ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΛΟΥΚΑ Δ. ΤΣΙΡΩΝΗ
ΧΗΜΙΚΟΥ

ΤΗ ΤΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ ΠΟΥ ΕΠΗΡΕΑΖΟΥΝ ΤΗΝ ΓΟΤΗΤΑ ΤΗΣ PAF - ΑΚΕΤΥΛΟΫΔΡΟΛΑΣΗΣ ΣΤΗΝ ΙΡΩΤΕΪΝΗ (a). ΡΟΛΟΣ ΣΤΗΝ ΑΘΗΡΟΘΡΟΜΒΩΣΗ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2003

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΛΟΥΚΑ Δ. ΤΣΙΡΩΝΗ
ΧΗΜΙΚΟΥ

ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ ΠΟΥ ΕΠΗΡΕΑΖΟΥΝ ΤΗΝ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑ ΤΗΣ PAF - ΑΚΕΤΥΛΟΫΔΡΟΛΑΣΗΣ ΣΤΗΝ ΛΙΠΟΠΡΩΤΕΪΝΗ (a). ΡΟΛΟΣ ΣΤΗΝ ΑΘΗΡΟΘΡΟΜΒΩΣΗ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2003

Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από το Τμήμα Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνωμών του συγγραφέα (Ν. 5343/1932, άρθρο 202).

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ
ΤΟΜΕΑΣ ΟΡΓΑΝΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ
Εργαστήριο Βιοχημείας *"Ερευνητικό Εργαστήριο Λιπιδίων-Λιποπρωτεϊνών"*
Αλέξανδρος Τσελέπης
Αναπληρωτής Καθηγητής Βιοχημείας

Ιωάννινα, 17-4-2003

Η επταμελής Εξεταστική Επιτροπή που ορίστηκε για την κρίση της Διδακτορικής Διατριβής του κ. Λουκά Τσιρώνη Χημικού, συνήλθε σε συνεδρίαση στο Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων την Πέμπτη 17 Απριλίου 2003, όπου παρακολούθησε την υποστήριξη της διατριβής με τίτλο: **"Μελέτη των παραγόντων που επηρεάζουν την ενεργότητα της PAF-ακετυλοϋδρολάσης στην λιποπρωτεΐνη(a). Ρόλος στην αθηροθρόμβωση"**.

Η επιτροπή έκρινε ομόφωνα ότι η διατριβή είναι πρωτότυπη, και αποτελεί ουσιαστική συμβολή στην πρόοδο της Επιστήμης, η δε κατάρτιση του υποψήφιου είναι ευρεία και ολοκληρωμένη. Με βάση τα παραπάνω η Εξεταστική Επιτροπή αποφάσισε να γίνει η απονομή του τίτλου του διδάκτορα από το Τμήμα Χημείας του Παν/μίου στον κ. Λουκά Τσιρώνη με βαθμό **Άριστα**.

Με τιμή

Τα μέλη της εξεταστικής Επιτροπής

1. Αλέξανδρος Τσελέπης, Αναπληρωτής Καθηγητής Βιοχημείας Παν/μίου Ιωαννίνων
2. Κων/νος Δημόπουλος, Καθηγητής Βιοχημείας Παν/μίου Αθηνών
3. Κων/νος Δραΐνας, Καθηγητής Βιοχημείας Παν/μίου Ιωαννίνων
4. Μωϋσής Ελισάφ, Καθηγητής Παθολογίας Παν/μίου Ιωαννίνων
5. Μαρία Σακαρέλλου, Καθηγήτρια Βιοχημείας Παν/μίου Ιωαννίνων
6. Ιωάννης Γουδέβενος, Αναπληρωτής Καθηγητής Καρδιολογίας Παν/μίου Ιωαννίνων
7. Δημόκριτος Τσουκάτος, Αναπληρωτής Καθηγητής Βιοχημείας Παν/μίου Ιωαννίνων

Δουρούτη, 45110 Ιωάννινα. Τηλ: 2651 098365, Fax: 2651 047832, e-mail: atselep@cc.uoi.gr

Στην οικογένειά μου,

με απέραντη ευγνωμοσύνη

Η εργασία αυτή εκπονήθηκε στο τμήμα Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων και συγκεκριμένα στον Τομέα Οργανικής Χημείας και Βιοχημείας (Ερευνητικό Εργαστήριο Λιπιδίων και Λιποπρωτεϊνών), από τον Οκτώβριο του 1998 έως τον Νοέμβριο του 2002.

Ευχαριστώ θερμά τον επιβλέποντα κ. Αλέξανδρο Τσελέπη Αναπληρωτή Καθηγητή Βιοχημείας του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, ο οποίος παρά τον φόρτο των υποχρεώσεών του δεν μου αρνήθηκε ποτέ καμία βοήθεια, τόσο στο πειραματικό όσο και στο συγγραφικό κομμάτι της διατριβής αυτής. Οφείλω ένα μεγάλο ευχαριστώ στον κ. Μωυσή Ελισάφ Καθηγητή Παθολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων για τον άψογο συντονισμό στη λήψη των κλινικών δειγμάτων. Για τον ίδιο λόγο θα ήθελα να ευχαριστήσω την φίλη Ιατρό Άννα Κακαφήκα, τον κ. Χαράλαμπο Μηλιώνη Λέκτορα Παθολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων καθώς και τον κ. Χρήστο Κατσούρα Λέκτορα Καρδιολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω και τον κ. Δημόκριτο Τσουκάτο Αναπληρωτή Καθηγητή Βιοχημείας του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, για τις εύστοχες παρατηρήσεις του σχετικά με την τελική μορφή των αποτελεσμάτων της διατριβής μου.

Ευχαριστώ το φίλο και συνάδελφο Γιάννη Μήτσιο για τις χρήσιμες υποδείξεις του στον τρόπο χειρισμού του κυτταρομέτρου ροής Becton Dickinson καθώς και τη φίλη και συνάδελφο Ευαγγελία Λουρίδα για τον τρόπο χειρισμού του φωτομέτρου Spectra Max 190 στα πειράματα της οξείδωσης αλλά και για τις εύστοχες παρατηρήσεις της σχετικά με την άρτια εμφάνιση των κειμένων. Επίσης χαίρομαι που γνώρισα από κοντά την συνάδελφο και φίλη Αφροδίτη Ταμπάκη, γιατί μου έδειξε τον τρόπο να κοιτάζω τα προβλήματα από διαφορετική οπτική γωνία. Ιδιαίτερα ευχαριστώ την συνάδελφο και φίλη Δρ. Σόνια-Αθηνά Καραμπίνα για το ανιδιοτελές ενδιαφέρον και τις πολύτιμες συμβουλές της. Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τα υπόλοιπα μέλη της ερευνητικής μου ομάδας: Αλεξάνδρα Τσουπινάκη, Ελένη Παπαβασιλείου και Φωτεινή Ρόδη καθώς και τα υπόλοιπα μέλη του Εργαστηρίου για την άψογη συνεργασία που είχαμε όλα αυτά τα χρόνια.

Τέλος, οφείλω ένα μεγάλο ευχαριστώ στην οικογένειά μου, η οποία αποτελεί πηγή έμπνευσης και δύναμης σε οποιοδήποτε εγχείρημά μου, για την ηθική και υλική συμπαράσταση όλα αυτά τα χρόνια. Εύχομαι η διατριβή αυτή να ανταμείψει τις αμέτρητες θυσίες και κόπους τους για μένα.

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

Είναι γνωστό ότι το σωματίδιο της λιποπρωτεΐνης (a) [Lp(a)] περιέχει ενεργότητα ακετυλοϋδρολάσης του παράγοντα ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων (PAF-AH) η οποία εξαρτάται τόσο από τα επίπεδα της στο πλάσμα όσο και από το μέγεθος της ισομορφής της. Έτσι ένα λειτουργικό χαρακτηριστικό της Lp(a) είναι η υδρόλυση και απενεργοποίηση του PAF αλλά και των οξειδωμένων φωσφολιπιδίων, μόρια τα οποία ασκούν προφλεγμονώδη και προαθηρογόνο δράση. Αρχικός σκοπός της διατριβής αυτής ήταν η μελέτη της ενεργότητας καθώς και των φαινόμενων κινητικών σταθερών Km και Vmax της PAF-AH στην Lp(a) σε σχέση με αυτή του ενζύμου της χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνης (LDL) σε στεφανιαίους ασθενείς καθώς και σε υγιείς μάρτυρες. Επειδή οι όλοι στεφανιαίοι ασθενείς της μελέτης ελάμβαναν υπολιπιδαιμική θεραπεία (ατορβαστατίνη) εξετάστηκε η πιθανή δράση αυτής στις παραπάνω παραμέτρους, ενώ παράλληλα ιδιαίτερο ενδιαφέρον δόθηκε και στο ρόλο της πολυπεπτιδικής αλυσίδας της apo(a).

Παράλληλα, τα τελευταία χρόνια έχει δοθεί ιδιαίτερο ενδιαφέρον ως προς το ρόλο των λιποπρωτεϊνών του πλάσματος [συμπεριλαμβανομένης και της Lp(a)] στην ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων. Ένας μικρός αριθμός πρόσφατων μελετών που επικεντρώθηκε στην αλληλεπίδραση της Lp(a) με τα αιμοπετάλια κατέληξε σε αντικρουόμενα αποτελέσματα καθιστώντας αδιευκρίνιστο τον πιθανό παθοφυσιολογικό ρόλο της λιποπρωτεΐνης αυτής στην θρόμβωση. Μέχρι σήμερα δεν υπάρχουν δεδομένα σχετικά με την δράση της Lp(a) στα αιμοπετάλια μετά από ενεργοποίηση με PAF, ο οποίος εκτός από υπόστρωμα για την PAF-AH παράλληλα αποτελεί και ισχυρό αγωνιστή για τα κύτταρα αυτά. Έτσι επόμενος στόχος της διατριβής αυτής ήταν η μελέτη της επίδρασης της λιποπρωτεΐνης αυτής στην ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων με PAF, τόσο σε πλάσμα πλούσιο σε αιμοπετάλια (PRP), όσο και σε σύστημα πλυμένων αιμοπεταλίων.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ

AA: αραχιδονικό οξύ

ACA: αμινοκαπροϊκό οξύ

ADP: διφωσφορική αδενοσίνη

Ala: αλανίνη

ALF: παράγοντας ασταθής στα οξέα

apo: απολιποπρωτεΐνη

APS: υπερθειϊκό αμμώνιο

Arg: αργινίνη

Asp:ασπαραγινικό

ATP: τριφωσφορική αδενοσίνη

β_2-GPI: β_2-γλυκοπρωτεΐνη τύπου I

BSA: αλβουμίνη από ορό βοδιού

β-TG: β-θρομβογλοβούλινη

c-AMP: κυκλική μονοφωσφορική αδενοσίνη

cDNA:συμπληρωματικό δεοξυριβονουκλεϊκό οξύ

CDP: διφωσφορική κυτιδίνη

CL: καρδιολιπίνη

Cox: κυκλοξυγονάση

CP: φωσφοκρεατίνη

CPK: κινάση της φωσφοκρεατίνης

cpm:κρούσεις ανά λεπτό

Cys: κυστεΐνη

DAG: διάκυλογλυκερόλη

DFP: διϊσοπροπυλοφθοριοφωσφορικό

DNA: δεοξυριβονουκλεϊκό οξύ

DTNB: 5,5-διθειο-δις-(2-νιτροβενζοϊκό οξύ)

DTT: διθειοθρεϊτόλη

EDTA: αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ

Ε.Ε.: Ειδική Ενεργότητα

Fg: ινωδογόνο

Fg-FITC: ινωδογόνο επισημασμένο με FITC

Gly: γλυκίνη

GTP: τριφωσφορική γουανοσίνη

H_2O_2: υπεροξείδιο του υδρογόνου

HDL: υψηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνη

$HepG_2$: σειρά από κύτταρα ηπατώματος

HETE: υδροξυεικοσατριένιο

His: ιστιδίνη

HMG-CoA: 3-υδρόξυ-3-μέθυλο-συνένζυμο A

HRP: υπεροξειδάση αγριοραπανιού

HUVECs: ανθρώπινα ενδοθηλιακά κύτταρα από ομφάλιο λώρο

ICAM-1: διακυτταρικό μόριο προσκολλήσεως τύπου 1

Ile: ισολευκίνη

IP_3: τριφωσφορική ινοσιτόλη

kDa: κιλοντάλτον

LDL: χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνη

LCAT: λεκιθινο-χοληστερολο-ακυλτρανσφεράση

Leu: λευκίνη

Lp(a): λιποπρωτεΐνη (a)

Lyso-PAF: λύσο- PAF

LT: λευκοτριένιο

Met:μεθειονίνη

MB: μοριακό βάρος

MFI: μέση ένταση φθορισμού

mRNA:αγγελιοφόρο ριβονουκλεϊκό οξύ

ox-LDL: οξειδωμένη LDL

PAF: παράγοντας ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων

PAF-AH: PAF-ακετυλοϋδρολάση

PAF-LL: οξειδωμένα φωσφολιπίδια που παρουσιάζουν παρόμοια δράση με τον PAF

PAGE: πολυακριλαμίδιο

PAI-1: αναστολέας του ενεργοποιητή του πλασμινογόνου-1

pBPB: p-βρωμοφαίνυλοβρωμίδιο

PBS: ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών

PDGF: αυξητικός παράγοντας των αιμοπεταλίων-B

PF4: αιμοπεταλιακός παράγοντας 4

PG: προσταγλανδίνη

Phe: φαινυλαλανίνη

PI: φωσφατιδυλοϊνοσίτης

PLA_2: φωσφολιπάση A_2

PLC: φωσφολιπάση C

PMSF: φαινυλομεθυλοσουλφονυλοφθορίδιο

PPP: πλάσμα φτωχό σε αιμοπετάλια

PRP: πλάσμα πλούσιο σε αιμοπετάλια

PS: φωσφατιδύλοσερίνη

PTK: τυροσινική κινάση

PVDF: μεμβράνη μεταφοράς πρωτεϊνών Polyscreen

Ser: σερίνη

-sn-: στερεοειδική αρίθμηση

TCA: τριχλωροξεικό οξύ

TEMED: N,N-τετραμέθυλοαιθυλενοδιαμίνη

TGF-β: μετασχηματίζων αυξητικός παράγοντας-β

TNF: παράγοντας νέκρωσης όγκων

tPA: ιστικός ενεργοποιητής του πλασμινογόνου

TxA_2: θρομβοξάνιο A_2

Val: βαλίνη

VCAM-1: μόριο προσκολλήσεως των αγγειακών κυττάρων τύπου 1

VHDL: πολύ υψηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνη

VLDL: πολύ χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνη

XMBI: χαμηλού μοριακού βάρους ισομορφή

YMBI: υψηλού μοριακού βάρους ισομορφή

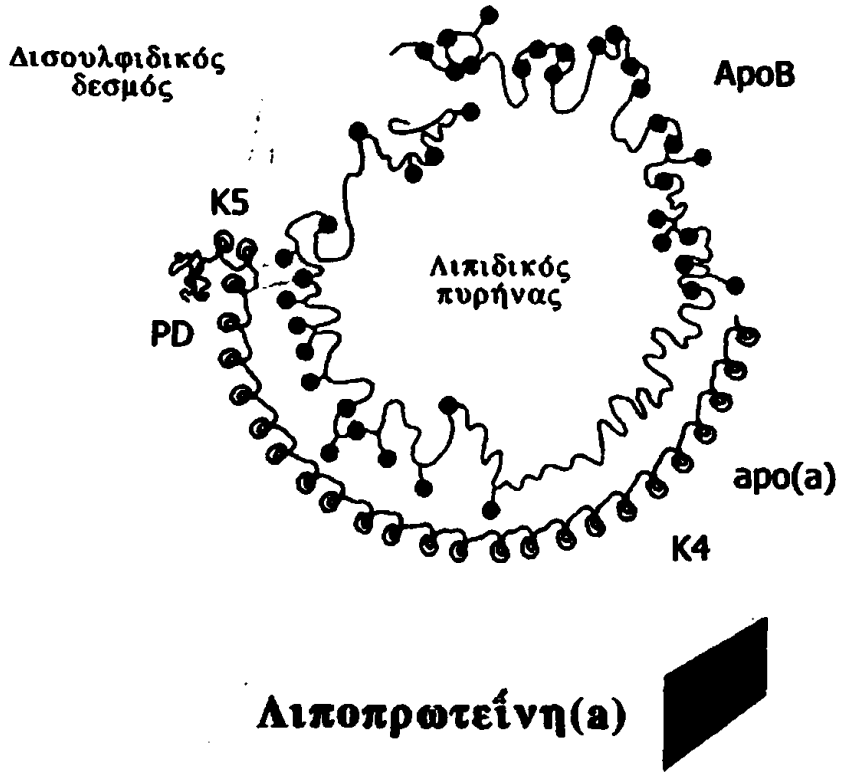
ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΠΡΩΤΟ

ΛΙΠΟΠΡΩΤΕΪΝΗ (a)

Ιστορική αναδρομή

Η λιποπρωτεΐνη(a) ανακαλύφθηκε το 1963 από τον Kare Berg σαν ένα νέο αντιγόνο του πλάσματος. Ο Berg παρατήρησε ότι κουνέλια τα οποία ήταν ανοσοποιημένα με ανθρώπινες χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνες (LDL) παρήγαγαν αντισώματα τα οποία αντιδρούσαν με ένα αντιγονικό συστατικό το οποίο φαινόταν να είναι παρών εντός του κλάσματος της LDL μερικών μόνο από τους δότες (1). Ο Berg στο νέο αυτό αντιγόνο έδωσε το όνομα λιποπρωτεΐνη(a) [Lp(a)], με το Lp να συμβολίζει την λιποπρωτεΐνη η οποία μεταφέρει στο πλάσμα το αντιγόνο (a).

Την ίδια περίοδο με μια άλλη μελέτη οι Berg και Mohr (2) πρότειναν ότι η παρουσία της Lp(a) στο πλάσμα καθορίζεται γενετικά και μάλιστα κληρονομείται με αυτοσωμικό επικρατούντα χαρακτήρα. Αργότερα βρέθηκε ότι η λιποπρωτεΐνη η οποία φέρει το αντιγόνο (a) περιέχει πολύ μεγαλύτερο ποσοστό υδατανθράκων σε σχέση την LDL λιποπρωτεΐνη ενώ σε αντίθεση με αυτή παρουσιάζει προ-β-ηλεκτροφορητική κινητικότητα σε πήκτωμα αγαρόζης (3). Υπερφυγοκέντρηση ανθρώπινου ορού έδειξε ότι οι πολύ χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνες (VLDL) με προ-β-ηλεκτροφορητική κινητικότητα επιπλέουν ενώ η Lp(a) καταβυθίζεται, έτσι το αντιγονικό σύστημα της Lp(a) έγινε γνωστό ως "καταβυθιζόμενη προ-β-λιποπρωτεΐνη" (4). Μεταγενέστερες μελέτες ταυτοποίησαν την παρουσία στο σωματίδιο της Lp(a) μιας υδρόφιλης μεγάλου MB γλυκοπρωτεΐνης η οποία απουσίαζε από τις υπόλοιπες γνωστές λιποπρωτεΐνες (5-7). Η γλυκοπρωτεΐνη αυτή ονομάστηκε απολιποπρωτεΐνη(a), [apo(a)]. Το 1987 μελέτη των Fless και Scanu (8) απέδειξε μια αξιοσημείωτη δομική ομολογία μεταξύ της apo(a) και του πλασμινογόνου, ενός ζυμογόνου το οποίο συμμετέχει στην πήξη του αίματος και στην ινωδόλυση. Τα πιο πάνω πειραματικά ευρήματα κατέστησαν ξεκάθαρο το γεγονός ότι η Lp(a) δεν είναι απλώς μια γενετική ποικιλομορφία της LDL όπως αρχικά πιστεύονταν, αλλά ένα σωματίδιο ανοσοχημικά και φυσικοχημικά διάφορο από αυτή, παρόλο το κοινό τους γνώρισμα την απολιποπρωτεΐνη apoB-100.



Εικόνα 1. Η δομή του σωματιδίου της Lp(a).

Δομή της Lp(a)

Μελέτες ηλεκτρονικής μικροσκοπίας υποδηλώνουν ότι το σωματίδιο της Lp(a) είναι σφαιρικό με την διάμετρο του να κυμαίνεται από 210-262 A^0. Πρόκειται για ένα σωματίδιο το οποίο αποτελείται από ένα υδρόφοβο πυρήνα πλούσιο σε εστέρες χοληστερόλης και τριγλυκερίδια ενώ η πολική του επιφάνεια απαρτίζεται από φωσφολιπίδια, ελεύθερη χοληστερόλη και τις απολιποπρωτεΐνες apoB-100 και apo(a), (εικόνα 1). Το μοριακό βάρος της Lp(a) κυμαίνεται από 4.600-5.600 KDa όπως προσδιορίστηκε με χρωματογραφία μοριακής διήθησης και ισορροπία καθίζησης. Οι ιδιαίτερες φυσικοχημικές ιδιότητες του σωματιδίου αυτού δεν του επιτρέπουν τον διαχωρισμό και την ταξινόμηση με την χρησιμοποίηση των τεχνικών της ηλεκτροφόρησης ή της υπερφυγοκέντρησης. Ηλεκτροφορητικά η Lp(a) εμφανίζει προ-β κινητικότητα παρόμοια με αυτή της VLDL, πράγμα το οποίο οι Morrisett και συν. απέδωσαν στην υψηλή συγκέντρωση της apo(a) σε σιαλικό οξύ η οποία αυξάνει

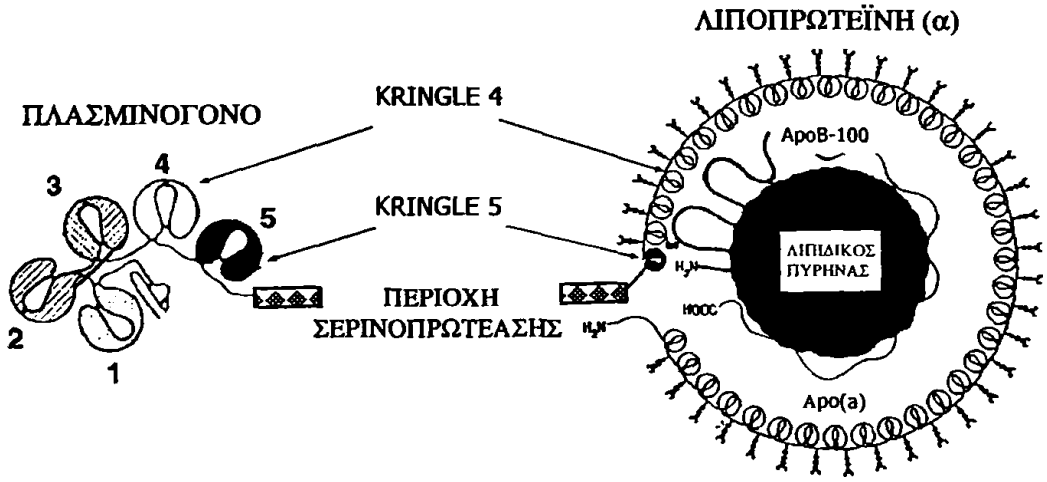
το καθαρό αρνητικό φορτίο του σωματιδίου και κατά συνέπεια την ανοδική μετανάστευση αυτού σε πήκτωμα αγαρόζης (9). Η περιοχή πυκνότητας της Lp(a) (1.050-1.100 g/ml) βρίσκεται μεταξύ αυτών της LDL (1.019-1.063 g/ml) και της υψηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνης (HDL) (1.063-1.210 g/ml) με αποτέλεσμα να είναι δύσκολος ο διαχωρισμός από αυτές με χρήση υπερφυγοκεντρικής τεχνικής (10).

Το 1983 οι Gaubatz και συν. (5), έδειξαν πρώτοι ότι όταν το σωματίδιο της Lp(a) εκτεθεί στην δράση ήπιων αναγωγικών αντιδραστηρίων όπως είναι η διθειοθρεϊτόλη, η οποία ανάγει κυστεϊνικές γέφυρες, χάνει την apo(a) η οποία αποτελεί τον χαρακτηριστικό δείκτη αυτού. Τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαιώθηκαν ένα χρόνο αργότερα από τους Fless και συν. (7) οι οποίοι εκτέλεσαν παρόμοια πειράματα χρησιμοποιώντας μερκαπτοαιθανόλη η οποία έχει δράση ανάλογη της διθειοθρεϊτόλης. Το λιποπρωτεϊνικό σωματίδιο που απομένει μετά την αναγωγή είναι γνωστό στην βιβλιογραφία σαν Lp(a-) και παρουσιάζει παρόμοιες φυσικοχημικές ιδιότητες με την LDL. Η αναγωγική αυτή σχάση οδήγησε στο συμπέρασμα πως το μόριο της apo(a) και το μόριο της Lp(a-) συνδέονται μέσω δισουλφιδικής γέφυρας. Η ομάδα του Jan (11) απέδειξε ότι ο δισουλφιδικός αυτός δεσμός σχηματίζεται μεταξύ δύο κυστεϊνών [Cys], της Cys 3734 που υπάρχει στην apoB-100 και της Cys 4074 που υπάρχει στην apo(a).

Δομή της apo(a) – Φαινότυποι

Η Lp(a) αποτελείται από έναν λιπιδιακό πυρήνα παρόμοιας σύστασης με αυτόν της LDL και περιβάλλεται από τις απολιποπρωτεΐνες apoB-100 (που αποτελεί κύριο δομικό συστατικό της LDL) και apo(a). Η στοιχειομετρία των δύο απολιποπρωτεϊνών στο σωματίδιο της Lp(a) δεν έχει ακόμη ταυτοποιηθεί. Αρκετές μελέτες αποδεικνύουν ότι τα περισσότερα σωματίδια της Lp(a) περιέχουν από ένα μόριο apoB-100 και apo(a) (12), ωστόσο υπάρχουν και κάποιες που υποστηρίζουν την ύπαρξη δύο μορίων apo(a) (13). Τα μόρια των δύο αυτών απολιποπρωτεϊνών συνδέονται με ένα ομοιοπολικό δεσμό, ενώ σημαντικός είναι και ο ρόλος μη ομοιοπολικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ αυτών οι οποίες συμβάλουν στην αρχική τους προσέγγιση (14-16).

Η apo(a) είναι μια έντονα γλυκοζυλιωμένη, υδρόφιλη πρωτεΐνη η οποία παρουσιάζει πολύ μικρή έλξη με τα λιπίδια. Η απολιποπρωτεΐνη αυτή παρουσιάζει σημαντική ετερογένεια μεγέθους με την μοριακή της μάζα να κυμαίνεται από 300 kDa μέχρι 800 kDa (7-17). Το υδατανθρακικό περιεχόμενο υπολογίζεται ότι αποτελεί περίπου το 28% αυτής με μοριακή αναλογία 3:7:5:4:7 σε μαννόζη, γαλακτόζη, γαλακτοζαμίνη, γλυκοζαμίνη και σιαλικό οξύ, αντίστοιχα. Η ετερογένεια η οποία χαρακτηρίζει το μέγεθος της apo(a) είναι κυρίως αποτέλεσμα διακύμανσης του μήκους της πολυπεπτιδικής αυτής αλυσίδας, ενώ η συνεισφορά του βαθμού γλυκοζυλίωσης (ο οποίος καθορίζει τις αλληλεπιδράσεις του μορίου της Lp(a) με άλλά μακρομόρια) φαίνεται να είναι από μικρός έως αμελητέος (10-18).

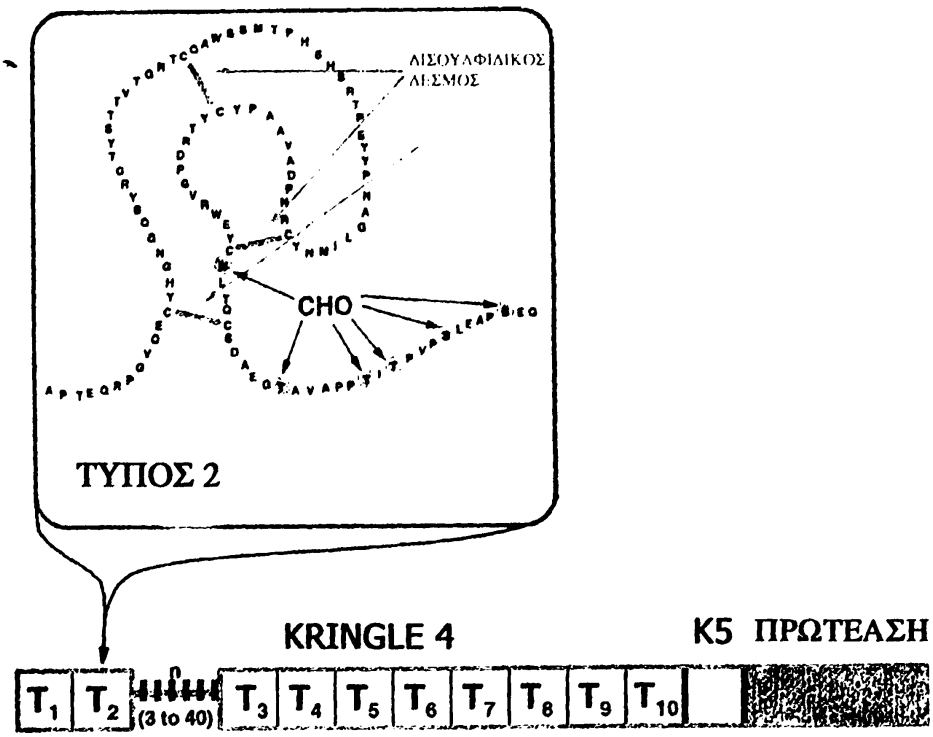


Εικόνα 2. Δομική ομολογία Lp(a) και πλασμινογόνου.

Ανάλυση του cDNA της apo(a) από τους Mc Lean και συν. (19) αποκάλυψε μια υψηλού βαθμού ομολογία μεταξύ της apo(a) και του ζυμογόνου πλασμινογόνο (εικόνα 2). Το πλασμινογόνο περιέχει μια περιοχή πρωτεάσης και ένα αντίγραφο από πέντε περιοχές οι οποίες είναι γνωστές ως «kringles» και υποδηλώνονται ως K1-K5. Καθένα kringle περιέχει από 80-114 αμινοξέα και σταθεροποιείται με τρεις εσωτερικούς δισουλφιδικούς δεσμούς. Περιοχές kringles απαντώνται και σε άλλες πρωτεΐνες οι οποίες συμμετέχουν στους μηχανισμούς πήξης του αίματος και ινωδόλυσης όπως είναι: ο ενεργοποιητής του πλασμινογόνου, η προθρομβίνη, η ουροκινάση, η πρωτεΐνη C και οι παράγοντες πήξης VII, IX, X (20-21). Η ονομασία kringle προκύπτει από την τριπλή αναδίπλωση που παρουσιάζει καθεμία από τις

πέντε αυτές περιοχές η οποία έχει σαν αποτέλεσμα την μορφολογική τους ομοιότητα με το δανέζικο γλυκό pretzel.

Η πολυπεπτιδική αλυσίδα της apo(a) περιλαμβάνει μία περιοχή από kringles και μία καρβοξυτελική περιοχή με δραστηριότητα πρωτεάσης. Η τελευταία είναι μια περιοχή σερινοπρωτεάσης η οποία αν και παρουσιάζει 85% δομική ομολογία με την αντίστοιχη του πλασμινογόνου, λόγω της παρουσίας στην περιοχή σχάσης του πεπτιδικού δεσμού Ser_{561}-Ile_{562} αντί του Arg_{561}-Val_{562} που υπάρχει στο πλασμινογόνο, δεν έχει πρωτεολυτική δραστηριότητα (8,22) αφού δεν αναγνωρίζεται από τους ενεργοποιητές του πλασμινογόνου.



Εικόνα 3. *Δομική οργάνωση του μορίου της apo(a).*

Τα kringles αποτελούν τις βασικές διαμορφωτικές μονάδες της apo(a). Είναι δομές μη καταλυτικές πλούσιες σε κυστεΐνη και ο αριθμός τους ο οποίος κυμαίνεται από 12 έως 51, καθορίζει το μέγεθος της πολυπεπτιδικής αλυσίδας της apo(a). Η τελευταία δεν περιέχει περιοχές ανάλογες με τα K1, K2, K3 του πλασμινογόνου, περιέχει όμως πολλαπλά αντίγραφα K4 και ένα αντίγραφο K5. Σε κάθε μόριο της apo(a) υπάρχουν 10 τύποι K4 που έχουν ομολογία με το K4 του πλασμινογόνου 78-88% (23-24). Καθένας από αυτούς τους τύπους περιέχει τουλάχιστον μια θέση N-γλυκοζυλίωσης και εκτός από τον τύπο 2 όλοι οι υπόλοιποι εμφανίζονται με ένα αντίγραφο (εικόνα 3). Αντίθετα ο αριθμός των αντιγράφων K4 τύπου 2 κυμαίνεται

από 3-40 και είναι αυτός που καθορίζει το μέγεθος του μορίου της apo(a) (25-26). Γειτονικά kringles συνδέονται με μια περιοχή 26-36 καταλοίπων σερίνης, προλίνης ή και θρεονίνης. Η περιοχή αυτή (interkringle region) περιέχει 6 θέσεις O-γλυκοζυλίωσης οι οποίες καθορίζουν έως ένα βαθμό τις αλληλεπιδράσεις του μορίου της apo(a) με τα διάφορα μακρομόρια. Τα διαφορετικά μόρια της apo(a) εκφράζονται φαινοτυπικά με τις ισομορφές. Οι μεγαλύτερες ισομορφές της apo(a) εμφανίζονται στα πυκνότερα σωματίδια της Lp(a), ενώ οι μικρότερες ισομορφές στα μικρότερης πυκνότητας σωματίδια (7,27).

Το γονίδιο της apo(a) θεωρείται ένα από τα πιο πολυμορφικά γονίδια που έχουν περιγραφεί στο ανθρώπινο γονιδίωμα. Μπορούν πάνω σε αυτό να διακριθούν τέσσερις κύριες περιοχές: (i) η περιοχή η οποία κωδικοποιεί το σηματοδοτικό πεπτίδιο (signal peptide), (ii) η περιοχή για τα επαναλαμβανόμενα μοτίβα K4, (iii) η περιοχή για το K5 και (iv) η αλληλουχία η οποία κωδικοποιεί την περιοχή πρωτεάσης της apo(a). Το γονίδιο της apo(a) βρίσκεται σε μια δέσμη γονιδίων στο χρωμόσωμα 6q26-27 το οποίο περιέχει εκτός αυτού το γονίδιο του πλασμινογόνου και δύο γονίδια συσχετιζόμενα με την apo(a) (28-30). Η γειτνίαση αλλά και η αξιοσημείωτη ομολογία των γονιδίων του πλασμινογόνου και της apo(a) φανερώνουν μια κοινή καταγωγή η οποί μπορεί να προέρχεται είτε από διπλασιασμό του γονιδίου του πλασμινογόνου είτε από έναν κοινό πρόδρομο.

Στο χρωμόσωμα 6q26-27 έχουν ταυτοποιηθεί 34 αλληλόμορφα γονίδια τα οποία έχουν ως συνέπεια την ανίχνευση στο πλάσμα ή στον ορό ισάριθμων ισομορφών της apo(a) (μοριακού βάρους <200 έως >800 kDa) με χρήση ηλεκτροφόρησης πολυακρυλαμιδίου ή αγαρόζης κάτω από αποδιατακτικές συνθήκες (παρουσία SDS) (25,31). Κάθε άτομο μπορεί να εμφανίσει μία ή δύο ισομορφές της apo(a) ενώ είναι πιθανό και να μην υπάρχει ανιχνεύσιμη ζώνη της απολιποπρωτεΐνης. Ο Gerd Utermann και οι συνεργάτες του (32) προσδιόρισαν πρώτοι την παρουσία έξι βασικών ισομορφών με χρήση ηλεκτροφόρησης πολυακρυλαμιδίου (Polyacrylamide Gel Electrophoresis). Οι ισομορφές αυτές σύμφωνα με την ονοματολογία του Utermann χαρακτηρίζονται σαν F, B, S1, S2, S3, S4 ανάλογα με την σχετική ηλεκτροφορητική κινητικοτητά τους ως προς την ηλεκτροφορητική κινητικότητα της apoB-100. Έτσι ως F χαρακτηρίζονται οι ισομορφές που κινούνται γρηγορότερα από την apoB-100, B ονομάζονται οι ισομορφές που έχουν παρόμοια ηλεκτροφορητική κινητικότητα με την apoB-100, ενώ S χαρακτηρίζονται εκείνες που μεταναστεύουν πιο αργά από την apoB-100. Άτομα με μη ανιχνεύσιμη ζώνη της apo(a)

χαρακτηρίζονται ως μηδενικού φαινότυπου (null phenotype), αλλά αυτό είναι σχετικό καθώς εξαρτάται από την ευαισθησία της μεθόδου ανοσοδέσμευσης για τον προσδιορισμό των ισομορφών. Οι ισομορφές της apo(a) συσχετίζονται με τα επίπεδα της Lp(a) στο πλάσμα. Ο Utermann παρατήρησε ότι υπάρχει μια αντίστροφη συσχέτιση μεταξύ του μεγέθους της apo(a) και των επιπέδων της Lp(a) στο πλάσμα. Στους ετεροζυγώτες (άτομα με διπλή ισομορφή) η συγκέντρωση της Lp(a) είναι το αποτέλεσμα της δράσης της κάθε ισομορφής ξεχωριστά. Έτσι σε apo(a) ετεροζυγώτες τα επίπεδα της Lp(a) στο πλάσμα είναι περίπου ίσα με το άθροισμα και όχι με την μέση τιμή της συγκέντρωσης της Lp(a) που καθορίζεται από το κάθε αλληλόμορφο ξεχωριστά. Στην περίπτωση των ετεροζυγωτών οι δύο ισομορφές της apo(a) εκπροσωπούν δύο πληθυσμούς σωματιδίων Lp(a) οι οποίοι είναι αδύνατο να διαχωριστούν με χρήση υπερφυγοκέντρησης βαθμίδωσης πυκνοτήτων (33).

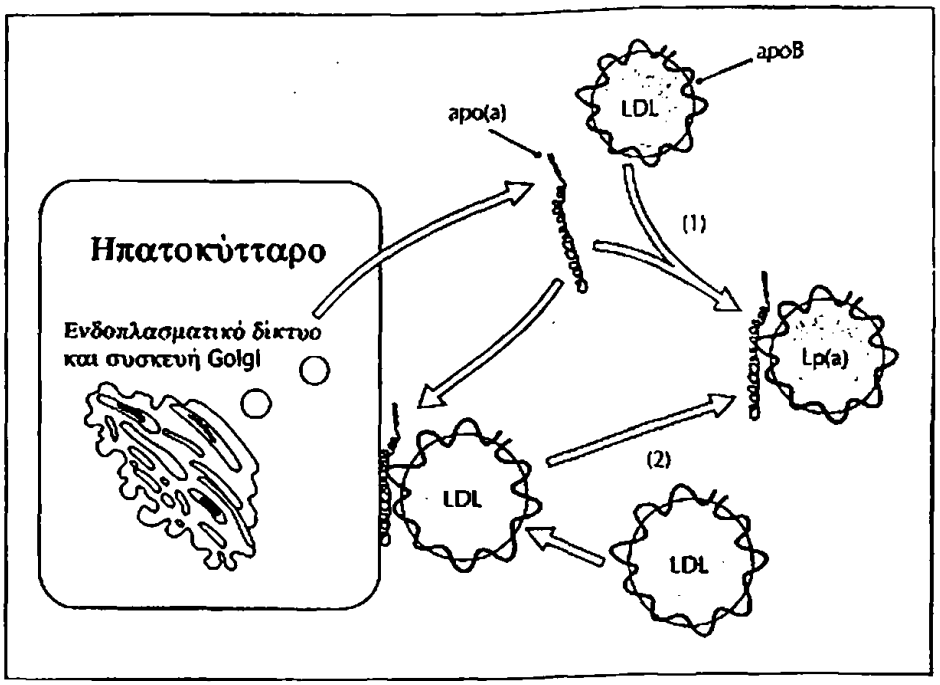
Βιοσύνθεση της Lp(a)

Ο τρόπος και ο τόπος βιοσύνθεσης της Lp(a) δεν έχει ακόμη πλήρως διευκρινιστεί. Μεταβολικές μελέτες έχουν αποδείξει ότι η λιποπρωτεΐνη αυτή βιοσυντίθεται στο ήπαρ ανεξάρτητα από τον μεταβολισμό των πλούσιων σε τριγλυκερίδια λιποπρωτεϊνών (34,35). Μελέτες των White και συν. σε πρωτογενείς καλλιέργειες ηπατοκυττάρων από πιθήκους απέδειξαν ότι οι ρυθμοί βιοσύνθεσης των μεγάλων ισομορφών της apo(a) είναι πολύ μικρότεροι από αυτούς των μικρών και ότι η έκκριση τους γίνεται με ένα πιο αργό ρυθμό .

Οι μεγάλες ισομορφές της apo(a) παραμένουν περισσότερο χρόνο εντός του ενδοπλασματικού δικτύου, όπου υφίστανται O- και N- γλυκοζυλίωση, εξαιτίας του μεγάλου αριθμού kringles που περιέχουν στη δομή τους. Είναι πιθανό ένα μεγάλο ποσοστό των ισομορφών αυτών να μην σχηματίζει σωστές περιοχές τριπλής αναδίπλωσης και να παραμένει στο διαμέρισμα αυτό για περαιτέρω επεξεργασία. Η παραπάνω υπόθεση εξηγεί πιθανά την αντίστροφη συσχέτιση μεταξύ του μεγέθους της apo(a) και των επιπέδων της Lp(a) στο πλάσμα (36-38).

Σχετικά με την συγκρότηση της Lp(a) μέχρι σήμερα έχουν προταθεί δύο μοντέλα. Σύμφωνα με το πρώτο η Lp(a) συγκροτείται στην επιφάνεια του ηπατοκυττάρου από ήδη σχηματισμένη apo(a) και LDL και στη συνέχεια

απελευθερώνεται στην κυκλοφορία (39). Το δεύτερο μοντέλο προτείνει τον εξωκυττάριο σχηματισμό του σωματιδίου της Lp(a) με μια διαδικασία δύο βημάτων (εικόνα 4). Αρχικά η apo(a) δεσμεύεται διαμέσου χαλαρών μη ομοιοπολικών αλληλεπιδράσεων σε μη ταυτοποιημένες ακόμα περιοχές της apoB-100 που είναι πλούσιες σε λυσίνη.



Εικόνα 4. Πιθανοί τρόποι βιοσύνθεσης της Lp(a)

Ως μια τέτοια περιοχή οι Mc Cormick και συν. έχουν ταυτοποίησαν πρόσφατα την αλληλουχία 4372-4392 βασιζόμενοι στην παρατήρηση ότι συνθετική apoB-100 με έλλειψη αυτής της αλληλουχίας παρουσίασε αδυναμία συγκρότησης Lp(a) *in vitro*. Η περιοχή 4372-4392 περιέχει ομάδες λυσίνης στις θέσεις 4372, 4379, 4385 και 4392 (40). Η μη ομοιοπολική δέσμευση της apo(a) στην περιοχή αυτή της apoB γίνεται διαμέσου λυσινοδεσμευτικών θέσεων (Lysine Binding Sites, LBS) του μορίου της οι οποίες είναι παρούσες στα K4 τύπου 6 έως 9 (LBS II) και αναστέλλεται από τα αμινοξέα λυσίνη, προλίνη, υδροξυπρολίνη ή αναλόγων της λυσίνης όπως το ε-αμινοκαπροϊκό οξύ (ε-ACA) (41,42). Τελευταίες μελέτες των Gabel και συν. εστιάζουν το ενδιαφέρον και στον ρόλο των K4 τύπου 5 έως 8 στην μη ομοιοπολική αλληλεπίδραση της apo(a) με την apoB-100 (43). Χαρακτηριστικό είναι το γεγονός ότι το πρώτο αυτό βήμα είναι ανάλογο με την αλληλεπίδραση του πλασμινογόνου με τα υπολλείματα λυσινών του ινώδους. Η αρχική μη ομοιοπολική αλληλεπίδραση της apo(a) με την apoB-100 συνοδεύεται από τον σχηματισμό δισουλφιδικού δεσμού μεταξύ της (μοναδικής) ελεύθερης κυστεΐνης της apo(a) η οποία βρίσκεται στο K4

τύπος 9 (Cys 4054) και της κυστεΐνης 3734 (Cys 3734) της apoB-100. Το ένζυμο που καταλύει την πιο πάνω αντίδραση οξείδωσης και είναι υπεύθυνο για την δημιουργία της δισουλφιδικής γέφυρας μεταξύ apo(a) και apoB-100 παραμένει ακόμα άγνωστο (44).

Παρά την καλά μέχρι σήμερα τεκμηριωμένη γνώση για την συμμετοχή της Cys 3734 στον σχηματισμό του πιο πάνω δεσμού οι Gabel και Mc Cormick εστιάζουν την προσοχή και στην Cys 4326 της apoB-100. Η ερευνητική ομάδα του Gabel έδειξε ότι καρβοξυτελικά τμήματα ανασυνδιασμένης apoB-100, apoB-94 και apoB-88 τα οποία περιείχαν στην δομή τους την Cys 3734 όχι όμως και την Cys 4326 δεν μπορούσαν να ενωθούν με την ανασυνδιασμένη apo(a) [recombinant apo(a), r-apo(a)] (45). Παρόμοια είναι και τα αποτελέσματα μελέτης της ομάδας του Mc Cormick με χρήση διαγονιδιακών ποντικιών τα οποία εξέφραζαν ανθρώπινη apo(a) και apoB-90. Τα πιο πάνω πειραματικά ευρήματα υποθέτουν ότι σημαντικό ρόλο στον σχηματισμό της δισουλφιδικής γέφυρας μεταξύ της apo(a) και της apoB100 παίζει και η Cys 4326. Μια άλλη πιθανή εξήγηση είναι ότι τα καρβοξυτελικά άκρα της apoB-100 είναι απαραίτητα για τις μη ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις αυτής με την apo(a) (46).

Το γεγονός όμως ότι στην βιβλιογραφία, ανάλογα με την λιπιδιακή σύσταση του LDL πυρήνα του σωματιδίου της Lp(a), έχουν περιγραφεί σωματίδια όπως: CE-Lp(a) (πλούσια σε εστέρες χοληστερόλης), TG-Lp(a) (πλούσια σε τριγλυκερίδια) καθώς και σωματίδια τα οποία περιέχουν ή όχι apoE υποδηλώνει την πιθανή συμμετοχή και άλλων βιοσυνθετικών δρόμων οι οποίοι παραμένουν άγνωστοι μέχρι σήμερα.

Ο σχηματισμός όμως της Lp(a) δεν εξαρτάται μόνο από την δομική ακεραιότητα των apo(a) και apoB-100 αλλά και από αυτή της LDL (47). Ασθενείς με έλλειψη του ενζύμου λεκιθινο-χοληστερόλο-ακυλτρανσφεράση (LCAT) δεν παρουσιάζουν ανιχνεύσιμα επίπεδα Lp(a) στο πλάσμα τους. Η LDL των ασθενών αυτών είναι μεν πλούσια σε apoB-100, αλλά έχει διαφορετική μορφολογία και χημική σύσταση από την κανονική LDL. Επώαση αυτής με r-apo(a) απέτυχε να σχηματίσει Lp(a) *in vitro*. Τα σωματίδια αυτά της LDL μπόρεσαν να ενωθούν με r-apo(a) μόνο όταν προεπωάστηκαν με ενεργό LCAT. Παρόμοια αδυναμία συγκρότησης Lp(a) έχει παρατηρηθεί και στην LDL ασθενών με οικογενή δυσ-β-λιποπρωτεϊναιμία (48).

Αποικοδόμηση της Lp(a)

Λίγα είναι γνωστά σχετικά με τους μηχανισμούς κάθαρσης της Lp(a) από την κυκλοφορία. Ο καταβολισμός της είναι δυνατόν να γίνει διαμέσου του κλασσικού LDL υποδοχέα (Apo B/E) αλλά αυτός δεν είναι ο κύριος τρόπος απομάκρυνσης της λιποπρωτεΐνης αυτής από την κυκλοφορία *in vivo* (49). Οι Snyder και συν. έδειξαν ότι σε πρωτογενείς καλλιέργειες ανθρώπινων ηπατοκυττάρων, μακροφάγων ή ινοβλαστών, η δέσμευση και αποικοδόμηση της Lp(a) διαμέσου του υποδοχέα της LDL γίνεται σε ποσοστό 10-30% σε σχέση με αυτή της LDL (50). Επίσης οι Utermann και συν. εξετάζοντας τα επίπεδα της Lp(a) καθώς και τον ισομορφικό τύπο της apo(a) σε ασθενείς με οικογενή υπερχοληστερολαιμία σε σχέση με φυσιολογικά άτομα διαπίστωσαν ότι οι ασθενείς αυτοί εμφάνιζαν υψηλότερες συγκεντρώσεις Lp(a) σε σύγκριση με τους φυσιολογικούς του ιδίου φαινοτύπου (51). Η πιο πάνω υπόθεση είναι σύμφωνη με πρόσφατη μελέτη των Watanabe και συν. (52) σε ομόζυγα και ετερόζυγα κουνέλια WHHL (Watanabe heritable hyperlipidemic) που εκφράζανε ανθρώπινη apo(a) και είχαν ελαττωματικό LDL υποδοχέα. Τα επίπεδα της Lp(a) βρέθηκαν κατά 4 και 2 φορές αντίστοιχα αυξημένα ενώ παρατηρήθηκαν και αυξημένα επίπεδα apo(a).

Ωστόσο, σημαντικός αριθμός ατόμων με ανεπάρκεια του υποδοχέα αυτού δεν εμφανίζει αυξημένα επίπεδα της Lp(a) στο πλάσμα. Ομοίως, φάρμακα (πχ. οι στατίνες οι οποίες αναστέλλουν συναγωνιστικά το ένζυμο της ενδοκυττάριας βιοσυνθετικής πορείας της χοληστερόλης HMG-CoA αναγωγάση) τα οποία αυξάνουν τον αριθμό αλλά και την δραστικότητα του κλασσικού LDL υποδοχέα δεν μειώνουν τα επίπεδα της λιποπρωτεΐνης αυτής. Τα πιο πάνω πειραματικά ευρήματα αποδεικνύουν ότι υπάρχουν και άλλοι δρόμοι καταβολισμού της Lp(a) που είναι ανεξάρτητοι από τον υποδοχέα της LDL (51,53,54).

Τα τελευταία χρόνια μελετήθηκε ο πιθανός ρόλος της λιποπρωτεϊνικής λιπάσης στον καταβολισμό της Lp(a) (55). Οι Keesler και συν. ανίχνευσαν έναν ειδικό υποδοχέα της Lp(a) στην επιφάνεια των ανθρωπίνων μακροφάγων (56). ενώ οι Kronenberg και συν. (57) πρότειναν τον καταβολισμό μέρους της Lp(a) από τους νεφρούς κάτι το οποίο όμως δεν επιβεβαιώνεται από άλλους ερευνητές (52). Πρόσφατα δεδομένα υποθέτουν ότι ένας πιθανός δρόμος καταβολισμού της Lp(a) είναι διαμέσου του VLDL υποδοχέα που εκφράζεται από τους ινοβλάστες. Οι ινοβλάστες που εκφράζουν τον υποδοχέα αυτόν ενδοκυτώνουν την Lp(a) και την

αποικοδομούν μέσα στα λυσοσώματα. Αντιθέτως ινοβλάστες με ανεπάρκεια του VLDL υποδοχέα δεν μπορούν να καταβολίσουν την Lp(a) (58).

Παθοφυσιολογικός ρόλος της Lp(a)

Ως πιθανός φυσιολογικός ρόλος της Lp(a) παρουσιάζεται μέχρι σήμερα ότι είναι η μη ελεγχόμενη από την δίαιτα και ανεξάρτητη από τον μεταβολισμό των τριγλυκεριδίων παροχή χοληστερόλης από το ήπαρ στους περιφερικούς ιστούς (59,60). Τα κύτταρα στόχοι της Lp(a) είναι κυρίως τα κύτταρα των οργάνων με μεγάλη παραγωγή στεροειδών ορμονών, όπως οι γονάδες, ο φλοιός επινεφριδίων και οι νεφροί (59). Η χοληστερόλη που μεταφέρεται με την Lp(a), επειδή μπορεί να παρακάμπτει την οδό των LDL υποδοχέων, προσφέρεται για άμεση κυτταρική χρήση σε σημεία που λαμβάνει χώρα επιδιόρθωση τραυματισμένων ιστών, ταχεία κυτταρική αναγέννηση, ενεργός βιοσύνθεση κυτταρικών μεμβρανών και οξεία φάση φλεγμονώδους διεργασίας. Για τον λόγο αυτό η Lp(a) αναφέρεται στην βιβλιογραφία ως πρωτεΐνη οξείας φάσεως (61-64), η δε συγκεντρωσή της στο πλάσμα συνήθως αυξάνεται μέσα στην πρώτη εβδομάδα μετά το έμφραγμα του μυοκαρδίου (63,65).

Τα δομικά χαρακτηριστικά της Lp(a) (ομοιότητα με την LDL και το πλασμινογόνο) την καθιστούν επίσης γέφυρα μεταξύ της αθηρωμάτωσης και της θρόμβωσης (66). Εξαιτίας της ομοιότητας της apo(a) με το πλασμινογόνο, η Lp(a) ανταγωνίζεται τη σύνδεση αυτού με τους κυτταρικούς υποδοχείς των ενδοθηλιακών κυττάρων, των μακροφάγων ,και των αιμοπεταλίων καθώς επίσης και τη σύνδεση του πλασμινογόνου με το ινώδες (67-70). Η εκτόπιση του πλασμινογόνου από τις κυτταρικές θέσεις δεσμευσής του έχει ως συνέπεια την αναστολή της μετατροπής του στο ενεργό πρωτεολυτικό ένζυμο πλασμίνη με αποτέλεσμα την παρεμπόδιση της ινωδόλυσης. Η δέσμευση του πλασμινογόνου στο ινώδες γίνεται διαμέσου λυσινοδεσμευτικών θέσεων οι οποίες είναι παρούσες στα K1 και K4. Παρόμοια λυσινοδεσμευτική θέση (LBS I) υπάρχει και στο K4 τύπος 10 της Lp(a). Πρόκειται για ένα ηλεκτρικό δίπολο του οποίου ο ανιονικός πόλος αποτελείται από τα αμινοξέα Asp_{55}, Asp_{57}, και ο κατιονικός πόλος από τα αμινοξέα Arg_{35}, Arg_{71}. Μεταξύ των δύο πόλων, οι οποίοι βρίσκονται σε απέναντι θέση, παρεμβάλλεται μια περιοχή (αυλάκι) που αποτελείται από τα υδρόφοβα αρωματικά αμινοξέα Phe_{64}, Trp_{62}, Trp_{72}. Αυτά τα

δομικά χαρακτηριστικά έχουν σαν συνέπεια τη δημιουργία μιας σταθερής γεωμετρίας η οποία επιτρέπει την εκλεκτική προσέγγιση και δέσμευση του καρβοξυτελικού άκρου καταλοίπων λυσινών που βρίσκονται στο ινώδες καθώς και των αλειφατικών ή αρωματικών προσδετών του τύπου των ω-αμινοκαρβοξυλικών οξέων (πχ. ε-ACA). Τόσο το πλασμινογόνο όσο και η Lp(a) παρουσιάζουν την ίδια υψηλή συγγένεια για δέσμευση σε απολήξεις λυσινών πάνω στο ινώδες (22, 71-74).

Πρόσφατα η ομάδα του Chapman μελέτησε την επίδραση κεκαθαρμένης Lp(a) από ομοζυγώτες σε ινωδολυτικό σύστημα *in vitro*. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα οι μικρού μοριακού βάρους ισομορφές είχαν μεγαλύτερη συγγένεια δέσμευσης για το ινώδες σε σχέση με τις μεγάλου μοριακού βάρους και έτσι ανέστειλαν αποτελεσματικότερα την ενεργοποίηση του πλασμινογόνου (η ισομορφή Β αποτέλεσε τον πιο ισχυρό αναστολέα). Τα δεδομένα αυτά στηρίζουν την υπόθεση πως ο αριθμός των επαναλήψεων K4 της apo(a) επηρεάζουν άμεσα την αλληλεπίδρασή της με την πλασμίνη (75).

Παράλληλα με τη δέσμευση του πλασμινογόνου στο ινώδες η Lp(a) ανταγωνίζεται την ενεργοποίηση του πλασμινογόνου από τον ιστικό ενεργοποιητή του t-PA (tissue Plasminogen Activator) (76,77). Η Lp(a) σε αντίθεση με το πλασμινογόνο δεν εμφανίζει πρωτεολυτική δράση διότι στην περιοχή σχάσης υπάρχει αντικατάσταση του πεπτιδικού δεσμού Arg_{561}-Val_{562} από τον Ser_{561}-Ile_{562}. Ο δεσμός Ser_{561}-Ile_{562} δεν αναγνωρίζεται σαν υπόστρωμα από τον t-PA. Αυτό έχει σαν συνέπεια η σχάση του δεσμού αυτού η οποία καταλύεται από τον t-PA να μην συμβαίνει, με αποτέλεσμα η Lp(a) να μην ενεργοποιείται από αυτόν. Αναστολέας του t-PA είναι ο PAI-1 (plasminogen activator inhibitor-1, αναστολέας 1 του ενεργοποιητή του πλασμινογόνου) ο οποίος συντίθεται κυρίως από τα ενδοθηλιακά κύτταρα, καθώς και από αλλά είδη κυττάρων. Η ομάδα του Etingen έδειξε ότι προσθήκη Lp(a) σε καλλιέργεια ενδοθηλιακών κυττάρων είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση της σύνθεσης και έκκρισης του PAI-1 από τα κύτταρα αυτά από τα κύτταρα αυτά παρουσία Lp(a) με συνέπεια την αυξημένη αναστολή του t-PA (78). Πρόσφατη μελέτη των Zhang και συν. έδειξε ότι η γλυκοζυλιωμένη Lp(a) προκαλεί επιπλέον αύξηση στην παραγωγή και έκκριση του PAI-1 από τα ενδοθηλιακά κύτταρα. Σημαντική ήταν επίσης και η μείωση της παραγωγής του t-PA από τα κύτταρα αυτά παρουσία Lp(a), με επακόλουθο την μειωμένη ινωδολυτική δραστηριότητα (79). Αξιοσημείωτη είναι η επίδραση της Lp(a) στα λεία μυϊκά κύτταρα του αρτηριακού τοιχώματος. Η λιποπρωτεΐνη αυτή έχει δειχτεί ότι μπορεί να ρυθμίζει την

ενεργοποίηση του μετατρεπτικού αυξητικού παράγοντα-β (transforming growth factor–β, TGF-β). Ο TGF-β είναι μια πολυλειτουργική κυτταροκίνη η οποία δρα ως ισχυρός αναστολέας του πολλαπλασιασμού και της μεταναστεύσεως των λείων μυϊκών κυττάρων. Εκκρίνεται υπό μη δραστική μορφή από διάφορα κύτταρα, όπως τα λεία μυϊκά κύτταρα, η οποία στη συνέχεια ενεργοποιείται μετά από αποικοδόμηση που υφίσταται από την πλασμίνη. Η apo(a)/Lp(a) αναστέλλοντας την ενεργοποίηση του πλασμινογόνου προς πλασμίνη παρεμποδίζει την ενεργοποίηση του TGF-β προάγοντας τον υπέρμετρο πολλαπλασιασμό και την μετανάστευση των λείων μυϊκών κυττάρων (80,81).

Η παρουσία της apo(a)/Lp(a) σε περιοχές του αρτηριακού τοιχώματος όπου υπάρχει αθηρωματική βλάβη έχει διαπιστωθεί από πολλές ερευνητικές ομάδες. Σημαντική είναι η αναλογική σχέση μεταξύ της συγκέντρωσης της Lp(a) στο πλάσμα και της εναπόθεσης apo(a) στο αρτηριακό τοίχωμα (82-85). Η Lp(a) έχει μεγάλη διεισδυτική ικανότητα. Διαπερνά με μεγάλη ευκολία τον ενδοθηλιακό φραγμό και ακινητοποιείται στον υπενδοθηλιακό χώρο συνεισφέροντας έτσι στη συσσώρευση χοληστερόλης (86). Εκεί ενώνεται διαμέσου της apo(a) με γλυκοζαμινογλυκάνες, το ινωδογόνο, το ινώδες καθώς και με την φιβρονεκτίνη (87-91). Στο αρτηριακό τοίχωμα τα σωματίδια της Lp(a) υφίστανται, όπως και αυτά της LDL, οξειδωτική και χημική τροποποίηση από ελεύθερες ρίζες οξυγόνου, δισθενή ιόντα καθώς και από την μηλονική διαλδεΰδη (92,93). Η οξειδωμένη Lp(a), προσλαμβάνεται από τους υποδοχείς εκκαθαριστές των μακροφάγων που οδηγούν στην ενδοκυττάρια συσσώρευση των εστέρων της χοληστερόλης και στον σχηματισμό αφρωδών κυττάρων, ένα από τα πρώτα στάδια του μηχανισμού δημιουργίας της αθηρωμάτωσης.

Σύμφωνα με τον Kostner η Lp(a)/apo(a) έχει επίσης την ικανότητα να ενώνεται με την LDL. Αποτέλεσμα είναι η αυξημένη παγίδευση της LDL στο αρτηριακό τοίχωμα σε μικροπεριβάλλον που ευνοεί την οξειδωσή της (94). Έτσι, η συγκέντρωση της Lp(a) στο πλάσμα ενεργεί αθροιστικά στη συγκέντρωση της LDL για την εμφάνιση καρδιαγγειακής νόσου (95,96). Την υπόθεση αυτή υποστηρίζει και πρόσφατη μελέτη σε άνδρες με αγγειογραφικά καταγεγραμμένη στεφανιαία νόσο οι οποίοι είχαν αυξημένα επίπεδα Lp(a) και LDL. Δραστική μείωση των επιπέδων της LDL χοληστερόλης καθιστούσαν τα υψηλά επίπεδα της Lp(a) μη αθηρωγόνα, υποθέτοντας ότι το σωματίδιο αυτό από μόνο του ίσως να μην αποτελεί την πρωτογενή αιτία της αθηρωγένεσης (97).

Αξιοσημείωτη είναι η παρατήρηση των Harpel και συν. ότι ενώσεις που διαθέτουν στην χημική τους δομή σουλφιδρυλικές ομάδες όπως είναι η γλουταθειόνη και η ομοκυστεΐνη, της οποίας η συμβολή στην αθηροσκλήρωση είναι γνωστή, αυξάνουν την συγγένεια της Lp(a) για το ινώδες (98,99). Η ομάδα του Karmansky (100) έδειξε ότι η συσσώρευση της Lp(a) στο αγγειακό τοίχωμα σε περιοχές με αθηρωματική βλάβη, μπορεί να προκαλέσει την αυξημένη προσκόλληση των μονοκυττάρων της κυκλοφορίας στην επιφάνεια των ενδοθηλιακών κυττάρων. Την ιδιότητα αυτή παρουσίασε μόνο η Lp(a)/apo(a), και όχι η LDL, διεγείροντας με αυτό τον τρόπο τον χημειοτακτισμό των μονοκυττάρων στην επιφάνεια ανθρώπινων ενδοθηλιακών κυττάρων από ομφάλιο λώρο (human umbilical vein endothelial cells, HUVECs) σε παρόμοια μελέτη των Poon και συν. (101).

Νεότερα πειραματικά δεδομένα αποδεικνύουν ότι η λιποπρωτεΐνη αυτή επάγει και την έκφραση μορίων προσκόλλησης στην επιφάνεια των ενδοθηλιακών κυττάρων, όπως είναι: το μόριο προσκολλήσεως των αγγειακών κυττάρων τύπου 1 (vascular cell adhesion molecule-1, VCAM-1), το διακυτταρικό μόριο προσκολλήσεως τύπου 1 (intracellular cell molecule-1, ICAM-1), η P- και η E-σελεκτίνη, καθώς και την έκφραση του αυξητικού παράγοντα των αιμοπεταλίων-B (platelet derived growth factor-B, PDGF-B) ο οποίος με την σειρά του επάγει τον πολλαπλασιασμό και την μετανάστευση των λείων μυϊκών κυττάρων (102-105). Επιπλέον, ενδιαφέρον παρουσιάζει η ταυτοποίηση της παρουσίας της β_2-γλυκοπρωτεΐνης I (β_2-GPI) στην περιοχή των επαναλαμβανόμενων K4 της apo(a) (106). Η β_2-GPI έχει την ικανότητα να προσδένεται σε αρνητικά φορτισμένα φωσφολιπίδια, όπως η καρδιολιπίνη (CL) και η φωσφατιδυλοσερίνη (PS), δημιουργώντας αντιγονικούς επίτοπους οι οποίοι αναγνωρίζονται από αντιφωσφολιπιδικά αντισώματα. Τέλος, υπό διερεύνηση βρίσκεται τα τελευταία χρόνια η πιθανή συμμετοχή της Lp(a) στην αγγειογένεση αφού η apo(a) παρουσιάζει δομική ομολογία με την αγγειοστατίνη η οποία αποτελεί αναστολέα αυτής (107,108).

Αλληλεπίδραση Lp(a) και αιμοπεταλίων

Η αλληλεπίδραση μεταξύ λιποπρωτεϊνών και αιμοπεταλίων παίζει σημαντικό ρόλο στην παθοφυσιολογία της αθηρωμάτωσης και της θρόμβωσης. Από πολύ νωρίς

in vivo μελέτες έχουν δείξει ότι ασθενείς με υπερχοληστερολαιμία εμφανίζουν ενεργοποιημένα αιμοπετάλια. Στο πλάσμα των ασθενών αυτών ανιχνεύονται αυξημένα επίπεδα συστατικών των αποθηκευτικών κοκκίων των αιμοπεταλίων όπως: η β-θρομβογλοβουλίνη (β-thromboglobulin, β-TG), ο αιμοπεταλιακός παράγοντας 4 (platelet factor 4, PF4) (109) καθώς και κυκλοφορούντα αιμοπεταλιακά συσσωρεύματα (110). *In vitro* τα αιμοπετάλια αυτά είναι περισσότερο ευαίσθητα, σε σχέση με αυτά των νορμολιπιδαιμικών ατόμων, στην δράση συσσωρευτικών παραγόντων όπως η διφωσφορική αδενοσίνη (ADP) και η θρομβίνη (111-113). Επιπλέον, η αυξημένη έκκριση ADP και σεροτονίνης από τα πυκνά κοκκία καθώς και του θρομβοξανίου A_2 (TxA_2) από τα α- κοκκία αποτελούν δείκτες πρώιμης ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων αυτών.

Τα αιμοπετάλια εκφράζουν στην επιφάνειά τους θέσεις με υψηλή συγγένεια πρόσδεσης (διαφορετικές του κλασσικού LDL υποδοχέα) τόσο για τις αθηρογόνες λιποπρωτεϊνικές τάξεις (VLDL, LDL) όσο και για τις αντιαθηρογόνες (HDL). Η πρόσδεση των λιποπρωτεϊνών στην μεμβράνη των αιμοπεταλίων μεταβάλλει την ανταπόκριση αυτών στη δράση διαφόρων αγωνιστών κινητοποιώντας ενδοκυττάριους μηχανισμούς επαγωγής σήματος. Έτσι, ενώ η πρόσδεση των LDL, VLDL έχει δειχτεί ότι επαυξάνει τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων, τα πλούσια σε apoE HDL σωματίδια την μειώνουν. Επιπρόσθετα, η παρουσία της LDL έχει σαν αποτέλεσμα την αύξηση της σύνδεσης του Fg με τα αιμοπετάλια όταν αυτά ενεργοποιηθούν με ADP κατά δοσοεξαρτώμενο τρόπο (114).

Αδιευκρίνιστος ωστόσο παραμένει ο ρόλος της Lp(a) στην παραπάνω διαδικασία. Μελέτες πρόσδεσης της Lp(a)/r-apo(a) στα αιμοπετάλια έχουν δείξει ότι το σημείο σύνδεσης της λιποπρωτεΐνης αυτής είναι διαφορετικό από αυτό της LDL. Στην μελέτη των Pedreno και συν (115) Lp(a) σωματίδια δεν ήταν ικανά να αναστείλουν την πρόσδεση ^{125}I-LDL σε αντίθεση με τις Lp(a-), LDL οποίες προσδένονταν με την ίδια συγγένεια. Η πρόσδεση της Lp(a)/r-apo(a) στην αιμοπεταλιακή μεμβράνη γίνεται με μεγάλη συγγένεια και είναι ανεξάρτητη του ισομορφικού μεγέθους της apo(a) αλλά και της αλληλουχίας Arg-Gly-Asp (RGD), η οποία παίζει σημαντικό ρόλο στην συσσώρευση των αιμοπεταλίων, παρά το γεγονός ότι υπάρχει στην πολυπεπτιδική αλυσίδα της apo(a) (116). Στη διαδικασία αυτή δεν φαίνεται να παίζει ενεργό ρόλο ο αιμοπεταλιακός υποδοχέας $\alpha_{IIb}\beta_3$ αφού αιμοπετάλια με αδυναμία έκφρασης αυτού του υποδοχέα προσδένουν κανονικά Lp(a) σωματίδια,

ενώ παρουσία αιθυλενοδιαμινοτετραοξικού οξέος (EDTA), το οποίο δεσμεύει ιόντα Ca^{2+} καθιστώντας τον υποδοχέα ανενεργό, η δέσμευση παραμένει αμετάβλητη (115).

Στην ερώτηση "ποιο είναι το ακριβές σημείο δέσμευσης της Lp(a) στα αιμοπετάλια" δεν έχει δοθεί μέχρι σήμερα ξεκάθαρη απάντηση. Μελέτη των Malle και συν (116) με χρήση ^{125}I-Lp(a) αναδεικνύει ως τέτοιο την υπομονάδα α_{IIb}. Στη μελέτη αυτή η πρόσδεση της Lp(a) (K_d 7.2±1.8 x 10^{-9} mol/L) ήταν 5-10 φορές ισχυρότερη αυτής των LDL (K_d 1.6-5.1 x 10^{-8} mol/L) και HDL (K_d 1.6-5.1 x 10^{-8} mol/L). Σε αντίθεση με τα αποτελέσματα της παραπάνω ερευνητικής ομάδας οι Ezratty και συν. (117) έδειξαν ότι η Lp(a) συνδέεται σε σημεία της αιμοπεταλιακής μεμβράνης όπου υπάρχουν κατάλοιπα λυσινών. Σε συμφωνία με την υπόθεση αυτή οι Martinez και συν (118) πρόσφατα έδειξαν ότι το δομικό ανάλογο της λυσίνης ε-ACA αναστέλλει πλήρως και αντιστρεπτά την σύνδεση ^{125}I-r-apo(a) στα αιμοπετάλια. Η πρόσδεση της r-apo(a) δεν επηρεάστηκε από μονοκλωνικό αντίσωμα το οποίο μπλόκαρε εξειδικευμένα την πρόσδεση του Fg στον αιμοπεταλιακό υποδοχέα $\alpha_{IIb}\beta_3$. Επιπλέον, η πρόσδεση παρέμεινε ανεπηρέαστη όταν τα αιμοπετάλια ενεργοποιήθηκαν με ADP ή κολλαγόνο ενώ αντίθετα παρατηρήθηκε μια σημαντική αύξηση αυτής παρουσία θρομβίνης ή TRAP (14/πεπτίδιο ενεργοποίησης του υποδοχέα της θρομβίνης) ή AA.

Άμεση συνέπεια της σύνδεσης της λιποπρωτεΐνης αυτής στα αιμοπετάλια είναι η εκτόπιση του πλασμινογόνου από τις αντίστοιχες θέσεις δεσμευσής του ενώ παράλληλα ανταγωνίζεται και την ενεργοποίηση αυτού από τον t-PA προς το ενεργό πρωτεολυτικό ένζυμο πλασμίνη αναστέλλοντας την ινωδόλυση. Παράλληλα τροποποιεί με άγνωστο μηχανισμό την απόκριση των αιμοπεταλίων στην επίδραση των διαφόρων αγωνιστών (118,119). Οι Rand και συν. (120) πρόσφατα ανακοίνωσαν ότι η Lp(a) (συγκεκριμένα η περιοχή της apo(a) που δεν παρουσιάζει δομική ομοιότητα με το πλασμινογόνο) αυξάνει τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων αλλά και την έκκριση σεροτονίνης, TxA_2 όταν αυτά ενεργοποιηθούν από το 6/πεπτίδιο Ser-Phe-Leu-Leu-Arg-Asn (SFLLRN) το οποίο αποτελεί το πεπτίδιο ενεργοποίησης του υποδοχέα της θρομβίνης. Παράλληλα στην ίδια μελέτη r-apo(a) διαφορετικού ισομορφικού μεγέθους δεν επηρέασε των αιμοπεταλίων όταν αυτά ενεργοποιήθηκαν με ADP, ενώ είχε σαν αποτέλεσμα την σημαντική αύξηση της ασθενούς δράσης του SFLLRN σ' αυτά. Σε άλλες μελέτες η Lp(a) σε αντίθεση με την LDL ήταν ικανή να αναστείλει την συσσώρευση αλλά και την έκκριση σεροτονίνης και TxA_2 όταν τα

αιμοπετάλια ενεργοποιήθηκαν με κολλαγόνο (115, 119). Ανάλογη αναστολή της συσσώρευσης παρατηρήθηκε και παρουσία θρομβίνης ή ADP. Τα αποτελέσματα αυτά όμως δεν επιβεβαιώθηκαν στην μελέτη των Martinez και συν (118) αφού r-apo(a) διαφορετικών ισομορφών προκάλεσε σημαντική αύξηση της συσσώρευσης παρουσία ΑΑ. Συμπερασματικά τα μέχρι σήμερα αποτελέσματα καθιστούν αντικρουόμενη την συνεισφορά και τον ακριβή παθοφυσιολογικό ρόλο της Lp(a) στην δημιουργία θρομβοεμβολικών επιπλοκών οι οποίες συνδέονται με την αθηροσκλήρωση.

Lp(a) και στεφανιαία νόσος

Ένας σημαντικός αριθμός case-control μελετών οι οποίες διεξήχθησαν τις προηγούμενες τρεις δεκαετίες, έδειξε ότι τα επίπεδα της Lp(a) στο πλάσμα ασθενών με στεφανιαία νόσο ήταν αυξημένα σε σχέση με τα αντίστοιχα των φυσιολογικών ατόμων (121,122). Το συμπέρασμα το οποίο προέκυψε από τις μελέτες αυτές ήταν ότι η Lp(a) αποτελεί δείκτη της στεφανιαίας νόσου ή ότι τα επίπεδα της λιποπρωτεΐνης αυτής αυξάνουν εξαιτίας της νόσου. Το 1977 οι Albers και συν. ανέφεραν πρώτοι την συσχέτιση μεταξύ αυξημένης συγκέντρωσης Lp(a) και στεφανιαίας νόσου βρίσκοντας αυξημένα επίπεδα της λιποπρωτεΐνης αυτής σε 90 επιζώντες εμφράγματος του μυοκαρδίου σε σύγκριση με τους υγιείς συζύγους τους (123). Το 1981 οι Kostner και συν. ανακοίνωσαν ότι ο κίνδυνος για την εμφάνιση εμφράγματος του μυοκαρδίου είναι σχεδόν διπλάσιος στα άτομα με συγκεντρώσεις Lp(a) μεγαλύτερες από 30 mg/dl (124). Ωστόσο, δεν υπάρχει μέχρι σήμερα άμεση απόδειξη που να στηρίζει την υπόθεση ότι τα επίπεδα της Lp(a) στο πλάσμα αυξάνουν με την εξέλιξη της αθηροσκλήρωσης.

Προοπτικές μελέτες οι οποίες διεξήχθησαν με σκοπό τον άμεσο προσδιορισμό της συνεισφοράς της Lp(a) στην ανάπτυξη στεφανιαίας νόσου κατέληξαν σε αντικρουόμενα αποτελέσματα. Έξι προοπτικές μελέτες έδειξαν ότι η συγκέντρωση της Lp(a) αποτελεί παράγοντα κινδύνου για την εμφάνιση εμφράγματος του μυοκαρδίου ή στεφανιαίας νόσου στους άνδρες (125-130) ενώ τρεις άλλες case-control μελέτες δεν κατέληξαν στο ίδιο συμπέρασμα (131-133). Πιθανές εξηγήσεις για τα αντικρουόμενα αυτά αποτελέσματα αποτέλεσαν διαφορές στον πειραματικό

σχεδιασμό, στα κριτήρια αποκλεισμού, στη διάρκεια της follow-up περιόδου, στον τρόπο συλλογής και αποθήκευσης των δειγμάτων, στην επιλογή της αναλυτικής μεθόδου για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης της Lp(a) (για τον προσδιορισμό της Lp(a) χρησιμοποιούνται ανοσοχημικές μέθοδοι των οποίων όμως η ακρίβεια επηρεάζεται σε μεγάλο βαθμό από την ετερογένεια μεγέθους της apo(a)) καθώς και διαφορές στις μεθόδους στατιστικής ανάλυσης. Επίσης, ασυμφωνίες στα τελικά αποτελέσματα υποτέθηκε ότι μπορεί να οφείλονταν και στην διαφορετικότητα των πληθυσμών οι οποίοι πήραν μέρος στις μελέτες αυτές.

