύκολα στον υπενδοθηλιακό χώρο και δεσμεύονται πιο έντονα στις ενδοαρτηριακές πρωτεογλυκάνες, οι οποίες τα παγιδεύουν στο αρτηριακό τοίχωμα. Επομένως, τα sdLDL είναι πιο ευαίσθητα σε οξειδωτική τροποποίηση, και η οποία οδηγεί σε εκτεταμένη πρόσληψη από τα μακροφάγα [1].



Εικόνα 1.4 Η δομή της LDL

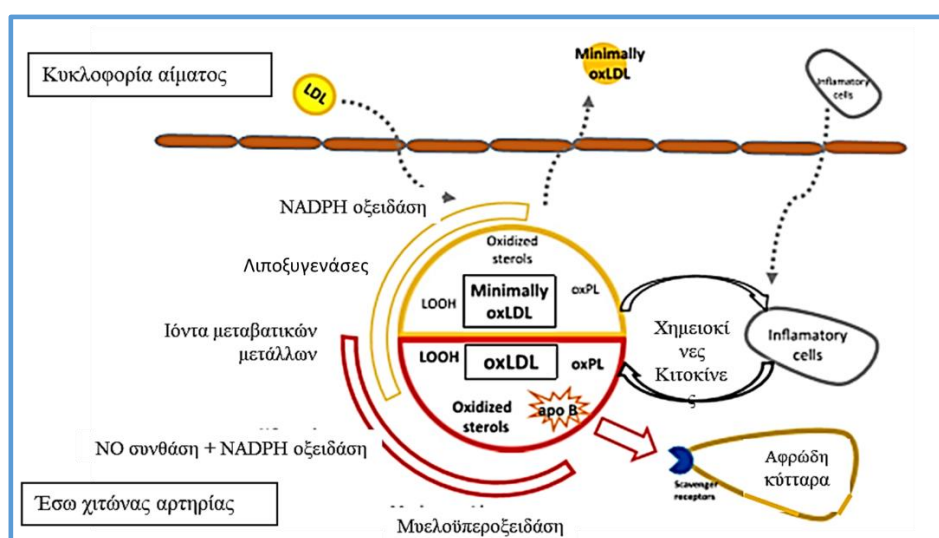
Με βάση το μέγεθος των σωματιδίων της LDL στο πλάσμα έχουν περιγραφεί δύο βασικοί φαινότυποι, ο φαινότυπος A στον οποίο επικρατούν τα μεγάλα σωματίδια, και ο φαινότυπος B στον οποίο κυριαρχούν τα μικρά-πυκνά σωματίδια της LDL. Οι φαινότυποι των LDL σωματιδίων έχουν αποκτήσει κλινικό ενδιαφέρον, καθώς άτομα με φαινότυπο B έχουν 2-3 φορές μεγαλύτερο κίνδυνο για την εμφάνιση στεφανιαίας νόσου σε σχέση με αυτούς με φαινότυπο A. Συνήθως, τα άτομα με φαινότυπο B έχουν αυξημένα επίπεδα τριγλυκεριδίων πλάσματος, αυξημένη μάζα των VLDL και IDL, καθώς και χαμηλά επίπεδα πλάσματος των apoA-I και HDL. Πιστεύεται ότι τα επίπεδα των τριγλυκεριδίων του πλάσματος είναι ο σημαντικότερος παράγοντας που καθορίζει το προφίλ των υποκλασμάτων της LDL. Σε άτομα με επίπεδα τριγλυκεριδίων μικρότερα από 90 mg/dL ο φαινότυπος B παρατηρείται σπάνια, ενώ το ακριβώς αντίθετο συμβαίνει όταν τα τριγλυκερίδια του πλάσματος ξεπεράσουν τα 180 mg/dL. Επίσης, ο φαινότυπος B συσχετίζεται με το σύνδρομο αντίστασης στην ινσουλίνη

(μεταβολικό σύνδρομο). Μέρος του καταβολισμού της LDL του πλάσματος γίνεται μέσω του υποδοχέα της, ενώ ένα μεγάλο ποσοστό της προσλαμβάνεται από τα μακροφάγα του υποενδοθηλιακού χώρου των αγγείων μέσω του υποδοχέα εκκαθαριστή (scavenger receptor). Μετά την πρόσληψη οι εστέρες της χοληστερόλης υδρολύονται από τη λυσοσωματική όξινη λιπάση. Ακολούθως, η ελεύθερη χοληστερόλη που παράγεται επανεστεροποιείται με τη δράση του ενζύμου ACAT και αποθηκεύεται στο κυτόπλασμα του μακροφάγου σε μορφή σταγονιδίων λίπους, τα οποία προσδίδουν στα κύτταρα αυτά μια αφρώδη όψη, και γιαυτό, ονομάζονται αφρώδη κύτταρα (foam cells). Η πρόσληψη των LDL από τα μακροφάγα και η μετατροπή τους σε αφρώδη κύτταρα αποτελεί ένα από τα πρώτα στάδια του μηχανισμού δημιουργίας της αθηρωματικής πλάκας. Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι οι LDL που προσλαμβάνουν τα μακροφάγα μέσω του υποδοχέα εκκαθαριστή δεν είναι οι φυσικές LDL, αλλά τροποποιημένες μορφές τους, κυρίως οι οξειδωμένες μορφές της LDL (oxLDL).

1.7.1 Οξειδωτικά τροποποιημένες μορφές της LDL

Οι οξειδωτικά τροποποιημένες μορφές της LDL έχουν αναφερθεί από τη δεκαετία του 1980 από τους βραβευμένους με Νόμπελ Brown και Goldstein [10], και ακολούθως παρατηρήθηκαν και ταυτοποιήθηκαν σε αθηρωματικές βλάβες το 1989 και το 2002, καθιστώντας έτσι τη μελέτη της οξείδωσης της LDL βασικό αντικείμενο έρευνας των καρδιαγγειακών νοσημάτων και της κλινικής της σημασίας [1]. Τα σωματίδια της LDL όπως αναφέραμε προηγουμένως αποτελούνται από έναν υδρόφοβο πυρήνα πολυακόρεστων λιπαρών οξέων, από εστεροποιημένη και μη εστεροποιημένη χοληστερόλη και από ένα μόριο apoB. Όλα τα συστατικά επομένως της LDL μπορούν να οξειδωθούν, ωστόσο, τα πολύ μικρά σωματίδια της LDL θεωρούνται ότι είναι τα περισσότερο επιρρεπή στην οξείδωση λόγω της ικανότητας τους να διεισδύουν στο αγγειακό τοίχωμα και ως εκ τούτου την έναρξη της φλεγμονώδους αντίδρασης. Η οξείδωση της LDL λαμβάνει χώρα σε δύο βασικά στάδια. Στο πρώτο στάδιο, η apoB-100 υφίσταται μια μικρή οξειδωτική τροποποίηση κατά το οποίο η LDL ονομάζεται ελάχιστα οξειδωμένη LDL (minimally oxidized LDL). Σε αυτό το στάδιο η LDL διατηρεί τη συγγένεια σύνδεσης με τον LDLR αλλά προκαλεί φλεγμονώδη αντίδραση με αποτέλεσμα αύξηση της παραγωγής χημειοκινών και κυτταροκινών. Με διαταραγμένη την οξειδοαναγωγική ομοιόσταση από τη φλεγμονώδη αντίδραση,

καθώς και τα αυξημένα επίπεδα ελεύθερων ριζών οξυγόνου (ROS) και άζωτου (RNS) η οξείδωση της LDL συνεχίζεται. Η τροποποιημένη LDL πλέον δεν αναγνωρίζεται από τον LDLR ως ένα φυσιολογικό μόριο καταβολισμού αλλά ως ξένο σώμα από τους υποδοχείς scavenger (SRs) των μακροφάγων, τα οποία στη συνέχεια μετατρέπονται σε αφρώδη κύτταρα χαρακτηριστικό γνώρισμα όπως αναφέραμε της αρτηριακής βλάβης. Τα ενδοθηλιακά και λεία μυϊκά κύτταρα των αγγείων καταλύουν με τη σειρά τους την οξείδωση της LDL με τη δράση ενζύμων όπως η οξειδάση του NADPH, οι λιποξυγενάσες (LOX), η οξειδάση της ξανθίνης (XO), η μυελοϋπεροξειδάση (MPO) (Εικόνα 1.5). Στο σημείο αυτό θα πρέπει να αναφέρουμε ότι σε *in vitro* πειράματα, η LDL οξειδώνεται παρουσία Cu^{2+} .



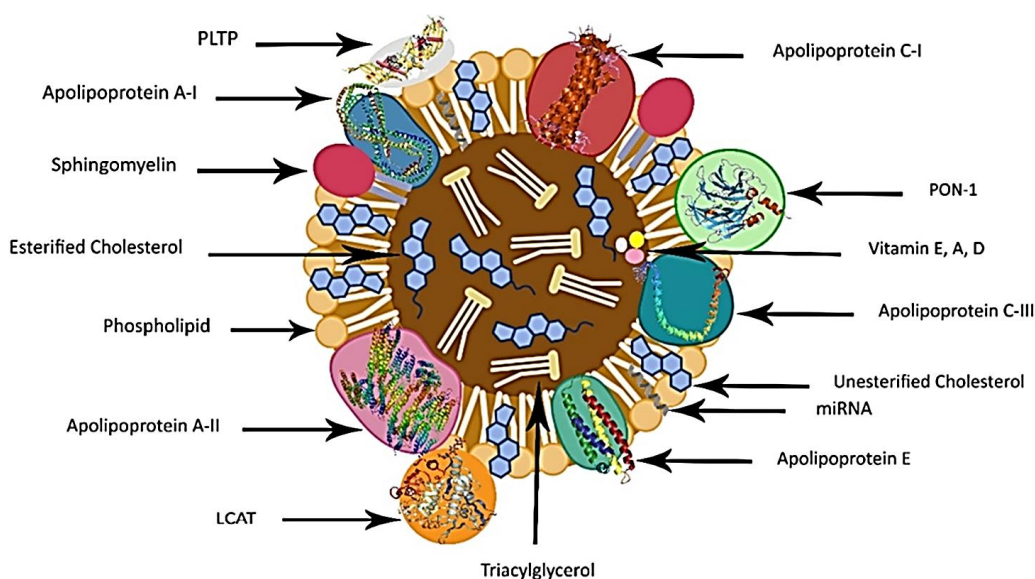
Εικόνα 1.5 Μηχανισμοί οξείδωσης της LDL στο αρτηριακό τοίχωμα. Κατά την είσοδο στον υποενδοθηλιακό χώρο, τα σωματίδια της LDL εκτίθενται σε τοπικό οξειδωτικό στρες που οφείλεται στην παρουσία ενζύμων συμπεριλαμβανομένης της NADPH οξειδάσης, της λιποξυγενάσης και της μυελοϋπεροξειδάσης, καθώς επίσης και από ιόντα των μεταβατικών μετάλλων. Οι οξειδωτικές μορφές που παράγονται από αυτές τις οντότητες μπορούν να οξειδώσουν την LDL σε διάφορους βαθμούς. Ενώ η NADPH οξειδάση και οι λιποξυγενάσες οδηγούν στο σχηματισμό μιας ελάχιστα οξειδωμένης μορφής της LDL, η μυελοϋπεροξειδάση και η NADPH οξειδάση σε συνδυασμό με την NO συνθάση προκαλούν εκτεταμένη οξείδωση στην LDL. Η ελάχιστα οξειδωμένη LDL χαρακτηρίζεται κυρίως από την παρουσία οξειδωμένων λιπιδίων, ενώ η εκτεταμένη οξείδωση τόσο των πρωτεϊνικών όσο και των λιπιδικών συστατικών αποτελεί το χαρακτηριστικό της οξειδωμένης LDL. Η ελάχιστα οξειδωμένη LDL εμφανίζει χαμηλή σύνδεση με τους υποδοχείς εκκαθαριστές των μακροφάγων και μπορεί εύκολα να επιστρέψει στην κυκλοφορία του αίματος. Τοπικά, η ελάχιστα οξειδωμένη LDL επάγει την ενεργοποίηση των ενδοθηλιακών που περιλαμβάνει την παραγωγή χημειοκίνης και κυτοκίνης και την προσέλκιση φλεγμονωδών κυττάρων, η οποία με τη σειρά της αυξάνει τη συσσώρευση χημειοκίνης και κυτοκίνης. Ως αποτέλεσμα, η οξείδωση των λιπιδίων

ολοκληρώνεται με τον σχηματισμό της οξειδωμένης Apo-B. Οι οξειδωτικά εκτεταμένες μορφές της LDL απορροφώνται εύκολα από μακροφάγα μέσω υποδοχέων σαρωτών που οδηγούν στο σχηματισμό αφρωδών κυττάρων [11]

1.8 HDL (High Density Lipoprotein)

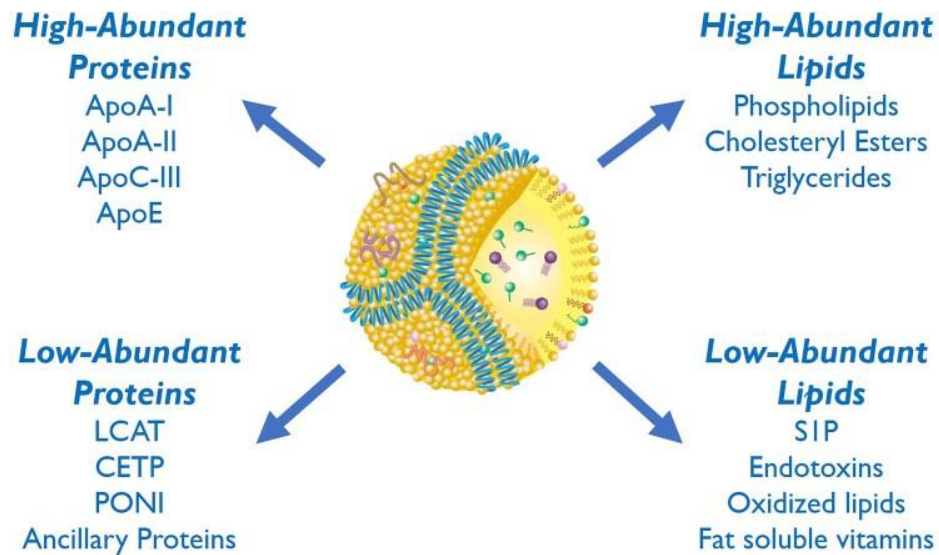
Οι λιποπρωτεΐνες υψηλής πυκνότητας είναι ένας ετερογενής πληθυσμός σε σχέση με το μέγεθος και τη σύσταση και που στην ώριμη μορφή τους αποκτούν σφαιρική διαμόρφωση με διάμετρο η οποία κυμαίνεται από 7,5 έως 10 nm. Η πυκνότητα σωματιδίων της HDL κυμαίνεται από 1,063 έως 1,210 g/ml καθώς η ετερογένεια οφείλεται στο μεγάλο ποσοστό του πρωτεϊνικού της περιεχομένου σε σχέση βέβαια με τα λιπίδια που φέρει (Εικόνα 1.6). Η μοναδική διάταξη των δύο κύριων συστατικών της (πρωτεΐνες και λιπίδια) στα διάφορα σωματίδια της HDL παρέχει πληροφορίες για την κατανόηση των διαφόρων φυσιολογικών ρόλων της. Τα λιπίδια στην HDL είναι διατεταγμένα σε μικκυλιακή διαμόρφωση, με τα αμφίφιλα λιπίδια (φωσφολιπίδια και ελεύθερη χοληστερόλη) να σχηματίζουν μια επιφανειακή μονοστιβάδα και τα πιο υδρόφοβα ή ουδέτερα λιπίδια (εστέρες χοληστερόλης και τριγλυκερίδια) να κατανέμονται εσωτερικά, στον πυρήνα των σωματιδίων. Σημαντική διάκριση, τα σωματίδια της HDL με σφαιρικές δομές και με διάμετρο περίπου 8-11nm έχουν σχηματισμένο λιπιδικό πυρήνα (ως *α-migrating HDL*, σύμφωνα με την ηλεκτροφορητική μετακίνησή τους σε γέλη αгарόζης) από ουδέτερα λιπίδια, ενώ τα σωματίδια της HDL που δεν έχουν ουδέτερα λιπίδια σχηματίζουν δομές που μοιάζουν με δίσκους. Η λιπιδική σύνθεση της HDL περιλαμβάνει 35-50% φωσφολιπίδια, 30-40% εστέρες χοληστερόλης, 5-12% τριγλυκερίδια, 5-10% σφιγγολιπίδια και 5-10% ελεύθερη χοληστερόλη [12]. Η HDL αποτελείται άνω των 200 διαφορετικών ειδών λιπιδίων και σύμφωνα με αυτή τη σύσταση μπορεί να κατηγοριοποιηθεί σε ουδέτερα-υδρόφοβα λιπίδια και σε αμφίφιλα λιπίδια [12]. Η πρώτη κατηγορία λιπιδίων περιλαμβάνει την εστεροποιημένη χοληστερόλη και τριγλυκερίδια που τοποθετούνται εντός του πυρήνα, ενώ η δεύτερη από ελεύθερη χοληστερόλη και φωσφολιπίδια, που τοποθετούνται στην επιφάνεια της HDL. Πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι ορισμένα από τα λιπίδια που μεταφέρονται από την HDL μπορεί να μετατραπούν σε ισχυρά βιοδραστικά μόρια όπως για παράδειγμα ο σχηματισμός του εξαιρετικά βιοδραστικού PL, της LysoPC η οποία εμπλέκεται άμεσα στο μηχανισμό της ανάπτυξης και εξέλιξης της αθηρωματικής νόσου και η οποία σχηματίζεται μετά από οξείδωση του AA της PC

που φέρει η HDL, στη θέση *sn-2* και υδρόλυση του λιπιδικού υπεροξειδίου με τη δράση της Lp-PLA₂ [13], [14]. Εκτός από τα λιπίδια, ένας μεγάλος αριθμός διαφορετικών πρωτεϊνών (άνω των 85), είναι συνδεδεμένες με την HDL, οι οποίες συμμετέχουν σε διάφορες λειτουργίες όπως είναι ο μεταβολισμός των λιποπρωτεϊνών και η ρύθμιση της χοληστερόλης, η αιμόσταση, ανοσολογικές αποκρίσεις, η μεταφορά βιταμινών κλπ. Οι βασικές απολιποπρωτεΐνες (apo) της HDL είναι η apo A-I, η apoA-II, η apoA-IV, η apoC-I, η apoC-II, η apoC-III, η apoE, η apoL1, και η apoM [15].



Εικόνα 1.6 Η κύρια δομή μιας σφαιρικής HDL. LCAT: λεκιθίνο-χοληστερολο-ακυλτρανσφεράση, PLTP: πρωτεΐνη μεταφοράς φωσφολιπιδίων, PON1: Παραζονάση 1 [16]

Από τις απολιποπρωτεΐνες η apo A-I και η apo A-II είναι δομικές πρωτεΐνες αποτελούν σχεδόν το 70% και περίπου το 20% της πρωτεΐνης HDL, αντίστοιχα και οι οποίες συμβάλουν μοναδικά στο σχηματισμό και τη διαμόρφωση της HDL. Ανάλογα με την περιεκτικότητα των πρωτεϊνικών και λιπιδικών μορίων της HDL (Εικόνα 1.7), τα σωματίδια χαρακτηρίζονται με υψηλή και χαμηλή περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες και λιπίδια αντίστοιχα. Με βάση τη μέση συγκέντρωση πλάσματος των 20 $\mu\text{mol/L}$, ένα αντιπροσωπευτικό σωματίδιο HDL φέρει 50–100 μόρια εστεροποιημένης ή μη εστεροποιημένης χοληστερόλης ή φωσφατιδυλοχολίνης και 2–3 μόρια apoA-I.



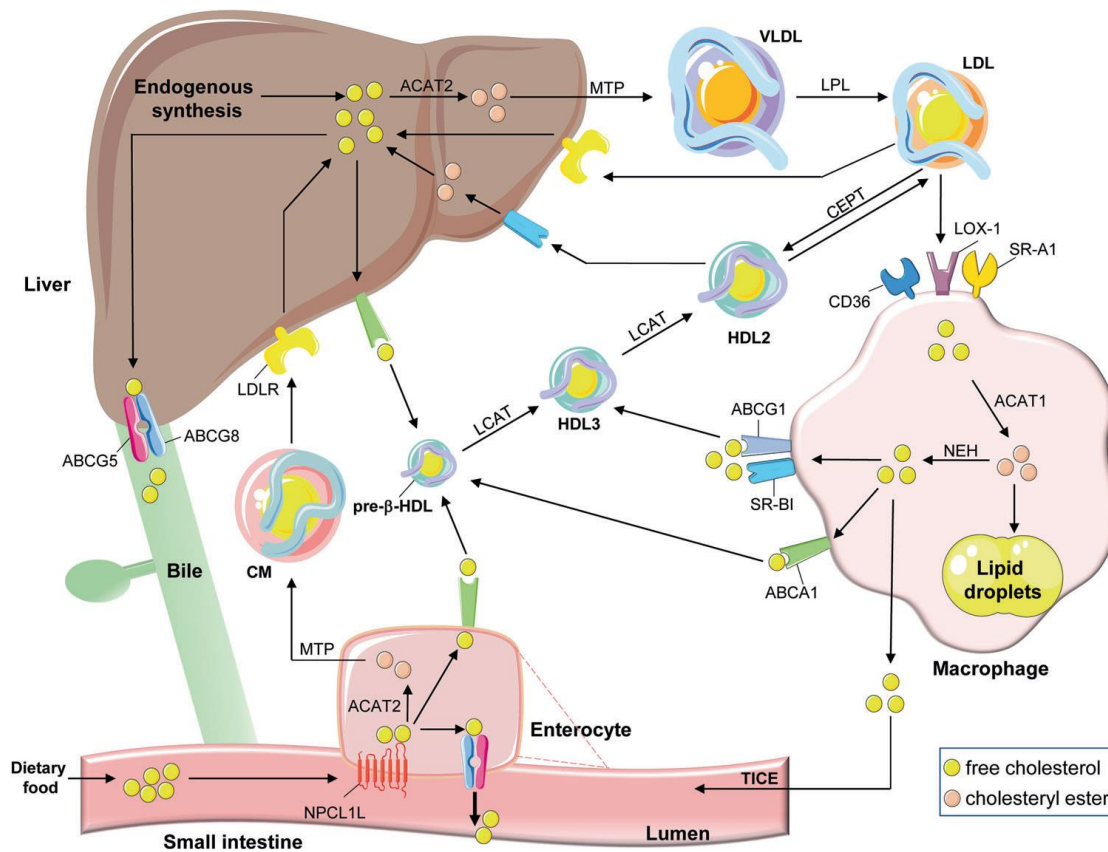
Εικόνα 1.7 Κατανομή των πρωτεϊνικών και λιπιδικών συστατικών ενός μέσου σωματιδίου HDL. Υψηλή και χαμηλή περιεκτικότητα των διαφόρων λιπιδίων και πρωτεϊνών στα σωματίδια της HDL. LCAT λεκιθίνη:ακυλοτρανσφεράση χοληστερόλης, CETP; πρωτεΐνη μεταφοράς χοληστερυλεστέρα, PONI; παραοξονάση 1 SIP; 1-φωσφορική σφιγγοσίνη [17]

Ταξινόμηση των σωματιδίων της HDL. Η ταξινόμηση των σωματιδίων της HDL γίνεται με:

1. Με βάση την πυκνότητα, η ώριμη HDL μπορεί να χωριστεί σε δύο υπότυπους: την HDL2 ($1,063 \text{ g/ml} < d < 1,125 \text{ g/ml}$) και την HDL3 ($1,125 \text{ g/ml} < d < 1,210 \text{ g/ml}$) [18].
2. Με βάση τη βαθμίδωση τηκτώματος ηλεκτροφόρησης, μπορούν να χωριστούν σε πέντε υποτύπους: την HDL2a (8,8-9,7 nm), την HDL2b (9,7-12,9 nm), την HDL3a (8,2-8,8 nm), και 2 HDL3b με 7,8-3,0 nm και 7,8-9,7 nm αντίστοιχα.
3. Με βάση τη μη μετουσιωτική δισδιάστατη ηλεκτροφόρηση στις pre-β HDL: την pre-β1HDL ($d=5,6 \text{ nm}$) και την pre-β2HDL ($d=12,0-14,0 \text{ nm}$) και στις αHDL: την α1HDL ($d=11,0 \text{ nm}$), την α2HDL ($d=9,2 \text{ nm}$), την α3HDL ($d=8,0 \text{ nm}$) και την α4HDL ($d=7,4 \text{ nm}$).

Τα σωματίδια Pre-β1 HDL είναι πιο αποτελεσματικά στην αλληλεπίδραση με την ABCA1 για την εκροή χοληστερόλης από τα κύτταρα για το σχηματισμό της εκκολαπτόμενης HDL. Αντίθετα, η α1 HDL αλληλεπιδρά κυρίως με τον ABCB1 για να μεταφέρει τη χοληστερόλη πίσω στο ήπαρ. Η α3 HDL μεσαίου μεγέθους αλληλεπιδρά κυρίως με το ABCG1 για να προκαλέσει κυτταρική εκροή χοληστερόλης σε σφαιρικά σωματίδια HDL που περιέχουν apoA-I και apoA-II .

HDL και ρύθμιση της χοληστερόλης-Μηχανισμός δράσης της RCT. Η HDL σχηματίζεται εξωκυττάρια μέσω του μηχανισμού της αντίστροφης μεταφοράς χοληστερόλης. Ο μεταβολισμός της HDL ξεκινά από την έκκριση της apoA-I από το ήπαρ και το έντερο. Το ήπαρ εκκρίνει περίπου 70-80% της συνολικής apoA-I της HDL στο πλάσμα. Η apoA-I, η οποία παράγεται και εκκρίνεται από τους παραπάνω ιστούς, αλληλεπιδρά με τον μεμβρανικό μεταφορέα λιπιδίων ABCA1 μέσω του οποίου λαμβάνει χώρα η μεταφορά της χοληστερόλης και των φωσφολιπιδίων από τα περιφερικά κύτταρα, (μακροφάγα του αρτηριακού τοιχώματος), και μετατρέπεται σε HDL δισκοειδούς μορφής (pre-HDL). Οι δισκοειδείς μορφές εξελίσσονται σε σφαιρικά σωματίδια HDL μέσω της δράσης του ενζύμου LCAT, το οποίο εστεροποιεί την ελεύθερη χοληστερόλη. Αξίζει να σημειώσουμε ότι η Apo A-I παίζει σημαντικό ρόλο στην ενεργοποίηση της LCAT. Επίσης, οι υποδοχείς, συμπεριλαμβανομένου του υποδοχέα καθαριστή κατηγορίας B τύπου I (SR-BI), συμβάλουν στην αγκίστρωση της HDL στην κυτταρική μεμβράνη και την προσρόφηση ακολούθως της χοληστερόλης του κυττάρου. Στη συνέχεια, η ώριμη HDL, αλληλεπιδρά με την ABCG1 εντός του ενδοαγγειακού τμήματος. Η LCAT, παρουσία του συμπαράγοντά της, την apoA-I, εστεροποιεί την ελεύθερη χοληστερόλη. Η CETP ακολούθως εμπλουτίζει την HDL με τριγλυκερίδια, οδηγώντας μαζί με την πρωτεΐνη μεταφοράς φωσφολιπιδίων (PLTP) σε περεταίρω ωρίμανση της HDL και το μετασχηματισμό της από HDL3 σε HDL2. Σε όλη αυτή τη διαδικασία η HDL παρέχει χοληστερόλη στους περιφερικούς ιστούς και στα όργανα, ειδικά στο ήπαρ, μέσω άμεσων και έμμεσων οδών (Εικόνα 1.8.). Η άμεση οδός περιλαμβάνει την εκλεκτική πρόσληψη της χοληστερόλης από τα ηπατοκύτταρα μέσω του SRB1, ενώ η έμμεση οδός βασίζεται στις επιδράσεις της CETP μέσω της ανταλλαγής εστέρων χοληστερόλης και TG, μεταξύ της ώριμης HDL και των σωματιδίων που περιέχουν ApoB, και ειδικότερα των VLDL και των LDL [19] (Εικόνα 1.8). Ο υποδοχέας LDL (LDLR) θα προσλάβει το μεγαλύτερο μέρος της εναπομένουσας χοληστερόλης στο ήπαρ ως μέρος της LDL, όπου η περίσσεια της απομακρύνεται μέσω της χολής ως χοληστερόλη ή χολικά άλατα.



