

A

Αρ. εισ.:.....98.....2004

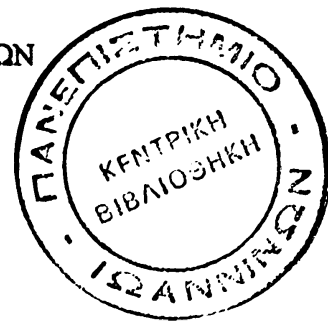
ΣΟΝΙΑΣ - ΑΘΗΝΑΣ ΚΑΡΑΜΠΙΝΑ
ΧΗΜΙΚΟΥ

117

ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑ ΡΑΦ - ΑΚΕΤΥΛΟΪΔΡΟΛΑΣΗΣ
ΣΤΑ ΥΠΟΚΛΑΣΜΑΤΑ ΛΙΠΟΠΡΩΤΕΪΝΩΝ
ΠΛΑΣΜΑΤΟΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΙΩΑΝΝΙΝΑ 1998



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





ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ
ΤΟΜΕΑΣ ΟΡΓΑΝΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ

Ιωάννινα, 11-6-'98

9156
16/6/98

Η επταμελής Εξεταστική Επιτροπή που ορίστηκε για την κρίση της Διδακτορικής Διατριβής της κας Σόνιας-Αθηνάς Καραμπίνα, Χημικού, συνήλθε σε συνεδρίαση στο Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων την Πέμπτη 11 Ιουνίου 1998, όπου παρακολούθησε την υποστήριξη της διατριβής με τίτλο: "Ενεργότητα ΡΑΦ-ακετυλοϋδρολάσης στα υποκλάσματα λιποπρωτεϊνών πλάσματος".

Η επιτροπή έκρινε ομόφωνα ότι η διατριβή είναι πρωτότυπη και αποτελεί ουσιαστική συμβολή στην πρόοδο της Επιστήμης, η δε κατάρτιση της υποψήφιας 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 Ιωαννίνων στην κα Σόνια-Αθηνά Καραμπίνα με βαθμό **Άριστα**.

Με τιμή
Τα μέλη της Εξεταστικής Επιτροπής

1. Αλέξανδρος Τσελέτης, Επίκουρος Καθηγητής Βιοχημείας Παν/μίου Ιωαννίνων

2. Δημόκριτος Τσουκάτος, Επίκουρος Καθηγητής Βιοχημείας Παν/μίου Ιωαννίνων

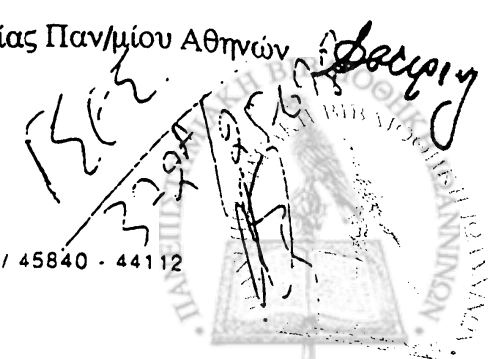
3. Ιωάννης Γουδέβενος, Επίκουρος Καθηγητής Καρδιολογίας Παν/μίου Ιωαννίνων

4. Ορέστης Τσόλας, Καθηγητής Βιολογικής Χημείας Παν/μίου Ιωαννίνων

5. Μαρία Σακαρέλλου, Καθηγήτρια Βιοχημείας Παν/μίου Ιωαννίνων

6. Κων/νος Δραΐνας, Καθηγητής Βιοχημείας Παν/μίου Ιωαννίνων

7. Αμαλία Διονυσίου Αστερίου, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιοχημείας Παν/μίου Αθηνών



*Κάθε αναζήτηση ξεκινά με την τόχη του πρωτάρη και τελειώνει με μια
δύσκολη δοκιμασία του νικητή...*



*Στην αδερφή μου Τζένη,
για το χαμόγελο και την ελπίδα που μοιραστήκαμε*



[The following text is extremely faint and mostly illegible due to the low contrast of the scan. It appears to be several paragraphs of handwritten or typed text.]

**Στην αγαπημένη μου θεία Jaqueline N. Fresta,
που πάλεψε σκληρά και έφραγε χαμογελώντας για την οδό των ονείρων**



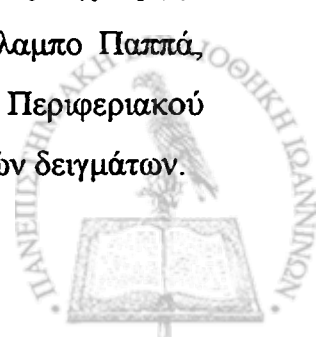
Το μεγαλύτερο τμήμα της παρούσας διατριβής εκπονήθηκε στον Τομέα Οργανικής Χημείας και Βιοχημείας (Ερευνητικό Εργαστήριο Λιπιδίων και Λιποπρωτεϊνών) του τμήματος Χημείας Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, από το 1993-1998, στα πλαίσια 2 ερευνητικών προγραμμάτων της Γενικής Γραμματείας Έρευνας και Τεχνολογίας (ΠΕΝΕΔ). Παράλληλα ένα μέρος της διατριβής υλοποιήθηκε στο ερευνητικό κέντρο INSERM Unité 321, Paris France, στα πλαίσια διακρατικής συνεργασίας (πρόγραμμα Platon).

Την επίβλεψη και άμεση καθοδήγηση της διατριβής είχε ο Επίκουρος Καθηγητής του Τμήματος Χημείας κ. Αλέξανδρος Τσελέπης. Ήταν για μένα μεγάλη τύχη που τον συνάντησα στο δρόμο μου. Του οφείλω την επιστημονική μου συγκρότηση αλλά και την αγάπη που μου ενέπνευσε για την έρευνα. Τον ευχαριστώ για τις ατελείωτες ώρες που δαπάνησε προσπαθώντας να με διδάξει με τον καλύτερο δυνατό τρόπο τα μυστικά του δύσκολου ερευνητικού χώρου μας, για την ενθάρρυνσή του στις απρόβλεπτες πειραματικές δυσκολίες αλλά και για την καθοριστικής σημασίας συμβολή του στην τελική εμφάνιση της διατριβής.

Θάθελα επίσης να ευχαριστήσω θερμά τα μέλη της τριμελούς μου επιτροπής κ. Δημόκριτο Τσουκάτο, Επίκουρο Καθηγητή του τμήματος Χημείας Πανεπιστημίου Ιωαννίνων για το ειλικρινές ενδιαφέρον του, τις χρήσιμες και επικοδομητικές παρατηρήσεις του κατά την διάρκεια εκπόνησης της διατριβής μου, καθώς και τον κ. Ιωάννη Γουδέβενο Επίκουρο Καθηγητή της Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων για την αξιόλογη συνεργασία μας αλλά και για την ενεργή συμβολή του στην εξέλιξη της ερευνητικής μου δουλειάς.

Πολλά ευχαριστώ οφείλω στον Αναπληρωτή Καθηγητή της Ιατρικής σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων κ. Μωϋσή Ελισάφ για την εξαιρετη συνεργασία μας, τον άψογο συντονισμό κατά τη συλλογή των κλινικών δειγμάτων, καθώς και για τις ακριβείς και πολύτιμες υποδείξεις του, στην εξέλιξη της διατριβής μου. Επίσης τον ευχαριστώ για την άρτια βιβλιογραφική ενημέρωση που μου παρείχε.

Ευχαριστώ πολύ το συνάδελφο Χρήστο Τζάλλα για τη συμβολή του στις μετρήσεις των βιοχημικών παραμέτρων των δειγμάτων και ιδιαιτέρως της Lp(a). Επίσης ευχαριστώ την κ Γιάννα Θεοδώρου καθώς και τον κ Χαράλαμπο Παππά, Επιμελητές Β της Παθολογικής Κλινικής του Πανεπιστημιακού Περιφερειακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων για τη βοήθειά τους στη συλλογή των κλινικών δειγμάτων.



Θεωρώ τιμή μου, τη δυνατότητα που είχα στα πλαίσια του προγράμματος Ελληνογαλλικής συνεργασίας «Platon», να μαθητεύσω κοντά σε εξαιρετους επιστήμονες και προπαντός ανθρώπους, στο τμήμα «Lipoprotéins et athérogénèse» του ερευνητικού Ινστιτούτου INSERM Unité 321 του Παρισιού όλα τα καλοκαίρια από το 1994 κι έπειτα. Ιδιαίτερα θα ήθελα να αναφέρω και να ευχαριστήσω τον Dr John Charman, διευθυντή της μονάδος «Lipoprotéins et athérogénèse» και δάσκαλο στο χώρο των λιποπρωτεϊνών για τις οξυδερκείς παρατηρήσεις του, που συνέβαλλαν ουσιαστικά στην εξέλιξη των πειραμάτων μου καθώς και το αμέριστο ενεργό ενδιαφέρον του κατά την διάρκεια της παράμονής μου στο Παρίσι. Επίσης ευχαριστώ την Dr Ewa Ninio υπεύθυνη του εργαστηρίου κυτταρικής βιολογίας της μονάδος «Lipoprotéins et athérogénèse», για την ζεστασιά με την οποία με περιέβαλλε στο εργαστήριό της τόσα χρόνια τώρα καθώς και την άπογη καθοδηγησή της. Ευχαριστώ επίσης την Dr Jöel Thillet για την ευγενική προσφορά των αντισωμάτων της Lp(a) και τις χρήσιμες υποδείξεις της στον τρόπο χειρισμού τους. Επίσης ευχαριστώ τις συναδέλφους και φίλες Dr Maryse Guerin και την Dr Christine Dentan για τις εύστοχες παρατηρήσεις τους και τις ενδιαφέρουσες επιστημονικές συζητήσεις μας κατά την παραμονή μου στη Γαλλία.

Ευχαριστώ επίσης το Λέκτορα του Χημικού Τμήματος Πανεπιστημίου Ιωαννίνων Δρ. Άγγελο Περισυνάκη για τις ευγενικές υποδείξεις του στον τρόπο χειρισμού του φωτομέτρου Perkin-Elmer L15, το συνάδελφο και φίλο Δρ Θεοδωρή Λιαπικό για την επικοδομητική συνεργασία μας καθώς επίσης και τη συνάδελφο Ειρήνη Κητσιούλη για τη βοήθειά της στην επεξεργασία των σχημάτων.

Θάθελα επίσης να ευχαριστήσω τους θείους μου Νίκο και Μανώλη Φρέστα καθώς και τη θεία μου Εύη Μ. Φρέστα για την καθοριστική επίδρασή τους στα πρώτα χρόνια της ζωής μου καθώς και για την αδιάκοπη ηθική και υλική υποστήριξή τους.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω στους γονείς μου Παύλο και Βασιλική για την αγάπη τους, την κατανόησή τους και την αμέριστη συμπαράστασή τους στην πραγματοποίηση των ονείρων μου. Ελπίζω η διατριβή αυτή να ανταμείψει τους κόπους τους.

Τέλος οφείλω ένα μεγάλο ευχαριστώ στο χαμόγελο, που υπήρξε πηγή έμπνευσης και ενθάρρυνσης.



ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1	1
ΛΠΟΠΡΩΤΕΪΝΕΣ ΑΝΘΡΩΠΙΝΟΥ ΠΛΑΣΜΑΤΟΣ	1
ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΣΤΙΣ ΛΠΟΠΡΩΤΕΪΝΕΣ	1
Ένζυμα και πρωτεΐνες μεταφοράς των λιπιδίων στο πλάσμα	2
ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΛΠΟΠΡΩΤΕΪΝΩΝ	4
ΑΤΥΠΕΣ ΛΠΟΠΡΩΤΕΪΝΕΣ	13
β-VLDL	13
Lp-x	14
ΦΑΙΝΟΤΥΠΟΙ LDL	14
ΠΑΘΟΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ ΤΟΥ ΜΙΚΡΟΥ ΠΥΚΝΟΥ LDL	18
ΔΙΑΤΑΡΑΧΕΣ ΤΟΥ ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΥ ΤΩΝ ΛΠΟΠΡΩΤΕΪΝΩΝ	23
Οικογενής δυσ-β-λιποπρωτεΐναιμία	24
Οικογενής χυλομικροναϊμία	24
Οικογενής υπερτριγλυκεριδαϊμία	25
Οικογενής υπερχοληστερολαϊμία	25
ΑΘΗΡΩΜΑΤΩΣΗ	27
Ο ρόλος των οξειδωμένων λιποπρωτεϊνών στην αθηρωμάτωση	28
Μηχανισμοί οξείδωσης της LDL	34
Στάδια οξείδωσης της LDL	36
Εντοπισμός οξειδωμένης LDL	39
Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΟΞΕΙΔΩΜΕΝΗΣ LDL ΣΤΗΝ ΑΘΗΡΟΘΡΩΜΒΩΣΗ	40
Αντιοξειδωτικά και αθηρωμάτωση	44
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2	46
Η ΛΠΟΠΡΩΤΕΪΝΗ (a)	46
Ιστορική Αναδρομή	46
Η ΔΟΜΗ ΤΗΣ Lp(a)	47
Φυσικοχημικές ιδιότητες της Lp(a)	47
Η δομή της apo (a)	49
ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΣ ΤΗΣ apo (a). -ΦΑΙΝΟΤΥΠΟΙ	51
ΒΙΟΣΥΝΘΕΣΗ ΤΗΣ Lp(a)	54
Ο ρόλος της apo (a) στη βιοσύνθεση της Lp(a)	55
Ο ρόλος της LDL στη βιοσύνθεση της Lp(a)	58
ΑΠΟΙΚΟΔΟΜΗΣΗ ΤΗΣ Lp(a)	59
ΠΑΘΟΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ Lp(a)	60
Παθοφυσιολογία της ινωδύλωσης και της θρόμβωσης.	
Ο ρόλος της Lp(a)	60
Ο ρόλος της Lp(a) στην εξέλιξη της αθηρωματικής πλάκας	65
ΚΛΙΝΙΚΗ ΣΗΜΑΣΙΑ ΤΗΣ Lp(a)	67
Πληθυσμιακές μελέτες	67
Lp(a) και στεφανιαία νόσος	69
Lp(a) και δυσλιπιδαιμία	70
Lp(a) διαβήτη και νεφρικές παθήσεις	71
ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΗ ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ ΤΗΣ Lp(a)	72
Επίδραση της διατροφής	72
Επίδραση φαρμάκων	73
Επίδραση ορμονών	75



ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3	77
Η ΑΚΕΤΥΛΟΥΔΡΟΛΑΣΗ ΤΟΥ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗΣ ΤΩΝ ΑΙΜΟΠΕΤΑΛΙΩΝ	77
Ο ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗΣ ΤΩΝ ΑΙΜΟΠΕΤΑΛΙΩΝ, ΡΑΦ ΔΙΑΣΠΟΡΑ ΤΗΣ ΡΑΦ-ΑΚΕΤΥΛΟΥΔΡΟΛΑΣΗΣ ΣΤΗ ΦΥΣΗ	80
ΕΞΕΙΔΙΚΕΥΣΗ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΟΣ ΤΗΣ ΡΑΦ-ΑΗ	82
ΡΑΦ-ΑΗ ΠΛΑΣΜΑΤΟΣ, ΕΚΚΡΙΝΟΜΕΝΗ ΜΟΡΦΗ	84
Ταυτοποίηση της δομής του ενζύμου	84
Φυσικοχημικές και ενζυμικές ιδιότητες	85
Ρύθμιση της έκκρισης της ΡΑΦ-ΑΗ	86
Παθοφυσιολογία της ΡΑΦ-ΑΗ ανθρώπινου πλάσματος	87
ΕΝΔΟΚΥΤΤΑΡΙΕΣ ΜΟΡΦΕΣ ΡΑΦ-ΑΗ	89
Δομή	89
Φυσικοχημικές και ενζυμικές ιδιότητες	90
Παθοφυσιολογία των ενδοκυττάρων μορφών	91
ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΜΕΛΕΤΕΣ	92
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4	98
ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ	98
ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ 3 ΥΠΟΚΛΑΣΜΑΤΩΝ ΤΗΣ LDL ΑΝΘΡΩΠΙΝΟΥ ΠΛΑΣΜΑΤΟΣ ΜΕ ΥΠΕΡΦΥΤΟΚΕΝΤΡΗΣΗ ΒΑΘΜΙΔΩΣΗΣ ΠΥΚΝΟΤΗΤΩΝ	98
ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ 5 ΥΠΟΚΛΑΣΜΑΤΩΝ ΤΗΣ LDL ΑΝΘΡΩΠΙΝΟΥ ΠΛΑΣΜΑΤΟΣ ΜΕ ΙΣΟΠΥΚΝΙΚΗ ΥΠΕΡΦΥΤΟΚΕΝΤΡΗΣΗ ΒΑΘΜΙΔΩΣΗΣ ΠΥΚΝΟΤΗΤΩΝ	101
ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ Lp(a) ΑΝΘΡΩΠΙΝΟΥ ΠΛΑΣΜΑΤΟΣ ΜΕ ΥΠΕΡΦΥΤΟΚΕΝΤΡΗΣΗ ΒΑΘΜΙΔΩΣΗΣ ΠΥΚΝΟΤΗΤΩΝ	104
ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΔΙΗΘΗΣΗΣ	106
ΑΝΑΓΩΓΙΚΗ ΔΙΑΣΠΑΣΗ ΤΗΣ Lp(a)	107
ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ K ⁺	108
ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ LOWRY	108
ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ BCA	110
ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΤΩΝ ΛΙΠΙΔΙΩΝ ΤΩΝ ΥΠΟΚΛΑΣΜΑΤΩΝ ΤΗΣ LDL ΚΑΙ ΤΗΣ Lp(a) ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ BLIGH-DYER	111
ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΛΙΠΙΔΙΩΝ ΤΩΝ ΥΠΟΚΛΑΣΜΑΤΩΝ ΤΗΣ LDL ΚΑΙ ΤΗΣ Lp(a) ΜΕ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΛΕΠΤΗΣ ΣΤΟΙΒΑΔΟΣ TLC	112
ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΦΩΣΦΟΡΟΥ ΣΤΑ ΦΩΣΦΟΛΙΠΙΔΙΑ	113
ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΛΙΠΟΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΣΕ ΠΗΚΤΩΜΑ ΑΓΑΡΟΖΗΣ	115
ΟΞΕΙΔΩΣΗ ΤΩΝ ΥΠΟΚΛΑΣΜΑΤΩΝ ΤΗΣ LDL ΚΑΙ ΤΗΣ Lp(a)	118
ΟΞΕΙΔΩΣΗ ΤΗΣ PC	122
ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑΣ ΤΗΣ ΡΑΦ-ΑΗ	123
ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΡΑΦ-ΑΗ	126
ΜΕΤΑΦΟΡΑ ΤΗΣ ΡΑΦ-ΑΗ ΜΕΤΑΞΥ ΤΩΝ ΥΠΟΚΛΑΣΜΑΤΩΝ ΤΗΣ LDL	127
ΚΑΤΑΝΟΜΗ ΤΗΣ ΡΑΦ-ΑΗ ΑΠΟ ΚΑΛΛΙΕΡΓΙΕΣ ΜΟΝΟΚΥΤΤΑΡΩΝ ΣΤΙΣ ΛΙΠΟΠΡΩΤΕΪΝΕΣ	127



ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΙΟΝΤΙΚΗΣ ΙΣΧΥΟΣ ΣΤΗ ΔΕΣΜΕΥΣΗ ΤΗΣ ΡΑΦ-ΑΗ ΣΤΙΣ ΛΙΠΟΠΡΩΤΕΪΝΕΣ	128
ΕΝΖΥΜΙΚΟΣ ΦΩΤΟΜΕΤΡΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΟΛΙΚΗΣ ΧΟΛΗΣΤΕΡΟΛΗΣ	129
ΕΝΖΥΜΙΚΟΣ ΦΩΤΟΜΕΤΡΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ HDL ΧΟΛΗΣΤΕΡΟΛΗΣ	131
ΕΝΖΥΜΙΚΟΣ ΦΩΤΟΜΕΤΡΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΡΙΓΛΥΚΕΡΙΔΙΩΝ	132
ΕΝΖΥΜΙΚΟΣ ΦΩΤΟΜΕΤΡΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΕΛΕΥΘΕΡΗΣ ΧΟΛΗΣΤΕΡΟΛΗΣ	134
ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΕΣΤΕΡΟΠΟΙΗΜΕΝΗΣ ΧΟΛΗΣΤΕΡΟΛΗΣ	135
ΕΝΖΥΜΙΚΟΣ ΦΩΤΟΜΕΤΡΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΦΩΣΦΟΛΙΠΙΔΙΩΝ	136
ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ LDL ΧΟΛΗΣΤΕΡΟΛΗΣ	137
ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΙΣΟΜΟΡΦΩΝ ΤΗΣ apo (a)	138
ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ SDS-PAGE 5-19%	143
ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ SDS-PAGE 3.75%	149
ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ SDS-PAGE 2-16%	150
ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ Lp(a) ΜΕ ELISA	151
ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΜΟΝΟΚΥΤΤΑΡΩΝ ΜΕ FICOLL	154
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5	158
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	158
ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑΣ ΤΗΣ ΡΑΦ-ΑΗ ΣΕ LDL ΥΠΟΚΛΑΣΜΑΤΑ	158
Υπερφυγοκεντρική απομόνωση 3 υποκλασμάτων της LDL	158
Χημική σύσταση των 3 LDL υποκλασμάτων	159
Οξειδωση των υποκλασμάτων της LDL in vitro	160
Ενεργότητα ΡΑΦ-ΑΗ στα υποκλάσματα της LDL πριν και μετά την οξειδωσή τους in vitro	162
Παραγωγή Lyso-PC πριν και μετά την οξειδωση των υποκλασμάτων	164
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6	166
ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑ ΡΑΦ-ΑΗ ΣΕ ΟΛΑ ΤΑ ΥΠΟΚΛΑΣΜΑΤΑ ΛΙΠΟΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΠΛΑΣΜΑΤΟΣ ΚΑΘΩΣ ΚΑΙ ΣΤΙΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΙΕΣ ΜΟΝΟΚΥΤΤΑΡΩΝ	166
Υποκλασμάτωση λιποπρωτεϊνών πλάσματος με υπερφυγοκέντρηση σε ισοπυκνική βαθμίδωση πυκνοτήτων.	
Χαρακτηρισμός των υποκλασμάτων	166
Κατανομή της ενεργότητας της ΡΑΦ-ΑΗ σε όλα τα λιποπρωτεϊνικά υποκλάσματα πλάσματος	168
Επίδραση της ιοντικής ισχύος στην κατανομή της ΡΑΦ-ΑΗ	170
Προσδιορισμός των κινητικών σταθερών του ενζύμου	170
Μεταφορά της ακετυλοϋδρολάσης μεταξύ των υποκλασμάτων της LDL	173
Φυσικοχημικές ιδιότητες της ΡΑΦ-ΑΗ των διαφόρων υποκλασμάτων	174

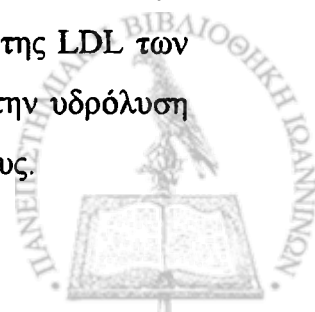


Ιδιότητες της ακετυλουδρολάσης από καλλιέργιες μονοκυττάρων	175
Κατανομή της PAF-AH των μονοκυττάρων στα υποκλάσματα των λιποπρωτεϊνών	177
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7	181
ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑ PAF-AH ΣΤΟ ΣΩΜΑΤΙΔΙΟ ΤΗΣ Lp(a)	181
Κατανομή της PAF-AH στις λιποπρωτεϊνες πλάσματος το οποίο περιέχει Lp(a)	181
Ιδιότητες της PAF-AH της Lp(a)	185
Ενεργότητα PAF-AH μετά από αναγωγική διάσπαση της Lp(a)	190
Μελέτη της ενεργότητας της PAF-AH στις διάφορες ισομορφές της Lp(a)	191
Η ενεργότητα της PAF-AH κατά την οξείδωση της Lp(a)	195
Παραγωγή Lyso-PC κατά την οξείδωση της PAF-AH	197
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8	199
ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑ PAF-AH ΣΤΗΝ ΟΙΚΟΓΕΝΗ ΥΠΕΡΧΟΛΗΣΤΕΡΟΛΑΙΜΙΑ	199
Χαρακτηριστικά του πληθυσμού μελέτης	199
Ενεργότητα της PAF-AH στον ορό και την HDL των ομάδων μελέτης	200
Απομόνωση και κατανομή των υποκλασμάτων της LDL	201
Μελέτη της οξειδωτικής τροποποίησης των LDL υποκλασμάτων	202
Ενεργότητα PAF-AH στα υποκλάσματα της LDL	204
Παραγωγή Lyso-PC κατά την οξείδωση των υποκλασμάτων της LDL	205
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 9	210
ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ	210
ΚΑΤΑΝΟΜΗ ΤΗΣ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑΣ ΤΗΣ PAF-AH ΣΤΑ ΥΠΟΚΛΑΣΜΑΤΑ ΛΙΠΟΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΠΛΑΣΜΑΤΟΣ	210
ΥΠΑΡΞΗ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑΣ PAF-AH ΣΤΗΝ Lp(a). Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΟΞΕΙΔΩΣΗ ΤΗΣ Lp(a)	215
ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑ PAF-AH ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ΟΙΚΟΓΕΝΗ ΥΠΕΡΧΟΛΗΣΤΕΡΟΛΑΙΜΙΑ	219
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	223
SUMMARY	226
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	228
ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ	230
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	231



ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

Η παρούσα διατριβή είχε σκοπό τη μελέτη της ενεργότητας της PAF-AH στα υποκλάσματα λιποπρωτεϊνών ανθρωπίνου πλάσματος. Ήταν ήδη γνωστό πως η PAF-AH, το ένζυμο που υδρολύει και αποικοδομεί τον ισχυρό διαμεσολαβητή της φλεγμονής PAF, κατανέμεται στις λιποπρωτεΐνες του πλάσματος με ποσοστό 70% στην LDL και 30% στην HDL. Επίσης με τη χρήση υπερφυγοκεντρικών τεχνικών είχε ήδη αρχίσει να διαφαίνεται πως οι λιποπρωτεΐνες είναι ένας ετερογενής πληθυσμός σωματιδίων τα οποία διαφέρουν ως προς τη χημική τους σύσταση και τις φυσικοχημικές ιδιότητές τους. Επιπλέον υπήρχαν οι πρώτες ενδείξεις για την ύπαρξη της οξειδωμένης LDL στις αθηρωματικές πλάκες και γινόταν μνεία για το ρόλο του μικρού και πυκνού υποκλάσματός της στην ανάπτυξη της πλάκας. Αποφασίσαμε λοιπόν να μελετήσουμε την κατανομή του ενζύμου στα υποκλάσματα όλων των λιποπρωτεϊνών ανθρωπίνου πλάσματος προσπαθώντας έτσι να διαπιστώσουμε πιθανές διαφορές ως προς την ενζυμική ενεργότητα μεταξύ των υποκλασμάτων οι οποίες θα βοηθούσαν στην κατανόηση του πιθανού ρόλου της PAF-AH στην παθοφυσιολογία της αθηρωμάτωσης. Επίσης διερευνήθηκε η πιθανή ύπαρξη PAF-AH στην Lp(a), ο τρόπος σύνδεσης της PAF-AH στο σωματίδιο της Lp(a), οι ιδιότητες του ενζύμου καθώς και η επίδραση του μεγέθους των ισομορφών της Lp(a) στην ενζυμική ενεργότητα. Επιπρόσθετα προσδιορίστηκε η ενεργότητα του ενζύμου κατά την οξειδωτική τροποποίηση των υποκλασμάτων της LDL, καθώς και της Lp(a) και μελετήθηκε η πιθανή συμμετοχή της PAF-AH στις λιπιδιακές αλλαγές που λαμβάνουν χώρα κατά την οξείδωση των λιποπρωτεϊνών και ιδιαίτερα στην υδρόλυση της ενδογενούς φωσφατιδυλοχολίνης. Τέλος μας απασχόλησε η εφαρμογή των αποτελεσμάτων της παραπάνω ερευνητικής προσπάθειας στην κλινική πράξη. Για το λόγο αυτό επιλέξαμε ετεροζυγώτες ασθενείς με οικογενή υπερχοληστερολαιμία (FH) οποίοι εκτός της αυξημένης αθηρωμάτωσης που παρουσιάζουν λόγω των μεγάλων επιπέδων της LDL, εμφανίζουν και μεγάλη επίπτωση στεφανιαίας νόσου. Προσδιορίσαμε την ενεργότητα της PAF-AH στον ορό και την HDL των ασθενών με FH. Επίσης μελετήσαμε την κατανομή της PAF-AH στα υποκλάσματα της LDL των ασθενών αυτών, την οξειδωτική τους τροποποίηση in vitro καθώς και την υδρόλυση της ενδογενούς φωσφατιδυλοχολίνης κατά τη διάρκεια της οξείδωσής τους.



ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ

- ALP: Αθηρωγόνος λιποπρωτεϊνικός φαινότυπος
 apo: Απολιποπρωτεΐνη
 Asp: Ασπαρτικό οξύ
 BSA: Αλβουμίνη από ορό βοδιού
 CAD: Ασθενείς με καρδιαγγειακή νόσο
 cDNA: Συμπληρωματικό DNA
 CETP: Πρωτεΐνη μεταφοράς εστέρων χοληστερόλης
 CM: Χυλομικρά
 CO: Κυκλοξυγονάση
 CoA: Συνένζυμο A
 CoA-IT: Ανεξάρτητη από το CoA τρανσακυλάση
 cpm: Κρούσεις ανά λεπτό
 D: Δάλτον
 DAG: Διακυλογλυκερόλη
 DFP: Διϊσοπροπυλοφθοριοφωσφορικό
 DNA: Δεοξυριβονουκλεϊνικό οξύ
 E.E.: Ειδική ενεργότητα ραδιενεργού διαλύματος
 EDRF: Παράγοντας χαλάρωσης που προέρχεται από το ενδοθήλιο
 EDTA: Αιθυλνοδιαμινοτετραοξικό οξύ
 FH: Ασθενείς με οικογενή υπερχοληστερολαιμία
 GAGs: Γλυκοζαμινογλυκάνες
 HMG-CoA αναγωγή: Υδροξυ-μεθυλο-γλουταρυλο-συνένζυμο A αναγωγή
 H₂O₂: Υπεροξείδιο του υδρογόνου
 HDL: Υψηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνη
 His: Ιστιδίνη
 HNE: 4-υδροξυνοενάλη
 HO[•]: Ρίζα του υδροξυλίου
 HO₂[•]: Ρίζα του υδροϋπεροξειδίου
 HPL: Ηπατική λιπάση
 ICAM-1: Διακυτταρικό μόριο προσκόλλησης-1
 IDDM: Ινσουλινοεξαρτώμενος διαβήτης
 IDL: Ενδιάμεσης πυκνότητας λιποπρωτεΐνη
 Ig: Ανοσοσφαιρίνη
 IGF-1: Ομοιάζων με την ινσουλίνη αυξητικός παράγοντας-1
 IL: Ιντερλευκίνη
 IP₃: Τριφωσφορική ινοσιτόλη
 LCAT: Λεκιθινοχοληστερολακυλτρανσφεράση
 LDL: Χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνη
 LO: Λιποξυγονάση



- LO • : Ρίζα αλκοξυλίου
 LOH: Αλκοόλη
 LOO • : Ρίζα λιπούπεροξειδίου
 LOOH: Λιπούπεροξείδιο
 Lp (a): Λιποπρωτεΐνη (a)
 LPL: Λιποπρωτεϊνική λιπάση
 LT: Λευκοτριένιο
 Lyso-PC: Λυσοφωσφατιδυλοχολίνη
 M.B.: Μοριακό βάρος
 MCP-1: Χημειοτακτική πρωτεΐνη-1 των μονοκυττάρων
 M-CSF: Διεγερτικός παράγοντας σχηματισμού αποικιών των μονοκυττάρων
 MDA: Μηλονική διαλδεύδη
 mRNA: Αγγελιοφόρο RNA
 NIDDM: Μη ινσουλινοεξαρτώμενος διαβήτης
 NO: Οξείδιο του αζώτου
 NO • : Ρίζα του οξειδίου του αζώτου
 O_2^- : Ανιόν του σουπεροξειδίου
 OH^- : Ανιόν του υδροξυλίου
 ox-LDL: Οξειδωμένη LDL
 PAF: Παράγοντας ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων
 PAF-AH: PAF-ακετυλοϋδρολάση
 PAF-LL: Οξειδωμένα φωσφολιπίδια που παρουσιάζουν δράση παρόμοια με τον PAF
 PAGE: Πολυακρυλαμίδιο
 PAI-1: Αναστολέας του ενεργοποιητή του πλασμινογόνου
 pBPB: p-βρωμοφαινυλοβρομίδιο
 PBS: Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών
 PC: Φωσφατιδυλοχολίνη
 PDGF: Αιμοπεταλιακός παράγοντας αύξησης
 PE: Φωσφατιδυλοαιθανολαμίνη
 PGs: Πρωτεογλυκάνες
 PIP₂: Διφωσφορική φωσφατιδυλοϊνσιτόλη
 PKC: Πρωτεϊνική κινάση C
 PLA₂: Φωσφολιπάση A₂
 PMSF: Φαινυλομεθυλοσουλφονυλοφθορίδιο
 PUFAs: Πολυακόρεστα λιπαρά οξέα
 r ή rec: ανασυνδιασμένη
 REM: Σχετική ηλεκτροφορητική κινητικότητα
 RNA: Ριβονουκλεϊνικό οξύ
 Ser: Σερίνη
 Sf: Συντελεστής καθίζησης (Svedberg)
 SMC: Λεία μυϊκά κύτταρα
 -sn-: Στερεοειδική αριθμηση
 Sph: Σφιγγομυελίνη
 TBARS: Ενώσεις που αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ



TF: Ιστικός παράγοντας

TGF: Μετασχηματίζων αυξητικός παράγοντας

TGFβ: Μετασχηματίζων αυξητικός παράγοντας β

TNF: Ογκονεκρωτικός παράγοντας

VCAM-1: Μόριο προσκόλλησης-1 των αγγειακών κυττάρων

Vit E: Βιταμίνη E

VLDL: Πολύ χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνη

WHO: Παγκόσμια Οργάνωση Υγείας

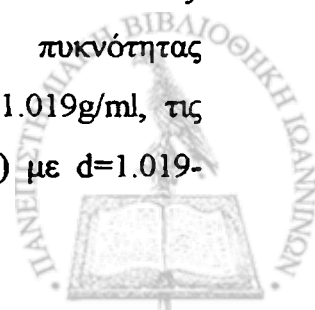


ΛΙΠΟΠΡΩΤΕΪΝΕΣ ΑΝΘΡΩΠΙΝΟΥ ΠΛΑΣΜΑΤΟΣ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΣΤΙΣ ΛΙΠΟΠΡΩΤΕΪΝΕΣ

Όλα τα λιπίδια του πλάσματος εκτός από τα ελεύθερα λιπαρά οξέα και μέρος της λυσοφωσφατιδυλοχολίνης μεταφέρονται με τη μορφή λιποπρωτεϊνών. Πρόκειται για μακρομοριακά συμπλέγματα λιπιδίων που περιέχουν εξειδικευμένες πρωτεΐνες γνωστές ως απολιποπρωτεΐνες (apo). Οι απολιποπρωτεΐνες αλληλεπιδρούν με τα φωσφολιπίδια και την ελεύθερη χοληστερόλη και σχηματίζουν το πολικό εξωτερικό τμήμα των λιποπρωτεϊνικών σωματιδίων που περιβάλλει έναν μη πολικό πυρήνα, ο οποίος αποτελείται από τριγλυκερίδια και εστέρες χοληστερόλης. Οι απολιποπρωτεΐνες οι οποίες συμβολίζονται με τα 5 πρώτα γράμματα της λατινικής αλφαβήτου (A-E), δεν έχουν μόνο δομικό ρόλο στο λιποπρωτεϊνικό σωματίδιο αλλά και λειτουργικό συμμετέχοντας στο μεταβολισμό τους. Έχουν ρόλο συνενζύμων σε αντιδράσεις του μεταβολισμού των λιποπρωτεϊνών όπου συμμετέχουν ένζυμα όπως, η λιποπρωτεϊνική λιπάση (Lipoprotein lipase, LPL), η ηπατική λιπάση (Hepatic lipase, HL) καθώς και η λεκιθινοχοληστερολοακυλοτρανσφεράση (Lecithin cholesterol acyl transferase, LCAT). Επίσης συντελούν στην αναγνώριση των λιποπρωτεϊνών από τους κυτταρικούς υποδοχείς και στη σύνδεσή τους με αυτούς ή χρησιμοποιούνται για τη μεταφορά εστέρων χοληστερόλης, φωσφολιπιδίων και τριγλυκεριδίων μεταξύ των λιποπρωτεϊνών. Διαταραχές του μεταβολισμού των λιποπρωτεϊνών συχνά οφείλονται σε μεταβολές της δομής ή της λειτουργίας των απολιποπρωτεϊνών.

Ο διαχωρισμός και η ταξινόμηση των λιποπρωτεϊνών γίνεται με τη χρήση τεχνικών ηλεκτροφόρησης και υπερφυγοκέντρωσης. Με βάση τη διαφορά πυκνότητας (d) των σωματιδίων, που αποτελεί και την αρχή διαχωρισμού με υπερφυγοκέντρωση, οι λιποπρωτεΐνες ταξινομούνται σε 6 κύριες τάξεις: τα χυλομικρά (Chylomicrons, CM) με $d < 0.096$ g/ml, τις πολύ χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνες (Very Low Density Lipoproteins, VLDL) με $d = 0.096 - 1.006$ g/ml, τις ενδιάμεσης πυκνότητας λιποπρωτεΐνες (Intermediate Density Lipoproteins, IDL) με $d = 1.006 - 1.019$ g/ml, τις χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνες (Low Density Lipoproteins, LDL) με $d = 1.019 -$



1.063g/ml, και τις υψηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνες (High Density Lipoproteins, HDL) με $d=1.063-1.210\text{g/ml}$. Στον βασικό αυτό διαχωρισμό πρόσφατα έχει προστεθεί και η λιποπρωτεΐνη a, (Lipoprotein (a), Lp(a)) με $d=1.060-1.100\text{g/ml}$.

Για διαχωρισμούς ρουτίνας των λιποπρωτεϊνών η ηλεκτροφόρηση είναι μια εύχρηστη τεχνική που τις διαχωρίζει με βάση το ηλεκτρικό τους φορτίο αλλά και στο μέγεθός τους. Σε αντιστοιχία με την ηλεκτροφόρηση των πρωτεϊνών, στην περιοχή των β-σφαιρινών εμφανίζεται η LDL, στην περιοχή των προ-β-σφαιρινών η VLDL, στην περιοχή των α-σφαιρινών η HDL ενώ λόγω του μικρού χρόνου ημιζωής της στο πλάσμα η IDL εμφανίζεται σπάνια και πάντα μεταξύ των β και προ-β-σφαιρινών. Τα χυλομικρά παραμένουν στην αφετηρία (σημείο ένθεσης) λόγω απουσίας φορτίου ενώ όταν στο πλάσμα υπάρχει Lp(a), μεταναστεύει στην περιοχή μεταξύ των προ-β και α-σφαιρινών.

Ο κυριότερος ρόλος των λιποπρωτεϊνών είναι η μεταφορά λιπιδίων. Έτσι οι VLDL αποτελούν την κύρια μορφή μεταφοράς στο πλάσμα των τριγλυκεριδίων που βιοσυντίθενται ενδογενώς. Οι LDL είναι ο κυριότερος τροφοδότης των ιστών με χοληστερόλη ενώ ο βασικός ρόλος των HDL είναι η αντίστροφη μεταφορά χοληστερόλης από τους ιστούς στο ήπαρ (reverse cholesterol transport). Τα χυλομικρά μεταφέρουν τα τριγλυκερίδια που προσλαμβάνονται με τις τροφές για λίγες ώρες μετά από ένα γεύμα. Κάτω από φυσιολογικές συνθήκες ο χρόνος παραμονής τους στο πλάσμα είναι 12 ώρες. Κατά τη διάρκεια της μεταφοράς τους με τις λιποπρωτεΐνες, τα λιπίδια υφίστανται ποιοτικές και ποσοτικές μεταβολές, οι οποίες οφείλονται στη δράση ενζύμων και πρωτεϊνών μεταφοράς συνδεδεμένων στα λιποπρωτεϊνικά σωματίδια [1].

Ένζυμα και πρωτεΐνες μεταφοράς των λιπιδίων στο πλάσμα

Η Λεκιθινοχοληστερολακυλοτρανσφεράση (LCAT),

Η λεκιθινοχοληστερολακυλοτρανσφεράση (LCAT) βρίσκεται κυρίως στην HDL και καταλύει την εστεροποίηση της χοληστερόλης που προσλαμβάνεται από την HDL, μεταφέροντας ένα λιπαρό οξύ από ένα μόριο φωσφατιδυλοχολίνης σύμφωνα με την αντίδραση:

φωσφατιδυλοχολίνη + χοληστερόλη → εστέρας χοληστερόλης + λυσοφωσφατιδυλοχολίνη



Το ένζυμο αυτό συντίθεται και εκκρίνεται από το ήπαρ. Μεταφέρεται κυρίως με το HDL-3 υποκλάσμα όπου και εστεροποιεί την χοληστερόλη την οποία έχει παραλάβει το σωματίδιο από τους ιστούς, τα χυλομικρά ή την VLDL. Ενεργοποιητής του ενζύμου είναι η apo A-I. Η φωσφατιδυλοχολίνη που υπάρχει στην επιφάνεια των HDL δρα ως δότης του λιπαρού οξέος που συνήθως είναι το αραχιδονικό ή το λινελαϊκό. Μετά την εστεροποίησή της η χοληστερόλη μεταφέρεται μέσω ειδικής πρωτεΐνης, της πρωτεΐνης μεταφοράς εστέρων χοληστερόλης (CETP), στις VLDL και έτσι δημιουργούνται νέες θέσεις πρόσληψης χοληστερόλης στην επιφάνεια της HDL. Παράλληλα με την εστεροποίησή της η χοληστερόλη παγιδεύεται στον πυρήνα των λιποπρωτεϊνικών σωματιδίων και έτσι παρεμποδίζεται η επαναφοράς της στους ιστούς.

Η λιποπρωτεϊνική λιπάση (LPL)

Η λιποπρωτεϊνική λιπάση (LPL), βρίσκεται στην επιφάνεια των ενδοθηλιακών κυττάρων των τριχοειδών. Συναντάται κυρίως στα τριχοειδή του λιπώδη και μυϊκού ιστού όπου είναι συνδεδεμένη με γλυκοζαμινογλυκάνες και κυρίως με θειική ηπαράνη. Ενεργοποιητής του ενζύμου είναι η apo C-II, που υπάρχει στα χυλομικρά στις VLDL και στις HDL ενώ η apo C-III, όπως και η apo E θεωρούνται αναστολείς του. Καταλύει την υδρόλυση των τριγλυκεριδίων τα οποία προέρχονται από τα χυλομικρά και τις VLDL προς γλυκερόλη και ελεύθερο λιπαρό οξύ το οποίο προσλαμβάνεται στη συνέχεια από τα κύτταρα περιφερικών ιστών κυρίως του μυϊκού και του λιπώδη για αποθήκευση ή παραγωγή ενέργειας. Μεταβολές της δραστηριότητας της LPL επηρεάζουν τα επίπεδα των λιποπρωτεϊνών αυτών στο πλάσμα. Στο λιπώδη ιστό η ενεργότητα του ενζύμου αυξάνει με την επίδραση της ινσουλίνης.

Η ηπατική λιπάση (HL)

Η ηπατική λιπάση (HL), έχει παρόμοια δράση με αυτή της LPL και βρίσκεται στα κολποειδή του ήπατος. Υδρολύει τα τριγλυκερίδια και τα φωσφολιπίδια που βρίσκονται στην επιφάνεια των IDL και HDL-2 συμμετέχοντας με τον τρόπο αυτό, είτε στην πρόσληψη των ανωτέρω λιποπρωτεϊνών από το ήπαρ είτε στη μετατροπή τους σε LDL και HDL-3 αντίστοιχα. Έλλειψη του ενζύμου οδηγεί σε συσσώρευση των IDL και σε αύξηση των HDL-2 στο πλάσμα. Η υδρόλυση των τριγλυκεριδίων, των υπολειμμάτων των χυλομικρών και των φωσφολιπιδίων της LDL θεωρείται πως γίνεται επίσης από την HL.



Η όξινη λυσοσωμιακή λιπάση

Η όξινη λυσοσωμιακή λιπάση δρα στις λιποπρωτεΐνες μετά την πρόσληψή τους από τα κύτταρα με ενδοκύττωση μέσω υποδοχέων. Υδρολύει τα τριγλυκερίδια και τους εστέρες της χοληστερόλης απελευθερώνοντας λιπαρά οξέα και χοληστερόλη για ενδοκυττάρια χρήση.

Η πρωτεΐνη μεταφοράς εστέρων χοληστερόλης, (CETP)

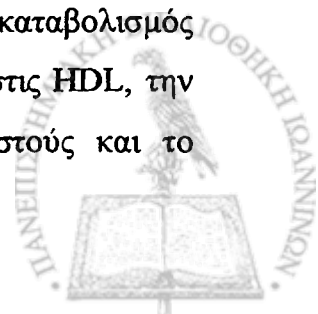
Η CETP είναι μια υδρόφοβη πρωτεΐνη του πλάσματος η οποία βρίσκεται κυρίως στην HDL. Είναι υπεύθυνη για τη μεταφορά εστέρων χοληστερόλης μεταξύ των HDL και LDL, των HDL και VLDL καθώς και μεταξύ των LDL και VLDL. Η μεταφορά εστέρων χοληστερόλης από μια λιποπρωτεΐνη σε μια άλλη συνοδεύεται από την αντίστροφη μεταφορά τριγλυκεριδίων.

ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΛΙΠΟΠΡΩΤΕΪΝΩΝ

Χυλομικρά, CM: Τα χυλομικρά είναι τα μεγαλύτερα λιποπρωτεϊνικά σωματίδια, το μέγεθος των οποίων κυμαίνεται από 100-1000nm. Αποτελούνται κατά 90% από τριγλυκερίδια, 5% ελεύθερη και εστεροποιημένη χοληστερόλη, 4% φωσφολιπίδια και 1% apo A-I, apo B-48, apo C, και apo E. Τα χυλομικρά βιοσυντίθενται από τα κύτταρα του εντερικού επιθηλίου και αρχικά αποτελούνται από τριγλυκερίδια, χοληστερόλη, φωσφολιπίδια και τις apo A-I και apo B-48. Από εκεί μέσω των λεμφαγγείων του εντέρου και του μείζονος θωρακικού πόρου μπαίνουν στη γενική κυκλοφορία του αίματος. Εκεί προσλαμβάνουν από την HDL εστέρες χοληστερόλης και τις apo C-II, apo C-III και apo E και στη συνέχεια έρχονται με το αίμα στο μυϊκό και λιπώδη ιστό. Στην επιφάνεια του ενδοθηλίου των τριχοειδών των παραπάνω ιστών βρίσκεται η LPL που ενεργοποιείται από την apo C-II η οποία έχει μεταφερθεί στα χυλομικρά από την HDL. Αντίθετα η apo C-III παρεμποδίζει την πρόωρη απόσυρση των χυλομικρών από την κυκλοφορία γιατί αναστέλλει τη σύνδεσή τους με τους apo E ηπατικούς υποδοχείς. Η έκκριση της LPL βρίσκεται υπό ορμονικό έλεγχο και κύρια από τη δράση της ινσουλίνης [2]. Με τη δράση της LPL υδρολύονται τα τριγλυκερίδια προς γλυκερόλη και ελεύθερα λιπαρά οξέα. Τα λιπαρά οξέα προσλαμβάνονται από τα κύτταρα του μυϊκού και λιπώδη ιστού όπου είτε χρησιμοποιούνται άμεσα για την

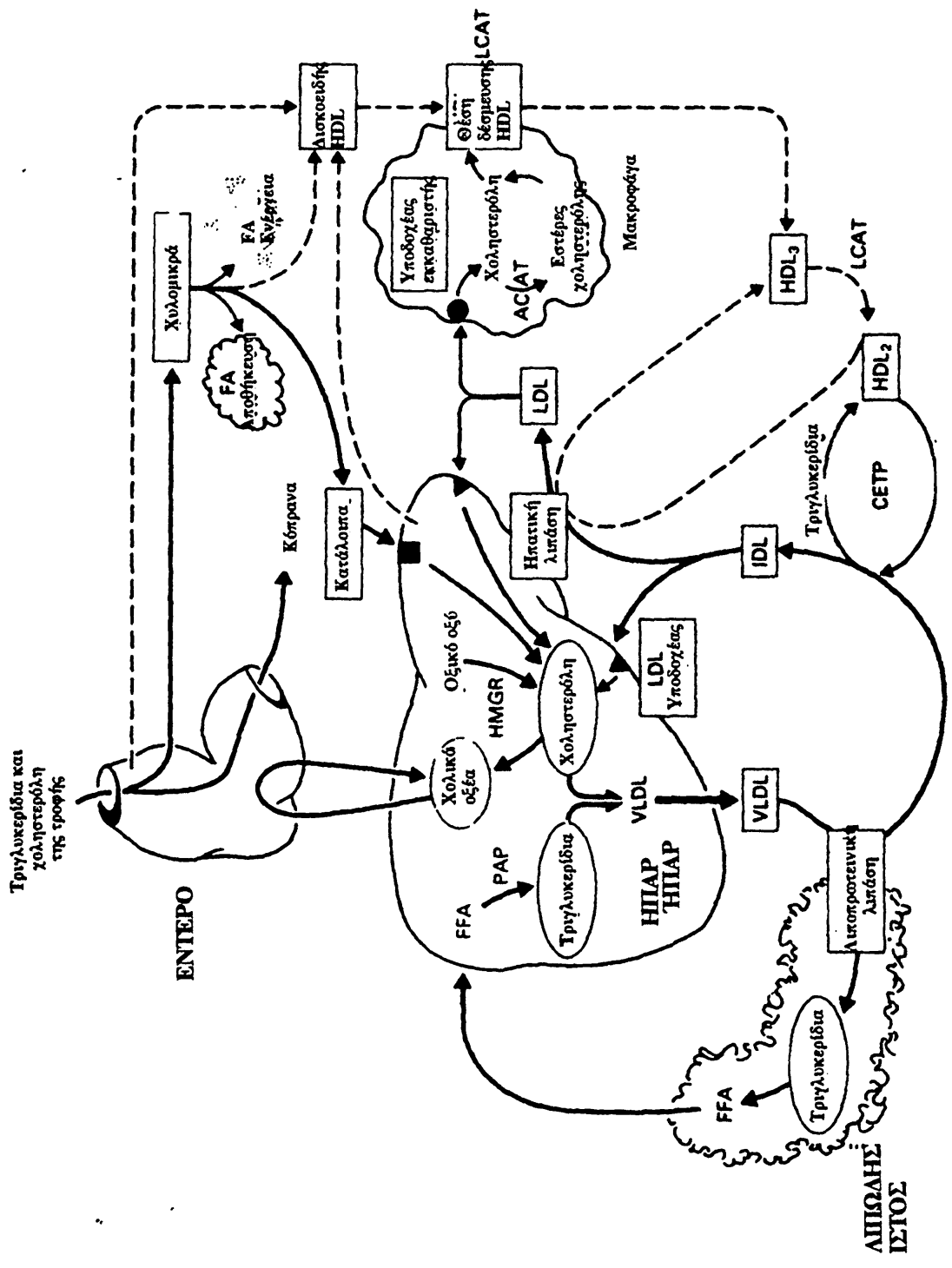
παραγωγή ενέργειας είτε επανεστεροποιούνται και αποθηκεύονται με τη μορφή τριγλυκεριδίων. Μετά την απομάκρυνση των τριγλυκεριδίων, τα χυλομικρά μικραίνουν σε μέγεθος, οπότε μέρος από τη χοληστερόλη, τα φωσφολιπίδια καθώς και οι apo A-I, apo C-II, apo C-III μεταφέρονται στην HDL. Τα εναπομείναντα σωματίδια γίνονται ως υπολείμματα χυλομικρών (remnants), μεταφέρονται στο ήπαρ όπου αποικοδομούνται προσλαμβάνόμενα από τους υποδοχείς των ηπατοκυττάρων που αναγνωρίζουν την apo E και την apo B-48 (σχήμα 1). Ένα ποσοστό της χοληστερόλης που αποδίδεται στο ήπαρ απεκκρίνεται στο έντερο είτε ως ελεύθερη χοληστερόλη, είτε με τη μορφή χολικών αλάτων. Η apo E των χυλομικρών αναγνωρίζεται επίσης από τους apo B/E υποδοχείς (LDL υποδοχείς) περιφερικών κυττάρων και ηπατοκυττάρων οπότε τα υπολείμματα των χυλομικρών μπορούν να καταβολιστούν και μέσω των LDL υποδοχέων.

Πολύ χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνες, VLDL: Οι VLDL παράγονται από το ήπαρ (σχήμα 1). Η λειτουργία τους είναι να μεταφέρουν στους περιφερικούς ιστούς τα τριγλυκερίδια που βιοσυντίθενται στο ήπαρ και τα οποία προέρχονται από τον καταβολισμό των υδατανθράκων ή από λιπαρά οξέα που έχουν μεταφερθεί στο ήπαρ από το έντερο. Αποτελούνται από 65% τριγλυκερίδια, 20% ελεύθερη και εστεροποιημένη χοληστερόλη, 10% φωσφολιπίδια και 5% πρωτεΐνη κυρίως apo E και apo B-100. Μετά την εισοδό τους στο πλάσμα οι VLDL ακολουθούν ένα μεταβολικό δρόμο παρεμφερή με αυτό των χυλομικρών, οπότε παραλαμβάνουν από την HDL apo C-II, apo C-III και apo E. Έτσι έρχονται στο μυϊκό και στο λιπώδη ιστό όπου τα τριγλυκερίδια υδρολύονται με τη δράση της LPL και τα ελεύθερα λιπαρά οξέα παραλαμβάνονται από τα κύτταρα των περιφερικών ιστών. Με τον τρόπο αυτό τα σωματίδια των VLDL, γίνονται μικρότερα σε μέγεθος και πυκνότερα οπότε και ονομάζονται IDL. Παράλληλα η apo C-II και η apo C-III μεταφέρονται στην HDL-3 συμβάλλοντας έτσι στο σχηματισμό της HDL-2. Από τις IDL, ένα μέρος τους παραλαμβάνεται από το ήπαρ μέσω των apo B/E υποδοχέων όπου και αποικοδομούνται, ενώ το μεγαλύτερο ποσοστό μετατρέπεται σε LDL. Λόγω της μετατροπής αυτής, οι IDL έχουν μικρό χρόνο ημιζωής στο πλάσμα. Ο καταβολισμός των VLDL έχει ως αποτέλεσμα την επιστροφή των apo C και apo E στις HDL, την απόδοση των λιπαρών οξέων από το ήπαρ στους περιφερικούς ιστούς και το



σχηματισμό των LDL. Με την υδρόλυση των τριγλυκεριδίων και τη σμίκρυνση του σωματιδίου της VLDL, αλλάζει η χωροδιάταξη της apo B-100 όπως και της apo E. Με τη νέα αυτή μορφή, η apo B100 αναγνωρίζεται από τους ηπατικούς apo B/E υποδοχείς οπότε η VLDL προσλαμβάνεται από τα ηπατοκύτταρα και απομακρύνεται από την κυκλοφορία. Πρόσφατες μελέτες μεταβολισμού των λιποπρωτεϊνών που περιέχουν την apo B στον άνθρωπο έδειξαν ότι εκκρίνονται περισσότερες από μια μορφές VLDL από το ήπαρ και ότι η apo B εμφανίζεται σε ένα πλήθος σωματιδίων τα οποία κυμαίνονται σε μέγεθος από αυτό της LDL μέχρι αυτό της μεγάλης VLDL. Υποκλασμάτωση των VLDL με Sf (20-400) έδειξε ότι αν και το μεγαλύτερο ποσοστό της apo B-100 εμφανίζεται στο υποκλάσμα VLDL-1, που αποτελείται από σωματίδια πλούσια σε τριγλυκερίδια και είναι γνωστό και ως, μεγάλο VLDL υποκλάσμα πλούσιο σε τριγλυκερίδια. Η απολιπίδωση των VLDL-1 *in vitro* δείχνει ότι η μάζα της apo B-100 που περιέχουν είναι πολύ μικρότερη από τη μάζα της apo B που υπάρχει στο υποκλάσμα VLDL-2, (μικρά σωματίδια VLDL, φτωχά σε τριγλυκερίδια), στην IDL και στην LDL [3-6]. Μελέτες σε μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες καθώς και σε υπερχοληστερολαιμικά άτομα έδειξαν ότι η παραγωγή των VLDL-1 και VLDL-2 από το ήπαρ, γίνεται ανεξάρτητα, χωρίς η σύνθεση του ενός να επηρεάζει την σύνθεση του άλλου. Επίσης βρέθηκε πως η οιστραδιόλη επάγει την παραγωγή της apo B-100 στις VLDL-1 αλλά όχι στις VLDL-2 [6]. Τα σωματίδια VLDL-1 ακολουθούν δυο πιθανούς μεταβολικούς δρόμους.





Σχήμα 1. Σχηματογράφημα βιοσύνθεσης λιποπρωτεϊνών πλάσματος.



Αρχικά, μέσω της δράσης της LPL [7,8] που χρησιμοποιεί ως συνένζυμο την apo C-II [9], τα σωματίδια VLDL-1 χάνουν μεγάλο μέρος των τριγλυκεριδίων τους μετατρέπόμενα σε VLDL-2. Η apo C-III πιστεύεται πως είναι αρνητικός ρυθμιστής στην πορεία αυτή [10] αφού σε άτομα με έλλειψη της apo C-III, η λιπόλυση της VLDL συμβαίνει με ρυθμούς πολλαπλάσιους από ότι στα φυσιολογικά [11]. Επιπλέον ένα σημαντικό μέρος των VLDL-1 απομακρύνεται από την κυκλοφορία πιθανώς μέσω υποδοχέων [12,13], που μπορεί να είναι είτε ο πολύ πρόσφατα ταυτοποιημένος υποδοχέας των VLDL που αναγνωρίζει την apo E, είτε μέσω της πρωτεΐνης που σχετίζεται με τον LDL υποδοχέα (LDL receptor related protein, LRP). Πιστεύεται πως είναι απαραίτητη η ύπαρξη της LPL για το μεταβολισμό των VLDL-1, αφού μελέτες σε άτομα με ανεπάρκεια LPL έδειξαν καθυστέρηση στη μετατροπή των VLDL-1 σε VLDL-2 αλλά και 90% μείωση του απευθείας καταβολισμού των VLDL-1 [7]. Επίσης στα άτομα αυτά τα κατάλοιπα της απολιπιδώσης των VLDL-1 συμβάλλουν στη βιοσύνθεση των IDL και των LDL, αλλά η μετατροπή τους στα πυκνότερα αυτά σωματίδια είναι μερική και ανεπαρκής [4,14]. Αντιθέτως η μετατροπή των VLDL -2 σε IDL και LDL δεν επηρεάζεται από την έλλειψη της LPL [7]. Σε άτομα με ανεπάρκεια HL, η μετατροπή των VLDL-1 σε VLDL-2 καθώς και των VLDL-2 σε IDL και LDL συμβαίνει με φυσιολογικούς ρυθμούς, όμως αναστέλλεται η μεταφορά της apo B από την IDL στην LDL [14]. Κατά συνέπεια τα ένζυμα αυτά, LPL και HL, έχουν συμπληρωματικό ρόλο στον καταράκτη απολιπιδώσης των VLDL. Δεν είναι ακόμη γνωστό, πως καθορίζεται αν ένα σωματίδιο που περιέχει apo B θα ακολουθήσει την πορεία απολιπιδώσης ή θα καταβολιστεί μέσω υποδοχέα. Τα επιφανειακά συστατικά των λιποπρωτεϊνών αλλάζουν διαρκώς επηρεάζοντας την αλληλεπίδραση με τα ένζυμα και τους υποδοχείς. Σε φυσιολογικά άτομα ούτε η apo B-100 ούτε η apo E των VLDL-1 μπορούν να προσδεθούν στον υποδοχέα, αλλά καθώς η λιπόλυση συνεχίζεται αποκτούν την κατάλληλη διαμόρφωση για τη θέση δέσμευσης και αναγνωρίζονται πιο εύκολα από τον κλασικό υποδοχέα των LDL [15-17].

Λιποπρωτεΐνη Χαμηλής Πυκνότητας, LDL: Η LDL ανθρώπινου πλάσματος είναι ένας ετερογενής πληθυσμός σωματιδίων των οποίων η πυκνότητα κυμαίνεται από 1.019-1.063g/ml [18-20] και διαφέρουν τόσο στις φυσικοχημικές ιδιότητες όσο και στο μεταβολισμό τους. Τα σωματίδια αυτά είναι σφαιρικά πολυμοριακά

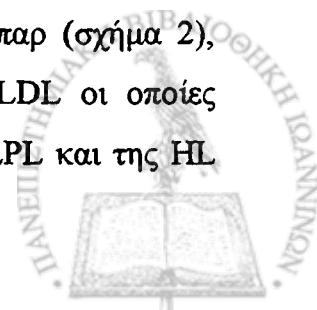


συμπλέγματα. Απαρτίζονται από έναν υδρόφοβο πυρήνα που περιέχει 1600 μόρια εστέρων χοληστερόλης και 170 μόρια τριγλυκεριδίων, ο οποίος, περιβάλλεται από 700 μόρια φωσφολιπιδίων, 600 μόρια ελεύθερης χοληστερόλης και ένα μόριο της apo B-100, που είναι και η μοναδική απολιποπρωτεΐνη της LDL. Η εξωτερική επιφάνεια των σωματιδίων αυτών είναι πολική και έτσι μετακινούνται ελεύθερα στο υδρόφιλο περιβάλλον του πλάσματος. Επιπλέον η LDL μεταφέρει μικρές ποσότητες λιπόφιλων συστατικών τα οποία δρουν ως αντιοξειδωτικά. Τέτοια συστατικά είναι η ουβικινόλη-10, η α-τοκοφερόλη (βιταμίνη E, VitE), καθώς και όλες οι υδρογονωμένες και οξυγονωμένες μορφές των καροτενοειδών [18].

• Η apo B-100 βιοσυντίθεται στο ήπαρ και είναι υπεύθυνη για την αναγνώριση και πρόσληψη της LDL από τον κλασικό κυτταρικό υποδοχέα B/E ο οποίος βρίσκεται κυρίως στα ηπατοκύτταρα. Περιβάλλει ολόκληρη την επιφάνεια του σωματιδίου σαν «χαταπόδι» και περιέχει 4.536 αμινοξέα η αλληλουχία των οποίων έχει προσδιοριστεί κατά ένα μέρος πάνω στην ίδια την apo B-100 ενώ ολοκληρωτικά προσδιορίστηκε με τεχνολογία ανασυνδιασμένου DNA (cDNA) [21]. Το μοριακό βάρος της υπολογισμένο με βάση τα αμινοξέα που περιέχει είναι 512.937. Ο αριθμός των αμινοξέων ανά μόριο apo B-100 είναι: 266Ala, 478 Asp+Asn, 148 Arg, 25 Cys, 529 Glu+Gln, 207 Gly, 15 His, 288 Ile, 523 Leu, 356 Lys, 78 Met, 223 Phe, 169 Pro, 393 Ser, 298 Thr, 37 Trp, 152 Tyr, 251 Val. Από τις 25 κυστεΐνες που υπάρχουν οι 4 έχουν ελεύθερες τις σουλφιδρυλομάδες (SH) ενώ οι υπόλοιπες σχηματίζουν δισουλφιδικούς δεσμούς (S-S) ή εστέρεςθειόλης [22]. Η apo B-100 είναι γλυκοζυλιωμένη και το συνολικό της ποσοστό σε υδατάνθρακες είναι αποτελεί το 8-10% του βάρους της. Οι κυριότεροι υδατάνθρακες που περιέχει είναι η μανόζη, η γαλακτόζη, η γλυκοζαμίνη και το σιαλικό οξύ. Το μοριακό βάρος της γλυκοζυλιωμένης apo B-100 είναι 550.000.

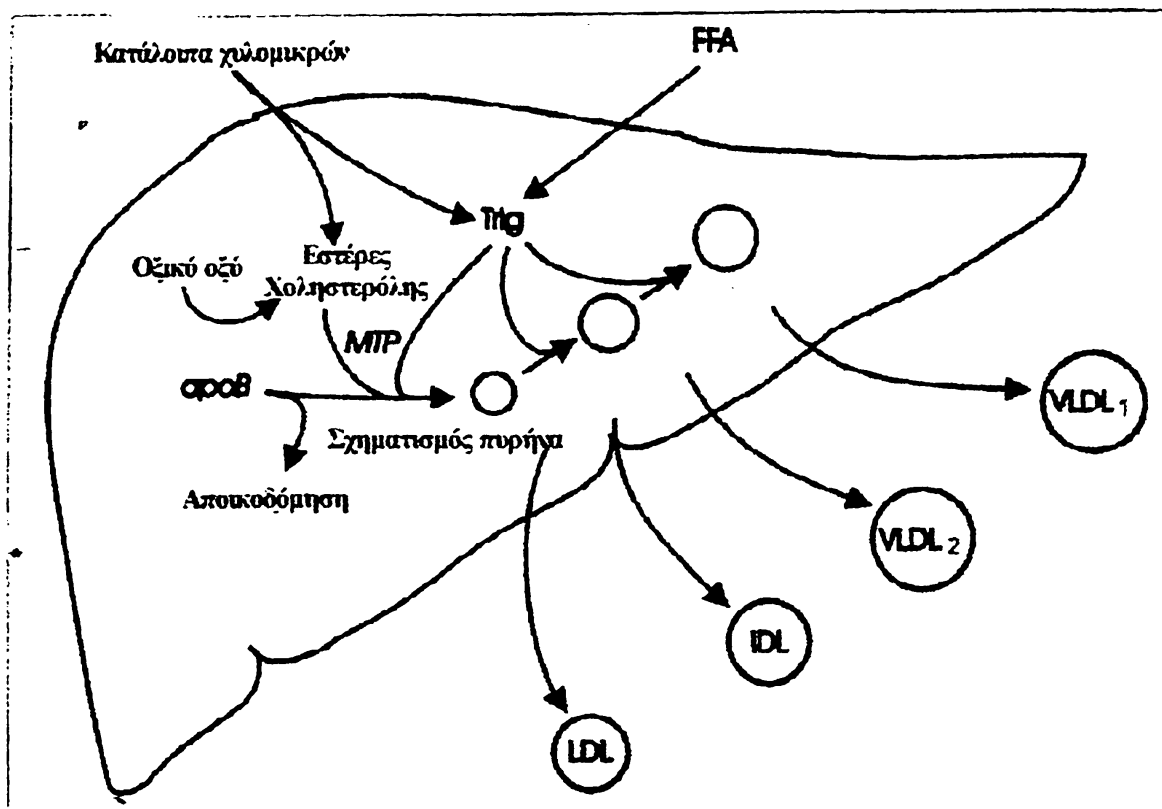
Ο κυριότερος ρόλος της LDL είναι η μεταφορά χοληστερόλης από το ήπαρ σε όλους τους περιφερικούς ιστούς. Η LDL μπορεί να διέρχεται από τις συνδέσεις που υπάρχουν μεταξύ των ενδοθηλιακών κυττάρων και μέσω των B/E υποδοχέων να τροφοδοτεί τα κύτταρα με χοληστερόλη για τις διάφορες μεταβολικές τους ανάγκες.

Τα νεώτερα δεδομένα δείχνουν οι LDL εκκρίνεται από το ήπαρ (σχήμα 2), κυρίως όμως σχηματίζονται στο πλάσμα από τις VLDL οι οποίες αρχικά μετατρέπονται σε IDL. Η μετατροπή αυτή γίνεται μέσω της LPL και της HL



χωρίς να είναι απαραίτητη η παρουσία της apo C-II, η οποία, όπως και η apo E κατά τη διάρκεια αυτής της μετατροπής μεταφέρεται στις HDL, γιατί και η μοναδική απολιποπρωτεΐνη που μένει στην LDL είναι η apo B-100. Η μετατροπή των VLDL σε LDL γίνεται με τόσο γρήγορο ρυθμό ώστε φυσιολογικά μετά από ολονύκτια νηστεία δεν είναι δυνατή η ανίχνευση IDL στο πλάσμα. Οι IDL και στη συνέχεια οι LDL προέρχονται από την απολιπίδωση των άμεσα εκκρινόμενων από το ήπαρ, VLDL-2 σωματιδίων. Τα σωματίδια αυτά των LDL ακολουθούν γρηγορότερο μεταβολικό ρυθμό από τα σωματίδια LDL που δημιουργούνται κατά τη λιπόλυση των VLDL-2 τα οποία προέρχονται από τα υπολείμματα των VLDL-1 στο πλάσμα. Έχει βρεθεί πως όταν ραδιοϊχνηθετημένη LDL εγχυθεί σε νορμολιπιδαιμικά ή υπερλιπιδαιμικά άτομα, εμφανίζει μεταβολική ετερογένεια [23-26]. Έτσι στις 5 πρώτες ημέρες μεταβολισμού της ^{125}I -LDL, ο ρυθμός έκκρισης ραδιενεργής ιωδοτυροσίνης είναι μεγάλος, δείχνοντας ένα μεγάλο καταβολικό ρυθμό της λιποπρωτεΐνης. Στις επόμενες 5-14 ημέρες παρατηρείται ένας μικρότερος ρυθμός έκκρισης ραδιενεργής ιωδοτυροσίνης συμβατός με μειωμένο καταβολισμό της LDL. Η πλέον πιθανή εκδοχή από τα ευρήματα αυτά είναι, η LDL να αποτελείται από δύο τουλάχιστον μορφές, μια που καταβολίζεται γρήγορα (πιθανώς μέσω υποδοχέων), ενώ η άλλη μεταβολίζεται πιο αργά και πιθανώς σε μεγάλο βαθμό από δρόμους ανεξάρτητους του υποδοχέα [24,26]. Η μορφή της LDL που μεταβολίζεται αργά (μικρά πυκνά σωματίδια LDL) συνδυάζεται και με υψηλά επίπεδα τριγλυκεριδίων στο πλάσμα [2]. Από τις παρατηρήσεις σχετικά με το μεταβολισμό των LDL και από τις μελέτες κινητικής των VLDL πιθανολογείται ότι η αργά μεταβολιζόμενη LDL προέρχεται από τη VLDL-1, αφού έχουν τον ίδιο ρυθμό καταβολισμού. Η μορφή της LDL που καταβολίζεται γρήγορα (μεγάλα σωματίδια LDL), πιθανώς προέρχεται από τη VLDL-2 που βιοσυντίθεται απευθείας στο ήπαρ καθώς επίσης και από απευθείας βιοσύνθεση LDL στο ήπαρ.





Σχήμα 2. Έκκριση apo-B λιποπρωτεϊνών από το ήπαρ.

Υψηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνη, HDL: Η HDL είναι η πιο εύπλαστη λιποπρωτεΐνη αφού όλα τα συστατικά της βρίσκονται σε διαρκή και γρήγορη ανταλλαγή. Αποτελείται από διάφορα υποκλάσματα που η μετατροπή του ενός στο άλλο διέπεται από τους μηχανισμούς της λιπόλυσης αλλά και ανταλλαγής συστατικών. Στο μεταβολισμό της HDL στο πλάσμα συμμετέχουν κυρίως τα ένζυμα LCAT και CETP. Τρεις είναι οι κύριες μορφές HDL που κυκλοφορούν στο πλάσμα, οι προ-β-HDL οι HDL-2 και οι HDL-3. Έχουν σχήμα σφαιρικό περιέχουν ένα υδρόφοβο πυρήνα από εστέρες χοληστερόλης και τριγλυκερίδια ο οποίος περιβάλλεται από φωσφολιπίδια, ελεύθερη χοληστερόλη και τις apo A-I, A-II, A-IV, C-I, C-II, C-III, E. Διαφέρουν ως προς την πυκνότητά τους και τη σχέση πρωτεΐνης /λιπίδια. Η HDL προσλαμβάνει την περίσσεια της χοληστερόλης από τα κύτταρα και τη μεταφέρει με τη μορφή εστέρων χοληστερόλης, οι οποίοι σχηματίζονται με τη δράση της LCAT. Έτσι διατηρείται μια βαθμίδωση αντίστροφης μεταφοράς χοληστερόλης προς το ήπαρ, το οποίο είτε μεταβολίζει τη «φορτωμένη» με χοληστερόλη HDL, είτε apo B σωματίδια τα οποία μέσω της δράσης της CETP έχουν πάρει τους εστέρες χοληστερόλης από την HDL [27]. Στα φυσιολογικά άτομα η προ-β-HDL αποτελεί ένα μικρό ποσοστό της

ολικής HDL όμως ο ρόλος της θεωρείται καθοριστικός στην έναρξη της αντίστροφης μεταφοράς χοληστερόλης [28]. Είναι μια μικρή λιποπρωτεΐνη μοριακής μάζας 60 kDa, η οποία περιέχει apo A-I όχι όμως apo A-II, γιαντό και μεταναστεύει κατά την ηλεκτροφόρηση στη προ-β περιοχή [28-30]. Όταν πλάσμα επώάζεται με καλλιέργια κυττάρων πλούσιων σε χοληστερόλη, τότε ένα μεγάλο ποσοστό της στερόλης των κυτταρικών μεμβρανών εντοπίζεται σε αυτό το υποκλάσμα [31]. Επιπλέον επώαση του πλάσματος *in vitro* οδηγεί σε μείωση των προ-β-HDL και μεταφορά της χοληστερόλης (πιθανώς μαζί με την apo A-I) στις φυσιολογικού μεγέθους HDL, δηλαδή τα σωματίδια με άλφα ηλεκτροφορητική κινητικότητα. Στη μεταφορά αυτή κεντρικό ρόλο φαίνεται να παίζει η LCAT, η οποία με τη δράση της δημιουργεί τον υδρόφοβο πυρήνα και κατά συνέπεια αυξάνει το μέγεθος του σωματιδίου [28,29]. Μελέτη του σχηματισμού των HDL σε άτομα με ανεπάρκεια LCAT έδειξε ένα μεγάλο ποσοστό σωματιδίων προ-β-HDL καθώς και μεγάλα δισκοειδή σωματίδια HDL [28,29]. Όμως και η αντίστροφη πορεία φαίνεται πιθανή μέσω της δράσης της CETP. Παρατηρήθηκε ότι κατά την επώαση HDL με CETP και με φυσιολογικές συγκεντρώσεις VLDL ή LDL, το σωματίδιο της HDL ανασυντάσσεται αφού περίπου το ένα τρίτο της apo A-I αποδεσμεύεται από την HDL. Αυτή η apo A-I που είναι ελεύθερη από λιπίδια αλληλεπιδρά με φωσφολιπίδια που απελευθερώνονται κατά τη λιπόλυση πλούσιων σε τριγλυκερίδια λιποπρωτεϊνών και σχηματίζει μικρές (προ-β-HDL) [28,33,34,39]. *In vivo* το φαινόμενο αυτό της αποδέσμευσης της apo A-I από την HDL είναι πολύ σημαντικό και για τη δημιουργία νέων σωματιδίων που θα είναι δέκτες χοληστερόλης αλλά και για τον καταβολισμό αυτής της απολιποπρωτεΐνης.

Η ώριμη HDL στο πλάσμα υπάρχει με τη μορφή της HDL-2 και HDL-3. Τα σωματίδια αυτά μπορούν να διαχωριστούν περαιτέρω με βάση την περιεκτικότητά τους σε apo A-I. Τόσο οι HDL-2 όσο και οι HDL-3 περιέχουν σωματίδια που περιέχουν μόνο apo A-I (LpA-I) αλλά και σωματίδια που έχουν apo A-I και apo A-II (LpA-I/AII). Ο καταβολισμός των σωματιδίων LpA-I και LpA-I/AII φαίνεται να γίνεται από ανεξάρτητους δρόμους [35-37]. Σημαντικό ρόλο στη συγκέντρωση της HDL στο πλάσμα αλλά και στην κατανομή των υποκλασμάτων της, παίζουν τα τριγλυκερίδια του πλάσματος. Μελέτες έδειξαν ότι κατά τη διάρκεια ενός γεύματος πλούσιου σε λιπαρά, τα τριγλυκερίδια των χυλομικρών και των VLDL μεταφέρονται

μέσω της CETP στην HDL [27,36]. Έτσι σχηματίζεται το υποκλάσμα HDL-2 που είναι πλούσιο σε τριγλυκερίδια τα οποία υδρολύονται με τη δράση της HL σχηματίζοντας το υποκλάσμα HDL-3 [39]. Το HDL-3 μετατρέπεται πάλι σε HDL-2 με τη δράση της LCAT [2]. Φαίνεται λοιπόν ότι το μέγεθος των HDL όπως και των LDL ρυθμίζεται με παρεμφερή τρόπο από τα τριγλυκερίδια του πλάσματος. Εξετάζοντας τα χαρακτηριστικά των HDL σε διάφορες διαταραχές του μεταβολισμού των λιπιδίων πιστοποιήθηκε πως ο κύκλος των λιπολύσεων και ανταλλαγής συστατικών ρυθμίζει και την HDL *in vivo*. Στην αθηταλιποπρωτεϊναιμία που δεν υπάρχουν πλούσιες σε τριγλυκερίδια λιποπρωτεΐνες για να δράσουν ως δότες, κυριαρχούν τα HDL-2 δωματίδια τα οποία είναι πλούσια σε εστέρες χοληστερόλης. Το ίδιο συμβαίνει και κατά την ανεπάρκεια CETP.

Ο καταβολισμός των HDL γίνεται στο ήπαρ μέσω των υποδοχέων apo E και apo B/E. Ακολουθεί ενδοκυττάρωση και αποικοδόμηση των εστέρων χοληστερόλης και των απολιποπρωτεϊνών. Η χοληστερόλη που ελευθερώνεται, είτε χρησιμοποιείται για τη βιοσύνθεση νέων λιποπρωτεϊνών είτε απεκκρίνεται από τον οργανισμό με τη χολή υπό τη μορφή ελεύθερης χοληστερόλης ή αφού πρώτα μετατραπεί σε χολικά οξέα.

ΑΤΥΠΕΣ ΛΙΠΟΠΡΩΤΕΪΝΕΣ

Εκτός από τις παραπάνω υπάρχουν και λιποπρωτεΐνες οι οποίες παρουσιάζονται μόνο σε παθολογικές καταστάσεις χαρακτηρίζονται ως «άτυπες». Στην κατηγορία αυτή ανήκουν οι β-VLDL και η Lp-x.

β-VLDL

Οι β-VLDL έχουν ηλεκτροφορητική κινητικότητα β-σφαιρινών και υπερφυγοκεντρικά πηγαίνουν στην περιοχή πυκνότητας των VLDL. Ονομάζονται και επιπλέουσες β-λιποπρωτεΐνες. Εμφανίζονται σε διάφορες δυσλιποπρωτεϊναιμίες καθώς και στη μεταγευματική λιπαιμία. Η απουσία λειτουργικής apo E παρεμποδίζει την φυσιολογική μετατροπή των VLDL σε LDL με αποτέλεσμα τη συσσώρευση των β-VLDL στο πλάσμα. Οι β-VLDL είναι πλούσιες σε εστέρες χοληστερόλης, προσλαμβάνονται από τους υποδοχείς εκκαθαριστές των μακροφάγων καθώς και από



υποδοχείς που βρίσκονται στην επιφάνεια των ενδοθηλιακών κυττάρων συμβάλλοντας και αυτές στην αθηρωμάτωση [40].

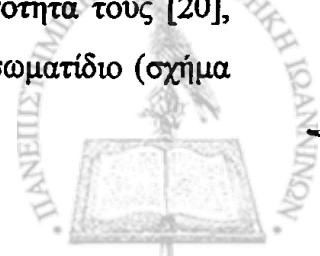
Lp-x

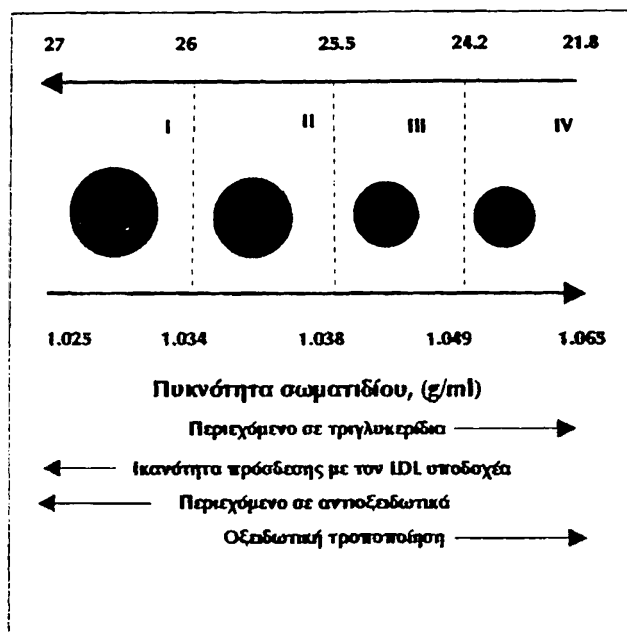
Η Lp-x είναι παθογνωμονικό σημάδι στο πλάσμα ασθενών με χολόσταση, εμφανίζεται όμως και στο πλάσμα ατόμων με οικογενή ανεπάρκεια της LCAT. Έχει την ίδια πυκνότητα και ηλεκτροφορητική κινητικότητα με την LDL διαχωρίζεται όμως από αυτή με ηλεκτροφόρηση σε άγαρ, όπου έχει αντίθετη μετανάστευση. Αποτελείται κατά 65% από φωσφολιπίδια, ενώ το πρωτεϊνικό της τμήμα αποτελείται από αλβουμίνη και apo C. Μεγάλη επίσης είναι και η περιεκτικότητά της σε χολικά άλατα [41].

ΦΑΙΝΟΤΥΠΟΙ LDL

Τα σωματίδια της LDL θεωρείται ότι ακολουθούν κατανομή Gauss ως προς το μέγεθος και την πυκνότητά τους [2]. Η ετερογένεια των σωματιδίων της LDL αναφέρεται στο μέγεθός τους, στο μοριακό τους βάρος, στην πυκνότητα επίπλευσης, στο φορτίο επιφανείας, στην υδροδυναμική συμπεριφορά καθώς και στη χημική τους σύσταση [18-20]. Λόγω των διαφορών αυτών τα σωματίδια της LDL μπορούν να διαχωριστούν με διάφορες μεθόδους όπως είναι η υπερφυγοκέντρωση βαθμίδωσης πυκνοτήτων διαφόρων αλάτων καθώς και με τεχνικές ηλεκτροφόρησης. Επιπλέον, πρόσφατες μελέτες δείχνουν ότι η διαμόρφωση της apo B-100 στα υποκλάσματα της LDL είναι διαφορετική γεγονός που επηρεάζει την αλληλεπίδραση και πρόσδεσή τους στον κυτταρικό υποδοχέα B/E [42-44].

Δυο βασικοί τύποι για τα υποκλάσματα της LDL [45-48], έχουν περιγραφεί, ο φαινότυπος A, όπου επικρατούν τα μεγάλα σωματίδια της LDL, και ο φαινότυπος B στον οποίο κυριαρχούν τα μικρά πυκνά σωματίδια της LDL. Ο διαχωρισμός και χαρακτηρισμός τους αρχικά βασίστηκε στην ηλεκτροφόρηση βαθμίδωσης πυκνοτήτων πολυακρυλαμιδίου παρεμφερή όμως προφίλ λαμβάνονται και με τη χρήση υπερφυγοκέντρωσης βαθμίδωσης πυκνοτήτων [47]. Μελέτες έχουν δείξει ότι η μέση διάμετρος των σωματιδίων της LDL μειώνεται όσο αυξάνει η πυκνότητά τους [20], ενώ παράλληλα μεταβάλλεται το % ποσοστό κάθε συστατικού στο σωματίδιο (σχήμα 3) [49].



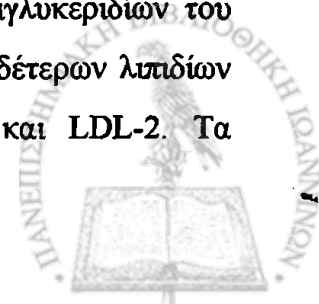


Σχήμα 3. Κατάταξη των υποκλασμάτων της LDL σε 4 υποκλάσματα με βάση τη διάμετρο και την πυκνότητά τους.

Ποικίλες μελέτες που έγιναν σε οικογένειες καθώς και σε δίδυμα έδειξαν ότι υπάρχει γενετική επίδραση στον καθορισμό του φαινότυπου χωρίς να παραβλέπονται και οι περιβαλλοντικοί παράγοντες. Πολυπαραγοντικές αναλύσεις κληρονομικών χαρακτηριστικών σε οικογένειες απέδειξαν ότι υπάρχει γονιδιακή συμμετοχή στον καθορισμό του φαινότυπου είτε με επικρατούντα χαρακτήρα είτε προσθετικά. Μελέτες σε δίδυμα άτομα (άνδρες και γυναίκες), έδειξαν ότι υπάρχει κληρονομικότητα του μεγέθους των LDL σωματιδίων σε ποσοστό 40-50%. Επίσης πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι υπάρχει σχέση μεταξύ του φαινότυπου LDL και του γενετικού τόπου του LDL υποδοχέα στο χρωμόσωμα 19 [50].