Ένας μικρός αριθμός μελετών έχει εξετάσει τη συσχέτιση μεταξύ του μεγέθους των ισομορφών της apo(a) και της στεφανιαίας νόσου. Σε μια τέτοια μελέτη οι Kark και συν. ανέφεραν επικράτηση των χαμηλού μοριακού βάρους ισομορφών apo(a) σε γυναίκες οι οποίες επέζησαν εμφράγματος του μυοκαρδίου, συγκρινόμενες με αντίστοιχα φυσιολογικά άτομα (134). Επίσης, μελέτες των Seed και Guo έδειξαν επικράτηση των μικρού μοριακού βάρους ισομορφών apo(a) σε ασθενείς με οικογενή υπερχοληστερολαιμία οι οποίοι εμφάνισαν στεφανιαία νόσο (135,136). Οι Wild και συν. (137) σε μια προοπτική case-control μελέτη ανέφεραν ότι τα επίπεδα της Lp(a) αποτελούσαν ανεξάρτητο παράγοντα κινδύνου για την εμφάνιση στεφανιαίας νόσου στους άνδρες και ότι στην διαδικασία αυτή πιθανά να εμπλέκεται και το ισομορφικό μέγεθος της apo(a). Στην μελέτη αυτή στην οποία πήραν μέρος 134 άτομα (90 άνδρες και 44 γυναίκες), δεν παρατηρήθηκαν διαφορές μεταξύ των επιπέδων της Lp(a) και του μεγέθους των ισομορφών της apo(a) μεταξύ των γυναικών ασθενών, με τις αντίστοιχες φυσιολογικές. Ο μικρός αριθμός των ατόμων που συμμετείχαν στην μελέτη αυτή δεν επιτρέπει την εξαγωγή ασφαλών συμπερασμάτων για την άμεση εκτίμηση του κινδύνου. Στην προοπτική μελέτη Framingham Heart Study (FHS) στην οποία συμμετείχαν 3003 γυναίκες για 12 χρόνια, η παρουσία μια καταβυθιζόμενης προ-β-λιποπρωτεϊνικής μπάντας στην ηλεκτροφόρηση που υποδηλούσε αυξημένα επίπεδα Lp(a) πλάσματος βρέθηκε να αποτελεί έναν ισχυρό, ανεξάρτητο δείκτη για την εμφάνιση εμφράγματος του μυοκαρδίου και διαλείπουσας χωλότητας (138). Ωστόσο, στην μελέτη αυτή δεν έγινε άμεσος προσδιορισμός των επιπέδων της Lp(a), ενώ παράλληλα δεν έγινε και προσδιορισμός των ισομορφών της apo(a), καθιστώντας αναγκαία την περαιτέρω μελέτη της συνεισφοράς του ισομορφικού μεγέθους της apo(a) στην αθηρογόνο δράση της Lp(a) στις γυναίκες αυτές.

Ιστορικά, η μεγάλη πλειοψηφία των μελετών που εξέτασαν την πιθανή σχέση μεταξύ Lp(a) και στεφανιαίας νόσου έχουν διενεργηθεί σε Καυκάσιους πληθυσμούς.

Τα τελευταία χρόνια μελέτες έχουν εκτιμήσει την κλινική σημασία της Lp(a) και σε άλλες εθνικές ομάδες. Αν και η μαύρη φυλή παρουσιάζει τα υψηλότερα επίπεδα Lp(a) (διάμεση τιμή 45,7 mg/dl) σε σχέση με τους Καυκάσιους (διάμεση τιμή 7,0 mg/dl) και τους Κινέζους (διάμεση τιμή 16,1 mg/dl) δεν εμφανίζει υψηλή συχνότητα εμφάνισης της νόσου (33,139,140). Το εύρημα αυτό έχει παρακινήσει πολλούς ερευνητές να υποθέσουν ότι η Lp(a) στην μαύρη φυλή παρουσιάζει μειωμένη αθηρογόνο δράση ή ότι αυτή αντισταθμίζεται από άλλους παράγοντες (140). Πρόσφατα διατυπώθηκε η υπόθεση ότι η μειωμένη αθηρογόνος δράση της Lp(a) στον μαύρο πληθυσμό πιθανά να οφείλεται στην χαμηλότερη συχνότητα εμφάνισης του συνδυασμού υψηλών επιπέδων Lp(a) και μικρού μοριακού βάρους ισομορφών apo(a) σε σχέση με τους λευκούς (141). Η υπόθεση αυτή έρχεται να συμπληρώσει τα πειραματικά ευρήματα των Chapman και συν. σύμφωνα με τα οποία σύμφωνα με τα οποία οι μικρού μοριακού βάρους ισομορφές της apo(a) ανταγωνίζονται αποτελεσματικότερα το πλασμινογόνο με επακόλουθο την μειωμένη ινωδολυτική δραστηριότητα (75).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΔΕΥΤΕΡΟ

Η ΑΚΕΤΥΛΟΫΔΡΟΛΑΣΗ ΤΟΥ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗΣ ΤΩΝ ΑΙΜΟΠΕΤΑΛΙΩΝ (PAF-AH)

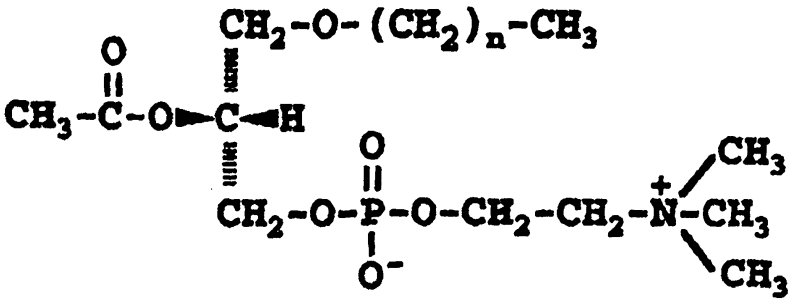
Παράγοντας ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων (PAF)

Ο Παράγοντας Ενεργοποίησης των Αιμοπεταλίων (Platelet-Activating Factor, PAF) είναι ένα βιολογικά δραστικό φωσφολιπίδιο που προκαλεί *in vivo* και *in vitro* ενεργοποίηση, συσσώρευση και έκκριση των αιμοπεταλίων (142,143). Είναι ένας χημικός διαβιβαστής ο οποίος παίζει γενικό ρόλο στην κυτταρική επικοινωνία, έχοντας έτσι παρόμοια λειτουργική συμπεριφορά με τις ορμόνες, τις κυτοκίνες και τις ιντερλευκίνες (144,145).

Αρχικά, μελετήθηκε η έκκριση του από τα λευκοκύτταρα κουνελιού, κάτω από συνθήκες αναφυλακτικού σόκ. Η δράση του στα αιμοπετάλια είναι η κύρια αιτία για την εμπειρική ονομασία που του δόθηκε, πριν ακόμη προταθεί η χημική του δομή ως η 1-Ο-αλκυλο-2-ακετυλο-sn-γλυκερο-3-φωσφοχολίνη (144,146). Το 1980 η ομάδα του Hanahan ταυτοποίησε τη δομή του φυσικού PAF, ο οποίος βιοσυντίθεται *in vitro* από ενεργοποιημένα βασεόφιλα κουνελιού (147). Στο μίγμα του PAF, στην θέση 1 του γλυκερινικού σκελετού υπάρχει συνδεδεμένη με αιθερικό δεσμό, σε ποσοστό 10% λιπαρή αλυσίδα με 16 άτομα άνθρακα και σε ποσοστό 90 % με 18 άτομα άνθρακα. Στην θέση sn-2 βρίσκεται εστεροποιημένη μια οξική ομάδα που είναι υπεύθυνη για τη βιολογική δράση του PAF, ενώ στην θέση 3 υπάρχει ένα πολικό μόριο χολίνης συνδεδεμένο με τη φωσφορική ομάδα (εικόνα 5). Η επιστημονική κοινότητα, με τον όρο PAF, αναφέρεται γενικότερα σε μια ομάδα φωσφολιπιδίων με χαρακτηριστικό την ύπαρξη του μορίου χολίνης στην θέση 3 των οποίων η δραστικότητα οφείλεται στον αριθμό των ατόμων άνθρακα των λιπαρών αλυσίδων των θέσεων 1 και 2. Το πιο δραστικό φωσφολιπίδιο από αυτά, ακόμη και σε συγκεντρώσεις της τάξης των 10^{-10}-10^{-11} M, είναι το 1-Ο-παλμιτοϋλο-2-ακετυλο-sn-γλυκερο-3-φωσφοχολίνη (148-150).

Στα κύτταρα, σε συνθήκες ηρεμίας, ο PAF φυσιολογικά δεν ανιχνεύεται, ενώ όταν αυτά διεγερθούν παράγεται και κατόπιν εκκρίνεται ή εκφράζεται στην μεμβράνη. Κατόπιν ενεργοποιεί διαμέσου των ειδικών υποδοχέων του τα κύτταρα

στόχους (151). Η δράση του δεν περιορίζεται μόνο στο κύτταρο από το οποίο εκκρίθηκε, αλλά και σε παρακείμενα κύτταρα, εμφανίζοντας ενδοκρινή, παρακρινή και συνδετοκρινή δράση. Ο PAF παράγεται από ευκαρυωτικά κύτταρα όπως τα βασεόφιλα, τα αιμοπετάλια, τα μονοκύτταρα, τα μακροφάγα, τα μαστοκύτταρα, τα ουδετερόφιλα, τα ηωσινόφιλα, τα ενδοθηλιακά κύτταρα και ευκαρυωτικά πρωτόζωα όπως το πρωτόζωο Tetrahymena Pyriformis (152).



Εικόνα 5. Η χημική δομή του PAF (1-O-αλκυλο-2-ακετυλο-sn-γλυκερο-3-φωσφοχολίνη), n=15-17.

Ο PAF προκαλώντας *in vivo* και *in vitro* την ενεργοποίηση διαφόρων κυττάρων (πίνακας 1) συμμετέχει ως διαμεσολαβητής στις φλεγμονώδεις καταστάσεις και στην θρόμβωση (153).

Πίνακας 1. *Οι δράσεις του PAF σε διάφορα κύτταρα θηλαστικών.*

ΕΙΔΟΣ ΚΥΤΤΑΡΟΥ	*ΔΡΑΣΕΙΣ ΤΟΥ PAF*
Αιμοπετάλια	Έκκριση κοκκίων, συσσώρευση, αλλαγή σχήματος, σύνθεση AA και TxA_2, φωσφορυλίωση πρωτεϊνών, αύξηση ενδοκυττάριου Ca^{2+}
Ουδετερόφιλα	Συσσώρευση, χημειοτακτισμός, σύνθεση LT, αυξημένη προσκόλληση, αποκοκκίωση, αύξηση ενδοκυττάριου Ca^{2+}, παραγωγή HETE, έκκριση λυσοσωμιακών ενζύμων
Ηωσινόφιλα	Σύνθεση LT, παραγωγή ανιόντος του υπεροξειδίου, χημειοτακτισμός
Μονοκύτταρα/ Μακροφάγα	Συσσώρευση, χημειοτακτισμός, διαφοροποίηση, σύνθεση PG και TxA_2, παραγωγή ανιόντος του υπεροξειδίου, IL και TNF, αύξηση ενδοκυττάριου Ca^{2+}
Ενδοθηλιακά κύτταρα	Δομικές αλλαγές, αύξηση ενδοκυττάριου Ca^{2+}, σύνθεση PG και TxA_2, έκκριση του ενεργοποιητή του πλασμινογόνου
Λεία μυϊκά κύτταρα	Αύξηση ενδοκυττάριου Ca^{2+}, ενεργοποίηση του κύκλου του PI, σύνθεση PG
Tetrahymena Pyriformis	Αύξηση ενδοκυττάριου Ca^{2+}, βιοσύνθεση της PG, αύξηση της γλυκογονόλυσης

TxA_2: θρομβοξάνιο A_2, PI: φωσφατιδυλοϊνοσίτης, LT: λευκοτριένιο, IL: ιντερλευκίνη, HETE: υδροξυεικοσατριένιο, TNF: παράγοντας νέκρωσης όγκων, PG: προσταγλανδίνη.

Υπάρχουν δύο κύριες ενζυμικές πορείες για την βιοσύνθεση του PAF. Η πορεία βιοσύνθεσης με ανάπλαση ή «remodeling pathway» και η πορεία βιοσύνθεσης εξ αρχής ή «de-novo pathway».

Η πορεία βιοσύνθεσης του PAF με ανάπλαση πραγματοποιείται σε ενεργοποιημένα κύτταρα (μεταξύ άλλων και στα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια) και

απαιτεί την παρουσία ιόντων ασβεστίου. Στον ενδοκυττάριο χώρο των ενεργοποιημένων κυττάρων, μια PLA_2 παρουσία ιόντων ασβεστίου υδρολύει στην sn-2 θέση την 1-O-αλκυλο-2-ακυλο-sn-γλυκερο-3-φωσφοχολίνη παράγοντας την 1-O-αλκυλο-2-λύσο-sn-γλυκερο-3-φωσφοχολίνη (λύσο-PAF), απομακρύνοντας αραχιδονικό οξύ (AA). Ο παραγόμενος λύσο-PAF είτε επανακυλιώνεται κάτω από την δράση μιας ακυλοτρανσφεράσης (154), είτε ακετυλιώνεται κάτω από την δράση μιας ακετυλοτρανσφεράσης, σχηματίζοντας PAF (155). Τελευταία πειραματικά δεδομένα υποδεικνύουν ότι άλλα ένζυμα συμμετέχουν στην πορεία ανάπλασης του PAF, όπως μια PAF τρανσακυλάση και η LCAT του ανθρώπινου πλάσματος (156, 157).

Η πορεία βιοσύνθεσης του PAF εξ αρχής παρατηρήθηκε σε μη ενεργοποιημένα κύτταρα, γεγονός που σημαίνει ότι σε αυτή τη βιοχημική πορεία οφείλονται οι μικρές ποσότητές του, που φυσιολογικά υπάρχουν στα κύτταρα. Σύμφωνα με την πορεία αυτή, το 1-O-αλκυλο-2-λυσο-sn-γλυκερο-3-φωσφορικό οξύ, παρουσία μιας ακετυλο-CoA-ακετυλοτρανσφεράσης, ακετυλιώνεται αρχικά στην sn-2 θέση παράγοντας το 1-O-αλκυλο-2-ακετυλο-sn-γλυκερο-3-φωσφορικό οξύ. Κατόπιν, με τη δράση μιας φωσφοϋδρολάσης, απομακρύνεται η φωσφορική ομάδα από την θέση 3 του γλυκερινικού σκελετού σχηματίζοντας την 1-O-αλκυλο-2-λυσο-sn-γλυκερόλη. Στο τελικό στάδιο της βιοσύνθεσης, η δράση του ενζύμου CDP-φωσφοχολινοτρανφεράσης έχει ως αποτέλεσμα την μεταφορά της φωσφοχολίνης στην θέση 3 του γλυκερινικού σκελετού παράγοντας τον PAF (158).

Αρχικά θεωρήθηκε ότι η συγκέντρωση του PAF σε κύτταρα και ιστούς οφείλεται στις βιοσυνθετικές του πορείες. Αργότερα όμως αποδείχθηκε ότι ο κύριος ρυθμιστής των επιπέδων του είναι η γρήγορη αποικοδόμησή του με τη βοήθεια ενός ενζύμου, που αρχικά εντοπίστηκε στον ορό των κουνελιών (159). Το ένζυμο αυτό είναι ευαίσθητο στην κατεργασία του με οξέα, γι αυτό και αρχικά ονομάστηκε «Παράγοντας ασταθής στα οξέα» (ALF) (160). Αργότερα όμως, λόγω της ιδιότητας του να υδρολύει τον εστερικό δεσμό στον οποίο συμμετέχει η ακετυλομάδα στην sn-2 θέση του PAF, ονομάστηκε PAF-ακετυλοϋδρολάση (PAF-AH).

Δράση του PAF στα αιμοπετάλια

Τα αιμοπετάλια βιοσυνθέτουν τον PAF (η ποσότητα που σχηματίζεται είναι πολύ μικρότερη σε σχέση με αυτή των κυττάρων που συμμετέχουν στην αλλεργία και στη φλεγμονή) όταν ενεργοποιούνται με αγωνιστές όπως ο ιονοφόρος του Ca^{2+} A23187 (161-163), η θρομβίνη (161,164) και το κολλαγόνο. Αντίθετα, η βιοσύνθεση του PAF δεν πραγματοποιείται παρουσία των αγωνιστών ADP και αραχιδονικού οξέος (AA) (165). Τα αιμοπετάλια είναι τα κύτταρα με τη μεγαλύτερη ευαισθησία έναντι του PAF. Ο PAF για τα κύτταρα αυτά αποτελεί ισχυρό παράγοντα συσσώρευσης αλλά και έκκρισης των συστατικών των α- και πυκνών κοκκίων τους (166). Η έκταση της δράσης του PAF στα αιμοπετάλια ανθρώπου, όπως άλλωστε συμβαίνει και με το ADP, έχει δειχτεί ότι εξαρτάται από την συγκέντρωση των ιόντων Ca^{2+}. Σε μέσο το οποίο περιέχει ιόντα Ca^{2+} σε συγκέντρωση 1-2 mM ο PAF προκαλεί συσσώρευση χωρίς τον σχηματισμό TxA_2 ενώ παράλληλα παρατηρείται μικρή έκκριση των συστατικών των α- και πυκνών κοκκίων (167). Αντίθετα, σε μέσο το οποίο δεν περιέχει Ca^{2+}, όπως και σε πλάσμα πλούσιο σε αιμοπετάλια (PRP), η συσσώρευση που προκαλείται από τον PAF συνοδεύεται από τον σχηματισμό TxA_2 καθώς και από εκτεταμένη έκκριση. Μη στεροειδή αντιφλεγμονώδη φάρμακα όπως η ασπιρίνη αναστέλλουν τόσο τον σχηματισμό TxA_2 όσο και τα φαινόμενα της έκκρισης. Η παρουσία EDTA αναστέλλει τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων καθώς και την παραγωγή PAF από αυτά (164). Η συσσώρευση που προκαλεί ο PAF δεν επηρεάζεται από τους αναστολείς του ADP, CP και CPK. Η συσσωρευτική οδός δηλαδή του PAF είναι ανεξάρτητη αυτών που ακολουθούν τόσο το αραχιδονικό οξύ όσο και το ADP (161).

Η ευαισθησία των αιμοπεταλίων έναντι του PAF ποικίλλει ανάλογα με το είδος τους. Τα αιμοπετάλια του κουνελιού και του χοίρου είναι τα πιο ευαίσθητα. Τα αιμοπετάλια του σκύλου, του αλόγου και του προβάτου εμφανίζουν μέτρια ανταπόκριση, ενώ την πιο μικρή ευαισθησία εμφανίζουν αυτά του ανθρώπου και του ποντικού. Ο ακριβής μηχανισμός δράσης του PAF στα αιμοπετάλια καθώς και στα υπόλοιπα κύτταρα-στόχους παραμένει ακόμα αδιευκρίνιστος. Η στερεοεκλεκτικότητα όμως που χαρακτηρίζει τις επιδράσεις του (ύπαρξη αιθερομάδας στην sn-1 θέση, οξικής ομάδας στην sn-2 θέση, χολίνης στην sn-3 θέση, ενώ μόνο το φυσικά παραγόμενο R στην sn-2 θέση στερεοϊσομερές είναι δραστικό) αλλά και το γεγονός ότι επώαση των αιμοπεταλίων με PAF έχει αποτέλεσμα αυτά να μην ανταποκρίνονται

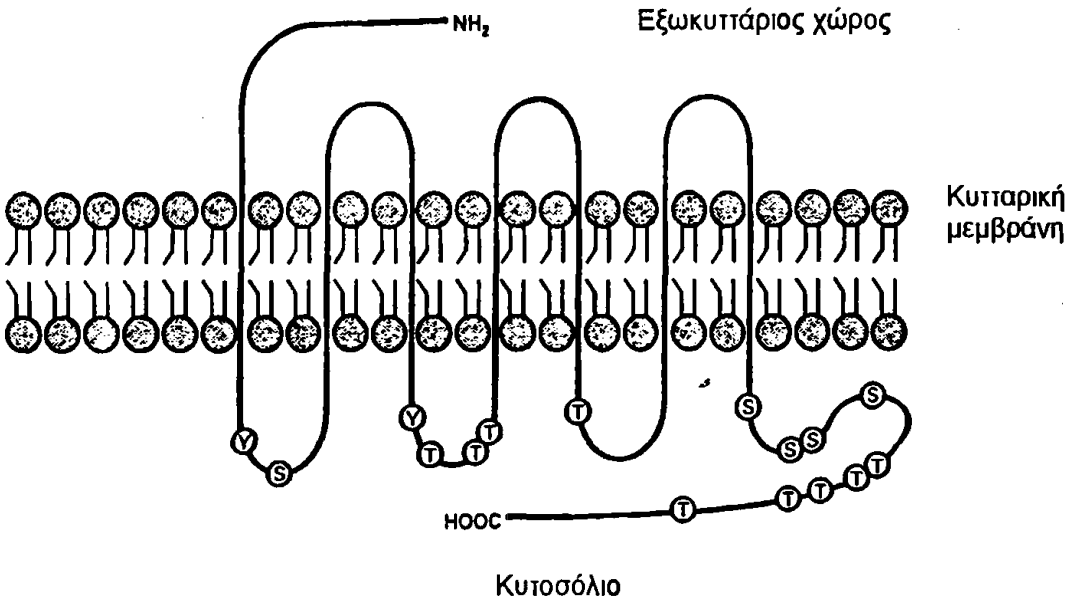
δεύτερη φορά στον ίδιο, οδήγησε στην υπόθεση ύπαρξης ειδικών σημείων δέσμευσης-υποδοχέων στις μεμβράνες των αιμοπεταλίων.

Μελέτες πρόσδεσης του PAF στα αιμοπετάλια με χρήση ραδιενεργών PAF, WEB 2086, ([^{3}H]-PAF, [^{3}H]-WEB 2086) έχουν αποδείξει την ύπαρξη υποδοχέων χωρίς όμως να διευκρινίζεται η ακριβής μοριακή δομή αυτών. Οι Valone και συν. (168) έδειξαν πρώτοι ότι ο [^{3}H]-PAF συνδέεται σε ανθρώπινα αιμοπετάλια σε δύο διαφορετικές θέσεις σύνδεσης. Η μία θέση, υπεύθυνη για την συσσώρευση των αιμοπεταλίων, είναι υψηλής συγγένειας και μικρής χωρητικότητας (K_d 37±13 nM, Bmax 1399 θέσεις ανά αιμοπετάλιο) ενώ η άλλη είναι χαμηλής συγγένειας και απεριόριστης ικανότητας δέσμευσης μορίων του PAF. Σε μια άλλη εργασία οι Kloprogge και συν. (169) επιβεβαίωσαν την ύπαρξη εξειδικευμένων θέσεων πρόσδεσης του [^{3}H]-PAF στα ανθρώπινα αιμοπετάλια με σταθερά διάστασης K_d 18.86±4.82 nM και ικανότητα πρόσδεσης 242±64 μόρια ανά αιμοπετάλιο. Επόμενη μελέτη των Kloprogge και συν. (170) στο ίδιο αντικείμενο έδειξε ότι όταν ο PAF επωαστεί με ανθρώπινα αιμοπετάλια στους 22 ^{0}C για 40 min επάγει επιπλέον και την έκθεση δύο περιοχών σύνδεσης του Fg. Οι περιοχές αυτές βρέθηκε να παρουσιάζουν διαφορετική συγγένεια, χωρητικότητα και τρόπο δέσμευσης των μορίων του ινωδογόνου (Fg). Παρόμοια με τα ανθρώπινα αιμοπετάλια, τα αιμοπετάλια κουνελιού έχουν υψηλή συγγένεια πρόσδεσης για [^{3}H]-PAF, ενώ αντίθετα στα αιμοπετάλια αρουραίου δεν έχει προσδιοριστεί σημείο ειδικής σύνδεσης. Η δέσμευση του [^{3}H]-PAF στους υποδοχείς του έχει δειχτεί ότι επηρεάζεται από την παρουσία διαφόρων ιόντων. Για παράδειγμα τα ιόντα Li^+ και Na^+ αναστέλλουν την πρόσδεση του [^{3}H]-PAF, ενώ αντίθετα τα ιόντα Ca^{2+}, Mg^{2+}, Mn^{2+} και K^+ τη διευκολύνουν (171).

Παρά τα σημαντικά προβλήματα τα οποία απαντώνται στην προσπάθεια απομόνωσης και καθαρισμού των υποδοχέων του PAF όπως είναι: η υψηλή μη ειδική δέσμευση, το γεγονός ότι τα περισσότερα κύτταρα μπορούν και μεταβολίζουν τον PAF και ο μικρός αριθμός υποδοχέων ανά κύτταρο, πρωτεΐνες των οποίων τα μοριακά βάρη κυμαίνονται από 52-350 kDa έχουν προταθεί από διαφορετικές ερευνητικές ομάδες σαν πιθανοί υποδοχείς του PAF στα αιμοπετάλια, χωρίς όμως να διευκρινίζονται τα ακριβή μοριακά χαρακτηριστικά αυτών (172-177).

Το 1991 οι Honda και συν. κλωνοποίησαν ένα cDNA για τον υποδοχέα του PAF από πνεύμονα χοίρου guinea (εικόνα 6) (178). Η ανάλυση του cDNA έδειξε ότι ο υποδοχέας του PAF αποτελείται από 342 αμινοξέα και έχει μοριακή μάζα 39 kDa. Η δομή του υποδοχέα του PAF είναι όμοια με αυτή της υπεροικογένειας των

συζευγμένων με G-πρωτεΐνες υποδοχέων. Πρόκειται για μια μονή πολυπεπτιδική αλυσίδα η οποία σχηματίζει 7 διαμεμβρανικά τμήματα ενώ το καρβοξυτελικό κυτοπλασματικό άκρο περιέχει 4 κατάλοιπα σερίνης και 5 θρεονίνης σαν πιθανά σημεία φωσφορυλίωσης από τις κινάσες των συζευγμένων με G-πρωτεΐνες υποδοχέων. Στην συνέχεια έγινε κλωνοποίηση του cDNA του υποδοχέα του PAF από ανθρώπινα λευκοκύτταρα (179,180), HL-60 κύτταρα (181), καρδιακά κύτταρα (182) και από τα ανθρώπινα λευχαιμικά ηωσινόφιλα EoL-1 (183). Η αλληλουχία των αμινοξέων του κλωνοποιημένου υποδοχέα του PAF από τα ανθρώπινα λευκοκύτταρα παρουσιάζει ομοιότητα κατά 83% στις διαμεμβρανικές περιοχές και 70% στην ολική αλληλουχία, με αυτόν του πνεύμονα του ινδικού χοιριδίου.



Εικόνα 6. Η δομή του υποδοχέα του PAF.

Αποτέλεσμα της πρόσδεσης του PAF στον υποδοχέα του είναι η εκδήλωση κυτταρικών απαντήσεων καθώς κινητοποιούνται μηχανισμοί επαγωγής σήματος. Αρκετές μελέτες έχουν αποδείξει την εμπλοκή G-πρωτεϊνών στην μετάδοση των κυτταρικών μηνυμάτων που εκδηλώνονται μετά την σύνδεση του PAF στον υποδοχέα του στα αιμοπετάλια αφού έχει δειχτεί ότι η σύνδεση αυτή διεγείρει την δραστικότητα μιας GTPασης ενώ το GTP μπορεί να μεταβάλλει την δέσμευση αυτή.

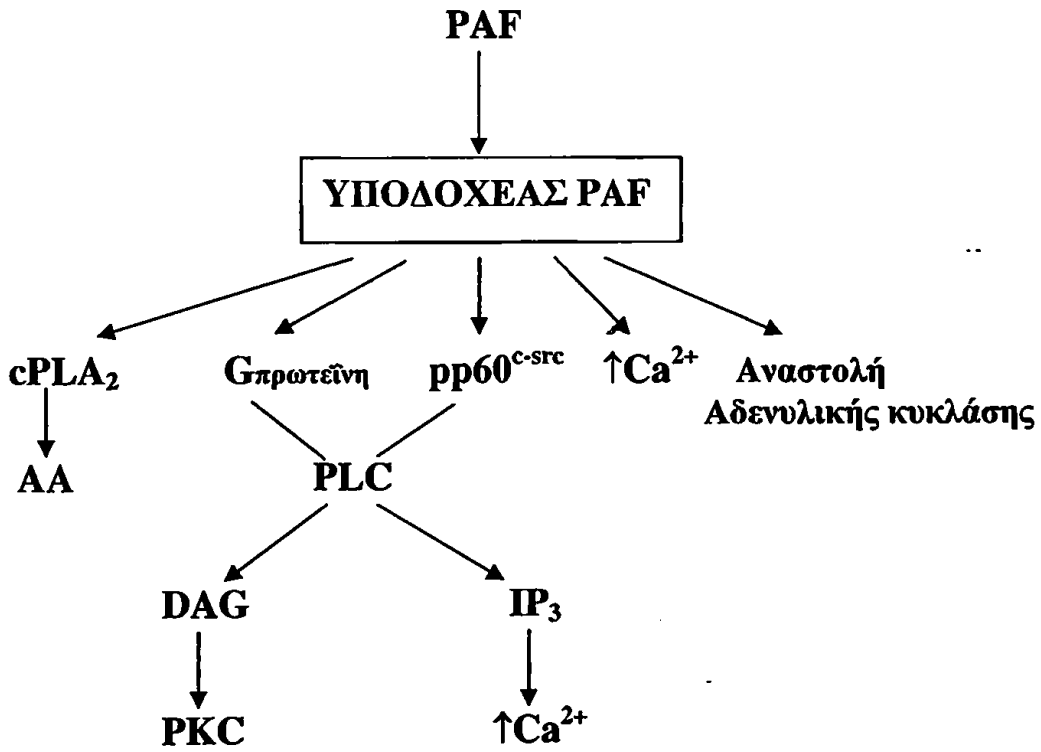
Ο PAF στα αιμοπετάλια, όπως και σε άλλα είδη κυττάρων, ενεργοποιεί την φωσφολιπάση C (PLC). Η ενεργοποίηση της PLC στα αιμοπετάλια γίνεται είτε διαμέσου σύζευξης αυτής με μία άγνωστη μέχρι σήμερα G-πρωτεΐνη η οποία δεν

είναι ευαίσθητη στην τοξίνη του κοκκύτη (PTX) είτε μέσω φωσφορυλίωσης ενός καταλοίπου τυροσίνης από την τυροσινική κινάση (PTK) χωρίς να είναι γνωστός ο μηχανισμός ενεργοποίησής της από τον PAF. Η PLC υδρολύει την 4,5-διφωσφορική φωσφατιδύλοϊνοσιτόλη (PIP_2) προς σχηματισμό των δύο δεύτερων αγγελιοφόρων 1,4,5 τριφωσφορική ινοσιτόλη (IP_3) και διακυλογλυκερόλη (DAG) (184). Η DAG έχει βρεθεί ότι ενεργοποιεί την πρωτεϊνική κινάση C (PKC) η οποία με τη σειρά της φωσφορυλιώνει κατάλοιπα σερίνης και θρεονίνης πρωτεϊνών στόχων προκαλώντας την ενεργοποιησή τους. Ιδιαίτερα, η PKC φωσφορυλιώνει την P47 MAP κινάση του κυτοπλάσματος η οποία παίζει σημαντικό ρόλο στην αλλαγή της διαμόρφωσης του υποδοχέα $\alpha_{IIb}\beta_3$ στην μεμβράνη των αιμοπεταλίων. Πειραματικά έχει αποδειχτεί ότι ο PAF διεγείρει τον μεταβολισμό των φωσφοϊνοσιτιδίων. Προκαλεί αύξηση του φωσφατιδικού οξέος (PA), το οποίο αποτελεί μεταβολικό προϊόν του κύκλου της PLC, πιθανώς μέσω της DAG η οποία με την δράση μιας κινάσης φωσφορυλιώνεται σε PA. Η IP_3 προκαλεί την ταχεία απελευθέρωση ιόντων Ca^{2+} από τις ενδοκυττάριες αποθήκες αυξάνοντας την κυτοσολική συγκέντρωση αυτού. Ωστόσο, η αύξηση των επιπέδων του ενδοκυττάριου Ca^{2+} που επάγεται από τον PAF είναι κυρίως αποτέλεσμα της εισροής εξωκυττάριου Ca^{2+} μέσω μεμβρανικών καναλιών Ca^{2+} που ρυθμίζονται από υποδοχείς του PAF ή από μόρια αγγελιοφόρους που παράγονται ενδοκυττάρια, όπως για παράδειγμα μεταβολίτες του αραχιδονικού οξέος (AA) και σε μικρότερο βαθμό στην προκαλούμενη από την IP_3 κινητοποίηση του ενδοκυττάριου Ca^{2+} (185,186).

Η αύξηση της συγκέντρωσης του ενδοκυττάριου Ca^{2+} έχει σαν αποτέλεσμα την ενεργοποίηση μιας κυτοσολικής φωσφολιπάσης A_2 ($cPLA_2$). Η $cPLA_2$ καταλύει την απελευθέρωση του AA που είναι εστεροποιημένο στην sn-2 θέση των μεμβρανικών φωσφολιπιδίων. Το AA στην συνέχεια μεταβολίζεται σε ενεργά βιολογικά εικοσανοειδή όπως προσταγλανδίνες, θρομβοξάνια και λευκοτριένια που συμμετέχουν στις παθολογικές δράσεις του PAF.

Ο υποδοχέας του PAFσυνδέεται μέσω Gi πρωτεϊνών, ευαίσθητων στην PTX, με την αδενυλική κυκλάση. Έτσι ο PAF συνδεόμενος στον υποδοχέα του εμποδίζει την συσσώρευση κυκλικού AMP (c-AMP) αναστέλλοντας την αδενυλική κυκλάση (187). Προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει ότι ο PAF διεγείρει την φωσφορυλίωση καταλοίπων τυροσίνης πολλών κυτταρικών πρωτεϊνών (188,189). Σύμφωνα με τους Rezaul και συν. (189) ο PAF σε αιμοπετάλια χοίρου προκαλεί φωσφορυλίωση και ενεργοποίηση της $p72^{syk}$ κινάσης η οποία πιθανώς παίζει ρόλο στη συσσώρευση και

κινητοποίηση των ιόντων Ca^{2+}. Η δράση αυτή του PAF, βρέθηκε να παρεμποδίζεται από τον ανταγωνιστή του υποδοχέα του CV3988 και τον αναστολέα κινασών τυροσίνης γενιστεΐνη, ενώ η ασπιρίνη και η απυράση δεν είχαν καμία επίδραση. Η αντίδραση φωσφορυλίωσης φαίνεται να καταλύεται από την PTK με άγνωστο μέχρι σήμερα τον μηχανισμό ενεργοποίησης της από τον PAF. Χαρακτηρισμός των φωσφορυλιωμένων στην τυροσίνη πρωτεϊνών των αιμοπεταλίων οδήγησε στην ταυτοποίηση της πρωτεΐνης $pp60^{c\text{-}src}$, μοριακού βάρους 60 kDa (188). Πρόσφατες μελέτες υποδηλώνουν τη συμμετοχή του PAF στην ενεργοποίηση MAP κινασών, όπως για παράδειγμα οι P42, P44 και S6 MAP κινάσες στα αιμοπετάλια προβάτου, με πιθανή συμμετοχή και της PKC (190). Οι κυριότερες δράσεις του PAF συνοψίζονται στο σχήμα 1.

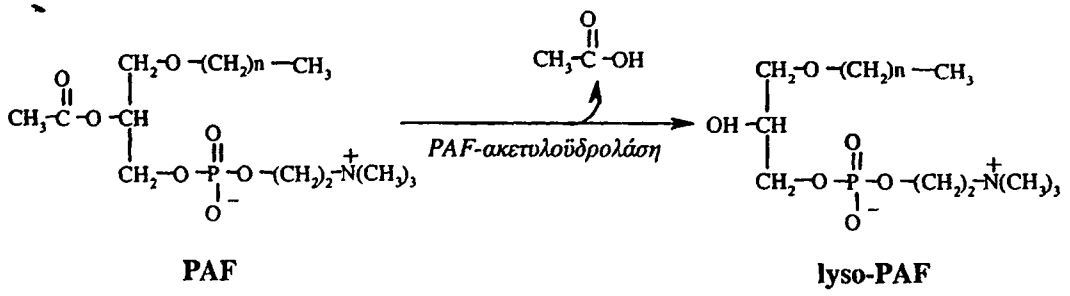


Σχήμα 1. Μηχανισμοί μεταγωγής σήματος μετά τη σύνδεση του PAF στον υποδοχέα του.

PAF-ακετυλοϋδρολάση

Γενικά χαρακτηριστικά

Η PAF-ακετυλοϋδρολάση, PAF-AH, (EC 3.1.1.47) υδρολύει τον εστερικό δεσμό στην sn-2 θέση του PAF απομακρύνοντας την οξική ομάδα και παράγοντας τον βιολογικά ανενεργό λύσο-PAF (σχήμα 2) (191). Ο λύσο-PAF (lyso-PAF) που παράγεται από την υδρόλυση, παρουσιάζει κυτταροτοξική δράση εξαιτίας των απορρυπαντικών ιδιοτήτων που εμφανίζει, σε πολύ μεγαλύτερες όμως συγκεντρώσεις από αυτές του PAF (>1μM) (192).



Σχήμα 2. Η αποικοδόμηση του PAF από την PAF-AH.

Οι PAF-ακετυλοϋδρολάσες είναι ένζυμα διαφορετικά από τις κλασικές PLA_2 γιατί δεν απαιτούν την ύπαρξη των ιόντων ασβεστίου για να δράσουν. Επίσης, σε αντίθεση με τις κλασικές PLA_2, οι PAF-AH υδρολύουν φωσφολιπίδια με μικρή αλκυλομάδα στην sn-2 θέση τους (<9 άτομα C). Με γενικό χαρακτηριστικό την υδρολυτική αυτή δράση καθώς και την δυνατότητα δράσης απουσία ιόντων ασβεστίου, η PAF-AH κατατάσσεται στις ανεξάρτητες ιόντων ασβεστίου PLA_2 (193).

Διασπορά της PAF-AH στη φύση

Ενεργότητα της PAF-AH έχει βρεθεί σε πολλά είδη ιστών και κυττάρων καθώς και στο πλάσμα ανθρώπου και άλλων θηλαστικών (πίνακας 2) (194).

Πίνακας 2. PAF-AH σε διάφορα είδη θηλαστικών.

ΕΙΔΟΣ ΘΗΛΑΣΤΙΚΟΥ	ΕΙΔΟΣ ΙΣΤΩΝ-ΚΥΤΤΑΡΩΝ	ΠΗΓΗ ΤΗΣ PAF-AH
Άνθρωπος	Αιμοπετάλια	Κυτοσόλιο
	Ουδετερόφιλα, Ηωσινόφιλα	Ομογενοποίημα
	Μονοκύτταρα-Μακροφάγα	Ομογενοποίημα
	Ερυθροκύτταρα, Μαστοκύτταρα	Κυτοσόλιο
	Νεφροί	Ομογενοποίημα
	HepG2	Υπερκείμενο
	Ορός-Πλάσμα	
Επίμυς	Νεφροί, Νεφρικός φλοιός	Κυτοσόλιο
	Εγκέφαλος	Κυτοσόλιο
	Πνεύμονας, Σπλήνας	Κυτοσόλιο
	Ήπαρ, Καρδιά	Κυτοσόλιο
	Αιμοπετάλια, Ερυθροκύτταρα	Ομογενοποίημα
	Λεμφοκύτταρα	Ομογενοποίημα
	Μονοκύτταρα-Μακροφάγα	Ομογενοποίημα
	Κοκκιοκύτταρα	Ομογενοποίημα
	Πλάσμα	
Ποντικός	Περιτόναιο, Αιμοπετάλια	Ομογενοποίημα
	Μακροφάγα	
	Πλάσμα	
Βόδι	Αιμοπετάλια	Υπερκείμενο
	Εγκέφαλος	
Κουνέλι	Νεφρά, Σπλήνας	Κυτοσόλιο
Ινδικό Χοιρίδιο	Νεφρά	Κυτοσόλιο
	Πλάσμα	

Κατάλληλες συνθήκες ενεργοποίησης προκαλούν την έκκριση της PAF-AH από διάφορα κύτταρα *in vitro*, παρόλα αυτά όμως η πηγή ή οι πηγές της PAF-AH πλάσματος *in vivo* δεν είναι ακόμη πλήρως γνωστές (195). Η PAF-AH των ιστών κατανέμεται κυρίως στο κυτοσόλιο των κυττάρων τους (196). Στα ανθρώπινα μονοκύτταρα κατά την διαφοροποίησή τους σε μακροφάγα, αυξάνεται κατά 260 φορές η ενεργότητα της ενδοκυττάριας PAF-AH ενώ παράλληλα το ένζυμο

εκκρίνεται στον εξωκυττάριο χώρο σε ελεύθερη μορφή (197). Τα κύτταρα ηπατώματος $HepG_2$ κατά την καλλιέργειά τους εκκρίνουν PAF-AH, όπως και οι πρωτογενείς καλλιέργειες ηπατοκυττάρων και η έκκριση αυτή ενισχύεται με την προσθήκη εξωγενούς PAF (198). Επίσης, τα πλυμένα αιμοπετάλια ανθρώπου και βοδιού εκκρίνουν PAF-AH κατά τη συσσώρευσή τους παρουσία PAF, ADP ή θρομβίνης (199,200). Γνωστό είναι ότι και τα μαστοκύτταρα εκκρίνουν PAF-AH μετά από ενεργοποίηση με PAF (201). Επομένως τα μακροφάγα, τα αιμοπετάλια, τα ηπατοκύτταρα και τα μαστοκύτταρα θεωρούνται σήμερα οι κυριότερες πηγές της PAF-AH του πλάσματος.

PAF-AH πλάσματος

Έχει μελετηθεί η PAF-AH του πλάσματος ανθρώπου (και συγκεκριμένα ως πηγή χρησιμοποιήθηκε η LDL) καθώς και η PAF-AH του πλάσματος διαφόρων θηλαστικών (202). Η PAF-AH της LDL του πλάσματος ανθρώπου αρχικά βρέθηκε ότι είναι μια μονομερής πρωτεΐνη η οποία αποτελείται από 441 αμινοξέα. Από τα αμινοξέα 42-441 υπολογίστηκε το μοριακό της βάρος και βρέθηκε να είναι 45.4 kDa (206). Η αλληλουχία των αμινοξέων της είναι μοναδική, εκτός από τη σειρά Gly-Xaa-Ser-Xaa-Gly που είναι χαρακτηριστική για τις σερινοεστεράσες και για πολλές λιπάσες. Το ενεργό κέντρο του ενζύμου έχει προσδιοριστεί με τη χρήση τεχνικών παράπλευρης μεταλλαξογέννεσης και αποτελείται από την καταλυτική τριάδα της Ser (273), της Asp (296) και της His (351) (203). Η δομή στον χώρο του ενζυμικού κέντρου παρομοιάζεται με τις πτυχές των α/β υδρολασών. Αποτελείται από ένα κεντρικό επικρατούν πτυχωτό β-φύλλο με συνδέσεις α-έλικας (204).

Το cDNA της PAF-AH του πλάσματος κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη της οποίας τα πρώτα 17 αμινοξέα (από την Met-1 έως την Ala-17) είναι υδρόφοβα και ο ρόλος τους πιθανά είναι η σηματοδότηση για την έκκρισή της. Η θέση Ala-17/Val-18 πιθανότατα είναι το σημείο σχάσης αυτού του πεπτιδίου. Τα επόμενα 24 αμινοξέα (από την Val-18 μέχρι Lys 41) δεν έχουν βρεθεί στην πρωτεΐνη που απομονώθηκε από το πλάσμα. Έτσι δεν έχει διευκρινιστεί αν πρόκειται για ένα προ-πεπτίδιο ή αν το ένζυμο που απομονώθηκε από το πλάσμα είχε υποστεί ήδη πρωτεόλυση (197). Πάντως η θέση

της Lys 41/Ile 42 δεν μπορεί αποτελεί το σημείο σχάσης του σηματοδοτικού πεπτιδίου αφού η Lys δεν έχει βρεθεί στην -1 θέση (205).

Η κυριότερη πηγή της PAF-AH του πλάσματος, όπως αναφέρθηκε ήδη, θεωρείται ότι είναι τα μακροφάγα. Το γονίδιό της εκφράζεται στα μακροφάγα, στον θύμο αδένα, στις αμυγδαλές και στον πλακούντα. Δεν εκφράζεται όμως στο ήπαρ, στην καρδιά, στο νεφρό και στον εγκεφαλικό φλοιό. Αντίθετα όμως εκφράζεται σε άλλες περιοχές του εγκεφάλου, όπως είναι ο υποθάλαμος (202). Τα ηπατοκύτταρα επίσης εκκρίνουν PAF-AH, αλλά το mRNA των ηπατοκυττάρων δεν αναγνωρίζει το cDNA της PAF-AH του πλάσματος. Η έκκριση από τα ηπατοκύτταρα γίνεται σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις (198). Δεν υπάρχει έκφραση του mRNA της PAF-AH σε μονοκύτταρα περιφερικού αίματος παρά μόνο μια ημέρα μετά την έναρξη της διαφοροποίησής τους προς μακροφάγα.

Εξειδίκευση υποστρώματος

Έχει μελετηθεί η εξειδίκευση στο υπόστρωμα που υδρολύει η PAF-AH του πλάσματος (206,207) και πρόσφατα επιβεβαιώθηκε χρησιμοποιώντας την ανασυνδυασμένη μορφή της PAF-AH. Χρησιμοποιήθηκαν για υπόστρωμα μόρια PAF και φωσφολιπίδια με διάφορα δομικά χαρακτηριστικά ανάλογα του PAF καθώς και αναστολείς της υδρόλυσης του. Τα συμπεράσματα συνοπτικά είναι:

1. Η δράση του ενζύμου δεν επηρεάζεται από τον δεσμό (αιθερικό ή εστερικό) της $1^{ης}$ θέσης του φωσφολιπιδίου που υδρολύει (του PAF ή αναλόγου του) αλλά επηρεάζεται από το μήκος της αλυσίδας στη θέση αυτή. Έχει παρατηρηθεί ότι για να δράσει το ένζυμο απαιτείται λιπαρή αλυσίδα με περισσότερα από 10 άτομα άνθρακα στην 1η θέση. Επίσης η PAF-AH εμφανίζει την ίδια εξειδίκευση για το D- ή το L-ισομερές. (208).

2. Σε αντίθεση με την $1^{η}$ θέση, υπάρχει μεγάλη εξειδίκευση για το είδος του δεσμού και το μήκος της ανθρακικής αλυσίδας της sn-2 θέσης. Υδρολύει μόνο εστερικούς δεσμούς, με μείωση της δυνατότητας υδρόλυσης από τα 2 άτομα άνθρακα (όπου παρατηρείται ισχυρή υδρολυτική ικανότητα), στα εννέα άτομα άνθρακα (όπου παρατηρείται ασθενής υδρολυτική ικανότητα), ενώ σε μεγαλύτερες ανθρακικές αλυσίδες η υδρολυτική ικανότητα χάνεται. Έτσι, όταν στην θέση αυτή υπάρχει

εστεροποιημένη οξική ομάδα, η ταχύτητα υδρόλυσης και η ενεργότητα του ενζύμου είναι υψηλές ενώ μειώνονται ανάλογα με τον αριθμό των ατόμων άνθρακα ως εξής: C2>>C3=C4>C6 (196,206). Επίσης, δεν αποτελούν υπόστρωμα για την PAF-AH του πλάσματος τα φωσφολιπίδια των λιποπρωτεϊνών και των βιολογικών μεμβρανών που έχουν εστεροποιημένες στην 2 θέση μεγάλες λιπαρές αλυσίδες. Επομένως το ένζυμο μπορεί να υπάρχει στην ενεργό του μορφή και να κυκλοφορεί ελεύθερα στο πλάσμα χωρίς να υδρολύει τα φωσφολιπίδια των κυττάρων και των λιποπρωτεϊνών του πλάσματος. Μπορεί όμως και υδρολύει τα οξειδωμένα παράγωγα των φωσφολιπιδίων, τα οποία έχουν μικρή ακυλομάδα στην sn-2 θέση του γλυκερινικού σκελετού, παίζοντας έτσι πολύ σημαντικό ρόλο στην ρύθμιση των επιπέδων τους (209,210). Τα βιολογικά δραστικά οξειδωμένα φωσφολιπίδια υπάρχουν στις κυτταρικές μεμβράνες καθώς και στις LDL και είναι αποτέλεσμα της οξείδωσης των εστεροποιημένων πολυακόρεστων λιπαρών οξέων στην sn-2 θέση (208). Τα οξειδωμένα φωσφολιπίδια εμφανίζουν δομικές ομοιότητες με τον PAF. Επίσης, μερικά από τα οξειδωμένα φωσφολιπίδια αναγνωρίζονται από τον υποδοχέα του PAF, με αποτέλεσμα να εμφανίζουν παρόμοιες βιολογικές δράσεις, γεγονός που δικαιολογείται και ο όρος που χρησιμοποιείται, PAF-like phospholipids (PAF-LL) (σχήμα 3). Σημαντική όμως διαφορά μεταξύ του PAF και των οξειδωμένων φωσφολιπιδίων είναι το γεγονός ότι η παραγωγή του PAF είναι απόλυτα ελεγχόμενη γιατί ρυθμίζεται ενζυμικά, με βάση τις δύο πορείες που ήδη έχουν αναφερθεί (181), σε αντίθεση με τα επίπεδα των οξειδωμένων φωσφολιπιδίων που αυξάνονται ανεξέλεγκτα, εξαρτώμενα από την ένταση του οξειδωτικού stress (196).

3. Η PAF-AH υδρολύει κατά προτίμηση τα φωσφολιπίδια με το πολικό μόριο χολίνης στην 3η θέση του γλυκερινικού σκελετού, αφού αντικατάστασή της από άλλα παρόμοια μόρια προκαλεί την μείωση της ενεργότητας της.

Τα φωσφολιπίδια τα οποία δεν περιέχουν γλυκερινικό σκελετό ή δεν έχουν παρόμοια δομικά χαρακτηριστικά στην 1η και 2η θέση με αυτά που προαναφέρθηκαν δεν αποτελούν υπόστρωμα για την PAF-AH του πλάσματος, γεγονός που αποδεικνύει ότι η PAF-AH είναι μια εξειδικευμένη εστεράση (208). Το ενεργό κέντρο της PAF-AH, που αποτελείται από τη σειρά Ser-Asp-His χαρακτηριστική των λιπασών, είναι ένα ακόμη χαρακτηριστικό που διαφοροποιεί την PAF-AH από τις PLA_2.

Ενζυμικές ιδιότητες

Η PAF-AH του πλάσματος κατατάσσεται στην ομάδα VII/A των PLA_2. Έχει μέγιστη ενεργότητα σε pH 7-8.4 και βέλτιστη σε ρυθμιστικό διάλυμα Hepes 7.6, η οποία δεν επηρεάζεται από την ύπαρξη ιόντων Ca^{2+} καθώς και από το EDTA (192).

Δεν αναστέλλεται η ενεργότητά της παρουσία του κλασικού αναστολέα των PLA_2 (pBPB) ενώ αναστέλλεται από τους αναστολείς των σερινοεστερασών, το (διϊσοπροπυλοφθοριοφωσφορικό (DFP) και το φαινυλομεθυλοσουλφονυλοφθορίδιο (PMSF). Ένας άλλος αναστολέας των σερινοεστερασών, το 4-[2-aminoethyl]benzenesulfonyl fluoride (Pefabloc) αποδείχτηκε ότι αναστέλλει μη αντιστρεπτά, την PAF-AH του πλάσματος καθώς και αυτή που εκκρίνεται από μονοκύτταρα /μακροφάγα σε καλλιέργεια (212).

Η PAF-AH του πλάσματος (ή της LDL) είναι ένζυμο διαφορετικής φύσης από την λεκιθινοχοληστερολοακυλοτρανσφεράση (LCAT), διότι ελάχιστα αναστέλεται από τους κλασικούς αναστολείς την LCAT, όπως είναι η διθειοθρεϊτόλη (DTT) και το 5,5-διθειο-δις-(2-νιτροβενζοϊκό οξύ) (DTNB ή αντιδραστήριο Ellmans) (206,207). Επίσης, το μονοκλωνικό αντίσωμα (B_{10}) κατά της καθαρισμένης ανθρώπινης LCAT, που αναστέλλει τόσο την εστερολυτική όσο και την εστεροποιητική της ενεργότητα και αναγνωρίσει και παγκρεατικές PLA_2 καθώς και PLA_2 από δηλητήριο φιδιών, δεν αναγνωρίζει την καθαρισμένη μορφή της PAF-AH του πλάσματος (206).

Ένα άλλο ένζυμο του πλάσματος που θα μπορούσε να έχει δράση PAF-AH είναι η τριβουτυρική εστεράση. Είναι ένα ένζυμο που υδρολύει μικρές ανθρακικές αλυσίδες εστεροποιημένες στο γλυκερινικό σκελετό. Η προσθήκη όμως τριβουτυρικής εστεράσης στο διάλυμα αντίδρασης σε υψηλές συγκεντρώσεις δεν αναστέλλει την ενεργότητα της PAF-AH του πλάσματος (206).

Η ενεργότητα της PAF-AH του πλάσματος (ή της LDL) όταν εκτεθεί σε ελεύθερες ρίζες οξυγόνου (οι οποίες δημιουργούνται από σύστημα ξανθίνης/υποξανθίνης) μειώνεται στο 50% της αρχικής, μέσα στα πρώτα 60 sec της επίδρασης. Μετά από 10 min, το μεγαλύτερο ποσοστό της ενεργότητας της έχει ανασταλεί μη αντιστρεπτά (213), χωρίς όμως να έχει μεταβληθεί και η Km του υπολοίπου ενεργού ενζύμου. Ο χρόνος αυτός της απενεργοποίησης της PAF-AH με τη δράση των ελευθέρων ριζών δεν είναι αρκετός για την έναρξη της υπεροξείδωσης των λιπαρών οξέων της LDL, ένδειξη ότι κατά την οξείδωση της LDL, η ενδογενής PAF-AH δεν επαρκεί για την υδρόλυση των οξειδωμένων φωσφολιπιδίων που θα

σχηματιστούν (213). Επίσης, άλλες μελέτες έχουν δείξει ότι κατά την οξειδωτική τροποποίηση της LDL η ενεργότητα του ενζύμου επίσης μειώνεται. Μελέτες των κινητικών σταθερών της PAF-AH κατά την οξείδωση της LDL έδειξαν πως η Km διατηρείται σταθερή (άρα το ένζυμο διατηρεί τη συγγένεια για το υπόστρωμα) μειώνεται όμως η Vmax. Η πτώση αυτή φανερώνει μείωση της ενεργότητας του ενζύμου που οφείλεται στην οξειδωτική τροποποίησή της πρωτεΐνης της PAF-AH (214).

Κινητικές μελέτες της PAF-AH έχουν γίνει χρησιμοποιώντας ως πηγές του ενζύμου πλάσμα ή ορό, καθαρή LDL ή ανασυνδιασμένο ένζυμο. Οι τιμές των Km για το ίδιο ένζυμο δεν είναι σταθερές και διαφέρουν ανάλογα με την πηγή (206,215-218). Αυτό το εύρημα αποτελεί ένδειξη ότι οι τιμές Km του ενζύμου επηρεάζονται από διάφορους εξωγενείς παράγοντες, μερικοί από τους οποίους έχουν διερευνηθεί, όπως είναι η αλβουμίνη και το λιποπρωτεϊνικό περιβάλλον (215).

Φυσικοχημικές ιδιότητες

Η PAF-ακετυλοϋδρολάση του πλάσματος ανθρώπου είναι υδρόφοβο μόριο το οποίο είναι συνδεδεμένο στις χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνες LDL (κατά περίπου 70%) και τις υψηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνες HDL (κατά το υπόλοιπο 30%). Έχει παρατηρηθεί *in vitro* ότι η PAF-AH μεταφέρεται από την LDL στην HDL και αντίστροφα, ανάλογα με το pH του περιβάλλοντος μέσου. Έτσι, σε pH 6, η ενεργότητα της PAF-AH μεταφέρεται από την LDL στην HDL ενώ σε pH 7.4 γίνεται το αντίστροφο. Τα ένζυμα που εντοπίζονται πάνω στις LDL και HDL είναι πιθανότατα της ίδιας ισομορφής γιατί εμφανίζουν την ίδια ηλεκτροφορητική κινητικότητα και αναγνωρίζονται ομοίως από το πολυκλωνικό αντίσωμα κατά της PAF-AH, που απομονώθηκε από την LDL (219).

Πρόσφατες μελέτες υποδεικνύουν ότι υπάρχουν δύο πιθανοί τρόποι σύνδεσης της PAF-AH με τις λιποπρωτεΐνες του πλάσματος (220). Μετά από απομόνωση των λιποπρωτεϊνών με FPLC, η PAF-AH βρέθηκε συνδεδεμένη κατά περίπου 85% με τις LDL ενώ μετά από υπερφυγοκέντρηση παρατηρήθηκε μια διασπορά της ενεργότητας σε υψηλότερες περιοχές πυκνοτήτων, στην περιοχή των HDL και στην περιοχή με πυκνότητα d>1.21g/ml. Η PAF-AH του πλάσματος, μετά από υπερφυγοκέντρηση,

βρέθηκε ότι είναι κατανεμημένη ανισομερώς στα 3 υποκλάσματα της LDL με μεγαλύτερη ενεργότητα να εμφανίζει το μικρό και πυκνό υποκλάσμα της (LDL-3) (221). Αναλυτικότερη απομόνωση όλων των υποκλασμάτων των λιποπρωτεϊνών του ανθρωπίνου πλάσματος (VLDL+IDL, LDL1-5, HDL2-3 και VHDL) επιβεβαίωσε την κατανομή της ενεργότητας στα μικρό και πυκνό υποκλάσμα της LDL (LDL-5) και έδειξε ότι μεταξύ των υποκλασμάτων της HDL η PAF-AH κατανέμεται στο μικρό-πυκνό υποκλάσμα VHDL (very high density lipoprotein) (222).

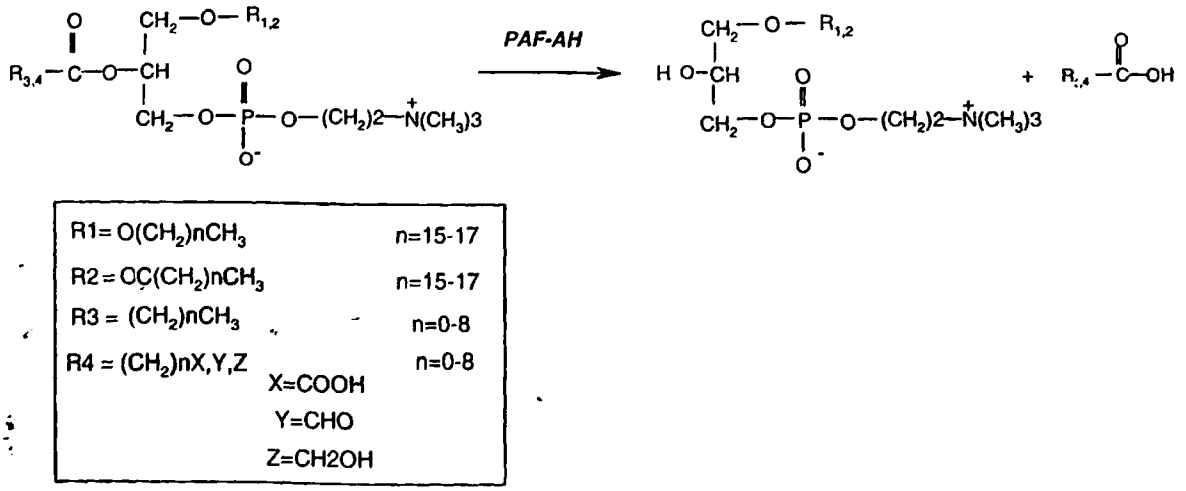
Η PAF-AH του πλάσματος από άλλα θηλαστικά διαφέρει από αυτή του πλάσματος ανθρώπου. Η PAF-AH του πλάσματος αρουραίων και κουνελιών είναι συνδεδεμένη κυρίως με τις υψηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνες (HDL) (193) ενώ η PAF-AH του πλάσματος των ποντικών κατανέμεται, εκτός από τις HDL σε μικρό ποσοστό και στις VHDL (224). Θα πρέπει όμως να τονιστεί ότι οι HDL των αρουραίων και των ποντικών αποτελούν περισσότερο από το 50% των συνολικών λιποπρωτεϊνών του πλάσματός τους (224). Επιπλέον μελέτες της PAF-AH του πλάσματος των ποντικών, έδειξε ότι αποτελείται από δύο διαφορετικού μοριακού βάρους πρωτεΐνες, 46 και 63 kDa (225). Τέλος, έχει κλωνοποιηθεί και χαρακτηριστεί το ένζυμο της PAF-AH από το πλάσμα των ινδικών χοιριδίων (226). Το cDNA του αποκωδικοποιεί 436 αμινοξέα με μοριακό βάρος υπολογιζόμενο περίπου 49 kDa. Το μοριακό αυτό βάρος είναι μικρότερο από το μοριακό βάρος του φυσικού ενζύμου, ένδειξη ότι, όπως και το ένζυμο του ανθρωπίνου πλάσματος, είναι πιθανότατα γλυκοζυλιωμένο.

Παθοφυσιολογικός ρόλος της PAF-AH

Ο PAF εκτός ότι είναι ένας πολύ ισχυρός διαμεσολαβητής της φλεγμονής, συμμετέχει σε πολλές παθοφυσιολογικές αντιδράσεις, μεταξύ των άλλων, στην απόπτωση, στην καρκινογένεση, στα εγκεφαλικά επεισόδια, στις ασθματικές και στις αλλεργικές αντιδράσεις όπως το βρογχικό άσθμα. Σημαντικός ρόλος της PAF-AH είναι η υδρόλυση και απενεργοποίηση αποικοδόμηση του PAF ρυθμίζοντας με αυτό τον τρόπο τα επίπεδα του στο πλάσμα.(204).

Η οξείδωση των χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεϊνών (LDL) φαίνεται να παίζει ένα σημαντικό ρόλο στην παθογένεια της αθηρωμάτωσης (227-229). Επίσης η

πρόσληψη των οξειδωμένων LDL (ox-LDL) από τα μακροφάγα του υπενδοθηλιακού χώρου είναι η αιτία που τα κύτταρα αυτά μετατρέπονται σε αφρώδη κύτταρα, συμβάλλοντας στο σχηματισμό των λιπωδών γραμμώσεων της αθηρωματικής πλάκας. Η ox-LDL είναι πλούσια σε φωσφολιπίδια μερικά από τα οποία έχουν παρόμοια δομή και δράση με αυτή του PAF, τα PAF-LL, που περιέχουν στην sn-2 θέση του γλυκερινικού σκελετού οξειδωμένες μικρές λιπαρές αλυσίδες που έχουν αλδεϋδομάδα, κετονομάδα, ομάδες υδροξυοξέων, κλπ. Η PAF-AH, εκτός από την υδρολυτική της δράση στον PAF, υδρολύει και τα PAF-LL της LDL τα οποία αναγνωρίζει ως υπόστρωμα (σχήμα 3). Πολύ σημαντικό ρόλο στην διαδικασία αυτή παίζει και η PAF-AH της HDL, γιατί υδρολύει τα φωσφολιπίδια των ox-LDL τα οποία διαχέονται σε αυτή. Επιπλέον, η HDL δρα και ως πηγή που αναπληρώνει την PAF-AH της LDL, αφού η ενεργότητα του ενζύμου μειώνεται σημαντικά κατά την οξείδωση της LDL (223,230). Με βάση την δράση αυτή η PAF-AH παίζει επίσης σημαντικό αντιαθηρωγόνο ρόλο με την αποικοδόμηση αυτών των οξειδωμένων φωσφολιπιδίων, τα οποία σχηματίζονται *in vivo* κάτω από διάφορες συνθήκες και επομένως προστατεύει από τη δημιουργία αθηρωματικής πλάκας. Υπάρχει όμως και η άποψη ότι η υδρόλυση των PAF-LL από την PAF-AH δεν αναστέλλει την αθηρογένεση αλλά την προάγει εξαιτίας της παραγωγής της lyso-PC που, όπως προαναφέρθηκε, είναι κυτταροτοξική σε πολύ μεγάλες όμως συγκεντρώσεις (231).



Σχήμα 3. Η υδρόλυση των PAF-LL από την PAF-AH.

Η έκκριση της PAF-AH από τα μακροφάγα, τα αιμοπετάλια ή άλλα κύτταρα και επομένως η σύνδεση της ή όχι με τις λιποπρωτεΐνες του πλάσματος, φαίνεται ότι επηρεάζεται από διάφορους παράγοντες, όπως είναι οι ορμόνες, οι κυτοκίνες και τα αυξημένα επίπεδα του PAF στο πλάσμα. Η έκκριση λοιπόν της PAF-AH μπορεί να αποτελεί ένα αντιφλεγμονώδη μηχανισμό σε παθήσεις στις οποίες συμμετέχει ο PAF, όπως είναι η αθηρωμάτωση, τα ισχαιμικά εγκεφαλικά επεισόδια, το άσθμα και τα καρδιαγγειακά σύνδρομα (199,222,232,233).

PAF-AH και Lp(a)

Στην καλά τεκμηριωμένη γνώση περί ύπαρξης ενεργότητας PAF-ακετυλοϋδρολάσης πάνω στις LDL και HDL, πρόσφατες μελέτες των Blencowe και Καραμπίνα (234,235) ήρθαν να προσθέσουν και την ύπαρξη ενεργότητας του ιδίου ενζύμου στην λιποπρωτεΐνη(a). Η Lp(a) περιέχει ενεργότητα PAF-AH που εξαρτάται τόσο από τα επιπεδά της στο πλάσμα όσο και από το μέγεθος της ισομορφής της. Η PAF-AH της Lp(a) έχει όμοιες φυσικοχημικές και καταλυτικές ιδιότητες με αυτές του ενζύμου των LDL και HDL. Η σύνδεση της PAF-AH στην Lp(a) γίνεται με την απολιποπρωτεΐνη B-100 και όχι με την απολιποπρωτεΐνη(a), η οποία όμως επηρεάζει την ειδική ενεργότητα και τις φαινόμενες κινητικές σταθερές του ενζύμου (235). Επιπλέον, πρόσφατη εργασία των Μηλιώνη και συν. έδειξε ότι η PAF-AH στην Lp(a) ασθενών με χρόνια νεφρική ανεπάρκεια οι οποίοι υποβάλλονταν σε συνεχή φορητή περιτοναϊκή κάθαρση, παρουσίαζε σημαντικά υψηλότερες τιμές ειδικής ενεργότητας καθώς και φαινόμενες τιμές Km και Vmax σε σύγκριση με τις αντίστοιχες τιμές των ασθενών που υποβάλλονταν σε αιμοκάθαρση καθώς και της ομάδας ελέγχου (236). Οι πιο πάνω μελέτες αναδεικνύουν ένα νέο παθοφυσιολογικό (αντιφλεγμονώδη) ρόλο της Lp(a), πέραν της καλά τεκμηριωμένης παρεμπόδισης της θρομβόλυσης και της προαγωγής της αθηρωματικής διαδικασίας.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΤΡΙΤΟ

ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

ΠΛΗΘΥΣΜΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Τον πληθυσμό της παρούσας μελέτης αποτέλεσαν στεφανιαίοι ασθενείς που επισκέφθηκαν το Εξωτερικό Ιατρείο της Καρδιολογικής Κλινικής και άτομα που επισκέφθηκαν το Εξωτερικό Ιατρείο Διαταραχών του Μεταβολισμού των Λιπιδίων του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων. Η επιλογή των ατόμων που συμμετείχαν στην μελέτη έγινε με βάση τα επίπεδα Lp(a) πλάσματος. Έτσι στην μελέτη πήραν μέρος ασθενείς αλλά και μάρτυρες με επίπεδα Lp(a) πλάσματος ≥ 20mg/dl. Ο καθορισμός της συγκέντρωσης αυτής έγινε με σκοπό να μειωθεί ο όγκος του απαιτούμενου πλάσματος για την απομόνωση επαρκούς ποσότητας της λιποπρωτεΐνης αυτής. Η διάγνωση της στεφανιαίας νόσου (n=20) βασίστηκε στο ιστορικό των ασθενών, σε ηλεκτροκαρδιογραφικά ευρήματα, σε βιοχημικές αναλύσεις και σε αγγειογραφικά αποτελέσματα. Κριτήρια εισόδου στην κατηγορία αυτή αποτέλεσαν τα παρακάτω: i) ιστορικό εμφράγματος μυοκαρδίου (αναδρομική διάγνωση βασισμένη στα κριτήρια του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας) και/ή ii) ιστορικό ασταθούς στηθάγχης (κριτήρια κατά Braunwald βασισμένα κύρια στο ιστορικό του ασθενούς), και/ή iii) σταθερή στηθάγχη με θετική δοκιμασία για προκλητή ισχαιμία και συνοδό στένωση (>70% της διαμέτρου) ενός τουλάχιστον επικαρδιακού αγγείου σε στεφανιογραφικό έλεγχο. Εξαιρέθηκαν της μελέτης άτομα με παράγοντες που επηρεάζουν τις συγκεντρώσεις Lp(a) πλάσματος (χρόνια νεφρική ανεπάρκεια, σακχαρώδη διαβήτη, κατάχρηση οινοπνεύματος ή κίρρωση του ήπατος, οξύ στεφανιαίο σύνδρομο ή αγγειοπλαστική των στεφανιαίων ή αορτοστεφανιαία παράκαμψη κατά τους προηγούμενους 3 μήνες πριν την αιμοληψία, λήψη οιστρογονικών σκευασμάτων, νικοτινικού οξέος, φιμπράτης και N-ακετυλοκυστεΐνη). Οι ασθενείς αυτοί ελάμβαναν β-αποκλειστές, νιτρώδη, αποκλειστές διαύλων ασβεστίου και αναστολείς του μετατρεπτικού ενζύμου της αγγειοτενσίνης. Όλοι οι ασθενείς ελάμβαναν υπολιπιδαιμική αγωγή (ατορβαστατίνη 20 mg/ημέρα) τουλάχιστον 4 μήνες πριν την λήψη αίματος. Με σκοπό την διερεύνηση της πιθανής επίδρασης της ατορβαστατίνης στην ενεργότητα της PAF-AH στην Lp(a) ή την LDL στην μελέτη πήραν μέρος και 11 ασθενείς με πρωτοπαθή υπερχοληστερολαιμία

(δυσλιπιδαιμία τύπου ΙΙΑ) οι οποίοι παρουσίαζαν επίπεδα LDL-χοληστερόλης πλάσματος >160mg/dl καθώς και Lp(a) ≥20mg/dl.

Ως μάρτυρες (n=25) ορίστηκαν άτομα παρόμοιας ηλικίας και φύλου, με φυσιολογικό ηλεκτροκαρδιογράφημα ηρεμίας, χωρίς ιστορικό και με χαμηλή πιθανότητα στεφανιαίας νόσου (ερωτηματολόγιο κατά Rose), που επισκέφτηκαν το Εξωτερικό Ιατρείο Διαταραχών του Μεταβολισμού των Λιπιδίων για κλινικοεργαστηριακό έλεγχο ρουτίνας.

ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ Lp(a) ΜΕ ΤΗΝ ΜΕΘΟΔΟ ELISA ΤΥΠΟΥ ΣΑΝΤΟΥΪΤΣ

Αρχή της μεθόδου

Το πλάσμα επωάζεται σε πλακίδιο που περιέχει ακινητοποιημένο αντι-Lp(a) αντίσωμα για 1h σε θερμοκρασία δωματίου. Με διαδοχικές εκπλύσεις το αντιγόνο που δεν έχει δεσμευτεί απομακρύνεται και ακολουθεί επώαση για 20min με πολυκλωνικό anti Lp(a) αντίσωμα το οποίο είναι συζευγμένο με υπεροξειδάση αγριοραπανιού. Η περίσσεια του πολυκλωνικού αντισώματος-υπεροξειδάσης απομακρύνεται με διαδοχικές εκπλύσεις και στο πλακίδιο παραμένει ακινητοποιημένο το σύμπλοκο του αντιγόνου με το μονοκλωνικό και το πολυκλωνικό αντίσωμα.. Ακολουθεί επώαση με υπεροξείδιο του υδρογόνου και χρωμοφόρο (ο-φαινυλοδιαμίνη) για 20min. Η αντίδραση παραγωγής χρώματος σταματά με την προσθήκη H_2SO_4 και η ένταση του χρώματος που μετράται στα 492 nm είναι συνάρτηση της συγκέντρωσης Lp(a) στο πλάσμα.

Όργανα - Διαλύματα Εργασίας

Ο προσδιορισμός γίνεται με την χρήση εμπορικής συσκευασίας η οποία περιλαμβάνει

- Πλακίδιο 96 θέσεων οι οποίες περιέχουν ακινητοποιημένο αντι-Lp(a) μονοκλωνικό αντίσωμα από ορό ποντικού
- Ανακινούμενη βάση
- Φωτόμετρο Microelisa
- **Πρότυπα διαλύματα Lp(a)** περιοχής συγκεντρώσεων από 0-80 mg/dl πλάσματος
- **Διάλυμα αραίωσης δειγμάτων Lp(a).** Περιέχει σταθεροποιητές των πρωτεϊνών και θιμεροζάλη (thimerozal)

- **Διάλυμα έκπλυσης 20X.** Περιέχει θιμεροζάλη και απορυπαντικό. Το διάλυμα 1X παρασκευάζεται με ανάμειξη 50ml του 20X με d H_2O μέχρι τελικού όγκου 1L Το αραιωμένο διάλυμα διατηρείται σε θερμοκρασία δωματίου για 2 εβδομάδες

- **Μονοκλωνικό αντίσωμα** από ποντικό (mouse anti-Lp(a) monoclonal antibody)

- **Δευτερογενές αντίσωμα** από αίγα (goat anti-Lp(a) polyclonal antibody) συζευγμένο με υπεροξειδάση αγριοραπανιού

- **Αντιδραστήριο χρωματομετρίας.** Περιέχει υπεροξείδιο του υδρογόνου

- **Ταμπλέτες ο-φαινυλενοδιαμίνης**

- **Αντιδραστήριο ανάπτυξης χρώματος.** 1 ταμπλέτα ο-φαινυλενοδιαμίνης διαλύεται σε 5 ml αντιδραστηρίου χρωματομετρίας. Το διάλυμα πρέπει να παρασκευάζεται 20 min πρίν τη χρήση του.

- **Αντιδραστήριο τερματισμού, 2N H_2SO_4**

Πειραματική διαδικασία

Τα δείγματα που χρησιμοποιούνται μπορούν να διατηρηθούν στους -80^{0}C για μεγάλο χρονικό διάστημα. Πρέπει να αποφεύγεται όμως η εναλλασόμενη απόψυξη-κατάψυξη

1. 10μl πλάσματος αναμιγνύονται με 2 ml αντιδραστηρίου αραίωσης δειγμάτων ώστε η τελική αραίωση να είναι 1:201. Αναδεύονται ήπια.

2. 100μl αραιωμένου πλάσματος και 100 μl από τα πρότυπα και τα δείγματα ελέγχου (τυφλά) τοποθετούνται με αυτόματη πιπέτα στον πυθμένα των κυψελίδων

που περιέχουν το αντίσωμα. Γίνεται επώαση για 60 min σε θερμοκρασία δωματίου, σε ανακινούμενη βάση.

3. Ακολουθούν δυο εκπλύσεις με το αντιδραστήριο έκπλυσης και απόχυση του υπερκειμένου ώστε να απομακρυνθεί η περίσσεια του υγρού έκπλυσης.

4. Προστίθενται 100 μl δευτερογενούς αντισώματος συζευγμένου με υπεροξειδάση αγριοραπανιού. Γίνεται επώαση για 20 min σε θερμοκρασία δωματίου, σε ανακινούμενη βάση.

5. Ακολουθούν δυο εκπλύσεις με το αντιδραστήριο έκπλυσης και απόχυση του υπερκειμένου.

6. 100μl από το αντιδραστήριο ανάπτυξης χρώματος προστίθενται σε κάθε κυψελίδα. Ακολουθεί επώαση για 20 min σε θερμοκρασία δωματίου, σε ανακινούμενη βάση. Το στάδιο αυτό είναι πολύ σημαντικό αφού ο χρόνος ανάπτυξης του χρώματος καθορίζει και την ακρίβεια των αποτελεσμάτων.

7. 50μl από το αντιδραστήριο τερματισμού της αντίδρασης προστίθενται σε κάθε κυψελίδα με τέτοιο τρόπο ώστε για κάθε δείγμα ο χρόνος ανάπτυξης χρώματος να είναι 20 min.