Εικόνα 1.8. Ωρίμανση HDL και ρύθμιση της μεταφοράς χοληστερόλης [20]

Ακολουθώς, η FC όπως βέβαια και η διατροφική FC στα εντεροκύτταρα, προσλαμβάνεται μέσω της πρωτεΐνης Niemann-Pick C1 Like 1 (NPC1L1) αντλείται στον εντερικό αυλό από τις πρωτεΐνες μεταφοράς κασέτας ABCG5 και ABCG8 (ABCG5/ABCG8) και απελευθερώνεται στην κυκλοφορία είτε μέσω της ABCA1 με τον σχηματισμό της pre-β-HDL είτε μέσω της βιοσύνθεσης των CM μετά από εστεροποίηση της χοληστερόλης με δράση της ACAT2, και λιπιδίωση της apoB-48 μέσω της δράσης της MTP. Η χοληστερόλη που συντίθεται ενδογενώς στο ήπαρ συνδέεται με την ApoB-100 όπως και τα TG προς σχηματισμό της VLDL της οποίας το μεγαλύτερο μέρος στην συνέχεια μετατρέπεται σε LDL. Η LDL αποτελεί τον κύριο φορέα για τη μεταφορά της ενδογενούς χοληστερόλης. Οι τροποποιημένες μορφές της LDL όπως ήδη αναφέραμε επάγουν την έκφραση υποδοχέων εκκαθαριστών των μακροφάγων, CD36, SR-A1 και LDL 1 (LOX1) προάγοντας τη συσσώρευση χοληστερόλης με αποτέλεσμα την αύξηση της αθηροσκλήρωσης. Κατά την ενδοκυττάρωση της LDL από τα μακροφάγα η CE υδρολύεται από τη λιπάση (LAL) προς σχηματισμό της FC. Η περίσσεια FC εστεροποιείται από την ACAT1 σε CE και αποθηκεύεται ως σταγονίδια λιπιδίων η περίσσεια των οποίων συμβάλει στον

σηματισμό των αφρωδών κυττάρων. Για την εκροή χοληστερόλης (αντίστροφη μεταφορά χοληστερόλης), τα μακροφάγα με δράση της ουδέτερης υδρολάσης του εστέρα της χοληστερόλης (Neutral cholesteryl Ester Hydrolase; NEH) υδρολύει το CE σε FC. Η εκροή FC των μακροφάγων λαμβάνει χώρα με 3 τρόπους:

1. με απλή διάχυση,
2. με διευκολυνόμενη διάχυση από τους υποδοχείς SR-B1 (SR-B1-facilitated diffusion) και
3. με διαμεσολαβούμενη εκροή μέσω των ABCA1/ABCG1.

Σε φυσιολογικά μακροφάγα η απλή διάχυση είναι η κύρια οδός εκροής της FC, και ρυθμίζεται από τη συγκέντρωση της χοληστερόλης. Αντίθετα σε υπερφορτωμένα με χοληστερόλη μακροφάγα, η εκροή χοληστερόλης γίνεται κυρίως μέσω των ABCA1 και ABCG1. Ειδικότερα, μέσω ABCA1 με τη μεσολαβούμενη εκροή χοληστερόλης (RCT) έχουμε το σχηματισμό της preβ-HDL, και στη συνέχεια με δράση της LCAT το σχηματισμό της HDL3. Ακολούθως, η μεσολαβούμενη μέσω των ABCG1 και SR-BI εκροή χοληστερόλης γίνεται απευθείας στην HDL3 η οποία με δράση της LCAT, η FC εστεροποιείται περαιτέρω με αποτέλεσμα το σχηματισμό των σωματιδίων HDL2. Η CE των HDL2 προσλαμβάνεται από τους SR-BI στο ήπαρ και μετατρέπεται σε FC με δράση της NEH. Ο προβλεπόμενος μηχανισμός πρόσληψης της CE της HDL από τα ηπατοκύτταρα μέσω SR-BI περιλαμβάνει τη δημιουργία ενός διαμεμβρανικού καναλιού μεταφοράς της CE στον ενδοκυττάριο χώρο του ηπατοκυττάρου. Κατά τη διάρκεια αυτή η HDL δεν αναλώνεται στην πρόσληψη αλλά δίνει την CE της στα ηπατοκύτταρα και επαναλάβει τον κύκλο της εκροής χοληστερόλης (RCT- preβ-HDL). Σημαντικό, στα ενδοθηλιακά κύτταρα μέσω της αλληλεπίδρασης η HDL (με τον SR-BI) εκκινεί μηχανισμούς σηματοδότησης που περιλαμβάνουν την ενεργοποίηση της ενδοθηλιακής συνθάσης του μονοξειδίου του αζώτου (eNOS) και τελικά την απελευθέρωση του μονοξειδίου του αζώτου το οποίο προκαλεί αγγειοδιαστολή όπως θα αναφέρουμε παρακάτω. Επιπλέον, οι CE των HDL2 σωματιδίων μπορούν να ανταλλάσσονται μέσω της CETP με τα σωματίδια της LDL, τα οποία στη συνέχεια προσλαμβάνονται από την LDLR. Η περίσσεια χοληστερόλης στο ήπαρ απεκκρίνεται στη χολή με τη μεσολάβηση ABCG5/ABCG8 και τελικά εισέρχεται στον εντερικό αυλό για απέκκριση στα κόπρανα. Θα πρέπει να αναφέρουμε ότι μέρος της χοληστερόλης στο αίμα μπορεί να απεκκριθεί απευθείας στον εντερικό αυλό μέσω της διαεντερικής απέκκρισης χοληστερόλης (TransIntestinal Cholesterol Excretion; TICE)

στα εντεροκύτταρα. Αξίζει να αναφέρουμε ότι ένας από τους υποδοχείς της HDL είναι και ο CLA-1, (CD36, και το ανάλογο LIMPII 1) ο οποίος ανήκει στην οικογένεια SR-B. Η έκφρασή του CLA-1 περιορίζεται κυρίως σε ιστούς που εμπλέκονται στον ενεργό μεταβολισμό της χοληστερόλης, όπως το ήπαρ και οι στεροειδογόνοι ιστοί (επινεφρίδια, γονάδες, πλακούντας). Λαμβάνοντας υπόψη αυτή την ανακάλυψη, μαζί με την ικανότητα του υποδοχέα να συνδέεται τόσο με τις φυσικές όσο και με τις τροποποιημένες λιποπρωτεΐνες, γίνεται προφανές ότι ο υποδοχέας CLA-1 παίζει σημαντικό ρόλο στον μεταβολισμό των λιπιδίων και μπορεί να συμβάλλει στην αθηρογένεση

Η δομή η λειτουργικότητα και ο μεταβολισμός της HDL παίζουν καθοριστικό ρόλο για τη ρύθμιση και διατήρηση των φυσιολογικών επιπέδων της χοληστερόλης. Η λιποπρωτεϊνική λιπάση (LpL) συμβάλλει καθοριστικά στην απομάκρυνση των [21], [22] τριγλυκεριδίων από τις πλούσιες σε τριγλυκερίδια λιποπρωτεΐνες, (CM, VLDL) και το επίπεδο της απολιπίδωση αυτών των σωματιδίων επηρεάζει έμμεσα τον μεταβολισμό της HDL μεταβάλλοντας τα συστατικά της. Επίσης κρίσιμο ρόλο στον μεταβολισμό της HDL διαδραματίζει η ηπατική λιπάση (HL), καθώς μέσω της δράσης της (υδρόλυση των τριγλυκεριδίων και των φωσφολιπιδίων) συμβάλλει στην αναδιαμόρφωση των σωματιδίων τόσο της LDL όσο και της HDL. Αυτή η διαδικασία έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό μικρότερων και πυκνότερων σωματιδίων [19] για τα οποία μιλήσαμε ανωτέρω.

Η HDL υπό φυσιολογικές συνθήκες θεωρείται αθηροπροστατευτική κυρίως μέσω της ικανότητας των σωματιδίων της να εκκινούν την απομάκρυνση της περίσσειας χοληστερόλης από τους περιφερικούς ιστούς (RCT), και να ρυθμίζουν τα επίπεδα της χοληστερόλης. Επίσης, η HDL μέσω της ενεργοποίησης της eNOS και της παραγωγής NO συμβάλλει στη ρύθμιση της διαστολής των αγγείων, συμβάλλει στην κυτταροπροστασία των μακροφάγων και των ενδοθηλιακών κυττάρων καθώς και στην επιδιόρθωση του επιθηλίου ενώ επίσης έχει αντιοξειδωτικές, αντιφλεγμονώδεις και αντιαιμοπεταλιακές δράσεις. Επιπρόσθετα, προσφέρει προστασία από λοιμώξεις και έχει ευνοϊκή επίδραση στην ομοιοστασία των υδατανθράκων. Όλες αυτές οι ιδιότητες χαρακτηρίζουν μια λειτουργική HDL αλλά οι μεταβολές της σύνθεσής της τόσο πρωτεϊνικές όσο και λιπιδικές που λαμβάνουν χώρα υπό συνθήκες νοσηρότητας καθιστούν την HDL δυσλειτουργική.

1.8.1 Η λειτουργικότητα της HDL

Η ποικιλόμορφη πρωτεϊνική και λιπιδική σύνθεση της HDL συμβάλει στην αθηροπροστατευτική της ικανότητα. Στο τοίχωμα του αγγείου, η HDL υφίσταται διακυττάρωση μέσω των ενδοθηλιακών κυττάρων στον υπενδοθηλιακό χώρο, όπου μπορεί να εκκινήσει όπως είπαμε την εκροή χοληστερόλης από τα αφρώδη κύτταρα (μακροφάγα φορτωμένα με χοληστερόλη), αποτρέποντας έτσι την έναρξη και το σχηματισμό της αθηρωματικής πλάκας. Πέρα από την RCT, για την οποία αναφερθήκαμε εκτενώς, οι HDL έχουν πολλές άλλες ευεργετικές ιδιότητες, όπως αντιοξειδωτική ικανότητα, διέγερση παραγωγής μονοξειδίου του αζώτου (NO), αντιφλεγμονώδη (δηλαδή έκφραση αντι-αγγειακής προσκόλλησης του μορίου-1) και αντι-αποπτωτικές δράσεις. Μία από τις πιο σημαντικές ιδιότητες της HDL είναι η ικανότητά της να εκκινεί την παραγωγή NO των ενδοθηλιακών κυττάρων, μέσω της ενεργοποίησης των επιφανειακών υποδοχέων, SR-B1 και S1P3R, και ακολούθως της ενδοκυτταρικής σηματοδότησης, των Akt, PI3K, και MAPK, και ενεργοποίηση της eNOS (ενδοθήλιο) για την παραγωγή NO. Στην Εικόνα 1.9 συνοψίζονται οι αθηροπροστατευτικές δράσεις της HDL και της πιθανής τους επίδρασης στους μεσολαβητές της αθηροσκλήρωσης εντός του τοιχώματος της αρτηρίας σε διαφορετικά στάδια της διαδικασίας της νόσου. Τα πρώιμα στάδια της αθηροσκλήρωσης, τα HDL σωματίδια εμφανίζουν αντιφλεγμονώδη δράση μέσω της αναστολής του NF-κB, ο οποίος επάγει την έκφραση μορίων προσκόλλησης όπως ο VCAM-1 και της έκφρασης χημειοκίνων όπως ο MCP-1. Οι HDL εμφανίζουν επίσης αντιοξειδωτικές ιδιότητες οι οποίες αναστέλλουν την οξείδωση (Ox) της LDL και της ίδιας της HDL. HDL στα στάδια ανάπτυξης της αθηρωματικής πλάκας. Εκτός από την RCT την αντιοξειδωτική και αντιφλεγμονώδη δράση που αναφέραμε ανωτέρω η HDL αλληλοεπιδρά με τον SR-B1 και ενεργοποιεί τη σηματοδότηση μέσω της πορείας PI3K /pAkt η οποία αυξάνει : 1. την έκφραση του αντιαποπτωτικού παράγοντα Bcl-xL και 2. την παραγωγή eNOS (ενδοθήλιο) που προκαλεί NO. Στα πρώιμα και μεσαία στάδια της αθηροσκλήρωσης λαμβάνει χώρα η RCT από τα μακροφάγα της αθηρωματικής πλάκας μέσω μεταφορέων χοληστερόλης ABCA1 και ACBG1. Οι HDL προάγουν επίσης τη μετανάστευση των μακροφάγων της αθηρωματικής πλάκας στους τοπικούς λεμφαδένες, η οποία κατευθύνεται από τον υποδοχέα CCR7 (C-C υποδοχέας χημειοκίνης τύπου 7). Σε εγκατεστημένες αθηρωματικές πλάκες και κατά τη γήρανση, οι ιδιότητες της HDL είναι πιθανό να είναι περιορισμένες λόγω αλλαγών στη σύνθεση

της πλάκας και στη λειτουργικότητα της HDL. Αυτό περιλαμβάνει βλάβες στην εκροή χοληστερόλης και τις αντιφλεγμονώδεις, αντιοξειδωτικές και αντιαποπρωτικές επιδράσεις της HDL

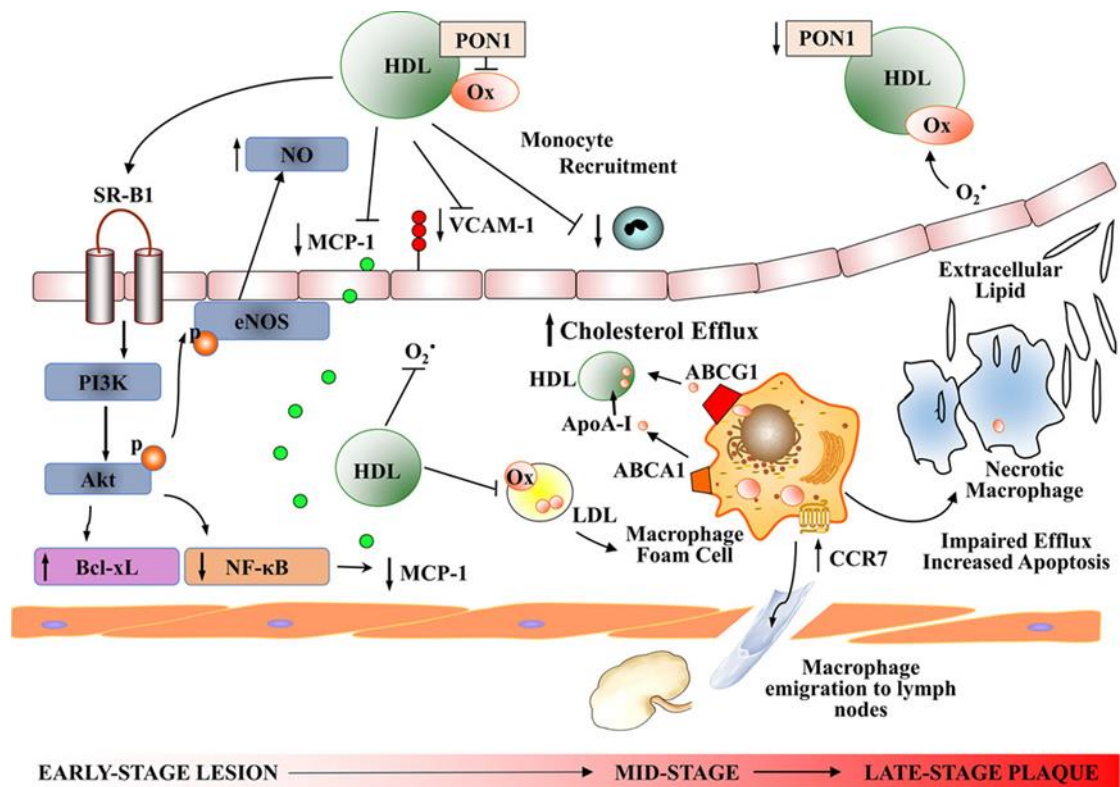
ApoA-I. Σημαντικό ρόλο στις αντιοξειδωτικές ιδιότητες της HDL παίζει η ApoA-I η οποία έχει την ικανότητα να απομακρύνει οξειδωμένα φωσφολιπίδια από την οξειδωμένη LDL και από τα κύτταρα. Πράγματι, τα κατάλοιπα Met που βρίσκονται στις θέσεις 112 και 148 της ApoA-I μπορούν να μειώσουν τα λιπιδικά υδροϋπεροξειδία (LOOH) μετατρέποντας τα σε οξειδοαναγωγικά υδροξείδια των λιπιδίων (LOH) μέσω της οξείδωσης των ομάδων της θειόλης τους, με αποτέλεσμα τον τερματισμό της αλυσιδωτής αντίδρασης της υπεροξείδωσης των λιπιδίων. Πρόσφατα στοιχεία υποδεικνύουν ότι επίσης και το κατάλοιπο Tyr 115 της apoA-I εμπλέκεται σε τέτοιες οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις. Επιπρόσθετα, έχει αποδειχθεί ότι η απεμπλουτισμένη λιπιδίων ApoA-I, απομακρύνει μόρια LOOH από την LDL [23]. Η ανασυσταμένη HDL (reconstituted HDL, rHDL) που περιέχει μόνο καθαρή ApoA-I και φωσφολιπίδια, παρουσιάζει παρόμοια ικανότητα να αναστέλλει την οξείδωση της LDL σε σύγκριση με αυτά των φυσικών σωματιδίων HDL3b και HDL3c. Καθοριστικό ρόλο της αντιοξειδωτικής ικανότητας της HDL φαίνεται να έχουν οι οξειδοαναγωγές ιδιότητες των καταλοίπων Met της ApoA-I. Πολλές μελέτες *in vivo* έχουν δείξει ότι η ApoA-I είναι ένας ισχυρός αντιοξειδωτικός, αντιφλεγμονώδης και αντι-αθηρωματικός παράγοντας και οι ιδιότητες αυτές αποδίδονται στην ικανότητά της α) να αναστέλλει τη δια-ενδοθηλιακή μετανάστευση ανοσοκυττάρων με τη μείωση ιντεγκρίνης, β) να αναστέλλει την ενεργοποίηση μονοκυττάρων και την παραγωγή κυτοκίνης που επάγεται από τα T-κύτταρα επαφής (T-cell contact), γ) να αναστέλλει την υπεροξείδωση των λιπιδίων και δ) να αλληλεπιδρά με ανοσολογικούς υποδοχείς [24]. Η υψηλή συγκέντρωση ApoA-I είναι ένας ανεξάρτητος αρνητικός προγνωστικός παράγοντας για τον καρδιαγγειακό κίνδυνο. Η ApoA-I χρησιμοποιείται συχνά ως βιοδείκτης για την πρόβλεψη καρδιαγγειακών παθήσεων. Η αναλογία ApoB-100 / ApoA-I, και η αναλογία σωματιδίων των λιποπρωτεϊνών (LDL / HDL) που μετρήθηκαν τόσο με κλασικές μεθόδους όσο και με NMR, είχαν ισχυρή συσχέτιση με την πρόβλεψη των συμβαμάτων εμφράγματος του μυοκαρδίου και του καρδιαγγειακού κινδύνου. Η ApoA-I εκτός από το ότι είναι απαραίτητη για τη δομή της HDL και για την ενεργοποίηση των συνδεδεμένων με την HDL ενζύμων, όπως οι PON1 και

LCAT[23]. Τα επίπεδα της αντιοξειδωτικής δράσης της PON-1 στην HDL υγιών ατόμων είναι υψηλότερα σε σχέση με άτομα με παράγοντες κινδύνου για ASCVD .

PON-1. Η παραοξονάση 1 (PON1) θεωρείται ότι συμβάλλει σημαντικά στις αντιοξειδωτικές και αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες της HDL, είναι ένα ένζυμο, γλυκοπρωτεΐνη, που στην κυκλοφορία συνδέεται αποκλειστικά με την HDL[23]. Η PON1 συντίθεται κυρίως στο ήπαρ και ένα μέρος στη συνέχεια εκκρίνεται στο πλάσμα, όπου συνδέεται με την HDL. Η PON1 υδρολύει μεγάλο εύρος υποστρωμάτων όπως λακτόνες, φάρμακα γλυκουρονιδίου, θειολακτόνες, αρυλεστέρες, κυκλικά ανθρακικά, οργανικά φωσφορούχα και παρασιτοκτόνα. Είναι μέλος της οικογένειας παραοξονασών (PON), οι οποίες είναι λακτονάσες εξαρτώμενες ασβεστίου, και στην οποία ανήκουν η PON2 και η PON3. Η πιο σημαντική λειτουργία της PON1 είναι ο μεταβολισμός των βιοδραστικών λιπιδίων που φέρει στα σωματίδια της τόσο η οξειδωμένη LDL όσο και η HDL [25]. Η PON1 προστατεύει τα φωσfolιπίδια της HDL από την οξείδωση [26] και επιπρόσθετα μπορεί να μεταβολίσει αρκετά φάρμακα μέσω της ικανότητας της να δρα και ως λακτονάση [27]. Η αντιπροσωπευτική βασική λειτουργία αυτού του ενζύμου είναι η υδρόλυση των oxPLs και το σχηματισμό της βιοδραστικής LysoPC. *In vitro* πειράματα έδειξαν ότι η παρουσία της PON1 στα λιποπρωτεϊνικά σωματίδια (κλάσματα) της HDL συμβάλλει αποτελεσματικά στην πρόληψη της συσσώρευσης των υπεροξειδωμένων λιπιδίων στην LDL [28]. Σε *in vivo* πειράματα με διαγονιδιακά ποντίκια με απουσία PON1 που υποβλήθηκαν σε δίαιτα υψηλής περιεκτικότητας σε λιπίδια παρατηρήθηκε ότι εμφανίζουν μικρότερη προστατευτική δράση στην οξείδωση της LDL και διπλάσια αθηρωματική βλάβη στην εγγύς αορτή σε σύγκριση με τα ποντίκια αναφοράς ενώ αντίθετα, η υπερέκφραση της ανθρώπινης PON1 εμφάνισε προστατευτική δράση σε ποντίκια επιρρεπή στην ανάπτυξη αρτηριοσκληρωτικών πλακών. Τα χαμηλά επίπεδα τόσο της HDL-C όσο και της δραστηριότητας της PON1 έχουν συσχετιστεί με αυξημένο καρδιαγγειακό κίνδυνο (CVD risk), ενώ αντίθετα τα υψηλά τους επίπεδα τους εμφανίζουν προστατευτική επίδραση. Η δραστηριότητα της PON1 στους ηλικιωμένους εμφανίζει σημαντική μείωση των επιπέδων της σε σύγκριση με τους ενήλικες και πολλές κλινικές μελέτες έχουν δείξει ότι η PON1 παίζει σημαντικό ρόλο σε ασθένειες που σχετίζονται με την ηλικία και το οξειδωτικό στρες, όπως ο διαβήτης μεταβολικά νοσήματα και ASCVD. Ωστόσο, η ακριβής σχέση μεταξύ HDL, PON1 και CVD δεν έχει πλήρως διερευνηθεί. Επομένως περισσότερες μελέτες απαιτούνται για τη

διερεύνηση του ακριβή ρόλου της PON1 σε σχέση με τους παράγοντες καρδιαγγειακού κινδύνου. Η PON1 θεωρείται ότι είναι ένας ανεξάρτητος, παράγοντας πρόγνωσης μελλοντικών καρδιαγγειακών συμβαμάτων, από τα επίπεδα HDL και ότι μπορεί να αξιολογηθεί ως καλύτερος βιοδείκτης για την πρόβλεψη του κινδύνου για CVD σε σχέση με τα επίπεδα HDL-C [29] Τα τελευταία χρόνια γίνεται όλο και πιο εμφανές ότι κατά τη διάρκεια ανάπτυξης παραγόντων κινδύνου για CVD, η HDL καθίσταται δυσλειτουργική [30], η PON1 είναι ένας από αυτούς τους στόχους βελτίωσης της δραστηριότητάς της και ως εκ τούτου τη βελτίωση της ποιότητας και καρδιοπροστατευτικής ικανότητας της HDL της μέσω φαρμακευτικής ή διατροφικής παρέμβασης. Για παράδειγμα, η χορήγηση ελαιόλαδου σε διαβητικούς τύπου 2 προκάλεσε αύξηση της PON1 στον ενώ η επίδραση ήταν πιο έντονη στις γυναίκες. [31]. Επίσης, η χορήγηση ωμέγα-3 πολυακόρεστων λιπαρών οξέων προκάλεσε 10% αύξηση στην δραστηριότητα της PON1 σε ασθενείς με υπερλιπιδαιμία. [32]

Σωματίδια της HDL. Σε ασθενείς με αθηροσκληρωτική στεφανιαία νόσο, έχει δειχθεί ότι τα μεγάλα σωματίδια της HDL (HDL2) έχουν μικρότερη αντιοξειδωτική ικανότητα σε σχέση με τα μικρότερα σε μέγεθος HDL3, και έχει δειχθεί ότι αυξανόμενης της apoA-II στα σωματίδια αυτά μειώνεται η δραστηριότητα της PON-1. Επίσης η HDL3 έχει πιο ισχυρή αντιφλεγμονώδη δράση σε σχέση με την HDL2, καθώς *in vitro* αναστέλλει σε ενδοθηλιακά κύτταρα την επαγόμενη από TNF-α έκφραση του VCAM-1. Επιπρόσθετα, η δράση αυτή δεν επηρεάζεται από πρωτεομικές τροποποιήσεις υποκατάστασης της apoA-I με apoA-II. Είναι ενδιαφέρον ότι όλο και περισσότερα δεδομένα υποδεικνύουν μια σχέση μεταξύ νοσήματος, και λειτουργικότητας σε σχέση με το μέγεθος των σωματιδίων της HDL. Ενώ οι μικρότερες HDL φαίνεται να λειτουργούν πιο προστατευτικά στην αθηροσκλήρωση, σε νοσήματα μεταβολικού συνδρόμου, όπως ο Σακχαρώδης Διαβήτης Τύπου 2 (ΣΔ2), τα μεγαλύτερα σωματίδια της HDL συσχετίζονται με καλύτερη λειτουργικότητα, πιθανότατα λόγω βελτιωμένης λειτουργίας της RCT ή λόγω της διαφορετικής μοριακής σύνθεσής τους.

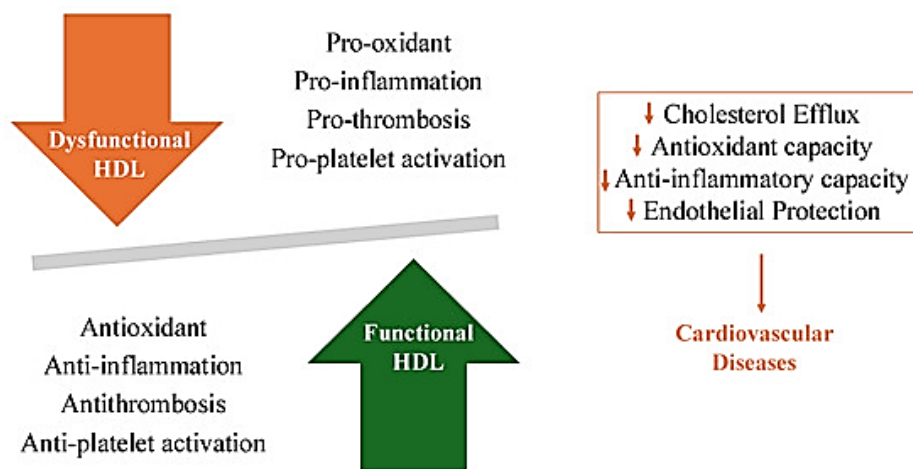


Εικόνα 1.9. Αθηροπροστατευτικές δράσεις της HDL (λιποπρωτεΐνη υψηλής πυκνότητας) [33].

1.8.3 Δυσλειτουργικότητα της HDL

Οι HDL μπορεί να χάσουν τις προστατευτικές λειτουργίες και ακόμη και να αποκτήσουν ανεπιθύμητες λειτουργίες, σε χρόνιες ασθένειες, όπως ρευματικά και αυτοάνοσα νοσήματα, CHD, διαβήτη, χρόνια νεφρική νόσο ή κατά τη διάρκεια μολυσματικών ασθενειών ή με την πάροδο της ηλικίας (Εικόνα 1.10, και 1.11). Σε αυτές τις συνθήκες η αντιοξειδωτική ικανότητα μειώνεται σταδιακά καθιστώντας τα σωματίδια της HDL από καρδιοπροστατευτικά σε προαθηρομωβωτικά. Η ικανότητα των εκκαθαριστών δικαρβονυλίου που προστατεύουν την HDL από οξειδωτική τροποποίηση αναστέλλοντας την οξειδωτική δράση με τις πρωτοταγείς τους αμίνες μειώνεται. Ειδικότερα, υπό αυξημένες οξειδωτικές συνθήκες, η αντίσταση στην υπεροξείδωση των λιπιδίων μειώνεται, τα λιπιδικά δικαρβονύλια που σχηματίζονται αντιδρούν και τροποποιούν τις πρωτεΐνες της HDL (Εικόνα 1.11 Α). Έτσι σε αυτές τις συνθήκες τα επίπεδα της δραστηριότητας των ενζύμων PON, PAF-AH και LCAT μειώνονται και τα υδροϋπεροξειδία λιπιδίων (LOOH) όπως είναι το 5-

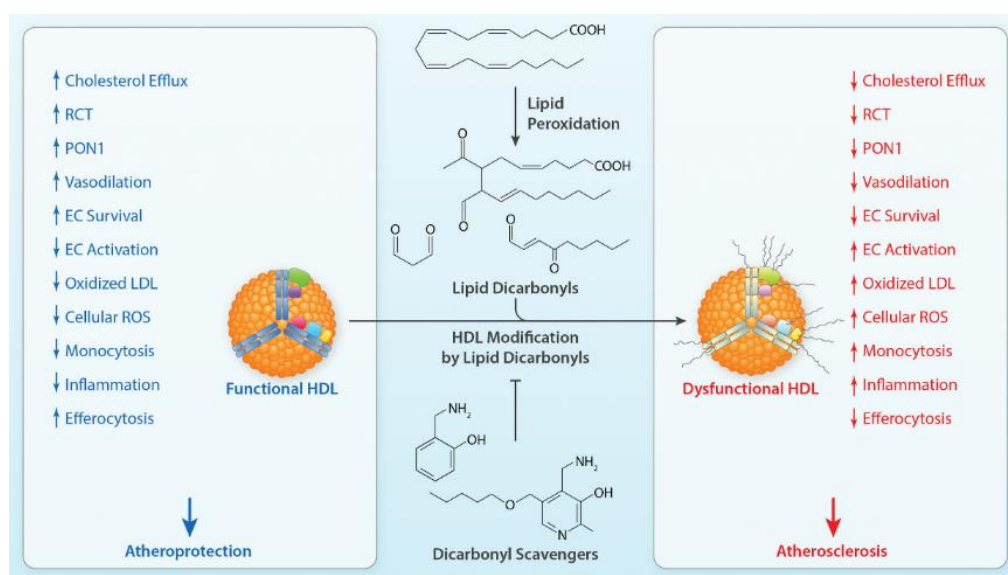
υδροϋπεροξυεικοσατετραενοϊκό οξύ (HPETE), το υδροϋπεροξυοκταδεκαδιενοϊκό οξύ (HPODE) και το υδροϋπεροξειδίο λινελαϊκού χοληστερυλεστέρα (CE-OOH) αυξάνονται. Το καθαρό αποτέλεσμα των αλλαγών στην HDL κατά τη διάρκεια της αντίδρασης οξειδίας φάσης είναι η παραγωγή προ-οξειδωτικών, σωματιδίων HDL (AP-HDL ή δυσλειτουργική HDL) Τα χαρακτηριστικά αυτής της εξασθενημένης (δυσλειτουργικής) HDL είναι η μειωμένη ικανότητά της να διεγείρει την εκροή χοληστερόλης από μακροφάγα, τη μειωμένη ικανότητα να αναστέλλει την οξείδωση της LDL και να ρυθμίσει την απόπτωση, τη μειωμένη ικανότητα της παραγωγής NO, και της αναστολής της έκφρασης της MCP-1 και της VCAM, την αυξημένη περιεκτικότητα σε υδροϋπεροξειδίο λιπιδίων (LOOH) αποτέλεσμα της οξείδωσης των λιπιδίων της που φέρει καθιστώντας τα σωματίδια από αθηροπροστατευτικά σε προ-αθηρογόνα (Εικόνα 1.10) [34]. Οι HDL των ασθενών με CHD ή χρόνια νεφρική νόσο για παράδειγμα αναστέλλουν αντί να διεγείρουν την παραγωγή NO, καθώς οι τροποποιημένες μορφές της αναγνωρίζονται από τον υποδοχέα της LDL τον LOX-1 τους TLR2 και TLR4 και αναστέλλουν την ενεργοποίηση της eNOS.