Οι φαινότυποι έχουν αποκτήσει κλινικό ενδιαφέρον αφού μεγάλη συγκέντρωση των μικρών πυκνών LDL (LDL-3 > 100mg/dl, φαινότυπος B), συσχετίζεται με 3-7 φορές μεγαλύτερο κίνδυνο για την εμφάνιση στεφανιαίας νόσου. Τα άτομα αυτά έχουν στο πλάσμα τους αυξημένα επίπεδα τριγλυκεριδίων, αυξημένη μάζα VLDL και IDL καθώς και χαμηλά επίπεδα apo A-I άρα και HDL [46,50-52]. Ο όρος αθηρωγόνος λιποπρωτεϊνικός φαινότυπος (ALP, atherogenic lipoprotein phenotype), έχει επιλεχθεί για να περιγράψει ακριβώς αυτό το σύνδρομο καθώς και τη μεταβολική δυσλειτουργία που οδηγεί στη γένεσή του [53]. Πιστεύεται πως τα επίπεδα των τριγλυκεριδίων του πλάσματος είναι ο πιο σημαντικός παράγοντας που καθορίζει το προφίλ των

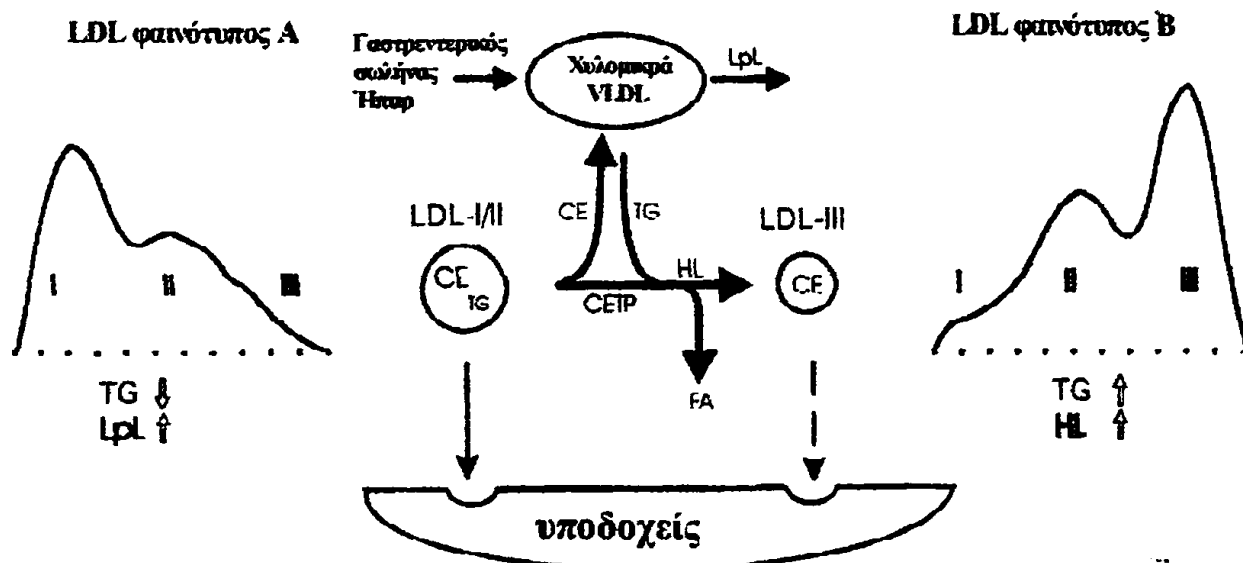
υποκλασμάτων της LDL. Σε άτομα με επίπεδα τριγλυκεριδίων μικρότερα από 1.0 mmol/l [53] ο φαινότυπος B σπάνια παρατηρείται, ενώ το ακριβώς αντίθετο συμβαίνει όταν τα τριγλυκερίδια του πλάσματος ξεπεράσουν τα 2.0 mmol/l. Επίσης ο φαινότυπος B συσχετίζεται και με το σύνδρομο αντίστασης στην ινσουλίνη καθώς και με το μη ινσουλινοεξαρτώμενο διαβήτη (NIDDM, non-insulin dependent diabetes mellitus) [54,55]. Ο φαινότυπος B συναντάται στο 30-35% των ενήλικων ανδρών ενώ είναι λιγότερο συχνός σε άνδρες ηλικίας < 20 ετών [53]. Επίσης συναντάται στο 5-10% των προεμμηνοπαυσιακών γυναικών και στο 15-25% των μετεμμηνοπαυσιακών γυναικών [56,57]. Σε νορμολιπιδαιμικά άτομα και κυρίως σε γυναίκες είναι πολύ συχνός ο ενδιάμεσος φαινότυπος, όπου κυριαρχούν τα ενδιάμεσης πυκνότητας και μεγέθους σωματίδια των LDL [58]. Με υπερφυγοκέντρωση βαθμίδωσης πυκνοτήτων η ομάδα Packard et al [2] απομόνωσε 3 υποκλάσματα LDL περιοχής πυκνότητας, LDL-1; $d=1.020-1.035\text{g/ml}$, LDL-2; $d=1.036-1.045\text{g/ml}$ και LDL-3; $d=1.045-1.060\text{g/ml}$. Μελέτησε τα φυσιολογικά επίπεδα τους στο πλάσμα και διερεύνησε την πιθανή συσχέτισή τους με τη συγκέντρωση των τριγλυκεριδίων του πλάσματος. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η συγκέντρωση του LDL-1 μειώνεται καθώς η συγκέντρωση των τριγλυκεριδίων αυξάνει προς τη μέγιστη φυσιολογική τιμή. Αντίθετα το LDL-2 αυξάνει καθώς αυξάνουν τα επίπεδα των τριγλυκεριδίων μέχρι περίπου τη μέση της κλίμακας των φυσιολογικών τιμών (περίπου μέχρι 1.3 mmol/l). Όταν τα φυσιολογικά επίπεδα των τριγλυκεριδίων ξεπεράσουν τα 1.3 mmol/l, τότε στους άντρες, το LDL-2 μειώνεται ενώ αυξάνει το LDL-3 [2,53,59]. Η πτώση του LDL-2 και η αύξηση του LDL-3 σε υψηλές συγκεντρώσεις τριγλυκεριδίων πλάσματος δεν συμβαίνει στις γυναίκες [2], όπου έχει βρεθεί πως η ποσότητα του LDL-3 συσχετίζεται με την ενεργότητα της HL στο πλάσμα. Σύμφωνα με τα δεδομένα αυτά μπορεί να υποθεθεί πως ο σχηματισμός του LDL-3 και κατ' επέκταση η εμφάνιση του φαινότυπου B ακολουθεί την εξής πορεία. Υπάρχει μια αυξημένη παραγωγή LDL με μεγάλο χρόνο ημίσειας ζωής εξαιτίας είτε αυξημένης παραγωγής των VLDL, κυρίως των VLDL-1, (όπως συμβαίνει στο σύνδρομο αντίστασης στην ινσουλίνη) [59a] είτε εξαιτίας μειωμένου καταβολισμού τους. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την ύπαρξη μιας πηγής τριγλυκεριδίων για τη δράση της CETP. Όταν τα επίπεδα των τριγλυκεριδίων του πλάσματος ξεπεράσουν τα 1.3 mmol/l τότε αρχίζει η ανταλλαγή ουδέτερων λιπιδίων μεταξύ των VLDL και LDL οπότε σχηματίζονται τα LDL-1 και LDL-2. Τα



τριγλυκερίδια του πυρήνα των υποκλασμάτων αυτών αποτελούν υποστρώμα για τη δράση της HL. Όταν η λιπόλυση αυτή συμβαίνει σε άνδρες όπου η ενεργότητα του ενζύμου είναι αυξημένη οδηγεί σε μεγάλη παραγωγή υποκλασμάτων LDL-3. Αντίθετα περιορισμένη είναι η παραγωγή των LDL-3 στις γυναίκες όπου είναι και χαμηλότερη η ενεργότητα του ενζύμου. Το μοντέλο αυτό φαίνεται και στο σχήμα 4, όπου ταυτόχρονα φαίνεται και η επίδραση των διαφόρων υπολιπιδαιμικών φαρμάκων. Από μελέτες που έχουν γίνει έχει παρατηρηθεί ότι παράγοντες οι οποίοι ενεργοποιούν τη δράση του LDL υποδοχέα πιθανώς επάγουν και την κάθαρση των υποκλασμάτων LDL-1 και LDL-2 [60]. Οι φμπράτες το νικοτινικό οξύ καθώς και το «aciripox», φάρμακα τα οποία μειώνουν τα τριγλυκερίδια του πλάσματος μετατοπίζουν τον φαινότυπο από τα μικρά και πυκνά στα μεγαλύτερα και αραιότερα σωματίδια των LDL [61-64]. Η δράση τους περιγράφεται συνοπτικά στο σχήμα 4. Στο βαθμό επίσης, που ο φαινότυπος επηρεάζεται από περιβαλλοντικούς παράγοντες δίαιτα χαμηλής περιεκτικότητας σε λιπαρά σε συνδυασμό με υπολιπιδαιμικά φάρμακα μπορεί να τροποποιήσει έναν φαινότυπο Β προς Α. Υπάρχουν όμως και υπολιπιδαιμικά φάρμακα που ενώ μειώνουν την LDL χοληστερόλη δεν επηρεάζουν το φαινότυπο, όπως πραβαστατίνη [65,66]. Πολλές φορές ένα υπολιπιδαιμικό φάρμακο όπως το gemfibrozil, επιτυγχάνει αλλαγή του φαινότυπου, με αλλαγές της μάζας του αραιού υποκλάσματος, χωρίς να μπορεί να επηρεάσει το μικρό και πυκνό υποκλάσμα. Επίσης σημαντική είναι η δράση των ορμονών. Αν και στις μετεμηνοπαυσιακές γυναίκες ο φαινότυπος Β έχει μεγαλύτερη συχνότητα, χορήγηση οιστρογόνων μείωσε τη μάζα των αραιών και μεγάλων LDL υποκλασμάτων προς τα ενδιάμεσης πυκνότητας [67,68]. Σε δυσλιπιδαιμικές μετεμηνοπαυσιακές γυναίκες χορήγηση οιστρογόνων μείωσε την LDL χοληστερόλη χωρίς να μειώσει τη μάζα του πυκνού LDL υποκλάσματος [69,70]. Κατά συνέπεια η έλλειψη των οιστρογόνων δεν είναι η αιτία εμφάνισης του φαινότυπου Β, αν και η χορήγησή τους είναι ωφέλιμη για τη μείωση της ολικής χοληστερόλης του πλάσματος. Ενδιαφέρον παρουσιάζει και το γεγονός πως η χορήγηση αντισυλληπτικών σε νεαρές γυναίκες αυξάνει τη μάζα του πυκνού υποκλάσματος, πιθανά ενεργοποιώντας τη δραστηριότητα της HL ανεξάρτητα με τις υπόλοιπες λιπιδαιμικές παραμέτρους [70,71]. Επίσης έχει παρατηρηθεί πως κατά το τελευταίο τρίμηνο της εγκυμοσύνης επικρατούν τα πυκνά υποκλάσματα, ενώ μετά τον



τοκετό το προφίλ των υποκλασμάτων της LDL μετατοπίζεται προς τα αραιότερα [70,72]

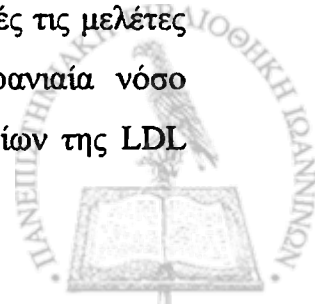


Σχήμα 4. Ρύθμιση της κατανομής των υποκλασμάτων της LDL. Στα περισσότερα άτομα υπάρχουν 3 διακριτά υποκλάσματα. Σε άτομα με χαμηλά επίπεδα τριγλυκεριδίων 0.5-1.3 mmol/L, κυριαρχεί ο φαινότυπος A, (επικρατούν τα LDL-1 και LDL-2), ενώ σε άτομα με υψηλά, φυσιολογικά επίπεδα τριγλυκεριδίων > 1.5 mmol/L, επικρατούν τα μικρά πυκνά LDL-3 υποκλάσματα (φαινότυπος B). Η μετατροπή των LDL-1 και LDL-2 σε LDL-3 γίνεται μέσω της CETP. Ανταλλάσσονται οι εστέρες χοληστερόλης της LDL με τα τριγλυκερίδια των πλούσιων σε τριγλυκερίδια VLDL. Στη συνέχεια με τη δράση της ηπατικής λιπάσης υδρολύονται οι εμπλουτισμένες σε τριγλυκερίδια LDL οδηγώντας στο σχηματισμό των μικρών και πυκνών LDL-3 που έχουν και μικρότερη συγγένεια για τον κλασικό B/E υποδοχέα.

ΠΑΘΟΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ ΤΟΥ ΜΙΚΡΟΥ ΠΥΚΝΟΥ ΥΠΟΚΛΑΣΜΑΤΟΣ ΤΩΝ LDL

Αν και τα επίπεδα LDL πλάσματος είναι ένας αποδεδειγμένος παράγοντας κινδύνου για την ανάπτυξη στεφανιαίας νόσου, για τα ίδια επίπεδα LDL ο καρδιαγγειακός κίνδυνος είναι μεταβλητός. Η αθηρωγόνος δράση της ολικής LDL εξαρτάται από τον τύπο των σωματιδίων που αποτελείται. Ένας μεγάλος αριθμός

μελετών έχει γίνει στις οποίες εξετάστηκε η σχέση μεταξύ της ετερογένειας της LDL και του κινδύνου για την ανάπτυξη στεφανιαίας νόσου. Πιθανότατα η πιο παλιά μελέτη που προσπάθησε με υπερφυγοκέντρηση να δει αν η LDL αποτελείται από ένα ή περισσότερα είδη σωματιδίων είναι αυτή της ομάδας των Fischer et al [73], οι οποίοι σύγκριναν άτομα με πρώιμη αθηρωμάτωση με φυσιολογικά. Τα συμπεράσματα της μελέτης τα οποία όμως δεν είναι στατιστικά σημαντικά, έδειξαν πως η LDL που απομονώθηκε από τα άτομα με την πρώιμη αθηρωμάτωση ήταν ετερογενής (σωματίδια διαφόρων μεγεθών) σε αντίθεση με την LDL των φυσιολογικών η οποία φαινόταν πιο ομοιογενής (σωματίδια ίδιου μεγέθους). Η ετερογενής LDL σχετίστηκε και με τις καταστάσεις υπερτριγλυκεριδαιμίας καθώς και με τη δυσανεξία στη γλυκόζη [55-57]. Σε άλλη μελέτη έγινε σύγκριση του μοριακού βάρους της LDL ανδρών που υποβλήθηκαν σε αγγειογραφία με φυσιολογικούς. Σε 46 άνδρες με στεφανιαία νόσο και στένωση >50% σε μια τουλάχιστον αρτηρία το μοριακό βάρος της LDL ήταν μικρότερο από το αντίστοιχο των φυσιολογικών ($p < 0.001$). Όπως και σε άλλες μελέτες τα επίπεδα της LDL χοληστερόλης και των τριγλυκεριδίων των ασθενών ήταν μεγαλύτερα από αυτά των φυσιολογικών ενώ μικρότερη αντίστοιχα ήταν η συγκέντρωση της HDL χοληστερόλης [53]. Μελέτες του φαινότυπου της LDL (με ηλεκτροφόρηση) σε άνδρες και γυναίκες επιζήσαντες από έμφραγμα του μυοκαρδίου [74-76] έδειξαν ότι ο φαινότυπος B [76] (επικράτηση των μικρών πυκνών σωματιδίων της LDL) σχετίζεται με τριπλάσιο κίνδυνο νέου εμφράγματος. Σε 36 άνδρες επιζήσαντες από έμφραγμα του μυοκαρδίου ηλικίας <45 ετών μελετήθηκε η κατανομή της apo B στην LDL μετά από υποκλασμάτωση βαθμίδωσης πυκνοτήτων [74]. Το 42% της apo B εντοπίστηκε στα πιο πυκνά υποκλάσματα της LDL των ασθενών σε αντίθεση με τους φυσιολογικούς όπου το αντίστοιχο ποσοστό ήταν 35%. Η ομάδα της Campos et al [75] μελέτησε τα υποκλάσματα της LDL με ηλεκτροφόρηση βαθμίδωσης πυκνοτήτων σε 275 άνδρες ηλικίας <60 ετών με στεφανιαία νόσο (με στένωση στεφανιαίας αρτηρίας > 50%) και σε 822 φυσιολογικά άτομα. Οι ασθενείς χωρίστηκαν σε 2 ομάδες ανάλογα με το αν έπαιρναν ή όχι β-blockers (β-αποκλειστές). Το ποσοστό των μικρών και πυκνών σωματιδίων LDL ήταν στατιστικά μεγαλύτερο στους ασθενείς και των δύο ομάδων σε σχέση με τους φυσιολογικούς [75]. Σε όλες αυτές τις μελέτες αλλά και σε πολλές άλλες είναι φανερό πως οι ασθενείς με στεφανιαία νόσο χαρακτηρίζονται από την υπερίσχυση των μικρών και πυκνών σωματιδίων της LDL



ανεξάρτητα με την τεχνική διαχωρισμού των υποκλασμάτων. Επίσης αυξημένα επίπεδα των πυκνών σωματιδίων της LDL συσχετίζονται με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης εμφράγματος του μυοκαρδίου, διαβήτη, συνδυασμένη υπερλιπιδαιμία και οικογενή δυσλιπιδαιμική υπέρταση [54,55,77,78]. Συνεπώς ο θεραπευτικός στόχος για τους ασθενείς αυτούς πρέπει να είναι η μείωση των επιπέδων του πυκνού LDL στο πλάσμα τους [77-85].

Πρόσφατα δεδομένα δείχνουν ότι η χαμηλή συγγένεια του πυκνού υποκλάσματος με τον κλασικό υποδοχέα των LDL, οφείλεται στη διαμόρφωση της από B-100. Σε καλλιέργειες ηπατοκυττάρων της κυτταρικής σειράς U 937 που εκφράζουν έναν μεγάλο αριθμό LDL υποδοχέων μελετήθηκε η συγγένεια και ο καταβολισμός του ενδιάμεσης πυκνότητας σωματιδίου ($d=1.030-1.036$ g/ml) και του μικρού πυκνού LDL [44]. Η σταθερά πρόσδεσης ($K_d=5$ nM) είναι πολύ μεγαλύτερη από την αντίστοιχη σταθερά του πυκνού σωματιδίου ($K_d=7$ nM) και το ίδιο συμβαίνει και με το ρυθμό καταβολισμού που είναι κατά 60% μικρότερος στα πυκνά σωματίδια LDL. Τα μεγάλα και ελαφριά σωματίδια LDL έχουν σταθερά πρόσδεσης και ρυθμό καταβολισμού μεταξύ των αντίστοιχων τιμών που παρουσιάζουν τα ενδιάμεσης πυκνότητας και πυκνά σωματίδια της LDL [44]. Φαίνεται λοιπόν πως στα ενδιάμεσης πυκνότητας σωματίδια LDL η διαμόρφωση της από B-100 είναι η βέλτιστη για την αναγνώριση από τον LDL υποδοχέα. Η υπόθεση αυτή πιστοποιήθηκε και με τη χρήση πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού NMR με ισότοπο τον ^{13}C όπου μετρήθηκε η διαμόρφωση του μικροπεριβάλλοντος των απολήξεων λυσίνης στις περιοχές έκθεσης της από B-100, στην επιφάνεια των διαφόρων υποκλασμάτων [86]. Τα ποσοστά των ενεργών λυσινών ($pK=8.9$) και των φυσικών λυσινών ($pK=10.5$) στην από B-100 των ενδιάμεσης πυκνότητας και πυκνών LDL είναι παρεμφερή με αυτά της ολικής LDL (μείγμα όλων των υποκλασμάτων $d=1.019-1.063$ g/ml) [42]. Χρήση κυκλικού διχρωϊσμού για τη μελέτη της διαμόρφωσης της από B-100 στα διάφορα LDL υποκλάσματα έδειξε ότι το περιεχόμενο σε α-έλικα (~40%) είναι σε όλα τα υποκλάσματα το ίδιο. Τα ευρήματα αυτά δείχνουν ότι η διαμόρφωση της από B-100 και το φορτίο της επιφάνειας καθορίζουν το ρυθμό καταβολισμού των υποκλασμάτων από τον κλασικό υποδοχέα. Όσο πιο αρνητικό φορτίο έχει το σωματίδιο τόσο μικρότερη είναι η ικανότητα σύνδεσής του με τον υποδοχέα.



Μελέτες της ομάδας Campos et al για την ικανότητα πρόσδεσης των υποκλασμάτων της LDL διαφορετικών φαινοτύπων (A,B) έδειξε ότι η σταθερά πρόσδεσης K_d του LDL-2 (ενδιάμεσης πυκνότητας σωματιδίου) είναι παρεμφερής και στους δύο φαινότυπους και μεγαλύτερη από ότι στα άλλα υποκλάσματα [87]. Επίσης μικρότερη κατά 30% είναι η ικανότητα πρόσδεσης του LDL-3 τόσο στον φαινότυπο A όσο και στον φαινότυπο B, συγκριτικά με αυτή του LDL-2 ενώ η σταθερά πρόσδεσης του LDL-1 στον φαινότυπο A είναι πολύ μικρότερη από αυτή του LDL-2 στον ίδιο φαινότυπο και του LDL-1 στον φαινότυπο B. Επώαση του κλασικού LDL υποδοχέα με μονοκλωνικό αντίσωμα που συνδέεται στην περιοχή που αναγνωρίζει την apo E, έδειξε ότι η ικανότητα πρόσδεσης του LDL-1 υποκλάσματος του φαινότυπου B μειώνεται και μάλιστα γίνεται μικρότερη και από αυτή του ίδιου υποκλάσματος στον φαινότυπο A [87]. Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν ότι υπάρχει μεγαλύτερο ποσοστό apo E στο υποκλάσμα LDL-1 του φαινότυπου B. Ο λόγος ύπαρξης της apo E στο υποκλάσμα αυτό του φαινότυπου B δεν είναι γνωστός. Επειδή όμως στα άτομα όπου επικρατούν τα πυκνά LDL υποκλάσματα, τα επίπεδα της IDL είναι υψηλότερα [53,88] είναι πιθανό να υπάρχει μια επικάλυψη λόγω μεγέθους και πυκνότητας των πλούσιων σε apo E σωματιδίων της IDL με τα LDL-1 σωματίδια του B φαινότυπου της LDL. Μπορεί όμως το εύρημα αυτό να είναι αποτέλεσμα των πειραματικών συνθηκών διαχωρισμού των σωματιδίων.

Το 1949 η ομάδα του Faber [89] με αξιοσημείωτη διάραση ανακοίνωσε ότι οι λιποπρωτεΐνες που μεταφέρουν χοληστερόλη συνεντοπίζονται στον έσω χιτώνα των αρτηριών με τις θεϊκές χονδροϊτίνες και η συσσώρευση αυτή οδηγεί στην εξέλιξη της αθηρωματικής βλάβης. Ανοσοχημικές μελέτες επιβεβαίωσαν τον συνεντοπισμό των λιποπρωτεΐνων με τις γλυκοζαμινογλυκάνες (Glycosaminoglycans, GAGs) της εξωκυττάριας ουσίας σε αθηρωματικές πλάκες τόσο σε ανθρώπους όσο και σε πειραματόζωα [90,91]. Η αλληλεπίδραση των apo B λιποπρωτεϊνών με τις GAGs γίνεται με ιοντικούς δεσμούς μεταξύ των αρνητικών θεϊκών ομάδων των GAGs και των θετικά φορτισμένων λυσινών και αργινινών της apo B [92-95]. Επιπλέον τα υποκλάσματα των LDL τα οποία έχουν μεγάλο μέσο όρο rI και τα οποία έχουν περισσότερα θετικά φορτία έχουν και τη μεγαλύτερη συγγένεια με τις πρωτεογλυκάνες (proteoglycans, PGs) του αρτηριακού τοιχώματος [96]. Ο αριθμός των παράπλευρων αλυσίδων αργινίνης, λυσίνης, γλουταμίνης, ασπαραγίνης, και ιστιδίνης της apo B-100

καθορίζει και την τιμή ρI των λιποπρωτεϊνικών σωματιδίων. Το φορτίο επιφανείας των λιποπρωτεϊνών επηρεάζεται επίσης και από τις O- και N- σιαλο ομάδες που υπάρχουν και μπορούν να αλληλεπιδράσουν με τις PGs του αρτηριακού τοιχώματος τόσο *in vitro* όσο και *in vivo* [97-99]. Όσο μικραίνουν σε μέγεθος τα σωματίδια VLDL και LDL τόσο η απο B-100 γίνεται καλύτερος υποκαταστάτης για τις πρωτεογλυκάνες επειδή αλλάζει η διαμόρφωσή της και περισσότερες θετικές περιοχές εκτίθενται στην επιφάνειά της [100-102]. Η βερσικάνη (πρωτεογλυκάνη θεικής χονδροϊτίνης) του αρτηριακού τοιχώματος έχει τη μεγαλύτερη συγγένεια για τα πυκνά σωματίδια LDL. Τα σωματίδια αυτά έχουν τη μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε απο B-100 και τη μικρότερη σε φωσφολιπίδια και ελεύθερη χοληστερόλη στη μονοστοιβάδα της επιφανείας τους, επιπλέον είναι περισσότερο βασικά αφού έχουν μεγαλύτερη τιμή ρI . Τα σωματίδια αυτά όταν συνδέονται με τη βερσικάνη, εμφανίζουν μεγαλύτερο ρυθμό πρόσληψης και καταβολισμού από τα ανθρώπινα μακροφάγα συγκριτικά με τα ελαφριά LDL υποκλάσματα. Επειδή οι περιοχές στην επιφάνεια των πυκνών LDL που καλύπτονται από φωσφολιπίδια και χοληστερόλη, είναι μικρότερες σε σχέση με τα άλλα σωματίδια της LDL, οι θετικές περιοχές δέσμευσης της απο B με PGs είναι περισσότερες [102].

Συνοψίζοντας λοιπόν, τα μικρά και πυκνά σωματίδια της LDL είναι και τα πλέον αθηρωγόνα. Εξαιτίας της χαμηλής συγγένειας τους με τον LDL υποδοχέα έχουν μεγάλο χρόνο ημίσειας ζωής στο πλάσμα [44,103]. *In vivo* και *in vitro* μελέτες έχουν δείξει πως η είσοδος των λιποπρωτεϊνικών σωματιδίων στον υπενδοθηλιακό χώρο είναι αντιστρόφως ανάλογη του μεγέθους τους, και για το λόγο αυτό η συγκέντρωση των μικρών και πυκνών σωματιδίων της LDL στο αρτηριακό τοίχωμα είναι αυξημένη. Μόλις περάσουν τον υπενδοθηλιακό φραγμό τα μικρά και πυκνά LDL σωματίδια κατακρατούνται από πρωτεογλυκάνες της εξωκυττάριας ουσίας [104,105]. Έτσι παραμένουν για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα στο αρτηριακό τοίχωμα και κατά συνέπεια υφίστανται μεγαλύτερης διάρκειας οξειδωτικό stress σε σχέση με τα άλλα σωματίδια της LDL. Η ιδιότητα αυτή σε συνδυασμό με την αυξημένη τάση για οξείδωση τα καθιστά περισσότερο αθηρωγόνα σε σχέση με τα μεγάλης και ενδιάμεσης πυκνότητας σωματίδια της LDL [106-110]. Τα τροποποιημένα σωματίδια της LDL τα οποία έχουν υποστεί οξείδωση από κύτταρα είτε από ιόντα δισθενών μετάλλων είτε από τη δράση ελευθέρων ριζών οξυγόνου καταβολίζονται από τα μακροφάγα με

αποτέλεσμα το σχηματισμό των αφρωδών κυττάρων [70,82,111]. Τα κύτταρα αυτά είναι συστατικά των ευπαθών και πλούσιων σε λιπίδια αθηρωματικών πλακών και παράγουν ένα πλήθος παραγόντων με προαθηρωγόνες, προφλεγμονώδεις και προθρομβωτικές ιδιότητες [111].

ΔΙΑΤΑΡΑΧΕΣ ΤΟΥ ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΥ ΤΩΝ ΛΙΠΟΠΡΩΤΕΪΝΩΝ

Οι διαταραχές του μεταβολισμού και των επιπέδων των λιπιδίων στο πλάσμα, είναι γνωστές ως υπέρ, ή υπολιποπρωτεϊναιμίες. Οι υπερλιποπρωτεϊναιμίες χαρακτηρίζονται από την αύξηση της συγκέντρωσης στο πλάσμα των λιποπρωτεϊνών που περιέχουν apo B, δηλαδή των LDL των VLDL και των χυλομικρών. Οι υπολιποπρωτεϊναιμίες αντίθετα χαρακτηρίζονται από μείωση της συγκέντρωσης των λιποπρωτεϊνών στο πλάσμα. Είναι σπάνιες και συνήθως είναι κληρονομικές μεταβολικές παθήσεις. Οι πιο γνωστές είναι η αθηταλιποπρωτεϊναιμία όπου υπάρχει αναπαρκής βιοσύνθεση της apo B και λείπουν από το πλάσμα τα χυλομικρά η VLDL και η LDL, και η νόσος του Tangier όπου υπάρχει έλλειψη της HDL στο πλάσμα. Από την άλλη η αύξηση της συγκέντρωσης των λιποπρωτεϊνών στο πλάσμα προκαλείται από αύξηση της ταχύτητας με την οποία οι λιποπρωτεΐνες βιοσυντίθενται (υπερπαραγωγή) ή από μείωση της ταχύτητας καταβολισμού τους. Οι υπερλιποπρωτεϊναιμίες έχουν άμεση επίδραση στη φυσιολογική λειτουργία του αγγειακού τοιχώματος, προκαλώντας αύξηση της διαπερατότητας του ενδοθηλίου, αύξηση της ταχύτητας αντιγραφής του DNA των ενδοθηλιακών και λείων μυϊκών κυττάρων, ενώ έχει θετική επίδραση στην προσκόλληση των μονοκυττάρων και στο σχηματισμό των αφρωδών κυττάρων. Οι υπερλιποπρωτεϊναιμίες διακρίνονται σε πρωτοπαθείς (συγγενείς) και σε δευτεροπαθείς. Οι δευτεροπαθείς παρουσιάζονται ως επιλοκές κάποιας άλλης μεταβολικής διαταραχής όπως ο διαβήτης, ο υποθυροειδισμός, ο αλκοολισμός και άλλα. Οι πρωτοπαθείς υπερλιποπρωτεϊναιμίες ανάλογα με την λιποπρωτεϊνική τάξη που υφίσταται τη διαταραχή έχουν ταξινομηθεί από την Παγκόσμια Οργάνωση Υγείας (WHO), σε 5 τύπους που συμβολίζονται με λατινικούς αριθμούς I-V (Fredrickson). Η ταξινόμηση αυτή είναι η περιγραφή του λιποπρωτεϊνικού διαγράμματος στο πλάσμα χωρίς να λαμβάνεται υπόψη η συγκέντρωση των HDL και των απολιποπρωτεϊνών (πίνακας 1).



Πίνακας.1. Ταξινόμηση των υπερλιποπρωτεϊναιμιών κατά Fredrickson

Τύπος	CM	VLDL	LDL	Χοληστερόλη	Τριγλυκερίδια
I	↑	N	N	N	↑↑
IIa	-	N	↑↑	↑↑	N↑
IIb	-	↑	↑	↑	↑
III	-	Αδρή ζώνη β		↑	↑
IV	-	↑	N	N(↑)	↑
V	↑	↑	N	N(↑)	↑↑

Οι κυριότερες πρωτοπαθείς υπερλιπιδαιμίες είναι οι εξής:

Οικογενής δυσ-β-λιποπρωτεϊναιμία

Η οικογενής δυσ-β-λιποπρωτεϊναιμία είναι μια διαταραχή που οφείλεται σε ελλατωμένη συγγένεια της apo E με τον υποδοχέα. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα στο πλάσμα των ασθενών που εμφανίζουν τη διαταραχή αυτή να υπάρχει αύξηση των επιπέδων της IDL και των κατάλοιπων των χυλομικρών με αποτέλεσμα την αύξηση της συγκέντρωσης της χοληστερόλης και των τριγλυκερίδιων. Χαρακτηρίζεται κλινικά από την εναπόθεση λίπους στις πτυχές της παλάμης και την εμφάνιση οζωδών ξανθωμάτων στο δέρμα στις περιοχές που υπάρχουν οστικές προεξοχές.

Οικογενής χυλομικροναϊμία

Υπάρχουν δύο διαφορετικές διαταραχές που οδηγούν στην εμφάνιση αυτής της υπερλιποπρωτεϊναιμίας. Η πρώτη είναι η έλλειψη της LPL και η δεύτερη η έλλειψη της apo C-II που παίζει το ρόλο συνενζύμου της LPL. Και οι δύο έχουν ως συνέπεια την αδυναμία αποικοδόμησης των χυλομικρών και την αύξησή τους στο πλάσμα. Οι ασθενείς αυτοί εμφανίζουν ξανθώματα, παγκρεατίτιδα και κάποιες φορές ηπατοσπληνομεγαλία. Η υπερτριγλυκεριδαιμία των ασθενών αυτών ελέγχεται με δίαιτα φτωχή σε λιπίδια και με τη λήψη τροφών που περιέχουν τριγλυκερίδια με μικρού και

μεσαίου μεγέθους λιπαρές αλυσίδες, οι οποίες μεταβολίζονται στο ήπαρ και δε σχηματίζουν χυλομικρά.

Οικογενής υπερτριγλυκεριδαιμία

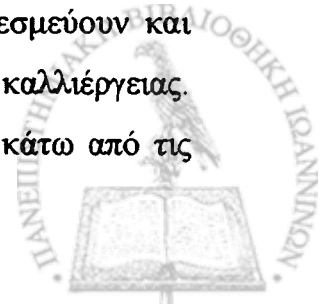
Χαρακτηρίζεται από την αυξημένη βιοσύνθεση τριγλυκεριδίων στο ήπαρ με αποτέλεσμα την αυξημένη έκκρισή τους με τη μορφή VLDL στο πλάσμα. Η αυξημένη VLDL παρεμποδίζει την αποικοδόμηση των χυλομικρών με αποτέλεσμα την πιθανή εμφάνιση χυλομικροναϊμίας. Η υπερτριγλυκεριδαιμία είναι συχνά ασυμπτωματική και δεν αποτελεί παράγοντα κινδύνου για τη στεφανιαία νόσο. Συχνά όμως συνοδεύεται από μείωση της HDL και σε συνδυασμό με τη μικρή αύξηση της χοληστερόλης που οφείλεται στην αύξηση της VLDL, οι ασθενείς αυτοί διατρέχουν μεγαλύτερο κίνδυνο για εμφάνιση στεφανιαίας νόσου συγκριτικά με τους φυσιολογικούς.

Οικογενής υπερχοληστερολαιμία

Παθοφυσιολογία της νόσου

Η οικογενής υπερχοληστερολαιμία (Familial hypercholesterolaemia, FH) είναι η πιο συχνή διαταραχή του μεταβολισμού των λιποπρωτεϊνών που οδηγεί στην πρώιμη εμφάνιση στεφανιαίας νόσου. Χαρακτηρίζεται από την έλλειψη των κλασικών υποδοχέων της LDL. Με χρήση αναλυτικής υπερφυγοκέντρωσης δείχτηκε ότι τα υψηλά επίπεδα χοληστερόλης στους ασθενείς αυτούς οφείλονται σε αύξηση των επιπέδων της LDL. Το 1972 οι Langer et al [112] πιστοποίησαν ότι η βασική διαταραχή είναι ο μειωμένος καταβολισμός της LDL. Αργότερα μελέτες των Goldstein and Brown σε καλλιέργειες ινοβλαστών έδειξαν ότι ο μικρός ρυθμός καταβολισμού της LDL σε άτομα με FH οφείλεται σε αδυναμία έκφρασης του κλασικού υποδοχέα της LDL [112-114]. Για το εύρημά τους αυτό καθώς και για τη μετέπειτα δουλειά τους πάνω στον LDL υποδοχέα, οι ερευνητές αυτοί τιμήθηκαν το 1985 με το βραβείο Nobel στην Ιατρική.

Φυσιολογικοί ινοβλάστες σε καλλιέργεια χωρίς εξωτερική πηγή χοληστερόλης, παράγουν υποδοχείς στην επιφάνειά τους, οι οποίοι δεσμεύουν και καταβολίζουν την LDL που προστίθεται εξωγενώς στο μέσο της καλλιέργειας. Αντίθετα οι ινοβλάστες ομοζυγωτών FH ασθενών που καλλιεργούνται κάτω από τις



ίδιες συνθήκες δεν μπορούν να καταβολίσουν την LDL ενώ οι ινοβλάστες των ετεροζυγωτών, καταβολίζουν τη μισή περίπου ποσότητα από αυτή που καταβολίζεται στα φυσιολογικά άτομα [115,116]. Μελέτες σε ινοβλάστες ομοζυγωτών έδειξαν ότι υπάρχουν δύο διαταραχές [117]. Στην πρώτη όπου δεν υπάρχει πρόσδεση της LDL στον υποδοχέα τα άτομα χαρακτηρίζονται ως R^{b0} , (αρνητικός υποδοχέας) ενώ η πιο συχνή περίπτωση είναι να δεσμεύεται η LDL αλλά με χαμηλή συγγένεια για τον υποδοχέα. Η διαταραχή αυτή χαρακτηρίζεται ως «ελαττωματικός υποδοχέας», R^b . Υπάρχει και ένας πολύ μικρός αριθμός ομοζυγωτών που δεσμεύει φυσιολογικά την LDL αλλά αδυνατεί να την καταβολίσει (συνδυασμός υποδοχέα, R^{b+} , i^0 [118]. Οι μεταλλάξεις που οδηγούν σε R^{b0} ή R^b υποδοχέα μελετήθηκαν αφότου έγινε γνωστή η αλληλουχία του γονιδίου που εκφράζει τον LDL υποδοχέα και αναπτύχθηκε η μεθοδολογία για την απομόνωσή του, τη μελέτη της μετανάστευσής του στην επιφάνεια του κυττάρου και την ανακύκλωσή του [119,120]. Υπάρχουν περίπου 100 μεταλλάξεις που οδηγούν στο κλινικό σύνδρομο της FH, και μπορούν να ταξινομηθούν σε 4 κατηγορίες.

1. Μεταλλάξεις που επηρεάζουν τη σύνθεση του υποδοχέα.
2. Μεταλλάξεις που επηρεάζουν τη μεταφορά του από το ενδοπλασματικό δίκτυο στο σύμπλεγμα Golgi.
3. Μεταλλάξεις που επηρεάζουν τη δέσμευση της LDL στον υποδοχέα
4. Μεταλλάξεις στις οποίες η LDL δεσμεύεται κανονικά στο εξωκυττάριο τμήμα του υποδοχέα όμως εξαιτίας διαταραχής που υπάρχει στο ενδοκυττάριο τμήμα του, δεν γίνεται η εγκόλπωση και η ενδοκύττωση της LDL με αποτέλεσμα τον ατελή καταβολισμό της.

Πειράματα ραδιοσημασμένης LDL με ^{125}I ή ^{131}I έδειξαν ότι ο χρόνος ημιζωής της στα φυσιολογικά άτομα είναι 2-3 μέρες, ενώ στους ετεροζυγώτες FH φαίνεται να παρατείνεται κατά 2 μέρες, εξαιτίας του μειωμένου καταβολισμού της [121,122]. Επιπλέον ο ρυθμός βιοσύνθεσης της apo B της LDL στα φυσιολογικά άτομα είναι 10mg/Kg βάρους ανά ημέρα, [123] στους ομοζυγώτες FH η παραγόμενη ποσότητα apo B διπλασιάζεται, ενώ στους ετεροζυγώτες η αύξηση είναι περίπου 30%.



Κλινικά συμπτώματα

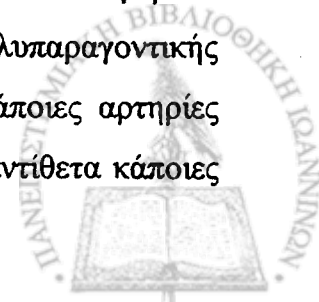
Η πρωτοπαθής οικογενής υπερχοληστερολαιμία κληρονομείται με μονογονικό επικρατούντα χαρακτήρα. Η ετερόζυγη μορφή είναι η πιο συχνή γενετική νόσος, με συχνότητα εμφάνισης 1:500 ενώ η ομόζυγη μορφή εμφανίζεται με συχνότητα 1:1.000.000. Η διάγνωση θεωρείται βέβαια όταν εκτός από αυξημένα επίπεδα LDL στο πλάσμα, ο ασθενής εμφανίζει και τενόντια ξανθώματα, τα οποία αποτελούν εντοπισμένο διήθημα από αφρώδη κυττάρια. Τα ξανθώματα είναι πιο συνηθισμένα στους Αχιλλείους τένοντες και αρκετά συχνά στην κνήμη, στην περιοχή πρόσφυσης του επιγονάτιου τένοντα και στους εκτατικούς μύς των δακτύλων των χεριών.

Όπως έχει διαπιστωθεί στην ετερόζυγη μορφή της FH, οι κλινικές εκδηλώσεις της στεφανιαίας νόσου αρχίζουν μετά τη δεύτερη δεκαετία της ζωής. Το 50% των ανδρών και το 15% των γυναικών αποβιώνουν μέχρι το εξηκοστό έτος. Στην ομόζυγη μορφή της FH που είναι και η πιο σοβαρή, η στεφανιαία νόσος εκδηλώνεται στην παιδική ηλικία. Ο θάνατος οφείλεται σε έμφραγμα του μυοκαρδίου και το επεισόδιο συμβαίνει πριν την ηλικία των 30 [124]. Εκτός από την καρδιαγγειακή νόσο τα άτομα με FH εμφανίζουν εκτεταμένη αθηρωμάτωση στην αορτή ενώ είναι λιγότερο σπάνια η πιθανότητα εμφάνισης αθηρωμάτωσης σε άλλες αρτηρίες, χωρίς να είναι γνωστό το γιατί [125,126]. Τα άτομα με FH εμφανίζουν επίσης δευτεροπαθή υπέρταση, πολυαρθρίτιδα και κάποιες φορές παχυσαρκία, στην οποία παρατηρούνται υπερβολικά αυξημένα επίπεδα χοληστερόλης του ορού [127,128]. Επίσης οι ασθενείς με FH έχουν υψηλά επίπεδα Lp(a) στον ορό τους.

ΑΘΗΡΩΜΑΤΩΣΗ

Εισαγωγή

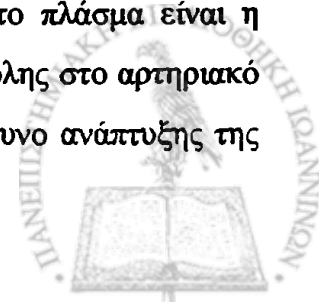
Η αθηρωμάτωση είναι μια πολύ συνηθισμένη νόσος στις χώρες που ακολουθούν δυτικό τρόπο ζωής. Περίπου το 50% των ατόμων που ακολουθεί το μοντέλο, αυτό πεθαίνουν από έμφραγμα του μυοκαρδίου. Η αθηρωσκλήρωση είναι γνωστή από πολύ παλιά αφού έχει βρεθεί και στις μούμιες των αιγυπτιακών φαραώ. Πρόκειται για μια χρόνια φλεγμονώδη νόσο των αρτηριών πολυπαραγοντικής αιτιολογίας. Η κατανομή της νόσου δεν είναι ομοιόμορφη αφού κάποιες αρτηρίες προσβάλλονται σπάνια όπως οι καρωτίδες και οι έσω μαστικές, ενώ αντίθετα κάποιες



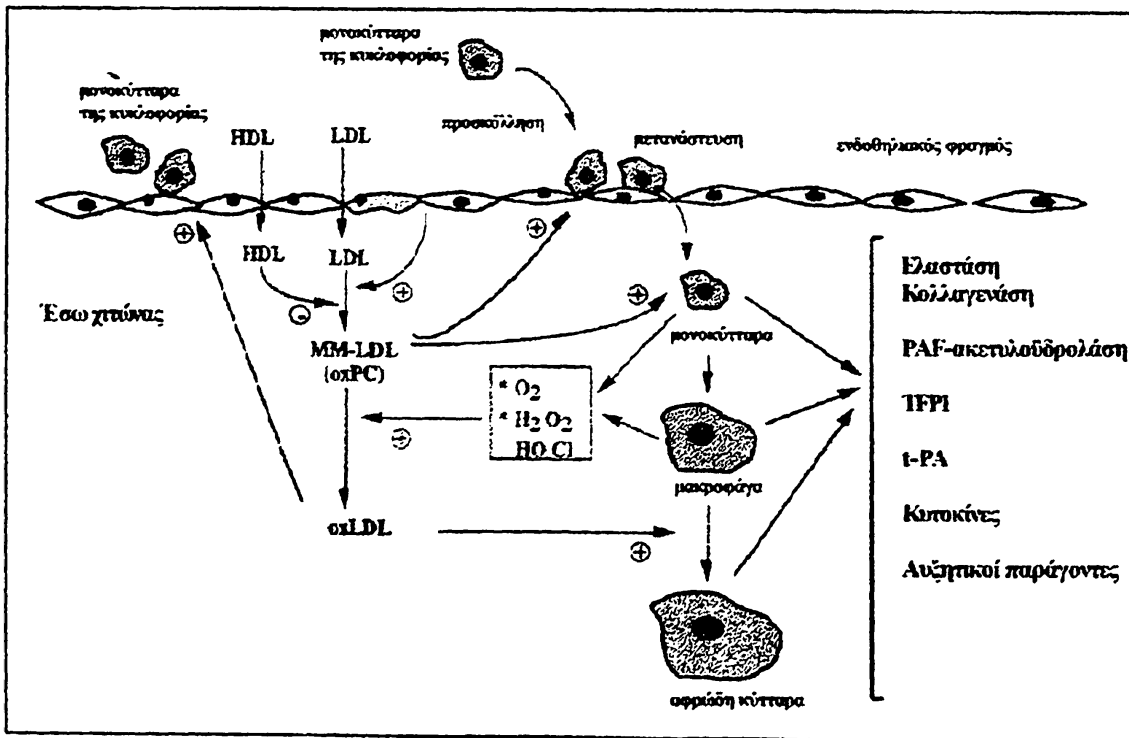
άλλες όπως οι στεφανιαίες είναι υψηλού κινδύνου. Είναι εστιακή νόσος του έσω χιτώνα των αρτηριών με μεγάλη εξωτερική διάμετρο (ρίζα της αορτής) ως πολύ μικρή διάμετρο (μέχρι 3 mm). Η αθηρωσκλήρωση είναι το αποτέλεσμα της αλληλεπίδρασης των συστατικών του αίματος, της διαταραχής στη ροή του καθώς και διαταραχών του αγγειακού τοιχώματος. Χαρακτηρίζεται από την ύπαρξη χρόνιας φλεγμονής, η οποία συνοδεύεται από αυξημένη διαπερατότητα του ενδοθηλίου, ενεργοποίηση του ενδοθηλίου και ενεργοποίηση των μονοκυττάρων. Επίσης στις αθηρωματικές πλάκες παρατηρείται ανάπτυξη, με πολλαπλασιασμό και μετανάστευση των λείων μυικών κυττάρων, σύνθεση μεσοκυττάριας ουσίας, συσσώρευση λιπιδίων, νέκρωση που πιθανώς οφείλεται στην κυτταροτοξική δράση των οξειδωμένων λιπιδίων, αποτιάνωση και οστεοποίηση καθώς και θρόμβωση με συσσώρευση αιμοπεταλίων και σχηματισμό ινώδους. Στα πρώτα στάδια της αθηρωγένεσης συμμετέχουν επίσης διάφοροι θρομβωτικοί παράγοντες, χωρίς όμως να δημιουργείται θρόμβος τέτοιος που να παρεμποδίζει τη ροή του αίματος. Αυτό όμως μπορεί να συμβεί στα επόμενα στάδια της αθηρωγένεσης όταν πια έχουν σχηματιστεί «ώριμες» πλάκες όπου εκεί η θρόμβωση θεωρείται επιλοκή παρά συνέχεια της αθηροσκληρωτικής διαδικασίας. Υπάρχουν δύο είδη αθηρωματικών πλακών, οι ασταθείς και πλούσιες σε λιπίδια και οι σταθερές, οι οποίες είναι πλούσιες σε κολλαγόνο και ινώδη ιστό. Οι πλάκες σταθεροποιούνται και προστατεύονται από τη ρήξη με μια κάλυψη από ινική κάψα. Η ρήξη της ασταθούς πλάκας και ο σχηματισμός θρόμβου σε στεφανιαία αγγεία αποτελεί τη μεγαλύτερη και την επικινδυνότερη επιλοκή της αθηρωμάτωσης. Ο κίνδυνος για τη ρήξη της πλάκας εξαρτάται από την σύσταση και κατά συνέπεια τη θραυστότητά της και λιγότερο από το βαθμό στένωσης (μέγεθος της πλάκας). Οι κυριότεροι παράγοντες που επηρεάζουν τη θραυστότητα της πλάκας είναι το μέγεθος και η σταθερότητα του λιπιδαιμικού πυρήνα, το πάχος της κάψας που καλύπτει τον πυρήνα αυτό καθώς και η ένταση των φλεγμονοδών αντιδράσεων που γίνονται μέσα στην κάψα [129-140].

Ο ρόλος των οξειδωμένων λιποπρωτεϊνών στην αθηρωμάτωση

Είναι γνωστό πως ο κυριότερος φορέας χοληστερόλης στο πλάσμα είναι η LDL, η οποία είναι υπεύθυνη και για την εναπόθεση της χοληστερόλης στο αρτηριακό τοίχωμα. Αυξημένα επίπεδα LDL συσχετίζονται με αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης της



αθηρωσκλήρωσης. Υπάρχουν πλέον ερευνητικά δεδομένα τα οποία επιβεβαιώνουν πως η LDL περνά το ενδοθηλιακό τοίχωμα οξειδώνεται *in vivo* και η οξειδωμένη μορφή της εμπλέκεται στη δημιουργία των πρώιμων αθηρωσκληρωτικών βλαβών [141-143]. Έχει βρεθεί πως η οξειδωμένη μορφή της LDL (ox-LDL) έχει χημειοτακτικές ιδιότητες και όταν είναι παρούσα στον έσω χιτώνα των αρτηριών προκαλεί τη μετανάστευση των μονοκυττάρων του αίματος τα οποία στη συνέχεια μετατρέπονται σε μακροφάγα. Τα μακροφάγα προσλαμβάνουν την ox-LDL με μηχανισμό που δεν εμφανίζει κορεσμό και δημιουργούν τα πλούσια σε λιπίδια αφρώδη κύτταρα. Επιπλέον η ox-LDL είναι κυτταροτοξική και θεωρείται υπεύθυνη για τη βλάβη του ενδοθηλίου. Επίσης διεγείρει τον πολλαπλασιασμό και τη μετανάστευση των λείων μυικών κυττάρων [141], σχήμα 5.

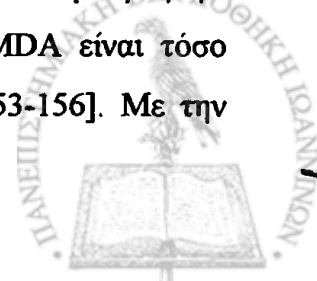


Σχήμα 1.5. Ο ρόλος της ox-LDL στην ανάπτυξη της αθηρωμάτωσης

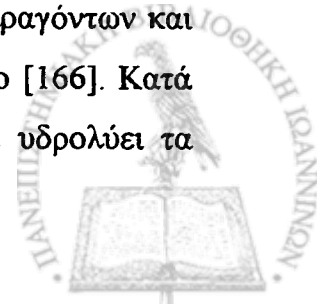
Οι πρώιμες αθηρωσκληρωτικές βλάβες χαρακτηρίζονται από μεγάλο αριθμό αφρώδων κυττάρων τα οποία είναι πλούσια σε εστέρες χοληστερόλης. Οι εστέρες της χοληστερόλης στο κυτόπλασμα των μακροφάγων φαίνονται σαν σταγονίδια λίπους και δίνουν στα κύτταρα αυτά στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο την αφρώδη όψη από την οποία παίρνουν και το όνομά τους [144-148]. Τα αφρώδη κύτταρα προέρχονται



κυρίως από μονοκύτταρα-μακροφάγα και δευτερευόντως από λεία μυϊκά κύτταρα (Smooth muscle cells, SMC) [149]. Η φυσική LDL δεν προσλαμβάνεται από τα μακροφάγα και σε καλλιέργειες όπου τα μακροφάγα επώαστηκαν για μεγάλα χρονικά διαστήματα με υψηλές συγκεντρώσεις LDL δεν παρατηρήθηκε συσσώρευση εστέρων χοληστερόλης στο κυτόπλασμα τους ούτε και μετατροπή τους σε αφρώδη κύτταρα [150]. Η πρόσληψη της φυσικής LDL γίνεται μόνο μέσω του κλασικού B/E υποδοχέα και ρυθμίζεται από τα επίπεδα της ενδοκυττάριας χοληστερόλης [150,151]. Αντίθετα η ox-LDL ή άλλες τροποποιημένες μορφές της LDL προσλαμβάνονται από τον υποδοχέα εκκαθαριστή που εκφράζεται στα μακροφάγα και δεν υπόκειται σε ρύθμιση από τα ενδοκυττάρια επίπεδα της χοληστερόλης. Ο υποδοχέας εκκαθαριστής ανακαλύφθηκε σε πειράματα κατά τα οποία χρησιμοποιήθηκε μια τροποποιημένη μορφή της LDL, η ακετυλιωμένη LDL. Κατεργασία της LDL με οξεικό ανυδρίτη οδηγεί στη ακετυλίωση των ε-αμινομάδων των λυσινών, του πρωτεϊνικού τμήματος της LDL με αποτέλεσμα να αυξάνει το ηλεκτραρνητικά φορτισμένο τμήμα του σωματιδίου. Ο κλασικός LDL υποδοχέας αναγνωρίζει μια θετικά φορτισμένη περιοχή της apo B-100 που δημιουργείται από απολήξεις λυσίνης, αργινίνης και ιστιδίνης. Όταν για οποιοδήποτε λόγο η περιοχή αυτή τροποποιηθεί, η αναγνώριση της LDL από τον υποδοχέα μειώνεται ή χάνεται τελείως [151]. Από την άλλη μεριά ο υποδοχέας εκκαθαριστής φαίνεται να αναγνωρίζει αρνητικά φορτισμένες περιοχές της apo B-100 και τεχνητή αύξηση του αρνητικού φορτίου επιφανείας με χημικές τροποποιήσεις συνήθως οδηγεί σε αυξημένη αναγνώριση της LDL και ανεξέλεγκτη πρόσληψη χοληστερόλης από τον υποδοχέα αυτό [152]. Τροποποιημένες LDL που αναγνωρίζονται από τον υποδοχέα εκκαθαριστή είναι αυτές που προκύπτουν με ακετυλίωση, με ακετοακετυλίωση, με καρβαμυλίωση καθώς και με κατεργασία με γλουταραλδεύδη [153,154]. Όλες αυτές οι κατεργασίες αποσκοπούν στην τροποποίηση των ελεύθερων αμινομάδων της apo B-100, όμως καμία από αυτές δεν συμβαίνει *in vivo*. Το 1980 η ομάδα του Fogelman [154] πρότεινε ως πιθανή βιολογική τροποποίηση της LDL *in vivo*, την αλληλεπίδρασή της με μηλονική διαλδεύδη (malonaldehyde, MDA) η οποία παράγεται από τα φλεγμονώδη κύτταρα σε περιοχές αρτηριακής βλάβης. Τροποποίηση *in vitro* της LDL με MDA, οδηγεί σε μακροφάγα πλούσια σε χοληστερόλη, όμως οι απαιτούμενες συγκεντρώσεις MDA είναι τόσο μεγάλες (10-100mM) που είναι απίθανο να παράγονται *in vivo* [153-156]. Με την



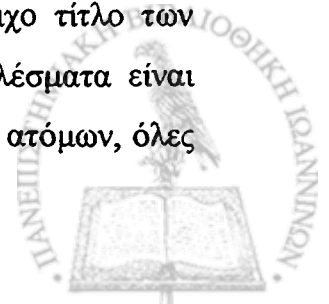
ανακάλυψη ότι τα κύτταρα του αγγειακού συστήματος μπορούν να επάγουν την υπεροξειδωση των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων στο σωματίδιο της LDL, φαίνεται πλέον πολύ πιθανό πως δραστικές αλδεύδες όπως και η MDA δημιουργούνται πάνω στο σωματίδιο της LDL και αλληλεπιδρούν με γειτονικές αμινομάδες καθώς επίσης και με υδροξυλομάδες ή σουλφιδρυλομάδες της πολυπεπτιδικής αλυσίδας της apo B-100. Η υπεροξειδωση των λιπαρών οξέων της LDL συνοδεύεται από εκτεταμένη διάσπαση της apo B-100 σε μικρότερα πεπτίδια [157-159], τα οποία μαζί με τις παραγόμενες αλδεύδες συνδέονται ομοιοπολικά και δημιουργούν νέους επίτοπους πάνω στην πρωτεΐνη οι οποίοι αναγνωρίζονται μόνο από τον υποδοχέα εκκαθαριστή. Η ox-LDL είναι τοξική για τα ενδοθηλιακά και τα λεία μυϊκά κύτταρα καθώς και για τους ινοβλάστες. Έχει αποδειχθεί ότι υπεύθυνο για την τοξική αυτή δράση είναι το λιπιδιακό και όχι το πρωτεϊνικό περιεχόμενο της ox-LDL [160]. Χημική τροποποίηση της LDL *in vitro*, με 4-υδροξυνονενάλη (4-hydroxynonenal, HNE), που έχει τα ίδια τοξικά χαρακτηριστικά με την ox-LDL [161] οδηγεί σε αναστολή της ανάπτυξης ινοβλαστών σε καλλιέργεια. Τα αποτελέσματα της κυτταροτοξικότητας της LDL είναι πιο έντονα στη φάση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού [162,163]. Είναι λοιπόν πιθανό η LDL *in vivo* να προκαλεί λύση των κυττάρων του αγγειακού τοιχώματος και ιδιαίτερα των αφρωδών κυττάρων. Το γεγονός αυτό μπορεί να είναι υπεύθυνο για το σχηματισμό του νεκρωτικού πυρήνα που περιβάλλεται από κυτταρικά θραύσματα και λιπίδια, και είναι χαρακτηριστικό των προχωρημένων αθηρωματικών βλαβών. Μελέτη από την ομάδα του Kaneko et al [164] για την κυτταροτοξικότητα και την αναστολή της ανάπτυξης των ενδοθηλιακών κυττάρων και των ινοβλαστών σε καλλιέργεια κάτω από την επίδραση προϊόντων υπεροξειδωσης λιπιδίων, έδειξε πως τα πιο τοξικά παράγωγα είναι τα 2,4-αλκαδιένια καθώς και η 4-HNE που μειώνουν κατά 50% τον πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων σε συγκεντρώσεις 10-25 μM . Τα λιποϋπεροξειδία του λινελαϊκού οξέος έχουν παρόμοια τοξικότητα [164,165]. Στις αλδεύδες η τοξικότητα αυξάνει καθώς αυξάνει το μέγεθος της λιπαρής ομάδας, δηλαδή όσο πιο λιπόφιλο είναι το μόριο. Στην ox-LDL υπάρχουν επίσης λυσοφωσφολιπίδια τα οποία έχουν τοξική δράση στα κύτταρα όπως π.χ η αναστολή της αντλίας K^+/Na^+ . Η κυτταροτοξικότητα επομένως της ox-LDL είναι αποτέλεσμα πολλών παραγόντων και το ίδιο συμβαίνει και με το χημειοτακτισμό που εμφανίζει το σωματίδιο [166]. Κατά την οξειδωση της LDL ενεργοποιείται μια φωσφολιπάση A_2 η οποία υδρολύει τα



ενδογενή οξειδωμένα φωσφολιπίδια της ox-LDL στην sn-2 θέση, παράγοντας οξειδωμένα λιπαρά οξέα και λυσοφωσφολιπίδια. Σε *in vitro* πειράματα αποδείχτηκε ότι τα λυσοφωσφολιπίδια αυτά διεγείρουν το χημειοτακτισμό στα μονοκύτταρα του αίματος [158]. Η υπόθεση πως η ox-LDL παίζει σημαντικό ρόλο στην παθογένεια της αθηροσκλήρωσης επιβεβαιώνεται και από έμμεσες ενδείξεις όπως είναι η εύρεση λιποϋπεροξειδίων στις περιοχές της αθηρωσκληρωτικής βλάβης ο βαθμός υπεροξειδωσης των οποίων σχετίζεται με την έκταση της βλάβης. Επίσης αυξημένα επίπεδα λιποϋπεροξειδίων έχουν βρεθεί στον ορό ασθενών με καρδιαγγειακή νόσο, σε χρόνιους καπνιστές καθώς και σε διαβητικούς [167].

Ο βαθμός οξείδωσης της LDL *in vitro* διαφέρει από άτομο σε άτομο και εξαρτάται από την περιεκτικότητα σε αντιοξειδωτικά, από το μέγεθος και την πυκνότητα της λιποπρωτεΐνης από τη μέθοδο που χρησιμοποιείται για την απομόνωση και οξείδωση της LDL καθώς επίσης και από την περιεκτικότητα του σωματιδίου σε τριγλυκερίδια και πολυακόρεστα λιπαρά οξέα [141]. Επίσης πολλές μελέτες τα τελευταία χρόνια έχουν δείξει πως τα σωματίδια της LDL έχουν διαφορετική ευαισθησία στην οξείδωση. Τα μικρά και πυκνά σωματίδια LDL είναι τα πλέον ευένδωτα στην οξειδωτική τροποποίηση σε σχέση με τα μεγάλα. Η πρώτη μελέτη προς αυτή την κατεύθυνση έγινε από την ομάδα της deGraaf [168], η οποία απομόνωσε 3 υποκλάσματα LDL (LDL-1, LDL-2, LDL-3), από πλάσμα φυσιολογικών ατόμων. Η οξειδωτική τροποποίηση των υποκλασμάτων *in vitro* έγινε με επώαση με ιόντα Cu^{2+} , μέθοδος που περιγράφηκε για πρώτη φορά από την ομάδα του Esterbauer [141]. Τα αποτελέσματα της μελέτης έδειξαν ότι τα μικρά και πυκνά σωματίδια LDL (LDL-3), είναι λιγότερο προστατευμένα από τα μεγάλα και αραιά (LDL-1). Ο λανθάνων χρόνος οξείδωσης των ενδιάμεσης πυκνότητας σωματιδίων (LDL-2) βρέθηκε μεταξύ του χρόνου οξείδωσης των μικρών πυκνών και των μεγάλων αραιών σωματιδίων. Στη μελέτη αυτή μετρήθηκε και η περιεκτικότητα των υποκλασμάτων σε Vit E, η οποία δεν είναι διαφορετική όταν εκφράζεται ανά mg λιποπρωτεϊνικής μάζας, είναι όμως μικρότερη στο μικρό και πυκνό υποκλάσμα LDL όταν εκφράζεται ανα mg πρωτεΐνης [168,169]. Επίσης στατιστικά μεγαλύτερη ήταν η περιεκτικότητα του πυκνού υποκλάσματος LDL σε πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (Polyunsaturated fatty acids, PUFAs) όταν αυτά εκφράζονται ανά mg Vit E. Στη μελέτη της ομάδας αυτής η περιεκτικότητα του LDL-3 σε αραχιδονικό ήταν στατιστικά μεγαλύτερη συγκρινόμενη

με το LDL-2 και το LDL-1. Επίσης τόσο σε αυτή όσο και σε πολλές άλλες μελέτες φαίνεται πως οι διαφορές στη σύσταση των τριών υποκλασμάτων οδηγούν σε διαμορφωτικές αλλαγές των σωματιδίων και πιθανά επηρεάζουν την έκθεση των ενδογενών αντιοξειδωτικών και των PUFA's στις ελεύθερες ρίζες, κατά τη διαδικασία της υπεροξειδωσης [169-171]. Η deGraaf et al παρατήρησαν μια αντιστρόφως ανάλογη σχέση μεταξύ του λανθάνοντος χρόνου και του μεγέθους του υποκλάσματος που οξειδώνεται [170,172-174]. Τα αποτελέσματα της ομάδας της deGraaf επιβεβαιώθηκαν και από την ομάδα του Tribble [175], που μελέτησε την οξειδωτική τροποποίηση 6 υποκλασμάτων LDL. Η ομάδα αυτή παρατήρησε θετική συσχέτιση μεταξύ της περιεκτικότητας σε ελεύθερη χοληστερόλη των υποκλασμάτων (η οποία μειώνεται καθώς αυξάνει η πυκνότητα του υποκλάσματος) και της οξειδωτικής τροποποίησης [175]. Μελέτες που έγιναν τόσο σε ασθενείς με υπερτριγλυκεριδαιμία όσο και σε ασθενείς με συνδυασμένη υπερλιπιδαιμία έδωσαν παρεμφερή αποτελέσματα [169,174,176]. Στην ομάδα των υπερτριγλυκεριδαιμικών έγινε και χορήγηση κλοφιβράτης η οποία αύξησε την περιεκτικότητα σε Vit E, των υποκλασμάτων LDL, άλλαξε την αναλογία αραιών και πυκνών υποκλασμάτων προς την πλευρά των αραιών, και μείωσε την ευαισθησία στην οξειδωτική τροποποίηση όλων των υποκλασμάτων, δείχνοντας πως και ο ρόλος της Vit E είναι σημαντικός. Επίσης έχει μελετηθεί η οξειδωτική τροποποίηση της LDL ατόμων με φαινότυπο A και B. Το μικρό και πυκνό υποκλάσμα του φαινότυπου B βρέθηκε πιο ευένδωτο στην οξειδωτική τροποποίηση από το μεγάλο και αραιό LDL υποκλάσμα του φαινότυπου A [177,178]. Επίσης το πυκνό LDL υποκλάσμα του φαινότυπου B οξειδώνεται πιο γρήγορα από το αντίστοιχο του φαινότυπου A, όμως η διαφορά αυτή δεν αναδεικνύεται όταν χρησιμοποιηθεί ολική LDL. Έτσι η διαφορά στην οξειδωτική τροποποίηση του πυκνού υποκλάσματος LDL μεταξύ των δύο φαινοτύπων αποδώθηκε στη μεγαλύτερη περιεκτικότητα του φαινότυπου B στο υποκλάσμα αυτό. Τόσο στην ομάδα με τον φαινότυπο A όσο και σε αυτή με το φαινότυπο B, ο λανθάνων χρόνος ήταν αντιστρόφως ανάλογος της πυκνότητας του υποκλάσματος [177]. Ενδιαφέρον είναι επίσης το γεγονός, πως σε άτομα με φαινότυπο B, ο τίτλος των αυτοαντισωμάτων (της IgM τάξης) κατά της LDL που έχει τροποποιηθεί με MDA, είναι μεγαλύτερος από τον αντίστοιχο τίτλο των ατόμων με φαινότυπο A [179]. Αν και σε πολλές μελέτες τα αποτελέσματα είναι αντικρουόμενα όταν αναφέρονται σε ομάδες ασθενών και φυσιολογικών ατόμων, όλες



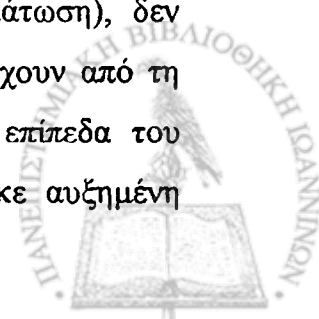
οι μελέτες συμφωνούν στο γεγονός ότι το πιο ευένδωτο στην οξειδωτική τροποποίηση υποκλάσμα είναι το μικρό και πυκνό. Πολλές φορές οι διαφορές των αποτελεσμάτων οφείλονται στον τρόπο παρασκευής των υποκλασμάτων και στη μέθοδο οξείδωσης [180,181], κάτι που θα πρέπει να ληφθεί σοβαρά υπόψη σε προσεχείς μελέτες.

Μηχανισμοί οξείδωσης της LDL

Η οξείδωση της LDL μπορεί να γίνει είτε παρουσία κυττάρων είτε με την επίδραση οξειδοαναγωγικών μετάλλων [182,183]. Πολλά κύτταρα όπως τα μονοκύτταρα τα μακροφάγα τα λεμφοκύτταρα και τα λεία μυϊκά κύτταρα έχουν τη δυνατότητα να οξειδώνουν την LDL *in vitro* [158]. Για την έναρξη της οξείδωσης της LDL απαιτούνται ίχνη οξειδοαναγωγικών μετάλλων όπως ο χαλκός και ο σίδηρος. Ο πλέον πιθανός χώρος που συμβαίνει η οξείδωση *in vivo* είναι το αρτηριακό τοίχωμα και πιο συγκεκριμένα οι περιοχές όπου υπάρχει αθηρωματική βλάβη με αυξημένες συγκεντρώσεις δισθενών οξειδωτικών ιόντων. Η οξείδωση δεν πιστεύεται πως συμβαίνει στο πλάσμα λόγω της μεγάλης περιεκτικότητάς του σε αντιοξειδωτικά [184]. Οι μηχανισμοί οξείδωσης της LDL παρουσία κυττάρων δεν έχουν πλήρως διευκρινιστεί. Η 15-λιποξυγονάση μπορεί και οξειδώνει την LDL *in vitro* και θεωρείται πως μπορεί να συμμετέχει στην οξείδωση της LDL από τα κύτταρα *in vitro* [185]. Οι αναστολείς της λιποξυγονάσης πιθανά να αναστέλλουν ή και να αντιστρέφουν την αθηρωσκλήρωση. Η ομάδα των Sprattow και Olszewski έδειξε πως οι αναγωγικοί αναστολείς της λιποξυγονάσης δρουν ως αντιοξειδωτικά και αναστέλλουν την ενεργότητα της 15-λιποξυγονάσης σε συγκεντρώσεις 100 φορές χαμηλότερες από αυτές που απαιτούνται για την αναστολή της οξείδωσης της LDL [186]. Κάποιοι όμως από τους αναστολείς αυτούς είναι κυτταροτοξικοί σε συγκεντρώσεις μικρότερες από αυτές που απαιτούνται για την οξείδωση της LDL. Επίσης το ανιόν του υπεροξειδίου είναι ένας πιθανός οξειδωτικός παράγοντας για την LDL αφού η δισμουτάση του, αναστέλλει την οξείδωση της LDL από κύτταρα *in vitro*. Όμως το ανιόν του υπεροξειδίου δεν μπορεί να οξειδώσει άμεσα την LDL παρα μόνο μετά την αντίδρασή του με το μονοξείδιο του αζώτου NO. Κατά την αντίδραση αυτή παράγεται το υπεροξυ-νιτρικό ανιόν το οποίο αποικοδομείται προς την ισχυρά οξειδωτική ρίζα υδροξυλίου (OH[•]) [187]. Τα μακροφάγα κατά την ενεργοποίησή τους από ιντερφερόνη

γ ή λιποπολυσακχαρίτες παράγουν NO χωρίς όμως να μπορούν να οξειδώσουν άμεσα την LDL παρά μόνο μετά από κατεργασία τους με το ανάλογο της αργινίνης N-γ-μονομεθυλοαργινίνη (NMMA), η οποία αναστέλλει την σύνθεση του NO [187]. Οι οξειδωμένες μορφές της LDL μετά την επώασή τους με κύτταρα προσλαμβάνονται από τους υποδοχείς εκκαθαριστές και οδηγούν στη δημιουργία αφρωδών κυττάρων και τελικά στο σχηματισμό αθηρωματικής πλάκας, όμως οι μηχανισμοί οξείδωσης παρουσία κυττάρων παραμένουν ακόμη άγνωστοι.

Ο πιο συνηθισμένος τρόπος οξείδωσης της LDL *in vitro* είναι η επώαση της με ιόντα μετάλλων. Ακόμη και σε καλλιέργειες κυττάρων είναι απαραίτητη η προσθήκη εξωγενώς ιόντων χαλκού ή σιδήρου για τροποποιηθεί η LDL [188] και αυτό αποδεικνύεται από το ότι ενώσεις που δημιουργούν χηλικά σύμπλοκα με τα μέταλλα αναστέλλουν την οξείδωση της LDL σε κυτταροκαλλιέργειες [158,163]. Υψηλές συγκεντρώσεις ιόντων μπορούν να οξειδώσουν την LDL και απουσία κυττάρων [158,188], το ίδιο συμβαίνει και με πρωτεΐνες που περιέχουν μέταλλα στο μόριό τους όπως η αίμη και η σερουλοπλασμίνη [189,190]. Ποιος είναι ο ρόλος των εξωκυττάρων μεταλλικών ιόντων στην οξείδωση της LDL είναι ακόμη υπο διερεύνηση. Ελεύθερα όμως ιόντα μετάλλων δεν κυκλοφορούν στο πλάσμα και φαίνεται απίθανο κάτω από φυσιολογικές συνθήκες να υπάρχουν στις αρτηρίες. Η τρανσφερίνη που είναι ο κυριότερος μεταφορέας σιδήρου στο πλάσμα περιέχει άκορεστες θέσεις υψηλής συγγένειας για σίδηρο και χαλκό. Επίσης η αλβουμίνη, η κυριότερη πρωτεΐνη του πλάσματος δεσμεύει τυχόν ελεύθερα ιόντα χαλκού, και ακόμη και σε χαμηλές συγκεντρώσεις αναστέλλει την οξειδωτική τροποποίηση της LDL [191-193]. Σε παθολογικές συνθήκες, όπως σε προχωρημένες αθηρωματικές βλάβες είναι δυνατό λόγω της κυτταρικής αποσύνθεσης να απελευθερώνονται μεταλλικά ιόντα. Κλινικές όμως μελέτες δείχνουν να μην εμπλέκονται τα ελεύθερα μεταλλικά ιόντα στα πρώτα στάδια της αθηρογένεσης ενώ οι επιδημιολογικές μελέτες είναι αντιφατικές για την σχέση που υπάρχει μεταξύ της συγκέντρωσης σιδήρου και του κινδύνου ανάπτυξης αθηροσκλήρωσης [194-196]. Σε περιπτώσεις γενετικών διαταραχών που συνοδεύονται από συσσώρευση σιδήρου στο πλάσμα, (π.χ αιμοχρωμάτωση), δεν παρουσιάζεται πρόιμη αθηρωμάτωση [197]. Ομοίως σε άτομα που πάσχουν από τη νόσο Wilson, νόσο μεταβολισμού του χαλκού, όπου αυξάνονται τα επίπεδα του χαλκού στο ήπαρ, στο πλάσμα και στον εγκέφαλο, δεν παρατηρήθηκε αυξημένη

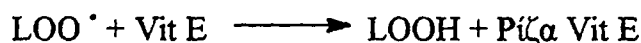


αθηρωμάτωση [198,199]. Στη νόσο αυτή τα επίπεδα της σερουλοπλασμίνης που είναι πρωτεΐνη δέσμησης του χαλκού στο πλάσμα είναι χαμηλά. Πρέπει να τονιστεί πως η σερουλοπλασμίνη οξειδώνει την LDL [189,199] *in vitro* και έχει εντοπιστεί στις περιοχές των αθηρωματικών βλαβών. Η αίμη επίσης μπορεί να οξειδώσει την LDL σχηματίζεται όμως ενδοκυττάρια και δεν κυκλοφορεί στο πλάσμα σε φυσιολογικές συνθήκες. Πρόσφατες όμως μελέτες *in vivo*, έδειξαν ότι η ενδοκυττάρια ρύθμιση των επιπέδων σιδήρου μπορεί να παίζει ρόλο στην οξείδωση των λιπιδίων και στην ανάπτυξη της αθηρωμάτωσης [200].

Στάδια οξείδωσης της LDL

Ανεξάρτητα από το μηχανισμό οξείδωσης της LDL τα στάδια της τροποποίησης είναι τα εξής: Αρχικά γίνεται η καταστροφή των ενδογενών αντιοξειδωτικών, στη συνέχεια ακολουθεί η οξείδωση των PUFA's και η παραγωγή των λιπούπεροξειδίων (LOOH) και τέλος γίνεται η αποικοδόμηση των LOOH προς αλδεϋδικά και άλλα παράγωγα. Η οξείδωση μπορεί να παρακολουθηθεί με διάφορες μεθόδους όπως, καταγραφή της αύξησης των TBARS (ενώσεις που αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ), των συζυγών διενίων, των λιπούπεροξειδίων, του φθορισμού στα 430 nm [201] και των παραγομένων αλδεϋδών. Άλλοι τρόποι είναι η παρακολούθηση της καταστροφής των ενδογενών αντιοξειδωτικών και των PUFA, της κατάτμησης της apo B και της αύξησης της σχετικής ηλεκτροφορητικής κινητικότητας (REM, Relative electrophoretic mobility). Κάθε μία από αυτές τις μεθόδους περιγράφει μία μόνο πλευρά της οξείδωσης και συχνά απαιτείται συνδυασμός δύο ή και περισσότερων για να έχουμε μια πλήρη εικόνα των γεγονότων. Η κινητική της οξειδωτικής τροποποίησης της LDL από ιόντα Cu^{2+} *in vitro* μπορεί να παρακολουθηθεί με την συνεχή καταγραφή της απορρόφησης στα 234 nm. Η απορρόφηση αυτή οφείλεται στα συζυγή διένια των λιπούπεροξειδίων που σχηματίζονται στο σωματίδιο της LDL με την πάροδο του χρόνου οξείδωσης [22]. Αφού η LDL είναι υδατοδιαλυτή και παραμένει υδατοδιαλυτή καθ' όλη τη διάρκεια της οξείδωσης, η μέτρηση της παραγωγής των συζυγών διενίων μπορεί να γίνει με άμεση και συνεχή φωτομέτρηση της LDL καθώς αυτή οξειδώνεται, χωρίς να απαιτείται εκχύλιση των λιπιδίων της. Κατά τη διάρκεια της λανθάνουσας και παραγωγικής φάσης καθώς και στα αρχικά στάδια της φάσης αποικοδόμησης, η καμπύλη παραγωγής των συζυγών διενίων

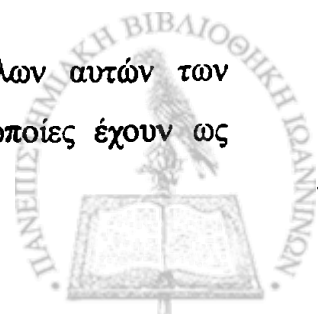
αντιστοιχεί πλήρως με αυτή της παραγωγής των λιπούπεροξειδίων, ενώ φτάνουν ταυτόχρονα στο μέγιστο της απορρόφησης [141]. Η δεύτερη αύξηση της απορρόφησης στα 234 nm, που παρατηρείται κατά τη διάρκεια της φάσης αποικοδόμησης, δεν οφείλεται σε παραγωγή νέων συζυγών διενίων αλλά σε προϊόντα αποικοδόμησης που απορροφούν σε αυτό το μήκος κύματος. Η καμπύλη μεταβολής των διενίων είναι σιγμοειδής και χωρίζεται σε 3 φάσεις. Στη λανθάνουσα όπου τα αντιοξειδωτικά καταναλώνονται, με πρώτη την α-τοκοφερόλη και τελευταίο το β-καροτένιο. Στην φάση αυτή συμβαίνει μια πολύ μικρή υπεροξείδωση των PUFAs όπως φαίνεται από τη μέτρηση των TBARS των LOOH και των συζυγών διενίων [22]. Σε αυτή τη φάση ελάχιστη υπεροξείδωση λιπαρών οξέων λαμβάνει χώρα, ενώ μια μικρή παραγωγή λιπούπεροξειδίων, κατά τη διάρκεια της λανθάνουσας φάσης, μπορεί να δικαιολογηθεί από την αντιοξειδωτική δράση της περιεχόμενης Vit E, η οποία σαρώνει τις ρίζες λιπούπεροξειδίων που σχηματίζονται κατά την οξείδωση με παράλληλο σχηματισμό τοκοφερδξύλο ριζών, οι οποίες και ανιχνεύονται στις LDL κατά την οξείδωσή της με Cu^{2+} :



Η διάρκεια της λανθάνουσας φάσης (σε min) είναι ενδεικτική για το περιεχόμενο της LDL σε αντιοξειδωτικά. Όταν η LDL «απογυμνωθεί» εντελώς από αντιοξειδωτικά μένει στο «έλεος του οξυγόνου». Με άλλα λόγια αρχίζει μία αυτοκαταλυόμενη αλυσιδωτή αντίδραση υπεροξείδωσης των λιπαρών οξέων και η οξείδωση της LDL οδηγείται στην παραγωγική φάση. Η ταχύτητα υπεροξείδωσης των λιπιδίων αυξάνεται εκθετικά και φτάνει σε μέγιστο της τάξης των 3 μορίων λιπούπεροξειδίων το λεπτό, για κάθε σωματίδιο LDL. Η μετάβαση από τη λανθάνουσα στην παραγωγική φάση διαμεσολαβείται από τα ιόντα Cu^{2+} που καταλύουν την αποικοδόμηση των ήδη σχηματισμένων, από τη λανθάνουσα φάση λιπούπεροξειδίων, σε ρίζες λιποξειδίων και λιπούπεροξειδίων (LO^\bullet , LOO^\bullet). Οι ρίζες αυτές πυροδοτούν νέες αλυσιδωτές αντιδράσεις σχηματισμού ελευθέρων ριζών. Χρήση ESR, πιστοποίησε την ύπαρξή τους σε LDL που οξειδώθηκε παρουσία Cu^{2+} ή λιποξυγονάσης [202,203]. Η ακριβής δομή των λιπαρών ριζών (L^\bullet , LO^\bullet , LOO^\bullet) δεν είναι όμως γνωστή. Προσθήκη EDTA, σε οποιαδήποτε στιγμή της λανθάνουσας ή της παραγωγικής φάσης, δεσμεύει τα ιόντα Cu^{2+} , παρεμποδίζοντας περαιτέρω διακλάδωση της αλυσιδωτής αντίδρασης, σταματώντας έτσι την οξείδωση της LDL [22]. Τα

λιποϋπεροξειδία που δημιουργούνται στην LDL κατά την παραγωγική φάση είναι ασταθή ενδιάμεσα προϊόντα. Η συγκέντρωσή τους φτάνει σε μέγιστο μέσα σε 60-80 min από την έναρξη της οξειδωσης. Σε αυτό το σημείο, στην περίπτωση οξειδωσης LDL με ιόντα Cu^{2+} , το 70-80% των PUFA έχουν οξειδωθεί. Από εδώ και πέρα, αποικοδομητικές αντιδράσεις αρχίζουν να κυριαρχούν και η συγκέντρωση των λιποϋπεροξειδίων και των συζυγών διενίων αρχίζει να μειώνεται. Ταυτόχρονα στη φάση αυτή παρατηρείται και εκτενής μετατροπή της ενδογενούς φωσφατιδυλοχολίνης της LDL σε λυσοφωσφατιδυλοχολίνη με τη δράση μιας φωσφολιπάσης A_2 που υπάρχει στην LDL [204]. Το σημείο όπου η παραγωγή των συζυγών διενίων φτάνει στο μέγιστο, έχει καθοριστεί ως το τέλος της παραγωγικής φάσης και η αρχή της φάσης αποικοδόμησης. Οι δύο αυτές φάσεις είναι δύσκολο να διαχωριστούν με ακρίβεια μεταξύ τους αφού από ένα σημείο και ύστερα αλληλεπικαλύπτονται. Αυτό συμβαίνει γιατί οι διάφορες αλλαγές που είναι χαρακτηριστικές της φάσης αποικοδόμησης, στην πραγματικότητα αρχίζουν αμέσως μετά την έναρξη της παραγωγικής φάσης. Τέτοιες αλλαγές, με γνωστές κινητικές, περιλαμβάνουν την αύξηση των αλδευδικών προϊόντων υπεροξειδωσης λιπιδίων, λόγω της κατάτμησης των προϊόντων υπεροξειδωσης, την παραγωγή φθοριζόντων χρωμοφόρων στην apo B και στο λιπιδιακό περιεχόμενο της LDL, αύξηση του επιφανειακού αρνητικού φορτίου που υπολογίζεται με τη μέτρηση της τιμής REM, κατάτμηση και τροποποίηση της apo B. Επίσης παρατηρείται παραγωγή οξυστερολών και των παραγώγων αυτών. Άλλες αλλαγές κατά τη φάση της αποικοδόμησης και που πιθανά έχουν παρόμοιες κινητικές, είναι η παραγωγή των λυσοφωσφολιπιδίων καθώς και η απώλεια των ελεύθερων αμινομάδων στην apo B [205-207]. Συνοπτικά η οξειδωση της LDL *in vitro* μπορεί να χωριστεί σε 3 φάσεις, τη λανθάνουσα φάση όπου καταναλώνονται τα αντιοξειδωτικά της, την παραγωγική φάση όπου συμβαίνει οξειδωση των ακόρεστων λιπαρών οξέων προς λιποϋπεροξειδία, και τη φάση αποικοδόμησης όπου τα λιποϋπεροξειδία μετατρέπονται σε ενεργές αλδεύδες (όπως η μηλονική διαλδεύδη και η 4-υδροξυνοενάλη) [183]. Η αλληλεπίδραση των αλδευδών αυτών με τις θετικά φορτισμένες περιοχές των λυσινών της apo B έχουν ως αποτέλεσμα την αύξηση της ηλεκτραρνητικότητας της apo B η οποία αναγνωρίζεται πλέον από τον υποδοχέα εκκαθαριστή [182].

Οι τροποποιήσεις της apo B οφείλονται σε αλληλεπίδραση όλων αυτών των παραγώγων υπεροξειδωσης των λιπιδίων που αναφέρθηκαν, οι οποίες έχουν ως



αποτέλεσμα τη μη αναγνώρισή της από τον κλασσικό B/E υποδοχέα και την προσληψή της από τα μακροφάγα μέσω του υποδοχέα εκκαθαριστή. Έτσι λοιπόν είναι φανερό πως η ox-LDL είναι ένας ετερογενής πληθυσμός σωματιδίων που περιέχει οξειδωμένα λιπαρά οξέα, οξειδωμένα φωσφολιπίδια, οξειδωμένες στερόλες καθώς και τα προϊόντα της οξειδωτικής τους κατάπτωσης. Κάποια από τα προϊόντα αυτά γίνονται πολικά και εγκαταλείπουν το σωματίδιο της ox-LDL συμμετέχοντας όμως και αυτά στις βιολογικές δράσεις της [204].

Εντοπισμός της οξειδωμένης LDL

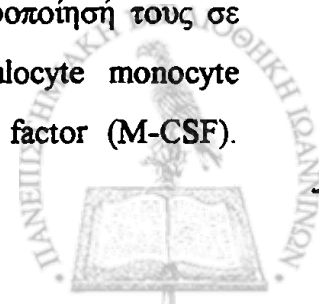
Υπάρχουν πλέον ερευνητικά αποτελέσματα τόσο σε πειραματόζωα όσο και σε ανθρώπους που επιβεβαιώνουν πως η οξείδωση της LDL συμβαίνει *in vivo*. Η πιο πιθανή θέση οξείδωσης θεωρείται το αρτηριακό τοίχωμα αν και δεν αποκλείονται και άλλες θέσεις. Προς το παρόν δεν υπάρχει άμεση ένδειξη για την ύπαρξη ox-LDL στο πλάσμα. Λόγω της μεγάλης συγκέντρωσης των αντιοξειδωτικών καθώς και της ύπαρξης πρωτεϊνών που δημιουργούν χημικά σύμπλοκα με τα ιόντα, η οξείδωση των λιποπρωτεϊνών φαίνεται απίθανο να συμβαίνει στο πλάσμα [205α]. Παρόλα αυτά η ομάδα του Shimano [206α,207α] περιέγραψε την ύπαρξη ενός ηλεκτραρνητικού, οξειδωτικά ευπαθούς, υποκλάσματος της LDL που απομονώθηκε από πλάσμα νορμολιπιδαιμικών ατόμων. Το υποκλάσμα αυτό που αποτελεί το 1-5% της ολικής LDL δεν έχει συγγένεια με τον υποδοχέα εκκαθαριστή έχει μικρότερη περιεκτικότητα σε σιαλικό οξύ και είναι περισσότερο γλυκοζυλιωμένο. Φαίνεται να οξειδώνεται πιο εύκολα παρουσία χαλκού από ότι τα αραιά και μεγάλα υποκλάσματα της LDL. Τα επίπεδά του συσχετίζονται αντιστρόφως ανάλογα με το λανθάνοντα χρόνο οξείδωσης [208-211]. Ox-LDL έχει απομονωθεί μετά από εκχύλιση αθηρωματικής αρτηρίας ανθρώπου και κουνελιού [212-214] ενώ δεν έχει βρεθεί μετά από εκχύλιση φυσιολογικής αρτηρίας. Με την χρήση ανοσοϊστοχημικών μεθόδων έχει βρεθεί σε αθηρωματικές αρτηρίες ανθρώπου και κουνελιού, ox-LDL καθώς και προϊόντα οξείδωσης των λιποπρωτεϊνών. Αυτοαντισώματα κατά της ox-LDL και των προϊόντων οξείδωσής της, έχουν εντοπιστεί σε ανθρώπινο ορό και σε ορό κουνελιού. Οι περιοχές με αθηρωματικές πλάκες περιέχουν IgG που αναγνωρίζουν την ox-LDL και τέλος η χορήγηση αντιοξειδωτικών ουσιών φαίνεται να επιβραδύνει την ανάπτυξη της αθηρωμάτωσης σε πειραματόζωα [215].



Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΟΞΕΙΔΩΜΕΝΗΣ LDL ΣΤΗΝ ΑΘΗΡΟΘΡΟΜΒΩΣΗ

Η έναρξη του σχηματισμού των αθηρωματικών βλαβών οφείλεται σε δομική και λειτουργική διαταραχή του ενδοθηλιακού φραγμού. Η διαταραχή αυτή επιτρέπει στις λιποπρωτεΐνες του πλάσματος να διέρχονται στον υπενδοθηλιακό χώρο. Οι περιοχές της μεγαλύτερης συσσώρευσης λιπιδίων είναι εκείνες όπου παρουσιάζεται διαταραχή της λειτουργικότητας του ενδοθηλίου παρά αυτές που έχουν κατεστραμένο ενδοθήλιο [216]. Η δυσλειτουργία των ενδοθηλιακών κυττάρων μπορεί να είναι αποτέλεσμα της αυξημένης ενδοκύτωσης που οφείλεται σε 'αθηρωγόνες' συγκεντρώσεις LDL [217].