8. Μετράται η απορρόφηση στα 492nm σε φωτόμετρο microelisa

Επεξεργασία αποτελεσμάτων

Με βάση τις απορροφήσεις των προτύπων διαλυμάτων σχεδιάζεται η καμπύλη, η οποία στον άξονα Χ έχει τις συγκεντρώσεις των προτύπων σε Lp(a) και στον άξονα Ψ τις αντίστοιχες απορροφήσεις τους. Με βάση την καμπύλη και τις απορροφήσεις των δειγμάτων υπολογίζεται η συγκεντρωσή τους σε Lp(a). Δείγματα με συγκέντρωση Lp(a) μεγαλύτερη από 80 mg/dl πρέπει να αραιώνονται και να προσδιορίζονται εκ νέου.

ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΙΣΟΜΟΡΦΩΝ ΤΗΣ Apo(a)

Αρχή της μεθόδου.

Οι ισομορφές της apo(a) διαχωρίζονται με βάση το μέγεθος και το φορτίο σε πήκτωμα αγαρόζης υπό μετουσιωτικές συνθήκες. Στην συνέχεια οι πρωτεΐνες μεταφέρονται σε μεμβράνη για ανοσοδέσμευση. Αντισώμα κατά του ακινητοποιημένου στη μεμβράνη αντιγόνου (πρωτογενές αντίσωμα) δεσμεύεται στο αντιγόνο και στη συνέχεια προστίθεται αντίσωμα συζευγμένο με υπεροξειδάση αγριοραπανιού, (horseradish peroxidase, HRP) που αναγνωρίζει το πρωτογενές αντίσωμα. Η προσθήκη στη συνέχεια του αντιδραστηρίου χημειοφωταύγειας στη μεμβράνη έχει ως αποτέλεσμα την οξειδωτική αποικοδόμηση της λουμινόλης και την εκπομπή ακτινοβολίας, η οποία αποτυπώνεται σε ειδικό ευαίσθητο φίλμ (Hyperfilm) (32, 237).

Όργανα - Διαλύματα Εργασίας

- Οριζόντια συσκευή ηλεκτροφόρησης (Photodyne, 1214)
- Χτένι 20 θέσεων πάχους 1.5 mm
- Τροφοδοτικό
- Hyperfilm ECL (Enhanced chemiluminescence Detection film, Amersam)
- Διηθητικό χαρτί Whatman 3 MM
- Μεμβράνη μεταφοράς πρωτεϊνών Polyscreen PVDF (Polyvinylidene difluoride Du Pont)
- Σαρωτής, Scanner (SHARP)
- **Αντίσωμα κατά της apo(α)** από αρνί.

- **Δευτερογενές αντίσωμα** από όνο (donkey- anti ovine), συζευγμένο με υπεροξειδάση αγριοραπανιού, (HRP-conjugated)

- **Πρότυπο διάλυμα ισομορφών** εμπορίου. Πρόκειται για λυοφιλιοποιημένο ανθρώπινο ορό που περιέχει τις ισομορφές apo(α) 14, 19, 23, 27 και 35 K4. Διαλυτοποιείται σε 0.5 ml d H_2O και διατηρείται στους -20^0 C αφού μοιραστεί σε μικρές ποσότητες ώστε κάθε φορά να αποψύχεται μόνο η ποσότητα που χρησιμοποιείται.

- **Αντιδραστήριο χημειοφωταύγειας ECL.** Η εμπορική του συσκευασία περιέχει 2 αντιδραστήρια το Enhanced luminol reagent και το Oxidizing reagent τα οποία αναμιγνύονται με αναλογία 1:1 (v/v) πριν τη χρήση. Απαιτούνται 0.125 ml μείγματος για κάθε cm^2 μεμβράνης.

- **Διαλύματα ανάπτυξης και σταθεροποίησης φίλμ,** Kodak X-ray developer and fixer

- **Ρυθμιστικό διάλυμα TBE** (Tris-Base, Borate) 10X. Το διάλυμα περιέχει 1M (121 g/L) Tris base, 1M (61.8g/L) Βορικό οξύ, 0.02M (7.44g/L) EDTA. Το pH ρυθμίζεται στο 8.3. Για την παρασκευή των διαλυμάτων TBE 1X και TBE 0.5X γίνεται αραίωση του TBE 10 X, 1:10 (v/v) και 1:20 (v/v) αντίστοιχα με d H_2O.

- **Διάλυμα 1M DTT** 0.3084 g διαλύονται σε 2 ml d H_2O. Το διάλυμα χωρίζεται σε μικρά δείγματα και διατηρείται στους - 20^{0}C.

- **Διάλυμα 10% SDS.** 10 g SDS διαλύονται σε 100 ml d H_2O. Κατά την ζύγισή του απαιτείται μάσκα.

- **1.5% Αγαρόζη σε TBE 1X και 0.1% SDS.** 1.12 g αγαρόζης αναμιγνύονται με 75 ml TBE 1X. Το εναιώρημα τοποθετείται στους 120^{0}C σε πυριαντήριο μέχρι να διαλυτοποιηθεί πλήρως η αγαρόζη. Στη συνέχεια προστίθενται 750μl 10%SDS και το διάλυμα αφήνεται λίγα λεπτά υπό ήπια ανάδευση για να αποκτήσει τη θερμοκρασία δωματίου.

- **Ρυθμιστικό διάλυμα κατεργασίας δειγμάτων** το οποίο περιέχει 20 mM (2.42g/L) Tris base pH 8.8, 1% SDS και 40 mM DTT

- **Κεχρωσμένο διάλυμα φόρτωσης 6X** (Gel loading buffer, GLB) που περιέχει 0.25% κυανούν βρωμοφαινόλης, 0.25% ξυλενοκυανόλη (xylene cyanol) και 30% γλυκερόλη σε d H_2O.

- **Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης** TBE 0.5X με 0.1%SDS

- **Ρυθμιστικό διάλυμα 10 mM PBS, pH 7.4**. 8.1816 g NaCl, 1.3800 g $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ και 1.7795 g $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ διαλυτοποιούνται σε 800 ml d H_2O και αφού ρυθμιστεί το pH στο 7.4, συμπληρώνεται ο όγκος στο 1 L με d H_2O. Το διάλυμα διατηρείται στους 4°C.

- **10% Tween 20**. 10 ml Tween 20 αραιώνονται σε 100 ml d H_2O

- **Γάλα**, σκόνη εμπορίου

Πειραματική διαδικασία

Προετοιμασία πηκτώματος αγαρόζης

Το διάλυμα 1.5% αγαρόζη σε TBE 1X και 0.1% SDS αφου αποκτήσει τη θερμοκρασία δωματίου αποχύνεται στην αντίστοιχη θέση παρασκευής του πηκτώματος στη συσκευή ηλεκτροφόρησης. Τοποθετείται το χτένι για τη δημιουργία φρεατίων εντός των οποίων θα φορτωθούν τα δείγματα. Μετά την πήξη της αγαρόζης αφαιρείται το χτένι ώστε να δημιουργηθούν τα φρεάτια φόρτωσης και καλύπτεται το πήκτωμα με το ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης TBE 0.5X-0.1%SDS. Ο όγκος του διαλύματος πρέπει να είναι τέτοιος ώστε να επικοινωνούν μεταξύ τους τα διαμερίσματα της συσκευής ηλεκτροφόρησης.

Προετοιμασία δειγμάτων

5 μl πλάσματος τοποθετούνται σε κωνικό σωλήνα eppendorf και στη συνέχεια προστίθενται 10 μl d H_2O, και 10 μl διαλύματος κατεργασίας δειγμάτων. Μετά από ανάδευση σε Vortex, τα eppendorf κλείνονται και βράζονται για 3 min αφού πρώτα τρυπηθεί το καπάκι τους με βελόνα ώστε να εκτονώνονται οι παραγώμενοι ατμοί. Μετά το βρασμό στα δείγματα προστίθενται 2 μl κεχρωσμένου διαλύματος φόρτωσης GLB.και ακολουθεί μια γρήγορη φυγοκέντρηση για 15 δευτερόλεπτα στις 12000rpm. Ποσότητες των 5-10 μl φορτώνονται στα φρεάτια ανάλογα με τη συγκέντρωση Lp(a) στο κάθε δείγμα.

Συνθήκες ηλεκτροφόρησης

Η ηλεκτροφόρηση διαρκεί 4h υπό σταθερή ένταση 50 mA, ενώ η τάση ανέρχεται στα 100V.

Προετοιμασία της μεμβράνης μεταφοράς πρωτεϊνών

Η μεμβράνη κόβεται προσεκτικά στις διαστάσεις του πηκτώματος (12X14cm) και ενεργοποιείται για 5 λεπτά σε 100% μεθανόλη. Κατά την κατεργασία αυτή η υδρόφοβη μεμβράνη αποκτά υδρόφιλο χαρακτήρα και από αδιαφανής γίνεται ημιδιαφανής γκρί. Στη συνέχεια εκπλένεται με d H_2O και αφήνεται σε H_2O, όπου και πρέπει να είναι απόλυτα βυθισμένη για μια ώρα τουλάχιστον. Η μεμβράνη πρέπει σε όλα τα στάδια να είναι υγρή. Στο σημείο αυτό κόβονται 10 διηθητικά χαρτιά Whatman επίσης στις διαστάσεις της πηκτής.

Μεταφορά πρωτεϊνών

Η διάταξη της μεταφοράς των πρωτεϊνών έχει ως εξής. Το πήκτωμα της αγαρόζης μετά την ηλεκτροφόρηση μεταφέρεται σε γυάλινη επιφάνεια. Πάνω στο πήκτωμα εφαρμόζεται η ενεργοποιημένη μεμβράνη χωρίς όμως να υπάρχουν αναμεσά τους φυσσαλίδες αέρα οι οποίες δυσχεραίνουν την μεταφορά. Πάνω από την μεμβράνη τοποθετούνται αρκετά διηθητικά χαρτιά τα οποία έχουν τις ίδιες διαστάσεις με το πήκτωμα και τη μεμβράνη. Και πάνω σε όλα αυτά εφαρμόζεται

βάρος 1-2 Kg. Η διαδικασία της μεταφοράς πρωτεϊνών ολοκληρώνεται σε μία με δύο ώρες.

Ανοσοαποτύπωση

1. Όταν ολοκληρωθεί η μεταφορά των πρωτεϊνών, η μεμβράνη επωάζεται με εναιώρημα 5% γάλακτος σε 10 mM PBS είτε για 30 min στους 37^0C είτε για ένα βράδυ στους 4^0C. Με την κατεργασία αυτή γίνεται κορεσμός της μεμ βράνης σε πρωτεΐνες.

2. Ακολουθεί έκπλυση της μεμβράνης με 10 mM PBS-0.1%Tween.

3. Στη συνέχεια γίνεται επώαση της μεμβράνης με το πρωτογενές αντίσωμα, το οποίο αραιώνεται 1:2500 σε PBS-0.1%Tween-1% γάλα. Η επώαση γίνεται υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου και διαρκεί 1h.

4. Ακολουθούν 3 εκπλύσεις των 10 min με PBS-0.1%Tween.

5. Η μεμβράνη επωάζεται με το δευτερογενές αντίσωμα το οποίο αραιώνεται 1:2500 σε PBS-0.1%Tween-1% γάλα η επώαση αυτή διαρκεί 30 min, υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου.

6. Ακολουθούν 3 εκπλύσεις των 10 min με PBS-0.1%Tween. Σε όλα τα στάδια των επωάσεων και των εκπλύσεων η μεμβράνη βρίσκεται σε κινούμενη βάση ανάδευσης.

7. Η μεμβράνη τοποθετείται σε διηθητικό χαρτί για να απομακρυνθεί η περίσσεια του διαλύματος έκπλυσης και στη συνέχεια μεταφέρεται σε πλαστική θέση ίσων διαστάσεων όπου γίνεται η αντίδραση της χημειοφωταύγειας.

8. Ετοιμάζεται το αντιδραστήριο χημειοφωταύγειας και αποχύνεται πάνω σε όλη την επιφάνεια της μεμβράνης έτσι ώστε να διαποτίσει και τις 2 πλευρές της. Η επώαση γίνεται υπό ανάδευση για 1min ακριβώς.

9. Η περίσσεια του αντιδραστηρίου χημειοφωταύγειας απομακρύνεται με διηθητικό χαρτί.

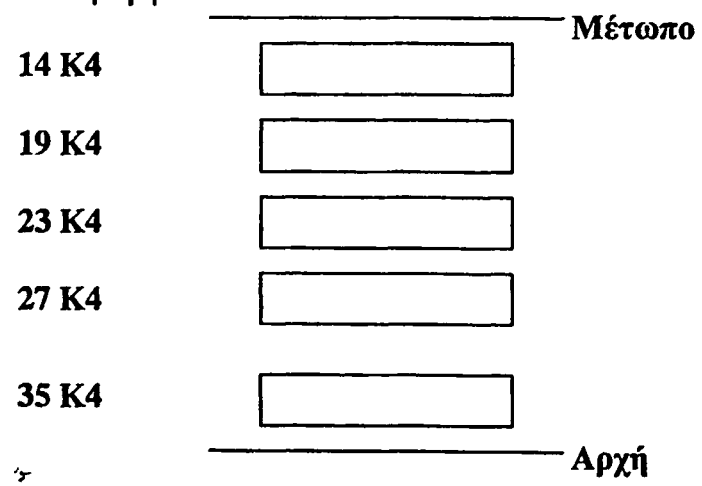
10. Η μεμβράνη περιβάλλεται με διαφανή λεπτή μεμβράνη και μεταφέρεται μέσα σε κασέτα σε σκοτεινό θάλαμο για την ανάπτυξη της χημειοφωταύγειας

11. Μέσα σε κασέτα και πάνω στην μεμβράνη τοποθετείται το υπερφίλμ και γίνεται επώαση για 5min.

12. Το φιλμ τοποθετείται στο υγρό εμφάνισης για 10 min και στην συνέχεια στο υγρό σταθεροποίησης για 5 min και τέλος εκπλένεται με H_2O.

Η ανάγνωση των ισομορφών γίνεται με την χρησιμοποίηση γνωστού προτύπου ισομορφών 14, 19, 23, 27 και 35 K4 (Immuno-France), με την βοήθεια του προγράμματος Image Master 1D Prime σε ηλεκτρονικό υπολογιστή (όπως φαίνεται στο πιο κάτω σχήμα), μετά από φωτογραφία του πηκτώματος στον σαρωτή ειδώλου.

Πρότυπο ισομορφών



ΥΠΕΡΦΥΓΟΚΕΝΤΡΙΚΟΣ ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΣ Lp(a) ΑΠΟ ΤΟ ΠΛΑΣΜΑ

Όργανα - Αντιδραστήρια

- Φυγόκεντρος πάγκου (Hermle, Z 320)
- Υπερφυγόκεντρος (L7, Beckman)
- Κεφαλή υπερφυγοκέντρου (NVT-65, Beckman)
- Σωλήνες υπερφυγοκέντρου (Optiseal, Beckman)
- Garamycin (Gentamicin sulfate, Schering-Plough). Το διάλυμα περιέχει 40 mg θειϊκής γενταμυκίνης/ml, υπάρχει σε φυαλίδια των 2ml.
- KBr (Merck). Το KBr ξηραίνεται στους 100^0C για 1 και διατηρείται σε ξηραντήρα.

Διαλύματα Εργασίας

- **Διάλυμα 10% EDTA pH 7.0.** 12.8247 g Na_2EDTA 2H2O (Titriplex III) διαλυτοποιούνται σε 90 ml d H_2O. Ρυθμίζεται το pH στο 7.0 και ο όγκος συμπληρώνεται στα 100 ml με d H_2O. Το διάλυμα διατηρείται στους 4^0C.
- **Διάλυμα KBr πυκνότητας 1.107 g/ml.** 38.75 g KBr διαλυτοποιούνται σε d H_2O μέχρι τελικό όγκο 250 ml. Το διάλυμα αυτό περιέχει 5 μl/ml 10% EDTA και 1.25 μl/ml Garamycin και διατηρείται στους 4^0C.

Πειραματική διαδικασία

Απομόνωση του πλάσματος

40 ml αίματος από τον ίδιο δότη με συγκέντρωση Lp(a) μεγαλύτερη από 20 mg/dl συλλέγονται σε πλαστικά σωληνάκια καθένα από τα οποία περιέχει 100 μl αντιπηκτικού 10% EDTA. Το κάθε σωληνάκι φυγοκεντρείται στις 3100 rpm (1500xg) για 15 min, σε θερμοκρασία δωματίου ώστε να διαχωριστεί το πλάσμα από τα έμμορφα συστατικά του αίματος. Το πλάσμα στην συνέχεια συλλέγεται με αυτόματη πιπέτα και προστίθενται σε αυτό 5 μl/ml 10% EDTA για την αποφυγή οξειδωτικής τροποποίησης των λιποπρωτεϊνικών σωματιδίων και 1.25 μl/ml αντιβιοτικού Garamycin. Το πλάσμα διατηρείται στους 4^0C το πολύ για 4 ημέρες.

Υπερφυγοκεντρική απομόνωση της Lp(a)

- Μετρείται ο όγκος του πλάσματος σε ml και πολλαπλασιάζεται με συντελεστή 0.1461. Ο αριθμός που προκύπτει ισούται με τα g στερεού KBr που προστίθενται στο πλάσμα ώστε η πυκνότητά του να γίνει 1.107 g/ml. Το πλάσμα μοιράζεται σε σωληνάκια υπερφυγοκέντρου, ο όγκος των οποίων συμπληρώνεται με διάλυμα KBr πυκνότητας 1.107 g/ml. Τα σωληνάκια αφού ζυγοσταθμιστούν, σφραγίζονται και τοποθετούνται σε υπερφυγόκεντρο, όπου υπερφυγοκεντρούνται με χρήση του ρότορα NVT 65 στις 40000 rpm για 10 h στους 14 ^{0}C. Μετά το τέλος της υπερφυγοκέντρησης γίνεται συλλογή με σύριγγα των λιποπρωτεϊνών (VLDL, LDL, Lp(a) και ένα μέρος της HDL), οι οποίες έχουν μαζευτεί στην κορυφή, όπως και του υπολείμματος στον πάτο του σωλήνα. Με τον τρόπο αυτό γίνεται ένας αρχικός διαχωρισμός των λιποπρωτεϊνών του πλάσματος από ένα μέρος της HDL καθώς και από το σύνολο του πλασμινογόνου και των άλλων πρωτεϊνών του πλάσματος. Το είδος των απομονωμένων λιποπρωτεϊνών όσο και το υπόλειμμα ελέγχονται με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης.

ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ Lp(a) ΜΕ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΣΥΓΓΕΝΕΙΑΣ

Αρχή της μεθόδου

Η αρχή της μεθόδου βασίζεται στην βιολογική συγγένεια την οποία παρουσιάζει η Lp(a) έναντι της λυσίνης η οποία βρίσκεται κατάλληλα ακινητοποιημένη πάνω στο πολυμερές υλικό Sepharose 4B. Λόγω της συγγενείας και της εκλεκτικής αλληλοαναγνωρίσεως του ακινητοποιημένου δεσμευτή (L-λυσίνη) και του σωματιδίου στόχου [Lp(a)], το αντίστοιχο σύμπλοκο σχηματίζεται επί της στήλης. Αντίθετα άλλα μόρια τα οποία δεν εμφανίζουν συγγένεια για την λυσίνη, δεν αναγνωρίζονται και περνούν αδέσμευτα. Η μέθοδος η οποία περιγράφεται πιο κάτω βασίζεται σε αυτή των Doucet και συν. (238).

- Μεμβράνη διαπίδυσης (Sigma). Η μεμβράνη ενεργοποιείται σε d H_2O για 3h και κατακρατά οποιοδήποτε συστατικό έχει μοριακό βάρος μεγαλύτερο από 12 KDa.
- Περισταλτική αντλία (Gilson, Minipuls 3)
- Αυτόματος συλλέκτης κλασμάτων, Fraction Collector
- **Lysine Sepharose 4B (Pharmacia Biotech).** Η Lysine Sepharose 4B είναι L-λυσίνη ακινητοποιημένη στο πολυμερές υλικό Sepharose 4B ενεργοποιημένη με βρωμιούχο κυανίο (cyanogen bromide activated Sepharose). Η δεσμευτική της ικανότητα ανέρχεται σε 0.6 mg πλασμινογόνου [βιολογικό ανάλογο της Lp(a)] ανά ml πηκτώματος (gel).
- **Ρυθμιστικό διάλυμα 20 mM φωσφορικών pH 7.4.** Διαλύονται 7.6020 g Na_3PO_4 $12H_2O$ και 3.5598 g Na_2HPO_4 $2H_2O$ σε 1 lt d H_2O. Το διάλυμα περιέχει και 0.02% (0.2 g/lt) NaN_3. Το pH ρυθμίζεται στο 7.4 και το διάλυμα διατηρείται στους 4^0C.
- **Ρυθμιστικό διάλυμα 200 mM ε-αμινοκαπροϊκού (ε-ACA) pH 7.4.** Διαλύονται 26.24 g ε-ACA, 7.6020 g Na_3PO_4 $12H_2O$, 3.5598 g Na_2HPO_4 $2H_2O$, 0.2 g NaN_3 σε 1 lt d H_2O. Επιπλέον το διάλυμα αυτό περιέχει και 0.15M (8.7660 g/lt) NaCl. Το pH ρυθμίζεται στο 7.4 και το διάλυμα διατηρείται στους 4^0C.
- **Ρυθμιστικό διάλυμα αναγέννησης-εξισορρόπησης της στήλης pH 7.4.** Είναι ένα διάλυμα 200 mM ε-ACA σε ρυθμιστικό διαλύμα 50 mM φωσφορικών (19.005 g Na_3PO_4 $12H_2O$, 8.8995 g Na_2HPO_4 $2H_2O$ και 0.5 g NaN_3 διαλύονται σε 1 lt d H_2O), ενώ περιέχει και 1M (58.44 g/lt) NaCl. Η παρασκευή του γίνεται όπως έχει περιγραφεί πιο πάνω. Χρησιμοποιείται κάθε πέμπτο πειραματικό γύρο για την εξισορρόπηση-αναγέννηση του υλικού της στήλης.
- **Διάλυμα συντήρησης.** Όταν η στήλη πρόκειται να χρησιμοποιηθεί μετά από ένα μεγάλο χρονικό διάστημα το υλικό της συντηρείται εντός διαλύματος 20% αιθανόλης.
- **Ρυθμιστικό διάλυμα Hepes pH 7.4.** Διαλύονται 1.0009 g Hepes, 8.0063 g NaCl, 0,1939 g KCl και 0.7445 g Titriplex III σε 1 lt d H_2O. Το pH ρυθμίζεται στο 7.4 και το διάλυμα διατηρείται στους 4^0C.

Πειραματική διαδικασία

Πλήρωση της στήλης

16 ml εναιωρήματος Lysine Sepharose 4B τοποθετούνται σε 4 κωνικά σωληνάκια των 50 ml των οποίων ο όγκος συμπληρώνεται με d H_2O μέχρι την χαραγή. Τα σωληνάκια φυγοκεντρούνται στις 1000 rpm για 10 min. Μετά το τέλος της φυγοκέντρησης το υπερκείμενο απορρίπτεται και η διαδικασία επαναλαμβάνεται άλλες τέσσερις φορές.Στην συνέχεια το υλικό της στήλης επαναιωρείται σε 6-10 ml διαλύματος 20 mM φωσφορικών.

Σε στήλη 16×1.6 (ύψος × διάμετρος) τοποθετείται λίγο από το διάλυμα 20 mM φωσφορικών, έχοντας κλειστή την περισταλτική αντλία. Στην συνέχεια το υλικό πλήρωσης διαβιβάζεται εντός της στήλης με πιπέτα με τρόπο ώστε να μην δημιουργούνται φυσαλίδες αέρα. Ο υπόλοιπος χώρος εντός της στήλης συμπληρώνεται με διάλυμα 20 mM φωσφορικών, ενώ ανοίγουμε την περισταλτική αντλία σε ταχύτητα 2.5 ml/min. Μετά την καθίζηση του υλικού της στήλης ακολουθεί εξισσορόπηση αυτού με 100 ml 20 mM φωσφορικών.

Προετοιμασία- Τοποθέτηση δείγματος

Οι λιποπρωτεΐνες (VLDL, LDL, Lp(a), HDL) που συλλέγονται μετά από την υπερφυγοκέντρηση σε KBr 1.107 g/ml, υποβάλλονται σε διαπύδηση έναντι διαλύματος 20 mM φωσφορικών το οποίο περιέχει και 5 μl/ml Garamycin για την εκδίωξη του KBr. Στην συνέχεια «φορτώνονται» στην στήλη με ρυθμό ροής 0.5 ml/min. Η στήλη αρχικά εκπλύνεται με το ρυθμιστικό διάλυμα 20 mM φωσφορικών για την απομάκρυνση όλων των λιποπρωτεϊνών εκτός της Lp(a) η οποία κατακρατείται από την στήλη. Στην συνέχεια η Lp(a) εκλούεται με το ρυθμιστικό διάλυμα 200 mM ε-ACA. Η ταχύτητα με την οποία γίνεται η συλλογή των κλασμάτων είναι 0.5 ml/min, ενώ συλλέγονται συνολικά 30 κλάσματα των 2.5 ml κάθε 5 min. Μετά το τέλος της παραπάνω διαδικασίας η στήλη εξισορροπείται, με το ρυθμιστικό διάλυμα 20 mM φωσφορικών και αποθηκεύεται στους 4 ^{0}C.

Προσδιορίζεται το περιεχόμενο σε χοληστερόλη και η ενεργότητα PAF-AH σε όλα τα κλάσματα της στήλης. Τα κλάσματα που ελήφθησαν με το διάλυμα ε-ACA, στα οποία περιέχεται η Lp(a), συνενώνονται και υποβάλλονται σε διαπίδυση για 12h έναντι ρυθμιστικού διαλύματος 10 mM PBS ή Hepes pH 7.4 το οποίο περιέχει 5μl/ml 10% EDTA και 1.25 μl/ml Garamycin, για την εκδίωξη του ε-ACA.

Υπερφυγοκεντρική συμπύκνωση της Lp(a)

Τα κλάσματα που συλλέγονται από τη στήλη και περιέχουν την Lp(a) ενώνονται και τοποθετούνται σε σωλήνες υπερφυγοκέντρου. Οι σωλήνες συμπληρώνονται με διάλυμα 10 mM PBS και αφού ζυγοσταθμιστούν υπερφυγοκεντρούνται στις 40000 rpm για 10 h στους 14 ^{0}C. Μετά την υπερφυγοκέντρηση η Lp(a) συλλέγεται από τον πυθμένα του σωλήνα όπου έχει συμπυκνωθεί, αφού πρώτα απομακρυνθεί το υπερκείμενο με σύριγγα.

ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ LDL ΜΕ ΔΙΑΔΟΧΙΚΕΣ ΥΠΕΡΦΥΓΟΚΕΝΤΡΗΣΕΙΣ

Όργανα - Διαλύματα Εργασίας

- Υπερφυγόκεντρος (L7, Beckman)
- Κεφαλή υπερφυγοκέντρου (NVT-65, Beckman)
- Σωλήνες υπερφυγοκέντρου (Optiseal, Beckman)
- Σωλήνες υπερφυγοκέντρου (Quickseal, Beckman)
- Μεμβράνη διαπίδυσης (Sigma). Η μεμβράνη ενεργοποιείται σε d H_2O για 3 h και κατακρατά οποιοδήποτε συστατικό έχει μοριακό βάρος μεγαλύτερο από 12000
- KBr (Merck). Το KBr ξηραίνεται στους 100^{0}C για 1 και διατηρείται σε ξηραντήρα
- **Διάλυμα KBr πυκνότητας 1.019 g/ml.** 14.92 g KBr διαλυτοποιούνται σε d H_2O μέχρι τελικό όγκο 500 ml. Το διάλυμα αυτό περιέχει 5 μl/ml 10% EDTA και 1.25 μl/ml Garamycin και διατηρείται στους 4^{0}C.
- **Διάλυμα KBr πυκνότητας 1.063 g/ml.** 45.99 g KBr διαλυτοποιούνται σε d H_2O μέχρι τελικό όγκο 500 ml. Το διάλυμα αυτό περιέχει 5 μl/ml 10% EDTA και 1.25 μl/ml Garamycin και διατηρείται στους 4^{0}C.
- **Ρυθμιστικό διάλυμα Hepes pH 7.4.** Όπως περιγράφεται στην σελίδα 52.

Πειραματική διαδικασία

Απομόνωση της VLDL

Η LDL απομονώθηκε από το αρχικό έκπλυμα της στήλης Lysine Sepharose 4B το οποίο περιέχει όλες τις λιποπρωτεΐνες εκτός της Lp(a). Αρχικά μετρείται ο όγκος του εκπλύματος σε ml και πολλαπλασιάζεται με συντελεστή 0.0212. Ο αριθμός που προκύπτει ισούται με τα g KBr που προστίθενται ώστε η πυκνότητά του να γίνει 1.019 g/ml. Στην συνέχεια μοιράζεται σε σωληνάκια υπερφυγοκέντρου Quickseal ο όγκος των οποίων συμπληρώνεται με διάλυμα KBr πυκνότητας 1.019 g/ml. Τα σωληνάκια αφού ζυγοσταθμιστούν, σφραγίζονται και τοποθετούνται σε υπερφυγόκεντρο όπου φυγοκεντρούνται στις 40000 rpm για 10 h στους 14 ^{o}C. Μετά το τέλος της υπερφυγοκέντρησης η VLDL έχει μαζευτεί στην κορυφή του σωλήνα διαχωρισμένη από τις LDL, HDL. Η VLDL συλλέγεται προσεκτικά με σύριγγα από την κορυφή του σωλήνα (2-2.5 ml) ενώ στην συνέχεια συλλέγεται και το υπόλειμμα.

Απομόνωση της LDL

Μετρείται ο όγκος του υπολείμματος της προηγούμενης υπερφυγοκέντρησης σε ml και πολλαπλασιάζεται με συντελεστή 0.060. Ο αριθμός που προκύπτει ισούται με τα g KBr που προστίθενται ώστε η πυκνότητά του να μεταβληθεί από 1.019 σε 1.063 g/ml. Το υπόλειμμα στην συνέχεια μοιράζεται σε σωληνάκια υπερφυγοκέντρου Optiseal ο όγκος των οποίων συμπληρώνεται με διάλυμα KBr πυκνότητας 1.063 g/ml. Τα σωληνάκια αφού ζυγοσταθμιστούν, σφραγίζονται και τοποθετούνται σε υπερφυγόκεντρο όπου φυγοκεντρούνται στις 40000 rpm για 10h στους 14 ^{0}C. Μετά το τέλος της υπερφυγοκέντρησης η LDL έχει μαζευτεί στην κορυφή του σωλήνα διαχωρισμένη από την HDL. Η LDL συλλέγεται προσεκτικά με σύριγγα από την κορυφή του σωλήνα. Στην συνέχεια υποβάλλεται σε διαπίδυση για 12h έναντι ρυθμιστικού διαλύματος Hepes pH 7.4 το οποίο περιέχει 5 μl/ml 10% EDTA και 1.25 μl/ml Garamycin, για την εκδίωξη της περίσσειας του KBr.

ΑΝΑΓΩΓΙΚΗ ΔΙΑΣΠΑΣΗ ΤΗΣ Lp(a)

Όργανα – Διαλύματα Εργασίας

- Υπερφυγόκεντρος (L7, Beckman)
- Κεφαλή υπερφυγοκέντρου (SW-41, Beckman)
- Σωλήνες υπερφυγοκέντρου (Ultra-Clear, Beckman)
- Μεμβράνη διαπίδυσης (Sigma)
- **1 M διθειοθρεϊτόλη, DTT**. Όπως περιγράφεται στην σελίδα 45.
- **Διάλυμα KBr πυκνότητας 1.050**. 6.023 g KBr διαλυτοποιούνται σε d H_2O μέχρι τελικό όγκο 500 ml. Το διάλυμα αυτό περιέχει 5μl/ml EDTA 10% και 1.25 μl/ml Garamycin και διατηρείται στους 4°C.
- **Διάλυμα KBr πυκνότητας 1.080**. 14.92 g KBr διαλυτοποιούνται σε d H_2O μέχρι τελικό όγκο 500 ml. Το διάλυμα αυτό περιέχει 5μl/ml EDTA 10% και 1,25 μl/ml Garamycin και διατηρείται στους 4°C.

Πειραματική διαδικασία

3 ml Lp(a) (περιεκτικότητας 150 μg πρωτεΐνης/ml HEPES) επωάζονται με 10 mM DTT στους 37°C για 3h. Δείγμα Lp(a) επωάζεται επίσης κάτω από τις ίδιες συνθήκες απουσία DTT. Όμοια πειράματα γίνονται και με LDL. Η Lp(a) ή LDL αναμιγνύονται με 1.23 g στερεού KBr και στη συνέχεια μεταφέρεται με πιπέτα Pasteur στον πυθμένα υπερφυγοκεντρικού σωλήνα όπου ακολουθεί η επιστίβαση των υπολοίπων διαλυμάτων με Auto Densi Flow. Επιστοιβάζονται διαδοχικά 3 ml διαλύματος KBr d=1.080 g/ml, 3 ml διαλύματος KBr d=1.050 g/ml, και τέλος 2 ml διαλύματος d H_2O. Στη συνέχεια, οι σωλήνες της υπερφυγοκέντρησης ζυγοσταθμούνται κλείνονται και τοποθετούνται στις υποδοχές του ρότορα SW-41. Ακολουθεί υπερφυγοκέντρηση στις 40000 rpm, στους 14°C για 24 h. Μετά το πέρας της υπερφυγοκέντρησης συλλέγονται προσεκτικά με την βοήθεια αυτόματης πιπέτας 28 κλάσματα, όγκου 400 μl το καθένα, από την κορυφή του σωλήνα προς τα κάτω. Στη συνέχεια τα κλάσματα ελέγχονται για χοληστερόλη και ενεργότητα PAF-AH. Η ενεργότητα του ενζύμου προσδιορίζεται και σε Lp(a) ή LDL πριν και αμέσως μετά την επώαση με DTT. Η παραχθείσα λιποπρωτεΐνη μετά την επώαση με DTT, που

εμφανίζεται σαν ενιαία ζώνη μετά την υπερφυγοκέντρηση, καθώς και τα 2 τελευταία κλάσματα (27 και 28) που συλλέγονται από τον πυθμένα του σωλήνα μετά την υπερφυγοκέντρηση χαρακτηρίζονται με ηλέκτροφόρηση αγαρόζης και SDS-πολυακρυλαμιδίου 5-19%. που συνοδεύεται από ανοσοδέσμευση με αντισώματα κατά της apo(a) και της apoB-100. Επιπλέον, τα κλάσματα 27 και 28 υποβάλλονται σε ανάλυση πρωτεΐνης και λιπιδίων.

ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΛΙΠΟΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΣΕ ΠΗΚΤΩΜΑ ΑΓΑΡΟΖΗΣ

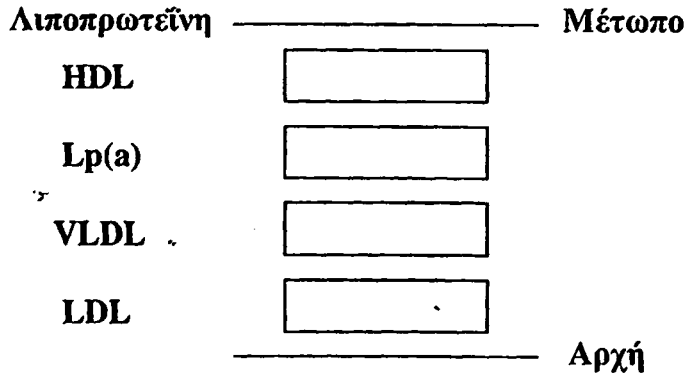
Αρχή της μεθόδου

Η ηλεκτροφόρηση είναι ποιοτική κυρίως μέθοδος διαχωρισμού των λιποπρωτεϊνών με βάση το ηλεκτρικό φορτίο και το μεγεθός τους. Κατά την ηλεκτροφόρηση των λιποπρωτεϊνών μεταναστεύουν και οι πρωτεΐνες του πλάσματος όμως η χρωστική που χρησιμοποιείται είναι μόνο για λιπίδια.

Δείγμα

Χρησιμοποιείται ορός ή πλάσμα με EDTA καθώς και απομονωμένες λιποπρωτεΐνες Lp(a), LDL για τον έλεγχο της καθαροτητάς τους. Η συντήρηση των δειγμάτων γίνεται στους 4^0C το πολύ για 3 μέρες.

Η ηλεκτροφόρηση ενός νορμολιπιδαιμικού ατόμου με Lp(a) θα είναι ως εξής:



Όργανα - Αντιδραστήρια

- Συσκευή ηλεκτροφόρησης Sebia -K20,
- Τροφοδοτικό.

- Εμπορική συσκευασία Kit ηλεκτροφόρησης Hydragel Lipo + Lp(a) (Sebia) που περιλαμβάνει:
- 10 πλάκες με πήκτωμα αγαρόζης, έτοιμες για χρήση.
- Φιαλίδια συμπυκνωμένου ρυθμιστικού διαλύματος Tris-βαρβιτουρικού. Το περιεχόμενο κάθε φιαλιδίου αραιώνεται στα 1000ml με d H_2O
- Φιαλίδια συμπυκνωμένης χρωστικής 3%Sudan black.
- **Διάλυμα χρώσης.** Η παρασκευή του διαλύματος χρώσης γίνεται ως εξής: Σε κωνική φιάλη αναμιγνύονται 160 ml απόλυτης αιθανόλης (EtOH) με 2 ml 3% Sudan black. Υπο συνεχή ισχυρή ανάδευση ακολουθεί προσθήκη, 140 ml d H_2O.
- Ειδική μεμβράνη με θέσεις τοποθέτησης των δειγμάτων.
- Διηθητικά χαρτιά
- Διάλυμα EtOH 45% σε d H_2O (v/v)

Εκτέλεση της ηλεκτροφόρησης

Η πλάκα με το πήκτωμα αγαρόζης τοποθετείται σε επιφάνεια καθαρισμένη εκ των προτέρων με 45% EtOH. Το πήκτωμα έχει χαραγμένα δύο βέλη τα οποία καθορίζουν την θέση τοποθέτησης της μεμβράνης των δειγμάτων. Η υγρασία που υπάρχει στην επιφάνεια του πηκτώματος απορροφάται γρήγορα με την εφαρμογή διηθητικού χαρτιού στην θέση που ορίζεται από τα βέλη. Στην συνέχεια εφαρμόζεται η μεμβράνη τοποθέτησης των δειγμάτων πάνω στο πήκτωμα της αγαρόζης ώστε τα βέλη της μεμβράνης να συμπίπτουν με τα βέλη της επιφάνειας της πηκτής. Κατά την εφαρμογή της μεμβράνης στην αγαρόζη πρέπει να αποφεύγεται η δημιουργία φυσσαλίδων αέρα γιατί παρεμποδίζουν την μετανάστευση των δειγμάτων. Έπειτα προστίθενται τα δείγματα στις κατάλληλες θέσεις με αυτόματη πιπέτα χωρίς να τραυματιστεί η αγαρόζη. Ο όγκος των δειγμάτων για ορό ή πλάσμα είναι 2 μl ενώ για άλλο υλικό δεν πρέπει να ξεπερνά τα 10 μl. Χρησιμοποίηση μεγάλων ποσοτήτων δείγματος έχει ως αποτέλεσμα την εμφάνιση ουρών που καθιστά δύσκολη την ταυτοποίηση των λιποπρωτεϊνών. Τα δείγματα αφήνονται για 10 min ώστε να προσροφηθούν πλήρως στην αγαρόζη. Στη συνέχεια αφαιρείται η ειδική μεμβράνη και η πηκτή είναι έτοιμη για την ηλεκτροφόρηση. Σε κάθε διαμέρισμα της συσκευής ηλεκτροφόρησης προστίθενται 150 ml ρυθμιστικού διαλύματος Tris-βαρβιτουρικού

και η πηκτή της αγαρόζης τοποθετείται ανεστραμένη πάνω στη γέφυρα της ηλεκτροφόρησης με τα δείγματα προς την καθοδική πλευρά.

Συνθήκες ηλεκτροφόρησης

Η συσκευή σκεπάζεται με το καπάκι της και συνδέονται τα ηλεκτρόδια με το τροφοδοτικό. Η διάρκεια της ηλεκτροφόρησης είναι 90 min και γίνεται υπό σταθερή τάση 50 V, ενώ η ένταση του ρεύματος ανέρχεται σε 3 mA για κάθε δείγμα.

Χρώση των λιποπρωτεϊνών

Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης το πήκτωμα στεγνώνεται σε ρεύμα θερμού αέρα (≤ 80°C). Η πλάκα υπο μορφή πλέον ζελατίνης τοποθετείται στο ειδικό δοχείο χρώσης που περιέχει το διάλυμα της χρωστικής, όπου αφήνεται για 15 min. Η περίσσεια της χρωστικής ξεπλένεται με νερό βρύσης. Στη συνέχεια η ζελατίνη τοποθετείται σε λεκάνη που περιέχει 45% EtOH για 5 min. Η περίσσεια της EtOH στεγνώνεται σε ρεύμα θερμού αέρα.

Έλεγχος της καθαρότητας των απομονωμένων λιποπρωτεϊνών

Μία υπερφυγοκεντρικά απομονωμένη λιποπρωτεΐνη για να θεωρηθεί καθαρή πρέπει να δίνει μία και μόνο ζώνη στην πηκτή της αγαρόζης, με μετατόπιση που είναι χαρακτηριστική για το συγκεκριμένο είδος λιποπρωτεΐνης. Η εμφάνιση και άλλων ζωνών έστω και αχνών σημαίνει ότι το δείγμα έχει προσμίξεις και από άλλες λιποπρωτεΐνες.

ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ SDS-PAGE 5-19%

Αρχή της μεθόδου

Η ηλεκτροφόρηση βαθμίδωσης πυκνοτήτων πολυακρυλαμιδίου, (PAGE), κάτω από συνθήκες αποδιάταξης (SDS), συνδιάζει την ηλεκτροφόρηση με βάση το μοριακό βάρος με την υψηλή διαχωριστική ικανότητα. Η παρουσία του ιοντικού απορρυπαντικού SDS έχει σαν αποτέλεσμα την πλήρη αποδιάταξη των πρωτεϊνών

και των υπομονάδων τους ώστε να προκύψουν πολύ ανιονικές αλυσίδες πεπτιδίων λόγω της συμπλοκοποίησης με SDS .Το SDS που ενώνεται με τις πρωτεΐνες δίνει ένα σταθερό λόγο ανιοντικού φορτίου προς μάζα για όλες τις πρωτεΐνες και τις αλυσίδες τους οι οποίες μεταναστεύουν προς την άνοδο με βάση το μοριακό τους βάρος. Η συγκέντρωση του PAGE δρα ως μοριακό κόσκινο και είναι τέτοια ώστε τα μόρια να εισέρχονται πρώτα σε μια περιοχή χαμηλής συγκέντρωσης PAGE και μεγάλων πόρων και στη συνέχεια καθώς προχωρούν στην πηκτή η συγκέντρωση του PAGE αυξάνει και μειώνεται το μέγεθος των πόρων. Τα μόρια ανάλογα με το μέγεθός τους παγιδεύονται όταν φτάνουν σε περιοχές πηκτής όπου το μέγεθος των πόρων είναι τέτοιο ώστε δεν μπορούν να εισέλθουν (239).

Όργανα - Διαλύματα Εργασίας

- Κάθετη συσκευή ηλεκτροφόρησης (Mini Protean II, Bio-Rad)

- Τροφοδοτικό

- **Διάλυμα Α.** 29.2% Ακρυλαμίδιο, 0.8% δις ακρυλαμίδιο. 58.4 g ακρυλαμιδίου και 1.6 g δις ακριλαμιδίου διαλύονται σε d H_2O μέχρι τελικού όγκου 200 ml. Το διάλυμα διατηρείται σε σκοτεινόχρωμο δοχείο στους 4^0C για ένα μήνα.

- **Διάλυμα Β.** Ρυθμιστικό διάλυμα διαδρομής (running) pH 8.8. 36.34 g Tris base και 0.8 g SDS διαλύονται σε 100 ml d H_2O. Ρυθμίζεται το pH στο 8.8 και συμπληρώνεται ο όγκος στα 200 ml. Το διάλυμα είναι σταθερό για ένα μήνα σε θερμοκρασία δωματίου.

- **Διάλυμα Γ.** Ρυθμιστικό διάλυμα επιστοίβασης, (stacking), pH 6.8. 6.6 g Tris base διαλύονται σε 50 ml d H_2O, ρυθμίζεται το pH στο 6.8 και συμπληρώνεται ο όγκος στα 100 ml με d H2O. Το διάλυμα είναι σταθερό για ένα μήνα σε θερμοκρασία δωματίου.

- **Διάλυμα Δ.** Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης. 72.5g γλυκίνης 7.5 g SDS και 15 g Tris base διαλύονται σε 5 l d H2O. Το pH επιβεβαιώνεται ότι είναι 8.2.

Προσοχή δεν πρέπει να ρυθμίζεται. Το διάλυμα παρασκευάζεται πρίν τη χρήση του.

- **Διάλυμα Ε (Διάλυμα δειγμάτων).** 6.61 g SDS και 0.32g Tris base διαλύονται σε 120 ml d H_2O. Το pH ρυθμίζεται στο 6.8 και ο όγκος συμπληρώνεται στα 200ml με d H_2O. Το διάλυμα είναι σταθερό για ένα μήνα σε θερμοκρασία δωματίου.

- **Διάλυμα 1M DTT.** Όπως περιγράφεται στην σελίδα 45.

- **Διάλυμα κατεργασίας δειγμάτων.** Σε 2 ml διαλύματος δειγμάτων προστίθενται 20 μl από το διάλυμα 1M DTT, έτσι ώστε η τελική συγκέντρωση της DTT στο διάλυμα να είναι 10 mM. Το διάλυμα παρασκευάζεται πριν τη χρήση του.

- **Διάλυμα 10% υπερθεϊικού αμμωνίου (Ammonium Persulfate, APS).** 0.1 g υπερθεϊικού αμμωνίου διαλύεται σε 1 ml d H_2O . Το διάλυμα παρασκευάζεται πριν τη χρήση του.

- **Διαλυμα εμπορίου N,N-τετραμέθυλοαιθυλενοδιαμίνη,TEMED.**

- **Διάλυμα ανασυνδιασμένης PAF-ακετυλοϋδρολάσης (4 mg/dl).**

- **Πρότυπα μοριακά Βάρη**

Μυοσίνη	210 kDa
β-γαλακτοζαμίνη	116 kDa
Φωσφορυλάση D	127 kDa
Αλβουμίνη βοδιού	84 kDa
Αλβουμίνη αυγού	49.5 kDa
Καρβονική ανυδράση	35.3 kDa
Αναστολέας της τρυψίνης	28.1 kDa
Λυσοζύμη	20.5 kDa
Αποπροτονίνη	7 kDa

- **Διάλυμα φόρτωσης** Το διάλυμα περιέχει 50% γλυκόζη σε d H_2O και σε αυτό προστίθεται μικρή ποσότητα μπλέ βρωμοφαινόλης.

- **Διάλυμα 10% SDS.** Όπως περιγράφεται στην σελίδα 45.

Πειραματική διαδικασία..

Προετοιμασία του πηκτώματος διαδρομής (running gel)

Προετοιμασία συσκευής

Χρησιμοποιούνται γυάλινες πλάκες διαστάσεων 7X10 cm οι οποίες καθαρίζονται προσεκτικά με H_2O και στη συνέχεια με απόλυτη αιθανόλη. Οι πλάκες τοποθετούνται η μια πάνω στην άλλη και στις 2 πλάγιες άκρες τους τοποθετούνται διαχωριστές πάχους 1.5 mm. Στη βάση στήριξης των πλακών της κάθετης συσκευής ηλεκτροφόρησης τοποθετούνται ελάσματα καουτσούκ που εξασφαλίζουν στεγανότητα. Οι γυάλινες πλάκες τοποθετούνται στη βάση στήριξης και σταθεροποιούνται με σφιγκτήρες. Με τη χρήση αλφαδιού εξασφαλίζεται η ευθύγραμμη τοποθέτησή τους.

Προετοιμασία διαλυμάτων πηκτώματος 5% και 19%

	5%	*19%*
Διάλυμα A	0.63 ml	2.38 ml
Διάλυμα B	0.93 ml	0.94 ml
H2O	2.19 ml	0.43 ml
APS	16 μl	16 μl
TEMED	2 μl	2 μl

Το APS και το TEMED προστίθενται την στιγμή κατά την οποία ενεργοποιείται η επιστοίβαση των πυκνοτήτων, αφού και τα δύο δρούν καταλυτικά στον πολυμερισμό του πολυακρυλαμιδίου. Μόλις παρασκευαστούν τα διαλύματα τοποθετούνται στα διαμερίσματα της συσκευής που θα δημιουργήσει τη βαθμίδωση πυκνοτήτων, (gradient former). Στο διαμέρισμα ανάμειξης των διαλυμάτων του gradient former τοποθετείται το διάλυμα 19% που είναι και η τελευταία πυκνότητα της βαθμίδωσης, ενώ το διάλυμα 5% διατηρείται στο άλλο διαμέρισμα, από όπου σε μικρές ποσότητες διοχετεύεται αυτόματα στο διαμέρισμα ανάμειξης, ώστε να δημιουργηθούν όλες οι πυκνότητες της βαθμίδωσης. Αρχικά τα δύο διαμερίσματα δεν επικοινωνούν μεταξύ τους και αυτό διασφαλίζεται με την προσθήκη ίχνους χρωστικής, βρωμοφαινόλης μπλέ, στο διάλυμα 19%. Αν δεν υπάρχει στεγανότητα η χρωστική βάφει και το 5%. Ο gradient former συνδέεται με περισταλτική αντλία η οποία μεταφέρει και επιστιβάζει τα διαλύματα στο χώρο σχηματισμού της πηκτής. Όταν όλα είναι έτοιμα αρχίζει η παροχή από τον gradient former και αρχίζει ο σχηματισμός της βαθμίδωσης μέσα στις γυάλινες πλάκες. Κατά την επιστοίβαση πρέπει να αποφεύγεται η δημιουργία φυσσαλίδων αέρα οι οποίες καθιστούν ασυνεχή την πηκτή και παρεμποδίζουν τον πολυμερισμό. Μόλις ολοκληρωθεί η επιστοίβαση τον διαλυμάτων, η επιφάνεια της πηκτής καλύπτεται με νερό, το οποίο επιστοιβάζεται αργά και προσεκτικά ώστε να μη διαταραχθεί η επιφάνεια του πολυακρυλαμιδίου. Το στάδιο αυτό αποβλέπει στην προστασία της πηκτής από την επαφή της με τον αέρα. Ο πολυμερισμός ολοκληρώνεται σε μια περίπου ώρα και το νερό αφαιρείται ποσοτικά με διηθητικό χαρτί. Στον χρόνο αυτό γίνεται η προετοιμασία του διαλύματος επιστοίβασης 3% (stacking gel).

	3% stacking gel
Διάλυμα Α	0.75 ml
Διάλυμα Γ	1.87 ml
H_20	4.87 ml
Ακολουθεί απαέρωση	
10% SDS	75 μl
10%APS	50 μl
TEMED	7.5 μl

Το προκύπτον διάλυμα αναδεύεται και επιστοιβάζεται με τη χρήση σήριγγας πάνω από την πηκτή 5-19%. Μεταξύ των γυάλινων πλακών έχει ήδη τοποθετηθεί

χτένι πάχους 1.5 mm ώστε μόλις πήξει το stacking gel να έχουν δημιουργηθεί οι θέσεις στις οποίες θα τοποθετηθούν τα δείγματα. Ο πολυμερισμός του stacking gel, ολοκληρώνεται σε διάστημα 30 -60 min. Στο χρόνο αυτό ετοιμάζονται τα δείγματα.

Προετοιμασία δειγμάτων

Ποσότητα δείγματος που περιέχει 5-10 μg πρωτεΐνης τοποθετείται σε κωνικό σωλήνα eppendorf και λυοφιλοποιείται. Σε κάθε δείγμα προστίθενται 20 μl από το διάλυμα κατεργασίας των δειγμάτων, και ακολουθεί βρασμός για 5 min, αφού τρυπηθούν τα καπάκια των eppendorf. Στη συνέχεια προστίθενται 20 μl από το διάλυμα φόρτωσης. Τα δείγματα αναδεύονται και είναι έτοιμα για ηλεκτροφόρηση. Το ίδιο γίνεται και με την ανασυνδιασμένη PAF-AH, χωρίς όμως να λυοφιλιοποιείται πιο πριν, από την οποία χρησιμοποιείται τόση ποσότητα όση υπολογίζεται για να είναι ανιχνεύσιμη η ενεργότητα (1 μl από το διάλυμα ανασυνδιασμένης PAF-ακετυλοϋδρολάσης). Τα πρότυπα μοριακών βαρών, από τα οποία χρησιμοποιούνται 10 μl, δεν υποβάλλονται σε καμία κατεργασία.

Τοποθέτηση δειγμάτων

Αφαιρείται το χτένι από την πηκτή και το σύστημα των πλακών αποσυνδέεται από την βάση στήριξής του και τοποθετείται στην θέση του μέσα στην συσκευή ηλεκτροφόρησης όπου σταθεροποιείται πάλι με σφιγκτήρες. Το διαμέρισμα της ηλεκτροφόρησης γεμίζει με το ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης όπως και το εσωτερικό διαμέρισμα μεταξύ των πλακών μέχρι να καλυφθεί η εσωτερική διαχωριστική γέφυρα. Στη συνέχεια στα φρεάτια που έχουν δημιουργηθεί από το χτένι τοποθετούνται τα δείγματα με σύριγγα Hamilton.

Συνθήκες ηλεκτροφόρησης

Η διάρκεια της ηλεκτροφόρησης είναι 1h (ο απαραίτητος χρόνος ώστε να εξέλθει η χρωστική από το πήκτωμα) και γίνεται υπό σταθερή ένταση ρεύματος 25 mA ανά πήκτωμα, ενώ η τάση ανέρχεται στα 200V.

Χρώση της πηκτής

Μόλις τελειώσει η ηλεκτροφόρηση, αποσυνδέονται οι πλάκες από τη θέση στήριξής τους και αφαιρώντας τα μεταξύ τους διαχωριστικά, οι πλάκες ανοίγουν. Το πήκτωμα μεταφέρεται σε γυάλινο δοχείο και συνεχίζεται η κατεργασία του με χρώση με νιτρικό άργυρο ή μεταφέρεται στην συσκευή μεταφοράς πρωτεϊνών.

ΜΕΤΑΦΟΡΑ ΚΑΙ ΑΝΟΣΟΑΠΟΤΥΠΩΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ

Όργανα – Διαλύματα Εργασίας

- Κάθετη συσκευή ηλεκτροφόρησης για μεταφορά πρωτεϊνών και κασέτα (Mini Protean II, Bio-Rad)
- Τροφοδοτικό
- Υπερφιλμ ECL (Enchanced Chemiluminecence Detection film, Amersam)
- Διηθητικό χαρτί Whatman 3MM
- Μεμβράνη μεταφοράς πρωτεϊνών Polyscreen PVDF (Polyvinylidene difluoride Du Pont)
- Πρωτογενές πολυκλωνικό αντίσωμα κουνελιού για την PAF-AH της LDL (Cayman): Χρησιμοποιείται σε αραίωση 1:1000 (v/v)
- Δευτερογενές αντίσωμα donkey anti-rabbit IgG HRP-conjugated (Serotec): Χρησιμοποιείται σε αραίωση 1:3000 (v/v)

- **Διάλυμα εμφάνισης του υπερφίλμ (Kodak)**

- **Ρυθμιστικό διάλυμα μεταφοράς 10X.** Tris-Base 30.3 g/lt, γλυκίνη 144 g/lt, SDS 5 g/lt.

- **Ρυθμιστικό διάλυμα μεταφοράς 1X.** Αναμιγνύονται 100 ml του 10X με 200 ml μεθανόλης. Ο όγκος συμπληρώνεται στα 1000 ml με H_2O.

- **Ρυθμιστικό διάλυμα TBS (Tris-Base, Saline).** Το διάλυμα περιέχει 20 mM (2.422 g/lt) Tris-base, 100 mM (5.84 g/lt) NaCl. Το pH ρυθμίζεται στο 7.5.

- **Ρυθμιστικό διάλυμα TBS-BSA 5%.** Το διάλυμα περιέχει 20 mM (2.422 g/lt) Tris-base, 100 mM (5.84 g/lt) NaCl και 5% BSA. Το pH ρυθμίζεται στο 7.5.

- **Αντιδραστήριο χημειοφωταύγειας ECL.** Η εμπορική του συσκευασία περιέχει 2 αντιδραστήρια: το Enhanced luminol reagent και το Oxidizing reagent τα οποία αναμιγνύονται με αναλογία 1:1 (v/v) λίγο πριν τη χρήση. Απαιτούνται 0.125 ml μίγματος για κάθε cm^2 μεμβράνης (1.5 ml από το καθένα).

Προετοιμασία της μεμβράνης

Η μεμβράνη κόβεται προσεκτικά στις διαστάσεις του πηκτώματος (7x10cm) και ενεργοποιείται για 5 min σε 100% μεθανόλη. Στη συνέχεια εκπλένεται με dH_2O και αφήνεται στο ρυθμιστικό διάλυμα μεταφοράς πρωτεϊνών, όπου πρέπει και να είναι απόλυτα βυθισμένη για μισή ώρα τουλάχιστον. Η μεμβράνη πρέπει σε όλα τα στάδια να είναι να είναι υγρή. Στο σημείο αυτό κόβονται και διηθητικά χαρτιά Whatman επίσης στις διαστάσεις του πηκτώματος και διαποτίζονται με το ρυθμιστικό διάλυμα μεταφοράς πρωτεϊνών.

Μεταφορά πρωτεϊνών

Η μεταφορά των πρωτεϊνών γίνεται με εφαρμογή ηλεκτρικού μετά τον σχηματισμό του "σαντουιτς" στην κασέτα ως εξής: Στην μαύρη πλευρά της κασέτας τοποθετείται ένα σφουγγαράκι Scotch-Brite και πάνω από αυτό διαδοχικά επιστοιβάζονται το διηθητικό χαρτί, το πήκτωμα ηλεκτροφόρησης, η μεμβράνη, άλλο ένα διηθητικό χαρτί και τέλος ένα σφουγγαράκι Scotch-Brite. Η κασέτα κλείνει και τοποθετείται στην συσκευή μεταφοράς πρωτεϊνών, στην οποία εφαρμόζεται τάση 90 V, για 1 h.

Ανοσοαποτύπωση

Όταν ολοκληρωθεί η μεταφορά των πρωτεϊνών, η μεμβράνη επωάζεται με διάλυμα TBS/BSA 5% για 1 h στους 37 °C ή για 12 h στους 4 °C. Ακολουθεί έκπλυση της μεμβράνης με TBS.

Στη συνέχεια γίνεται επώαση της μεμβράνης με το πρωτογενές αντίσωμα, το οποίο αραιώνεται 1:1000 σε TBS/BSA 5%. Η επώαση αυτή διαρκεί 1 h σε θερμοκρασία δωματίου υπό ανάδευση. Ακολουθούν 3 εκπλύσεις των 10 min με TBS.

Η μεμβράνη επωάζεται με το δευτερογενές αντίσωμα το οποίο αραιώνεται 1:3000 σε TBS/BSA 5%. Η επώαση αυτή διαρκεί 30 min σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολουθούν 3 εκπλύσεις των 10 min με TBS.

Σε όλα τα στάδια των επωάσεων και των εκπλύσεων η μεμβράνη βρίσκεται σε κινούμενη βάση ανάδευσης.

Η μεμβράνη ακουμπά όρθια σε διηθητικό χαρτί, για να απομακρυνθεί η περίσσεια του διαλύματος έκπλυσης και στη συνέχεια μεταφέρεται σε πλαστική θέση ίσων διαστάσεων με αυτή, όπου γίνεται η αντίδραση της χημειοφωταύγειας. Ετοιμάζεται το αντιδραστήριο χημειοφωταύγειας και αποχύνεται πάνω σε όλη την επιφάνεια της μεμβράνης έτσι ώστε να διαποτίσει και τις 2 πλευρές της. Η επώαση γίνεται υπό ανάδευση για 1.5 min ακριβώς. Η περίσσεια του αντιδραστηρίου χημειοφωταύγειας απομακρύνεται με διηθητικό χαρτί.

Η μεμβράνη περιβάλλεται με διαφανή λεπτή μεμβράνη και μεταφέρεται μέσα σε κασέτα σε σκοτεινό θάλαμο για ανάπτυξη της χημειοφωταύγειας. Μέσα στην κασέτα και πάνω στην μεμβράνη τοποθετείται το υπερφίλμ, χωρίς να έχει αγγίξει πουθενά πριν και γίνεται επώαση για 5 min. Το φίλμ τοποθετείται αρχικά στο υγρό εμφάνισης εως ότου εμφανιστούν οι μπάντες, στην συνέχεια στο υγρό σταθεροποίησης για 5 min και τέλος εκπλένεται με H_2O βρύσης.

ΧΡΩΣΗ ΜΕ ΝΙΤΡΙΚΟ ΑΡΓΥΡΟ

Αρχή της Μεθόδου

Η χρώση με νιτρικό άργυρο είναι γρήγορη, υψηλής ευαισθησίας και απλή μέθοδος για τον προσδιορισμό πρωτεϊνών ή νουκλεϊνικών οξέων σε πήκτωμα αγαρόζης

ή πολυακρυλαμιδίου μετά από ηλεκτροφόρηση. Οι πρωτεΐνες και τα νουκλεϊνικά οξέα εμφανίζονται μέσα σε 1 h. Είναι 30-50 φορές περισσότερο ευαίσθητη από τη χρώση με Coomassie Blue και μπορεί ανιχνεύει έως και ng πρωτεϊνών και DNA.

Η χρώση με νιτρικό άργυρο γίνεται με την αναγωγή του νιτρικού αργύρου σε μεταλλικό άργυρο από τον πεπτιδικό δεσμό των πρωτεϊνών, με αποτέλεσμα την εναπόθεση του σε αυτές.

Όργανα - Αντιδραστήρια

- Silver Stain Plus Kit (Bio-Rad): Περιέχει το συμπυκνωμένο διάλυμα σταθεροποίησης (Fixative Enhancer), το αντιδραστήριο της ανάπτυξης (Development Accelerator Reagent) και τα διαλύματα ανάπτυξης και χρώσης (Silver Complex Solution, Reduction Moderator και Image Development Reagent)
- Μεθανόλη, Οξικό Οξύ, Νιτρικό Οξύ
- Σαρωτής ειδώλου (Πρόγραμμα Image Master 1D Prime, Pharmacia)

Διαλύματα εργασίας

Όλα τα διαλύματα τοποθετούνται σε γυαλικά τα οποία έχουν πριν καθαριστεί με νιτρικό οξύ 50%. Επίσης με νιτρικό οξύ έχει καθαριστεί και η λεκάνη που τοποθετείται το πήκτωμα για την χρώση.

- **Διάλυμα σταθεροποίησης (Fixative Solution) (200 ml/πήκτωμα).** Αποτελείται από 100 ml μεθανόλης, 20 ml οξικού οξέος, 20 ml συμπυκνωμένου διαλύματος σταθεροποίησης και 60 ml dH_2O.

- **Διάλυμα επιτάχυνσης ανάπτυξης (Development Accelerator Solution).** 5 g από το αντιδραστήριο της ανάπτυξης (Development Accelerator Reagent) προσθέτονται σιγά σιγά και διαλύονται σε 80 ml dH_2O. Κατόπιν συμπληρώνεται ο όγκος στα 100 ml και το διάλυμα διατηρείται μέχρι 3 μήνες στους 4 ^{0}C. Χρησιμοποιείται πάντα σε θερμοκρασία δωματίου.

- **Διάλυμα χρώσης και ανάπτυξης (Staining and Developing) (50 ml/πήκτωμα).** 5 min πριν την χρώση, σε καλά προστατευμένο από το φως γυάλινο ποτήρι των 50 ml, αναμιγνύονται 2.5 ml από το κάθε διάλυμα ανάπτυξης και χρώσης (Silver Complex Solution, Reduction Moderator και Image Development Reagent) με

17.5 ml dH_2O. Μόλις 3 min πριν από την χρώση προσθέτονται 25 ml από διάλυμα επιτάχυνσης ανάπτυξης και αναδεύονται.

- **Διάλυμα οξικού οξέος 5% (Τερματισμού της αντίδρασης).** 10 ml οξικού οξέος αναμιγνύονται με 190 ml dH_2O.

Πειραματική διαδικασία

Μετά την ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE ακολουθούνται τα εξής στάδια :

Σταθεροποίηση

Το πήκτωμα τοποθετείται σε λεκάνη παρουσία του διαλύματος σταθεροποίησης για 30 min υπό ανάδευση. Κατόπιν απομακρύνεται το διάλυμα σταθεροποίησης και το πήκτωμα εκπλύνεται δυο φορές με νερό για 40 min (2x20 min).

Χρώση και ανάπτυξη χρώματος

Μετά τις εκπλύσεις προσθέτεται το διάλυμα χρώσης και ανάπτυξης χρώματος υπό ανάδευση. Η επώαση γίνεται έως ότου να εμφανιστούν καλά οι μπάντες των πρωτεϊνών (για τουλάχιστον 20 min).

Τερματισμός της ανάπτυξης χρώματος

Κατόπιν το πήκτωμα τοποθετείται σε 200 ml διαλύματος 5% οξεικού οξέος, για τουλάχιστον 15 min, με σκοπό να τερματιστεί η περαιτέρω ανάπτυξη του χρώματος.

Συντήρηση και επεξεργασία του πηκτώματος

Το πήκτωμα τοποθετείται για τουλάχιστον 5 min σε νερό πριν την επεξεργασία του και διατηρείται σε θερμοκρασία δωματίου. Η επεξεργασία των αποτελεσμάτων γίνεται με την βοήθεια του προγράμματος Image Master 1D Prime σε ηλεκτρονικό υπολογιστή, μετά από φωτογραφία του πηκτώματος στον σαρωτή ειδώλου.

ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ 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 δισιχρονικού οξέος, που απορροφά στα 560 nm (240-241).

- Πρωτεΐνη + Cu^{2+} $\xrightarrow{OH^-}$ Τετραχηλικό σύμπλοκο πρωτεΐνης-Cu^{1+}
- Cu^{1+} + 2 Δισιχρονικό οξύ (BCA) $\longrightarrow$ BCA-Cu^{1+} (μοβ χρώμα)

Αντιδραστήρια - Όργανα

Ο προσδιορισμός γίνεται με την χρήση εμπορικής συσκευασίας Kit που περιλαμβάνει τα παρακάτω:

- Αντιδραστήριο Α. Το αντιδραστήριο Α είναι μείγμα ανθρακικού νατρίου, διττανθρακικού νατρίου, δισιχρονικού οξέος και ταρταρικού νατρίου σε 0.2N NaOH.
- Αντιδραστήριο Β. Διάλυμα 4%$CuSO_4$.
- Πρότυπο διάλυμα 2 mg/ml BSA σε 0.9% NaCl και 0.05% NaN_3.
- Πλακίδιο microelisa 96 θέσεων.
- Πολυπιπέτα σταθερού όγκου 200 μl (Costar)
- Μετρητής microelisa.

Πειραματική διαδικασία

- **Διάλυμα εργασίας**. Το διάλυμα εργασίας προκύπτει από την ανάμιξη των αντιδραστηρίων Α και Β σε κατ' όγκο αναλογία 50:1. Το αντιδραστήριο παρασκευάζεται λίγο πριν τη χρήση του.
- **Πρότυπα διαλύματα BSA**. Παρασκευάζονται με κατάλληλη αραίωση του διαλύματος BSA 2 mg/ml, έτσι ώστε να προκύψουν διαλύματα 0.25-1.5 mg/ml BSA. Τα πρότυπα διαλύματα BSA διατηρούνται στους -20°C.

Αναλυτική πορεία

Σε πλακίδιο microelisa 96 θέσεων τοποθετούνται 20 μl προτύπων καθώς και 10 δείγματος. Στη συνέχεια προστίθενται με πολυπιπέτα 200 μl του διαλύματος εργασίας σε κάθε θέση της πλάκας. Η πλάκα ανακινείται ήπια, και επωάζεται στους 37°C για 30 min. Έπειτα εισάγεται στον μετρητή microelisa όπου φωτομετρείται στα 560 nm με φίλτρο αναφοράς τα 620 nm.

Επεξεργασία των αποτελεσμάτων

Με βάση τις απορροφήσεις των προτύπων δειγμάτων σχεδιάζεται με την βοήθεια ηλεκτρονικού υπολογιστή, η βέλτιστη ευθεία:

Απορρόφηση= a × συγκέντρωση + b (όπου a και b οι συντελεστές της ευθείας γραμμής).

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

ΕΝΖΥΜΙΚΟΣ ΦΩΤΟΜΕΤΡΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΟΛΙΚΗΣ ΧΟΛΗΣΤΕΡΟΛΗΣ

Αρχή της μεθόδου

Οι ενζυμικές μέθοδοι φωτομετρικών προσδιορισμών που θα περιγραφούν στηρίζονται στην παραγωγή H_2O_2 μετά την επίδραση εξειδικευμένου οξειδωτικού ενζύμου. Το παραγόμενο H_2O_2 παρουσία υπεροξειδάσης οξειδώνει παράγωγα της φαινόλης προς παράγωγα κινόνης τα οποία εξαιτίας των συζυγών διπλών δεσμών τους είναι χρωμοφόρα και απορροφούν στο ορατό (242). Η παρακάτω ακολουθία αντιδράσεων δίνει την αρχή του ενζυματικού φωτομετρικού προσδιορισμού της χοληστερόλης.

- Υδρόλυση της εστεροποιημένης χοληστερόλης

$$\text{Εστέρας της χοληστερόλης} + H_2O \xrightarrow[\text{της χοληστερόλης}]{\text{Εστεράση}} \text{Χοληστερόλη} + RCOOH$$

(ελεύθερο λιπαρό οξύ)

- Οξείδωση της χοληστερόλης παρουσία εξειδικευμένης οξειδάσης

$$\text{Χοληστερόλη} + O_2 \xrightarrow[\text{της χοληστερόλης}]{\text{Οξειδάση}} \text{Χοληστεν 4-όνη-3} + H_2O_2$$

- Αντίδραση ανίχνευσης χρώματος :Αναγωγή του H_2O_2

$$2H_2O_2 + \text{4-αμινο-αντιπυρίνη} + \text{παραχλωροφαινόλη} \xrightarrow{\text{Υπεροξειδάση}} \text{Παράγωγα κινονών (κόκκινο χρώμα)}$$

Αντιδραστήρια - Όργανα

Ο προσδιορισμός γίνεται με τη χρήση εμπορικής συσκευασίας kit (BioMerieux) που περιλαμβάνει:

- **R1:** 0.1 mM ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών, pH 6.9, 15 mM φαινόλη, 3.75 mM χολικό Na

- **R2:** 0.5 mM 4- αμινο-αντιπυρίνη 2.5 mM χολικό Na, Εστεράση της χοληστερόλης >125 U/L, Οξειδάση της χοληστερόλης >200 U/L, Υπεροξειδάση >1000 U/L

- **R3:** Πρότυπο διάλυμα χοληστερόλης, 2 g/lt. Γίνονται αραιώσεις του προτύπου με d H_2O ώστε η κλίμακα συγκεντρώσεων των προτύπων να κυμαίνεται από 0.25 mg/ml μέχρι 1.5 mg/ ml.

- **Αντιδραστήριο εργασίας** Το περιεχόμενο του R2 αναδιασπείρεται σε 25 ml του R1. Αφήνεται για 15 min σε θερμοκρασία δωματίου υπο ήπια ανάδευση. Είναι σταθερό για 3 μήνες στους 4^0C
- Πλακίδιο microelisa 96 θέσεων.
- Πολυπιπέτα σταθερού όγκου 200 μl (Costar)
- Μετρητής microelisa

Πειραματική διαδικασία

Σε πλακίδιο microelisa 96 θέσεων τοποθετούνται 20 μl προτύπων καθώς και 10 μl δείγματος. Στη συνέχεια προστίθενται με πολυπιπέτα 200 μl του διαλύματος εργασίας σε κάθε θέση της πλάκας. Η πλάκα ανακινείται ήπια, και επωάζεται στους 37°C για 5 min. Έπειτα εισάγεται στον μετρητή microelisa όπου και φωτομετρείται στα 492 nm με φίλτρο αναφοράς τα 620 nm.

Επεξεργασία των αποτελεσμάτων

Με βάση τις απορροφήσεις των προτύπων δειγμάτων σχεδιάζεται με την βοήθεια ηλεκτρονικού υπολογιστή, η βέλτιστη ευθεία:

Απορρόφηση= a × συγκέντρωση + b (όπου a και b οι συντελεστές της ευθείας γραμμής).

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

ΕΝΖΥΜΙΚΟΣ ΦΩΤΟΜΕΤΡΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΡΙΓΛΥΚΕΡΙΔΙΩΝ

Αρχή της μεθόδου

Η παρακάτω ακολουθία αντιδράσεων δίνει την αρχή του ενζυμικού φωτομετρικού προσδιορισμού των τριγλυκεριδίων (243).

- Υδρόλυση των τριγλυκεριδίων

$$\text{Τριγλυκερίδια} + H_2O \xrightarrow[\text{Λιπάση}]{\text{Λιποπρωτεϊνική}} \text{Γλυκερόλη} + \text{Λιπαρά οξέα}$$

- Φωσφορυλίωση της γλυκερόλης

$$\text{Γλυκερόλη} + \text{ATP} \xrightarrow[Mg^{2+}]{\text{Κινάση της Γλυκερόλης}} \text{3-φωσφο-γλυκερόλη} + \text{ADP}$$

- Οξείδωση της φωσφογλυκερόλης

$$\text{3-φωσφο-γλυκερόλη} + O_2 \xrightarrow[\text{της Φωσφογλυκερόλης}]{\text{Οξειδάση}} \text{Φωσφοδιϋδροξυακετόνη} + H_2O_2$$

- Μέτρηση του παραγόμενου H_2O_2

$$2H_2O_2 + \text{4-αμινο-αντιπυρίνη} + \text{παραχλωροφαινόλη} \xrightarrow{\text{Υπεροξειδάση}} \text{Παράγωγα κινονών (κόκκινο χρώμα)}$$

Αντιδραστήρια- Όργανα

Ο προσδιορισμός γίνεται με τη χρήση εμπορικής συσκευασίας (kit) που περιλαμβάνει:

- **R1:** 2.29 mM Γλυκερόλη
- **R2:** Διάλυμα tris base pH 7.6, 2.7 mM παραχλωροφαινόλη και 4mM μαγνήσιο
- **R3:** 0.4 mM 4- αμινο-αντιπυρίνη, λιπάση>1000U/L, γλυκεροκινάση>200 U/L, οξειδάση της 3-φωσφογλυκερόλης>2000 U/L, υπεροξειδάση>200 U/L και 0.8 mM ATP
- **R4:** Πρότυπο διάλυμα τριγλυκεριδίων, 2 g/lt. Γίνονται αραιώσεις του προτύπου με d H_2O για συγκεντρώσεις από 0.25 mg/ml μέχρι 1.5 mg/ ml.
- **Αντιδραστήριο εργασίας.** Το περιεχόμενο του R2 αναδιασπείρεται σε 25 ml του R1. Αφήνεται για 15 min σε θερμοκρασία δωματίου υπο ήπια ανάδευση. Είναι σταθερό για 4 εβδομάδες στους 4^0C.
- Πλακίδιο microelisa 96 θέσεων

- Πολυπιπέτα σταθερού όγκου 200 μl (Costar)
- Μετρητής microelisa

Πειραματική διαδικασία

Σε πλάκα των 96 θέσεων τοποθετούνται 20 μl προτύπων καθώς και 10 μl δείγματος. Στη συνέχεια προστίθενται με πολυπιπέτα 200 μl του διαλύματος εργασίας σε κάθε θέση της πλάκας. Η πλάκα ανακινείται ήπια, και επωάζεται στους 37°C για 5 min. Έπειτα εισάγεται στον μετρητή microelisa όπου και φωτομετρείται στα 492 nm με φίλτρο αναφοράς τα 620 nm .