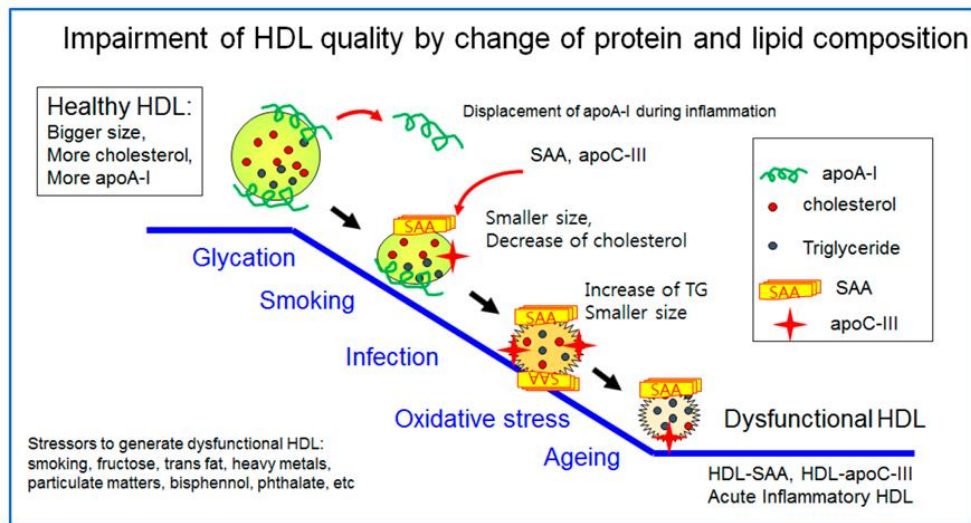
Εικόνα 1.10. Τα χαρακτηριστικά της δυσλειτουργικής HDL και της λειτουργικής HDL [34]

Σχέση δομής – λειτουργικότητας της HDL. Μια συστηματική διερεύνηση των σχέσεων δομής-λειτουργίας των HDL σε CHD και διαβήτη έδειξε ότι οι διαφορετικές λειτουργίες της HDL δεν συσχετίζονται μεταξύ τους και καθορίζονται από διαφορετικά χαρακτηριστικά και μόρια των HDL. Για παράδειγμα, τα υψηλά επίπεδα χοληστερόλης σχηματίζουν μεγαλύτερο μέγεθος σωματιδίων HDL ενώ τα

ανάλογης περιεκτικότητας σε TG σχηματίζουν μικρότερα σωματίδια HDL-TG και τα οποία εμφανίζουν μειωμένη λειτουργικότητα RCT. Ανάλυση μεγέθους και λειτουργικότητας της HDL, σε δείγμα καπνιστών έδειξαν μικρότερο μέγεθος σωματιδίων με υψηλότερη περιεκτικότητα σε TG, περισσότερο οξειδωμένη και γλυκοζυλιωμένη, η οποία ενίσχυσε την κυτταρική γήρανση και την αθηρογόνο εξέλιξη σε σχέση με μη καπνιστές ίδιας ηλικίας [35] (Εικόνα 1.11 B) . Επιπλέον τα υψηλά επίπεδα περιεκτικότητας σε TG στην HDL σχετίζεται με υψηλότερη συχνότητα μεταβολικού συνδρόμου λόγω κακής ποιότητας HDL ενώ ο λόγος TG/HDL-C συσχετίστηκε με υπέρταση [36]. Σφαιρικό σχήμα και μεγαλύτερο μέγεθος σωματιδίων όπως φαίνεται στην Εικόνα 1.11B χαρακτηρίζεται ως <κακή> HDL και η οποία είναι εμπλουτισμένη με χοληστερόλη και apoA-I. Η μορφή αυτή της HDL μπορεί να αλλάξει, από στρεσογόνους παράγοντες, όπως η γήρανση, το κάπνισμα, οι λοιμώξεις, οι ρύποι και κακές διατροφικές συνήθειες. Η μορφή της τροποποιημένης HDL (κακή HDL) δείχνει μεταβολή της apoA-I, μείωση της περιεκτικότητας σε χοληστερόλη, και αύξηση της περιεκτικότητας σε: TG, SAA και apoC-III. Υπο αυτές τις συνθήκες, η μορφολογία των σωματιδίων αλλάζει και από μεγάλα και σφαιρικά σωματίδια γίνονται μικρότερα με ακανόνιστο σφαιρικό σχήμα (Εικόνα 1.11A) [37]. Η γλυκοζυλιωμένη μορφή της HDL επίσης έδειξε μικρό μέγεθος των σωματιδίων διαφορετική μορφολογία και απώλεια δραστηριότητας PON [16]



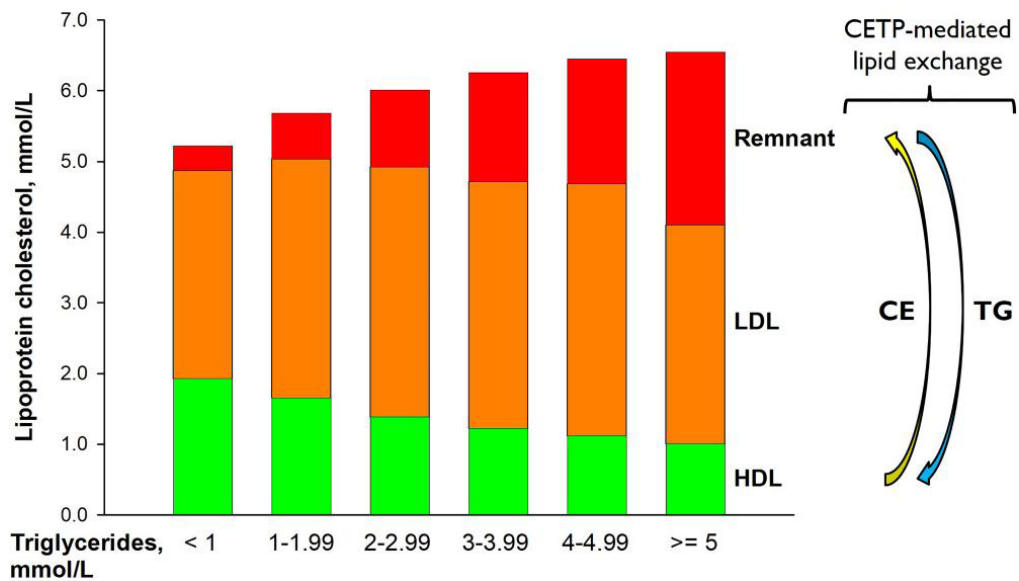
Εικόνα 1.11. Α Οι εκκαθαριστές δικαρβονυλίου προστατεύουν τη λειτουργικότητα της HDL.[37]



Εικόνα 1.11. Β Σχέσεις δομής-λειτουργίας της HDL [16].

Σε πολλές μελέτες έχειδειχθεί ότι τα χαμηλά επίπεδα της HDL-C συσχετίζονται ισχυρά με τα υψηλά επίπεδα των TGRL (Εικόνα 1.12). Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι τα επίπεδα HDL-C μειώνονται κατά τη διαταραγμένη μεταφορά της FC από τα TGRL στην HDL [16] που σχηματίζεται κατά τη λιπόλυση των TGRL (δράση LPL και HL), καθώς και με την αυξημένη μεταφορά CE από τα HDL στα TGRL σωματίδια με τη δράση της CETP (Εικόνα 1.12). Έχει καθιερωθεί ότι τα χαμηλά επίπεδα HDL-C είναι ένας έμμεσος και μη αιτιολογικός βιοδείκτης αυξημένου κινδύνου για ASCVD που συσχετίζεται με την αθηρογένεση και που οφείλεται στα αυξημένα επίπεδων των TGRL στο πλάσμα καθώς και των υπολειμμάτων τους (remnants) [38]

Σύμφωνα με πρόσφατες μελέτες έχειδειχθεί ότι ο συνολικός αριθμός σωματιδίων HDL, καθώς και ο αριθμός των μικρών (SHDL) και μεσαίων (IHDL), αλλά λιγότερο των μεγάλων σωματιδίων (LHDL), συσχετίζονται με κίνδυνο για ASCVD [39]. Η θεραπεία με νικοτινικό οξύ και αναστολείς CETP αύξησαν τα επίπεδα της HDL-C σε σχέση με τον αριθμό των σωματιδίων της (HDL-Particle Number; HDL-P), ενώ αντίθετα η θεραπεία με φιβράτες αύξησε τα HDL-P σε σχέση με την HDL-C (



Εικόνα 1.12. Λιποπρωτεϊνική-χοληστερόλη σε σχέση με τα επίπεδα τριγλυκεριδίων. [39], [40]

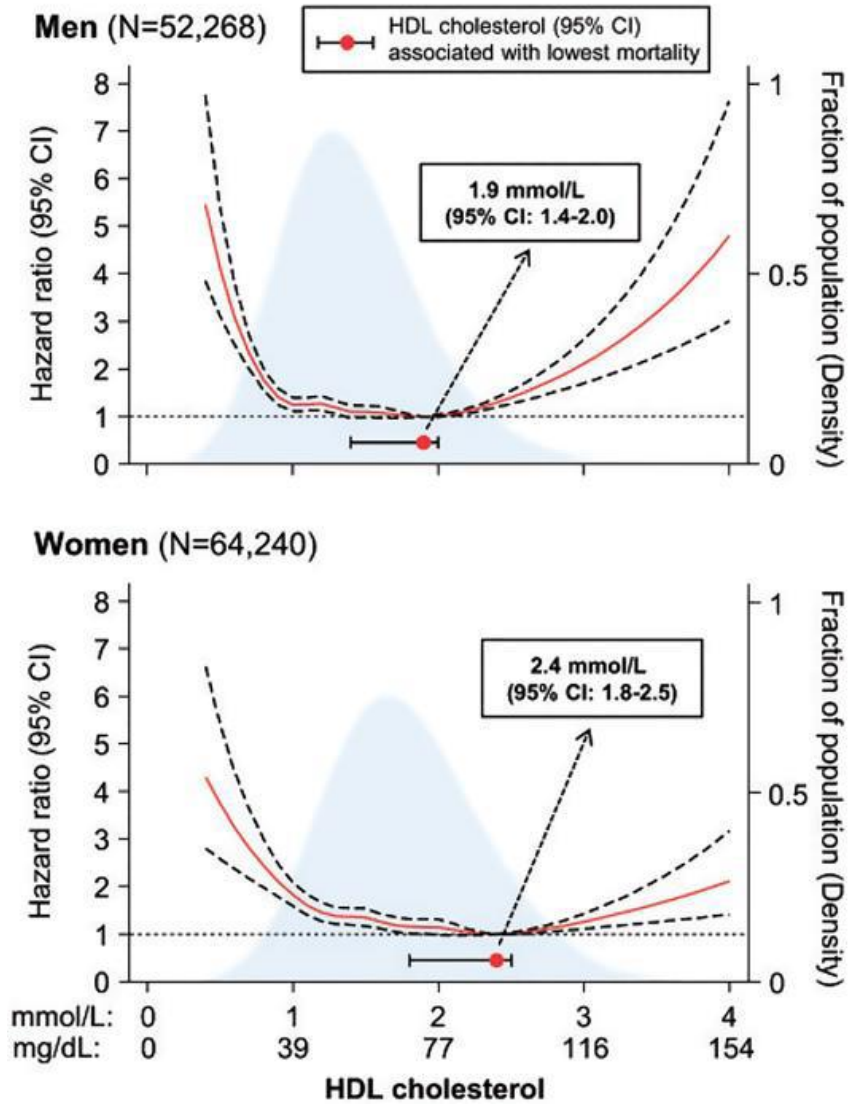
Η apoC-III σχετικά με την εμπλοκή της στη φλεγμονή έχει δείξει ότι επηρεάζει αρνητικά την ικανότητα της HDL να αναστείλει την απόπτωση των ενδοθηλιακών κυττάρων και την εκροή χοληστερόλης από τα μακροφάγα ενώ το SAA διαταράσσει την ικανότητα της HDL να ενεργοποιεί το eNOS. Ωστόσο δεν έγινε σαφές κατά πόσο τα επίπεδα του περιεχόμενου σε apoC-III ή σε SAA (serum amyloid) εμπλέκονται άμεσα ή έμμεσα με τη δυσλειτουργικότητα της HDL κατά τον μεταβολισμό των TGRL ή παρουσία φλεγμονής. Η ικανότητα της εκροής χοληστερόλης (cholesterol efflux capacity; CEC) διερευνήθηκε εκτενέστερα, παρά την ετερογένεια των αποτελεσμάτων, μια πρόσφατη μετα-ανάλυση αποκάλυψε ότι CEC σχετίζεται αντιστρόφως με συμβάντα ASCVD ανεξάρτητα από τα επίπεδα της HDL-C [41]. Ωστόσο, η ανάλυση είναι δύσκολο να τυποποιηθεί και δεν είναι κατάλληλη για κλινική ρουτίνας [40]. Αν και η αύξηση της CEC είτε ως μονοθεραπεία είτε ως θεραπεία συνδυασμού με στατίνες, δεν απέτρεψε τα συμβάντα σε ASCVD. Παρά τους περιορισμούς αυτούς, η CEC έχει χρησιμοποιηθεί ως αναφορά για την ανάπτυξη μοριακών βιοδεικτών που μπορούν να μετρηθούν σε κλινικά εργαστήρια. Ένα παράδειγμα είναι η παραγωγή ενός αλγορίθμου που ενσωματώνει τις πληροφορίες διαφορετικού μεγέθους σωματιδίων HDL με τη χρήση NMR. Η εκτιμώμενη CEC που βασίζεται σε τεχνική NMR συσχετίστηκε πολύ καλά με τη CEC που μετρήθηκε *in vitro*. Ωστόσο, σε αντίθεση με τα αρχικά ενθαρρυντικά αποτελέσματα, η επικύρωση του αλγορίθμου εκτίμησης CEC

απέτυχε σε μεγάλες πολυκεντρικές μελέτες [42]. Ένα άλλο παράδειγμα είναι μια μελέτη πρωτεωμικής αξιολόγησης που ενσωματώνει τις πληροφορίες των απολιποπρωτεϊνών A-I, C-I, C-II, C-III και C-IV, η οποία έδειξε καλή και σημαντική συσχέτιση με CEC, ανεξάρτητα από κλινικούς παράγοντες κινδύνου, συμπεριλαμβανομένων συμβατικά μετρούμενων συγκεντρώσεων apoA-I και apoB [43]. Για την επικύρωση και αξιοποίηση των παραγόντων αυτών ως βιοδείκτες απαιτούνται περισσότερες μελέτες [39].

Υψηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνη στη θνησιμότητα. Πολλές μελέτες έχουν δείξει ότι όχι μόνο τα χαμηλά αλλά και τα πολύ υψηλά επίπεδα της HDL-C έχουν συσχετιστεί με υψηλό καρδιαγγειακό κίνδυνο και κίνδυνο θνησιμότητας (Εικόνα 1.13) [44], [45]. Αυτό το εύρημα, προέρχεται από πολλές μελέτες 30,115–117 και θέτει το ερώτημα εάν πράγματι τα πολύ υψηλά επίπεδα HDL-C έχουν επιβλαβείς επιπτώσεις. Οι μη γραμμικοί Μεντελικοί τυχαιοποιημένοι σχεδιασμοί μπορούν να χρησιμοποιηθούν για συσχετισμούς παρατήρησης σχήματος U ωστόσο, αυτές οι μελέτες χρειάζονται μεγαλύτερη στατιστική ανάλυση και μέχρι στιγμής καμία τέτοια μελέτη δεν έχει εξετάσει εάν τα εξαιρετικά υψηλά επίπεδα HDL-C σχετίζονται αιτιολογικά με την αυξημένη θνησιμότητα.

Για τα πολύ υψηλά επίπεδα της HDL προτάθηκε ότι: 1. οφείλονται κυρίως σε άτομα με σπάνιες γενετικές παραλλαγές (περίπου το 11%) που μπορεί να έχουν επιβλαβείς επιπτώσεις στην υγεία, πιθανότατα μέσω της δυσλειτουργικής HDL, [45] 2. οφείλονται σε πολύ υψηλή κατανάλωση αλκοόλ [44] [45] 3. σε καθυστερημένο καταβολισμό της HDL-C που σημαίνει διαταραγμένη κάθαρση χοληστερόλης στο ήπαρ ή όπως και στην περίπτωση της LDL, ο παρατεταμένος χρόνος παραμονής στο κυκλοφορικό θα προκαλέσει τροποποίηση των συστατικών της HDL, καθιστώντας την τελικά σε δυσλειτουργική. Σε υψηλά επίπεδα HDL-C επομένως, τα δυσλειτουργικά αυτά σωματίδια της HDL παγιδεύονται στον αρτηριακό έσω χιτώνα, οδηγώντας σε συσσώρευση χοληστερόλης και τελικά σε αθηροσκλήρωση και ASCVD [16]

All-cause mortality



Εικόνα 1.13. Διαγραμματική αναπαράσταση των επιπέδων της HDL σε σχέση με κίνδυνο θνησιμότητας σε άνδρες και γυναίκες. Μελέτη Γενικού Πληθυσμού της Κοπεγχάγης.[45]

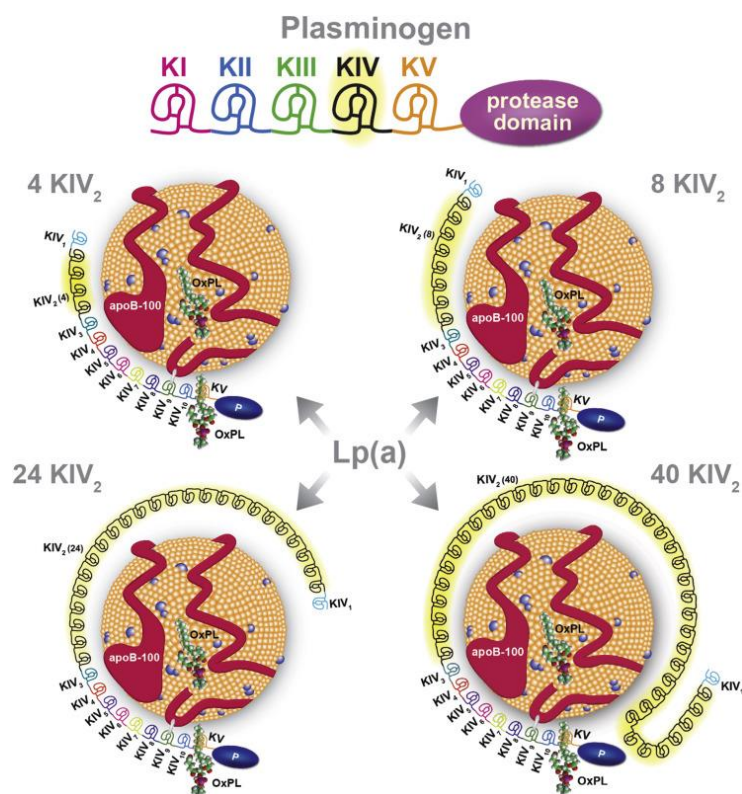
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

Lp(a) ΚΑΙ ΑΘΗΡΟΣΚΛΗΡΩΣΗ

2.1 Δομικά χαρακτηριστικά της Lp(a)

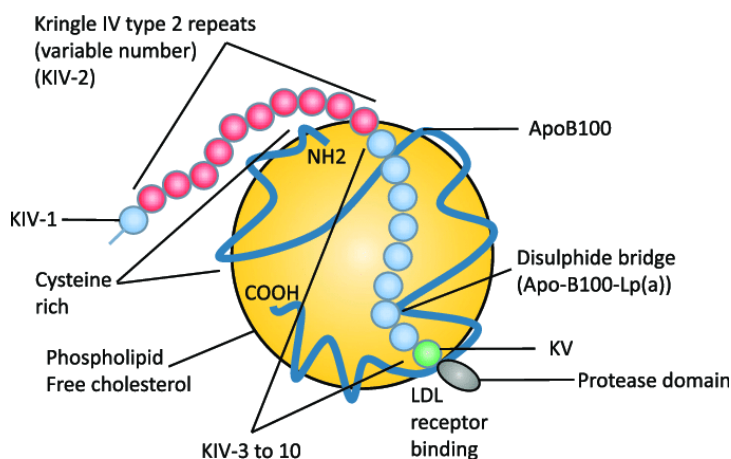
Η λιποπρωτεΐνη (α) ή Lp(a), είναι ένας καθιερωμένος και γενετικά καθορισμένος παράγοντας κινδύνου για την αθηροσκλήρωση, την στεφανιαία νόσο, το εγκεφαλικό επεισόδιο, τη θρόμβωση και τη στένωση αορτής. Η Lp(a) αποτελεί μια ιδιαίτερη λιποπρωτεΐνη καθώς εκτός από την εμπλοκή της στον μεταβολισμό των λιπιδίων μελέτες έχουν δείξει ότι συνδέεται και με το σύστημα πήξης του αίματος (16). Δομικά, η Lp(a), είναι μια λιποπρωτεΐνη που μοιάζει με την LDL η οποία περιέχει μια χαρακτηριστική υδρόφιλη απολιποπρωτεΐνη την apo (a), η οποία συνδέεται ομοιοπολικά με έναν δισουλφιδικό δεσμό με την apoB (Εικόνα 2.1). Η ομοιοπολική αυτή σύνδεση λαμβάνει χώρα κατά τη διαδικασία της δομικής συναρμολόγησης της apoB100 και της apo(a) στο κυτταρόπλασμα του ηπατοκυττάρου. Το γονίδιο LPA, που κωδικοποιεί την apo(a) εντοπίζεται στη θέση 6q27 του ανθρώπινου χρωμοσώματος, και είναι ο κύριος τόπος ο οποίος ελέγχει τις συγκεντρώσεις Lp(a), τα επίπεδα της οποίας στο πλάσμα είναι γενετικά καθορισμένα, με συγκεκριμένη με μικρές αποκλίσεις τιμή για κάθε άτομο. ~~και~~ Στον γενικό πληθυσμό κυμαίνονται από <0,1 mg/dL έως >200 mg/dL. Το γονίδιο της LPA παρουσιάζει μεγάλο βαθμό ομοιότητας με το γονίδιο του πλασμινογόνου. Το πλασμινογόνο είναι ένα προένζυμο, το οποίο μετατρέπεται από τους ενεργοποιητές του (t-PA και u-PA) σε ινωδολυτικό ένζυμο το την πλασμίνη. Δομικά το πλασμινογόνο περιέχει μια περιοχή πρωτεάσης και 5 kringle (KI έως KV, Εικόνα 2.1.) Οι περιοχές Kringle είναι δομές 80 - 90 αμινοξέων με τρεις βρόγχους χωρίς ελικοειδή δευτεροταγή δομή και με μικρές περιοχές β-κλώνων που σταθεροποιούνται σε τριτοταγή δομή η οποία οφείλεται στην παρουσία τριών δισουλφιδικών δεσμών. Η apo(a) έχει δέκα διαφορετικούς τύπους Kringle που μοιάζουν με τα Kringle τύπου IV του πλασμινογόνου, από KIV1 έως KIV10. Οι περιοχές KIV1 και KIV3 έως KIV10 είναι ίδιες σε όλες τις ισομορφές της apo(a) εκτός από την KIV2. Η apo(a) περιέχει μία ακόμη περιοχή Kringle που εμφανίζει μεγάλο βαθμό ομολογίας με την περιοχή KV του πλασμινογόνου και είναι ίδια σε όλες τις

ισομορφές της apo(a), καθώς και μία περιοχή πρωτεάσης που είναι καταλυτικώς ανενεργή εξαιτίας της αντικατάστασης των καταλοίπων ARG561-VAL562, με SER561-ILE562, ή της απουσίας 9 αμινοξέων που παρατηρείται στην περιοχή της apo(a) πρωτεάσης. Αυτές οι μεταλλάξεις έχουν ως αποτέλεσμα να μην επιτρέπουν στους ενεργοποιητές πλασμινογόνου (t-PA και u-PA) να μετατρέψουν την apo(a) - πλασμινογόνο σε πλασμίνη. Όπως αναφέραμε από τους δέκα τύπους KIV που απαντώνται στην apo(a) μόνο η KIV2 κωδικοποιείται από μεταβλητό αριθμό επαναλαμβανόμενων αντιγράφων δημιουργώντας πληθώρα αλληλίων LPA διαφορετικού μεγέθους και ισομορφών apo(a) στον ανθρώπινο πληθυσμό. Υπάρχουν αλληλία που κωδικοποιούν από ένα ως 34 αντίγραφα KIV2 ώστε να υπάρχουν ισομορφές apo(a) που περιέχουν από 10 ως 43 περιοχές KIV2, με μάζα από 200 ως 800 kDa. Έτσι, υπάρχουν ισομορφές της apo(a) διαφορετικού μεγέθους που περιγράφονται είτε ως μεγάλου μοριακού βάρους είτε ως μικρού μοριακού βάρους ισομορφές Η συγκέντρωση της Lp(a) στο πλάσμα είναι αντιστρόφως ανάλογη με το μέγεθος της ισομορφής της apo(a).



Εικόνα 2.1. Δομικά χαρακτηριστικά και ισομορφές της Lp(a). Αναπαράσταση ισομορφών apo(a) με 4, 8, 24 και 40 επαναλήψεις του KIV2, που αντιπροσωπεύουν 13, 17, 33 και 49 συνολικές επαναλήψεις KIV. Οι ισομορφές της Lp(a) που εμφανίζονται στον ανθρώπινο πληθυσμό κυμαίνονται από 1 έως >40 KIV [46].

Ο βιολογικός ρόλος των περιοχών Kringle είναι οι αλληλεπιδράσεις πρόσδεσης συνήθως με υποστρώματα που περιέχουν λυσίνη (Lys) και για το λόγο αυτό ονομάζονται σημεία πρόσδεσης λυσίνης (Lysine Binding Sites, LBS). Από τα Kringle τύπου IV της apo(a) μόνο τα KIV5-KIV8 και KIV10 περιέχουν LBS. Όλοι οι υπόλοιποι KIV τύποι έχουν ανενεργά LBS λόγω αμινοξικών αντικαταστάσεων. Τα LBS των KIV5-8 έχει αποδειχθεί ότι έχουν χαμηλότερη συγγένεια για τη λυσίνη απ' ότι το KIV10 και ονομάζονται ασθενή και ισχυρά LBS, αντίστοιχα. Η αλληλεπίδραση της apoB-100 με την apo(a), στο Lp(a) σωματίδιο, καθιστά τα LBS KIV5-8 μη διαθέσιμα με αποτέλεσμα η πρόσδεση λυσίνης στην Lp(a) να επιτελείται αποκλειστικά από το KIV10 (Εικόνα 2.2) [47].



Εικόνα 2.2 Δομή της Lp(a)

2.2 Μεταβολισμός της Lp(a).