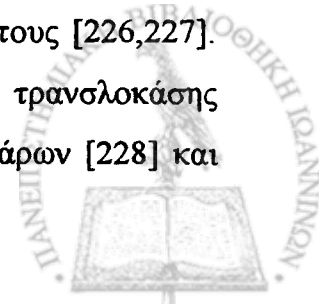
Από τις πρώτες εμφανείς αλλαγές που συμβαίνουν σε μοντέλα αθηροσκληρωτικών πειραματοζώων είναι η αυξημένη προσκόλληση μονοκυττάρων στο αρτηριακό ενδοθήλιο. Σε περιοχές αθηρωματικών βλαβών τα ενδοθηλιακά κύτταρα εκφράζουν διάφορα μόρια προσκόλλησης όπως το intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) που προάγει την προσκόλληση των μονοκυττάρων των ουδετερόφιλων και των λεμφοκυττάρων στο ενδοθήλιο, το endothelium leukocyte adhesion molecule 1 (ELAM-1), που επάγει την αλληλεπίδραση των μονοκυττάρων με τα T-λεμφοκύτταρα, και του vascular cell adhesion molecule (VCAM-1) που προκαλεί την προσκόλληση των μονοκυττάρων και των T-λεμφοκυττάρων στο ενδοθήλιο [218]. Παράλληλα τα ενδοθηλιακά κύτταρα καθώς και τα αιμοπετάλια που έρχονται στην περιοχή της βλάβης εκφράζουν στη μεμβράνη τους την P-σελεκτίνη η οποία, παίζει σημαντικό ρόλο στη διακυτταρική αλληλεπίδραση μεταξύ μονοκυττάρων και ουδετεροφίλων, ενδοθηλίου και αιμοπεταλίων [218]. Όταν τα μονοκύτταρα προσκολληθούν στο ενδοθήλιο τότε αρχίζει η μετανάστευσή τους προς τον έσω χιτώνα. Ο ακριβής μηχανισμός της μετανάστευσης δεν έχει διευκρινιστεί πλήρως, φαίνεται όμως ότι σημαντικό ρόλο παίζει η monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1) της οποίας η σύνθεση ενεργοποιείται από τα λεία μυικά και ενδοθηλιακά κύτταρα καθώς και από την ox-LDL [131]. Επίσης η ενεργοποίηση των ενδοθηλιακών κυττάρων από την ox-LDL προκαλεί την έκκριση διαφόρων αυξητικών παραγόντων οι οποίοι διεγείρουν τον πολλαπλασιασμό των μονοκυττάρων και τη διαφοροποίησή τους σε μακροφάγα. Ανάμεσα στους παράγοντες αυτούς είναι ο granulocyte monocyte stimulating factor (GM-CSF) και ο monocyte colony stimulating factor (M-CSF).



Επιπρόσθετα ο M-CSF επάγει την έκφραση του υποδοχέα εκκαθαριστή στην επιφάνεια των μακροφάγων, οπότε υπάρχει αυξημένη πρόσληψη της ox-LDL και αυξημένη παραγωγή αφρωδών κυττάρων [219-220]. Επίσης η ox-LDL προκαλεί την παραγωγή και έκκριση του platelet derived growth factor (PDGF) και του basic fibroblast growth factor (bFGF) οι οποίοι προκαλούν τη μετανάστευση και τον πολλαπλασιασμό των λείων μυικών κυττάρων (smooth muscle cells, SMC) καθώς και την έκφραση των υποδοχέων εκκαθαριστών στην επιφάνεια των SMC. Οι υποδοχείς αυτοί αναγνωρίζουν και ενδοκυττώνουν την ox-LDL οπότε δημιουργούνται αφρώδη κύτταρα και από τα SMC [221].

Η συσσώρευση των αφρωδών κυττάρων και ο πολλαπλασιασμός των SMC έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση του πάχους του έσω χιτώνα και κατά συνέπεια τη μείωση της διαμέτρου του αυλού της αρτηρίας, η οποία εκδηλώνεται με διαταραχή της φυσιολογικής αγγειοδιαστολής. Η ox-LDL προκαλεί επίσης αγγειοσύσπαση αφού αναστέλλει τη βιοσύνθεση του endothelial cell derived relaxing factor (EDRF), καθώς και του NO [222]. Επιπλέον η αγγειοσύσπαση επιτείνεται από την παραγόμενη λυσολεκθίνη κατά την οξείδωση της LDL, η οποία επάγει τη σύνθεση της ενδοθηλίνης -1 και του endothelium-derived constricting factor (EDCF) [223]. Τέλος η ox-LDL αυξάνει την ενδοκυττάρια συγκέντρωση ελεύθερου ασβεστίου στα SMC προκαλώντας έτσι υπερτροφία και αυξημένη μετανάστευση [224], πίνακας 2.

Είναι λοιπόν φανερό πως η δομή της ox-LDL έχει κάποιο χαρακτηριστικό το οποίο αναγνωρίζει ο υποδοχέας εκκαθαριστής. Πολύ πιθανό η φυσιολογική λειτουργία του υποδοχέα αυτού να είναι η αναγνώριση και κάθαρση των κατεστραμένων και νεκρών κυττάρων. Το μοντέλο της οξειδωμένης LDL και των μεταβολών που έχουν συμβεί στο σωματίδιό της προσωμιάστηκε με τα οξειδωμένα ερυθροκύτταρα και με τις μεταβολές που συμβαίνουν στην κατεστραμένη ερυθροκυτταρική μεμβράνη. Επίσης η απόπτωση ενός κυττάρου συνοδεύεται από αυξημένη παραγωγή ελευθέρων ριζών και οξειδωτική τροποποίηση [225]. Μελέτη της πρόσληψης των οξειδωτικά κατεστραμένων ερυθροκυττάρων από μακροφάγα έδειξε ότι εν μέρη οφείλεται στην έκφραση περίσσειας φωσφατιδυλοσερίνης στην κυτταρική μεμβράνη τους [226,227]. Αυτό οφείλεται στην καταστροφή μιας ATP-εξαρτούμενης τρανσλοκάσης αμινοφωσφολιπιδίων η οποία υπάρχει στη μεμβράνη των ερυθροκυττάρων [228] και



διατηρεί την ασυμμετρία της μεμβράνης κυρίως ως προς την φωσφατιδυλοσερίνη. Καταστροφή του ενζύμου αυτού έχει ως αποτέλεσμα τη συμμετρική κατανομή της φωσφατιδυλοσερίνης στη διπλοστοιβάδα και την αυξημένη έκφρασή της προς τον εξωκυττάριο χώρο. Αντίστοιχα στην LDL υπάρχει η PC η οποία κατά την οξείδωση των sn-2 πολυακόρεστων λιπαρών οξέων της μετατρέπεται στα περισσότερα πολικά φωσφολιπίδια. Πιθανώς αυτά τα φωσφολιπίδια μπορεί να παίζουν τον αντίστοιχο ρόλο της φωσφατιδυλοσερίνης στην αναγνώριση από τον υποδοχέα εκκαθαριστή [212]. Βέβαια τόσο η οξείδωση της LDL όσο και η οξειδωτική τροποποίηση των κυτταρικών μεμβρανών είναι πολύπλοκα φαινόμενα τα οποία περιλαμβάνουν πολλές ενδο- και διαμοριακές αλληλεπιδράσεις και χρειάζονται ακόμη πολλές μελέτες πριν συγκεκριμένες χημικές δομές θεωρηθούν υπεύθυνες για την αναγνώριση από τον υποδοχέα εκκαθαριστή.

Το φυσικό ενδοθήλιο έχει αντιθρομβωγόνο δράση, όταν όμως ενεργοποιηθεί (μέσω της ox-LDL) τότε γίνεται θρομβωγόνο. Η ox-LDL μειώνει την ανασταλκτική δράση του ενδοθηλίου στην προσκόληση και συσσώρευση των αιμοπεταλίων, αναστέλλοντας τη βιοσύνθεση του EDRF [221] και ενεργοποιώντας τη βιοσύνθεση των προσταγλανδινών, κυρίως του θρομβοξανίου A_2 [229]. Η αντιπηκτική ικανότητα του ενδοθηλίου μειώνεται ακόμη περισσότερο με την αναστολή της πρωτεΐνης C [230]. Επιπρόσθετα η ox-LDL αυξάνει την έκφραση του ιστικού παράγοντα (Tissue Factor, TF) στα ενεργοποιημένα ενδοθηλιακά κύτταρα αυξάνοντας έτσι την προπηκτική ικανότητα του ενδοθηλίου. Τέλος η ox-LDL επηρεάζει το μηχανισμό αιμόστασης μειώνοντας την ινωδόλυση με δύο κυρίως μηχανισμούς. Η λυσοφωσφατιδυλοχολίνη που παράγεται κατά την οξείδωση της LDL, ενεργοποιεί τη σύνθεση και έκκριση από τα ενδοθηλιακά κύτταρα του αναστολέα του ενεργοποιητή του πλασμινογόνου-1 (plasminogen activator inhibitor, PAI-1) [231] ενώ οι οξυστερόλες αναστέλλουν τη σύνθεση του ιστικού ενεργοποιητή του πλασμινογόνου (tissue type plasminogen activator t-PA), από τα ενδοθηλιακά κύτταρα [232]. Συνεπώς τόσο η ανάπτυξη της αθηροσκλήρωσης όσο και η θρόμβωση ενεργοποιούνται παράλληλα από την ox-LDL [206].



Πίνακας 2. Επίδραση της ox-LDL στα κύτταρα του αρτηριακού τοιχώματος

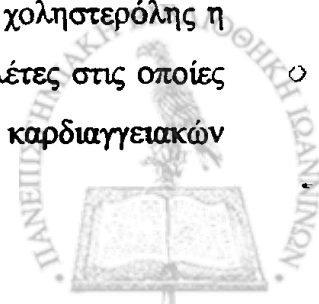
Κύτταρο-στόχος	Άμεσο αποτέλεσμα	Έμμεσο αποτέλεσμα
Ενδοθηλιακά κύτταρα	Σύνθεση των μορίων προσκόλλησης (ELAM-1, ICAM-1, VCAM-1, P-σελεκτίνη)	Προσκόλληση μονοκυττάρων
	Σύνθεση της MCP-1	Μετανάστευση των μονοκυττάρων στον έσω χείλινα
	Σύνθεση των διεγερτικών παραγόντων (M-CSF, GM-CSF)	Πολλαπλασιασμός λείων μυϊκών κυττάρων
	Σύνθεση των αυξητικών παραγόντων (bFGF PDGF)	Πολλαπλασιασμός λείων μυϊκών κυττάρων και αύξηση του πάχους του έσω χείλινα
	Μειωμένη έκκριση του EDRF	Αγγειοσύσπαση και συσσώρευση αιμοπεταλίων
	Έκκριση του EDCF	Αγγειοσύσπαση
	Έκκριση προσταγλανδινών	Συσσώρευση αιμοπεταλίων
	Αυξημένη σύνθεση πρωτεΐνης C και TF	Παραγωγή θρομβίνης, Συσσώρευση αιμοπεταλίων και πήξη
Αναστολή της σύνθεσης του t-PA και ενεργοποίηση της σύνθεσης του PAI-1	Ατελής ινωδόλυση	
Μονοκύτταρα/ Μακροφάγα	Σύνθεση του MCP-1	Χημειοταξία των μονοκυττάρων
	Άμεση πρόσληψη	Δημιουργία αφροδών κυττάρων
	Αυξημένη ανταγωνική ιδιότητα	Ενεργοποίηση ανοσολογικών αντιδράσεων
Λεία μυϊκά κύτταρα	Χημειοταξία	Μετανάστευση και των λείων μυϊκών κυττάρων αύξηση του πάχους του έσω χείλινα
	Σύνθεση PDGF	Μετανάστευση των λείων μυϊκών κυττάρων
	Σύνθεση bFGF	Πολλαπλασιασμός των λείων μυϊκών κυττάρων. Έκφραση του υποδοχέα εικκαθαριστή και παραγωγή αφροδών κυττάρων



Αντιοξειδωτικά και αθηρωμάτωση

Η μελέτη της δράσης των αντιοξειδωτικών στην εξέλιξη της αθηρωμάτωσης άρχισε το 1940. Έχουν χρησιμοποιηθεί όλοι οι τύποι των αντιοξειδωτικών όπως οι βιταμίνες A,E,C καθώς και το β-υδροξυτολουόλιο (BHT), τα αποτελέσματα όμως είτε σε ανθρώπους είτε σε πειραματόζωα είναι ακόμη αντιφατικά. Σημαντικότερη δράση από όλα φαίνεται να έχει η Vit E αφού συμπλήρωμα Vit E στη διατροφή αυξάνει την αντίσταση της LDL στην οξειδωτική τροποποίηση, ενώ η συμβολή των άλλων αντιοξειδωτικών φαίνεται αμελητέα [233,234]. Πρόσφατες επιδημιολογικές μελέτες σε 40.000 άνδρες και 80.000 γυναίκες στους οποίους χορηγήθηκε Vit E σε ποσότητες 500-1000 IU/μέρα μείωσε σημαντικά τον κίνδυνο ανάπτυξης στεφανιαίας νόσου [235,236]. Στις μελέτες αυτές δεν υπήρχαν πληροφορίες για τα συσταση των λιπαρών οξέων της LDL. Επίσης μια μεγάλη διπλή τυφλή μελέτη για την επίδραση της Vit E σε καρδιαγγειακά επεισόδια, έδειξε ότι η χορήγηση 400-800 IU Vit E/μέρα σε άτομα με αγγειογραφικά αποδεδειγμένο έμφραγμα του μυοκαρδίου μείωσε τα μη θανατηφόρα εμφράγματα κατά 70% καθώς και κατά 47% το ποσοστό των καρδιαγγειακών θανάτων [237]. Τα αποτελέσματα αυτά έγιναν εμφανή ακόμη και στους 17 πρώτους μήνες follow-up. Τα άτομα αυτά είχαν σίγουρα προχωρημένη αθηρωμάτωση και η δράση της βιταμίνης πιθανά να είναι όχι σε αντιοξειδωτικό επίπεδο αλλά σε επίδραση πάνω στα μακροφάγα της βλάβης [238].

Είναι γνωστό ότι η αντίσταση στην οξειδωτική τροποποίηση της LDL δεν οφείλεται μόνο στα ενδογενή αντιοξειδωτικά της αλλά και στο είδος των λιπαρών οξέων που περιέχει. Μελέτες έχουν δείξει ότι τα κορεσμένα λιπαρά οξέα αυξάνουν τα επίπεδα της ολικής χοληστερόλης του ορού, μειώνουν τα επίπεδα της HDL και αυξάνουν την οξειδωτική τροποποίηση της LDL, *in vitro*. Αντίθετα η επώαση της LDL με ελαϊκό οξύ οδηγεί σε δόσοεξαρτώμενη μείωση της οξείδωσης της LDL *in vitro*. Το ίδιο φαινόμενο παρατηρείται και στις περιπτώσεις όπου ακολουθείται διαίτα πλούσια σε ελαϊκό οξύ [239]. Η προμπουκόλη (probucol) είναι ένα ευρέως χρησιμοποιούμενο υπολιπιδαιμικό φάρμακο και ένα ισχυρό αντιοξειδωτικό. Παρόλο που μειώνει την ολική χοληστερόλη και την LDL χοληστερόλη με αύξηση της HDL χοληστερόλης η συμβολή του στην ανάπτυξη της πλάκας είναι αμφισβητούμενη. Μελέτες στις οποίες χρησιμοποιήθηκε β-καροτένιο δεν έδειξαν πρόληψη καρκίνου ούτε καρδιαγγειακών



επεισοδίων [240-241]. Βέβαια το β-καροτένιο δεν είναι ο καλύτερος σαρωτής ελευθέρων ριζών. Ακόμη και σε μεγάλες συγκεντρώσεις δεν μπορεί να αναστείλει την οξειδωτική τροποποίηση της LDL *in vitro* [234]. Αντίθετα αποτελέσματα είχε η μελέτη της επίδρασης α-τοκοφερόλης σε συνδυασμό με β-καροτένιο για την πρόληψη του κ̄ρκινου στην οποία καταγράφηκαν και τα καρδιαγγειακά αποτελέσματα η οποία δεν έδωσε στατιστικά σημαντικές αλλαγές, ούτε ακόμη και μετά από χορήγηση συμπληρώματος Vit E. Παρόλα τα αντιφατικά αποτελέσματα αρκετές ακόμη ελπίδες βασίζονται στην χορήγηση αντιοξειδωτικών για την επιβράδυνση της αθηροσκλήρωσης αφού τα μοντέλα των πειραματόζων έχουν δώσει πολύ καλά αποτελέσματα. Υπάρχουν επίσης μελέτες όπου φαίνεται πως αυξημένη διαιτητική πρόσληψη κάποιων αντιοξειδωτικών σε συνδυασμό με υψηλά επίπεδα τους στο πλάσμα μειώνουν τον κίνδυνο εμφάνισης καρδιαγγειακών νοσημάτων. Είναι λοιπόν εμφανές πως χρειάζονται ακόμη πολλές μεγάλες και μακροχρόνιες μελέτες σε ανθρώπους για τη διεξαγωγή ασφαλών συμπερασμάτων.



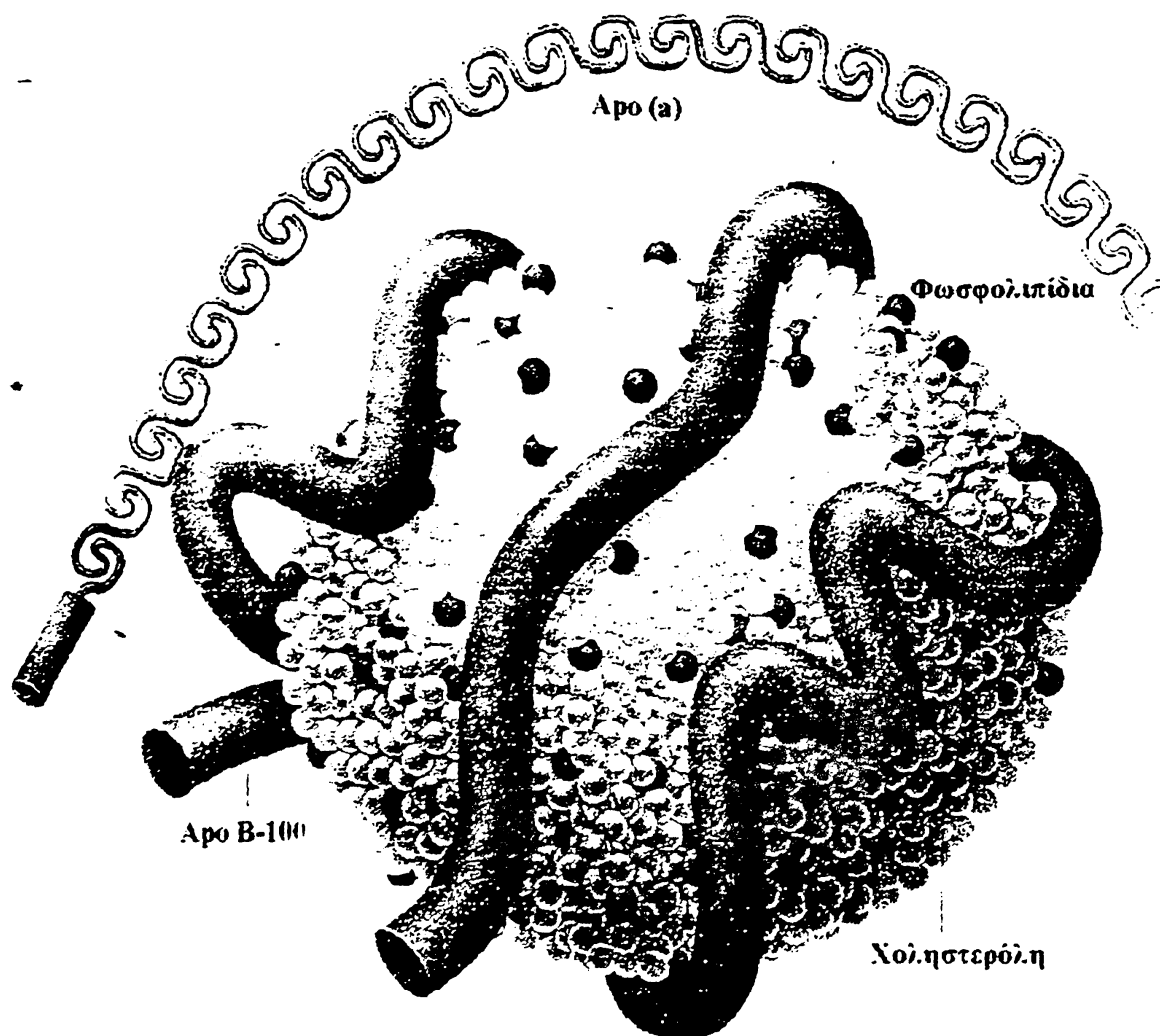
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

Η ΛΙΠΟΠΡΩΤΕΪΝΗ (a)

ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΔΡΟΜΗ

Η λιποπρωτεΐνη(a) ανακαλύφθηκε το 1963 από τον Kare Berg [242] στο πανεπιστήμιο του Oslo στα πλαίσια μελέτης της αντιγονικής συμπεριφοράς των διαφόρων από Β λιποπρωτεϊνών. Ο Berg έκανε έκχυση σε κουνέλια μίγματος Β-λιποπρωτεϊνών, τις οποίες απομόνωσε από διάφορα άτομα και στη συνέχεια εξέτασε τη συγγένεια των αντισωμάτων των ανοσοποιημένων κουνελιών με αυτές. Η αντιγονική απόκριση στα αντισώματα κατά της LDL σε κάποιους δότες έδειξε την ύπαρξη ενός ακόμη αντιγόνου των Β-λιποπρωτεϊνών. Σε αυτό το νέο αντιγονικό σύστημα δώθηκε το όνομα Lp_a, που συμβολίζει το αντιγόνο (a) το οποίο στο πλάσμα μεταφέρεται με μια λιποπρωτεΐνη (Lp). Τα άτομα τα οποία παρουσίαζαν θετική αντίδραση με αυτό το αντιγόνο ονομάστηκαν Lp(a⁺), ενώ όσα δεν αντιδρούσαν με αυτό Lp(a⁻). Την ίδια χρονική περίοδο το αντιγόνο Lp(a) ανιχνεύτηκε στο 30-40% των ατόμων που συμμετείχαν σε πληθυσμιακές μελέτες και θεωρήθηκε καταρχήν ως γενετική ποικιλομορφία της LDL [242]. Την ίδια χρονική περίοδο που ο Berg περιέγραφε το αντιγόνο Lp(a), η ομάδα του Seegers χρησιμοποιώντας τεχνικές ηλεκτροφόρησης παρατήρησε μια λιποπρωτεΐνη την οποία θεώρησε γενετική ποικιλομορφία των LDL με προ-β-ηλεκτροφορητική κινητικότητα σε πήκτωμα αγαρόζης [243]. Το 1970 η ομάδα του Rider περιέγραφε μια λιποπρωτεΐνη με ηλεκτροφορητική κινητικότητα όμοια με αυτή της VLDL και υπερφυγοκεντρική συμπεριφορά όμοια με αυτή της LDL [244]. Όλες αυτές οι λιποπρωτεΐνες που ανιχνεύτηκαν με διάφορες τεχνικές περιείχαν το αντιγόνο Lp(a). Υπερφυγοκέντρωση ανθρώπινου ορού έδειξε πως οι VLDL με προ-β-ηλεκτροφορητική κινητικότητα επιπλέουν ενώ η Lp(a) καταβυθίζεται και έτσι της αποδόθηκε ο χαρακτηρισμός sinking (καταβυθιζόμενη) προ β- λιποπρωτεΐνη [245]. Στο αντιγονικό σύστημα της Lp(a) βρέθηκε αργότερα ότι συνυπάρχει μια υδρόφιλη γλυκοπρωτεΐνη μεγάλου μοριακού βάρους η οποία ονομάστηκε απολιποπρωτεΐνη (a) (από (a)). Με τον τρόπο αυτό αποδείχτηκε πως η Lp(a) δεν είναι απλώς μια γενετική ποικιλομορφία της LDL όπως αρχικά πιστευόταν, αλλά πρόκειται για ένα σωματίδιο

ανοσοχημικά και φυσικοχημικά διάφορο από αυτή. Η Lp(a) κληρονομείται με αυτοσωμικό επικρατούντα χαρακτήρα [246].



Σχήμα 6. Σωματίδιο Lp(a).

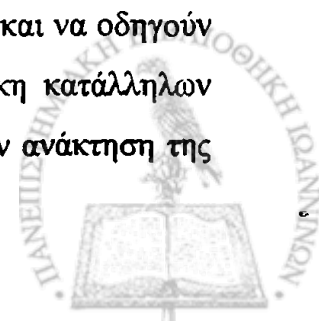
Η ΔΟΜΗ ΤΗΣ Lp(a)

Φυσικοχημικές ιδιότητες της Lp(a)

Η Lp(a) είναι ένα σφαιρικό σωματίδιο που αποτελείται από έναν υδρόφοβο πυρήνα πλούσιο σε εστέρες χοληστερόλης και τριγλυκερίδια. Η πολική επιφάνεια απαρτίζεται από φωσφολιπίδια ελεύθερη χοληστερόλη και τις απολιποπρωτεΐνες apo a και apo B-100, (σχήμα 6). Το μοριακό βάρος της Lp(a) κυμαίνεται από 4.600.000-5.600.000 όπως προσδιορίστηκε με χρωματογραφία μοριακής διήθησης και ισορροπία καθίζησης. Η περιοχή πυκνότητας της Lp(a) 1.050-1.100 g/ml βρίσκεται

μεταξύ των πυκνοτήτων της LDL και της HDL. Με χρήση υπερφυγοκεντρικής τεχνικής, η Lp(a) είτε διακρίνεται ως μια σαφής ζώνη στο διάστημα μεταξύ LDL και HDL2 είτε βρίσκεται πολύ κοντά στην LDL με αποτέλεσμα να είναι δύσκολος ο διαχωρισμός της από αυτή [247]. Η ομάδα του Fless απομόνωσε διάφορα υποκλάσματα της Lp(a) με υπερφυγοκέντρωση βαθμίδωσης πυκνοτήτων [247]. Ο αριθμός των υποκλασμάτων εξαρτάται από τον δότη και οι πυκνότητες τους κυμαίνονται από 1.050-1.082 g/ml. Η διαφορά στις πυκνότητες των υποκλασμάτων αυτών οφείλεται στη διαφορετική τους περιεκτικότητα σε apo (a), η οποία επίσης περιέχει διαφορετικά ποσοστά υδατανθράκων. Η Lp(a) εμφανίζει προ-β-ηλεκτροφορητική κινητικότητα σε ηλεκτροφόρηση αγαρόζης. Αυτή η πιο γρήγορη μετακίνηση της Lp(a) σε σχέση με την LDL μπορεί να οφείλεται στην παρουσία της apo (a) της οποίας η υψηλή συγκέντρωση σε σιαλικό οξύ αυξάνει το καθαρό αρνητικό φορτίο του σωματιδίου αυξάνοντας έτσι την ανοδική της μετανάστευση [248].

Η διάμετρος του σωματιδίου της Lp(a) κυμαίνεται από 210-262 Å. Όταν αποθηκεύεται κάτω από συνθήκες χαμηλής ιοντικής ισχύος (μικρή συγκέντρωση άλατος), τότε σχηματίζει συσσωμάτωμα με διάμετρο γύρω στα 420 Å. Αντίθετα σε μεγάλες συγκεντρώσεις άλατος (>1M NaCl) επιβραδύνεται η συσσωμάτωση της Lp(a). Η τάση της για συσσωμάτωση εξαρτάται επίσης και από την συγκέντρωσή της. Έτσι σε συγκεντρώσεις >5-10 mg/ml το φαινόμενο της συσσωμάτωσης είναι έντονο. Η ομάδα του Jurgens [249] έδειξε ότι η συσσωμάτωση σε μεγάλες συγκεντρώσεις Lp(a) μπορεί να οφείλεται στη δράση πρωτεασών και εστερασών που δεν απομακρύνονται κατά τον καθαρισμό της Lp(a). Ηλεκτροφόρηση της Lp(a) σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου (PAGE) κάτω από μη αποδιατακτικές συνθήκες (απουσία SDS) και απουσία αναστολέων των πρωτεασών δίνει ένα πληθυσμό ζωνών χωρίς κάποια από αυτές να εμφανίζει αντιγονική δράση. Αντίθετα με την προσθήκη αναστολέων των πρωτεασών κατά την παρασκευή της Lp(a) τα φαινόμενα αυτά δεν εμφανίζονται. Άρα διαφαίνεται η ύπαρξη μιας ενδογενούς ενεργότητας πρωτεάσης, η οποία αποικοδομεί την apo (a) και παράγει υδρόφιλα πεπτίδια, με αποτέλεσμα να εκθέτονται υδρόφοβες περιοχές του μορίου της apo (a) προς τα έξω και να οδηγούν στη συσσωμάτωση. Κρίνεται λοιπόν ότι είναι αναγκαία η προσθήκη κατάλληλων αναστολέων των πρωτεασών κατά την απομόνωση της Lp(a) για την ανάκτηση της φυσικής της δομής [250].

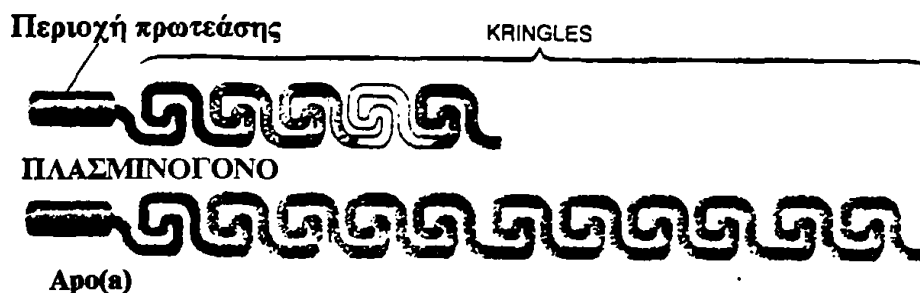


Η δομή της apo (a)

Η Lp(a) αποτελείται από έναν λιπιδιακό πυρήνα όμοιας χημικής σύστασης με αυτόν της LDL, ο οποίος περιβάλλεται από τις απολιποπρωτεΐνες apo B-100 και apo (a). Η apo B-100 υπάρχει και στην LDL ενώ η apo (a) δεν έχει βρεθεί ως τώρα σε άλλη λιποπρωτεΐνη. Η στοιχειομετρία των δύο αυτών απολιποπρωτεϊνών στο μόριο της Lp(a) δεν έχει ακόμη ταυτοποιηθεί αν και πιστεύεται ότι τα περισσότερα σωματίδια της Lp(a) περιέχουν από ένα μόριο apo B-100 και apo (a) (στοιχειομετρία 1:1) [251]. Υπάρχουν όμως μελέτες που υποστηρίζουν πως κάποια σωματίδια μπορεί να περιέχουν δύο μόρια της apo (a) [251]. Οι δύο αυτές απολιποπρωτεΐνες είναι συνδεδεμένες μεταξύ τους με ένα δισουλφιδικό δεσμό και έτσι είναι δυνατό να διαχωριστούν κάτω από ήπιες αναγωγές συνθήκες με διθειοθρεϊτόλη ή 2-μερκαπτοαιθανόλη. Το λιποπρωτεϊνικό σωματίδιο μετά την αναγωγή περιέχει μόνο την apo B-100 και ονομάζεται «Lp(a-)». Η αναγωγική αυτή σχέση οδήγησε στο συμπέρασμα πως το μόριο της apo (a) και το σωματίδιο της Lp(a-) συνδέονται μέσω δισουλφιδικής γέφυρας [252,253]. Η ομάδα του Jan [254] απέδειξε ότι ο δισουλφιδικός αυτός δεσμός σχηματίζεται μεταξύ των δύο κυστεϊνών [Cys], της Cys 3734 που υπάρχει στην apo B-100 και της Cys 4057 που υπάρχει στην apo (a). Η Lp(a-) και η LDL παρουσιάζουν ομοιότητες και διαφορές. Έχουν όμοιο εσωτερικό ιξώδες (πυρήνα) (3.56 και $3.57 \text{ cm}^3/\text{g}$ αντίστοιχα), περιέχουν μόνο apo B-100 και δίνουν ίδιο φάσμα κυκλικού διχρωϊσμού. Διαφέρουν όμως ως προς το μοριακό βάρος (3.22×10^6 και 2.93×10^6 αντίστοιχα) και την πυκνότητα επιφανείας (1.028 και 1.037 g/mol αντίστοιχα). Επίσης η Lp(a-) έχει μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε τριγλυκερίδια σε σχέση με την LDL (10.3% και 6.0% αντίστοιχα). Παρόλες όμως τις διαφορές της Lp(a-) από την LDL, τις μοναδικές ιδιότητες της η Lp(a) τις οφείλει στην apo (a) [255].

Η apo (a) είναι μια γλυκοζυλιωμένη υδατοδιαλυτή πρωτεΐνη που περιέχει 28.1% κ.β υδατάνθρακες [256] και εμφανίζει σημαντική ετερογένεια μεγέθους, με μοριακή μάζα που κυμαίνεται από 200 KDa μέχρι 800 KDa [257]. Η ετερογένεια αυτή είναι αποτέλεσμα κυρίως της μεγάλης διακύμανσης του μήκους της πολυπεπτιδικής αλυσίδας της apo (a), ιδιότητα η οποία ρυθμίζεται γενετικά [253,258]. Ο βαθμός γλυκοζυλίωσης φαίνεται να επηρεάζει ελάχιστα το μέγεθος της apo (a) [248,259]. Μελέτες ως προς το υδατανθρακικό περιεχόμενο της apo (a)

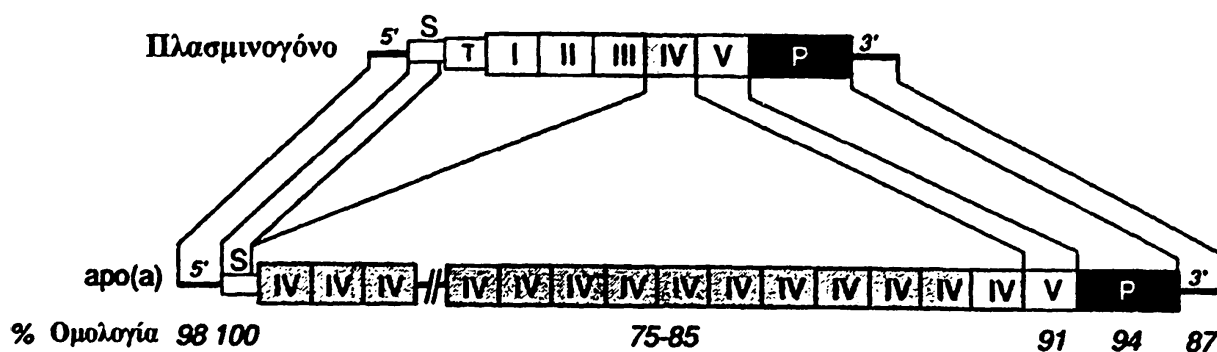
έδειξαν ότι αποτελείται κυρίως από μαννόζη, γαλακτόζη, γαλακτοζαμίνη, γλυκοζαμίνη, και σιαλικό οξύ (νευραμινικό οξύ) σε μοριακή αναλογία 3:7:5:4:7 αντίστοιχα [256]. Η γλυκοζυλίωση της apo (a) επηρεάζει το μέγεθος του μορίου κυρίως όμως παίζει ρόλο στις αλληλεπιδράσεις της Lp(a) με άλλα μακρομόρια [255]. Μελέτες κυκλικού διχρωϊσμού στο μόριο της apo (a) έδειξαν σε μεγάλο βαθμό τυχαία δομή με 8% α-έλικα και 21% δομή β-πτυχωτής επιφάνειας. Επιπρόσθετα με βάση το μεγάλο εσωτερικό ιξώδες της πρόκειται για μια εκτεταμένη εύελικτη δομή σπειράματος [256]. Αυτό όμως έρχεται σε αντίθεση με την αλληλουχία των αμινοξέων της apo (a), στην οποία υπάρχουν περιοχές που εμφανίζουν ομοιότητα με το πλασμινογόνο, ένα ζυμογόνο που συμμετέχει στην πήξη του αίματος και στην ινωδόλυση [260,261].



Σχήμα 7. Περιοχές τριπλών αναδιπλώσεων (Kringles) στην apo (a) και το πλασμινογόνο

Αρχικά η ομολογία αυτή διαπιστώθηκε με ανοσοχημικές μεθόδους όπου υπήρξε διασταυρωτική αντίδραση μεταξύ του πλασμινογόνου και της apo (a). Έτσι διαπιστώθηκε ότι στο μόριο της apo (a) υπάρχουν περιοχές τριπλής αναδίπλωσης που ονομάζονται «kringles» [K], εξαιτίας της μορφολογικής τους ομοιότητας με το δανέζικο γλυκό (pretzel), (σχήμα 7). Τέτοιες περιοχές υπάρχουν και στο πλασμινογόνο αλλά και σε άλλες πρωτεΐνες της πήξης του αίματος και της ινωδόλυσης [262], όπως στην προθρομβίνη, στον ενεργοποιητή του πλασμινογόνου στην ουροκινάση στην πρωτεΐνη C καθώς και στους παράγοντες πήξης VII, IX, X, VII. Οι περιοχές αυτές «kringles» σταθεροποιούνται με τρεις εσωτερικούς δισουλφιδικούς δεσμούς. Το πλασμινογόνο περιέχει ένα αντίγραφο από πέντε διαφορετικά kringles τα οποία χαρακτηρίζονται ως K1-K5 και περιέχουν από 80-114 αμινοξέα (σχήμα 8). Οι βασικές διαμορφωτικές μονάδες τόσο στην apo (a) όσο και στο πλασμινογόνο είναι μη καταλυτικές, πλούσιες σε κυστεΐνη. Το μέγεθος της apo

(a) καθορίζεται από τον αριθμό των «kingles» που περιέχει κάθε μόριο. Οι περιοχές αυτές των αναδιπλώσεων κωδικοποιούνται από το γονίδιο της apo (a) και ποικίλουν σε αριθμό από 12 μέχρι 51. Η apo (a) δεν περιέχει περιοχές ανάλογες με τα K1, K2, K3, του πλασμινογόνου περιέχει όμως πολλαπλά ομόλογα αντίγραφα K4 και ένα αντίγραφο K5 (σχήμα 8). Σε κάθε μόριο της apo (a) υπάρχουν 10 τύποι K4 [263]. Καθένας από αυτούς τους τύπους περιέχει N-και O- θέσεις γλυκοσυλίωσης και εκτός από τον K4 τύπος 2 όλοι εμφανίζονται σε ένα αντίγραφο [264]. Αντίθετα ο αριθμός των K4 τύπου 2 ποικίλει και είναι αυτός που καθορίζει το μέγεθος της apo (a) [265]. Τα διαφορετικά μόρια της apo (a) εκφράζονται φαινοτυπικά με τις ισομορφές. Η apo (a) περιέχει επίσης μια περιοχή σερίνοπρωτεάσης ομόλογη με αυτή του πλασμινογόνου η οποία διατηρεί τρία αμινιζέα υπεύθυνα για την ενεργότητα πρωτεάσης. Υπάρχει όμως αντικατάσταση μιας σερίνης από μία αργινίνη στην περιοχή της σχάσης που καταλύεται από τον ιστικό και τον ουρικό ενεργοποιητή του πλασμινογόνου έτσι ώστε η apo (a) να μην διασπάται στη περιοχή αυτή και κατά συνέπεια να μην ενεργοποιείται από τις πρωτεάσες αυτές [260,261,266].



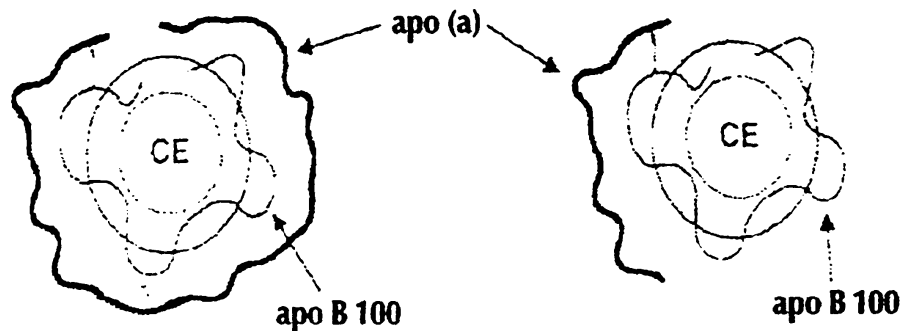
Σχήμα 8. Δομική ομολογία Lp(a) και πλασμινογόνου.

ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΑΡΟ (a).-ΦΑΙΝΟΤΥΠΟΙ

Η ετερογένεια που παρουσιάζει Lp(a) είτε μεταξύ διαφορετικών ατόμων είτε στο ίδιο άτομο αφορά το μέγεθός της (25-30 nm διάμετρος που αντιστοιχεί σε μοριακή μάζα $4.6-5.6 \times 10^6$ kDa) και την πυκνότητά της (1.027-1.100 g/ml). Για την ετερογένεια αυτή υπεύθυνη είναι η ετερογένεια μεγέθους της apo (a). Οι μεγαλύτερες ισομορφές της apo (a) εμφανίζονται στα πυκνότερα σωματίδια της Lp(a) ενώ οι μικρότερες ισομορφές στα μεγαλύτερης πυκνότητας σωματίδια της Lp(a) [257,267].

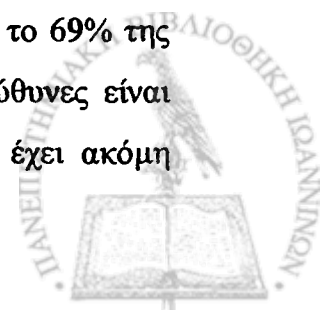
Μετά από ανάλυση του c-DNA για το μόριο της apo (a), έχουν εντοπιστεί σημαντικές διαφορές στην αλληλουχία των αμινοξέων μεταξύ των διαφόρων τύπων K4. Τα διαφορετικά είδη K4 τύπος 1 και τα K4 τύποι 3-10 έχουν ονομαστεί σύμφωνα με την ονοματολογία της ομάδας του Morissett [263]. Στο K4 τύπος 2 η αλληλουχία των αμινοξέων είναι πάντοτε η ίδια διαφέρει όμως ο αριθμός τους και αυτό είναι το κλειδί στον προσδιορισμό του μεγέθους της apo (a) [268,269]. Μέχρι σήμερα έχουν ταυτοποιηθεί 34 διαφορετικές αλληλουχίες της apo (a), οι οποίες περιέχουν από 12-51 K4 [268,270]. Ο πολυμορφισμός οφείλεται σε αλληλόμορφα τα οποία λειτουργούν σε μονό χρωμοσωμικό γενετικό τόπο (single chromosomal locus) [271]. Ηλεκτροφόρηση ορού ή πλάσματος σε πολυακρυλαμίδιο ή αγαρόζη κάτω από αποδιατακτικές συνθήκες (παρουσία SDS) δίνει τη δυνατότητα διαχωρισμού των ισομορφών της apo (a). Οι μοριακές μάζες των ισομορφών κυμαίνονται από 400 μέχρι και 700 kD. Κάθε άτομο μπορεί να εμφανίζει μια ή δύο ισομορφές της apo (a), είναι όμως πιθανό και να μην υπάρχει ανιχνεύσιμη ζώνη της απολιποπρωτεΐνης. Ανάλογα με την αναλυτικότητα της μεθόδου μπορούν να ανιχνευτούν από 6 μέχρι 25 ισομορφές. Οι έξι βασικές ισομορφές σύμφωνα με την ονοματολογία του Gerd Utermamm χαρακτηρίζονται ως F, B, S1, S2, S3, S4 ανάλογα με τη σχετική ηλεκτροφορητική κινητικότητα τους ως προς την ηλεκτροφορητική κινητικότητα της apo B-100. Έτσι ως F χαρακτηρίζονται οι ισομορφές που κινούνται πιο γρήγορα (faster than) από την apo B-100, ως B ονομάζονται οι ισομορφές που έχουν όμοια ηλεκτροφορητική κινητικότητα με την apoB-100, ενώ S χαρακτηρίζονται οι ισομορφές που κινούνται πιο αργά (slower than) από την apo B-100. Υπάρχει επίσης και ο μηδενικός φαινότυπος (null phenotype) που χαρακτηρίζει άτομα με μη ανιχνεύσιμη ζώνη apo(a), εξαρτάται όμως από την ευαισθησία της μεθόδου ανοσοδέσμωσης καθώς δεν είναι βέβαιο ότι υπάρχουν άτομα χωρίς Lp(a) [272]. Οι ισομορφές της apo(a) επηρεάζουν την συγκέντρωσή της Lp(a) στο πλάσμα. Η ομάδα του Utermamm παρατήρησε πρώτη μια αντιστρόφως ανάλογη σχέση μεταξύ του μεγέθους της apo(a) και των επιπέδων της Lp(a) στο πλάσμα [253,273]. Σε άτομα που έχουν δύο ισομορφές apo(a), η συγκέντρωση της Lp(a) στο πλάσμα είναι αποτέλεσμα της δράσης της κάθε ισομορφής ξεχωριστά. Σε apo(a) ετεροζυγώτες τα επίπεδα της της Lp(a) στο πλάσμα είναι το άθροισμα και όχι η μέση τιμή της συγκέντρωσης Lp(a) που καθορίζεται από κάθε αλληλόμορφο ξεχωριστά. Είναι ενδιαφέρον πως στην περίπτωση των ετεροζυγωτών οι δύο ισομορφές της apo(a)

εκπροσωπούν δύο πληθυσμούς σωματιδίων $Lp(a)$ οι οποίοι μπορούν να διαχωριστούν με υπερφυγοκέντρωση βαθμίδωσης πυκνοτήτων [272], (σχήμα 9).



Σχήμα 9. Σχηματική αναπαράσταση της δομής δύο σωματιδίων $Lp(a)$ τα οποία περιέχουν μια μεγάλη (αριστερά) και μια μικρή (δεξιά) ισομορφή της $apo(a)$. Οι δυο αυτοί πληθυσμοί σωματιδίων ανιχνεύονται στο πλάσμα ετεροζυγωτών για την $apo(a)$.

Δεν είναι μέχρι σήμερα γνωστός ο λόγος για την αντιστρόφως ανάλογη σχέση που υπάρχει μεταξύ του μεγέθους της $apo(a)$ και των επιπέδων της $Lp(a)$ στο πλάσμα. Νεώτερες μελέτες δείχνουν ότι η σχέση αυτή δεν είναι ακριβής εξαιτίας της τεχνικής με την οποία καθιερώθηκε. Τα επίπεδα της $Lp(a)$ επηρεάζονται και από την δράση *cis* αλληλουχιών που υπάρχουν στο γενετικό τόπο της $apo(a)$ [264]. Η ομάδα του Perombelon έδειξε ότι για αλληλόμορφα της $apo(a)$ του ίδιου μεγέθους τα επίπεδα της $Lp(a)$ ποικίλουν μέχρι 200 φορές. Η ομάδα του Utermamm δεν μπόρεσε να ανιχνεύσει όλα τα αλληλόμορφα της $apo(a)$ λόγω της χαμηλής ευαισθησίας της μεθόδου ανοσοδέσμευσης που χρησιμοποιήθηκε. Υπάρχουν γονίδια έξω από τον γενετικό τόπο της $apo(a)$ τα οποία μπορούν να επηρεάσουν τα επίπεδα της $Lp(a)$. Για την κάλυψη αυτού του κενού η ομάδα του Boerwinkle [274] έλαβε υπόψη της όλα τα γνωστά αλληλόμορφα της $apo(a)$ καθώς και όσα από αυτά σχετίζονται με μικρή ή και μηδενική παραγωγή πρωτεΐνης $apo(a)$. Η ανάλυση αυτή έδειξε ότι το γονίδιο της $apo(a)$ είναι υπεύθυνο για το 91% της διακύμανσης των επιπέδων της $Lp(a)$ στο πλάσμα καυκάσιων και βορειοαμερικανικών οικογενειών που μελετήθηκαν. Ο αριθμός των K4 που υπάρχει στο γονίδιο της $apo(a)$ είναι υπεύθυνος για το 69% της διακύμανσης των επιπέδων της $Lp(a)$, ενώ για το υπόλοιπο 22% υπεύθυνες είναι αλληλουχίες στο γενετικό τόπο της $apo(a)$ των οποίων ο ρόλος δεν έχει ακόμη



προσδιοριστεί. Το γονίδιο της apo(a) βρίσκεται σε μια δέσμη γονιδίων στο χρωμόσωμα 6q26-27 το οποίο περιέχει το γονίδιο της apo(a), το γονίδιο του πλασμινογόνου, και δύο γονίδια συσχετιζόμενα με την apo(a) [275,276].

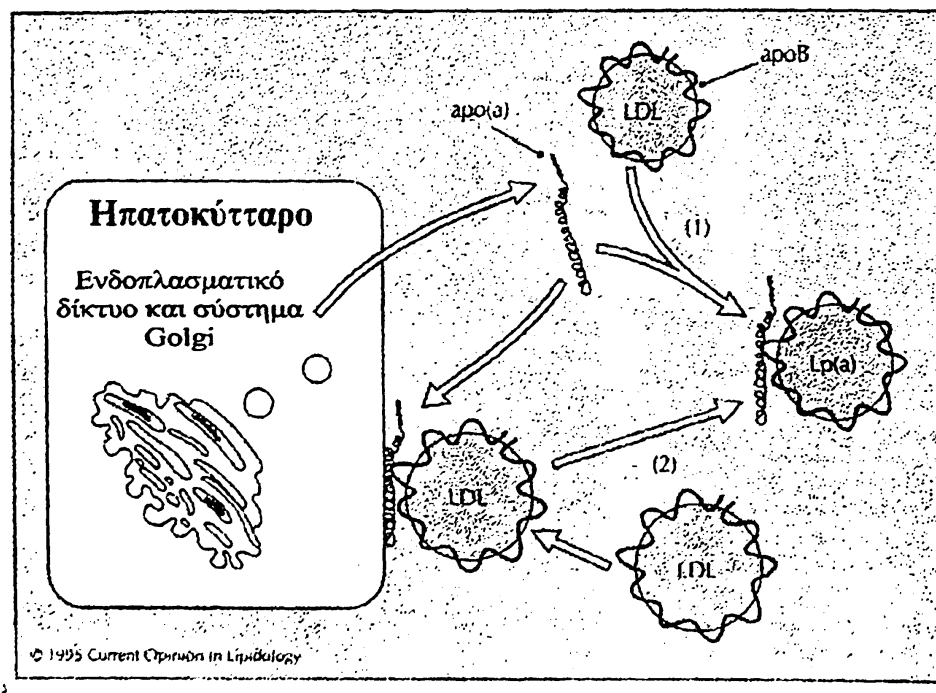
ΒΙΟΣΥΝΘΕΣΗ ΤΗΣ Lp(a).

Που και πως βιοσυντίθεται η Lp(a) ακόμη δεν έχει πλήρως δευκρινιστεί. Για να ταυτοποιηθεί αν προκύπτει από τον καταράκτη απολιπιδώσης της VLDL έγινε το εξής πείραμα. VLDL από εθελοντές με υψηλά επίπεδα Lp(a) επισημάνθηκε με ραδιενέργεια, επανεγχύθηκε στην κυκλοφορία του αίματος και μετρήθηκε η κατανομή καθώς και η σταδιακή μείωση της ραδιενέργειας σε συνάρτηση με τον χρόνο, στις λιποπρωτεΐνες VLDL, IDL, LDL και Lp(a) [277]. Οι μελέτες αυτές έδειξαν ότι η Lp(a) δεν είναι άμεσο μεταβολικό προϊόν της VLDL. Είναι πιθανό να εκκρίνεται απευθείας από το ήπαρ, χωρίς να εμπλέκεται στο μεταβολισμό των πλούσιων σε τριγλυκερίδια λιποπρωτεϊνών. Η apo(a) βιοσυντίθεται ως μια πρόδρομη ένωση μικρού μοριακού βάρους, η οποία ωριμάζει κατά την παραμονή της στο ενδοπλασματικό δίκτυο μέσα από διαδικασίες O- και N- γλυκοζυλίωσης. Οι μεγάλες ισομορφές της apo(a) μένουν περισσότερο χρόνο στο ενδοπλασματικό δίκτυο από ότι οι μικρές και εκεί ένα μεγάλο ποσοστό τους αποικοδομείται. Μόνο οι σωστά σχηματισμένες πρωτεΐνες επιτρέπεται να βγουν από το διαμέρισμα αυτό. Εξαιτίας του μεγάλου αριθμού περιοχών τριπλής αναδίπλωσης που υπάρχει στις μεγάλες ισομορφές, καθεμία από τις οποίες περιέχει έξι κυστεΐνες και μέχρι επτά θέσεις γλυκοζυλίωσης, ένα μεγάλο ποσοστό των ισομορφών αυτών δεν σχηματίζει σωστές αναδιπλώσεις και παραμένει στο ενδοπλασματικό δίκτυο. Αυτή είναι και μια πιθανή εξήγηση για την αντιστρόφως ανάλογη σχέση που υπάρχει μεταξύ του μεγέθους της apo(a) και της συγκέντρωσης της Lp(a) στο πλάσμα [265]. Η θεωρία αυτή για την ύπαρξη ενός βασικού βιολογικού φαινομένου συμφωνεί με τα αποτελέσματα της ομάδας του Gaw [278] που έδειξε ότι η σχέση μεταξύ του μεγέθους της apo(a) και της συγκέντρωσης της Lp(a) στο πλάσμα είναι σταθερή στους διάφορους πληθυσμούς [278]. Μελέτες σε πρωτογενείς καλλιέργειες ηπατοκυττάρων από πθήκους επιβεβαίωσαν ότι οι ρυθμοί βιοσύνθεσης των μεγάλων ισομορφών της apo(a) είναι πολύ μικρότεροι από αυτούς των μικρών ισομορφών και πως η έκκριση των μεγάλων ισομορφών από τα κύτταρα καθυστερεί [279]. Τα ηπατοκύτταρα των

πιθήκων που έφεραν το μηδενικό αλληλόμορφο βιοσύνθεταν τις μεγάλες ισομορφές της apo(a), οι οποίες όμως καταβολίζοταν ενδοκυττάρια, χωρίς να εκκρίνονται. Η ομάδα του Rader μελέτησε τη βιοσύνθεση των ισομορφών της apo(a) σε εθελοντές ετεροζυγώτες για μικρή και μεγάλη apo(a). Τα πειράματα αυτά έδειξαν ότι ο ρυθμός παραγωγής του κάθε αλληλόμορφου στο ίδιο άτομο σχετίζεται αρνητικά με το μέγεθος της apo(a). Φαίνεται λοιπόν πως ο μεταβολισμός της Lp(a) δεν σχετίζεται με αυτόν της VLDL και των χυλομικρών. Το συμπέρασμα αυτό ενισχύεται από την παρατήρηση πως η διατροφή δεν επηρεάζει τα επίπεδα της Lp(a) στο πλάσμα, ενώ επηρεάζει τα επίπεδα όλων των άλλων λιποπρωτεϊνών, που περιέχουν apo B [280].

Ρόλος της apo(a) στη βιοσύνθεση της Lp(a)

Το πιο πιθανό ενδεχόμενο είναι η συγκρότηση του σωματιδίου της Lp(a) να γίνεται εξωκυττάρια ή στην επιφάνεια του ηπατοκυττάρου από ήδη σχηματισμένη apo(a) και LDL (σχήμα 10).



Σχήμα 10. Πιθανό μοντέλο βιοσύνθεσης της Lp(a). Το ηπατοκύτταρο εκκρίνει την apo(a) η οποία είτε κατευθύνεται στην κυκλοφορία είτε μένει συνδεδεμένη στην επιφάνεια του ηπατοκυττάρου. Η βιοσύνθεση της Lp(a) είτε γίνεται στην κυκλοφορία όπου ένα σωματίδιο LDL συνδέεται με την apo(a) είτε το σωματίδιο της LDL προσεγγίζει την επιφάνεια του ηπατοκυττάρου, αλλάζει την διαμόρφωση της apo(a) και σχηματίζουν την Lp(a).

Τα πρώτα πειράματα που υποστήριζαν την άποψη αυτή έγιναν από την ομάδα του Koschinsky [281], η οποία έδειξε ότι ανασχηματισμένη apo(a) (γ-apo(a)), από παροδικά επιμολυνθέντα κύτταρα HepG2 εκκρίνεται ελεύθερη στο κυτταρικό μέσο. Μόνο μια μικρή ποσότητα γ-apo(a) σχηματίζει σύμπλοκα με την ενδοκυττάρια apo B-100 τα οποία μοιάζουν με Lp(a), [Lp(a)-like]. Με την χρήση εξειδικευμένων αντισωμάτων κατά του συμπλόκου γ-apo(a)-apoB δεν ανιχνεύτηκαν ενδοκυττάρια συγκροτημένα σωματίδια Lp(a). Πειράματα σε πρωτογενείς καλλιέργειες ηπατοκυττάρων από πιθήκους επιβεβαίωσαν τα δεδομένα αυτά [282]. Σταθερά συσσωματώματα γ-apo(a)-apoB ανοσοκαταβυθίστηκαν στο μέσο καλλιέργειας των κυττάρων ενώ στο κυτταρόλυμα ανιχνεύτηκαν ελεύθερες οι apo(a) και apo B-100. Για να προσεγγιστεί η φύση του δεσμού καθώς και τα αναγκαία δομικά χαρακτηριστικά για την συγκρότηση της Lp(a) από την apo(a) και την apoB αναπτύχθηκε ένα σύστημα έκφρασης σε παροδικά επιμολυνθέντα Cos7 κύτταρα [283]. Όταν τα κύτταρα αυτά επώαστηκαν με LDL απομονωμένη από ανθρώπινο ορό σχημάτισαν συμπλέγματα γ-apo(a)-apoB τα οποία έμοιαζαν φυσικοχημικά με την Lp(a) του πλάσματος. Τα ίδια συμπλέγματα σχηματίστηκαν ακόμη και όταν η επώαση της LDL έγινε μόνο με το μέσο καλλιέργειας των κυττάρων αυτών. Τα συμπλέγματα αυτά δεν αποδιατάχτηκαν με βρασμό παρουσία SDS, η apo(a) όμως κάτω από αναγωγικές συνθήκες (παρουσία μερκαπτοαιθανόλης) απελευθερώθηκε από αυτά. Όλες αυτές οι παρατηρήσεις οδηγούν στο συμπέρασμα ότι η apo(a) είναι ομοιοπολικά συνδεδεμένη με την apo B-100 μέσω ενός δισουλφιδικού δεσμού [261,280,284,285], και ότι τέτοια σωματίδια δημιουργούνται *in vitro* με ανάμειξη apo(a) και LDL.

Η apo(a) περιέχει μια μοναδική ελεύθερη Cys την Cys-78 που βρίσκεται στο K4 τύπος 9. Για να προσδιοριστεί ο ρόλος της έγιναν πειράματα μεταλλαξιγένεσης *in vitro* με αντικατάστασή της από σερίνη ή αργινίνη [286,287]. Η ικανότητα δέσμευσης της μεταλλαγμένης γ-apo(a) με την LDL μειώθηκε σημαντικά όμως δεν εξαφανίστηκε. Κάτω από φυσιολογικές συνθήκες, το 25% της μεταλλαγμένης πρωτεΐνης μπορούσε να ενωθεί με την LDL δείχνοντας ότι μεταξύ των δύο απολιποπρωτεϊνών ακόμη και απουσία δισουλφιδικού δεσμού υπάρχουν ισχυρές μη ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις. Η προσθήκη του αναλόγου της λυσίνης ε-aminohexoid acid (ε-AHA), καθώς και απορρυπαντικών όχι μόνο ανέστειλε τη δημιουργία του συμπλόκου αλλά και το αποδιέτασε μόλις σχηματιζόταν. Μεγάλες

συγκεντρώσεις άλατος (μέχρι 10%NaCl) δεν επηρέασαν τον σχηματισμό συμπλόκου του γ-αρο(a)-αροB δείχνοντας ότι υπάρχουν και μη ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις στο σύμπλοκο.

Επειδή η αρο(a) περιέχει 28% υδατάνθρακες, μελετήθηκε και ο ρόλος των διαφόρων σακχάρων στην βιοσύνθεση της Lp(a). Κύτταρα ωοθήκης από μεταλλαγμένα κινέζικα χάμστερ (CHO), τα οποία εμφάνιζαν διάφορες ανεπάρκειες στη γλυκοζυλίωση των πρωτεϊνών επιμολύνθηκαν με τον φορέα εκφραστή της αρο(a) και μελετήθηκε τόσο η έκφραση της γ-αρο(a) όσο και η ένωση της γ-αρο(a) με την LDL. Κύτταρα CHO με ανεπάρκεια N-ακετυλογλυκοζαμίνης παρήγαγαν 50% λιγότερη γ-αρο(a) από τα φυσιολογικά ενώ κύτταρα με ανεπάρκεια σιαυλίωσης έκκριναν 50% περισσότερη γ-αρο(a) από αυτά άγριου τύπου (wild type). Ανεξάρτητα όμως από τη διαταραχή η γ-αρο(a) που εκκρινόταν από όλα τα είδη κυττάρων είχε την ίδια ικανότητα δέσμευσης με την ανθρώπινη LDL, όπως αυτή που εκκρίνεται από φυσιολογικά κύτταρα, ένδειξη ότι υπάρχει μια καθαρή αλληλεπίδραση πρωτεΐνης-πρωτεΐνης στο σχηματισμό της Lp(a) που δεν επηρεάζεται από την ύπαρξη υδατανθράκων. Για να μελετηθεί ο ρόλος των Kringles στις μη ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις της αρο(a) με την LDL παρήχθησαν c-DNA για μόρια αρο(a) τα οποία διέφεραν σε περιεκτικότητα K4 περιοχών, όλα όμως περιείχαν το K4 τύπου 9. Τα μόρια της γ-αρο (a) που περιείχαν K4 τύπου 1 και K4 τύπου 2 ενώ δεν περιείχαν K4 τύπου 3-8, δεν μπορούσαν να ενωθούν με την LDL. Μελέτες που έγιναν με διάφορους συνδυασμούς των K4 τύπου χ έδειξαν ότι απαραίτητο για τη δέσμευση της αρο (a) στην LDL είναι το K4 τύπου 6, μια που σε αυτό υπάρχουν απολήξεις λυσινών, οι οποίες αλληλεπιδρούν με τις απολήξεις λυσινών της αρο B. Επίσης τα K4 τύπου 5, 7, και 8 συμβάλλουν στις μη ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις κατά την συγκρότηση της Lp(a). Με βάση αυτά τα πειραματικά μοντέλα φαίνεται πως η συγκρότηση της Lp(a) συμβαίνει σε δύο στάδια. Στο πρώτο στάδιο μια ή περισσότερες απολήξεις μη ταυτοποιημένων ακόμη λυσινών της LDL συνδέονται στην θέση δέσμευσης της λυσίνης στο K4 τύπου 6 σχηματίζοντας ένα χαλαρό σύμπλοκο, ανθεκτικό στις μεγάλες συγκεντρώσεις άλατος. Το πρώτο αυτό βήμα είναι ανάλογο με την αλληλεπίδραση του πλασμινογόνου με τα υπολείμματα λυσινών του ινώδους. Ο δισουλφιδικός δεσμός μεταξύ της Cys-78 που βρίσκεται στο K4 τύπου 9 και της Cys-3734 που βρίσκεται στην αρο B σχηματίζεται σε ένα δεύτερο βήμα με οξείδωση, δίνοντας τη σταθερή δομή της Lp(a). Δεν έχει βρεθεί ακόμη αν υπάρχει

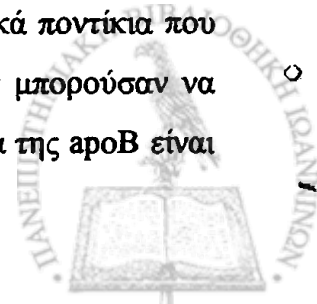
κάποιο ένζυμο που να καταλύει τη δημιουργία αυτού του δισουλφιδικού δεσμού [280].

Ο ρόλος της LDL στη βιοσύνθεση της Lp(a)

Τροποποίηση της δομής ή της χημικής σύστασης της ανθρώπινης LDL, μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση ή ακόμη και την αδυναμία σχηματισμού της Lp(a). Υπάρχουν τρεις μεταβολικές ασθένειες στις οποίες έχει αναφερθεί διαταραγμένη συγκρότηση της Lp(a). Στην οικογενή υπερχοληστερολαιμία όπου μια αργινίνη στο κωδικίο 3500 της apo B-100 έχει αντικατασταθεί από μια γλυκίνη, με αποτέλεσμα η LDL που σχηματίζεται να είναι δομικά διαφοροποιημένη και να μην αναγνωρίζεται από τον υποδοχέα της. Μελέτη της ικανότητας δέσμευσης ανασυνδιασμένης apo (a) με LDL από ομόζυγους και ετερόζυγους ασθενείς με αυτή τη μεταβολική νόσο έδειξε ότι υπάρχει μείωση κατά 50% ή 25% αντίστοιχα της δυνατότητας συγκρότησης Lp(a) [288]. Αυτό σημαίνει πως οι ομάδες των Lys/Cys στην apo B-100 που είναι υπεύθυνες για το σχηματισμό της Lp(a) βρίσκονται πολύ κοντά στην περιοχή πρόσδεσης στον υποδοχέα της LDL.

Επίσης σε ομοζυγώτες με έλλειψη της LCAT απομονώθηκε το κλάσμα περιοχής πυκνότητας (1.020-1.060 mg/dl), το οποίο περιείχε σωματίδια LDL, πλούσια σε apo B-100 τα οποία όμως είχαν διαφορετική μορφολογία και χημική σύσταση από την κανονική LDL. Τα σωματίδια αυτά δεν μπορούσαν να ενωθούν με την γ-apo (a), παραμόνο μετά από επώασή τους με ενεργή LCAT. Η ομάδα του Streyer [289] έδειξε πως στο πλάσμα ομοζυγωτών με έλλειψη της LCAT δεν υπάρχουν ανιχνεύσιμα επίπεδα Lp(a) ούτε apo (a). Στους ετεροζυγώτες τα επίπεδα της Lp(a) είναι αρκετά μικρά (<13mg/dl), ανταποκρίνονται όμως στον γονότυπο της apo (a) που έχουν. Φαίνεται λοιπόν η βιοσύνθεση της Lp(a) επηρεάζεται από τη δράση της LCAT.

Τέλος η ομάδα του Gabell [290] έδειξε πως καρβοξυτελικά τμήματα ανασυνδιασμένης apo B-100, apo B-94, και apo B-88 που αναπτύχθηκαν σε επιμολυσμένα κύτταρα ήπατος ποντικού, δεν μπορούσαν να ενωθούν με γ-apo (a) και περιείχαν στην δομή τους την Cys-3734. Ομοίως και διαγονιδιακά ποντίκια που εξέφραζαν την ανθρώπινη apo (a) και την ανθρώπινη apoB-90 δεν μπορούσαν να σχηματίσουν Lp(a). Φαίνεται λοιπόν πιθανό πως καρβοξυτελικά άκρα της apoB είναι



απαραίτητα για τις μη ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις της με την apo (a), ή περικοπές της αλληλουχίας της apoB αλλάζουν την διαμορφωσή της καθιστώντας την Cys-3734 ανενεργός [265]. Μια άλλη πιθανή εξήγηση είναι να υπάρχει και άλλη απόληξη κυστεΐνης στην LDL, εκτός από την Cys-3734 που να παίζει ρόλο στο σχηματισμό του δισουλφιδικού δεσμού με την apo (a) και ως τέτοια πιθανολογείται η Cys-4326

ΑΠΟΙΚΟΔΟΜΗΣΗ ΤΗΣ Lp(a).

Λίγα επίσης είναι γνωστά για τους μηχανισμούς κάθαρσης της Lp(a) από την κυκλοφορία. Αν και κάποιο ποσοστό της Lp(a) αποικοδομείται μέσω του κλασικού LDL υποδοχέα, αυτός δεν είναι ο κυριότερος τρόπος καταβολισμού της *in vivo* [291]. Η ομάδα του Snyder έδειξε ότι σε πρωτογενείς καλλιέργειες ανθρώπινων ηπατοκυττάρων, μακροφάγων ή ινοβλαστών η δέσμευση και αποικοδόμηση της Lp(a) μέσω του υποδοχέα της LDL γίνεται σε ποσοστό 10-30% σε σχέση με την LDL [292]. Επίσης σε ασθενείς με FH τα επίπεδα της Lp(a) είναι μεγαλύτερα από τα αντίστοιχα φυσιολογικών ατόμων με ίδιο φαινότυπο apo (a) [293]. Επίσης μελέτες σε διαγονιδιακά ποντίκια τα οποία υπερεκφράζουν τον LDL υποδοχέα έδειξαν ότι ο καταβολισμός της Lp(a) είναι ταχύτερος [294]. Όμως τα επίπεδα της Lp(a) σε περιπτώσεις ανεπάρκειας του LDL υποδοχέα δεν είναι αυξημένα και επίσης φάρμακα τα οποία επηρεάζουν τη δραστηριότητα του υποδοχέα δεν επηρεάζουν τα επίπεδα της Lp(a), γεγονός που δείχνει ότι υπάρχουν και άλλοι δρόμοι καταβολισμού που δεν περιλαμβάνουν τον υποδοχέα της LDL [293,295]. Η λιποπρωτεϊνική λιπάση μπορεί να συμμετέχει σε άλλες τέτοιες μεταβολικές πορείες [296]. Η ομάδα του Keesler χαρακτήρισε έναν υποδοχέα της Lp(a) στα ανθρώπινα μακροφάγα [297], και η ομάδα του Malle [298] ταυτοποίησε τη δέσμευση της Lp(a) στη γλυκοπρωτεΐνη Ib των αιμοπεταλίων [299]. Ένας νέος τρόπος μελέτης του καταβολισμού της Lp(a) είναι με τη χρήση διαγονιδιακών ποντικών [298,300]. Στην περίπτωση αυτή η apo (a) που παράγεται κυκλοφορεί ελεύθερη στο πλάσμα των ποντικών μια που δεν μπορεί να συνδεθεί με την ενδογενή apo B [301]. Στα apo B-100-apo (a) διαγονιδιακά ποντίκια η apo (a) συνδέεται με την ανθρώπινη apo B μέσω μιας δισουλφιδικής γέφυρας στο λιποπρωτεϊνικό κλάσμα του πλάσματος. Παραδόξως τα επίπεδα της apo (a) στο πλάσμα, Lp(a) διαγονιδιακών ποντικών είναι μεγαλύτερα από ότι στο πλάσμα των apo (a) διαγονιδιακών ποντικών [298-300]. Αυτό σημαίνει ότι η ένωση της apo (a) με

την ανθρώπινη apo B είτε μειώνει την κάθαρση της ελεύθερης apo (a) είτε προστατεύει από μια χαλαρή σύνδεση με την apoB του ποντικού και την κάθαρσή της μέσω του LDL υποδοχέα του ποντικού [265]. Πρόσφατα δεδομένα δείχνουν πως ένας πιθανός δρόμος καταβολισμού είναι και ο VLDL υποδοχέας που εκφράζεται από τους ινοβλάστες. Οι ινοβλάστες που εκφράζουν τον υποδοχέα αυτό ενδοκυτώνουν την Lp(a) και την αποικοδομούν μέσα στα λυσοσώματα. Αντιθέτως ινοβλάστες με ανεπάρκεια του VLDL υποδοχέα δεν μπορούν να καταβολίσουν την Lp(a) [302].

ΠΑΘΟΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ Lp(a)

Δεν έχει ακόμη προσδιοριστεί ποιος μπορεί να είναι ο φυσιολογικός ρόλος της Lp(a). Μια πιθανή βιολογική λειτουργία της Lp(a) είναι η μη ελεγχόμενη από διαίτα και ανεξάρτητη από μεταβολισμό των τριγλυκεριδίων παροχή χοληστερόλης από το ήπαρ προς τους περιφερικούς ιστούς [303,304]. Τα κύτταρα στόχοι της Lp(a) χοληστερόλης είναι τα κύτταρα των οργάνων με μεγάλη παραγωγή ορμονών, γονάδες, φλοιός επινεφριδίων ή νεφροί. Η χοληστερόλη που μεταφέρεται με την Lp(a) επειδή μπορεί και παρακάμπει την οδό των LDL-υποδοχέων προσφέρεται για άμεση χρήση όπου υπάρχει ταχεία κυτταρική αναγέννηση, ενεργός βιοσύνθεση κυτταρικών μεμβρανών και οξεία φάση φλεγμονώδους διαδικασίας. Γιαντό και η Lp(a) και πιο συγκεκριμένα η apo (a) αναφέρεται ως πρωτεΐνη οξείας φάσεως [305-308]. Μέχρι τώρα η «απουσία» Lp(a) από το πλάσμα, (μη ανιχνεύσιμα επίπεδα) δεν φαίνεται να οδηγεί σε σύνδρομο έλλειψης ή σε κάποια ασθένεια. Όμως τα δομικά χαρακτηριστικά της Lp(a) είναι υπεύθυνα για τις αθηρωγόνες και θρομβογόνες ιδιότητές της και η ίδια φαίνεται να αποτελεί την γέφυρα μεταξύ της αθηρωμάτωσης και της θρόμβωσης [272,309-311].

Παθοφυσιολογία της ινωδόλυσης και της θρόμβωσης. Ο ρόλος της Lp(a).

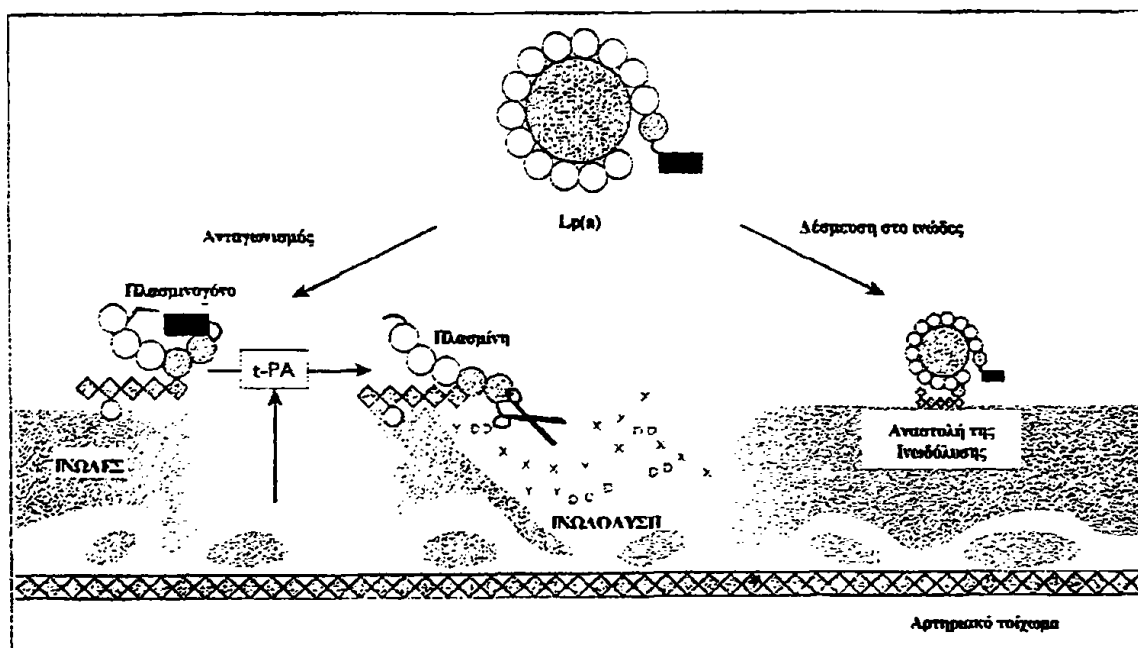
Το αγγειακό ενδοθήλιο εξασφαλίζει τη φυσιολογική ροή του αίματος αποτρέποντας την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων καθώς και άλλων παραγόντων της πήξης. Σε περίπτωση τραυματισμού ενός αγγείου ο οργανισμός παρεμποδίζει την απώλεια αίματος με την αιμόσταση, που περιλαμβάνει τους εξής μηχανισμούς-

τοπική αγγειοσύσπαση, συσσώρευση αιμοπεταλίων, πήξη του αίματος και δημιουργία θρόμβου. Η πήξη του αίματος είναι ένας μηχανισμός στον οποίο συμμετέχουν μια σειρά από πρωτεΐνες του πλάσματος οι οποίες ονομάζονται και παράγοντες πήξης. Στην ανενεργό τους μορφή οι πρωτεΐνες αυτές είναι πρωτεολυτικά ένζυμα. Κατά την διαδικασία της πήξης ενεργοποιούνται διαδοχικά η μια μετά την άλλη. Το τελικό στάδιο της πήξης είναι η μετατροπή του ινωδογόνου μιας ευδιάλυτης πρωτεΐνης του πλάσματος σε μια δυσδιάλυτη πρωτεΐνη το ινώδες. Η μετατροπή αυτή γίνεται παρουσία θρομβίνης. Η μετέπειτα πορεία της συρρίκνωσης και λύσης του θρόμβου ονομάζεται ινωδόλυση. Μόλις το τοίχωμα κάποιου αγγείου υποστεί βλάβη, το αγγείο συσπάται με σκοπό τη μείωση της ροής του αίματος. Στο σημείο της βλάβης αρχίζουν να συσσωρεύονται αιμοπετάλια τα οποία εκκρίνουν αγγειοδραστικές ουσίες, διάφορους μεταβολίτες του αραχιδονικού οξέος, και αιμοπεταλιακούς παράγοντες που είναι υπεύθυνοι για την πήξη. Επίσης το τραυματισμένο ενδοθήλιο παράγει τον ιστικό παράγοντα ο οποίος με τη σειρά του ενεργοποιεί το σχηματισμό του ινώδους. Η συσσώρευση των αιμοπεταλίων στον τόπο της βλάβης οδηγεί στο σχηματισμό μιας αιμοπεταλιακής πλάκας η οποία στην συνέχεια θα είναι η βάση για τη δημιουργία του θρόμβου. Η περαιτέρω ανάπτυξη του θρόμβου εξαρτάται από τη λειτουργία του ενδοθηλίου. Υπάρχουν αντιθρομβωτικοί μηχανισμοί όπως ο EDRF και οι προστακυκλίνες οι οποίοι αναστέλλουν τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων. Επίσης υπάρχουν σερίνοπρωτεάσες που είναι αναστολείς των ενεργοποιημένων παραγόντων πήξης καθώς και των παραγόντων V_a , V_{IIIa} που αναστέλλουν την ακινητοποίηση του ινώδους [312]. Όταν σταματήσει η αιμοραγία και επιδιορθωθεί το αγγείο ο θρόμβος πρέπει να διαλυθεί. Για το λόγο αυτό ενεργοποιείται το πλασμινογόνο προς το πρωτεολυτικό ένζυμο πλασμίνη. Η ενεργοποίηση αυτή γίνεται κυρίως από τον ιστικό t-PA και ουρικό u-PA ενεργοποιητή του πλασμινογόνου. Ο t-PA απελευθερώνεται από τα ενδοθηλιακά κύτταρα υπο την επίδραση ερεθισμάτων μεταξύ των οποίων είναι η στάση που παρατηρείται μετά από αγγειακή απόφραξη και από προϊόντα της διαδικασίας της πήξεως [313]. Ανάστολέας του είναι ο PAI-1 (plasminogen activator inhibitor 1), ο οποίος συντίθεται από πολλά είδη κυττάρων [314]. Μεταξύ αυτών τα ενδοθηλιακά κύτταρα και τα ηπατοκύτταρα φαίνεται να είναι οι κύριες πηγές του PAI-1 στο αίμα. Από τα ενδοθηλιακά κύτταρα η έκκρισή του είναι τοπική προς τον αυλό του αγγείου και προς το συνδετικό ιστό του υπενδοθηλιακού χώρου όπου ενώνεται με τη

φιβρονεκτίνη [315]. Υπάρχει και στα α-κοκκία των αιμοπεταλίων οπότε και είναι δυνατή η άμεση προσαγωγή του στο σημείο της αιμοστατικής διεργασίας [316]. Το πλασμινογόνο έχει την ικανότητα να δεσμεύεται με το ινώδες καθώς και με ειδικούς υποδοχείς, τους υποδοχείς πλασμινογόνου οι οποίοι υπάρχουν σε πολλά είδη κυττάρων όπως στα ενδοθηλιακά, στα αιμοπετάλια, και στα μονοκύτταρα [317-319].^{*} Η επίδραση του ιστικού ενεργοποιητή του πλασμινογόνου πάνω στο πλασμινογόνο αυξάνει μέχρι και 400 φορές όταν το τελευταίο βρίσκεται συνδεδεμένο με κυτταρικούς υποδοχείς κυρίως ενδοθηλιακών κυττάρων καθώς και παρουσία ινώδους. Στη δεύτερη περίπτωση σχηματίζεται σύμπλοκο μεταξύ ινώδους, t-PA και πλασμινογόνου στην επιφάνεια του θρόμβου με αποτέλεσμα να επιταχύνεται η αντίδραση διάσπασης του πεπτιδικού δεσμού Arg₅₆₁-Val₅₆₂ του πλασμινογόνου από τον t-PA. Ειδικές θέσεις του μορίου του πλασμινογόνου οι οποίες παραμένουν στο μόριο της σχηματιζόμενης πλασμίνης επιτρέπουν την σύνδεση με το ινώδες. Οι ίδιες αυτές θέσεις απαιτούνται και για τη σύνδεση της πλασμίνης με την α₂-αντιπλασμίνη (αναστολέα της πλασμίνης). Έτσι η σύνδεση του ινώδους με το πλασμινογόνο εκτός από την επιτάχυνση του σχηματισμού της πλασμίνης προστατεύει ταυτόχρονα και τη σχηματιζόμενη πλασμίνη από αναστολή. Η δράση της πλασμίνης είναι τοπική αφού η ενεργοποίηση του πλασμινογόνου από τον t-PA ασκείται κυρίως παρουσία ινώδους, αλλά και γιατί η μη συνδεδεμένη πλασμίνη η οποία διαφεύγει από το μικροπεριβάλλον του ινώδους αμέσως απενεργοποιείται από την α₂-αντιπλασμίνη [320]. Η ισορροπία μεταξύ της ινωδολυσης και της θρόμβωσης εξαρτάται από την ενεργοποίηση του πλασμινογόνου σε πλασμίνη μέσω του t-PA στη «στερεή φάση» και την αναστολή της α₂-αντιπλασμίνης και του PAI-1 στην «υγρή φάση» [321]. Η εξασθένηση της ινωδολυτικής διαδικασίας είναι αποτέλεσμα μειωμένης ενεργοποίησης ή αυξημένης αναστολής ή και των δύο λόγω της εμπλοκής του δομικού ανάλογου του πλασμινογόνου, της apo (a). Τόσο η Lp(a) όσο και η apo (a) δεν εμφανίζουν πρωτεολυτική ενεργότητα μόνες τους, ούτε παρουσία του t-PA, της ουροκινάσης ή της στρεπτοκινάσης [260] γιατί η απόληξη αργινίνης που απομακρύνεται κατά την ενεργοποίηση του πλασμινογόνου σε πλασμίνη δεν υπάρχει στην apo (a). Στη θέση αυτή βρίσκεται μια σερίνη και κατά συνέπεια η apo (a) δεν ενεργοποιείται. Η Lp(a) λοιπόν δεν έχει πρωτεολυτική δράση και κατά συνέπεια προάγει τη θρόμβωση αναστέλλοντας την ινωδολύση, (σχήμα 11). Μεταξύ των επιπέδων της Lp(a) στο πλάσμα και της φυσικής ινωδολυτικής ικανότητας υπάρχει

μια αντιστρόφως ανάλογη σχέση. Η συσσώρευση της Lp(a) στις περιοχές με αθηρωματική βλάβη έχει ως αποτέλεσμα τον αυξημένο ανταγωνισμό της Lp(a) με το πλασμινογόνο για τις θέσεις δέσμευσης στα κύτταρα και το συνδετικό ιστό με αποτέλεσμα την εξασθένηση της ινωδολυτικής δραστηριότητας, (σχήμα 11). *In vitro* μελέτες έδειξαν ότι η Lp(a) ανταγωνίζεται το πλασμινογόνο για τις θέσεις δέσμευσής του στα ενδοθηλιακά κύτταρα, τα μονοκύτταρα, τα μακροφάγα και τα αιμοπετάλια [310,311,322,323]. Η κυτταρική αυτή σειρά U-937 των μακροφάγων αποτελεί ένα καλό μοντέλο για την *in vitro* μελέτη των θέσεων δέσμευσης του πλασμινογόνου και την ενεργοποίησή του προς πλασμίνη. Η δέσμευση του πλασμινογόνου στο ινώδες γίνεται μέσω απολήξεων λυσινών των K1 και K4. Τόσο το πλασμινογόνο όσο και η Lp(a) έχουν την ίδια συγγένεια για τις θέσεις δέσμευσης [322,324] πάνω στο ινώδες. Μονοκλωνικά αντισώματα κατά των K4 περιοχών της Lp(a) παρεμπόδισαν τον ανταγωνισμό της με το πλασμινογόνο [325]. Η εκτόπιση του πλασμινογόνου από την Lp(a) από τις κυτταρικές θέσεις δέσμευσής του έχει ως αποτέλεσμα την αναστολή της μετατροπής του σε πλασμίνη. Επίσης η Lp(a) δεσμεύεται στο ακινητοποιημένο ινώδες ενώ μπορεί ταυτόχρονα και ανταγωνίζεται το πλασμινογόνο κατά την ενεργοποίησή του από τον τον t-PA και τον u-PA [310,311,326], (σχήμα 11). Σε αντίθεση με τον u-PA η ενεργοποίηση του πλασμινογόνου από τον t-PA αυξάνει όταν το πλασμινογόνο είναι συνδεδεμένο σε κύτταρα στο ινώδες ή σε γλυκοζαμινογλυκάνες [327-333]. Η Lp(a) παίζει ρόλο και στη ρύθμιση της δράσης της πλασμίνης, αν και το αποτέλεσμα δεν είναι τόσο άμεσο [255]. Επώαση της Lp(a) με πλασμίνη δεν επηρεάζει την ενεργότητα της πλασμίνης [334]. Όμως η συγκέντρωση της Lp(a) επηρεάζει τα επίπεδα της α₂-αντιπλασμίνης [335]. Η πλασμίνη προστατεύεται από την ανασταλτική δράση της α₂-αντιπλασμίνης όταν είναι δεσμευμένη στο ινώδες για το οποίο έχει και μεγαλύτερη συγγένεια από την α₂-αντιπλασμίνη. Όμως για αυτές τις θέσεις δέσμευσής της στο ινώδες ανταγωνίζεται με την Lp(a), με αποτέλεσμα η πλασμίνη να μην δεσμεύεται στο ινώδες αλλά στην α₂-αντιπλασμίνη και έτσι αναστέλλεται η δράση της και η αποικοδόμηση του θρόμβου [335-337]. Επίσης η Lp(a) αυξάνει τη σύνθεση του PAI-1 από τα ενδοθηλιακά κύτταρα αυξάνοντας έτσι το θρομβογόνο φαινότυπο των κυττάρων αυτών [338]. Η Lp(a) ανταγωνίζεται τον PAI-1 για την δέσμευσή του με τον t-PA πιθανά μέσω ενός στερικού φαινομένου [335]. Επίσης η Lp(a) εμπλέκεται στην ινωδόλυση συνδεδεμένη με την τετρανεκτίνη. Η τετρανεκτίνη είναι μια πρωτεΐνη του πλάσματος η οποία

συνδέεται αντιστρεπτά με τις περιοχές τριπλής αναδίπλωσης K4 του πλασμινογόνου και επάγει την ενεργοποίησή του από τον t-PA [339]. Φαίνεται λοιπόν πως η Lp(a) μέσω όλων αυτών των μηχανισμών μπορεί να παρεμβαίνει στην ενδογενή ινωδόλυση και θρόμβωση. Αν η δράση της Lp(a) θα προάγει ή θα καταστείλει την ινωδόλυση εξαρτάται από τη συγκεντρωσή της. Φυσιολογικές τιμές Lp(a) πιθανά να ρυθμίζουν την παραγωγή της πλασμίνης προστατεύοντας το ινωδογόνο από τη δράση του PAI, καθώς και με ανταγωνισμό για τις θέσεις δέσμευσης πάνω στον t-PA. Από την άλλη παθολογικά επίπεδα Lp(a) αναστέλλουν την ινωδόλυση πιθανά παρεμποδίζοντας μια μεγάλη ποσότητα πλασμινογόνου να προσεγγίσει τον t-PA ώστε ενεργοποιηθεί προς πλασμίνη [340].