Επεξεργασία των αποτελεσμάτων

Με βάση τις απορροφήσεις των προτύπων δειγμάτων σχεδιάζεται με την βοήθεια ηλεκτρονικού υπολογιστή, η βέλτιστη ευθεία:

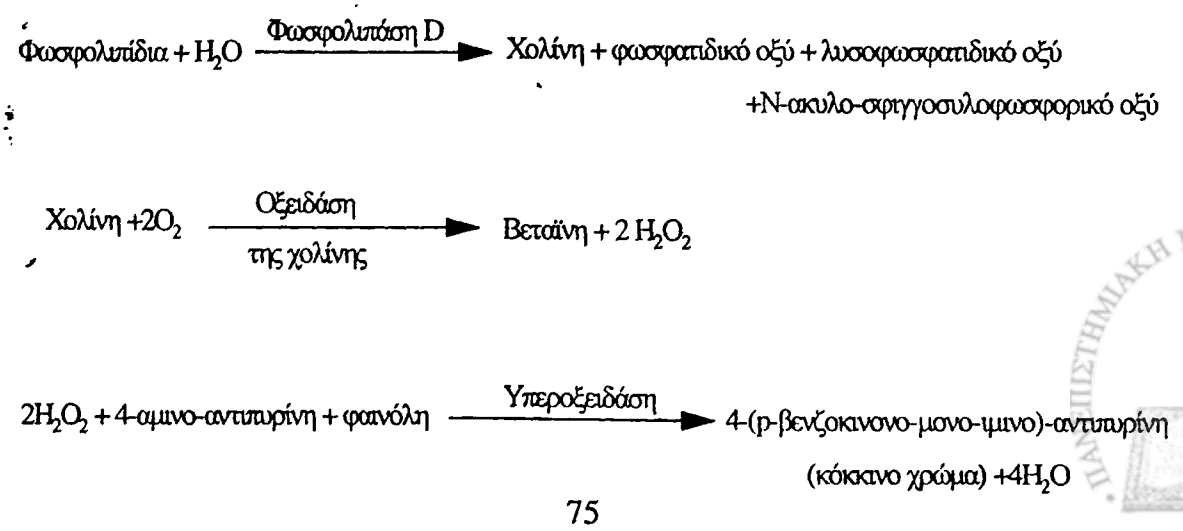
Απορρόφηση= a × συγκέντρωση + b (όπου a και b οι συντελεστές της ευθείας γραμμής).

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

ΕΝΖΥΜΙΚΟΣ ΦΩΤΟΜΕΤΡΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΦΩΣΦΟΛΙΠΙΔΙΩΝ

Αρχή της μεθόδου

Τα φωσφολιπίδια (Lyso-PC, PC, και Sph), υδρολύονται από την φωσφολιπάση D και απελευθερώνουν χολίνη. Η παραγώμενη χολίνη ποσοτικοποιείται με την αντίδραση Trinder (244).



Αντιδραστήρια - Όργανα

Ο προσδιορισμός γίνεται με τη χρήση εμπορικής συσκευασίας που περιλαμβάνει:

- **R1:** Διάλυμα Tris base pH 7.8, 10 mM φαινόλη και 3 mM επιφανειοδραστική ουσία

- **R2:** 0.5mM 4-αμινο-αντιπυρίνη, φωσφολιπάση D >600U/L, U/L, οξειδάση της χολίνης>2000 U/L και υπεροξειδάση>1000 U/L

- **R3:** Πρότυπο διάλυμα φωσφολιπιδίων, 3.10 mg/ml Γίνονται αραιώσεις του προτύπου με d H2O ώστε οι συγκεντρώσεις των παραγώμενων προτύπων να κυμαίνονται από 0.3875 mg/ml μέχρι 3.10 mg/ ml.

- **Αντιδραστήριο εργασίας.** Το περιεχόμενο του R2 αναδιασπείρεται σε 25 ml του R1. Αφήνεται για 15 min σε θερμοκρασία δωματίου υπο ήπια ανάδευση. Είναι σταθερό για 4 εβδομάδες στους 4^0C
- Πλάκα αντίδρασης 96 θέσεων
- Πολυπιπέτα σταθερού όγκου 200 μl (Costar)
- Μετρητής microelisa

Πειραματική διαδικασία

Σε πλάκα των 96 θέσεων τοποθετούνται 20 μl προτύπων καθώς και 10 μl δείγματος. Στη συνέχεια προστίθενται με πολυπιπέτα 200 μl του διαλύματος εργασίας σε κάθε θέση της πλάκας. Η πλάκα ανακινείται ήπια, και επωάζεται στους 37°C για 10 min. Έπειτα εισάγεται στον μετρητή microelisa όπου και φωτομετρείται στα 492 nm με φίλτρο αναφοράς τα 620 nm.

Επεξεργασία των αποτελεσμάτων

Με βάση τις απορροφήσεις των προτύπων δειγμάτων σχεδιάζεται με την βοήθεια ηλεκτρονικού υπολογιστή, η βέλτιστη ευθεία:

Απορρόφηση $= a \times$ ***συγκέντρωση*** $+ b$ (όπου a και b οι συντελεστές της ευθείας γραμμής).

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

ΑΠΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗ ΤΗΣ PAF-AH ΤΗΣ Lp(a)

Όργανα – Διαλύματα Εργασίας

- Μεμβράνη διαπίδυσης (Sigma).
- Φίλτρα διήθησης 0.20 μ (Corning).
- **Ρυθμιστικό διάλυμα 10 mM PBS, pH 7.4.** Όπως περιγράφεται στην σελίδα 46.
- **Διάλυμα 100 mM pefabloc.** 0.0187 g pefabloc διαλύονται σε 670.25 μl H_2O. Το διάλυμα διατηρείται στους 4°C.

Πειραματική διαδικασία

Η απενεργοποίηση της PAF-AH επιτυγχάνεται με την προσθήκη διαλύματος 100 mM Pefabloc, 5 μl/ml Lp(a), δίνοντας τελική συγκέντρωση pefabloc 0.5mM. Το μίγμα επωάζεται στους 37 °C για 1 h. Μετά το τέλος της αντίδρασης η Lp(a) με απενεργοποιημένη την ενδογενή PAF-AH υφίσταται εκτενή διαπίδυση για την απομάκρυνση της περίσσειας του pefabloc. Στη συνέχεια μεταφέρεται σε μεμβράνη διαπίδυσης και τοποθετείται σε ποτήρι που περιέχει 200πλάσιο όγκο, σε σχέση με τον όγκο της Lp(a), PBS 10 mM, pH 7.4. Η διαπίδυση γίνεται στους 4°C, υπό συνεχή ανάδευση. Μετά από 5 h το PBS αντικαθιστάται με καινούργιο και η διαπίδυση συνεχίζεται για άλλες 19 h. Μετά το τέλος της διαπίδυσης η Lp(a) συλλέγεται προσεκτικά με σύριγγα και διηθείται από φίλτρο 0.20 μ. Ακολουθεί προσδιορισμός της πρωτεΐνης της Lp(a).

ΟΞΕΙΔΩΣΗ ΤΗΣ Lp(a)

Αρχή της μεθόδου

Η οξείδωση της Lp(a) επιτυγχάνεται με την επώασή της, με ιόντα Cu^{2+}. Η οξειδωτική τροποποίηση της Lp(a) επιτυγχάνεται με την επώασή της, σε κατάλληλες συνθήκες, με ιόντα Cu^{2+} στους 37^0C. Η παρακολούθηση της οξείδωσης γίνεται στα 234 nm, περιοχή απορρόφησης των συζυγών διενίων που σχηματίζονται στην Lp(a) κατά την υπεροξείδωση των ενδογενών πολυακόρεστων λιπαρών τους οξέων.

Όργανα – Διαλύματα Εργασίας

- Μεμβράνη διαπίδυσης (Sigma).
- Φίλτρα διήθησης 0.20 μ (Corning).
- **Διάλυμα 10% EDTA, pH 7.0.** Όπως περιγράφεται στην σελίδα 50.
- **Ρυθμιστικό διάλυμα 10 mM PBS, pH 7.4.** Όπως περιγράφεται στην σελίδα 46.
- **Διάλυμα 20 mM $CuSO_4$.** 0.0319 g $CuSO_4$ διαλυτοποιούνται σε 100 ml H_2O δίνοντας διάλυμα 20 mM $CuSO_4$. Το διάλυμα διατηρείται στους 4°C.
- **Διάλυμα 2 mM $CuSO_4$.** 10 μl του διαλύματος 20 mM $CuSO_4$ προστίθενται σε 90 μl H_2O δίνοντας διάλυμα 2 mM $CuSO_4$. Το διάλυμα διατηρείται στους 4°C.
- **Διάλυμα 0.5 mM $CuSO_4$.** 25 μl του διαλύματος 2 mM $CuSO_4$ προσθέτονται σε 75 μl H_2O δίνοντας διάλυμα 0.5 mM $CuSO_4$. Το διάλυμα διατηρείται στους 4°C.

Πειραματική διαδικασία

Προετοιμασία της Lp(a) για οξείδωση

Η Lp(a) διατηρείται στους 4°C παρουσία EDTA 0.05%, έτσι πριν την οξείδωση υφίσταται εκτενή διαπίδυση για την απομάκρυνση του EDTA. Η Lp(a) μεταφέρεται σε μεμβράνη διαπίδυσης και τοποθετείται σε ποτήρι που περιέχει 200πλάσιο όγκο, σε σχέση με τον όγκο της Lp(a), 10 mM PBS, pH 7.4. Η διαπίδυση γίνεται στους 4°C,

υπό συνεχή ανάδευση. Μετά από 5 h το PBS αντικαθιστάται με καινούργιο και η διαπίδυση συνεχίζεται για άλλες 19 h. Μετά το τέλος της διαπίδυσης η Lp(a) συλλέγεται προσεκτικά με σύριγγα και διηθείται από φίλτρο 0.20 μ. Ακολουθεί προσδιορισμός της πρωτεΐνης της Lp(a).

Οξείδωση της Lp(a)

Η Lp(a) αραιώνεται στα 100 μg πρωτεΐνης/ml με την προσθήκη κατάλληλου όγκου 10 mM PBS, pH 7.4. Η οξείδωση αρχίζει με την προσθήκη διαλύματος 0,5 mM $CuSO_4$, 10 μl/ml Lp(a), δίνοντας τελική συγκέντρωση ιόντων 5 μM Cu^{2+}. Η Lp(a) τοποθετείται σε UV φωτόμετρο στους 37°C για όση ώρα διαρκεί η οξείδωση. Η οξείδωση παρακολουθείται στα 234 nm με καταγραφή της σιγμοειδούς καμπύλης παραγωγής των συζυγών διενίων.

Τερματισμός της οξείδωσης

Η οξείδωση της Lp(a) σταματά με την προσθήκη 5 μl/ml Lp(a) διαλύματος 10% EDTA, pH 7.0, δίνοντας τελική συγκέντρωση EDTA 0.05%. Η οξειδωμένη Lp(a) είτε κατεργάζεται αμέσως είτε διατηρείται στους 4°C.

Έλεγχος του βαθμού οξείδωσης

Ο βαθμός της οξειδωτικής τροποποίησης της Lp(a) υπολογίζεται με τη μέτρηση της REM, με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης, και με τη μέτρηση των TBARS.

ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ TBARS

Αρχή της μεθόδου

Οι καρβονυλικές ενώσεις συμπλέκονται και αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ δίνοντας έγχρωμο προϊόν το οποίο προσδιορίζεται φωτομετρικά στα 532 nm.

Όργανα - Διαλύματα εργασίας

- Γυάλινα σωληνάκια.
- Φυγόκεντρος πάγκου (Hermle, Z 320).
- **Διάλυμα 10% TCA.** 10 g TCA διαλυτοποιούνται σε 100 ml H_2O. Το διάλυμα διατηρείται στους 4°C.
- **Διάλυμα 0.67% TBA.** 0.7539 g TBA διαλυτοποιούνται σε περίπου 80 ml H_2O υπό θέρμανση. Το διάλυμα αφήνεται να κρυώσει και ο όγκος του συμπληρώνεται στα 100 ml με την προσθήκη H_2O. Το TBA είναι ευαίσθητο στον αέρα γι' αυτό μετά από κάθε χρήση και πριν από την αποθήκευσή του αφαιρείται όλος ο αέρας από το μπουκάλι με ρεύμα N_2. Το διάλυμα διατηρείται στους 4°C.

- **Διάλυμα 6 mM MDA.** Μέρος του πυκνού διαλύματος MDA αραιώνεται 1000 φορές με την προσθήκη H_2O, δίνοντας διάλυμα 6 mM MDA. Το διάλυμα διατηρείται στους 4°C.
- **Πρότυπο διάλυμα 200 μM MDA.** 30 μl διαλύματος MDA 6 μmol/ml προσθέτονται σε 870 μl H_2O δίνοντας διάλυμα 200 μM MDA. Το διάλυμα αυτό παρασκευάζεται λίγο πριν τη χρήση του.

Πειραματική διαδικασία

Προετοιμασία των δειγμάτων

Για τη μέτρηση των TBARS σε Lp(a), μεταφέρεται σε γυάλινο σωληνάκι ποσότητα φυσικής ή οξειδωμένης Lp(a), που περιέχει 10 μg πρωτεΐνης. Ο όγκος των δειγμάτων συμπληρώνεται στα 100 μl με την προσθήκη H_2O.

Προετοιμασία των προτύπων

Σε 6 γυάλινα σωληνάκια προσθέτονται 0, 5, 10, 15, 20 και 25 μl διαλύματος 200 μM MDA αντίστοιχα (0-5 nmol MDA αντίστοιχα). Ο όγκος των προτύπων συμπληρώνεται στα 100 μl με την προσθήκη H_2O. Στη συνέχεια τα πρότυπα κατεργάζονται με τον ίδιο ακριβώς τρόπο όπως και τα προς μέτρηση δείγματα.

Κατεργασία των δειγμάτων και των προτύπων

Σε κάθε σωληνάκι προσθέτονται 1ml διαλύματος 10% TCA και 1ml διαλύματος 0.67% TBA. Τα δείγματα αναδεύονται ισχυρά σε Vortex και αφού σκεπαστούν με αλουμινόχαρτο, τοποθετούνται σε υδατόλουτρο 75 °C για 60min ακριβώς. Στη συνέχεια τα σωληνάκια αφήνονται να αποκτήσουν θερμοκρασία περιβάλλοντος.

Φωτομέτρηση των δειγμάτων και των προτύπων

Τα δείγματα φυγοκεντρούνται σε φυγόκεντρο πάγκου, στις 3100 rpm (1500xg) για 15min, ώστε να καταβυθιστούν οι πρωτεΐνες που προκαλούν θόλωμα. Στη συνέχεια αφαιρείται προσεκτικά από το υπερκείμενο ποσότητα δείγματος, η οποία μεταφέρεται σε κυψελίδα φωτομέτρου. Γίνεται μέτρηση της απορρόφησης στα 532 nm.

Επεξεργασία των αποτελεσμάτων

Με βάση τις απορροφήσεις των προτύπων δειγμάτων σχηματίζεται, σε ηλεκτρονικό υπολογιστή, καταγράφημα που περιλαμβάνει την περιεκτικότητα των προτύπων σε MDA ως άξονα των X και τις απορροφήσεις των προτύπων ως άξονα Y. Χαράζεται η βέλτιστη ευθεία που περνάει από τα σημεία και ταυτόχρονα υπολογίζεται η εξίσωσή της. Από την εξίσωση της πρότυπης καμπύλης και από τις απορροφήσεις των δειγμάτων υπολογίζονται τα nmol καρβονυλικών ενώσεων που περιέχει η Lp(a). Ο αριθμός των nmol πολλαπλασιάζεται με συντελεστή 100 ώστε τα αποτελέσματα να δίνονται σε nmol MDA/mg πρωτεΐνης Lp(a).

ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑΣ ΤΗΣ PAF-AH

Αρχή της μεθόδου

Η ενεργότητα της PAF-AH προσδιορίζεται με την μέθοδο ιζηματοποίησης με τριχλωροξικό οξύ (TCA). Η μέτρηση της ενεργότητας της PAF-AH πραγματοποιείται έμμεσα με την μέτρηση των ραδιοσημασμένων οξικών ομάδων που ελευθερώνονται κατά την υδρόλυση του υποστρώματος [^{3}H]-PAF από το ένζυμο. Οι ομάδες αυτές παραμένουν στο υπερκείμενο κατά την καταβύθιση με TCA του εναπομείναντος

[^{3}H]-PAF και του παραγόμενου Lyso-PAF, οι οποίοι βρίσκονται δεσμευμένοι σε BSA που μετουσιώνεται και καταβυθίζεται από το TCA (245).

Όργανα- Αντιδραστήρια

- Μετρητής υγρού σπινθηρισμού, Packard (TriCarb 2100 TR)
- Μικροφυγόκεντρος για eppendorf
- Υδατόλουτρο 37 ^{0}C
- Υπολογιστικό πρόγραμμα Enzpack.
- PAF (1-O-δεκαεξάκυλο-2-ακετυλο-sn-γλυκερο-3-φωσφοχολίνη, M.B. 523.7 g/mol, Sigma).
- Πρότυπο διάλυμα [^{3}H]-PAF (1-O-δεκαεξέκυλο-2-[^{3}Hακετυλο]-sn-γλυκερο-3-φωσφοχολίνη), 0.25 mCi/0.5 ml, 10 Ci/mmol, DuPont New England Nuclear Boston MA.
- Υγρό σπινθηρισμού, Scintilation liquid Optiphase Hisafe 3
- Τριχλωροξικό οξύ (TCA, Sigma)
- Αλβουμίνη βοδινού ορού ελεύθερη λιπαρών οξέων (BSA, Sigma)

Διαλύματα εργασίας

- **Διάλυμα 20 mM PAF.** Διαλύονται 25 mg σκόνης PAF σε 2.387 ml 80% αιθανόλης. Το διάλυμα διατηρείται στους –20 ^{0}C

- **20% TCA.** 20 g TCA διαλυτοποιούνται σε 100 ml H_2O. Το διάλυμα διατηρείται στους 4°C.

- **2.5 mg/ml BSA.** 25 mg BSA διαλυτοποιούνται σε 10 ml φυσιολογικού ορού. Το διάλυμα διατηρείται στους -20°C.

- **100 mg/ml BSA.** 1 g BSA διαλυτοποιείται σε 10 ml φυσιολογικού ορού. Το διάλυμα διατηρείται στους -20°C.

- **Ρυθμιστικό διάλυμα Hepes pH 7.4.** Όπως περιγράφεται στην σελίδα 52.

- **Διάλυμα 25 μM [^{3}H]-PAF.** Αρχικά αναμιγνύονται 10 μl από τον 20 mM PAF με 90 μl 80% αιθανόλης (διάλυμα C). Σε πλαστικό σωληνάκι

πολυπροπυλενίου αναμιγνύονται 12.5 μl από το διάλυμα C με 10 μl από το πρότυπο διάλυμα [^{3}H]-PAF. Εξατμίζονται μέχρι ξηρού σε ρεύμα αζώτου και αναδιασπείρονται σε 1 ml BSA 2.5 mg/ml. Το μίγμα αναδεύεται σε Vortex και επωάζεται στους 37^{0}C. Το διάλυμα διατηρείται στους -20^{0}C.

- **Διάλυμα 50 μM [^{3}H]-PAF.** Σε πλαστικό σωληνάκι πολυπροπυλενίου αναμιγνύονται 25 μl από το διάλυμα C με 10 μl από το πρότυπο διάλυμα [^{3}H]-PAF. Εξατμίζονται μέχρι ξηρού σε ρεύμα αζώτου και αναδιασπείρονται σε 1 ml BSA 2.5 mg/ml. Το μίγμα αναδεύεται σε Vortex και επωάζεται στους 37^{0}C. Το διάλυμα διατηρείται στους -20^{0}C.

- **Διάλυμα 100 μM [^{3}H]-PAF.** Σε πλαστικό σωληνάκι πολυπροπυλενίου αναμιγνύονται 50 μl από το διάλυμα C με 10 μl από το πρότυπο διάλυμα [^{3}H]-PAF. Εξατμίζονται μέχρι ξηρού σε ρεύμα αζώτου και αναδιασπείρονται σε 1 ml BSA 2.5 mg/ml. Το μίγμα αναδεύεται σε Vortex και επωάζεται στους 37^{0}C. Το διάλυμα διατηρείται στους -20^{0}C.

- **Διάλυμα 250 μM [^{3}H]-PAF.** Σε πλαστικό σωληνάκι πολυπροπυλενίου αναμιγνύονται 12.5 μl από τον PAF 20 mM με 10 μl από το πρότυπο διάλυμα [^{3}H]-PAF. Εξατμίζονται μέχρι ξηρού σε ρεύμα αζώτου και αναδιασπείρονται σε 1 ml BSA 2.5 mg/ml. Το μίγμα αναδεύεται σε Vortex και επωάζεται στους 37^{0}C. Το διάλυμα διατηρείται στους -20^{0}C.

- **Διάλυμα 500 μM [^{3}H]-PAF.** Σε πλαστικό σωληνάκι πολυπροπυλενίου αναμιγνύονται 25 μl από τον PAF 20 mM με 20 μl από το πρότυπο διάλυμα [^{3}H]-PAF. Εξατμίζονται μέχρι ξηρού σε ρεύμα αζώτου και αναδιασπείρονται σε 1 ml BSA 2.5 mg/ml. Το μίγμα αναδεύεται σε Vortex και επωάζεται στους 37^{0}C. Το διάλυμα διατηρείται στους -20^{0}C.

- **Διάλυμα 1000 μM [^{3}H]-PAF.** Σε πλαστικό σωληνάκι πολυπροπυλενίου αναμιγνύονται 50 μl από τον PAF 20 mM με 15 μl από το πρότυπο διάλυμα [^{3}H]-PAF. Εξατμίζονται μέχρι ξηρού σε ρεύμα αζώτου και αναδιασπείρονται σε 1 ml BSA 2.5 mg/ml. Το μίγμα αναδεύεται σε Vortex και επωάζεται στους 37^{0}C. Το διάλυμα διατηρείται στους -20^{0}C.

Πειραματική διαδικασία

Ως πηγή του ενζύμου χρησιμοποιούνται 5 μg πρωτεΐνης Lp(a) ή LDL ή 50 μl από κάθε κλάσμα που συλλέχθηκε από τη στήλη Lysine Sepharose 4B ή 90 μl από κάθε κλάσμα που συλλέχθηκε μετά από την αναγωγική διάσπαση της Lp(a) ή 50 μl πλάσματος (αραιωμένου 1/50 v/v με 10 mM Hepes, pH 7.4), τα οποία αναμιγνύονται με ρυθμιστικό διάλυμα Hepes pH 7.4 μέχρι τελικού όγκου 90 μl. Για την μέτρηση των κινητικών σταθερών του ενζύμου χρησιμοποιούνται διαλύματα [^{3}H]-PAF τελικής συγκέντρωσης 2.5- 100 μM.

Σε eppendorf προστίθενται 90 μl δείγματος (λιποπρωτεΐνη ή πλάσμα και ρυθμιστικό διάλυμα Hepes, pH 7.4). Παράλληλα ετοιμάζεται και δείγμα ελέγχου (τυφλό) όπου αντί για λιποπρωτεΐνη προστίθενται 90 μl Hepes, pH 7.4. Τα eppendorf τοποθετούνται σε υδατόλουτρο. Η ενζυμική αντίδραση ξεκινά με την προσθήκη 10 μl [^{3}H]-PAF σε δείγμα και τυφλό ενώ ακολουθεί επώαση στους 37 °C για 30 min ακριβώς. Για τον προσδιορισμό της ενεργότητας του πλάσματος η διάρκεια της πιο πάνω ενζυμικής αντίδρασης είναι 10 min στους 37 °C. Μόλις συμπληρωθεί ο απαραίτητος χρόνος επώασης, η ενζυμική αντίδραση σταματά με την προσθήκη 20 μl διαλύματος 100 mg/ml BSA. Στη συνέχεια τα eppendorf αναδεύονται ισχυρά σε Vortex και τοποθετούνται σε θερμοκρασία 4°C (παγόλουτρο) για 12 min. Έπειτα προστίθενται 80 μl διαλύματος 20% TCA, τα eppendorf αναδεύονται ισχυρά σε Vortex και τοποθετούνται σε θερμοκρασία 4°C για άλλα 30 min. Ακολουθεί φυγοκέντρηση, σε μικροφυγόκεντρο eppendorf, σε 10000 rpm (7200xg) για 5 min ώστε να καταβυθιστούν οι πρωτεΐνες. Στην συνέχεια 100 μl από το υπερκείμενο μεταφέρονται σε σωληνάκι σπινθηρισμού, προστίθενται 2 ml υγρού σπινθηρισμού, το σωληνάκι αναδεύεται καλά και τοποθετείται στο μετρητή υγρού σπινθηρισμού. Η μέτρηση γίνεται για 3 min και τα αποτελέσματα δίνονται σε κρούσεις, cpm.

Υπολογισμός ειδικής ενεργότητας

Στο μετρητή υγρού σπινθηρισμού μετρούνται οι κρούσεις που δίνουν τα 10 μl των διαλυμάτων [^{3}H]-PAF 2.5- 100 μM για τον υπολογισμό της ειδικής ενεργότητας (Ε.Ε). Έτσι, π.χ τα 10 μl [^{3}H]-PAF 2.5 μM περιέχουν 0.25 nmol [^{3}H]-PAF, άρα:

$$E.E = \text{κρούσεις} / \text{nmol } [^3H]\text{-PAF} = cpm_{st}/0.25$$

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

Υπολογισμός ενζυμικής ενεργότητας

Στο μετρητή υγρού σπινθηρισμού μετρούνται οι κρούσεις των 100 μl του δείγματος (cpm_δ) και του δείγματος ελέγχου (cpm_τ). Πρίν από την μέτρηση υπήρχε συνολικά όγκος 200 μl, ο οποίος δίνει 2 x cpm_δ κρούσεις από τις οποίες αφαιρούνται οι κρούσεις που οφείλονται στο δείγμα ελέγχου (τυφλό) 2 x cpm_τ. Άρα, οι καθαρές κρούσεις που οφείλονται στο δείγμα είναι 2 x (cpm_δ- cpm_τ). Έτσι η ενεργότητα της PAF-AH υπολογίζεται από τον παρακάτω τύπο:

$$\textbf{Ενεργότητα PAF-AH} = [2 \times (cpm_\delta - cpm_\tau) \times 1000] / [E.E \times A \times B]$$

1000, είναι ο συντελεστής για την μετατροπή των μg πρωτεΐνης σε mg, ή των μl εναιωρήματος σε ml

A, είναι τα μg πρωτεΐνης ή τα μl εναιωρήματος

B, είναι ο χρόνος επώασης του δείγματος σε min

Έτσι, η ενεργότητα της PAF-AH εκφράζεται ως nmol του [^{3}H]-PAF που αποικοδομούνται ανά mg πρωτεΐνης ή ανά ml εναιωρήματος ή ανά mg λιποπρωτεϊνικής μάζας, ανά min. Οι φαινόμενες τιμές Km, Vmax υπολογίζονται με την εξίσωση Hanes-Dixon χρησιμοποιώντας το υπολογιστικό πρόγραμμα Enzpack.

ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΣΥΣΣΩΡΕΥΣΗΣ ΤΩΝ ΑΙΜΟΠΕΤΑΛΙΩΝ ΣΕ ΠΛΑΣΜΑ ΠΛΟΥΣΙΟ ΣΕ ΑΙΜΟΠΕΤΑΛΙΑ (PRP)

Αρχή της μεθόδου

Η συσσώρευση των αιμοπεταλίων παρουσία ενός εξωγενώς προστιθέμενου αγωνιστή έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της διαπερατότητας του εναιωρήματος των αιμοπεταλίων, η οποία μετριέται με ειδικό νεφελόμετρο. Τα αιμοπετάλια προ-επωάζονται με την Lp(a) για 1 min στους 37 °C, μετά προστίθεται ο αγωνιστής και παρακολουθείται η συσσώρευση για 3 min στους 37 °C. Τα αιμοπετάλια (σε ορισμένα πειράματα) προ-επωάζονται με ασπιρίνη, τον αναστολέα της κυκλοοξυγονάσης, ώστε να μην παράγεται και εκκρίνεται TxA_2. Εκτός από την ασπιρίνη χρησιμοποιείται και ο συνδυασμός CP/CPK ως περισυλλέκτης του ενδογενώς παραγόμενου ADP.

Όργανα - Διαλύματα Εργασίας

- Φυγόκεντρος πάγκου (Hermle, Z 320)
- Αιματοκυτόμετρο (Newbauer)
- Μικροσκόπιο (Olympus)
- Μετρητής συσσώρευσης αιμοπεταλίων (Aggregometer, CHRONO-LOG)
- Καταγραφικό (CHRONO-LOG)
- Γυάλινες κυψελίδες συσσώρευσης
- Ειδικά μαγνητάκια συσσώρευσης

- **Αντιπηκτικό διάλυμα κιτρικών (ACD).** Το υδατικό αντιπηκτικό διάλυμα ACD περιέχει 0.07 M κιτρικού οξέος, 0.11 M κιτρικού νατρίου και 0.11 M D(+) γλυκόζη. Το διάλυμα διατηρείται στους 4^0C.

- **Διάλυμα 1% οξαλικού αμμωνίου.** 1 g οξαλικού αμμωνίου διαλυτοποιείται σε 100 ml H_2O. Το διάλυμα διατηρείται στους 4^0C.

- **Διάλυμα 130 mM $CaCl_2$ – 1 M $MgCl_2.H_2O$.** 2.88 g $CaCl_2$ και 40.6 g $MgCl_2.H_2O$ διαλυτοποιούνται σε 200 ml d H_2O. Το διάλυμα διατηρείται στους 4°C.

- **Διάλυμα φωσφοκρεατίνης 0.2 M.** 0.1020 g CP διαλυτοποιούνται σε 2 ml φυσιολογικό ορό. Το διάλυμα διατηρείται στους –20 °C.

- **Διάλυμα κινάσης της φωσφοκρεατίνης 4 U/μl.** 0.016 g CPK διαλυτοποιούνται σε 1 ml φυσιολογικό ορό. Το διάλυμα διατηρείται στους –20 °C.

- **Διάλυμα ασπιρίνης τελικής συγκέντρωσης 0.1 M.** 0.0162 g ασπιρίνης διαλυτοποιούνται σε 500 μl φυσιολογικού ορού.

- **Διάλυμα 100 mg/ml BSA.** Όπως περιγράφεται στην σελίδα 82.

- **Ρυθμιστικό διάλυμα 10 mM PBS, pH 7.4**. Όπως περιγράφεται στην σελίδα 46. Επιπλέον το διάλυμα αυτό περιέχει 10 μl ανά ml από το διάλυμα 130 mM $CaCl_2$ – 1 M $MgCl_2.H_2O$ καθώς και 1 mg/ml BSA.

- **Διαλύματα 0.5- 5 μM PAF.** 50 μl από το διάλυμα 20 mM PAF σε αιθανόλη εξατμίζονται μέχρι ξηρού σε ρεύμα N_2 και επαναδιαλύονται σε διάλυμα BSA/saline (2.5 mg/ml) ώστε να παρασκευαστεί διάλυμα PAF συγκέντρωσης, 1 mM. Απο το διάλυμα αυτό με κατάλληλες αραιώσεις παρασκευάζονται διαλύματα PAF συγκεντρώσεων 0.5 έως 5 μM.

- **Διάλυμα 5.8 mM TRAP.** Η εμπορική συσκευασία περιέχει 1 mg λυοφιλοποιημένου TRAP το οποίο διαλυτοποιείται σε 100 μl φυσιολογικό ορό. Το διάλυμα αυτό διατηρείται στους –80 °C σε κλάσματα των 25 μl.

- **Διάλυμα 1 mM διφωσφορικής αδενοσίνης (ADP).** Το διάλυμα της διφωσφορικής αδενοσίνης προέρχεται από 2.5 mg λυοφιλοποιημένου ADP διαλυτοποιημένο σε 5 ml φυσιολογικό ορό. Το διάλυμα αυτό διατηρείται στους –80 °C σε κλάσματα των 50 μl.

Πειραματική διαδικασία

Η μέτρηση της συσσωρευτικής απόκρισης των αιμοπεταλίων γίνεται χρησιμοποιώντας πλάσμα πλούσιο σε αιμοπετάλια (PRP) (246). Σε σωληνάκια

πολυπροπυλενίου τα οποία περιέχουν αντιπηκτικό διάλυμα ACD σε αναλογία 1:9 (v:v) συλλέγονται 10.8 ml περιφερικού φλεβικού αίματος το οποίο δεν περιέχει Lp(a). Ακολουθεί μία φυγοκέντρηση στις 1000 rpm (120xg), για 15 min σε θερμοκρασία δωματίου όπου και απομονώνονται 3 ml από το υπερκείμενο υγρό (PRP). Το πλάσμα που υπολείπεται μαζί με τα κύτταρα του αίματος φυγοκεντρείται στη συνέχεια στις 3100 rpm (1500xg), για 15 min σε θερμοκρασία δωματίου και απομονώνεται το υπερκείμενο υγρό που είναι το πλάσμα φτωχό σε αιμοπετάλια (PPP).

Η μέτρηση των αιμοπεταλίων του PRP γίνεται με τη βοήθεια αιματοκυτόμετρου. Συγκεκριμένα 10 μl PRP αναδιασπείρονται σε 190 μl διαλύματος οξαλικού αμμωνίου 1% (αραίωση 1:20). Το μίγμα ομογενοποιείται ήπια και 10 μl από το εναιώρημα τοποθετούνται σε μία από τις δύο υποδοχές που υπάρχουν στο αιματοκυτόμετρο, πάνω στο οποίο έχει τοποθετηθεί καλυπτρίδα. Το αιματοκυτόμετρο τοποθετείται για 15 min σε τρυβλίο Petri, το οποίο περιέχει ένα κομμάτι βρεγμένου βαμβακιού για να διατηρηθεί υγρή η ατμόσφαιρα στο εσωτερικό του τρυβλίου. Μετά από 15 min γίνεται η μέτρηση των αιμοπεταλίων στο μικροσκόπιο. Μετρούνται 5 μέτριου μεγέθους τετράγωνα του κεντρικού μεγάλου τετραγώνου του αιματοκυτομέτρου. Γνωρίζοντας ότι καθένα από τα 5 τετράγωνα καταλαμβάνει όγκο 0.004mm^3 μπορούμε με τον παρακάτω τύπο να υπολογίσουμε τον συνολικό αριθμό αιμοπεταλίων του PRP ανά mm^3 ή ανά μl:

$$\frac{(\text{Μέση τιμή αιμοπεταλίων των 5 τετράγωνων}) \times 1\text{mm}^3 \times 20}{0.004\text{mm}^3}$$

Στη συνέχεια με βάση τον αριθμό που βρίσκουμε υπολογίζουμε την ποσότητα του PPP με την οποία πρέπει να αραιωθεί το ομόλογο του PRP έτσι ώστε η τελική συγκέντρωση αιμοπεταλίων να είναι 360000 αιμοπετάλια/mm^3 ή 360000 αιμοπετάλια/μl.

Στο PRP που προκύπτει μετά την αραίωση προστίθεται η Lp(a) σε διάφορες τελικές συγκεντρώσεις (20- 80 μg πρωτεΐνης /ml). Γίνεται η ρύθμιση της κλίμακας του οργάνου χρησιμοποιώντας το PPP ως αναφορά για το 100% οπτικής διαπερατότητας ή 100% συσσώρευσης, και το PRP για το 0% της οπτικής διαπερατότητας ή 0% συσσώρευσης. Μετά από αυτή την κατεργασία η συσσώρευση

των αιμοπεταλίων προσδιορίζεται παρουσία PAF ή ADP ή TRAP τελικής συγκέντρωσης 7.5 nM ή 1 μM ή 2.4 μM αντίστοιχα. Συγκεκριμένα 350 μl PRP καθώς και η Lp(a) σε διάφορες τελικές συγκεντρώσεις τοποθετούνται σε ειδική γυάλινη κυψελίδα συσσώρευσης, ή ο αντίστοιχος όγκος του ρυθμιστικού διαλύματος της Lp(a) (PBS) ως δείγμα αναφοράς. Στην συνέχεια η κυψελίδα τοποθετείται στο όργανο και μετά από αναμονή 1 min υπό συνεχή ανάδευση προστίθεται σε αυτή η κατάλληλη ποσότητα του αγωνιστή. Αυτό γίνεται για να μπορέσει το PRP να αποκτήσει τη θερμοκρασία του οργάνου η οποία είναι 37 °C. Έτσι προσδιορίζεται η μέγιστη συσσώρευση που επιτυγχάνεται μέσα σε 3 min μετά την προσθήκη του αγωνιστή. Σε ορισμένα πειράματα το PRP που προκύπτει μετά την αραίωση προ-επωάζεται 15min με ασπιρίνη τελικής συγκέντρωσης 0.1 mM καθώς και με τον συνδυασμό CP/CPK σε συγκεντρώσεις 4 mM και 40 U/ml αντίστοιχα 1 min πριν από την συσσώρευση που επάγεται από τον PAF (25 nM). Η % αναστολή της συσσώρευσης παρουσία της Lp(a) υπολογίζεται με βάση τον παρακάτω τύπο:

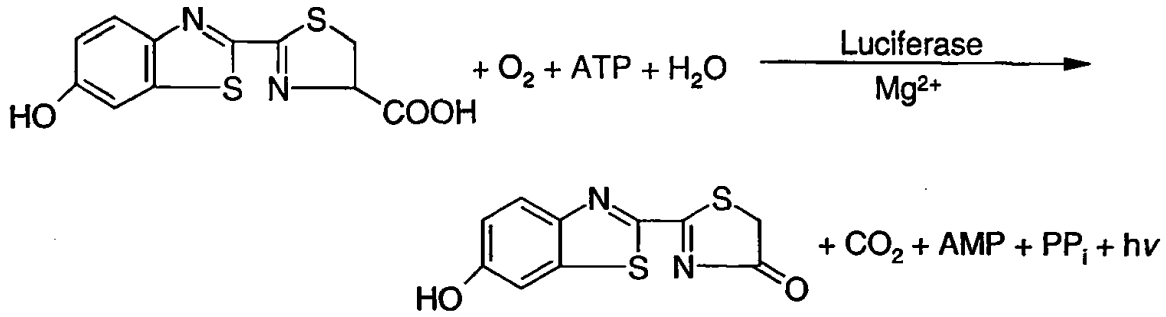
$$\% \text{ Αναστολή} = \frac{\text{Δείγμα Αναφοράς} - \text{Δείγμα παρουσία Lp(a)}}{\text{Δείγμα Lp(a)}} \times 100$$

Όλα τα πειράματα συσσωρευομετρίας ολοκληρώνονται μέσα σε 3 ώρες από την αιμοληψία.

ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΚΚΡΙΣΗΣ ΤΟΥ ATP ΤΩΝ ΑΙΜΟΠΕΤΑΛΙΩΝ ΣΕ ΠΛΑΣΜΑ ΠΛΟΥΣΙΟ ΣΕ ΑΙΜΟΠΕΤΑΛΙΑ (PRP)

Αρχή της μεθόδου

Κατά την ενεργοποίηση και συσσώρευση των αιμοπεταλίων συμβαίνει η αποκοκκίωση των α-κοκκίων και πυκνών κοκκίων. Η έκκριση του περιεχομένου των πυκνών κοκκίων, δηλαδή του ATP, του ADP, του Ca^{2+}, και της σεροτονίνης γίνεται κατά την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων. Η ποσότητα του ATP που εκκρίνεται προσδιορίζεται με την προσθήκη του Luciferin/Luciferase στο PRP (247). Η αντίδραση του Luciferin/Luciferase έχει ως εξής:



Μια ένδειξη ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων είναι η έκκριση του ATP. Παρουσία του αντιδραστηρίου αυτού, το ATP που εκκρίνεται από τα πυκνά κοκκία μετατρέπεται σε AMP και εκπέμπει χημειοφωταύγεια. Η εκπομπή της χημειοφωταύγειας από την παραπάνω αντίδραση μας δίνει πληροφορίες για την έκκριση του ATP καθώς και για την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων.

Όργανα – Διαλύματα Εργασίας

- Φυγόκεντρος πάγκου (Hermle, Z 320)
- Αιματοκυτόμετρο (Newbauer)
- Μικροσκόπιο (Olympus)
- Μετρητής συσσώρευσης αιμοπεταλίων (Aggregometer, CHRONO-LOG)
- Καταγραφικό (CHRONO-LOG)
- Γυάλινες κυψελίδες συσσώρευσης
- Ειδικά μαγνητάκια συσσώρευσης

- **Αντιπηκτικό διάλυμα κιτρικών (ACD).** Όπως περιγράφεται στην σελίδα 86.

- **Διάλυμα 1% οξαλικού αμμωνίου.** Όπως περιγράφεται στην σελίδα 86.

- **Διάλυμα 100 mg/ml BSA.** Όπως περιγράφεται στην σελίδα 82.

- **Ρυθμιστικό διάλυμα 10 mM PBS, pH 7.4.** Όπως περιγράφεται στην σελίδα 46.

- **Διαλύματα 0.5- 5 μM PAF.** Όπως περιγράφεται στην σελίδα 87.

- **Διάλυμα 5.8 mM TRAP.** Όπως περιγράφεται στην σελίδα 87.

- **Διάλυμα 1 mM διφωσφορικής αδενοσίνης (ADP).** Όπως περιγράφεται στην σελίδα 87.

- **Διάλυμα Luciferin/Luciferase (CHRONO-Lume Reagent).** Το εμπορικό αντιδραστήριο Luciferin/Luciferase περιέχει σε λυοφιλοποιημένη μορφή 0.2mg Luciferin, 22000 μονάδες d-Luciferase, θειικό μαγγάνιο, αλβουμίνη ανθρωπίνου ορού, σταθεροποιητές και ρυθμιστικό. Το αντιδραστήριο διαλυτοποιείται σε 1.25 ml αποστειρωμένο απεσταγμένο νερό και αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου για 20 min για την πλήρη διαλυτοποίηση. Το διάλυμα φυλάσσεται στους –80 °C σε κλάσματα των 250 μl.

- **Πρότυπο διάλυμα τριφωσφορικής αδενοσίνης (ATP standard, CHRONO-LOG).** Το εμπορικό αντιδραστήριο περιέχει 2 μmol λυοφιλοποιημένης τριφωσφορικής αδενοσίνης (ATP). Το ATP διαλυτοποιείται σε 5 ml αποστειρωμένο φυσιολογικό ορό. Το διάλυμα φυλάσσεται στους –80 °C σε κλάσματα των 50 μl.

Πειραματική διαδικασία

Το PRP παρασκευάζεται με το ίδιο τρόπο που αναφέρεται πιο πάνω. Στο PRP που προκύπτει μετά την αραίωση προστίθεται το Luciferin/Luciferase και η Lp(a) σε τελική συγκέντρωση (20- 80 μg πρωτεΐνης /ml). Συγκεκριμένα 350 μl PRP, 50 μl του διαλύματος του Luciferin/Luciferase καθώς και η Lp(a), ή ο αντίστοιχος όγκος του ρυθμιστικού διαλύματος της Lp(a) (PBS) ως δείγμα αναφοράς, τοποθετούνται σε ειδική γυάλινη κυψελίδα συσσώρευσης. Στην συνέχεια μετά από την μέγιστη έκκριση ATP προστίθενται 5 μl από το διάλυμα του προτύπου ATP δίνοντας συγκέντρωση 2nmole ανεξάρτητα από τον όγκο του δείγματος. Η έκκριση ATP υπολογίζεται με τον παρακάτω τύπο:

$$\text{Έκκριση ATP (nmoles)} = \frac{\text{Χημειοφωταύγεια του δείγματος}}{\text{Χημειοφωταύγεια του πρότυπου}} \times 2 \text{ nmoles}$$

Όλα τα πειράματα συσσωρευομετρίας ολοκληρώνονται μέσα σε 3 ώρες από την αιμοληψία.

ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΣΥΣΣΩΡΕΥΣΗΣ ΤΩΝ ΠΛΥΜΕΝΩΝ ΑΙΜΟΠΕΤΑΛΙΩΝ

Όργανα - Διαλύματα Εργασίας

- Φυγόκεντρος πάγκου (Hermle, Z 320)
- Αιματοκυτόμετρο (Newbauer)
- Μικροσκόπιο (Olympus)
- Μετρητής συσσώρευσης αιμοπεταλίων (Aggregometer, CHRONO-LOG)
- Καταγραφικό (CHRONO-LOG)
- Γυάλινες κυψελίδες συσσώρευσης
- Ειδικά μαγνητάκια συσσώρευσης

- **Αντιπηκτικό διάλυμα κιτρικών (ACD).** Όπως περιγράφεται στην σελίδα 86.

- **Διάλυμα απυράσης.** Το εμπορικό αντιδραστήριο περιέχει 500 units απυράσης σε λυοφιλοποιημένη μορφή τα οποία διαλυτοποιούνται σε 5 ml φυσιολογικό ορό δίνοντας διάλυμα τελικής συγκέντρωσης 100 units/ml. Το διάλυμα διατηρείται στους –80 °C σε κλάσματα των 500 μl.

- **Διάλυμα προστγλανδίνης Ε1 (PGE_1).** Το εμπορικό αντιδραστήριο περιέχει 50 mg PGE_1 σε λυοφιλοποιημένη μορφή τα οποία διαλυτοποιούνται σε 5 ml αιθανόλη δίνοντας διάλυμα συγκέντρωσης 1 mg/ml. Το διάλυμα διατηρείται στους –80 °C σε κλάσματα των 20 μl.

- **Ρυθμιστικό διάλυμα Tyrode's (pH 7.0).** Το ρυθμιστικό αυτό διάλυμα περιέχει 5.0 mM Hepes, 137 mM NaCl, 2.68 mM KCl, 11.8 mM $NaHCO_3$, 10

mM $MgCl_2.6H_2O$, 0.41 mM $NaH_2PO_4.H_2O$, 0.5 mM δεξτρόζη. 70 mM κιτρικό οξύ, 110 mM κιτρικό νάτριο και 0.25% αλβουμίνη . Το pH αρχικά είναι όξινο. Με διαλύματα 10 N και 0.5 N NaOH ρυθμίζεται στο 7.0. Το διάλυμα διατηρείται στους –20 °C σε πλαστικά φιαλίδια.

- **Ρυθμιστικό διάλυμα Tyrode's (pH 7.4).** Το ρυθμιστικό αυτό διάλυμα έχει ακριβώς την ίδια σύσταση με το Tyrode's pH 7.0 με την εξαίρεση ότι δεν περιέχει κιτρικό οξύ, κιτρικό νάτριο καθώς και αλβουμίνη. Επιπλέον το pH ρυθμίζεται στο 7.4. Διατηρείται στους 4 °C σε πλαστικά φιαλίδια.

- **Διάλυμα 100 mg/ml BSA.** Όπως περιγράφεται στην σελίδα 82.

- **Διάλυμα 130 mM $CaCl_2$ – 1 M $MgCl_2.H_2O$.** Όπως περιγράφεται στην σελίδα 86.

- **Ρυθμιστικό διάλυμα 10 mM PBS, pH 7.4.** Όπως περιγράφεται στην σελίδα 46.

- **Διάλυμα 20 mg/ml ινωδογόνου (Fg).** Το λυοφιλοποιημένο Fg παραλαμβάνεται από το εμπόριο απαλλαγμένο από τον vWF και την φιβρονεκτίνη κλεισμένο σε αεροστεγή φιαλίδια που περιέχουν 250 mg και φυλάσσεται στους 4°C. Το περιεχόμενο ενός φιαλιδίου διαλύεται σε 12.5 mL PBS (τελική συγκέντρωση 20 mg Fg/ml) και φυλάσσεται στους –80 °C.

- **Διαλύματα 0.5- 5 μM PAF.** Όπως περιγράφεται στην σελίδα 87.

- **Διάλυμα 1.9 mM ιονοφόρου A23187.** Το εμπορικό αντιδραστήριο περιέχει 1 mg A 23187 σε λυοφιλοποιημένη μορφή τα οποία διαλυτοποιούνται σε 1 ml DMSO δίνοντας διάλυμα συγκέντρωσης 1.9 mM. Το διάλυμα διατηρείται στους –80 °C σε κλάσματα των 100 μl.
- **Διάλυμα 5.8 mM TRAP.** Όπως περιγράφεται στην σελίδα 87.

Πειραματική διαδικασία

Σε σωληνάκια πολυπροπυλενίου τα οποία περιέχουν αντιπηκτικό διάλυμα ACD σε αναλογία 1:9 (v:v) καθώς και απυράση και PGE_1 σε τελικές συγκεντρώσεις 1 U/ml και 0.1 mg/ml αντίστοιχα, συλλέγονται 10.8 ml περιφερικού φλεβικού αίματος. Τα 2/3 από την επάνω επιφάνεια του PRP απομονώνεται πολύ προσεκτικά, για να αποφευχθεί η πρόσληψη ποσότητας ερυθροκυττάρων και λευκοκυττάρων, μετά από φυγοκέντρηση στα 120xg (1000 rpm) για 15 min, σε θερμοκρασία δωματίου. Το PRP στο οποίο προστίθεται απυράση και PGE_1 σε τελικές συγκεντρώσεις 1 U/ml και 0.1 mg/ml αντίστοιχα, φυγοκεντρείται στα 650xg (2000 rpm) για 10 min. Το ίζημα των αιμοπεταλίων αναδιασπείρεται δύο φορές, μέχρι τελικού όγκου 10 ml, με ρυθμιστικό διάλυμα Tyrode's pH 7.0 ($1^η$ και $2^η$ έκπλυση). Τα αιμοπετάλια στο εναιώρημα αυτό μετρούνται με το αιματοκυτόμετρο Newbauer (με τον τρόπο που περιγράφεται πιο πάνω), μετά από αραίωση 1:20 (v/v) σε διάλυμα Tyrode's 7.0. Σε όλα τα στάδια των εκπλύσεων στο εναιώρημα των αιμοπεταλίων περιέχει απυράση και PGE_1 σε τελικές συγκεντρώσεις 1 U/ml και 0.1 mg/ml αντίστοιχα. Τέλος, ακολουθεί τρίτη αναδιασπορά των αιμοπεταλίων (μετά από φυγοκέντρηση στα 650xg για 10 min) σε διάλυμα Tyrode's pH 7.4 σε τελική συγκέντρωση 360000 αιμοπετάλια/mm^3 ή 360000 αιμοπετάλια/μl.

Στο εναιώρημα (αιμοπεταλίων) που προκύπτει προστίθεται $CaCl_2$ και $MgCl_2.H_2O$ σε τελικές συγκεντρώσεις 1.3 mM και 10 mM αντίστοιχα, καθώς και η Lp(a) σε διάφορες τελικές συγκεντρώσεις (20- 80 μg πρωτεΐνης /ml). Γίνεται η ρύθμιση της κλίμακας του οργάνου χρησιμοποιώντας το διάλυμα Tyrode's pH 7.4 ως αναφορά για το 100% οπτικής διαπερατότητας ή 100% συσσώρευσης. Μετά από αυτή την κατεργασία η συσσώρευση των αιμοπεταλίων προσδιορίζεται παρουσία PAF ή A23187 ή TRAP τελικής συγκέντρωσης 50 nM ή 4.9 μM ή 20- 30 μM αντίστοιχα. Στην περίπτωση της ενεργοποίησης με PAF, προστίθεται εξωγενώς Fg σε τελική συγκέντρωση 0.5 mg/ml 30 sec πριν την προσθήκη του αγωνιστή με σκοπό την υποβοήθηση της συσσώρευσης. Συγκεκριμένα 350 μl (εναιωρήματος) αιμοπεταλίων καθώς και η Lp(a) σε διάφορες τελικές συγκεντρώσεις τοποθετούνται σε ειδική γυάλινη κυψελίδα συσσώρευσης, ή ο αντίστοιχος όγκος του ρυθμιστικού διαλύματος της Lp(a) (PBS) ως δείγμα αναφοράς. Στην συνέχεια η κυψελίδα τοποθετείται στο όργανο και μετά από αναμονή 1 min υπό συνεχή ανάδευση προστίθεται σε αυτή η κατάλληλη ποσότητα του αγωνιστή. Έτσι προσδιορίζεται η μέγιστη συσσώρευση που επιτυγχάνεται μέσα σε 3 min μετά την προσθήκη του

αγωνιστή. Όλα τα πειράματα συσσωρευομετρίας ολοκληρώνονται μέσα σε 3 ώρες από την αιμοληψία.

ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΣΥΣΣΩΡΕΥΣΗΣ ΤΩΝ ΠΛΥΜΕΝΩΝ ΑΙΜΟΠΕΤΑΛΙΩΝ ΚΑΤΑ LOTNER

Όργανα - Διαλύματα Εργασίας

- Φυγόκεντρος πάγκου (Hermle, Z 320)
- Αιματοκυτόμετρο (Newbauer)
- Μικροσκόπιο (Olympus)
- Μετρητής συσσώρευσης αιμοπεταλίων (Aggregometer, CHRONO-LOG)
- Καταγραφικό (CHRONO-LOG)
- Γυάλινες κυψελίδες συσσώρευσης
- Ειδικά μαγνητάκια συσσώρευσης

- **Αντιπηκτικό διάλυμα κιτρικών (ACD).** Όπως περιγράφεται στην σελίδα 86.

- **Ρυθμιστικό διάλυμα Tyrode's (pH 7.0).** Το ρυθμιστικό αυτό διάλυμα περιέχει 5.0 mM Hepes, 137 mM NaCl, 2.68 mM KCl, 11.8 mM $NaHCO_3$, 10 mM $MgCl_2.6H_2O$, 0.41 mM $NaH_2PO_4.H_2O$, 0.5 mM δεξτρόζη. 70 mM κιτρικό οξύ, 110 mM κιτρικό νάτριο και 0.25% αλβουμίνη . Το pH αρχικά είναι όξινο. Με διαλύματα 10 N και 0.5 N NaOH ρυθμίζεται στο 7.0. Το διάλυμα διατηρείται στους –20 °C σε πλαστικά φιαλίδια.

- **Ρυθμιστικό διάλυμα Tyrode's (pH 7.4).** Το ρυθμιστικό αυτό διάλυμα έχει ακριβώς την ίδια σύσταση με το Tyrode's pH 7.0 με την εξαίρεση ότι δεν περιέχει κιτρικό οξύ, κιτρικό νάτριο καθώς και αλβουμίνη. Επιπλέον το pH ρυθμίζεται στο 7.4. Διατηρείται στους 4 °C σε πλαστικά φιαλίδια.

- **Διάλυμα 100 mg/ml BSA.** Όπως περιγράφεται στην σελίδα 82.

- **Διάλυμα 130 mM $CaCl_2$ – 1 M $MgCl_2.H_2O$.** Όπως περιγράφεται στην σελίδα 86.

- **Ρυθμιστικό διάλυμα 10 mM PBS, pH 7.4.** Όπως περιγράφεται στην σελίδα 46.

- **Διάλυμα 20 mg/ml Fg.** Όπως περιγράφεται στην σελίδα 93.

- **Διαλύματα 0.5- 5 μM PAF.** Όπως περιγράφεται στην σελίδα 87.

- **Διάλυμα 5.8 mM TRAP.** Όπως περιγράφεται στην σελίδα 87.

Πειραματική διαδικασία

Η συγκεκριμένη παρασκευή πλυμένων αιμοπεταλίων στηρίζεται στην μέθοδο των Lotner και συν. (248) η οποία εφαρμόστηκε με μερικές τροποποιήσεις. Αφορά αιμοπετάλια τα οποία απομονώνονται παρουσία ερυθροκυττάρων και που είναι ευαίσθητα στην επίδραση του PAF (248).

Σε σωληνάκια πολυπροπυλενίου περιέχουν αντιπηκτικό διάλυμα ACD σε αναλογία 1:9 (v:v) συλλέγονται 10.8 ml περιφερικού φλεβικού αίματος. Αρχικά το αίμα φυγοκεντρείται στα 3900xg (5000 rpm) για 5 min σε θερμοκρασία δωματίου για την απομόνωση του πλάσματος, το οποίο και απομακρύνεται προσεκτικά. Το ίζημα των έμμορφων συστατικών του πλάσματος αναδιασπείρεται μέχρι τελικού όγκου 10 ml, με ρυθμιστικό διάλυμα Tyrode's pH 7.0. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στα 3900xg (5000 rpm) για 3 min σε θερμοκρασία δωματίου, απόχυση του υπερκείμενου υγρού και (δεύτερη) αναδιασπορά σε ρυθμιστικό διάλυμα Tyrode's pH 7.0. Η τρίτη αναδιασπορά (μετά από φυγοκέντρηση στα 120xg επί 10 min) γίνεται σε ρυθμιστικό διάλυμα Tyrode's pH 7.4.

Στο εναιώρημα (αιμοπεταλίων) που προκύπτει προστίθεται $CaCl_2$ και $MgCl_2.H_2O$ σε τελικές συγκεντρώσεις 1.3 mM και 10 mM αντίστοιχα, καθώς και η Lp(a) σε διάφορες τελικές συγκεντρώσεις (20- 80 μg πρωτεΐνης /ml). Γίνεται η ρύθμιση της κλίμακας του οργάνου χρησιμοποιώντας το διάλυμα Tyrode's pH 7.4 ως αναφορά για το 100% οπτικής διαπερατότητας ή 100% συσσώρευσης. Μετά από αυτή την κατεργασία η συσσώρευση των αιμοπεταλίων προσδιορίζεται παρουσία PAF ή TRAP τελικής συγκέντρωσης 5- 10 nM ή 20 μM αντίστοιχα. Στην περίπτωση

της ενεργοποίησης με PAF, προστίθεται εξωγενώς Fg σε τελική συγκέντρωση 0.5 mg/ml 30 sec πριν την προσθήκη του αγωνιστή με σκοπό την υποβοήθηση της συσσώρευσης. Συγκεκριμένα 350 μl (εναιωρήματος) αιμοπεταλίων καθώς και η Lp(a) σε διάφορες τελικές συγκεντρώσεις τοποθετούνται σε ειδική γυάλινη κυψελίδα συσσώρευσης, ή ο αντίστοιχος όγκος του ρυθμιστικού διαλύματος της Lp(a) (PBS) ως δείγμα αναφοράς. Στην συνέχεια η κυψελίδα τοποθετείται στο όργανο και μετά από αναμονή 1 min υπό συνεχή ανάδευση προστίθεται σε αυτή η κατάλληλη ποσότητα του αγωνιστή. Έτσι προσδιορίζεται η μέγιστη συσσώρευση που επιτυγχάνεται μέσα σε 3 min μετά την προσθήκη του αγωνιστή. Όλα τα πειράματα συσσωρευομετρίας ολοκληρώνονται μέσα σε 3 ώρες από την αιμοληψία.

ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΠΡΟΣΔΕΣΗΣ (BINDING) ΤΟΥ ΕΠΙΣΗΜΑΣΜΕΝΟΥ ΜΕ FITC ΙΝΩΔΟΓΟΝΟΥ ΣΤΟΝ ΥΠΟΔΟΧΕΑ $\alpha_{IIb}\beta_3$ ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑΣ ΡΟΗΣ (FLOW CYTOMETRY)

Όργανα – Αντιδραστήρια

- CD61-PerCP
- CD41a-FITC
- PAC-1-FITC
- Arg-Gly-Asp-Ser (RGDS) [MB: 433.4 g/mol]
- Ινωδογόνο (Fg)
- FITC, isomer on celite 10%
- Σωληνάκια πολυστηρενίου των 5 ml (12×75 mm)
- Cell Quest πρόγραμμα (Becton Dickinson)
- Μικροφυγόκεντρος eppendorf
- Κυτταρόμετρο ροής FACScalibur (Flow Cytometer, Becton Dickinson)

Διαλύματα εργασίας

- **Αντιπηκτικό διάλυμα κιτρικών (ACD):** Όπως περιγράφεται στην σελίδα 86.
- **Διάλυμα 1% οξαλικού αμμωνίου:** Όπως περιγράφεται στην σελίδα 86.

- **Διάλυμα διφωσφορικής αδενοσίνης (ADP):** Όπως περιγράφεται στην σελίδα 86.
- **Ρυθμιστικό διάλυμα 10 mM PBS (pH=7.4).** Όπως περιγράφεται στην σελίδα 46.
- **Διάλυμα 5% Na_2CO_3.** 5 g Na_2CO_3 διαλυτοποιείται σε 100 ml H_2O. Το διάλυμα διατηρείται στους 4 °C.

Επισήμανση Ινωδογόνου (Fg) με FITC:

Η επισήμανση του Fg με FITC έγινε σύμφωνα με την μεθόδου που περιγράφει ο Xia και συν. (249). Το λυοφιλοποιημένο Fg παραλαμβάνεται από το εμπόριο απαλλαγμένο από τον vWF και την φιβρονεκτίνη κλεισμένο σε αεροστεγή φιαλίδια που περιέχουν 250 mg και φυλάσσεται στους 4°C. Το περιεχόμενο ενός φιαλιδίου διαλύεται σε 12.5 mL PBS (τελική συγκέντρωση 20 mg Fg/ml) και φυλάσσεται στους –80 °C.

Η επισήμανση του Fg γίνεται ως εξής: αρχικά ρυθμίζεται το pH του ρυθμιστικού διαλύματος PBS με διάλυμα 5% Na_2CO_3 στο 8.5 (Ρυθμιστικό PBS-Na_2CO_3). Επίσης προστίθεται ορισμένη ποσότητα celite-FITC στο διάλυμα PBS-Na_2CO_3 υπό ισχυρή ανάδευση. Η συγκέντρωση του celite-FITC δεν πρέπει να ξεπερνά τα 5mg/ml. Προσθέτουμε σε eppendorf 150 μl ξεπαγωμένου Fg (3mg/150μl), εναιωρούμε celite-FITC που περιέχει 1.5 mg celite-FITC (300 μl) και ο όγκος συμπληρώνεται μέχρι το 1.5 ml με PBS-Na_2CO_3. Τα eppendorf επωάζονται σε θερμοκρασία δωματίου για 60min υπό περιοδική ανάδευση στο σκοτάδι. Ακολουθεί μια φυγοκέντρηση στα 10000×g (σε μικροφυγόκεντρο eppendorf) για 5min, και στη συνεχεία το υπερκείμενο υποβάλλεται σε διαπίδυση. Η διαπίδυση γίνεται έναντι 2 l PBS 10 mM pH 7.4 με αλλαγή στης 12 h για 24 h στους 4 °C. Μετά από την διαπίδυση γίνεται μια φυγοκέντρηση στα 10000×g (σε μικροφυγόκεντρο eppendorf) για 5min και το υπερκείμενο φωτομετρείται σε κυψελίδες με διαδρομή φωτός 1 cm στα 280 nm και στα 495 nm.

Το Fg επισημασμένο ή μη επισημασμένο με FITC φυλάσσεται σε κλάσματα των 1.5 ml στους –80 °C. Πριν την χρήση του ξεπαγώνεται σε θερμοκρασία δωματίου, φυγοκεντρείται στα 10000×g για 5 min (σε μικροφυγόκεντρο eppendorf)

και χρησιμοποιείται την ίδια μέρα. Ο ποσοτικός προσδιορισμός της πρωτεΐνης γίνεται στο υπερκείμενο μετά το ξεπάγωμα και τη φυγοκέντρηση.

Υπολογισμοί:

Η συγκέντρωση του Fg-FITC ισούται με:

- **[Fg-FITC]=(A^{280}-βA^{495})/εFg^{280}**
  όπου A^{280}, A^{495} οι αντίστοιχες απορροφήσεις στους 280 nm και 495 nm, β=0.286 και $\varepsilon Fg^{280}=5.44\times10^5\ M^{-1}cm^{-1}$.
  Οι συγκεντρώσεις από κάθε φθοριμένο Fg-FITC κυμαίνονται από 2-5μM.

- **F:P=9.8A^{495}/A^{280}-βA^{495}** είναι η σχέση φθορισμού προς πρωτεΐνη και για να είναι αποδεκτή πρέπει να είναι κυμαίνεται απο 5-6.

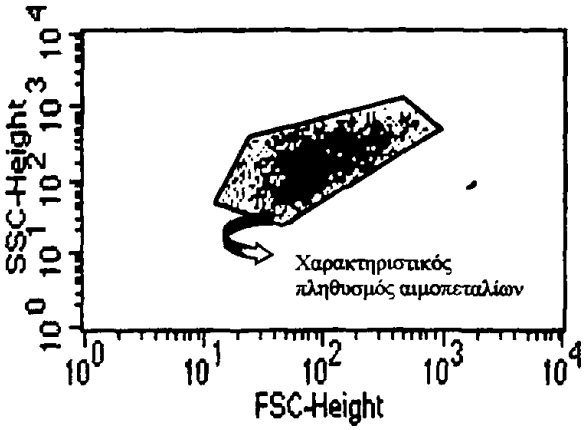
- **Ρυθμιστικό διάλυμα αλβουμίνης (Walsh-albumin buffer) [pH=7.4].** Το ρυθμιστικό διάλυμα αλβουμίνης περιέχει 140 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 0.4 mM Na_2CO_3, 2mM $MgCl_2.6H_2O$, 0.1% γλυκόζη και 0.1% αλβουμίνη. Το pH ρυθμίζεται στο 7.4. Το διάλυμα διατηρείται στους 4°C.

- **Διάλυμα Arg-Gly-Asp-Ser (RGDS).** Το RGDS παραλαμβάνεται από το εμπόριο κλεισμένο σε αεροστεγές φιαλίδιο που περιέχει 5 mg πεπτιδίου και φυλάσσεται στους –20 °C. Το RGDS διαλυτοποιείται σε 500 μl PBS (10 mM, pH=7.4) με τελική συγκέντρωση 23.07 mM. Το διάλυμα διατηρείται στους –20 °C σε κλάσματα των 50 μl.

Αρχή της μεθόδου

Το κυτταρόμετρο ροής έχει ως πηγή φωτός μια ακτίνα laser Αργού, η οποία παράγει φως ισχύος 15 mW και μήκος κύματος 488 nm. Η ακτίνα του laser προμηθεύει μια περιοχή φωτός αρκετά μεγάλη για τα περισσότερα είδη κυττάρων ώστε να υπάρχει πλήρης φωτισμός εντός της ακτίνας και να δίνει μια ομοιόμορφη διέγερση όλων των κύτταρων τα οποία περιέχονται στο δείγμα. Η εστιασμένη ακτίνα laser αλληλεπιδρά με τα φθορίζοντα αντισώματα με τα οποία έχει επισημανθεί ένα

κύτταρο, με αποτέλεσμα να δημιουργούνται ταυτόχρονα σκεδασμένο φως καθώς και σήματα φθορισμού. Με τα κατάλληλα φθοριστικά αντισώματα έχουμε την δυνατότητα να μελετήσουμε διάφορα κύτταρα και την αλληλεπίδρασή τους με τα αντισώματα αυτά. Στο κυτταρόμετρο τα κύτταρα διαχωρίζονται με βάση το μέγεθος και την κοκκίωση τους. Επίσης, το καθένα από τα αντισώματα έχουν επισημανθεί με μια φθορίζουσα ουσία η οποία εκπέμπει σε ένα χαρακτηριστικό μήκος κύματος (FITC= 530nm/30, PE= 585nm/42, και PerCP= 650 nm). Όμως, όλες η φθορίζουσες ουσίες με της οποίες ειναι επισημασμένα, τα αντισώματα που χρησιμοποιούνται στη κυτταρομετρία διεγείρονται στο ίδιο μήκος κύματος 488 nM. Το σήμα της πρόσθιας σκέδασης (FSC, Forward Scatter) συλλέγεται με την δίοδο της πρόσθιας σκέδασης. Η πλάγια σκέδαση (SSC, Side Scatter) αλλά και οι παράμετροι του φθορισμού συλλέγονται από καθρέπτες που βρίσκονται 90° από την ακτίνα του laser. Μια αντιπροσωπευτική εικόνα του πληθυσμού των αιμοπεταλίων με βάση το μέγεθος, δηλαδή FSC, και την κοκκίωση τους ή SSC, όπως αυτή λαμβάνεται από το κυτταρόμετρο, φαίνεται στην εικόνα 7.



Εικόνα 7. Αντιπροσωπευτική εικόνα πληθυσμού αιμοπεταλίων με βάση το FSC και την SSC σε κυταρρόμετρο ροής.

Πειραματική διαδικασία

Αρχικά συλλέγονται 10.8 ml περιφερικού φλεβικού αίματος, το οποίο δεν περιέχει Lp(a), σε σωληνάκια πολυπροπυλενίου τα οποία περιέχουν αντιπηκτικό διάλυμα ACD σε αναλογία 1:9 (v:v). Ακολουθεί μία φυγοκέντρηση στις 1000 rpm (120xg) για 15 min σε θερμοκρασία δωματίου όπου και απομονώνονται 3 ml PRP.

Συγκεκριμένα το PRP αραιώνεται 1:10 με ρυθμιστικό διάλυμα αλβουμίνης (PRP/W-A) ανεξάρτητα από την συγκέντρωση των αιμοπεταλίων (που συνήθως κυμαίνεται μεταξύ 250000 αιμοπετάλια/μl – 450000 αιμοπετάλια/μl). Όποτε σε 350 μl PRP/W-A, προσθέτουμε: την Lp(a) σε τελική συγκέντρωση (40 και 80 μg πρωτεΐνης/ml) ή τον αντίστοιχο όγκο του ρυθμιστικού διαλύματος της Lp(a) (PBS) ως δείγμα αναφοράς, ή το πεπτίδιο RGDS (τελική συγκέντρωση, 1 mM) και σε όλα τα δείγματα το Fg που έχουμε προηγουμένως φθορίσει με FITC (τελική συγκέντρωση, 500 nM). Σε όλα τα δείγματα προσθέτονται 5 μl από το CD61-PerCP (τελική συγκέντρωση, 0.03 μg/ml) που είναι ένα εξειδικευμένο αντίσωμα κατά της β_3 υπομονάδας. Στη συνέχεια το παραπάνω εναιώρημα των αιμοπεταλίων ενεργοποιείται με ADP (τελική συγκέντρωση, 100 μM) για 60 min σε θερμοκρασία 25 °C στο σκοτάδι, χωρίς ανάδευση. Από τα δείγματα αυτά υπολογίζεται η ολική πρόσδεση του Fg (Total binding, $TB_{Fg\text{-}FITC}$). Παράλληλα έχουμε και ένα αντίστοιχο εναιώρημα αιμοπεταλίων το οποίο ετοιμάζεται κάτω από της ίδιες συνθήκες χωρίς την προσθήκη ADP. Από αυτά τα δείγματα προσδιορίσουμε την μη ειδική πρόσδεση του Fg (Non-specific binding, $NB_{Fg\text{-}FITC}$). Η διαφορά της μη ειδικής πρόσδεσης από την ολική μας δίνει την ειδική πρόσδεση του Fg (specific-binding, $SB_{Fg\text{-}FITC}$). Η ειδική πρόσδεση του Fg υπολογίζεται με βάση τον παρακάτω τύπο:

$$SB_{Fg\text{-}FITC} = TB_{Fg\text{-}FITC} - NB_{Fg\text{-}FITC}$$

Με αυτό τον τρόπο προσδιορίζεται η αναστολή που μας δίνει η Lp(a) ή το πεπτίδιο RGDS, ως προς την πρόσδεση του Fg στον υποδοχέα $\alpha_{IIb}\beta_3$, μετά από την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων με ADP (250). Μετά την ενεργοποίηση ακολουθεί η κυτταρομετρία. Η απορρόφηση του δείγματος γίνεται με χαμηλή ροή (12 μl ± 3 μl/min) χωρίς καμία άλλη επεξεργασία στο δείγμα και μετά ακολουθεί ανάλυση από τον υπολογιστή.

Για να διερευνηθεί περαιτέρω ο ρόλος του υποδοχέα $\alpha_{IIb}\beta_3$ στην αλληλεπίδραση της Lp(a) με τα αιμοπετάλια, μελετήθηκε η δράση της λιποπρωτεΐνης αυτής στην πρόσδεση του PAC-1 σ'αυτόν. Το PAC-1 είναι ένα εξειδικευμένο μονοκλωνικό αντίσωμα το οποίο συνδέεται μόνο στον ενεργοποιημένο υποδοχέα $\alpha_{IIb}\beta_3$ ενώ δεν αναγνωρίζει τη μη ενεργοποιημένη του μορφή. Η πειραματική πορεία έχει ως εξής: προετοιμάζουμε ειδικά σωληνάκια της Becton Dickinson με 5 μl από τα κατάλληλα αντισώματα (CD61-PerCP σε τελική συγκέντρωση 0.03 μg/ml και PAC-1-FITC σε

τελική συγκέντρωση 0.025 μg/ml). Μετά προσθέτουμε 35 μl PRP ή πλυμένων αιμοπεταλίων (που παρασκευάστηκαν και με τους δύο τρόπους, όπως περιγράφονται πιο πάνω), την Lp(a) σε διάφορες τελικές συγκεντρώσεις, ή τον αντίστοιχο όγκο του ρυθμιστικού διαλύματος της Lp(a) (PBS) ως δείγμα αναφοράς. Ακολουθεί επώαση για 1 min σε θερμοκρασία 25 °C. Τα αιμοπετάλια στην συνέχεια ενεργοποιούνται με PAF (80 nM) ή TRAP (50-100 μM) για 5 min στους 37 °C ενώ μετά ακολουθεί αραίωση αυτών 1:10 με ρυθμιστικό διάλυμα 10 mM PBS, pH=7.4. Η ανάλυση στο κυτταρόμετρο γίνεται με την ίδια διαδικασία όπως περιγράφεται πιο πάνω.

ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Οι τιμές εκφράστηκαν ως μέση τιμή (± τυπική απόκλιση) εκτός από τα επίπεδα Lp(a) πλάσματος τα οποία εκφράστηκαν ως διάμεση τιμή (εύρος). Η σύγκριση μεταξύ των αρχικών τιμών και των τιμών μετά τη θεραπεία έγινε χρησιμοποιώντας το Student's *t* test, ενώ η στατιστική ανάλυση των τιμών στις επιμέρους ομάδες των ατόμων της μελέτης έγινε με τη βοήθεια του ANOVA test το οποίο ακολουθήθηκε από επεξεργασία με LSD test. Για μεταβλητές με μή κανονική κατανομή (επίπεδα Lp(a) πλάσματος) η στατιστική ανάλυση έγινε με το Wilcoxon test. Τέλος, η σύγκριση των παραμέτρων διαφορετικών πληθυσμών έγινε με τη βοήθεια των Kruscall Wallis και Mann Whitney test. Σε κάθε περίπτωση το επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας θεωρήθηκε ως $p < 0.05$.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΤΕΤΑΡΤΟ

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑ PAF-AH ΣΤΗΝ Lp(a) ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ΣΤΕΦΑΝΙΑΙΑ ΝΟΣΟ

Χαρακτηριστικά του πληθυσμού της μελέτης

Όλα τα άτομα που πήραν μέρος στην παρούσα μελέτη προέρχονται από προηγούμενη μελέτη μας (251) στην οποία πήραν μέρος ασθενείς με ιστορικό στεφανιαίας νόσου (n=131) και υγιείς μάρτυρες (n=33) στους οποίους έγινε προσδιορισμός των επιπέδων της Lp(a) αλλά και του ισομορφικού μεγέθους της apo(a). Το κριτήριο για την επιλογή των ατόμων που πήραν μέρος στην παρούσα μελέτη ήταν η συγκέντρωση πλάσματος Lp(a) να είναι ≥20mg/dl. Ο καθορισμός της συγκέντρωσης αυτής έγινε με δεδομένο ότι μόνο με τέτοια ή μεγαλύτερη συγκέντρωση Lp(a) πλάσματος είναι δυνατή η απομόνωση ικανής ποσότητας Lp(a) για τον προσδιορισμό της ενεργότητας της PAF-AH. Τον πληθυσμό της μελέτης αποτέλεσαν 20 στεφανιαίοι ασθενείς, 14 άνδρες και 6 γυναίκες, ηλικίας 50 έως 70 έτη. Μεταξύ αυτών, 8 παρουσίαζαν χρόνια σταθερή στηθάγχη, 6 ιστορικό οξέος εμφράγματος του μυοκαρδίου και 6 ιστορικό ασταθούς στηθάγχης. Επίσης στην μελέτη πήραν μέρος 25 υγιείς μάρτυρες, 18 άνδρες και 7 γυναίκες ηλικίας 51 έως 70 έτη. Επειδή όλοι οι στεφανιαίοι ασθενείς ελάμβαναν υπολιπιδαιμική θεραπεία (ατορβαστατίνη) στην μελέτη πήραν μέρος και 11 ασθενείς με δυσλιπιδαιμία τύπου IIA, 7 άνδρες και 4 γυναίκες ηλικίας 45 έως 62 έτη για να εξετασθεί η πιθανή δράση αυτού του φαρμάκου στις λιπιδαιμικές παραμέτρους καθώς και στην ενεργότητα της PAF-AH στον πληθυσμό της μελέτης. Τα κλινικά και βιοχημικά χαρακτηριστικά του πληθυσμού της μελέτης φαίνονται στον πίνακα 3. Δεν παρουσιάστηκαν διαφορές μεταξύ των ομάδων της μελέτης όσο αφορά τα επίπεδα Lp(a) πλάσματος αλλά και το ισομορφικό μέγεθος της apo(a). Οι ασθενείς με δυσλιπιδαιμία τύπου IIA παρουσίασαν πριν τη θεραπεία σημαντικά μεγαλύτερες τιμές ολικής και LDL-χοληστερόλης καθώς και ενεργότητας PAF-AH πλάσματος σε σύγκριση είτε με τους μάρτυρες ή τους στεφανιαίους ασθενείς. Αντίθετα, δεν παρατηρήθηκαν διαφορές στις πιο πάνω παραμέτρους μεταξύ στεφανιαίων ασθενών και μαρτύρων, φαινόμενο το

οποίο πιθανά να οφείλεται στο γεγονός όλοι οι στεφανιαίοι ασθενείς ελάμβαναν υπολιπιδαιμική θεραπεία. Επιπρόσθετα, η θεραπεία με ατορβαστατίνη μείωσε σημαντικά τα επίπεδα της ολικής και LDL-χοληστερόλης καθώς την ενεργότητα της PAF-AH πλάσματος στους υπερχοληστερολαιμικούς ασθενείς (πίνακας 3).