Τα επίπεδα της Lp(a) στην κυκλοφορία καθορίζονται όπως αναφέραμε κυρίως από τον τόπο του γονιδίου LPA, χωρίς σημαντικές διατροφικές ή περιβαλλοντικές επιδράσεις [48]. Η apo(a) συντίθεται σχεδόν αποκλειστικά στο ήπαρ, τα βήματα συναρμολόγησης περιλαμβάνουν την πρόσδεση της apo(a) στην LDL, στη συνέχεια, τον σχηματισμό ενός ομοιοπολικού δισουλφιδικού δεσμού μεταξύ του KIV-9 της apo(a) και της apoB της LDL. Η Lp(a) έχει μεγαλύτερο χρόνο παραμονής στο πλάσμα από την LDL. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι η apo(a) παρεμποδίζει την πρόσδεση της apoB-LDL στον LDLR, με αποτέλεσμα τη μείωση της ικανότητας κάθαρσης μέσω του υποδοχέα LDLR και ως εκ τούτου να απαιτείται κάθαρση μέσω εναλλακτικών

οδών. Οι μηχανισμοί μέσω των οποίων η Lp(a) απομακρύνεται από το πλάσμα παραμένουν αμφιλεγόμενοι. Ο υποδοχέας LDLR πιθανότατα έχει έναν σχετικά μέτριο ρόλο κάθαρσης της Lp(a), όπως αποδεικνύεται από το γεγονός ότι οι στατίνες παρότι έχει δειχθεί ότι αυξάνουν τους υποδοχείς LDLR, δεν μειώνουν την Lp(a), ενώ οι αναστολείς της PCSK9 αυξάνουν τους LDLR, και μειώνουν τα επίπεδα της Lp(a) στο πλάσμα. Η νεφρική απέκριση, καθώς και άλλοι μηχανισμοί κάθαρσης, όπως ο SRB1 και οι υποδοχείς πλασμινογόνου, ή η πρωτεολυτική διάσπαση της apo(a), μπορεί να εμπλέκονται στους εναλλακτικούς μηχανισμούς κάθαρσης της Lp(a).

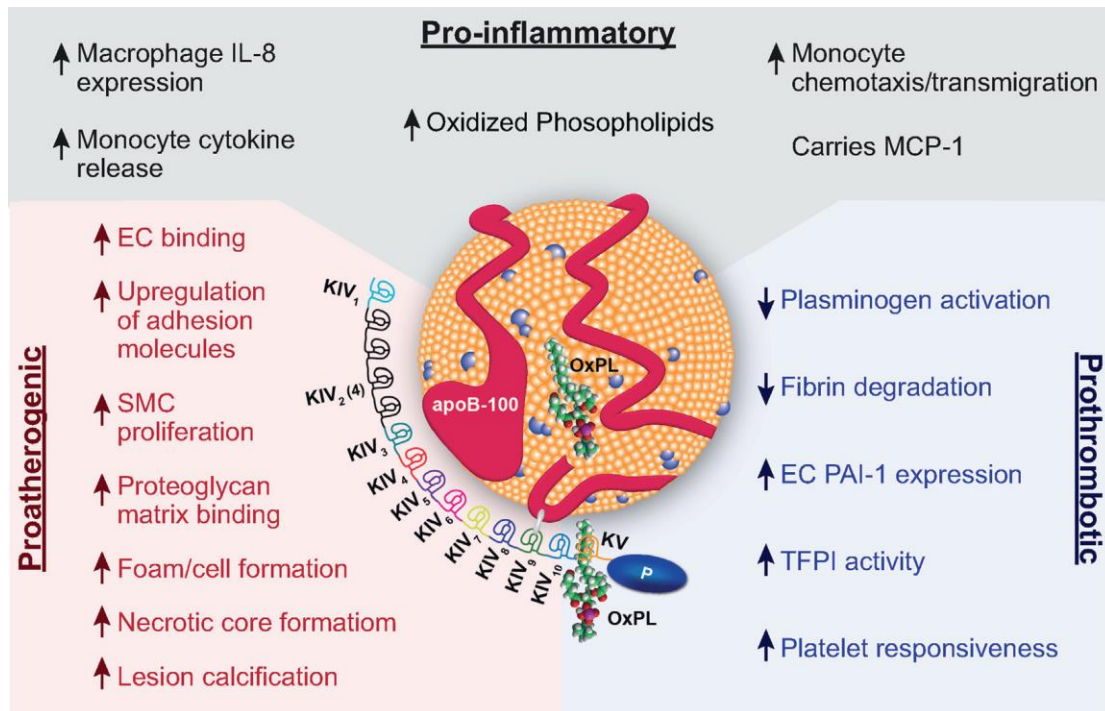
2.3 Μηχανισμοί δράσης της Lp(a) και καρδιαγγειακός κίνδυνος.

Τα αυξημένα επίπεδα Lp(a) σχετίζονται με αυξημένο κίνδυνο καρδιαγγειακών παθήσεων και του εγκεφαλικού επεισοδίου. Ο αυξημένος κίνδυνος έχει γενικά αποδοθεί στις αθηροσκληρωτικές και θρομβωτικές αντ-ινωδολυτικές ιδιότητες αυτής της λιποπρωτεΐνης ο οποίος λαμβάνει χώρα μέσω πολλαπλών μηχανισμών. Η Lp(a) όπως και η LDL μετά την είσοδό τους στο αγγειακό τοίχωμα, υφίστανται οξειδωτική τροποποίηση εκκινώντας προφλεγμονώδεις αντιδράσεις. Σε ισομοριακή βάση, η Lp(a) θεωρείται ισχυρότερος αθηρογόνος παράγοντας από την LDL, εξαιτίας της συνδεδεμένης apo(a) που φέρει. Η apo(a) συμβάλλει στην αθηρογόνο δράση της Lp(a) μέσω της ιδιότητάς της να δεσμεύει οξειδωμένα φωσφολιπίδια. Είναι γνωστό ότι τα OxPL καθώς και τα LysoPC που σχηματίζονται από τη δράση Lp-PLA₂ επάγουν φλεγμονώδεις αντιδράσεις, προκαλούν αθηροθρόμβωση και βρίσκονται σε αφθονία στις ασταθείς αθηρωματικές πλάκες. Ο κύριος λιποπρωτεϊνικός μεταφορέας των OxPL ($\approx 85\%$) του ανθρώπινου πλάσματος είναι η Lp(a), και σε μικρότερα ποσοστά είναι συνδεδεμένα τόσο με τα apo-B όσο και με τα HDL λιποπρωτεϊνικά σωματίδια. Η Lp(a), περιέχει OxPL, όπως και οι άλλες λιποπρωτεΐνες στη λιπιδική φάση του σωματιδίου καθώς και στην δέσμευσή τους με την apo(a) [49]. Η δέσμευση των OxPLs στην apo(a) λαμβάνει χώρα στην περιοχή της πρωτεάσης της apo(a) και στην περιοχή KIV10 τόσο με ομοιοπολικές όσο και με μη-ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις [50]. Ειδικότερα μελέτες έχουν δείξει ότι πολυμορφισμός SNP rs3798220, που προκαλεί την αντικατάσταση Ile (Ισολευκίνη) από Met (Μεθειονίνη) στη θέση 4399 στην περιοχή της πρωτεάσης αλλά και ο πολυμορφισμός SNP rs10455872 στο ιντρόνιο 25, συσχετίζονται με υψηλά επίπεδα OxPL στην apo(a) [51]. Επιπρόσθετα, μεταλλάξεις

στην περιοχή KIV10 της apo(a) στη θέση που εντοπίζεται το ισχυρό Lysine Binding Site (LBS), μειώνουν την ικανότητα της Lp(a) να δεσμεύει OxPLs. Ωστόσο ο ακριβής μηχανισμός αυτής της διαδικασίας παραμένει άγνωστος [51]. Τα συστατικά επομένως των OxPL που φέρει η Lp(a), είναι προφλεγμονώδη και προσδίδουν πολλές από τις προαθηρογόνες ιδιότητες της. Μελέτες έδειξαν ότι τα αυξημένα επίπεδα OxPL στις apoB (OxPL/apoB) αποτελούν προγνωστικό δείκτη θανάτου, εμφράγματος του μυοκαρδίου και αγγειακού εγκεφαλικού επεισοδίου [52]. Επιπρόσθετα, κλινικές μελέτες έδειξαν ότι τα επίπεδα των OxPL που περιέχονται σε σωματίδια apoB (OxPL-apoB), συσχετίζονται σημαντικά με την περιεκτικότητα των OxPL που φέρει η Lp(a). Γεγονός που καταδεικνύει ότι τα αυξημένα επίπεδα OxPL-apoB ίσως ισότιμος ή και καλύτερος δείκτης πρόγνωσης καρδιακών και καρδιαγγειακών παθήσεων. Τα OxPLs ενεργοποιούν ένα μεγάλο αριθμό μορίων που εμπλέκονται στη διαδικασία της αθηροσκλήρωσης, όπως οι μεταγραφικοί παράγοντες Peroxisome Proliferator Activator Receptor γ (PPAR- γ) και ο ηπατικός X υποδοχέας α (LXR- α). Ο PPAR- γ και ο LXR- α αυξάνουν την έκφραση των Scavenger υποδοχέων των μακροφάγων επομένως προάγουν τη δημιουργία αφρωδών κυττάρων στα τοιχώματα των αγγείων και επίσης αυξάνουν την ικανότητα της πρωτεΐνης ATP binding cassette 1 (ABCA1) να δέχεται χοληστερόλη [53]

Η Lp(a) παρουσιάζει υψηλότερη συγγένεια σύνδεσης για το αγγειακό τοίχωμα, με τις πρωτεογλυκάνες και την ινωδονεκτίνη στην επιφάνεια των ενδοθηλιακών κυττάρων σε σύγκριση με τις άλλες λιποπρωτεΐνες που περιέχουν apo B. Η apo(a) περιέχει θέσεις δέσμευσης λυσίνης που της επιτρέπουν να δεσμεύεται στενά σε εκτεθειμένες επιφάνειες του ενδοθηλίου, και αυτό οδηγεί στη συσσώρευση Lp(a) στον αρτηριακό έσω χιτώνα, γεγονός που οδηγεί σε φλεγμονή και ως εκ τούτου στην ανάπτυξη αθηροσκληρωτικών αλλοιώσεων. Η Lp(a) συμβάλλει με τη δέσμευσή της στο αρτηριακό τοίχωμα στη δυσλειτουργία του ενδοθηλίου μέσω μιας διαδικασίας μετασχηματισμού του κυτταροσκελετού, η οποία οφείλεται στην αλληλεπίδραση της Lp(a) με την ακτίνη και τη μυοσίνη. Επιπλέον, η Lp(a) προκαλεί αναστολή της έκφρασης της συνθάσης του μονοξειδίου του αζώτου (eNOs). Ακόμη, η Lp(a) προκαλεί αύξηση της διαπερατότητας του ενδοθηλίου που έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της εναπόθεσης σωματιδίων LDL και Lp(a) στο αρτηριακό τοίχωμα [50], [51]. Αξίζει να σημειωθεί ότι η Lp(a) συμβάλλει στη δυσλειτουργία του ενδοθηλίου και μέσω της απορρύθμισης των ελαφρών αλυσίδων της μυοσίνης μέσω του Rho/Rho kinase

μονοπατιού σηματοδότησης ή ακόμα και με τη διαταραχή της ομοιοστασίας του ασβεστίου το οποίο έχει ως αποτέλεσμα την αυξημένη παραγωγή αλκαλικής φωσφατάσης και της πρωτεΐνης Matrix gla protein (MGP) καθώς και μειωμένη έκφραση οστεοποντίνης [50]. Το δυσλειτουργικό ενδοθήλιο έχει ως αποτέλεσμα την αυξημένη παραγωγή ελευθέρων ριζών που με τη σειρά τους συμβάλλουν στην οξειδωτική τροποποίηση των λιποπρωτεϊνών. Τα φλεγμονώδη μόρια διαδραματίζουν καθοριστικό ρόλο στη δημιουργία και στην αύξηση των αθηροσκληρωτικών περιοχών. Όταν το αγγειακό τοίχωμα υποστεί βλάβη, τα ενδοθηλιακά κύτταρα εκκρίνουν χημειοτακτικούς παράγοντες όπως ο MCP-1, οι οποίοι προκαλούν τη μετανάστευση μονοκυττάρων και τη διαφοροποίηση τους σε μακροφάγα. Τα ενεργοποιημένα μακροφάγα εκκρίνουν τις κυτταροκίνες IL-1β, IL-6, IL-8 και TNFα που είναι κατεξοχήν φλεγμονώδη μόρια τα οποία συμβάλλουν στην επιτάχυνση της αθηρωματικής βλάβης και την ασβεστοποίηση των στεφανιαίων αγγείων και της αορτικής βαλβίδας. Πειραματικά μοντέλα έχουν δείξει ότι η Lp(a) επάγει την έκφραση μορίων προσκόλλησης (ICAM, VCAM και E-Selectin), καθώς και την αύξηση της σύνθεσης των προσταγλανδινών [54]. Τα μακροφάγα προσλάβουν την Lp(a), οδηγώντας στον σχηματισμό αφρωδών κυττάρων, η οποία αποτελεί χαρακτηριστικό γνώρισμα της πρώιμης αθηροσκλήρωσης. Άλλοι μηχανισμοί με τους οποίους η Lp(a) συμβάλλει στην αθηρογένεση και στην εμφάνιση της καρδιαγγειακής νόσου είναι είτε μέσω της δημιουργίας ενός θρομβωτικού περιβάλλοντος με την πρόσδεσή της στον TFPI (Tissue Factor Pathway Inhibitor) ή μέσω της αλληλεπίδρασης της apo(a) με τους υποδοχείς του πλασμινογόνου με αποτέλεσμα τη μειωμένη παραγωγή πλασμίνης. Ειδικότερα, λόγω της δομής της, η Lp(a) όπως αναφέραμε οδηγεί σε μειωμένη ινωδόλυση καθώς ανταγωνίζεται το πλασμινογόνο για την ειδική θέση σύνδεσής του, παρεμβαίνοντας έτσι στη λειτουργία του με αποτέλεσμα τη μείωση της ινωδόλυσης. Η θρομβογένεση διεγείρεται επίσης από την Lp(a), καθώς οδηγεί σε αυξημένο αναστολέα του ενεργοποιητή πλασμινογόνου-1. Τα επίπεδα της Lp(a) στο πλάσμα καθορίζονται γενετικά και οι πολυμορφισμοί του γονιδίου Lp(a) οδηγούν γενικά σε εξαιρετικά μεταβλητά επίπεδα Lp(a) εντός του πληθυσμού, που κυμαίνονται από <1 mg/dL έως >1000 mg/dL. Οι ισομορφές χαμηλού μοριακού βάρους πιστεύεται ότι αποτελούν σημαντική αιτία καρδιαγγειακών παθήσεων σε σύγκριση με τις ισομορφές υψηλού μοριακού βάρους. Οι ασθενείς με επίπεδα Lp(a) >50 mg/dL θεωρούνται ότι έχουν αυξημένο κίνδυνο καρδιακών παθήσεων.



Εικόνα 2.2. Αθηρογενετικοί μηχανισμοί δράσης της Lp(a). Η αθηρογενετική δράση της Lp(a) μπορεί να ταξινομηθεί ως προαθηρογόνος, προφλεγμονώδης και αντινωδολυτική [46]

2.4 Αλληλεπίδραση μεταξύ Lp(a) και HDL

Οι μελέτες που εξετάζουν την αλληλεπίδραση μεταξύ Lp(a) και HDL είναι ελάχιστες. Η αλληλεπίδραση μεταξύ Lp(a) και HDL μπορεί να είναι κλινικά σημαντική, καθώς έχει προταθεί ότι αυτά τα δύο λιποπρωτεϊνικά σωματίδια μπορεί να μοιράζονται μια κοινή μεταβολική οδό. Η Lp(a) μπορεί να προκαλέσει τον μετασχηματισμό της HDL σε μια δυσλειτουργική παραλλαγή, η οποία μπορεί να επηρεάσει τις ευεργετικές της ιδιότητες [55]. Επιπλέον, έχει αποδειχθεί σε μελέτες για τον μεταβολισμό της Lp(a) σε ποντίκια ότι τόσο η Lp(a) όσο και η HDL συνδέονται με τον υποδοχέα SR-BI [56]. Ορισμένες μελέτες έδειξαν θετική συσχέτιση μεταξύ της Lp(a) και της HDL-C ορού [57], [58]. Σε κλινική μελέτη με ασθενείς που είχαν υποβληθεί σε στεφανιαία αγγειογραφία, οι ασθενείς με επίπεδα Lp(a) ≥ 30 mg/dL εμφάνισαν στατιστικά υψηλότερα επίπεδα HDL σε σύγκριση με αυτούς που είχαν Lp(a) < 30 mg/dL [58]. Επιπλέον, ισχυρή συσχέτιση εμφανίσθηκε μεταξύ υψηλών επιπέδων Lp(a) και στεφανιαίας νόσου σε ασθενείς με υψηλά επίπεδα HDL. Οι ασθενείς με αυξημένη Lp(a) είχαν σημαντικά υψηλότερο κίνδυνο εμφάνισης

στεφανιαίας νόσου, ακόμη και παρουσία αυξημένων επιπέδων HDL στον ορό, γεγονός που υποδηλώνει ότι η αυξημένη Lp(a) μπορεί να μειώνει τα προστατευτικά χαρακτηριστικά της HDL [58]. Αυτό θα μπορούσε να εξηγηθεί από την υψηλή συστηματική και αγγειακή φλεγμονή που προκαλείται από την αυξημένη Lp(a), η οποία οδηγεί στον μετασχηματισμό της HDL σε μια δυσλειτουργική μορφή, εξαλείφοντας τις προστατευτικές της επιδράσεις έναντι της αθηροσκλήρωσης [58]. Μελέτες αξιολόγησης της σχέσεις μεταξύ των Lp(a), TG και HDL, ανέφεραν ότι η σχέση μεταξύ Lp(a) και HDL ποικίλλει ανάλογα με τα επίπεδα TG. Σε υψηλά επίπεδα TG, η Lp(a) έδειξε ισχυρή συσχέτιση με το λόγο των κλασμάτων HDL2/HDL3 ($p = 0,0004$), με την VLDL ($p = 0,009$) και με τα TG ($p = 0,02$), γεγονός που υποδηλώνει ότι η Lp(a), η VLDL, τα TG και η HDL μπορεί να μοιράζονται κοινές μεταβολικές οδούς σε υψηλά επίπεδα TG [59]. Δεν παρατηρήθηκε ωστόσο τέτοια σχέση σε χαμηλά επίπεδα TG. Επιπρόσθετα, σε μια μελέτη σε παχύσαρκα αфроαμερικανικά παιδιά ηλικίας 9-11 ετών, παρατηρήθηκε θετική συσχέτιση μεταξύ της Lp(a) και της HDL-C ($r = 0,462$; $p < 0,001$) [58]. Αυτές οι διάφορες αλληλεπιδράσεις μεταξύ της Lp(a) και της HDL είναι σημαντικές, καθώς μπορούν να βοηθήσουν στον καλύτερο έλεγχο του καρδιαγγειακού κινδύνου. Ωστόσο, απαιτείται περαιτέρω έρευνα για την πλήρη κατανόηση αυτής της σχέσης [60].

Στην παρούσα μελέτη εξετάσουμε κατά πόσο μεταβάλλονται τα χαρακτηριστικά και η ποιότητα της HDL σε άτομα με πολύ υψηλά επίπεδα Lp(a).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3:

ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

3.1 Πληθυσμός της μελέτης

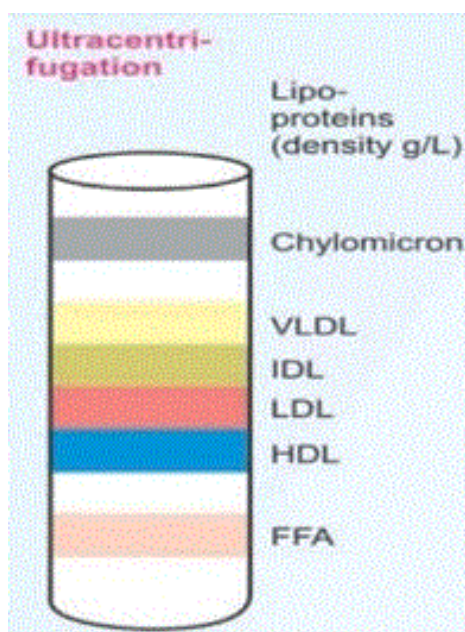
Στη μελέτη μας συμμετείχαν 20 ασθενείς, μέσης ηλικίας 46 ± 15 , με αυξημένα επίπεδα Lp(a) (>50 mg/dL) και αποτέλεσαν την ομάδα Lp(a), καθώς και 10 υγιείς εθελοντές, μέσης ηλικίας 51 ± 10 με επίπεδα Lp(a) <10 mg/dL, οι οποίοι αποτέλεσαν την ομάδα ελέγχου. Ασθενείς και εθελοντές που χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη μας επισκέφθηκαν και παρακολούθηθηκαν από την Εξωτερική Κλινική Λιπιδίων του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων. Όλοι οι συμμετέχοντες στη μελέτη ήταν Καυκάσιας καταγωγής και σύμφωνα με τις οδηγίες δεν είχαν λάβει προηγούμενη θεραπεία. Το πρωτόκολλο της μελέτης εγκρίθηκε από την Τοπική Επιτροπή Δεοντολογίας του Ιδρύματος και ελήφθη η συγκατάθεση από κάθε ασθενή. Η μελέτη διεξήχθη σύμφωνα με τις οδηγίες της Διακήρυξης του Ελσίνκι και εγκρίθηκε από την Επιτροπή Δεοντολογίας του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Ιωαννίνων, Ελλάδα (896/21-12-2020). Σε όλους τους συμμετέχοντες των ομάδων καταγράφηκαν οι κλασικοί παράγοντες κινδύνου. Μια πλήρης αξιολόγηση του κλινικού και εργαστηριακού προφίλ πραγματοποιήθηκε κατά την επίσκεψη, τα δημογραφικά και κλινικά χαρακτηριστικά περιλάμβαναν: φύλο, ηλικία, ιστορικό καπνίσματος, συνοδά νοσήματα με ιδιαίτερη έμφαση στην αθηροσκληρωτική καρδιαγγειακή νόσο (ASCVD), δείκτη μάζας σώματος (BMI) και αρτηριακή πίεση (BP). Δείγματα φλεβικού αίματος ελήφθησαν τόσο σε αποστειρωμένους σωλήνες Vacutainer-SST II advance (Becton-Dickinson, Plymouth, Ηνωμένο Βασίλειο) όσο και σε vacutainer που περιείχε EDTA καλίου, το πρωί μετά από 12 ώρες νηστείας. Τα δείγματα ορού και πλάσματος αποθηκεύτηκαν στους -80°C . Οι συγκεντρώσεις ολικής χοληστερόλης (TC), τριγλυκεριδίων (TG), HDL-C και Lp(a) στον ορό, προσδιορίστηκαν από το Βιοχημικό Εργαστήριο του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Ιωαννίνων. Η LDL-C υπολογίστηκε χρησιμοποιώντας τον τύπο Friedewald, υπό την προϋπόθεση ότι τα επίπεδα τριγλυκεριδίων ήταν <400 mg/dL ($4,5$ mmol/L). Τα κλινικά και βιοχημικά

χαρακτηριστικά του πληθυσμού της μελέτης απεικονίζονται στον πίνακα 1 στο κεφάλαιο των αποτελεσμάτων.

3.2 Απομόνωση λιποπρωτεϊνών με διαδοχικές υπερφυγοκεντρήσεις

Αρχή της μεθόδου. 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 (Εικόνα 3.1). 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: $d = 1.063 - 1.210 \text{ g/mL}$



Εικόνα 3.1 Απεικόνιση στοιβάδων κατά την υπερφυγοκέντρωση

Αντιδραστήρια – όργανα

- Αντιβιοτικό Πενικιλίνη/Στεπτομυκίνη

- Titriplex III (Merck)
- KBr (Merck). Ξηραίνεται στους 100 °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)
- Μεμβράνη 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 μM (Corning)

Διαλύματα εργασίας

- **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.

Πειραματική πορεία

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.

1η Υπερφυγοκέντρηση - 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 φυγοκέντρηση είτε στα 40000 rpm για 10 ώρες στους 14 °C είτε στα 45000 rpm για 8 ώρες στους 14 °C. Μετά το πέρας της 1ης υπερφυγοκέντρησης, 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.

2η Υπερφυγοκέντρηση - Απομόνωση LDL.

Αφού μετρηθεί ο όγκος του πλάσματος της 1ης υπερφυγοκέντρησης 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 υπερφυγονκέντρου, όπου πραγματοποιείται φυγοκέντρωση όπως περιεγράφηκε παραπάνω. Μετά το πέρας της 2ης υπερφυγοκέντρωσης, η LDL έχει συγκεντρωθεί στην πάνω επιφάνεια του σωλήνα διαχωρισμένη από τα υπόλοιπα συστατικά του πλάσματος και, έτσι, απομονώνεται προσεκτικά με μια σύριγγα.

3η 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 3ης 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.

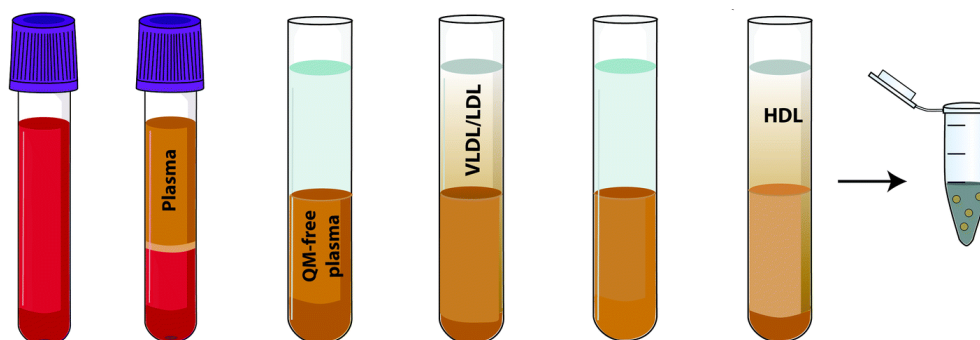
4η Υπερφυγοκέντρωση – Έκπλυση της HDL.

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 της LDL και της HDL.

Μετά την απομόνωση των LDL και HDL, πραγματοποιείται διαπίδυση αυτών, ώστε να απομακρυνθεί το EDTA, ώστε να μην δεσμεύσει τον χαλκό που χρησιμοποιείται κατά την οξειδωση, 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 50 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. Ακολουθεί μέτρηση της πρωτεΐνης των κλασμάτων με τη μέθοδο BCA.

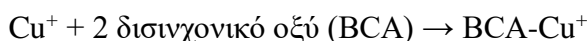


Εικόνα 3.2 Απεικόνιση βημάτων για την απομόνωση της HDL

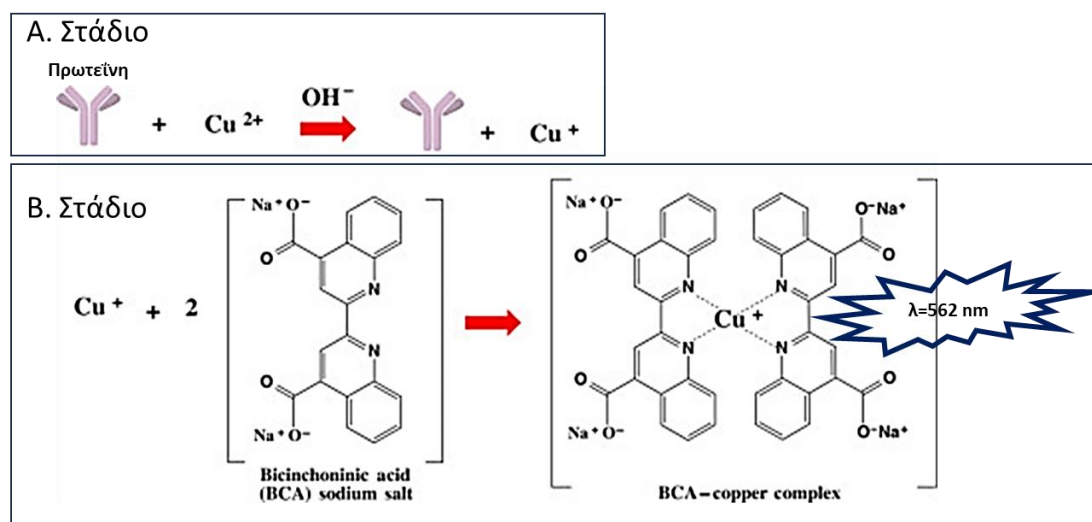
3.3 Προσδιορισμός πρωτεΐνης με την μέθοδο BCA

Αρχή της μεθόδου. 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 δικινchonινικού οξέος, σύμφωνα με την παρακάτω αντίδραση, το προϊόν της οποίας απορροφά στα 562 nm (Εικόνα 3.3).

Πρωτεΐνη (πεπτιδικοί δεσμοί) + Cu^{2+} → Τετραηλικό σύμπλοκο πρωτεΐνης- Cu^+



Ε



Εικόνα 3.3 Απεικόνιση των σταδίων και των αντιδράσεων του προσδιορισμού πρωτεΐνης με τη μέθοδο BCA.

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

- **Αντιδραστήριο A:** Μείγμα ανθρακικού νατρίου, διττανθρακικού νατρίου, δικινchonινικού 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 (Orange)
- Μετρητής microELISA (TECAN Infinite 200Pro)

Διαλύματα εργασίας

- **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 αραιώση 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 °C.