Σχήμα 11. Παρεμβολή της Lp(a) στην ινωδόλυση.

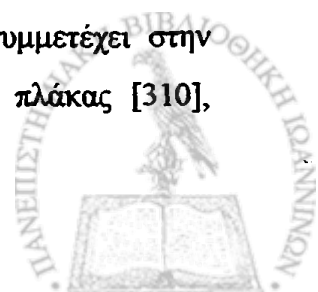
Η μείωση της φυσιολογικής ινωδολυτικής ενεργότητας συνδέει τα επίπεδα της Lp(a) στο πλάσμα με τον αυξημένου κινδύνου θρόμβωσης. Στις περιοχές των αθηρωματικών βλαβών η Lp(a) συνεντοπίζεται με το ινώδες [341]. Πρόσφατες μελέτες έδειξαν οι χαμηλού μοριακού βάρους ισομορφές σε διαφορετικής εθνικότητας πληθυσμούς σχετίζονται με τη στεφανιαία νόσο. Η ομάδα του Charman [342], έδειξε ότι η αλληλεπίδραση της apo (a) με τα συστατικά του αρτηριακού τοιχώματος εξαρτάται από το μέγεθός της. Μελετήθηκε λοιπόν η επίδραση κεκαθαρμένης Lp(a) από ομοζυώτες σε ινωδολυτικό σύστημα *in vitro*. Η ισομορφή

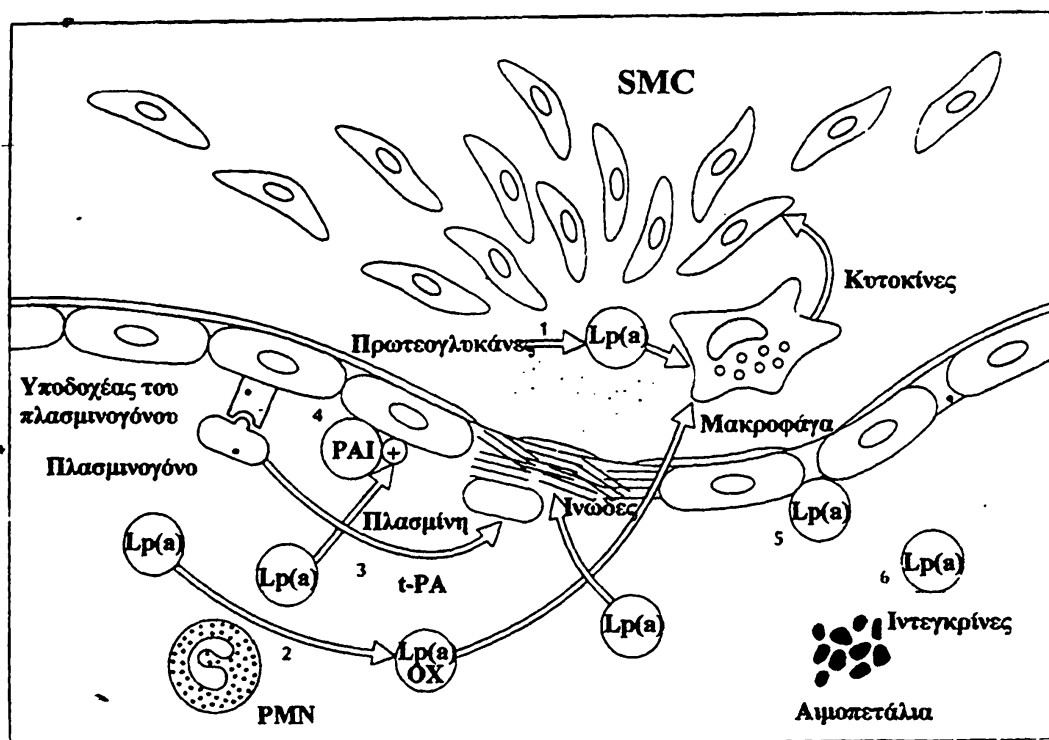
B (MB~540 kDa) φαίνεται να είναι ο πιο δυναμικός αναστολέας της ενεργοποίησης του πλασμινογόνου. Μικρότερη ανασταλτική δράση έχει η ισομορφή S1 (MB~590 kDa) ενώ η ισομορφή S2 (MB~610 kDa) δεν αναστέλλει *in vitro* την ενεργοποίηση του πλασμινογόνου. Τα αποτελέσματα αυτά σχετίζονται άμεσα και με την ικανότητα δέσμευσης των διαφόρων ισομορφών της apo (a) στο ινώδες. Την μεγαλύτερη συγγένεια με το ινώδες έχει η μικρότερη ισομορφή (B>S1>S2), με σταθερά δέσμευσης K_d 16nM. Τα δεδομένα αυτά στηρίζουν την υπόθεση πως ο αριθμός των K4 περιοχών στην apo (a) επηρεάζει την αλληλεπίδρασή της με την πλασμίνη. Η απομόνωση των περιοχών αυτών ίσως διευκρινίσει και τον ακριβή ρόλο τους.

Ο ρόλος της Lp(a) στην εξέλιξη της αθηρωματικής πλάκας

Πρώτη η ομάδα του Walton [343] με τη χρήση ανοσοϊστοχημικών μεθόδων ταυτοποίησε την ύπαρξη της Lp(a) στο αρτηριακό τοίχωμα. Λίγο αργότερα η ομάδα των Smith και Cochran [344] έδειξε τη σχέση που υπάρχει μεταξύ της συγκέντρωσης της Lp(a) στο πλάσμα και της εναπόθεσης apo (a) στο αρτηριακό τοίχωμα. Η ομάδα του Peret [345] με ποσοτικές μελέτες σε αθηρωματικές βλάβες έδειξε την προσκόλληση της Lp(a) στα συστατικά της εξωκυττάριας ουσίας. Πιθανά η Lp(a) αφού δεν μεταβολίζεται μέσω του κλασσικού υποδοχέα της LDLπροσλαμβάνεται και καταβολίζεται μέσω μη ρυθμιζόμενων μηχανισμών οι οποίοι να οδηγούν στη συσσώρευση χοληστερόλης στους ιστούς [272,310,311]. Με βάση τη θεωρία αυτή η Lp(a) προσλαμβάνεται από τον υποδοχέα εκκαθαριστή των μακροφάγων οδηγώντας στη δημιουργία αφρωδών κυττάρων και κατά συνέπεια στην ανάπτυξη της αθηρωματικής πλάκας. Η φυσική όμως Lp(a) δηλαδή το σωματίδιο εκείνο που δεν είναι συσσωματωμένο και του οποίου η apo (a) δεν έχει τροποποιηθεί με οξειδωση ή πρωτεόλυση δεν προσλαμβάνεται από τα μακροφάγα *in vitro*. Είναι όμως γνωστό πως η μηλονική διαλδεύδη που παράγεται κατά τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων τροποποιεί την Lp(a) *in vivo*. Η τροποποιημένη αυτή Lp(a) προσλαμβάνεται από τα μακροφάγα μέσω του υποδοχέα εκκαθαριστή [346]. Η Lp(a) περνά τον ενδοθηλιακό φραγμό λόγω μεγέθους και εισέρχεται στον υπενδοθηλιακό χώρο. Η μεταφορά της Lp(a) από το πλάσμα στο αρτηριακό τοίχωμα πιστεύεται πως είναι μεγαλύτερη όταν τα επίπεδα της Lp(a) στο πλάσμα είναι μεγάλα, εξαιτίας της βαθμίδωσης της ποσότητας που υπάρχει καθώς και λόγω κάποιας πιθανής δράσης της Lp(a) στην

αρτηριακή διαπερατότητα [347]. Στον υπενδοθηλιακό χώρο η Lp(a) συνδέεται με τα συστατικά της εξωκυττάριας ουσίας, κυρίως με τις θειϊκές γλυκοζαμινογλυκάνες και με την φιβρονεκτίνη [341]. Με τον τρόπο αυτό ακινητοποιείται στον υπενδοθηλιακό χώρο συνεισφέροντας έτσι στη συσσώρευση χοληστερόλης στο αγγειακό τοίχωμα. Στο μικροπεριβάλλον του αρτηριακού τοιχώματος τα σωματίδια της Lp(a) είναι ευένδωτα στην οξειδωτική και χημική τροποποίηση από ελεύθερες ρίζες οξυγόνου δισθενή ιόντα, καθώς και από τη μηλονική διαλδεύδη, την τρανσγλουταμινάση και την ομοκυστεΐνη. Όπως ακριβώς συμβαίνει και με την LDL, η φύση και η αναλογία των λιπαρών οξέων που περιέχει στους εστέρες χοληστερόλης στα τριγλυκερίδια και στα φωσφολιπίδια καθώς και το περιεχόμενό της σε αντιοξειδωτικά, καθορίζουν την οξειδωτική συμπεριφορά της. Μελέτες έχουν δείξει πως η Lp(a) περιέχει 25% λιγότερη Vit E και 40% λιγότερο β-καροτένιο από την LDL [316,348]. Τα αποτελέσματα όμως των διαφόρων μελετών όταν συγκρίνουν την οξειδωτική τροποποίηση της Lp(a) και της LDL είναι αντιφατικά. Βέβαια η μεγάλη περιεκτικότητα της Lp(a) σε σιαλικό οξύ αποτελεί έναν επιπλέον παράγοντα που επηρεάζει την οξειδωτική συμπεριφορά του φυσικού σωματιδίου. Τα προϊόντα της αποικοδόμησης των λιπούπεροξειδίων της Lp(a) προσλαμβάνονται από τον υποδοχέα εκκαθαριστή των μακροφάγων οδηγώντας σε ενδοκυττάρια συσσώρευση χοληστερόλης και στο σχηματισμό αφρωδών κυττάρων [316,348,349]. Ο καταράκτης των επιπτώσεων της οξείδωσης της Lp(a) δεν διαφέρει από αυτόν της LDL. Πρέπει επιπλέον να τονιστεί και η επίδραση της Lp(a) στα λεία μυϊκά κύτταρα του αρτηριακού τοιχώματος. Ο υπέρμετρος πολλαπλασιασμός και η μετανάστευση των λείων μυϊκών κυττάρων προάγονται από την Lp(a) μέσω της ενεργοποίησης του μετατρεπτικού αυξητικού παράγοντα β (Transforming growth factor-β, TGF-β). Ο TGF-β είναι μια πολυλειτουργική κυτταροκίνη η οποία δρά ως ισχυρός αναστολέας της αύξησης και της μετανάστευσης των λείων μυϊκών κυττάρων [350-353], ενώ επάγει τη διαφοροποίησή τους [353,354]. Εκκρίνεται υπο μη λειτουργική μορφή από διάφορους τύπους κυττάρων όπως και από τα λεία μυϊκά, και ενεργοποιείται από την δράση της πλασμίνης. Η Lp(a) παρεμποδίζοντας την ενεργοποίηση του πλασμινογόνου προς πλασμίνη παρεμποδίζει και την ενεργοποίηση του TGF-β. Φαίνεται λοιπόν πως η Lp(a) έχει προαθηρωγόνο ρόλο αφού συμμετέχει στην εναπόθεση χοληστερόλης κατά την ανάπτυξη της αθηρωματικής πλάκας [310], (σχήμα 12).





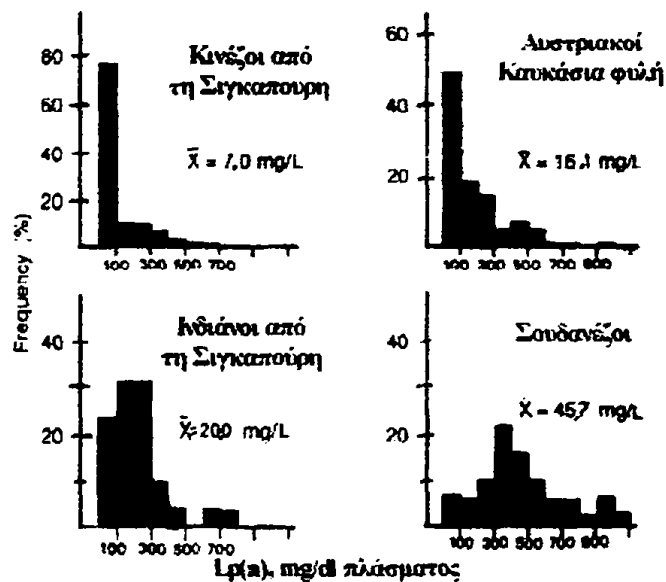
Σχήμα 12. Παθοφυσιολογικός ρόλος της Lp(a). 1. Η Lp(a) συνδέεται με τις πρωτεογλυκάνες και προσλαμβάνεται από τα μακροφάγα. 2. Πολυμορφοπύρρινα λευκοκύτταρα οξειδώνουν την Lp(a), και η οξειδωμένη μορφή προσλαμβάνεται από τα μακροφάγα. 1+2, η πρόσληψη της οξειδωμένης Lp(a) (ox-Lp(a)), από τα μακροφάγα έχει ως αποτέλεσμα την μετατροπή τους σε αφρώδη κύτταρα και την παραγωγή κυτοκινών οι οποίες δρουν χημειοτακτικά και μιτογόνα στα λεία μυϊκά κύτταρα. 3. Η Lp(a) εμπλέκεται στην ενεργοποίηση του πλασμινογόνου μέσω εκμαγείου από τον ιστικό ενεργοποιητή t-PA. 4. Η Lp(a) αυξάνει την έκκριση του αναστολέα του ενεργοποιητή του πλασμινογόνου (PAI) από τα ενδοθηλιακά κύτταρα. 5. Η Lp(a) συνδέεται στην τετρανεκτίνη προκαλώντας διαταραχή της λειτουργίας του ενδοθηλίου. 6. Η Lp(a) εμπλέκεται στην συσσώρευση των αιμοπεταλίων.

ΚΛΙΝΙΚΗ ΣΗΜΑΣΙΑ ΤΗΣ Lp(a)

Πληθυσμιακές μελέτες

Η κατανομή συχνότητας της συγκέντρωσης της Lp(a) στο πλάσμα ατόμων της καυκάσιας φυλής δεν είναι μια τυπική κατανομή κατά Gauss, αλλά εμφανίζει σημαντική θετική μετατόπιση [355]. Το μεγαλύτερο ποσοστό του πληθυσμού προσεγγίζει τις μικρότερες τιμές συγκέντρωσης Lp(a) δηλαδή < 0.1g/L. Το εύρος κατανομής είναι όμως μεγάλο από 0.01 g/L μέχρι 1 g/L και μόλις ένα 5% του πληθυσμού έχει τιμές μικρότερες από 0.01 g/L [355]. Η μαύρη φυλή έχει τα

υψηλότερα επίπεδα Lp(a) (μέση τιμή 45.7 mg/dl) και η κατανομή συχνοτήτων της πλησιάζει πιο πολύ την κατανομή Gauss [356]. Οι Κινέζοι έχουν τα χαμηλότερα επίπεδα Lp(a) (μέση τιμή 7.0 mg/dl) ακόμη και από τους καυκάσιους πληθυσμούς (μέση τιμή 16.1 mg/dl) [272]. Η κατανομή της καυκάσιας φυλής οφείλεται στην μεγαλύτερη συχνότητα εμφάνισης εκείνων των αλληλόμορφων της apo (a) που οδηγούν σε χαμηλές συγκεντρώσεις της Lp(a) στο πλάσμα [272], όπως δηλαδή του αλληλόμορφου S4, (σχήμα 13).



Σχήμα 13. Κατανομή της συγκέντρωσης της Lp(a) στο πλάσμα διαφόρων φυλών.

Οι τιμές της Lp(a) στα νεογέννητα βρίσκονται στην περιοχή των χαμηλότερων δυνατών ανιχνεύσιμων ορίων 0.005-0.03 g/L και δε συσχετίζονται με την ηλικία του εμβρύου, το γένος ή τη φυλή, όπως συμβαίνει στους ενήλικες [357]. Τα επίπεδα της Lp(a) αυξάνουν κατά τον πρώτο χρόνο ζωής και φτάνουν τις συγκεντρώσεις των ενηλίκων στο δεύτερο χρόνο [357]. Οι διαφορές στα επίπεδα της Lp(a) μεταξύ ανδρών και γυναικών της ίδιας ηλικίας είναι πολύ μικρές ως ανύπαρκτες [356,358], ενώ δεν υπάρχει καμία στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων της Lp(a) και της ηλικίας, του ύψους, του δείκτη της μάζας του σώματος, της ολικής χοληστερόλης, της HDL χοληστερόλης [358] ή της LDL χοληστερόλης [359].

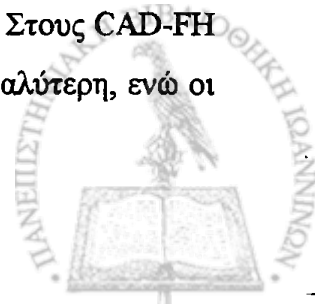
Lp(a) και στεφανιαία νόσος.

Μελέτη σε άντρες επιζήσαντες από έμφραγμα του μυοκαρδίου έδειξε ότι τα επίπεδα της Lp(a) είναι αυξημένα στην ομάδα αυτή από ότι στην αντίστοιχη ηλικιακά ομάδα των φυσιολογικών [360,361]. Στατιστική ανάλυση των δεδομένων έδειξε πως η Lp(a) δεν συσχετίζεται με άλλους παράγοντες κινδύνου (τριγλυκερίδια, ολική χοληστερόλη, HDL χοληστερόλη) κατά συνέπεια είναι ένας ανεξάρτητος παράγοντας κινδύνου για το έμφραγμα του μυοκαρδίου. Ασθενείς που υποβλήθηκαν σε διαγνωστική στεφανιαία αγγειογραφία με υποψία στεφανιαίας νόσου και με προσβεβλημένα αγγεία είχαν στατιστικά μεγαλύτερα επίπεδα Lp(a) από αυτούς με φυσιολογικά αγγεία [362]. Τα αποτελέσματα όμως είναι αντιφατικά στη συσχέτιση των επιπέδων της Lp(a) και του αριθμού των προσβεβλημένων αγγείων ασθενείς με CAD. Σε μια προοπτική (prospective) μελέτη που έγινε από τους Hearn et al. [363] μετρήθηκαν τα επίπεδα λιπιδίων, απολιποπρωτεϊνών και της Lp(a) μετά από 10 μήνες σε ασθενείς που είχαν υποβληθεί σε αγγειοπλαστική των στεφανιαίων. Τα διάμεσα επίπεδα Lp(a) των ασθενών που εμφάνισαν επαναστένωση των στεφανιαίων ήταν στατιστικά μεγαλύτερα από τα αντίστοιχα των ασθενών που δεν εμφάνισαν επαναστένωση. Ο βαθμός επαναστένωσης ήταν επίσης ανάλογος των επιπέδων της Lp(a). Τέλος υψηλά επίπεδα Lp(a) έχουν αναφερθεί και σε ασθενείς με επαναστένωση έπειτα από επέμβαση στεφανιαίας παράκαμψης [364]. Ο προσδιορισμός των ισομορφών της apo (a) σε ασθενείς με στεφανιαία νόσο και σε φυσιολογικούς, διαφόρων εθνοτήτων, έδειξε μεγαλύτερη συχνότητα εμφάνισης των ισομορφών εκείνων που συνδέονται με υψηλά επίπεδα Lp(a) στους ασθενείς όλων των εθνοτήτων από ότι στους φυσιολογικούς [365]. Είναι πιθανό να υπάρχουν αλληλόμορφα στο γενετικό τόπο της apo (a) τα οποία να προσδιορίζουν τον κίνδυνο εμφάνισης στεφανιαίας νόσου μέσω της συγκέντρωσης της Lp(a) στο πλάσμα [365]. Αντίθετα μελέτες στο πληθυσμό της Ιαπωνίας δεν έδωσαν διαφορές στην συχνότητα εμφάνισης των διαφόρων αλληλόμορφων της apo (a) μεταξύ ασθενών με CAD και φυσιολογικών ατόμων [366]. Ενδιαφέρον όμως παρουσιάζουν οι μελέτες στις οποίες τα επίπεδα της Lp(a) είναι μεγαλύτερα σε στεφανιαίους ασθενείς από ότι στους αντίστοιχους φυσιολογικούς παρόλο που οι ισομορφές της apo (a) είναι ίδιες [365,366]. Αυτό συμβαίνει με τους πιο συνηθισμένους φαινότυπους της Lp(a), παρόλο που οι μηχανισμοί είναι άγνωστοι. Πιθανά να οφείλεται στην ετερογένεια

του γενετικού τόπου που δεν μπορεί να διαφανεί με τις μεθόδους προσδιορισμού των ισομορφών, μπορεί όμως και να παίζουν ρόλο διάφοροι γενετικοί και περιβαλλοντικοί παράγοντες [365,366]. Η επικρατέστερη υπόθεση λέει πως ο γενετικός τόπος της apo (a) επηρεάζει την εμφάνιση της στεφανιαίας νόσου όχι μόνο γιατί επηρεάζει τα επίπεδα της Lp(a) αλλά γιατί επιπλέον ρυθμίζει τη λειτουργικότητα της apo (a). Πρόσφατες μελέτες που αποδεικνύουν ότι οι μικρού μοριακού βάρους ισομορφές της apo (a), ανταγωνίζονται πιο αποτελεσματικά το πλασμινογόνο για τις θέσεις δέσμευσης στο ινώδες από ότι οι μεγάλου μοριακού βάρους ισομορφές, αποτέλεσαν την βάση για την υπόθεση αυτή.

Lp(a) και δυσλιπιδαιμία

Πολλές μελέτες έχουν γίνει για την πιθανή σχέση της Lp(a) με τους διάφορους τύπους δυσλιπιδαιμίας. Η ομάδα του Boyer [367] μέτρησε τα επίπεδα της Lp(a) στον ορό 1065 ατόμων με φυσιολογικές και υψηλές τιμές λιπιδίων. Τα διάμεσα επίπεδα της Lp(a) ήταν μικρότερα στα νορμολιπιδαιμικά άτομα από ότι στα άτομα με δυσλιπιδαιμία στα οποία περιλαμβάνονταν άτομα με υπερλιπιδαιμία τύπου Πα (με ή χωρίς ξανθώματα), Pb και IV. Μεταξύ των διαφόρων δυσλιπιδαιμικών ομάδων τα διάμεσα επίπεδα της Lp(a) δεν παρουσίαζαν στατιστικά σημαντικές διαφορές. Φυσιολογικά επίπεδα Lp(a) βρέθηκαν σε ομοζυγώτες apo E2/2 με τύπου III υπερλιποπρωτεϊναιμία, όμως μειωμένα ήταν τα επίπεδα της Lp(a) σε άτομα με έλλειψη λιποπρωτεϊνικής λιπάσης (τύπου I υπερλιποπρωτεϊναιμία) [368]. Τα επίπεδα της Lp(a) σε ετεροζυγώτες με οικογενή υπερχοληστερολαιμία είναι αυξημένα συγκριτικά με τα αντίστοιχα των φυσιολογικών όπως προσδιορίστηκαν από τις ομάδες Utermann [365] και Mbewu [369]. Επίσης η μελέτη της ομάδας Soutar [370], που έγινε σε 115 ασθενείς με οικογενή υπερχοληστερολαιμία, 54 από τους οποίους είχαν έμφραγμα του μυοκαρδίου, έδειξε ότι τα επίπεδα της Lp(a) είναι στατιστικά μεγαλύτερα στους εμφραγματίες υπερχοληστερολαιμικούς (CAD-FH) και πως τα επίπεδα της Lp(a) είναι ο καλύτερος διαφορικός παράγοντας μεταξύ των δύο ομάδων των υπερχοληστερολαιμικών, συγκρινόμενος με όλες τις τιμές λιπιδίων και λιποπρωτεϊνών, καθώς και με την ηλικία, το φύλλο και το κάπνισμα. Στους CAD-FH η συχνότητα εμφάνισης των μικρών ισομορφών της apo (a) είναι μεγαλύτερη, ενώ οι μεγάλες ισομορφές είναι πιο συχνές στους μη εμφραγματίες [370].



Lp(a) διαβήτης και νεφρικές παθήσεις

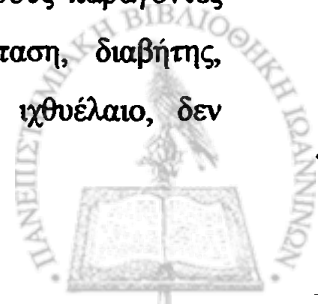
Αντιφατικά είναι τα αποτελέσματα των μελετών για τα επίπεδα της Lp(a) σε διαβητικούς ασθενείς. Η ομάδα του Schemthaler [371] παρατήρησε ότι οι ασθενείς με σακχαρώδη διαβήτη έχουν τριπλάσια πιθανότητα από τους φυσιολογικούς η συγκέντρωση της Lp(a) στο πλάσμα τους να ξεπερνά τα 200mg/dl [371]. Λίγο αργότερα ανακοινώθηκαν αυξημένα επίπεδα Lp(a) στο πλάσμα ασθενών με ινσουλινοεξαρτώμενο διαβήτη IDDM (insulin dependent diabetes mellitus) καθώς και στο πλάσμα ασθενών με μη ινσουλινοεξαρτώμενο διαβήτη NIDDM, (non insulin dependent diabetes mellitus) σε σχέση με φυσιολογικά άτομα [372,373]. Τα αποτελέσματα αυτά όμως δεν επαληθεύτηκαν από τις ομάδες των Austin [374], Joven και Villela [375] καθώς και του Haffner [376]. Άγνωστος παραμένει επίσης ο τρόπος με τον οποίο η ρύθμιση του σακχαρώδους διαβήτη επηρεάζει τα επίπεδα της Lp(a) αφού και εδώ τα αποτελέσματα των διαφόρων μελετών είναι αντιφατικά [372,377-379]. Πιθανά για να είναι πιο εύκολη η εξαγωγή συμπεράσματος πρέπει να ληφθούν υπόψη και οι φαινότυποι της Lp(a) πέρα από τα επίπεδά της. Επίσης ενδιαφέρον παρουσιάζει και η συσχέτιση της Lp(a) με την νεφρική ανεπάρκεια. Ασθενείς με IDDM και μικροαλβουμινουρία ή πρωτεϊνουρία έχουν μεγαλύτερα επίπεδα Lp(a) από τους ασθενείς με IDDM και φυσιολογική νεφρική λειτουργία [380-382]. Τα επίπεδα της Lp(a) μπορεί να είναι η αιτία για τον αυξημένο κίνδυνο εμφράγματος του μυοκαρδίου που εμφανίζουν τα άτομα αυτά. Σε ασθενείς με νεφρική νόσο χωρίς διαβήτη τα επίπεδα της Lp(a) είναι διπλάσια και τριπλάσια από τα αντίστοιχα των φυσιολογικών [383]. Σε μελέτη για τον συσχετισμό της Lp(a) με την χρόνια νεφρική ανεπάρκεια [384], διαφορές στα επίπεδα της Lp(a) μεταξύ φυσιολογικών και ασθενών αναδείχθηκαν μόνο όταν λήφθηκαν υπόψη παράγοντες όπως η εθνικότητα και ο διαβήτης. Στη μελέτη αυτή ο τύπος θεραπείας της χρόνιας νεφρικής ανεπάρκειας (δίαιτα, αιμοδιάλυση, περιτοναϊκή διάλυση) δεν φάνηκε να επηρεάζει τα επίπεδα Lp(a) των ασθενών, ούτε και υπήρξε συσχετισμός με τα επίπεδα της κρεατινίνης τους [384]. Διατυπώθηκε η υπόθεση πως η αύξηση των επιπέδων της Lp(a) συμβαίνει στα πρώτα στάδια της νόσου, ή εναλλακτικά τα αυξημένα επίπεδα της Lp(a) επιταχύνουν την πορεία της χρόνιας νεφρικής ανεπάρκειας [384]. Μεταμόσχευση νεφρών σε ασθενείς που βρίσκονται στα τελικά στάδια της νόσου οδήγησε σε μείωση των επιπέδων της Lp(a) τα οποία είχαν και στατιστικά σημαντική

συσχέτιση με την κάθαρση της κρεατινίνης [385]. Νεώτερες μελέτες έδειξαν ότι ο τρόπος θεραπείας της χρόνιας νεφρικής ανεπάρκειας επηρεάζει τα επίπεδα της Lp(a) [386]. Έτσι ασθενείς που δεν ακολουθούσαν καμία θεραπεία ή ακολουθούσαν περιτοναϊκή κάθαρση είχαν αυξημένα επίπεδα Lp(a) ενώ τα επίπεδα της Lp(a) όσων είχαν υποβληθεί σε μεταμόσχευση νεφρών ή σε αιμοκάθαρση δεν διέφεραν από αυτά των φυσιολογικών [386].

ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΗ ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ ΤΗΣ Lp(a)

Επίδραση της διατροφής

Ο κυριότερος ρυθμιστής των επιπέδων της Lp(a) φαίνεται να είναι κάποιος γενετικός μηχανισμός. Πολλές μελέτες έγιναν για να ελεγχθεί αν η διατροφή μπορεί να επηρεάσει τα επίπεδα της Lp(a) στο πλάσμα. Η ομάδα του Albers [387,388] μελέτησε σε μικρή ομάδα ατόμων την επίδραση διαίτας με μεγάλη περιεκτικότητα σε χοληστερόλη. Τα επίπεδα της Lp(a) παρέμειναν σταθερά αυξήθηκαν όμως τα επίπεδα της apo B. Σε άλλες μελέτες χρησιμοποιήθηκαν δίαιτες με χαμηλή περιεκτικότητα σε λιπαρά όπως επίσης και δίαιτες γαλακτοχορτοφάγων. Σε καμία από τις μελέτες αυτές δεν παρατηρήθηκε μείωση των επιπέδων της Lp(a) [389,390]. Συγκριτική μελέτη μεταξύ παχύσαρκων και μη προεμμηνοπαυσιακών γυναικών από την ομάδα του De Pergola δεν έδειξε κάποια σχέση μεταξύ των επιπέδων της Lp(a) και του βάρους [391]. Οι ομάδες των Mensink [392] και Nestel [393] σε παράλληλες μελέτες έδειξαν ότι η χρήση στη διατροφή μονοακόρεστων λιπαρών οξέων και του τρανς λιπαρού οξέος, ελαιϊκού αυξάνει τα επίπεδα της Lp(a) στο πλάσμα. Τα λιπαρά αυτά τα οποία αυξάνουν και τα επίπεδα της LDL χρησιμοποιήθηκαν μετά από υδρογόνωση εμπορικών πολυακόρεστων λιπαρών οξέων. Ιχθυέλαια που περιέχουν δεκαεξανοϊκό και εικοσιπεντανοϊκό οξύ (ω -3 πολυακόρεστα) έχουν ευεργετική επίδραση στις λιποπρωτεΐνες και φαίνεται να έχουν προστατευτικό ρόλο και στα καρδιαγγειακά νοσήματα. Τα ιχθυέλαια εμπλέκονται σε διάφορα στάδια της βιοσύνθεσης των λιποπρωτεϊνών και κυρίως της VLDL [394] χωρίς ακόμη να είναι γνωστοί οι μηχανισμοί. Μελέτες σε υγιείς εθελοντές και σε άτομα με διάφορους παράγοντες κινδύνου για την ανάπτυξη καρδιαγγειακών παθήσεων (υπέρταση, διαβήτης, υπερλιπιδαιμία, ασταθής στηθάγχη) στους οποίους χορηγήθηκε ιχθυέλαιο, δεν



έδειξαν μεταβολή στα επίπεδα της Lp(a) [395]. Θετική επίδραση είχε η χορήγηση ιχθυελαίου σε υπερτριγλυκεριδαμικούς ασθενείς όπου παρατηρήθηκε μείωση στα επίπεδα της Lp(a) [365], σε άτομα όμως με οικογενή υπερχοληστερολαιμία το ιχθυέλαιο σε συνδυασμό με πραβαστατίνη δεν είχε καμία επίδραση στα επίπεδα της Lp(a) [396]. Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι η ανταπόκριση της Lp(a) στο ιχθυέλαιο είναι ετερογενής και εξαρτάται από το μεταβολικό σύνδρομο του ατόμου στο οποίο χορηγείται.

Επίδραση φαρμάκων

Ρεζίνες χολικού οξέος και αναστολείς της 3-υδρόξυ-3-μεθυλογλουταρυλο συνένζυμο Α αναγωγάσης (HMG CoA αναγωγάσης).

Ελάχιστα υπολιπιδαιμικά φάρμακα τα οποία μειώνουν τα επίπεδα της LDL επηρεάζουν και τα επίπεδα της Lp(a) παρόλες της δομικές ομοιότητες των δυο λιποπρωτεϊνών. Οι ρεζίνες του χολικού οξέος καθώς και οι αναστολείς της HMG CoA αναγωγάσης δεν μειώνουν τα επίπεδα της Lp(a) [388,397-400], αντιθέτως μάλιστα σε κάποιες μελέτες παρουσιάστηκε μια μικρή αύξηση των επιπέδων της Lp(a) μετά από χορήγηση αναστολέων της HMG CoA αναγωγάσης [399,401,402]. Οι περισσότερες από αυτές τις μελέτες ήταν βραχυπρόθεσμες, τα ίδια αποτελέσματα όμως έδωσαν και μακράς διάρκειας μελέτες σε υπερχοληστερολαιμικά άτομα [403-405]. Τόσο οι ρεζίνες του χολικού οξέος όσο και οι αναστολείς της HMG CoA αναγωγάσης ρυθμίζουν τη δραστηριότητα του κλασικού υποδοχέα της LDL, και αφού ο ρόλος του στον μεταβολισμό της Lp(a) φαίνεται να είναι περιορισμένος [272,406,407] τα αποτελέσματα ήταν αναμενόμενα.

Νικοτινικό οξύ

Η δράση του νικοτινικού οξέος εντοπίζεται σε επίπεδο σύνθεσης αφού μειώνει τη λιπόλυση στο λιπώδη ιστό και τη μεταφορά λιπαρών οξέων στο ήπαρ με αποτέλεσμα τη μείωση της ηπατικής παραγωγής VLDL. Χορήγηση νικοτινικού οξέος είτε ως μονοθεραπεία είτε σε συνδυασμό με νεομυκίνη είχε ως αποτέλεσμα την μείωση των επιπέδων της Lp(a) [408,409]. Η ομάδα της Seed [410], μελέτησε την καθημερινή χορήγηση νικοτινικού οξέος για 2 μήνες σε υπερχοληστερολαιμικά άτομα με αρχικά επίπεδα Lp(a) > 30mg/dl. Σε 14 από τα 26 άτομα που ολοκλήρωσαν



τη θεραπεία, τα επίπεδα της Lp(a) μειώθηκαν κατά 36%. Στα υπόλοιπα άτομα διακόπηκε η χορήγηση του φαρμάκου εξαιτίας παρενεργειών. Η μείωση των επιπέδων της Lp(a) εντοπίζεται στο ρυθμό βιοσύνθεσής της αφού μελέτες του ρυθμού μεταβολισμού της δεν έδειξαν αλλαγή σε καταβολικό επίπεδο. Χορήγηση αναλόγων του νικοτινικού οξέος τα οποία είχαν λιγότερες παρενέργειες, όπως τα acipimox, και nicergitrol είχε ως αποτέλεσμα μικρότερη μείωση στα επίπεδα της Lp(a). Αν και ο μηχανισμός δράσης του νικοτινικού οξέος δεν έχει πλήρως εξακριβωθεί είναι το κυριότερο μέσο ρύθμισης των επιπέδων της Lp(a). Ισορροπία μεταξύ της ευεργετικής επίδρασης του νικοτινικού οξέος και των παρενεργειών του μπορεί να επιτευχθεί με τη χρήση των αναλόγων του.

Φιμπράτες

Ο μηχανισμός μέσω του οποίου δρουν οι φιμπράτες περιλαμβάνει μείωση της έκκρισης ελεύθερων λιπαρών οξέων από το λιπώδη ιστό, αναστολή της βιοσύνθεσης τριγλυκεριδίων από το ήπαρ καθώς και αυξημένη ενεργότητα λιποπρωτεϊνικής λιπάσης μετά από χορήγηση ηπαρίνης. Οι μελέτες της επίδρασης των φιμπρατών στα επίπεδα της Lp(a) δεν ήταν καταληκτικές, γιατί σε άλλες παρατηρήθηκε μια μικρή μείωση των επιπέδων της Lp(a) στο πλάσμα ενώ σε άλλες όχι [397,411,412]. Σε μια διπλή τυφλή placebo μελέτη, η καθημερινή χορήγηση 400 mg besafibrate οδήγησε σε πτώση των επιπέδων της Lp(a) κατά 13%. Αντίθετα το gemfibrozil δεν φαίνεται να επηρεάζει τα επίπεδα της Lp(a) σε ανθρώπους, ενώ μελέτες που έγιναν σε πηθήκους έδειξαν μια δοσοεξαρτώμενη μείωση των επιπέδων της Lp(a) [413]. Το ενδιαφέρον είναι πως παρόλο που η δόση ήταν διπλάσια με οχταπλάσια (50-200 mg/Kg ημερησίως) από την καθιερωμένη μικρότερη δόση υπολιπιδαιμικής θεραπείας (50-200 mg/Kg ημερησίως), η μείωση των επιπέδων της Lp(a) ήταν γύρω στο 16% [414].

Προμπουκόλη

Δεν παρατηρήθηκε επίδραση της προμπουκόλης στα επίπεδα της Lp(a) του πλάσματος [415,416] υπάρχει όμως μία μελέτη που δείχνει πως το η προμπουκόλη αυξάνει την αντίσταση της Lp(a) στην οξειδωτική τροποποίηση [416].



Πλασμαφαίρεση

Εξαιτίας της δομικής συσχέτισης που υπάρχει μεταξύ των σωματιδίων της LDL και της Lp(a) κατά την διαδικασία πλασμαφαίρεσης της LDL απομακρύνεται και η Lp(a), και αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση των επιπέδων της στο πλάσμα. [417,418]. Η διαδικασία αυτή είναι όμως ακριβή, πρέπει να επαναλαμβάνεται συχνά και χρησιμοποιείται κυρίως για τη μείωση των επιπέδων της LDL σε ασθενείς με οικογενή υπερχοληστερολαιμία υψηλού κινδύνου, οι οποίοι είναι ανθεκτικοί στη συνήθη φαρμακευτική αντιμετώπιση. Σε μελέτη πρόληψης της επαναστένωσης μετά από αγγειοπλαστική σε ασθενείς με οξεία μείωση των επιπέδων της Lp(a) > 50% με πλασμαφαίρεση, η συχνότητα επαναστένωσης ήταν μικρότερη [419]. Πρόσφατα έγινε δυνατή η ανοσοαπορρόφηση της Lp(a) [420]. Με αυτό το σύστημα αφαίρεσης τα επίπεδα της LDL παραμένουν ανεπηρέαστα και αυτός πιθανά να είναι ένας νέος δρόμος για την αντιμετώπιση της Lp(a) χωρίς να επηρεάζεται η LDL.

Επίδραση ορμονών

Επίδραση ορμονών φύλλου

Τα ανδρογόνα, τα οιστρογόνα, η προγεστερόνη μειώνουν τα επίπεδα της Lp(a). Το πρώτο φάρμακο που βρέθηκε να επηρεάζει την συγκέντρωση της Lp(a) είναι το ανδρογόνο stanozolol [421] ενώ ακολούθησαν και άλλα ανδρογόνα όπως το danazole και το tibolone [422-424]. Σε μελέτη που περιελάμβανε άτομα με καρκίνο του προστάτη, η χορήγηση μεγάλης δόσης οιστρογόνων μείωσε τα επίπεδα της Lp(a) μέχρι και 50%, ενώ η ορχεκτομή οδήγησε σε αύξηση των επιπέδων της Lp(a) κατά 20% [425]. Σε μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες η χορήγηση οιστρογόνων όπως και του συνδυασμού οιστρογόνων και προγεστερόνης μείωσε τα επίπεδα της Lp(a) [426,427]. Επίσης σε 6 γυναίκες με καρκίνο του στήθους η χορήγηση tamoxifen το οποίο εκτός από τις ποικίλες δράσεις του είναι και αγωνιστής των οιστρογόνων [428] είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση των επιπέδων της Lp(a).

Επίδραση άλλων ορμονών

Ένας μεγάλος αριθμός ορμονών φαίνεται να επηρεάζει τα επίπεδα της Lp(a) χωρίς ακόμη οι μηχανισμοί δράσης τους να έχουν πλήρως διασαφηνιστεί. Χορήγηση αυξητικής ορμόνης σε φυσιολογικά άτομα καθώς και σε άτομα με ανεπάρκεια της ορμόνης αυτής είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση των επιπέδων της Lp(a) [429,430].

Χρησιμοποιώντας ένα μακράς δράσης ανάλογο της σωματοτροπίνης, το octreotide σε 15 άτομα με μεγαλακρία και υψηλά επίπεδα Lp(a) οδήγησε στην μείωση των επιπέδων της Lp(a) [431]. Επίσης μείωση των επιπέδων της Lp(a) επιτυγχάνεται και με τη χορήγηση dexamethasone ή corticotropin σε φυσιολογικά άτομα [432]. Ο ρόλος των ορμονών του θυροειδή είναι ακόμη αντιφατικός για την Lp(a) αν και είναι γνωστό πως παίζουν ρόλο στο μεταβολισμό της LDL.



ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

Η ΑΚΕΤΥΛΟΪΔΡΟΛΑΣΗ ΤΟΥ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗΣ ΤΩΝ ΑΙΜΟΠΕΤΑΛΙΩΝ

Ο ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗΣ ΤΩΝ ΑΙΜΟΠΕΤΑΛΙΩΝ, PAF

Ο Παράγοντας Ενεργοποίησης των Αιμοπεταλίων, PAF (Platelet-Activating Factor) αρχικά περιγράφηκε ως ένας δραστικός διαμεσολαβητής που εκκρίνεται από τα λευκοκύτταρα κουνελιού όταν αυτά υποβληθούν σε αναφυλακτικό σόκ. Προκαλεί επίσης έκκριση και συσώρευση σε αιμοπετάλια κουνελιού *in vitro* [433,434]. Η τελευταία αυτή βιολογική του δράση είναι υπεύθυνη για την ονομασία που του δόθηκε το 1972 από τους Benveniste et al [435] όταν ακόμη ήταν άγνωστος ο χημικός του τύπος. Η χημική του δομή ταυτοποιήθηκε το 1979 από τους Demopoulos et al ως 1-O-αλκυλο-2-ακετυλο-sn-γλυκερο-3-φωσφοχολίνη [436-438], οι οποίοι τον συνέθεσαν και χημικά. Το 1980 ομάδα του Hanahan [439], ταυτοποίησε τη δομή του φυσικού PAF που βιοσυντίθεται *in vitro* από ενεργοποιημένα βασεόφιλα κουνελιού. Ο PAF υπο φυσιολογικές συνθήκες υπάρχει στα διάφορα κύτταρα σε μικρές, πολλές φορές μη ανιχνεύσιμες ποσότητες. Παράγεται όμως σε μεγάλες ποσότητες από αυτά όταν διεγερθούν. Οι κυριότερες κυτταρικές πηγές του είναι τα βασεόφιλα, τα πολυμορφοπύρρηνα, τα ουδετερόφιλα, τα μακροφάγα (περιτοναϊκά και κυψελιδικά), τα μονοκύτταρα, τα μαστοκύτταρα, τα ηωσινόφιλα, τα αιμοπετάλια, τα ενδοθηλιακά κύτταρα, τα νεφρικά κύτταρα, το πρωτόζωο *Tetrahymena pyriformis* και διάφορα βακτήρια [440]. Η ποικιλομορφία των κυττάρων που εκκρίνει PAF δείχνει ότι το φωσφολιπίδιο αυτό παίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση των οξέων και χρόνιων φλεγμονωδών αντιδράσεων.[441]. Ο PAF είναι ένας ισχυρός βιοδραστικός παράγοντας που μπορεί να δράσει ως αυτακοειδές αλλά και ως παρακρινικό μόριο. Όλα τα κύτταρα τα οποία παράγουν PAF αποτελούν τα ίδια και στόχους των βιολογικών δράσεων που προκαλούνται από το PAF. Οι κυριότερες δράσεις του PAF στα διάφορα κύτταρα στόχους συνοψίζονται στον πίνακα 3.

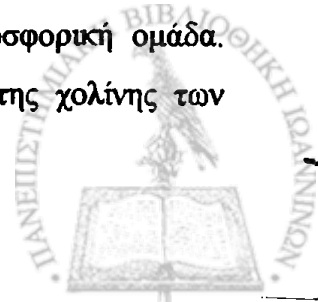


Πίνακας 3. Δράσεις του PAF σε κύτταρα στόχους.

Κύτταρο στόχος	Απόκριση στην ενεργοποίηση με PAF.
Αιμοπετάλια	Έκκριση, συσώρευση, αλλαγή σχήματος, ενεργοποίηση του κύκλου του PI και προϊόντων μεταβολισμού του αραχιδονικού οξέος, σύνθεση TXA ₂ , φωσφορυλίωση πρωτεϊνών.
Ουδετερόφιλα	Αποκοκκίωση, Αυξημένη προσκόλληση, συσώρευση, χημειοτακτισμός, έκκριση λυσοσωμιακών ενζύμων, Σύνθεση LT, παραγωγή HETE, ενεργοποίηση του κύκλου του PI, αύξηση ελεύθερου ενδοκυττάριου ασβεστίου.
Ηωσινόφιλα	Σύνθεση LT, Παραγωγή ανιόντος του υπεροξειδίου, χημειοτακτισμός.
Μονοκύτταρα / Μακροφάγα	Χημειοτακτισμός, διαφοροποίηση, συσώρευση, σύνθεση TXA ₂ και PG, παραγωγή TNF και ανιόντος υπεροξειδίου, παραγωγή IL, αύξηση ελεύθερου ενδοκυττάριου ασβεστίου.
Ενδοθηλιακά	Αύξηση ελεύθερου ενδοκυττάριου ασβεστίου, έκκριση του ενεργοποιητή του πλασμινογόνου, δομικές αλλαγές, σύνθεση TXA ₂ και PG
Λεία μυϊκά	Αύξηση ελεύθερου ενδοκυττάριου ασβεστίου, ενεργοποίηση του κύκλου του PI, σύνθεση PG
Πρωτόζωα (Tetrahymena Pyriiformis)	Ενεργοποίηση της βιοσύνθεσης PG, αύξηση του ενδοκυττάριου ασβεστίου αύξηση της γλυκογονόλυσης

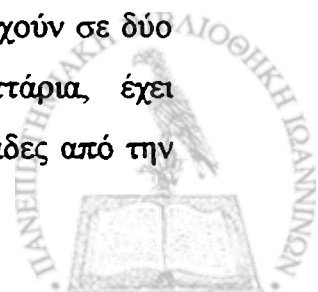
PI: φωσφατιδυλινοσίτης, TXA₂ θρομβοξάνιο A₂, LT: λευκοτριένιο, HETE:υδροξυεικοσατριένιο, PG:προσταγλανδίνη, IL:ιντερλευκίνη.

Ο PAF είναι ένα φωσφολιπίδιο, δομικό ανάλογο της φωσφατιδυλοχολίνης. Ο φυσικής προέλευσης PAF, που απομονώθηκε από ευαισθητοποιημένα βασεόφιλα κουνελιού μετά από ενεργοποίησή τους, [439] περιέχει δύο κυρίως λιπαρές αλυσίδες 16 ή 18 ατόμων άνθρακα, (σε ποσοστό 10 και 90% αντίστοιχα) οι οποίες συνδέονται με αιθερικό δεσμό στη θέση 1 του γλυκερινικού σκελετού. Στη δεύτερη θέση υπάρχει εστεροποιημένη μια οξεική ομάδα που είναι υπεύθυνη και για τη βιολογική δραστηριότητα του μορίου. Τέλος χαρακτηριστική πολική ομάδα στη τρίτη θέση του γλυκερινικού σκελετού είναι η χολίνη που συνδέεται με τη φωσφορική ομάδα. Σήμερα, λέγοντας PAF εννοούμε μια οικογένεια φωσφολιπιδίων της χολίνης των



οποίων η βιολογική δραστηριότητα εξαρτάται από το μήκος των λιπαρών αλυσίδων στην 1 και 2 θέση, [442-444] με πλέον δραστικό μόριο τον PAF (1-O-παλμιτοϋλο-2-ακετυλο-sn-γλυκερο-3-φωσφοχολίνη), που είναι δραστικός σε συγκεντρώσεις 10^{-11} - 10^{-10} M.

Έχουν περιγραφεί διάφορες πορείες βιοσύνθεσης του PAF. Οι πιο γνωστές από τις οποίες είναι η πορεία ανάπλασης (remodeling pathway) που θεωρείται υπεύθυνη για την παραγωγή του PAF μετά από διέγερση φλεγμονωδών κυττάρων, και η «εκ νέου» (de novo) πορεία με την οποία παράγονται οι χαμηλές συγκεντρώσεις του PAF, που υπάρχουν σε φυσιολογικές συνθήκες στα διάφορα κύτταρα. Η πορεία ανάπλασης απαιτεί κυτταρική διέγερση με ενεργοποίηση μιας ενδοκυττάριας φωσφολιπάσης A_2 , (PLA_2), η οποία παρουσία ιόντων ασβεστίου υδρολύει τον εστερικό δεσμό στην sn-2 θέση της ενδοκυττάριας 1-O-αλκυλο-2-ακυλο-sn-γλυκερο-3-φωσφοχολίνη παράγοντας 1-O-αλκυλο-2-λυσσο-sn-γλυκερο-3-φωσφοχολίνη γνωστή και ως λυσο-PAF, (Lyso-PAF) και αραχιδονικό οξύ, το οποίο είναι και η πρόδρομη ένωση βιοσύνθεσης προσταγλανδινών, θρομβοξανίου, και λευκοτριενίων. Ο Lyso-PAF που παράγεται μπορεί να ακολουθήσει 2 πορείες: είτε επανακυλιώνεται με τη δράση μιας ακυλοτρανσφεράσης [445,446], είτε ακετυλιώνεται με τη δράση μιας ακετυλοτρανσφεράσης προς το βιολογικά δραστικό 1-O-αλκυλο-2-ακετυλο-sn-γλυκερο-3-φωσφοχολίνη (PAF) [447,448]. Η δράση και των δυο αυτών ενζύμων εξαρτάται από την ύπαρξη συνενζύμου A (CoA) καθώς και Ca^{2+} . Νεώτερα όμως δεδομένα δείχνουν ότι η βιοσυνθετική πορεία ανάπλασης του PAF, συνδυάζει τις ενεργότητες μιας PLA_2 και μιας ανεξάρτητης από το CoA τρανσακυλάσης. Για να σχηματιστεί Lyso-PAF μέσω αυτής της πορείας είναι απαραίτητη η ύπαρξη αραχιδονικού ή άλλου πολυακόρεστου λιπαρού οξέος στη θέση 2 της πρόδρομης ένωσης [449-454]. Πρόσφατα ταυτοποιήθηκε και η δράση μιας νέας ανεξάρτητης από το CoA, PAF τρανσακετυλάσης, που χρησιμοποιεί τον PAF ως δότη οξικής ομάδας και διάφορα λυσοφωσφολιπίδια και αλκοόλες ως μόρια δέκτες [455]. Επίσης έχει αναφερθεί πως η LCAT από ανθρώπινο πλάσμα καταλύει τη μεταφορά της οξικής ομάδας από τον PAF στην Lyso-PC [456]. Οι ενεργότητες της LCAT και της ανεξάρτητης από το CoA τρανσακετυλάσης αντιστοιχούν σε δύο διαφορετικά ένζυμα αφού η PAF-τρανσακετυλάση είναι ενδοκυττάρια, έχει μικρότερη μάζα και δε μεταφέρει μεγάλες ακυλομάδες ούτε οξικές ομάδες από την PC στην χοληστερόλη, όπως συμβαίνει με την LCAT [455].

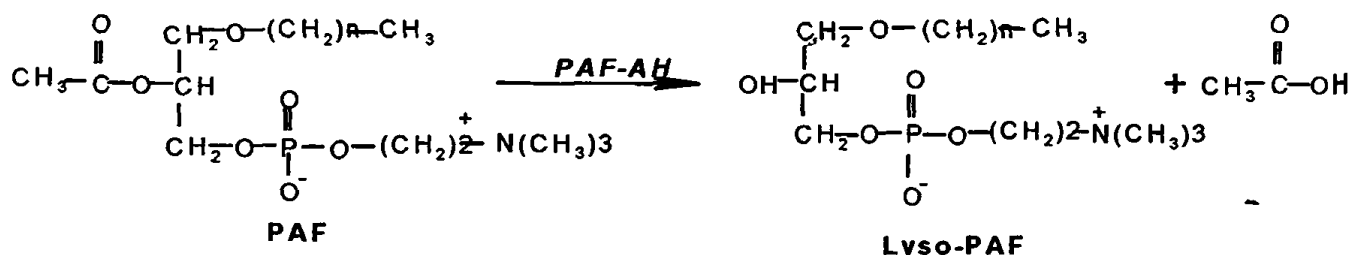


Η «εκ νέου» πορεία βιοσύνθεσης του PAF καταλύεται από μια CDP-φωσφοχολινοτρανσφεράση. Το αρχικό υπόστρωμα 1-O-αλκυλο-2-λυσσο-*sn*-γλυκερο-3-φωσφορικό οξύ ακετυλιώνεται στην *sn*-2 θέση με τη δράση της ακετυλοCoA-ακετυλοτρανσφεράσης παρουσία ακέτυλοCoA. Στη συνέχεια με τη δράση της φωσφοϋδρολάσης του 1-O-αλκυλο-2-ακετυλο-*sn*-γλυκερο-3-φωσφορικού οξέος απομακρύνεται η φωσφορική ομάδα από την *sn*-3 θέση του γλυκερινικού σκελετού. Η βιοσύνθεση του PAF ολοκληρώνεται με τη δράση της CDP-φωσφοχολινοτρανσφεράσης, η οποία μεταφέρει την ομάδα της φωσφοχολίνης από την CDP-χολίνη στην 1-O-αλκυλο-2-ακετυλο-*sn*-γλυκερόλη [457].

Η συγκέντρωση του PAF στα διάφορα κύτταρα και ιστούς ρυθμίζεται κυρίως από τον καταβολισμό του παρά από την βιοσύνθεσή του. Η αποικοδόμηση και απενεργοποίησή του, η οποία είναι ανεξάρτητη από τη διέγερση του κυττάρου, καταλύεται από ένα μοναδικό ένζυμο, γνωστό ως PAF-ακετυλοϋδρολάση.

ΔΙΑΣΠΟΡΑ ΤΗΣ PAF-ΑΚΕΤΥΛΟΪΔΡΟΛΑΣΗΣ ΣΤΗ ΦΥΣΗ

Η PAF-ακετυλοϋδρολάση, PAF-AH, (EC 3.1.1.48) είναι μια φωσφολιπάση A₂ [458] με ξεχωριστές ιδιότητες. Υδρολύει τον εστερικό δεσμό που υπάρχει στην *sn*-2 θέση του μορίου του PAF απελευθερώνοντας μια οξική ομάδα η οποία είναι απαραίτητη για τη βιολογική του δράση (σχήμα 14).



Σχήμα 14. Υδρόλυση του PAF από την PAF-ακετυλοϋδρολάση

Ο Lyso-PAF που παράγεται είναι βιολογικά αδρανές μόριο, εμφανίζει όμως κυτταροτοξική δράση λόγω των γενικών απορρυπαντικών ιδιοτήτων των λυσοφωσφολιπιδίων. Υπάρχουν τουλάχιστον δύο μορφές του ενζύμου αυτού, η ενδοκυττάρια και η εκκρινόμενη, με κυριότερο εκπρόσωπο την PAF-AH του πλάσματος. Ενεργότητα PAF-ακετυλοϋδρολάσης έχει βρεθεί σε μια πλειάδα ιστών, στα κύτταρα του αίματος, στο πλάσμα ανθρώπου και άλλων θηλαστικών [459-461], καθώς και στο μικροσωματικό κλάσμα του πρωτοζώου *Tetrahymena Pygiformis*. Οι

πηγές της ακετυλοϋδρολάσης συνοψίζονται στον πίνακα 4. Η κυτταρική προέλευση της PAF-AH του πλάσματος δεν έχει πλήρως διερευνηθεί, αν και μελέτες έδειξαν ότι κατά τη διαφοροποίηση των μονοκυττάρων σε μακροφάγα αυξάνει η ενδοκυττάρια ενεργότητα της PAF-AH, γεγονός που οφείλεται σε αύξηση της σύνθεσης του ενζύμου [462]. Παράλληλα τα μακροφάγα εκκρίνουν την περιεχόμενη σε αυτά PAF-AH γιατί και θεωρούνται μια από τις πιο σημαντικές πηγές του ενζύμου στο πλάσμα.[463]. Εκτός από τα μακροφάγα, ως πηγές του ενζύμου στο πλάσμα θεωρούνται τα ηπατοκύτταρα και τα αιμοπετάλια. Έτσι έχει αναφερθεί ότι οι πρωτογενείς καλλιέργειες ηπατοκυττάρων καθώς και καλλιέργειες της κυτταρικής σειράς ανθρώπινου ηπατώματος HepG2 εκκρίνουν PAF-AH όμοια με αυτή του πλάσματος [464], η έκκριση της οποίας αυξάνει με την εξωγενή προσθήκη PAF. Επίσης τα αιμοπετάλια βοδιού καθώς και τα πλυμμένα αιμοπετάλια ανθρώπου, εκκρίνουν PAF-AH [465] κατά την συσσωρευση τους όταν αυτή επάγεται από PAF, ADP ή θρομβίνη [466].

Πίνακας 3.2. Κατανομή της PAF-AH σε διάφορα είδη θηλαστικών

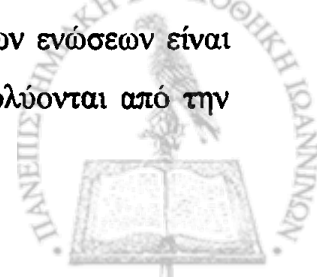
Είδος	Ιστοί-Κύτταρα	Πηγή της PAF-AH
Άνθρωπος	Ουδετερόφιλα, Ηωσινόφιλα	Ομογενοποίηση
	Αιμοπετάλια	Κυτοσόλιο
	Μονοκύτταρα- Μακροφάγα	Ομογενοποίηση
	Ερυθροκύτταρα	Κυτοσόλιο
	Νεφροί	Ομογενοποίηση
	HepG2	Υπερκείμενο
Επίμυς	Ορός-Πλάσμα	
	Νεφροί	Κυτοσόλιο
	Νεφρικός φλοιός	Κυτοσόλιο
	Πνεύμονας	Κυτοσόλιο
	Εγκέφαλος	Κυτοσόλιο
	Σπλήνας	Κυτοσόλιο
	Ήπαρ	Κυτοσόλιο
	Καρδιά	Κυτοσόλιο
	Κοκκιοκύτταρα	Ομογενοποίηση
	Μονοκύτταρα- Μακροφάγα	Ομογενοποίηση
	Λεμφοκύτταρα	Ομογενοποίηση
	Αιμοπετάλια, Ερυθροκύτταρα	Ομογενοποίηση
	Πλάσμα	
Ποντίκι	Περιτόναιο	Ομογενοποίηση
	Μακροφάγα	
	Πλάσμα	
Βόδι	Αιμοπετάλια	Υπερκείμενο
Κουνέλι	Νεφρά	Κυτοσόλιο
	Σπλήνα	Κυτοσόλιο
Ινδικό χοιρίδιο	Νεφρά	Κυτοσόλιο
	Πλάσμα	



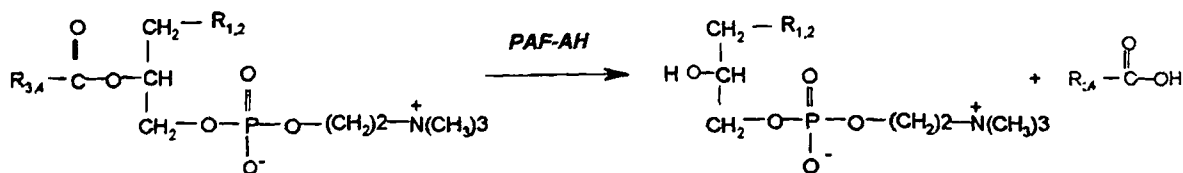
ΕΞΕΙΔΙΚΕΥΣΗ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΟΣ ΤΗΣ PAF-AH

Αρχικά η εξειδίκευση υποστρώματος μελετήθηκε με τη χρήση ακετυλοϋδρολάσης από ανθρώπινο πλάσμα (εκκρινόμενη μορφή) [467,468]. Τα αποτελέσματα αυτά πρόσφατα επιβεβαιώθηκαν με τη χρήση της ανασυνδυασμένης PAF-AH. Για να εξεταστούν τα μοριακά χαρακτηριστικά του PAF που είναι απαραίτητα ώστε να αποτελεί υπόστρωμα για την PAF-AH χρησιμοποιήθηκαν πολλά ανάλογά του καθώς και διάφοροι αναστολείς της υδρόλυσής του. Τα αποτελέσματα των διαφόρων μελετών συνοψίζονται στα εξής:

- Η αναγνώριση του υποστρώματος από το ένζυμο δεν εξαρτάται από το είδος του δεσμού (αιθερικός ή εστερικός), που υπάρχει στην sn-1 θέση του μορίου του PAF. Επίσης το ένζυμο έχει την ίδια εξειδίκευση για το D ή το L-ισομερές, αφού η 3-O-ακυλο-2-ακετυλο-sn-γλυκερο-1-φωσφοχολίνη αναστέλλει συναγωνιστικά την υδρόλυση του PAF. Η ενεργότητα του ενζύμου φαίνεται όμως να επηρεάζεται από το μήκος της λιπαρής αλυσίδας που υπάρχει στην sn-1 θέση και δείχνει προτίμηση για αλυσίδα μεγαλύτερη των 10 ατόμων άνθρακα [469].
- Η PAF-AH εμφανίζει μεγάλη εξειδίκευση για την λιπαρή αλυσίδα που υπάρχει στην sn-2 θέση του γλυκερινικού σκελετού, με σαφή προτίμηση για μικρές αλυσίδες (μέχρι 9 άτομα άνθρακα), εμφανίζοντας τη μεγαλύτερη ενεργότητα όταν υπάρχει οξική ομάδα. Όταν στη θέση αυτή υπάρχει εστεροποιημένη άλλη ομάδα, η ταχύτητα υδρόλυσης μειώνεται ανάλογα με τον αριθμό ατόμων άνθρακα ως εξής: $C2 \gg C3 = C4 > C6$. Σε φωσφολιπίδια με μεγάλες ανθρακικές αλυσίδες η ενεργότητα του ενζύμου πρακτικά μηδενίζεται [470-472]. Επειδή τα φωσφολιπίδια με μεγάλες λιπαρές αλυσίδες εστεροποιημένες στην sn-2 θέση δεν αποτελούν υπόστρωμα για το ένζυμο, αυτό μπορεί ελεύθερα να κυκλοφορεί στο πλάσμα με την ενεργό του μορφή, χωρίς να προκαλεί υδρόλυση των φωσφολιπιδίων των λιποπρωτεϊνών και των βιολογικών μεμβρανών. Αποτέλεσμα αυτής της εξειδίκευσης είναι η φωσφατιδυλοχολίνη του αυγού καθώς και διάφορα 1,2 διακυλογλυκεροφωσφολιπίδια να μην αναστέλλουν σημαντικά την υδρόλυση του PAF. Επίσης, δεν αποτελούν υπόστρωμα για την PAF-AH χημικές ενώσεις, που έχουν οξική ομάδα αλλά τις χαρακτηρίζει η απουσία ή η μεγάλη τροποποίηση του γλυκερινικού σκελετού. Παραδείγματα τέτοιων ενώσεων είναι το ακετυλοσαλικυλικό οξύ και η ακετυλοχολίνη που δεν υδρολύονται από την



PAF-AH, απόδειξη ότι το ένζυμο αυτό δεν είναι μια μη ειδική εστεράση. Επίσης η PAF-AH έχει απόλυτη απαίτηση για την ύπαρξη εστερικού δεσμού στην sn-2 θέση αφού η 1-O-αλκυλ-2-O-αιθυλ-sn-γλυκερο-3-φωσφοχολίνη ακόμη και σε μεγάλες συγκεντρώσεις δεν αναστέλλει την υδρόλυση του εστερικού αναλόγου της (PAF) [469]. Εκτός από την υδρόλυση του PAF, η PAF-AH αναγνωρίζει και υδρολύει τα οξειδωμένα παράγωγα των φωσφολιπιδίων με μικρές ακυλομάδες στην sn-2 θέση του γλυκερινικού σκελετού [473,474], τα οποία παράγονται κατά την οξείδωση των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων που είναι εστεροποιημένα στην sn-2 θέση φωσφολιπιδίων και υπάρχουν στις κυτταρικές μεμβράνες αλλά και στο σωματίδιο της LDL [469]. Τα φωσφολιπίδια αυτά χαρακτηρίζονται από την ύπαρξη καρβοξυλικής, καρβονυλικής και υδροξυλομάδας στο ω-τελικό άκρο της ακυλομάδας που υπάρχει στην sn-2 θέση, σχήμα 14. Τα οξειδωμένα φωσφολιπίδια έχουν δομικές ομοιότητες με τον PAF και αναγνωρίζονται από τον υποδοχέα του, έχοντας έτσι όμοιες βιολογικές δράσεις (PAF-like phospholipids). Η βασική διαφορά μεταξύ του PAF και των οξειδωμένων αναλόγων είναι η ρύμιση των επιπέδων τους. Η ρύθμιση των επιπέδων του PAF είναι αυστηρά ελεγχόμενη [475,476] ενώ η παραγωγή των οξειδωμένων φωσφολιπιδίων γίνεται ανεξέλεκτα [470], αφού εξαρτάται από τον βαθμό οξείδωσης και αποικοδόμησης των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων. Συνεπώς η PAF-AH φαίνεται να παίζει έναν ουσιαστικό ρόλο στην προσπάθεια ρύθμισης των επιπέδων των βιολογικά δραστικών οξειδωμένων φωσφολιπιδίων [470].



R1 = O(CH ₂) _n CH ₃	n=15-17
R2 = OOC(CH ₂) _n CH ₃	n=15-17
R3 = (CH ₂) _n CH ₃	n=0-8
R4 = (CH ₂) _n X,Y,Z	n=0-8
	X=COOH
	Y=CHO
	Z=CH ₂ OH

Σχήμα 15. Υδρόλυση οξειδωμένων φωσφολιπιδίων από την PAF-AH.

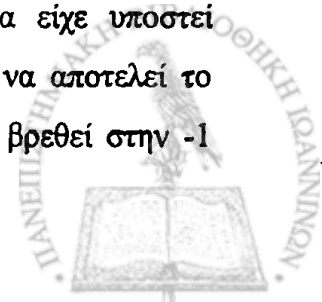


- Η PAF-AH φαίνεται να προτιμά ως πολική ομάδα στην sn-3 θέση του μορίου του PAF, τη χολίνη αφού διαδοχικές απομακρύνσεις μεθυλομάδων από την χολίνη (διμεθυλαιθανολαμίνη, μονομεθυλαιθανολαμίνη, αιθανολαμίνη), οδηγούν σε μείωση της ενεργότητάς της.

PAF-AH ΠΛΑΣΜΑΤΟΣ, ΕΚΚΡΙΝΟΜΕΝΗ ΜΟΡΦΗ

Ταυτοποίηση της δομής του ενζύμου

Όπως προαναφέρθηκε η κυριότερη πηγή της PAF-AH του πλάσματος είναι τα μακροφάγα. Τα ηπατοκύτταρα επίσης εκκρίνουν PAF-AH αλλά σε πολύ μικρές ποσότητες. Μόλις το 1995 με την χρήση cDNA έγινε η κλωνοποίηση της PAF-AH που υπάρχει στην LDL του πλάσματος [477]. Το γονίδιο της εκφράζεται στα μακροφάγα, στον θύμο αδένα, στις αμυγδαλές και στον πλακούντα, δεν εκφράζεται όμως στο ήπαρ στην καρδιά στο νεφρό ή στον εγκεφαλικό φλοιό. Ενδιαφέρον είναι πως το mRNA των ηπατοκυττάρων δεν αναγνωρίζει το cDNA της PAF-AH του πλάσματος. Δεν υπάρχει έκφραση του mRNA της PAF-AH σε μονοκύτταρα περιφερικού αίματος παρά μόνο μια ημέρα μετά την έναρξη της διαφοροποίησής τους προς μακροφάγα. Επίσης υπάρχουν περιοχές του εγκεφάλου στις οποίες εκφράζεται η PAF-AH του πλάσματος [477]. Αυτό είναι αρκετά ενδιαφέρον αφού ο PAF φαίνεται να παίζει ρόλο νευροδιαβιβαστή [478]. Δεν έχει όμως ακόμη διευκρινιστεί αν η PAF-AH του πλάσματος είναι η μόνη υπεύθυνη για τη ρύθμιση των επιπέδων του PAF στον εγκέφαλο αφού έχουν βρεθεί και ενδοκυττάρια μορφές PAF-AH σε διάφορες περιοχές του εγκεφάλου [479,480]. Το cDNA της PAF-AH ανθρώπινου πλάσματος κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη με 441 αμινοξέα. Τα πρώτα 17 αμινοξέα από την Met-1 μέχρι Ala-17 είναι υδρόφοβα και ίσως αποτελούν το σηματοδοτικό πεπτιδίο, υπεύθυνο για την έκκριση της πρωτεΐνης. Έτσι η θέση Ala-17/Val-18 μπορεί να είναι το σημείο σχάσης του πεπτιδίου αυτού. Τα επόμενα 24 αμινοξέα (από την Val-18 μέχρι Lys 41) δεν έχουν βρεθεί στην πρωτεΐνη που απομονώθηκε από το πλάσμα οπότε δεν έχει διευκρινιστεί αν πρόκειται για ένα προπεπτιδίο ή αν το ένζυμο που απομονώθηκε από το πλάσμα είχε υποστεί πρωτεόλυση [470]. Πάντως η θέση της Lys 41/Ile 42 δεν μπορεί να αποτελεί το σημείο σχάσης του σηματοδοτικού πεπτιδίου αφού η Lys δεν έχει βρεθεί στην -1

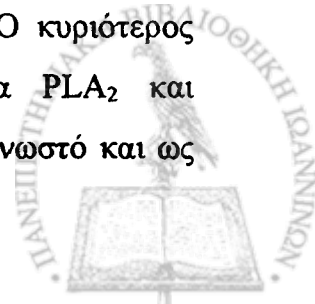


θέση. Το μοριακό βάρος υπολογιζόμενο από τα αμινοξέα 42-441 είναι 45,388, όσο περίπου υπολογιζόταν με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου στις αρχικές μελέτες καθαρισμού του ενζύμου [470]. Η δομή της PAF-AH είναι μοναδική και περιέχει μόνο μια μικρή περιοχή ομολογίας με τις σερινοεστεράσες και τις λιπάσες (Gly-Xaa-Ser-Xaa-Gly). 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[481].

Φυσικοχημικές και ενζυμικές ιδιότητες

Το ένζυμο του πλάσματος είναι υδρόφοβο και μεταφέρεται με τις λιποπρωτεΐνες, κυρίως τις LDL και HDL στις οποίες κατανέμεται κατά 70% και 30 % αντίστοιχα [482], ενώ η PAF-AH πλάσματος ποντικού ή κουνελιού κατανέμεται κυρίως στις λιποπρωτεΐνες υψηλής πυκνότητας (HDL) [469]. Η κατανομή του ενζύμου στις λιποπρωτεΐνες είναι δυναμική και εξαρτάται από το pH. Έτσι σε pH 6.0, η PAF-AH μεταφέρεται από την LDL στην HDL, ενώ σε pH 7.4 μεταφέρεται από την HDL στην LDL. Αν και η κατανομή της PAF-AH στις λιποπρωτεΐνες είναι ένα πολύπλοκο φαινόμενο, πιστεύεται πως η ίδια μορφή πρωτεΐνης υπάρχει πάνω στην LDL και στην HDL αφού το ένζυμο της LDL έχει την ίδια ηλεκτροφορητική κινητικότητα με αυτό που εντοπίζεται στην HDL ενώ παράλληλα, πολυκλωνικό αντίσωμα κατά της PAF-AH που έχει απομονωθεί από την LDL αναγνωρίζει και την PAF-AH της HDL [482].

Η ενεργότητα της PAF-AH έχει ένα ευρύ πεδίο βέλτιστου pH που κυμαίνεται από 7.5-8.5. Η ενεργότητά της δεν επηρεάζεται από την ύπαρξη ιόντων Ca^{2+} καθώς και από το αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ, EDTA. Δείχνει μια ισχυρή εξειδίκευση για μικρές ακυλομάδες εστεροποιημένες στην sn-2 θέση του μορίου του PAF. Αναστέλλεται από την δράση αναστολέων των σερινοεστερασών όπως το διίσοπροπυλοφθοριοφωσφορικό (Diisopropylfluorophosphate, DFP) και το φαινυλομεθυλοσουλφονυλοφθορίδιο, (phenylmethylsulphonylfluoride, PMSF). Αντιθέτως είναι ανθεκτική στον κλασικό αναστολέα των φωσφολιπασών A_2 , παραβρωμοφαινυλακυλοβρωμιδίου (p-Bromophenylbromide, pBPB). Ο κυριότερος αναστολέας της ανθρώπινης LCAT, (η οποία έχει ενεργότητα PLA_2 και ακετυλουδρολάσης [483]), το 5,5'-διθειο-δις-(2-νιτροβενζοϊκό οξύ), γνωστό και ως

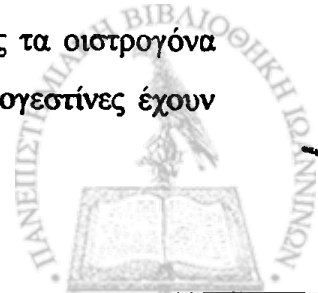


αντιδραστήριο Ellmans, δεν επηρεάζει την ενεργότητα της PAF-AH του πλάσματος και της LDL, γεγονός που αποδεικνύει ότι πρόκειται για διαφορετικές ενζυμικές οντότητες. Η ύπαρξη αναγωγικών αντιδραστηρίων όπως της διθειοθρεϊτόλης, (dithiothreitol, DTT) είναι αναγκαία για τη βέλτιστη δραστικότητα της LCAT, ενώ δεν είναι απαραίτητα για την PAF-AH. Επίσης το μονοκλωνικό αντισώμα (B₁₀) κατά της κεκαθαυμένης ανθρώπινης LCAT, που αναστέλλει τόσο την εστερολυτική όσο και την εστεροποιητική της ενεργότητα και αναγνωρίζει και άλλες PLA₂ (από πάγκρεας ή δηλητήριο φιδιών) δεν αναγνωρίζει την PAF-AH πλάσματος [459,467,468]. Πρόσφατα ένας νέος υδατοδιαλυτός 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 [484].

Όταν PAF-AH από ολικό πλάσμα καθώς και από LDL εκτεθεί στην παρουσία ελευθέρων ριζών οξυγόνου, οι οποίες δημιουργούνται από σύστημα ξανθίνης/υποξανθίνης, τότε η ενεργότητα του ενζύμου μειώνεται στο 50% της αρχικής, μέσα στα 60 πρώτα sec της επίδρασης. Μετά από 10 min, όλη σχεδόν η ενεργότητα της PAF-AH έχει ανασταλλεί μη αντιστρεπτά [485], χωρίς όμως να έχει μεταβληθεί η K_m του εναπομείναντος ενζύμου. Ο χρόνος αυτός της απενεργοποίησης της PAF-AH με τη δράση των ελευθέρων ριζών δεν είναι αρκετός για την έναρξη της υπεροξειδωσής των λιπαρών οξέων της LDL [485]. Άλλες όμως 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 οξειδωση της LDL έδειξαν πως η K_m διατηρείται σταθερή (άρα το ένζυμο διατηρεί τη συγγένεια για το υπόστρωμα) μειώνεται όμως η V_{max}. Η πτώση αυτή φανερώνει μείωση της ενεργότητας του ενζύμου που οφείλεται είτε στην οξειδωτική τροποποίησή της πρωτεΐνης της PAF-AH είτε στο σχηματισμό μορίων με ανασταλτική ως προς την ενεργότητα της PAF-AH, δράση [486].

Ρύθμιση της έκκρισης της PAF-AH

Θεωρείται πιθανό η σύνθεση και η έκκριση της PAF-AH *in vivo* να υπόκειται σε ορμονική ρύθμιση. Η ομάδα του Miyaura et al [487] έδειξε πως τα οιστρογόνα μειώνουν την έκκριση της PAF-AH από τα μακροφάγα, ενώ οι προγεστίνες έχουν

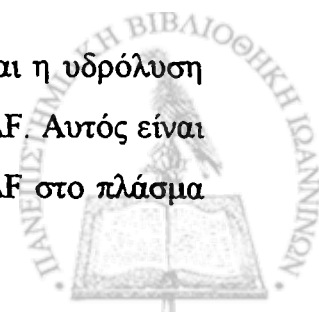


αντίθετη δράση. Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν με την παρατήρηση πως η ενεργότητα του ενζύμου είναι χαμηλή στο πλάσμα μητέρας πριν τον τοκετό [488] και επανέρχεται στα φυσιολογικά αμέσως μετά τον τοκετό. Ο ρυθμιστικός ρόλος των οιστρογόνων υποστηρίζεται και από το εύρημα πως τα επίπεδα της PAF-AH στις γυναίκες είναι χαμηλότερα από ότι στους άνδρες [489]. Επίσης ένα αντιφλεγμονώδες κορτικοειδές η δεξαμεθαζόνη, αυξάνει τα επίπεδα της PAF-AH σε πλάσμα ποντικών [490]. Επίσης υπάρχει μια αύξηση των επιπέδων της PAF-AH στις πρώτες εβδομάδες της ζωής [491], καθώς και θετική συσχέτιση μεταξύ της ενεργότητας του ενζύμου και των επιπέδων της χοληστερόλης και της LDL χοληστερόλης στο πλάσμα ενηλίκων [492-494], χωρίς να έχει ακόμη προσδιοριστεί η βάση όλων αυτών. Το ένζυμο κυκλοφορεί στο πλάσμα με τις λιποπρωτεΐνες και μάλιστα η μορφή που υπάρχει στην LDL φαίνεται να είναι η πιο δραστική [495]. Αυτό πιθανά να οφείλεται σε αλλοστερικό φαινόμενο δέσμευσης ή και σε επίδραση του λιπιδιακού περιεχομένου της λιποπρωτεΐνης στην ενζυμική ενεργότητα. Εξάλλου η ομάδα του Satoh et al [496], έδειξε ότι και ο PAF μπορεί να επάγει τη σύνθεση και έκκριση της PAF-AH του πλάσματος. Αυτή η παλλίνδρομη ρύθμιση πιθανά προστατεύει τον οργανισμό από υπέρμετρη σηματοδότηση που μπορεί να προκαλείται από τον PAF και άλλα οξειδωμένα φωσφολιπίδια.

Ο TNF και η IL-1, που είναι προφλεγμονώδεις κυτοκίνες, αναστέλλουν την έκκριση της PAF-AH από τα ανθρώπινα μακροφάγα [497]. Ο PAF όμως επάγει την έκκριση της PAF-AH από την κυτταρική σειρά HepG2 [498]. Παρόλη την φαινομενική αντίθεσή τους οι δύο αυτές παρατηρήσεις μπορεί να έχουν κοινή βάση. Σε διάφορες φάσεις της φλεγμονής εκκρίνεται ο PAF και οι προφλεγμονώδεις κυτοκίνες [497]. Οι κυτοκίνες αναστέλλουν την έκκριση της PAF-AH από τα μακροφάγα και έτσι έχουμε συσσώρευση του PAF. Αυξημένες συγκεντρώσεις PAF ενεργοποιούν της έκκριση της PAF-AH από τα ηπατοκύτταρα [498], ώστε να διακοπεί η φλεγμονώδης δράση του.

Παθοφυσιολογία της PAF-AH ανθρώπινου πλάσματος

Ο βασικός και ο πλέον μελετημένος ρόλος της PAF-AH είναι η υδρόλυση και απενεργοποίηση του δραστικού διαμεσολαβητή της φλεγμονής, PAF. Αυτός είναι και ο μοναδικός τρόπος με τον οποίο ρυθμίζονται τα επίπεδά του PAF στο πλάσμα



και στο κυτόπλασμα των θηλαστικών [482,462]. Για την PAF-AH του πλάσματος όμως, ο PAF δεν είναι το μοναδικό υπόστρωμα, οπότε και ο παθοφυσιολογικός της ρόλος είναι πολλαπλός. Η PAF-AH υδρολύει και τα οξειδωμένα παράγωγα του αραχιδονικού οξέος στην sn-2 θέση της φωσφατιδυλοχολίνης. Το πιο ενδιαφέρον από αυτά είναι το 1-παλμιτούλ-2-(5-οξοβαλεορυλ)-sn-γλυκερο 3-φωσφοχολίνη [463]. Παρόλο που η ενεργότητα του ενζύμου μειώνεται καθώς αυξάνει η ακυλομάδα στην sn-2 θέση, αυτή η μορφή της οξειδωμένης φωσφατιδυλοχολίνης φαίνεται να είναι από τα καλύτερα υποστρώματα της PAF-AH [472]. Άρα η PAF-AH παίζει έναν πολύ σημαντικό ρόλο στην αποικοδόμηση των βιολογικά δραστικών οξειδωμένων φωσφολιπιδίων τα οποία δημιουργούνται *in vivo* κάτω από ποικίλες συνθήκες. Ομοίως κατά την οξειδωτική τροποποίηση της LDL, τα πολυακόρεστα φωσφολιπίδια οξειδώνονται και στη συνέχεια υδρολύονται με τη δράση της PAF-AH προς λυσοφωσφατιδυλοχολίνη και οξειδωμένα λιπαρά οξέα. Τα προϊόντα αυτά της υπεροξείδωσης των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων θεωρούνται υπεύθυνα για την τροποποίηση της apo B-100, με αποτέλεσμα αυτή να μην αναγνωρίζεται πλέον από τον κλασικό B/E υποδοχέα. Ο ρόλος της PAF-AH στην υδρόλυση των οξειδωμένων φωσφολιπιδίων είναι αντιφατικός αφού παράγεται η λυσοφωσφατιδυλοχολίνη με τις γνωστές κυτταροτοξικές συνέπειες [166]. Όμως είναι επίσης πιθανό τα προϊόντα της υδρόλυσης των οξειδωμένων παραγώγων των φωσφολιπιδίων να μπορούν με υδατοδιαλυτή πλέον μορφή να διαχέονται από την LDL σε άλλες πρωτεΐνες και λιποπρωτεΐνες του πλάσματος [470]. Με τον τρόπο αυτό η PAF-AH φαίνεται να παρέχει στο σωματίδιο της LDL έναν δυναμικό μηχανισμό με τον οποίο μειώνονται τα καταστροφικά αποτελέσματα της υπεροξείδωσης των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων της [470]. Σημαντικό ρόλο στη διαδικασία αυτή παίζει και η PAF-AH της HDL, η οποία υδρολύει τα οξειδωμένα φωσφολιπίδια που διαχέονται στο σωματίδιο της HDL από την ox-LDL, ταυτόχρονα όμως δρά και ως πηγή που αναπληρώνει στην LDL την ενεργότητα της PAF-AH που έχει μειωθεί μη αντιστρεπτά κατά την οξείδωση [499,500].



ΕΝΔΟΚΥΤΤΑΡΙΕΣ ΜΟΡΦΕΣ ΤΗΣ PAF-AH

Δομή

Τα επίπεδα του PAF στα διάφορα κύτταρα [501-504], ρυθμίζονται και από ενδοκυττάρια μορφές της PAF-AH. Τέτοια ένζυμα έχουν βρεθεί κυρίως στον εγκέφαλο, στο ήπαρ και στους νεφρούς και διακρίνονται σε δυο ισομορφές, τις I και II [470]. Η ισομορφή I φαίνεται να αποτελείται από δύο ή και περισσότερες υπομονάδες (Ia, Ib). Μέχρι σήμερα έχουν απομονωθεί τρία διαφορετικά cDNA τα οποία κωδικοποιούν ενδοκυττάρια μορφές PAF-AH [505], (Πίνακας 5). Όλες οι ενδοκυττάρια μορφές όπως και οι εκκρινόμενες περιέχουν το καταλυτικό πενταπεπτίδιο (Gly-Xaa-Ser-Xaa-Gly) ή (Gly-Xaa-Ser-Xaa-Val) που υπάρχει τόσο στις λιπάσες όσο και στις εστεράσες [505]. Η ομάδα του Hatori et al [506] δημοσίευσε πρόσφατα την κλωνοποίηση του cDNA που κωδικοποιεί την ισομορφή II, η οποία εκφράζεται στο ήπαρ και στους νεφρούς. Η ισομορφή αυτή της οποίας το καταλυτικό κέντρο αποτελείται από σερίνη και κυστεΐνη έχει παρεμφερή εξειδίκευση υποστρώματος με το ένζυμο του πλάσματος, και υδρολύει φωσφολιπίδια με ακυλομάδες που δεν ξεπερνούν τα 5 άτομα άνθρακα.

Από τις περισσότερο μελετημένες ενδοκυττάρια ισομορφές PAF-AH είναι η Ib, η οποία έχει τρεις υπομονάδες α, β και γ, μοριακού βάρους 45000, 30000 και 29000 αντίστοιχα [507]. Η υπομονάδα των 29kDa (Ib-γ) είναι καταλυτικά ενεργός και δεν εμφανίζει ομολογία με άλλες πρωτεΐνες, αν και περιέχει μια τροποποιημένη περιοχή που υπάρχει στις σερινοεστεράσες, όπως και σε άλλες PAF-AH. Η τριτοταγής δομή της είναι όμοια με αυτή των G-πρωτεϊνών [508]. Το καταλυτικό της κέντρο απαρτίζεται από μια τριάδα των αμινοξέων που μοιάζει με αυτή των τρυψινών, (Ser-His-Asp) ενώ η χειρικότητα είναι ίδια με αυτή των εστερασών και των ουδετέρων λιπασών [470]. Η υπομονάδα των 30kDa (Ib-β) είναι κατά 63.2% ομόλογη με αυτή των 29kDa, είναι επίσης καταλυτικά ενεργός και περιέχει στο ενεργό της κέντρο την ίδια καταλυτική τριάδα με την Ib-γ [480]. Τέλος η υπομονάδα των 45 kDa της ισομορφής Ib (Ib-α) είναι καταλυτικά αδρανής, αλλά ρυθμίζει την ενεργότητα, τον εντοπισμό και τον μεταβολισμό του ολοενζύμου [508]. Η ισομορφή Ib εμφανίζεται ως τριμερές και *in vivo*, αφού οι τρεις υπομονάδες απομονώνονται ταυτόχρονα με τη χρήση χρωματογραφικών μεθόδων, η υπομονάδα των 29 kDa έχει

την ίδια κρυσταλική δομή με αυτή του ετεροτριμερούς των G πρωτεϊνών, και επιπλέον το mRNA των 3 υπομονάδων συνεκφράζεται κατά την ανάπτυξη του εγκεφάλου [509].

Πίνακας 5. Εκκρινόμενες και ενδοκυττάριας μορφές PAF-AH.

Τύπος	Ισομορφή	Πηγή	Ενεργό κέντρο	Μοριακό βάρος
Εκκρινόμενη	-	Πλάσμα	GHSFG	45000
Ενδοκυττάρια	II	Ήπαρ & νεφροί	GHSFG	40000
Ενδοκυττάρια	Ib-γ υπομονάδα	Εγκέφαλος	GDSLIV	29000
Ενδοκυττάρια	Ib-β υπομονάδα	Εγκέφαλος	GDSMV	30000

Ενδοκυττάρια μορφή ακετυλοϋδρολάσης είναι και αυτή των ερυθροκυττάρων, η οποία αποτελείται από δυο όμοιες υπομονάδες 25kD. Οι φυσικοχημικές και ενζυμικές ιδιότητες είναι διαφορετικές από αυτές του ενζύμου που υπάρχει στο πλάσμα, όπως περιγράφεται αμέσως παρακάτω [510].