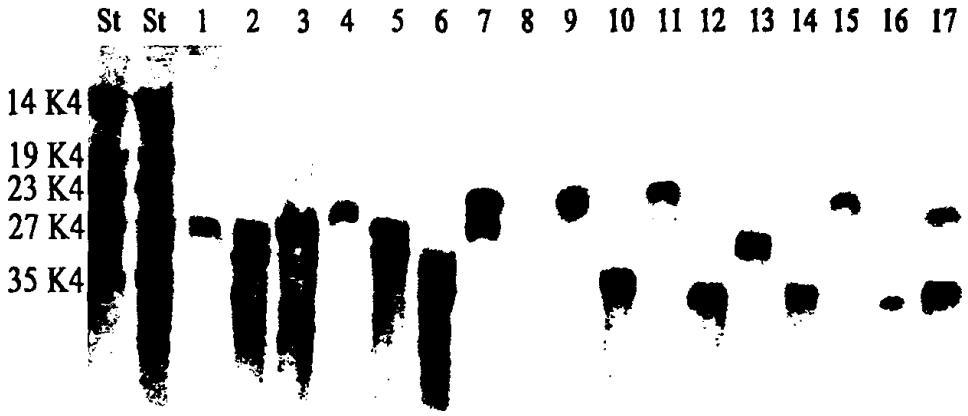
Πίνακας 3. Βιοχημικά και κλινικά χαρακτηριστικά του πληθυσμού της μελέτης

Παράμετρος	Μάρτυρες (n=25)	Στεφανιαίοι (n=20)	Υπερχοληστερολαιμικοί ασθενείς (n=11)	
			Πριν τη θεραπεία	Μετά τη θεραπεία
Φύλο (άνδρες/γυναίκες)	18/7	14/6	7/4	
Ηλικία, έτη (εύρος)	60.5 ±9.1 (51-70)	60.7±9.2 (50-77)	58.8±8.0 (45-62)	
Ιστορικό ΣΣ/ΟΕΜ/ΑΣ[a] (*n*)	-	8/6/6	-	
Δείκτης μάζας σώματος (Kg/m^2)	26.8±3.7	27.1±3.5	26.5±3.6	
Υπέρταση (*n*)	8	7	4	
Καπνιστές (*n*)	10	7	4	
Τριγλυκερίδια (mg/dl)	120±25	125±30	122±16	112±17
Ολική χοληστερόλη (mg/dl)	195±30	210±47	318±45*	220±43**
LDL- χοληστερόλη (mg/dl)	130±29	145±40	211±33*	132±37**
HDL- χοληστερόλη (mg/dl)	47.2±5.1	46.3±4.0	50.1±7.1	48.4±8.4
Lp(a) διάμεση τιμή (mg/dl) (εύρος)	33 (20.0-54.0)	38 (23.0-54.0)	30 (20.0-67.0)	37 (20.0-67.0)
Apo(a) διάμεση τιμή (επαναλήψεις K4)	25	26	28	
ΧΜΒ/ΥΜΒ[b] ισομορφές (*n*) (%)	16/9 (64/36)	12/8 (60/40)	6/5 (55/45)	
Ενεργότητα PAF-AH πλάσματος (nmol/ml πλάσματος/min)	50.8±11.1	64.6±10.7	80.2±15.5*	56.7±9.3**

Οι τιμές εκφράζονται ως αριθμός (*n*) ή σαν μέση τιμή ± τυπική απόκλιση εκτός από την Lp(a) που εκφράζεται σαν διάμεση τιμή (εύρος).
[a]ΣΣ: σταθερή στηθάγχη, ΟΕΜ: οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου, ΑΣ: ασταθή στηθάγχη.
[b]ΧΜΒ: χαμηλού μοριακού βάρους ισομορφή, ΥΜΒ: υψηλού μοριακού βάρους ισομορφή.
*$p<0.01$, σε σύγκριση είτε με τους μάρτυρες ή τους στεφανιαίους ασθενείς.
**$p<0.02$, σε σύγκριση με τις τιμές πριν την θεραπεία.

Συγκεντρώσεις Lp(a) πλάσματος και ισομορφές apo(a)

Ο προσδιορισμός των επιπέδων της Lp(a) έγινε με την μέθοδο ELISA τύπου σάντουϊτς, ενώ αυτός των ισομορφών της apo(a) με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα 1.5% SDS-αγαρόζης ακολουθούμενη από ανοσοαποτύπωση και χημειοφωταύγεια όπως περιγράφεται στην μεθοδολογία. Η ανάγνωση των ισομορφών έγινε με βάση γνωστό πρότυπο ισομορφών 14, 19, 23, 27 και 35 K4, (εικόνα 8).

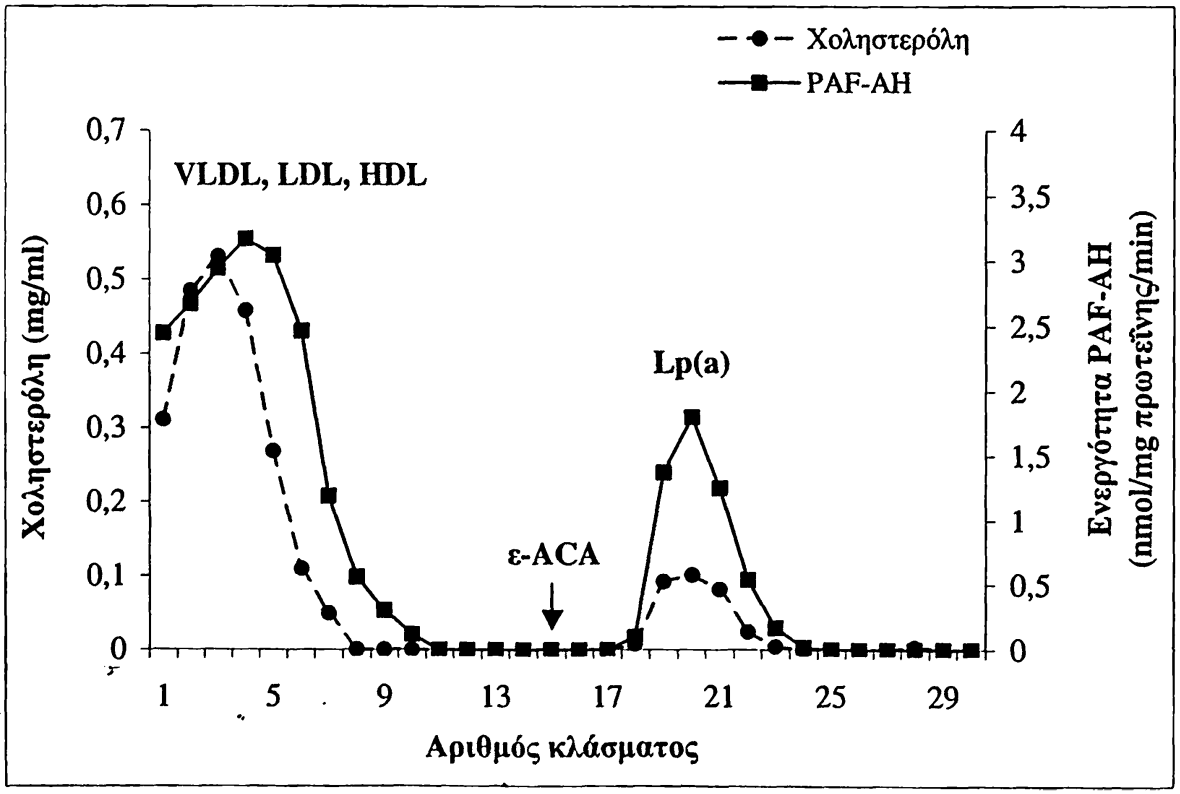


Εικόνα 8. *Ισομορφές της apo(a) μετά από ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα 1.5% SDS-αγαρόζης η οποία ακολουθείται από ανοσοαποτύπωση και χημειοφωταύγεια. Στις δύο πρώτες θέσεις φαίνονται τα πρότυπα των ισομορφών (st) της apo(a). Οι θέσεις 1-17 αντιπροσωπεύουν διαφορετικές ισομορφές της apo(a).*

Το ισομορφικό μέγεθος της apo(a) που προσδιορίστηκε σε όλα τα άτομα της μελέτης κυμαίνονταν από 13 έως 40 επαναλήψεις K4. Δεν παρατηρήθηκαν διαφορές στα επίπεδα Lp(a) πλάσματος μεταξύ των τριών ομάδων της μελέτης. Παράλληλα δεν παρουσιάστηκε διαφορά στη διάμεση τιμή του ισομορφικού μεγέθους της apo(a) καθώς και στο ποσοστό των ατόμων με χαμηλού μοριακού βάρους ισομορφές ή στο ποσοστό των ατόμων με υψηλού μοριακού βάρους ισομορφές της apo(a) μεταξύ των τριών ομάδων της μελέτης. Επιπλέον η θεραπεία με ατροβαστατίνη δεν επηρέασε τα επίπεδα Lp(a) πλάσματος στους υπερχοληστερολαιμικούς ασθενείς (πίνακας 3).

Απομόνωση της Lp(a)

Όλα τα άτομα από τα οποία έγινε απομόνωση της Lp(a), είχαν επίπεδα Lp(a) πλάσματος ≥20mg/dl. Ο καθορισμός της συγκέντρωσης αυτής έγινε με δεδομένο ότι μόνο με τέτοια ή μεγαλύτερη συγκέντρωση Lp(a) πλάσματος είναι δυνατή η απομόνωση ικανής ποσότητας Lp(a) για τον προσδιορισμό της ενεργότητας της PAF-AH. Η Lp(a) απομονώθηκε με χρωματογραφία συγγενείας σε στήλη Lysine-Sepharose 4B όπως περιγράφεται στην μεθοδολογία. Στα κλάσματα που ελήφθησαν από την στήλη έγινε προσδιορισμός του περιεχομένου τους σε χοληστερόλη και ενεργότητας PAF-AH. Η μέθοδος επιτρέπει τον εκλεκτικό διαχωρισμό της Lp(a) από τις υπόλοιπες λιποπρωτεΐνες και παράλληλα δεν επηρεάζει την PAF-AH, η οποία συνεκλούεται δεσμευμένη πάνω στο σωματίδιο της Lp(a) στα κλάσματα 19-22 (εικόνα 9).



Εικόνα 9. Αντιπροσωπευτικό προφίλ έκλουσης Lp(a) από τη στήλη χρωματογραφίας συγγενείας Lysine Sepharose 4B.

Απομόνωση της LDL

Με δεδομένο ότι το σωματίδιο της LDL είναι ο κύριος φορέας της PAF-AH στο πλάσμα, έγινε απομόνωση της LDL από τα ίδια άτομα από τα οποία έγινε και η απομόνωση της Lp(a), με σκοπό την μελέτη της ενεργότητας της PAF-AH. Η LDL απομονώθηκε από το αρχικό έκπλυμα της στήλης συγγενείας [το οποίο δεν περιέχει Lp(a)] με δύο διαδοχικές υπερφυγοκεντρήσεις σε πυκνότητες KBr 1.019 g/ml και 1.063 g/ml όπως περιγράφεται στην μεθοδολογία.

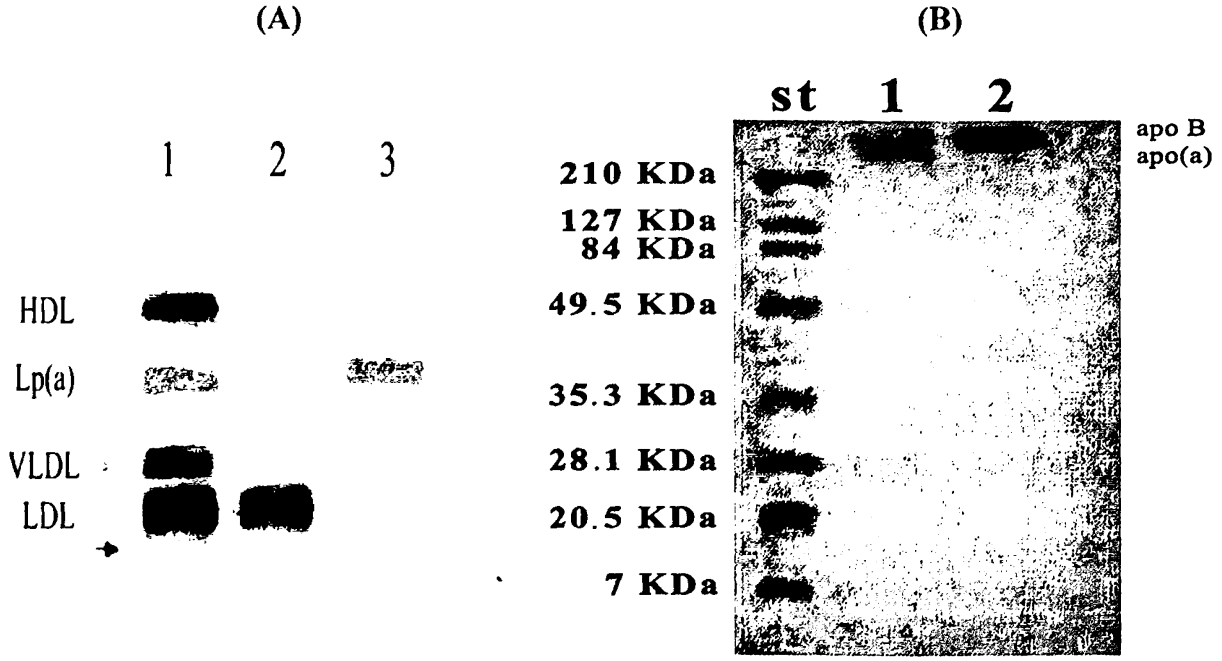
Ταυτοποίηση Lp(a) και LDL

Ο χαρακτηρισμός των απομονωμένων σωματιδίων της Lp(a) και της LDL έγινε με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης (εικόνα 10A) και ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου 5-19% κάτω από αποδιατακτικές συνθήκες (SDS-PAGE 5-19%) (εικόνα 10B). Όπως χαρακτηριστικά φαίνεται στην εικόνα 10B στην Lp(a) παρουσιάζονται δύο ζώνες οι οποίες αντιστοιχούν στις δύο πρωτεΐνες apo(a) και apoB-100 ενώ στην LDL μία ζώνη η οποία αντιστοιχεί στην μοναδική πρωτεΐνη της λιποπρωτεΐνης αυτής apoB-100. Η απουσία επιπλέον ζωνών τόσο στην ηλεκτροφόρηση αγαρόζης όσο και στην ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου δηλώνει ότι οι παρασκευές των λιποπρωτεϊνικών σωματιδίων ήταν απαλλαγμένες προσμίξεων. Επίσης, έγινε προσδιορισμός της χημικής τους σύστασης ο οποίος ήταν σύμφωνος με την διεθνή βιβλιογραφία (πίνακας 4). Επιπλέον, δεν παρουσιάστηκαν διαφορές στην χημική σύσταση τόσο της Lp(a) όσο και της LDL μεταξύ των ομάδων της μελέτης.

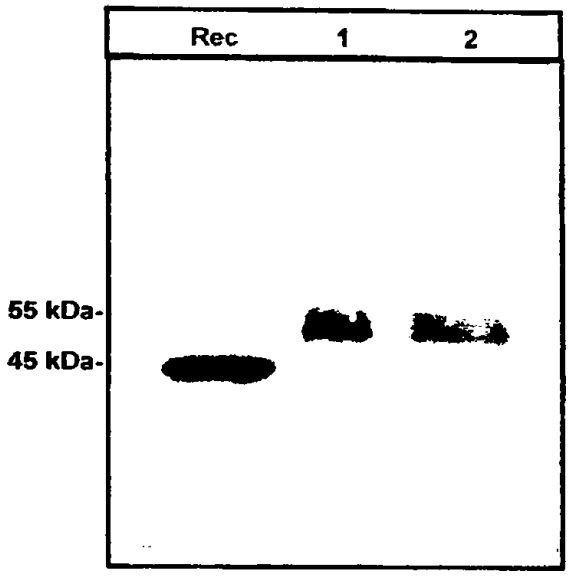
Πίνακας 4. *Χημική σύσταση της Lp(a). Το κάθε συστατικό είναι εκφρασμένο ως % ποσοστό της λιποπρωτεϊνικής μάζας. Οι τιμές εκπροσωπούν την μέση τιμή ± τυπική απόκλιση από 5 παρασκευές Lp(a).*

Σύσταση	Lp(a)	LDL
Πρωτεΐνη	31.2 ± 2.1	22.1 ± 1.6
Ολική χοληστερόλη	38.7 ± 3.8	49.5 ± 3.0
Τριγλυκερίδια	7.8 ± 1.5	7.0 ±0.6
Φωσφολιπίδια	22.3 ± 2.3	21.4 ± 1.0

Τόσο στις παρασκευές της Lp(a) όσο και σε αυτές της LDL δεν παρατηρήθηκε οξειδωτική τροποποίηση γεγονός που διαπιστώθηκε με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης (εικόνα 10A) αλλά και με προσδιορισμό των TBARS (0.7±0.3 nmol MDA/mg πρωτεΐνης για την Lp(a) και 0.8±0.2 για την LDL). Όπως έχει ήδη αναφερθεί, το σωματίδιο της Lp(a) είναι εμπλουτισμένο σε ενεργότητα PAF-AH. Επίσης η PAF-AH της Lp(a) έχει όμοιες φυσικοχημικές και καταλυτικές ιδιότητες με αυτές του ενζύμου της LDL (235). Προκειμένου να γίνει περαιτέρω προσδιορισμός της (πρωτεϊνικής) φύσης του ενζύμου που βρίσκεται στην Lp(a), υποβάλλαμε το σωματίδιο της Lp(a) (τόσο φυσιολογικών όσο και στεφανιαίων ασθενών) αλλά και της LDL σε ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE 5-19% χρησιμοποιώντας ως θετικό μάρτυρα ανασυνδιασμένη PAF-AH (rec PAF-AH). Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης έγινε ανοσοαποτύπωση με αντίσωμα κατά της PAF-AH της LDL. Όπως φαίνεται στην εικόνα 11 τόσο στην Lp(a) όσο και στην LDL εμφανίζεται μια ζώνη η οποία αντιστοιχεί στο ίδιο MB (55 kDa) το οποίο είναι μεγαλύτερο αυτού της rec PAF-AH λόγω της γλυκοζυλίωσης που υφίσταται το ένζυμο. Αυτό αποτελεί ένδειξη ότι η LDL και η Lp(a) μεταφέρουν το ίδιο ένζυμο με τον ίδιο βαθμό γλυκοζυλίωσης, συνεπώς η πηγή του ενζύμου και για τα δύο λιποπρωτεϊνικά σωματίδια είναι η ίδια, πιθανώς τα μακροφάγα (252).



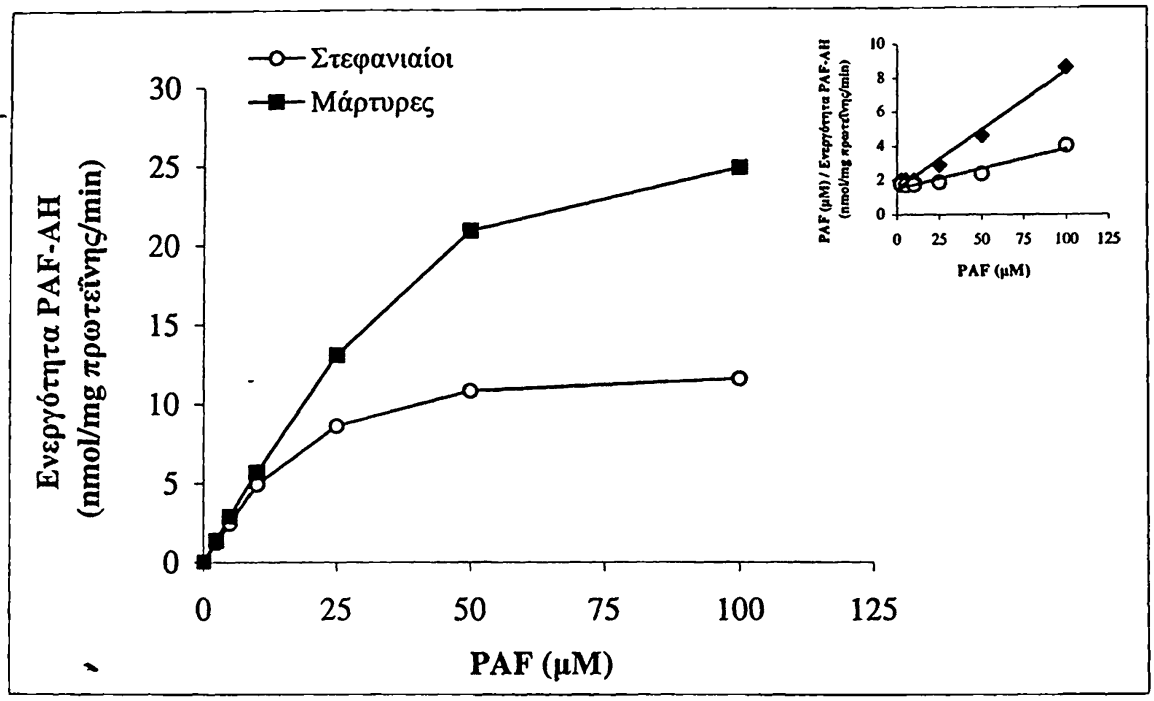
Εικόνα 10. (A): *Ηλεκτροφόρηση αγαρόζης. Θέση 1: πλάσμα το οποίο περιέχει Lp(a), Θέσεις 2 και 3: χαρακτηριστικές ζώνες των LDL και Lp(a) αντίστοιχα, μετά από απομόνωση και καθαρισμό τους.* ***(B):*** *Ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE 5-19% η οποία ακολουθείται από χρώση με νιτρικό άργυρο. Στην πρώτη θέση βρίσκονται τα πρότυπα μοριακά βάρη, στην θέση 1 η Lp(a) και στην θέση 2 η LDL.*



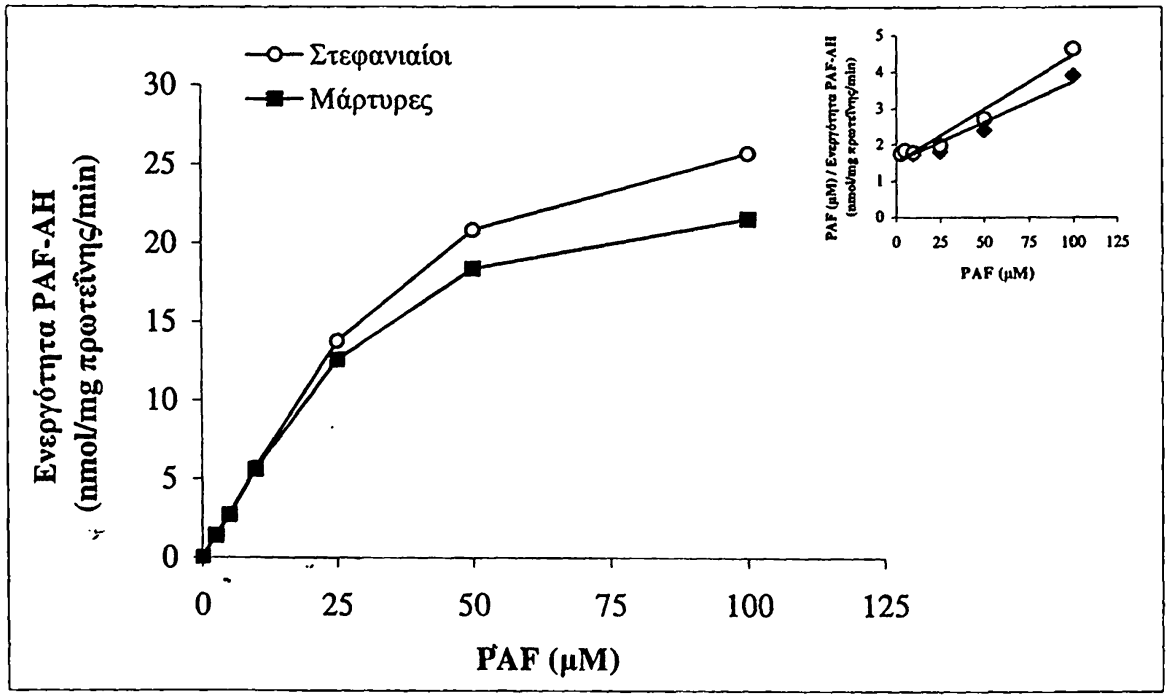
Εικόνα 11. *Ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE 5-19% της PAF-AH μετά από ανοσοαποτύπωση και χημειοφωταύγεια. Στην θέση 1 είναι PAF-AH της LDL από μάρτυρες, ενώ στην θέση 2 PAF-AH της Lp(a) από τα ίδια άτομα.*

Ενεργότητα PAF-AH στην Lp(a)

Ως πηγή του ενζύμου για τον προσδιορισμό της ενεργότητας της PAF-AH χρησιμοποιήθηκαν 5 μg πρωτεΐνης Lp(a) ή LDL. Ως υπόστρωμα χρησιμοποιήθηκαν διάφορες συγκεντρώσεις [^{3}H]-PAF, που κυμαινόνταν από 2.5-100 μM. Ο προσδιορισμός της ενεργότητας έγινε με την μέθοδο ιζηματοποίησης με τριχλωροξικό οξύ. Στην συνέχεια με κινητική Michaelis-Menten και με χρήση της εξίσωσης Hanes-Dixon προσδιορίστηκαν οι φαινόμενες κινητικές σταθερές Km, Vmax καθώς η ειδική ενεργότητα του ενζύμου (εικόνες 12, 13)



Εικόνα 12. Κινητική μελέτη της ενεργότητας της PAF-AH στην Lp(a) σε ασθενείς και μάρτυρες με χρήση των εξισώσεων Michaelis-Menten και της γραμμικής μετατροπής αυτής Hanes-Dixon. Η καμπύλη είναι αντιπροσωπευτικό παράδειγμα από 3 παρασκευές Lp(a).



Εικόνα 13. Κινητική μελέτη της ενεργότητας της PAF-AH στην LDL σε ασθενείς και μάρτυρες με χρήση των εξισώσεων Michaelis-Menten και της γραμμικής μετατροπής αυτής Hanes-Dixon. Η καμπύλη είναι αντιπροσωπευτικό παράδειγμα από 3 παρασκευές LDL.

Όπως φαίνεται από τον πίνακα 5, η ενεργότητα της PAF-AH στην Lp(a) των στεφανιαίων ασθενών ήταν 3 φορές μικρότερη από την αντίστοιχη των μαρτύρων (4.5±0.8 nmol/mg λιποπρωτεϊνικής μάζας/min έναντι 14.8±3.9, αντίστοιχα, p<0.001). Όμοια, οι τιμές των φαινόμενων κινητικών σταθερών Km και Vmax του ενζύμου ήταν σημαντικά μικρότερες από τις αντίστοιχες των μαρτύρων. Προκειμένου να διερευνηθεί κατά πόσο το φαινόμενο της μειωμένης ενζυμικής ενεργότητας αλλά και των φαινόμενων κινητικών σταθερών της PAF-AH στην Lp(a) αφορά και άλλες λιποπρωτεΐνες του πλάσματος που περιέχουν την απολιποπρωτεΐνη apoB-100 έγινε απομόνωση από τα ίδια άτομα και της LDL, αφού η λιποπρωτεΐνη αυτή αποτελεί τον κύριο φορέα της PAF-AH στο πλάσμα. Όπως φαίνεται στον πίνακα 5 δεν βρέθηκε να υπάρχουν σημαντικές διαφορές τόσο στην ειδική ενεργότητα όσο και στις κινητικές σταθερές του ενζύμου που βρίσκεται στην LDL μεταξύ στεφανιαίων ασθενών και μαρτύρων. Επίσης δεν υπήρξαν σημαντικές διαφορές ως προς την ειδική ενεργότητα αλλά και τις κινητικές σταθερές του ενζύμου μεταξύ Lp(a) και LDL στους μάρτυρες ενώ αντίστροφα τόσο η ειδική ενεργότητα όσο και οι σταθερές αυτές ήταν σημαντικά μικρότερες στην Lp(a) των στεφανιαίων ασθενών έναντι της LDL του ιδίου πληθυσμού (πίνακας 5). Παρόμοια αποτελέσματα ελήφθησαν όταν η ενεργότητα του ενζύμου εκφράστηκε ανά mg φωσφολιπιδίων τα οποία βρίσκονται σε σταθερή αναλογία τόσο στο σωματίδιο της Lp(a) (22.3±3.9% της λιποπρωτεϊνικής μάζας) όσο και της LDL (21.4±1.0% της λιποπρωτεϊνικής μάζας). Η ενεργότητα της PAF-AH στην Lp(a) των στεφανιαίων ασθενών ήταν αρκετά μικρότερη από την αντίστοιχη των μαρτύρων (62.4±16.6 nmol/mg φωσφολιπιδίου/min για τους μάρτυρες έναντι 21.7±6.4 για τους στεφανιαίους ασθενείς 21.7±6.7, αντίστοιχα, p<0.001). Αντίθετα δεν παρουσιάστηκε διαφορά στην ενεργότητα του ενζύμου που βρίσκεται στην LDL μεταξύ των δύο ομάδων (42.1±8.3 nmol/mg φωσφολιπιδίου/min για τους μάρτυρες έναντι 56.0±12.8 για τους στεφανιαίους ασθενείς, αντίστοιχα, p=NS).

Επειδή όλοι οι στεφανιαίοι ασθενείς ελάμβαναν υπολιπιδαιμική θεραπεία (ατορβαστατίνη) για χρονικό διάστημα 4-6 μήνες πριν από την λήψη αίματος στην μελέτη πήραν μέρος και 11 ασθενείς με πρωτοπαθή υπερχοληστερολαιμία (δυσλιπιδαιμία τύπου IIA) με σκοπό να διερευνηθεί η πιθανή επίδραση της θεραπείας με στατίνη στην ενεργότητα της PAF-AH στην Lp(a). Στους ασθενείς αυτούς έγινε προσδιορισμός της ενεργότητας του ενζύμου στις Lp(a) και LDL καθώς και των αντίστοιχων κινητικών σταθερών πριν και μετά την 5μηνη χορήγηση ατορβαστατίνης (20 mg/ημέρα). Όπως φαίνεται από τον πίνακα 5, η ενεργότητα της PAF-AH στην

Lp(a) των ασθενών αυτών βρέθηκε να είναι παραπλήσια με αυτή των μαρτύρων και σημαντικά μεγαλύτερη από την αντίστοιχη των στεφανιαίων ασθενών (12.7±2.7 nmol/mg λιποπρωτεϊνικής μάζας/min έναντι 4.5±0.8, αντίστοιχα, $p<0.03$). Το ίδιο φαινόμενο παρατηρήθηκε και για τις φαινόμενες κινητικές σταθερές του ενζύμου Km και Vmax. Επιπλέον βρέθηκε ότι η θεραπεία με ατορβαστατίνη δεν επηρέασε είτε την ειδική ενεργότητα είτε τις κινητικές σταθερές της PAF-AH στην Lp(a) (πίνακας 5). Αντίθετα, παρατηρήθηκε σημαντική μείωση όσον αφορά την ειδική ενεργότητα (15.3±2.5 nmol/mg λιποπρωτεϊνικής μάζας/min έναντι 11.2±0.4, αντίστοιχα, $p<0.01$). και τις κινητικές σταθερές Km και Vmax του ιδίου ενζύμου στην LDL στον ίδιο πληθυσμό.

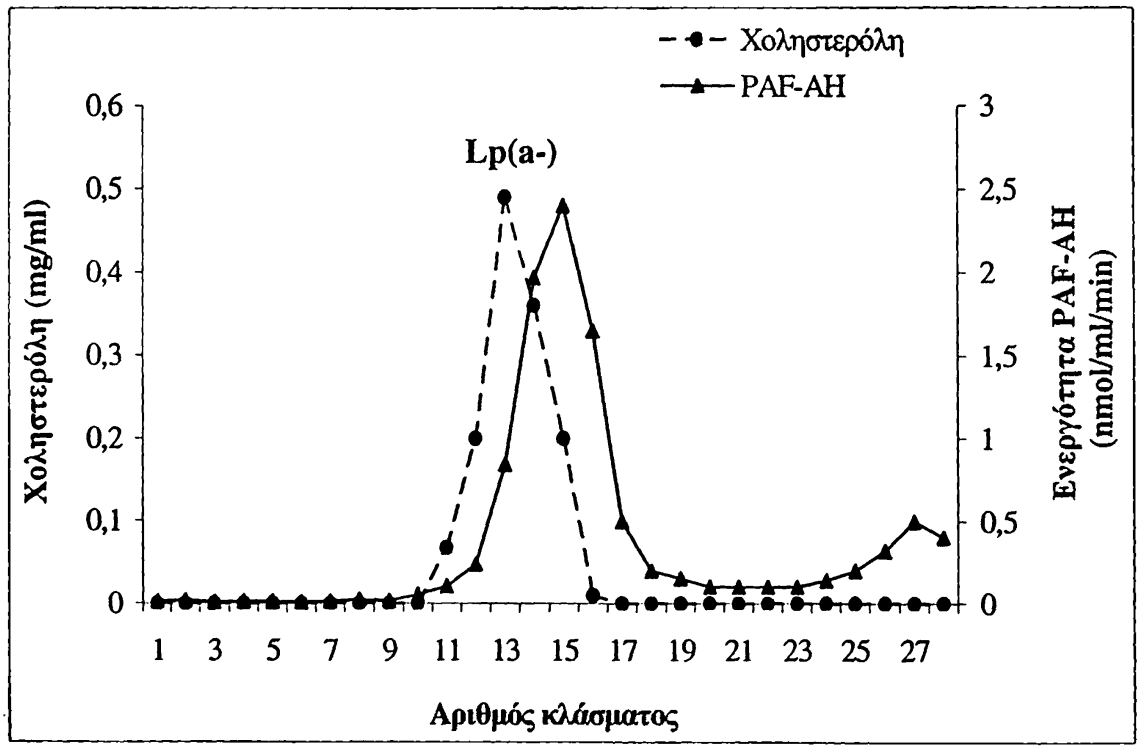
Πίνακας 5. Ειδική ενεργότητα και κινητικές σταθερές της PAF-AH στην Lp(a) και LDL στον πληθυσμό της μελέτης.

	Παράμετρος	Μάρτυρες (n=25)	Στεφανιαίοι (n=20)	Υπερχοληστερολαιμικοί ασθενείς (n=11)	
				Πρίν τη θεραπεία	Μετά την θεραπεία
Lp(a)	Ειδική ενεργότητα (nmol/mg λιποπρωτεϊνικής μάζας/min)	14.8±3.9	4.5±0.8$^{*\$}$	12.7±2.7**	12.4±2.3
	Km (μM)	70.2±28.4	19.6±8.2$^{*\$}$	84.2±23.5**	78.3±27.2
	Vmax (nmol/mg πρωτεΐνης/min)	44.6±11.9	15.5±4.6$^{*\$}$	37.1±8.5**	37.3±9.3
LDL	Ειδική ενεργότητα (nmol/mg λιποπρωτεϊνικής μάζας/min)	11.2±1.7	12.3±4.2	15.3±2.5$^{\#}$	11.2±0.4†
	Km (μM)	79.9±16.5	91.7±24.0	116.0±22.6$^{\#}$	78.2±1.0†
	Vmax (nmol/mg πρωτεΐνης/min)	40.8±8.0	54.2±12.4	70.6±11.4$^{\#}$	47.8±0.7†

Οι τιμές εκφράζονται σαν μέση τιμή ± τυπική απόκλιση.
$^{*}p<0.001$ σε σύγκριση με τους μάρτυρες.
$^{\$}p<0.001$ σε σύγκριση με τις αντίστοιχες τιμές της LDL της ίδιας ομάδας.
$^{**}p<0.03$ σε σύγκριση με τους στεφανιαίους ασθενείς.
$^{\#}p<0.03$ σε σύγκριση με τους μάρτυρες ή τους στεφανιαίους ασθενείς.
$^{\dagger}p<0.01$ σε σύγκριση με τις αντίστοιχες τιμές πριν την θεραπεία.

Αναγωγική διάσπαση της Lp(a)

Για να εξετασθεί το εάν και κατά πόσο η πολυπεπτιδική αλυσίδα της apo(a) μπορεί να ευθύνεται για την μειωμένη ενεργότητα που παρατηρείται στην Lp(a) των στεφανιαίων ασθενών, Lp(a) που απομονώθηκε τόσο από στεφανιαίους ασθενείς όσο και από μάρτυρες επωάστηκε με 10 mM DTT στους 37 °C για 3 h. Η χρήση της DTT αποσκοπεί στην αναγωγική διάσπαση του δισουλφιδικού δεσμού που ενώνει την apo(a) με το υπολειπόμενο LDL τμήμα του σωματιδίου της Lp(a) και είναι μια κατεργασία η οποία δεν επηρεάζει την ενεργότητα της PAF-AH στην Lp(a) (11.0±1.8 nmol/min πριν την επώαση με DTT και 10.3±1.1 μετά, στους μάρτυρες καθώς και 5.1±0.6 πριν και 5.0±0.8 μετά στους στεφανιαίους ασθενείς). Μετά την αναγωγική διάσπαση, η Lp(a) υποβλήθηκε σε υπερφυγοκέντρηση βαθμίδωσης πυκνοτήτων.



Εικόνα 14. Αντιπροσωπευτικό προφίλ χοληστερόλης-ενεργότητας PAF-AH της Lp(a) μετά από αναγωγική διάσπαση και υπερφυγοκέντρηση βαθμίδωσης πυκνότητας.

Η προκύπτουσα λιποπρωτεΐνη μετά την αναγωγή, συμβολίζεται ως, Lp(a-), μεταναστεύει στην περιοχή πυκνότητας d = 1.038-1.089 g/ml (κλάσματα 11-15) όπου εντοπίζεται και το μεγαλύτερο μέρος (85±5%) της ολικής ενζυμικής ενεργότητας PAF-AH (εικόνα 14). Τα δύο τελευταία κλάσματα 27 και 28 οποία περιέχουν μόνο

apo(a) καθώς και ένα μικρό μέρος της αρχικής ολικής ενζυμικής ενεργότητας (15±5%).

Η Lp(a-) ταυτοποιήθηκε με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου 5-19% κάτω από αποδιατακτικές συνθήκες (SDS-PAGE 5-19%) από την οποία διαπιστώθηκε ότι περιέχει μόνο apoB-100 καθώς και με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης στην οποία εμφάνισε β ηλεκτροφορητική κινητικότητα όμοια με αυτή του σωματιδίου της LDL (εικόνα 15). Παράλληλα έγινε και προσδιορισμός της χημικής της σύστασης ο οποίος ήταν σύμφωνος με την διεθνή βιβλιογραφία (πίνακας 6).

Lp(a) Lp(a-) LDL

Εικόνα 15. *Ηλεκτροφόρηση αγαρόζης σε Lp(a), Lp(a-) και LDL.*

Πίνακας 6. *Χημική σύσταση της Lp(a-). Το κάθε συστατικό είναι εκφρασμένο ως % ποσοστό της λιποπρωτεϊνικής μάζας. Οι τιμές εκπροσωπούν την μέση τιμή ± τυπική απόκλιση από 5 παρασκευές Lp(a-).*

Σύσταση	Lp(a)	LDL	Lp(a-)
Πρωτεΐνη	31.2 ± 2.1	22.1 ± 1.6	25.9 ± 1.9
Ολική χοληστερόλη	38.7 ± 3.8	49.5 ± 3.0	45.1 ± 2.9
Τριγλυκερίδια	7.8 ± 1.5	7.0 ±0.6	8.1 ± 0.7
Φωσφολιπίδια	22.3 ± 2.3	21.4 ± 1.0	20.9 ± 1.8

Μετά την αναγωγική διάσπαση η ενεργότητα του ενζύμου στην Lp(a-) στους στεφανιαίους ασθενείς παρουσίασε σημαντική αύξηση σε σχέση με αυτή της ίδιας Lp(a) πριν την αναγωγική διάσπαση (11.3±3.0 nmol/mg λιποπρωτεϊνικής μάζας/min για την Lp(a-) έναντι 4.5±0.8 της Lp(a), $p<0.001$). Ανάλογη αύξηση παρατηρήθηκε και στις κινητικές σταθερές Km και Vmax του ενζύμου (πίνακας 7). Αντίθετα το φαινόμενο αυτό δεν παρατηρήθηκε για την PAF-AH στην Lp(a) των μαρτύρων πριν και μετά την κατεργασία με DTT και υπερφυγοκέντρηση βαθμίδωσης πυκνότητας του σωματιδίου της Lp(a). Όμοια, δεν παρατηρήθηκε διαφορά στην ενζυμική ενεργότητα αλλά και στις κινητικές σταθερές της PAF-AH στην LDL πριν και μετά την κατεργασία με DTT και υπερφυγοκέντρηση βαθμίδωσης πυκνοτήτων και στις δύο ομάδες. Το εύρημα αυτό εστιάζει την προσοχή στον κυρίαρχο ρόλο που πιθανώς να παίζουν δομικά χαρακτηριστικά της πολυπεπτιδικής αλυσίδας της apo(a) στην εκδήλωση μικρής ενζυμικής ενεργότητας PAF-AH στο σωματίδιο της Lp(a) στους στεφανιαίους ασθενείς.

Πίνακας 7. Ειδική ενεργότητα και κινητικές σταθερές της PAF-AH στην Lp(a) και Lp(a) στους μάρτυρες και στους στεφανιαίους ασθενείς.

	Παράμετρος	Lp(a)	Lp(a-)
Μάρτυρες	Ειδική ενεργότητα (nmol/mg λιποπρωτεϊνικής μάζας/min)	14.8±3.9	14.3±3.1
	Km (μM)	70.2±28.4	72.4±17.1
	Vmax (nmol/mg πρωτεΐνης/min)	44.6±11.9	42.8±6.1
Στεφανιαίοι	Ειδική ενεργότητα (nmol/mg λιποπρωτεϊνικής μάζας/min)	4.5±0.8	11.3±3.0*
	Km (μM)	19.6±8.2	73.5±21.8*
	Vmax (nmol/mg πρωτεΐνης/min)	15.5±4.6	35.9±9.5*

Οι τιμές εκφράζονται σαν μέση τιμή ± τυπική απόκλιση.
*$p<0.001$ σε σύγκριση με την Lp(a).

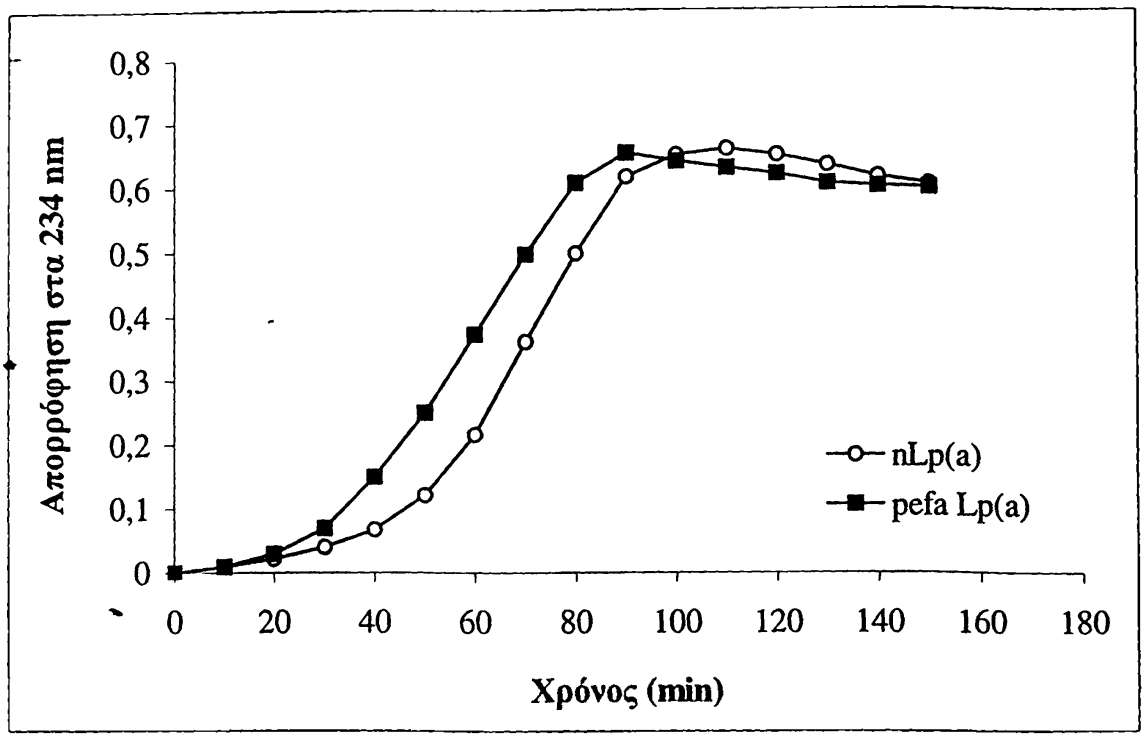
Παρόμοια αποτελέσματα ελήφθησαν όταν η ενεργότητα του ενζύμου εκφράστηκε ανά mg φωσφολιπιδίων τα οποία βρίσκονται σε σταθερή αναλογία τόσο

στο σωματίδιο της Lp(a) (22.3±3.9% της λιποπρωτεϊνικής μάζας) όσο και της Lp(a-) (20.9±1.8% της λιποπρωτεϊνικής μάζας) (62.4±16.6 nmol/mg φωσφολιπιδίου/min για την Lp(a) έναντι 53.0±7.6 της Lp(a-) στους μάρτυρες και 21.7±6.7 για την Lp(a) έναντι 44.5±11.8 της Lp(a-) στους στεφανιαίους, αντίστοιχα, $p<0.001$).

Παθοφυσιολογικός ρόλος της μειωμένης ενεργότητας στους στεφανιαίους ασθενείς

A) Οξείδωση της Lp(a) *in vitro*

Θέλοντας να διερευνήσουμε τον πιθανό παθοφυσιολογικό ρόλο της μειωμένης ενεργότητας PAF-AH της Lp(a) που παρατηρήθηκε στα προηγούμενα πειράματα στους στεφανιαίους ασθενείς υποβάλλαμε σε οξείδωση Lp(a) από 3 διαφορετικές παρασκευές με ενεργό την PAF-AH [nLp(a)] καθώς και την αντίστοιχη λιποπρωτεΐνη στην οποία είχε γίνει προηγούμενη απενεργοποίηση της ενδογενούς PAF-AH παρουσία 0.5 mM pefablock [pefa Lp(a)]. Όπως περιγράφεται στην μεθοδολογία η οξείδωση της Lp(a), *in vitro*, έγινε με επώαση αυτής με ιόντα Cu^{2+} και συνεχή καταγραφή της απορρόφησης των συζυγών διενίων στα 234 nm. Η καμπύλη απορρόφησης σε συνάρτηση με το χρόνο είναι σιγμοειδής και φαίνεται χαρακτηριστικά στην εικόνα 16.



Εικόνα 16. Σιγμοειδής καμπύλη οξείδωσης της Lp(a) με ενεργό και μη την PAF-AH.

Ο λανθάνων χρόνος οξείδωσης στην nLp(a) είναι παρόμοιος με τον αντίστοιχο χρόνο που παρατηρείται για την pefa Lp(a) με απενεργοποιημένη την PAF-AH. Παράλληλα δεν διαπιστώθηκαν σημαντικές διαφορές και στις υπόλοιπες παραμέτρους της οξείδωσης (πίνακας 8).

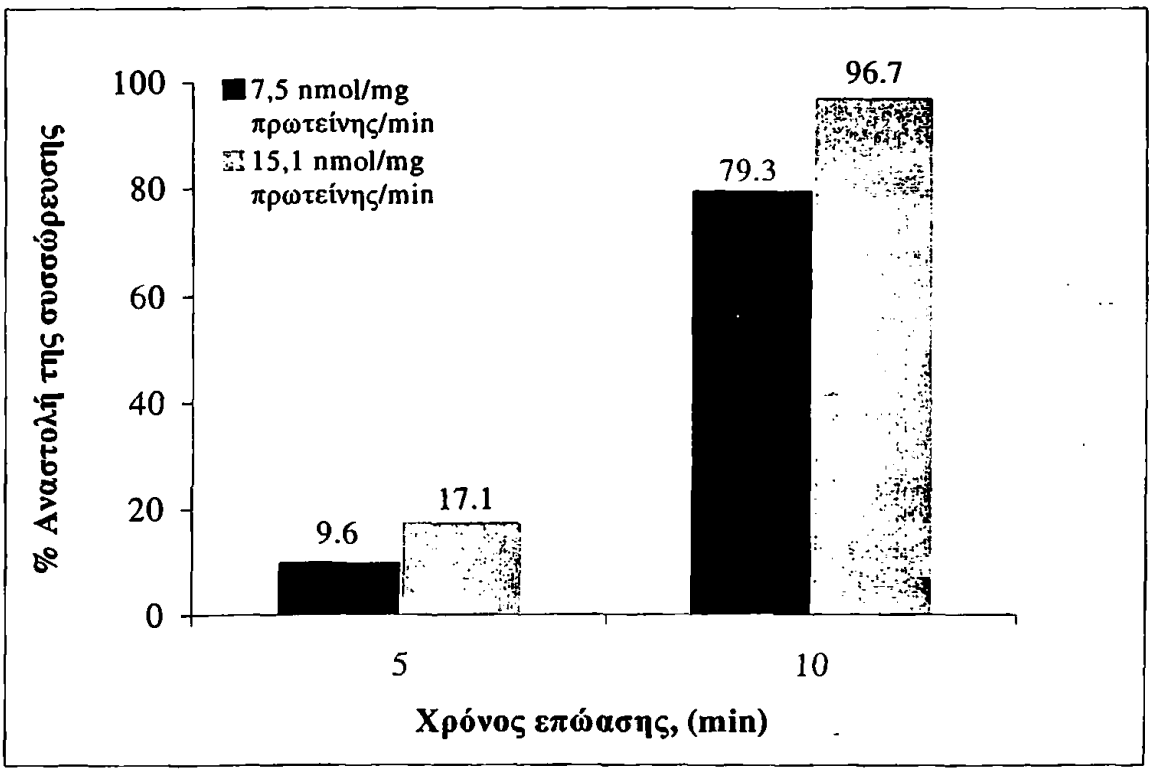
Πίνακας 8. Οξειδωτικές παράμετροι των nLp(a), pefa Lp(a)

	nLp(a)	pefa Lp(a)
PAF-AH, nmol/mg πρωτεΐνης/min	8.0 ± 1.3	0.5 ± 0.1
Λανθάνων χρόνος, min	43.5 ± 9.2	32.5 ± 17.7
Ρυθμός παραγωγής συζυγών διενίων, nmol/mg πρωτεΐνης/min	1.4 ± 0.28	1.2 ± 0.72
Συνολικός αριθμός διενίων, nmol/mg πρωτεΐνης	197.3 ± 15.8	192.9 ± 89.2

Οι τιμές εκφράζονται σαν μέση τιμή ± τυπική απόκλιση.

Β) Ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων

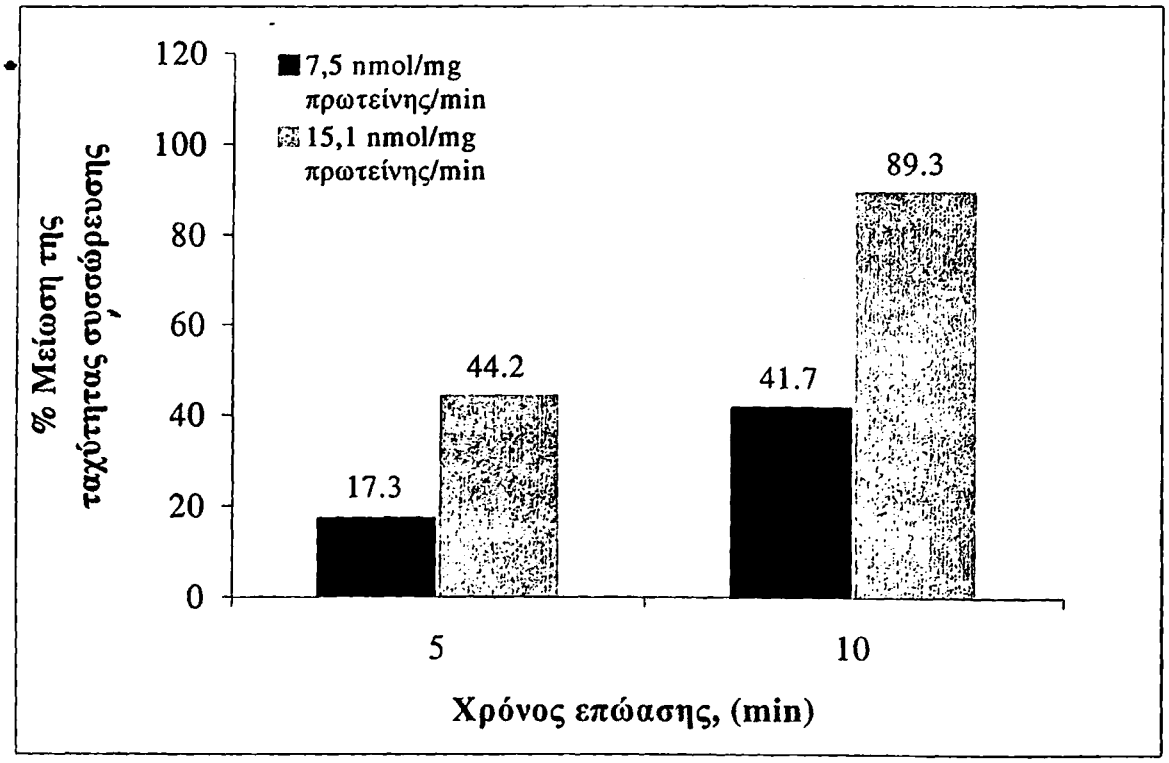
Ένα από τα κυριότερα υποστρώματα της PAF-AH είναι ο PAF ο οποίος αποτελεί ισχυρό αγωνιστή της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων. Για να μελετηθεί η επίδραση της PAF-AH που βρίσκεται στην Lp(a) στην συσσώρευση των αιμοπεταλίων όταν αυτά ενεργοποιηθούν με τον αγωνιστή αυτό, Lp(a) διαφορετικής ενεργότητας PAF-AH (7.5 και 15.1 nmol/mg πρωτεΐνης/min) επωάστηκε με PAF (25 nM) για 5 και 10 λεπτά στους 37 °C και στην συνέχεια προστέθηκε PRP, το οποίο δεν περιείχε Lp(a), υπό ανάδευση. Η συσσώρευση των αιμοπεταλίων παρακολουθήθηκε για 3 min.



Εικόνα 17. Επίδραση της PAF-AH της Lp(a) στην συσσώρευση των αιμοπεταλίων από τον PAF.

Παρατηρήθηκε αναστολή της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων η οποία ήταν ανάλογη του περιεχόμενου σε ενεργότητα PAF-AH. Επιπλέον, η αναστολή αυτή ήταν μεγαλύτερη όταν ο χρόνος επώασης του λιποπρωτεϊνικού σωματιδίου με τον PAF αυξήθηκε από 5 σε 10 min (εικόνα 17). Το εύρημα αυτό εξηγείται με δεδομένο

ότι ο PAF αποτελεί υπόστρωμα για την PAF-AH και άρα όσο μεγαλύτερη είναι η ενεργότητα του ενζύμου αλλά και ο χρόνος της ενζυμικής αντίδρασης τόσο μεγαλύτερη είναι η υδρόλυση και επομένως η απενεργοποίηση του συγκεκριμένου αγωνιστή. Παρόμοια αποτελέσματα ελήφθησαν σε ότι αφορά την ταχύτητα της συσσώρευσης (εικόνα 18).



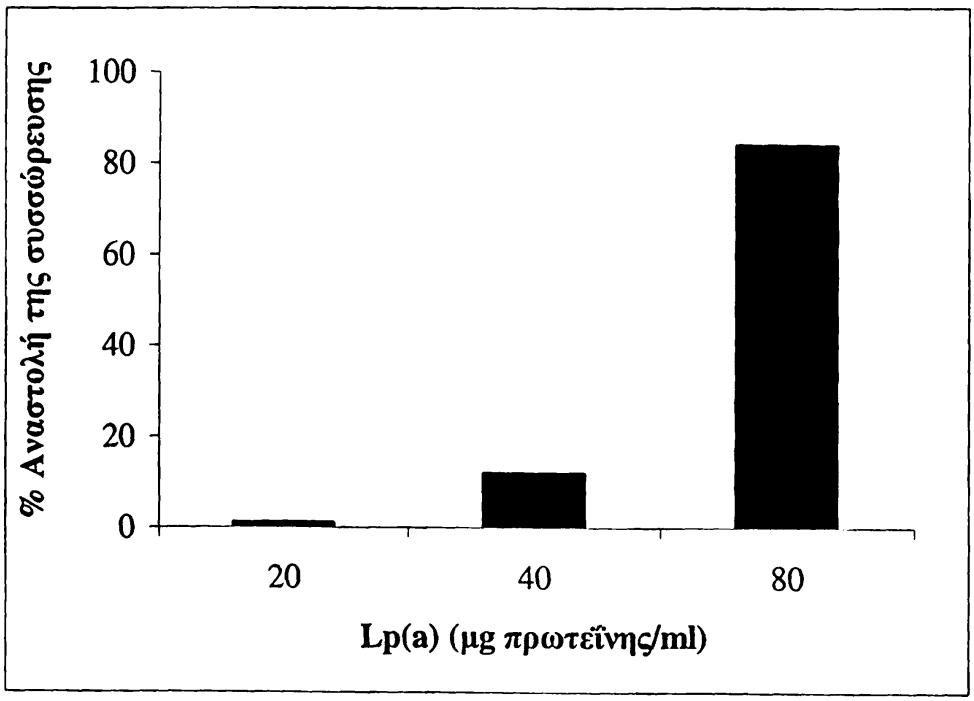
Εικόνα 18. Επίδραση της PAF-AH της Lp(a) στην ταχύτητα της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων από τον PAF.

ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ Lp(a) ΣΤΗΝ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΑΙΜΟΠΕΤΑΛΙΩΝ ΑΠΟ ΤΟΝ PAF

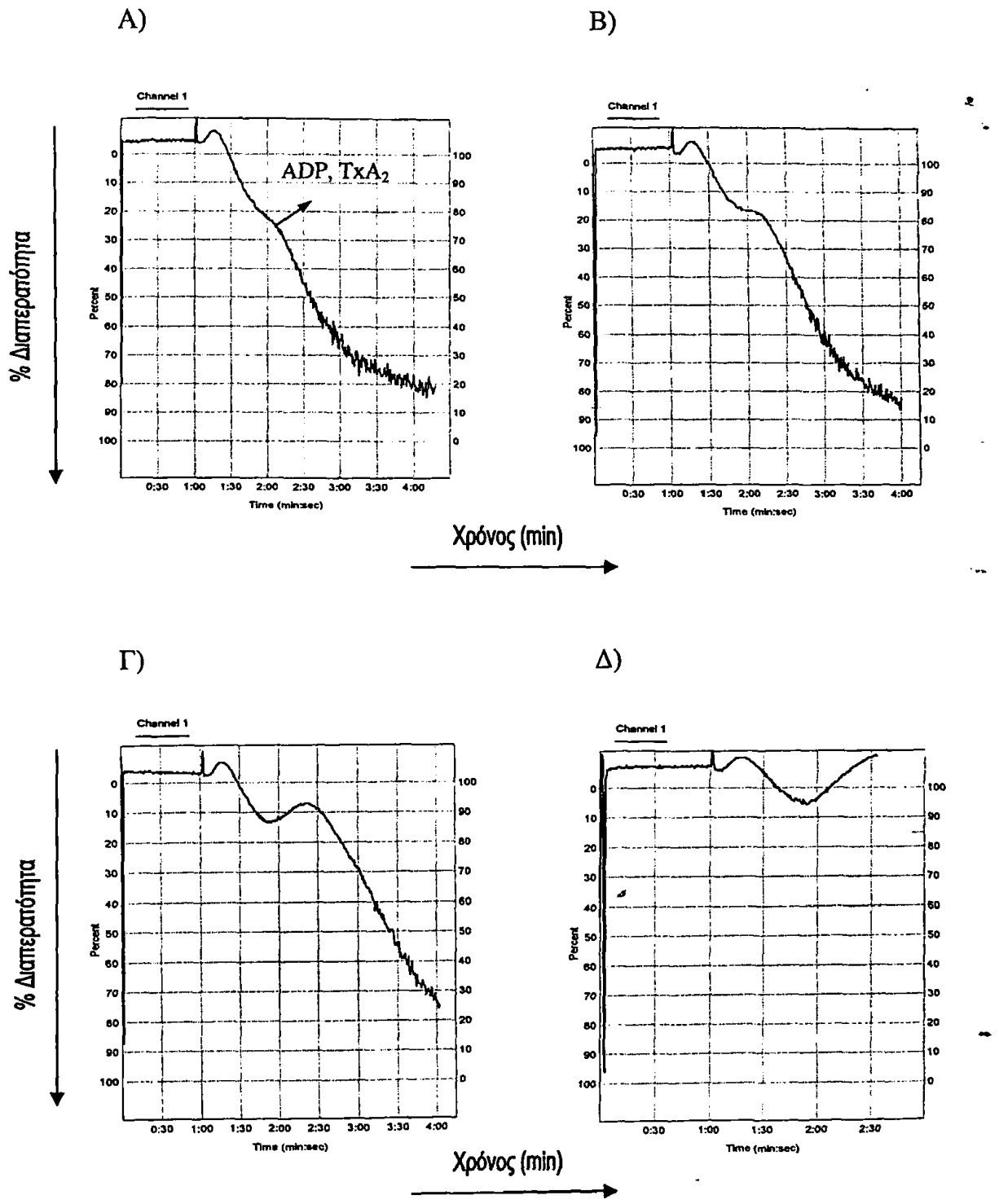
Επίδραση της Lp(a) στη συσσώρευση των αιμοπεταλίων σε PRP από τον PAF

Η συμμετοχή των παραγόντων της αιμόστασης και ιδιαίτερα των αιμοπεταλίων στην παθογένεια της αθηροσκλήρωσης και των επιπλοκών της αποτελεί ένα αντικείμενο με ολοένα αυξανόμενο ερευνητικό ενδιαφέρον. Σήμερα είναι πλέον καλά τεκμηριωμένος ο ρόλος των αιμοπεταλίων στην παθογένεια της αθηρωμάτωσης και των οξέων στεφανιαίων συνδρόμων. Νεότερα ερευνητικά δεδομένα αποδεικνύουν ότι οι λιποπρωτεΐνες του πλάσματος, εκτός από την άμεση συμμετοχή τους στην αθηρωματική διαδικασία, επηρεάζουν την ευαισθησία των αιμοπεταλίων στους διάφορους αγωνιστές αυτών, διαδραματίζοντας έτσι ένα επιπλέον ρόλο στη διαδικασία της θρόμβωσης. Μέχρι σήμερα υπάρχουν λίγες μελέτες σχετικά με την αλληλεπίδραση της Lp(a) με τα αιμοπετάλια οι οποίες έχουν καταλήξει σε αντικρουόμενα αποτελέσματα καθιστώντας αδιευκρίνιστο τον πιθανό παθοφυσιολογικό ρόλο της λιποπρωτεΐνης αυτής στην θρόμβωση. Με βάση το γεγονός αυτό αλλά και λαμβάνοντας υπόψη: i) τα προηγούμενα αποτελέσματα της μειωμένης ενεργότητας PAF-AH στους στεφανιαίους ασθενείς, ii) το ότι ο PAF εκτός από υπόστρωμα για την PAF-AH παράλληλα αποτελεί και ισχυρό αγωνιστή για τα αιμοπετάλια, και iii) την έλλειψη δεδομένων σχετικά με τον τρόπο δράσης της Lp(a) στα αιμοπετάλια μετά από ενεργοποίηση με τον PAF, μελετήθηκε η επίδραση της λιποπρωτεΐνης αυτής στην ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων με PAF, τόσο σε PRP όσο και σε σύστημα πλυμένων αιμοπεταλίων.

Αρχικά μελετήθηκε η επίδραση της Lp(a) στην ενεργοποίηση αιμοπεταλίων σε PRP, το οποίο δεν περιείχε ανιχνεύσιμα επίπεδα Lp(a). Η ενεργοποίηση έγινε με PAF τελικής συγκέντρωσης 7.5 nM, η οποία αποτέλεσε την μικρότερη συγκέντρωση του PAF που προκαλεί την μέγιστη συσσώρευση των αιμοπεταλίων. Το PRP επωάστηκε με την λιποπρωτεΐνη για 1 min στους 37 °C και στην συνέχεια προστέθηκε ο αγωνιστής. Η συσσώρευση παρακολουθήθηκε για 3 min. Παρουσία της Lp(a) παρατηρήθηκε δοσοεξαρτώμενη αναστολή της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων, με την μέγιστη συγκέντρωση Lp(a) που χρησιμοποιήθηκε (80 μg πρωτεΐνης/ml) να παρουσιάζει την μεγαλύτερη αναστολή (83.9%, εικόνα 19).



Εικόνα 19. *Δοσοεξαρτώμενη αναστολή της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων σε PRP, από την Lp(a), μετά από ενεργοποίηση με PAF.*



Εικόνα 20. *Επίδραση της Lp(a) στην συσσώρευση των αιμοπεταλίων σε PRP μετά από ενεργοποίηση με PAF.*

Α) PBS (τυφλό).

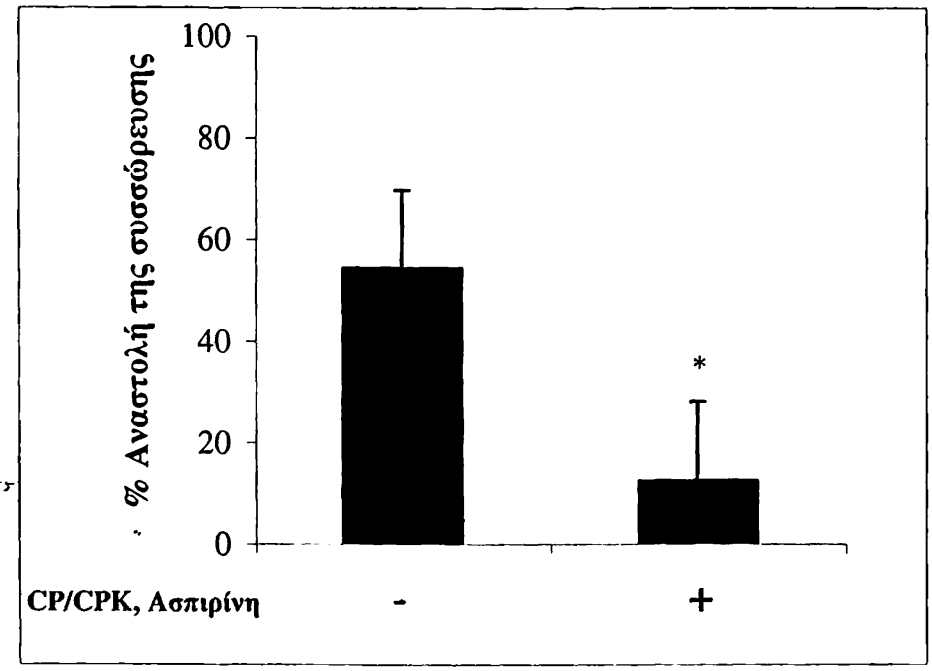
Β) Lp(a) 20 μg πρωτεΐνης/ml.

Γ) Lp(a) 40 μg πρωτεΐνης/ml.

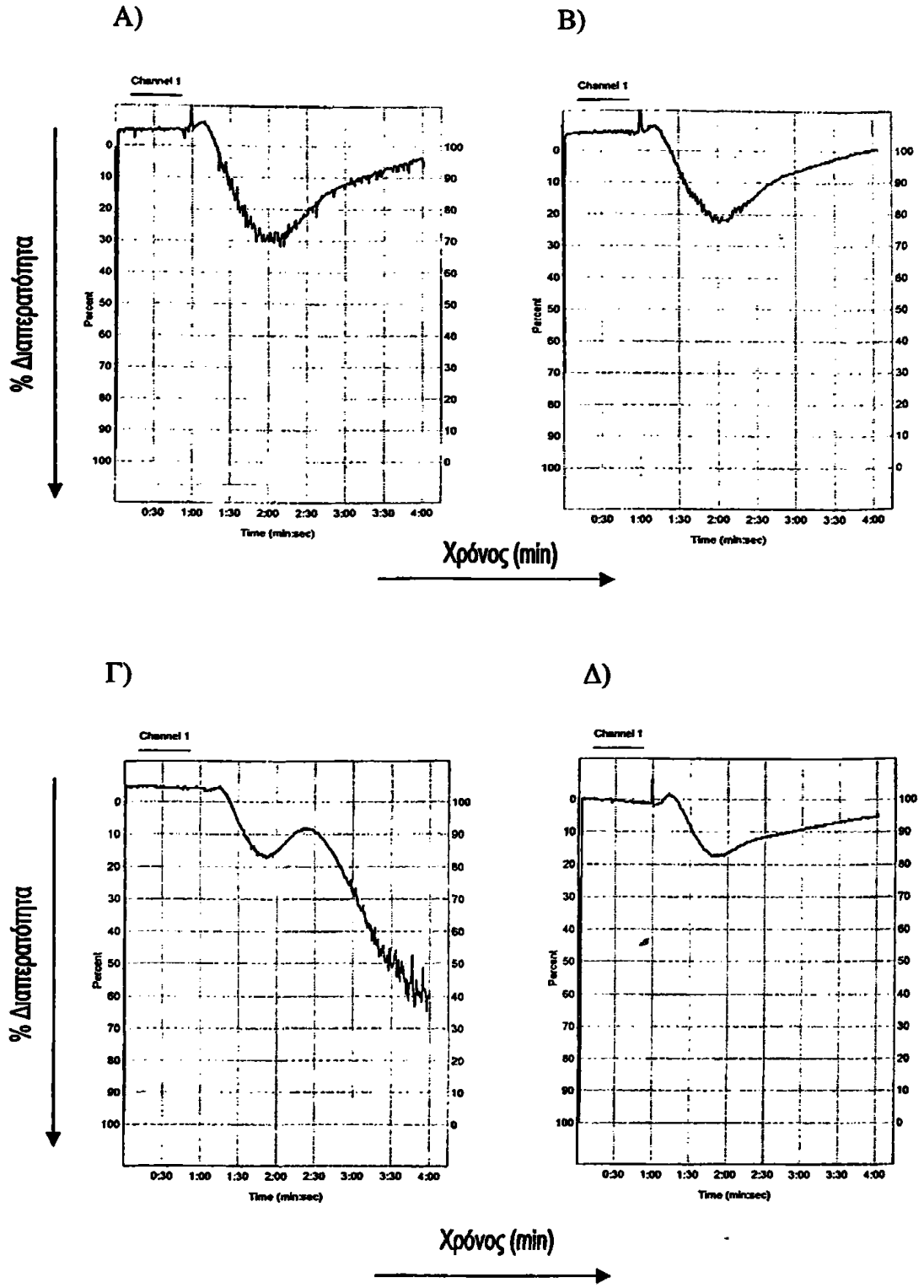
Δ) Lp(a) 80 μg πρωτεΐνης/ml.

Όπως φαίνεται στην εικόνα 20, η Lp(a) αναστέλλει τόσο την πρωτογενή συσσώρευση που προκαλεί ο PAF όσο και την δευτερογενή η οποία οφείλεται στην δράση άλλων αγωνιστών όπως του ADP και του TxA_2 οι οποίοι εκκρίνονται από τα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια με τη δράση του PAF και οδηγούν σε μη αντιστρεπτή συσσώρευση.

Προκειμένου να διερευνήσουμε την εξειδικευμένη δράση της Lp(a) έναντι του PAF σε σχέση με την πρωτογενή συσσώρευση σε επόμενα πειράματα χρησιμοποιήθηκε το σύστημα CP/CPK το οποίο δρα ως εκκαθαριστής του παραγόμενου ADP καθώς και η ασπιρίνη η οποία αναστέλλει μη αντιστρεπτά την δράση του ενζύμου Cox1 και παρεμποδίζει την σύνθεση του TxA_2. Η ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων έγινε με PAF τελικής συγκέντρωσης 25 nM η οποία αποτέλεσε την μικρότερη συγκέντρωση του PAF που προκαλεί την μέγιστη συσσώρευση των αιμοπεταλίων παρουσία CP/CPK και ασπιρίνης. Η Lp(a) (40 μg πρωτεΐνης/ml) παρουσίασε ανασταλτική δράση στην συσσώρευση των αιμοπεταλίων η οποία βρέθηκε να είναι σημαντικά μεγαλύτερη απουσία CP/CPK και ασπιρίνης (54.5±15.4% απουσία έναντι 12.6±15.6% παρουσία CP/CPK και ασπιρίνης, $p<0.03$, εικόνες 21, 22).



Εικόνα 21. Αναστολή της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων σε PRP από την Lp(a) (40 μg πρωτεΐνης/ml), μετά από ενεργοποίηση με PAF, παρουσία και απουσία CP/CPK και ασπιρίνης



Εικόνα 22. Επίδραση της Lp(a) στην συσσώρευση των αιμοπεταλίων σε PRP παρουσία και απουσία CP/CPK και ασπιρίνης, μετά από ενεργοποίηση με PAF.

Α) PBS (τυφλό).

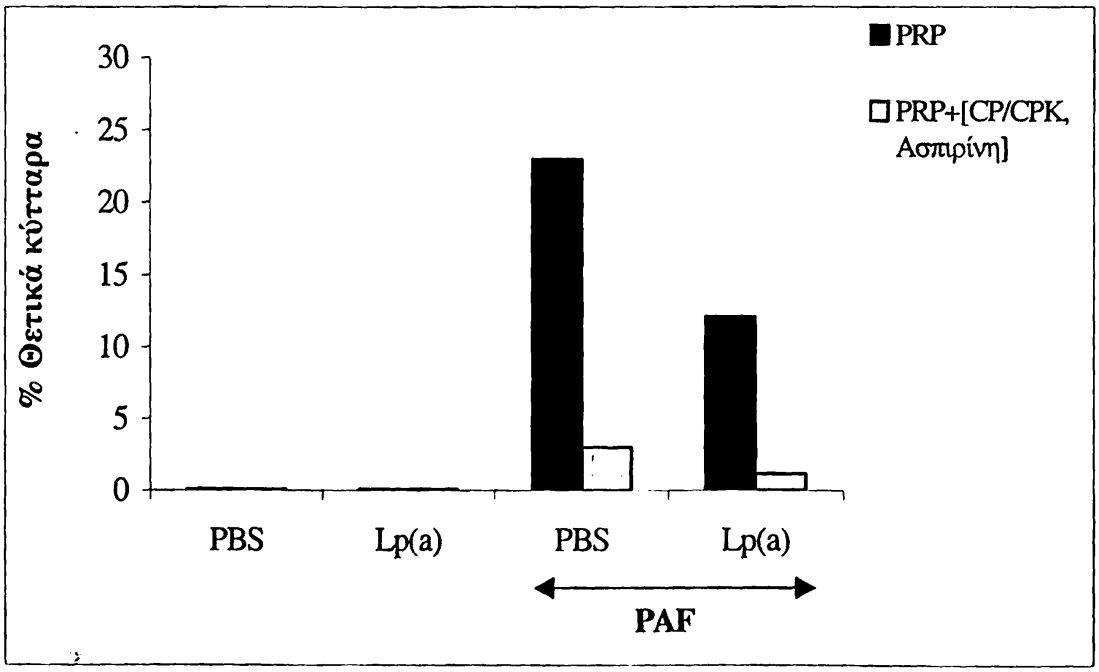
Β) Lp(a) 40 μg πρωτεΐνης/ml.

Γ) PBS (τυφλό).

Δ) Lp(a) 40 μg πρωτεΐνης/ml.

Συνεπώς από το παρών καθώς και το προηγούμενο αποτέλεσμα συνάγεται ότι η Lp(a) αναστέλλει τόσο την πρωτογενή συσσώρευση που προκαλεί ο PAF όσο και την δευτερογενή συσσώρευση που προκαλείται από εκκρινόμενους αγωνιστές των ενεργοποιημένων αιμοπεταλίων.