Πειραματική πορεία

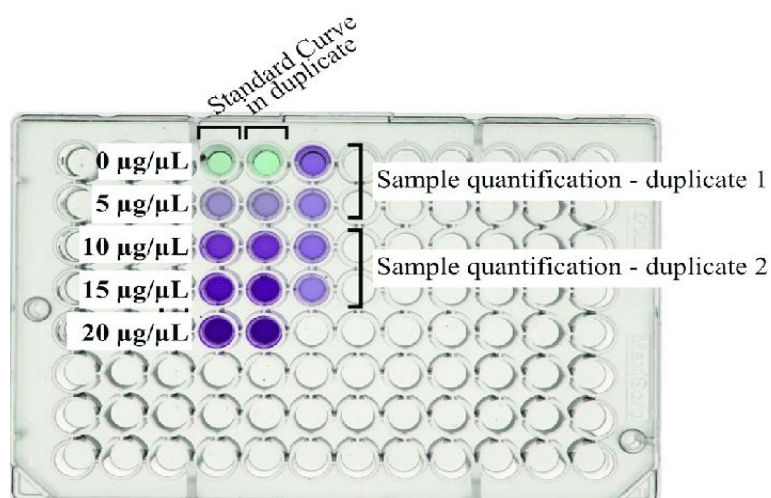
Σε πλακίδιο ELISA 96 θέσεων τοποθετούνται 20 μl από κάθε πρότυπο διάλυμα BSA (πρότυπη καμπύλη), καθώς και 20 μl του κάθε δείγματος προς ανάλυση. Στη συνέχεια, προστίθενται 200 μl του διαλύματος εργασίας σε κάθε θέση του μικροπλακιδίου (Εικόνα 3.4). Το πλακίδιο καλύπτεται με αυτοκόλλητη μεμβράνη, ανακινείται ήπια και επωάζεται στους 37 °C για 30 λεπτά. Έπειτα, εισάγεται στον μετρητή microELISA όπου καταγράφεται η απορρόφηση στα 562 nm.

Επεξεργασία των αποτελεσμάτων

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.

$$\text{Απορρόφηση} = a \times \text{συγκέντρωση} + b$$

Από την εξίσωση της πρότυπης καμπύλης και από τις απορροφήσεις των δειγμάτων υπολογίζονται τα mg/ml πρωτεΐνης που περιέχουν τα δείγματα.



Εικόνα 3.4 Απεικόνιση επιθυμητού αποτελέσματος διαδικασίας BCA

3.4 Οξειδωτική τροποποίηση των HDL και LDL με ιόντα Cu^{2+}

Αρχή της μεθόδου.

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. Η οξείδωση χωρίζεται σε τρεις φάσεις, αρχικά είναι η λανθάνουσα φάση κατά την οποία παρατηρείται μικρή οξείδωση, έπειτα ακολουθεί η εκθετική φάση ή φάση διάδοσης στην οποία λαμβάνουν χώρα αλυσιδωτές αντιδράσεις με αποτέλεσμα την αύξηση του ρυθμού οξείδωσης. Τελευταία στην σειρά είναι η φάση αποικοδόμησης η φάση τερματισμού κατά την οποία εμφανίζεται πλατώ στη συγκέντρωση των διενίων και η οξείδωση σταματάει (Εικόνα 3.5). Η οξείδωση παρακολουθείται στα 234 nm, στους 37 °C, περιοχή που απορροφούν τα συζυγή διένια και τα οποία σχηματίζονται κατά την υπεροξειδωση των ενδογενών πολυακόρεστων λιπαρών οξέων που περιέχουν οι λιποπρωτεΐνες. Η καταγραφή των τιμών απορρόφησης γίνεται με κινητική σε μετρητή microELISA ανά 10 λεπτά για 4-6 ώρες. Η καμπύλη απορρόφησης/χρόνου είναι σιγμοειδούς μορφής. (Εικόνα 3.5)

Αντιδραστήρια – όργανα

- 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)
- Μεμβράνη διαπίδυσης (Sigma): Η μεμβράνη ενεργοποιείται σε PBS για 3 ώρες και κατακρατά οποιοδήποτε σωματίδιο με μοριακό βάρος μεγαλύτερο από 12kDa
- Πλακίδιο ELISA 96 θέσεων (Costar UV-transparent microplate)
- Μετρητής microELISA (TECAN Infinite 200Pro)

Διαλύματα εργασίας

- Ρυθμιστικό διάλυμα 10 mM PBS, pH 7.4
- Διάλυμα 10% EDTA, pH 7.0

- Διάλυμα 20 mM CuSO₄: 0.4993g CuSO₄ διαλύονται σε 100 ml dH₂O, δίνοντας διάλυμα 20 mM CuSO₄. Το διάλυμα διατηρείται στους 4 °C.
- Διάλυμα 0.2 mM CuSO₄: Το διάλυμα αυτό προκύπτει από το διάλυμα 20 mM CuSO₄ με αραιώση 1:100. Το διάλυμα διατηρείται στους 4 °C.

Πειραματική πορεία

Οξείδωση των LDL και HDL

Η οξείδωση λαμβάνει χώρα σε πηγαδάκια μικροπλακιδίων (UV microplate costar) συνολικού όγκου αντίδρασης 250 μl. Προσθέτουμε σε τελικές συγκεντρώσεις:

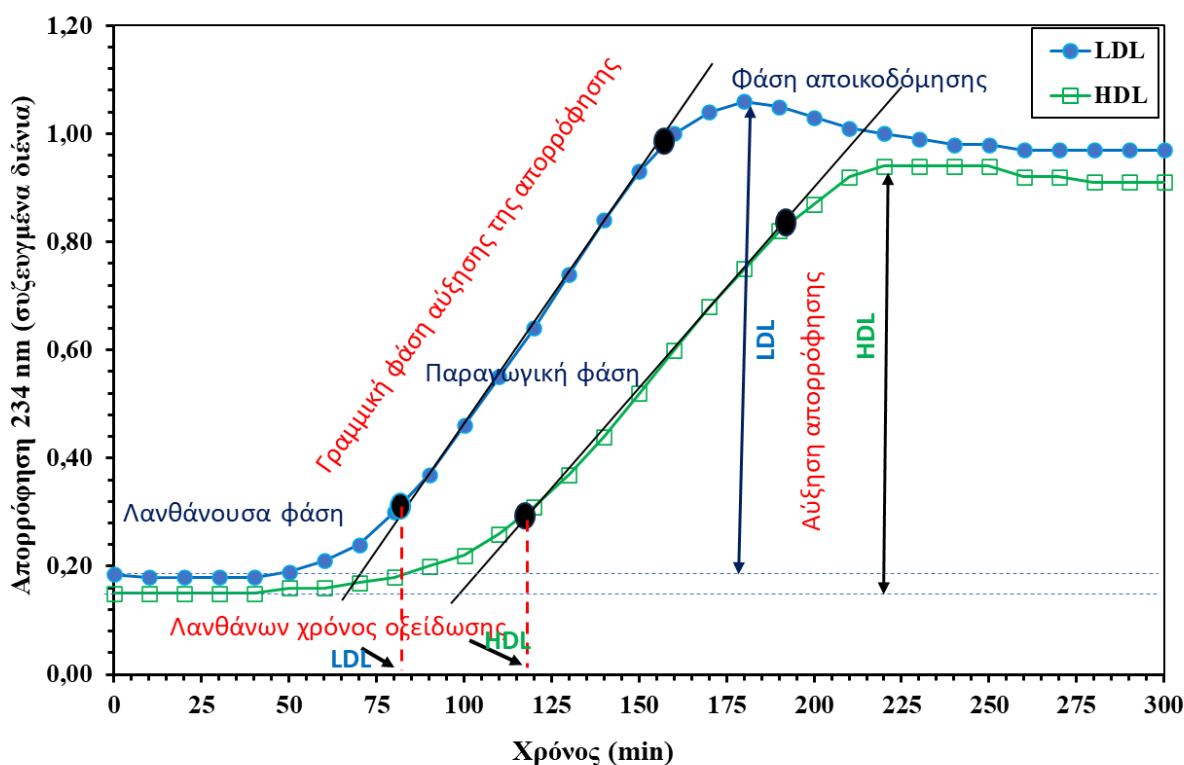
1. Δείγματα λιποπρωτεϊνικών κλασμάτων (LDL, HDL ή κλάσματος LDL/HDL) τελικής περιεκτικότητας 100 μg πρωτεΐνης/ml. καταλληλη ποσότητα λιποπρωτεΐνης
2. Ρυθμιστικό διάλυμα 10 mM PBS pH 7.4.
3. Έναρξη της οξείδωσης γίνεται με την προσθήκη 12,5 μl του διαλύματος 200μM CuSO₄ ώστε για τελικό όγκο 250μl να προκύψει τελική συγκέντρωση 10μM CuSO₄. Ακολουθεί ανάδευση και στη συνέχεια, το πλακίδιο τοποθετείται στη θέση του μετρητή microELISA. Η οξείδωση με καταγραφή της σιγμοειδούς καμπύλης παραγωγής των συζυγών διενίων παρακολουθείται στα 234nm ανά 10min και για 4-6 ώρες στους 37 °C. Ο έλεγχος της ευαισθησίας στην οξείδωση των δειγμάτων LDL και HDL των ομάδων μελέτης ή η μελέτη της αντιοξειδωτικής δράσης διαφόρων ουσιών γίνεται με προσαρμογή στις τελικές συγκεντρώσεις με την ανωτέρω μέθοδο.

Τερματισμός της οξείδωσης

Η οξείδωση των LDL και HDL σταματά με την προσθήκη 5 μl 10% EDTA pH 7.0, 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 της ευαισθησίας στην οξείδωση

Ο προσδιορισμός της ευαισθησίας των κλασμάτων στην οξείδωση, ή της αντιοξειδωτικής δράσης ουσιών γίνεται με την αξιολόγηση των παραμέτρων της σιγμοειδούς καμπύλης οξείδωσης [61] όπως παρουσιάζονται στην Εικόνα 3.5.



Εικόνα 3.5 Αντιπροσωπευτική καμπύλη οξείδωσης με Cu^{2+} των λιποπρωτεϊνικών κλασμάτων HDL και LDL αντίστοιχα. Στη σιγμοειδή καμπύλη οξείδωσης της LDL και της HDL παρουσιάζονται α) οι φάσεις της οξείδωσης και β) οι παράμετροι υπολογισμού της ευαισθησίας των κλασμάτων στην οξείδωση, ήτοι: 1. λανθάνων χρόνος οξείδωσης [oxidation lag time, (min)], 2. αύξηση της απορρόφησης [absorbance increase, (A 234 nm)], και 3) κλίση της γραμμικής καμπύλης οξείδωσης [slope of oxidation curve, (degree)].

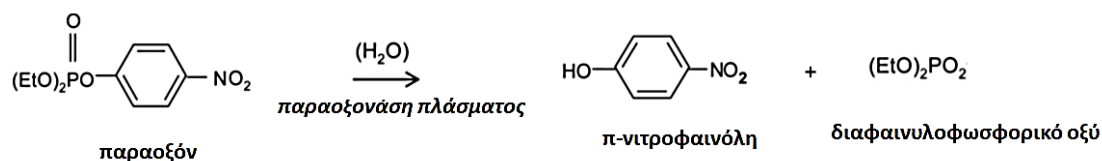
3.5 Προσδιορισμός ενεργοτήτων παραοξονάσης και αρυλεστεράσης του ενζύμου παραοξονάση 1 (PON1)

Αρχή της μεθόδου

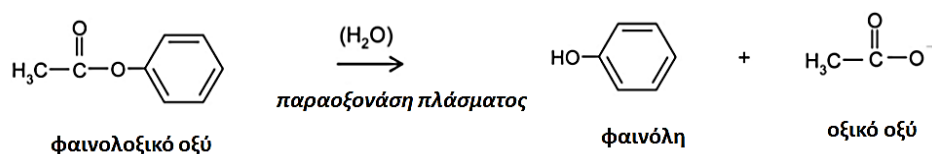
Το παραοξόν και το φαινολοξικό οξύ αποτελούν υποστρώματα της PON1 σύμφωνα με την παρακάτω αντίδραση (Εικόνα 3.6). Η ενεργότητα της PON1 προσδιορίζεται έχοντας ως υπόστρωμα είτε το πάραξον (ενεργότητα παραοξονάσης) είτε το φαινολοξικό (ενεργότητα αρυλεστεράσης) [62]. Ο ρυθμός υδρόλυσης του παραοξόν προκύπτει από την καταγραφή της αύξησης της απορρόφησης στα 412 nm στους 25 C για 1.5min στο φασματοφωτόμετρο. Ο ρυθμός υδρόλυσης του

φαινολοξικού προκύπτει από την καταγραφή της αύξησης της απορρόφησης στα 270 nm στους 25 C για 1.5 min

[A]



[B]



Εικόνα 3.6 Ενζυμικές αντιδράσεις της PON1. [A] με υπόστρωμα παραοξόν και [B] με φαινολοξικό οξύ [63]

Αντιδραστήρια-Όργανα

- Μετρητής microELISA (TECAN Infinite 200Pro)
- Παραοξόν (Διαιθυλ-π-νιτροφαινυλοφωσφορικό οξύ Sigma)
- Φαινολοξικό οξύ (Aldrich)
- Χλωριούχο ασβέστιο (Sigma)
- Tris-HCl (Sigma)
- Πλακίδιο ELISA 96 θέσεων (Costar)
- Πλακίδιο ELISA UV 96 θέσεων (Costar)
- Οκτακάναλη πολυπιπέτα μεταβαλλόμενου όγκου 20-200μl

Διαλύματα εργασίας

- Ρυθμιστικό διάλυμα μέτρησης ενεργότητας PON1 έναντι παραοξόν (ενεργότητα παραξονάσης). Περιέχει 100 mM Tris-HCl και 2 mM CaCl₂. Το pH του διαλύματος ρυθμίζεται στο 8.0 Διατηρείται στους 4 °C
- Ρυθμιστικό διάλυμα εργασίας παραξονάσης. Το διάλυμα προκύπτει με την ανάμιξη κατάλληλου όγκου ρυθμιστικού διαλύματος μέτρησης ενεργότητας PON1 έναντι παραοξόν με το αντίστοιχο όγκο παραοξόν, ώστε η συγκέντρωσή

του να είναι 6.11 mM. Συγκεκριμένα 14.5 μl παραοξον προστίθενται σε 10 ml ρυθμιστικού διαλύματος μέτρησης ενεργότητας PON1 έναντι παραοξόν.

- Ρυθμιστικό διάλυμα μέτρησης ενεργότητας PON1 έναντι φαινολοξικού (ενεργότητα αρυλεστεράσης). Περιέχει 20 mM Tris-HCl και 2 mM CaCl₂. Το pH του διαλύματος ρυθμίζεται στο 8.0 Διατηρείται στους 4 °C
- Ρυθμιστικό διάλυμα εργασίας αρυλεστεράσης. Το διάλυμα προκύπτει από την προσθήκη 1.6 μl φαινολοξικού οξέος σε 10 ml ρυθμιστικού διαλύματος μέτρησης ενεργότητας PON1 έναντι φαινολοξικού.

Πειραματική διαδικασία

Η ενεργότητα της PON1 προσδιορίζεται έχοντας ως υπόστρωμα είτε το πάραοξον (ενεργότητα παραοξονάσης) είτε το φαινοξικό οξύ (ενεργότητας αρυλεστεράσης). Ο ρυθμός υδρ'όλυσης του παραοξον προκύπτει από την καταγραφή της αύξησης της απορρόφησης στα 412nm στους 25 °C για 1.5 min στο φασματοφωτόμετρο. Ο τελικός όγκος, στον οποίο γίνεται η μέτρηση, είναι 250 μl, τα οποία περιέχουν 25μl ορού και 225μl ρυθμιστικού διαλύματος εργασίας παραοξονάσης. Η τελική συγκέντρωση του παραοξον στο μίγμα της αντίδρασης είναι 5.5 mM. Στη συνέχεια υπολογίζεται η ποσότητα της p-νιτροφαινόλης που σχηματίστηκε χρησιμοποιώντας το συντελεστή μοριακής απόσβεσης 17,000 (mol/l)⁻¹ cm⁻¹. Η ενεργότητα της παραοξονάσης εκφράζεται σε U/L ορού, ορίζοντας το 1U (διεθνής μονάδα ενεργότητας) ως την ενεργότητα που καταλύει το σχηματισμό 1 μmol p-νιτροφαινόλης στο λεπτό.

Η μέτρηση της ενεργότητας της αρυλεστεράσης γίνεται επίσης σε τελικό όγκο 250μl, ο οποίος περιέχει 50μl αραιωμένου ορού (1/100 v/v σε ρυθμιστικό διάλυμα αρυλεστεράσης), και 200μl ρυθμιστικού διαλύματος εργασίας αρυλεστεράσης. Η τελική συγκέντρωση του φαινολοξικού οξέος στο μίγμα της αντίδρασης είναι 1 mM. Ο ρυθμός υδρόλυσης του φαινολοξικού προκύπτει από την καταγραφή της αύξησης της απορρόφησης στα 270 nm στους 25 °C για 1.5 min. Η ενεργότητα αρυλεστεράσης υπολογίζεται χρησιμοποιώντας το συντελεστή μοριακής απόσβεσης 1310 (mol/l)⁻¹ cm⁻¹ και εκφράζεται σε U/ml όπου 1U ορίζεται το 1μmol του φαινολοξικού που υδρολύεται στο λεπτό.

3.3 Ηλεκτροφόρηση λιποπρωτεϊνών ορού με το Lipoprint System

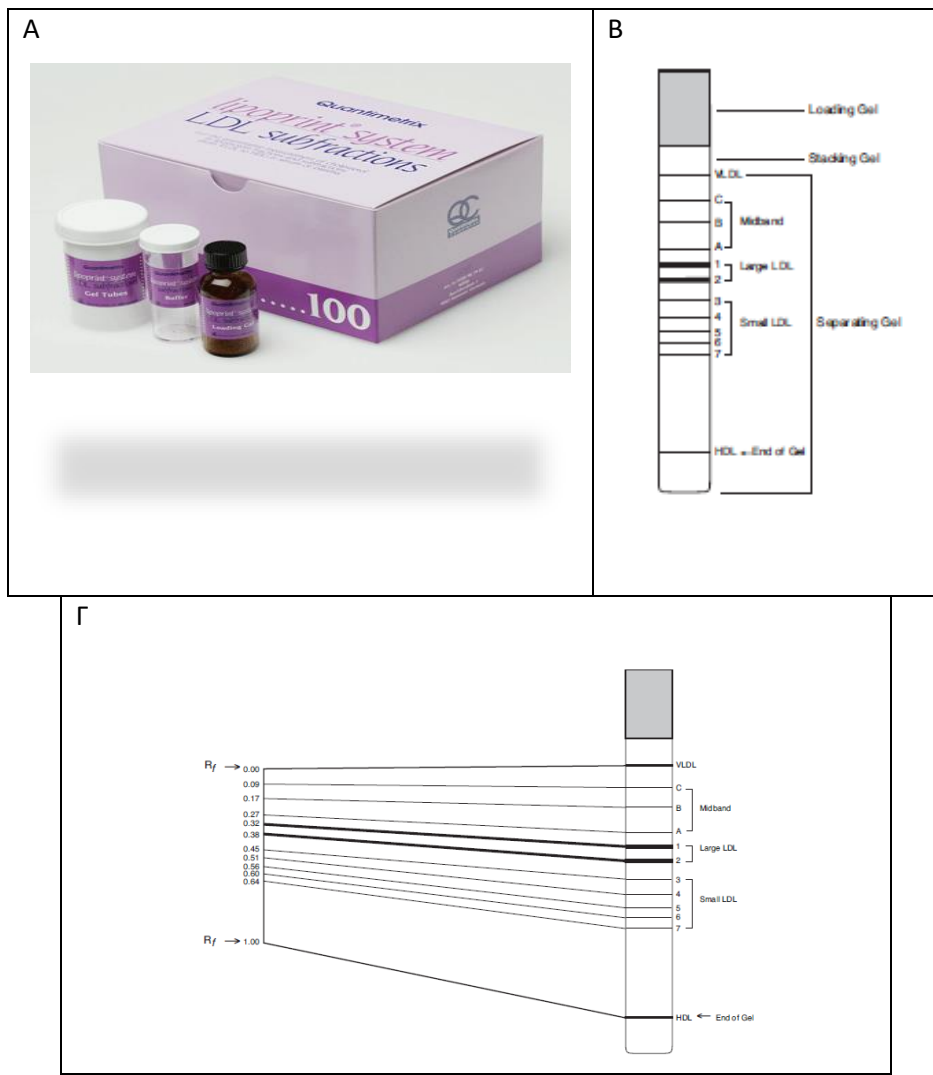
3.3.1 Ηλεκτροφόρηση και κατανομή των σωματιδίων της LDL ορού σε υποκλάσματα.

Αρχή της μεθόδου

Το σύστημα Quantimetrix Lipoprint "Lipoprint LDL Kit" ηλεκτροφόρησης υποκλασμάτων της LDL είναι μια συσκευή ποσοτικοποίησης και κατανομής των σωματιδίων της LDL στον ορό ή πλάσμα με συγκέντρωση ολικής χοληστερόλης >100 mg/dL. Οι μετρήσεις αυτές χρησιμοποιούνται για την αξιολόγηση των διαταραχών του μεταβολισμού των λιπιδίων και χρησιμοποιούνται σε συνδυασμό με άλλες εξετάσεις λιπιδίων, με σκοπό την κλινική αξιολόγηση ασθενούς. Οι λιποπρωτεΐνες του πλάσματος είναι ετερογενείς είναι σφαιρικά σωματίδια αποτελούμενες από υποκλάσματα που ποικίλλουν ως προς το μέγεθος, την πυκνότητα και τη χημική σύνθεση. Η ετερογένεια των λιποπρωτεϊνών έχει αποδειχθεί με διάφορες αναλυτικές μεθόδους, όπως η υπερφυγοκέντρωση με κλίση πυκνότητας, ο πυρηνικός μαγνητικός συντονισμός (NMR), η ηλεκτροφόρηση σε γέλη μη μετουσιωτικής βαθμίδωσης (GGE). Το σύστημα Lipoprint, ένα γραμμικό σύστημα ηλεκτροφόρησης σε γέλη βαθμίδωσης πολυακρυλαμιδίου. Με το σύστημα αυτό, η LDL μπορεί να αναλυθεί σε έως και επτά υποκλάσματα. Τα υποκλάσματα της LDL έχουν χαρακτηριστεί από το LDL-1, το οποίο αποτελείται από τα μεγαλύτερα σωματίδια, έως το LDL-7, το οποίο αποτελείται από τα μικρότερα σωματίδια. Γενετικοί καθώς και περιβαλλοντικοί παράγοντες ευθύνονται για τις διαφορές στον βαθμό ετερογένειας της LDL μεταξύ των ατόμων. Η ηλικία, το φύλο και η κατάσταση των λιπιδίων είναι γνωστό ότι επηρεάζουν το προφίλ του υποκλάσματος LDL. Τα άτομα που εμφανίζουν προφίλ λιποπρωτεϊνών αποτελούμενο κυρίως από τα μεγαλύτερα, υποκλάσματα της LDL (LDL-1 και LDL-2), έχουν φαινότυπο A, ενώ αυτοί που εμφανίζουν κυρίως τα μικρότερα και πυκνότερα υποκλάσματα (LDL-3 έως LDL-7) έχουν φαινότυπο B. (Εικόνα 3.8). Ο φαινότυπος B συσχετίστηκε με τριπλάσια αύξηση του κινδύνου έμφραγμα του μυοκαρδίου, ανεξάρτητα από το φύλο, την ηλικία και το σχετικό βάρος.

Το Lipoprint της LDL αποτελείται από:

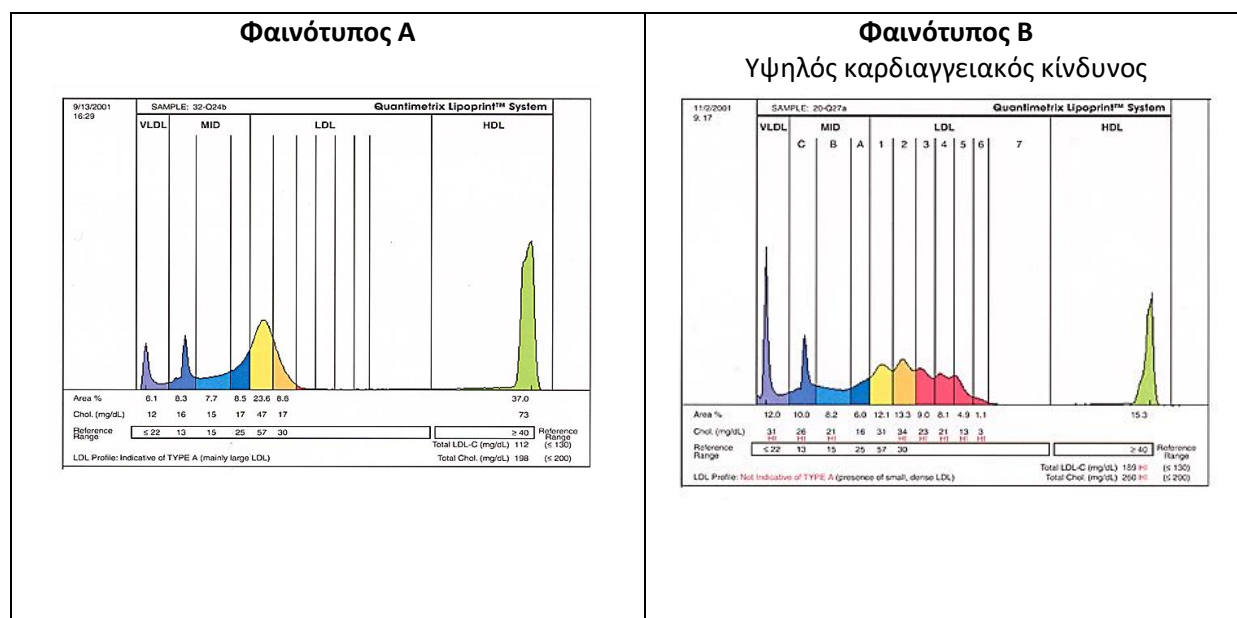
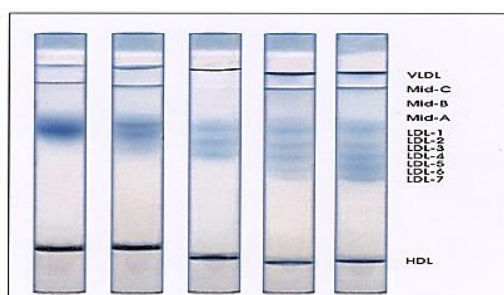
- Προκατασκευασμένο πήκτωμα βαθμίδωσης σε γέλη πολυακρυλαμιδίου (πήκτωμα στοιβαξης και πήκτωμα διαχωρισμού) σε γυάλινο σωλήνα
- Υγρή γέλη φόρτωσης με λιπόφιλη χρωστική ουσία
- Ρυθμιστικά άλατα



Εικόνα 3.7 Α. Κιτ Lipoprint system LDL subfractions. Β. Σχηματική απεικόνιση βαθμίδωσης πηκτώματος πολυακρυλαμιδίου σε σωληνάριο Lipoprint. Γ. Λιποπρωτεϊνική κατανομή των υποκλασμάτων της LDL (<https://quantimetrix.com/wp-content/uploads/Lipoprint-LDL-Test-Kit-English-REF-48-7002.pdf>).

Η χοληστερόλη των λιποπρωτεϊνικών σωματιδίων συνδέεται αναλογικά με την χρωστική του lipoprint και προχρωματίζονται. Τα προχρωματισμένα σωματίδια υποβάλλονται στη συνέχεια σε ηλεκτροφόρηση, μετακινούνται μέσω της διαφοράς δυναμικού στη βαθμίδωση πυκνοτήτων της πηκτής και διαχωρίζονται ανάλογα με το μέγεθός τους από το μεγαλύτερο προς το μικρότερο σε λιποπρωτεϊνικές ζώνες. Έτσι η HDL μετακινείται πρώτη, ακολουθούμενη από τα μικρά και πυκνά σωματίδια της LDL (small LDL), τα μεγαλύτερα της LDL (Large LDL), στη μεσαία ζώνη (Midland) που κινείται η IDL και τέλος η VLDL. Εάν υπάρχουν χυλομικρά, θα εμφανιστούν στο

πήκτωμα στοίβαξης ή φόρτωσης (Εικόνα 3.7B) . Ένα τυπικό προφίλ του Liporprint αποτελείται από 1 ζώνη VLDL, 3 Midbands, έως και 7 ζώνες LDL και 1 ζώνη HDL. Μετά την ολοκλήρωση της ηλεκτροφόρησης, οι βαμμένες λιποπρωτεϊνικές ζώνες που υπάρχουν στο ηλεκτροφόρημα, ταυτοποιούνται με βάση την κινητικότητα τους (Rf) χρησιμοποιώντας τη ζώνη της VLDL ως αρχικό σημείο αναφοράς (VLDL = 0) και της ζώνη της HDL ως τελικό σημείο αναφοράς. (HDL = 1). (Εικόνα 3.7Γ). Ακολούθως, προσδιορίζεται η σχετική επιφάνεια για κάθε λιποπρωτεϊνικής ζώνης και πολλαπλασιάζεται με τη συνολική συγκέντρωση χοληστερόλης του δείγματος για να προκύψει η ποσότητα χοληστερόλης κάθε ζώνης σε mg/dL. Για τον προσδιορισμό επομένως των υποκλασμάτων της LDL απαιτείται ο προσδιορισμός της ολικής χοληστερόλης του δείγματος.