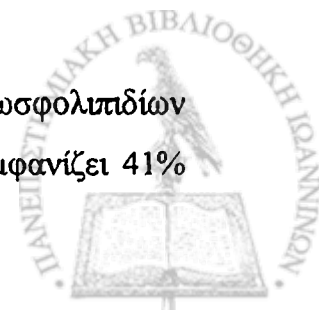
Φυσικοχημικές και ενζυμικές ιδιότητες

Έχει μελετηθεί η βιοχημική συμπεριφορά διαφόρων ενδοκυττάριας μορφών χρησιμοποιώντας ως πηγή του ενζύμου, ομογενοποίημα ανθρώπινου ηπατόματος, ομογενοποίημα σπλήνα, λευκοκύτταρα (ουδετερόφιλα και μονοκύτταρα), και ερυθροκύτταρα [467,469]. Η ενεργότητα της PAF-AH έχει ένα ευρύ φάσμα βέλτιστου pH που κυμαίνεται από 7.5-8.5. Η ενεργότητά της δεν επηρεάζεται από την ύπαρξη ιόντων Ca^{2+} καθώς και από το EDTA. Στις ενδοκυττάριας αυτές μορφές μελετήθηκε η επίδραση διαφόρων αναστολέων των PLA_2 . Το πυρηνόφιλο αντιδραστήριο pBPB, το οποίο αναστέλλει τη δράση των φωσφολιπασών A_2 σχηματίζοντας ένα παράγωγο ιστιδίνης στο ενεργό τους κέντρο, αναστέλλει πλήρως την PAF-AH των ουδετεροφίλων των ερυθροκυττάρων και του ήπατος. Μερικώς ευαίσθητη στον αναστολέα αυτό είναι η PAF-AH των μονοκυττάρων και του σπλήνα. Αυτό μπορεί να οφείλεται στην ταυτόχρονη παρουσία και άλλων πρωτεϊνών

οι οποίες πιθανά δεσμεύουν τον αναστολέα, προστατεύοντας έτσι την PAF-AH από πλήρη απενεργοποίηση. Καθαρισμός του ενζύμου με χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής, αύξησε την ευαισθησία της PAF-AH από ομογενοποίημα ήπατος και σπλήνας στη δράση του pBPB, χωρίς να επηρεάσει την αντίστοιχη των ερυθροκυττάρων. Υπενθυμίζουμε ότι η ενεργότητα της PAF-AH του πλάσματος είναι ανθεκτική ακόμη και σε μεγάλες συγκεντρώσεις του pBPB, άρα οι ενδοκυττάρια μορφές είναι διαφορετικές από τις εκκρινόμενες. Η χρήση του αναστολέα που δρά σε απολήξεις ιστιδίνης DEPC (diethylpyrocarbonate), αναστέλλει την ενεργότητα της PAF-AH των ουδετεροφύλων των ερυθροκυττάρων και του σπλήνα. Η χρήση του pBPB και του DEPC αποδεικνύει την ύπαρξη ιστιδίνης στο ενεργό κέντρο των ενδοκυττάρων μορφών. Το 5,5 διθειο-δισ(2-νιτροβενζοϊκό οξύ) DTNB, αντιδραστήριο το οποίο δρά στις σουλφιδρυλομάδες του ενεργού κέντρου των ενζύμων, αναστέλλει την ενεργότητα της PAF-AH των ερυθροκυττάρων ενώ αναστέλλει μερικώς τις άλλες ενδοκυττάρια ενεργότητες. Κατά συνέπεια υπάρχουν τουλάχιστον δυο ενδοκυττάρια μορφές της PAF-AH. Η μια βρίσκεται στα μονοκύτταρα τα ουδετερόφιλα και τα ερυθροκύτταρα και περιέχει σουλφιδρυλομάδες στο ενεργό της κέντρο, ενώ η άλλη που βρίσκεται στο ήπαρ και το σπλήνα είτε περιέχει σουλφιδρυλομάδες που είναι «προστατευμένες», είτε αυτές δεν είναι στο ενεργό κέντρο του ενζύμου. Η πρωτεάση τρυψίνη, αναστέλλει την PAF-AH των ερυθροκυττάρων του σπλήνα και του ήπατος, ενώ επηρεάζει μερικώς την ενεργότητα της PAF-AH των μονοκυττάρων και των ουδετεροφύλων. Το NaF που αναστέλλει τη δράση των PLA_2 αναστέλλει την ερυθροκυτταρική PAF-AH, ενώ δεν επηρεάζει την ενεργότητα των άλλων ενδοκυττάρων μορφών. Άρα η PAF-AH των ερυθροκυττάρων φαίνεται να είναι μια ισομορφή με ξεχωριστές ιδιότητες από τις άλλες, είναι ευαίσθητη στις πρωτεάσες, αναστέλλεται από την δράση του pBPB, και δεν καταβυθίζεται από τα πολυκλωνικά ή μονοκλωνικά αντισώματα της PAF-AH που υπάρχει στο πλάσμα [511].

Παθοφυσιολογία των ενδοκυττάρων μορφών

Η ισομορφή II, υδρολύει τα παράγωγα των οξειδωμένων φωσφολιπιδίων όπως και η PAF-AH του πλάσματος [512], με την οποία άλλωστε εμφανίζει 41%



ομοιότητα στην αλληλουχία των αμινοξέων [506]. Λόγω της ομοιότητας αυτής και της εξειδίκευσης υποστρώματος, η PAF-AH του πλάσματος και η ενδοκυττάρια ισομορφή II μπορεί να έχουν κοινό φυσιολογικό ρόλο [470].

Η ισομορφή Ib υδρολύει μόνο τον PAF χωρίς να αναγνωρίζει τα οξειδωμένα παράγωγα των φωσφολιπιδίων [507]. Επίσης η ισομορφή Ib και πιο συγκεκριμένα η υπομονάδα α, έχει μελετηθεί εκτενώς αφού μια μετάλλαξή της είναι υπεύθυνη για την Miller-Dieker lissencephaly [513], μια νευρολογική ασθένεια που χαρακτηρίζεται από λεία εγκεφαλική επιφάνεια [514]. Η κυτταρική βάση της νόσου είναι μια παθολογική νευρωνική μετανάστευση κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης. Το εύρημα ότι μια υπομονάδα ενδοκυττάριας PAF-AH παίζει ρόλο στην ανάπτυξη του εγκεφάλου σχετίζεται με την θεωρία πως ο PAF αποτελεί έναν νευροδιαβιβαστή μεγάλης δραστηριότητας [515]. Υπάρχει μια θεωρία που υποστηρίζει ότι η PAF-AH ρυθμίζει τα επίπεδα του PAF κατά την ανάπτυξη του εγκεφάλου, τα οποία σε μεγάλες συγκεντρώσεις είναι τοξικά και ότι η υδρόλυση του PAF προκαλεί διαμορφωτικές αλλαγές στο τριμερές της PAF-AH που επηρεάζουν την αλληλεπίδραση της γ υπομονάδας με κυτταροσκελετικές πρωτεΐνες [508].

Με την εξειδίκευση που εμφανίζει η ισομορφή Ib φαίνεται να έχει κάποιο σημαντικό ρόλο στη μετάδοση σήματος στον εγκέφαλο ενώ το ένζυμο του πλάσματος και η ενδοκυττάρια ισομορφή II έχουν ένα ρόλο πιο αντιφλεγμονώδη και ίσως αντιαθηρωγόνο υδρολύοντας εκτός από τον PAF και τα οξειδωμένα παράγωγα των φωσφολιπιδίων τα οποία δημιουργούνται σε μεγάλες συγκεντρώσεις σε συνθήκες οξειδωτικού stress [470]. Σε αυτή την κατηγορία μπορεί να υπαχθεί και η ερυθροκυτταρική PAF-AH

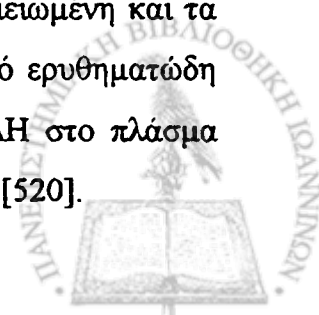
ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΜΕΛΕΤΕΣ

Η ενεργότητα της PAF-AH του πλάσματος έχει μελετηθεί σε διάφορες φλεγμονώδεις παθήσεις. Οι μέχρι τώρα μελέτες περιορίζονταν αυστηρά στην μέτρηση της ενεργότητας του ενζύμου μια που το αντίσωμα κατά της PAF-AH του πλάσματος κυκλοφόρησε μόλις πρόσφατα.



Μελέτη των επιπέδων της ενεργότητας της PAF-AH σε όλα τα μέλη 60 οικογενειών έδειξε, πως το 62% των επιπέδων της καθορίζεται κληρονομικά. Κανονικοποίηση των τιμών ως προς το φύλλο και την LDL χοληστερόλη, δεν άλλαξε τα δεδομένα. Βέβαια σημαντικός είναι και ο ρόλος των περιβαλλοντικών παραγόντων. Τα γονίδια αυτά που είναι υπεύθυνα για την κληρονομικότητα της PAF-AH δεν έχουν ακόμη εντοπιστεί [516]. Μελετήθηκε επίσης η επίδραση της ηλικίας, του φύλλου και των λιπιδαιμικών παραμέτρων πλάσματος στην ενεργότητα της PAF-AH. Τα αποτελέσματα έδειξαν πως υπάρχει θετική συσχέτιση μεταξύ της ηλικίας και της ενεργότητας της PAF-AH καθώς και μεταξύ της LDL χοληστερόλης και της ενεργότητας της PAF-AH. Επίσης τα επίπεδα της PAF-AH στις γυναίκες είναι χαμηλότερα σε σχέση με τα αντίστοιχα των ανδρών. Φαίνεται λοιπόν ότι η διακύμανση των επιπέδων της PAF-AH σε φυσιολογικά άτομα οφείλεται κατά 36% στα επίπεδα της LDL χοληστερόλης. Για τα ίδια επίπεδα LDL χοληστερόλης, η ηλικία δεν φαίνεται να παίζει ρόλο. Μελέτες της ενεργότητας του ενζύμου σε άτομα με μονογονική δυσλιπιδαιμία (οικογενή υπερχοληστερολαιμία) έδειξαν ότι η αύξηση της LDL χοληστερόλης είναι ανάλογη με την αύξηση της ενεργότητας της PAF-AH στο πλάσμα των ασθενών αυτών. Αντιθέτως σε ασθενείς με υπερτριγλυκεριδαίμια και σε φυσιολογικά άτομα δεν υπήρχε διαφορά στην ενεργότητα της PAF-AH του πλάσματος. Η χορήγηση λοβαστατίνης επέφερε μείωση της LDL χοληστερόλης και αντίστοιχα μείωση των επιπέδων της PAF-AH. Το αποτέλεσμα αυτό δείχνει πως πιθανά η σχέση της PAF-AH με την LDL χοληστερόλη ίσως να εντοπίζεται στο επίπεδο καταβολισμού τους, αφού στις περιπτώσεις αθηταλιποπρωτεϊναιμίας, η ενεργότητα της PAF-AH του πλάσματος των ασθενών αυτών είναι στα φυσιολογικά όρια [516].

Η ενεργότητα της PAF-AH είναι μειωμένη στο πλάσμα ασθενών με σηψαιμία ενώ είναι αυξημένα τα επίπεδα του PAF [517]. Η βακτηριακή ενδοτοξίνη ή λιποπολυσακχαρίτης (LPS), επάγει την παραγωγή του PAF και πιθανά αναστέλει την έκκριση της PAF-AH από τα μονοκύτταρα, οπότε η ενεργότητά της στο πλάσμα [497,518] είναι μειωμένη. Επίσης η ενεργότητα της PAF-AH είναι μειωμένη και τα επίπεδα του PAF αυξημένα και σε πλάσμα ασθενών με συστηματικό ερυθματώδη λύκο [519]. Σε αντίθεση, αυξημένη είναι η ενεργότητα της PAF-AH στο πλάσμα ατόμων με ρευματιδή αρθρίτιδα καθώς και άλλες μορφές αρθρίτιδας [520].



Το 1988 έγινε γνωστό πως το 4% του πληθυσμού στην Ιαπωνία έχει μη ανιχνεύσιμα επίπεδα PAF-AH και το φαινόμενο αυτό έχει μεγαλύτερη συχνότητα σε παιδιά που υποφέρουν από βρογχικό άσθμα [521]. Η μοριακή βάση της ανεπάρκειας ανακαλύφθηκε πρόσφατα και οφείλεται σε μια μετάλλαξη της Val-279 σε Phe [522]. Στην Ιαπωνία η μετάλλαξη αυτή υπάρχει στο 27% του πληθυσμού με την ετερόζυγη μορφή της. Γίνονται μελέτες για να εντοπιστεί αν η μετάλλαξη αυτή προκαλεί φλεγμονώδεις και αλλεργικές ασθένειες. Πιθανά η PAF-AH του πλάσματος να έχει αντιφλεγμονώδη δράση όπως και οι άλλες πρωτεάσες. Αν αυτό όντως συμβαίνει τότε η έλλειψη του ενζύμου μπορεί να θεωρηθεί παράγοντας κινδύνου για κάποιες ασθένειες, οι οποίες να εκδηλώνονται όταν υπάρχει κάποιος συνδυασμός με άλλους γενετικούς ή περιβαλλοντικούς παράγοντες [470]

Η ενεργότητα της PAF-AH σε πλάσμα ατόμων με υπέρταση είναι μεγαλύτερη από την αντίστοιχη των ατόμων με φυσιολογική πίεση [523]. Επίσης αυξημένη ενεργότητα PAF-AH παρατηρείται και σε καταστάσεις υπέρτασης λόγω εγκυμοσύνης ή στην προεκλαμψία [524]. Είναι ακόμη αδιευκρίνιστο αν η αυξημένη ενεργότητα της PAF-AH είναι η αιτία ή το αποτέλεσμα της υπέρτασης, αφού είναι γνωστό ότι ο PAF σε συγκεκριμένες συγκεντρώσεις προκαλεί υπόταση [437]. Είναι λοιπόν πιθανό κατά τη διάρκεια της αύξησης της πίεσης να επάγεται η έκκριση του PAF ώστε να μειωθεί η πίεση και έτσι να ενεργοποιείται η σύνθεση και έκκριση της PAF-AH. Αντιστρόφως μπορεί να υπάρχουν διαταραχές στην κατανομή και σύνθεση του ενζύμου που να οδηγούν στην υπέρταση [495,525].

Είναι γνωστό ότι ο PAF παράγεται από τα ενδοθηλιακά κύτταρα σε καταστάσεις οξειδωτικού στρες και προκαλεί την έκκριση από τα μακροφάγα ελευθέρων ριζών οξυγόνου [476]. Σε περιοχές αθηρωματικής βλάβης η έκκριση του PAF κάτω από αυτές τις συνθήκες μπορεί να αυξήσει την οξειδωτική τροποποίηση της LDL που λαμβάνει χώρα στον έσω χιτώνα των αγγείων και να ενισχύσει τις δυσμενείς επιπτώσεις της. Κατά τον οξειδωτικό τραυματισμό των ενδοθηλιακών κυττάρων και την οξείδωση της LDL παράγονται οξειδωμένα φωσφολιπίδια με δομή και βιολογική δραστηριότητα όμοια με αυτή του PAF (PAF-like φωσφολιπίδια) [5-26]. Τα προϊόντα διάσπασης των οξειδωμένων αυτών παραγώγων τροποποιούν την apoB-100, η οποία αναγνωρίζεται πλέον από τον υποδοχέα εκκαθαριστή των μακροφάγων



και οδηγεί στον σχηματισμό αφρωδών κυττάρων. Η PAF-AH απενεργοποιεί υδρολύοντας τόσο τον PAF όσο και τα PAF-like φωσφολιπίδια, παίζοντας πιθανά έτσι έναν προστατευτικό ρόλο στην εξέλιξη της αθηρωμάτωσης [527]. Η ενεργότητα της PAF-AH στο πλάσμα ατόμων με σοβαρή αθηρωμάτωση καθώς και περιφερική αγγειοπάθεια [528], έμφραγμα του μυοκαρδίου, εγκεφαλικό επεισόδιο [529], ή οικογενή έλλειψη HDL, (νόσος του Tangier) είναι αυξημένη [530,495]. Επίσης σε περιπτώσεις εγκεφαλικού επεισοδίου παρατηρείται μειωμένη ενεργότητα PAF-AH [529,531,532], στο κυττόςολιο και τις μεμβράνες ερυθροκυττάρων που έχουν απομονωθεί από το πλάσμα αυτών των ασθενών [533,534]. Άρα κατά την εγκεφαλική ισχαιμία παράγεται PAF ή και οξειδωμένα PAF-like φωσφολιπίδια και η ικανότητα υδρόλυσής τους είναι μειωμένη. Μεταξύ ασθενών με εγκεφαλικό επεισόδιο και των φυσιολογικών ατόμων δεν υπήρχε διαφορά στην ενεργότητα PAF-AH της HDL, ενώ αυξημένη ήταν η ενεργότητα PAF-AH στην LDL. Αν και τα επίπεδα της LDL μεταξύ ασθενών και φυσιολογικών ήταν παρεμφερή, ο λόγος PAF-AH/χοληστερόλη στην LDL των ασθενών ήταν μεγαλύτερος από τον αντίστοιχο των φυσιολογικών. Χωρίς να έχει προσδιοριστεί ο μηχανισμός, η αυξημένη ενεργότητα της PAF-AH στην LDL σχετίζεται με την αυξημένη βιοσύνθεση PAF στους ασθενείς αυτούς [530,535].

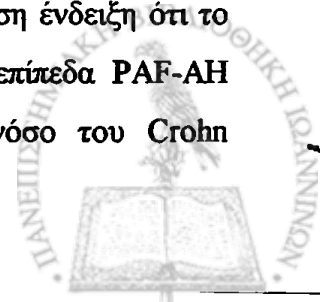
Αυξημένη ενεργότητα PAF-AH παρατηρείται επίσης σε άτομα με σοβαρή στεφανιαία νόσο. Η ενεργότητα του ενζύμου έχει θετική συσχέτιση με τα επίπεδα της LDL χοληστερόλης στα άτομα αυτά, και αρνητική με τα επίπεδα της HDL χοληστερόλης. Για τα ίδια επίπεδα ολικής χοληστερόλης, η PAF-AH πλάσματος ασθενών με στεφανιαία νόσο, ήταν μεγαλύτερη από την αντίστοιχη των φυσιολογικών [493]. Επίσης η ενεργότητα της PAF-AH στον ορό ασθενών που έχουν υποβληθεί σε στεφανιαία παράκαμψη (by pass) μειώνεται στο 38% της αρχικής, στις 7 πρώτες μέρες που ακολουθούν την εγχείρηση. Η ενεργότητα της PAF-AH στους ασθενείς αυτούς έχει θετική συσχέτιση με την ολική και την LDL χοληστερόλη του ορού πριν την εγχείρηση, καθώς και με την πτώση των λιπιδαιμικών αυτών παραμέτρων στις πρώτες 7 μετεγχειρητικές μέρες. Ενδιαφέρον είναι το ότι η πτώση της ενεργότητας της PAF-AH δεν συσχετίζεται με την πτώση της HDL χοληστερόλης και επίσης δεν υπάρχει αύξηση του χρόνου ημίσειας ζωής του PAF στον ορό μετά την εγχείρηση. Αυξημένη ικανότητα υδρόλυσης του PAF

παρατηρήθηκε επίσης σε άτομα με βαριά αθηρωμάτωση σε μια προκαταρκτική μελέτη του 1987, η οποία συνοδεύεται και από μια έντονη αύξηση των λιπιδαιμικών παραμέτρων των ατόμων αυτών [528.]

Η ενεργότητα της PAF-AH είναι επίσης αυξημένη σε ασθενείς που πάσχουν από σακχαρώδη διαβήτη [536] καθώς και στα ούρα ασθενών με διαβητική νεφροπάθεια [537]. Οι πρώτες μελέτες που έγιναν σε άτομα με ινσουλινοεξαρτώμενο σακχαρώδη διαβήτη έδειξαν ότι οι ασθενείς αυτοί έχουν αυξημένη ικανότητα αποικοδόμησης του PAF στο πλάσμα τους. Η αυξημένη αποικοδόμηση του PAF συσχετιζόταν και με αύξηση των επιπέδων των λιποπρωτεϊνών που περιέχουν apo B, ενώ μεταξύ φυσιολογικών ατόμων και ασθενών δεν παρατηρήθηκαν διαφορές στα επίπεδα της HDL χοληστερόλης [538]. Σε ανεφρικούς ασθενείς τα επίπεδα της PAF-AH είναι φυσιολογικά και σε μερικούς ασθενείς αυξημένα, ένδειξη πως ο νεφρός δεν είναι πηγή της PAF-AH που υπάρχει στο πλάσμα. Σε άτομα με χρόνια νεφρική ανεπάρκεια υπάρχει μια μικρή αύξηση της ενεργότητας της PAF-AH [539], ενώ σε άτομα με δευτεροπαθή διαβητική νεφροπάθεια, με σπειραματονεφρίτιδα ή υπερτασικές νεφρικές ασθένειες υπάρχει αυξημένη ενεργότητα PAF-AH στα ούρα [537,540].

Αν και υπάρχει αυξημένη ενεργότητα PAF-AH στο πλάσμα ασθενών με χρόνια ηπατική νόσο, δεν βρέθηκε θετική συσχέτιση των επιπέδων της PAF-AH με τα επίπεδα της LDL πιθανά λόγω των σοβαρών λιπιδιακών διαταραχών που συμβαίνουν σε βλάβη του ήπατος. Επίσης αυξημένα επίπεδα PAF-AH έχουν αναφερθεί και σε άτομα με χρόνια χολόσταση [540,541]. Μετά από μεταμόσχευση ήπατος τα επίπεδα της PAF-AH επανέρχονται στα φυσιολογικά [540-542], υποδεικνύοντας πως το ήπαρ μπορεί να παίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση των επιπέδων του ενζύμου στο πλάσμα, είτε άμεσα στο επίπεδο βιοσύνθεσης και καταβολισμού, είτε έμμεσα μέσω ορμονών [540].

Μειωμένη ενεργότητα PAF-AH και αυξημένα επίπεδα PAF και TNF α έχουν αναφερθεί σε άτομα με νεκρωτική εντεροκολίτιδα [543]. Σε πειραματικά μοντέλα ζώων, ο PAF επάγει το φαγεδαινικό έλκος, όμως δεν υπάρχει άμεση ένδειξη ότι το ίδιο συμβαίνει και σε ανθρώπους [544,545]. Επίσης αυξημένα επίπεδα PAF-AH υπάρχουν και στα κόπρανα ασθενών που πάσχουν από τη νόσο του Crohn



συγκριτικά με ασθενείς που έχουν ισχαιμική νέκρωση του εντέρου συνοδευόμενη από διάρροια καθώς και διάρροια που συνοδεύεται από δυσαπορόφηση [546].

Ο PAF υπάρχει στο αμνιακό υγρό και πιστεύεται πως ενεργοποιεί την σύσπαση της μήτρας στα τελευταία στάδια της εγκυμοσύνης [547,548,549], γιαυτό και τα επίπεδα της PAF-AH είναι πολύ χαμηλά. Με βάση τα δεδομένα αυτά η ομάδα του Johnston et al [488], υποστήριξε πως στα πρώτα στάδια της εγκυμοσύνης τα επίπεδα της PAF-AH στο πλάσμα είναι υψηλά ώστε να διατηρούνται χαμηλά τα επίπεδα του PAF και να αποφεύγεται έτσι πρόωρη συστολή της μήτρας. Αντίθετα τα επίπεδα μειώνονται όταν πλησιάζει ο τοκετός ώστε η συσσώρευση του PAF να προκαλέσει την έναρξη των συστολών.

Η ενεργότητα της PAF-AH είναι επίσης μεγαλύτερη στους χρόνιους καπνιστές σε σχέση με τους μη καπνιστές [550]. Σε *in vitro* μελέτες η ενεργότητα της PAF-AH πλάσματος αναστέλεται από εκχύλισμα καπνού το οποίο όμως επάγει την οξείδωση των λιποπρωτεϊνών [551]. Επίσης ο καπνός του τσιγάρου αναστέλλει την έκκριση της PAF-AH από τα ανθρώπινα περιφερικά μονοκύτταρα [552,553]. Φαίνεται λοιπόν πως το κάπνισμα διαφοροποιεί την έκκριση και την ενεργότητα της PAF-AH και επάγει την οξείδωση της LDL και τη δημιουργία PAF-like οξειδωμένων φωσφολιπιδίων [545,554]

Τέλος πρόσφατες μελέτες σε επίμυς με τη χρήση ανασυνδυασμένης PAF-AH κατέληξαν σε πιο συγκεκριμένα συμπεράσματα για τον ρόλο του ενζύμου στις διάφορες ασθένειες. Η χορήγηση ανασυνδυασμένης PAF-AH αναστέλλει το οίδημα που προκαλείται από τον PAF [477], προλαμβάνει τα συμπτώματα του άσθματος, και προστατεύει τα πειραματόζωα από σηψαιμία [470]. Η χρήση της ανασυνδυασμένης PAF-AH δείχνει ότι το ένζυμο όχι μόνο προστατεύει από φλεγμονώδεις καταστάσεις οι οποίες επάγονται από τη χορήγηση εξωγενούς PAF αλλά και από ασθένειες στις οποίες εμπλέκεται ο PAF και τα διάφορα οξειδωμένα φωσφολιπίδια.



ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ 3 ΥΠΟΚΛΑΣΜΑΤΩΝ ΤΗΣ LDL ΑΝΘΡΩΠΙΝΟΥ
ΠΛΑΣΜΑΤΟΣ ΜΕ ΥΠΕΡΦΥΓΟΚΕΝΤΡΗΣΗ ΒΑΘΜΙΑΩΣΗΣ
ΠΥΚΝΟΤΗΤΩΝ

Αρχή της μεθόδου

Ο διαχωρισμός των λιποπρωτεϊνών του πλάσματος με υπερφυγοκέντρηση βασίζεται στην παρατήρηση ότι διαφορές στο λιπιδιακό περιεχόμενο των λιποπρωτεϊνών έχουν ως αποτέλεσμα την επιπλευσή τους σε διαφορετικές πυκνότητες [168]. Απομονώνονται οι εξής λιποπρωτεΐνες στις αντίστοιχες πυκνότητες.

VLDL +IDL	d=0,096-1,019g/ml
LDL	d=1,019-1,063g/ml
HDL	d=1,063-1,210g/ml
Lp(a)	d=1,060-1,107g/ml

Υλικά - Όργανα

Garamycin, (Gentamicin sulfate, Schering-Plough). Το διάλυμα περιέχει 40 mg θεικής γενταμικίνης/ml υπάρχει και σε φιαλίδια των 2 ml.

KBr. Το KBr ξηραίνεται σε κλίβανο στους 100°C για 24 h και διατηρείται σε ξηραντήρα.

Υπερφυγόκεντρος (L7, Beckman).

Κεφαλή υπερφυγοκέντρου 'ρότορας', (NVT-65, Beckman).

Σωλήνες υπερφυγοκέντρου Polyallomer των 13ml για κεφαλή NVT-65 (Beckman).

Μεμβράνη διαπίδυσης (Sigma). Η μεμβράνη ενεργοποιείται σε H₂O για 3 h και έχει όριο αποκλεισμού μεγαλύτερο από 12000.

Φίλτρα διήθησης 0.20 μ (Corning).



Διαλύματα εργασίας

• **10% EDTA.** Titriplex III, pH 7.0. 12.8247 g EDTANa₂·2H₂O διαλυτοποιούνται σε 90 ml H₂O. Ρυθμίζεται το pH στο 7.0 και ο όγκος συμπληρώνεται στα 100 ml με d H₂O. Το διάλυμα διατηρείται στους 4°C.

• **Διάλυμα KBr πυκνότητας 1.006.** 6.023 g KBr διαλυτοποιούνται σε d H₂O μέχρι τελικό όγκο, 500 ml. Το διάλυμα αυτό περιέχει 5μl/ml 10% EDTA και 1.25 μl/ml Garamycin και διατηρείται στους 4°C.

• **Διάλυμα KBr πυκνότητας 1.019.** 14.92 g KBr διαλυτοποιούνται σε d H₂O μέχρι τελικό όγκο, 500 ml. Το διάλυμα αυτό περιέχει 5μl/ml 10% EDTA και 1.25 μl/ml Garamycin και διατηρείται στους 4°C.

• **Διάλυμα KBr πυκνότητας 1.035.** 25.9g KBr διαλυτοποιούνται σε d H₂O μέχρι τελικό όγκο, 500 ml. Το διάλυμα αυτό περιέχει 5μl/ml 10% EDTA και 1.25 μl/ml Garamycin και διατηρείται στους 4°C.

• **Διάλυμα KBr πυκνότητας 1.063.** 45.99 g KBr διαλυτοποιούνται σε d H₂O μέχρι τελικό όγκο, 500 ml. Το διάλυμα αυτό περιέχει 5μl/ml 10% EDTA και 1.25 μl/ml Garamycin και διατηρείται στους 4°C.

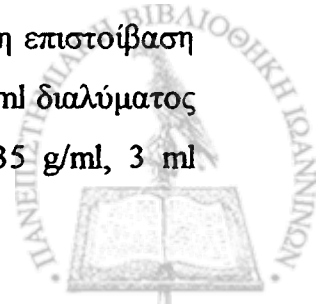
Πειραματική διαδικασία

Απομόνωση του πλάσματος

10 ml αίματος συλλέγονται σε πλαστικό σωλήνα ο οποίος περιέχει 100 μl αντιπηκτικού 10% K₂EDTA. Το αίμα φυγοκεντρείται στις 3100 rpm για 15 min, σε θερμοκρασία δωματίου ώστε να διαχωριστεί το πλάσμα από τα έμμορφα συστατικά. Έπειτα το πλάσμα συλλέγεται με αυτόματη πιπέτα και προστίθενται σε αυτό 5μl/ml, 10% EDTA για την αποφυγή οξειδωτικής τροποποίησης των λιποπρωτεϊνικών σωματιδίων και 1.25 μl/ml, αντιβιοτικού Garamycin. Το πλάσμα διατηρείται στους 4°C, το πολύ για μια εβδομάδα.

Επιστοιβασία των διαλυμάτων διαφόρων πυκνοτήτων και υπερφυγοκέντρηση

Σε 3 ml πλάσματος διαλύονται 0.42 g στερεού KBr, έτσι ώστε η πυκνότητα του πλάσματος να γίνει 1.10 g/ml. Το πλάσμα στη συνέχεια μεταφέρεται με πιπέτα Pasteur στον πυθμένα του υπερφυγοκεντρικού σωλήνα και ακολουθεί η επιστοιβασία των υπολοίπων διαλυμάτων με σήριγγα. Επιστοιβάζονται διαδοχικά 2 ml διαλύματος KBr πυκνότητας 1.063 g/ml, 3 ml διαλύματος KBr πυκνότητας 1.035 g/ml, 3 ml



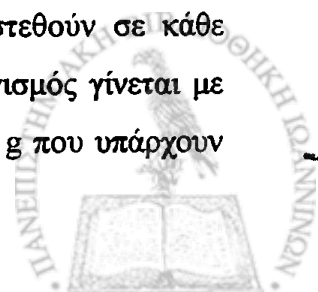
διαλύματος KBr πυκνότητας 1.019 g/ml και τέλος 3 ml διαλύματος KBr πυκνότητας 1.006 g/ml. Η επιστοίβαση των διαλυμάτων γίνεται πολύ αργά ώστε να μην προκαλείται η παραμικρή ανάμειξή τους. Στη συνέχεια, οι σωλήνες της υπερφυγοκέντρωσης ζυγοσταθμούνται, σφραγίζονται και τοποθετούνται στις υποδοχές του ρότορα NVT-65. Ακολουθεί υπερφυγοκέντρωση στις 40000 rpm, στους 15°C για 4 h. Μετά το πέρας της υπερφυγοκέντρωσης συλλέγονται προσεκτικά με τη βοήθεια αυτόματης πιπέτας 90 κλάσματα, όγκου 150 μl το καθένα, από την κορυφή του σωλήνα προς τα κάτω. Στο πάνω μέρος του σωλήνα έχει μαζευτεί η ωχροκίτρινη VLDL, περίπου στη μέση βρίσκεται η πορτοκαλόχρωη LDL και στον πυθμένα η HDL μαζί με τις πρωτεΐνες του πλάσματος. Στα κλάσματα αυτά γίνεται προσδιορισμός της χοληστερόλης και μέτρηση της συγκέντρωσης K^+ .

Ανασύσταση των υποκλασμάτων των λιποπρωτεϊνών

Η συγκέντρωση K^+ μετρατρέπεται υπολογιστικά σε πυκνότητα (d) κάθε κλάσματος και σχεδιάζεται η γραφική παράσταση της d σε συνάρτηση με τον αριθμό των κλασμάτων. Με βάση τη γραφική παράσταση συγκεκριμένα κλάσματα αναμιγνύονται ώστε να σχηματιστούν τα 3 υποκλάσματα της LDL. Τα υπόλοιπα κλάσματα απορρίπτονται. Έτσι, για το υποκλάσμα LDL-1 συλλέγονται τα κλάσματα περιοχής $d=1.030-1.033$ g/ml, για το LDL-2 τα κλάσματα που έχουν $d=1.034-1.040$ g/ml και τέλος για το LDL-3 τα κλάσματα με $d=1.041-1.048$ g/ml.

Έκπλυση των υποκλασμάτων της LDL

Επειδή η υπερφυγοκέντρωση γίνεται με σχεδόν κάθετο ρότορα (Near Vertical, NVT) τα υποκλάσματα της LDL που απομονώνονται έχουν προσμίξεις με αλβουμίνη, η οποία μετά την υπερφυγοκέντρωση συνήθως κατανέμεται σε όλο το μήκος του σωλήνα. Για το λόγο αυτό μετά την απομόνωσή τους τα υποκλάσματα της LDL υπερφυγοκεντρούνται ακόμη μια φορά στο διάλυμα της πυκνότητας της LDL, 1.063 g/ml. Η έκπλυση αυτή βοηθά στην απαλλαγή από τις προσμίξεις της αλβουμίνης. Το κάθε υποκλάσμα που συλλέγεται από την υπερφυγοκέντρωση βαθμίδωσης πυκνοτήτων τοποθετείται σε πλαστικό σωλήνα και μετράται ο όγκος του. Υπολογίζονται τα g του στερεού KBr που πρέπει να προστεθούν σε κάθε υποκλάσμα ώστε η πυκνότητά του να γίνει 1.063 g/ml. Ο υπολογισμός γίνεται με αφαίρεση από τα g KBr που αντιστοιχούν στην $d=1.063$ g/ml των g που υπάρχουν



στην δεδομένη πυκνότητα του υποκλάσματος. Τα συνολικά g που προστίθενται προκύπτουν από τον πολλαπλασιασμό της διαφοράς των g KBr (μεταξύ της πυκνότητας του κάθε υποκλάσματος και της πυκνότητας του διαλύματος έκπλυσης) με τον όγκο του κάθε υποκλάσματος. Με διορθωμένη την πυκνοτητα του το κάθε υποκλάσμα τοποθετείται σε υπερφυγοκεντρικό σωλήνα ο όγκος του οποίου συμπληρώνεται με διάλυμα KBr πυκνότητας 1.063 g/ml. Οι σωλήνες, αφού ζυγοσταθμιστούν, σφραγίζονται και τοποθετούνται στην κεφαλή NVT-65 της υπερφυγοκέντρου. Η υπερφυγοκέντρωση γίνεται στις 40000 rpm, για 10 h, στους 14°C. Μετά το τέλος της υπερφυγοκέντρωσης το κάθε υποκλάσμα LDL έχει μαζευτεί στην κορυφή του σωλήνα από όπου συλλέγεται με σύριγγα. Μετά την συλλογή τους τα υποκλάσματα διηθούνται από φίλτρο 0.20 μ και προσδιορίζεται η περιεκτικότητά τους σε πρωτεΐνη. Τα υποκλάσματα διατηρούνται στους 4°C, (όχι περισσότερο από 2 εβδομάδες).

ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ 5 ΥΠΟΚΛΑΣΜΑΤΩΝ ΤΗΣ LDL ΑΝΘΡΩΠΙΝΟΥ ΠΛΑΣΜΑΤΟΣ ΜΕ ΙΣΟΠΥΚΝΙΚΗ ΥΠΕΡΦΥΓΟΚΕΝΤΡΩΣΗ ΒΑΘΜΙΑΩΣΗΣ ΠΥΚΝΟΤΗΤΩΝ

Υλικά - Όργανα

Garamycin (Gentamicin sulfate, Schering-Plough). Το διάλυμα περιέχει 40 mg θεϊκής γενταμυκίνης/ml, υπάρχει σε φιαλίδια των 2 ml.

KBr. Το KBr ξηραίνεται σε κλίβανο στους 100°C για 24 h και διατηρείται σε ξηραντήρα.

Πυκνόμετρο.

Υπερφυγόκεντρος (L7, Beckman).

Κεφαλή υπερφυγοκέντρου 'ρότορας', (SW41, Beckman).

Σωλήνες υπερφυγοκέντρου για κεφαλή Ultraclear 13 ml για κεφαλή SW41 (Beckman).

Μεμβράνη διαπίδυσης (Sigma). Η μεμβράνη ενεργοποιείται σε H₂O για 3 h και έχει όριο αποκλεισμού μεγαλύτερο από 12000.

Φίλτρα διήθησης 0.20 μ (Corning).



Διαλύματα εργασίας

•**10% EDTA.** Titriplex III, pH 7.0. 12.8247 g EDTANa₂·2H₂O διαλυτοποιούνται σε 90 ml H₂O. Ρυθμίζεται το pH στο 7.0 και ο όγκος συμπληρώνεται στα 100 ml με H₂O. Το διάλυμα διατηρείται στους 4°C.

•**Διάλυμα NaCl 1.006 g/ml** 9 g NaCl, 0.4 g EDTA και 100 μl Garamycin διαλυτοποιούνται σε 1 L H₂O. Ρυθμίζεται το pH στο 7.4 και το διάλυμα φιλτράρεται υπό κενό σε φίλτρα διήθησης 0.20 μ. Η ακριβής πυκνότητα του διαλύματος μετριέται σε πυκνόμετρο. Το διάλυμα διατηρείται στο ψυγείο, στους 4°C.

•**Διάλυμα NaCl-KBr 1.357 g/ml.** 153 g NaCl, 354 g KBr, 0.4 g EDTA και 10 μl Garamycin διαλυτοποιούνται σε 1 L H₂O. Ρυθμίζεται το pH στο 7.4 και το διάλυμα φιλτράρεται υπό κενό σε φίλτρα διήθησης 0.20 μ. Η ακριβής πυκνότητα του διαλύματος μετριέται σε πυκνόμετρο. Το διάλυμα διατηρείται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος γιατί λόγω της υψηλής του πυκνότητας σχηματίζει κρυστάλλους στο ψυγείο.

•**Διαλύματα NaCl-KBr 1.019, 1.063 και 1.240 g/ml.** Τα διαλύματα NaCl-KBr διαφόρων πυκνοτήτων παρασκευάζονται με την ανάμειξη κατάλληλων όγκων διαλύματος NaCl 1.006 g/ml και διαλύματος NaCl-KBr 1.357 g/ml. Οι όγκοι των διαλυμάτων υπολογίζονται με τη χρήση του παρακάτω τύπου:

$$d_X \cdot (V_A + V_B) = (V_A \cdot d_A) + (V_B \cdot d_B) \quad \{1\}$$

όπου: d_X , η επιθυμητή τελική πυκνότητα του διαλύματος

V_A και d_A , ο όγκος και η ακριβής πυκνότητα του διαλύματος NaCl 1.006 g/ml

V_B και d_B , ο όγκος και η ακριβής πυκνότητα του διαλύματος NaCl-KBr 1.357 g/ml

Μετά την παρασκευή γίνεται ακριβής μέτρηση της πυκνότητας κάθε διαλύματος και η πυκνότητα ρυθμίζεται στην τελική επιθυμητή τιμή της με την προσθήκη διαλύματος NaCl 1.006 g/ml ή NaCl-KBr 1.357 g/ml, ο όγκος του οποίου υπολογίζεται εκ νέου με τη χρήση της εξίσωσης {1} Τα διαλύματα διατηρούνται στους 4°C.

Αρχή της μεθόδου

Με την υπερφυγοκέντρωση επιτυγχάνεται ο σχηματισμός μίας συνεχούς βαθμίδωσης πυκνοτήτων στην οποία κατανέμονται τα υποκλάσματα των λιποπρωτεϊνών ανάλογα με την πυκνότητά τους [19].



Πειραματική πορεία

Απομόνωση του πλάσματος

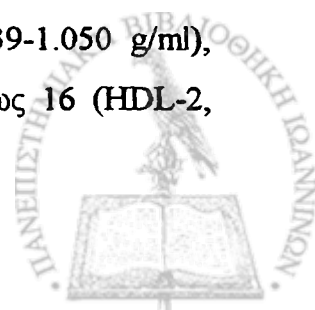
10 ml αίματος ατόμων με επίπεδα Lp(a) $< 8 \text{ mg/ml}$ συλλέγονται σε πλαστικό σωλήνα ο οποίος περιέχει 100 μl αντιπηκτικού 10% K_2EDTA . Το αίμα φυγοκεντρείται στις 3100 rpm για 15 min, σε θερμοκρασία δωματίου ώστε να διαχωριστεί το πλάσμα από τα έμμορφα συστατικά. Έπειτα το πλάσμα συλλέγεται με αυτόματη πιπέτα και προστίθενται σε αυτό 5 $\mu\text{l/ml}$ πλάσματος 10% EDTA για την αποφυγή οξειδωτικής τροποποίησης των λιποπρωτεϊνικών σωματιδίων και 1.25 $\mu\text{l/ml}$ πλάσματος αντιβιοτικού Garamycin. Το πλάσμα διατηρείται στους 4°C , το πολύ για μια εβδομάδα.

Επιστοιβασία των διαλυμάτων διαφόρων πυκνοτήτων και υπερφυγοκέντρωση

3 ml πλάσματος αναμιγνύονται με 0.9660 g στερεού KBr, έτσι ώστε η πυκνότητα του πλάσματος να γίνει 1.21 g/ml. Ακριβώς 3 ml αυτού του πλάσματος μεταφέρονται με πιπέτα Pasteur στο σωλήνα της υπερφυγοκέντρου, όπου έχουν ήδη τοποθετηθεί στον πυθμένα 2 ml διαλύματος NaCl-KBr $d=1.24 \text{ g/ml}$. Η επιστοιβασία των υπολοίπων διαλυμάτων γίνεται με όργανο αυτόματης ροής. (Auto-densi flow, Buchler Instruments) και επιστιβάζονται διαδοχικά 2 ml διαλύματος NaCl-KBr $d=1.063 \text{ g/ml}$, 2.5 ml διαλύματος NaCl-KBr $d=1.019 \text{ g/ml}$ και τέλος 2.5 ml διαλύματος NaCl $d=1.006 \text{ g/ml}$. Οι σωλήνες της υπερφυγοκέντρωσης ζυγοσταθμούνται και τοποθετούνται στις υποδοχές του ρότορα SW-41. Ακολουθεί υπερφυγοκέντρωση στις 40000 rpm, στους 15°C για 44 h. Μετά το πέρας της υπερφυγοκέντρωσης συλλέγονται προσεκτικά με τη βοήθεια αυτόματης πιπέτας 30 κλάσματα, όγκου 400 μl το καθένα, από την κορυφή του σωλήνα προς τα κάτω. Στα κλάσματα αυτά γίνεται προσδιορισμός πρωτεΐνης.

Ανασύσταση των υποκλασμάτων των λιποπρωτεϊνών

Συγκεκριμένα κλάσματα αναμιγνύονται ώστε να σχηματιστούν τα υποκλάσματα των λιποπρωτεϊνών. Η ανάμιξη γίνεται με τον παρακάτω τρόπο: κλάσματα 1 και 2 (VLDL+IDL, $d < 1.019 \text{ g/ml}$), κλάσματα 3 και 4 (LDL-1, $d=1.019-1.023 \text{ g/ml}$), κλάσματα 5 και 6 (LDL-2, $d=1.023-1.029 \text{ g/ml}$), κλάσματα 7 και 8 (LDL-3, $d=1.029-1.039 \text{ g/ml}$), κλάσματα 9 και 10 (LDL-4, $d=1.039-1.050 \text{ g/ml}$), κλάσματα 11 και 12 (LDL-5, $d=1.050-1.63 \text{ g/ml}$), κλάσματα 13 έως 16 (HDL-2,



$d=1.063-1.100$ g/ml), κλάσματα 17 έως 22 (HDL-3, $d=1.100-1.167$ g/ml), κλάσματα 23 και 24 (VHDL, $d=1.167-1.190$ g/ml).

Διαπίδυση και αποθήκευση των λιποπρωτεϊνικών υποκλασμάτων.

Τα υποκλάσματα υποβάλλονται σε διαπίδυση για 24 h έναντι 2x5 L 10 mM PBS + 0.05% EDTA pH 7.4, με αλλαγή του διαλύματος διαπίδυσης στις 6 h, ώστε να απομακρυνθεί η μεγάλη περίσσεια αλάτων. Στη συνέχεια διηθούνται από φίλτρο 0.20 μ και προσδιορίζεται η περιεκτικότητά τους σε πρωτεΐνη. Τα υποκλάσματα διατηρούνται στους 4°C, όχι για περισσότερο από 2 εβδομάδες.

ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ Lp(a) ΑΝΘΡΩΠΙΝΟΥ ΠΛΑΣΜΑΤΟΣ ΜΕ ΥΠΕΡΦΥΓΟΚΕΝΤΡΗΣΗ ΒΑΘΜΙΑΔΩΣΗΣ ΠΥΚΝΟΤΗΤΩΝ [555]

Υλικά - Όργανα

Garamycin (Gentamicin sulfate, Schering-Plough). Το διάλυμα περιέχει 40 mg θεικής γενταμικίνης/ml, υπάρχει σε φιαλίδια των 2 ml.

KBr. Το KBr ξηραίνεται σε κλίβανο στους 100°C για 1 h και διατηρείται σε ξηραντήρα.

Υπερφυγόκεντρος (L7, Beckman).

Κεφαλή υπερφυγοκέντρου (SW-41, Beckman).

Σωλήνες υπερφυγοκέντρου mat 13 ml για κεφαλή SW-41 (Beckman).

Διαλύματα εργασίας

•10% EDTA. Titriplex III, pH 7.0. 12.8247 g EDTANa₂·2H₂O διαλυτοποιούνται σε 90 ml H₂O. Ρυθμίζεται το pH στο 7.0 και ο όγκος συμπληρώνεται στα 100 ml με H₂O. Το διάλυμα διατηρείται στους 4°C.

•Διάλυμα KBr πυκνότητας 1.050. 6.023 g KBr διαλυτοποιούνται σε d H₂O 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 H₂O 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

Απομόνωση του πλάσματος

10 ml αίματος από διάφορους δότες με συγκέντρωση Lp(a) μικρότερη από 8 mg/dl για τα control ή μεγαλύτερη από 30 mg/dl (ισομορφές F, S1, S2, S2/S3), συλλέγονται σε πλαστικό σωλήνα ο οποίος περιέχει 100 μl αντιπηκτικού 10% K₂EDTA. Το κάθε σωληνάκι φυγοκεντρείται στις 3100 rpm για 15 min, σε θερμοκρασία δωματίου ώστε να διαχωριστεί το πλάσμα από τα έμμορφα συστατικά του αίματος. Έπειτα το πλάσμα συλλέγεται με αυτόματη πιπέτα και προστίθενται σε αυτό 5μl/ml 10% EDTA για την αποφυγή οξειδωτικής τροποποίησης των λιποπρωτεϊνικών σωματιδίων και 1.25 μl/ml αντιβιοτικού Garamycin. Το πλάσμα διατηρείται στους 4°C, το πολύ για μια εβδομάδα.

Επιστοιβασή των διαλυμάτων διαφόρων πυκνοτήτων και υπερφυγοκέντρωση

3 ml πλάσμα από κάθε δότη αναμιγνύονται με 1.23 g στερεού KBr και το πλάσμα στη συνέχεια μεταφέρεται με πιπέτα Pasteur στον πυθμένα του υπερφυγοκεντρικού σωλήνα όπου ακολουθεί η επιστοιβασή των υπολοίπων διαλυμάτων με όργανο αυτόματης ροής, 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 H₂O. Στη συνέχεια, οι σωλήνες της υπερφυγοκέντρωσης ζυγοσταθμούνται κλείνονται και τοποθετούνται στις υποδοχές του ρότορα SW-41. Ακολουθεί υπερφυγοκέντρωση στις 40000 rpm, στους 15°C για 24 h. Μετά το πέρας της υπερφυγοκέντρωσης συλλέγονται προσεκτικά με την βοήθεια αυτόματης πιπέτας 28 κλάσματα, όγκου 400 μl το καθένα, από την κορυφή του σωλήνα προς τα κάτω. Η στιβάδα της Lp(a) εντοπίζεται μεταξύ της LDL και της HDL. Σε όλα τα κλάσματα γίνεται προσδιορισμός χοληστερόλης, συγκέντρωσης Lp(a), συγκέντρωσης K⁺ καθώς και ενεργότητας PAF-AH. Τα κλάσματα που περιέχουν την Lp(a) (d=1.050-1.100 g/ml) συλλέγονται και υποβάλλονται σε χρωματογραφία μοριακής διήθησης για επιπλέον καθαρισμό από τυχόν προσμίξεις με άλλες λιποπρωτεΐνες.

Απομόνωση Lp(a) από πλάσμα εμπλουτισμένο με LDL-5

Σε ορισμένα πειράματα το πλάσμα από δότες με Lp(a) εμπλουτίστηκε με ορισμένη ποσότητα (mg πρωτεΐνης) πυκνού υποκλάσματος LDL-5, d=1.050-1.063 g/ml, το οποίο είχε απομονωθεί με υπερφυγοκέντρωση ισοπυκνικής βαθμίδωσης πυκνοτήτων από φυσιολογικό πλάσμα χωρίς ανιχνεύσιμα επίπεδα Lp(a). Η

πειραματική διαδικασία απομόνωσης της Lp(a) στη συνέχεια παρέμεινε η ίδια όπως περιγράφεται παραπάνω.

Υπερφυγοκεντρική συμπύκνωση Lp(a)

Τα κλάσματα που συλλέγονται από την στήλη μοριακής διήθησης και αντιστοιχούν στο MB της Lp(a) ενώνονται και τοποθετούνται σε σωλήνες υπερφυγοκέντρου. Οι σωλήνες συμπληρώνονται με το διάλυμα έκλουσης της στήλης και αφού ζυγοσταθμιστούν κλείνονται και υπερφυγοκεντρούνται στις 40000 rpm για 10 h στους 15°C. Μετά την υπερφυγοκέντρωση, η Lp(a) συλλέγεται από τον πυθμένα του σωλήνα όπου έχει συμπυκνωθεί, αφού πρώτα απομακρυνθεί το υπερκείμενο με σήριγγα.

ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΔΙΗΘΗΣΗΣ

Υλικά -Διαλύματα

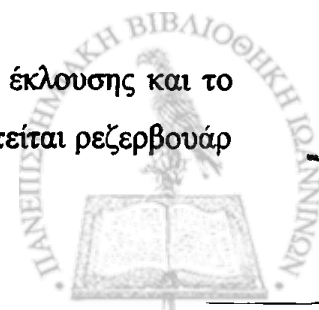
- **Sepharose 6B (Pharmacia).** Η εμπορική συσκευασία είναι εναιώρημα πηκτής σε 20% αιθανόλη. Η πηκτή παρασκευάζεται από αγαρόζη και η διάμετρος των σωματιδίων της κυμαίνεται από 45-165 nm. Διαχωρίζει μοριακά βάρη δεξτρινών από 10.000-1.000.000 και σφαιρικών πρωτεϊνών από 10.000-4.000.000.
- **Ρυθμιστικό διάλυμα έκλουσης.** 10 mM Tris-base, (1.211 g/L), 1M NaCl, (58.44 g/L), 1mM EDTA, (0.3722 g/L) και 0.02% NaN₃
- **Πρότυπα μοριακά βάρη.** 2.5 mg/ml Dextran Blue, 2.5 mg/ml αποφερριτίνη, 2.5 mg/ml θυροσφαιρίνη, 2.5 mg/ml αλβουμίνη βοδινού ορού και 2.5 mg/ml κυτόχρωμα C. Όλα τα πρότυπα διαλύματα υπάρχουν σε συσκευασίες των 50 mg/ml και αραιώνονται στα 2.5 mg/ml με d H₂O.

Πειραματική διαδικασία

Η πειραματική διάταξη εκτός από τη στήλη περιλαμβάνει περισταλτική αντλία με ταχύτητα ροής 18 ml/ h, UV-ανιχνευτή ρυθμισμένο στα 280 nm, καταγραφέα με ταχύτητα χάρτου 15 mm/ h, και αυτόματο συλλέκτη των εκλουσμάτων της στήλης ρυθμισμένο στα 8 min.

Πλήρωση της στήλης

196 ml Sepharose 6B αναμιγνύονται με 65 ml διαλύματος έκλουσης και το μείγμα απαερώνεται υπο κενό. Στο πάνω μέρος της στήλης τοποθετείται ρεζερβουάρ



με το υλικό αυτό και η στήλη πληρώνεται με ταχύτητα 30 ml/h. Η στήλη αφήνεται να εξισορροπήσει μια νύχτα και η διαχωριστική της ικανότητα ελέγχεται με την χρήση πρότυπων διαλυμάτων γνωστών μοριακών βαρών. Για κάθε πρότυπο μετρείται ο όγκος έκλουσής του (V_e , elution volume), ο όγκος στον οποίο εκλύεται η μεγάλου μοριακού βάρους (2000000) Dextran Blue, (V_d , void volume) και υπολογίζεται ο λόγος V_e/V_d . Σχεδιάζεται στη συνέχεια η ευθεία που έχει στον άξονα των X τους λόγους V_e/V_d και άξονα των Y τους λογάριθμους των αντίστοιχων μοριακών βαρών. Με βάση την πρότυπη αυτή καμπύλη μπορούν να υπολογιστούν κατά προσέγγιση τα MB άγνωστων πρωτεϊνών, όταν είναι γνωστός ο V_e .

Τοποθέτηση δείγματος

Η Lp(a) που συλλέγεται μετά από υπερφυγοκέντρηση βαθμίδωσης πυκνοτήτων KBr, τοποθετείται «φορτώνεται» στη στήλη. Η ταχύτητα με την οποία γίνεται η έκλυση του δείγματος είναι 18 ml/h ενώ συλλέγονται κλάσματα των 2.1 ml κάθε 8 min. Τα κλάσματα που αντιστοιχούν στο MB της Lp(a), συλλέγονται και υποβάλλονται σε υπερφυγοκεντρική συμπύκνωση.

ΑΝΑΓΩΓΙΚΗ ΔΙΑΣΠΑΣΗ ΤΗΣ Lp(a)

Υλικά - Διαλύματα

- **Μεμβράνη διαπίδυσης (Sigma).** Η μεμβράνη ενεργοποιείται σε d H₂O για 3h και κατακρατά οποιοδήποτε συστατικό έχει MB μεγαλύτερο από 12000.

- **Φίλτρα διήθησης 0.20 μ (Corning).**

- **20 mM Tris pH 7.4.** g Tris base και g EDTA διαλύονται σε 800 ml d H₂O. Το pH ρυθμίζεται στο 7.4 και συμπληρώνεται ο όγκος στα 1000 ml.

- **10 mM διθειοθρεϊτόλη, DTT.** 0.1543 g DTT διαλύονται σε 100 ml d H₂O. Το διάλυμα διατηρείται στους -20°C

Πειραματική διαδικασία

Lp(a) περιεκτικότητας 1 mg σε πρωτεΐνη υποβάλλεται σε 24ωρη διαπίδυση σε διάλυμα 20 mM Tris pH 7.4, στους 4°C και στη συνέχεια επώάζεται με 10 mM DTT στους 37°C για 3h. Δείγμα Lp(a) επώάζεται επίσης κάτω από τις ίδιες συνθήκες απουσία DTT. Όμοια πειράματα γίνονται και με LDL που απομονώνεται με υπερφυγοκέντρηση βαθμίδωσης πυκνοτήτων όπως περιγράφεται στη μεθοδολογία. Γίνεται ανάμειξη ίσων όγκων από κάθε υποκλάσμα της LDL (LDL-1 ως LDL-5), από

πλάσμα νορμολιπιδαιμικών ατόμων με επίπεδα Lp(a) < 8mg/dl. Μετά την επώαση ακολουθεί 24ωρη διαπίδυση σε διάλυμα 10 mM Tris pH 7.4. Η Lp(a) όπως και η LDL υποβάλλονται έπειτα σε υπερφυγοκέντρηση βαθμίδωσης πυκνοτήτων KBr όπως περιγράφεται στην υπερφυγοκεντρική απομόνωση της Lp(a). Συλλέγονται 28 κλάσματα των 400 μl τα οποία ελέγχονται για ενεργότητα PAF-AH. Η ενεργότητα του ενζύμου προσδιορίζεται επίσης σε 25 μl Lp(a) ή LDL πριν και αμέσως μετά την επώαση με DTT. Η παραχθείσα λιποπρωτεΐνη μετά την επώαση με DTT, που εμφανίζεται ως 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 ηλεκτροφόρηση αγαρόζης και SDS-πολυακρυλαμιδίου 3.75%. 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.

ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ K⁺

Ο προσδιορισμός του K⁺ γίνεται σε αυτόματο αναλυτή, Astra, Beckman με ηλεκτρόδιο αγωγιμότητας K⁺. Τα κλάσματα της υπερφυγοκέντρησης αραιώνονται (1/11 v/v) με d H₂O για να είναι μέσα στην κλίμακα μετρήσεων του οργάνου. Ο αναλυτής δίνει τις τιμές, σε μονάδες mmol/L οπότε πολλαπλασιάζονται με το μοριακό βάρος του KBr καθώς και με το συντελεστή αραιώσης ώστε να μετατραπούν σε μονάδες πυκνότητας g/L.

ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ LOWRY

Υλικά - Όργανα

NaOH

Na₂CO₃

Κιτρικό νάτριο (C₆H₅Na₃O₇•2H₂O, M.B.: 294.10 g/mol, Merck).

CuSO₄

Αντιδραστήριο φαινόλης 2 N. (Folin & Ciocalteu's phenol reagent, Sigma).

Φασματοφωτόμετρο ορατού



Διαλύματα εργασίας

• **Διάλυμα 1N NaOH.** 4 g NaOH διαλύονται σε 80 ml dH₂O. Το διάλυμα αφήνεται να κρυώσει, μεταφέρεται σε ογκομετρική των 100 ml όπου συμπληρώνεται ο όγκος με d H₂O. Το διάλυμα διατηρείται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.

• **Διάλυμα 0.5N NaOH.** Γίνεται αραιώση 1:1 (v/v) του διαλύματος 1N NaOH με d H₂O. Το διάλυμα διατηρείται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος

• **Διάλυμα 2% Na₂CO₃.** 2 g Na₂CO₃ διαλυτοποιούνται σε 100 ml H₂O. Το διάλυμα διατηρείται στους 4°C.

• **Διάλυμα 1% κιτρικού νατρίου.** 1.139 g κιτρικού νατρίου διαλυτοποιούνται σε 100 ml H₂O. Το διάλυμα διατηρείται στους 4°C.

• **Διάλυμα 0.5% CuSO₄ σε 1% κιτρικό νάτριο.** 0.5 g CuSO₄ διαλυτοποιούνται σε 100 ml διαλύματος κιτρικού νατρίου 1%. Το διάλυμα διατηρείται στους 4°C.

• **Διάλυμα εργασίας A** 2% Na₂CO₃ και 0.5% CuSO₄ σε αναλογία 50:1 (v/v). Σε 50 ml διαλύματος 2% Na₂CO₃ προσθέτεται 1 ml διαλύματος 0.5% CuSO₄. Το μίγμα παρασκευάζεται λίγο πριν τη χρήση του.

• **Πρότυπο διάλυμα 100 μg/ml BSA** σε 0.5N NaOH. 10 mg BSA διαλυτοποιούνται σε 100 ml H₂O. Το διάλυμα διατηρείται στους -20°C.

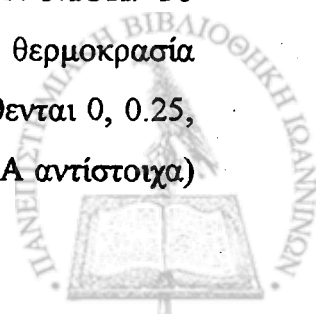
• **Αντιδραστήριο φαινόλης.** Ορισμένος όγκος Folin & Ciocalteu's αναμιγνύεται με ίσο όγκο d H₂O. Το αντιδραστήριο παρασκευάζεται λίγο πριν τη χρήση του.

Αρχή της μεθόδου

Οι πρωτεΐνες αρχικά αντιδρούν με τον Cu²⁺, σε αλκαλικό περιβάλλον, και στη συνέχεια ανάγουν το φωσφομολυβδαινικό-φωσφοβολφραμικό αντιδραστήριο με αποτέλεσμα το σχηματισμό μπλε χρώματος που απορροφά στα 720 nm [556].

Πειραματική Διαδικασία

Σε πλαστικό σωλήνα πολυπροπυλενίου μεταφέρεται μια ποσότητα δείγματος, ίσος όγκος 1N NaOH, και ο όγκος συμπληρώνεται στο 1 ml με 0.5 N NaOH. Το μίγμα αναδεύεται ισχυρά σε Vortex και αφήνεται για 60 min σε θερμοκρασία δωματίου. Ομοίως σε 5 πλαστικούς σωλήνες πολυπροπυλενίου προστίθενται 0, 0.25, 0.5, 0.75 και 1 ml προτύπου διαλύματος 100 μg/ml BSA (0-100 μg BSA αντίστοιχα)



και ο όγκος συμπληρώνεται στο 1 ml με 0.5N NaOH. Τα πρότυπα αφήνονται επίσης για 60 min σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά την επώαση της μίας ώρας σε κάθε σωλήνα προστίθενται 5 ml διαλύματος εργασίας A. Οι σωλήνες αναδεύονται ισχυρά σε Vortex, αφήνονται για 10 min σε θερμοκρασία δωματίου και στη συνέχεια προστίθενται 0.5 ml αντιδραστήριου φαινόλης. Επακολουθεί ισχυρή ανάδευση σε Vortex και επώαση για 30 min σε θερμοκρασία δωματίου. Τα δείγματα και τα πρότυπα μεταφέρονται σε γυάλινη κυψελίδα φωτομέτρου όπου μετράται η απορρόφησή τους στα 720 nm.

Επεξεργασία των αποτελεσμάτων

Με βάση τις απορροφήσεις των προτύπων δειγμάτων σχεδιάζεται με την βοήθεια ηλεκτρονικού υπολογιστή, η βέλτιστη ευθεία της μορφής $\psi = \alpha x + \beta$ που έχει στον άξονα των X την συγκέντρωση των προτύπων σε BSA και στον άξονα των Y τις απορροφήσεις των προτύπων. Από την εξίσωση της πρότυπης καμπύλης και από τις απορροφήσεις των δειγμάτων υπολογίζονται τα μg πρωτεΐνης που περιέχουν τα δείγματα.

ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ BCA

Αντιδραστήρια-Όργανα

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

Αντιδραστήριο A. Το αντιδραστήριο A είναι μείγμα ανθρακικού νατρίου, δισανθρακικού νατρίου, δισιχρονικού οξέος και ταρταρικού νατρίου σε 0.2N NaOH.

Αντιδραστήριο B. Διάλυμα 4% CuSO₄.

Πρότυπο διάλυμα 2 mg/ml BSA σε 0.9% NaCl και 0.05% NaN₃.

Πλάκα αντίδρασης 96 θέσεων.

Μετρητής microelisa.

Διαλύματα εργασίας

Διάλυμα εργασίας. Το διάλυμα εργασίας προκύπτει από την ανάμιξη των αντιδραστηρίων A και B σε αναλογία 50:1. Το αντιδραστήριο παρασκευάζεται λίγο πριν τη χρήση του.



Πρότυπα διαλύματα BSA. Παρασκευάζονται με κατάλληλη αραιώση του διαλύματος BSA 2 mg/ml, έτσι ώστε να προκύψουν διαλύματα 0.2-1 mg/ml BSA. Τα πρότυπα διαλύματα BSA διατηρούνται στους -20°C.

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, το οποίο απορροφά στα 560 nm [557,558].

Πειραματική διαδικασία

Στην πλάκα των 96 θέσεων τοποθετούνται 10 μl δείγματος καθώς και 10 μl προτύπων. 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 που έχει στον άξονα των X την συγκέντρωση των προτύπων σε BSA και στον άξονα των Y τις απορροφήσεις των προτύπων. Από την εξίσωση της πρότυπης καμπύλης και από τις απορροφήσεις των δειγμάτων υπολογίζονται τα μg πρωτεΐνης που περιέχουν τα δείγματα.

EΚΧΥΛΙΣΗ ΤΩΝ ΛΙΠΙΔΙΩΝ ΤΩΝ ΥΠΟΚΛΑΣΜΑΤΩΝ ΤΗΣ LDL ΚΑΙ ΤΗΣ Lp(a) ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ BLIGH-DYER

Αρχή της μεθόδου

Με το σχηματισμό κατάλληλης πολικότητας μονοφασικού συστήματος διαλυτών επιτυγχάνεται η καταστροφή του μικκυλίου των σωματιδίων της LDL και της Lp(a) και απελευθερώνονται τα λιπίδιά τους. Με τη μετατροπή του μονοφασικού συστήματος σε διφασικό τα λιπίδια κατανέμονται στην χλωροφορμική φάση ενώ τα υδατοδιαλυτά συστατικά κατανέμονται στην υδατομεθανολική φάση [559].



Πειραματική διαδικασία

1 ml εναιωρήματος 250 mg/ml πρωτεΐνης κάθε υποκλάσματος της LDL ή 1 ml εναιωρήματος 180 mg/ml πρωτεΐνης Lp(a) μεταφέρεται σε γυάλινο βιδωτό σωλήνα χωρητικότητας 10 ml. Στο σωλήνα προστίθεται τριπλάσιος όγκος μείγματος CHCl_3 :MeOH σε αναλογία 1:2 v/v. Ακολουθεί περιοδική ισχυρή ανάδευση σε Vortex για 10 min και στη συνέχεια προστίθεται 1 ml CHCl_3 και μετά από ισχυρή ανάδευση, 1 ml H_2O οπότε και σχηματίζονται οι δύο φάσεις. Το μίγμα αναδεύεται ισχυρά και στη συνέχεια ο σωλήνας φυγοκεντρείται στις 1500 rpm για 10 min για να διαχωριστούν καλά οι φάσεις. Η χλωροφορμική φάση (κάτω φάση) που περιέχει τα φωσφολιπίδια συλλέγεται με πιπέτα Pasteur και μεταφέρεται ποσοτικά σε άλλο γυάλινο σωλήνα όπου το χλωροφόρμιο εξατμίζεται σε ρεύμα N_2 μέχρι ξηρού και το υπόλειμμα αναδιαλύεται σε μικρό όγκο μείγματος CHCl_3 :MeOH (1:1, v/v). Το χλωροφορμικό εκχύλισμα περιέχει το σύνολο των λιπιδίων και υποβάλλεται σε χρωματογραφία λεπτής στοιβάδος, (TLC).

ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΛΙΠΙΔΙΩΝ ΤΩΝ ΥΠΟΚΛΑΣΜΑΤΩΝ ΤΗΣ LDL ΚΑΙ ΤΗΣ Lp(a) ΜΕ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΛΕΠΤΗΣ ΣΤΙΒΑΔΑΣ (TLC)

Αντιδραστήρια - Όργανα

•Πρότυπα φωσφολιπιδίων. Χρησιμοποιούνται διαλύματα φωσφολιπιδίων (Sigma), Φωσφατιδυλοχολίνη, PC, φωσφατιδυλοαιθανολαμίνη, PE, σφιγγομυελίνη Sph, λυσοφωσφατιδυλοχολίνη, Lyso-PC, σε CHCl_3 :MeOH 1:1 (v/v).

•Εκχύλισμα λιπιδίων Lp(a) και υποκλασμάτων της LDL. Τα λιπίδια των υποκλασμάτων της LDL και της Lp(a) εκχυλίζονται με τη μέθοδο Bligh-Dyer, όπως έχει περιγραφεί.

Θάλαμος TLC.

Πλάκες TLC (1.05721, Merck).

Ειδικά ξυστηράκια πλακών TLC (Alltech).

Γυάλινοι βιδωτοί σωλήνες χωρητικότητας 20 ml.



Αρχή της μεθόδου

Ο διαχωρισμός των λιπιδίων επιτυγχάνεται με τη διαφορετική μετατόπιση του κάθε λιπιδίου στην πλάκα TLC, ανάλογα με την πολικότητά του καθώς και την πολικότητα μίγματος διαλυτών που χρησιμοποιείται [560].

Πειραματική διαδικασία

Οι εσωτερικές πλευρές του θαλάμου καλύπτονται με διηθητικό χαρτί. Ετοιμάζεται μίγμα διαλυτών $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O}$ (65:35:6, v/v) το οποίο αποχύνεται μέσα στο θάλαμο, διαβρέχοντας ταυτόχρονα το διηθητικό χαρτί. Ο θάλαμος σκεπάζεται με το καπάκι του και αφήνεται να κορεστεί για τουλάχιστον 1 h. Η πλάκα TLC χωρίζεται σε παράλληλες κάθετες λουρίδες, το πλάτος των οποίων εξαρτάται από την περιεκτικότητα των δειγμάτων σε λιπίδια καθώς και από τον αριθμό των δειγμάτων. Στις δύο ακραίες λουρίδες τοποθετούνται πρότυπες ουσίες PC, Lyso-PC, Sph και PE. Σε απόσταση 2 cm από την κάτω πλευρά της πλάκας σημειώνεται με μολύβι παράλληλη ευθεία γραμμή, η οποία αποτελεί το σημείο τοποθέτησης των δειγμάτων. Τα δείγματα και τα πρότυπα τοποθετούνται με πιπέτα Pasteur στο κατάλληλο σημείο της πλάκας. Αφού εξατμιστούν οι διαλύτες η πλάκα τοποθετείται μέσα στο θάλαμο, που έχει πλέον κορεστεί με το μίγμα των διαλυτών και αφήνεται να αναπτυχθεί για μία ώρα. Μετά το τέλος της χρωματογραφίας σημειώνεται με μολύβι το μέτωπο του διαλύτη και η πλάκα στεγνώνεται στον απαγωγό με ρεύμα ζεστού αέρα. Η εμφάνιση της πλάκας γίνεται σε θάλαμο που περιέχει ατμούς I_2 . Οι κηλίδες των λιπιδίων και των προτύπων σημειώνονται πάνω στην πλάκα με μολύβι και στη συνέχεια απομακρύνεται το I_2 με θερμό αέρα στον απαγωγό. Ξύνεται προσεκτικά η περιοχή του κάθε λιπιδίου και το πυρίτιο μεταφέρεται σε γυάλινο βιδωτό σωλήνα για τον προσδιορισμό του φωσφόρου.

ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΦΩΣΦΟΡΟΥ ΣΤΑ ΦΩΣΦΟΛΙΠΙΑ

Υλικά - Όργανα

H_2O . Χρησιμοποιείται δισαπεσταγμένο H_2O , απαλλαγμένο από φωσφορικά.

Γυάλινοι δοκιμαστικοί σωλήνες Pyrex. Οι σωλήνες πλένονται λίγο πριν από τη χρήση τους με χρωμοθειϊκό οξύ ή άλλο πυκνό οξύ, επειδή τα απορρυπαντικά, που



περιέχουν φωσφορικά άλατα, αφήνουν στα τοιχώματα των σωλήνων ένα λεπτό φιλμ που περιέχει φώσφορο.

Γυάλινα σκεύη. Όλα τα γυάλινα σκεύη που χρησιμοποιούνται (σιφώνια, ποτήρια ζέσεως) πλένονται λίγο πριν από τη χρήση τους με χρωμοθειικό οξύ ή άλλο πυκνό οξύ.

Φίλτρα διήθησης ελεύθερα από ανόργανα άλατα (Macherey-Nagel).

Θερμαινόμενη πλάκα με ρυθμιστή θερμοκρασίας.

Διαλύματα εργασίας

• **Πρότυπο διάλυμα φωσφορικών.** 1.7575 mg KH_2PO_4 , το οποίο πριν την χρήση ξηραίνεται στους 105°C για 60 min, διαλυτοποιούνται σε 100 ml d H_2O . Το διάλυμα που προκύπτει περιέχει ακριβώς 4 μg P/ml. Το διάλυμα διατηρείται στους 4°C .

• 72% HClO_4

• **0.4% μολυβδαινικό αμμώνιο.** 0.425 g $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ διαλυτοποιούνται σε 100 ml d H_2O . Το διάλυμα παρασκευάζεται λίγο πριν τη χρήση του.

• **Διάλυμα αμινοναφθολο-σουλφονικού οξέος (ANSA).** 30 g NaHSO_3 (ή 28.5 g $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$) και 6 g Na_2SO_3 διαλυτοποιούνται σε 250 ml d H_2O . Σε αυτό το διάλυμα θειωδών αλάτων προστίθενται 0.5 g ANSA. Το διάλυμα αφήνεται σε ηρεμία για 3 h και αν σχηματιστεί ίζημα διηθείται. Το διάλυμα διατηρείται στους 4°C .

Αντιδραστήριο ANSA. 4 ml διαλύματος ANSA αναμιγνύονται με 6 ml d H_2O . Το αντιδραστήριο ANSA παρασκευάζεται λίγο πριν την χρήση του.

Αρχή της μεθόδου

Ο προσδιορισμός φωσφόρου βασίζεται στην μετατροπή του οργανικού φωσφόρου σε ανόργανα φωσφορικά ιόντα, μετά από καύση με HClO_4 . Στη συνέχεια στο σχηματίζεται φωσφομολυβδαινικό, με την προσθήκη μολυβδαινικού αμμωνίου, το οποίο ανάγεται προς κυανό του φωσφομολυβδαινίου, με θέρμανση σε όξινο περιβάλλον. Ως αναγωγικό χρησιμοποιείται το ANSA [561].

Πειραματική διαδικασία.

Ο προσδιορισμός φωσφόρου γίνεται σε φωσφολιτίδια που βρίσκονται πάνω σε πλάκα TLC, μετά τον διαχωρισμό τους. Ξύνονται από την πλάκα TLC οι κηλίδες



που αντιστοιχούν στα Rf των προτύπων PC, PE, Lyso-PC και Sph και το πυρίτιο μεταφέρεται ποσοτικά σε γυάλινο δοκιμαστικό σωλήνα Pyrex. Σε κάθε σωλήνα προστίθεται 0.5 ml 72% HClO₄ και τα δείγματα καίγονται σε αμμόλουτρο 170-180°C για μια ώρα. Μετά το τέλος της καύσης τα δείγματα αφήνονται να αποκτήσουν θερμοκρασία περιβάλλοντος και στη συνέχεια προστίθεται από 1 ml d H₂O. Κατά τη διάρκεια της καύσης των δειγμάτων ετοιμάζονται τα πρότυπα δείγματα. Ετοιμάζονται 6 γυάλινοι δοκιμαστικοί σωλήνες Pyrex στους οποίους προστίθεται από 0.5 ml 72% HClO₄ και συνέχεια προστίθεται 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 και 1 ml (0-4 μg φωσφόρου) από το πρότυπο διάλυμα φωσφορικών. Ο όγκος συμπληρώνεται στο 1.5 ml με την προσθήκη d H₂O. Από το σημείο αυτό και έπειτα τα δείγματα και τα πρότυπα κατεργάζονται με τον ίδιο ακριβώς τρόπο. Σε κάθε δοκιμαστικό σωλήνα προστίθενται 3 ml διαλύματος μολυβδαινικού αμμωνίου και 0.5 ml αντιδραστηρίου ANSA. Ακολουθεί ισχυρή ανάδευση σε Vortex και θέρμανση σε υδρόλουτρο 100°C για 10 min ακριβώς. Οι σωλήνες ψύχονται και στον κάθε ένα προστίθενται 5 ml οξικού αιθυλεστέρα. Ακολουθεί ισχυρή ανάδευση σε Vortex και τα δείγματα αφήνονται να ηρεμήσουν. Σχηματίζεται διφασικό σύστημα και το κυανούν του μολυβδαινίου εκχλιίζεται στην οργανική φάση. Μέρος της οργανικής φάσης μεταφέρεται σε γυάλινη κυψελίδα φωτομέτρου και γίνεται μέτρηση της απορρόφησης στα 780 nm.

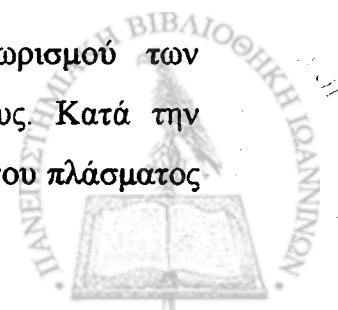
Επεξεργασία των αποτελεσμάτων

Με βάση τις απορροφήσεις των προτύπων διαλυμάτων σχηματίζεται, σε ηλεκτρονικό υπολογιστή, καταγράφημα που περιλαμβάνει την περιεκτικότητα των προτύπων σε φώσφορο στον άξονα των X και τις απορροφήσεις των προτύπων στον άξονα Y. Χαράζεται η βέλτιστη ευθεία της μορφής $\psi = \alpha x + \beta$ και υπολογίζεται η εξίσωσή της. Από τις απορροφήσεις των δειγμάτων με βάση την εξίσωση της πρότυπης καμπύλης υπολογίζεται η περιεκτικότητα των δειγμάτων σε φώσφορο.

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

Μέτωπο		
α-σφαιρίνες	<input style="width: 100%; height: 20px;" type="text"/>	HDL
	<input style="width: 100%; height: 20px;" type="text"/>	Lp(a)
προ-β-σφαιρίνες	<input style="width: 100%; height: 20px;" type="text"/>	VLDL
β-σφαιρίνες	<input style="width: 100%; height: 20px;" type="text"/>	LDL
Αρχή		

Δείγμα

Χρησιμοποιείται ορός ή πλάσμα με EDTA καθώς και υποκλάσματα LDL στη φυσική ή οξειδωμένη τους μορφή. Η συντήρηση των δειγμάτων γίνεται στους 4°C το πολύ για 3 μέρες

Όργανα- Αντιδραστήρια

Συσκευή ηλεκτροφόρησης Sebia -K20,

Τροφοδοτικό.

Εμπορική συσκευασία Kit ηλεκτροφόρησης Hydrigel Lipo + Lp(a) (Sebia) που περιλαμβάνει:

10 πλάκες με πηκτή αγαρόζης, έτοιμες για χρήση.

Φιαλίδια συμπυκνωμένου ρυθμιστικού διαλύματος Tris-βαρβιτουρικού. Το περιεχόμενο κάθε φιαλιδίου αραιώνεται στα 1000ml με d H₂O

Φιαλίδια συμπυκνωμένης χρωστικής 3% Sudan black.

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 H₂O.

Ειδική μεμβράνη με θέσεις τοποθέτησης των δειγμάτων.



Διηθητικά χαρτιά

Διάλυμα EtOH 45% σε d H₂O (v/v)

Εκτέλεση ηλεκτροφόρησης

Η πλάκα με την πηκτή αγαρόζης τοποθετείται σε επιφάνεια καθαρισμένη εκ των προτέρων με 45% EtOH. Η πηκτή έχει χαραγμένα δύο βέλη τα οποία καθορίζουν την θέση τοποθέτησης της μεμβράνης των δειγμάτων. Η υγρασία που υπάρχει στην επιφάνεια της πηκτής απορροφάται γρήγορα με την εφαρμογή διηθητικού χαρτιού στην θέση που ορίζεται από τα βέλη. Στην συνέχεια εφαρμόζεται η μεμβράνη τοποθέτησης των δειγμάτων πάνω στην πηκτή 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 φυσαλίδων 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 ανεστραμμένη πάνω στη γέφυρα της ηλεκτροφόρησης με τα δείγματα προς την καθοδική πλευρά.

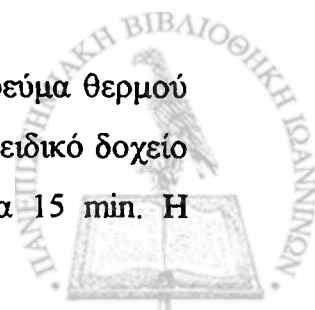
Συνθήκες ηλεκτροφόρησης

Η συσκευή σκεπάζεται με το καπάκι της και συνδέονται τα ηλεκτρόδια με το τροφοδοτικό. Ρυθμίζονται οι συνθήκες ηλεκτροφόρησης ως εξής:

Τάση σταθερή	50V
Ένταση ρεύματος	3mA για κάθε δείγμα
Διάρκεια ηλεκτροφόρησης	90min

Χρώση των λιποπρωτεϊνών

Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης η πηκτή στεγνώνεται σε ρεύμα θερμού αέρα ($\leq 80^{\circ}\text{C}$). 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 όπως φαίνεται και στο σχήμα 1. Η εμφάνιση και άλλων ζωνών, έστω και αχνών σημαίνει ότι το δείγμα έχει προσμίξεις και από άλλες λιποπρωτεΐνες. Τα υποκλάσματα της φυσικής LDL έχουν την ίδια μετανάστευση με την ολική LDL στην ηλεκτροφόρηση αγαρόζης

Μέτρηση της REM σε δείγματα οξειδωμένων υποκλασμάτων LDL και οξειδωμένης Lp(a).

Τα οξειδωμένα υποκλάσματα της LDL, λόγω του αυξημένου αρνητικού ηλεκτρικού φορτίου τους, εμφανίζουν μεγαλύτερη μετατόπιση σε σχέση με τις φυσικές τους μορφές. Το ίδιο συμβαίνει και με την Lp(a). Η αύξηση της μετατόπισης είναι διαφορετική για κάθε υποκλάσμα και είναι ανάλογη με το βαθμό της οξειδωτικής του τροποποίησης. Η μετατόπιση μετριέται πάνω στην πηκτή με χάρακα, από το σημείο τοποθέτησης των δειγμάτων έως το μέτωπο της ζώνης κάθε δείγματος. Η μετατόπιση κάθε οξειδωμένης μορφής συγκρίνεται με την μετατόπιση της αντίστοιχης φυσικής μορφής και το πηλίκο των δύο μετατοπίσεων σε cm είναι καθαρός αριθμός και ονομάζεται REM (Relative electrophoretic mobility)

ΟΞΕΙΔΩΣΗ ΤΩΝ ΥΠΟΚΛΑΣΜΑΤΩΝ LDL ΚΑΙ ΤΗΣ Lp(a)

Διαλύματα εργασίας

• **Διάλυμα 20 mM CuSO₄** 0.0319 g CuSO₄ διαλυτοποιούνται σε 100 ml d H₂O. Το διάλυμα διατηρείται στους 4°C.

• **Διάλυμα 2 mM CuSO₄** Γίνεται αραιώση (1:1, v/v) του διαλύματος 20 mM CuSO₄ με d H₂O. Το διάλυμα διατηρείται στους 4°C.

• **10% EDTA, pH 7.0.** 12.8247 g EDTANa₂·2H₂O διαλυτοποιούνται σε 90 ml H₂O. Ρυθμίζεται το pH στο 7.0 και ο όγκος συμπληρώνεται στα 100 ml με d H₂O. Το διάλυμα διατηρείται στους 4°C.



• **10 mM PBS**, pH 7.4. 8.1816 g NaCl, 1.3800 g NaH₂PO₄·H₂O και 1.7795 g Na₂HPO₄·2H₂O διαλυτοποιούνται σε 800 ml d H₂O και, αφού ρυθμιστεί το pH στο 7.4, συμπληρώνεται ο όγκος στο 1 L με H₂O. Το διάλυμα διατηρείται στους 4°C.

• Φασματοφωτόμετρο UV, Perkin Elmer L-15

Αρχή της μεθόδου

Η οξειδωτική τροποποίηση των υποκλασμάτων της LDL καθώς και της Lp(a) επιτυγχάνεται κατά την επώασή τους με ιόντα Cu²⁺ στους 37°C. Η παρακολούθηση της οξείδωσης γίνεται στα 234 nm, περιοχή απορρόφησης των συζυγών διενίων που σχηματίζονται στην LDL και την Lp(a) κατά την υπεροξείδωση των ενδογενών πολυακόρεστων λιπαρών τους οξέων [348].

Πειραματική διαδικασία

Τα υποκλάσματα της LDL και η Lp(a) μετά την απομόνωσή τους διατηρούνται στους 4°C παρουσία 0.05% EDTA που τα προστατεύει από την οξείδωση. Το EDTA απομακρύνεται με διαπίδυση της κάθε λιποπρωτεΐνης πριν την οξείδωση. Ορισμένος όγκος υποκλάσματος LDL ή Lp(a) μεταφέρεται σε μεμβράνη διαπίδυσης κλείνονται τα άκρα της μεμβράνης με σφιγκτήρες και τοποθετείται σε ποτήρι ζέσεως που περιέχει 200πλάσιο όγκο 10 mM PBS, pH 7.4, σε σχέση με τον όγκο της λιποπρωτεΐνης. Η διαπίδυση γίνεται στους 4°C, υπό συνεχή ανάδευση και αλλαγή του PBS, με νέο μετά από 6 ώρες διαπίδυσης. Ο συνολικός χρόνος διαπίδυσης είναι 22-24 h. Μετά την διαπίδυση η κάθε λιποπρωτεΐνη συλλέγεται προσεκτικά από την μεμβράνη με απόχυση αφού απομακρυνθούν οι σφιγκτήρες και διηθείται από φίλτρο 0.20 μ. Ακολουθεί προσδιορισμός της πρωτεΐνης.

Μεθοδολογία οξείδωσης

Από τα διαπιδυμένα υποκλάσματα της LDL και από την Lp(a) όγκος που αντιστοιχεί σε 250 και 180 μg/ml εναιωρήματος πρωτεΐνης αντίστοιχα μεταφέρεται σε κυψελίδα UV. Όπου χρειάζεται αραιώση γίνεται με διάλυμα 10 mM PBS, pH 7.4. Η οξείδωση γίνεται σε φασματοφωτόμετρο UV το οποίο είναι ρυθμισμένο στα 234 nm και καταγράφει την απορρόφηση του δείγματος ανά 10 min για το διάστημα της οξείδωσης. Η κυψελίδα βρίσκεται σε θερμαινόμενη βάση με σταθερή θερμοκρασία 37°C. Η οξείδωση αρχίζει με την προσθήκη 8 μl/ml διαλύματος 2 mM CuSO₄, δίνοντας τελική συγκέντρωση ιόντων Cu²⁺, 16μM. Η οξείδωση σταματά με την

προσθήκη 5 $\mu\text{l/ml}$ διαλύματος 10%EDTA, pH 7.0. Οι οξειδωμένες λιποπρωτεΐνες υποβάλλονται σε ηλεκτροφόρηση αгарόζης και υπολογίζεται η τιμή REM.

Οξείδωση της Lp(a) με ανεσταλμένη την ενεργότητα της PAF-AH

Αναστολή με DFP

Σε μερικά πειράματα, Lp(a) σε PBS παρουσία 0.01% Na_2EDTA επωάζεται με 20 mM διϊσοπροπυλοφθοριοφωσφορικό (DFP) για 30 min στους 37° C, διαδικασία που απενεργοποιεί πλήρως την PAF-AH. Στη συνέχεια, ακολουθεί διαπίδυση σε PBS για 24 h στους 4° C, ώστε να απομακρυνθεί η περίσσεια του DFP, καθώς και το EDTA, και η Lp(a) οξειδώνεται όπως περιγράφεται παραπάνω.

Αναστολή με θέρμανση (δράση LCAT)

Σε κάποια πειράματα, Lp(a) σε PBS παρουσία 0.01% Na_2EDTA θερμαίνεται στους 60° C για 1 h, ακολουθεί 24ωρη διαπίδυση σε PBS και στη συνέχεια η Lp(a) οξειδώνεται.

Μέτρηση κινητικών σταθερών του ενζύμου.