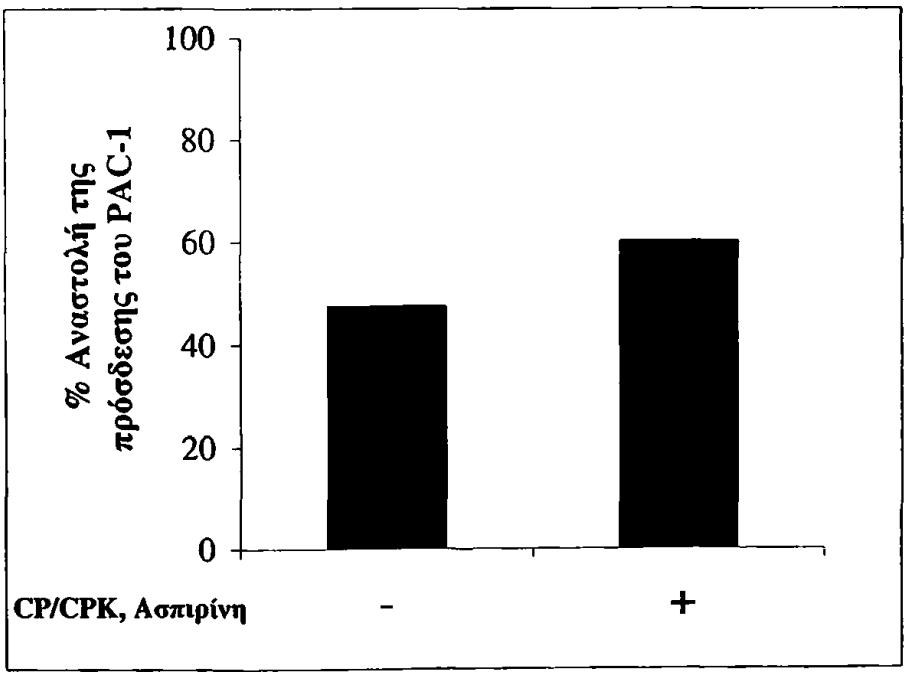
Στην συνέχεια, για να διευκρινισθεί ο τρόπος με τον οποίο επιτυγχάνεται η αναστολή που παρατηρήθηκε στα πειράματα της συσσωρευομετρίας, διερευνήθηκε με χρήση κυτταρομετρίας ροής η επίδραση της Lp(a) στην έκφραση του αιμοπεταλιακού υποδοχέα $\alpha_{IIb}\beta_3$ (γνωρίζοντας ότι ο υποδοχέας αυτός μέσω της πρόσδεσης του Fg αποτελεί τον τελικό αποδέκτη της δράσης όλων των αγωνιστών των αιμοπεταλίων παίζοντας με τον τρόπο αυτό κυρίαρχο ρόλο στην συσσώρευση των κυττάρων αυτών) μετά από ενεργοποίηση με PAF. Για το λόγο αυτό χρησιμοποιήθηκε το εξειδικευμένο mAb PAC-1, το οποίο συνδέεται μόνο στον ενεργοποιημένο υποδοχέα ενώ δεν αναγνωρίζει την μη ενεργοποιημένη μορφή αυτού.



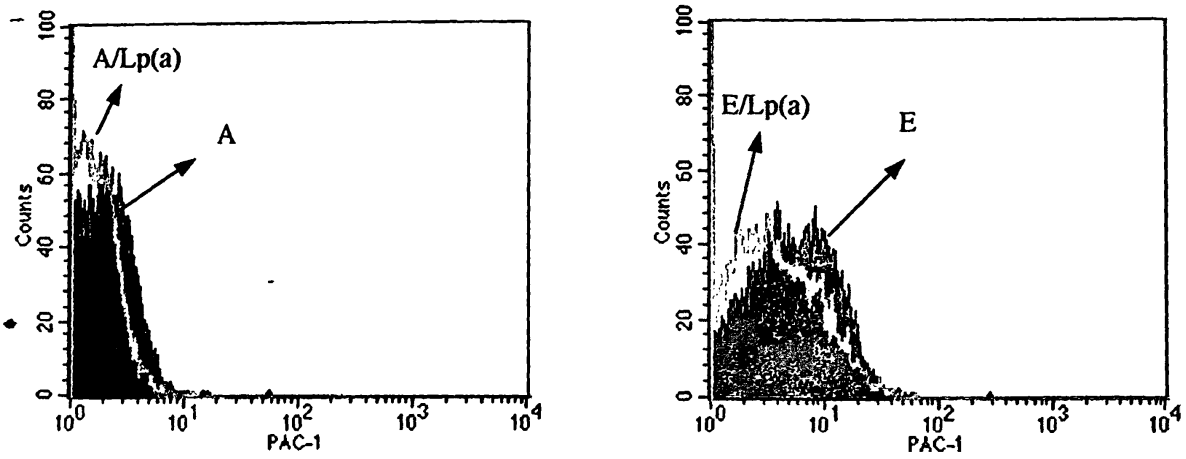
Εικόνα 23. *Επίδραση της Lp(a) (40 μg πρωτεΐνης/ml) στην έκφραση του υποδοχέα $\alpha_{IIb}\beta_3$ πριν και μετά την ενεργοποίηση αιμοπεταλίων σε PRP με PAF απουσία και παρουσία CP/CPK και ασπιρίνης.*

Όπως φαίνεται στην εικόνα 23 τα μη ενεργοποιημένα αιμοπετάλια δεν εκφράζουν $\alpha_{IIb}\beta_3$. Όταν τα αιμοπετάλια ενεργοποιήθηκαν, απουσία ή παρουσία

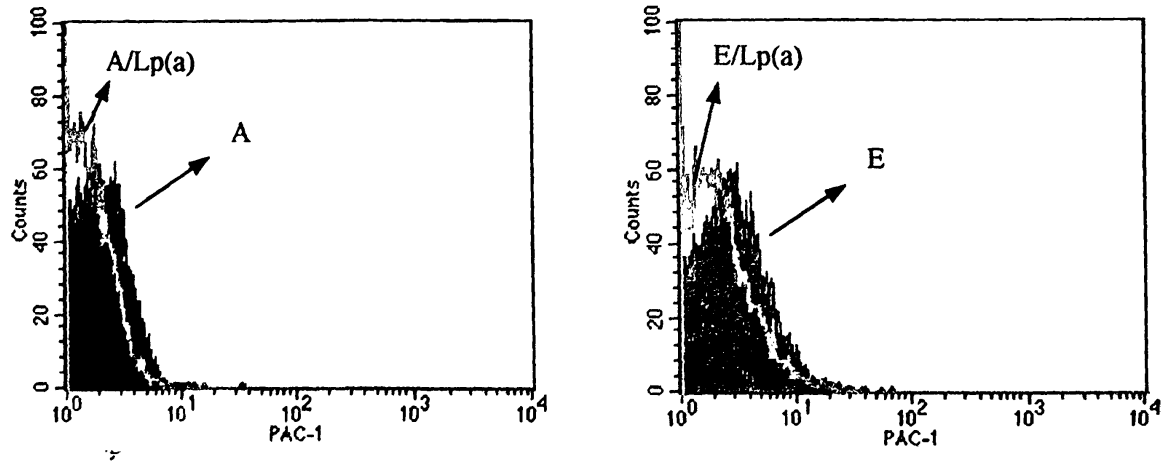
CP/CPK και ασπιρίνης, με PAF (80 nM) υπήρξε έκφραση 23.0% και 3% αντίστοιχα επί του συνόλου αυτών. Όταν προστέθηκε η Lp(a) (σε τελική συγκέντρωση 40 μg πρωτεΐνης/ml, η οποία από την προηγούμενη εμπειρία στα πειράματα συσσωρευομετρίας προκαλεί αναστολή της συσσώρευσης) η έκφραση αυτή μειώθηκε στο 12.1% και 1.2% (εικόνα 23) αντίστοιχα προκαλώντας αναστολή της τάξης του 47.4% και 60.0% αντίστοιχα (εικόνες 24-26). Συνεπώς από τα παραπάνω αποτελέσματα (τα οποία έρχονται σε συμφωνία με αυτά της συσσωρευομετρίας) συνάγεται ότι η Lp(a) αναστέλλει τόσο την πρωτογενή συσσώρευση που προκαλεί ο PAF όσο και την δευτερογενή συσσώρευση η οποία προκαλείται από εκκρινόμενους αγωνιστές των ενεργοποιημένων αιμοπεταλίων, διαδικασία στην οποία η Lp(a) παρεμβαίνει επηρεάζοντας την έκφραση του υποδοχέα $\alpha_{IIb}\beta_3$.



Εικόνα 24. *Αναστολή της έκφρασης του υποδοχέα $\alpha_{IIb}\beta_3$ από την Lp(a) (40 μg πρωτεΐνης/ml) αιμοπεταλίων σε PRP μετά από ενεργοποίηση με PAF παρουσία ή απουσία CP/CPK και ασπιρίνης.*

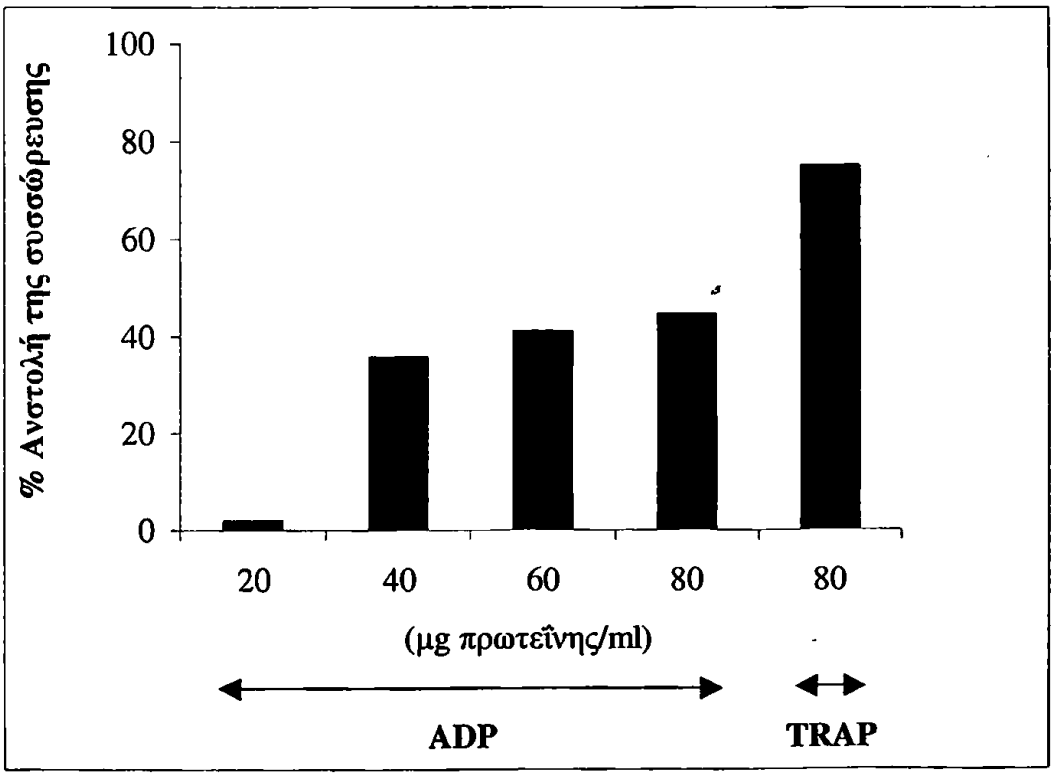


Εικόνα 25. *Αντιπροσωπευτικό κυτταρομετρικό προφίλ της αναστολής της πρόσδεσης του PAC-1 από την Lp(a) (40 μg πρωτεΐνης/ml), αιμοπεταλίων σε PRP τα οποία ενεργοποιήθηκαν με PAF. A: αιμοπετάλια, A/Lp(a): αιμοπετάλια παρουσία Lp(a), E: ενεργοποιημένα αιμοπετάλια, E/Lp(a): ενεργοποιημένα αιμοπετάλια παρουσία Lp(a).*

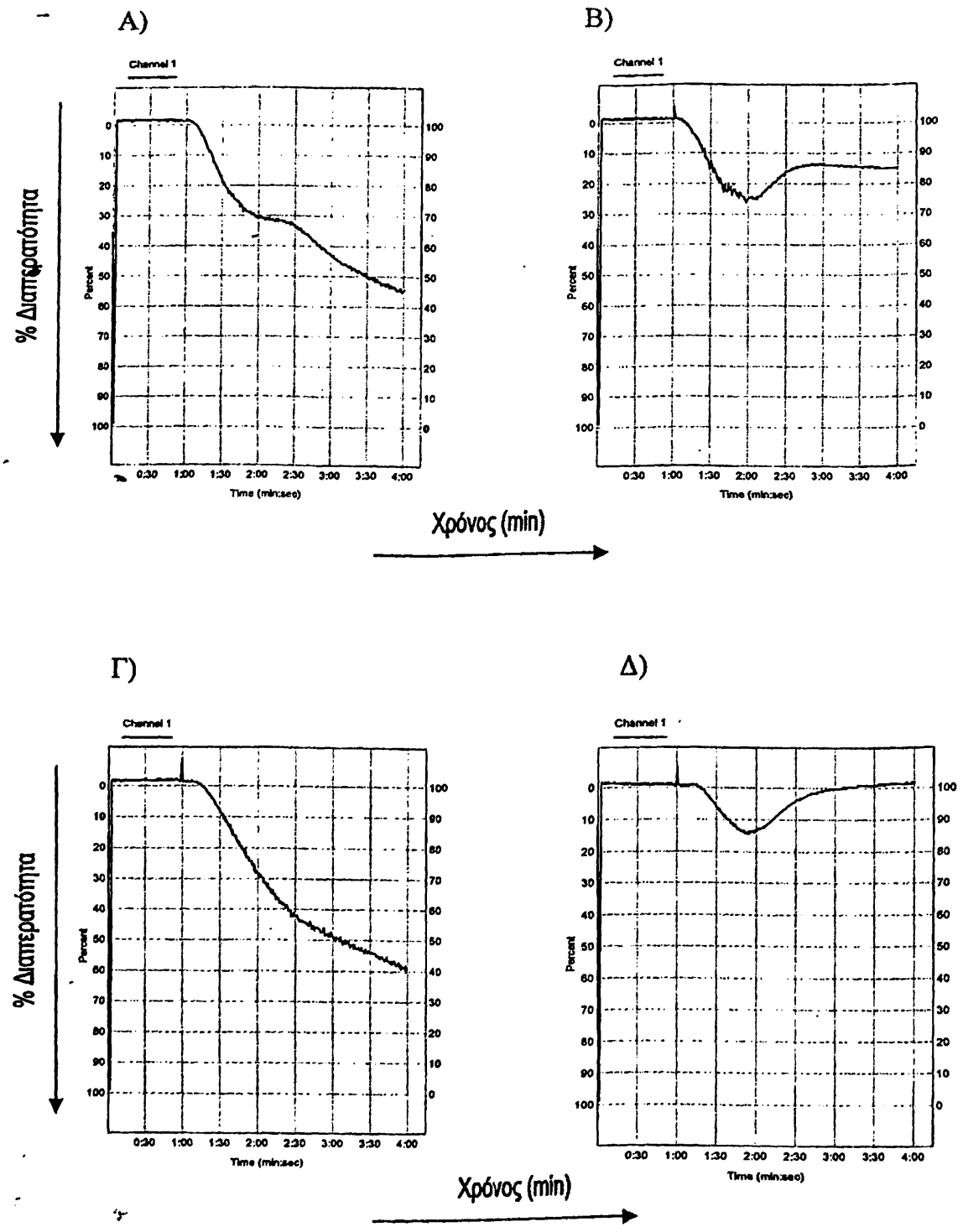


Εικόνα 26. *Αντιπροσωπευτικό κυτταρομετρικό προφίλ της αναστολής της πρόσδεσης του PAC-1 από την Lp(a) (40 μg πρωτεΐνης/ml), αιμοπεταλίων σε PRP τα οποία ενεργοποιήθηκαν με PAF παρουσία CP/CPK και ασπιρίνης. A: αιμοπετάλια, A/Lp(a): αιμοπετάλια παρουσία Lp(a), E: ενεργοποιημένα αιμοπετάλια, E/Lp(a): ενεργοποιημένα αιμοπετάλια παρουσία Lp(a).*

Ιδιαίτερα η αναστολή της δευτερογενούς συσσώρευσης μπορεί να οφείλεται: i) είτε στο ότι η λιποπρωτεΐνη αυτή αναστέλλει την δράση ενδογενώς παραγόμενων αγωνιστών (ADP και TxA_2) αφότου αυτοί εκκριθούν, ii) είτε ότι αναστέλλει την έκκριση των αγωνιστών αυτών, iii) είτε και τα δύο. Για να διερευνήσουμε περαιτέρω τον τρόπο με τον οποίο η Lp(a) αναστέλλει την δευτερογενή συσσώρευση εξετάστηκε η δράση της σε αιμοπετάλια τα οποία ενεργοποιήθηκαν με έναν από τους εκκρινόμενους αγωνιστές (ADP). Παράλληλα χρησιμοποιήθηκε και ο αγωνιστής των αιμοπεταλίων TRAP (thrombin receptor activating peptide) το οποίο αποτελεί το 14/πεπτίδιο ενεργοποίησης του υποδοχέα της θρομβίνης και το οποίο χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας, αφού η δράση του είναι ανεξάρτητη αυτής του εκκρινόμενου ADP.



Εικόνα 27. Αναστολή της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων σε PRP από την Lp(a), μετά από ενεργοποίηση με ADP, TRAP.



Εικόνα 28. Επίδραση της Lp(a) στην συσσώρευση των αιμοπεταλίων σε PRP μετά από ενεργοποίηση με ADP (A, B), TRAP (Γ, Δ).

A) PBS (τυφλό).

B) Lp(a) 80 μg πρωτεΐνης/ml.

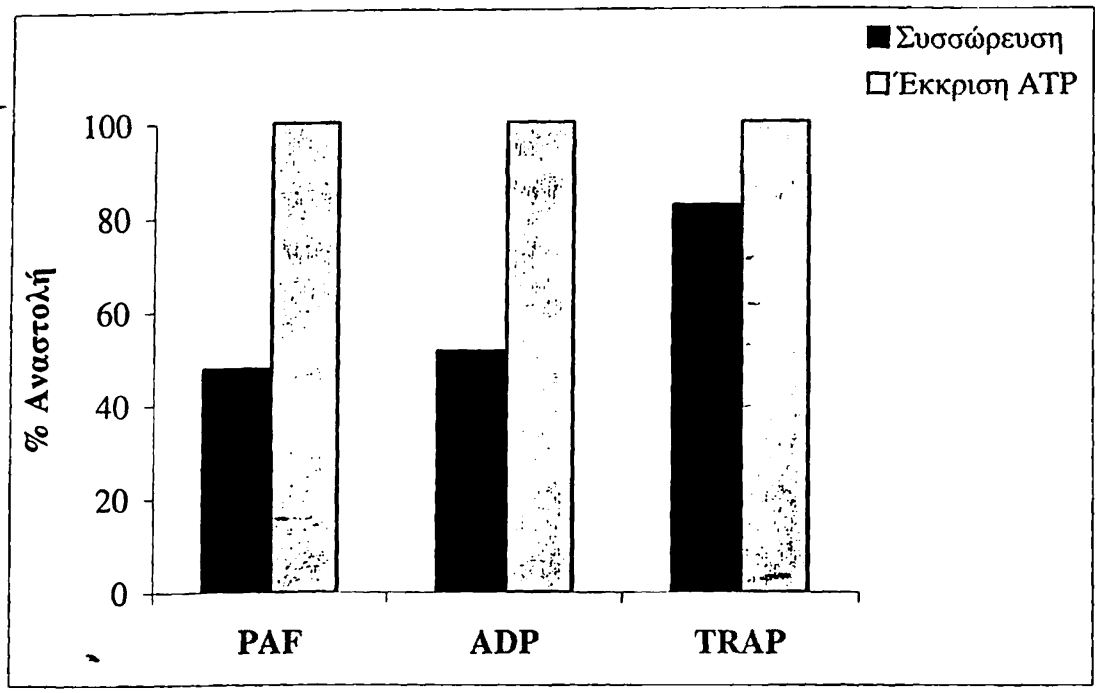
Γ) PBS (τυφλό).

Δ) Lp(a) 80 μg πρωτεΐνης/ml.

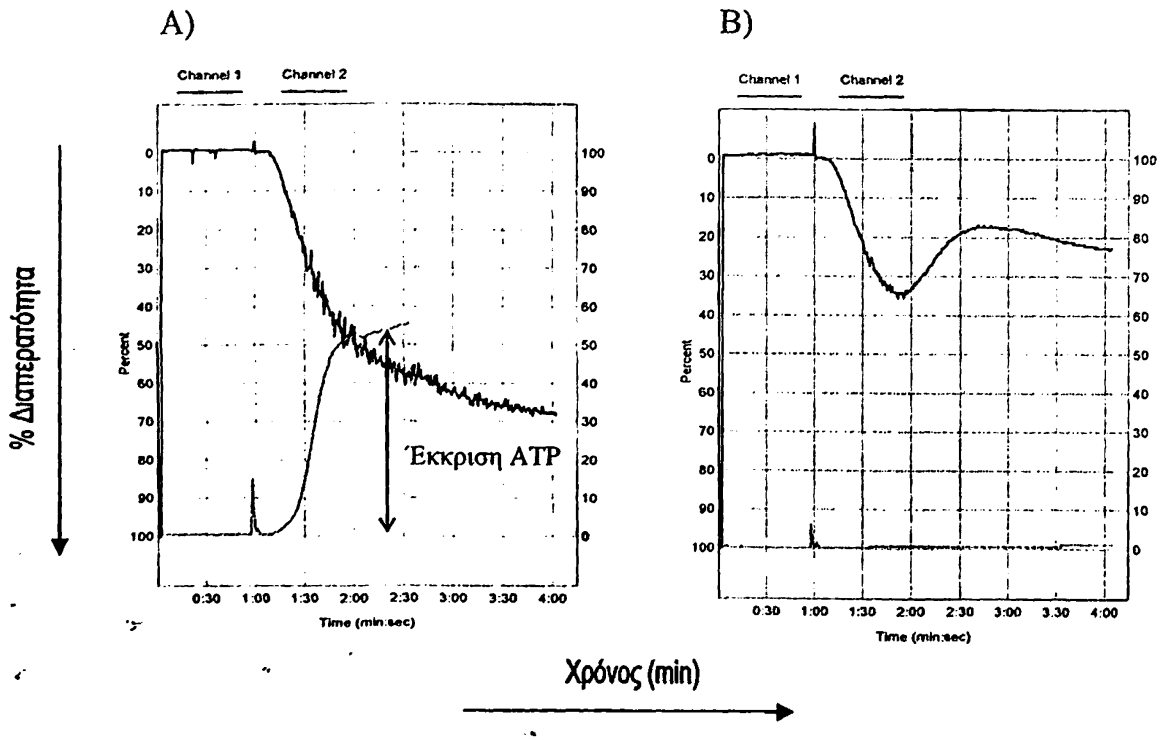
Παρουσία της Lp(a) παρατηρήθηκε μια δοσοεξαρτώμενη αναστολή της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων, τα οποία ενεργοποιήθηκαν με ADP (1 μM), με την μεγαλύτερη ανασταλτική δράση αυτής να αντιστοιχεί στην μεγαλύτερη συγκέντρωση (80 μg πρωτεΐνης/ml) και ήταν της τάξης του 44.6%. Επιπλέον, στην συγκέντρωση αυτή η Lp(a) παρουσίασε αναστολή της τάξης του 75.0% σε αιμοπετάλια που ενεργοποιήθηκαν με TRAP (2.4 μM) (εικόνες 27, 28). Η ενεργοποίηση με ADP ή TRAP οδήγησε σε μη αντιστρεπτή συσσώρευση των αιμοπεταλίων γεγονός το οποίο (όπως και στην περίπτωση ενεργοποίησης με PAF) δεν παρατηρήθηκε παρουσία της Lp(a). Από τα αποτελέσματα αυτά φαίνεται ότι η Lp(a) αναστέλλει την δράση του ADP, ενώ παράλληλα μπορεί και αναστέλλει και την δράση του TRAP στην συσσώρευση των αιμοπεταλίων.

Στη συνέχεια θελήσαμε να διερευνήσουμε κατά πόσο η Lp(a) αναστέλλει την έκκριση του ATP η οποία προκαλείται από τον PAF (το οποίο βρίσκεται αποθηκευμένο στα πυκνά κοκκία των αιμοπεταλίων και η έκκριση του οποίου αποτελεί δείκτη της ενεργοποιήσεως των κυττάρων αυτών). Με δεδομένο ότι η συγκέντρωση των 80 μg πρωτεΐνης/ml είναι αυτή η οποία παρουσίασε την μεγαλύτερη ανασταλτική δράση της Lp(a) στην συσσώρευση των αιμοπεταλίων, έγινε έλεγχος αυτής και στην πιθανή επιδρασή της στην έκκριση του ATP.

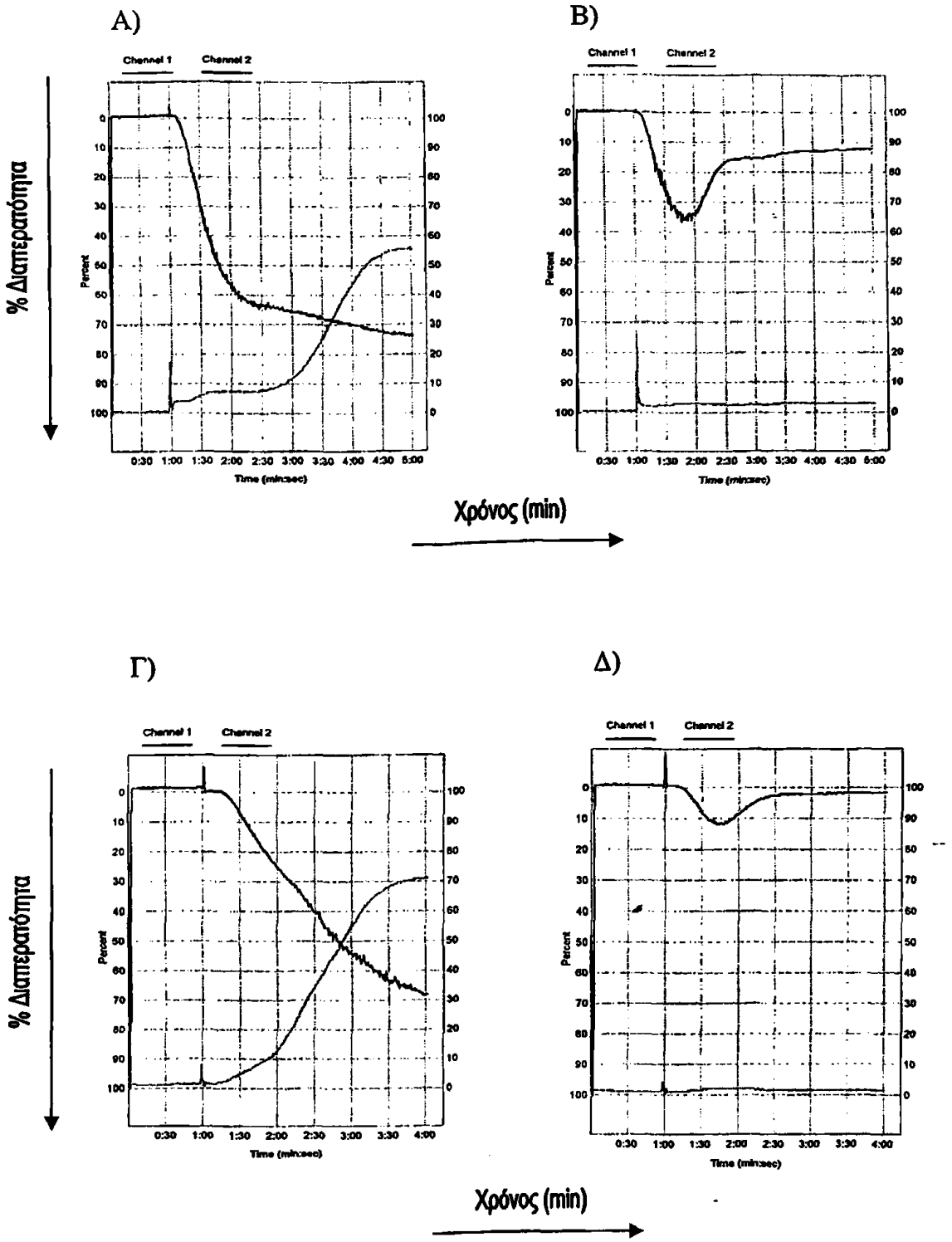
Η Lp(a) στην συγκεκριμένη συγκέντρωση παρουσίασε πλήρη αναστολή (100%) της έκκρισης του ATP από τα πυκνά κοκκία αιμοπεταλίων που ενεργοποιήθηκαν με PAF. Το αποτέλεσμα αυτό δεν εξειδικευμένο έναντι της δράσης του αγωνιστή αυτού στα αιμοπετάλια αφού παρόμοια αναστολή (100%) παρατηρήθηκε και όταν σαν αγωνιστές χρησιμοποιήθηκαν ADP και TRAP. Η αναστολή της έκκρισης συνοδεύτηκε από παράλληλη αναστολή της συσσώρευσης (47.8% με PAF, 51.4% με ADP, 82.4% με TRAP) η οποία ήταν μεγαλύτερη σε αιμοπετάλια τα οποία ενεργοποιήθηκαν με TRAP (εικόνες 29-31).



Εικόνα 29. Αναστολή της συσσώρευσης και της έκκρισης ATP αιμοπεταλίων σε PRP από την Lp(a) (80 μg πρωτεΐνης/ml), μετά από ενεργοποίηση με PAF, ADP και TRAP.



Εικόνα 30. Επίδραση της Lp(a) στην συσσώρευση και στην έκκριση του ATP αιμοπεταλίων σε PRP μετά από ενεργοποίηση με PAF . A) PBS (τυφλό), B) Lp(a) 80 μg πρωτεΐνης/ml.



Εικόνα 31. Επίδραση της Lp(a) στην συσσώρευση και στην έκκριση του ATP αιμοπεταλίων σε PRP μετά από ενεργοποίηση με ADP (A, B), TRAP (Γ, Δ).

A) PBS (τυφλό).

B) Lp(a) 80 μg πρωτεΐνης/ml.

Γ) PBS (τυφλό).

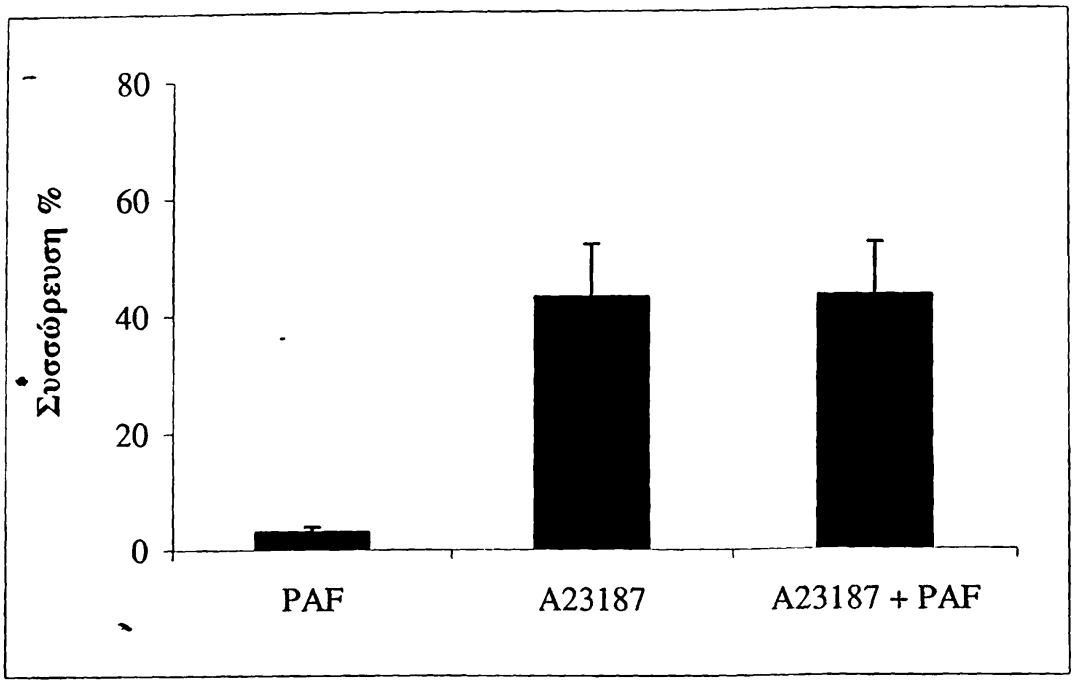
Δ) Lp(a) 80 μg πρωτεΐνης/ml.

Συμπερασματικά, η Lp(a) αναστέλλει την έκκριση του ADP που προκαλείται από τον PAF, ενώ επίσης αναστέλλει και την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων που προκαλείται από το ADP. Στηριζόμενοι στο εύρημα ότι η Lp(a) αναστέλλει την συσσώρευση αλλά και την έκκριση από το TRAP συνάγεται το συμπέρασμα ότι η λιποπρωτεΐνη αυτή αναστέλλει την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων με ένα γενικό μηχανισμό ο οποίος είναι ανεξάρτητος από το είδος του αγωνιστή που χρησιμοποιείται αφού παρουσία PAF, ADP και TRAP προκάλεσε σημαντική αναστολή της συσσώρευσης αλλά και της έκκρισης του ATP. Όσο αφορά τον PAF η Lp(a) μπορεί και παρεμβαίνει στην δευτερογενή συσσώρευση, δράση η οποία αποδίδεται στην ικανότητα της λιποπρωτεΐνης αυτής να αναστέλλει αφενός μεν την έκκριση αλλά και την συσσώρευση που προκαλεί ο ενδογενώς παραγόμενος αγωνιστής (ADP).

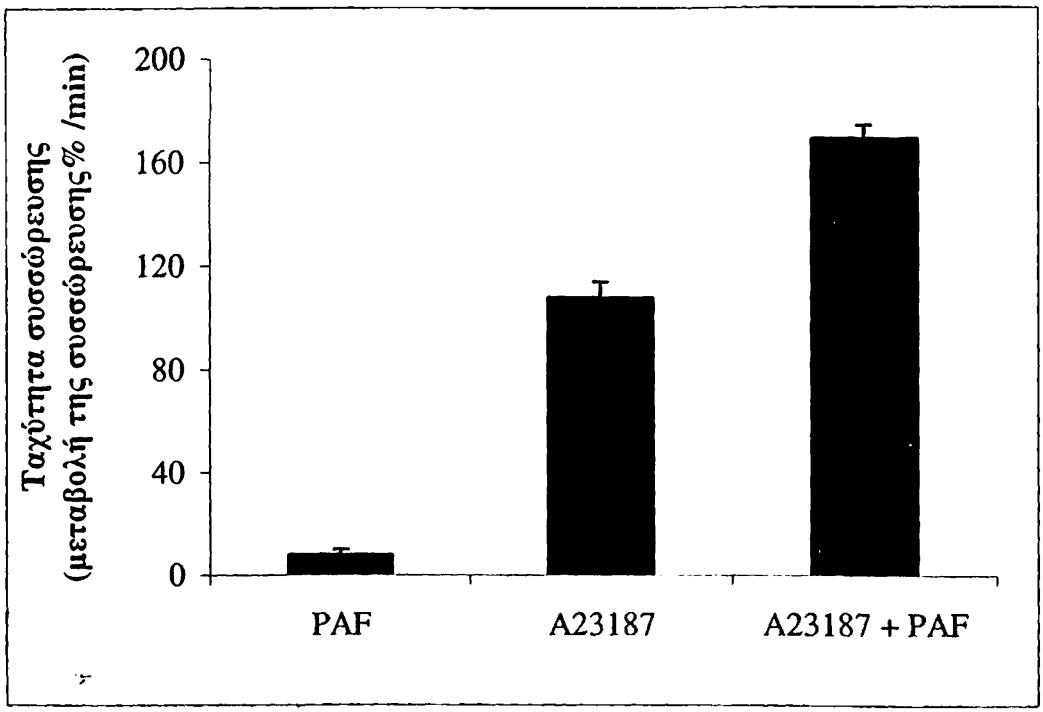
Επίδραση της Lp(a) στη συσσώρευση πλυμένων αιμοπεταλίων από τον PAF

Στην συνέχεια θελήσαμε να διερευνήσουμε ποια από τα συστατικά της Lp(a) είναι υπεύθυνα για την βιολογική της δράση. Επικεντρώσαμε το ενδιαφέρον μας στο ρόλο της PAF-AH η οποία διαφοροποιεί την δράση Lp(a) ως προς τον PAF αλλά και στην συνεισφορά της apo(a), η οποία αποτελεί χαρακτηριστικό συστατικό της Lp(a) το οποίο διαφοροποιεί την λιποπρωτεΐνη αυτή από την LDL. Για το σκοπό αυτό έγινε παρασκευή πλυμένων αιμοπεταλίων τα οποία, σε αντίθεση με το PRP το οποίο προσομοιάζει με τις *in vivo* συνθήκες, επιτρέπουν την εξειδικευμένη μελέτη της δράσης της Lp(a) αλλά και των επιμέρους δομικών συστατικών στα κύτταρα αυτά, αφού σύμφωνα με την παρασκευή αυτή παίρνουμε αιμοπετάλια που είναι απαλλαγμένα από τα υπόλοιπα συστατικά του πλάσματος. Αρχικά έγινε ενεργοποίηση με PAF ο οποίος όμως δεν αποτέλεσε ισχυρό αγωνιστή για τα αιμοπετάλια αυτά, αφού ακόμα και σε συγκέντρωση 50 nM προκάλεσε μέγιστη συσσώρευση της τάξης του 3±1% ενώ η ταχύτητα της συσσώρευσης που αντιστοιχεί στην μεταβολή της συσσώρευσης % /min ήταν 8±2 (εικόνες 32, 33). Με δεδομένο ότι ο PAF δεν προκαλεί ισχυρή ενεργοποίηση αιμοπεταλίων που έχουν παρασκευαστεί με το συγκεκριμένο τρόπο, σε επόμενες παρασκευές πλυμένων αιμοπεταλίων έγινε

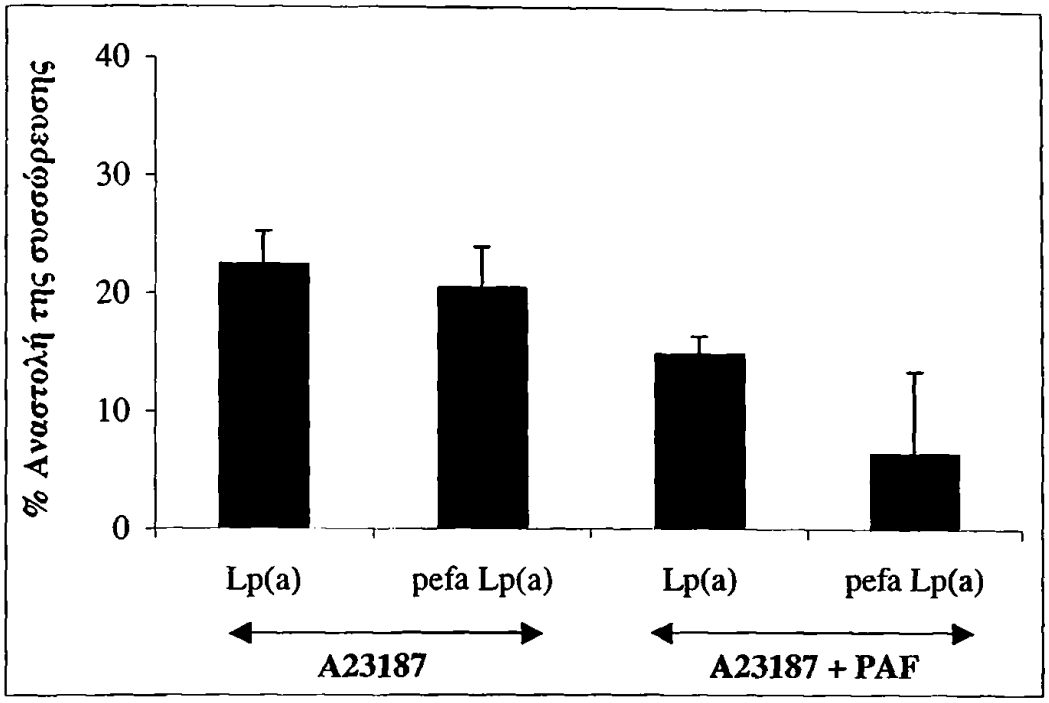
ενεργοποίηση με A23187 το οποίο αποτελεί τον ιονοφόρο του Ca^{2+} σε τελική συγκέντρωση 4.9 μM. Παρουσία του A23187 παρατηρήθηκε μέγιστη συσσώρευση των αιμοπεταλίων της τάξης του 43±9% και ταχύτητα συσσώρευσης 108±6 (εικόνες 32, 33). Παρουσία της Lp(a) (60 μg πρωτεΐνης/ml) παρατηρήθηκε αναστολή της συσσώρευσης καθώς και της ταχύτητας αυτής κατά 22.4±2.8% και 54.5±1.9% αντίστοιχα. Όταν έγινε προηγούμενη απενεργοποίηση της ενδογενούς PAF-AH της Lp(a) [pefa Lp(a)] οι αντίστοιχες αναστολές που παρατηρήθηκαν ήταν 20.4±3.5% και 48.2±5.2% (εικόνες 34, 34), ένδειξη ότι η PAF-AH της Lp(a) δεν διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην ανασταλτική δράση της Lp(a) ως προς την συσσώρευση από το ιονοφόρο A23187. Όταν σαν αγωνιστής χρησιμοποιήθηκαν συνεργειακά A23187 (4.9 μM) και PAF (50 nM) το μέγιστο της συσσώρευσης παρέμεινε αμετάβλητο (43±9%) ενώ παρατηρήθηκε αύξηση της ταχύτητας με την οποία αυτή επιτυγχάνεται (169±5) (εικόνες 32, 33). Παρουσία της Lp(a) παρατηρήθηκε μείωση της αναστολή της συσσώρευσης (14.9±1.5%) σε σχέση με αυτή που παρατηρήθηκε όταν χρησιμοποιήθηκε μόνο του το A23187, ενώ το ίδιο φαινόμενο παρατηρήθηκε και για το σωματίδιο την pefa Lp(a) (αναστολή 6.4±7.1%, εικόνα 34). Επίσης υπήρξε μείωση και στην αναστολή της ταχύτητα της συσσώρευσης και για τα δύο σωματίδια [27.9±2.0% για την Lp(a) και 22.4±4.5% για την pefa Lp(a), εικόνα 35). Συνεπώς, από τα αποτελέσματα αυτά προκύπτει ότι η PAF-AH δεν επηρεάζει σημαντικά την ανασταλτική δράση της Lp(a) ως προς την συσσώρευση από τον PAF.



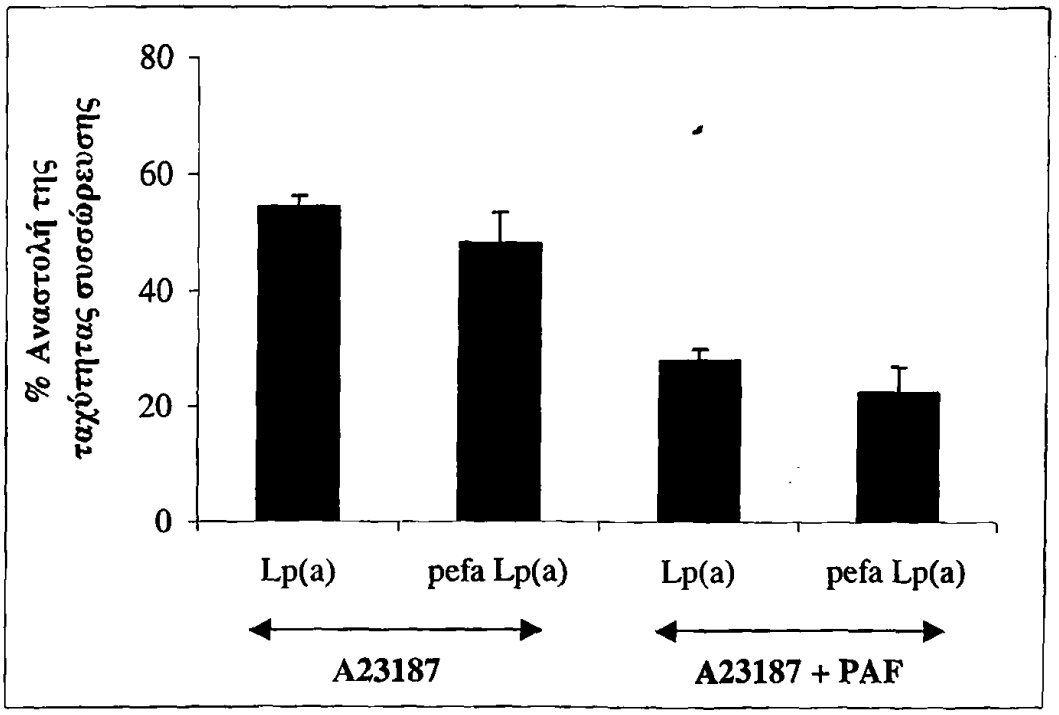
Εικόνα 32. Ενεργοποίηση πλυμένων αιμοπεταλίων παρουσία PAF και A23187.



Εικόνα 33. Ενεργοποίηση πλυμένων αιμοπεταλίων παρουσία PAF και A23187.



Εικόνα 34. Αναστολή της συσσώρευσης πλυμένων αιμοπεταλίων από τις Lp(a), pefa Lp(a) (60 μg πρωτεΐνης/ml) μετά από ενεργοποίηση με PAF, A23187.

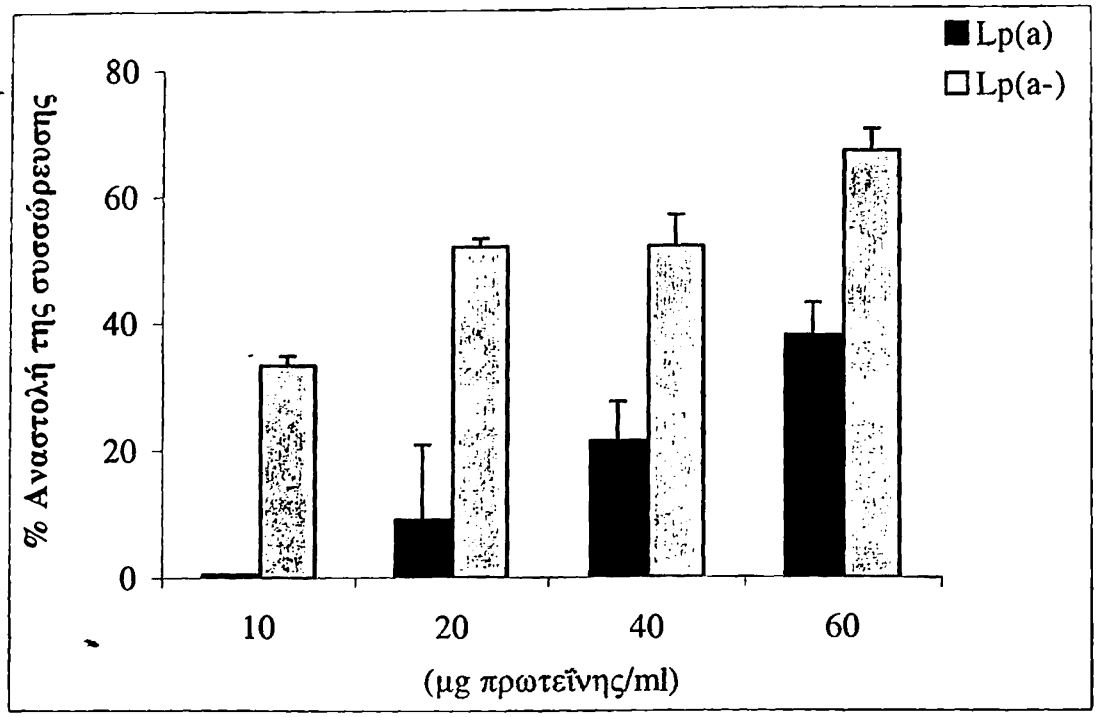


Εικόνα 35. Αναστολή της ταχύτητας συσσώρευσης πλυμένων αιμοπεταλίων από τις Lp(a), pefa Lp(a) (60 μg πρωτεΐνης/ml) μετά από ενεργοποίηση με PAF, A23187.

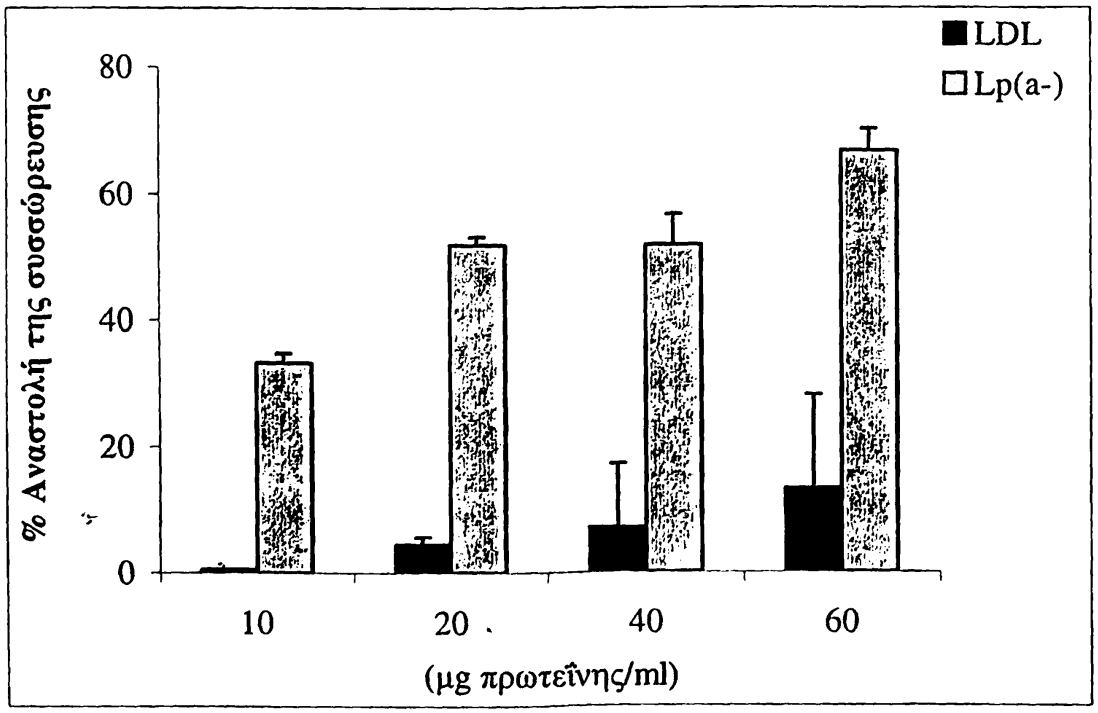
Μια μέθοδος παρασκευής ανθρώπινων πλυμένων αιμοπεταλίων ευαίσθητων στην επίδραση του PAF είναι αυτή που προτάθηκε από τους Lotner και συν. (248) και η οποία στηρίζεται στην απομόνωση αιμοπεταλίων παρουσία ερυθροκυττάρων. Πράγματι, συγκεντρώσεις PAF 5-10 nM (ανάλογα με την ευαισθησία των αιμοπεταλίων) προκάλεσαν μέγιστη συσσώρευση της τάξης του 35±5% (εικόνα 38Α). Σε πλυμένα αιμοπετάλια που παρασκευάστηκαν με αυτό τον τρόπο η Lp(a) (10-60 μg πρωτεΐνης/ml) ανέστειλε με δοσοεξαρτώμενο τρόπο την συσσώρευση αυτών με την μέγιστη συγκέντρωση αυτής (60 μg πρωτεΐνης/ml) να παρουσιάζει την μεγαλύτερη ανασταλτική δράση (37.8±5.1%) (εικόνες 36, 38Β). Απενεργοποίηση της ενδογενούς PAF-AH δεν διαφοροποίησε την ανασταλτική δράση της Lp(a). Στη συνέχεια για να διερευνήσουμε τον πιθανό ρόλο της apo(a) στην ανασταλτική δράση της Lp(a) παρασκευάστηκε Lp(a-) δηλαδή λιποοπρωτεΐνη χωρίς την apo(a). Βρέθηκε ότι το λιποπρωτεϊνικό αυτό σωματίδιο, όχι μόνο διατήρησε την δράση της Lp(a) αλλά ήταν ικανό να αναστείλει ακόμη εντονότερα την συσσώρευση (αναστολή της συσσώρευσης 66.7±3.5% για την συγκέντρωση των 60 μg πρωτεΐνης/ml, εικόνες 36, 37, 38Γ). Παράλληλα, σε σύγκριση με την Lp(a) μελετήθηκε και η δράση της LDL, η οποία μοιάζει δομικά με την Lp(a-), με σκοπό να διαπιστωθεί (με έμμεσο τρόπο) η συνεισφορά της apo(a) στην ανασταλτική δράση που παρουσιάζει το σωματίδιο της Lp(a). Δεν παρατηρήθηκε ανάλογη ανασταλτική δράση για το σωματίδιο της LDL στο ίδιο εύρος συγκέντρωσης με αυτό της Lp(a) αλλά και της Lp(a-) (εικόνες 37, 38Δ). Η αναστολή της συσσώρευσης για την LDL στην συγκέντρωση των 60 μg πρωτεΐνης/ml ήταν της τάξης του 13.3±14.8% η οποία είναι αρκετά μικρότερη των αντίστοιχων της Lp(a) και Lp(a-) στην ίδια συγκέντρωση (37.8±5.1% και 66.7±3.5%). Παρόμοια αποτελέσματα ελήφθησαν όταν οι συγκεντρώσεις των Lp(a), Lp(a-) και LDL, εξαιτίας του διαφορετικού πρωτεϊνικού περιεχομένου τους, εκφράστηκαν σαν μg λιποπρωτεϊνικής μάζας /ml. Με βάση τα αποτελέσματα αυτά φαίνεται ότι η ανασταλτική δράση της Lp(a) ως προς τον PAF οφείλεται σε ξεχωριστά δομικά χαρακτηριστικά που έχει το σωματίδιο της Lp(a-) και η εκδήλωση των οποίων παρεμποδίζεται παρουσία της apo(a) αλλά και διαφοροποιούνται σε σχέση με την LDL.

Στην συνέχεια, όπως και στην περίπτωση του PRP, διερευνήθηκε με χρήση κυτταρομετρίας ροής η επίδραση της Lp(a) στην έκφραση του αιμοπεταλιακού υποδοχέα $\alpha_{IIb}\beta_3$ μετά από ενεργοποίηση με PAF. Όπως φαίνεται στις εικόνες 39-42

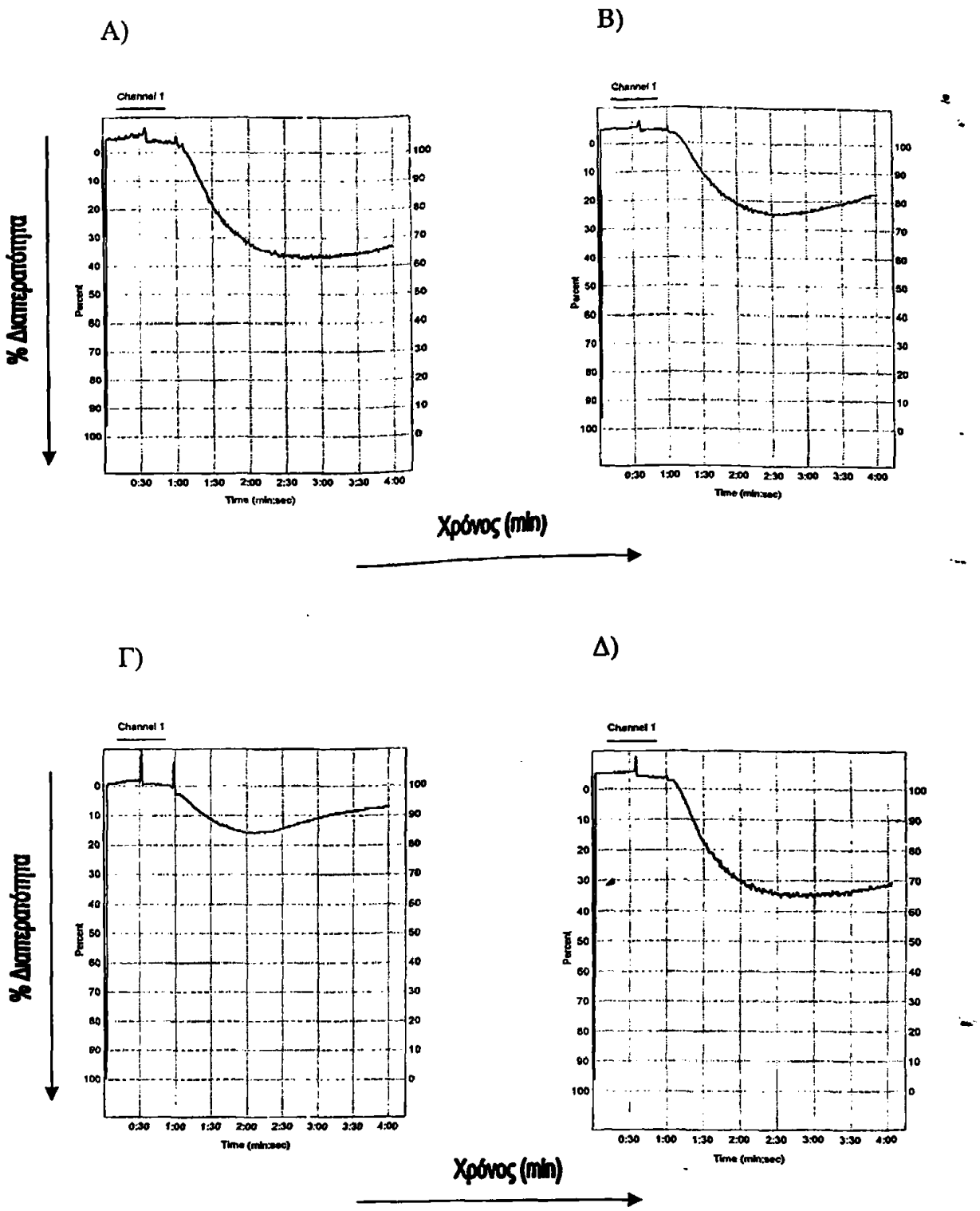
σε αιμοπετάλια τα οποία ενεργοποιήθηκαν με PAF 80 nM Lp(a), Lp(a-) και LDL σωματίδια σε συγκέντρωση που παρουσίασαν μέγιστη ανασταλτική δράση στα πειράματα της συσσωρευομετρίας (60 μg πρωτεΐνης/ml) ήταν επίσης ικανά να αναστείλουν (σε διαφορετικό βαθμό το καθένα) και την έκφραση του υποδοχέα $\alpha_{IIb}\beta_3$. Συγκεκριμένα, η Lp(a) προκάλεσε αναστολή της τάξης του 59.6±13.7%. Η δράση αυτή ήταν εντονότερη όταν απομακρύνθηκε η apo(a) [Lp(a-), 94.7±4.5%]. Αντίθετα, αρκετά μικρότερη αναστολή του $\alpha_{IIb}\beta_3$ παρουσίασε η LDL (21.5±30.4%). Τα παραπάνω αποτελέσματα της αναστολής από τα λιποπρωτεϊνικά σωματίδια Lp(a), Lp(a-) και LDL της έκφρασης του $\alpha_{IIb}\beta_3$ που προκαλεί ο PAF, είναι σε συμφωνία με τα αποτελέσματα της συσσωρευομετρίας.



Εικόνα 36. *Δοσοεξαρτώμενη αναστολή της συσσώρευσης πλυμένων αιμοπεταλίων κατά Lotner από τις Lp(a), Lp(a-) μετά από ενεργοποίηση με PAF.*



Εικόνα 37. *Δοσοεξαρτώμενη αναστολή της συσσώρευσης πλυμένων αιμοπεταλίων κατά Lotner από τις LDL, Lp(a-) μετά από ενεργοποίηση με PAF.*



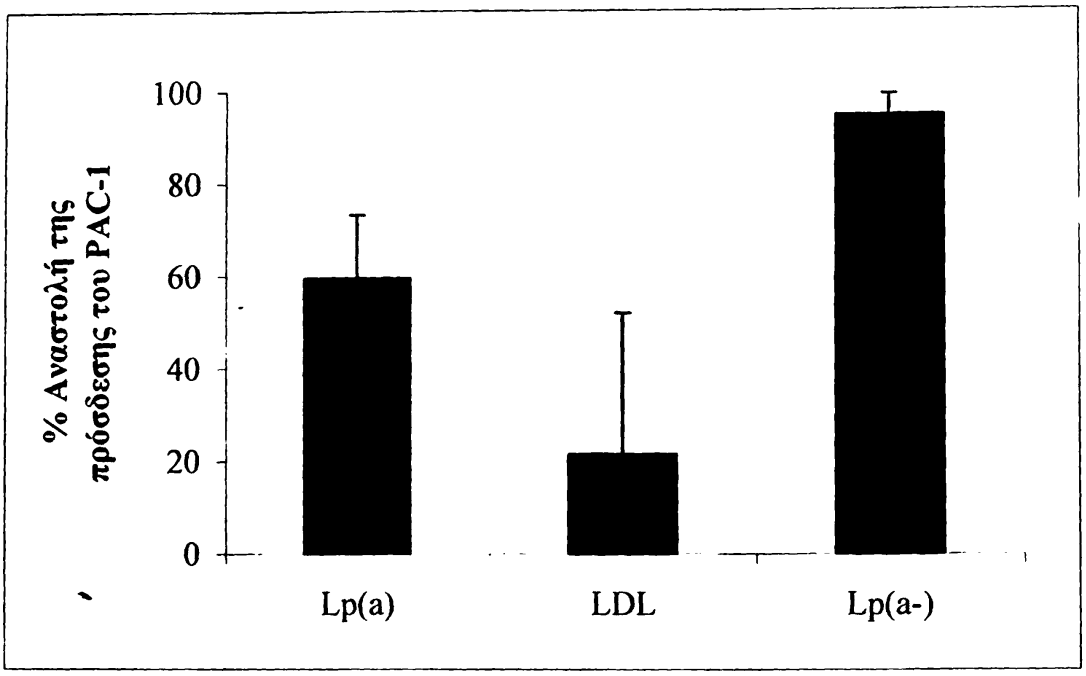
Εικόνα 38. Επίδραση των Lp(a), LDL, Lp(a-), στην συσσώρευση πλυμένων αιμοπεταλίων κατά Lotner, μετά από ενεργοποίηση με PAF.

Α) PBS (τυφλό).

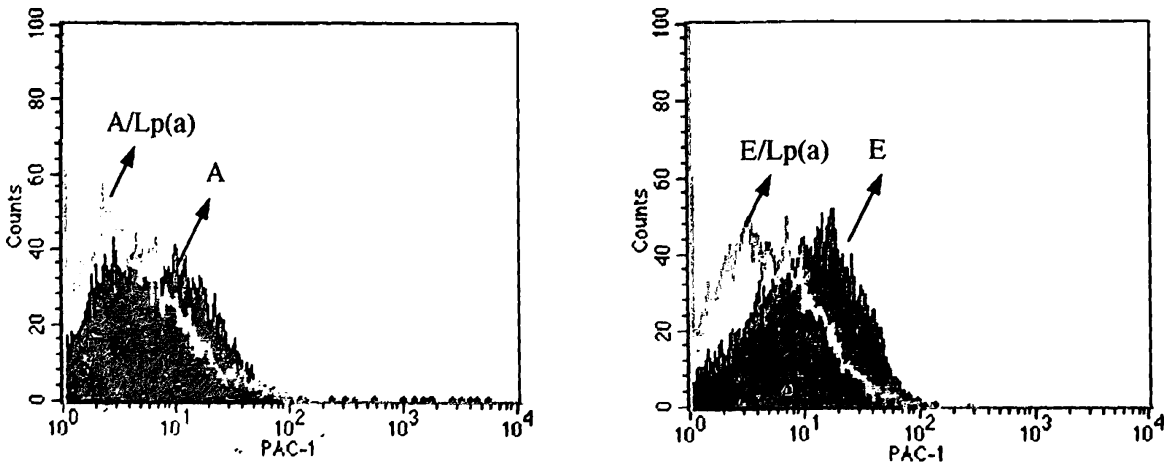
Β) Lp(a) (60 μg πρωτεΐνης/ml).

Γ) Lp(a-) (60 μg πρωτεΐνης/ml).

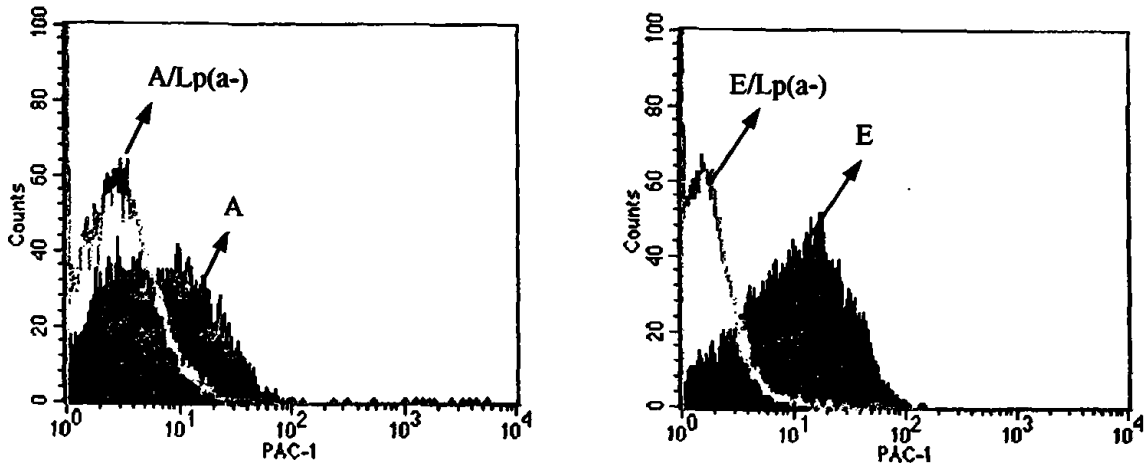
Δ) LDL (60 μg πρωτεΐνης/ml).



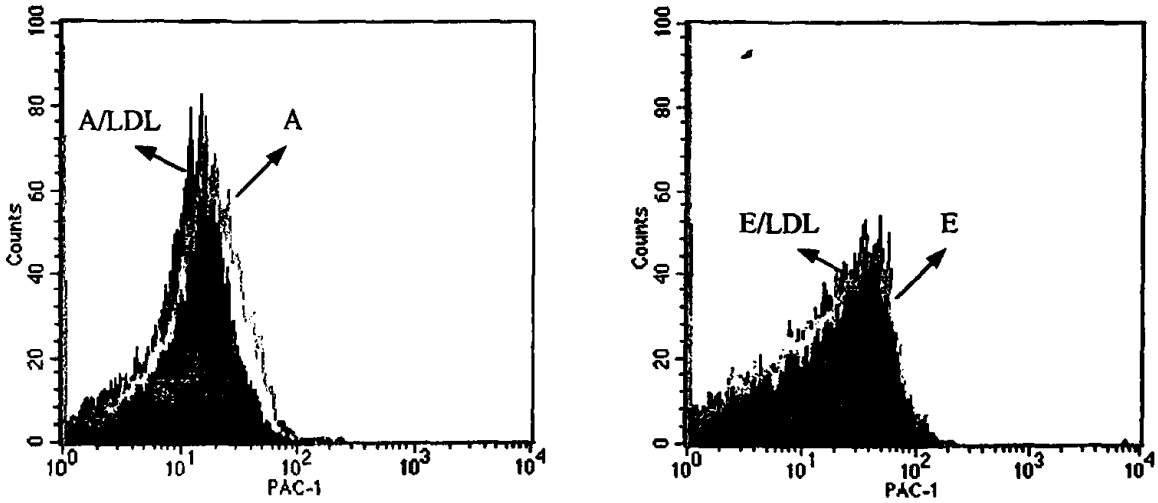
Εικόνα 39. *Αναστολή της έκφρασης του υποδοχέα $\alpha_{IIb}\beta_3$ από τις Lp(a), LDL, Lp(a-) (60 μg πρωτεΐνης/ml) πλυμένων αιμοπεταλίων κατά Lotner μετά από ενεργοποίηση με PAF.*



Εικόνα 40. *Αντιπροσωπευτικό κυτταρομετρικό προφίλ της αναστολής της πρόσδεσης του PAC-1 από την Lp(a) (60 μg πρωτεΐνης/ml), πλυμένων αιμοπεταλίων κατά Lotner τα οποία ενεργοποιήθηκαν με PAF. A: αιμοπετάλια, A/Lp(a): αιμοπετάλια παρουσία Lp(a), E: ενεργοποιημένα αιμοπετάλια, E/Lp(a): ενεργοποιημένα αιμοπετάλια παρουσία Lp(a).*



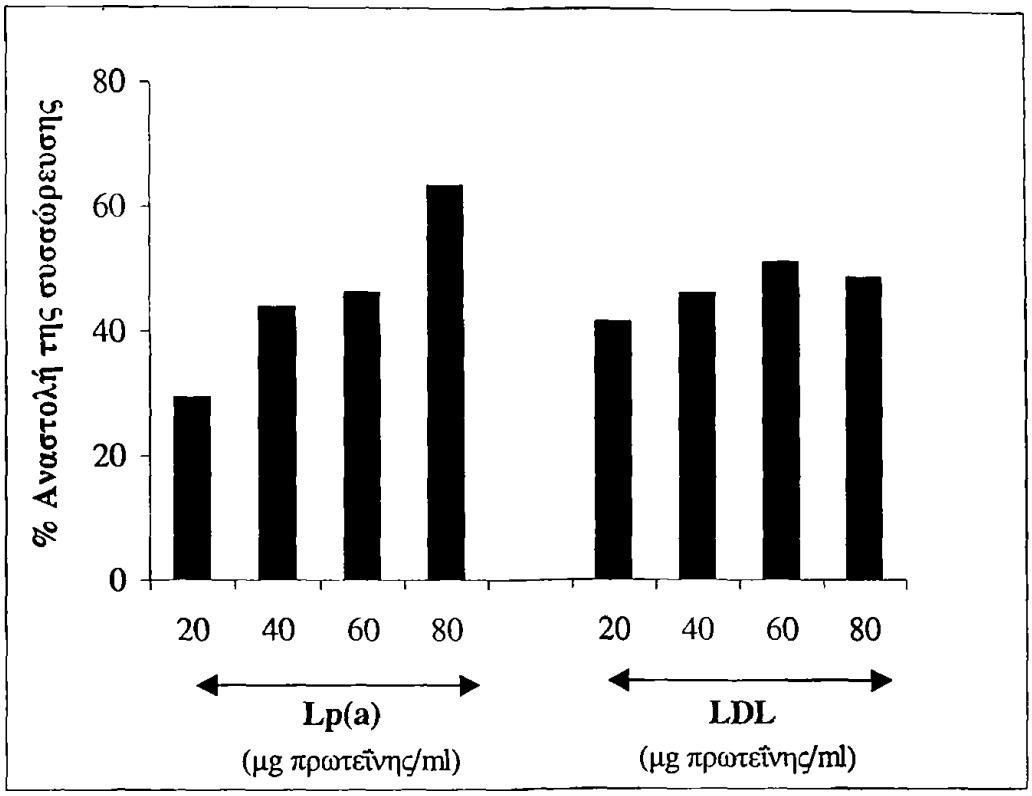
Εικόνα 41. *Αντιπροσωπευτικό κυτταρομετρικό προφίλ της αναστολής της πρόσδεσης του PAC-1 από την Lp(a-) (60 μg πρωτεΐνης/ml), πλυμένων αιμοπεταλίων κατά Lotner τα οποία ενεργοποιήθηκαν με PAF. A: αιμοπετάλια, A/Lp(a-): αιμοπετάλια παρουσία Lp(a-), E: ενεργοποιημένα αιμοπετάλια, E/Lp(a-): ενεργοποιημένα αιμοπετάλια παρουσία Lp(a-).*



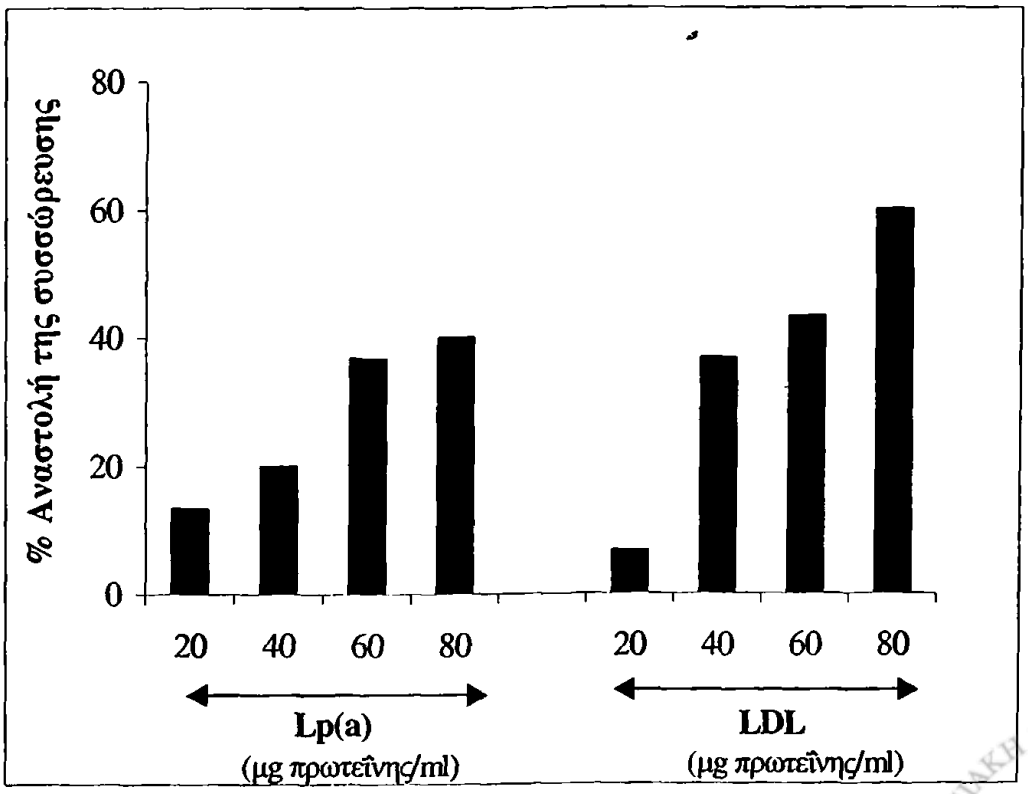
Εικόνα 42. *Αντιπροσωπευτικό κυτταρομετρικό προφίλ της αναστολής της πρόσδεσης του PAC-1 από την LDL (60 μg πρωτεΐνης/ml), πλυμένων αιμοπεταλίων κατά Lotner τα οποία ενεργοποιήθηκαν με PAF. A: αιμοπετάλια, A/LDL: αιμοπετάλια παρουσία LDL, E: ενεργοποιημένα αιμοπετάλια, E/LDL: ενεργοποιημένα αιμοπετάλια παρουσία LDL.*

Για να διαπιστωθεί αν η ανασταλτική δράση της Lp(a), στα πλυμένα αιμοπετάλια, αφορά μόνο τον PAF ή αποτελεί γενικότερο λειτουργικό χαρακτηριστικό της λιποπρωτεΐνης αυτής εξετάστηκε η πιθανή επιδρασή της στην ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων αυτών με τον υδατοδιαλυτό αγωνιστή TRAP. Σε πλυμένα, κατά Lotner, αιμοπετάλια η Lp(a) ανέστειλε με δοσοεξαρτώμενο τρόπο την συσσώρευση που προκαλεί ο συγκεκριμένος αγωνιστής (TRAP 20 μM) προκαλώντας αντιστρεπτή συσσώρευση. Παρόμοια δράση παρουσίασε και το σωματίδιο της LDL ίδιο μοντέλο αιμοπεταλίων, ένδειξη ότι η apo(a) δεν παίζει κάποιο ρόλο στην βιολογική (ανασταλτική) δράση της Lp(a). Μάλιστα οι παρατηρούμενες αναστολές είναι μεγαλύτερες αυτών που παρατηρήθηκαν, και για τα δύο σωματίδια, παρουσία PAF. Έτσι, στην συγκέντρωση των 80 μg πρωτεΐνης/ml η αναστολή που παρατηρήθηκε για την Lp(a) ήταν της τάξης του 63.4% ενώ για την LDL 48.8% (εικόνες 43, 45). Για την συγκεκριμένη συγκέντρωση, και για τα δύο λιποπρωτεϊνικά σωματίδια, ανάλογη ήταν και η αναστολή της έκφρασης του $\alpha_{IIb}\beta_3$ αιμοπεταλίων μετά από ενεργοποίηση με TRAP 50-100 μM (40.3±5.6% για την Lp(a) και 51.1±1.8% για την LDL) (εικόνες 47, 49, 50).