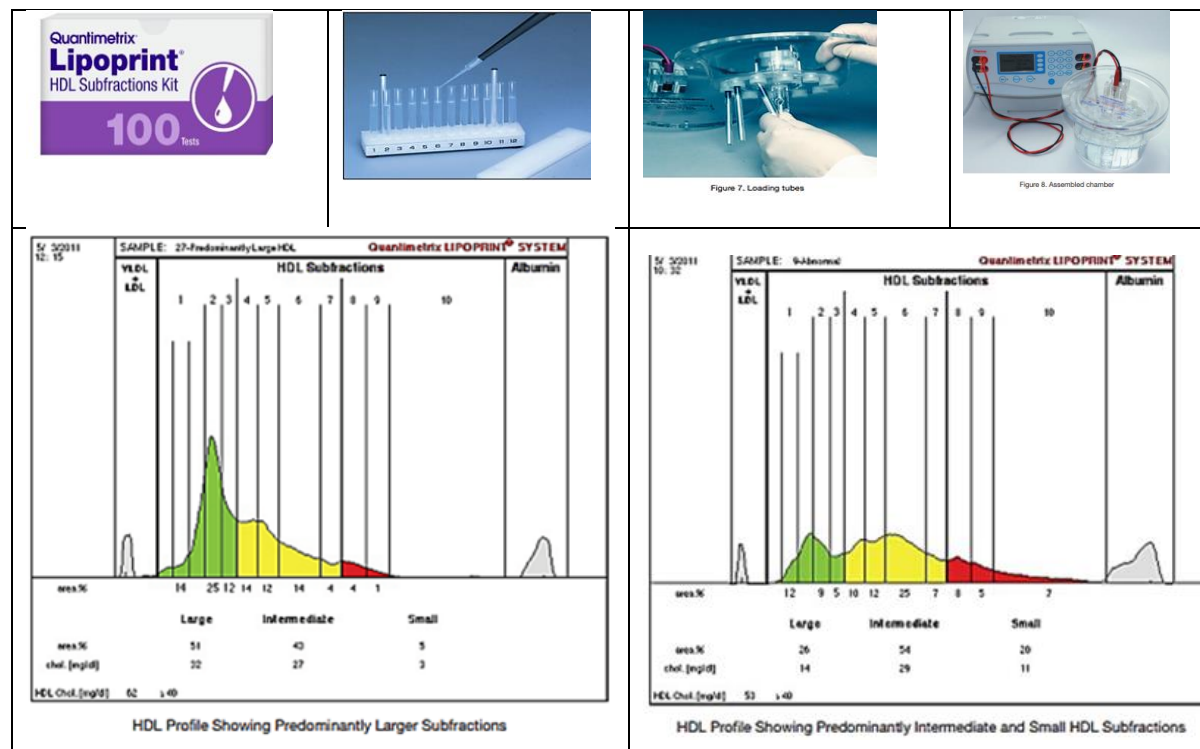


Εικόνα 3.8 Ηλεκτροφορητικός διαχωρισμός σωματιδίων LDL και χαρακτηρισμός τους σε φαινότυπο Α και φαινότυπο Β με το σύστημα Quantimetrix Liporprint "Liporprint LDL Kit" (<https://quantimetrix.com/wp-content/uploads/Liporprint-LDL-Test-Kit-English-REF-48-7002.pdf>)

3.3.2 Ηλεκτροφόρηση και κατανομή των σωματιδίων της HDL ορού σε υποκλάσματα.

Αρχή της μεθόδου

Το σύστημα ηλεκτροφόρησης “Quantimetrix Lipoprint system HDL subfractions” διαχωρίζει και αναλύει τα υποκλάσματα της HDL με την ίδια βασική αρχή λειτουργίας που περιγράψαμε και για τον διαχωρισμό των υποκλασμάτων της LDL. Το κιτ διαχωρισμού υποκλασμάτων της HDL αξιοποιεί επίσης για το διαχωρισμό και την ποσοτικοποίηση των υποκλασμάτων HDL χοληστερόλης, πήκτωμα βαθμίδωσης πολυακρυλαμιδίου, και χρωστική για τη βαφή της χοληστερόλης των σωματιδίων της HDL. Η μέθοδος ανάλυσης των υποκλασμάτων της HDL είναι μόνο για ερευνητική χρήση. Η HDL χοληστερόλη όπως έχουμε αναφέρει έχει αποδειχθεί ότι έχει αντίστροφη σχέση με τον κίνδυνο στεφανιαίας νόσου. Τα επίπεδα της HDL χοληστερόλης κάτω από 35 mg/dL θεωρούνται ως ανεξάρτητος παράγοντας κινδύνου. Με τη χρήση αναλυτικής υπερφυγοκέντρωσης, έχουν εντοπιστεί δύο κύριες υποκατηγορίες HDL, οι HDL2 και HDL3.



Εικόνα 3.9 Ενδεικτικός ηλεκτροφορητικός διαχωρισμός σωματιδίων HDL με το σύστημα Quantimetrix Lipoprint "Lipoprint LDL Kit" με προφίλ κατανομής: [A] με κυρίαρχα τα μεγάλα σωματίδια της HDL και [B] με κυρίαρχα τα ενδιάμεσα και μικρά σωματίδια της HDL (https://quantimetrix.com/wp-content/uploads/LipoprintHDLTestKit_REF-48-9002.pdf)

Αυτά τα υποκλάσματα έχουν επίσης διαχωριστεί μέσω διαφόρων τεχνικών καθίζησης, και ηλεκτροφόρησης σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου με κλίση πόρων. Η σημασία των υποκλασμάτων της HDL και της λειτουργικότητας της είναι υπό διερεύνηση.

Πειραματική διαδικασία. Η πειραματική διαδικασία είναι αναλογική και για τους 2 προσδιορισμούς με μικρές διαφορές σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

Αντιδραστήρια-όργανα

- **Lipoprint HDL/LDL 4x25 gel tubes**
Πολυακρυλαμίδιο, ρυθμιστικό, συντηρητικό
- **Lipoprint HDL/LDL loading gel**
Ακρυλαμίδιο
N,N-μεθυλενοδισακρυλαμίδιο
Λιπόφιλη Βάση
Καταλύτης
Σταθεροποιητής
Ρυθμιστής
- **Lipoprint Electrolyte Buffer Salts**
Τρις (υδροξυμέθυλ) αμινομεθάνιο
Βορικό Οξύ
- **Lipoprint HDL/LDL Product Insert**

Πειραματική πορεία

- Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης: Σε ένα ποτήρι ζέσεως διαλύουμε με H₂O υπό μαγνητική ανάδευση σε έναν τελικό 1200 mL ένα φιαλίδιο μίγματος ρυθμιστικών αλάτων ηλεκτροφόρησης (Lipoprint Electrolyte Buffer Salts)
- Σωληνάκια πήκτωματος ακρυλαμιδίου: Παραλαμβάνουμε με λαβίδα τα σωληνάκια γέλης από το δοχείο Lipoprint HDL/LDL 1x25 gel tubes. Καθαρίζουμε με χαρτί κουζίνας την γυάλινη επιφάνεια από το διάλυμα αποθήκευσης και τα τοποθετούμε στην αριθμημένη βάση προετοιμασίας. Η άνω πλευρά του σωλήνα πάνω από τη γέλη περιέχει ρυθμιστικό διάλυμα αποθήκευσης. Αφαιρούμε το ρυθμιστικό διάλυμα αποθήκευσης από την επιφάνεια των πήκτωμάτων με αναστροφή και με τη βοήθεια

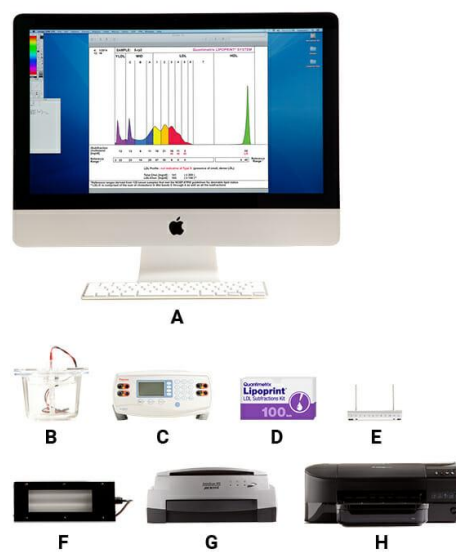
απορροφητικού χαρτιού. Εάν είναι απαραίτητο, σκουπίζουμε το άκρο του σωλήνα ενώ οι σωλήνες είναι ανεστραμμένοι προς τα μέσα προκειμένου να αφαιρεθεί η περίσσεια του ρυθμιστικού διαλύματος από το εσωτερικό του σωλήνα.

- Προσθήκη δειγμάτων. Απλώνουμε με προσοχή στην επιφάνεια του κάθε πηκτώματος σωληναρίου από 25 μL δείγματος ορού (Εικόνα 3.9).
- Ακολούθως, προσθέτουμε με προσοχή στην επιφάνεια του πηκτώματος του κάθε σωληναρίου ηλεκτροφόρησης δείγματος από 200 μL Lipoprint Loading Gel.
- Ανάμιξη δείγματος και Loading gel. Για την πλήρη ανάμιξη του δείγματος και του Loading gel που προσθέσαμε στην επιφάνεια του πηκτώματος των σωλήνων, καλύπτουμε την επιφάνεια των σωλήνων με Parafilm και αναστρέφουμε περιοδικά το σωλήνα (5-6 φορές).
- Φωτοπολυμερισμός. Η σύνδεση της χρωστικής με τη χοληστερόλη γίνεται υπο δέσμη φωτός για 30 min. Τοποθετούμε το Preparation Rack σωλήνων ηλεκτροφόρησης εφαπτομενικά με το λαμπτήρα έτσι ώστε η δέσμη του να πέφτει στο πάνω μέρος θέση τοποθέτησης του δείγματος και του Loading gel.
- Τοποθέτηση των δειγμάτων στη συσκευή ηλεκτροφόρησης. Αφού ολοκληρωθεί ο φωτοπολυμερισμός, αφαιρούμε κάθε σωλήνα γέλης από το preparation rack και τους τοποθετούμε προσεκτικά στον προσαρμογέα σιλικόνης του επάνω μέρους θαλάμου ηλεκτροφόρησης (Εικόνα 3.9). Ο μέγιστος αριθμός σωλήνων ηλεκτροφόρησης της συσκευής είναι έως 12 σωλήνες. Στην περίπτωση λιγότερων δειγμάτων καλύπτουμε τους άδειους προσαρμογείς με τους 6 γυάλινους σωλήνες χωρίς πήκτωμα.
- Προσθήκη ρυθμιστικού διαλύματος ηλεκτροφόρησης στο άνω και κάτω θάλαμο της συσκευής. Τοποθετούμε 1000 mL ρυθμιστικού διαλύματος ηλεκτρολυτών στον κάτω θάλαμο και 200 mL στον άνω θάλαμο. Το ρυθμιστικό διάλυμα του κάτω θαλάμου μπορεί να επαναχρησιμοποιηθεί έως και πέντε φορές. Το ρυθμιστικό διάλυμα πρέπει να είναι σε θερμοκρασία δωματίου (18-27°C). Αφού πληρωθούν με ρυθμιστικό και συναρμολογηθούν οι δύο θάλαμοι, απομακρύνουμε τυχόν φυσαλίδες αέρα

από κάθε σωλήνα, οι οποίες θα μπορούσαν να εμποδίσουν τη διέλευση του ηλεκτρικού ρεύματος, με τη βοήθεια αυτόματης πιπέτας.

- Ηλεκτροφόρηση. Τοποθετούμε το καπάκι του θαλάμου ηλεκτροφόρησης στη θέση του και το συνδέουμε στην πηγή ρεύματος. Ρυθμίζουμε την πηγή τροφοδοσίας ώστε να παρέχεται ρεύμα 3 mA ανά σωλήνα γέλης (π.χ. 36 mA για 12 σωλήνες, 18 mA για 6 σωλήνες κ.λπ.). Η τάση στα 500V, και ο χρόνος ηλεκτροφόρησης στα 50 λεπτά. Όταν ολοκληρωθεί η ηλεκτροφόρηση, διακόπτουμε τη παροχή ρεύματος, αφαιρούμε το καπάκι του θαλάμου και απορρίπτουμε το ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης από τον άνω θάλαμο. Αφαιρέσουμε τους σωλήνες από το θάλαμο ηλεκτροφόρησης, καθαρίσουμε τη γυάλινη επιφάνεια με απορροφητικό χαρτί, τους τοποθετούμε στο Preparation Rack και στη συνέχεια ακολουθεί η διαδικασία σάρωσης και ανάλυσης.

- Σάρωση και ανάλυση των δειγμάτων. Τα δείγματα ακολούθως σαρώνονται από το σύστημα Lipoprint και ανάλογα με την ανάλυση HDL ή LDL ακολουθούμε το αντίστοιχο πρόγραμμα ανάλυσης. Τα δεδομένα παρέχονται σε μορφή διαγράμματος και λογιστικού φύλου Excel με τις ποσότητες των σωματιδίων σε mg/ml χοληστερόλης όσο και σε % κατανομή των σωματιδίων σε σχέση με την ολική χοληστερόλη του δείγματος ηλεκτροφόρησης.



Εικόνα 3.10 Lipoprint System

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.1 Χαρακτηριστικά του πληθυσμού της μελέτης

Στη μελέτη μας συμμετείχαν 20 άτομα μέσης ηλικίας 46 ± 15 , με αυξημένα επίπεδα Lp(a) (>50 mg/dL) και αποτέλεσαν την ομάδα Lp(a), καθώς και 10 υγιείς εθελοντές, μέσης ηλικίας 51 ± 10 με επίπεδα Lp(a) <10 mg/dL, οι οποίοι αποτέλεσαν την ομάδα ελέγχου. Ασθενείς και εθελοντές που χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη μας επισκέφθηκαν και παρακολούθηθηκαν από την Εξωτερική Κλινική Λιπιδίων του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων. Όλοι οι συμμετέχοντες στη μελέτη ήταν Καυκάσιας καταγωγής και σύμφωνα με τις οδηγίες δεν είχαν λάβει προηγούμενη θεραπεία. Μια πλήρης αξιολόγηση του κλινικού και εργαστηριακού προφίλ πραγματοποιήθηκε κατά την επίσκεψη. Τα δημογραφικά και κλινικά χαρακτηριστικά περιλάμβαναν: φύλο, ηλικία, ιστορικό καπνίσματος, συνοδά νοσήματα με ιδιαίτερη έμφαση στην αθηροσκληρωτική καρδιαγγειακή νόσο (ASCVD), δείκτη μάζας σώματος (BMI) και αρτηριακή πίεση (BP). Τα επίπεδα των λιπιδίων προσδιορίστηκαν μετά από δωδεκάωρη νηστεία. Τα κλινικά και βιοχημικά χαρακτηριστικά του πληθυσμού της μελέτης απεικονίζονται στον πίνακα 1. Το λιπιδαιμικό προφίλ των δυο ομάδων (TG, TC, LDL-C, HDL-C) εκτός από τα επίπεδα της Lp (a) αν και υπάρχουν κάποιες διαφορές στους μέσους όρους των τιμών τους δεν εμφανίζουν στατιστικά σημαντική διαφορά. Οι υγιείς εθελοντές (ομάδα ελέγχου) ήταν μεγαλύτερης κατά μέσο όρο ηλικίας κατά 5 έτη χωρίς όμως να είναι στατιστικά σημαντική αυτή η διαφορά. Οι ομάδα των Lp(a) εμφάνισαν χαμηλότερη ενεργότητα αρυλεστεράσης ($p<0.02$) σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου (Πίνακας 1). Η κατανομή των σωματιδίων της HDL με HDL-Liporprint έδειξε στατιστικά σημαντική μείωση των Large HDL-C και αύξηση των Small HDL-C σε σχέση με την ομάδα ελέγχου αντίστοιχα. Καμία στατιστικά μεταβολή δεν παρατηρήθηκε στην κατανομή των ενδιάμεσων σωματιδίων της HDL (I-HDL). Η κατανομή των σωματιδίων της LDL με LDL Liporprint έδειξε φαινότυπο A για όλα τα μέλη της ομάδας ελέγχου και φαινότυπο B για όλα τα μέλη της ομάδα Lp(a)

Πίνακας 4.1: Βιοχημικά και κλινικά χαρακτηριστικά του πληθυσμού της μελέτης

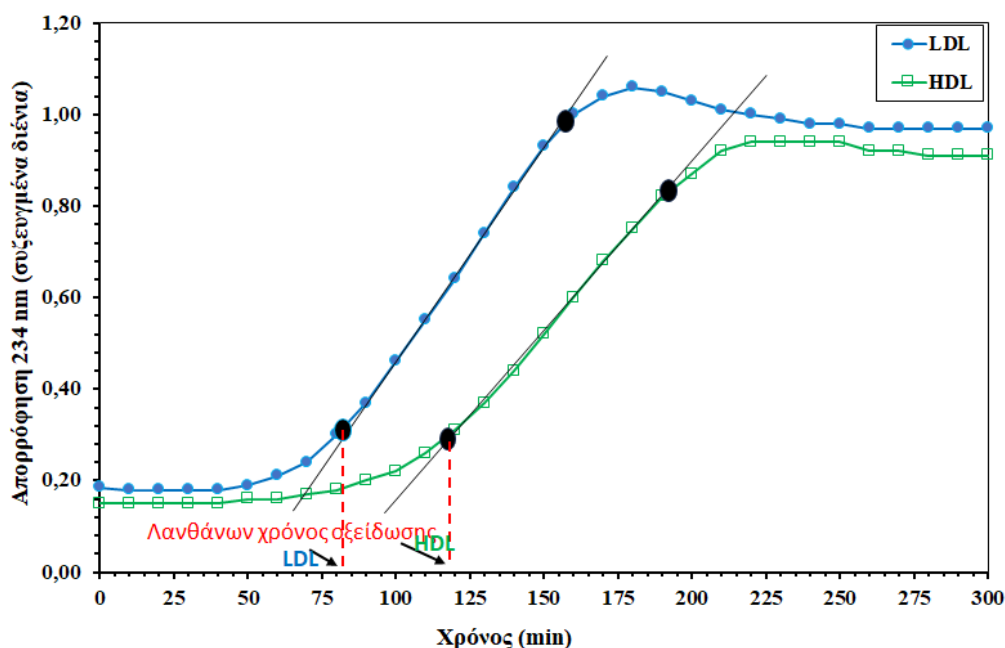
Χαρακτηριστικά	Ομάδα ελέγχου (n=10)	Ομάδα Lp(a) (n=20)	p
Ηλικία (έτη)	51 ± 10	46 ± 15	NS
Συστηματικοί καπνιστές (%)	2 /10	5 /20	NS
Δείκτης μάζας σώματος (kg/m ²)	23 ± 5	26 ± 4	NS
Ολική χοληστερόλη (mg/dl)	95 ± 15	119 ± 32	NS
Τριγλυκερίδια (mg/dl)	190 ± 30	203 ± 45	NS
LDL-χοληστερόλη (mg/dl)	118 ± 29	129 ± 42	NS
HDL-χοληστερόλη (mg/dl)	67 ± 6	52 ± 12	NS
Lp(a) (mg/dl)	<10	96 ± 54	<0.01
Ενεργότητα της PON1 αρυλεστεράσης (U/L)	67 ± 7	55 ± 10	<0.02
Lipoprint- LDL	Φαινότυπος A	Φαινότυπος B	<0.001
Lipoprint- HDL			
Large HDL (%)	30 ± 10	20 ± 10	0.03
Intermediate HDL-C (%)	47 ± 8	47 ± 9	NS
Small HDL-C (%)	23 ± 11	39 ± 11	0.03

4.2 Αντιοξειδωτική ικανότητα της HDL

4.2.1 Οξειδωτική ευαισθησία των λιποπρωτεϊνικών κλασμάτων LDL και HDL των ομάδων μελέτης.

Προκειμένου να εκτιμήσουμε την αντιοξειδωτική ικανότητα των κλασμάτων της HDL τόσο της ομάδας αναφοράς όσο και της ομάδας μελέτης, εφαρμόσαμε τη μέθοδο της οξειδωτικής τροποποίησης με ιόντα Cu²⁺ όπως αναλυτικά περιεγράφηκε στο κεφάλαιο 3. Η απομόνωση των λιποπρωτεϊνικών υποκλασμάτων της LDL, και της HDL της ομάδας αναφοράς και της ομάδας μελέτης έγινε με διαδοχικές υπερφυγοκεντρήσεις σε βαθμίδωση πυκνοτήτων, και ο προσδιορισμός της πρωτεΐνης των έγινε με τη μέθοδο BCA όπως αναλυτικά περιεγράφηκε στο κεφάλαιο 3. Η ευαισθησία στην οξείδωση των λιποπρωτεϊνικών κλασμάτων αξιολογήθηκε μετρώντας

τον λανθάνοντα χρόνο οξείδωσης [oxidation lag time (min)]. Στην εικόνα 4.1 παρουσιάζουμε μια μέση αντιπροσωπευτική σιγμοειδή καμπύλη οξείδωσης του λιποπρωτεϊνικού κλάσματος της HDL και της LDL της ομάδας αναφοράς ($Lp(a) < 10$ mg/dL) καθώς και τον λανθάνοντα χρόνο οξείδωσης (OLT, min). Ο μέσος όρος του OLT για την LDL ήταν 82 ± 14 min και για την HDL ήταν 117 ± 12 min ($p < 0.01$)



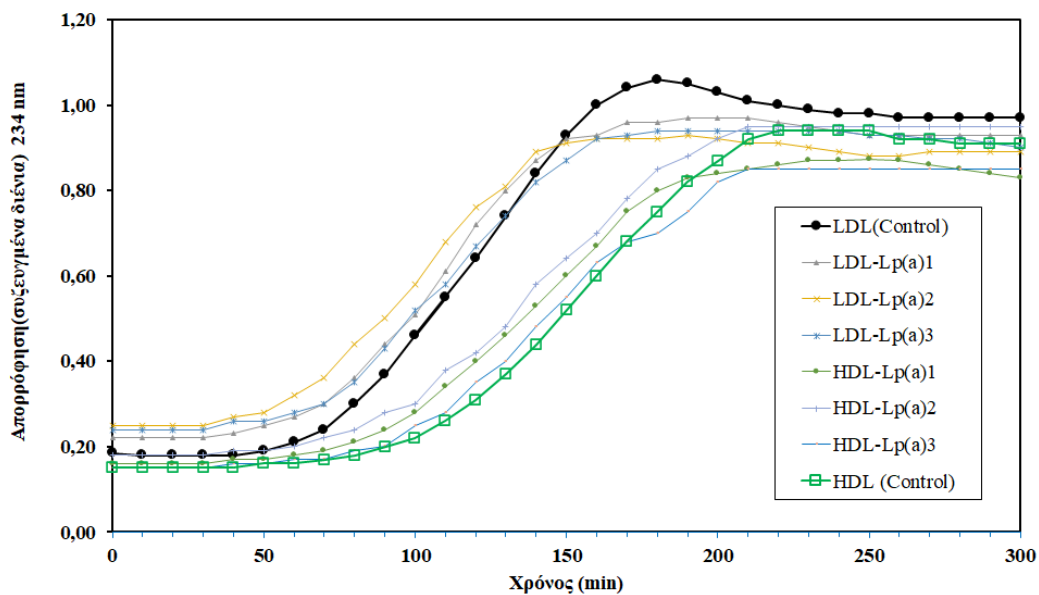
Εικόνα 4.1. Αντιπροσωπευτική καμπύλη οξείδωσης με Cu^{2+} των λιποπρωτεϊνικών κλασμάτων HDL και LDL αντίστοιχα της ομάδας αναφοράς ($Lp(a) < 10$ mg/dL)

Ακολούθως μελετήσαμε την ευαισθησία στην οξειδωτική τροποποίηση των λιποπρωτεϊνικών κλασμάτων HDL και LDL της ομάδας μελέτης [$Lp(a)$] σε σχέση με την ομάδα αναφοράς (Control). Στην Εικόνα 4.2 απεικονίζονται:

A. Οι σιγμοειδείς καμπύλες οξείδωσης, LDL- $Lp(a)1$, LDL- $Lp(a)2$, LDL- $Lp(a)3$, των λιποπρωτεϊνικών κλασμάτων LDL της ομάδας μελέτης σε σχέση με την LDL της ομάδας αναφοράς (Control) και

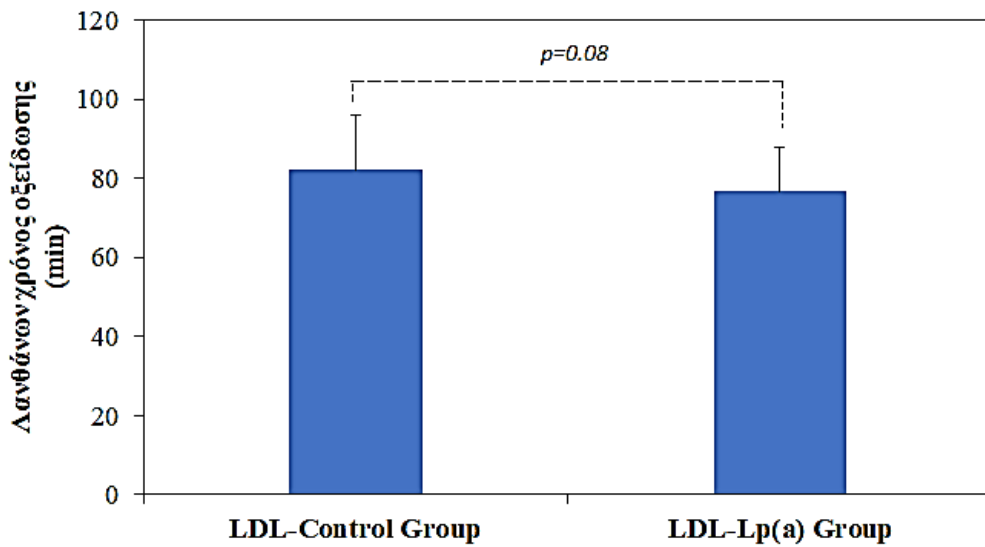
B. Οι σιγμοειδείς καμπύλες της οξείδωσης, HDL- $Lp(a)1$, HDL- $Lp(a)2$, HDL- $Lp(a)3$ των λιποπρωτεϊνικών κλασμάτων HDL της ομάδας μελέτης σε σχέση με την HDL της ομάδας αναφοράς (Control).

Ο μέσος λανθάνων χρόνος οξείδωσης που προκύπτει από τη σιγμοειδή καμπύλη ανάπτυξης των λιποπρωτεϊνικών κλασμάτων της ομάδας μελέτης τόσο για την LDL όσο και για την HDL ήταν $76,7 \pm 11$ min και 101 ± 15 min ($p < 0.01$), αντίστοιχα.

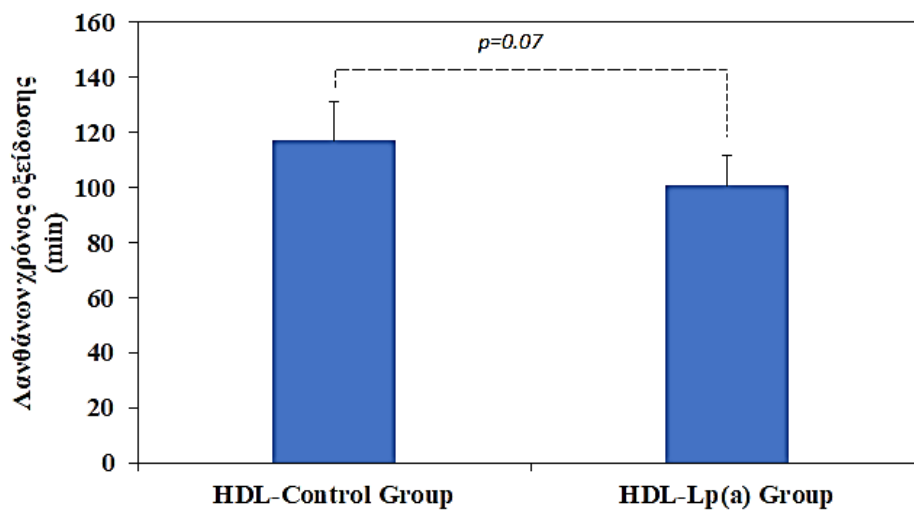


Εικόνα 4.2 Αντιπροσωπευτικές σιγμοειδής καμπύλες οξείδωσης των λιποπρωτεϊνικών κλασμάτων HDL και LDL της ομάδας αναφοράς (Control Group) και της ομάδας μελέτης [Lp(a) Group] με Cu^{2+} . LDL-Lp(a)1, LDL-Lp(a)2, LDL-Lp(a)3: σιγμοειδής καμπύλες οξείδωσης, κλασμάτων LDL της ομάδας [Lp(a) Group] και HDL-Lp(a)1, HDL-Lp(a)2, HDL-Lp(a)3: σιγμοειδής καμπύλες οξείδωσης, κλασμάτων HDL της ομάδας [Lp(a) Group].

Η σύγκριση του λανθάνοντα χρόνου οξείδωσης μεταξύ των λιποπρωτεϊνικών κλασμάτων της LDL των 2 ομάδων όπως φαίνεται από την Εικόνα 4.3 έδειξε ότι ο λανθάνων χρόνος της οξείδωσης της LDL της ομάδας Lp(a) μειώνεται σε σχέση με αυτόν της ομάδας αναφοράς ($76,7 \pm 11$ έναντι $82,0 \pm 14$ min). Επομένως το λιποπρωτεϊνικό κλάσμα της LDL της ομάδας Lp(a) εμφανίζει μεγαλύτερη ευαισθησία στην οξειδωτική τροποποίηση κατά την επίδραση με ιόντα Cu^{2+} . Ωστόσο, αυτή η μείωση δεν ήταν στατιστικά σημαντική ($p=0.08$).