Η οξείδωση των υποκλασμάτων της LDL ή της Lp(a) σε ορισμένα πειράματα σταματά στο τέλος της παραγωγικής φάσης και το δείγμα χρησιμοποιείται για να προσδιοριστούν οι κινητικές σταθερές του ενζύμου, K_m και V_{max} . Οι σταθερές αυτές προσδιορίζονται και πριν την οξείδωση.

Μέτρηση του λόγου Lyso-PC/Sph

Τα οξειδωμένα υποκλάσματα της LDL καθώς και η οξειδωμένη Lp(a) χρησιμοποιούνται για ανάλυση φωσφολιπιδίων με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδος και προσδιορισμό φωσφόρου. Για το σκοπό αυτό λαμβάνονται δείγματα πριν την οξείδωση και στο τέλος της παραγωγικής φάσης για εκχύλιση λιπιδίων και TLC όπως περιγράφηκε. Στα πειράματα με Lp(a) η μέτρηση του λόγου Lyso-PC/ Sph γίνεται μετά την αναστολή της ενεργότητας της PAF-AH

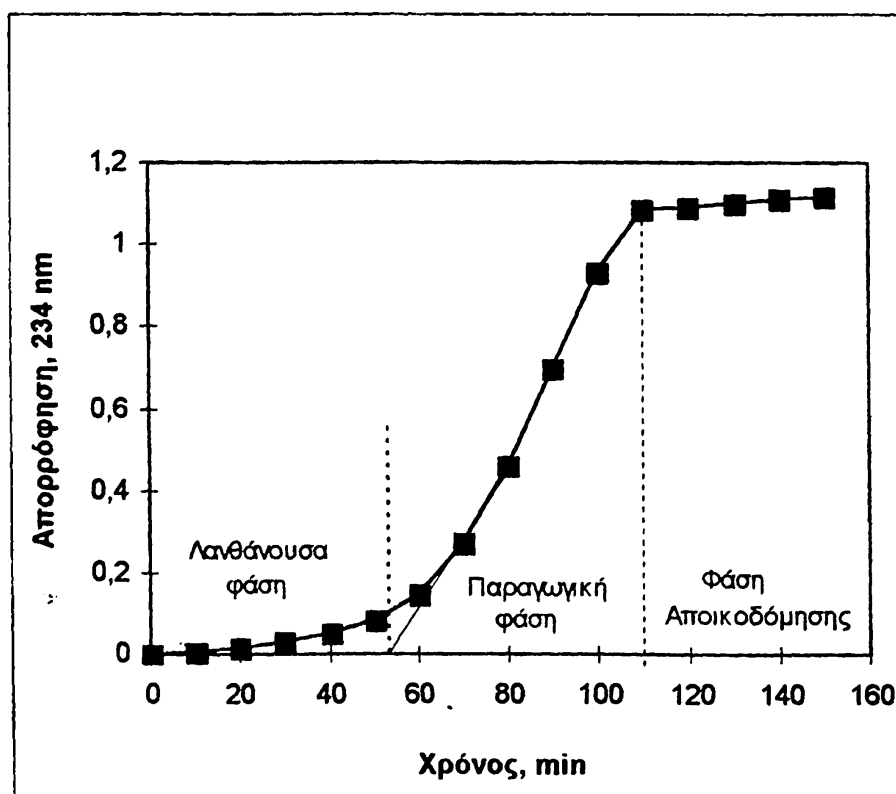
Μέτρηση της ενεργότητας της PAF- AH και του REM

Δείγματα των 100 μl λαμβάνονται πριν την οξείδωση, στο τέλος της παραγωγικής φάσης, όπως επίσης και στο τέλος της οξείδωσης. Τα δείγματα αυτά ελέγχονται ως προς την ενεργότητα της PAF-AH και την ηλεκτροφορητική τους κινητικότητα οποία εκφράζεται με την τιμή REM.



Υπολογισμός δεδομένων

Η παρακολούθηση της οξείδωσης δίνει σιγμοειδή καμπύλη της απορρόφησης των διενίων σε σχέση με τον χρόνο (σχήμα 1). Η καμπύλη αυτή όπως φαίνεται και στο σχήμα χωρίζεται σε 3 φάσεις, τη λανθάνουσα την παραγωγική και στην φάση αποικοδόμησης. Κάθε φάση χαρακτηρίζεται από μια παράμετρο που είναι ο λανθάνων χρόνος για τη λανθάνουσα φάση ο μέγιστος ρυθμός παραγωγής συζυγών διενίων για την παραγωγική φάση καθώς και ο συνολικός αριθμός των συζυγών διενίων που σχηματίζονται κατά τη φάση αποικοδόμησης. Ο υπολογισμός του λανθάνοντος χρόνου γίνεται με το σχεδιασμό της εφαπτομένης στη σιγμοειδή καμπύλη. Το σημείο στο οποίο η εφαπτομένη τέμνει τον άξονα των χρόνων δίνει την τιμή της παραμέτρου αυτής. Ο τύπος $\{(A_2 - A_1)/t_2 - t_1\} \cdot x$ δίνει τον ρυθμό παραγωγής διενίων, όπου A_1 , A_2 η αρχική και τελική απορρόφηση αντίστοιχα της παραγωγικής φάσης t_1 , t_2 , οι αντίστοιχοι χρόνοι και x ο συντελεστής μοριακής απορρόφησης. Ομοίως ο τύπος $(A_2 \cdot x)$ δίνει το συνολικό αριθμό παραγόμενων διενίων στο τέλος της φάσης αποικοδόμησης με A_2 την τελική απορρόφηση και x τον συντελεστή μοριακής απορρόφησης των συζυγών διενίων στα 234 nm που ισούται με $x = 29500 \text{ l/mol/cm}$.



Σχήμα 16. Τυπική καμπύλη οξείδωσης LDL λιποπρωτεΐνης



ΟΞΕΙΔΩΣΗ ΤΗΣ PC

Υλικά- Όργανα

- Πολυακόρεστη PC, Sigma, phosphatidylcholine, β -arachidonyl- γ -palmitoyl (C16:0/C20:4(cis))
- Διάλυμα 0.2 mM CuCl₂. 0.0269 g CuCl₂ διαλύονται σε 1000 ml d H₂O. Το διάλυμα διατηρείται στους 4°C.
- 10% EDTA, pH 7.0. 12.8247 g EDTANa₂·2H₂O διαλυτοποιούνται σε 90 ml H₂O. Ρυθμίζεται το pH στο 7.0 και ο όγκος συμπληρώνεται στα 100 ml με d H₂O. Το διάλυμα διατηρείται στους 4°C.
- Διάλυμα 10 mM PBS, pH 7.4. 8.1816 g NaCl, 1.3800 g NaH₂PO₄·H₂O και 1.7795 g Na₂HPO₄·2H₂O διαλυτοποιούνται σε 800 ml d H₂O και, αφού ρυθμιστεί το pH στο 7.4, συμπληρώνεται ο όγκος στο 1 L με H₂O. Το διάλυμα διατηρείται στους 4°C.
- Συσκευή υπερήχων (Sonics & Materials Inc).

Πειραματική διαδικασία.

Πολυακόρεστη PC, 5mg μεταφέρεται σε σωληνάκι πολυπροπυλενίου και κατεργάζεται με υπερήχους σε διάλυμα 10 mM PBS, pH 7.4 Το μίγμα αναδεύεται ισχυρά σε Vortex και τοποθετείται σε παγόλουτρο. Προστίθενται 20 μ l διαλύματος 2 mM CuCl₂, ώστε η τελική συγκέντρωση των ιόντων Cu²⁺ να είναι 20 μ M, και το σωληνάκι τοποθετείται σε κλίβανο 37°C για 24 h. Η οξείδωση σταματά με την προσθήκη 10 μ l διαλύματος 10% EDTA, pH 7.4. Η οξειδωμένη PC εκχυλίζεται με τη μέθοδο Bligh-Dyer και μεταφέρεται σε πλάκα TLC ώστε να διαχωριστούν και να μελετηθούν τα προϊόντα της οξείδωσης όπως περιγράφεται παραπάνω. Μετά την TLC η περιοχή που αντιστοιχεί στο R_f του PAF (μεταξύ της Lyso-PC και της Sph), εκχυλίζεται με τη μέθοδο Bligh-Dyer και τα οξειδωμένα φωσφολιπίδια συλλέγονται στη χλωροφορμική φάση. Μέρος της φάσης αυτής υποβάλλεται σε προσδιορισμό φωσφόρου όπως περιγράφεται παραπάνω. Το υπολοιπο τμήμα εξατμίζεται σε ρεύμα N₂ μέχρι ξηρού αναδιασπείρεται σε απόλυτη αιθανόλη και χρησιμοποιείται σε πειράματα αναστολής της ενεργότητας της PAF-AH σε συγκεντρώσεις 0.5, 1 και 2.5 mM.



ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑΣ ΤΗΣ PAF-AH

Υλικά - Όργανα

PAF (1-O-εξαδεκυλο-2-ακετυλο-sn-γλυκερο-3-φωσφοχολίνη, M.B. 523.7 g/mol, Sigma). Τα 25 mg σκόνης διαλυτοποιούνται σε 2.387 ml EtOH 80% δίνοντας διάλυμα 20 mM. Το διάλυμα διατηρείται στους -20°C.

[³H]-PAF (1-O-εξαδεκυλο-2-[³Hακετυλο]-sn-γλυκερο-3-φωσφοχολίνη), 0.25 mCi/0.5 ml, 10 Ci/mmol, DuPont New England Nuclear Boston MA.

- PPO (2,5-diphenyloxazole, M.B.: 221.3 g/mol, Serva).

POPOP (1,4-bis[2-(5-phenyl)-oxazolyl]benzene, M.B.: 364.4 g/mol, Serva).

Triton X-100 (Serva).

Διαλύματα εργασίας

- **10% EDTA**, pH 7.0. 12.8247 g EDTANa₂·2H₂O διαλυτοποιούνται σε 90 ml H₂O. Ρυθμίζεται το pH στο 7.0 και ο όγκος συμπληρώνεται στα 100 ml με d H₂O. Το διάλυμα διατηρείται στους 4°C.

- **Διάλυμα 10 mM PBS**, pH 7.4. 8.1816 g NaCl, 1.3800 g NaH₂PO₄·H₂O και 1.7795 g Na₂HPO₄·2H₂O διαλυτοποιούνται σε 800 ml d H₂O και, αφού ρυθμιστεί το pH στο 7.4, συμπληρώνεται ο όγκος στο 1 L με H₂O. Το διάλυμα διατηρείται στους 4°C.

- **Ρυθμιστικό διάλυμα Hepes pH 7.4**, 4.2mM (1.0009g/L) Hepes, 137 mM (8.0063 g/L) NaCl, 2.6 mM (0.1939 g/L) KCl, 2 mM (0.7445 g/L) EDTA.

- **2.5-200 μM [³H]PAF** σε BSA 2.5 mg/ml. Σε πλαστικό σωληνάκι πολυπροπυλενίου αναμιγνύονται κατάλληλες ποσότητες PAF 20 mM και [³H]-PAF. Τα φωσφολιπίδια εξατμίζονται σε ρεύμα N₂, μέχρι ξηρού και αναδιασπείρονται σε 1 ml BSA 2.5 mg/ml. Το μίγμα αναδεύεται σε Vortex και επωάζεται για 30 min στους 37°C. Το διάλυμα διατηρείται στους -20°C.

- **20% TCA**. 20 g TCA διαλυτοποιούνται σε 100 ml H₂O. Το διάλυμα διατηρείται στους 4°C.

- **2.5 mg/ml BSA**. 25 mg BSA διαλυτοποιούνται σε 10 ml H₂O. Το διάλυμα διατηρείται στους -20°C.

- **100 mg/ml BSA**. 1 g BSA διαλυτοποιείται σε 10 ml H₂O. Το διάλυμα διατηρείται στους -20°C.



• **Υγρό σπινθηρισμού.** 4 g PPO και 0.04 g POPOP διαλυτοποιούνται σε 666 ml τολουόλιο, υπό συνεχή ήπια ανάδευση. Στη συνέχεια προστίθενται 333 ml Triton X-100. Το διάλυμα διατηρείται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.

• **Υγρό σπινθηρισμού Optiphase Hisafe 3**

Αρχή της μεθόδου

Η μέτρηση της ενεργότητας της PAF-AH βασίζεται στη μέτρηση των ραδιοσημασμένων με [^3H] οξικών ομάδων που ελευθερώνονται κατά την υδρόλυση του υποστρώματος [^3H]-PAF από το ένζυμο. Οι ομάδες αυτές παραμένουν στο υπερκείμενο κατά την καταβύθιση με TCA του εναπομένου [^3H]-PAF και του παραγόμενου Lyso-PAF οι οποίοι βρίσκονται δεσμευμένοι σε BSA [562].

Πειραματική πορεία

Για τα πειράματα ρουτίνας χρησιμοποιούνται 8 μg πρωτεΐνης κάθε υποκλάσματος LDL ή 10 μg πρωτεΐνης Lp(a) ή 25 μl από κάθε κλάσμα που συλλέχθηκε από την υπερφυγοκέντρωση βαθμίδωσης της Lp(a), ή 50 μl πλάσματος (αραιωμένου 1/50 v/v με 10 mM PBS, pH 7.4), ή 50 μl από το υπερκείμενο που περιέχει την HDL χοληστερόλη μετά την καταβύθιση των apoB λιποπρωτεϊνών (αραιωμένο 1/3 v/v 10 mM PBS, pH 7.4) ή 50 μl από το υπερκείμενο των μονοκυττάρων, τα οποία αναμιγνύονται με 10 mM PBS, pH 7.4 μέχρι τελικού όγκου 90 μl . Για την μέτρηση των κινητικών σταθερών του ενζύμου των 5 υποκλασμάτων της LDL, των διαφόρων ισομορφών της Lp(a), της Lp(a) από αναμεμιγμένο πλάσμα διαφόρων ισομορφών, του υπερκείμενου των μονοκυττάρων καθώς και στα πειράματα της ανασταλτικής επίδρασης της PC χρησιμοποιούνται διαλύματα PAF τελικής συγκέντρωσης 2.5-200 μM . Οι κινητικές σταθερές της PAF-AH προσδιορίστηκαν σε Lp(a) πριν από την οξείδωσή της και στο τέλος της παραγωγικής φάσης όπως έχει περιγραφεί. Η φαινόμενη (apparent) τιμή K_m , η V_{max} καθώς και η σταθερά αναστολής K_i υπολογίζονται με την εξίσωση Lineweaver-Burk.

Πειραματική διαδικασία

Σε eppendorf προστίθενται 90 μl δείγματος και αμέσως μετά 10 μl [^3H]PAF της απαιτούμενης ανάλογα με το πείραμα συγκέντρωσης. Παράλληλα ετοιμάζεται και δείγμα ελέγχου (τυφλό) όπου αντί για λιποπρωτεΐνη προστίθενται 90 μl 10 mM PBS, ή 90 μl HEPES pH 7.4. Τα eppendorf επωάζονται στους 37°C για 10 min

ακριβώς. Μόλις συμπληρωθεί ο απαραίτητος χρόνος επώασης προστίθενται σε κάθε δείγμα 20 μl 100 mg/ml BSA. Στη συνέχεια τα δείγματα αναδεύονται ισχυρά σε Vortex και τοποθετούνται σε παγόλουτρο για 12 min. Έπειτα προστίθενται 80 μl 20%TCA, τα δείγματα αναδεύονται ισχυρά σε Vortex και τοποθετούνται σε παγόλουτρο για άλλα 30 min. Ακολουθεί φυγοκέντρηση, σε μικροφυγόκεντρο erpendorf, για 5 min ώστε να καταβυθιστούν οι πρωτεΐνες. 100 μl του υπερκειμένου μεταφέρονται σε σωληνάκι σπινθηρισμού, προστίθενται 2 ml υγρού σπινθηρισμού, το σωληνάκι αναδεύεται καλά και τοποθετείται στο μετρητή β-ακτινοβολίας.

Επεξεργασία των αποτελεσμάτων

Μετριοούνται οι κρούσεις που δίνουν 10 μl διαλύματος [³H]PAF (cpm_ε) για τον υπολογισμό της ειδικής ενεργότητας (E.E.) του διαλύματος. Π.χ τα 10 μl [³H]PAF 20 μM περιέχουν 0.2 nmol PAF, άρα:

$$E.E \text{ (cpm/nmol)} = \frac{\text{cpm}_\epsilon}{0.2}$$

Το ίδιο ισχύει για όλες τις συγκεντρώσεις PAF που χρησιμοποιήθηκαν

Η ενεργότητα της PAF-AH υπολογίζεται από τον παρακάτω γενικό τύπο:

$$\text{Ενεργότητα PAF-AH} = \frac{(\text{cpm}_\delta - \text{cpm}_\epsilon) \cdot 1000}{E.E. \cdot \alpha \cdot \beta} \text{ nmol/mg πρωτεΐνης ή ml ελαιωρήματος /min}$$

όπου: cpm_δ, είναι οι κρούσεις των 200 μl κάθε δείγματος ή ml ελαιωρήματος

cpm_ε, είναι οι κρούσεις των 200 μl του δείγματος ελέγχου

α, είναι ο χρόνος επώασης του δείγματος σε min

β, είναι τα μg πρωτεΐνης, ή τα μl του δείγματος

1000, ο συντελεστής για τη μετατροπή των μg πρωτεΐνης σε mg, ή των μl σε ml

Η ενεργότητα της PAF-AH εκφράστηκε ως nmol του [³H]-PAF που αποικοδομούνται ανά min, ανά mg πρωτεΐνης ή ανά ml κλάσματος βαθμίδωσης ή ανά ml υπερκειμένου μόνοκυττάρων ή ανά mg λιποπρωτεϊνικής μάζας ή ανά ml πλάσματος.



ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ PAF-AH [563].**Αντιδραστήρια**

PMSF (phenylmethylsulfonyl fluoride, Sigma)

DFP (diisopropylfluorophosphate, M.B.: 184.15 g/mol, d: 1.055 g/ml, Aldrich)

Pefabloc (4-[2-aminoethyl]benzenesulfonyl fluoride, M.B: 279 g/mol, Pierce)

CV 3988 (Takeda Chemical Industries Ltd)

Τρυψίνη (Sigma)

Διθειοθρεϊτόλη (Dithiothreitol DTT, Sigma)

Ιωδοξικό οξύ (iodoacetic acid IAA, Sigma)

Διαλύματα

• **4 mM PMSF.** 69.7 mg PMSF διαλύονται σε 1 ml DMSO. Διατηρείται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος

• **20 mM DFP**

• **100 mM Pefabloc.** 0.0187g Pefabloc διαλυτοποιούνται σε 670.25 μ l H₂O. Το διάλυμα διατηρείται στους 4°C

• **10 mM CV 3988**

• **5 mg/ml Τρυψίνη.**

• **1mM DTT (διθειοθρεϊτόλη)**

• **2mM Ιωδοξικό οξύ (iodoacetic acid, IAA)**

• **10 mM Tris pH 7.4.** 1.5760 g Tris-HCl, 5.9648 g KCl 1.1688 g NaCl⁻ διαλυτοποιούνται σε 800 ml H₂O και αφού ρυθμιστεί το pH στο 7.4, συμπληρώνεται ο όγκος στο 1 L με H₂O. Το διάλυμα διατηρείται στους 4°C.

• **Tris-Ca²⁺ (2,22 g /L) 20 mM CaCl₂ σε 10 mM Tris, ph 7.4**

• **Tris-EDTA (7.368 g/L) 20 mM K₂EDTA σε 10 mM Tris, ph 7.4**

• **100 mg/ml HSA (human serum albumin) σε 10 mM Tris**

• **100 mg/ml HSA σε 10 mM Tris-Ca²⁺**

• **100 mg/ml HSA σε 10 mM Tris-EDTA**



Πειραματική διαδικασία

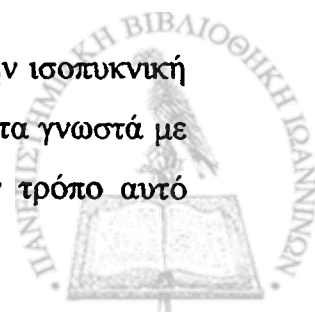
Στα πειράματα όπου η ενεργότητα της PAF-AH προσδιορίζεται παρουσία 10 mM Ca^{2+} ή 10 mM K_2EDTA σε 10 mM Tris η πειραματική πορεία είναι όπως ακριβώς περιγράφεται παραπάνω, έχοντας αντικαταστήσει το PBS με Tris. Παρουσία 20 mM DFP ή 0.1 mM Pefablock, γίνεται επώαση της πηγής του ενζύμου με τον αναστολέα για 30 min στους 37°C, ενώ παρουσία PMSF γίνεται επώαση 60 min στους 37°C. Όλες οι επώσεις ακολουθούνται από διαπύδωση σε 10 mM PBS για 24h, ώστε να απομακρυνθεί η περίσσεια του αναστολέα. Ο προσδιορισμός της ενεργότητας του ενζύμου στη συνέχεια γίνεται όπως περιγράφεται παραπάνω. Η πηγή του ενζύμου επωάζεται για 1h στους 37°C παρουσία 5mg/ml τρυψίνης, 15 min στους 37°C παρουσία IAA ή DTT και 30 min στους 37°C παρουσία 10 mM CV 3988 πριν την προσθήκη του [^3H]-PAF. στην ενεργότητα του ενζύμου. Σε κάποια πειράματα όπου η Lp(a) είναι πηγή της PAF-AH θερμαίνεται στους 60° C για 1 h.

ΜΕΤΑΦΟΡΑ ΤΗΣ PAF-AH ΜΕΤΑΞΥ ΤΩΝ ΥΠΟΚΛΑΣΜΑΤΩΝ ΤΗΣ LDL

Το υποκλάσμα LDL-5 που απομονώνεται από την βαθμίδωση πυκνοτήτων όπως περιγράφεται πιο πάνω επωάζεται κατά τα γνωστά με Pefablock και ακολουθεί διαπύδωση σε 10 mM PBS-EDTA. 1ml LDL-5 που έχει απενεργοποιημένη την PAF-AH επωάζεται με 1 ml LDL-1 και 1ml LDL-2, (που έχουν το ένζυμο στην ενεργό του μορφή), στους 37°C για 1h. Στη συνέχεια το μίγμα υποβάλλεται σε ισοπυκνική υπερφυγοκέντρηση βαθμίδωσης πυκνοτήτων όπου απομονώνονται 30 κλάσματα, σε καθένα από τα οποία προσδιορίζεται η ενεργότητα της PAF-AH.

ΚΑΤΑΝΟΜΗ ΤΗΣ PAF-AH ΑΠΟ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ ΜΟΝΟΚΥΤΤΑΡΩΝ ΣΤΙΣ ΛΙΠΟΠΡΩΤΕΪΝΕΣ

Πλάσμα ή ολική LDL ή ολική HDL που απομονώνονται από την ισοπυκνική βαθμίδωση πυκνοτήτων όπως περιγράφεται πιο πάνω επωάζονται κατά τα γνωστά με Pefablock και ακολουθεί διαπύδωση σε 10 mM PBS-EDTA. Με τον τρόπο αυτό



αναστέλεται πλήρως η ενεργότητα του ενζύμου. Τα κατεργασμένα δείγματα αναμιγνύονται 1/1 (v/v) με υπερκείμενο μονοκυττάρων (βλέπε απομόνωση μονοκυττάρων με Ficoll) που περιέχει ενεργότητα PAF-AH (2.1 ± 1) nmol/min και επωάζονται στους 37°C για 1h. Στη συνέχεια ολικό υπερκείμενο μονοκυττάρων μόνο του ή τα μίγματα που προέκυψαν υποβάλλονται σε ισοπυκνική υπερφυγοκέντρωση βαθμίδωσης πυκνοτήτων όπου απομονώνονται 30 κλάσματα. Σε 50 μl κάθε κλάσματος προσδιορίζεται η ενεργότητα της PAF-AH.

ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΙΟΝΤΙΚΗΣ ΙΣΧΥΟΣ ΣΤΗ ΔΕΣΜΕΥΣΗ ΤΗΣ PAF-AH ΣΤΙΣ ΛΙΠΟΠΡΩΤΕΪΝΕΣ.

Για να προσδιοριστεί αν η κατανομή του ενζύμου στα λιποπρωτεϊνικά υποκλάσματα επηρεάζεται από την επίδραση της ιοντικής ισχύος των διαλυμάτων που χρησιμοποιούνται στην απομόνωση των λιποπρωτεϊνών, ολική LDL ή HDL που προέκυψαν από την ανασύσταση των αντίστοιχων υποκλασμάτων μετά από υπερφυγοκέντρωση βαθμίδωσης πυκνοτήτων, επωάζονται στους 37°C με τόση ποσότητα KBr που να αντιστοιχεί σε $d = 1.063 \text{ g/ml}$, $d = 1.240 \text{ g/ml}$ και $d = 2.480 \text{ g/ml}$. Μετά την επώαση η LDL και η HDL ξεχωριστά τοποθετούνται σε σωλήνες υπερφυγοκέντρου, ρυθμίζεται η πυκνοτητά τους σε 1.063 g/ml και 1.210 g/ml αντίστοιχα και υπερφυγοκεντρούνται σε ρότορα NVT-65 στις 40000 rpm για 10 h στους 14°C . Μετά την υπερφυγοκέντρωση οι δύο λιποπρωτεΐνες συλλέγονται από την κορυφή του σωλήνα με σήριγγα και προσδιορίζεται σε αυτές η ενεργότητα της PAF-AH. Επίσης η ενεργότητα του ενζύμου προσδιορίζεται πριν και αμέσως μετά την επώασή τους με το KBr.

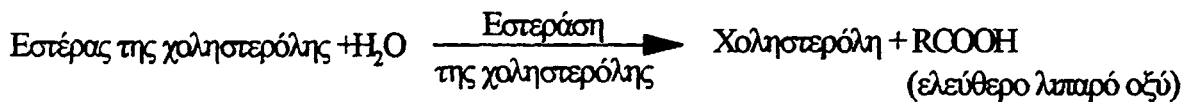


ΕΝΖΥΜΙΚΟΣ ΦΩΤΟΜΕΤΡΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΟΛΙΚΗΣ ΧΟΛΗΣΤΕΡΟΛΗΣ

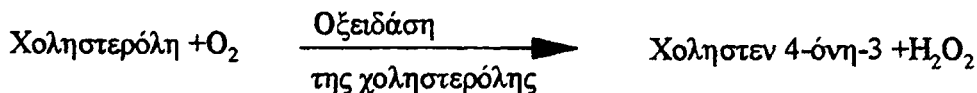
Αρχή της μεθόδου

Οι ενζυμικές μέθοδοι φωτομετρικών προσδιορισμών που περιγράφονται 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 [564]. Η παρακάτω ακολουθία αντιδράσεων δίνει την αρχή του ενζυμικού φωτομετρικού προσδιορισμού της χοληστερόλης.

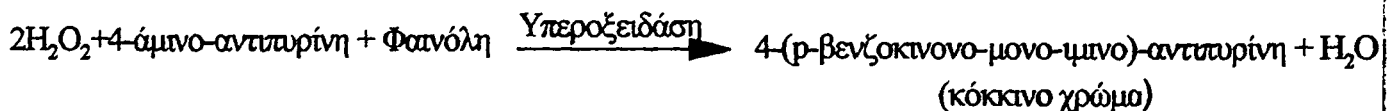
Υδρόλυση της εστεροποιημένης χοληστερόλης



Οξείδωση της χοληστερόλης παρουσία εξειδικευμένης οξειδάσης



Αντίδραση ανίχνευσης χρώματος : Αναγωγή του H_2O_2



Δείγμα

Πλάσμα που λαμβάνεται μετά από 12ωρη νηστεία, υποκλάσματα LDL, Lp(a).

Τα δείγματα διατηρούνται στους $4^\circ C$.



Αντιδραστήρια- Όργανα

Ο προσδιορισμός γίνεται με τη χρήση εμπορικής συσκευασίας kit που περιλαμβάνει

- **R1** 0.1mM ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών, pH 6.9, 15mM φαινόλη, 3.75mM χολικό Na
- **R2** 0.5mM 4- αμινο-αντιπυρίνη 2.5mM χολικό Na, Εστεράση της χοληστερόλης >125U/L, Οξειδάση της χοληστερόλης >200 U/L, Υπεροξειδάση >1000 U/L
- **R3** Πρότυπο διάλυμα χοληστερόλης, 200mg/100ml. Γίνονται αραιώσεις του προτύπου με d H₂O ώστε η κλίμακα συγκεντρώσεων των προτύπων να κυμαίνεται από 0.2mg/ml μέχρι 2mg/ ml.
- **Αντιδραστήριο εργασίας** Το περιεχόμενο του R2 αναδιασπείρεται σε 25ml του R1. Αφήνεται για 15 min σε θερμοκρασία δωματίου υπο ήπια ανάδευση. Είναι σταθερό για 3 μήνες στους 4°C

Πειραματική διαδικασία

Σε πλάκα των 96 θέσεων τοποθετούνται 10 μl δείγματος καθώς και 10 μl από κάθε συγκέντρωση προτύπων. 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 που έχει στον άξονα των X την συγκέντρωση χοληστερόλης των προτύπων και στον άξονα των Y τις απορροφήσεις των προτύπων. Από την εξίσωση της πρότυπης καμπύλης και από τις απορροφήσεις των δειγμάτων υπολογίζεται η συγκέντρωση χοληστερόλης των δειγμάτων



ΕΝΖΥΜΙΚΟΣ ΦΩΤΟΜΕΤΡΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ HDL ΧΟΛΗΣΤΕΡΟΛΗΣ

Αρχή της μεθόδου

Οι λιποπρωτεΐνες που περιέχουν apo B, όπως τα χυλομικρά, οι VLDL οι LDL και η Lp(a) καταβυθίζονται με την προσθήκη φωσφοβολφραμικού οξέος και ιόντων μαγνησίου στο δείγμα [565,566]. Μετά από φυγοκέντρηση παραμένει στο υπερκείμενο μόνο η HDL, της οποίας η περιεκτικότητα σε χοληστερόλη προσδιορίζεται ενζυμικά

Δείγμα

Πλάσμα

Αντιδραστήρια

Ο προσδιορισμός γίνεται με τη χρήση εμπορικής συσκευασίας (kit) που περιλαμβάνει το διάλυμα καταβύθισης το οποίο περιέχει 14mM φωσφοβολφραμικού οξέος και 1mM χλωριούχο μαγνήσιο είναι σταθερό σε θερμοκρασία δωματίου μέχρι την ημερομηνία λήξης του.

Πειραματική διαδικασία

Σε πλαστικό κωνικό σωλήνα erpendorf αναμιγνύονται 500 μl δείγματος με 1000 μl διαλύματος καταβύθισης. Ακολουθεί ανάδευση και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 10 min ακριβώς. Έπειτα γίνεται φυγοκέντρηση στις 12000 rpm για 2 min. Το υπερκείμενο της φυγοκέντρησης περιέχει την HDL και χρησιμοποιείται για προσδιορισμό χοληστερόλης όπως περιγράφεται πιο πάνω. Είναι σταθερό για 5 μέρες στους 4°C.



Επεξεργασία αποτελεσμάτων

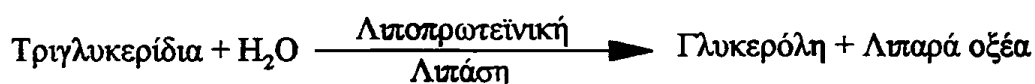
Η τιμή της συγκέντρωσης χοληστερόλης που υπολογίζεται πολλαπλασιάζεται με τον συντελεστή 3 που εκφράζει την αραιώση λόγω προσθήκης του αντιδραστηρίου καταβύθισης.

ΕΝΖΥΜΙΚΟΣ ΦΩΤΟΜΕΤΡΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΡΙΓΛΥΚΕΡΙΔΙΩΝ

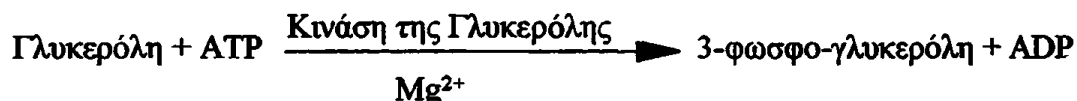
Αρχή της μεθόδου

Η παρακάτω ακολουθία αντιδράσεων δίνει την αρχή του ενζυμικού φωτομετρικού προσδιορισμού των τριγλυκεριδίων [567].

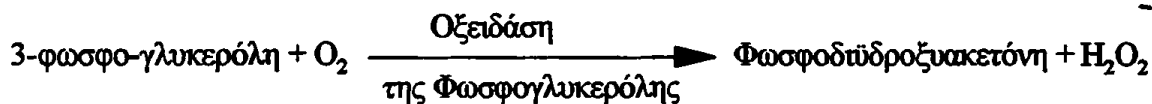
- Υδρόλυση των τριγλυκεριδίων



- Φωσφορυλίωση της γλυκερόλης



- Οξείδωση της φωσφογλυκερόλης



- Μέτρηση του παραγόμενου H_2O_2



Δείγμα

Πλάσμα που λαμβάνεται μετά από 12ωρη νηστεία, υποκλάσματα LDL, Lp(a).

Αντιδραστήρια

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** 0.4mM 4- αμινο-αντιτυρίνη, 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, 200mg/100ml. Γίνονται αραιώσεις του προτύπου με d H₂O για συγκεντρώσεις από 0.2 mg/ml μέχρι 2 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°C.

Πειραματική διαδικασία

Σε πλάκα των 96 θέσεων τοποθετούνται 10 μl δείγματος καθώς και 10 μl προτύπων. Στη συνέχεια προστίθενται με οκτακάναλη 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

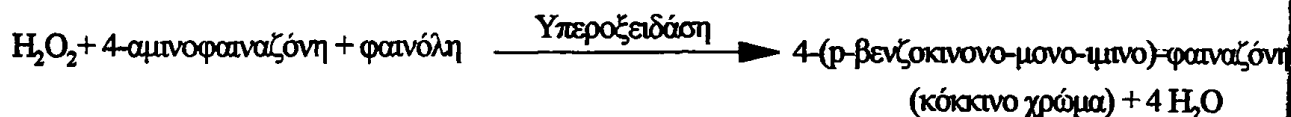
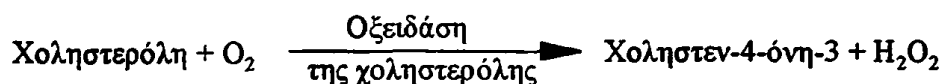
Με βάση τις απορροφήσεις των προτύπων δειγμάτων σχεδιάζεται με την βοήθεια ηλεκτρονικού υπολογιστή, η βέλτιστη ευθεία της μορφής $\psi = \alpha\chi + \beta$ που έχει στον άξονα των X την συγκέντρωση των προτύπων τριγλυκεριδίων και στον άξονα των Y τις απορροφήσεις των προτύπων. Από την εξίσωση που δίνει η πρότυπη

καμπύλη και από τις απορροφήσεις των δειγμάτων υπολογίζεται η συγκέντρωση των τριγλυκεριδίων που περιέχουν τα δείγματα.

ΕΝΖΥΜΙΚΟΣ ΦΩΤΟΜΕΤΡΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΕΛΕΥΘΕΡΗΣ ΧΟΛΗΣΤΕΡΟΛΗΣ

Αρχή της μεθόδου

Η παρακάτω ακολουθία αντιδράσεων δίνει την αρχή του ενζυμικού φωτομετρικού προσδιορισμού της ελεύθερης χοληστερόλης [568].



Δείγμα

Υποκλάσματα LDL, και Lp(a).

Αντιδραστήρια

Ο προσδιορισμός γίνεται με τη χρήση εμπορικής συσκευασίας που περιλαμβάνει

- R1. Ρυθμιστικό διάλυμα 20mM φαινόλης.
- R2. Ρυθμιστικό διάλυμα 2mM 4- αμινοφαιναζόνης
- R3. οξειδάση της χοληστερόλης >12 U/ml, και υπεροξειδάση >8U/ml
- R4. Πρότυπο διάλυμα χοληστερόλης, 200mg/100ml. Γίνονται αραιώσεις του προτύπου με H₂O ώστε η κλίμακα συγκεντρώσεων των προτύπων να κυμαίνεται από 0.2 mg/ ml μέχρι 2 mg/ml.



- **Αντιδραστήριο εργασίας** Αναμιγνύονται ίσοι όγκοι του R1 και του R2 και στο διάλυμα που προκύπτει προστίθεται κατάλληλος όγκος του R3 Το αντιδραστήριο εργασίας αφήνεται για 15 min σε θερμοκρασία δωματίου υπο ήπια ανάδευση. Είναι σταθερό για 2 εβδομάδες στους 4°C.

Πειραματική διαδικασία

Σε πλάκα των 96 θέσεων τοποθετούνται 10 μl δείγματος καθώς και 10 μl από κάθε συγκέντρωση προτύπων. Στη συνέχεια προστίθενται με οκτακάναλη 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 που έχει στον άξονα των X την συγκέντρωση των προτύπων της χοληστερόλης και στον άξονα των Y τις απορροφήσεις των προτύπων. Από την εξίσωση της πρότυπης καμπύλης και από τις απορροφήσεις των δειγμάτων υπολογίζονται η συγκέντρωση της ελεύθερης χοληστερόλης που περιέχουν τα δείγματα.

ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΕΣΤΕΡΟΠΟΙΗΜΕΝΗΣ ΧΟΛΗΣΤΕΡΟΛΗΣ

Ο προσδιορισμός των εστέρων χοληστερόλης γίνεται με βάση τον ακόλουθο τύπο

Εστέρες χοληστερόλης = (Ολική χοληστερόλη - Ελεύθερη χοληστερόλη) × 1.67

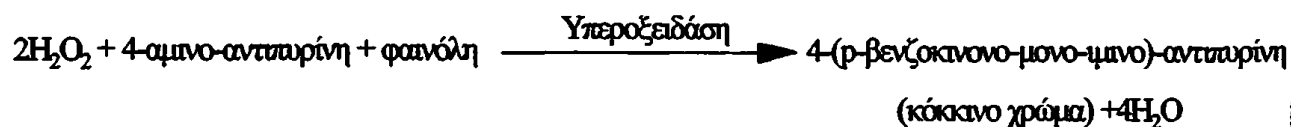
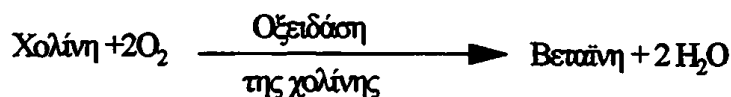
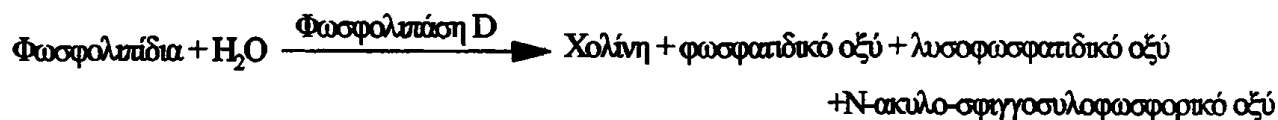
Ο συντελεστής 1.67 εκπροσωπεί την συνεισφορά των λιπαρών οξέων στους εστέρες χοληστερόλης.



ΕΝΖΥΜΙΚΟΣ ΦΩΤΟΜΕΤΡΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΦΩΣΦΟΛΙΠΙΔΙΩΝ

Αρχή της μεθόδου

Τα φωσφολιπίδια (Lyso-PC, PC, και Sph), υδρολύονται από την φωσφολιπάση D και απελευθερώνουν χολίνη. Η παραγόμενη χολίνη ποσοτικοποιείται με την αντίδραση Trinder [569].



Δείγμα

Υποκλάσματα LDL, Lp(a)

Αντιδραστήρια

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 παραγόμενων 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°C

Πειραματική διαδικασία

Σε πλάκα των 96 θέσεων τοποθετούνται 10 μl δείγματος καθώς και 10 μl προτύπων. Στη συνέχεια προστίθενται με οκτακάναλη 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 που έχει στον άξονα των X την συγκέντρωση των προτύπων σε BSA και στον άξονα των Y τις απορροφήσεις των προτύπων. Από την εξίσωση της πρότυπης καμπύλης και από τις απορροφήσεις των δειγμάτων υπολογίζονται η συγκέντρωσή τους σε φωσφολιπίδια.

ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ LDL ΧΟΛΗΣΤΕΡΟΛΗΣ

Ο προσδιορισμός της LDL χοληστερόλης γίνεται με βάση τον τύπο του Friedwald [570] ως εξής:

LDL χοληστερόλη = Ολική χοληστερόλη - Τριγλυκερίδια/5 - HDL χοληστερόλη (mg/100ml)

Ο τύπος αυτός δεν ισχύει όταν στο δείγμα υπάρχουν χυλομικρά, όταν το δείγμα προέρχεται από ασθενή με τύπου III υπερλιπιδαιμία, ή όταν τα τριγλυκερίδια υπερβαίνουν τα 400mg/100 ml.



ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΙΣΟΜΟΡΦΩΝ ΤΗΣ ΑΡΟ(α)

Αρχή της μεθόδου.

Οι ισομορφές της αρο (α), διαχωρίζονται σε πύγμα αγαρόζης υπο μετουσιωτικές συνθήκες, λόγω μεγέθους και φορτίου. Στην συνέχεια οι πρωτεΐνες μεταφέρονται σε μεμβράνη για ανοσοδέσμευση. Αντίσωμα 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. Στη συνέχεια η προσθήκη του αντιδραστηρίου χημειοφωταύγειας στη μεμβράνη έχει ως αποτέλεσμα την οξειδωτική αποικοδόμηση της λουμινόλης και την εκπομπή ακτινοβολίας, η οποία αποτυπώνεται σε ειδικό ευαίσθητο φιλμ (Hyperfilm) [571,253].

Διαλύματα -Όργανα

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)

- Αντίσωμα κατά της αρο(α) από αρνί
- Δευτερογενές αντίσωμα από γαϊδούρι (donkey- anti sheep), συζευγμένο με υπεροξειδάση αγριοραπανιού, (HRP-conjugated)



- **Πρότυπο διάλυμα ισομορφών** εμπορίου. Πρόκειται για λυοφιλοποιημένο ανθρώπινο ορό που περιέχει όλες τις ισομορφές της apo(α), (F, S1, S2, S3, S4). Διαλυτοποιείται σε 0.5 ml d H₂O και διατηρείται στους -20⁰ 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 μείματος για κάθε cm² μεμβράνης.
- **Διαλύματα ανάπτυξης και σταθεροποίησης ακτίνων X,** 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 αραιώση του TBE 10 X, 1:10 (v/v) και 1:20 (v/v) αντίστοιχα με d H₂O.
- **Διάλυμα 1M DTT** 0.3086 g διαλύονται σε 2 ml d H₂O. Το διάλυμα διατηρείται στους - 20⁰C.
- **Διάλυμα 10% SDS.** 10 g SDS διαλύονται σε 100 ml d H₂O. Κατά την ζύγισή του απαιτείται μάσκα.
- **1.5% Αγαρόζη σε TBE 1X και 0.1% SDS.** 1.12 g αγαρόζης προστίθενται σε 75 ml TBE 1X. Το μείγμα αφήνεται στους 120⁰C μέχρι να λιώσει πλήρως η αγαρόζη. Στη συνέχεια προστίθενται 750μl 10%SDS και το διάλυμα αφήνεται λίγα λεπτά υπό ήπια ανάδευση για να αποκτήσει την θερμοκρασία δωματίου.
- **Ρυθμιστικό διάλυμα κατεργασίας δειγμάτων** το οποίο περιέχει 20 mM (2.42g/L) Tris base pH 8.8, 1% SDS, 40 mM DTT



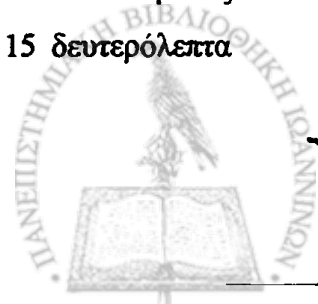
- **Κεχρωσμένο διάλυμα φόρτωσης (Gel loading buffer, GLB)** που περιέχει 0.25% κυανούν βρωμοφαινόλης, 0.25% κυανολικό ξυλένιο (xylene cyanol) και 30% γλυκερόλη σε d H₂O.
- **Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης TBE 0.5X με 0.1% SDS**
- **Ρυθμιστικό διάλυμα 10 mM PBS, pH 7.4.** 8.1816 g NaCl, 1.3800 g NaH₂PO₄H₂O και 1.7795 g Na₂HPO₄·2H₂O διαλυτοποιούνται σε 800 ml d H₂O και αφού ρυθμιστεί το pH στο 7.4, συμπληρώνεται ο όγκος στο 1 L με d H₂O. Το διάλυμα διατηρείται στους 4°C.
- **10% Tween 20.** 10 ml Tween 20 αραιώνονται σε 100 ml d H₂O
- **Γάλα, σκόνη εμπορίου**

Προετοιμασία πηκτώματος αγαρόζης

Το μείγμα 1.5% αγαρόζη σε TBE 1X και 0.1% SDS αφού 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 πηκτώμα 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 erpendorf και στη συνέχεια προστίθενται 10 μl d H₂O, και 10 μl διαλύματος κατεργασίας δειγμάτων. Μετά από ανάδευση σε Vortex, τα erpendorf κλείνονται και βράζονται για 3 min αφού πρώτα τρυπηθεί το καπάκι τους με βελόνα ώστε να εκτονώνονται οι παραγόμενοι ατμοί. Μετά το βρασμό στα δείγματα προστίθενται 2 μl κεχρωσμένου διαλύματος φόρτωσης G.L.B. και ακολουθεί μια γρήγορη φυγοκέντρηση για 15 δευτερόλεπτα.



στις 12000 rpm. Ποσότητες των 5-10 μ l φορτώνονται στα φρεάτια ανάλογα με τη συγκέντρωση Lp(a) στο κάθε δείγμα.

Συνθήκες ηλεκτροφόρησης

Διάρκεια	4 h
Ένταση σταθερή	50 mA
Τάση	100V

Προετοιμασία της μεμβράνης

Η μεμβράνη κόβεται προσεκτικά στις διαστάσεις της πηκτής (12X14cm) και ενεργοποιείται για 5 λεπτά σε 100% μεθανόλη. Κατά την κατεργασία αυτή η υδρόφοβη μεμβράνη αποκτά υδρόφιλο χαρακτήρα και από αδιαφανής γίνεται ημιδιαφανής γκρι. Στη συνέχεια εκπλένεται με d H₂O και αφήνεται σε H₂O, 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 και διηθητικά χαρτιά Whatman επίσης στις διαστάσεις της πηκτής.

Μεταφορά πρωτεϊνών

Η διάταξη της μεταφοράς των πρωτεϊνών έχει ως εξής. Η πηκτή της αγαρόζης μετά την ηλεκτροφόρηση μεταφέρεται σε γυάλινη επιφάνεια. Πάνω στην πηκτή εφαρμόζεται η ενεργοποιημένη μεμβράνη χωρίς όμως να υπάρχουν αναμεσά τους φυσαλίδες αέρα οι οποίες δυσχεραίνουν τη μεταφορά. Πάνω από την μεμβράνη τοποθετούνται αρκετά διηθητικά χαρτιά τα οποία έχουν τις ίδιες διαστάσεις με την πηκτή και τη μεμβράνη. Και πάνω σε όλα αυτά εφαρμόζεται βάρος 1-2 Kg. Η διαδικασία της μεταφοράς πρωτεϊνών ολοκληρώνεται σε μία με δύο ώρες.

Ανοσοαποτίπωση

1. Όταν ολοκληρωθεί η μεταφορά των πρωτεϊνών, η μεμβράνη επωάζεται με διάλυμα 10 mM PBS-5% γάλα είτε για 30 min στους 37°C είτε για ένα βράδυ



στους 4°C. Με την κατεργασία αυτή δεσμεύονται ως αντιγόνο- αντίσωμα, όλες οι πρωτεΐνες που έχουν μεταφερθεί στη μεμβράνη εκτός της από (α).

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 αυτή διαρκεί 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου
4. Ακολουθούν 3 εκπλύσεις των 10 min με PBS-0.1% Tween.
5. Η μεμβράνη επώαζεται με το δευτερογενές αντίσωμα το οποίο αραιώνεται 1:2500 σε PBS-0.1%Tween-1% γάλα η επώαση αυτή διαρκεί 30 min σε θερμοκρασία δωματίου.
6. Ακολουθούν 3 εκπλύσεις των 10 min με PBS-0.1%Tween. Σε όλα τα στάδια των επώασεων 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



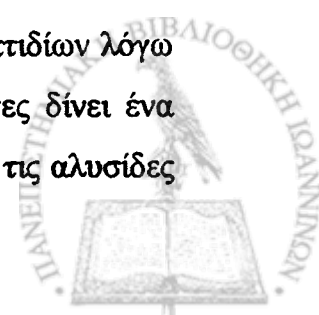
11. Μέσα σε κασσέτα και πάνω στην μεμβράνη τοποθετείται το υπερφίλμ και γίνεται επώαση για 5 min.
12. Το φιλμ τοποθετείται στο υγρό εμφάνισης για 10 min και στη συνέχεια στο υγρό σταθεροποίησης για 5 min και τέλος εκπλένεται με H₂O.
13. Η ανάγνωση των ισομορφών γίνεται με βάση το πρότυπο ισομορφών που εμφανίζεται όπως φαίνεται στο σχήμα.

Μέτωπο	
F	<input type="text"/>
B	<input type="text"/>
S1	<input type="text"/>
S2	<input type="text"/>
S4	<input type="text"/>
Αρχή	

ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ SDS-PAGE 5-19%

Αρχή της μεθόδου

Η ηλεκτροφόρηση βαθμίδωσης πυκνοτήτων πολυακρυλαμιδίου, (PAGE), κάτω από συνθήκες αποδιάταξης (SDS), συνδυάζει την ηλεκτροφόρηση με βάση το μοριακό βάρος με την υψηλή διαχωριστική ικανότητα. Η παρουσία του ιοντικού απορρυπαντικού SDS έχει ως 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 δρά 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 πηκτική 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 [572].

Διαλύματα- Όργανα

- **Διάλυμα Α.** 29.2% Ακρυλαμίδιο, 0.8% δις ακριλαμίδιο. 58.4 g ακρυλαμιδίου και 1.6 g δις ακριλαμιδίου διαλύονται σε d H₂O μέχρι τελικού όγκου 200 ml. Το διάλυμα διατηρείται σε σκοτεινόχρωμο δοχείο στους 4°C για ένα μήνα.
- **Διάλυμα Β.** Ρυθμιστικό διάλυμα διαδρομής (running) pH 8.8. 36,34g Tris base και 0.8g SDS διαλύονται σε 100 ml d H₂O. 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. 6.6g Tris base διαλύονται σε 50 ml d H₂O, 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 15g Tris base διαλύονται σε 5 L d H₂O. Το pH επιβεβαιώνεται ότι είναι 8.2. Προσοχή δεν πρέπει να ρυθμίζεται. Το διάλυμα παρασκευάζεται πριν τη χρήση του.
- **Διάλυμα Ε.** Διάλυμα δειγμάτων. 6.61g SDS και 0.32g Tris base διαλύονται σε 120 ml d H₂O. Το pH ρυθμίζεται στο 6.8 και ο όγκος συμπληρώνεται στα 200 ml με d H₂O. Το διάλυμα είναι σταθερό για ένα μήνα σε θερμοκρασία δωματίου.



- **Διάλυμα 1M DTT.** 0.3086 g DTT διαλύονται σε 2 ml d H₂O. Διατηρείται στους -20°C σε δείγματα των 20 μl.
- **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% υπερθεϊκού αμμωνίου (Ammonium Persulfate, APS).** 0.1 g υπερθεϊκού αμμωνίου διαλύεται σε 1 ml d H₂O . Το διάλυμα παρασκευάζεται πριν τη χρήση του.
- **Διάλυμα εμπορίου N,N-τετραμέθυλοαιθυλενοδιαμίνη, TEMED**

- **Πρότυπα μοριακά Βάρη**

Μυοσίνη	205 kD
β-γαλακτοζαμίνη	116 kD
Φωσφορυλάση D	97.4 kD
Αλβουμίνη βοδιού	66 kD
Αλβουμίνη αυγού	45 kD
Καρβονική ανυδράση	29 kD
α-λακταλβουμίνη	14.2 kD

- **Διάλυμα φόρτωσης** Το διάλυμα περιέχει 50% γλυκόζη σε d H₂O και σε αυτό προστίθεται μικρή ποσότητα μπλέ βρωμοφαινόλης.
- **Διάλυμα 10% SDS.** 10 g SDS διαλύονται σε 100ml d H₂O. Το διάλυμα διατηρείται σε θερμοκρασία δωματίου.



- **Διάλυμα Χρωστικής.** 0.5g Coomassie Blue αναμιγνύονται με 250ml MeOH, 50ml CH₃COOH και 200 ml H₂O Το διάλυμα φυλάσσεται στον απαγωγό.
- **Διάλυμα αποχρωστικής.** 250ml MeOH αναμιγνύονται με 50ml CH₃COOH και 200 ml H₂O. Το διάλυμα φυλάσσεται στον απαγωγό.

Πειραματική διαδικασία.

Προετοιμασία του πηκτώματος διαδρομής (running gel)

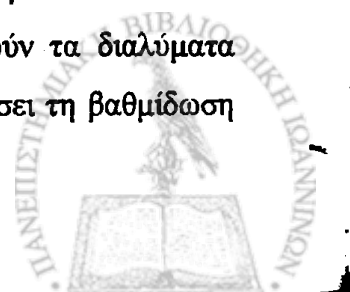
Προετοιμασία συσκευής: Χρησιμοποιούνται γυάλινες πλάκες διαστάσεων 16X18 cm οι οποίες καθαρίζονται προσεκτικά με H₂O και στη συνέχεια με απόλυτη αιθανόλη.

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 αφαδιού εξασφαλίζεται η ευθύγραμμη τοποθέτησή τους.

Προετοιμασία διαλυμάτων πηκτώματος 5% και 19%

	5%	19%
Διάλυμα A	2.65ml	10.15ml
Διάλυμα B	3.35 ml	1.25ml
H ₂ O	10 ml	4.6ml
APS	57 μl	57 μl
TEMED	5.7 μl	5.7 μl

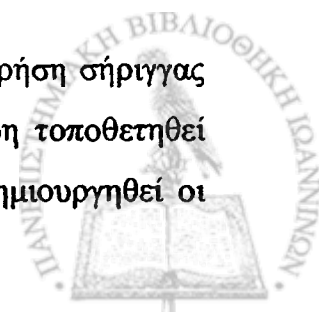
Το APS και το TEMED προστίθενται την στιγμή κατά την οποία ενεργοποιείται η επιστοίβαση των πυκνοτήτων, αφού και τα δύο δρούν καταλυτικά στον πολυμερισμό του πολυακρυλαμιδίου. Μόλις παρασκευαστούν τα διαλύματα τοποθετούνται στα διαμερίσματα της συσκευής που θα δημιουργήσει τη βαθμίδωση



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 επιστοιβάσει 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 φυσαλίδων αέρα οι οποίες καθιστούν ασυνεχή την πηκτή και παρεμποδίζουν τον πολυμερισμό. Μόλις ολοκληρωθεί η επιστοίβαση των 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 ₂ O	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 ≥ 20 μg πρωτεΐνης τοποθετείται σε κωνικό σωλήνα τύπου «erpendorf» και λυοφιλοποιείται. Το ίδιο γίνεται και για πρότυπα μοριακών βαρών, από τα οποία χρησιμοποιούνται 10 μl . Σε κάθε δείγμα ή πρότυπο προστίθενται 30 μl από το διάλυμα κατεργασίας των δειγμάτων, και ακολουθεί βρασμός για 5 min, αφού τρυπηθούν τα καπάκια των erpendorf. Στη συνέχεια προστίθενται 20 μl από το διάλυμα φόρτωσης. Τα δείγματα αναδεύονται και είναι έτοιμα για ηλεκτροφόρηση.

Τοποθέτηση, «φόρτωμα» δειγμάτων

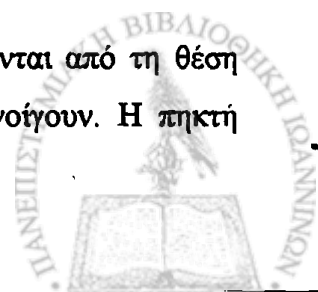
Αφαιρείται το χτένι από την πηκτή και το σύστημα των πλακών αποσυνδέεται από την βάση στήριξης του και τοποθετείται στην θέση του μέσα στην συσκευή ηλεκτροφόρησης όπου σταθεροποιείται πάλι με σφιγγήρες. Το διαμέρισμα της ηλεκτροφόρησης γεμίζει με το ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης όπως και το εσωτερικό 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 σήριγγα Hamilton,

Συνθήκες ηλεκτροφόρησης

Τάση	950 V
Ένταση ρεύματος	30 mA/πηκτή
Χρόνος	ο απαραίτητος ώστε να εξέλθει η χρωστική από την πηκτή

Χρώση της πηκτής

Μόλις τελειώσει η ηλεκτροφόρηση, οι πλάκες αποσυνδέονται από τη θέση στήριξης τους και αφαιρώντας τα μεταξύ τους διαχωριστικά ανοίγουν. Η πηκτή



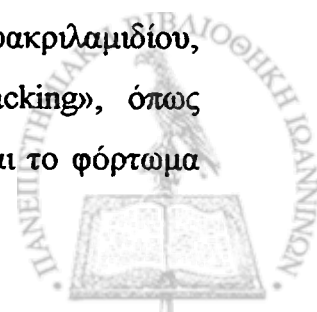
μεταφέρεται σε γυάλινο δοχείο και επικαλύπτεται με το διάλυμα χρώσης. Η χρώση διαρκεί περίπου μια ώρα και ακολουθούν εκπλύσεις με το διάλυμα αποχρωστικής μέχρι να αποχρωματιστεί τελείως η πηκτή και να μείνουν χρωματισμένες μόνο οι ζώνες των πρωτεϊνών.

Υπολογισμός μοριακών βαρών

Για κάθε πρότυπο μορικό βάρος που χρησιμοποιήθηκε υπολογίζεται η μετατόπιση του (χ) στην πηκτή του πολυακρυλαμιδίου. Υπολογίζεται επίσης το μήκος της πηκτής δηλαδή το μήκος του running gel, (X) και από τα δεδομένα αυτά, ο λόγος της μετατόπισης προς την συνολική απόσταση $Rf = (\chi / X)$. Στη συνέχεια με τη χρήση ηλεκτρονικού υπολογιστή σχεδιάζεται η λογαριθμική ευθεία που έχει ως άξονα των X τις τιμές Rf και ως άξονα των Ψ τις τιμές των μοριακών βαρών. Από την εξίσωση της ευθείας και τα Rf των δειγμάτων υπολογίζονται τα μοριακά βάρη των δειγμάτων. Παράλληλα, με την ηλεκτροφόρηση αυτή ελέγχεται και η καθαρότητα των δειγμάτων, αφού κάθε πρωτεΐνη έχει περισσότερες από μια μπάντες στο πήκτωμα όταν υπάρχουν προσμίξεις.

ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ SDS-PAGE 3.75%

Η μέθοδος στηρίζεται στην ίδια αρχή με την ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE 5-19%. Στην ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE 3.75% δεν σχηματίζεται βαθμίδωση πυκνοτήτων αλλά η πυκνότητα αμέσως μετά την παρασκευή της, αποχύνεται στην συσκευή ηλεκτροφόρησης, με σήριγγα. Για την παρασκευή της πυκνότητας 3.75% αναμιγνύονται 4.4 ml διαλύματος A, με 24 ml d H₂O και 9.2 ml διαλύματος B. Η προετοιμασία του πηκτώματος διαδρομής γίνεται με απόχυση του μίγματος αυτού στη συσκευή ηλεκτροφόρησης αφού προηγουμένως προστεθούν 175 μl 10%APS, και 17.5 μl TEMED. Μόλις ολοκληρωθεί ο πολυμερισμός του πολυακρυλαμιδίου, ακολουθεί η προετοιμασία και επιστοίβαση του διαλύματος «stacking», όπως περιγράφεται στην ηλεκτροφόρηση 5-19%. Επίσης η προετοιμασία και το φόρτωμα

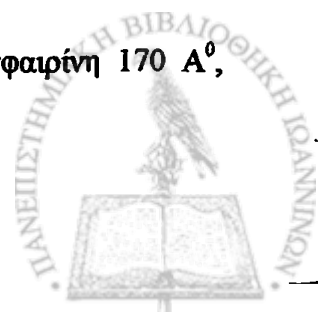


των δειγμάτων, οι συνθήκες ηλεκτροφόρησης και η χρώση της γίνεται όπως περιγράφεται στην ηλεκτροφόρηση 5-19%.

ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ PAGE 2-16%

Η ηλεκτροφόρηση αυτή γίνεται κάτω από μη αποδιατακτικές συνθήκες, απουσία δηλαδή SDS. Η μετανάστευση των δειγμάτων ακολουθεί την ίδια αρχή όπως και στην ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE ενώ εξετάζεται η μοριακή διάμετρος των σωματιδίων με τη χρήση πρότυπων ουσιών γνωστής μοριακής διαμέτρου. Το πήκτωμα του πολυακρυλαμιδίου 2-16% χορηγείται σε εμπορική συσκευασία που περιλαμβάνει και το πρότυπο μοριακών βαρών της ηλεκτροφόρησης [573].

- **Ρυθμιστικό Διάλυμα Ηλεκτροφόρησης.** 54.5g (0.09M), Tris base 24.7 g (0.08M) βορικού οξέος και 5.6 g (0.003M) EDTA διαλύονται σε 5 L d H₂O. Το pH επιβεβαιώνεται ότι είναι 8.35. Προσοχή δεν πρέπει να ρυθμίζεται. Το διάλυμα παρασκευάζεται πριν τη χρήση του.
- **Διάλυμα φόρτωσης** Το διάλυμα περιέχει 50% γλυκόζη σε d H₂O και σε αυτό προστίθεται μικρή ποσότητα μπλέ βρωμοφαινόλης.
- **Διάλυμα Χρωστικής.** 1g Coomassie Blue αναμιγνύεται με 250ml MeOH, 100ml CH₃COOH και συμπληρώνεται μέχρι τα 1000 ml με d H₂O Το διάλυμα φυλάσσεται στον απαγωγό.
- **Διάλυμα αποχρωστικής.** 250ml MeOH αναμιγνύονται με 100ml CH₃COOH και συμπληρώνεται ο όγκος μέχρι τα 1000 ml με d H₂O Το διάλυμα φυλάσσεται στον απαγωγό.
- **Ουσίες πρότυπων μοριακών διαμέτρων:** λατέξ 380A⁰, θυρεοσφαιρίνη 170 A⁰, φερριτίνη 122 A⁰, καταλάση 104 A⁰.



Πειραματική διαδικασία

15 μg πρωτεΐνης κάθε λιποπρωτεϊνικού υποκλάσματος λυοφιλοποιούνται και αναδιασπείρονται σε 50μl 10mM PBS. Τα δείγματα «φορτώνονται» στις έτοιμες θέσεις του πηκτώματος PAGE 2-16% παρουσία 20 μl διαλύματος φόρτωσης. Η ηλεκτροφόρηση γίνεται στη συσκευή Pharmacia GE-2/4 LS, η οποία πληρώνεται με το ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης. Οι συνθήκες ηλεκτροφόρησης είναι 24 h στους 4°C με σταθερή τάση 125V.

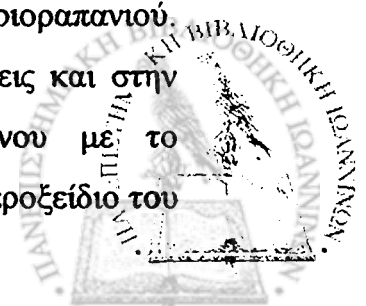
Υπολογισμός μοριακών διαμέτρων

Για κάθε ουσία που χρησιμοποιήθηκε ως πρότυπο μοριακής διαμέτρου υπολογίζεται η μετατόπισή του (χ_i) στην πηκτή του πολυακρυλαμιδίου. Υπολογίζεται επίσης το μήκος της πηκτής δηλαδή το μήκος του running gel, (X) και από τα δεδομένα αυτά, ο λόγος της μετατόπισης προς την συνολική απόσταση $Rf = (\chi_i / X)$. Στη συνέχεια με τη χρήση ηλεκτρονικού υπολογιστή σχεδιάζεται η λογαριθμική ευθεία που έχει ως άξονα των X τις τιμές Rf και ως άξονα των Ψ τις τιμές των μοριακών διαμέτρων. Από την εξίσωση της ευθείας και τα Rf του κάθε δείγματος υπολογίζεται η μοριακή του διάμετρος. Παράλληλα, με την ηλεκτροφόρηση αυτή είναι εμφανής και η ετερογένεια των λιποπρωτεϊνικών υποκλασμάτων.

ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ Lp(a) ΜΕ ΤΗΝ ΜΕΘΟΔΟ ELISA

Αρχή της μεθόδου

Το πλάσμα επωάζεται σε κυψελίδες που περιέχουν ακινητοποιημένο αντι-Lp(a) αντίσωμα. Με διαδοχικές εκπλύσεις το αντιγόνο που δεν έχει δεσμευτεί απομακρύνεται και ακολουθεί μια επώαση με πολυκλωνικό αντίσωμα έναντι του αντι-Lp(a) αντισώματος το οποίο είναι συζευγμένο με υπεροξειδάση αγριοραπανιού. Η περίσσεια της υπεροξειδάσης απομακρύνεται με διαδοχικές εκπλύσεις και στην κυψελίδα παραμένει ακινητοποιημένο το σύμπλοκο του αντιγόνου με το μονοκλωνικό και το πολυκλωνικό αντίσωμα. Ακολουθεί επώαση με υπεροξειδίου του



υδρογόνου και χρωμοφόρο (ο-φαινυλοδιαμίνη). Η αντίδραση παραγωγής χρώματος σταματά με την επίδραση H_2SO_4 και η ένταση του χρώματος που μετράται στα 492 είναι συνάρτηση της συγκέντρωσης Lp(a) στο πλάσμα.

Αντιδραστήρια

Ο προσδιορισμός γίνεται με την χρήση εμπορικής συσκευασίας η οποία περιλαμβάνει

- Πλακέτα με 96 κυψελίδες οι οποίες περιέχουν ακινητοποιημένο αντι-Lp(a) μονοκλωνικό αντίσωμα από ορό ποντικού.
- Πρότυπα διαλύματα Lp(a) περιοχής συγκεντρώσεων από 0-80 mg/dl πλάσματος
- Διάλυμα αραιώσης δειγμάτων Lp(a)
- Διάλυμα έκπλυσης 20X. 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.
- Δευτερογενές αντίσωμα, συζευγμένο με υπεροξειδάση αγριοραπτανιού.
- Αντιδραστήριο χρωματομετρίας
- Ταμπλέτες ο-φαινυλενοδιαμίνης
- Αντιδραστήριο ανάπτυξης χρώματος. 1 ταμπλέτα ο-φαινυλενοδιαμίνης διαλύεται σε 5 ml αντιδραστηρίου χρωματομετρίας. Το διάλυμα πρέπει να παρασκευάζεται 20 min πριν τη χρήση του.
- Αντιδραστήριο τερματισμού, 2N H_2SO_4



Πειραματική διαδικασία

Τα δείγματα που χρησιμοποιούνται μπορούν να διατηρηθούν στους -80°C για μεγάλο χρονικό διάστημα. Πρέπει να αποφεύγεται όμως η εναλλασσόμενη απόψυξη-κατάψυξη

1. 10μl πλάσματος αναμιγνύονται με 2 ml αντιδραστηρίου αραιώσης δειγμάτων ώστε η τελική αραιώση να είναι 1:201. Αναδεύονται ήπια.
2. 100μl αραιωμένου πλάσματος και 100 μl από τα πρότυπα και τα κοντρόλ 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 εκκλύσεις με το αντιδραστήριο έκπλυσης και απόχυση του υπερκειμένου με τέτοιο τρόπο ώστε να απομακρυνθεί η μέγιστη δυνατή ποσότητα υγρού και να εξασφαλιστεί με τον τρόπο αυτό η μεγαλύτερη ακρίβεια της μεθόδου.
4. Προστίθενται 100 μl δευτερογενούς αντισώματος συζευγμένου με υπεροξειδάση αγριοραπανιού. Γίνεται επώαση για 20 min σε θερμοκρασία δωματίου, σε ανακινούμενη βάση.
5. Ακολουθούν δυο εκκλύσεις με το αντιδραστήριο έκπλυσης και απόχυση του υπερκειμένου με τέτοιο τρόπο ώστε να απομακρυνθεί η μέγιστη δυνατή ποσότητα υγρού και να εξασφαλιστεί με τον τρόπο αυτό η μεγαλύτερη ακρίβεια της μεθόδου.
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 σε φωτόμετρο microelisa η απορόφηση στα 492 nm

Επεξεργασία αποτελεσμάτων

Με βάση τις απορροφήσεις των προτύπων διαλυμάτων σχεδιάζεται η καμπύλη, η οποία στον άξονα των X 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 επαναπροσδιορίζονται.

ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΜΟΝΟΚΥΤΑΡΩΝ ΜΕ FICOLL

Δείγμα

Φρέσκο αίμα μετά από πλασμαφαίρεση

Αντιδραστήρια - Διαλύματα

- Ρυθμιστικό διάλυμα 10 mM PBS, Προκύπτει με αραιώση 1:10 v/v, έτοιμου αποστειρωμένου 10X PBS, με επίσης αποστειρωμένο d H₂O, (Biowhittaker)
- Έτοιμο αποστειρωμένο διάλυμα 100X EDTA (Biowhittaker)
- Διάλυμα 10 mM PBS-10% EDTA. 100ml 10X PBS και 10 ml 100X EDTA αναμιγνύονται με αποστειρωμένο d H₂O, μέχρι τελικού όγκου 1000ml. Η ανάμειξη γίνεται υπο στείρες συνθήκες.
- Αποστειρωμένο διάλυμα Ficoll
- Θρεπτικό υλικό RPMI 1640, Biowhittaker
- Διάλυμα 200 mM L- γλουταμίνης σε 0.85% NaCl . Διατηρείται στους -20°C, Biowhittaker
- Αντιβιοτικό, gentamycin 80 mg/ml.

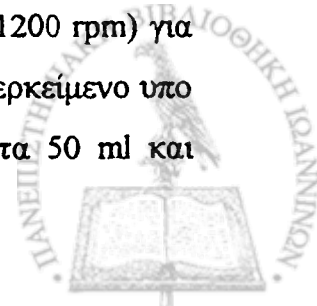


- Θρεπτικό υλικό RPMI εργασίας, Σε 500 ml RPMI προστίθενται 5.5 ml 200mM L-γλουταμίνης και 160 mg gentamycin. Η ανάμιξη γίνεται υπο στείρες συνθήκες και το διάλυμα διατηρείται στους 4°C.
- Πλακίδιο Petri 24 θέσεων, (35x10 mm, Primaria Falcon)

Πειραματική διαδικασία

Απομόνωση μονοκυττάρων

Όλη η διαδικασία της απομόνωσης των μονοκυττάρων γίνεται σε στείρες συνθήκες, στο χώρο των ιστοκαλλιεργιών, στο θάλαμο νηματοειδούς ροής. Η φιάλη της αιμοδοσίας που περιέχει το αίμα αποστειρώνεται και με τη χρήση φλόγας, πριν τη διαδικασία της απομόνωσης. Επίσης ο χώρος καθαρίζεται με αραιό διάλυμα υποχλωριώδους νατρίου και 70% διάλυμα αιθανόλης. Το στόμιο της φιάλης αιμοδοσίας κόβεται και αποχύνεται το περιεχόμενο σε κωνικό βαθμονομημένο αποστειρωμένο σωλήνα των 50 ml. Το αίμα αναμιγνύεται με PBS-EDTA σε αναλογία όγκων 1/1 (v/v). 20 ml του παραπάνω μίγματος επιστοιβάζονται με μεγάλη προσοχή σε 15 ml διαλύματος Ficoll που βρίσκονται σε κωνικό σωλήνα των 50 ml. Η επιστοιβασία γίνεται με πλαστικό αποστειρωμένο σιφώνιο των 25 ml. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στα 1000g (2200rpm) για 25 min σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά το πέρας της φυγοκέντρησης στον πυθμένα του σωλήνα βρίσκονται τα ερυθροκύτταρα και τα πολυμορφοπύρηνα λευκοκύτταρα. Πάνω από αυτά βρίσκονται επιστοιβασμένα τα αιμοπετάλια και περίπου στη μέση του σωλήνα υπάρχει η στοιβάδα των μονοκυττάρων, μαζί με λεμφοκύτταρα. Πάνω από αυτήν υπάρχει διαυγές διάλυμα PBS το οποίο αφαιρείται με πλαστικό σιφώνιο υπο κενό. Στη συνέχεια συλλέγεται κατά το δυνατόν ποσοτικά και χωρίς πολλές προσμίξεις με ερυθροκύτταρα η στοιβάδα των μονοκυττάρων και λεμφοκυττάρων, η οποία μεταφέρεται σε νέο κωνικό σωλήνα. Ο όγκος συμπληρώνεται στα 50 ml με διάλυμα PBS-EDTA και ακολουθεί φυγοκέντρηση στα 340g (1300rpm) για 10 min σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά την έκλυση, αφαιρείται το υπερκείμενο υπο κενό και τα κύτταρα αναδιασπείρονται στα 50 ml με PBS-EDTA με τη βοήθεια πλαστικού αποστειρωμένου σιφωνίου. Ακολουθεί νέα φυγοκέντρηση στα 290 g (1200 rpm) για 10 min σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά την έκλυση αφαιρείται το υπερκείμενο υπο κενό και γίνεται αναδιασπορά των κυττάρων σε PBS-EDTA μέχρι τα 50 ml και



ακολουθεί νέα φυγοκέντρηση στα 160 g (900 rpm) για 10 min σε θερμοκρασία δωματίου. Με τη μέθοδο αυτή των διαφορικών φυγοκεντρήσεων απομακρύνονται κατά το δυνατόν ποσοτικά τα διαφόρων μεγεθών λεμφοκύτταρα, τα αιμοπετάλια που έχουν απομείνει μετά το Ficoll, καθώς και μεμβρανικά υπολείματα κατεστραμένων κυττάρων. Σε όλες αυτές της εκπλύσεις η παρουσία του EDTA είναι απαραίτητη για την κατά το δυνατό αποφυγή ενεργοποίησης και συγκόλλησης των κυττάρων, τόσο μεταξύ τους όσο και στον πλαστικό σωλήνα. Στη συνέχεια αφαιρείται το υπερκείμενο υπο κενό και γίνεται αναδιασπορά των κυττάρων σε PBS χωρίς EDTA. Συμπληρώνεται ο όγκος του σωλήνα στα 50 ml και ακολουθεί νέα φυγοκέντρηση στα 160 g (1200 rpm) για 10 min σε θερμοκρασία δωματίου. Τα κύτταρα αναδιασπείρονται σε 30 ml RPMI εργασίας αφού έχει αφαιρεθεί το PBS υπο κενό και ακολουθεί η μετρησή τους.

Μέτρηση κυττάρων

90 μl Giemsa sterile αραιωμένη 1/1 (v/v) με 10 mM PBS+ 10 μl εναιωρήματος κυττάρων τοποθετούνται σε σωληνάκι erpendorf και αναδεύονται. 10 μl από το εναιώρημα τοποθετείται και στις δύο πλευρές του αιματοκυττομέτρου Malassez. Μετρούνται τα μεγάλα μόνο κύτταρα που είναι στην πλειοψηφία τους μονοκύτταρα. Ο αριθμός των κυττάρων στο εναιώρημα RPMI υπολογίζεται ως εξής: Συνολικός αριθμός των κυττάρων στα 10 τετράγωνα του αιματοκυττομέτρου / 10 = αριθμός των κυττάρων $\times 10^6$ /ml εναιωρήματος. Αυτός ο αριθμός πολλαπλασιασμένος με τον ολικό όγκο του εναιωρήματος δίνει τον συνολικό αριθμό κυττάρων στο εναιώρημα. Τα κύτταρα στο στάδιο αυτό μπορούν να παραμείνουν στους 4°C για ένα βράδυ. Έπειτα φυγοκεντρώνονται ξανά και αναδιασπείρονται σε τόσα ml RPMI ώστε η τελική συγκέντρωση κυττάρων να είναι 2×10^6 κύτταρα/ml .

Καλλιέργεια μονοκυττάρων

Σε πλαστικά Petri των 24 θέσεων, τοποθετείται 1 ml κυττάρων συγκέντρωσης 2×10^6 κύτταρα/ml (σε κάθε θέση). Τα κύτταρα αφήνονται να κολλήσουν στον πυθμένα για 60 min στους 37°C σε κλίβανο επώασης με ατμόσφαιρα 5% σε CO₂. Στη συνέχεια το υπερκείμενο απομακρύνεται με αναρρόφηση υπο κενό με την χρήση πιπέτας Pasteur. Ακολουθούν 2 εκπλύσεις των κυττάρων με PBS για την απομάκρυνση των κυττάρων που δεν έχουν κολλήσει στον πυθμένα και στη συνέχεια τα μονοκύτταρα καλλιεργούνται για 4 μέρες παρουσία 0.5 ml RPMI. Δείγμα για τον προσδιορισμό της ενεργότητας της PAF-AH λαμβάνεται πριν την προσθήκη του

RPMI (0 h), καθώς και στις χρονικές στιγμές 24, 48, 72 h. Μετά το πέρας των 4 ημερών όλο το υπερκείμενο των κυττάρων της καλλιέργειας συλλέγεται, φυγοκεντρείται ήπια στα 500g για 10 min για την απομάκρυνση κυττάρων ή κυτταρικών υπολειμάτων και διατηρείται κάτω από στείρες συνθήκες στους 4°C παρουσία 0.01% EDTA.



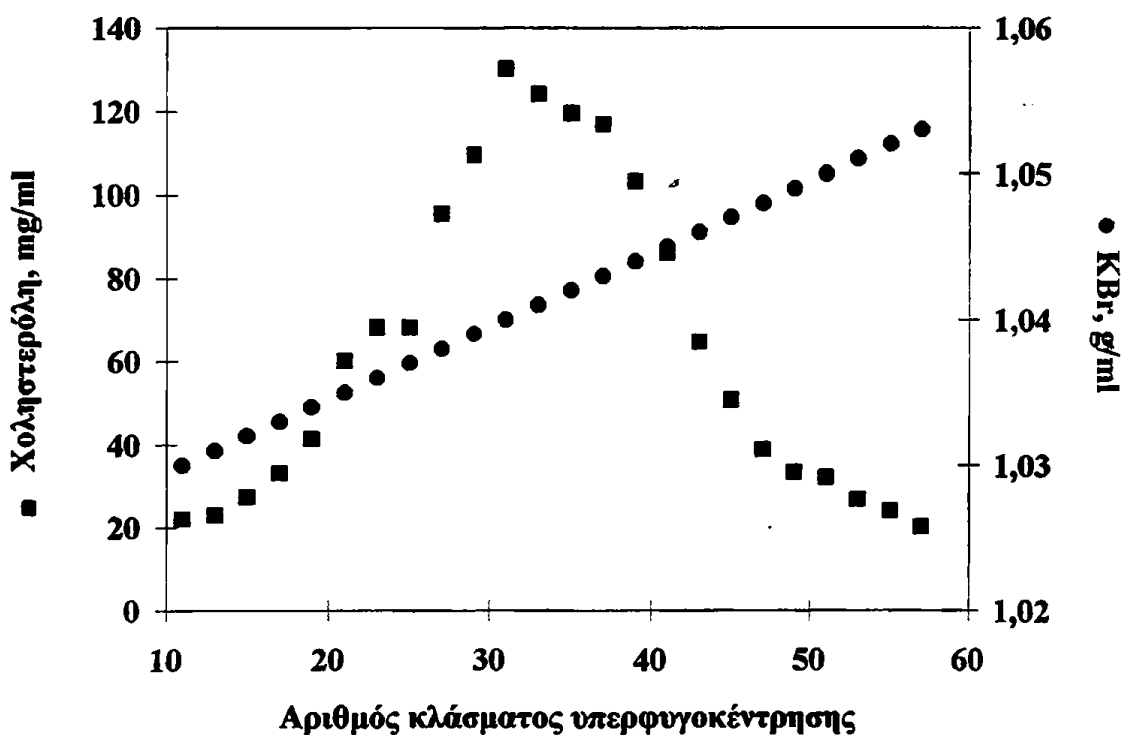
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑΣ ΤΗΣ PAF-AH ΣΕ 3 LDL ΥΠΟΚΛΑΣΜΑΤΑ

Υπερφυγοκεντρική απομόνωση 3 υποκλασμάτων LDL

Για να μελετηθεί η κατανομή της PAF-AH στα τρία υποκλάσματα της LDL χρησιμοποιήθηκε η υπερφυγοκεντρική μέθοδος απομόνωσής τους. Νορμολιπιδαιμικό πλάσμα με επίπεδα Lp(a) <8 mg/dl υποβλήθηκε σε βαθμίδωση πυκνοτήτων KBr περιοχής $d=1.006-1.210$ g/ml όπως περιγράφεται στη μεθοδολογία. Το περιεχόμενο του κάθε υπερφυγοκεντρικού σωλήνα συλλέχθηκε ανά κλάσματα των 150 μ l. Σε καθένα από τα κλάσματα αυτά προσδιορίστηκε η συγκέντρωσή του σε χοληστερόλη καθώς και η πυκνότητα του KBr. Με τον τρόπο αυτό διαχωρίστηκαν 3 υποκλάσματα LDL, το LDL-1 $d=1.030-1.034$, το LDL-2 $d=1.034-1.041$ και το LDL-3 $d=1.041-1.048$ g/ml. Το σχήμα 17 παριστάνει ένα τυπικό προφίλ της LDL πλάσματος μετά την υπερφυγοκέντρησή του.



Σχήμα 17. Τυπικό προφίλ LDL μετά από υπερφυγοκέντρωση νορμολιπιδαιμικού πλάσματος σε βαθμίδωση πυκνοτήτων KBr.



Χημική σύσταση των 3 υποκλασμάτων LDL

Τα υποκλάσματα που συλλέχθηκαν υποβλήθηκαν σε περαιτέρω καθαρισμό, με υπερφυγοκέντρηση σε $d=1.063 \text{ g/ml}$ ώστε να απομακρυνθούν προσμίξεις αλβουμίνης, που υπάρχουν πάντα όταν χρησιμοποιείται ρότορας σταθερής γωνίας (NVT). Ακολούθησε ποσοτική μέτρηση της περιεκτικότητάς τους σε πρωτεΐνη (protein, Pr), σε ελεύθερη (free cholesterol, FC) και εστεροποιημένη χοληστερόλη (cholesterol esters, CE), τριγλυκερίδια (triglycerides, TG) και φωσφολιπίδια (phospholipids, PL). Η ολική μάζα των υποκλασμάτων προσδιορίστηκε αρθροίζοντας τις τιμές της συγκέντρωσης κάθε συστατικού. Οι τιμές που φαίνονται στον πίνακα 6 δείχνουν το % ποσοστό κάθε συστατικού στην ολική μάζα του. Επιπλέον προσδιορίστηκαν οι 4 βασικές τάξεις φωσφολιπιδίων που υπάρχουν στην LDL, δηλαδή η PC, η Lyso-PC, η Sph καθώς και η PE, όπως περιγράφεται στην μεθοδολογία. Τα αποτελέσματά μας συμφωνούν με τα βιβλιογραφικά δεδομένα και η περιεκτικότητα του πυκνού LDL υποκλάσματος σε εστέρες χοληστερόλης και φωσφολιπίδια είναι μικρότερη ($P<0.05$) από την αντίστοιχη του LDL-1 και του LDL-2. Η περιεκτικότητα του LDL-3 σε Pr καθώς και σε PC είναι μεγαλύτερη από την αντίστοιχη των άλλων υποκλασμάτων με $P<0.05$. Δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των άλλων συστατικών των υποκλασμάτων.

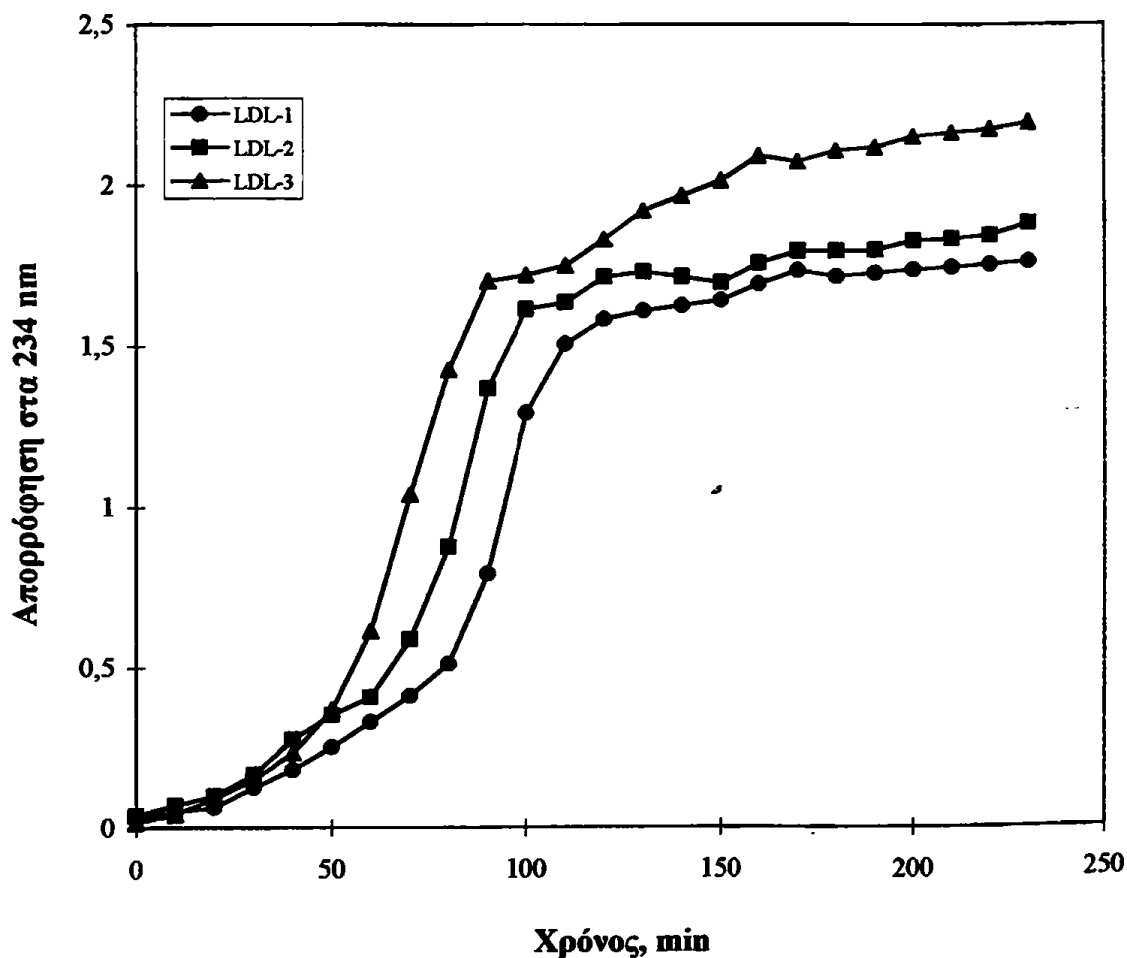
ΠΙΝΑΚΑΣ 6. Χημική σύσταση των 3 LDL υποκλασμάτων. Το κάθε συστατικό είναι εκφρασμένο ως % ποσοστό της ολικής μάζας του υποκλάσματος.

ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΣ	LDL-1	LDL-2	LDL-3
Πρωτεΐνη %	22.2±2.9	24.9±1.9	29.9±2.7 ^a
Ελεύθερη χοληστερόλη %	12.8±3.2	12.1±2.6	11.7±2.2
Εστέρες χοληστερόλης %	35.8±3.6	33.0±3.1	29.9±2.5 ^a
Τριγλυκερίδια %	6.9±3.2	7.8±1.3	7.8±3.1
Φωσφολιπίδια %	23.3±1.4	22.2±1.9	20.7±1.7 ^a
PE %	5.9±1.0	5.7±3.6	5.0±2.1
PC %	59.4±1.4	60.7±2.5	63.0±1.5 ^a
Sph %	29.4±1.3	29.0±2.6	27.0±5.7
Lyso-PC %	5.3±1.8	4.6±2.2	5.0±4.2

Κάθε τάξη φωσφολιπιδίων εκφράζεται ως το % ποσοστό των ολικών φωσφολιπιδίων. Οι τιμές εκπροσωπούν την μέση τιμή±S.D από 10 πειράματα. ^a $P<0.05$ μεταξύ LDL-1 και LDL-2 καθώς και μεταξύ LDL-3 και LDL-1.

Οξείδωση των υποκλασμάτων της LDL in vitro

Όπως περιγράφεται στην μεθοδολογία η οξείδωση των υποκλασμάτων της LDL in vitro έγινε με συνεχή καταγραφή της απορρόφησης των συζυγών διενίων στα 234 nm. Η καμπύλη της απορρόφησης σε συνάρτηση με το χρόνο, είναι σιγμοειδής και χωρίζεται σε 3 φάσεις που φαίνονται χαρακτηριστικά και στο σχήμα 18 και από τις οποίες προσδιορίζονται ο λανθάνοντας χρόνος, ο ρυθμός παραγωγής διενίων καθώς και τα συνολικά παραγόμενα διένια. Εκτός από τον λανθάνων χρόνο ο οποίος υπολογίζεται σε min, για τον υπολογισμό του ρυθμού παραγωγής των διενίων και του συνολικού αριθμού διενίων χρησιμοποιείται ο συντελεστής μοριακής απορρόφησης των συζυγών διενίων, (ο οποίος στα 234 nm ισούται με 29500 l/mol/cm), έτσι ώστε οι τιμές της απορρόφησης να εκφραστούν σε nmol/mg πρωτεΐνης.



Σχήμα 18. Σιγμοειδείς καμπύλες οξείδωσης των 3 LDL υποκλασμάτων.

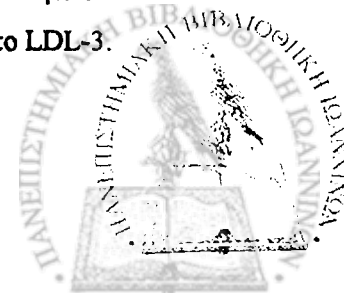


Όπως φαίνεται και στον πίνακα 7 το πιο ευαίσθητο υποκλάσμα στην οξειδωτική τροποποίηση είναι το μικρό και πυκνό LDL, (LDL-3), ενώ το πιο ανθεκτικό είναι το μεγάλης διαμέτρου LDL-1. Ο λανθάνων χρόνος οξείδωσης του LDL-1 είναι 71.0 ± 20.6 min και είναι μεγαλύτερος από αυτόν του LDL-3, 48.2 ± 12.9 ($P < 0.05$). Επίσης στατιστικά μεγαλύτερος είναι και ο ρυθμός παραγωγής διενίων του LDL-2 και του LDL-3 συγκρινόμενος με αυτόν του LDL-1, (3.5 ± 0.5 nmol/mg πρωτεΐνης/min, 3.7 ± 0.5 nmol/mg πρωτεΐνης/min και 2.5 ± 0.3 nmol/mg πρωτεΐνης/min αντίστοιχα, $P < 0.02$). Το ίδιο συμβαίνει και με το συνολικό αριθμό παραγόμενων διενίων (278.7 ± 27.5 nmol/mg πρωτεΐνης/min, 286.1 ± 24.3 nmol/mg πρωτεΐνης/min, 200.1 ± 31.6 nmol/mg πρωτεΐνης/min, για LDL-2 LDL-3 και LDL-1 αντίστοιχα $P < 0.04$). Εκτός από τις παραμέτρους οξείδωσης μετρήθηκαν και οι τιμές R.E.M των υποκλασμάτων μετά την οξείδωσή τους. Στο τέλος της παραγωγικής φάσης οι τιμές R.E.M είναι 2.0 ± 0.2 για το LDL-3, 1.8 ± 0.2 για το LDL-2 και 1.6 ± 0.1 για το LDL-1. Στατιστικά σημαντική είναι η διαφορά που εμφανίζει η τιμή R.E.M των υποκλασμάτων LDL-3 (2.6 ± 0.1) και LDL-2 (2.5 ± 0.3) συγκριτικά με αυτή του LDL-1 (2.0 ± 0.3) μετά από 4 ώρες οξείδωση, $P < 0.03$ και $P < 0.05$ αντίστοιχα.

ΠΙΝΑΚΑΣ 7 Οξειδωτικές παράμετροι των LDL υποκλασμάτων

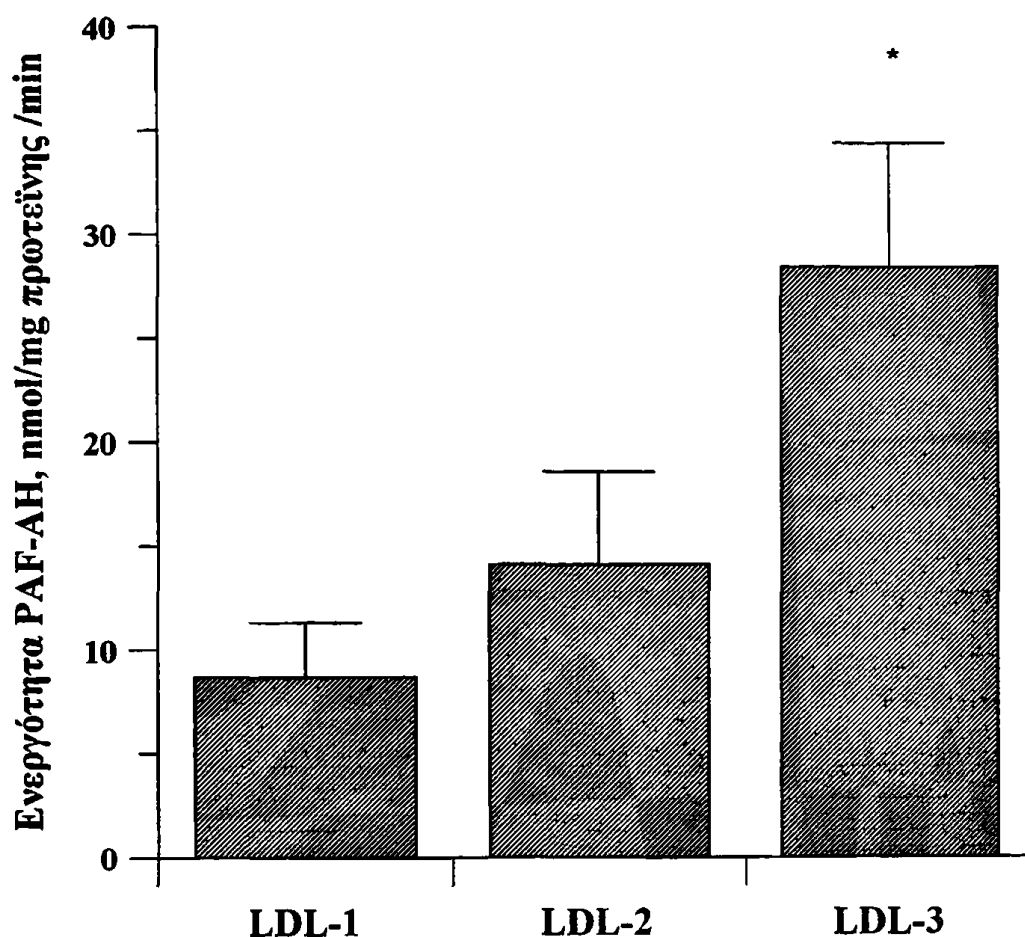
	LDL-1	LDL-2	LDL-3
Λανθάνων χρόνος, min	71.0 ± 20.6^a	61.4 ± 19.5	48.2 ± 12.9
Ρυθμός παραγωγής συζυγών διενίων, nmol/mg πρωτεΐνης /min	2.5 ± 0.3^b	3.5 ± 0.5	3.7 ± 0.5
Συνολικός αριθμός διενίων, nmol/mg πρωτεΐνης	200.0 ± 31.6^c	278.7 ± 27.5	286.1 ± 24.3
R.E.M	2.0 ± 0.3^d	2.5 ± 0.3	2.6 ± 0.1

Η οξείδωση πραγματοποιήθηκε στους 37°C με επώαση 0.25 mg/ml PBS ελαιώδη LDL πρωτεΐνης κάθε υποκλάσματος με ιόντα Cu^{2+} , τελικής συγκέντρωσης $16\mu\text{M}$. Η κινητική μελέτη της οξείδωσης έγινε με καταγραφή της απορρόφησης των συζυγών διπλών δεσμών στα 234 nm κάθε 10 min για 4 ώρες. Οι τιμές εκπροσωπούν την μέση τιμή \pm S.D από 10 πειράματα. ^a $P < 0.05$ συγκρινόμενο με το LDL-3, ^b $P < 0.05$ συγκρινόμενο με το LDL-2, ^c $P < 0.04$ συγκρινόμενο με το LDL-2 και το LDL-3 και ^d $P < 0.05$ συγκρινόμενο με το LDL-2 και $P < 0.02$ συγκρινόμενο με το LDL-3.



Ενεργότητα PAF-AH στα υποκλάσματα της LDL πριν και μετά την οξείδωσή τους *in vitro*

Η ενεργότητα της PAF-AH στα υποκλάσματα της LDL μετρήθηκε πριν, κατά τη διάρκεια και στο τέλος της οξείδωσής τους με ιόντα Cu^{2+} *in vitro*. Όπως φαίνεται στο σχήμα 19, η κατανομή της ενεργότητας είναι ετερογενής και η μεγαλύτερη ενεργότητα του ενζύμου εντοπίζεται στο μικρό πυκνό υποκλάσμα LDL-3 (28.4 ± 8.6 nmol/mg πρωτεΐνης/min).



Σχήμα 19. Κατανομή της ενεργότητας της PAF-AH στα 3 υποκλάσματα της LDL. Η ενεργότητα της PAF-AH προσδιορίστηκε με τη μέθοδο ιζηματοποίησης με TCA. Η συγκέντρωση του υποστρώματος είναι $10 \mu\text{M}$ ^3H -PAF και η πηγή του ενζύμου είναι η πρωτεΐνη των υποκλασμάτων ($80 \mu\text{g/ml}$ PBS). Οι τιμές εκπροσωπούν την μέση τιμή \pm S.D από 10 παρασκευές LDL υποκλασμάτων.

Η ενεργότητα της PAF-AH στο LDL-3 πριν την οξείδωση (28.4 ± 8.6 nmol/mg πρωτεΐνης /min) είναι μεγαλύτερη από αυτή του LDL-2 (14.1 ± 5.8 nmol/mg πρωτεΐνης /min), $P < 0.001$ και από αυτή του LDL-1 (8.7 ± 3.7 nmol/mg πρωτεΐνης /min), $P <$

0.0001. Μεγαλύτερη είναι επίσης και η ενεργότητα του LDL-2 συγκρινόμενη με αυτή του LDL-1, $P < 0.04$. Κατά την διάρκεια της οξείδωσης παρατηρείται πτώση της ενεργότητας της PAF-AH και το φαινόμενο αυτό γίνεται πιο αντιληπτό στο LDL-1. Στον πίνακα 8 φαίνονται οι τιμές της ενεργότητας της PAF-AH στο τέλος της παραγωγικής φάσης και στο τέλος της φάσης αποικοδόμησης εκφρασμένες ως % ποσοστό της ενεργότητας που έχουν τα υποκλάσματα πριν την οξείδωση.

Πίνακας 8. Πτώση της ενεργότητας της PAF-AH κατά την οξείδωση των υποκλασμάτων.

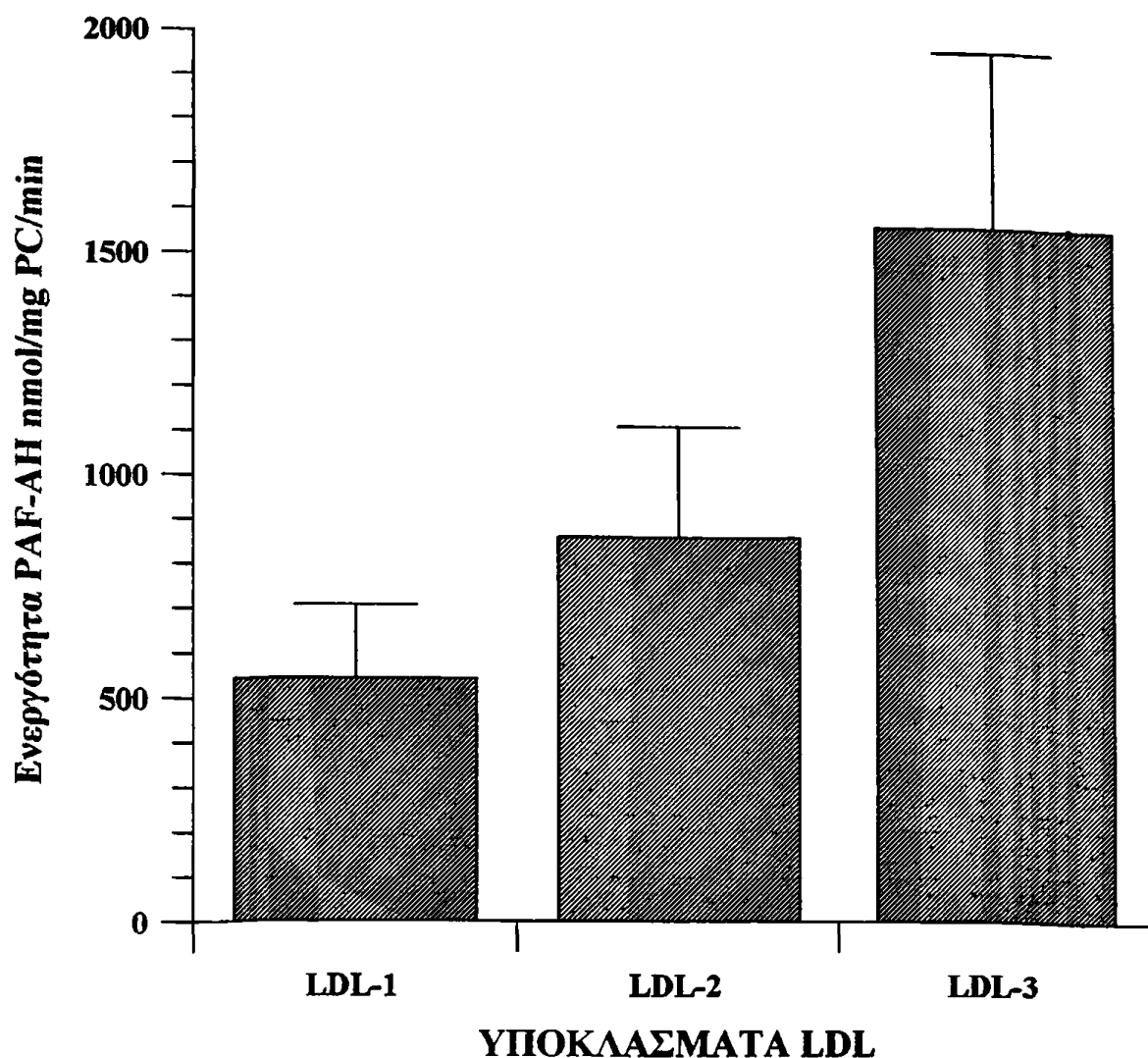
Υποκλάσμα LDL	% ποσοστό της ενεργότητας PAF-AH πριν την οξείδωση.	
	Παραγωγική φάση	Φάση αποικοδόμησης
LDL-1	71.3±4.4 ^a	48.3±1.1 ^b
LDL-2	85.7±7.8	60.6±8.4
LDL-3	86.2±7.3 ^c	65.3±9.2 ^d

^a $P < 0.02$ συγκρινόμενο με το LDL-2, ^b $P < 0.03$ συγκρινόμενο με το LDL-2

^c $P < 0.009$ συγκρινόμενο με το LDL-1, ^d $P < 0.03$ συγκρινόμενο με το LDL-1

Η ετερογενής κατανομή του ενζύμου επαληθεύτηκε ακόμη και όταν οι τιμές της ενεργότητας εκφράστηκαν ανα mg PC κάθε υποκλάσματος. Έτσι η ενεργότητα της PAF-AH στο LDL-3 είχε τη μεγαλύτερη τιμή 1564±396 nmol/mg συγκρινόμενη με το LDL-2, 861±248 nmol/mg ($P < 0.005$, $n=10$) και το LDL-1, 542±164 nmol/mg PC ($P < 0.001$, $n=10$). Τα αποτελέσματα αυτά φαίνονται και στο σχήμα 20.



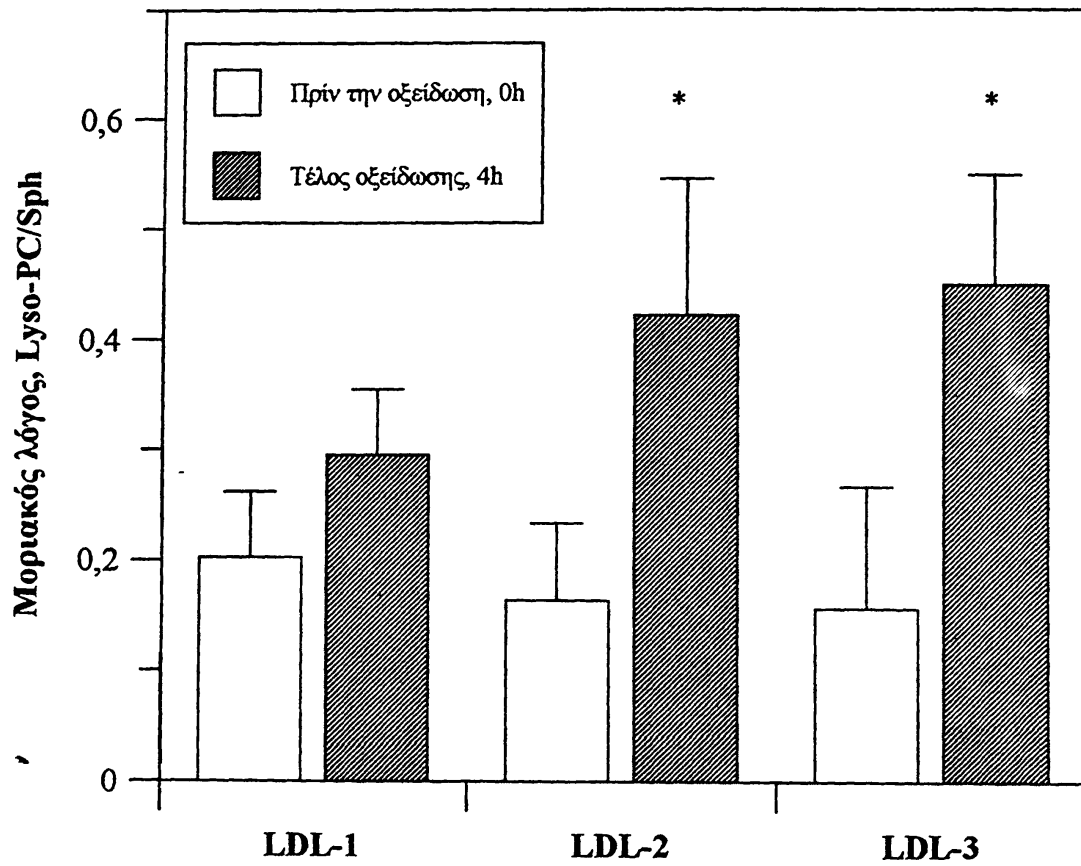


Σχήμα 20. Κατανομή της ενεργότητας της PAF-AH στα 3 υποκλάσματα της LDL, εκφρασμένη ανα mg PC κάθε υποκλάσματος.

Παραγωγή Lyso-PC πριν και μετά την οξείδωση των υποκλασμάτων.

Για να δούμε κατά πόσο η διαφορετική κατανομή της ενεργότητας της PAF-AH στα τρία υποκλάσματα της LDL επηρεάζει την υδρόλυση της ενδογενούς PC κατά την οξείδωσή τους, μετρήσαμε τα επίπεδα της PC, Sph, Lyso-PC και PE πριν και μετά την οξειδωτική τροποποίησή τους *in vitro*. Επειδή η Sph θεωρείται ότι παραμένει σταθερή κατά την διάρκεια της οξείδωσης, οι τιμές εκφράζονται ως μοριακός λόγος της Lyso-PC/Sph (σχήμα 21). Από τα αποτελέσματα αυτά αναδεικνύεται μια θετική συσχέτιση της ενεργότητας της PAF-AH με την παραγωγή της Lyso-PC.





Σχήμα 21 Μοριακός λόγος *Lyso-PC/Sph* στα 3 υποκλάσματα LDL πριν και μετά την οξειδωτική τους τροποποίηση *in vitro*.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6

ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑ PAF-AH ΣΕ ΟΛΑ ΤΑ ΥΠΟΚΛΑΣΜΑΤΑ ΛΙΠΟΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΠΛΑΣΜΑΤΟΣ ΚΑΘΩΣ ΚΑΙ ΣΕ ΚΑΛΛΙΕΡΓΙΕΣ ΜΟΝΟΚΥΤΤΑΡΩΝ

Για να διερευνηθεί σε βάθος η ετερογενής κατανομή της PAF-AH στα υποκλάσματα της LDL ανθρώπινου πλάσματος χρησιμοποιήσαμε στη συνέχεια μια αναλυτικότερη υπερφυγοκεντρική μέθοδο με την οποία είναι δυνατή η υποκλασμάτωση της LDL σε 5 υποκλάσματα ενώ παράλληλα διαχωρίζεται το κλάσμα VLDL+IDL και 3 υποκλάσματα της HDL. Με την τεχνική αυτή είναι δυνατό να μελετηθεί η κατανομή του ενζύμου παράλληλα σε όλο το φάσμα των υποκλασμάτων λιποπρωτεϊνών πλάσματος.

Υποκλασμάτωση λιποπρωτεϊνών πλάσματος με υπερφυγοκέντρωση σε ισοπυκνική βαθμίδωση πυκνοτήτων. Χαρακτηρισμός των υποκλασμάτων

Μετά την υπερφυγοκέντρωση συλλέχθηκαν 30 κλάσματα των 400 μl τα οποία υποβλήθηκαν σε ηλεκτροφόρηση βαθμίδωσης πυκνοτήτων πολυακρυλαμιδίου με αποδιατακτικές συνθήκες (SDS-PAGE 5-19%) για να εξακριβωθεί η καθαρότητά τους. Τα κλάσματα από το 1 μέχρι και το 12 περιοχής πυκνότητας $< 1.063 \text{ g/ml}$ περιείχαν σχεδόν αποκλειστικά apo B, ενώ το κλάσμα 13 ($d = 1,063 - 1.072 \text{ g/ml}$) ήταν ένα μίγμα apo B και apo A-I γεγονός που πιστοποιεί την πρόσμειξή του με HDL. Τα υπόλοιπα κλάσματα από το 14-23 ($d = 1.072 - 1.179 \text{ g/ml}$) περιείχαν μόνο apo A-I, ενώ το κλάσμα 24 ($d = 1.179 - 1.190 \text{ g/ml}$) περιείχε και ίχνη αλβουμίνης. Όλα τα κλάσματα μετά το 24 περιείχαν τις πρωτεΐνες του πλάσματος και αποχύθηκαν. Μετά τον έλεγχο καθαρότητάς τους τα διάφορα κλάσματα αναμίχθηκαν όπως περιγράφεται στην μεθοδολογία ώστε να αποτελέσουν τα υποκλάσματα των λιποπρωτεϊνών. Στη συνέχεια μελετήθηκε η χημική σύσταση όλων των υποκλασμάτων όπως φαίνεται στον πίνακα 9 και υπολογίστηκε η λιποπρωτεϊνική



Πίνακας 9. Χημική σύσταση των λιποπρωτεϊνικών υποκλασμάτων νορμολιπιδαιμικού πλάσματος έπειτα από υπερφυγοκέντρωση ισοπυκνικής βαθμίδωσης πυκνότητων. Οι τιμές δίνονται ως το % ποσοστό του κάθε συστατικού στη λιποπρωτεϊνική μάζα του υποκλάσματος.

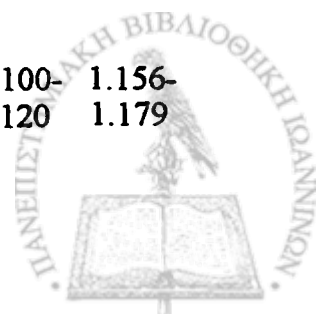
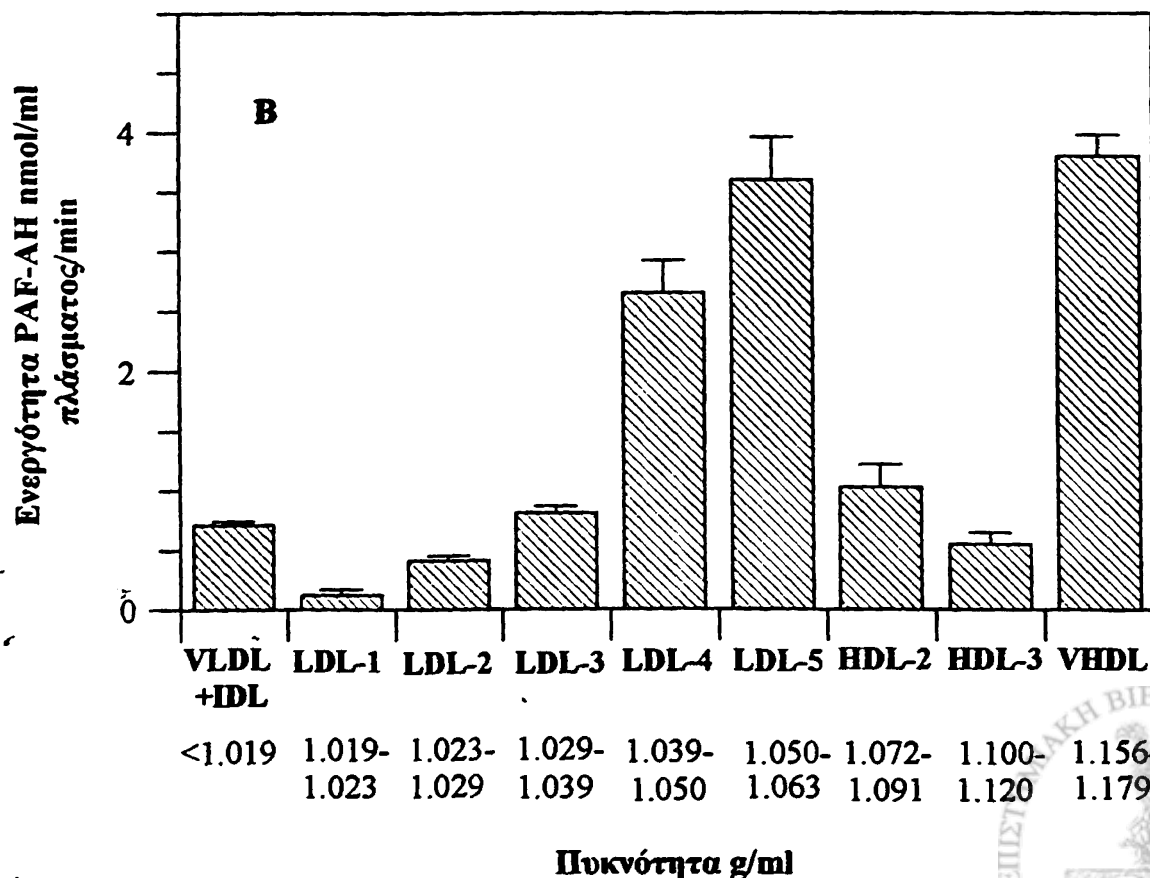
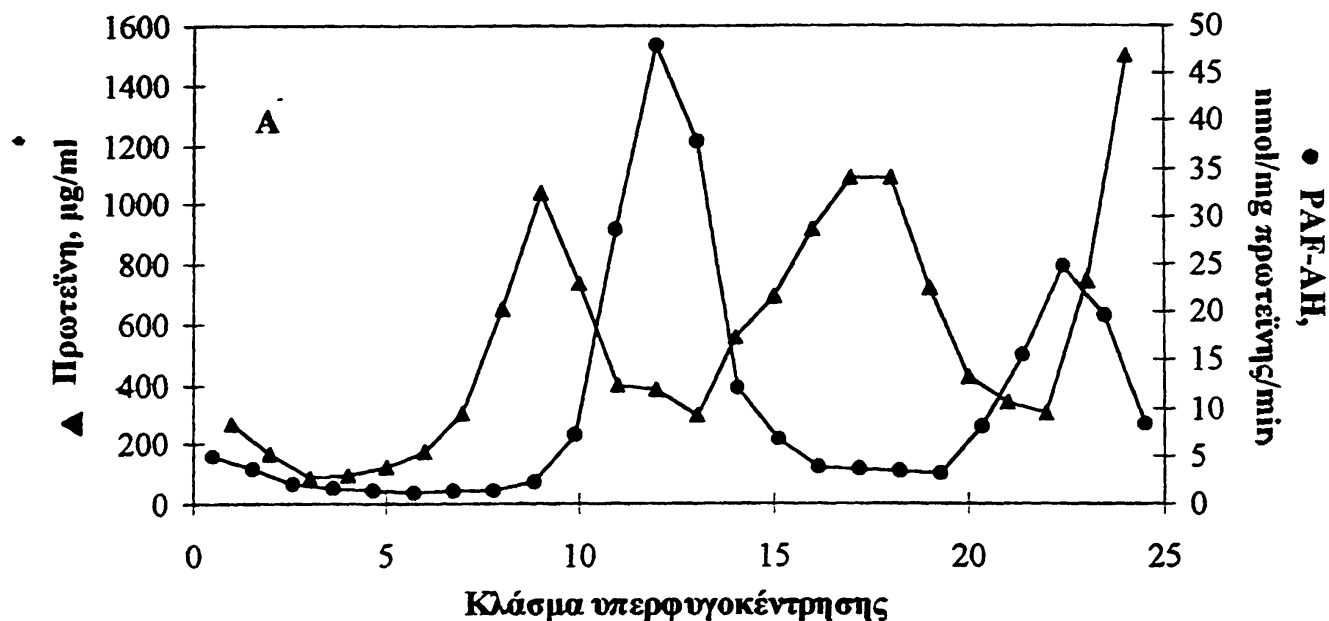
	VLDL +HDL	LDL-1	LDL-2	LDL-3	LDL-4	LDL-5	HDL-2	HDL-3	VHDL-1
Πυκνότητα, g/ml	<1.019	1.019-1.023	1.023-1.029	1.029-1.039	1.039-1.050	1.050-1.063	1.072-1.091	1.100-1.120	1.156-1.176
Πρωτεΐνη, %	19.7±11.4	20.2±4.2	21.5±2.5	22.8±1.2	24.8±4.4	27.8±1.7	41.0±1.6	48.7±3.8	69.2±6.5
Ελεύθερη χοληστερόλη, %	4.7±1.3	8.6±2.3	9.4±1.5	9.8±1.2	8.1±1.0	5.9±1.6	3.9±0.3	2.3±0.2	0.8±0.7
Εστέρες χοληστερόλης, %	9.8±3.4	36.5±3.5	39.0±7.0	41.0±2.6	40.8±3.4	37.9±5.0	20.5±2.3	18.8±1.8	14.2±2.6
Τριγλυκερίδια, %	52.0±14.6	13.9±1.0	8.9±0.8	5.0±3.6	4.8±2.1	5.8±2.7	4.0±1.7	3.0±1.2	3.0±2.1
Φωσφολιπίδια, %	13.8±3.6	20±0.9	24.2±0.7	21.4±0.5	21.5±2.1	22.6±1.0	30.6±0.6	27.2±3.2	12.8±3.6
Λιποπρωτεϊνική μάζα, mg/100ml πλάσματος	47.2±23.4	12.4±8.3	20.7±8.5	91.7±18.3	121.1±30.0	40.0±4.2	80.1±31.8	83.1±31.8	15.9±4.1
Μέγεθος σωματιδίου, A°	-	280±6	267±2	258±3	250±4	245±3	-	-	-

τους μάζα ως το άθροισμα όλων των λιπιδιακών και πρωτεϊνικών συστατικών του κάθε υποκλάσματος. Επιπλέον με ηλεκτροφόρηση βαθμίδωσης πυκνοτήτων πολυακρυλαμιδίου κάτω από μη αποδιατακτικές συνθήκες (PAGE 2-16%) προσδιορίστηκε το μέγεθος των 5 υποκλασμάτων της LDL. Τα αποτελέσματα αυτά είναι σε συμφωνία με την διεθνή βιβλιογραφία και υπάρχει αντιστοιχία με τη χημική σύσταση των 3 υποκλασμάτων της LDL, όπως φαίνεται και στο κεφάλαιο 5, πίνακας 6. Όπως παρατηρείται και στον πίνακα 9, το πυκνό υπόκλασμα LDL-5 έχει μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη και μικρότερη σε εστέρες χοληστερόλης από τα άλλα υποκλάσματα της LDL.

Κατανομή της ενεργότητας της PAF-AH σε όλα τα λιποπρωτεϊνικά υποκλάσματα πλάσματος

Για να μελετηθεί η κατανομή της ενεργότητας της PAF-AH σε όλα τα λιποπρωτεϊνικά υποκλάσματα μετρήθηκε πρώτα η ενεργότητα του ενζύμου σε κάθε ένα από τα 24 κλάσματα της υπερφυγοκέντρωσης ξεχωριστά και στη συνέχεια αφού έγινε η ανασύσταση των κλασμάτων σε υποκλάσματα, όπως περιγράφεται στην μεθοδολογία, επαναπροσδιορίστηκε σε αυτά η ενεργότητα της PAF-AH. Όπως φαίνεται στο σχήμα 22A τα κλάσματα 11, 12 και 13, $d = 1.050 - 1.072 \text{ g/ml}$ (περιέχουν $28.715 \text{ nmol/mg πρωτεΐνης/min}$, $47.924 \text{ nmol/mg πρωτεΐνης/min}$ και $37.857 \text{ nmol/mg πρωτεΐνης/min}$ αντίστοιχα) καθώς και τα κλάσματα 22 και 23, $d = 1.156 - 1.179 \text{ g/ml}$ περιέχουν την μεγαλύτερη ενεργότητα PAF-AH ($24.683 \text{ nmol/mg πρωτεΐνης/min}$, $19.701 \text{ nmol/mg πρωτεΐνης/min}$, αντίστοιχα). Όπως φαίνεται και στο σχήμα 22B, τα κλάσματα 1+2 (που αντιστοιχούν στην VLDL + IDL, $d < 1.019 \text{ g/ml}$) περιέχουν το $3.3 \pm 1.6\%$ της ολικής ενεργότητας PAF-AH του πλάσματος ($0.71 \pm 0.030 \text{ nmol/ml πλάσματος/min}$), τα κλάσματα 11+12 (LDL-5, $d = 1.050-1.063 \text{ g/ml}$) περιέχει το $8.1 \pm 3.9\%$ ($3.6 \pm 0.360 \text{ nmol/ml πλάσματος/min}$) και τέλος τα κλάσματα 22+23 (που αντιστοιχούν σε μέρος της VHDL, $d=1.156-1.179 \text{ g/ml}$) περιέχουν το $20.6 \pm 3.2\%$ της ολικής ενεργότητας πλάσματος ($3.8 \pm 0.180 \text{ nmol/ml πλάσματος/min}$). Μεταξύ των υποκλασμάτων της LDL (κλάσματα από 3-12 $d=1.019-1.063 \text{ g/ml}$) το πυκνό υποκλάσμα της LDL, το LDL-5 (κλάσματα 11+12, $d = 1.050-1.063 \text{ g/ml}$) περιέχει τη μεγαλύτερη ενεργότητα PAF-AH, ποσοστό $60.4 \pm 16.6\%$ της ολικής

ενεργότητας PAF-AH που περιέχει η LDL. Ομοίως μεταξύ των υποκλασμάτων της HDL (κλάσματα 13-23 $d = 1.063-1.179$ g/ml) η ενεργότητα της PAF-AH εντοπίζεται στο πιο πυκνό υποκλάσμα VHDL-1 (κλάσματα 22+23, $d = 1.156-1.179$ g/ml) με ποσοστό $35.5 \pm 10.9\%$ της ολικής ενεργότητας PAF-AH που υπάρχει στην HDL.



Σχήμα 22. Το σχήμα δείχνει την κατανομή της PAF-AH μετά από ισοπικνική υπερφυγοκέντρωση βαθμίδωσης πυκνοτήτων, (A) στα 24 κλάσματα της βαθμίδωσης και (B) στα κυριότερα υποκλάσματα λιποπρωτεϊνών φυσιολογικού πλάσματος. Μετά την υπερφυγοκέντρωση συλλέχθησαν 24 κλάσματα των 400μl. Η ανασύσταση των υποκλασμάτων έγινε με ανάμειξη ίσων όγκων κάθε κλάσματος, όπως περιγράφεται στη μεθοδολογία. Η ενεργότητα της PAF-AH προσδιορίστηκε χρησιμοποιώντας ως πηγή του ενζύμου 4μg πρωτεΐνης κάθε κλάσματος ή υποκλάσματος ενώ ως υπόστρωμα χρησιμοποιήθηκε 25μM ^3H -PAF. Τα αποτελέσματα είναι η μέση τιμή πειραμάτων εις διπλούν (CV < 10%).

(A) Το σχήμα δείχνει την τυπική κατανομή του ενζύμου σε 24 κλάσματα μετά από υπερφυγοκέντρωση βαθμίδωσης πυκνοτήτων νορμολιπιδαιμικού πλάσματος • δείχνει την PAF-AH ▼ δείχνει την πρωτεΐνη.

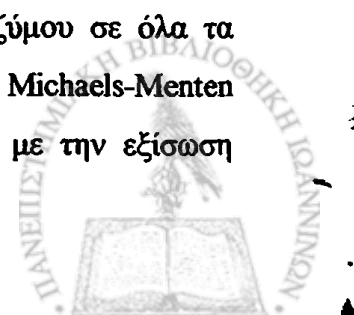
(B) Οι μπάρες δείχνουν την μέση τιμή \pm S.D της ενεργότητας της PAF-AH στα κυριότερα υποκλάσματα λιποπρωτεϊνών πλάσματος 3 διαφορετικών ατόμων.

Επίδραση της ιοντικής ισχύος στην κατανομή της PAF-AH

Για να διαπιστωθεί αν η κατανομή της ενεργότητας της PAF-AH στα διάφορα υποκλάσματα είναι αποτέλεσμα της συγκέντρωσης του KBr και κατά συνέπεια της ιοντικής ισχύος των διαλυμάτων της υπερφυγοκέντρωσης, ολική LDL (κλάσματα 3-12) καθώς και ολική HDL (κλάσματα 14-23) επώαστηκαν με 3 διαφορετικές συγκεντρώσεις KBr. Οι συγκεντρώσεις αυτές αντιστοιχούν σε πυκνότητα 1.063, 1.240 και 2.480 g/ml. Μετά την επώαση των δειγμάτων με τις διάφορες συγκεντρώσεις KBr και την υπερφυγοκέντρωσή τους, δεν παρατηρήθηκε καμία μεταβολή στην ολική ενεργότητα του ενζύμου ούτε και στο προφίλ της ενεργότητας του ενζύμου σε συνάρτηση με την πυκνότητα της βαθμίδωσης. Άρα η κατανομή του ενζύμου στα λιποπρωτεϊνικά υποκλάσματα δεν είναι αποτέλεσμα της επίδρασης της ιοντικής ισχύος κατά την υπερφυγοκέντρωση.

Προσδιορισμός των κινητικών σταθερών του ενζύμου

Στη συνέχεια μελετήθηκαν οι κινητικές σταθερές του ενζύμου σε όλα τα λιποπρωτεϊνικά υποκλάσματα. Η PAF-AH ακολουθεί κινητική Michaels-Menten οπότε οι παράμετροι K_m και V_{max} προσδιορίστηκαν σύμφωνα με την εξίσωση



Lineweaver-Burk. Όπως φαίνεται στον πίνακα 10 οι κινητικές σταθερές των 4 υποκλασμάτων της LDL (LDL-1 μέχρι και LDL-4) έχουν παραπλήσιες K_m ($\sim 9 \mu\text{mol/L}$) σε αντίθεση με το υποκλάσμα LDL-5 που έχει 10πλάσια τιμή K_m συγκρινόμενη με αυτή των άλλων LDL υποκλασμάτων ($\sim 89.7 \pm 23.4 \mu\text{mol/L}$). Παραπλήσιες είναι και οι τιμές της V_{max} των LDL-1 μέχρι 4, οι οποίες εκφραζόμενες ανά mg πρωτεΐνης κυμαίνονται από 3-8 nmol/mg πρωτεΐνης ενώ η V_{max} του LDL-5 είναι 188 ± 40 nmol/mg πρωτεΐνης/min. Η τιμή της V_{max} όταν εκφραστεί ανά ml πλάσματος αυξάνει παράλληλα με την αύξηση της πυκνότητας των υποκλασμάτων προσεγγίζοντας τη μέγιστη τιμή της στην πυκνότητα του LDL-5 ($V_{\text{max}} = 18.45 \pm 3.95$ nmol/ml πλάσματος/min). Η αύξηση της V_{max} μπορεί να αντικατοπτρίζει την ποσότητα του ενζύμου που συνδέεται με κάθε LDL υποκλάσμα καθώς γίνεται η μετάβαση από τα αραιά στα πυκνά υποκλάσματα. Η K_m της ολικής LDL ($d = 1.019-1.063$ g/ml), είναι $21.3 \pm 4.9 \mu\text{mol/L}$ και δείχνει ότι η συγγένεια της ολικής LDL για τον PAF είναι ενδιάμεση από αυτή του καθενός από τα 5 υποκλάσματα ξεχωριστά. Επίσης η V_{max} της ολικής LDL όταν εκφραστεί ανά ml πλάσματος, (20.4 ± 4.2 nmol/min) αντιστοιχεί στο άθροισμα των V_{max} των 5 υποκλασμάτων. Η τιμή αυτή είναι ενδεικτική της συνολικής πρωτεΐνης της PAF-AH που υπάρχει σε όλα τα υποκλάσματα της LDL. Το ίδιο φαινόμενο παρατηρείται και με τα υποκλάσματα της HDL όπου το πιο πυκνό υποκλάσμα, VHDL-1 έχει και την μεγαλύτερη K_m ($34.8 \pm 4.5 \mu\text{mol/L}$) και V_{max} (65.9 ± 18 nmol/mg πρωτεΐνης/min). Οι κινητικές σταθερές του HDL-2 και του HDL-3 είναι $K_m = 19.2 \pm 1.2 \mu\text{mol/L}$, $V_{\text{max}} = 16.2 \pm 4.1$ nmol/mg πρωτεΐνης/min και $K_m = 18.4 \pm 2.4 \mu\text{mol/L}$, $V_{\text{max}} = 6.4 \pm 2.0$ nmol/mg πρωτεΐνης/min αντίστοιχα. Όταν οι K_m και V_{max} των υποκλασμάτων της HDL εκφραστούν ανά ml πλάσματος, φαίνεται πως το VHDL-1 φέρει και την μεγαλύτερη ποσότητα του ενζύμου. Τα αποτελέσματα συνοψίζονται στον πίνακα 10.

Για να διαπιστωθεί εάν εκτός από τις κινητικές σταθερές η PAF-AH των λιποπρωτεϊνικών υποκλασμάτων διαφέρει και ως προς το είδος του υποστρώματος που αναγνωρίζει χρησιμοποιήθηκαν οξειδωμένα παράγωγα της PC όπως περιγράφεται στη μεθοδολογία. Η ανασταλτική δράση της PC στην αποικοδόμηση του ^3H -PAF μελετήθηκε χρησιμοποιώντας οξειδωμένη-PC τελικής συγκέντρωσης 12.5, 25 και 62.5 $\mu\text{mol/L}$ ενώ η συγκέντρωση της αιθανόλης στο μείγμα της αντίδρασης ήταν 2.5%. Ως πηγές του ενζύμου χρησιμοποιήθηκαν τα υποκλάσματα

LDL-1, LDL-5 και VHDL-1, τα οποία έχουν μεγάλες διαφορές στις κινητικές τους σταθερές (πίνακας 10). Λόγω της δομικής τους ομοιότητας με τον PAF, τα οξειδωμένα αυτά παράγωγα της PC με τις μικρές παράπλευρες αλυσίδες, εστεροποιημένες στην sn-2 θέση του γλυκερινικού σκελετού, μπορούν να δράσουν ως υποστρώματα για την PAF-AH αναστέλλοντας έτσι την υδρόλυση του PAF. Όπως φαίνεται στον πίνακα 10 η οξειδωμένη PC εμφανίζει μια συναγωνιστική αναστολή της υδρόλυσης του [^3H]-PAF. Οι σταθερές K_i της αναστολής είναι μεγαλύτερες για τα πυκνά υποκλάσματα LDL-5 ($K_i = 35.5 \pm 7.2 \mu\text{mol/L}$) και VHDL-1 ($K_i = 19.1 \pm 4.3 \mu\text{mol/L}$) από ότι για το LDL-1 ($K_i = 3.5 \pm 1.7 \mu\text{mol/L}$).

Πίνακας 10: Κινητικές σταθερές της PAF-AH σε όλα τα υποκλάσματα των λιποπρωτεϊνών ανθρώπινου πλάσματος

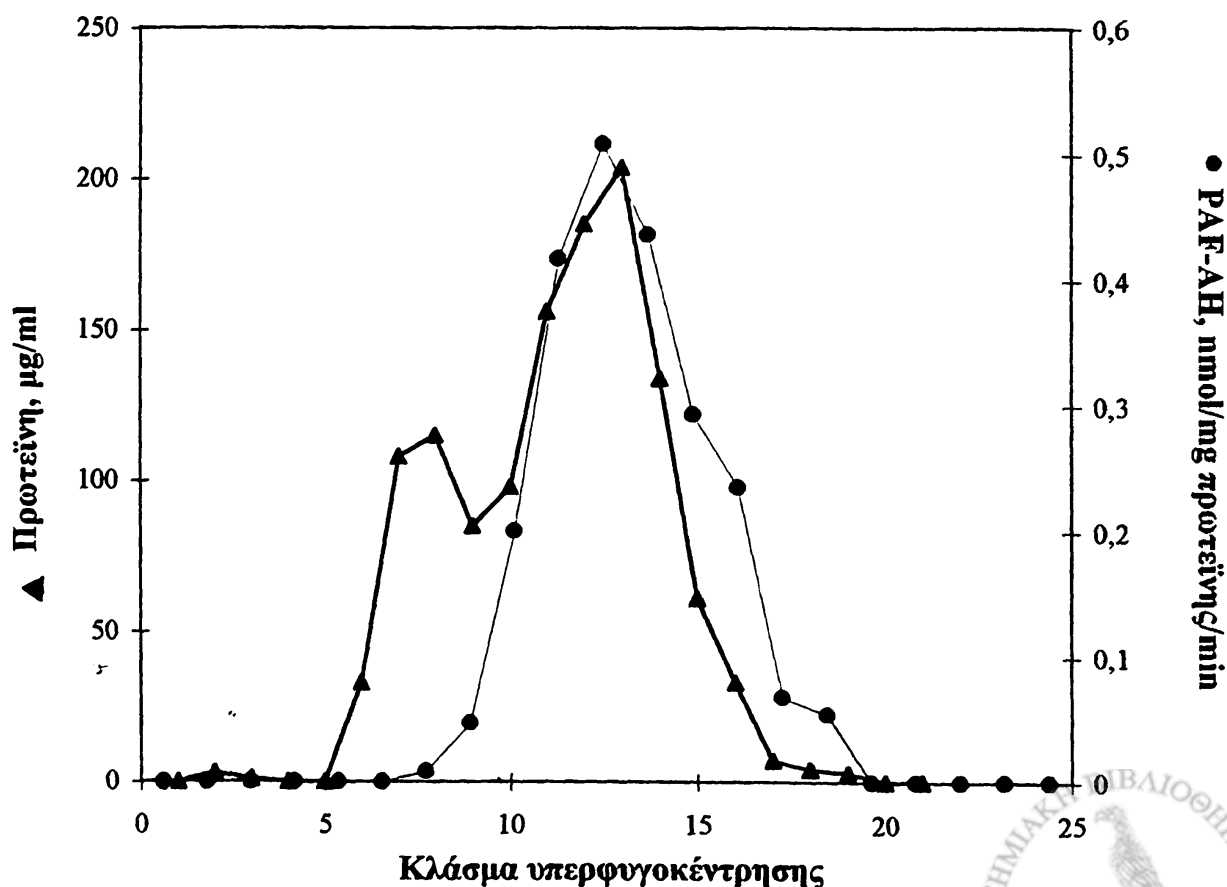
Λιποπρωτεϊνικό υποκλάσμα	K_m , $\mu\text{mol/L}$	V_{max} , mol/mg πρωτεΐνης /min	V_{max} , nmol/ml πλάσματος /min	K_i , $\mu\text{mol/L}$
VLDL+IDL	7.8 ± 1.1	8.8 ± 1.4	0.56 ± 0.09	-
LDL-1	8.4 ± 2.6	4.9 ± 2.2	0.12 ± 0.06	3.5 ± 1.7
LDL-2	8.4 ± 3.3	4.0 ± 1.8	0.17 ± 0.08	-
LDL-3	9.5 ± 3.7	3.2 ± 1.2	0.44 ± 0.16	-
LDL-4	10.3 ± 2.1	7.9 ± 1.5	2.02 ± 0.38^a	-
LDL-5	89.7 ± 23.4^b	188.0 ± 40.4^c	18.45 ± 3.96^c	35.5 ± 7.2
HDL-2	19.2 ± 1.2	16.2 ± 4.1	2.92 ± 0.74	-
HDL-3	18.4 ± 2.4	6.4 ± 2.0	2.01 ± 0.63	-
VHDL-1	34.8 ± 4.5^d	65.9 ± 18.0^e	9.96 ± 2.72^e	19.1 ± 4.3

Οι κινητικές σταθερές της PAF-AH προσδιορίστηκαν χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα [^3H]-PAF τελικής συγκέντρωσης από 2.5 μέχρι 200 $\mu\text{mol/L}$. Η ανασταλτική δράση της οξειδωμένης PC στην αποικοδόμηση του [^3H]-PAF μελετήθηκε χρησιμοποιώντας οξειδωμένη-PC τελικής συγκέντρωσης 12.5, 25 και 62.5 $\mu\text{mol/L}$ ενώ η συγκέντρωση της αθανόλης στο μείγμα της αντίδρασης ήταν 2.5%. Όλες οι κινητικές σταθερές προσδιορίστηκαν χρησιμοποιώντας την εξίσωση Lineweaver-Burk και τα αποτελέσματα εκφράζουν την μέση τιμή \pm S.D 3 πειραμάτων εις διπλούν. $^a p < 0.003$ συγκρινόμενο με το LDL-1-μέχρι το LDL-3, $^b p < 0.004$, $^c p < 0.002$ συγκρινόμενο με το LDL-1, έως το LDL-4, $^d p < 0.004$, $^e p < 0.02$ συγκρινόμενο με το HDL-2 και το HDL-3.



Μεταφορά της ακετυλοϋδρολάσης μεταξύ των υποκλασμάτων της LDL

Για να πιστοποιηθεί αν οι διαφορετικές καταλυτικές ιδιότητες της PAF-AH μεταξύ των διαφόρων υποκλασμάτων είναι αποτέλεσμα της χημικής τους σύστασης ή της δομής των σωματιδίων ή αν πρόκειται για διαφορετικές ισομορφές του ενζύμου, έγινε επώαση του υποκλάσματος LDL-5, στο οποίο αρχικά απενεργοποιήθηκε η PAF-AH, με μείγμα υποκλασμάτων LDL-1 και LDL-2 τα οποία είχαν το ένζυμο στην ενεργό του μορφή. Μετά την ανάμειξη και επώασή τους, τα υποκλάσματα διαχωρίστηκαν με υπερφυγοκέντρηση βαθμίδωσης πυκνοτήτων όπως περιγράφεται στη μεθοδολογία. Ένα ποσοστό > 85% της ενζυμικής ενεργότητας που προσδιορίστηκε στο LDL-1 και LDL-2 πριν την επώαση, βρέθηκε τώρα στο LDL-5 όπως φαίνεται και στο σχήμα 23. Το ένζυμο όμως διατήρησε τις κινητικές σταθερές των υποκλασμάτων από τα οποία προήλθε. Έτσι λοιπόν η K_m του LDL-1 και LDL-2 πριν την επώαση με το LDL-5 ήταν $8.4 \mu\text{mol/L}$ και μετά την υπερφυγοκέντρηση η K_m του LDL-5 ήταν $9.4 \pm 2.1 \mu\text{mol/L}$.



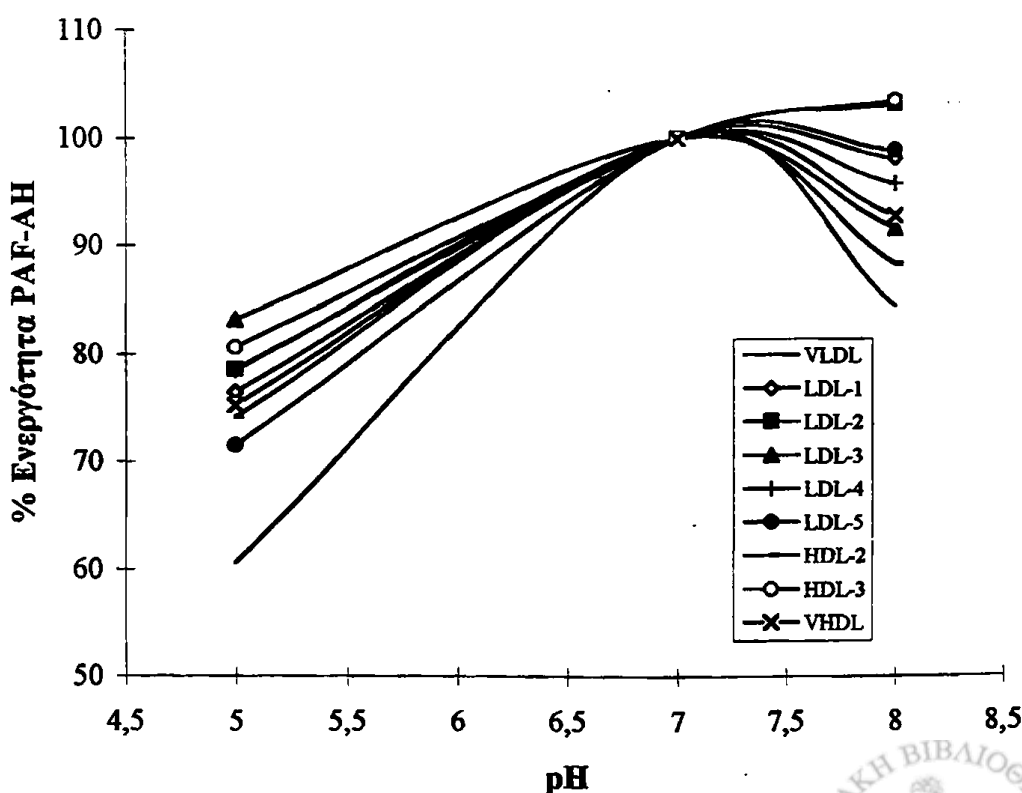
Σχήμα 23. Μεταφορά της PAF-AH από το μείγμα των υποκλασμάτων LDL-1 και LDL-2 στο



LDL-5. Έγινε απενεργοποίηση της PAF-AH του LDL-5 με Pefabloc και μετά από διαπύδωση 24h ακολούθησε επώαση με μείγμα LDL-1 και LDL-2 ως εξής: 1ml LDL-5 επωάστηκε με 1ml LDL-1 και 1 ml LDL-2 στους 37°C για 1h, ώστε να γίνει η μεταφορά της ενεργότητας του ενζύμου. Στη συνέχεια το μείγμα των υποκλασμάτων διαχωρίστηκε με υπερφυγοκέντριση βαθμίδωσης πυκνοτήτων όπως αναφέρεται στη μεθοδολογία. Κάθε ένα από τα κλάσματα της υπερφυγοκέντρισης ελέγχθηκε για ενεργότητα PAF-AH. Τα αποτελέσματα είναι αντιπροσωπευτικά από 3 πειράματα με πλάσμα από διαφορετικούς δότες.

Φυσικοχημικές ιδιότητες της PAF-AH των διαφόρων υποκλασμάτων

Στη συνέχεια εξετάστηκαν οι φυσικοχημικές ιδιότητες του ενζύμου ώστε να πιστοποιηθεί αν διαφορά των κινητικών του παραμέτρων στα διάφορα υποκλάσματα οφείλεται σε αυτές. Έτσι αρχικά μελετήθηκε η ενεργότητα της PAF-AH σε 3 διαφορετικές τιμές pH, σε pH =5, σε pH =7, και pH =8. Όπως φαίνεται στο σχήμα 24, η ενεργότητα του ενζύμου έχει την ίδια συμπεριφορά για κάθε τιμή pH σε όλα τα υποκλάσματα. Στην περιοχή του pH=7-7.4 έχουμε την μέγιστη ενεργότητα της PAF-AH (100-115%), ενώ η ελάχιστη ενεργότητα εμφανίζεται σε pH =5 (~ 75%-80%).



Σχήμα 24. Επίδραση pH στην ενεργότητα της PAF-AH



Επίσης μελετήθηκε η επίδραση της τρυψίνης στην ενεργότητα της PAF-AH καθώς και των σουλφιδριλικών αντιδραστηρίων IAA και DTT. Επιπλέον η ενεργότητα της PAF-AH μετρήθηκε παρουσία του ειδικού αναστολέα των σερινοεστερασών Refabloc καθώς και του ειδικού ανταγωνιστή του PAF, CV 3988. Όπως φαίνεται και στον πίνακα 11 η ενεργότητα του ενζύμου σε όλα τα υποκλάσματα δεν επηρεάζεται από την τρυψίνη και τα σουλφιδρικά αντιδραστήρια αφού μετά την επώαση ανακτάται ενεργότητα > 80%. Επιπλέον παρουσία 0.1mM Refabloc έχουμε πλήρη αναστολή της ενεργότητας της PAF-AH, και το ίδιο συμβαίνει παρουσία 10mM CV 3988.

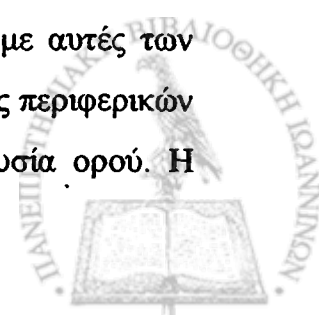
Πίνακας 11. Φυσικοχημικές ιδιότητες της PAF-AH όλων των λιποπρωτεϊνικών υποκλασμάτων ανθρωπίνου πλάσματος

Λιποπρωτεϊνικό υποκλάσμα	IAA	Τρυψίνη	DTT	CV 3988	Refabloc
	% της ενεργότητας του τυφλού				
VLDL	106.1±0.5	84.8±1.1	96.6±4.7	1.7±1.1	3.7±0.1
LDL-1	97.1±0.8	74.5±2.9	88.7±0.9	4.5±2.9	3.9±0.1
LDL-2	80.9±3.9	68.2±6.3	84.5±0.5	5.6±6.3	6.1±0.3
LDL-3	87.8±9.8	72.6±4.5	94.2±3.9	6.3±4.5	8.9±0.9
LDL-4	103.1±3.7	89.1±1.2	93.6±7.8	2.2±1.2	1.5±0.1
LDL-5	98.4±0.2	95.2±0.8	92.8±1.2	1.3±0.8	0.1±0.1
HDL-2	97.2±1.3	97.0±2.3	83.5±6.1	4.0±2.3	2.4±0.1
HDL-3	100.0±4.0	110.4±0.4	84.2±2.3	6.0±0.4	8.3±0.4
VHDL	106.8±1.0	91.6±0.7	88.3±3.3	1.6±0.7	1.8±0.1

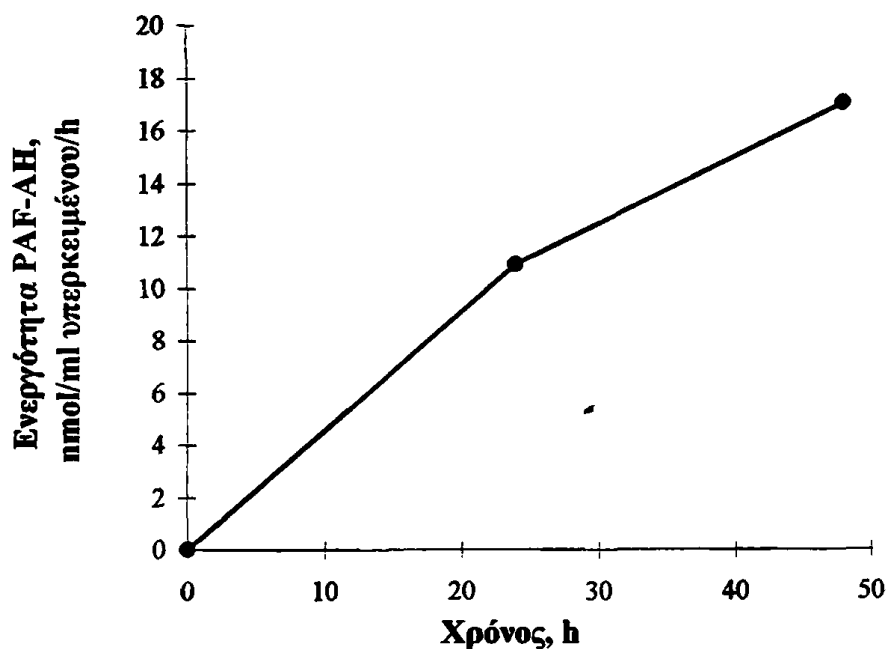
IAA: Ιωδοξικό οξύ, DTT: Διθειοθρεϊτόλη, CV 3988 ειδικός ανταγωνιστής του PAF, Refabloc: αναστολέας σερινοεστερασών.

Ιδιότητες ακετυλουδρολάσης από καλλιέργειες μονοκυττάρων

Επειδή η κύρια πηγή της ακετυλουδρολάσης του πλάσματος είναι τα μονοκύτταρα κατά την διαφοροποίησή τους σε μακροφάγα, μελετήθηκαν οι ιδιότητες του ενζύμου που εκκρίνεται από τα μακροφάγα σε σχέση με αυτές των διαφόρων λιποπρωτεϊνικών υποκλασμάτων. Έγιναν λοιπόν καλλιέργειες περιφερικών μονοκυττάρων αίματος για 2 ημέρες σε θρεπτικό υλικό RPMI απουσία ορού. Η



υδρολυτική ως προς τον PAF, ενεργότητα στο υπερκείμενο των καλλιέργειών αυτών ταυτοποιήθηκε ως PAF-AH αφού η δράση της είναι ανεξάρτητη Ca^{2+} και αναστέλλεται πλήρως από το CV 3988 καθώς και από το Refabloc. Επίσης τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά του ενζύμου αυτού μοιάζουν με αυτά της PAF-AH των αρσ A-I και αρσ B λιποπρωτεϊνών μια που η ενεργότητά του δεν επηρεάζεται από την επώαση με IAA, τρυψίνης ή DTT. Όπως φαίνεται στο σχήμα 25 η έκκριση της ενεργότητας της PAF-AH φτάνει στη μέγιστη τιμή της στις 48h καλλιέργειας των μονοκυττάρων, όταν η καλλιέργεια γίνεται απουσία ορού. Η ενεργότητα της PAF-AH που εκκρίνεται από τα μονοκύτταρα προσδιορίστηκε τις χρονικές στιγμές 0h, 24h και 48h και ήταν 0 nmol/ml υπερκειμένου/min, 10.9 ± 1.44 nmol/ml υπερκειμένου/min και 17.1 ± 2.69 nmol/ml υπερκειμένου/min αντίστοιχα. Οι κινητικές σταθερές του ενζύμου είναι, $K_m = 23.4 \pm 7.6$ μ mol/L και $V_{max} = 0.5 \pm 0.2$ nmol/mg πρωτεΐνης/min και είναι όμοιες με αυτές της PAF-AH στην ολική LDL.



Σχήμα 25. Αντιπροσωπευτικό σχήμα έκκρισης PAF-AH από καλλιέργεια μονοκυττάρων



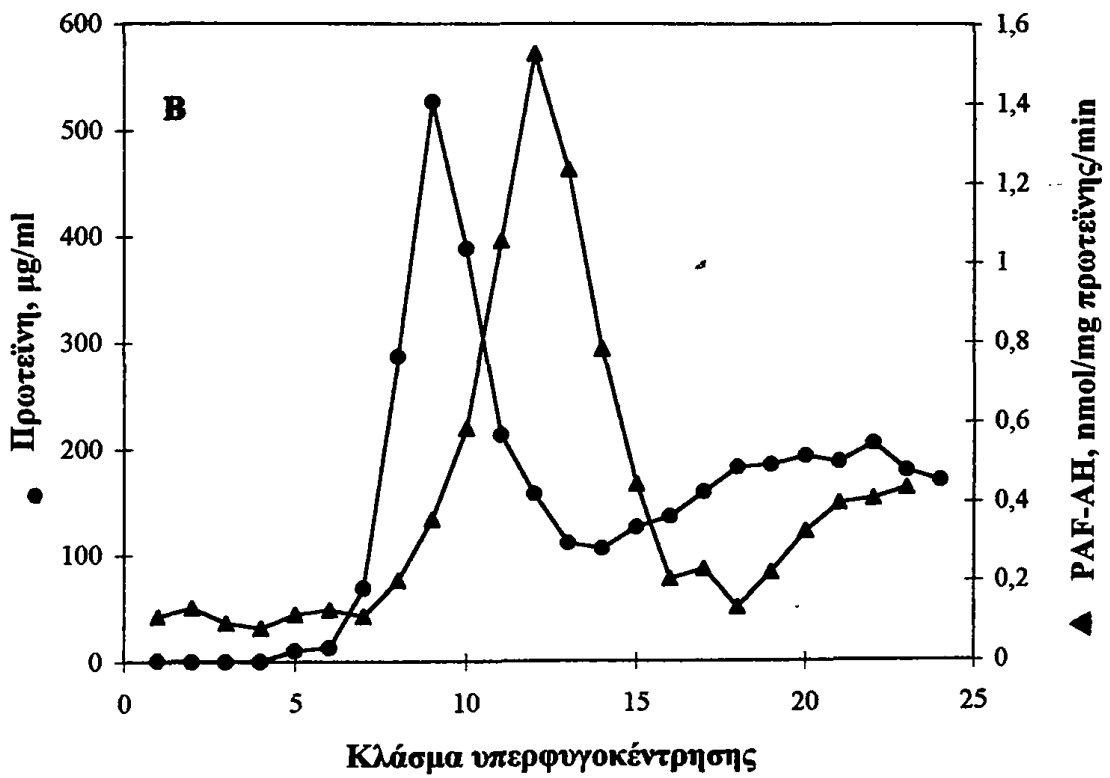
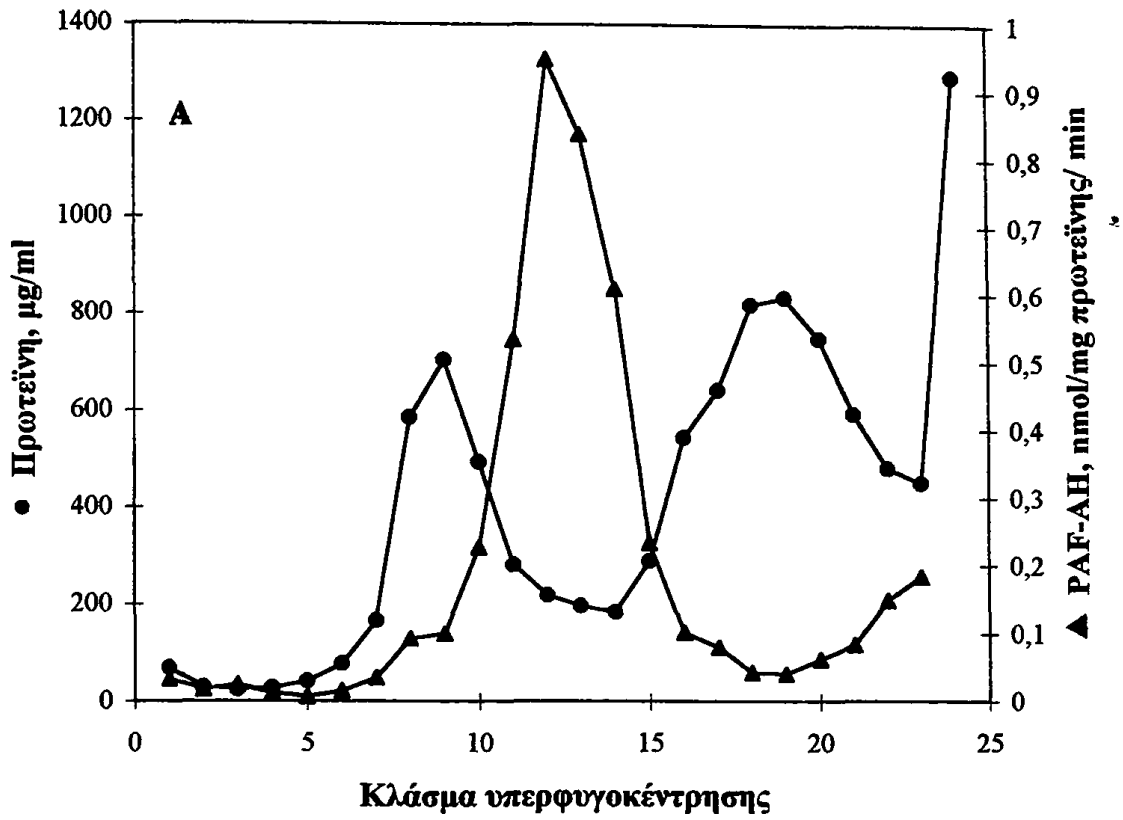
Κατανομή της PAF-AH των μονοκυττάρων στα υποκλάσματα των λιποπρωτεϊνών

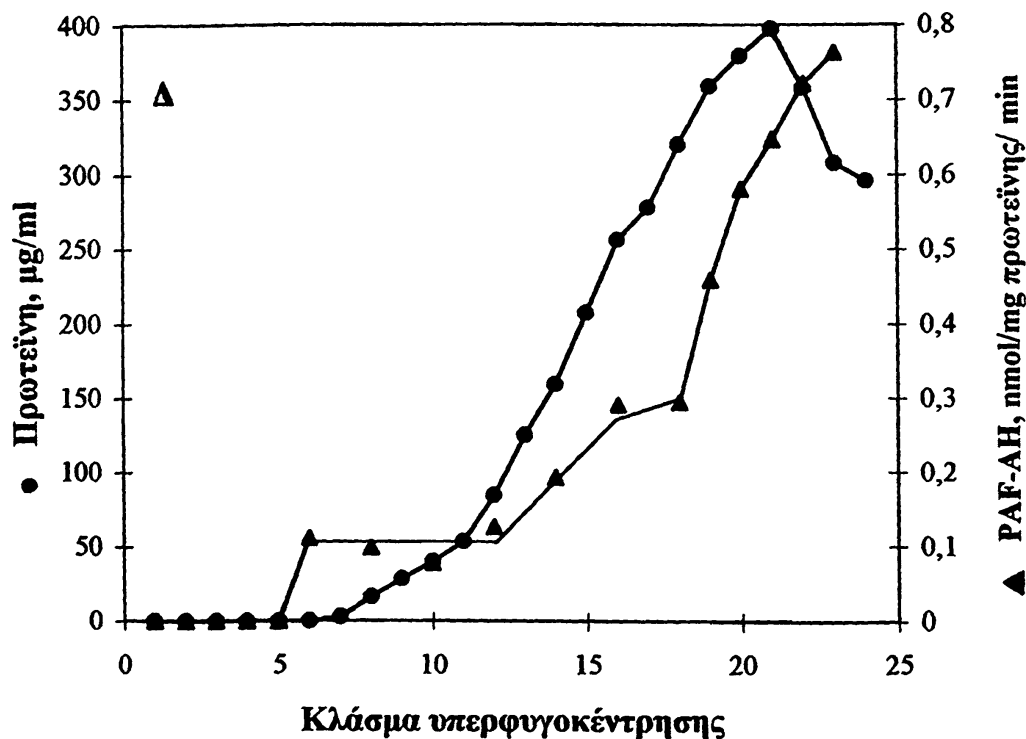
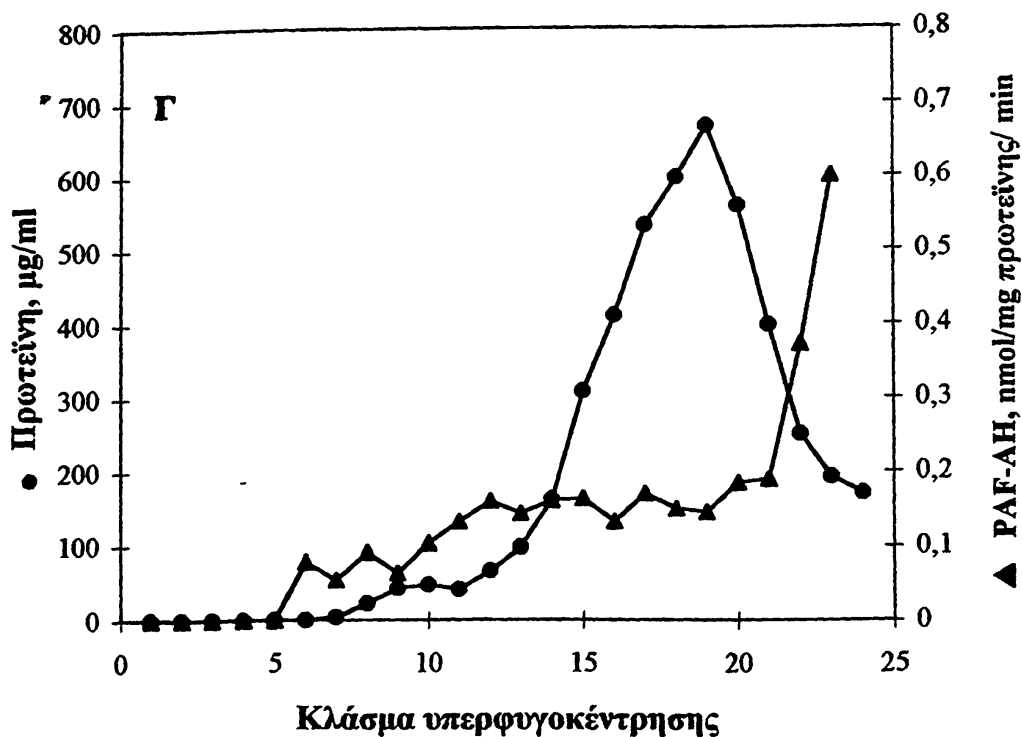
Στη συνέχεια διερευνήθηκε η δυνατότητα κατανομής της PAF-AH των μονοκυττάρων στα λιποπρωτεϊνικά υποκλάσματα πλάσματος. Το υπερκείμενο καλλιέργειας μονοκυττάρων υποβλήθηκε σε υπερφυγοκέντρηση βαθμίδωσης πυκνοτήτων όπως περιγράφεται στην μεθοδολογία, και σε όλα τα κλάσματα που ανακτήθηκαν ελέγχθηκε η ενεργότητα της PAF-AH. Όπως φαίνεται και στο σχήμα 26Δ το μεγαλύτερο ποσό της ενεργότητας της PAF-AH, > 70% της ολικής εντοπίστηκε στην περιοχή των μεγάλων πυκνοτήτων της βαθμίδωσης δηλαδή στα κλάσματα 24-30, $d > 1.179 \text{ g/ml}$).

Το ίδιο πείραμα έγινε με επώαση του υπερκειμένου με πλάσμα, ή ολική LDL ή ολική HDL των οποίων η ενδογενής ενεργότητα της PAF-AH είχε αρχικά απενεργοποιηθεί με Refabloc όπως περιγράφεται στη μεθοδολογία. Όπως φαίνεται στο σχήμα 26Α, η ενεργότητα της PAF-AH του υπερκείμενου των μονοκυττάρων, όταν αυτό επωαστεί με πλάσμα, εντοπίζεται στα κλάσματα 11 και 12, δηλαδή στο υπόκλασμα LDL-5. Ταυτόχρονα, ένα μεγάλο μέρος της ενεργότητας (> 40% της ολικής) ανιχνεύεται μετά το κλάσμα 24, δηλαδή στην περιοχή των πρωτεϊνών $d > 1.179 \text{ g/ml}$).

Όταν το υπερκείμενο των μονοκυττάρων επωαστεί με ολική LDL (κλάσματα 3-12), η ενεργότητα της PAF-AH ανιχνεύεται κυρίως στην πυκνότητα του LDL-5, κλάσματα 11-12 ενώ ένα ποσοστό ~15% της ολικής εντοπίζεται στην πυκνότητα των πρωτεϊνών $d > 1.179 \text{ g/ml}$, Σχ 26Β. Ομοίως ένα 40% της ολικής ενεργότητας εντοπίζεται στην περιοχή των πρωτεϊνών κατά την επώαση του υπερκειμένου των μονοκυττάρων με ολική HDL (κλάσματα 14-17) ενώ ένα ποσοστό μόλις $26 \pm 8\%$ της ολικής ενεργότητας βρίσκεται στην περιοχή του υποκλάσματος VHDL-1, σχήμα 26Γ.







Σχήμα 26. Κατανομή της PAF-AH που εκκρίνεται από καλλιέργειες μονοκυττάρων στα υποκλάσματα των λιποπρωτεϊνών μετά από υπερφυγοκέντρωση βαθμίδωσης πυκνοτήτων. Σε ολικό πλάσμα, ολική LDL, και ολική HDL απενεργοποιήθηκε η PAF-AH με 1mM Refabloc, όπως περιγράφεται στη μεθοδολογία. Στη συνέχεια καθεμιά από αυτές τις πηγές του ενζύμου αναμίχθηκε

με το υπερκείμενο της καλλιέργειας μονοκυττάρων σε αναλογία 1:1 (v/v) και επώαστηκε για 60 min στους 37°C. Το υπερκείμενο μόνο του είτε μείγμα με λιποπρωτεΐνες υποβλήθηκε σε υπερφυγοκέντρωση για τον διαχωρισμό των 30 κλασμάτων στα οποία προσδιορίστηκε η ενεργότητα της PAF-AH και το περιεχόμενό τους σε πρωτεΐνη, όπως περιγράφεται στη μεθοδολογία.

A. Κατανομή της PAF-AH που εκκρίνεται από καλλιέργεια μονοκυτάρων μετά από επώαση με πλάσμα.

B. Κατανομή της PAF-AH μετά από επώαση με LDL.

Γ. Κατανομή της PAF-AH μετά από επώαση με HDL.

Δ. Κατανομή της PAF-AH εκκρίνεται από καλλιέργεια μονοκυτάρων.

Τα αποτελέσματα είναι αντιπροσωπευτικά από 3 ανεξάρτητα πειράματα, με πλάσμα από διαφορετικούς δότες. Εκφράζουν την μέση τιμή \pm S.D προσδιορισμών εις διπλούν.

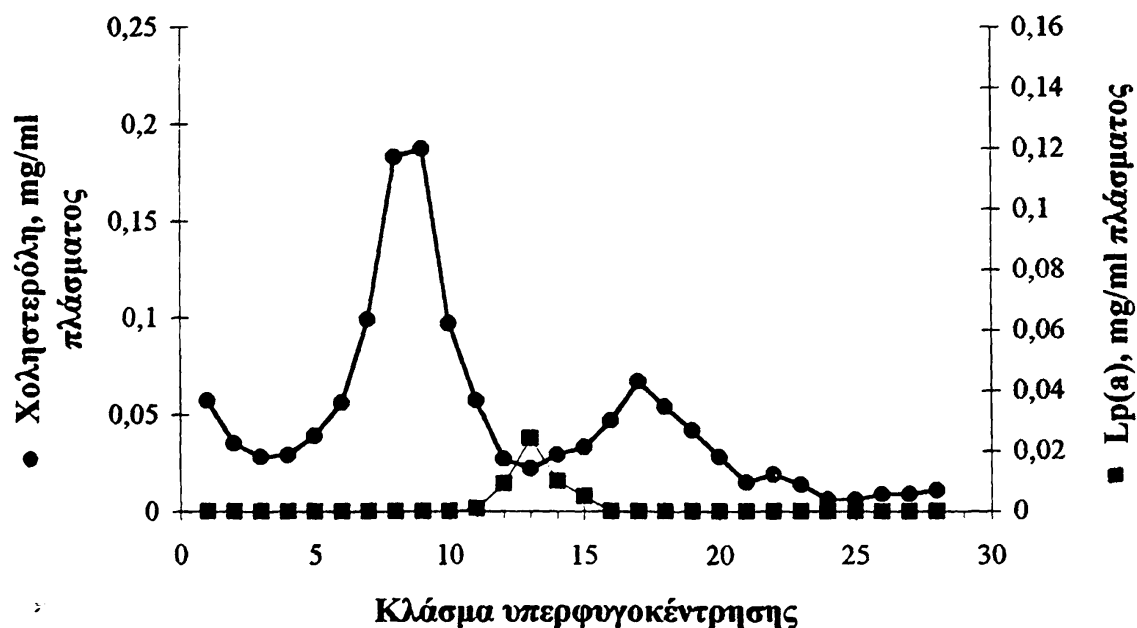


ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7

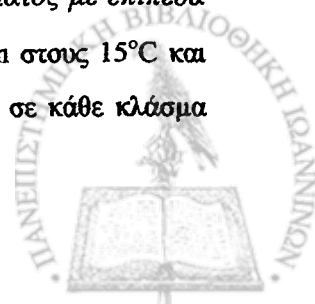
ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑ ΡΑΦ-ΑΗ ΣΤΟ ΣΩΜΑΤΙΔΙΟ ΤΗΣ Lp(a)

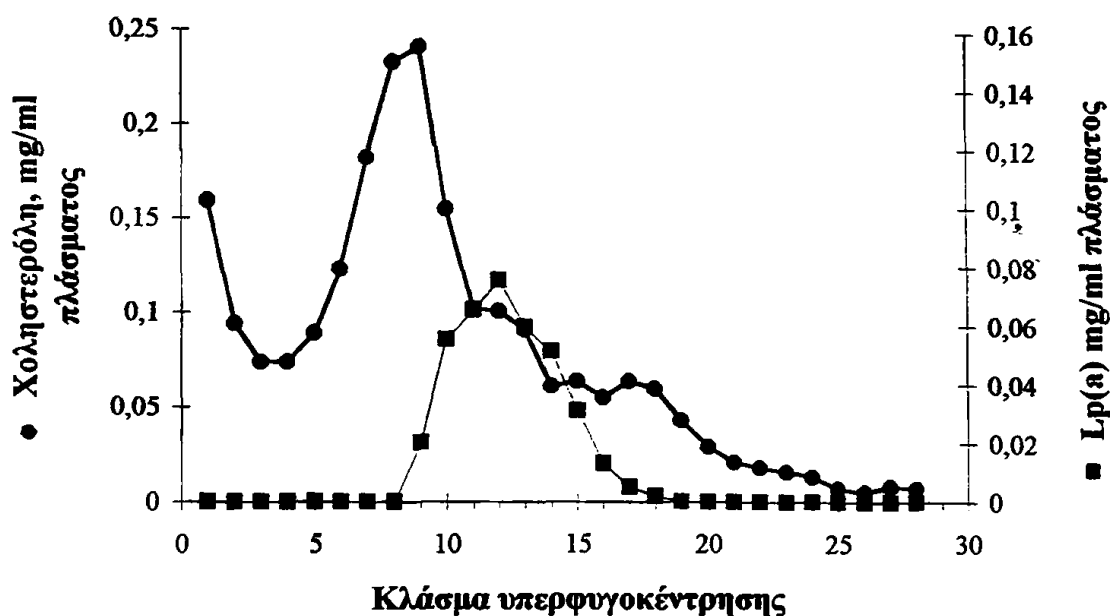
Κατανομή της ΡΑΦ-ΑΗ στις λιποπρωτεΐνες πλάσματος το οποίο περιέχει Lp(a).

Στο προηγούμενο κεφάλαιο μελετήθηκε η κατανομή του ενζύμου σε όλα τα υποκλάσματα λιποπρωτεϊνών πλάσματος χωρίς ανιχνεύσιμα επίπεδα Lp(a). Για να βρεθεί αν η κατανομή του ενζύμου στο πλάσμα επηρεάζεται από την ύπαρξη της Lp(a), έγινε συγκριτική μελέτη μεταξύ πλάσματος από νορμολιπιδαιμικούς δότες χωρίς ανιχνεύσιμα επίπεδα Lp(a) ($Lp(a) < 8 \text{ mg/dl}$) και πλάσματος από δότες με επίπεδα $Lp(a) > 30 \text{ mg/dl}$ ή με επίπεδα Lp(a) μεταξύ 80-100 mg/dl. Οι λιποπρωτεΐνες διαχωρίστηκαν με υπερφυγοκέντρηση βαθμίδωσης πυκνοτήτων όπως περιγράφεται στη μεθοδολογία και αντιπροσωπευτικές καμπύλες της κατανομής των λιποπρωτεϊνών μετά την υπερφυγοκέντρηση φαίνονται στα σχήματα 27 και 28.



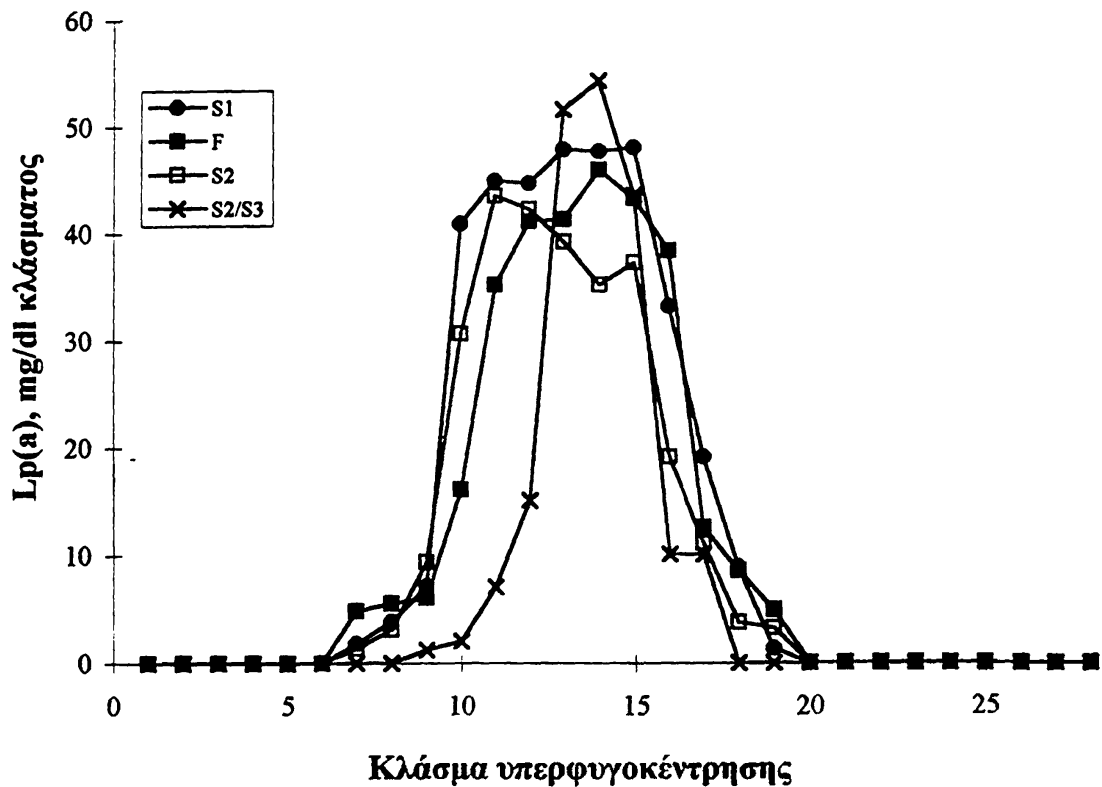
Σχήμα 27. Αντιπροσωπευτική καμπύλη διαχωρισμού λιποπρωτεϊνών πλάσματος με επίπεδα $Lp(a) < 8 \text{ mg/dl}$. Η υπερφυγοκέντρηση έγινε με ρότορα SW-41 στις 40.000 rpm στους 15°C και 24h όπως περιγράφεται στη Μεθοδολογία. Η μέτρηση των επιπέδων της Lp(a) σε κάθε κλάσμα της υπερφυγοκέντρησης έγινε με ELISA.