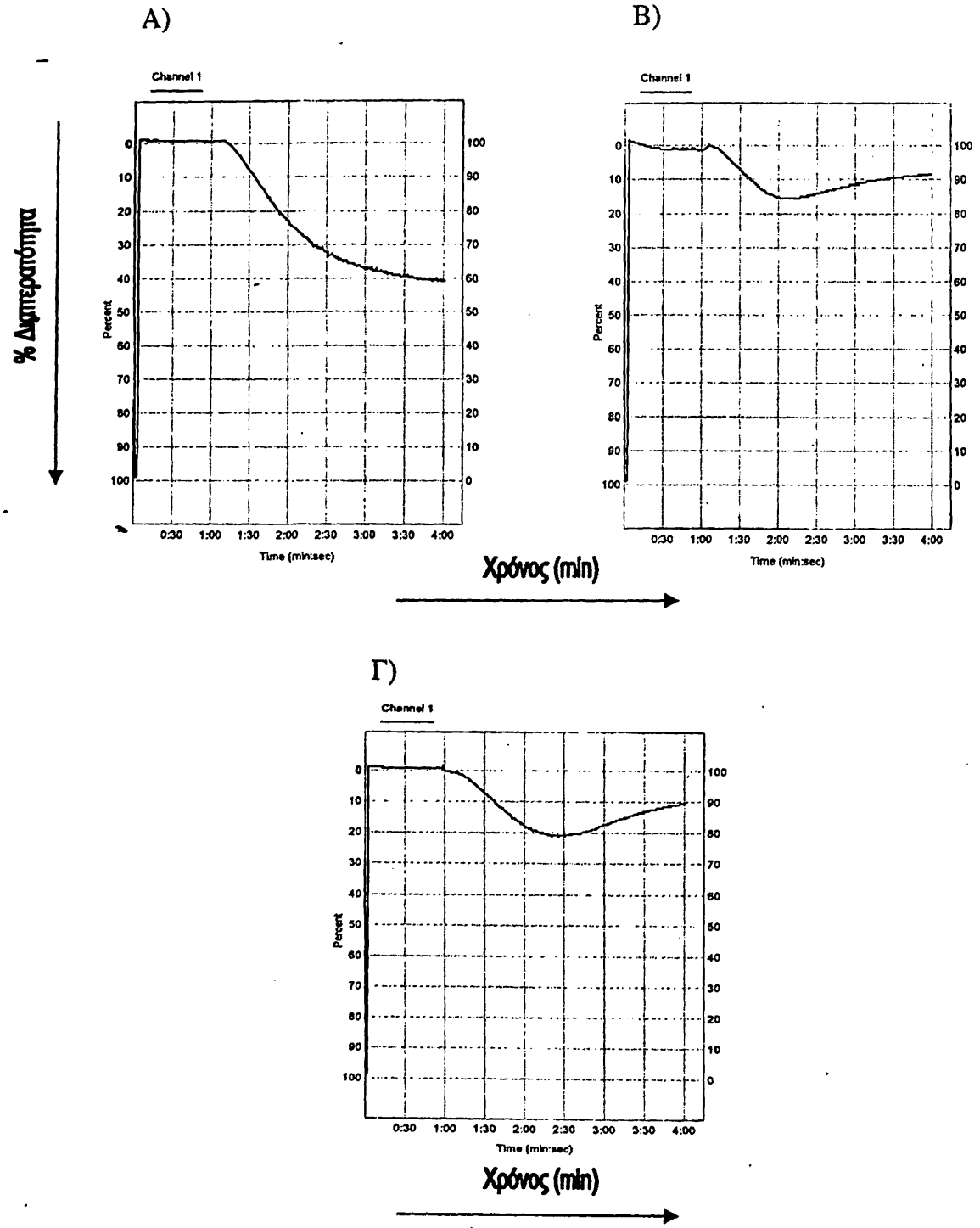
Το ίδιο φαινόμενο παρατηρήθηκε και στο "κλασικό" σύστημα πλυμένων αιμοπεταλίων που ενεργοποιήθηκαν με TRAP τελικής συγκέντρωσης 30 μM. Υπήρξε δοσοεξαρτώμενη αναστολή της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων από το σωματίδιο της Lp(a), ενώ το ίδιο φαινόμενο παρατηρήθηκε και για αυτό της LDL. Η μεγαλύτερη αναστολή βρέθηκε να αντιστοιχεί στην συγκέντρωση των 80 μg πρωτεΐνης/ml και ήταν 40.0% για την Lp(a), ενώ για η αντίστοιχη για την LDL ήταν 60.0% (εικόνες 44, 46). Σε συμφωνία με τα αποτελέσματα της συσσωρευομετρίας ήταν και αυτά που ελήφθησαν σε μετέπειτα πειράματα κυτταρομετρίας (εικόνες 48, 51, 52). Συγκεκριμένα η αναστολή του $\alpha_{IIb}\beta_3$ μετά από ενεργοποίηση με TRAP 50-100 μM παρουσία της Lp(a) (80 μg πρωτεΐνης/ml) ήταν της τάξης του 64.8±12.7% ενώ για την LDL της ίδια συγκέντρωσης 48.1±9.2%.



Εικόνα 43. Δοσοεξαρτώμενη αναστολή της συσσώρευσης πλυμένων αιμοπεταλίων κατά Lotner από τις Lp(a), LDL μετά από ενεργοποίηση με TRAP.



Εικόνα 44. Δοσοεξαρτώμενη αναστολή της συσσώρευσης πλυμένων αιμοπεταλίων από τις Lp(a), LDL μετά από ενεργοποίηση με TRAP.

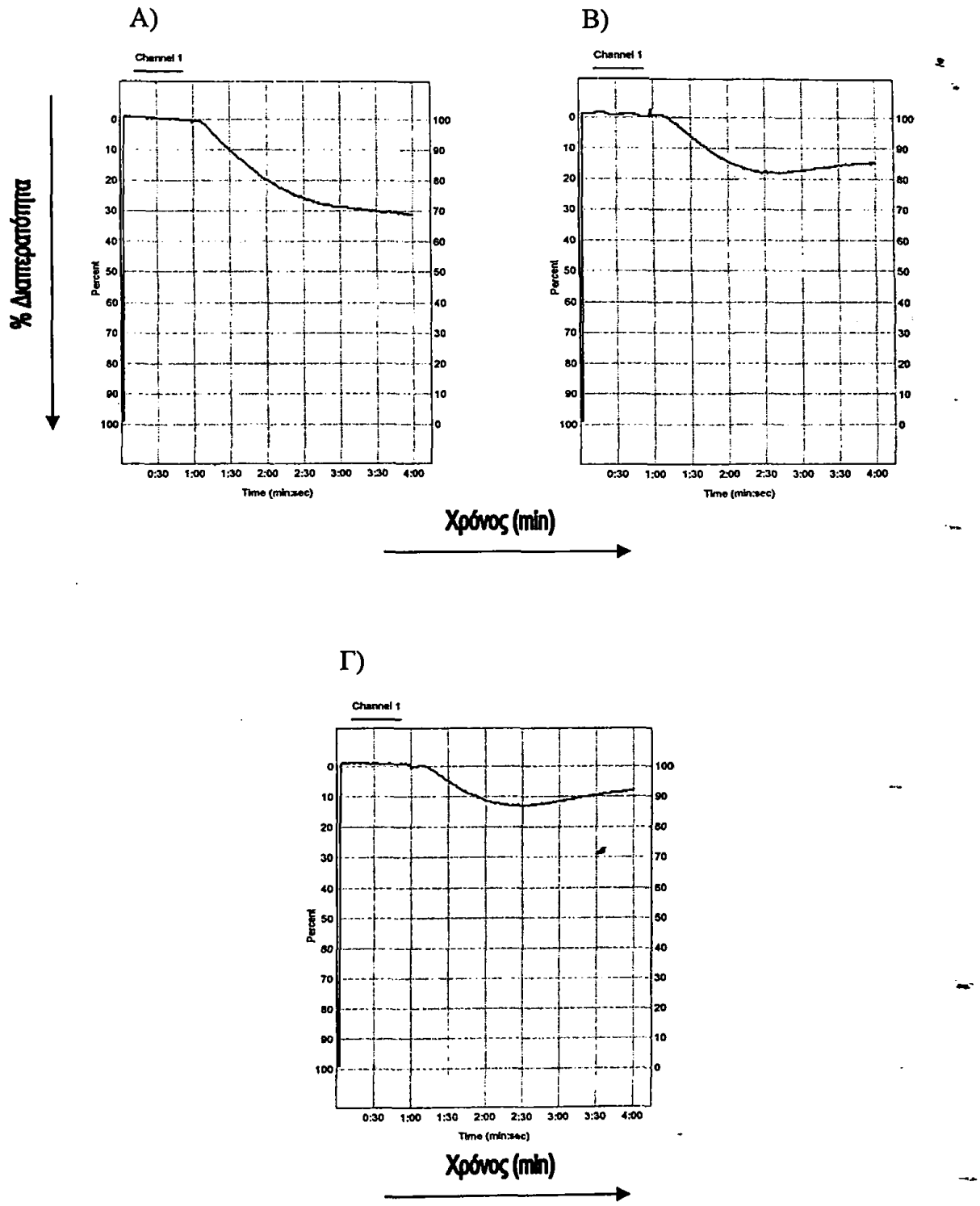


Εικόνα 45. Επίδραση των Lp(a), LDL στην συσσώρευση πλυμένων αιμοπεταλίων κατά Lotner, μετά από ενεργοποίηση με TRAP.

A) PBS (τυφλό).

B) Lp(a) (80 μg πρωτεΐνης/ml).

Γ) LDL (80 μg πρωτεΐνης/ml).

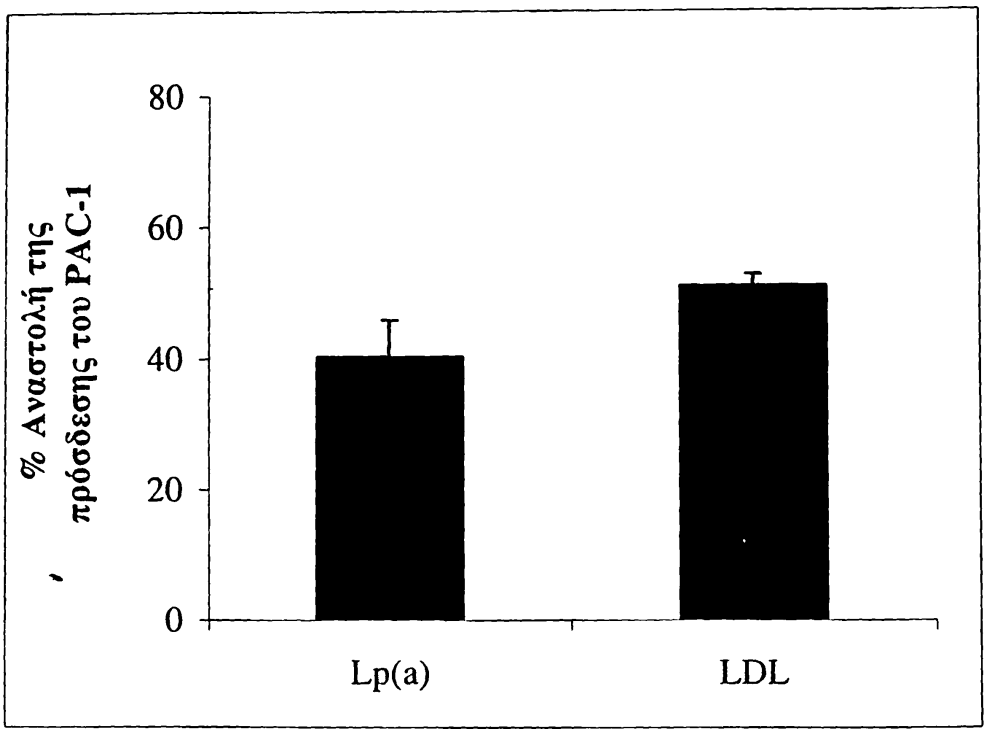


Εικόνα 46. Επίδραση των Lp(a), LDL στην συσσώρευση πλυμένων αιμοπεταλίων, μετά από ενεργοποίηση με TRAP.

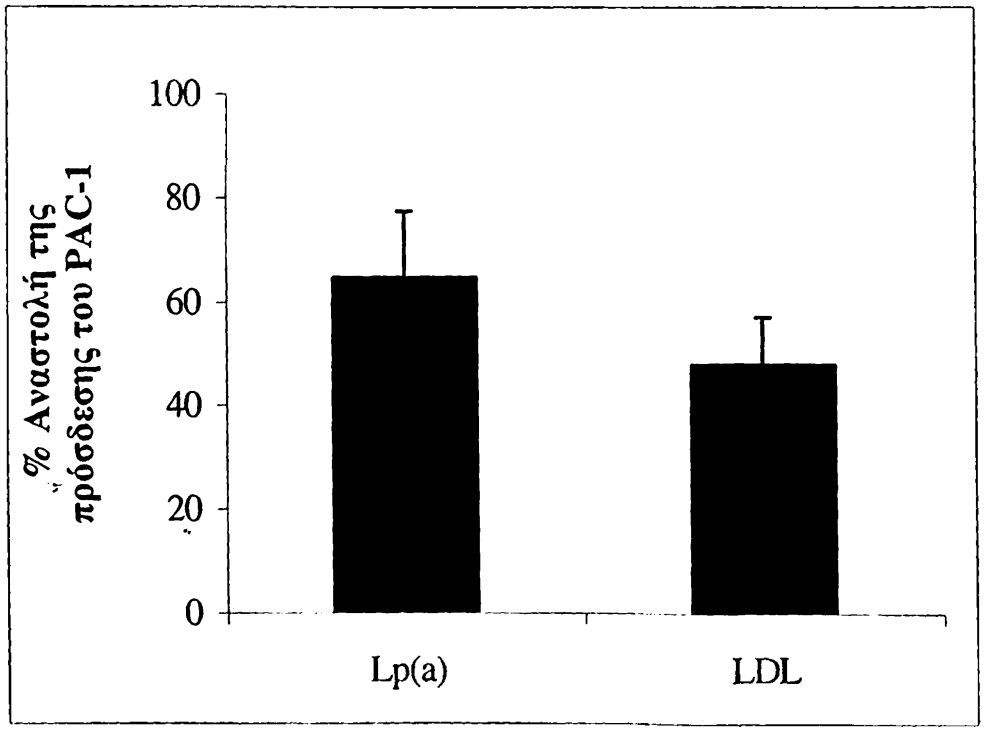
A) PBS (τυφλό).

B) Lp(a) (80 μg πρωτεΐνης/ml).

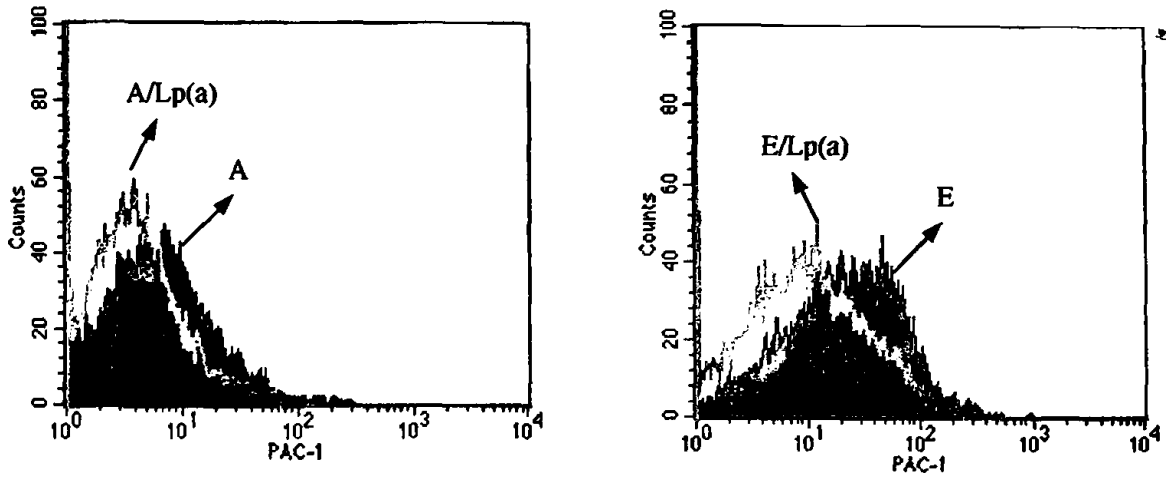
Γ) LDL (80 μg πρωτεΐνης/ml).



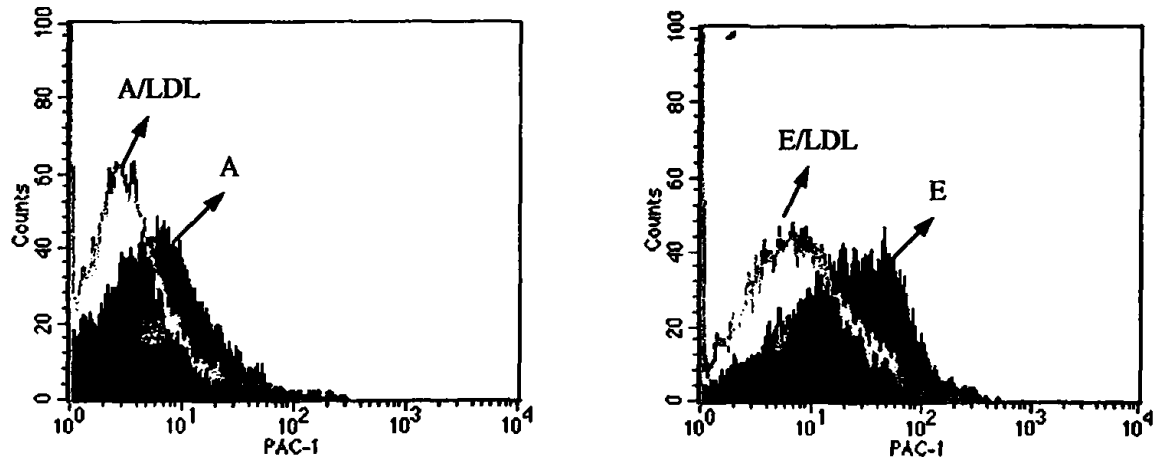
Εικόνα 47. Αναστολή της έκφρασης του υποδοχέα $\alpha_{IIb}\beta_3$ από τις Lp(a), LDL, (80 μg πρωτεΐνης/ml) πλυμένων αιμοπεταλίων κατά Lotner, μετά από ενεργοποίηση με TRAP.



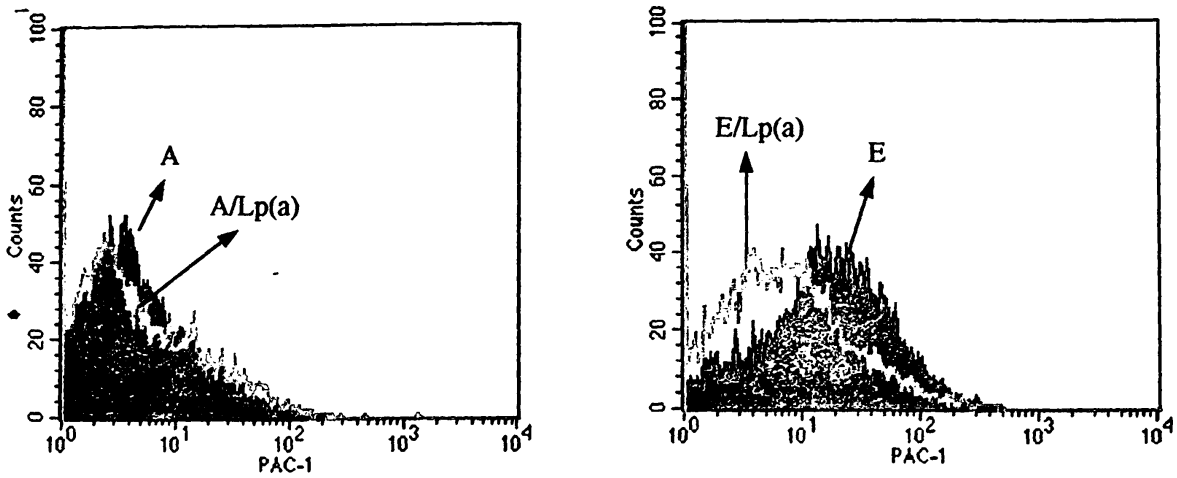
Εικόνα 48. Αναστολή της έκφρασης του υποδοχέα $\alpha_{IIb}\beta_3$ από τις Lp(a), LDL, (80 μg πρωτεΐνης/ml) πλυμένων αιμοπεταλίων, μετά από ενεργοποίηση με TRAP.



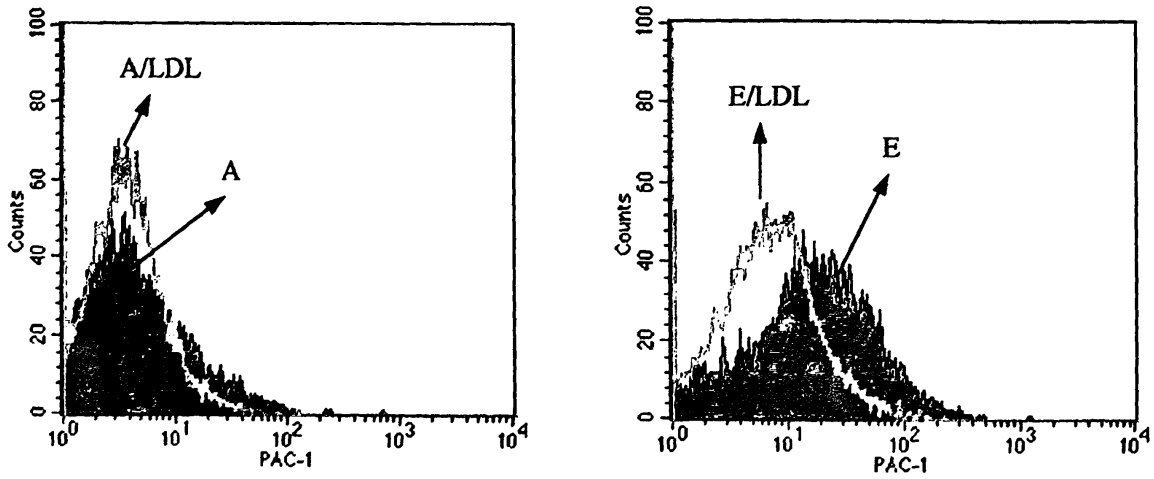
Εικόνα 49. *Αντιπροσωπευτικό κυτταρομετρικό προφίλ της αναστολής της πρόσδεσης του PAC-1 από την Lp(a) (80 μg πρωτεΐνης/ml), πλυμένων αιμοπεταλίων κατά Lotner τα οποία ενεργοποιήθηκαν με TRAP. A: αιμοπετάλια, A/Lp(a): αιμοπετάλια παρουσία Lp(a), E: ενεργοποιημένα αιμοπετάλια, E/Lp(a): ενεργοποιημένα αιμοπετάλια παρουσία Lp(a).*



Εικόνα 50. *Αντιπροσωπευτικό κυτταρομετρικό προφίλ της αναστολής της πρόσδεσης του PAC-1 από την LDL (80 μg πρωτεΐνης/ml), πλυμένων αιμοπεταλίων κατά Lotner τα οποία ενεργοποιήθηκαν με TRAP. A: αιμοπετάλια, A/LDL: αιμοπετάλια παρουσία LDL, E: ενεργοποιημένα αιμοπετάλια, E/LDL: ενεργοποιημένα αιμοπετάλια παρουσία LDL.*



Εικόνα 51. *Αντιπροσωπευτικό κυτταρομετρικό προφίλ της αναστολής της πρόσδεσης του PAC-1 από την Lp(a) (80 μg πρωτεΐνης/ml), πλυμένων αιμοπεταλίων τα οποία ενεργοποιήθηκαν με TRAP. A: αιμοπετάλια, A/Lp(a): αιμοπετάλια παρουσία Lp(a), E: ενεργοποιημένα αιμοπετάλια, E/Lp(a): ενεργοποιημένα αιμοπετάλια παρουσία Lp(a).*



Εικόνα 52. *Αντιπροσωπευτικό κυτταρομετρικό προφίλ της αναστολής της πρόσδεσης του PAC-1 από την LDL (80 μg πρωτεΐνης/ml), πλυμένων αιμοπεταλίων τα οποία ενεργοποιήθηκαν με TRAP. A: αιμοπετάλια, A/LDL: αιμοπετάλια παρουσία LDL, E: ενεργοποιημένα αιμοπετάλια, E/LDL: ενεργοποιημένα αιμοπετάλια παρουσία LDL.*

Επίδραση της Lp(a) στην πρόσδεση του Fg-FITC στον υποδοχέα $\alpha_{IIb}\beta_3$

Είναι γνωστό ότι κατά την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων ο υποδοχέας $\alpha_{IIb}\beta_3$ αλλάζει διαμόρφωση, με αποτέλεσμα την αναγνώριση και δέσμευση διαφόρων προσδετών, κυρίως του Fg, που οδηγούν στην συσσώρευση των αιμοπεταλίων. Η δέσμευση γίνεται διαμέσου της αλληλουχίας Arg-Gly-Asp (RGD) που βρίσκεται σε όλα τα προσκολλητικά μόρια του υποδοχέα $\alpha_{IIb}\beta_3$.

Με δεδομένο ότι RGD αλληλουχία έχει ταυτοποιηθεί στο μόριο της apo(a) (19), αλλά και για να διερευνηθεί περαιτέρω ο τρόπος με τον οποίο η Lp(a) ασκεί ανασταλτική δράση στην ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων μελετήθηκε η δράση της στην πρόσδεση του Fg-FITC στον υποδοχέα $\alpha_{IIb}\beta_3$ σε ενεργοποιημένα με ADP (100 μM) αιμοπετάλια σε PRP. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε η τεχνική της κυτταρομετρίας ροής όπως περιγράφεται στην μεθοδολογία.

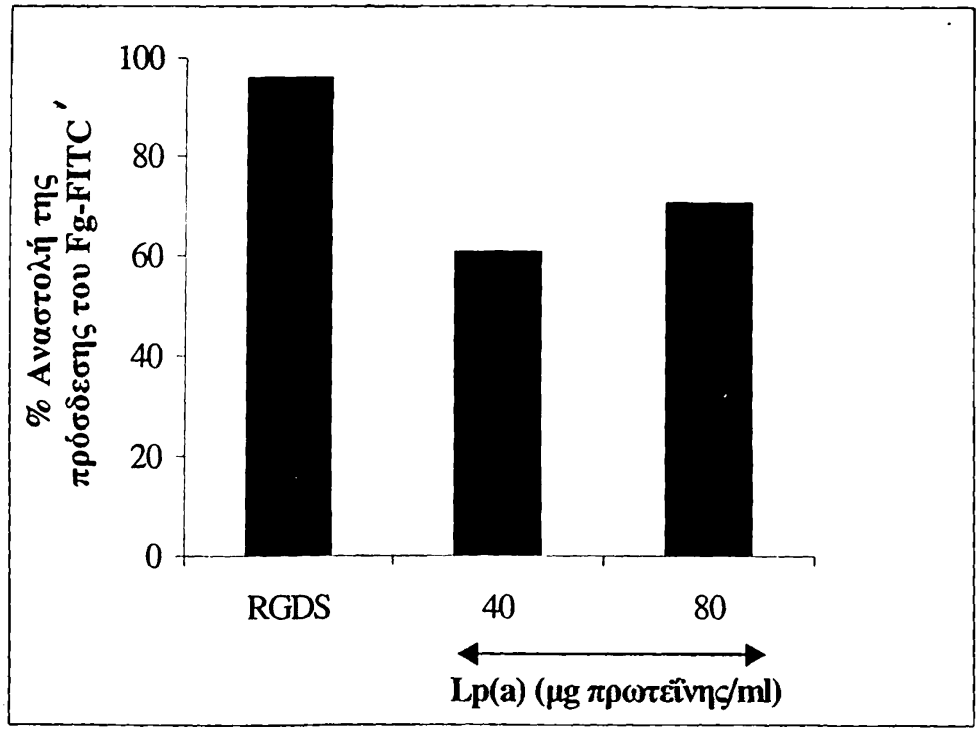
Τυπικό προφίλ πρόσδεσης του Fg-FITC στον υποδοχέα φαίνεται στην εικόνα 54. Η μέση ένταση φθορισμού (MFI) του Fg-FITC των μη ενεργοποιημένων αιμοπεταλίων, βρίσκεται στο ίδιο σημείο με την MFI των ενεργοποιημένων αιμοπεταλίων παρουσία του RGDS. Όμως η MFI των ενεργοποιημένων αιμοπεταλίων μετακινείται προς τα δεξιά γεγονός που αποτελεί ένδειξη προσκόλλησης του Fg στον υποδοχέα $\alpha_{IIb}\beta_3$. Παρουσία του RGDS αναστέλλεται η πρόσδεση του Fg, με αποτέλεσμα την μείωση της MFI του Fg-FITC.

Όπως φαίνεται στις εικόνες 53, 54 το πεπτίδιο RGDS (το οποίο χρησιμοποιήθηκε ως θετικός μάρτυρας της πρόσδεσης του Fg-FITC) σε τελική συγκέντρωση 1 mM (433 μg/ml) προκάλεσε πλήρη αναστολή της πρόσδεσης του Fg-FITC (95.7%). Παράλληλα έγινε και έλεγχος της Lp(a) σε τελικές συγκεντρώσεις 40 και 80 μg πρωτεΐνης/ml, οι οποίες με βάση την εμπειρία των προηγούμενων πειραμάτων αναστέλλουν την ενεργοποίηση (συσσώρευση, έκκριση ATP και έκφραση του υποδοχέα $\alpha_{IIb}\beta_3$) των αιμοπεταλίων. Παρατηρήθηκε σημαντική ανασταλτική δράση της Lp(a) στην πρόσδεση του Fg-FITC η οποία ήταν της τάξης του 70.6% για την συγκέντρωση των 80 μg πρωτεΐνης/ml (πίνακας 9, εικόνες 57, 55).

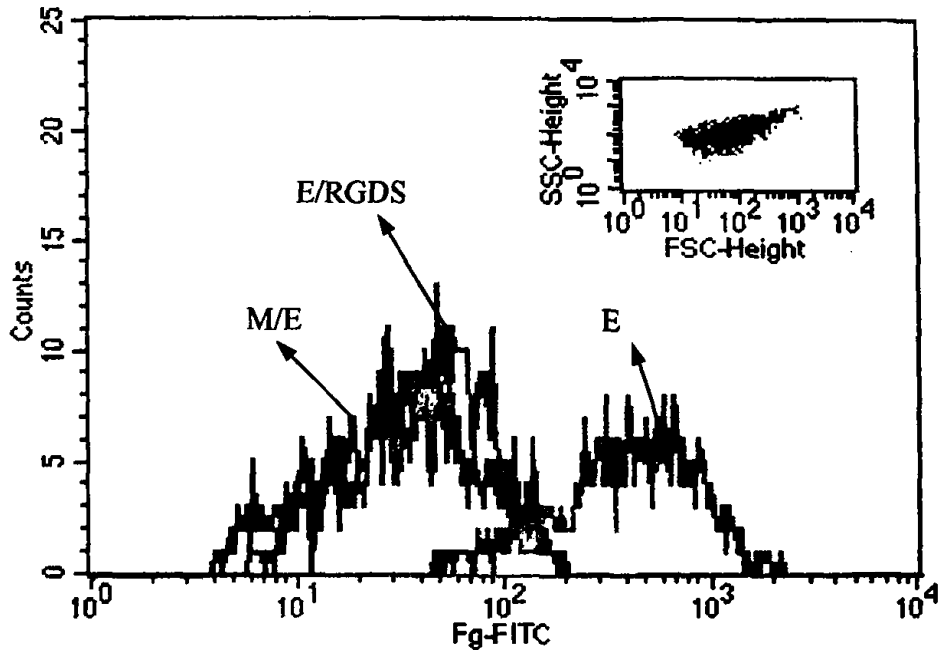
Πίνακας 9. Επίδραση της συγκέντρωσης της Lp(a) στην πρόσδεση του Fg-FITC στον υποδοχέα $\alpha_{IIb}\beta_3$ ενεργοποιημένων αιμοπεταλίων.

Lp(a) (μg πρωτεΐνης/ml)	NB	TB	SB	% Αναστολή
40	36.4	445.6	409.2	60.7
80	30.0	151.5	121.6	70.6

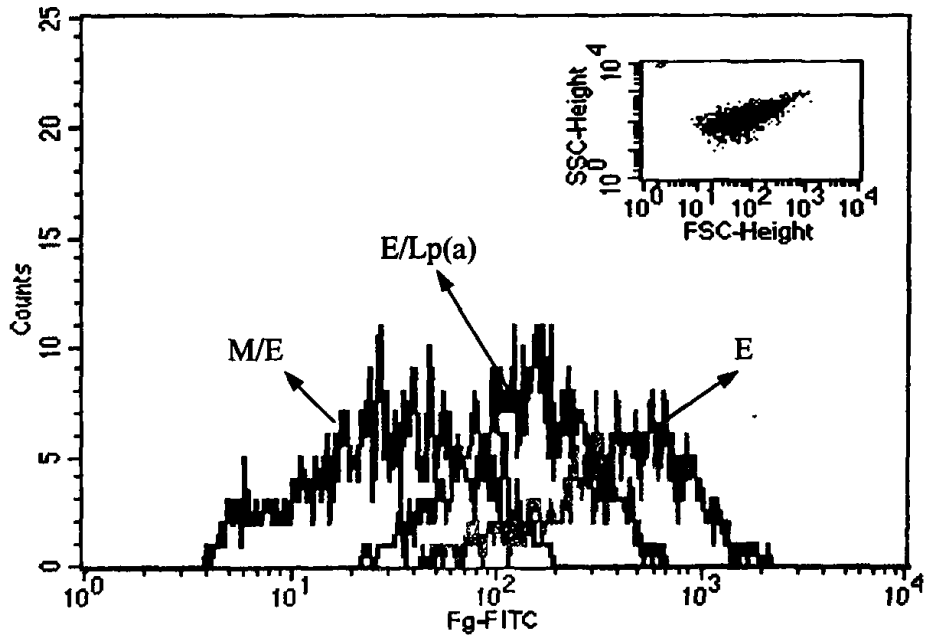
NB: μη ειδική πρόσδεση, TB: ολική πρόσδεση, SB: ειδική πρόσδεση



Εικόνα 53. *Αναστολή της πρόσδεσης του Fg-FITC στον υποδοχέα $\alpha_{IIb}\beta_3$ ενεργοποιημένων αιμοπεταλίων από το πεπτίδιο RGDS (1 mM) και την Lp(a).*

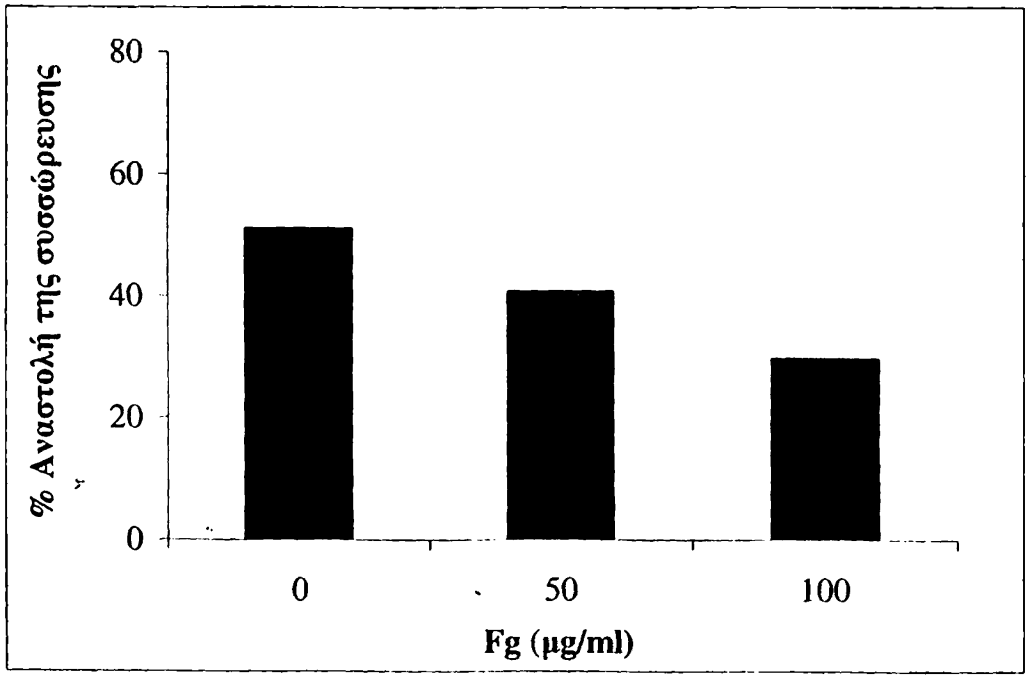


Εικόνα 54. *Τυπικό προφίλ κυτταρομετρίας παρουσία και απουσία RGDS (1 mM). M/E: Μη ενεργοποιημένα αιμοπετάλια. E/RGDS: ενεργοποιημένα αιμοπετάλια παρουσία RGDS, E: ενεργοποιημένα αιμοπετάλια απουσία*



Εικόνα 55. *Αναστολή της πρόσδεσης του Fg-FITC στα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια από την Lp(a) (80 μg πρωτεΐνης/ml). M/E: Μη ενεργοποιημένα αιμοπετάλια. E/Lp(a): ενεργοποιημένα αιμοπετάλια παρουσία Lp(a), E: ενεργοποιημένα αιμοπετάλια απουσία*

Στηριζόμενοι στο παραπάνω εύρημα αλλά και λαμβάνοντας υπόψη τα πειράματα κυτταρομετρίας στα οποία παρατηρήθηκε αναστολή της έκφρασης του υποδοχέα $\alpha_{IIb}\beta_3$ μπορούμε να υποθέσουμε ότι είναι πιθανό η Lp(a) και το Fg να δρούν ανταγωνιστικά μεταξύ τους για πρόσδεση στον ενεργοποιημένο υποδοχέα $\alpha_{IIb}\beta_3$ ή ότι το σωματίδιο της Lp(a) προσδένεται σε σημείο της αιμοπεταλιακής μεμβράνης πλησίον του υποδοχέα επηρεάζοντας με αυτό τον τρόπο άμεσα την πρόσδεση του Fg και κατ' επέκταση την λειτουργικότητα του υποδοχέα αυτού. Για να διασαφηνισθεί περαιτέρω ο ρόλος του Fg στην εκδήλωση της βιολογικής δράσης της Lp(a) στα αιμοπετάλια έγινε και πείραμα συσσωρευομετρίας. Έτσι σε πλυμένα αιμοπετάλια τα οποία ενεργοποιήθηκαν με TRAP (20 μM) η Lp(a) σε τελική συγκέντρωση 80 μg πρωτεΐνης/ml παρουσίασε αναστολή της τάξης του 51.0%. Παράλληλη παρουσία όμως αυξανόμενης συγκέντρωσης Fg είχε σαν αποτέλεσμα να παρατηρηθεί μια δοσοεξαρτώμενη μείωση της ανασταλτικής δράσης της Lp(a) ως προς τη συσσώρευση. Έτσι, για την συγκέντρωση των 100 μg/ml Fg (που ήταν και η μεγαλύτερη που χρησιμοποιήθηκε) η Lp(a) παρουσίασε αναστολή της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων της τάξης του 29.7%, (εικόνα 56).



Εικόνα 56. Επίδραση του Fg στην αναστολή της συσσώρευσης πλυμένων αιμοπεταλίων από την Lp(a) (80 μg πρωτεΐνης/ml) μετά από ενεργοποίηση με TRAP.

Συμπερασματικά η Lp(a) αναστέλλει την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων από όλους τους αγωνιστές με ένα μη ειδικό μηχανισμό στον οποίο δεν φαίνεται να διαδραματίζει σημαντικό ρόλο η apo(a) και ειδικότερα ως προς τον PAF ούτε το περιεχόμενο σε PAF-AH. Αντίθετα, η δράση αυτή φαίνεται να αποδίδεται σε κάποιο άλλο ενδογενές συστατικό της. Πράγματι τα πειράματα κυτταρομετρίας δείχνουν ότι η Lp(a) αναστέλλει τόσο την έκφραση του υποδοχέα $\alpha_{IIb}\beta_3$ όσο και την πρόσδεση του Fg (η οποία αποτελεί τον τελικό αποδέκτη της δράσης όλων των αγωνιστών) σε αυτόν με ανταγωνιστικό τρόπο. Συνεπώς είναι πιθανό η ανασταλτική δράση της λιποπρωτεΐνης αυτής να οφείλεται στην παρεμπόδιση της πρόσδεσης του Fg στον υποδοχέα η οποία όχι μόνο προκαλεί αναστολή της συσσώρευσης αλλά και την περαιτέρω ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων, όπως είναι η έκκριση.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΠΕΜΠΤΟ

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑ PAF-AH ΣΤΗΝ Lp(a) ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ΣΤΕΦΑΝΙΑΙΑ ΝΟΣΟ

Αυξημένα επίπεδα Lp(a) πλάσματος (>30 mg/dl) έχουν θεωρηθεί ως ένας ανεξάρτητος παράγοντας κινδύνου για την εμφάνιση πρώιμης καρδιαγγειακής νόσου, ιδιαίτερα σε άτομα με αυξημένα επίπεδα ολικής και LDL χοληστερόλης. Η Lp(a) μοιάζει δομικά με την LDL, διαφοροποιείται όμως από αυτή γιατί, εκτός από την apoB-100, περιέχει μια γλυκοπρωτεΐνη, την apo(a), η οποία συνδέεται με την apoB-100 με ένα δισουλφιδικό δεσμό. Η apo(a) μοιάζει δομικά με το πλασμινογόνο λόγω της παρόμοιας διαμόρφωσης του αμινοτελικού άκρου των δύο μορίων και εμφανίζει πολυμορφισμό εξαιτίας του ποικίλου αριθμού K4 που μπορεί να υπάρχουν στο μόριό της. Εξαιτίας της δομικής ομοιότητας με το πλασμινογόνο, η Lp(a) παρεμποδίζει τη θρομβολυτική διαδικασία, ενώ φαίνεται να διαδραματίζει ρόλο και στη διαδικασία της αθηρογένεσης (έχει δειχθεί η παρουσία της στις αθηρωματικές πλάκες).

Η PAF-AH είναι ένα αντιφλεγμονώδες ένζυμο το οποίο μεταφέρεται στο πλάσμα συνδεδεμένο κυρίως με την LDL και την HDL. Η PAF-AH υδρολύει και απενεργοποιεί τον ισχυρό διαμεσολαβητή της φλεγμονής PAF αλλά και τα οξειδωμένα φωσφολιπίδια, μόρια που σχηματίζονται κατά την οξείδωση της LDL και παίζουν σημαντικό ρόλο στους φλεγμονώδεις μηχανισμούς που συμμετέχουν στην αθηρογένεση.

Δυο προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει την ύπαρξη ενεργότητας PAF-AH στην Lp(a) σε νορμολιπιδαιμικά άτομα, υποθέτοντας ένα νέο παθοφυσιολογικό (αντιφλεγμονώδη) ρόλο της Lp(a), πέραν της καλά τεκμηριωμένης παρεμπόδισης της ινωδόλυσης (234, 235). Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν να μελετήσει την ενεργότητα αλλά και τις φαινόμενες τιμές Km και Vmax της PAF-AH στην Lp(a) σε σύγκριση με αυτές του ενζύμου που βρίσκεται συνδεδεμένο στην LDL σε στεφανιαίους ασθενείς και υγιείς μάρτυρες.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της μελέτης μας αποδεικνύεται για πρώτη φορά ότι η Lp(a) των ασθενών με στεφανιαία νόσο μεταφέρει σημαντικά μικρότερη ενεργότητα PAF-AH σε σχέση με τους μάρτυρες γεγονός που αποδεικνύεται από τη

μειωμένη ειδική ενεργότητα καθώς και τις μειωμένες τιμές των φαινόμενων κινητικών σταθερών Km και Vmax του ενζύμου. Το φαινόμενο αυτό δεν αποδίδεται σε διαφορές των λιπιδαιμικών παραμέτρων όπως είναι οι συγκεντρώσεις Lp(a) και LDL του πλάσματος καθώς και τα επίπεδα της PAF-AH πλάσματος, αφού τέτοιες δεν παρουσιάστηκαν μεταξύ των δύο ομάδων της μελέτης. Επιπλέον, η μειωμένη ενζυμική ενεργότητα PAF-AH στην Lp(a) δεν παρατηρήθηκε σε ασθενείς με πρωτοπαθή υπεχοληστερολαιμία (δυσλιπιδαιμία τύπου IIA) οι οποίοι παρουσίασαν σημαντικά μεγαλύτερες συγκεντρώσεις LDL καθώς και επίπεδα PAF-AH πλάσματος σε σχέση είτε με τους μάρτυρες είτε τους στεφανιαίους ασθενείς. Για να διερευνηθεί εάν το φαινόμενο αυτό αφορά μόνο την ενεργότητα του ενζύμου στην Lp(a) ή αποτελεί και χαρακτηριστικό και άλλων λιποπρωτεϊνών στους στεφανιαίους ασθενείς, απομονώθηκε επίσης LDL από τους ίδιους ασθενείς και μάρτυρες ταυτόχρονα με την απομόνωση της Lp(a). Ο λόγος που επιλέχθηκε η LDL σε σχέση με άλλες λιποπρωτεΐνες ήταν η δομική ομοιότητα της με την Lp(a), αλλά και το ότι είναι ο κύριος φορέας της PAF-AH στο πλάσμα. Σε αντίθεση με την Lp(a), βρέθηκε ότι η LDL των ασθενών μετέφερε παρόμοια ενεργότητα PAF-AH σε σχέση με εκείνη των μαρτύρων. Επιπλέον, το σωματίδιο της Lp(a) των ασθενών μεταφέρει σημαντικά μικρότερη ενεργότητα PAF-AH σε σχέση με εκείνη της LDL του ιδίου πληθυσμού, ένα φαινόμενο που δεν παρατηρείται στους μάρτυρες.

Λαμβάνοντας υπόψη ότι όλοι οι στεφανιαίοι ασθενείς της μελέτης ελάμβαναν υπολιπιδαιμική αγωγή (ατροβαστατίνη) θελήσαμε να διερευνήσουμε τη πιθανή επίδραση αυτής στην ενεργότητα της PAF-AH της Lp(a) στα άτομα αυτά. Για το σκοπό αυτό έγινε προσδιορισμός της ενεργότητας του ενζύμου στους υπερχοληστερολαιμικούς ασθενείς της μελέτης πριν και μετά την 5μηνη χορήγηση ατορβαστατίνης (20 mg/ημέρα). Η θεραπεία με ατορβαστατίνη σύμφωνα με τα αποτελεσματά μας προκάλεσε σημαντική μείωση της ενεργότητας της PAF-AH στην LDL, η οποία συνοδεύτηκε και από παράλληλη μείωση των επιπέδων στο πλάσμα της λιποπρωτεΐνης αυτής, εύρημα που έρχεται σε συμφωνία με τα αποτελέσματα πρόσφατα δημοσιευμένη εργασία του Εργαστηρίου μας (253). Αντίθετα δεν επηρέασε την ενεργότητα της PAF-AH στην Lp(a) καθώς και τα επίπεδα αυτής στο πλάσμα, εύρημα το οποίο αποκλείει την συμμετοχή της υπολιπιδαιμικής θεραπείας στο παραπάνω φαινόμενο.

Είναι γνωστό ότι το λιποπρωτεϊνικό περιβάλλον μεταβάλλει την καταλυτική συμπεριφορά της PAF-AH (254). Έτσι, προκειμένου να αποκλειστεί το ενδεχόμενο η

μειωμένη ενζυμική ενεργότητα της PAF-AH στην Lp(a) που παρατηρείται στους στεφανιαίους ασθενείς της μελέτης να οφείλεται σε διαφορετική σύσταση έναντι αυτής των μαρτύρων έγινε προσδιορισμός της χημικής σύστασης [ακριβώς μετά από κάθε απομόνωση Lp(a)] ο οποίος όμως αφενός μεν δεν έδειξε κάποια διαφορά μεταξύ των ομάδων της και αφετέρου ήταν σύμφωνος με την διεθνή βιβλιογραφία.

Με βάση τα δεδομένα προηγούμενων μελετών η σύνδεση της PAF-AH στην Lp(a) γίνεται με την apoB-100 και όχι με την apo(a). Επιπλέον το ισομορφικό μέγεθος της τελευταίας έχει δειχτεί ότι επηρεάζει την ειδική ενεργότητα και τις φαινόμενες κινητικές σταθερές του ενζύμου (234, 235). Σύμφωνα με τα αποτελεσματά μας τόσο το διάμεσο μέγεθος όσο και η % κατανομή των χαμηλού και υψηλού μοριακού βάρους δεν παρουσίασαν διαφορές μεταξύ των ομάδων που μελετήθηκαν, καθιστώντας την επίπτωση του ισομορφικού μεγέθους της apo(a) στην μειωμένη ενεργότητα της PAF-AH στην Lp(a) αμελητέα. Ωστόσο, η απομάκρυνση της apo(a) με υπερφυγοκέντρηση από το υπόλοιπο λιποπρωτεϊνικό σωματίδιο μετά από αναγωγική διάσπαση με DTT είχε σαν αποτέλεσμα τη σημαντική αύξηση της ενζυμικής ενεργότητας της PAF-AH στην Lp(a) των στεφανιαίων (σε επίπεδα ανάλογα με αυτά των μαρτύρων), ένα φαινόμενο το οποίο δεν παρατηρήθηκε στην Lp(a) των μαρτύρων. Το εύρημα αυτό δηλώνει ότι η Lp(a) των ασθενών με στεφανιαία νόσο δεν είναι ελλιπής σε ενεργότητα PAF-AH. Με βάση το γεγονός ότι η apo(a) αυτό καθεαυτό δεν επηρεάζει την ενεργότητα του ενζύμου [όπως αυτό προκύπτει από τα πειράματα αναγωγικής διάσπασης στην Lp(a) των μαρτύρων] φαίνεται πιθανό ότι κάποιος άλλος παράγοντας πάνω στην πολυπεπτιδική αλυσίδα της apo(a) είναι υπεύθυνος για την μειωμένη ενεργότητα PAF-AH στην Lp(a) των ασθενών με στεφανιαία νόσο.

Μεταξύ των μορίων τα οποία βρίσκονται συνδεδεμένα με την apo(a) στο πλάσμα συγκαταλέγονται και πρωτεϊνικοί προσδέτες όπως το ινωδογόνο, το ινώδες, η φιβρονεκτίνη και η β_2-γλυκοπρωτεΐνη I (β_2-GPI). Μεταξύ αυτών, η β_2-GPI είναι μια υψηλού βαθμού γλυκοζυλιομένη μονομερής πρωτεΐνη του πλάσματος μοριακού βάρους 50 kDa η οποία έχει την ικανότητα να προσδένεται σε ανιοντικά φωσφολιπίδια , οξειδωμένα φωσφολιπίδια καθώς και σε οξειδωμένες λιποπρωτεΐνες (255-257). Σε πρόσφατη μελέτη των Köchl S. και συν. (106) ταυτοποιήθηκε στην περιοχή των επαναλαμβανόμενων K4 apo(a) η παρουσία της β_2-GPI η οποία όπως προαναφέρθηκε με την σειρά της μπορεί και δεσμεύει οξειδωμένα φωσφολιπίδια τα οποία παρουσιάζουν δομή παρόμοια με αυτή του PAF (258). Όπως ο PAF, τα

φωσφολιπίδια αυτά παίζουν σημαντικό ρόλο στην αθηρωγένεση και αποτελούν υπόστρωμα για την PAF-AH. Στηριζόμενοι στα παραπάνω αλλά και στα τελευταία αποτελέσματα της μελέτης μας σύμφωνα με τα οποία παρουσιάζεται μια ανταγωνιστικού τύπου αναστολή της PAF-AH στην Lp(a) των στεφανιαίων ασθενών (αφού οι τιμές των φαινόμενων κινητικών σταθερών Km και Vmax του ενζύμου στην Lp(a) των ασθενών αυτών μετά την απομάκρυνση της apo(a) ανέρχονται σε επίπεδα παρόμοια με αυτά των δύο άλλων ομάδων της μελέτης) θα μπορούσαμε να υποθέσουμε ότι η Lp(a) αυτών είναι εμπλουτισμένη σε υψηλότερο βαθμό σε σχέση με τις δύο άλλες ομάδες σε β_2-GPI η οποία με τη σειρά της θα μπορούσε να δεσμεύεται με το σύμπλοκο ενζύμου (PAF-AH) – υποστρώματος (PAF) στην επιφάνεια του λιποπρωτεϊνικού σωματιδίου δημιουργώντας ένα αντιστρεπτά ανενεργό σύμπλοκο. Ο παραπάνω προτεινόμενος μηχανισμός ο οποίος στηρίζεται στην παραδοχή της παρουσίας υψηλών ποσών της γλυκοπρωτεΐνης β_2-GPI στην Lp(a) των στεφανιαίων ασθενών είναι σε συμφωνία με το εύρημα άλλων ερευνητών οι οποίοι αναφέρουν την παρουσία υψηλού τίτλου αντισωμάτων κατά της β_2-GPI στο πλάσμα ασθενών με στεφανιαία νόσο (259). Παρόμοια ήταν και τα αποτελέσματα σε πρόσφατες μελέτες των Keeling και Mori οι οποίοι παρατήρησαν αναστολή της δράσης της πρωτεΐνης C από την β_2-GPI παρουσία φωσφολιπιδίων (260, 261).

Θέλοντας να διερευνήσουμε τον πιθανό παθοφυσιολογικό ρόλο της μειωμένης ενεργότητας PAF-AH στην Lp(a) των στεφανιαίων ασθενών υποβάλλαμε σε οξείδωση σωματίδιο Lp(a) στο οποίο έγινε προηγούμενη απενεργοποίηση του ενζύμου [pefa Lp(a)] καθώς και φυσική Lp(a). Σύμφωνα με τα αποτελεσματά μας τα δύο σωματίδια δεν παρουσίασαν διαφορές ως προς τον λανθάνωντα χρόνο οξείδωσης καθώς και τις υπόλοιπες παραμέτρους οξείδωσης. Παράλληλα, έγινε και πείραμα συσσωρευομετρίας αιμοπεταλίων, χρησιμοποιώντας τόσο Lp(a) από στεφανιαίους ασθενείς όσο και από μάρτυρες, στο οποίο έγινε προεπώαση της Lp(a) με PAF. Παρατηρήθηκε αναστολή της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων η οποία ήταν ανάλογη του περιεχόμενου σε ενεργότητα PAF-AH. Επιπλέον, η αναστολή αυτή ήταν μεγαλύτερη όταν ο χρόνος επώασης του λιποπρωτεϊνικού σωματιδίου με τον PAF αυξήθηκε, εύρημα το εξηγείται με δεδομένο ότι ο PAF αποτελεί υπόστρωμα για την PAF-AH και άρα όσο μεγαλύτερη είναι η ενεργότητα του ενζύμου αλλά και ο χρόνος της ενζυμικής αντίδρασης, τόσο μεγαλύτερη είναι η υδρόλυση και επομένως η απενεργοποίηση του συγκεκριμένου αγωνιστή. Το εύρημα αυτό παρότι αναμενόμενο ίσως δεν έχει άμεση παθοφυσιολογική σημασία, αφού η Lp(a) συνυπάρχει

ταυτόχρονα με τα αιμοπετάλια και σε πιθανή έκκριση PAF ο αγωνιστής αυτός θα έρθει ταυτόχρονα σε επαφή με Lp(a) και αιμοπετάλια. Παρόλα αυτά θα μπορούσε να έχει σημασία σε σημεία όπου συμβαίνει εντοπισμένη έκκριση PAF και υπάρχει Lp(a) αλλά όχι αιμοπετάλια, όπως για παράδειγμα συμβαίνει στο αρτηριακό τοίχωμα. Συμπερασματικά, η παρούσα μελέτη δείχνει ότι η πολυπεπτιδική αλυσίδα της apo(a) πιθανώς να επηρεάζει την ενεργότητα της PAF-AH στην Lp(a) των ασθενών με στεφανιαία νόσο μειώνοντας την ικανότητα αυτής να υδρολύει και να απενεργοποιεί τον PAF και τα οξειδωμένα φωσφολιπίδια μόρια τα ασκούν προφλεγμονώδη και αθηρογόνο δράση και τα οποία σχηματίζονται στο σωματίδιο της Lp(a) όταν αυτό βρεθεί σε συνθήκες οξειδωτικού στρες όπως συμβαίνει στο αρτηριακό τοίχωμα. Συνεπώς, η Lp(a) (σε αντίθεση με το θρομβογόνο ρόλο της) υπό φυσιολογικές συνθήκες, εξαιτίας της PAF-AH, είναι εμπλουτισμένη σε ένα ισχυρό αντιαθηρογόνο ένζυμο, ένα φαινόμενο το οποίο πιθανώς να προσδίδει μια νέα διάσταση ως προς τον ρόλο της Lp(a) στην παθοφυσιολογία της αθηρωμάτωσης και της στεφανιαίας νόσου.

ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ Lp(a) ΣΤΗΝ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΑΙΜΟΠΕΤΑΛΙΩΝ ΑΠΟ ΤΟΝ PAF

Η συμμετοχή των παραγόντων της αιμόστασης και ιδιαίτερα των αιμοπεταλίων στην παθογένεια της αθηροσκλήρωσης και των επιπλοκών της αποτελεί ένα αντικείμενο με ολοένα αυξανόμενο ερευνητικό ενδιαφέρον. Σήμερα είναι πλέον καλά τεκμηριωμένος ο ρόλος των αιμοπεταλίων στην παθογένεια της αθηρωμάτωσης και των οξέων στεφανιαίων συνδρόμων. Νεότερα ερευνητικά δεδομένα αποδεικνύουν ότι οι λιποπρωτεΐνες του πλάσματος, εκτός από την άμεση συμμετοχή τους στην αθηρωματική διαδικασία, επηρεάζουν την ευαισθησία των αιμοπεταλίων στους διάφορους αγωνιστές αυτών, διαδραματίζοντας έτσι ένα επιπλέον ρόλο στη διαδικασία της θρόμβωσης. Μέχρι σήμερα υπάρχουν λίγες μελέτες σχετικά με την αλληλεπίδραση της Lp(a) με τα αιμοπετάλια οι οποίες έχουν καταλήξει σε αντικρουόμενα αποτελέσματα καθιστώντας αδιευκρίνιστο τον πιθανό παθοφυσιολογικό ρόλο της λιποπρωτεΐνης αυτής στην θρόμβωση. Με βάση το γεγονός αυτό αλλά και λαμβάνοντας υπόψη: i) τα προηγούμενα αποτελέσματα της μειωμένης ενεργότητας PAF-AH στην Lp(a) ασθενών με στεφανιαία νόσο, ii) το ότι

ο PAF εκτός από υπόστρωμα για την PAF-AH παράλληλα αποτελεί και ισχυρό αγωνιστή για τα αιμοπετάλια, και iii) την έλλειψη δεδομένων σχετικά με τον τρόπο δράσης της Lp(a) στα αιμοπετάλια μετά από ενεργοποίηση με τον PAF, μελετήθηκε η επίδραση της λιποπρωτεΐνης αυτής στην ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων με PAF, τόσο σε PRP όσο και σε σύστημα πλυμένων αιμοπεταλίων.

Αρχικά μελετήθηκε η επίδραση της Lp(a) στην ενεργοποίηση αιμοπεταλίων από τον PAF σε PRP, το οποίο δεν περιείχε ανιχνεύσιμα επίπεδα Lp(a). Σύμφωνα με τα αποτελεσματά μας, η Lp(a) αναστέλλει με δοσοεξαρτώμενο τρόπο την συσσώρευση των αιμοπεταλίων. Η δράση της Lp(a) συνίσταται τόσο στην αναστολή της πρωτογενούς συσσώρευσης που προκαλεί ο PAF όσο και στην αναστολή της δευτερογενούς συσσώρευσης η οποία οφείλεται στην δράση άλλων αγωνιστών όπως του ADP και του TxA_2 οι οποίοι εκκρίνονται από τα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια με τη δράση του PAF και οδηγούν σε μη αντιστρεπτή συσσώρευση.

Προκειμένου να διερευνήσουμε την εξειδικευμένη δράση της Lp(a) έναντι του PAF σε σχέση με την πρωτογενή συσσώρευση σε επόμενα πειράματα χρησιμοποιήθηκε το σύστημα CP/CPK το οποίο δρα ως εκκαθαριστής του παραγόμενου ADP καθώς και η ασπιρίνη η οποία αναστέλλοντας μη αντιστρεπτά την δράση του ενζύμου Cox1 παρεμποδίζει την σύνθεση του TxA_2. Η παρατηρούμενη αναστολή παρουσία του συστήματος CP/CPK και ασπιρίνης βρέθηκε να είναι σημαντικά μικρότερη σε σχέση με αυτή απουσία τους. Συνεπώς από το παρών καθώς και το προηγούμενο αποτέλεσμα συνάγεται ότι η Lp(a) αναστέλλει τόσο την πρωτογενή συσσώρευση που προκαλεί ο PAF όσο και την δευτερογενή συσσώρευση που προκαλείται από εκκρινόμενους αγωνιστές των ενεργοποιημένων αιμοπεταλίων.

Στην συνέχεια, για να διευκρινισθεί ο τρόπος με τον οποίο επιτυγχάνεται η αναστολή που παρατηρήθηκε στα πειράματα της συσσωρευομετρίας, διερευνήθηκε με χρήση κυτταρομετρίας ροής η επίδραση της Lp(a) στην έκφραση του αιμοπεταλιακού υποδοχέα $\alpha_{IIb}\beta_3$ (γνωρίζοντας ότι ο υποδοχέας αυτός μέσω της πρόσδεσης του Fg αποτελεί τον τελικό αποδέκτη της δράσης όλων των αγωνιστών των αιμοπεταλίων παίζοντας με τον τρόπο αυτό κυρίαρχο ρόλο στην συσσώρευση των κυττάρων αυτών) μετά από ενεργοποίηση με PAF. Είτε απουσία είτε παρουσία του συστήματος CP/CPK και ασπιρίνη παρατηρήθηκε αναστολή της έκφρασης του υποδοχέα, αποτελέσματα τα οποία έρχονται σε συμφωνία με αυτά της συσσωρευομετρίας. Συνεπώς από τα παραπάνω αποτελέσματα συνάγεται ότι η Lp(a) αναστέλλει τόσο την πρωτογενή συσσώρευση που προκαλεί ο PAF όσο και την

δευτερογενή συσσώρευση η οποία προκαλείται από εκκρινόμενους αγωνιστές των ενεργοποιημένων αιμοπεταλίων. Επίσης η Lp(a) αναστέλλει επηρεάζοντας την έκφραση του υποδοχέα $\alpha_{IIb}\beta_3$.

Ιδιαίτερα η αναστολή της δευτερογενούς συσσώρευσης μπορεί να οφείλεται: i) είτε στο ότι η λιποπρωτεΐνη αυτή αναστέλλει την δράση ενδογενώς παραγόμενων αγωνιστών (ADP και TxA_2) αφότου αυτοί εκκριθούν, ii) είτε ότι αναστέλλει την έκκριση των αγωνιστών αυτών, iii) είτε και τα δύο. Για να διερευνήσουμε περαιτέρω τον τρόπο με τον οποίο η Lp(a) αναστέλλει την δευτερογενή συσσώρευση εξετάστηκε η δράση της σε αιμοπετάλια τα οποία ενεργοποιήθηκαν με έναν από τους εκκρινόμενους αγωνιστές (ADP). Παράλληλα χρησιμοποιήθηκε και ο αγωνιστής των αιμοπεταλίων TRAP το οποίο αποτελεί το 14/πεπτίδιο ενεργοποίησης του υποδοχέα της θρομβίνης και το οποίο χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας, αφού η δράση του είναι ανεξάρτητη αυτής του εκκρινόμενου ADP. Παρουσία της Lp(a) παρατηρήθηκε μια δοσοεξαρτώμενη αναστολή της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων, τα οποία ενεργοποιήθηκαν με ADP. Επιπλέον, η Lp(a) προκαλεί σημαντική αναστολή και της συσσώρευσης αιμοπεταλίων που προκαλεί το TRAP. Η ενεργοποίηση με ADP ή TRAP οδήγησε σε μη αντιστρεπτή συσσώρευση των αιμοπεταλίων φαινόμενο το οποίο (όπως και στην περίπτωση ενεργοποίησης με PAF) δεν παρατηρήθηκε παρουσία της Lp(a). Από τα αποτελέσματα αυτά φαίνεται ότι η Lp(a) αναστέλλει την δράση του ADP, ενώ παράλληλα μπορεί και αναστέλλει και την δράση του TRAP στην συσσώρευση των αιμοπεταλίων.

Στη συνέχεια θελήσαμε να διερευνήσουμε κατά πόσο η Lp(a) αναστέλλει την έκκριση του ATP η οποία προκαλείται από τον PAF (το οποίο βρίσκεται αποθηκευμένο στα πυκνά κοκκία των αιμοπεταλίων και εκκρίνεται παράλληλα με το ADP). Η Lp(a) ανέστειλε πλήρως (100%) την έκκριση του ATP από τα πυκνά κοκκία αιμοπεταλίων που ενεργοποιήθηκαν με PAF. Το αποτέλεσμα αυτό δεν εξειδικευμένο έναντι της δράσης του αγωνιστή αυτού στα αιμοπετάλια αφού παρόμοια αναστολή (100%) παρατηρήθηκε και όταν ως αγωνιστές χρησιμοποιήθηκαν ADP και TRAP.

Συμπερασματικά, η Lp(a) αναστέλλει την έκκριση του ADP που προκαλείται από τον PAF, ενώ επίσης αναστέλλει και την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων που προκαλείται από το ADP. Στηριζόμενοι στο εύρημα ότι η Lp(a) αναστέλλει την συσσώρευση αλλά και την έκκριση που προκαλείται από το TRAP συνάγεται το συμπέρασμα ότι η λιποπρωτεΐνη αυτή αναστέλλει την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων με ένα γενικό μηχανισμό ο οποίος είναι ανεξάρτητος από το είδος του

αγωνιστή που χρησιμοποιείται αφού παρουσία PAF, ADP και TRAP προκάλεσε σημαντική αναστολή της συσσώρευσης αλλά και της έκκρισης του ATP. Όσο αφορά τον PAF η Lp(a) μπορεί και παρεμβαίνει στην δευτερογενή συσσώρευση, δράση η οποία αποδίδεται στην ικανότητα της λιποπρωτεΐνης αυτής να αναστέλλει αφενός μεν την έκκριση αλλά και την συσσώρευση που προκαλεί ο ενδογενώς παραγόμενος αγωνιστής (ADP).

Στην συνέχεια θελήσαμε να διερευνήσουμε ποια από τα συστατικά της Lp(a) είναι υπεύθυνα για την βιολογική της δράση. Επικεντρώσαμε το ενδιαφέρον μας στο ρόλο της PAF-AH η οποία διαφοροποιεί την δράση Lp(a) ως προς τον PAF αλλά και στην συνεισφορά της apo(a), η οποία αποτελεί χαρακτηριστικό συστατικό της Lp(a) που διαφοροποιεί την λιποπρωτεΐνη αυτή από την LDL. Για το σκοπό αυτό έγινε παρασκευή πλυμένων αιμοπεταλίων τα οποία, σε αντίθεση με το PRP το οποίο προσομοιάζει με τις *in vivo* συνθήκες, επιτρέπουν την εξειδικευμένη μελέτη της δράσης της Lp(a) αλλά και των επιμέρους δομικών συστατικών στα κύτταρα αυτά, αφού σύμφωνα με την παρασκευή αυτή παίρνουμε αιμοπετάλια που είναι απαλλαγμένα από τα υπόλοιπα συστατικά του πλάσματος. Το ποιο δύσκολο σημείο της ερευνητικής αυτής δουλειάς ήταν ενεργοποίηση των πλυμένων αιμοπεταλίων με PAF με δεδομένο ότι αυτός δεν αποτελεί ισχυρό αγωνιστή για τα αιμοπετάλια αυτά. Έτσι για να ξεπεραστεί η πειραματική αυτή δυσκολία χρησιμοποιήθηκε συνεργειακά ο συνδυασμός A23187 (που αποτελεί τον ιονοφόρο του Ca^{2+}) με PAF. Παρατηρήθηκε αναστολή τόσο της συσσώρευσης όσο και της ταχύτητας με την οποία αυτή επιτυγχάνεται από το σωματίδιο της Lp(a) η οποία δεν διαφοροποιήθηκε σημαντικά όταν έγινε προηγούμενη απενεργοποίηση της ενδογενούς PAF-AH της Lp(a). Συνεπώς, από τα αποτελέσματα αυτά προκύπτει ότι η PAF-AH δεν επηρεάζει σημαντικά την ανασταλτική δράση της Lp(a) ως προς την συσσώρευση από τον PAF.

Μια μέθοδος παρασκευής ανθρώπινων πλυμένων αιμοπεταλίων ευαίσθητων στην επίδραση του PAF είναι αυτή που προτάθηκε από τους Lotner και συν. (248) και η οποία στηρίζεται στην απομόνωση αιμοπεταλίων παρουσία ερυθροκυττάρων. Πράγματι, συγκεντρώσεις PAF 5-10 nM (ανάλογα με την ευαισθησία των αιμοπεταλίων) προκάλεσαν μέγιστη συσσώρευση της τάξης του 35 ± 5%. Σε πλυμένα αιμοπετάλια που παρασκευάστηκαν με αυτό τον τρόπο η Lp(a) ανέστειλε με δοσοεξαρτώμενο τρόπο την συσσώρευση αυτών. Απενεργοποίηση της ενδογενούς PAF-AH δεν διαφοροποίησε την ανασταλτική δράση της Lp(a). Στη συνέχεια για να

διερευνήσουμε τον πιθανό ρόλο της apo(a) στην ανασταλτική δράση της Lp(a) παρασκευάστηκε Lp(a-), δηλαδή λιποπρωτεΐνη χωρίς την apo(a). Βρέθηκε ότι λιποπρωτεϊνικό αυτό σωματίδιο, όχι μόνο διατήρησε την δράση της Lp(a) αλλά ήταν ικανό να αναστείλει ακόμη εντονότερα την συσσώρευση. Παράλληλα, σε σύγκριση με την Lp(a) μελετήθηκε και η δράση της LDL, η οποία μοιάζει δομικά με την Lp(a-), με σκοπό να διαπιστωθεί (με έμμεσο τρόπο) η συνεισφορά της apo(a) στην ανασταλτική δράση που παρουσιάζει το σωματίδιο της Lp(a). Δεν παρατηρήθηκε ανάλογη ανασταλτική δράση για το σωματίδιο της LDL στο ίδιο εύρος συγκέντρωσης με αυτό της Lp(a) αλλά και της Lp(a-) (εικόνες 41, 42Γ). (Παρόμοια αποτελέσματα ελήφθησαν όταν οι συγκεντρώσεις των Lp(a), Lp(a-) και LDL, εξαιτίας του διαφορετικού πρωτεϊνικού περιεχομένου τους, εκφράστηκαν σαν μg λιποπρωτεϊνικής μάζας /ml). Με βάση τα αποτελέσματα αυτά φαίνεται ότι η ανασταλτική δράση της Lp(a) ως προς τον PAF οφείλεται σε ξεχωριστά δομικά χαρακτηριστικά που έχει το σωματίδιο της Lp(a-) και η εκδήλωση των οποίων παρεμποδίζεται παρουσία της apo(a) αλλά και διαφοροποιούνται σε σχέση με την LDL.

Στην συνέχεια, για να διευκρινισθεί ο τρόπος με τον οποίο επιτυγχάνεται η αναστολή που παρατηρήθηκε στα πειράματα της συσσωρευομετρίας, διερευνήθηκε με χρήση κυτταρομετρίας ροής η επίδραση της Lp(a) στην έκφραση του αιμοπεταλιακού υποδοχέα $\alpha_{IIb}\beta_3$. Σε συνάφεια με τα αποτελέσματα της συσσωρευομετρίας σε πλυμένα αιμοπετάλια παρατηρήθηκε σημαντική αναστολή της έκφρασης του υποδοχέα $\alpha_{IIb}\beta_3$ που προκαλεί ο PAF, από τα σωματίδια Lp(a) και Lp(a-), ένα φαινόμενο το οποίο δεν παρατηρήθηκε για το σωματίδιο της LDL.

Για να διαπιστωθεί αν η ανασταλτική δράση της Lp(a), στα πλυμένα αιμοπετάλια, αφορά μόνο τον PAF ή αποτελεί γενικότερο λειτουργικό χαρακτηριστικό της λιποπρωτεΐνης αυτής εξετάστηκε η πιθανή επιδρασή της στην ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων αυτών με τον υδατοδιαλυτό αγωνιστή TRAP. Σε πλυμένα, κατά Loiner, αιμοπετάλια η Lp(a) ανέστειλε με δοσοεξαρτώμενο τρόπο την συσσώρευση που προκαλεί ο συγκεκριμένος αγωνιστής. Παρόμοια δράση παρουσίασε και το σωματίδιο της LDL, ένδειξη ότι η apo(a) δεν παίζει κάποιο ρόλο στην βιολογική (ανασταλτική) δράση της Lp(a). Μάλιστα οι παρατηρούμενες αναστολές είναι μεγαλύτερες αυτών που παρατηρήθηκαν, και για τα δύο σωματίδια, παρουσία PAF. Το ίδιο φαινόμενο παρατηρήθηκε και στο "κλασικό" σύστημα πλυμένων αιμοπεταλίων που ενεργοποιήθηκαν με τον ίδιο αγωνιστή. Παρατηρήθηκε δοσοεξαρτόμενη αναστολή της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων και από τα δύο

λιποπρωτεϊνικά σωματίδια. Παράλληλα παρατηρήθηκε σημαντική ανασταλτική δράση από το σωματίδιο της Lp(a) στην έκφραση του υποδοχέα $\alpha_{IIb}\beta_3$ μετά από ενεργοποίηση με TRAP και στα δύο συστήματα πλυμένων αιμοπεταλίων, ένα φαινόμενο το οποίο παρατηρήθηκε και για το σωματίδιο της LDL.

Είναι γνωστό ότι κατά την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων ο υποδοχέας $\alpha_{IIb}\beta_3$ αλλάζει διαμόρφωση, με αποτέλεσμα την αναγνώριση και δέσμευση διαφόρων προσδετών, κυρίως του Fg, που οδηγούν στην συσσώρευση των αιμοπεταλίων. Στη δέσμευση αυτή σημαντικό ρόλο διαδραματίζει η αλληλουχία Arg-Gly-Asp (RGD) που βρίσκεται σε όλα τα προσκολλητικά μόρια του υποδοχέα $\alpha_{IIb}\beta_3$.

Με δεδομένο ότι RGD αλληλουχία έχει ταυτοποιηθεί στο μόριο της apo(a) (19), αλλά και για να διερευνηθεί περαιτέρω ο τρόπος με τον οποίο η Lp(a) ασκεί ανασταλτική δράση στην ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων μελετήθηκε η δράση της στην πρόσδεση του Fg-FITC στον υποδοχέα $\alpha_{IIb}\beta_3$ σε ενεργοποιημένα με ADP αιμοπετάλια σε PRP με χρήση κυτταρομετρίας ροής.

Βρέθηκε ότι το σωματίδιο της Lp(a) ασκεί σημαντική ανασταλτική δράση στην πρόσδεση του Fg-FITC στον υποδοχέα $\alpha_{IIb}\beta_3$. Στηριζόμενοι στο παραπάνω εύρημα αλλά και λαμβάνοντας υπόψη τα πειράματα κυτταρομετρίας στα οποία παρατηρήθηκε αναστολή της έκφρασης του υποδοχέα $\alpha_{IIb}\beta_3$ μπορούμε να υποθέσουμε ότι είναι πιθανό η Lp(a) και το Fg να δρούν ανταγωνιστικά μεταξύ τους για πρόσδεση στον ενεργοποιημένο υποδοχέα $\alpha_{IIb}\beta_3$ ή ότι το σωματίδιο της Lp(a) προσδένεται σε σημείο της αιμοπεταλιακής μεμβράνης παρακείμενο του συγκεκριμένου υποδοχέα επηρεάζοντας με αυτό τον τρόπο άμεσα την πρόσδεση του Fg και κατ' επέκταση την λειτουργικότητα του υποδοχέα αυτού. Για να διασαφηνισθεί περαιτέρω ο ρόλος του Fg στην εκδήλωση της βιολογικής δράσης της Lp(a) στα αιμοπετάλια έγινε και πείραμα συσσωρευομετρίας. Έτσι σε πλυμένα αιμοπετάλια τα οποία ενεργοποιήθηκαν με TRAP η Lp(a) σε τελική συγκέντρωση 80 μg πρωτεΐνης/ml παρουσίασε αναστολή της τάξης του 51.0%. Παράλληλη παρουσία όμως αυξανόμενης συγκέντρωσης Fg είχε σαν αποτέλεσμα να παρατηρηθεί μια δοσοεξαρτώμενη μείωση της ανασταλτικής δράσης της Lp(a) ως προς τη συσσώρευση. Συμπερασματικά η Lp(a) αναστέλλει την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων από όλους τους αγωνιστές με ένα μη ειδικό μηχανισμό στον οποίο δεν φαίνεται να διαδραματίζει σημαντικό ρόλο η apo(a) και ειδικότερα ως προς τον PAF ούτε το περιεχόμενο σε PAF-AH. Αντίθετα, η δράση αυτή φαίνεται να αποδίδεται σε κάποιο άλλο ενδογενές συστατικό της. Πράγματι τα πειράματα κυτταρομετρίας

δείχνουν ότι η Lp(a) αναστέλλει τόσο την έκφραση του υποδοχέα $\alpha_{IIb}\beta_3$ όσο και την πρόσδεση του Fg (η οποία αποτελεί τον τελικό αποδέκτη της δράσης όλων των αγωνιστών) σε αυτόν με ανταγωνιστικό τρόπο. Συνεπώς είναι πιθανό η ανασταλτική δράση της λιποπρωτεΐνης αυτής να οφείλεται στην παρεμπόδιση της πρόσδεσης του Fg στον υποδοχέα η οποία όχι μόνο προκαλεί αναστολή της συσσώρευσης αλλά και την περαιτέρω ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων, όπως είναι η έκκριση.