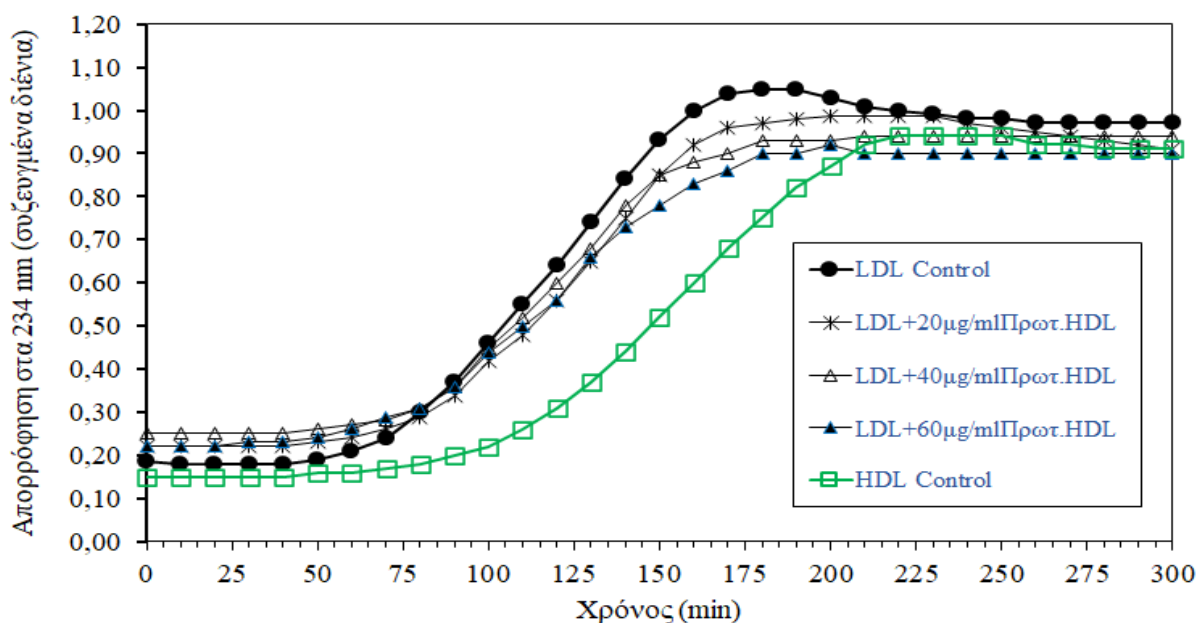
Εικόνα 4.3. Λανθάνων χρόνος οξείδωσης των λιποπρωτεϊνικών κλασμάτων της LDL μεταξύ της ομάδας μελέτης [Lp (a)Group] και αναφοράς (Control Group)



Εικόνα 4.4. Λανθάνων χρόνος οξείδωσης των λιποπρωτεϊνικών κλασμάτων της HDL μεταξύ της ομάδας μελέτης [Lp (a)Group] και αναφοράς (Control Group)

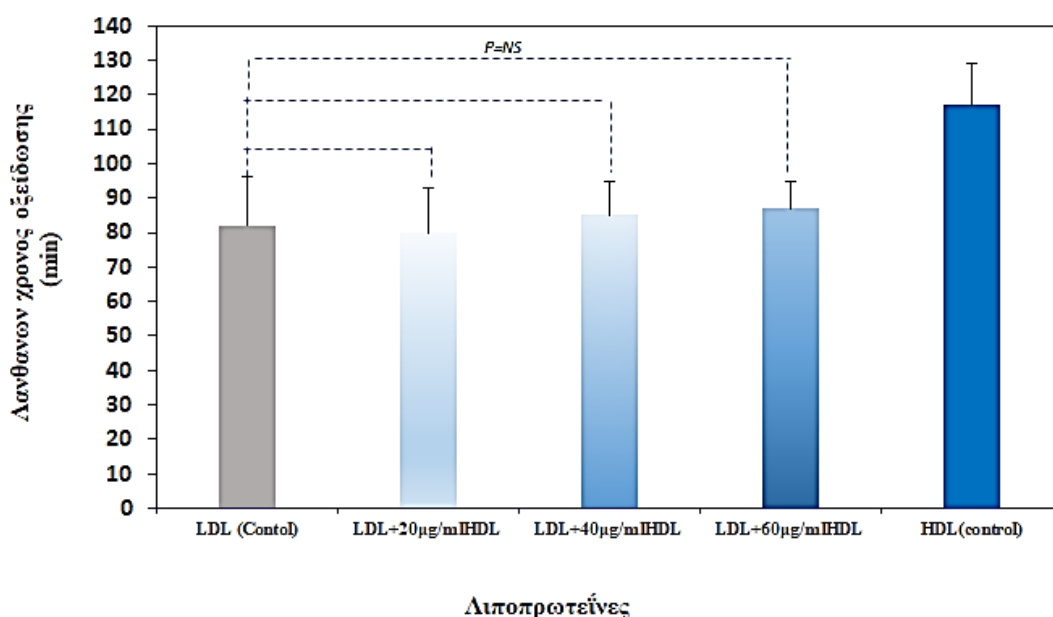
Ακολούθως εξετάσουμε κατά πόσο στο σύστημα μελέτης μας μπορούμε να παρακολουθήσουμε την αντιοξειδωτική επίδραση (ανασταλτική δράση) που θα

μπορούσε να επιφέρει το κλάσμα της HDL κατά την οξειδωτική τροποποίηση της LDL με Cu^{2+} . Ειδικότερα εξετάσαμε σε διάφορες δοκιμές τη μεταβολή της ευαισθησίας στην οξειδωτική τροποποίηση της LDL κατά την προσθήκη 20, 40 και 60 $\mu\text{g/ml}$ πρωτεΐνης HDL (Εικόνα 4.5 και 4.6).



Εικόνα 4.5 Μεταβολές της σιγμοειδούς καμπύλης οξείδωσης του λιποπρωτεϊνικού κλάσματος της LDL κατά την προσθήκη αυξανόμενης συγκέντρωσης του κλάσματος HDL της ομάδας αναφοράς στο διάλυμα της οξειδωτικής αντίδρασης με Cu^{2+}

Στην εικόνα 4.6 φαίνεται ότι η δοσοεξαρτώμενη αύξηση της συγκέντρωσης της HDL, αυξάνει τον λανθάνοντα χρόνο της οξείδωσης της LDL. Ωστόσο, αυτή η μεταβολή δεν είναι στατιστικά σημαντική και το εύρος των μεταβολών αυτών είναι πολύ μικρό ώστε να αξιοποιηθεί η μέθοδος για τη μέτρηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας της HDL της ομάδας μελέτης.



Εικόνα 4.6 Δοσοεξαρτώμενη επίδραση της HDL στην οξείδωση του λιποπρωτεϊνικού κλάσματος της LDL κατά με Cu^{2+}

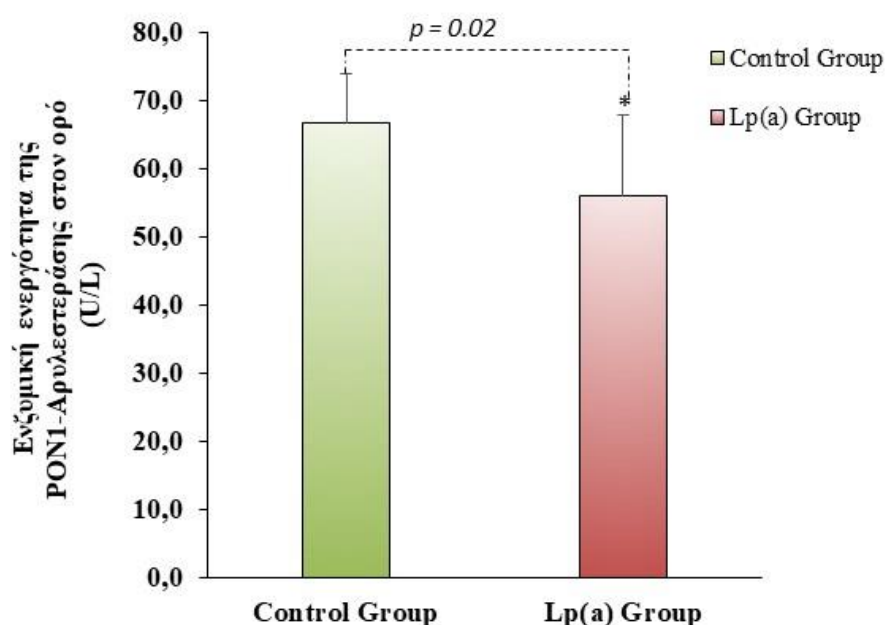
Συνοψίζοντας τα παραπάνω δεδομένα τόσο η ανασταλτική επίδραση της HDL στην επαγόμενη με Cu^{2+} οξείδωση της LDL όσο και η μελέτη της ευαισθησίας στην οξείδωση της HDL των κλασμάτων της ομάδας μελέτης σε σχέση με αυτή της ομάδας αναφοράς, δεν μας παρέχουν στατιστικά σημαντική διαφορά για την εφαρμογή ως μεθόδων μέτρησης της αντιοξειδωτικής ικανότητας της HDL των δειγμάτων μας. Ως εκ τούτου για την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας της HDL προχωρήσαμε στην μέτρηση της ενεργότητας της PON1 αρυλεστεράσης.

4.2.2 Προσδιορισμός της ενζυμικής ενεργότητας της παραξονάσης-1 ορού

Εκτός από την μέτρηση της ευαισθησίας στην οξείδωση της HDL και την ανασταλτική ικανότητά της στην επαγόμενη με Cu^{2+} οξείδωση της LDL για τη συνολική εκτίμηση της αντιοξειδωτικής της ικανότητα μετρήσαμε και τα επίπεδα της ενζυμικής ενεργότητας της παραξονάσης-1 ορού στο πληθυσμό της μελέτης μας. Η PON-1, όπως αναλυτικά παρουσιάσαμε στο κεφάλαιο 1, θεωρείται ότι συμβάλει σημαντικά στις αντιοξειδωτικές και αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες της HDL καθώς συμβάλει καθοριστικά στην υδρόλυση των oxPLs και την πρόληψη της συσσώρευσης

των υπεροξειδωμένων λιπιδίων της LDL. Τα χαμηλά επίπεδα τόσο της HDL-C όσο και της δραστηριότητας της PON1 έχουν συσχετιστεί με αυξημένο καρδιαγγειακό κίνδυνο (CVD risk), ενώ αντίθετα τα υψηλά τους επίπεδά τους εμφανίζουν προστατευτική επίδραση.

Στη μελέτη μας τα επίπεδα της PON-1 αρυλεστεράσης ορού του πληθυσμού της μελέτης μας έδειξαν ότι υπάρχει στατιστικά σημαντική μείωση των επιπέδων της ενεργότητας μεταξύ της ομάδας μελέτης (Lp(a)) και της ομάδας ελέγχου (55 ± 10 έναντι 67 ± 7 με $p=0.02$).

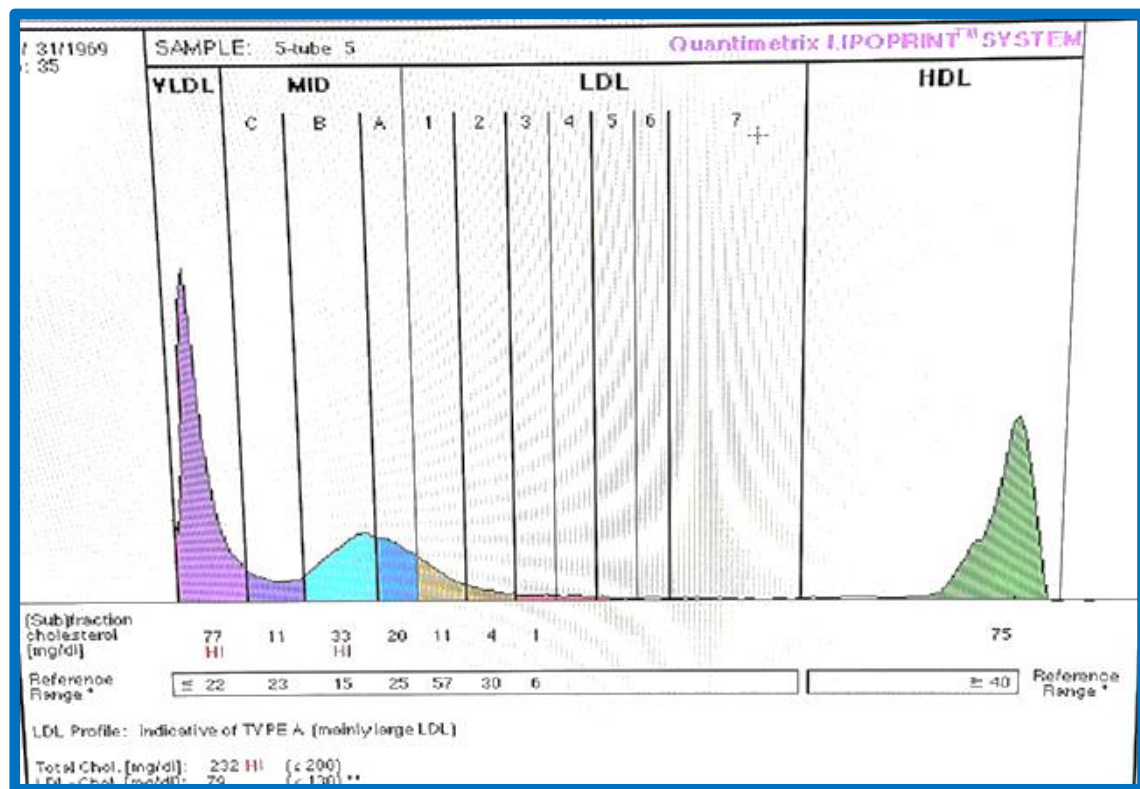


Εικόνα 4.7 Επίπεδα ενζυμικής ενεργότητας της PON-1 Αρυλεστεράσης στον ορό του πληθυσμού της μελέτης

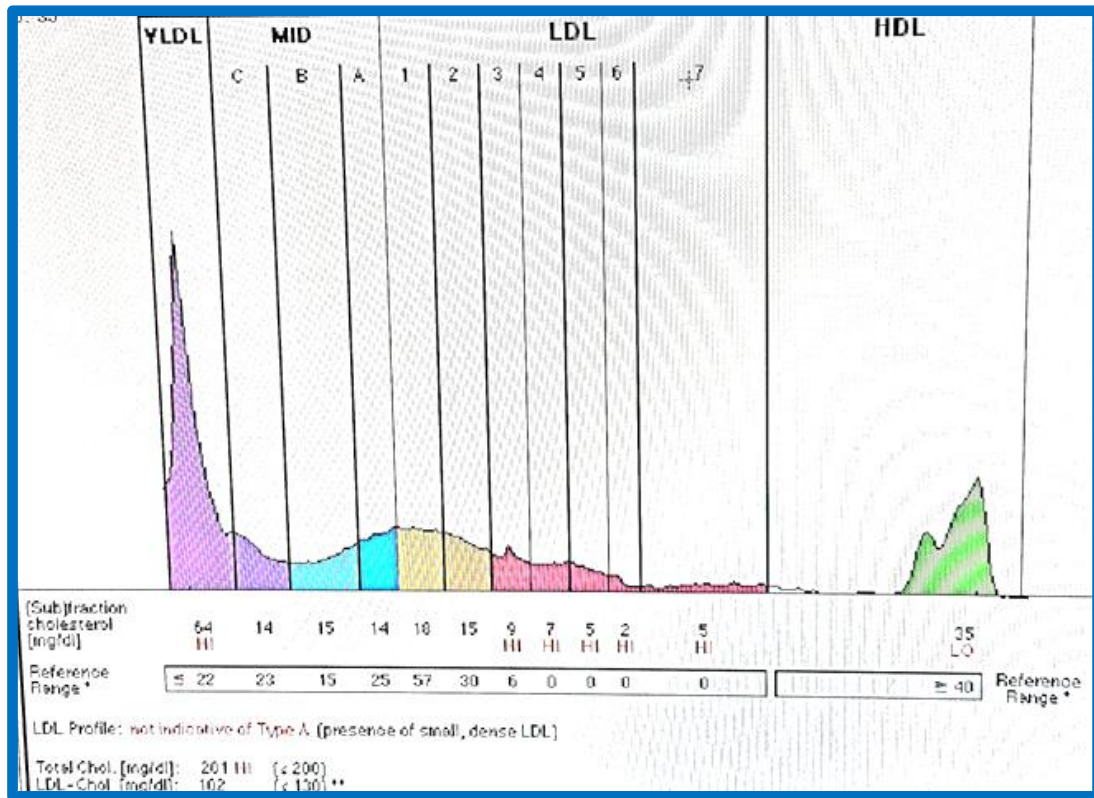
4.3 Ηλεκτροφόρηση και κατανομή των σωματιδίων της LDL με το Liporprint System

Όπως προαναφέρθηκε τα μικρά πυκνά σωματίδια LDL θεωρούνται προ-αθηρογόνα καθώς έχουν μειωμένη συγγένεια πρόσδεσης με τον υποδοχέα της LDL (LDLR) με αποτέλεσμα την παρατεταμένη χρονική διάρκεια στην κυκλοφορία και ως εκ τούτου την αύξηση της οξειδωτικής τους τροποποίησης. Με βάση το μέγεθος των σωματιδίων της LDL στο πλάσμα έχουν περιγραφεί δύο βασικοί φαινότυποι, ο

φαινότυπος Α στον οποίο επικρατούν τα μεγάλα σωματίδια, και ο φαινότυπος Β στον οποίο κυριαρχούν τα μικρά-πυκνά σωματίδια της LDL. Οι φαινότυποι των LDL σωματιδίων έχουν αποκτήσει κλινικό ενδιαφέρον, καθώς άτομα με φαινότυπο Β έχουν 2-3 φορές μεγαλύτερο κίνδυνο για την εμφάνιση στεφανιαίας νόσου σε σχέση με αυτούς με φαινότυπο Α. Στη μελέτη μας θέλαμε να δούμε σε ποιο φαινότυπο κατατάσσονται τα άτομα της ομάδας μελέτης [Lp(a)>50 mg/dl] σε σχέση με την ομάδα αναφοράς [Lp(a)<10 mg/dl]. Η ηλεκτροφορητική ανάλυση της κατανομής της σωματιδίων της LDL των δειγμάτων ορού με το Liporprint System έδειξε ότι όλα τα δείγματα της ομάδας ελέγχου χαρακτηρίστηκαν με τον φαινότυπο Α (Εικόνα 4.7), ενώ όλα τα δείγματα της ομάδας Lp(a) με τον φαινότυπο Β (Εικόνα 4.8).



Εικόνα 4.7. Κατανομή των σωματιδίων της LDL με ηλεκτροφόρηση (Liporprint system) σε υγιείς. Όλα τα μέλη της ομάδας αναφοράς χαρακτηρίστηκαν με τον φαινότυπο Α.



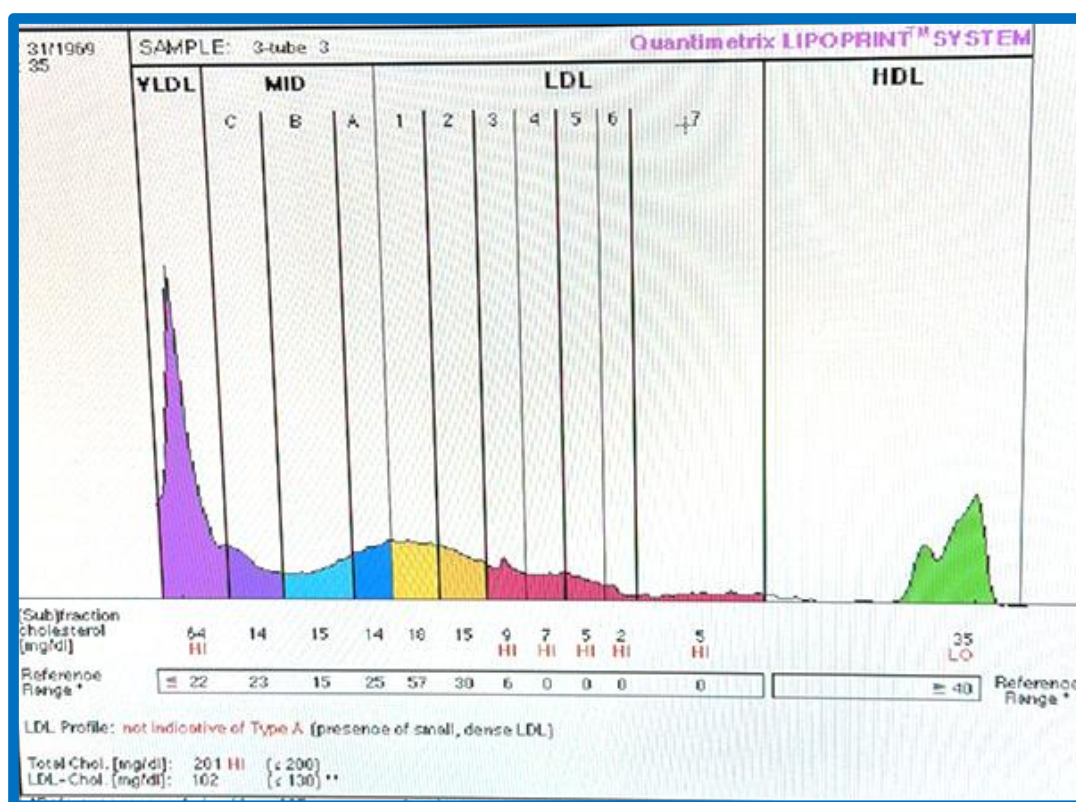
Εικόνα 4.8. Κατανομή των σωματιδίων της LDL με ηλεκτροφόρηση (Lipoprint system) σε ασθενείς με υψηλά επίπεδα Lp(a). Όλα τα μέλη της ομάδας Lp(a) χαρακτηρίστηκαν με τον φαινότυπο B.

Σύμφωνα με τα παραπάνω είναι εμφανές ότι τα άτομα ελέγχου (Φαινότυπος A) παρουσίασαν ένα προφίλ κατανομής όπου κυριαρχούν τα ενδιάμεσα σωματίδια της LDL δηλαδή τα κλάσματα LDL1, LDL2 ενώ τα άτομα της ομάδας Lp(a) (Φαινότυπος B) παρουσίασαν ένα προφίλ κατανομής όπου κυριαρχούν τα sdLDL σωματίδια τα αντιστοιχεί σε πέντε κλάσματα από το LDL3 έως LDL7. Ποσοτικά οι ασθενείς είχαν σημαντικά υψηλότερα επίπεδα sdLDL στο πλάσμα από τα υγιή άτομα ελέγχου και αυτό οφείλεται κυρίως στα υψηλά επίπεδα των σωματιδίων της Lp(a).

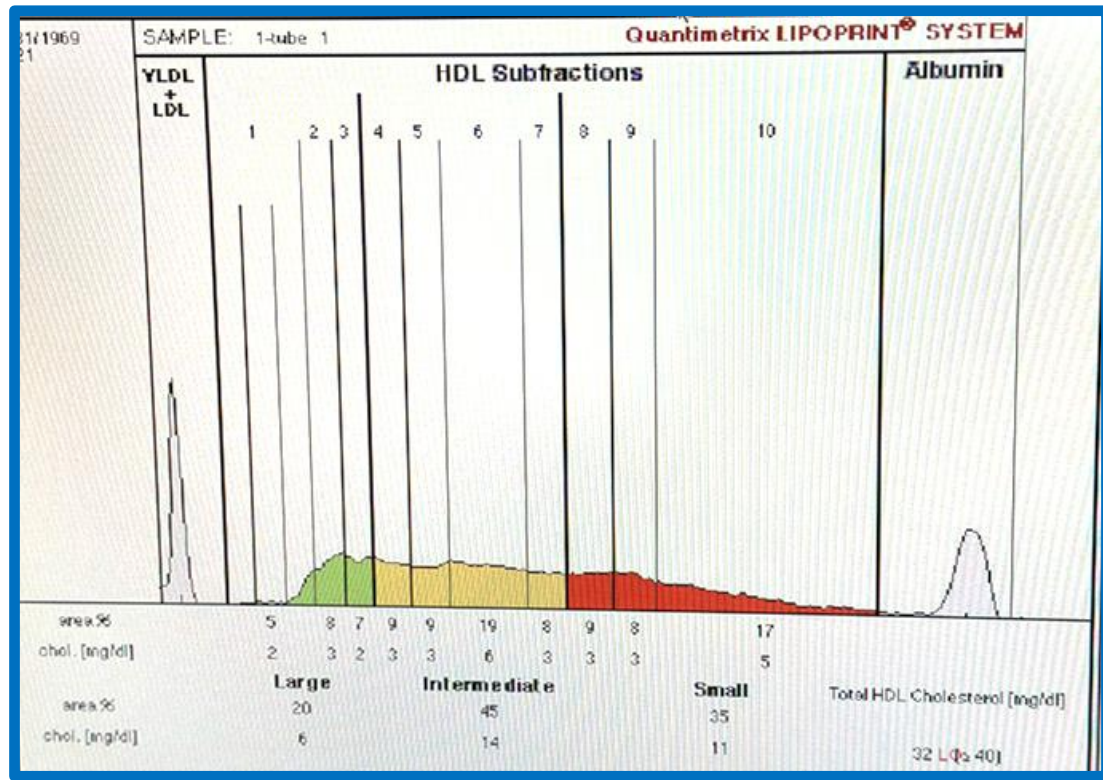
4.4 Ηλεκτροφόρηση και κατανομή των σωματιδίων της HDL με Lipoprint System

Όπως προαναφέρθηκε η HDL που είναι εμπλουτισμένη με χοληστερόλη και apoA-I έχει σφαιρικό σχήμα και μεγαλύτερο συγκριτικά μέγεθος. Αντίθετα η κυρίαρχη αυτή μορφή μπορεί να αλλάξει από στρεσογόνους παράγοντες, όπως, το κάπνισμα, οι

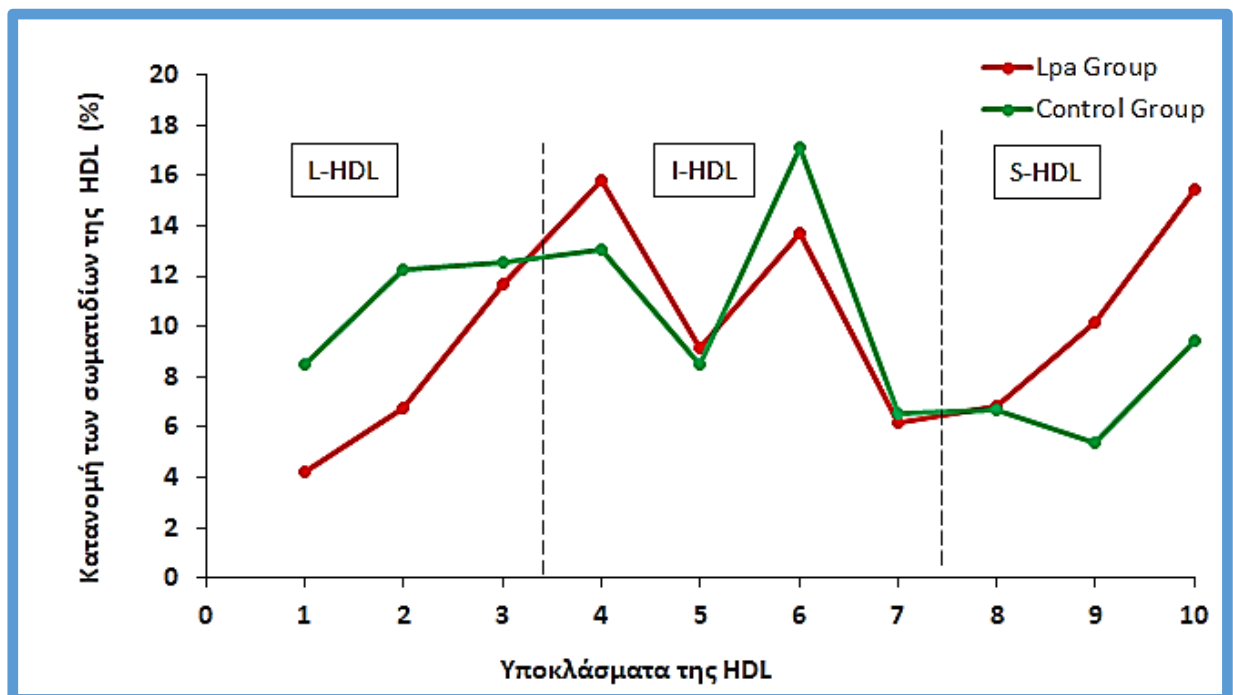
λοιμώξεις, η γήρανση οι κακές διατροφικές συνήθειες. Υπο αυτές τις συνθήκες, η μορφολογία των σωματιδίων αλλάζει και από μεγάλα και σφαιρικά σωματίδια γίνονται μικρότερα με ακανόνιστο σφαιρικό σχήματα μικρά σωματίδια HDL. Τα μικρά αυτά σωματίδια θεωρούνται προ-αθηρογόνα καθώς έχουν μειωμένη συγγένεια πρόσδεσης με τον υποδοχέα της LDL (LDLR) με αποτέλεσμα την παρατεταμένη χρονική διάρκεια στην κυκλοφορία και ως εκ τούτου την αύξηση της οξειδωτικής τους τροποποίησης. Εξετάσαμε επομένως στη συνέχεια κατά πόσο η κατανομή της Lp(a) φαινότυπος B μπορεί να μεταβάλει τη σωματιδιακή σύσταση και τη λειτουργικότητα της HDL. Έτσι αντίστοιχα με την LDL αναλύθηκε και η κατανομή των σωματιδίων της HDL. Όπως φαίνεται στις Εικόνες 4.9 και 4.10, η HDL της ομάδας Lp(a) εμφάνισε στατιστικά σημαντική μείωση των μεγάλων σωματιδίων της HDL σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου (20 ± 10 έναντι 30 ± 10 ; $p=0.03$) ενώ παράλληλα παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική αύξηση των μικρών σωματιδίων της HDL της ομάδας Lp(a) σε σχέση με την ομάδα ελέγχου (39 ± 11 έναντι 23 ± 11 ; $p=0.03$). Καμία στατιστικά σημαντική μεταβολή δεν παρατηρήθηκε στα ενδιάμεσα σωματίδια της HDL και των 2 ομάδων.