Τα μέχρι σήμερα πειραματικά αποτελέσματα παραμένουν αντικρουόμενα για το ποιο είναι το πιθανό σημείο πρόσδεσης της Lp(a) στα αιμοπετάλια αλλά και την άμεση συνέπεια της πρόσδεσης αυτής. Στην μελέτη των Pedreno και συν (115) Lp(a) σωματίδια δεν ήταν ικανά να αναστείλουν την πρόσδεση ^{125}I-LDL σε αντίθεση με τις Lp(a-), LDL οποίες προσδένονταν με την ίδια συγγένεια. Η πρόσδεση της Lp(a)/r-apo(a) στην αιμοπεταλιακή μεμβράνη γίνεται με μεγάλη συγγένεια και είναι ανεξάρτητη του ισομορφικού μεγέθους της apo(a) αλλά και της αλληλουχίας Arg-Gly-Asp (RGD), ενώ στην διαδικασία αυτή δεν φαίνεται να παίζει ενεργό ρόλο ο αιμοπεταλιακός υποδοχέας $\alpha_{IIb}\beta_3$ (115). Σε συμφωνία με αυτά έρχονται τα αποτελέσματα των Ezratty και Martinez (117, 118) οι οποίοι επιπλέον προτείνουν ότι η σύνδεση της Lp(a) γίνεται σε σημεία της αιμοπεταλιακής μεμβράνης όπου υπάρχουν κατάλοιπα λυσινών. Αντίθετα, μελέτη των Malle και συν (116) με χρήση ^{125}I-Lp(a) αναδεικνύει ως υποψήφιο σημείο πρόσδεσης την υπομονάδα α_{IIb}. Στη μελέτη αυτή η πρόσδεση της Lp(a) ήταν 5-10 φορές ισχυρότερη αυτής των LDL και HDL. Σύμφωνα με τα αποτελεσματά μας η Lp(a) συνδέεται είτε στον (ενεργοποιημένο) υποδοχέα $\alpha_{IIb}\beta_3$ είτε σε κάποιο σημείο της αιμοπεταλιακής μεμβράνης πλησίον αυτού αναστέλλοντας την εκφρασή του. Όμως, τόσο η αναστολή της πρόσδεσης του PAC-1 όσο και η αναστολή της πρόσδεσης του Fg στον ενεργοποιημένο υποδοχέα $\alpha_{IIb}\beta_3$ με ανταγωνιστικό τρόπο (όπως αυτό φάνηκε από τα αποτελέσματα της κυτταρομετρίας αλλά και της συσσωρευομετρίας) υποθέτει περισσότερο ότι η Lp(a) συνδέεται στον ενεργοποιημένο υποδοχέα σε περιοχές που συνδέεται και το Fg, ενώ σ'αυτή τη σύνδεση δεν παίζει ρόλο η πολυπεπτιδική αλυσίδα της apo(a).

Το παραπάνω εύρημα υποδεικνύει έναν νέο μηχανισμό με τον οποίο πιθανά η Lp(a) να συμμετέχει στην παθοφυσιολογία της θρόμβωσης. Η σημασία αυτού για τον πιθανό παθοφυσιολογικό ρόλο της λιποπρωτεΐνης αυτής στην θρόμβωση ίσως να είναι μεγάλη, χρειάζονται όμως περισσότερες μελέτες για την πλήρη διερεύνηση αυτής της υπόθεσης.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Μελέτη των παραγόντων που επηρεάζουν την ενεργότητα της PAF-ακετυλοϋδρολάσης στην Λιποπρωτεΐνη (a). Ρόλος στην αθηροθρόμβωση

Λ. Δ. Τσιρώνης

Διδακτορική Διατριβή
Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

Το σωματίδιο της λιποπρωτεΐνης (a) [Lp(a)] είναι εμπλουτισμένο σε ενεργότητα ακετυλοϋδρολάσης του παράγοντα ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων (PAF-AH). Έτσι ένα λειτουργικό χαρακτηριστικό της Lp(a) είναι η υδρόλυση και απενεργοποίηση του PAF αλλά και των οξειδωμένων φωσφολιπιδίων, μόρια τα οποία ασκούν προφλεγμονώδη και προαθηρογόνο δράση. Στην διατριβή αυτή μελετήθηκαν η ενεργότητα αλλά και οι φαινόμενες κινητικές σταθερές Km και Vmax της PAF-AH στην Lp(a) σε σύγκριση με αυτές του ενζύμου που βρίσκεται συνδεδεμένο στην LDL σε στεφανιαίους ασθενείς και υγιείς μάρτυρες. Στην μελέτη πήραν μέρος 20 στεφανιαίοι ασθενείς καθώς και 25 υγιείς μάρτυρες. Τα επίπεδα της Lp(a) μετρήθηκαν με μέθοδο ELISA, ενώ οι ισομορφές της apo(a) προσδιορίστηκαν με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα 1.5% SDS-αγαρόζης και εκφράστηκαν ως αριθμός επαναλαμβανόμενων Kringle 4 (K4). Η απομόνωση της Lp(a) από το πλάσμα έγινε με χρωματογραφία συγγενείας σε στήλη Lysine-Sepharose 4B, ενώ αυτή της LDL με υπερφυγοκέντρηση. Η ενεργότητα της PAF-AH προσδιορίστηκε με την μέθοδο καταβύθισης με τριχλωροξικό οξύ. Η ειδική ενεργότητα και οι φαινόμενες κινητικές σταθερές της PAF-AH στην Lp(a) ήταν σημαντικά μικρότερες στους στεφανιαίους ασθενείς σε σύγκριση με τους μάρτυρες, ένα φαινόμενο το οποίο δεν παρατηρήθηκε στους μάρτυρες. Λαμβάνοντας υπόψη ότι όλοι οι στεφανιαίοι ασθενείς της μελέτης ελάμβαναν υπολιπιδαιμική αγωγή θελήσαμε να διερευνήσουμε τη πιθανή επίδραση αυτής στην ενεργότητα της PAF-AH της Lp(a) στα άτομα αυτά. Για το σκοπό αυτό έγινε στην μελέτη πήραν μέρος και 11 ασθενείς με πρωτοπαθή υπεχοληστερολαιμία (δυσλιπιδαιμία τύπου IIA) στους οποίους έγινε προσδιορισμός της ενεργότητας του ενζύμου στις Lp(a), LDL πριν και μετά την 5μηνη χορήγηση ατορβαστατίνης. Η θεραπεία με ατορβαστατίνη σύμφωνα με τα αποτελεσματά μας προκάλεσε σημαντική

μείωση της ενεργότητας της PAF-AH στην LDL, ενώ αντίθετα δεν επηρέασε την ενεργότητα της PAF-AH στην Lp(a), εύρημα το οποίο αποκλείει την συμμετοχή της υπολιπιδαιμικής θεραπείας στο παραπάνω φαινόμενο. Ωστόσο, η απομάκρυνση της apo(a) με αναγωγική διάσπαση από το υπόλοιπο λιποπρωτεϊνικό σωματίδιο είχε σαν αποτέλεσμα τη σημαντική αύξηση της ενζυμικής ενεργότητας της PAF-AH στην Lp(a) των στεφανιαίων, ένα φαινόμενο το οποίο δεν παρατηρήθηκε στην Lp(a) των μαρτύρων. Με βάση τα παραπάνω αποτελέσματα είναι πιθανό η πολυπεπτιδική αλυσίδα της apo(a) να επηρεάζει την ενεργότητα της PAF-AH στην Lp(a) των ασθενών με στεφανιαία νόσο μειώνοντας την ικανότητα αυτής να αποικοδομεί και να απενεργοποιεί φωσφολιπίδια με προφλεγμονώδη και προαθηρογόνο δράση.

Λαμβάνοντας υπόψη ότι ο PAF εκτός από υπόστρωμα για την PAF-AH αποτελεί και ισχυρό αγωνιστή για τα αιμοπετάλια μελετήθηκε η επίδραση της Lp(a) στην ενεργοποίηση των κυττάρων αυτών με PAF. Σε πλάσμα πλούσιο σε αιμοπετάλια η Lp(a) ανέστειλε με δοσοεξαρτώμενο τρόπο τόσο την πρωτογενή συσσώρευση που προκαλεί ο PAF όσο και την δευτερογενή η οποία οφείλεται στη δράση αγωνιστών οι οποίοι εκκρίνονται από τα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια. Η παρατηρούμενη αναστολή βρέθηκε να είναι αρκετά μικρότερη παρουσία του συστήματος CP/CPK και ασπιρίνης. Παράλληλα η Lp(a) ανέστειλε πλήρως την έκκριση του ATP από τα πυκνά κοκκία αιμοπεταλίων που ενεργοποιήθηκαν με PAF. Το φαινόμενο αυτό δεν ήταν εξειδικευμένο έναντι της δράσης του PAF, αφού παρόμοια αναστολή παρατηρήθηκε και όταν ως αγωνιστές χρησιμοποιήθηκαν ADP και TRAP. Για να διευκρινισθεί ο τρόπος με τον οποίο επιτυγχάνεται η αναστολή που παρατηρήθηκε στα πειράματα της συσσωρευομετρίας, διερευνήθηκε με χρήση κυτταρομετρίας ροής η επίδραση της Lp(a) στην έκφραση του αιμοπεταλιακού υποδοχέα $\alpha_{IIb}\beta_3$ μετά από ενεργοποίηση με PAF. Είτε παρουσία είτε απουσία του συστήματος CP/CPK και ασπιρίνης παρατηρήθηκε αναστολή της έκφρασης του υποδοχέα αυτού παρουσία της Lp(a). Στην συνέχεια θελήσαμε να διερευνήσουμε ποια από τα δομικά χαρακτηριστικά της Lp(a) είναι υπεύθυνα για την εκδήλωση της βιολογικής (ανασταλτικής) της δράσης. Για τον σκοπό αυτό έγινε παρασκευή πλυμένων αιμοπεταλίων. Βρέθηκε ότι η Lp(a) καθώς και η Lp(a-) ήταν ικανές να αναστείλουν σημαντικά τόσο την συσσώρευση όσο και την έκφραση του $\alpha_{IIb}\beta_3$ μετά από ενεργοποίηση με PAF, ένα φαινόμενο το οποίο δεν παρατηρήθηκε για την LDL. Προηγούμενη απενεργοποίηση της ενδογενούς PAF-AH δεν διαφοροποίησε την ανασταλτική δράση της Lp(a). Αντίθετα, όταν τα αιμοπετάλια ενεργοποιήθηκαν με TRAP τα σωματίδια Lp(a) και

LDL παρουσίασαν παρόμοια σημαντική ανασταλτική δράση τόσο ως προς τη συσσώρευση όσο και ως προς την έκφραση του υποδοχέα $\alpha_{IIb}\beta_3$. Επιπλέον βρέθηκε ότι το σωματίδιο της Lp(a) ασκεί σημαντική αναστολή της πρόσδεσης του Fg-FITC σε αιμοπετάλια που ενεργοποιήθηκαν με ADP. Συμπερασματικά είναι πιθανό η Lp(a) να αναστέλλει την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων με ένα μη ειδικό μηχανισμό αναστέλλοντας την έκφραση του υποδοχέα $\alpha_{IIb}\beta_3$ καθώς και την πρόσδεση του Fg σ'αυτόν. Στην παραπάνω διαδικασία δεν φαίνεται να διαδραματίζει σημαντικό ρόλο η apo(a) αλλά ούτε το περιεχόμενο της Lp(a) σε PAF-AH. Το παραπάνω εύρημα υποδεικνύει έναν νέο μηχανισμό με τον οποίο πιθανά η Lp(a) να συμμετέχει στην παθοφυσιολογία της θρόμβωσης.

ABSTRACT

Factors that affect the Lp(a)-associated PAF-acetylhydrolase activity. Role in atherothrombosis

L. D. Tsironis

Doctoral Dissertation
Department of Chemistry, University of Ioannina

Lipoprotein(a) [Lp(a)] is enriched in platelet activating factor acetylhydrolase (PAF-AH) activity. Thus, a functional characteristic of Lp(a), is its capability to hydrolyze and inactivate PAF and oxidized phospholipids, molecules that exert potent pro-inflammatory and pro-atherogenic activity. We studied the specific activity and the apparent kinetic constant Km, Vmax of the Lp(a)-associated PAF-AH in patients with CAD, in comparison to that of the LDL-associated PAF-AH activity. Twenty patients with CAD and 25 control subjects participated in the study. Lp(a) was measured by ELISA, and apo(a) isoform size was studied by 1.5% SDS-agarose gel electrophoresis and expressed as number of Kringle 4 (K4) repeats. Lp(a) was isolated from plasma by affinity chromatography onto a Lysine-Sepharose 4B column, while LDL by ultracentrifugation. The PAF-AH activity on Lp(a) as well as the enzyme activity on LDL were determined by the trichloroacetic acid precipitation method. The specific activity as well as the apparent kinetic constants of Lp(a) associated PAF-AH were significantly lower in CAD patients, a phenomenon that not observed on LDL. All CAD patients participated in the study were receiving statin therapy before the blood sampling. To investigate whether statin therapy might have any impact on the Lp(a)-associated PAF-AH activity, we enrolled in the study 11 patients with primary hypercholesterolemia (dyslipidemia of type IIA), and we determined the Lp(a) and LDL-associated enzyme activity before and 5 months after the initiation of therapy. Atorvastatin therapy in hypercholesterolemic patients did not affect either the activity or the kinetic constants of PAF-AH associated with Lp(a) whereas it significantly reduced the LDL-associated PAF-AH activity and kinetic constants. However, removal of apo(a) from Lp(a) of CAD patients by reductive

cleavage resulted in a significant increase in the specific activity and kinetic constants of PAF-AH on reduced Lp(a), a phenomenon which was not observed on Lp(a) of the control population. The above results suggest that the apo(a) moiety of Lp(a) may play an important role in the lower activity and kinetic constants of the PAF-AH associated with this lipoprotein in CAD patients, diminishing the capability of Lp(a) to degrade and inactivate proinflammatory and proatherogenic phospholipids.

Except from being a substrate for PAF-AH, PAF is also a potent agonist for platelets. We studied the effect of Lp(a) on PAF-induced platelet activation. In PRP, Lp(a) inhibited in a dose dependent manner the primary aggregation induced by PAF as well as the secondary one which is due to other agonists that are secreted from activated platelets. The observed inhibition was found to be decreased in the presence on CP/CPK and aspirin. In addition, Lp(a) fully inhibited the ATP secretion (a marker of dense granules) from platelets activated with PAF. This phenomenon wasn't specific to PAF, since similar inhibition was observed when ADP and TRAP were used as agonists. Subsequently, we performed flow cytometry study in an effort to further investigate the mechanisms of Lp(a)-inducing inhibition of platelet aggregation. The effect of Lp(a) on the expression on integrin receptor $\alpha_{IIb}\beta_3$ was determined on platelets activated by PAF. We observed that Lp(a) effectively inhibited the expression of $\alpha_{IIb}\beta_3$ in the presence or the absence of CP/CPK and aspirin. In order to investigate the structural characteristics of Lp(a) that are responsible for its biological activity, washed platelets were prepared. We found that both Lp(a) and Lp(a-) significantly inhibited the aggregation and the expression of $\alpha_{IIb}\beta_3$ on PAF-activated platelets, while LDL had no effect. Inactivation of endogenous PAF-AH had no effect on the inhibitory activity of Lp(a). When TRAP was used as agonist, Lp(a) and LDL exhibited similar inhibition of platelet activation. Furthermore we also found that the binding of Fg-FITC was significantly inhibited by Lp(a) on ADP-activated platelets. In conclusion, Lp(a) may inhibit platelet activation by non specific mechanism influencing the expression of $\alpha_{IIb}\beta_3$ and fibrinogen binding. Neither apo(a) nor Lp(a)'s PAF-AH content seems to play an important role in that phenomenon. The above findings suggest a novel mechanism by which Lp(a) may participate in the pathophysiology of thrombosis.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Berg K. A new serum type system in man: the Lp system. *Acta Pathol. Microbiol. Scand.* 1963; 59: 362-82.
2. Berg K, Mohr J. Genetics of the Lp system. *Acta Genet. Med.* Gemmellol (Roma) 1963; 13: 349-60.
3. Seegers W, Hirschorn K, Burnett L, Robson E, Harris H. *Science* 1965; 149: 303-4.
4. Albers JJ, Cabana VG, Warnick GR, Hazzard WR. Lp(a) lipoprotein: relationship to sinking pre-β lipoprotein, hyperlipoproteinemia, and apolipoprotein B. *Metabolism* 1975; 24: 1047-54.
5. Gaubatz JW, Heidman C, Gotto AM Jr, Morrisett JD, Dahlen GH. Human plasma lipoprotein(a). Structural properties. *J Biol. Chem.* 1983, 258: 4582-9.
6. Utermann G, Weber W. Protein composition of Lp(a) lipoprotein from human plasma. *FEBS Lett.* 1983; 154: 357-61.
7. Fless GM, Rolih CA, Scanu AM. Heterogeneity of human plasma lipoprotein(a). Isolation and characterization of lipoprotein subspecies and their apoproteins. *J Biol. Chem.* 1984; 259: 11470-8.
8. Eaton DL, Fless GM, Kohr WJ, Mc Lean JW, Xu QT, Miller CG, Lawn RM, Scanu AM. Partial amino acid sequence of apolipoprotein(a) shows that is homologous to plasminogen. *Biochemistry* 1987; 84: 3224-28.
9. Morrisett JD, Guyton JR, Gaubatz JW, Gotto AM Jr. Lipoprotein(a): structure, metabolism and epidemiology. *In: Plasma Lipoproteins. Chapter 4.* Gotto AM Jr, *(Eds), Elsevier Science Publisers B.V.* 1987; 129-52.
10. Fless GM, Scanu AM. Lipoprotein(a): biochemistry and biology. *In: Biochemistry and Biology of Plasma Lipoproteins. Chapter 4.* Scanu AM, Spector AA, *(Eds), Marcel Dekker. Inc. New York.* 1986; 73.
11. Jan AY, Guevara J, Spurlino J, Yang C, Tulinsky A, Prasad BVV, Gaubatz JW, Morrisett JD. Proposed mechanisms for binding of apo(a) Kringle type 9 to apoB-100 in human lipoprotein(a). (abstr) *The second International Conference on lipoprotein(a)* 1992;19.

12. Albers JJ, Kennedy H, Marcovina SM. Evidence that Lp(a) contains one molecule of apo(a) and one molecule of apoB: evaluation of amino acid analysis data. *J Lipid Res.* 1996; 37: 192-6.

13. Dahlen G, Berg K, Gillnas T, Ericson Lp(a) lipoprotein/pre-betal-lipoprotein in Swedish middle-aged males and in patients with coronary heart disease. C. *Clin. Genet.* 1975; 7: 334-41.

14. Ernst A, Helmhold M, Brunner C, Petho-Schramm P, Armstrong VW, Muller H-J. Identification of two functionally dinstict lysine-binding sites in Kringle 37 and in Kringles 32-36 of human apolipoprotein(a). *J Biol. Chem.* 1994; 270: 6227-34.

15. Trieu VN, Mc Conathy WJ. A two-step model for lipoprotein(a) formation. *J Biol. Chem.* 1995; 270: 15471-4.

16. Gabel BR, May LF, Marcovina SM, Koschinsky ML. Lipoprotein(a) Assembly: Quantitative assessment of the role of apo(a) Kringle IV types 2-10 in particle formation. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 1996; 16: 1559-67.

17. Fless GM, ZumMallen ME, Scanu AM. Physicochemical properties of apolipoprotein(a) and lipoprotein(a) derived from the dissosiation of human plasma lipoprotein(a). *J Biol. Chem.* 1986; 261: 8712-18.

18. Gaubatz JW, Chari MV, Nava ML, Guyton JR, Morrisett JD. Isolation and characterization of the two major apoproteins in human lipoprotein(a). *J Lipid Res.* 1987; 28: 76-79.

19. Mc Lean JW, Tonlison JE, Kuang W-J, et al. cDNA sequence of human apolipoprotein(a) is homologous to plasminogen. *Nature* 1987; 330: 132-7.

20. Magnusson S, Sottrup-Jensen L, Petersen TE, et al. Homologous "Kringle" structures common to plasminogen and prothrombin: substrate specificity of enzymes activating prothrombin and plasminogen. *In:* Ribbons DW, Brew K, *eds. Proteolysis and physiological regulation. New York: Academic Press,* 1976: 203-38.

21. Castellino FJ, Beals JM. The genetic relationships between the Kringle domains of human plasminogen, prothrombin, tissue plasminogen activator, urokinase, and coagulation factor XII. *J Mol. Evol.* 1987; 26:358-69.

22. Angles-Cano E, Rojas G. Apolipoprotein(a): Structure-Function Relationship at the Lysine-Binding Site and Plasminogen Activator Cleavage Site. *J Biol Chem* 1990; 265: 6104-6111.

23. Guevara J Jr, Knapp RD, Honda S, Northup SR, Morrisett JD. A structural assessment of the apo(a) protein of human lipoprotein(a). *Proteins* 1992; 12: 188-99.

24. Guevara J Jr, Jan AY, Knapp R, Tulinsky A, Morrisett JD. Comparison of ligand-binding sites of modeled apo(a) Kringle-like sequences in human lipoprotein(a). *Arterioscler. Thromb.* 1993; 13: 758-70.

25. Lackner C, Cohen JC, Hobbs HH. Molecular definition of the extreme size polymorphism in apolipoprotein(a). *Hum. Mol. Genet.* 1993; 2: 933-40.

26. Van der Hoek YY, Wittekoek ME, Beisigel U, Kastelein JJ, Koschinsky ML. The apolipoprotein(a) Kringle IV repeats which differ from the major repeat Kringle are present in variably-sized isoforms. *Hum. Mol. Genet.* 1993; 2:361-66.

27. Fless GM, Snyder ML, Furbee JW, Garcia-Hedo MT, Mora R. Subunit composition of lipoprotein(a) protein. *Biochemistry* 1994; 33: 13492-501.

28. Frank SL, Klisa KI, Sparkes RS, et al. The apolipoprotein(a) gene resides on human chromosome 6q26-27, in close proximity to the homologous gene for plasminogen. *Hum. Genet.* 1998; 79: 352-6.

29. Mangaghi P, Citterio E, Malgaretti N, Ottolenghi S, Taramelli R. Molecular characterization of the human apo(a)-plasminogen gene family clustered on the telomeric region of chromosome 6 (6q26-27). *Hum. Mol. Genet.* 1994; 3:437-42.

30. Byrne CD, Schwartz K, Meer K, Cheng J-F, Lawn RM. The human apolipoprotein(a)/plasminogen gene cluster contains a novel homologue transcribed in liver. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 1994; 14: 534-41.

31. Marcovina SM, Zhang ZH, Graur VP, Albers JJ. Identification of 34 apolipoprotein(a) isoforms: differential expression of apolipoprotein(a) alleles between American blacks and whites. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1993; 191: 1192-96.

32. Utermann G, Menzel HJ, Kraft HG, Duba HC, Kemmler HG, Seitz C. Lp(a) glycoprotein phenotypes: inheritance and relation to Lp(a)-lipoprotein concentrations in plasma. *J Clin. Invest.* 1987; 80: 458-65.

33. Utermann G. The mysteries of Lipoprotein(a). *Science* 1989; 246: 904-10.

34. Krempler F, Kostner GM, Bolzano K, Sandhofer F. Turnover of lipoprotein(a) Lp(a) in man. *J Clin.Inv.* 1980; 65: 1483-90.

35. Kostner GM and Krempler F. Lipoprotein(a). *Curr. Opin. Lipidol.* 1992; 3:279-84.

36. White AL, Rainwater DL, Lanford RE. Intracellular maturation of apolipoprotein(a) and assembly of lipoprotein(a) in primary baboon hepatocytes. *J Lipid Res.* 1993; 34: 509-17.

37. White AL, Rainwater DL, Hixson JE, Estlack LE, Lanford RE. Intracellular processing of apo(a) in primary baboon hepatocytes. *Chem. Phys. Lipids* 1994; 67/68: 123-33.

38. White AL, Hixson JE, Rainwater DL, Lanford RE. Molecular basis for null lipoprotein(a) phenotypes and the influence of apolipoprotein(a) size on plasma lipoprotein(a) level in the baboon. *J Biol. Chem.* 1994; 269: 9060-66.

39. White AL, Lanford RE. Cell surface assembly of lipoprotein(a) in primary cultures of baboon hepatocytes. *J Biol. Chem.* 1994; 269: 28716-23.

40. Sharp RJ, Pollock RC, Bowron ME, Mc Cormick SPA. *Circulation* 1999; 100: I-109.

41. Trieu VN, Zioncheck TF, Lawn RM, Mc Conathy WJ. Interaction of apolipoprotein(a) with apolipoproteinB-containing lipoproteins. *J Biol. Chem.* 1991; 266: 5480-85.

42. Frank S, Durovic S, Kostner K, Kostner GM. Inhibitors for the in vitro assembly of Lp(a). *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 1995, 15: 1774-80.

43. Gabel BR, May LF, Marcovina SM, Koschinsky ML. Lipoprotein(a) assembly: quantitative assesment of the role of the apo(a) Kringle IV types 2-10 in particle formation. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 1996; 16: 1559-67.

44. Frank S, Durovic S, Kostner GM. The assembly of lipoprotein Lp(a). *Europ. J. Clin. Inv.* 1996; 26: 109-14.

45. Gabel BR, Yao Z, Mc Leod RS, Young SG, Koschinsky ML. Carboxyl-terminal truncation of apolipoprotein B-100 inhibits lipoprotein(a) particle formation. *FEBS Lett.* 1994; 350: 77-81.

46. White AL, Lanfor RE. Biosynthesis and metabolism of lipoprotein(a). *Curr. Opin.Lipidol.* 1995; 6: 75-80.

47. Streyer E, Durovic S, Frank S, Giessauf W, Burger A, Dieplinger H, Zechner R, Kostner GM. The role of lecithin: cholesterol acyltransferase for lipoprotein(a) assembly. Structural of low density lipoproteins is a prerequisite for Lp(a) for formation in human plasma. *J. Clin. Invest.* 1994; 94: 2330-2340.

48. Durovic S, März W, Frank S, Scharnagl H, Baumstark MW, Zechner R, Kostner GM. Decreased binding of apolipoprotein(a) to famililal defective apolipoproteinB-100 (Arg→Gln). A study of the assembly of recombinant apolipoprotein(a) with mutant low density lipoproteins. *J. Biol. Chem.* 1994; 269: 30320-30325.

49. Lin AC, Lawn RM. Lipoprotein(a) and atherogenesis. *Trends Cardiovasc. Med.* 1994; 4: 40-44.

50. Snyder ML, Hay RV, Whitington PF, Scann AM, Fless GM. Binding and degradiation of lipoprotein(a) and LDL by primary cultures of human hepatocytes: comparison with cultured human monocyte-macrophages and fibroblasts. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 1994; 14: 770-779.

51. Utermann G, Hoppichler F, Dieplinger H, Seed M, Thompson G, Boerwinkle E. Defects in the low density lipoprotein receptor gene affect lipoprotein(a) levels: multiple interaction of two gene loci assosiated with premature atherosclerosis. *Proc. Nat.l Acad. Sci. USA* 1989; 86: 4171-4174.

52. Fan J, Challah M, Shimoyamada H, Schiomi M, Marcovina S, Watanabe T. Defects of the LDL receptor in WHHL transgenetic rabbits lead to a marked accumulation of plasma lipoprotein(a). *J Lipid Res.* 2000; 41: 1004-12.

53. Kostner GM, Grillhofer H. The interaction of Lp(a) with normal and LDL-receptor deficient human skin fibrinoblasts. *Chem. Phys. Lipids.* 1994; 67/68: 153-9.

54. Kostner GM, Gavish D, Leopold B, Bolzano K, Weintraub MS, Breslow JL. HMG Coa reductase inhibitors lower LDL cholesterol without reducing Lp(a) levels. *Circulation.* 1989; 80: 1313-9.

55. Williams KJ, Fless GM, Petrie KA, Snyder ML, Brocia RW, Swenson TL. Mechanisms by which lipoprotein lipase alters cellular metabolism of lipoprotein(a), low density lipoprotein receptors and heparan sulfate proteoglycans. *J. Biol. Chem.* 1992; 267: 13284-92.

56. Keesler GA, Li Y, Skiba PJ, Fless GM, Tabas I. Macrophage foam cell lipoprotein(a)/apoliopoprotein(a) receptor: cell-surface localization, dependence of induction on new protein synthesis, and ligand specificity. *Arterioscler. Thromb.* 1994; 14: 1337-45.

57. Kronenberg F, Trenkwalder E, Lingenhel A, et al.Renovascular arteriovenous differences in Lp(a) plasma concentrations suggest removal of Lp(a) from the renal circulation. *J Lipid Res.* 1997; 38: 1755-63.

58. Mc Agraves K, Kozarsky K, Fallon JT, Harpel PC, Strickland DK. The atherogenic lipoprotein Lp(a) is internalized and degraded in a process mediated by VLDL receptor. *J Clin. Invest.* 1997; 100: 2170-81.

59. Kostner GM. The physiological role of Lp(a). *In:* Scanu AM (ed) Lipoprotein(a) *Academic Press Inc. San Diego California.* 1990; 183-204.

60. Sandholzer C, Feussner G, Brunzell J, Utermann G. Distribution of apolipoprotein(a) in the plasma from patients with lipoprotein lipase deficiency and with type III hyperlipoproteinemia. No evidence for a triglyceride-rich precursor of lipoprotein(a). *J Clin. Inv.* 1992; 90: 1958-65.

61. Beil Fu, Terres W, Orgass M, Greten H. Dietary fish oil lowers lipoprotein(a) in primary hypertriglyceridemia. *Atherosclerosis* 1991; 90: 95-7.

62. Crook MA, Haq S, Chusney G, Tutt P. Acute phase proteins and lipoprotein (a) in patients with severe hypercholesterolaemia and normal subjects. *Clin. Chim. Acta* 1994; 224: 199-201.

63. Dahlen GH. Incidence of Lp(a) among populations. *In:* Scanu AM (ed) Lipoprotein(a) *Academic Press Inc. San Diego California.* 1990; 151-173.

64. Meada SA, Abe A, Seishima M, Makino K, Noma A, Kawade M. Transient changes of serum lipoprotein(a) as an acute phase protein. *Atherosclerosis* 1989; 78: 145-150.

65. Slunga L, Johnson O, Dahlen GH, Eriksson S. Lp(a) and acute phase phase proteins in acute myocardial infarction. *Scand J Clin Lab Invest* 1992; 52: 95-101.

66. Scanu AM. Lipoprotein(a):a potential bridge between the fields of atherosclerosis and thrombosis. *Arch Pathol Lab Med* 1988; 112: 1045-7.

67. Ezratty A, Simon D, Fless G, Scanu A, Loscalzo J. Lipoprotein(a) inhibits plasminogen binding to platelets. *Clin. Res.* 1991; 39: 197A.

68. Gonzalez-Gronow M, Edelberg JM, Pizzo SV. Further characterization of the cellular plasminogen binding site: evidence that plasminogen 2 and lipoprotein(a) compete for the same site. *Biochemistry* 1989; 28: 2374-77.

69. Hajjar KA, Harpel PC, Jaffe EA, Nachman RL. Binding of plasminogen to cultured human endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 1986; 261: 11656-62.

70. Harpel PC, Gordon BR, Parker TS. Plasmin catalyses binding of lipoprotein(a) to immobilized fibrinogen and fibrin. *Proc. Natl. Sci. USA* 1989; 86: 3847-51.

71. Hajjar KA, Gavish D, Breslow JL, Nachman RL. Lipoprotein(a) modulation of endothelial cell surface fibrinolysis and its potential role in atherosclerosis. *Nature* 1989; 339: 303-305.

72. Menhart N, Sehl LC, Kelley RF, Castellino FJ. Construction, expression and purification of recombinant Kringle 1 of human plasminogen and analysis of ist interactions with ω-aminoacids. *Biochemistry* 1991; 30: 1948.

73. Rejante MR, Byeon IJL, Llinas M. Ligand specificity of human plasminogen kringle 4. *Biochemistry* 1991; 30: 11081.

74. Sangrar W, Marcovina SM, Koshinsky ML. Expression and characterization of apolipoprotein(a) Kringle IV types 1,2 and 10 in mammalian cell. *Prot. Eng.* 1994; 7: 723.

75. Chapman MJ, Huby T, Nigon F, Thillet J. Lipoprotein(a): implication in atherothrombosis. *Atherosclerosis* 110 (suppl) 1994; S69-75.

76. Scanu AM, Scandiani L. Lipoprotein(a): Structure, biology and clinical relevance. *In: Lipoprotein(a). Stollerman GH. (Eds) Mosby Year Book St Louis: Mosby* 1991; 249-270.

77. Loscalzo J, Weinfeld M, Fless GM, Scanu AM. Lipoprotein(a), fibrin binding and plasminogen activation. *Arteriosclerosis* 1990; 10: 240-245.

78. Etingen OR, Hajjar DP, Hajjar ka, Harpel PC, Nachman RL. Lipoprotein(a) regulates plasminogen activator inhibitor-1 expression in endothelial cells. A potential mechanism in thrombogenesis. *J. Biol. Chem.* 1991; 266: 2459-65.

79 Zhang J, Ren S, Shen GX. Glycation aplifies lipoprotein(a)-indused alterations in the generation of fibrinolytic regulators from human vascular endothelial cells. *Atherosclerosis* 2000; 150: 299-308.

80 Grainger DJ, Kirschenlohr HL, Metcalfe JC, Weissberg PL, Wade DP, Lawn RM. Proliferation of human smooth muscle cells promoted by lipoprotein(a). *Science* 1993; 260: 1655-58.

81 Grainger DJ, Kemp PR, Liu AC, Lawn RM, , Metcalfe JC. Activation of transforming growth factor-β is inhibited in apolipoprotein(a) transgenic mice. *Nature* 1994; 370:460-462.

82 Rath M, Niendorf A, Reblin T, Dietel M, Krebber HJ, Beisiengel U. Detection and pualification of lipoprotein(a) in the arterial wall of 107 coronary bypass patients. *Arteriosclerosis* 1989; 9: 579-92.

83 Niendorf A, Rath M, Wolf K, Peters S, Arps H, Beisiengel, Dietel M. Morphological detection and quantification of lipoprotein(a) deposition in the atheromatous lesions of human aorta and coronary arteries. *Virchows Arch* 1990; 417: 105-111.

84 Reblin T, Meyer N, Labeur C, Henne-Bruns D, Beisiengel U. Extraction of lipoprotein(a), apo B, and apoE from human arterial wall and atherosclerotic plaques. *Atherosclerosis* 1995; 113: 179-88.

85 Smith EB, Cochran S. Factors influencing the accumulation in fibrous plaques of lipid derived from low density lipoprotein, II: preferential immobilization of lipoprotein (a) Lp(a). *Atherosclerosis* 1990; 84: 173- 181.

86 Brown MS, Goldstein JL. Plasma lipoproteins: teaching old dogmas new tricks. *Nature* 1987; 330: 113-114.

87 Bihari-Varga M, Gruber E, Rotheneder M, Zechner R, Kostner G. Interaction of lipoprotein Lp(a) and low-density lipoprotein with glycosaminoglycans from human aorta. *Arteriosclerosis* 1988; 8: 851-857.

88 Beisiengel U, Niendorf A, Wolf K, Reblin T, Rath M. Lipoprotein(a) in the arterial wall. *Eur Heart J* 1990; 11 (suppl E): 174-183.

89 Pepin JM, O'Neal JA, Hoff HF. Quantification of apo(a) and apoB in human atherosclerotic lesions. *J. Lipid Res.* 1991; 32: 317-327.

90 Salonen EM, Jauhiainen M, Zardi L, Vaheri A, Enholm C. Lipoprotein(a) bindws to fibronectin and has serine protease activity capable of cleaving it. *EMBO J* 1989; 8: 4035-40.

91 van der Hoek YY, Sangrar W, Gote GP, Kastelein JJP, Koschinsky ML. Binding of recombinant apolipoprotein(a) to extracellular matrix proteins. *Arterioscle.r Throm.b Vas.c Biol.* 1994; 14: 1792-98.

92 Haberland ME, Fless GM, Scanu AM, Fogelman AM. Malondialdehyde modification of lipoprotein(a) produces avid up take by human monocyte-macrophages. *J. Biol. Chem.* 1992; 267: 4143-51.

93 Sattler W, Kostner GM, Waeg G, Esterbauer H. Oxidation of Lp(a). A comparison with low-density lipoproteins. *Biochim. Biophys. Acta* 1991; 1081: 65-74.

94 Kostner GM, Grillhofer HK. Lipoprotein(a) mediates high affinity low density lipoprotein association to receptor negative fibrinoblasts. *J. Biol. Chem.* 1991; 266: 21287-292.

95 Armstrong VW, Cremer P, Eberle E, Manke A, Shulze E, Wieland H, Kreuzer H, Seidel D. The association between serum Lp(a) concentrations and angiographically assesed coronary atherosclerosis depence on serum LDL levels. *Atherósclerosis* 1986; 62: 249-257.

96 Utermann G, Hoppichler F, Dieplinger H. Defects in the low density lipoprotein receptor gene affect lipoprotein(a) levels: multiplicative interaction of two gene loci associated with premature atherosclerosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1989; 86: 4171-74.

97 Maher VM, Brown BG, Marcovina SM, Hillger LA, Zhao XQ, Albers JJ. Effects of lowering elevated LDL cholesterol on the cardiovascular risk of lipoprotein(a). *JAMA* 1995; 274: 1771-74.

98 Harpel PC, Chang VT, Borth W. Homocysteine and other sulfydryl compounds enhance the binding of lipoprotein(a) to fibrin: a potential biochemical link thrombosis, atherogenesis and sulfhydryl compound metabolism. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1992; 89: 10193-7.

99 Harpel PC, Borth W.Fibrin, lipoprotein(a), plasmin interactions: a model linking thrombosis and atherogenesis. *Ann NY Acad Sci* 1992; 667: 233-8.

100 Karmansky I, Gruener N. Roles of immobilized glycozylated proteins and lipoprotein(a) in adhesivity of endothelial cells: possible implications for atherogenesis. *Cell Biol Int* 1992; 16: 503-515.

101 Poon M, Zhang X, Dunsky KG, Taubman MB, Harpel PC. Apolipoprotein(a) induces monocyte chemotactic activity in human vascular endothelilal cells. *Circulation* 1997; 96: 2514-19.

102 Takami S, Yamashita S, Kihara S, Ishigami M, Takemura K, Kume N, Kita T, Matsuzawa Y. Lipoprotein(a) enhances the expression of intercellular adhesion molecule-1 in human umbilical vein endothellial cells. *Circulation* 1998; 97: 721-8.

103 Allen S, Khan S, Tam SP, Koschinsky ML, Taylor P, and Yacoub M. Expression of adhesion molecules by Lp(a): a potencial novel mechanism for its atherogenicity. *FASEB J.* 1998; 12: 1765-76.

104 Zhao S, Xu DY. Oxidized Lipoprotein(a) Enhanced the Expression of P-selectin in cultured Human Umbilical Vein Endothelial Cells. *Thrombosis Research* 2000; 100: 501-10.

105 Zhao S, Xu DY. Oxidized lipoprotein(a) increases the expression of platelet-derived growth factor-B in human umbilical vein endothelial cells. *Clinica Chimica Acta* 2000; 296: 121-33.

106 Köchl S, Fresser F, Lobentanz E, Baier G, and Utermann G. Novel Interaction of Apolipoprotein(a) With β-2 Glycoprotein I Mediated by the Kringle IV Domain. *Blood* 1997; 90: 1482-89.

107 Ribatti D, Vacca A, Giacchetta F, Cesaretti S, Anichini m, Roncali L, Damacco F. Lipoprotein(a) induces angiogenesis on the click embryo chlorioallantoic membrane. *Eur J Clin Invest* 1998; 28: 533-37.

108 Lou XJ, Kwan HH, Prionas SD, Yang ZJ, Lawn RM, Fajardo LF. Despite its homology to angiostatin apolipoprotein(a) does not affect angiogenesis. *Exp Mol Pathol* 1998; 65: 53-63.

109 Zahavi J, Betteridge JD, Jones NAG, Galton DJ, Kakkar VV. Enhanced in vivo platelets release reaction and malondialdehyde formation in patients with hyperlipidemia. *Am J Med* 1981; 70: 59-64.

110 Lowe GDO, Drummond MM, Third JL, Bremner WF, Forbes CD, Prentice CR, et al. Increased plasma fibrinigen and platelet-aggregates in type II hyperlipoproteinaemia. *Thromb Haemost* 1979; 42: 1503-7.

111 Carvaiho ACA, Cilman RW, & Lee RS. Platelet function in hyperlipoproteinemia. *New England Journal of Medicine* 1974; 290: 434-8.

112 Corash L, Andersen J, Poindexter BJ & Schaefer EJ. Platelet function and survival in patients with severe hypercholesterolemia. *Arteriosclerosis* 1981; 1: 443-8.

113 Di Minio G, Silver MJ, Cerbone AM et al. Increased fibrinogen binding to platelets from patients with familial hypercholesterolemia. *Arteriosclerosis* 1986; 6: 203-11.

114 Desai K, Bruckdorfer KR, Hutton RA & Owen JS. Binding of apoE-rich high density lipoprotein particles by saturable sites on human blood platelets inhibits agonist-induced platelet aggregation. *Journal of Lipid Research* 1989; 30: 831-40.

115 Pedreno J, Fernandez R, Culllare C, Barcelo A, Elorza MA, Castellarnau C. Platelet Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ (GPIIb-IIIa) Is Not Implicated in the Binding of LDL to Intact Resting Platelets. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1997; 17: 156-63.

116 Malle E, Ibovnik A, Steinmetz A, Kostner GM, Sattler W. Identification of Glycoprotein IIb as the Lipoprotein(a)-Binding Protein on Platelets. *Arterioscler Thromb.* 1994; 14: 354-52.

117 Ezratty A, Simon DI, and Loscalzo J. Lipoprotein(a) Binds to Human Platelets and Attenuates Plasminogen Binding and Activation. *Biochemistry* 1993; 32: 4628-33.

118 Martinez C, Rivera J, Loyau S, Corral J, Gonzalez-Conejero R, Lozano ML, Vicente V, Angles-Cano E. Binding of Recombinant Apolipoprotein(a) to Human Platelets and Effect on Platelet Aggregation. *Thromb Haemost* 2001; 85: 686-93.

119 Gries A, Gries M, Wurm H, Kenner T, Ijsseldijk M, Sixma JJ, Kostner GM. Lipoprotein(a) Inhibits Collagen-Induced Aggregation of Thrombocytes. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1996; 16: 648-55.

120 Rand ML, Sangrar W, Hancock MA, Taylor DM, Marcovina SM, Packham MA, Koschinsky ML. Apolipoprotein(a) enhances platelet responses to the thrombin receptor-activating peptide, SFLLRN. *Arterioscle.r Throm.b Vas.c Biol.* 1998; 18: 1393-99.

121 Marcovina SM, Koschinsky ML. Lipoprotein(a): structure, measurment and clinical significance. *In: Rifai N, Warnick GR, Dominiczak MH, eds. Handbook of Lipoprotein Testing. Washington, DC: AACC Press* 1997: 283-313.

122 Koschinsky ML, Marcovina SM. Lipoprotein(a): structural implications for pathophysiology. *Int J Clin Lab Res* 1997; 27:14-23.

123 Albers JJ, Adolphson JL, Hazzard WR. Radioimmunoassay of human plasma Lp(a) lipoprotein. *J. Lipid. Res.* 1977; 18: 331-8.

124 Kostner GM, Avogaro P, Gazzolato G, Math E, Bittolo-Bon G, Quinici GB. Lipoprotein Lp(a) and the risk for myocardial infarction. *Atherosclerosis* 1981; 38: 51.

125 Rosengren A, Wihelmsen L, Eriksson E, Risberg B, Webel H. Lipoprotein(a) and coronary heart disease: a prospective case control study in ageneral population sample of middle-aged men. *BMJ* 1990; 301: 1248-1251.

126 Cantin R, Gagnon F, Moorjani S, et al. Is lipoprotein(a) an independent risk factor for ischemic heart disease in men? The Quebec Cardiovascular Study. *J Am Coll Cardiol* 1998; 31: 519-25.

127 Sigurdsson G, Baldursdottir A, Sigvaldason H, Aggnarsson U, Thorgeirsson G, Sigfusson N. Predictive value of apolipoproteins in a prospective survey of coronary artery disease in men. *Am J Cardiol* 1992; 69: 1251-54.

128 Schaefer EJ, Lamon-Fava S, Jener JL, Mc Namara JR, Ordovas JM, Davis CE, Abolafia JM, Lippel K, Levy RI. Lipoprotein(a) levels and risk of coronary heart disease in men. The Lipid Research Clinics Coronary Primary Prevention Trial. *JAMA* 1994; 271: 999-1003.

129 Cremer P, Nagel D, Labrot B, Mann H, Muche R, Elster H, Seidel D. Lipoprotein Lp(a) as apredictor of myocardial infarction in comparison to fibrinogen, LDL cholesterol and other risk factors: results from the prospective Gottingen Risk, Incidence and Prevalencde Study (GRIPS). *Eur J Clin Invest* 1994; 24: 444-453.

130 Bostom AG, Cupples LA, Jenner JL, Ordovas JM, Seman LJ, Wilson PWF, Schaefer EJ, Castelli WP. Elevated plasma lipoprotein(a) and coronary heart disease in men aged 55 years and younger. *JAMA* 1996; 276: 544-548.

131 Jauhiainen M, Koskinen P, Ehnholm C, Frick MH, Manttari M, Manninen V, Huttunen JK. Lipoprotein(a) and coronary heart disease risk: a nested case-control study of the Helsinky Heart Study participants. *Atherosclerosis* 1991; 89: 59-67.

132 Alfthan G, Pekkanen J, Jauhiainen M, Pitkdniemi J, Karvonen M, Tuomilehto J, Salonen JT, Ehnholm C. Relation of serum homocysteine and lipoprotein(a) concentrations to atherosclerotic disease in a prospective Finnish population-based study. *Atherosclerosis* 1994; 106: 9-19.

133 Ridker PM, Hennekens CH, Stampfer MJ. A prospective study of lipoprotein(a) and the risk of myocardial infarction. *JAMA* 1993; 270: 2195-99.

134 Kark JD, Sandholzer C, Friedlander Y, Utermann G. Plasma Lp(a), apolipoprotein(a) isoforms and acute myocardial infarction in men and women: a case-control study in the Jerusalem population. *Atherosclerosis* 1993; 38: 139-151.

135 Seed M, Hopplicher F, Reaveley D, McCarthy S, Thompson GR, Boerwinkle E, Utermann G. Relation of serum lipoprotein(a) concentration and

apolipoprotein(a) phenotype to coronary heart disease in patients with familial hypercholesterolemia. *N Eng J Med* 1990; 322: 1494-99.

136 Guo HC, Chapman MJ, Bruckert E, Farriaux JP, DeGennes JL. Lipoprotein Lp(a) in homozygous familial hypercholesterolemia : density profile, particle heterogeneity and apolipoprotein(a) phenotype. *Atherosclerosis* 1991; 86: 69-83.

137 Wild SH, Fortmann SP, Marcovina SM. A prospective case-control study of lipoprotein levels and apo(a) size and risk of coronary heart disease in Stanford Five-City Project participants. *Arterioscl Thromb Vasc Biol* 1997; 17: 239-245.

138 Bostom AG, Gagnon DR, Cupples A, Wilson PWF, Jenner FL, Ordovas JM, Schaefer EJ, Castelli WP. A prospective investigation of elevated lipoprotein(a) detected by electrophoresis and cardiovascular disease in women: the Framingham Heart Study. *Circulation* 1994; 90: 1688-95.

139 Harvie NR, Schultz JS. Studies of Lp(a) lipoprotein as a quantitative genetic trait. *Proc Natl Acad Sci USA* 1970; 66: 99-103.

140 Guyton JR, Dahlen GH, Patsch W, Kautz JA, Gotto AM. Relationship of plasma lipoprotein (a) levels to race and to apolipoprotein B. *Arteriosclerosis* 1985; 5: 265-272.

141 Taddei-Peters WC, Butman BT, Jones GR, Venetta TM, Macomber PF, Ransom H. Quantification of lipoprotein(a) particles containing various apolipoprotein(a) isoforms by anti-apo(a) capture antibody and a polyclonal anti-apolipoprotein B detection antibody sandwich enzyme immunoassay. *Clin Chem* 1993; 39: 1382-9.

142 Henson PM. Release of vasoactive amines from rabbit platelets induced by antiplatelet antibody in the presence and absence of complement. *J. Immunol.* 1970; 104: 924-934.

143 Siraganian RP and Olser AG. Destruction of rabbit platelets in the allergic response of sensitized leukocytes. I. Demonstration of a fluid phase intermediate. *J. Immunol.* 1971; 106: 1244-1251.

144 Demopoulos CA, Pinckard RN, Hanahan DJ. Platelet-activating factor. Evidence for 1-O-alkyl-2-acetyl-sn-glyceryl-3-phosphorylcholine as the active component (a new class of lipid chemical mediators). *J. Biol. Chem.* 1979; 254: 9355-9358.

145 Imaizumi T-A, Stafforini DM, Yamada Y, McIntyre TM, Prescott SM, Zimmerman GA. Platelet-activating factor: a mediator for clinicians. *J. Internal Med.* 1995; 238: 5-20.

146 Benveniste J, Henson PM, Cohrane CG. Leukocyte-dependent histamine release from rabbit platelets. The role of IgE, basophils, and a platelet-activating factor. *J. Exp. Med.* 1972; 136:1356-1377.

147 Hanahan DJ, Demopoulos CA, Liehr J and Pinckard RN. Identification of platelet-activating factor isolated from rabbit basophils as acetyl glyceryl ether phosphorylcholine. *J. Biol. Chem.* 1980; 255: 5514-5516.

148 Ludwig JC, Pinckard RN. Diversity in the chemical structures of neutrophil-derived platelet-activating factors. *In :New horizons in Platelet Activating Factor Research, edited by Winslow CM, Lee JL, Wiley J & Sons, New York* 1987; 59-71.

149 Mueller HW, O'Flaherty JT, Wykle RL. The molecular species distribution of platelet-activating factor synthesized by rabbit and human neutrophils. *J Biol Chem* 1984; 259:14554-14559.

150 Pinckard RN, Jackson EM, Hoppens C, Weintraub ST, Ludwig JC, McManus LM, Mott GE. Molecular heterogeneity of platelet-activating factor prodused by stimulated human polymorphonuclear leukocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 1984; 122: 325-332.

151 Kroegel C, Yulkawa T, Westwick J and Barnes PJ. Evidence for two platelet-activating factor receptors on eosinophils: dissociation between PAF-induced intracellular calcium mobilization degranulation and superoxide anion generation in eosinophils. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1989; 162: 511-522.

152 McManus LM. Pathobiology of platelet-activating factors. Path. and *Immun.Res.* 1986; 5: 104-117.

153 Koltai M and Braquet P. Involvement of PAF in atherogenesis. Brief review. *Agents Actions* 1992; 37: 333-339.

154 Wyckle RL, Olson SC, O'Flaherty JT. Biochemical pathways of platelet-activating factor synthesis and breakdown. *Adv. Inflam. Res.* 1986; 11: 71-81.

155 Wyckle RL, Malone B, Snyder F. Enzymatic synthesis of 1-O-alkyl-2-acetyl-sn-glycero-3-phosphocholine, a hypotensive and platelet-activating lipid. *J. Biol. Chem.* 1980; 255:10256-10260.

156 Lee T-C, Uemura Y, Snyder F. A novel CoA-independent transacetylase produces the ethanolamine plasmalogen and acyl analogs of platelet-activating factor (PAF) with PAF as the acetate donor in HL-60 cells. *J. Biol. Chem.* 1992; 267: 19992-20001.

157 Liu M and Subbaiah PV. Hydrolysis and transesterification of platelet-activating factor by lecithin-cholesterol acyltransferase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 6035-6039.

158 Renooij W, Snyder R. Biosynthesis of 1-O-alkyl-2-acetyl-sn-glycero-3-phosphocholine (platelet activating factor and a hypotensive lipid) by cholinephosphotransferase in various rat tissues. *Biochem. Biophys. Acta.* 1981; 663: 545-556.

159 Pinckard RN, Farr RS and Hanahan DJ. Physicochemical and functional identity of rabbit platelet-activating factor (PAF) released in vivo during IgE anaphylaxis with PAF released in vitro from IgE-sensitized basophils. *Journal of Immunology* 1979; 123: 1847-1857.

160 Farr RS, Cox CP, Wardlow ML and Jorgensen R. Preliminary studies of an acid-labile factor (ALF) in human sera that inactivates platelet-activating factor (PAF). *Clinical Immunology and Immunopathology* 1980; 15: 318-321.

161 Chignard M, Le Courdic JP, Tence M, Vargaftig BB, Benveniste J. The role of PAF in platelet aggregation. *Nature* 1979; 799-800.

162 Chap M, Manco G, Simon MF, Benveniste J, Douste-Blazy L. Biosynthetic labeling of PAF from radioactive acetate by stimulated platelets. *Nature* 1981; 289: 312-314.

163 Marcus AJ, Safer LB, Ullman HL, Wong KTH, Broekman MJ, Weskler BB, Kaplan KL. Effects of acetyl glycerylether phosphorylcholine on human platelet function in vitro. *Blood* 1981; 58: 1027-31.

164 Benveniste J, Chignard M, Le Couedic JP, Vargaftig BB. Biosynthesis of PAF-acether II. Involvement of phospholipase A2 in the formation of PAF-acether and lyso PAF from rabbit platelets. *Thrombosis Res* 1982; 25: 375-85.

165 Chignard M, Le Couedic JP, Vargaftig BB, Benveniste J. Platelet-activating factor (PAF-acether) secretion from platelets: effect of aggregating agents. *Brit J Hematol* 1980; 46: 455-64.

166 Kloprogge E, de Haas GH, Gorter G, and Akkerman JWN. Properties of PAF-acether-induced platelet aggregation and secretion. Studies in gel filtered human platelets. *Thromb. Res.* 1983; 29: 595-608.

167 Chignard M, Lalau Keraly C, Nunez D, Coëffier E, and Benveniste J. PAF-acether and platelets. In *Platelets in Biology and Pathology III* (Edited by Mac Intyre DE and Gordon JL), pp. 289-315. Elsevier Science Publishers BV (Biomedical Division), Amsterdam, The Netherlands.

168 Valone FH, Coles E, Reinhold VR, Goetzl EF. Specific binding of phospholipids platelet activating factor by human platelets. *J Immunol* 1982; 129: 1637-41.

169 Kloprogge E, Akkerman JWN. Binding kinetics of PAF acether to human platelets. *Biochem J* 1984; 223: 901-909.

170 Kloprogge E, Akkerman JWN. Platelet-activating factor (PAF-acether) induces high- and low-affinity binding of fibrinogen to human platelets via independent mechanisms. *Biochem J* 1986; 240: 403-12.

171. Hwang SB. Specific receptors for PAF, receptor heterogeneity and signal transduction mechanisms. *J Lipid Mediators* 1990; 2: 123-58.

172 Chau LY, Jii YJ. Characterization of ^{3}H-labelled platelet activating factor receptor complex solubilized from rabbit platelet membranes. *Biochim Biophys Acta* 1988; 970: 103-12.

173 Chau LY, Tsai YM, Cheng JR. Photoaffinity labeling of platelet activating factor binding sites in rabbit platelets membranes. *Biochem Biophys Res Commun* 1989; 161: 1070-76.

174 Rogers JE, Duronio V, Wong SI, Mc Neil M, Salari H. Solubilization of a functionally active platelet-activating factor receptor from rabbit platelets. *Biochem J* 1991; 278: 405-10.

175 Valone FH. Isolation of a platelet membrane protein which binds the platelet-activating factor 1-O-hexadecyl-2-acetyl-SN-glycero-3-phosphorylcholine. *Immunology* 1984; 52:169-74.

176 Nishihara J, Ishibashi T, Imai Y, Muramatsu T. Purification and characterization of the specific binding protein for platelet activating factor from human platelets. *Tohuku J Exp Med* 1985; 147: 145-52.

177 Shen TY, Hussaini I, Hwang SB, Chang MN. Recent developments of platelet activating factor antagonists. *Adv Prostaglandin Throboxane Leukotriene Res* 1989; 19: 359-62.

178 Honda Z, Nakamura M, Mikki I, Minami M, Watanabe T, Seyama Y, Okado H, Toh H, Ito K, Miyamoto T, Shimizu T. Cloning functional expression of platelet activating factor receptor from guinea pig lung. *Nature* 1991; 349: 342-46.

179 Nakamura M, Honda Z, Izumi T, Sakanaka C, Mutoh H, Minami M, Bito H, Seyama Y, Matsumoto T, Noma M, Shimizu T. Molecular cloning and expression of platelet-activating factor receptor from human leukocytes. *J Biol Chem* 1991; 266: 20400-05.

180 Kunz D, Gerard NP, Gerard C. The human leukocyte platelet-activating factor receptor, cDNA cloning, cell surface expression, and construction of a novel epitope-bearing analog. *J Biol Chem* 1992; 267: 9101-06.

181 Ye RD, Prossnitz ER, Zou AH, Cochrane CG. Charachterization of a human cDNA that encodes a functional receptor for platelet activating factor. *Biochem Biophys Res Commun* 1991; 180: 105-111.

182 Sugimoto T, Tsuchimochi H, McGregor CG, Mutoh H, Shimizu T, Kurachi Y. Molecular cloning and characterization of the platelet-activating factor receptor gene expressed in the human heart. *Biochem Biophys Res Commun* 1992; 189: 617-24.

183 Izumi T, Kishimoto S, Takano T, Nakamura M, Miyabe Y, Nakata M, Sakanaka C, Shimizu T. Expression of the platelet-activating factor receptor gene in EoL-1 cells following butyrate-induced differentiation. *Biochem J* 1995; 305: 829-35.

184 Tysnes OB, Verhoeven AJ, Holmsen H. Neomycin inhibits agonist-stimulated polyphosphoinositide metabolism and response in human platelets. *Biochem Biophys Res Commun* 1987; 144: 454-62.

185 Avdonin PV, Cheglakov IB, Boogry EM, Svitina-Ulitina IV, Mazaev AV, Tkachuk VA. Evidence for the receptor-operated calcium channels in human platelet plasma membrane. *Thromb Res* 1987; 46: 29-37.

186 Lee TC, Malone B, Blank ML, Snyder F. 1-O-alkyl-2-acetyl-sn-glycero-3-phosphocholine (platelet-activating factor) stimulates calcium influx in rabbit platelets. *Biochem Biophys Res Commun* 1981; 102: 1262-68.

187 Haslam RJ, Vanderwel M. Inhibition of platelet adenylate cyclase by 1-O-alkyl-2-acetyl-sn-glycero-3-phosphorylcholine (platelet-activating factor). *J Biol Chem* 1982; 257: 6879-85.

188 Dhar A, Shukla SD. Involvement of $pp60^{c-src}$ in PAF stimulated platelets: Evidence for translocation from cytosol to membranes. *J Biol Chem* 1991; 266: 18797-801.

189 Rezaul K, Yanagi S, Sada K, Taniguchi T, Yamamura H. Protein-tyrosine kinase p72syk is activated by platelet activating factor in platelets. *Thromb Haemos* 1994; 72: 937-41.

190 Samiei M, Sanghera JS, Pelech SL. Activation of myelin basic protein and S6 peptide kinases in phorbol ester- and PAF-treated sheep platelets. *Biochim Biophys Acta* 1993; 1176: 287-98.

191 Blank ML, Lee Tc, Fitzgerald V, Snyder F. A specific acetylhydrolase for 1-alkyl-2-acetyl-sn-glucero-3-phosphocholine (a hypotensive and platelet-activating lipid). *J Biol Chem* 1981; 256: 175-178.

192 Farr RS, Wardlow ML, Cox CP, Meng KE, Greene DE. Human serum acid-labile factor is an acetylhydrolase that inactivates platelet-activating factor. *Feder Proc* 1983; 42: 3120-3122.

193 Dennis EA. The growing phospholipase A_2 superfamily of signal transduction enzymes.*Trends Biochem. Sci.* 1997; 22: 1-2.

194 Tselepis AD, Pinckard RN. Paf-acetylhydrolase: A novel enzyme with biochemical and clinical interest. *Clin. Chem. Enzym. Comms.* 1992; 4: 279-290.

195 Kramer RM, Patton GM, Pritzker CR, Deykin DM. Metabolism of platelet-activating factor in human platelets. Transacylase-mediated synthesis of 1-O-alkyl-2-arachidonoyl-sn-glycero-3-phosphocholine. *J Biol Chem* 1984; 259: 13316-13320.

196 Stafforini DM, McIntyre TM, Zimmerman GA, Prescott SM. Platelet-activating Factor Acetyhydrolases. J. Biol. Chem. 1997; 272: 17895-17898.

197 Stafforini DM, Elstad MR, McIntyre TM, Zimmerman GA, Prescott SM. Human macrophages secrete platelet-activating factor acetylhydrolase. *J. Biol. Chem.* 1990; 265: 9682-9687.

198 Satoh K, Imaizumi T, , Kawamura Y, Yoshida H,Hiramoto M, Takamatsu S, Takamatsu M. Platelet-activating factor (PAF) stimulates the production of

PAF-acetylhydrolase by the human hepatoma cell line, HepG2. *J. Clin. Invest.* 1991; 87: 476-481.

199 Korth R, Bidault J, Palmantier R, Benveniste J, Ninio E. Human Platelets Release a Paf-Acether: Acetylhydrolase Similar to That in Plasma. *Lipids* 1993; 28(3): 193-199.

200 Suzuki Y, Miwa M, Harada M, Matsumoto M. Release of acetylhydrolase from platelets on aggregation with platelet-activating factor. *Eur. J. Biochem.* 1988; 172: 117-120.

201 Nakajima K, Murakami M, Yanoshita R, Samejima Y, Karasawa K, Setaka M, Nojima S, Kudo I. Activated mast cells release extracellular type platelet-activating factor acetylhydrolase that contributes to autocrine inactivation of platelet-activating factor. *J. Biol. Chem.* 1997; 272: 19708-19713.

202 Tjolker LW, Wilder C, Eberhardt C, Stafforini DM, Dietsch G, Schimpf B, Hooper S, Trong HL, Cousens LS, Zimmerman GA, Yamada Y, McIntyre TM, Prescott SM, Gray PW. Antiinflammatory properties of a platelet activating factor acetylhydrolase. *Nature* 1995; 374: 549-552.

203 Tjoelker LW, Eberhardt C, Unger J, Trong HL, Zimmermam GA, McIntyre TM, Stafforini DM, Prescott SM, Gray PW. Plasma platelet-activating factor acetylhydrolase is a secreted phospholipase A_2 with a catalytic triad. *J. Biol. Chem.* 1995; 270: 25481-25487.

204 Derewenda ZS, Derewenda U. The structure and function of platelet-activating factor acetylhydrolases. *Cell. Mol. Life. Sci.* 1998; 54: 446-455.

205 Tew DG, Southan C, Rice SQ, Lawrence MP, Li H, Boyd HF et al. Purification, properties, sequencing and cloning of a lipoprotein-associated, serine-dependent phospholipase involved in the oxidative modification of low-density lipoproteins. *Art. Thromb. Vasc. Biol.* 1996; 16: 591-599.

206 Stafforini DM, Prescott SM, McIntyre TM. Human Plasma Platelet-activating Factor Acetylhydrolase. Purification and properties. *J. Biol. Chem.* 1987; 262(9): 4223-4230.

207 Wardlow ML, Cox CP, Meng KE, Greene DE, Farr RS. Substrate specificity and partial characterization of the PAF-acetylhydrolase in human serum that rapidly inactivates platelet-activating factor. *J. Immun.*1989; 136: 3441-3446.

208 Tselepis AD, Pinckard RN. Paf-acetylhydrolase: A novel enzyme with biochemical and clinical interest. *Clin. Chem. Enzym. Comms.* 1992; 4: 279-290.

209 Patel KD, Zimmerman GA, Prescott SM, Mc Intyre TM. Novel leukocyte agonists are released by endothelial cells exposed to peroxide. *J. Biol. Chem.* 1992; 267: 15168-15175.

210 Heery JM, Kozak M, Stafforini DM, Jones DA, Zimmerman GA., Mc Intyre TM, Prescott SM. Oxidatively modified LDL contains phospholipids with platelet activating factor like activity and stimulates the growth of smooth muscle cells. *J. Clin. Inv.* 1995; 96: 2322-2330.

211 Venable ME, Zimmerman GA, Mc Intyre TM, Prescott SM. Platelet-activating factor: a phospholipid autacoid with diverse actions. *J. Lipid Res.* 1993; 34: 691-702.

212 Dentan C, Tselepis AD, Chapman JM, Ninio E. Pefabloc, 4-[2-aminoethyl] benzesulfonyl fluoride, is a new potent nontoxic and irreversible inhibitor of PAF-degrading acetylhydrolase. *Biochim. Biophys. Acta.* 1996; 1299(3): 353-357.

213 Ambrosio G, Oriente A, Napoli C, Palumbo G, Chiariello P, Marone G, Condorelli M, Chiariello M, Triggiani M. Oxygen radicals inhibit human plasma acetylhydrolase, the enzyme that catabolishes PAF. *J. Clin. Inv.* 1994; 93: 2408-2416.

214 Dentan C, Lesnik P, Chapman MJ, Ninio E. PAF-acether degrading acetylhydrolase in plasma LDL is inactivated by cooper and cell mediated oxidation. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 1994; 14: 353-360.

215 Ostermann G, Kostner GM, Gries A, Malle E and Till U. The contribution of individual lipoproteins to the degradation of platelet-activating factor in human serum. *Haemostasis* 1989; 19: 160-168.

216 Stafforini DM, Carter ME, Zimmerman GA, McIntyre TM and Prescott SM. Lipoproteins alter the catalytic behavior of the platelet-activating factor acetylhydrolase in human plasma. *Procceedings of the National Academy of Sciences* USA 1989; 86: 2393-2397.

217 Prichard PH, Chonn A and Yeung CCH. The degradation of platelet-activating factor in the plasma of a patient with familiar high density lipoprotein deficiency (Tangier disease). *Blood* 1985; 66: 1476-1478.

218 Miwa M, Miyake T, Yamanaka T, Sugatani J, et al. Characterization of serum platelet-activating factor (PAF) acetylhydrolase: correlation between deficiency of serum PAF acetylhydrolase and respiratory symptoms in asthmatic children. *J. Clin. Invest.* 1988; 82: 1983-1991.

219 Stafforini DM, McIntyre TM, Carter ME and Prescott SM. Human plasma platelet-activating factor acetylhydrolase. Association with lipoprotein particles and role in the degradation of platelet-activating factor. *J. Biol. Chem.* 1987; 262: 4215-4522.

220 McCall MR, La Belle M, Forte TM, Krauss RM, Takanami Y, Tribble DL. Dissociable and nondissociable forms of platelet-activating factor acetylhydrolase in human plasma LDL: implications for LDL oxidative susceptibility. *Biochim. Biophys. Acta* 1999; 1437: 23-36.

221 Karabina SAP, Liapikos TA, Grekas G, Goudevenos J, Tselepis A. Distribution of PAF-acetylhydrolase activity in human plasma low density lipoprotein subfractions. *Biochim. Biophys. Acta* 1994; 1213: 34-38.

222 Tselepis A, Dentan C, Karabina SAP, Chapman J, Ninio E. PAF-degrading acetylhydrolase is preferentially associated with dense LDL and VHDL-1 in human plasma. Catalytic characteristics and relation to the monocyte derived enzyme. *Arterioscl. Thromb. Vasc. Biol.* 1995; 15: 1764-1773.

223 Pritchard PH. The degradation of platelet-activating factor by high-density lipoprotein in rat plasma. *Biochem. J.* 1987; 246: 791-794.

224 Tsaoussis V, Vakirtzi-Lemonias C. The mouse PAF acetylhydrolase: II. It consists of two enzymes both associated with the HDL. *J. Lipid Med. Cell Sign.* 1994; 9: 317-331.

225 Tsaoussis V, Vakirtzi-Lemonias C. The mouse PAF acetylhydrolase: I. Characterization and properties. *J. Lipid Med. Cell Sign.* 1994; 9: 301-315.

226 Karasawa K, Kuge O, Kawasaki K, Nishijima M, Nakano Y, Tomita M, Yokoyama K, Setaka M, Nojima S. Cloning, Expression and Characterization of Plasma Platelet-Activating Factor Acetylhydrolase from Guinea Pig. *J. Biochem.* 1997; 120:838-844.

227 Steinberg D, Parthasarathy S, Carew TE, et al. Beyond cholesterol. Modifications of low density lipoproteins that increase in atherogenicity. *N. Engl. J. Med.* 1989; 320: 915-924.

228 Witztum JL, Steinberg D. Role of oxidised low density lipoprotein in atherogenesis. *J. Clin. Invest.* 1991; 88: 1785-1792.

229 Berliner JA, Haberland ME. Role of oxidized low density lipoprotein in atherogenesis. Curr. Opin. Lipidol. 1993; 4: 373-381.

230 Banka C. High density lipoprotein and lipoprotein oxidation. *Curr Opin Lipid* 1996; 7: 139-142.

231 Kaneko T, Honda S, Nakano SI, Matsuo M. Lethal effects of a linoleic acid hydroperoxide and its autoxidation products, unsaturated aliphatic aldehydes, on human diploid fibroblasts. *Chem. Biol. Interact.* 1987; 63: 127-137.

232 Yoshida H, Satoh K, Imaizumi T, Takamatsu S, et al. Platelet-activating acetylhydrolase activity in red blood cell-stroma from patients with cerebral thrombosis. *Acta Neurol Scand* 1992; 86: 199-203.

233 Pinckard RN and Ludwig JC. Determination of PAF-2-acetylhydrolase activity. *Federation Proceedings* 1986; 45: 856 (abs).

234 Blencowe C, Hermetter A, Kostner GM, Deigner HP.Enhanced Association of Platelet-activating Factor Acetylhydrolase with Lipoprotein(a) in Comparison with Low Density Lipoprotein. *J. Biol. Chem.* 1995; 270: 31151-157.

235 Karabina SAP, Elisaf M, Goudevenos J, Siamopoulos KC, Sideris D, Tselepis AD. PAF-acetylhydrolase activity on Lp(a) before and during Cu^{+2} –induced oxidative modification in vitro. *Atherosclerosis* 1996; 125: 121-134.

236 Millionis HJ, Elisaf MS, Karabina SAP, Bairaktari E, Tselepis AD, Siamopoulos KC. Plasma and Lp(a)-associated PAF-acetylhydrolase activity in uremic patients undergoing different dialysis procedures. *Kidney International* 1999; 56: 2276-85.

237 Doucet C, Huby T, Chaman MJ, Thillet J. Lipoprotein(a) in the chimpanzee: relationship of the apo(a) phenotype to elevated plasma Lp(a) levels. *J. Lipid Res.* 1994; 35: 263.

238 Doucet C, Huby T, Ruiz J, Chaman MJ, Thillet J. Non enzymatic glycation of lipoprotein(a) in vitro and in vivo. *Atherosclerosis* 1995; 118: 135-143.

239 Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophaga T4. *Nature* 1970; 227: 680-685.

240 Smith P.K., Krohn R.I., Hermanson G.T., Mallia A.K, Gartner F.H., Provenzano M.D., Fujimoto E.K., Goeke N.M, Olson B.J, Klenk D.C.

Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* 1985; 150: 76-85.

241 Wiechelman K., Braun R, Fitzpatrick J. Investigation of the bicinchoninic acid protein assay: identification of the groups responsible for color formation. *Anal. Biochem.* 1988; 175: 231-237.

242 Richmond W. Preparation and properties of a cholesterol oxidase from Nocardia sp. And its application to the enzymatic assay of total cholesterol in serum. *Clin. Chem.* 1973; 19: 1350-56.

243 Fossati P, Prencipe L. Serum triglycerides determined colorimetrically with an enzyme that produces hydrogen peroxide. *Clin. Chem.* 1982; 28: 2077-80.

244 Takayama M, Itoh S, Nagasaki T, Tanimizu I. A new enzymatic method for determination of serum choline-containing phospholipids. *Clin. Chim. Acta* 1977; 79: 93-98.

245 Tselepis AD, Lekka ME, Tsoukatos D. A PAF-acetylhydrolase activity in Tetrahymena pyriformis cells. *FEBS Letts* 1991; 288: 147-150.

246 Goudevenos J, Tselepis AD, Vini MP, Michalis L, Tsoukatos DC, Elisaf M, Ninio E, Sideris DA. Platelet-associated and secreted PAF-acetylhydrolase activity in patients with stable angina: sequential changes of enzyme activity after angioplasty. *Eur. J. Clin. Invest.* 2001; 31: 15-23.

247 Taylor ML, Misso NLA, Stewart GA, Thomson PJ. The effects of varying doses of aspirin on human platelet activation induced by PAF, collagen and arachidonic acid. *Br. J. Pharmac.* 1992; 33: 25-31.

248 Lotner GZ, Lynch JM, Betz SJ, and Henson PM. Human neutrophil-derived platelet activating factor. *Journal of Immunology.* 1980; 124: 676-684.

249 Xia Z, Wong T, Lin Q, Kasirer-Friede A, Brown E, Frojmovic MM. Optimally functional flourescein isothiocyante-labelled fibrinogen for puantitative studies of binding to activated platelets and platelet aggregation. *Br. J. Haematol.* 1996; 93: 204-214.

250 Frojmovic MM, Mooney RF, Wong T. Dynamics of platelet glycoprotein IIb-IIIa receptor expression and fibrinogen binding I. Quantal activation of platelet subpopulations varies with adenosine diphosphate concentration. *Biophys. J.* 1994; 67: 2060-68.

251 Katsouras CS, Karabina SAP, Tambaki AP, Goudevenos JA, Michalis LK, Tsironis LD, Stroumbis CS, Elisaf M, Sideris DA, Tselepis AD. Serum lipoprotein(a) concentrations and apolipoprotein(a) isoforms: association with the serevity of clinical presentation in patients with coronary artery disease. *J. Cardiovasc. Risk.* 2001; 8: 311-317.

252 Tselepis AD, Karabina SAP, Stengel D, Piedangel R, Chapman MJ, Ninio E. N-linked glycosylation of macrophage-derived PAF-AH is a major determinant of enzyme association with plasma HDL. *J. Lipid Res.* 2001; 42: 1645-54.

253 Tsimichodimos V., Karabina SAP, Tambaki AP, Bairaktari E, Goudevenos JA, Chapman MJ, Elisaf M, Tselepis AD. Atorvastatin preferentially reduces LDL-associated platelet-activating factor acetylhydrolase activity in dislipidemias of type IIA and type IIB. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2002; 22: 306-311.

254 Stafforini DM, Carter ME, Zimmerman GA, Mc Intyre TM, Prescott SM. Lipoproteins alter the catalytic behavior of the platelet-activating factor acetylhydrolase in human plasma. *Proc. Natl. Sci. USA.* 1989; 86: 2393-97.

255 Mc Neil PH., Simpson RJ, Chesterman CN, Krilis SA. Anti-phospholipid antibodies are directed against a complex antigen that includes a lipid-binding inhibitor of coagulation: β2-Glycoprotein I (apolipoprotein H). *Proc Natl Sci USA.* 1990; 87: 4120-24.

256 Vaarala O, Alfthan G, Jauhiainen M, Leirisalo-Repo M, Aho K, Palosuo T. Crossreaction between antibodies to oxidized low-density lipoprotein and to cardiolipin in systematic lupus erythematosus. *Lancet.* 1993; 341: 923-925.

257 Hasunuma Y, Matsuura E, Makita Z, Katahira T, Nishi S, Koike T. Involvement of beta2-glycoprotein I and anticardiolipin antibodies in oxidatively modified low-density lipoprotein uptake by macrophages. *Clin. Exp. Immunol.* 1997; 107: 569-573.

258 Itabe H. Oxidized phospholipids as a new landmark in atherosclerosis. *Prog. Lipid. Res.* 1998; 37: 181-207.

259 Farsi A, Domeneghetti MP, Fedi S, Capani M, Giusti B, Marcucci R, Giurlani L, Prisco D, Passaleva A, Gensini GF, Abbate R. High prevalence of anti-beta2 glycoprotein I antibodies in patients with ischemic heart disease. *Autoimmunity.* 1999; 30: 93-98.

260 Keeling DM, Wilson AJG, Mackie IJ, Isenberg DA, Machin SJ. Role of β2-glycoprotein I and anti-phospholipid antibobies in activation of protein C in vitro. *J. Clin. Pathol.* 1993; 46: 908-911.

261 Mori T, Takeya H, Nishioka J, Gabazza EC, Suzuki K. β2-glycoprotein I modulates the anticoagulant activity of activated protein C on the phosholipid surface. *Thromb. Haemost.* 1996; 75: 49-55.