Εικόνα 4.9. Κατανομή των σωματιδίων της HDL με ηλεκροφόρηση (Lipoprint system) της ομάδας ελέγχου .



Εικόνα 4.10 Κατανομή των σωματιδίων της HDL με ηλεκροφόρηση (Lipoprint system) σε ασθενείς με υψηλά επίπεδα Lp(a).



Εικόνα 4.11 Κατανομή των σωματιδίων HDL του πληθυσμού της μελέτης χρησιμοποιώντας μη μετουσιωτικής PAGE, με Lipoprint System HDL subtraction kit.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

ΣΥΖΗΤΗΣΗ -ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

5.1 Συζήτηση

Τα σωματίδια της HDL, όπως αναφέραμε στο κεφάλαιο 1, μπορεί σε παθολογικές καταστάσεις, όπως χρόνιες ασθένειες, ρευματικά και αυτοάνοσα νοσήματα, CHD, διαβήτη, χρόνια νεφρική νόσος, και με την πάροδο της ηλικίας να χάσουν τις προστατευτικές τους ιδιότητες και να αποκτήσουν ανεπιθύμητες λειτουργίες. Σε αυτές τις συνθήκες η αντιοξειδωτική ικανότητα μειώνεται σταδιακά καθιστώντας τα σωματίδια της HDL από καρδιοπροστατευτικά σε προαθηρομωβωτικά [64].

Τα αυξημένα επίπεδα Lp(a) σχετίζονται με αυξημένο κίνδυνο καρδιαγγειακών παθήσεων και του εγκεφαλικού επεισοδίου. Ο αυξημένος κίνδυνος έχει γενικά αποδοθεί στις αθηροσκληρωτικές και θρομβωτικές αντινωδολυτικές ιδιότητες αυτής της λιποπρωτεΐνης και λαμβάνει χώρα μέσω πολλαπλών μηχανισμών. Η Lp(a) θεωρείται ότι είναι ο βασικός λιποπρωτεϊνικός μεταφορέας των OxPL ($\approx 85\%$) στο κυκλοφορικό λόγω της δέσμευσής τους με την apo(a)[48][49]. Πράγματι, σύμφωνα με τα αποτελέσματα της μελέτης μας όλα τα άτομα της ομάδας Lp(a)>50 mg/dl κατατάχθηκαν με το σύστημα κατανομής των σωματιδίων της LDL (Lipoprint LDL system) στον φαινότυπο τύπου B, ο οποίος χαρακτηρίζεται ως προαθηρογόνος με υψηλό καρδιαγγειακό κίνδυνο. Επιπρόσθετα, τα αποτελέσματα της οξειδωτικής τροποποίησης του λιποπρωτεϊνικού κλάσματος της LDL της ομάδας με υψηλά επίπεδα Lp(a) εμφάνισε μια τάση με μεγαλύτερη ευαισθησία στην οξείδωση .

Θα πρέπει να αναφέρουμε ότι οι μελέτες που εξετάζουν την αλληλεπίδραση μεταξύ Lp(a) και της λειτουργικότητας της HDL είναι ελάχιστες. Ειδικότερα, δεν έχει διερευνηθεί κατά πόσο τα υψηλά επίπεδα της Lp(a) τα οποία είναι φορείς των oxPLs στο ανθρώπινο πλάσμα μπορούν να μειώσουν την αντιοξειδωτική ικανότητα των σωματιδίων της HDL και να τα μετατρέψουν από καρδιοπροστατευτικά σε προαθηρογόνα. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της μελέτης μας παρατηρήθηκε μείωση της αντιοξειδωτικής ικανότητας της HDL, καθώς το λιποπρωτεϊνικό κλάσμα της HDL της ομάδας Lp(a) εμφανίζει μια τάση για μεγαλύτερη ευαισθησία στην οξειδωτική τροποποίηση κατά την επίδραση με ιόντα Cu^{2+} έναντι της ομάδας αναφοράς (Lp(a)<10 mg/dl). Τα ευρήματά μας για τη μείωση της αντιοξειδωτικής ικανότητας της HDL

επιβεβαιώθηκαν με τη μείωση της ενζυμικής ενεργότητας της PON1 σε σχέση με την ομάδα αναφοράς. Τα ευρήματα μας είναι στην ίδια κατεύθυνση με μελέτες που έχουν δείξει ότι σε αυξημένες οξειδωτικές συνθήκες μειώνεται η αντίσταση της HDL στην υπεροξείδωση των λιπιδίων, και παράλληλα μειώνονται και τα επίπεδα της ενζυμικής ενεργότητας της PON [64].

Το ερευνητικό ενδιαφέρον της ποιότητας των σωματιδίων της HDL έχει εστιαστεί στη σχέση μεταξύ του μεγέθους-μορφής των σωματιδίων σε συνάρτηση με τη δυσλειτουργικότητά της. Σε αυτή την κατεύθυνση έχει δειχθεί ότι τα μεγάλα και σφαιρικά σωματίδια της HDL περιέχουν υψηλά επίπεδα χοληστερόλης, ενώ τα μικρότερα με σωματίδια HDL περιέχουν υψηλής περιεκτικότητας σε TG και εμφανίζουν μειωμένη λειτουργικότητα RCT. Ανάλογη ανάλυση μεγέθους και λειτουργικότητας της HDL σε δείγμα καπνιστών έδειξε μικρότερο μέγεθος σωματιδίων με υψηλότερη περιεκτικότητα σε TG. Γενικά, ως <καλή> χαρακτηρίζεται η HDL που έχει σφαιρικό σχήμα και μεγαλύτερο μέγεθος σωματιδίων τα οποία είναι κυρίως εμπλουτισμένα με χοληστερόλη και apoA-I. Αυτή η <καλή> HDL μπορεί να αλλάξει σε μια τροποποιημένη μορφή από στρεσογόνους παράγοντες, όπως η γήρανση, το κάπνισμα, οι λοιμώξεις, οι ρύποι και οι κακές διατροφικές συνήθειες. Τα βασικά χαρακτηριστικά της τροποποιημένης μορφής της HDL (κακή HDL) εμφανίζουν μεταβολή της apoA-I, μείωση της περιεκτικότητας σε χοληστερόλη, και αύξηση της περιεκτικότητας σε: TG, SAA και apoC-III [16]. Υπό αυτές τις συνθήκες, η μορφολογία των σωματιδίων αλλάζει και από μεγάλα και σφαιρικά σωματίδια γίνονται μικρότερα με ακανόνιστο σφαιρικό σχήμα, απώλεια δραστηριότητας PON και άλλων παραγόντων [37]. Η ενεργότητα της PON-1 αρυλεστεράσης και η σωματιδιακή κατανομή της HDL μπορούν να αποτελέσουν πρώιμους βιοδείκτες που να προβλέπουν τη δυνατότητα ανάπτυξης καρδιαγγειακής νόσου. Συγκεκριμένα η αντιαθηρογόνος ιδιότητα της HDL αποδίδεται σε μεγάλο βαθμό από την PON-1 και την ικανότητα της να αποτρέπει τον σχηματισμό οξειδωμένης LDL. Παράγοντες όπως η χαμηλή ενζυμική δραστηριότητα, η συγκέντρωση της PON-1 και η αναλογία των υποκλασμάτων της HDL μπορούν να υποδείξουν μείωση της αντιοξειδωτικής ικανότητας της HDL.

Τα αποτελέσματά μας στη μελέτη του μεγέθους-ποιότητας των σωματιδίων της HDL σε συνθήκες υψηλών επιπέδων της Lp(a) έδειξαν στατιστικά σημαντική μείωση των μεγάλων σωματιδίων της HDL, με παράλληλη αύξηση των μικρών σωματιδίων της HDL στα άτομα με υψηλά επίπεδα Lp(a) σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου. Τα

αποτελέσματα αυτά δείχνουν ότι κατά την αλληλεπίδραση των αθηρογόνων σωματιδίων της Lp(a), μεταβάλλεται η σωματιδιακή σύσταση της HDL, με αύξηση των μικρών σωματιδίων της (SHDL). Πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι αυξημένα επίπεδα SHDL και IHDL, αλλά λιγότερο των LHDL, συσχετίζονται με κίνδυνο για ASCVD ([38].

Η αλληλεπίδραση μεταξύ Lp(a) και HDL μπορεί να είναι κλινικά σημαντική, καθώς έχει προταθεί ότι αυτά τα δύο λιποπρωτεϊνικά σωματίδια μπορεί να μοιράζονται μια κοινή μεταβολική οδό. Η Lp(a) μπορεί να προκαλέσει τον μετασχηματισμό της HDL σε μια δυσλειτουργική παραλλαγή, η οποία μπορεί να επηρεάσει τις ευεργετικές της ιδιότητες [55]. Σε κλινική μελέτη, ισχυρή συσχέτιση εμφανίσθηκε μεταξύ υψηλών επιπέδων Lp(a) και στεφανιαίας νόσου σε ασθενείς με υψηλά επίπεδα HDL. Οι ασθενείς με αυξημένη Lp(a) είχαν σημαντικά υψηλότερο κίνδυνο εμφάνισης στεφανιαίας νόσου, ακόμη και παρουσία αυξημένων επιπέδων HDL στον ορό, γεγονός που υποδηλώνει ότι η αυξημένη Lp(a) μπορεί να μειώνει τα προστατευτικά χαρακτηριστικά της HDL [58]. Αυτό θα μπορούσε να εξηγηθεί από την υψηλή συστηματική και αγγειακή φλεγμονή που προκαλείται από την αυξημένη Lp(a), η οποία οδηγεί στον μετασχηματισμό της HDL σε μια δυσλειτουργική μορφή, εξαλείφοντας τις προστατευτικές της επιδράσεις έναντι της αθηροσκλήρωσης [58]. Μελέτες αξιολόγησης της σχέσης μεταξύ των Lp(a), TG και HDL, ανέφεραν ότι η σχέση μεταξύ Lp(a) και HDL ποικίλλει ανάλογα με τα επίπεδα TG. Αυτές οι διάφορες αλληλεπιδράσεις μεταξύ της Lp(a) και της HDL είναι σημαντικές, καθώς μπορούν να βοηθήσουν στον καλύτερο έλεγχο του καρδιαγγειακού κινδύνου. Ωστόσο, απαιτείται περαιτέρω έρευνα για την πλήρη κατανόηση αυτής της σχέσης [60].

5.2 Συμπέρασμα

Τα χαμηλά επίπεδα αντιοξειδωτικής δραστηριότητας της PON1 σε συνδυασμό με τα υψηλά επίπεδα των αθηρογόνων σωματιδίων της SHDL στους Lp(a) υποδηλώνουν μεταβολές της λειτουργικότητας της HDL ως προς την προστατευτική της δράση για ASCVD. Η συνδυαστική αξιολόγηση των επιπέδων της PON1 και της κατανομής των υποκλασμάτων της HDL των ατόμων με Lp(a), μπορούν να αποτελέσουν καλύτερο βιοδείκτη κινδύνου για την ASCVD.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- [1] T. A. B. K.Kotsovasilis, "Lipoproteins and atherosclerosis," Athens, 2003.
- [2] H. B. Brewer, R. E. Gregg, J. M. Hoeg, and S. S. Fojo, "Apolipoproteins and lipoproteins in human plasma: an overview.," *Clin Chem*, vol. 34, no. 8B, pp. B4-8, 1988.
- [3] A. Gugliucci, "The chylomicron saga: time to focus on postprandial metabolism," *Front Endocrinol (Lausanne)*, vol. 14, Jan. 2024, doi: 10.3389/fendo.2023.1322869.
- [4] A. Al-Mamari, "Atherosclerosis and physical activity.," *Oman Med J*, vol. 24, no. 3, pp. 173–8, Jul. 2009, doi: 10.5001/omj.2009.34.
- [5] T. Miida *et al.*, "Homogeneous Assays for LDL-C and HDL-C are Reliable in Both the Postprandial and Fasting State," *J Atheroscler Thromb*, vol. 24, no. 6, pp. 583–599, 2017, doi: 10.5551/jat.40006.
- [6] A. Gugliucci, "Triglyceride-Rich Lipoprotein Metabolism: Key Regulators of Their Flux.," *J Clin Med*, vol. 12, no. 13, Jun. 2023, doi: 10.3390/jcm12134399.
- [7] A. Kontush, "HDL and Reverse Remnant-Cholesterol Transport (RRT): Relevance to Cardiovascular Disease," *Trends Mol Med*, vol. 26, no. 12, pp. 1086–1100, Dec. 2020, doi: 10.1016/j.molmed.2020.07.005.
- [8] A. Gugliucci, "The chylomicron saga: time to focus on postprandial metabolism.," *Front Endocrinol (Lausanne)*, vol. 14, p. 1322869, 2023, doi: 10.3389/fendo.2023.1322869.
- [9] D. P. K. T. A.Tselepis, "Κλινική Βιοχημεία-Διαγνωστική," Apr. 2024. doi: <http://dx.doi.org/10.57713/kallipos-964>.
- [10] D. Li and J. L. Mehta, "Oxidized LDL, a critical factor in atherogenesis.," *Cardiovasc Res*, vol. 68, no. 3, pp. 353–4, Dec. 2005, doi: 10.1016/j.cardiores.2005.09.009.
- [11] F. Brites, M. Martin, I. Guillas, and A. Kontush, "Antioxidative activity of high-density lipoprotein (HDL): Mechanistic insights into potential clinical benefit.," *BBA Clin*, vol. 8, pp. 66–77, Dec. 2017, doi: 10.1016/j.bbacli.2017.07.002.
- [12] A. Kontush, M. Lhomme, and M. J. Chapman, "Unraveling the complexities of the HDL lipidome.," *J Lipid Res*, vol. 54, no. 11, pp. 2950–63, Nov. 2013, doi: 10.1194/jlr.R036095.
- [13] C. C. Tellis and A. D. Tselepis, "The role of lipoprotein-associated phospholipase A2 in atherosclerosis may depend on its lipoprotein carrier in plasma," May 2009. doi: 10.1016/j.bbalip.2009.02.015.
- [14] A. D. Tselepis and M. John Chapman, "Inflammation, bioactive lipids and atherosclerosis: potential roles of a lipoprotein-associated phospholipase A2, platelet activating factor-acetylhydrolase.," *Atheroscler Suppl*, vol. 3, no. 4, pp. 57–68, Dec. 2002, doi: 10.1016/s1567-5688(02)00045-4.

- [15] T. Okada *et al.*, “Shotgun proteomic analysis reveals proteome alterations in HDL of patients with cholesteryl ester transfer protein deficiency.,” *J Clin Lipidol*, vol. 13, no. 2, pp. 317–325, 2019, doi: 10.1016/j.jacl.2019.01.002.
- [16] K.-H. Cho, “The Current Status of Research on High-Density Lipoproteins (HDL): A Paradigm Shift from HDL Quantity to HDL Quality and HDL Functionality,” *Int J Mol Sci*, vol. 23, no. 7, p. 3967, Apr. 2022, doi: 10.3390/ijms23073967.
- [17] A. von Eckardstein, B. G. Nordestgaard, A. T. Remaley, and A. L. Catapano, “High-density lipoprotein revisited: biological functions and clinical relevance.,” *Eur Heart J*, vol. 44, no. 16, pp. 1394–1407, Apr. 2023, doi: 10.1093/eurheartj/ehac605.
- [18] A. Kontush, “HDL-mediated mechanisms of protection in cardiovascular disease.,” *Cardiovasc Res*, vol. 103, no. 3, pp. 341–9, Aug. 2014, doi: 10.1093/cvr/cvu147.
- [19] T. Kuusi, P. Saarinen, and E. A. Nikkilä, “Evidence for the role of hepatic endothelial lipase in the metabolism of plasma high density lipoprotein2 in man,” *Atherosclerosis*, vol. 36, no. 4, pp. 589–593, Aug. 1980, doi: 10.1016/0021-9150(80)90251-8.
- [20] Y. Duan, K. Gong, S. Xu, F. Zhang, X. Meng, and J. Han, “Regulation of cholesterol homeostasis in health and diseases: from mechanisms to targeted therapeutics.,” *Signal Transduct Target Ther*, vol. 7, no. 1, p. 265, Aug. 2022, doi: 10.1038/s41392-022-01125-5.
- [21] Y. Yang, J. Wu, L. Wang, G. Ji, and Y. Dang, “Copper homeostasis and cuproptosis in health and disease.,” *MedComm (Beijing)*, vol. 5, no. 10, p. e724, Oct. 2024, doi: 10.1002/mco2.724.
- [22] C. Röhrli *et al.*, “Scavenger receptor, Class B, Type I provides an alternative means for beta-VLDL uptake independent of the LDL receptor in tissue culture.,” *Biochim Biophys Acta*, vol. 1801, no. 2, pp. 198–204, Feb. 2010, doi: 10.1016/j.bbali.2009.11.005.
- [23] A. Kontush, M. Lindahl, M. Lhomme, L. Calabresi, M. J. Chapman, and W. S. Davidson, “Structure of HDL: particle subclasses and molecular components.,” *Handb Exp Pharmacol*, vol. 224, pp. 3–51, 2015, doi: 10.1007/978-3-319-09665-0_1.
- [24] S. Arora, S. K. Patra, and R. Saini, “HDL-A molecule with a multi-faceted role in coronary artery disease.,” *Clin Chim Acta*, vol. 452, pp. 66–81, Jan. 2016, doi: 10.1016/j.cca.2015.10.021.
- [25] M. I. Mackness, S. Arrol, and P. N. Durrington, “Paraoxonase prevents accumulation of lipoperoxides in low-density lipoprotein.,” *FEBS Lett*, vol. 286, no. 1–2, pp. 152–4, Jul. 1991, doi: 10.1016/0014-5793(91)80962-3.
- [26] L. G. Costa, T. B. Cole, G. P. Jarvik, and C. E. Furlong, “Functional Genomics of the Paraoxonase (PON1) Polymorphisms: Effects on Pesticide Sensitivity, Cardiovascular Disease, and Drug Metabolism,” *Annu Rev Med*, vol. 54, no. 1, pp. 371–392, Feb. 2003, doi: 10.1146/annurev.med.54.101601.152421.
- [27] D. S. Kim, J. Marsillach, C. E. Furlong, and G. P. Jarvik, “Pharmacogenetics of paraoxonase activity: elucidating the role of high-density lipoprotein in disease.,”

- Pharmacogenomics*, vol. 14, no. 12, pp. 1495–515, Sep. 2013, doi: 10.2217/pgs.13.147.
- [28] F. Brites, M. Martin, I. Guillas, and A. Kontush, “Antioxidative activity of high-density lipoprotein (HDL): Mechanistic insights into potential clinical benefit.,” *BBA Clin*, vol. 8, pp. 66–77, Dec. 2017, doi: 10.1016/j.bbacli.2017.07.002.
- [29] J. F. Teiber, G. L. Kramer, J. A. de Lemos, M. H. Drazner, and R. W. Haley, “Abstract 17217: Serum Paraoxonase 1 (PON1) Activity is Associated With Indices of Hypertensive Heart Disease and Cardiac Remodeling in the Dallas Heart Study Population,” *Circulation*, vol. 132, no. suppl_3, Nov. 2015, doi: 10.1161/circ.132.suppl_3.17217.
- [30] N. Shunmoogam, P. Naidoo, and R. Chilton, “Paraoxonase (PON)-1: a brief overview on genetics, structure, polymorphisms and clinical relevance.,” *Vasc Health Risk Manag*, vol. 14, pp. 137–143, 2018, doi: 10.2147/VHRM.S165173.
- [31] D. S. Kim *et al.*, “Dietary cholesterol increases paraoxonase 1 enzyme activity.,” *J Lipid Res*, vol. 53, no. 11, pp. 2450–8, Nov. 2012, doi: 10.1194/jlr.P030601.
- [32] M. Morvaridzadeh, N. Zoubdane, J. Heshmati, M. Alami, H. Berrougui, and A. Khalil, “High-Density Lipoprotein Metabolism and Function in Cardiovascular Diseases: What about Aging and Diet Effects?,” *Nutrients*, vol. 16, no. 5, p. 653, Feb. 2024, doi: 10.3390/nu16050653.
- [33] B. A. Di Bartolo, P. J. Psaltis, C. A. Bursill, and S. J. Nicholls, “Translating Evidence of HDL and Plaque Regression.,” *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, vol. 38, no. 9, pp. 1961–1968, Sep. 2018, doi: 10.1161/ATVBAHA.118.307026.
- [34] C. Madaudo *et al.*, “Dysfunctional High-Density Lipoprotein Cholesterol and Coronary Artery Disease: A Narrative Review.,” *J Pers Med*, vol. 14, no. 9, Sep. 2024, doi: 10.3390/jpm14090996.
- [35] C. R. White, G. Datta, and S. Giordano, “High-Density Lipoprotein Regulation of Mitochondrial Function.,” *Adv Exp Med Biol*, vol. 982, pp. 407–429, 2017, doi: 10.1007/978-3-319-55330-6_22.
- [36] M. Tohidi, M. Hatami, F. Hadaegh, and F. Azizi, “Triglycerides and triglycerides to high-density lipoprotein cholesterol ratio are strong predictors of incident hypertension in Middle Eastern women.,” *J Hum Hypertens*, vol. 26, no. 9, pp. 525–32, Sep. 2012, doi: 10.1038/jhh.2011.70.
- [37] M. F. Linton, P. G. Yancey, H. Tao, and S. S. Davies, “HDL Function and Atherosclerosis: Reactive Dicarbonyls as Promising Targets of Therapy.,” *Circ Res*, vol. 132, no. 11, pp. 1521–1545, May 2023, doi: 10.1161/CIRCRESAHA.123.321563.
- [38] A. Langsted, A. M. R. Jensen, A. Varbo, and B. G. Nordestgaard, “Low High-Density Lipoprotein Cholesterol to Monitor Long-Term Average Increased Triglycerides,” *J Clin Endocrinol Metab*, vol. 105, no. 4, pp. e1657–e1666, Apr. 2020, doi: 10.1210/clinem/dgz265.

- [39] A. von Eckardstein, B. G. Nordestgaard, A. T. Remaley, and A. L. Catapano, "High-density lipoprotein revisited: biological functions and clinical relevance.," *Eur Heart J*, vol. 44, no. 16, pp. 1394–1407, Apr. 2023, doi: 10.1093/eurheartj/ehac605.
- [40] M. Cardner *et al.*, "Structure-function relationships of HDL in diabetes and coronary heart disease," *JCI Insight*, vol. 5, no. 1, Jan. 2020, doi: 10.1172/jci.insight.131491.
- [41] M. T. Soria-Flórido, H. Schröder, M. Grau, M. Fitó, and C. Lassale, "High density lipoprotein functionality and cardiovascular events and mortality: A systematic review and meta-analysis.," *Atherosclerosis*, vol. 302, pp. 36–42, Jun. 2020, doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2020.04.015.
- [42] S. Kuusisto *et al.*, "Genetic and observational evidence: No independent role for cholesterol efflux over static high-density lipoprotein concentration measures in coronary heart disease risk assessment.," *J Intern Med*, vol. 292, no. 1, pp. 146–153, Jul. 2022, doi: 10.1111/joim.13479.
- [43] P. Natarajan *et al.*, "Association of an HDL Apolipoproteomic Score With Coronary Atherosclerosis and Cardiovascular Death.," *J Am Coll Cardiol*, vol. 73, no. 17, pp. 2135–2145, May 2019, doi: 10.1016/j.jacc.2019.01.073.
- [44] Emerging Risk Factors Collaboration *et al.*, "Major lipids, apolipoproteins, and risk of vascular disease.," *JAMA*, vol. 302, no. 18, pp. 1993–2000, Nov. 2009, doi: 10.1001/jama.2009.1619.
- [45] C. M. Madsen, A. Varbo, and B. G. Nordestgaard, "Extreme high high-density lipoprotein cholesterol is paradoxically associated with high mortality in men and women: two prospective cohort studies.," *Eur Heart J*, vol. 38, no. 32, pp. 2478–2486, Aug. 2017, doi: 10.1093/eurheartj/ehx163.
- [46] S. Tsimikas, "A Test in Context: Lipoprotein(a) Diagnosis, Prognosis, Controversies, and Emerging Therapies," 2017.
- [47] M. B. Boffa and M. L. Koschinsky, "Lipoprotein (a): truly a direct prothrombotic factor in cardiovascular disease?," *J Lipid Res*, vol. 57, no. 5, pp. 745–57, May 2016, doi: 10.1194/jlr.R060582.
- [48] F. Kronenberg, "Human Genetics and the Causal Role of Lipoprotein(a) for Various Diseases.," *Cardiovasc Drugs Ther*, vol. 30, no. 1, pp. 87–100, Feb. 2016, doi: 10.1007/s10557-016-6648-3.
- [49] A. D. Koutsogianni, E. Liberopoulos, K. Tellis, and A. D. Tselepis, "Oxidized phospholipids and lipoprotein(a): An update," Apr. 01, 2022, *John Wiley and Sons Inc.* doi: 10.1111/eci.13710.
- [50] C. Yeang, B. Cotter, and S. Tsimikas, "Experimental Animal Models Evaluating the Causal Role of Lipoprotein(a) in Atherosclerosis and Aortic Stenosis.," *Cardiovasc Drugs Ther*, vol. 30, no. 1, pp. 75–85, Feb. 2016, doi: 10.1007/s10557-015-6634-1.
- [51] R. Romagnuolo, C. A. Scipione, M. B. Boffa, S. M. Marcovina, N. G. Seidah, and M. L. Koschinsky, "Lipoprotein(a) catabolism is regulated by proprotein convertase

- subtilisin/kexin type 9 through the low density lipoprotein receptor.," *J Biol Chem*, vol. 290, no. 18, pp. 11649–62, May 2015, doi: 10.1074/jbc.M114.611988.
- [52] S. Tsimikas, "A Test in Context: Lipoprotein(a): Diagnosis, Prognosis, Controversies, and Emerging Therapies.," *J Am Coll Cardiol*, vol. 69, no. 6, pp. 692–711, Feb. 2017, doi: 10.1016/j.jacc.2016.11.042.
- [53] H. J. Milionis, D. P. Mikhailidis, and A. F. Winder, "Platelets and lipoprotein (a): a brief overview of their role in the pathogenesis of atherothrombosis.," *Platelets*, vol. 10, no. 5, pp. 277–84, 1999, doi: 10.1080/09537109975906.
- [54] L. D. Tsironis, J. V Mitsios, H. J. Milionis, M. Elisaf, and A. D. Tselepis, "Effect of lipoprotein (a) on platelet activation induced by platelet-activating factor: role of apolipoprotein (a) and endogenous PAF-acetylhydrolase.," *Cardiovasc Res*, vol. 63, no. 1, pp. 130–8, Jul. 2004, doi: 10.1016/j.cardiores.2004.03.005.
- [55] R. S. Rosenson *et al.*, "Dysfunctional HDL and atherosclerotic cardiovascular disease," Jan. 01, 2016, *Nature Publishing Group*. doi: 10.1038/nrcardio.2015.124.
- [56] X. P. Yang *et al.*, "Scavenger receptor-BI is a receptor for lipoprotein(a).," *J Lipid Res*, vol. 54, no. 9, pp. 2450–2457, Sep. 2013, doi: 10.1194/jlr.M038877.
- [57] O. E. Johansen, D. Neubacher, M. von Eynatten, S. Patel, and H. J. Woerle, "Cardiovascular safety with linagliptin in patients with type 2 diabetes mellitus: A pre-specified, prospective, and adjudicated meta-analysis of a phase 3 programme," *Cardiovasc Diabetol*, vol. 11, Jan. 2012, doi: 10.1186/1475-2840-11-3.
- [58] C. Al Hageh *et al.*, "Elevated Lp(a) Levels Correlate with Severe and Multiple Coronary Artery Stenotic Lesions," *Vasc Health Risk Manag*, vol. 19, pp. 31–41, 2023, doi: 10.2147/VHRM.S394134.
- [59] M. Konerman, K. Kulkarni, P. P. Toth, and S. R. Jones, "Evidence of dependence of lipoprotein(a) on triglyceride and high-density lipoprotein metabolism," *J Clin Lipidol*, vol. 6, no. 1, pp. 27–32, Jan. 2012, doi: 10.1016/j.jacl.2011.08.004.
- [60] H. Sheashaa *et al.*, "Interaction Between Lipoprotein(a) and Other Lipid Molecules: A Review of the Current Literature," Feb. 01, 2025, *Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI)*. doi: 10.3390/biom15020162.
- [61] A. Krześcińska *et al.*, "Reduced Oxidative Susceptibility of Lp(a) and LDL Fractions as a Pleiotropic Effect of Lipoprotein Apheresis in Patients with Elevated Lp(a) and ASCVDs," *Int J Mol Sci*, vol. 25, no. 24, Dec. 2024, doi: 10.3390/ijms252413597.
- [62] W. De Gruyter, · Berlin, · New, Y. P. M. Laplaud, T. Dantoine, and M. J. Chapman, "Paraoxonase as a Risk Marker for Cardiovascular Disease: Facts and Hypotheses 1)," 1998.
- [63] R. J. Richter, G. P. Jarvik, and C. E. Furlong, "Determination of paraoxonase 1 status without the use of toxic organophosphate substrates.," *Circ Cardiovasc Genet*, vol. 1, no. 2, pp. 147–152, 2008, doi: 10.1161/CIRCGENETICS.108.811638.

- [64] K. H. Cho, “The Current Status of Research on High-Density Lipoproteins (HDL): A Paradigm Shift from HDL Quantity to HDL Quality and HDL Functionality,” Apr. 01, 2022, *MDPI*. doi: 10.3390/ijms23073967.