Σχήμα 28. Αντιπροσωπευτική καμπύλη διαχωρισμού λιποπρωτεϊνών πλάσματος με επίπεδα $Lp(a) < 80 \text{ mg/dl}$, ισομορφή S1. Η υπερφυγοκέντρωση έγινε με ρότορα SW-41 στις 40.000 rpm στους 15°C και 24h όπως περιγράφεται στη Μεθοδολογία. Η μέτρηση των επιπέδων της $Lp(a)$ σε κάθε κλάσμα της υπερφυγοκέντρωσης έγινε με ELISA.

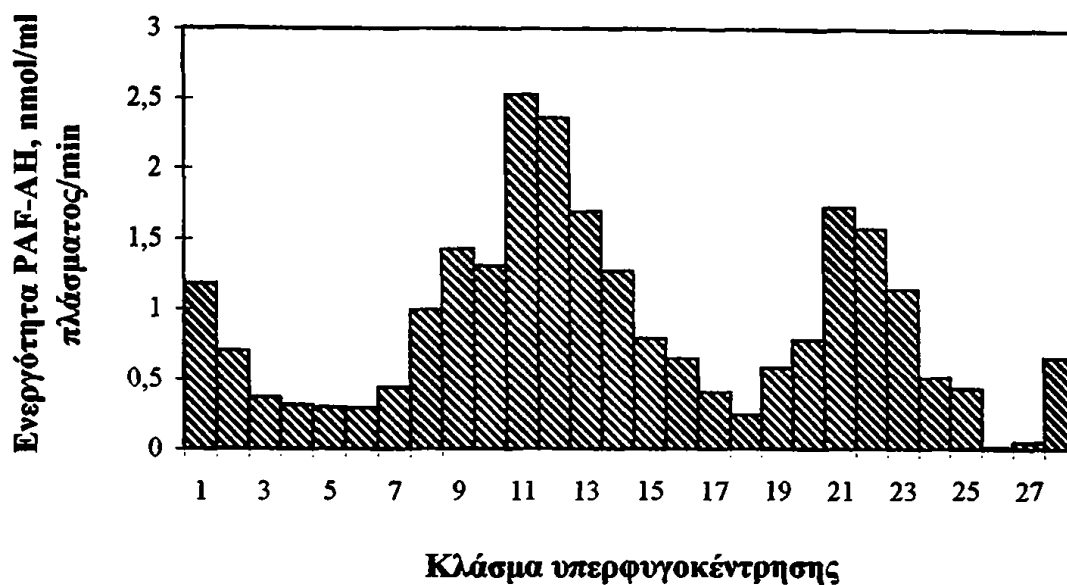
Στα άτομα με επίπεδα $Lp(a) < 8 \text{ mg/dl}$ (control), η $Lp(a)$ είτε δεν ανιχνεύθηκε σε κανένα κλάσμα της υπερφυγοκέντρωσης είτε εντοπίστηκε σε ένα μικρό αριθμό κλασμάτων, συγκεκριμένα στα κλάσματα 12-15 ($d = 1.064\text{-}1.095 \text{ g/ml}$), σχήμα 27. Σε πλάσμα με επίπεδα $Lp(a) > 30 \text{ mg/dl}$, η $Lp(a)$ εντοπίστηκε σε μια ευρεία περιοχή κλασμάτων (9 μέχρι και 17) πυκνότητας ($1.050\text{-}1.10 \text{ g/ml}$), σχήμα 28. Η $Lp(a)$ εμφανίζεται στην ίδια πάντα περιοχή πυκνότητας ($d = 1.050\text{-}1.10 \text{ g/ml}$) ανεξάρτητα από την ισομορφή της. Αυτό που μεταβάλλεται ανάλογα με την ισομορφή είναι η πυκνότητα στην οποία εμφανίζεται η μέγιστη τιμή της $Lp(a)$ σχήμα 29. Μετά την υπερφυγοκέντρωση σε κάθε κλάσμα μετρήθηκε η ενεργότητα της PAF-AH, και τα σχήματα 30 και 31 δείχνουν αντιπροσωπευτικά προφίλ της κατανομής του ενζύμου σε όλες τις λιποπρωτεΐνες πλάσματος, ανάλογα με τα επίπεδα της $Lp(a)$.



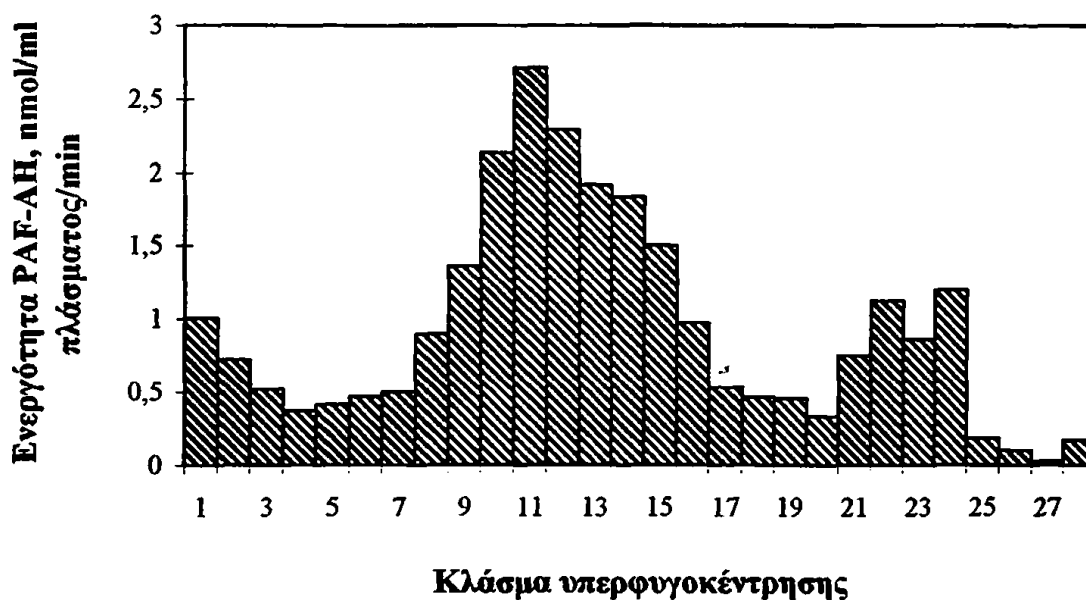
Σχήμα 29. Αντιπροσωπευτικές καμπύλες διαχωρισμού λιποπρωτεϊνών πλάσματος με ισομορφές F, S1, S2, S2/S3. Η υπερφυγοκέντρωση έγινε με ρότορα SW-41 στις 40.000 στους 15°C και 24h όπως περιγράφεται στη Μεθοδολογία. Η μέτρηση των επιπέδων της Lp(a) σε κάθε κλάσμα της υπερφυγοκέντρωσης έγινε με ELISA.

Με τη χρήση και αυτής της βαθμίδωσης πυκνοτήτων για το διαχωρισμό των λιποπρωτεϊνών η ενεργότητα της PAF-AH κατανέμεται στα πυκνά υποκλάσματα των λιποπρωτεϊνών LDL και HDL, και αυτό είναι σε συμφωνία με τα προηγούμενα αποτελέσματά μας. Σε άτομα χωρίς ανιχνεύσιμα επίπεδα Lp(a) το 50±1% της ολικής ενεργότητας της PAF-AH εντοπίζεται στα κλάσματα 9-17. Η VLDL και το μεγαλύτερο ποσό της LDL, κλάσματα 1-8, περιέχουν το 18.9±1.6% της ολικής ενεργότητας, ενώ το 31.1±1.2% κατανέμεται στα κλάσματα 18-28 όπου υπάρχει το μεγαλύτερο ποσό της HDL και οι πρωτεΐνες του πλάσματος, σχήμα 30. Σε πλάσμα με επίπεδα Lp(a) 30-40 mg/dl, η ενεργότητα της PAF-AH στα κλάσματα 9-17 αποτελεί το 54±1.6% της ολικής (4% μεγαλύτερη συγκριτικά με τους control $P < 0.05$ $n=3$). Ενώ τα κλάσματα 1-8 και 18-28 περιέχουν το 20±1.8% και 26±1.3% της ολικής ενεργότητας PAF-AH αντίστοιχα.





Σχήμα 30. Κατανομή της ενεργότητας της PAF-AH σε όλα τα λιποπρωτεϊνικά κλάσματα, μετά από υπερφυγοκέντρηση πλάσματος με επίπεδα $Lp(a) < 8 \text{ mg/dl}$.



Σχήμα 31. Κατανομή της ενεργότητας της PAF-AH σε όλα τα λιποπρωτεϊνικά κλάσματα, μετά από υπερφυγοκέντρηση πλάσματος με επίπεδα $Lp(a) 80 \text{ mg/dl}$, ισομορφή S1. Η υπερφυγοκέντρηση έγινε με ρότορα SW-41 στις 40.000 rpm στους 15°C και 24h όπως περιγράφεται στη Μεθοδολογία. Η ενεργότητα της PAF-AH προσδιορίστηκε με τη μέθοδο ιζηματοποίησης με TCA.

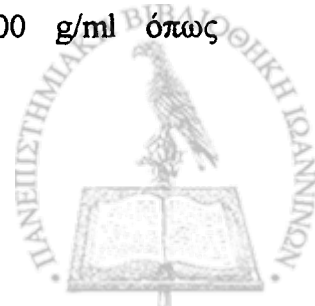


Τέλος σε πλάσμα με επίπεδα Lp(a) 80-100 mg/dl, η ενεργότητα της PAF-AH που υπάρχει στα κλάσματα 9-17 είναι $59 \pm 1.5\%$ (9% μεγαλύτερη από τα αντίστοιχα των control $P < 0.05$ $n=3$). Τα κλάσματα 1-8 και 18-28, περιέχουν το $19 \pm 1.4\%$ και $22 \pm 0.9\%$ της ολικής ενζυμικής ενεργότητας, αντίστοιχα, σχήμα 31. Δεν υπήρχαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στην κατανομή του ενζύμου όταν χρησιμοποιήθηκαν πλάσματα με όμοια επίπεδα Lp(a) αλλά με διαφορετικές ισομορφές.

Επίσης, επειδή στα κλάσματα 9-17 εντοπίζεται και το πυκνό υπόκλασμα της LDL το οποίο όπως έχουμε δείξει έχει το μεγαλύτερο ποσοστό της ενεργότητας PAF-AH της LDL (LDL-5), έγινε υπερφυγοκέντρωση βαθμίδωσης πυκνοτήτων με διαφορετικές ποσότητες LDL-5 ώστε να μελετηθεί η επίδραση της συγκέντρωσης του στην κατανομή της PAF-AH, στις λιποπρωτεΐνες πλάσματος με Lp(a). Έτσι πλάσμα με επίπεδα Lp(a) 80 mg/dl ισομορφή S1, εμπλουτίστηκε με δύο διαφορετικές ποσότητες LDL-5 (ενεργότητα PAF-AH 6 και 12 nmol/ml αντίστοιχα) και υποβλήθηκε σε υπερφυγοκεντρικό διαχωρισμό των λιποπρωτεϊνών όπως περιγράφεται στη μεθοδολογία. Μετά τον εμπλουτισμό του πλάσματος με LDL-5, η PAF-AH στα κλάσματα 9-17 ήταν κατά 6% και 8% αντίστοιχα μεγαλύτερη. Η περιοχή αυτή των κλασμάτων πριν τον εμπλουτισμό περιείχε το $59 \pm 1.5\%$ της ολικής ενεργότητας PAF-AH του πλάσματος ενώ μετά τον εμπλουτισμό το $65 \pm 2.0\%$ και το $67 \pm 3.2\%$ αντίστοιχα, $P < 0.05$, $n=3$.

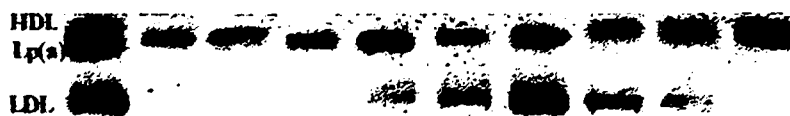
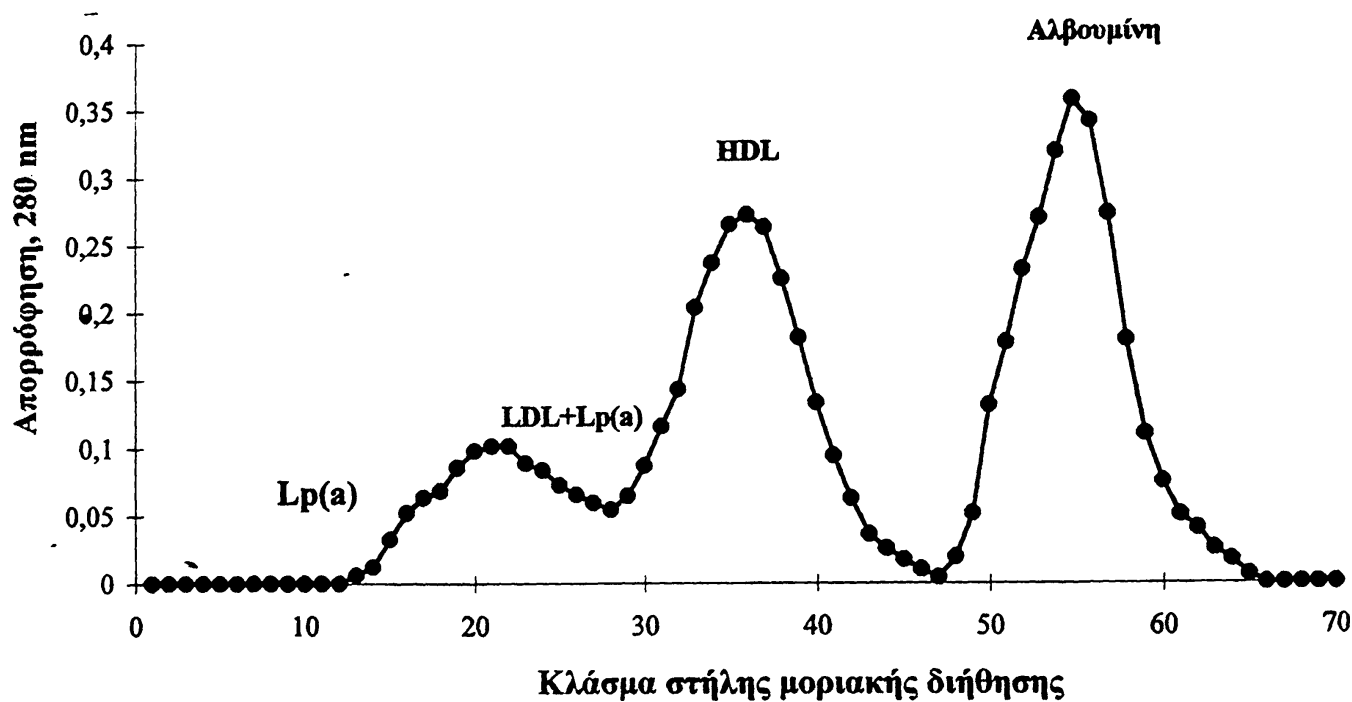
Ιδιότητες της PAF-AH της Lp(a)

Από τα παραπάνω πειράματα υπήρξαν ενδείξεις ότι υπάρχει ενεργότητα PAF-AH και στην Lp(a). Για να μελετηθούν οι ιδιότητες του ενζύμου αυτού και να πιστοποιηθεί εάν πρόκειται για το ίδιο ένζυμο (PAF-AH) που υπάρχει και στις άλλες λιποπρωτεΐνες, απομονώθηκε και καθαρίστηκε Lp(a) από αναμεμιγμένο πλάσμα ατόμων με επίπεδα που αντιστοιχούν στις ισομορφές F, S1, S2. Οι ισομορφές της αρo (α) ταυτοποιήθηκαν με ηλεκτροφόρηση SDS-αγαρόζης 1.5%, όπως περιγράφεται στη μεθοδολογία, εικόνα 1. Επίσης η Lp(a) απομονώθηκε με διαδοχικές υπερφυγοκεντρήσεις πυκνοτήτων KBr στην περιοχή 1.050-1.100 g/ml όπως περιγράφεται στη μεθοδολογία.



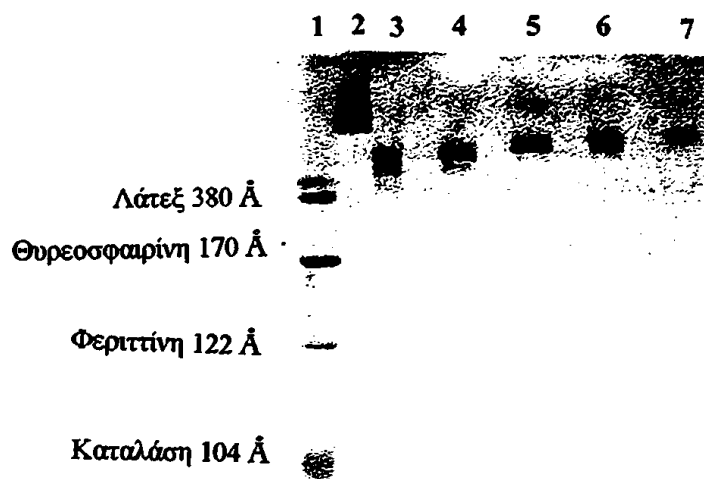


Εικόνα 1. Ισομορφές της apo (a) μετά από ηλεκτροφόρηση αγαρόζης 1.5% η οποία ακολουθείται από ανοσοαποτύπωση και χημειοφωταύγεια. Στην πρώτη και τελευταία θέση της πηκτής φαίνονται τα πρότυπα ισομορφών (st) της apo(a).



Σχήμα 32. Αντιπροσωπευτικό δείγμα έκλουσης της $Lp(a)$ από τη στήλη μοριακής διήθησης και έλεγχος καθαρότητάς της με ηλεκτροφόρηση αγαρόζης.

Η απομονωμένη $Lp(a)$ καθαρίστηκε με χρωματογραφία μοριακής διήθησης (σχήμα 32) και ταυτοποιήθηκε ως $Lp(a)$ με ηλεκτροφόρηση αγαρόζης (σχήμα 32) και με ηλεκτροφόρηση πολυακρυλαμιδίου 2-16% κάτω από μη αποδιατακτικές συνθήκες (σχήμα 33), και τέλος με προσδιορισμό της χημικής της σύστασης που ήταν σε συμφωνία με την διεθνή βιβλιογραφία όπως φαίνεται στον πίνακα 12.



Σχήμα 33. Ηλεκτροφόρηση PAGE 2-16%. Στην θέση 1 είναι πρότυπα μοριακά βάρη, στη θέση 2 η Lp(a) στη θέση 3 η LDL-5, στη θέση 4 η LDL-4 στη θέση 5 η LDL-3 στη θέση 6 η LDL-2 στη θέση 7 η LDL-1.

Πίνακας 12. Χημική σύσταση ανθρώπινης Lp(a) από αναμεμιγμένο πλάσμα διαφόρων ισομορφών (F, S1, S2). Το κάθε συστατικό είναι εκφρασμένο ως % ποσοστό της λιποπρωτεϊνικής μάζας

Παράμετρος	Lp(a)
Πρωτεΐνη %	36.8±2.9
Ελεύθερη χοληστερόλη %	8.1±2.9
Εστέρες χοληστερόλης %	34.0±3.3
Τριγλυκερίδια %	6.1±1.9
Φωσφολιπίδια %	15.1±1.8
PE %	4.9±1.4
PC %	59.3±8.1
Sph %	29.8±1.6
Lyso-PC %	4.3±1.6
Λιποπρωτεϊνική μάζα, mg/ml πλάσματος	0.6±0.1

Κάθε τάξη φωσφολιπιδίων εκφράζεται ως το % των ολικών PL. Οι τιμές εκπροσωπούν την μέση τιμή ± S.D από 5 διαφορετικές παρασκευές Lp(a). Η ολική λιποπρωτεϊνική μάζα αντιστοιχεί στο άθροισμα όλων των λιπιδιακών και πρωτεϊνικών συστατικών της Lp(a).

Για να προσδιοριστεί η ενεργότητα της PAF-AH στην Lp(a) έγινε αρχικά έλεγχος της γραμμικότητας της μεθόδου σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση πρωτεΐνης. Μετρήσεις της PAF-AH στην περιοχή 20-200 μg/ml πρωτεΐνης έδειξαν

γραμμικότητα κάτω από τα 150 $\mu\text{g/ml}$ πρωτεΐνης, οπότε σε όλους τους προσδιορισμούς χρησιμοποιήθηκε τελική συγκέντρωση πρωτεΐνης 100 $\mu\text{g/ml}$. Στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκαν όλοι οι γνωστοί τρόποι για να ταυτοποιηθεί ότι πρόκειται για το ίδιο ένζυμο που υπάρχει και στις άλλες λιποπρωτεΐνες του πλάσματος, πίνακας 13. Η ενεργότητα του ενζύμου που χρησιμοποιήθηκε για τις διάφορες κατεργασίες της Lp(α) ήταν 10.90 ± 2.30 nmol/mg πρωτεΐνη /min. Όπως φαίνεται στον πίνακα 2 η ενεργότητα αυτή δεν επηρεάζεται από την ύπαρξη ιόντων Ca^{2+} και EDTA, ούτε και από τη τρυψίνη ή τα σουλφυδριλικά αντιδραστήρια IAA και DTT. Αντιθέτως παρουσία των αναστολέων σερινοεστερασών DFP και PMSF καθώς και του ειδικού ανταγωνιστή του PAF, CV 3988 η ενεργότητα της PAF-AH αναστέλλεται πλήρως ($P < 0.0001$) ($n=3$).

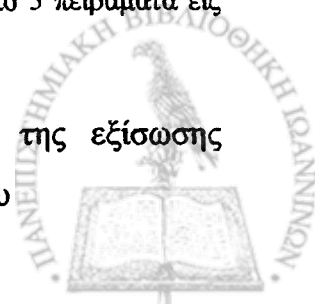
Επίσης για να πιστοποιηθεί ότι η ενεργότητα που μετράμε δεν οφείλεται σε δράση ενδογενούς LCAT, έγινε απενεργοποίησή της με θέρμανση της Lp(α) στους 60°C για 1h και έπειτα έγινε προσδιορισμός της ενεργότητας της PAF-AH. Η ενεργότητα της PAF-AH δεν επηρεάστηκε από την θέρμανση, (πίνακας 13).

Πίνακας 13. Κατεργασίες για την ταυτοποίηση της PAF-AH στην Lp(α).

Αντιδραστήριο	Ενεργότητα PAF-AH, nmol/mg πρωτεΐνης /min
Τυφλό	10.90 ± 2.3
Ca^{2+} , 10 mM	10.30 ± 1.47
EDTA, 10 mM	11.64 ± 1.13
DFP, 20 mM, 30 min, 37°C	0.10 ± 0.10^a
PMSF, 4 mM, 1h, 37°C	1.60 ± 0.78^a
CV 3988, 10mM, 30min, 37°C	0.07 ± 0.01^a
Τρυψίνη, 5mg/ml, 1h, 37°C	9.51 ± 0.13
DTT, 1mM, 15 min, 37°C	11.97 ± 0.42
IAA, 2mM, 15 min, 37°C	12.16 ± 0.15
Θέρμανση, 1h, 60°C	10.12 ± 0.17

Η ενεργότητα της PAF-AH προσδιορίστηκε με την μέθοδο ιζηματοποίησης με TCA όπως περιγράφεται στην μεθοδολογία. Οι τιμές εκπροσωπούν την μέση τιμή \pm S.D από 5 πειράματα εις διπλούν ^a $P < 0.0001$ συγκρινόμενα με το τυφλό.

Στη συνέχεια με κινητική Michaelis-Menten και με χρήση της εξίσωσης Lineweaver-Burk προσδιορίστηκαν οι κινητικές σταθερές του ενζύμου



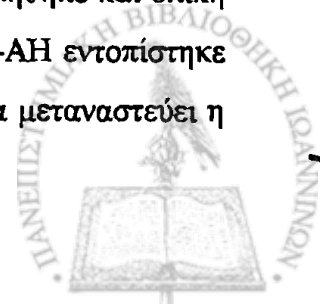
$K_m = 72.1 \pm 14.2 \mu\text{mol/L}$ και $V_{\text{max}} = 58.6 \pm 7.8 \text{ nmol/mg πρωτεΐνης}/\text{min}$ σε Lp(a) η οποία απομονώθηκε από αναμεμιγμένο πλάσμα διαφόρων ισομορφών.

Ενεργότητα PAF-AH μετά από αναγωγική διάσπαση της Lp(a)

Για να βρεθεί πως συνδέεται το ένζυμο στην Lp(a), και ποια η σχέση του με την apo(a), έγινε επώαση Lp(a) παρασκευασμένης από αναμεμιγμένο πλάσμα διαφόρων ισομορφών με 10mM DTT στους 37°C για 3h. Η χρήση της DTT αποσκοπεί στην αναγωγική διάσπαση του δισουλφιδικού δεσμού που ενώνει την apo(a) με το υπολλειπόμενο LDL τμήμα της Lp(a). Η ενεργότητα της PAF-AH δεν επηρεάστηκε από την κατεργασία της Lp(a) με DTT ($21.7 \pm 6.9 \text{ nmol/min}$ πριν την επώαση με DTT και $23.8 \pm 6.8 \text{ nmol/min}$ μετά την επώαση με DTT). Μετά την αναγωγική διάσπαση η Lp(a) υποβλήθηκε σε υπερφυγοκέντρηση βαθμίδωσης πυκνοτήτων και το $85 \pm 5\%$ της ολικής ενζυμικής ενεργότητας ($20.2 \pm 1.2 \text{ nmol/min}$) εντοπίστηκε στην περιοχή πυκνότητας $d = 1.038-1.089 \text{ g/ml}$ όπου μεταναστεύει η προκύπτουσα λιποπρωτεΐνη μετά την αναγωγή. Η λιποπρωτεΐνη αυτή περιέχει μόνο apo B-100 και έχει β ηλεκτροφορητική κινητικότητα σε ηλεκτροφόρηση αγαρόζης. Το υπόλοιπο $15 \pm 5\%$ της ολικής ενεργότητας ($3.6 \pm 1.2 \text{ nmol/min}$) βρέθηκε στα 2 τελευταία κλάσματα της βαθμίδωσης 27 και 28 ($d > 1.210 \text{ g/ml}$). Τα κλάσματα αυτά περιέχουν μόνο apo(a) ενώ το περιεχόμενό τους σε φωσφολιπίδια και ολική χοληστερόλη είναι μόλις το 0.72% ($0.067 \pm 0.01 \text{ mg/ml}$ πλάσματος) και 0.38% ($0.09 \pm 0.02 \text{ mg/ml}$ πλάσματος) αντίστοιχα του συνόλου.

Κατά τον ίδιο τρόπο Lp(a) που είχε θερμανθεί στους 37°C για 3h απουσία DTT, υποβλήθηκε σε υπερφυγοκέντρηση βαθμίδωσης πυκνοτήτων. Το $97 \pm 3\%$ της ολικής ενζυμικής ενεργότητας εντοπίστηκε στην περιοχή πυκνότητας $d = 1.050-1.100 \text{ g/ml}$ (περιοχή πυκνότητας της Lp(a)), ενώ τα κλάσματα 27 και 28 δεν περιείχαν ούτε ενζυμική ενεργότητα ούτε ανιχνεύσιμες ποσότητες λιπιδίων ή πρωτεΐνης.

Στην ίδια κατεργασία, με DTT και υπερφυγοκέντρηση υποβλήθηκε και ολική LDL. Είτε παρουσία είτε απουσία DTT όλη η ενεργότητα της PAF-AH εντοπίστηκε στην περιοχή πυκνότητας $d = 1.019-1.064 \text{ g/ml}$, περιοχή στην οποία μεταναστεύει η



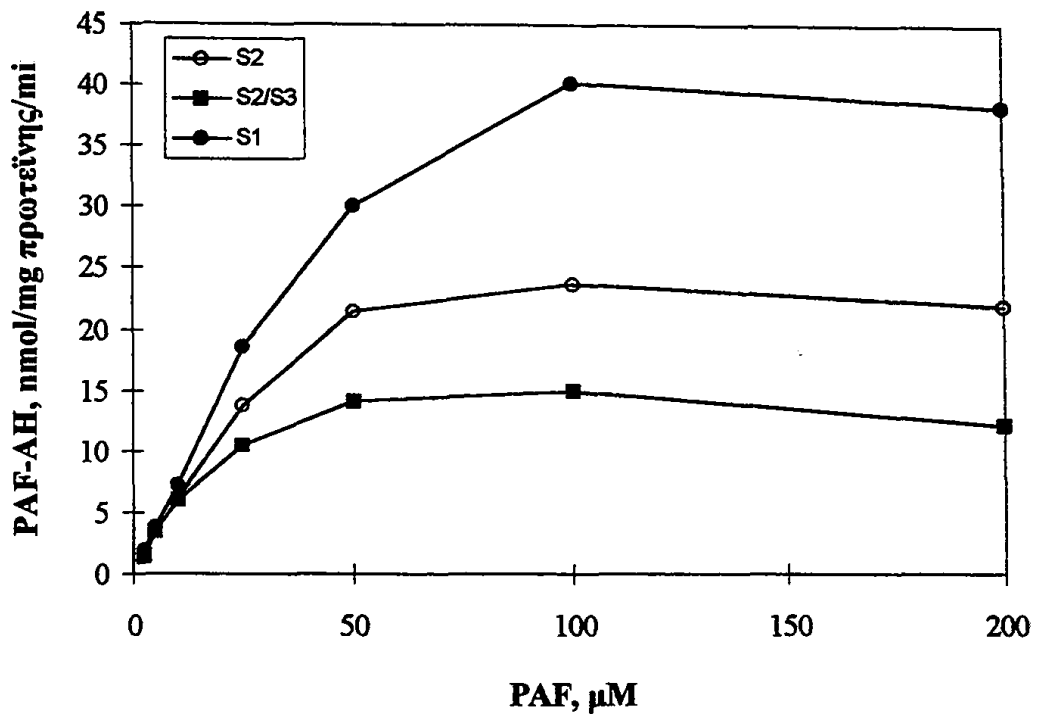
LDL. Σε κανένα άλλο κλάσμα δεν εντοπίστηκε ενεργότητα PAF-AH ούτε ανιχνεύθηκαν φωσφολιπίδια ή πρωτεΐνη. Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν ότι στη σύνδεση της PAF-AH με το σωματίδιο της Lp(a) δεν συμμετέχει η apo (a), αφού απομάκρυνσή της δεν επηρεάζει ουσιαστικά τη σύνδεση αυτή.

Μελέτη της ενεργότητας της PAF-AH στις διάφορες ισομορφές της Lp(a)

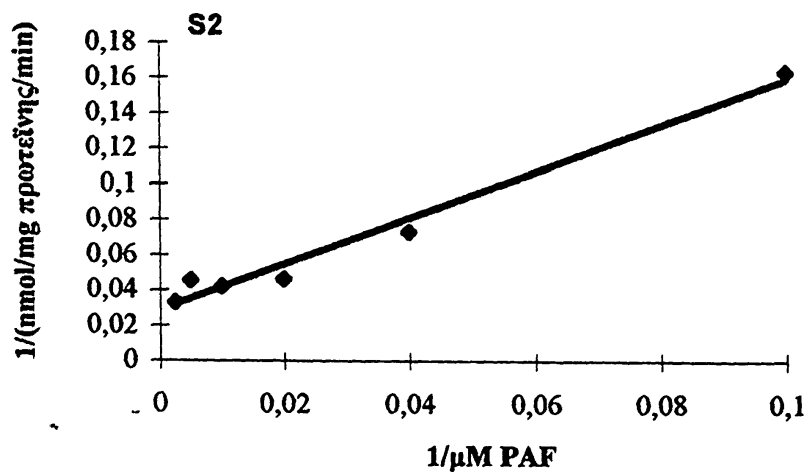
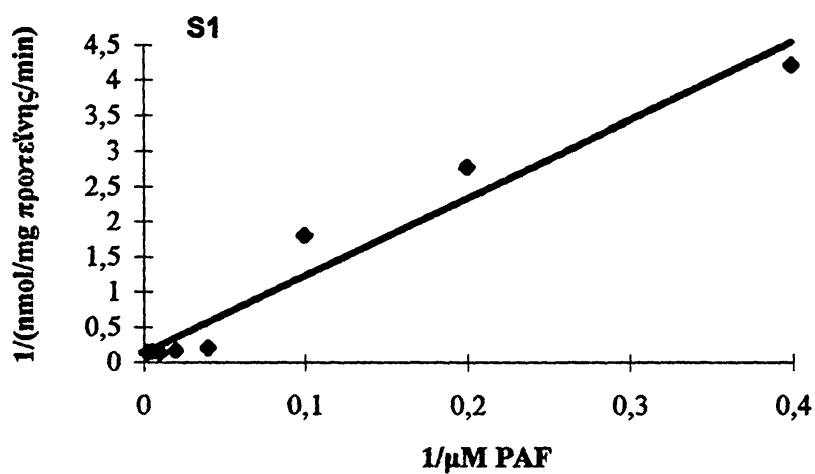
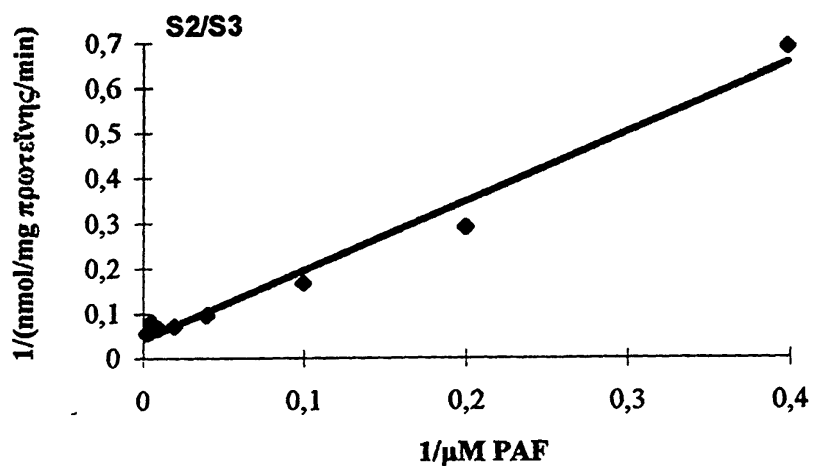
Στη συνέχεια εξετάστηκε κατά πόσο το μήκος της apo (a) μπορεί να επηρεάζει την ενεργότητα του ενζύμου που υπάρχει στην Lp(a). Για το λόγο αυτό μελετήθηκε η ενεργότητα της PAF-AH σε διάφορες ισομορφές της Lp(a). Έτσι προσδιορίστηκαν οι κινητικές σταθερές και η ειδική ενεργότητα της PAF-AH σε ισομορφές Lp(a) F, S1, S2 και S2/S3 που απομονώθηκαν από ανεξάρτητους δότες.

Όπως φαίνεται και στον πίνακα 14 υπάρχει μια αντιστρόφως ανάλογη σχέση μεταξύ της ενεργότητας του ενζύμου και του μεγέθους της apo(a) που χαρακτηρίζει άλλωστε και την ισομορφή. Οι κινητικές σταθερές K_m και V_{max} της PAF-AH μειώνονται όσο το μέγεθος της apo(a) αυξάνει. Έτσι στην ισομορφή F (μικρή αλυσίδα της apo(a)) η K_m είναι 117 ± 9 $\mu\text{mol/L}$ και η V_{max} 95 ± 5 nmol/mg πρωτεΐνη/min ενώ στην ισομορφή S2/S3 (μεγάλη αλυσίδα apo(a)) η K_m είναι 36 ± 9 $\mu\text{mol/L}$ και η V_{max} 25 ± 5 nmol/mg πρωτεΐνη/min. (Σχήμα 34,35A, 35B,35Γ)





Σχήμα 34. Κινητική μελέτη της ενεργότητας της PAF-AH σε διάφορες ισομορφές της apo (a). ...
 Η ενεργότητα μετρήθηκε όπως περιγράφεται στη μεθοδολογία με διάφορες συγκεντρώσεις [^3H]-PAF.
 Η καμπύλη είναι αντιπροσωπευτικό παράδειγμα από 3 παρασκευές Lp(a) εις διπλούν.



Σχήμα 35. Τυπικές αντιπροσωπευτικές κινητικές κατά Lineweaver-Burk διαφορετικών ισομορφών της $Lp(\alpha)$



Πίνακας 14. Ειδική ενεργότητα και κινητικές σταθερές της PAF-AH που υπάρχει στις διάφορες ισομορφές της Lp(a)

Ισομορφή Lp(a)	Km $\mu\text{mol/L}$	V _{max} nmol/mg πρωτεΐνης/min	Ειδική ενεργότητα nmol/mg λιποπρωτεϊνικής μάζας/min	Ενεργότητα PAF-AH % της ολικής ενεργότητας πλάσματος
F	117±9 ^a	94±5 ^a	14.0±1.2 (9.5±1.4) ^{a,b}	29-39
S1	98±8	85±3	11.0±0.9 (9.9±0.7)	31-38
S2	50±6	38±4	7.1±0.6 (6.5±0.4)	22-35
S2/S3	36±9	25±5	4.8±0.5 (3.2±0.4)	10-18

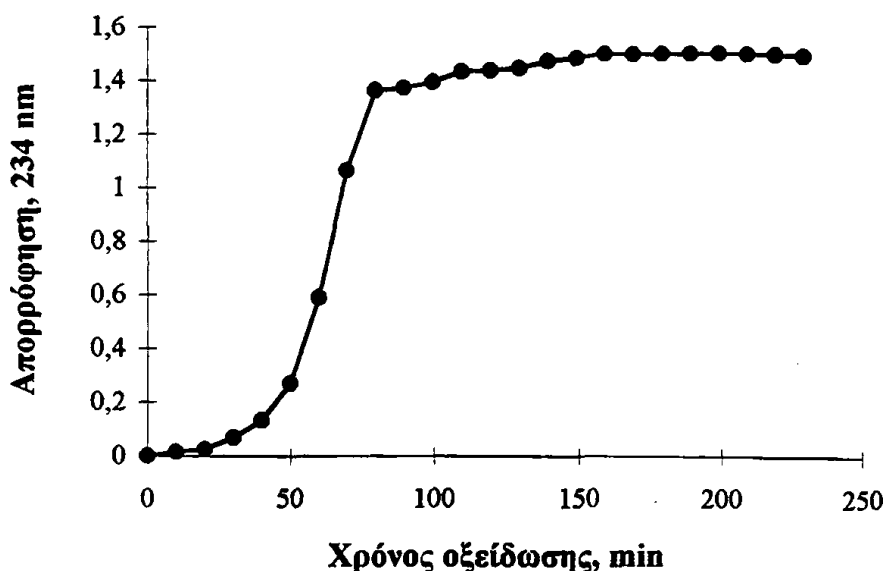
Η ανάλυση των ισομορφών της apo(a) έγινε με ηλεκτροφόρηση αгарόζης 1,5% παρουσία SDS. Στην συνέχεια έγινε ανοσοδέσμευση και οι ζώνες εμφανίστηκαν με χημιοφωταύγεια. Η ενεργότητα της PAF-AH προσδιορίστηκε με την μέθοδο ζηματοποίησης με TCA. Οι τιμές Km και V_{max} υπολογίστηκαν με βάση την εξίσωση Lineweaver-Burk. Η ολική ενεργότητα του πλάσματος προσδιορίστηκε αφορίζοντας τις επιμέρους ενεργότητες των 28 κλάσμάτων της υπερφωσφοκέντρωσης και κυμαίνεται μεταξύ 19 nmol/ml/min - 33 nmol/ml πλάσμα/min. Οι τιμές εκπροσωπούν την μέση τιμή ± S.D από 3 πειράματα εις διπλούν. Οι τιμές στις παρενθέσεις εκφράζουν την ειδική ενεργότητα σε nmol/ml πλάσμα/min. Στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ F και S1, S1 και S2, S2 και S2/S3. P < 0.05

Οι κινητικές σταθερές των άλλων ισομορφών με ενδιάμεσου μεγέθους αλυσίδα όπως η S1 και η S2 κυμαίνονται μεταξύ αυτών της F και S2/S3. Το ίδιο φαινόμενο της αντιστρόφου ανάλογης σχέσης μεταξύ της ενεργότητας της PAF-AH και της ισομορφής της Lp(a) χαρακτηρίζει και την ειδική ενεργότητα του ενζύμου είτε αυτή εκφραστεί ανά mg λιποπρωτεϊνικής μάζας είτε ανά ml πλάσματος. Η ενεργότητα της PAF-AH στην Lp(a) εκφράστηκε και ως το % ποσοστό της συνολικής ενεργότητας του πλάσματος. Η τιμή αυτή κυμαίνεται από 10-39% της συνολικής ενεργότητας και εξαρτάται από τη συγκέντρωση της Lp(a) στο πλάσμα.

Η ενεργότητα της PAF-ακετυλοϋδρολάσης κατά την οξείδωση της Lp(a)

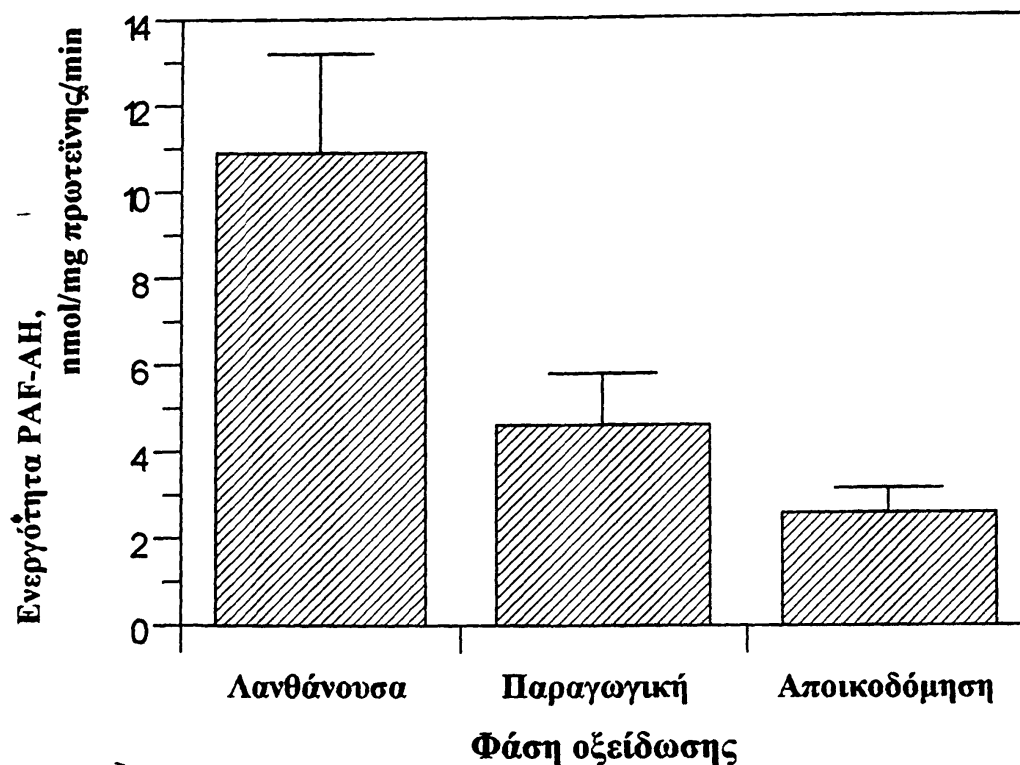
Από τα μέχρι τώρα πειράματα οξείδωσης της LDL καθώς και των υποκλασμάτων της, γνωρίζαμε ότι η ενεργότητα της PAF-AH μειώνεται κατά την οξείδωση. Μελετήσαμε λοιπόν στη συνέχεια τη συμπεριφορά του ενζύμου και κατά την οξείδωση της Lp(a). Η Lp(a) απομονώθηκε από πλάσμα διαφόρων ισομορφών και οξειδώθηκε παρουσία 16μM Cu^{2+} , όπως περιγράφεται στη μεθοδολογία. Η παρακολούθηση της οξείδωσης έγινε στα 234nm και η σιγμοειδής καμπύλη της Lp(a) φαίνεται στο σχήμα 36. Ο λανθάνων χρόνος οξείδωσης της Lp(a) είναι 69 ± 23 min, ο ρυθμός παραγωγής διενίων 5.0 ± 1.3 nmol/mg πρωτεΐνης /min και τα ολικά παραγώμενα διένια είναι 256 ± 52 nmol/mg πρωτεΐνης. Η τιμή REM στο τέλος της παραγωγικής φάσης είναι 1.19 ± 0.01 ενώ στο τέλος της φάσης αποικοδόμησης (4h από την έναρξη της οξείδωσης) είναι 1.35 ± 0.05 .





Σχήμα 36. Αντιπροσωπευτική καμπύλη οξείδωσης της Lp(a). Η οξείδωση πραγματοποιήθηκε στους 37°C με επώαση εναωρήματος Lp(a) 180 μg πρωτεΐνης/ml PBS με ιόντα Cu^{2+} τελικής συγκέντρωσης 16 μM . Η κινητική μελέτη της οξείδωσης έγινε με καταγραφή της απορρόφησης των συζυγών διπλών δεσμών στα 234 nm κάθε 10 min για 4h όπως περιγράφεται στη μεθοδολογία.

Όπως συμβαίνει και με την LDL και όπως φαίνεται στο σχήμα 37, η ενεργότητα της PAF-AH κατά την οξείδωση της Lp(a) μειώνεται, από 10.9 ± 2.30 nmol/mg πρωτεΐνης/min σε 4.60 nmol/mg πρωτεΐνης/min στο τέλος της παραγωγικής φάσης ($P < 0.001$) και σε 2.57 ± 0.56 nmol/mg πρωτεΐνης/min στο τέλος της φάσης αποικοδόμησης ($P < 0.001$ $n=7$). Η ενεργότητα του ενζύμου δεν επηρεάζεται από τα ιόντα Cu^{2+} (10.5 ± 2.90 nmol/mg πρωτεΐνης/min). Επίσης στο τέλος της παραγωγικής φάσης προσδιορίστηκε η K_m του ενζύμου η οποία παραμένει πρακτικά αμετάβλητη ($K_m = 61.4 \pm 7.4$ $\mu\text{mol/L}$) και η V_{max} , η οποία μειώνεται δραστικά από 58.6 ± 7.8 nmol/mg πρωτεΐνης/min την οξείδωση σε 38.2 ± 8.7 nmol/mg πρωτεΐνης/min (τέλος παραγωγικής φάσης), $P < 0.03$, $n=3$.

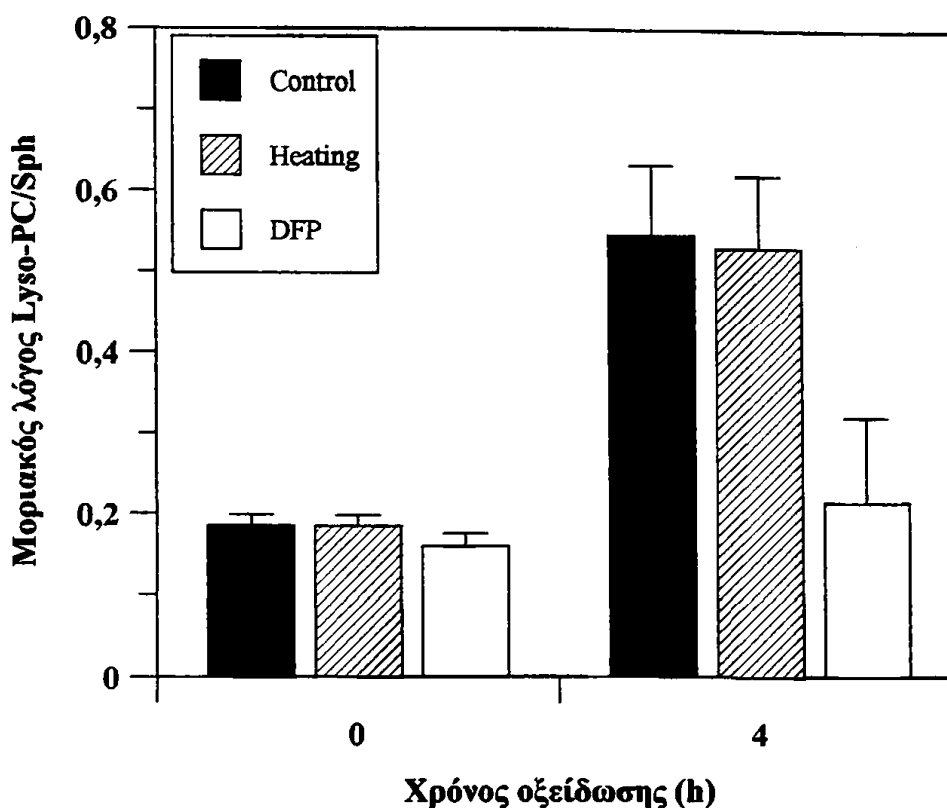


Σχήμα 37. Πτώση της ενεργότητας της PAF-AH κατά την οξείδωση της Lp(a). Η οξείδωση έγινε παρουσία 16μM Cu^{2+} όπως περιγράφεται στη μεθοδολογία. Η ενεργότητα της PAF-AH μετρήθηκε πριν την οξείδωση στο τέλος της παραγωγικής φάσης και στο τέλος της φάσης αποικοδόμησης, 4h από την έναρξη της οξείδωσης. Οι τιμές εκπροσωπούν την μέση τιμή \pm S.D από 7 πειράματα εις διπλούν, $P < 0.001$.

Παραγωγή Lyso-PC κατά την οξείδωση της PAF-AH

Γνωρίζοντας ότι η PAF-AH παίζει σημαντικό ρόλο στην υδρόλυση της PC που λαμβάνει χώρα κατά την οξείδωση της LDL, μετρήθηκε η παραγωγή Lyso-PC πριν και μετά την οξείδωση της Lp(a). Μια που η Shp παραμένει αμετάβλητη κατά την οξείδωση, η Lyso-PC εκφράστηκε ως μοριακός λόγος Lyso-PC / Shp. Στο τέλος της οξείδωσης ο μοριακός λόγος Lyso-PC / Shp είναι (0.55 ± 0.09) μεγαλύτερος από αυτόν πριν την οξείδωση (0.19 ± 0.01), $P < 0.01$ $n=7$. Μελέτη της υδρόλυσης της PC από την PAF-AH, μετά από θέρμανση της Lp(a) για 1h στους 60°C πριν την οξείδωση (αναστολή LCAT ενεργότητας) δεν επηρέασε την τιμή του μοριακού λόγου (Lyso / Shp πριν την οξείδωση μετά από θέρμανση στους 60°C για 1h = 0.19 ± 0.01 και μετά από θέρμανση στους 60°C για 1h και οξείδωση: 0.53 ± 0.09 , $P < 0.001$ $n=3$). Αντιθέτως κατεργασία της Lp(a) με τον αναστολέα των σερινοεστερασών DFP πριν την οξείδωση αναστέλλει πλήρως την παραγωγή της Lyso-PC (μοριακός λόγος

Lyso / Shp μετά την οξείδωση: 0.22 ± 0.10 σε σχέση με την τιμή 0.55 ± 0.09 της Lp(a) που δεν κατεργάστηκε με DFP, $P < 0.001$, $n=3$), σχήμα 38.



Σχήμα 38. Μοριακός λόγος Lyso-PC / Shp πριν και μετά την οξείδωση της Lp(a). Χρησιμοποιήθηκε Lp(a) χωρίς επώαση (τυφλό), Lp(a) που έχει επωαστεί για 1h στους 60°C και Lp(a) που έχει επωαστεί με 20mM DFP στους 37°C για 30 min. Η οξείδωση έγινε παρουσία 16μM Cu²⁺ όπως περιγράφεται στη μεθοδολογία. Η Lyso-PC και η Shp ποσοτικοποιήθηκαν με προσδιορισμό φωσφόρου. Οι τιμές εκπροσωπούν την μέση τιμή ± τη τυπική απόκλιση από 3 πειράματα εις διπλούν

Επίσης προσδιορίστηκαν και όλες οι τιμές των φωσφολιπιδίων πριν και μετά την οξείδωση της Lp(a), όπως περιγράφονται στον πίνακα 15

Πίνακας 15. Τιμές των φωσφολιπιδίων της Lp(a) πριν και μετά την οξείδωσή της.

Φωσφολιπίδιο	0h, μg/mg πρωτεΐνης	4h, μg/mg πρωτεΐνης
PC	9.6±2.1	5.6±1.6*
Shp	5.1±1.1	5.2±1.4
Lyso-PC	1.1±0.79	2.9±0.9*
PE	1.3±0.9	1.3±1.1

* $P < 0.05$ μεταξύ 0h και 4h



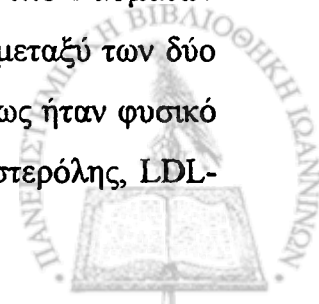
Κεφάλαιο 8

ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑ ΡΑΦ-ΑΗ ΣΤΗΝ ΟΙΚΟΓΕΝΗ ΥΠΕΡΧΟΛΗΣΤΕΡΟΛΑΙΜΙΑ

Τα αποτελέσματά από την όλη παραπάνω βασική βιοχημική ερευνητική προσπάθεια θελήσαμε στη συνέχεια να δούμε αν μπορούν να εφαρμοστούν στην κλινική πράξη. Για το λόγο αυτό επιλέξαμε ετεροζυγώτες ασθενείς με οικογενή υπερχοληστερολαιμία (FH), οι οποίοι, εκτός από αυξημένη αθηρωμάτωση που παρουσιάζουν λόγω των μεγάλων επιπέδων της LDL που έχουν, εμφανίζουν και μεγάλη επίπτωση στεφανιαίας νόσου.

Χαρακτηριστικά του πλυθησμού μελέτης

Στις ομάδες μελέτης συμμετείχαν 15 ασθενείς με οικογενή υπερχοληστερολαιμία και 13 νορμολιπιδαιμικά άτομα. Κανένας από τους ασθενείς δεν παρουσίαζε καρδιαγγειακά προβλήματα, ενώ η διάγνωση της υπερχοληστερολαιμίας έγινε σύμφωνα με τα υπάρχοντα κριτήρια. Οι νορμολιπιδαιμικοί εθελοντές δεν είχαν ιστορικό υπερχοληστερολαιμίας ή στεφανιαίας νόσου. Κανένα από τα άτομα που χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη δεν ήταν καπνιστής. Επίσης κανείς δεν έκανε χρήση υπολιπιδαιμικών φαρμάκων ή άλλων φαρμάκων που να επηρεάζουν το μεταβολισμό των λιπιδίων. Επίσης κανένας δεν ακολουθούσε ορμονική θεραπεία. Τα άτομα που συμμετείχαν στη μελέτη δεν είχαν κλινικές ή βιοχημικές ενδείξεις υπέρτασης, σακχαρώδη διαβήτη, δυσλειτουργίας του θυροειδή, ηπατικής ή νεφρικής νόσου. Άτομα τα οποία έπαιρναν συμπληρώματα βιταμινών, έπιναν παραπάνω από δυο αλκοολικά ποτά ημερησίως ή είχαν επίπεδα Lp(a) > 8 mg/dl πλάσματος αποκλείστηκαν από τη μελέτη. Επίσης σε όλα τα άτομα που συμμετείχαν στη μελέτη ζητήθηκε να ακολουθήσουν δίαιτα μικρής περιεκτικότητας σε χοληστερόλη (< 200 mg / μέρα) και χαμηλής περιεκτικότητας σε λιπαρά (<30% των συνολικά προσλαμβανόμενων θερμίδων) ώστε να αποφευχθούν πιθανές επιδράσεις της διατροφής στην οξειδωτική τροποποίηση των υποκλασμάτων της LDL. Όπως φαίνεται και στον πίνακα 16 δεν υπήρχαν διαφορές μεταξύ των δύο ομάδων στην ηλικία, στον δείκτη μάζας σώματος και στο φύλλο. Όπως ήταν φυσικό η ομάδα των ασθενών με FH είχε μεγαλύτερα επίπεδα ολικής χοληστερόλης, LDL-



χοληστερόλης, apo B καθώς και λόγο LDL-χοληστερόλης /HDL- χοληστερόλης από τα αντίστοιχα των νορμολιπιδαιμικών ($P < 0.001$). Αντιθέτως τα επίπεδα της HDL-χοληστερόλης, της apo A-I και των τριγλυκεριδίων του ορού δεν διέφεραν μεταξύ των δύο ομάδων.

Πίνακας 16. Χαρακτηριστικά των ετεροζυγωτών ασθενών με FH και των νορμολιπιδαιμικών ατόμων.

Παράμετρος	Νορμολιπιδαιμικοί n=13	FH ετεροζυγώτες n=15	P
Φύλλο (Άνδρες/γυναίκες)	10/3	9/4	Δ.Π
Ηλικία, χρόνια	30±16	35±22	Δ.Π
Δείκτης μάζας σώματος, Kg/m ²	22±4.5	23±4.0	Δ.Π
Ολική χοληστερόλη, mg/ml	181±30	298±62	0.001
LDL-χοληστερόλη, mg/ml	115±21	232±56	0.001
HDL-χοληστερόλη, mg /ml	45±8	47±13	Δ.Π
LDL-C/HDL-C	3.1±1.0	4.9±1.5	0.001
Τριγλυκερίδια mg/ml	71±23	73±23	Δ.Π
Apo B, mg/μλ	107±21	210±51	0.001
Apo AI, mg/ml	148±27	148±25	Δ.Π

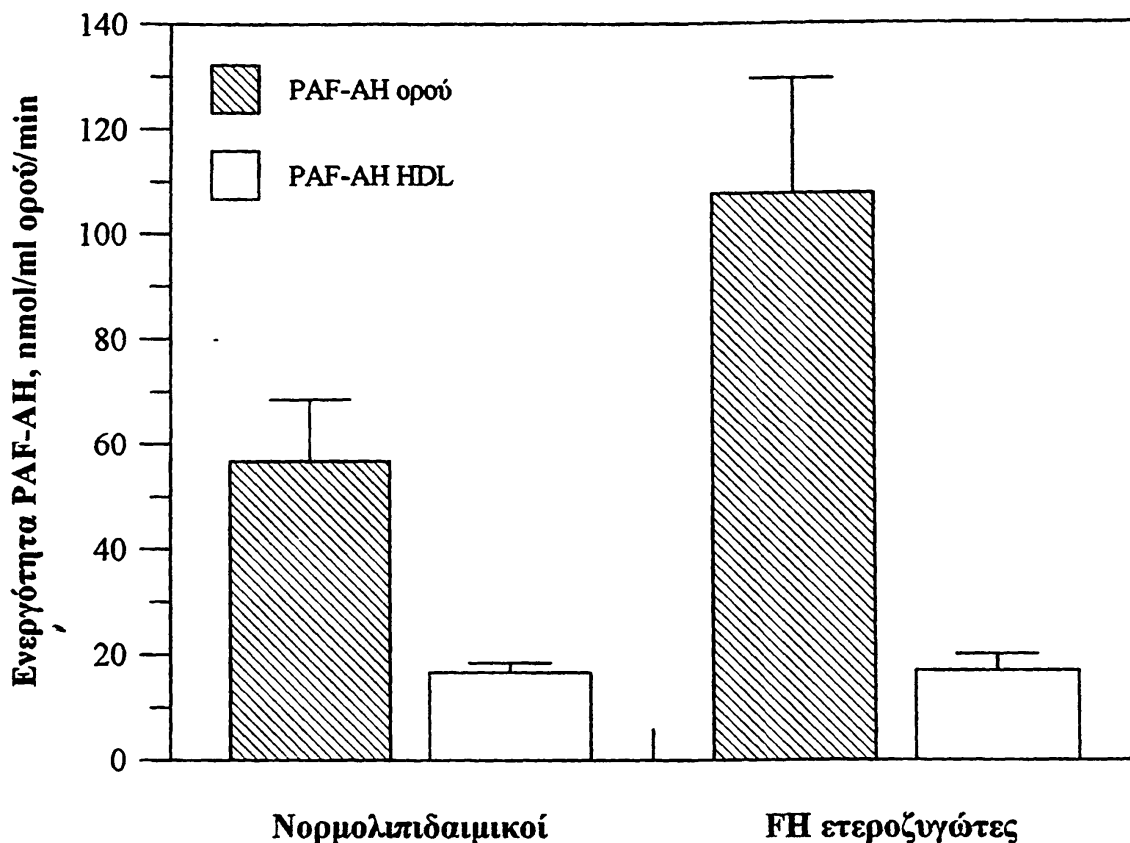
Οι τιμές εκφράζουν τη μέση τιμή ± S.D.

Ενεργότητα της PAF-ακετυλοϋδρολάσης στον ορό και την HDL των ομάδων μελέτης

Μετρήθηκαν τα επίπεδα της PAF-ακετυλοϋδρολάσης στον ορό των ετεροζυγωτών ασθενών με FH καθώς των νορμολιπιδαιμικών ατόμων. Όπως φαίνεται και στο σχήμα 39, η ολική ενεργότητα της ακετυλοϋδρολάσης στον ορό των FH είναι μεγαλύτερη (107.6 ± 21.9) από αυτή των φυσιολογικών (56.7 ± 11.9), $P < 0.0001$. Αντιθέτως η ενεργότητα της PAF-AH στην HDL (η οποία προσδιορίστηκε μετά από καταβύθιση των apo B λιποπρωτεϊνών με ιόντα μαγνησίου και θεική δεξτράνη) δεν διαφέρει μεταξύ των νορμολιπιδαιμικών και ετεροζυγωτών ασθενών με FH, όταν εκφραστεί κατά απόλυτο τιμή ($67.67 \pm 1,8$ και 16.9 ± 3.1 , αντίστοιχα).

Όταν όμως εκφραστεί ως το % ποσοστό της ολικής ενεργότητας του ορού, τότε η ομάδα των ασθενών με FH έχει μικρότερη ενεργότητα PAF-AH πάνω στην

HDL από την ομάδα των νορμολιπιδαιμικών ($13.9 \pm 6.6\%$ και $30.6 \pm 4.4\%$ αντίστοιχα, $P < 0.001$).



Σχήμα 39. Ενεργότητα PAF-AH στον ορό και την HDL νορμολιπιδαιμικών και ετεροζυγωτών ασθενών με FH. Η ενεργότητα της PAF-AH προσδιορίστηκε με τη μέθοδο ιζηματοποίησης με 20% TCA. Ως πηγή του ενζύμου χρησιμοποιήθηκαν 50 μl ορού (αραιωμένου 1:50 με PBS), ή 50 μl από το υπερκείμενο (αραιωμένο 1:25 με PBS) μετά την καταβύθιση των apo B λιποπρωτεϊνών με ιόντα μαγνησίου και θεική δεξτράνη, όπως περιγράφεται στη μεθοδολογία. Οι τιμές εκφράζουν τη μέση τιμή \pm S.D.

Απομόνωση και κατανομή των υποκλασμάτων της LDL

Τα υποκλάσματα της LDL απομονώθηκαν όπως περιγράφεται στην μεθοδολογία με υπερφυγοκέντρηση βαθμίδωσης πυκνοτήτων KBr με ρότορα σταθερής γωνίας NVT-65. Μετά την υπερφυγοκέντρηση συλλέχθηκαν 53 κλάσματα των 200 μl στα οποία προσδιορίστηκε το περιεχόμενό τους σε χοληστερόλη. Με βάση την καμπύλη πυκνοτήτων της βαθμίδωσης συλλέχθηκαν και χαρακτηρίστηκαν ως LDL-1 τα κλάσματα 9-16, $d = 1.030-1.034$ g/ml, LDL-2 τα 17-24, $d = 1.034-1.041$ g/ml και LDL-3 τα 25-37, $d = 1.041-1.048$ g/ml. Η καθαρότητα των υποκλασμάτων πιστοποιήθηκε και με ηλεκτροφόρηση αгарόζης. Σε καθένα από τα υποκλάσματα

προσδιορίστηκε η χημική του σύσταση και η λιποπρωτεϊνική του μάζα ως το άθροισμα των επί μέρους συστατικών. Η ολική μάζα της LDL των ετεροζυγωτών ασθενών με FH, όπως υπολογίζεται από το άθροισμα των μαζών των 3 υποκλασμάτων της ξεχωριστά είναι μεγαλύτερη από την αντίστοιχη των νορμολιπιδαιμικών (438 ± 88.6 mg/dl 196 ± 53.1 mg/dl, αντίστοιχα $P < 0.003$). Το επικρατέστερο υποκλάσμα της LDL των φυσιολογικών ήταν το LDL-2 με μάζα 94 ± 23 mg/dl πλάσματος, ενώ οι συγκεντρώσεις του LDL-1 και του LDL-3 ήταν αντίστοιχα 31 ± 17 mg/dl πλάσματος και 72 ± 36 mg/dl πλάσματος. Το LDL-2 ήταν επίσης και το κυρίαρχο υποκλάσμα της LDL των ετεροζυγωτών ασθενών με FH. Η συγκέντρωσή του στο πλάσμα ήταν 226 ± 33.2 mg/dl, ενώ οι συγκεντρώσεις του LDL-1 και του LDL-3 ήταν αντίστοιχα 81 ± 28 mg/dl και 132 ± 33.2 mg/dl πλάσματος. Η συγκέντρωση κάθε υποκλάσματος της LDL των ετεροζυγωτών ασθενών με FH, ήταν μεγαλύτερη από την αντίστοιχη συγκέντρωση των υποκλασμάτων της LDL των νορμολιπιδαιμικών ατόμων, $P < 0.05$.

Μελέτη της οξειδωτικής τροποποίησης των LDL υποκλασμάτων

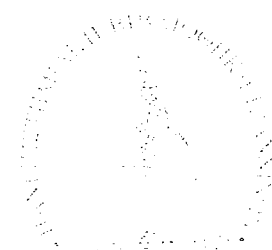
Η μελέτη της οξείδωσης των υποκλασμάτων της LDL των δυο ομάδων έγινε με επώαση των υποκλασμάτων με ιόντα Cu^{2+} και συνεχή παρακολούθηση της απορρόφησης στα 234 nm όπως περιγράφεται στη μεθοδολογία. Όπως φαίνεται και στον πίνακα 17, το υποκλάσμα LDL-1 και των δύο ομάδων παρουσίασε την μικρότερη οξειδωτική τροποποίηση, αφού είχε τον μεγαλύτερο λανθάνοντα χρόνο, το μικρότερο ρυθμό παραγωγής διενίων και το μικρότερο ποσό συνολικών παραγώμενων διενίων. Επίσης οι τιμές R.E.M του LDL-1 και των δύο ομάδων ήταν οι μικρότερες συγκρινόμενες με αυτές των άλλων υποκλασμάτων. Το πιο ευένδωτο υποκλάσμα και των δυο ομάδων στην οξείδωση ήταν το LDL-3. Αξίζει να σημειωθεί πως δεν υπήρχαν διαφορές στην οξείδωση των αντίστοιχων υποκλασμάτων μεταξύ των δύο ομάδων.



Πίνακας 17. Παράμετροι οξειδωσης των υποκλάσμάτων της LDL νορμολιπιδαιμικών ατόμων και ετεροζυγωτών ασθενών με FH.

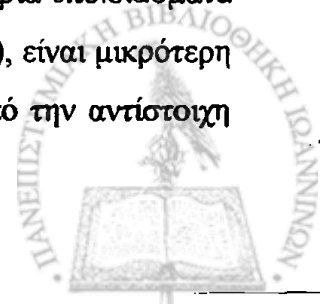
	Νορμολιπιδαιμικοί			FH ετεροζυγώτες		
	LDL-1	LDL-2	LDL-3	LDL-1	LDL-2	LDL-3
Λανθάνων χρόνος, min	71.2±12.6	53.1±4.7**	49.4±5.8***	62.6±14.3	52.1±10.6	47.9±10.7**
Ρυθμός παραγωγής διενίων, nmol/mg πρωτεΐνης /min	4.2±0.5	4.9±0.7**	5.4±0.3***	4.6±0.4	5.1±0.5*	5.4±0.4**
Σύνολο παραγόμενων διενίων, nmol/mg πρωτεΐνης	281.7±17.1	305.1±18.6*	316.8±20.9**	297.7±8.5	319.3±24.6*	325.6±17.4**
R.E.M	2.64±0.27	3.09±0.32	3.18±0.26***	2.71±0.46	3.30±0.36*	3.47±0.27**

Η οξείδωση πραγματοποιήθηκε στους 37°C με επώαση εναιωρήματος LDL (200μg πρωτεΐνης κάθε υποκλάσματος / ml PBS), με ιόντα Cu^{2+} τελικής συγκέντρωσης 16μM. Η κινητική μελέτη των οξειδώσεων έγινε με καταγραφή της απορρόφησης των συζυγών διπλών δεσμών στα 234 nm κάθε 10 min, για 3h όπως περιγράφεται στη μεθοδολογία. Οι τιμές εκφράζουν τη μέση τιμή ± S.D. Όλα τα P εκφράζουν διαφορές μεταξύ των παραμέτρων της ίδιας ομάδας και αντιστοιχούν σε συγκρίσεις με το υποκλάσμα LDL-1.



Ενεργότητα PAF-AH στα υποκλάσματα της LDL

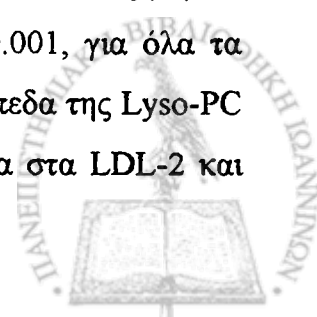
Η ενεργότητα της PAF-AH προσδιορίστηκε στα 3 υποκλάσματα της LDL των δυο ομάδων πριν και μετά την οξειδωτική τους τροποποίηση *in vitro*. Η ολική ενεργότητα της PAF-AH στα τρία υποκλάσματα της LDL των νορμολιπιδαιμικών ήταν μικρότερη από την αντίστοιχη ενεργότητα των ετεροζυγωτών FH, (57.9 ± 9.5 nmol/mg πρωτεΐνης/min και 90.1 ± 12.0 nmol/mg πρωτεΐνης/min αντίστοιχα, $P < 0.0001$). Επιβεβαιώνοντας τα μέχρι τώρα αποτελέσματά μας και όπως φαίνεται και στο σχήμα 40A-B, η ενεργότητα της PAF-AH κατανέμεται στα πυκνά υποκλάσματα της LDL και των δύο ομάδων. Έτσι το υποκλάσμα LDL-3 των νορμολιπιδαιμικών περιέχει τη μεγαλύτερη ενεργότητα της PAF-AH (33.08 ± 4.78 nmol/mg πρωτεΐνης/min), ποσοστό 58.3 ± 8.5 % της ολικής ενεργότητας του ενζύμου που υπάρχει στην LDL, συγκρινόμενη με την ενεργότητα που υπάρχει στο LDL-2 (18.56 ± 5.28 nmol/mg πρωτεΐνης/min), ποσοστό 32.7 ± 9.3 % $P < 0.0001$ και την ενεργότητα που υπάρχει στο LDL-1 (5.11 ± 1.53 nmol/mg πρωτεΐνης/min), ποσοστό 9.0 ± 2.6 %, $P < 0.0001$. Το ίδιο φαινόμενο παρατηρείται και στην ομάδα των ετεροζυγωτών FH όπου το υποκλάσμα LDL-3 περιέχει τη μεγαλύτερη ενεργότητα της PAF-AH (53.39 ± 11.52 nmol/mg πρωτεΐνης/min), ποσοστό 60.7 ± 13.1 % της ολικής ενεργότητας του ενζύμου που υπάρχει στην LDL, συγκρινόμενη με την ενεργότητα που υπάρχει στο LDL-2 (26.84 ± 10.37 nmol/mg πρωτεΐνης/min), ποσοστό 30.5 ± 11.8 % $P < 0.0001$ και την ενεργότητα που υπάρχει στο LDL-1 (7.80 ± 2.62 nmol/mg πρωτεΐνης/min), ποσοστό 8.9 ± 3.0 %, $P < 0.0001$. Η ενεργότητα του ενζύμου σε καθένα από τα υποκλάσματα της LDL των ετεροζυγωτών ήταν μεγαλύτερη από την αντίστοιχη των νορμολιπιδαιμικών ατόμων, $P < 0.02$ για το LDL-1, $P < 0.03$ για το LDL-2 $P < 0.0001$ για το LDL-3, σχήμα 40A. Το εύρημα της ετερογενούς κατανομής της ενεργότητας της PAF-AH στα υποκλάσματα της LDL επιβεβαιώθηκε για μια ακόμη φορά και μάλιστα και στην ομάδα των ασθενών που χρησιμοποιήθηκε. Η ενεργότητα της PAF-AH κατά την διάρκεια της οξείδωσης μειώνεται και το γεγονός αυτό παρατηρήθηκε σε κάθε υποκλάσμα της LDL και των δυο ομάδων. Η ολική ενεργότητα της PAF-AH που παραμένει στα τρία υποκλάσματα της LDL, 3h μετά την έναρξη της οξείδωσης (φάση αποικοδόμησης), είναι μικρότερη στους νορμολιπιδαιμικούς (28.8 ± 8.6 nmol/mg πρωτεΐνης/min) από την αντίστοιχη



των ετεροζυγωτών ασθενών με FH (40.8 ± 9.2 nmol/mg πρωτεΐνης/min), $P < 0.05$. Όπως φαίνεται και στο σχήμα 40B η ενεργότητα του ενζύμου που παρέμεινε στο LDL-1 υποκλάσμα των νορμολιπιδαιμικών ήταν 2.7 ± 0.7 nmol/mg πρωτεΐνης/min, (ποσοστό μείωσης 46.9%, $P < 0.001$), ενώ στο LDL-1 των ασθενών με FH ήταν 2.1 ± 0.9 nmol/mg πρωτεΐνης/min, (ποσοστό μείωσης 73.3%, $P < 0.0001$). Ομοίως η ενεργότητα του ενζύμου που παρέμεινε στο LDL-2 υποκλάσμα των νορμολιπιδαιμικών ήταν 7.4 ± 4.1 nmol/mg πρωτεΐνης/min, (ποσοστό μείωσης 60.2%, $P < 0.0001$), ενώ στο LDL-2 των ασθενών με FH ήταν 8.7 ± 6.8 nmol/mg πρωτεΐνης/min, (ποσοστό μείωσης 67.5%, $P < 0.0001$). Τέλος η ενεργότητα της PAF-AH που παρέμεινε στο LDL-3 υποκλάσμα των νορμολιπιδαιμικών ήταν 14.8 ± 6.4 nmol/mg πρωτεΐνης/min, (ποσοστό μείωσης 55.3%, $P < 0.001$), ενώ στο LDL-3 των ασθενών με FH ήταν 26.7 ± 14.2 nmol/mg πρωτεΐνης/min, (ποσοστό μείωσης 50.1%, $P < 0.0001$). Από τα αποτελέσματα αυτά φαίνεται πως στο τέλος της οξειδωτικής τροποποίησης των υποκλασμάτων της LDL (3h από την έναρξη της οξείδωσης) η ενεργότητα της PAF-AH που παραμένει στο LDL-3 των ετεροζυγωτών ασθενών με FH είναι μεγαλύτερη από αυτή των νορμολιπιδαιμικών, $P < 0.03$, σχήμα 40B.

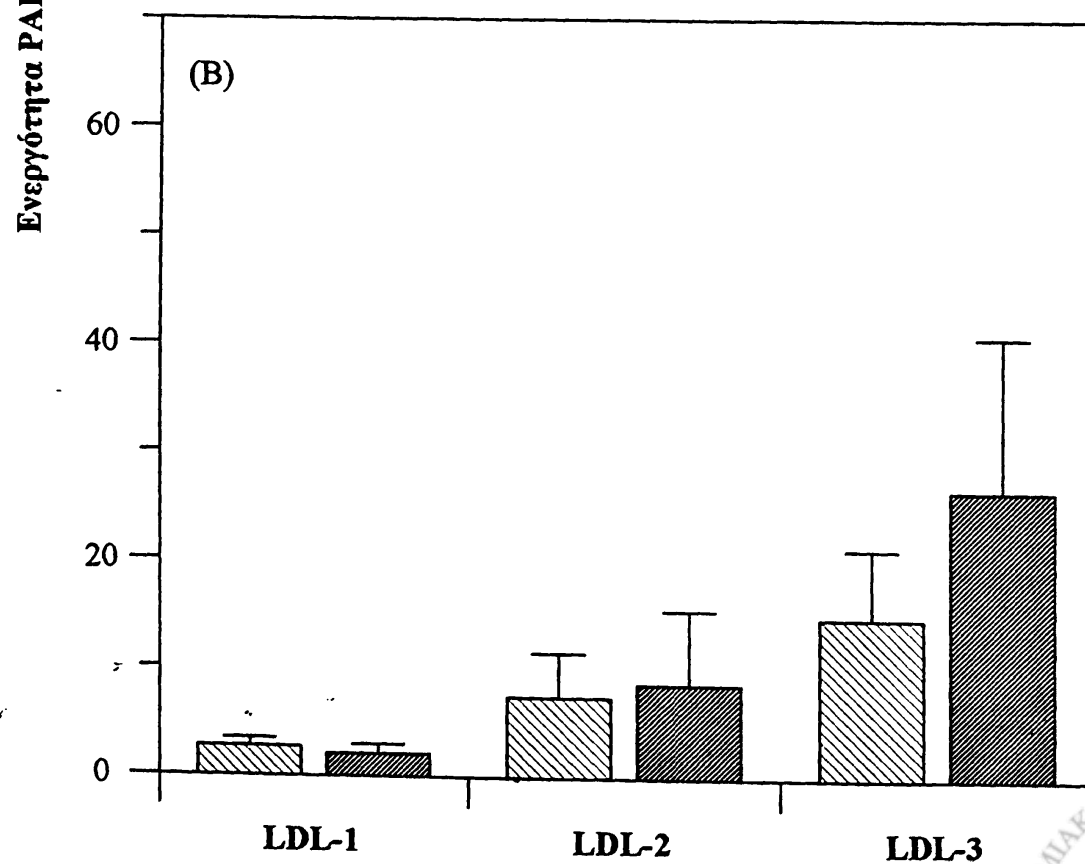
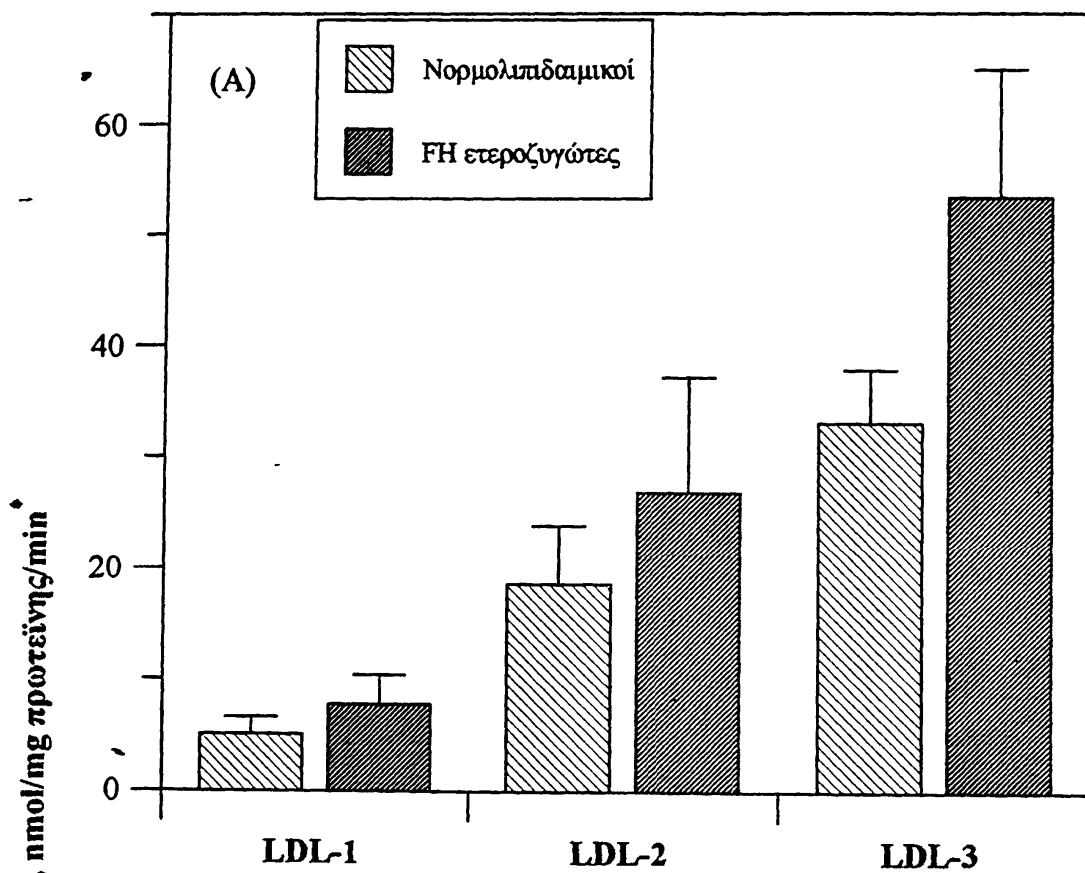
Παραγωγή Lyso-PC κατά την οξείδωση των υποκλασμάτων της LDL

Για να διερευνήσουμε αν η μεγαλύτερη ενεργότητα της PAF-AH στα υποκλάσματα των ετεροζυγωτών FH συνοδεύεται και από μεγαλύτερη παραγωγή Lyso-PC κατά τη διάρκεια της οξείδωσης συγκρινόμενη με την αντίστοιχη των φυσιολογικών, μετρήσαμε τα επίπεδα της Lyso-PC σε κάθε υποκλάσμα της LDL των δυο ομάδων, πριν και μετά το τέλος της οξείδωσης (3h από την έναρξη της οξείδωσης). Όπως φαίνεται και στον πίνακα 18, τα επίπεδα της Lyso-PC, πριν την οξείδωση, εκφραζόμενα είτε σε nmol/mg πρωτεΐνης LDL, είτε ως μοριακός λόγος Lyso-PC/Sph δεν διέφεραν μεταξύ των 3 υποκλασμάτων κάθε ομάδος αλλά ούτε και μεταξύ των δυο ομάδων. Στο τέλος όμως της οξείδωσης (3h από την έναρξη της), τα επίπεδα της Lyso-PC σε όλα τα υποκλάσματα και των δυο ομάδων αυξήθηκαν σημαντικά συγκρινόμενα με τα επίπεδα πριν την οξείδωση ($P < 0.001$, για όλα τα υποκλάσματα και στις δυο ομάδες). Επιπλέον σε κάθε ομάδα τα επίπεδα της Lyso-PC στο υποκλάσμα LDL-3 ήταν μεγαλύτερα συγκριτικά με τα επίπεδα στα LDL-2 και



LDL-1 ($P < 0.05$, για όλες τις συγκρίσεις μεταξύ των υποκλασμάτων). Είναι σημαντικό να αναφέρουμε πως τα επίπεδα της Lyso-PC στο τέλος της οξείδωσης κάθε LDL υποκλάσματος των ετεροζυγωτών ασθενών με FH ήταν μεγαλύτερα, από τα αντίστοιχα των φυσιολογικών, ($P < 0.001$ για το LDL-1, $P < 0.01$ για το LDL-2 και $P < 0.003$ για το LDL-3), πίνακας 18. Επίσης αξίζει να σημειωθεί ότι τα επίπεδα της PC πριν την οξείδωση, εκφραζόμενα σε $\mu\text{mol}/\text{mg}$ πρωτεΐνης LDL, δεν διέφεραν μεταξύ των υποκλασμάτων της ίδιας ομάδας, ούτε και μεταξύ των δυο ομάδων. Επιπλέον, όταν η ενεργότητα της PAF-AH εκφράστηκε σε $\mu\text{mol}/\text{mg PC}/\text{min}$, διατήρησε την ετερογενή κατανομή της μεταξύ των υποκλασμάτων (μεγαλύτερη στο LDL-3 συγκριτικά με το LDL-2 και το LDL-1, $P < 0.02$ και $P < 0.01$, αντίστοιχα). Επιπρόσθετα όπως φαίνεται και στον πίνακα 18, η ενεργότητα της PAF-AH (σε $\mu\text{mol}/\text{mgPC}$) ήταν μεγαλύτερη σε κάθε υποκλάσμα των ασθενών με FH από την αντίστοιχη των νορμολιπιδαιμικών, $P < 0.01$.





Σχήμα 40. *Ενεργότητα PAF-AH στα υποκλάσματα νορμολιπιδαιμικών και ετεροζυγωτών FH.*
Η ενεργότητα της PAF-AH προσδιορίστηκε με τη μέθοδο καταβύθισης με 20% TCA, χρησιμοποιώντας ως πηγή του ενζύμου 40 $\mu\text{g/ml}$ πρωτεΐνης σε PBS κάθε υποκλάσματος της LDL. Οι τιμές εκφράζουν τη μέση \pm S.D. (A) Ενεργότητα PAF-AH πριν την οξείδωση των υποκλασμάτων, (B) ενεργότητα PAF-AH 3h μετά την έναρξη της οξείδωσης.



Πίνακας 18. Επίπεδα της PC και ενεργότητα PAF-AH πριν την οξείδωση, καθώς και τα επίπεδα της Lyso-PC πριν και 3h μετά την έναρξη της οξείδωσης, στα υποκλάσματα της LDL ετεροζυγωτών ασθενών με FH και νορμολιπιδαιμικών ατόμων.

	Νορμολιπιδαιμικοί					
	LDL-1	LDL-2	LDL-3	LDL-1	LDL-2	LDL-3
PC, 0h *	550±30	510±50	460±60	420±90	490±130	440±230
PAF-AH ενεργότητα στις 0 h (nmol/mg πρωτεΐνηςLDL)	265±76	1111±171	2312±336	623±135	2236±229	5221±322
Lyso-PC, 0h *	33±4	33±7	36±10	36±14	36±16	33±11
(nmol/mg πρωτεΐνηςLDL)	(0.15±0.02)	(0.15±0.03)	(0.16±0.03)	(0.15±0.03)	(0.16±0.08)	(0.16±0.05)
Lyso-PC, 3h *	70±15	86±8	94±7	93±8	108±18	114±12
(nmol/mg πρωτεΐνηςLDL)	(0.27±0.04)	(0.39±0.03)	(0.42±0.06)	(0.36±0.03)	(0.46±0.08)	(0.55±0.11)

Τα επίπεδα της φωσφατιδυλοχολίνης (PC) και της λυσοφωσφατιδυλοχολίνης (Lyso-PC), μετρήθηκαν με προσδιορισμό φωσφόρου μετά από TLC των ολικών λιπιδίων που αντιστοιχούν σε 200μg LDL πρωτεΐνης. Η ενεργότητα της PAF-AH μετρήθηκε με τη μέθοδο ζημιατοποίησης με TCA 20%, όπως περιγράφεται στη μεθοδολογία. Οι τιμές εκτροσωπών τη μέση τιμή ± S.D. Οι τιμές μέσα στην παρένθεση εκφράζουν τα επίπεδα της Lyso-PC ως μοριακό λόγο Lyso-PC/ Sph.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 9

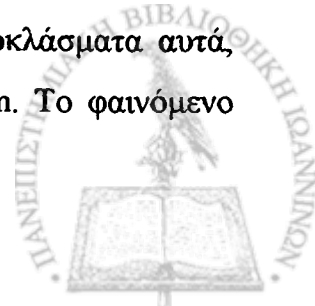
ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

ΚΑΤΑΝΟΜΗ ΤΗΣ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑΣ ΤΗΣ PAF-AH ΣΤΑ ΥΠΟΚΛΑΣΜΑΤΑ ΛΙΠΟΠΡΟΤΕΪΝΩΝ ΠΛΑΣΜΑΤΟΣ

Όπως αναφέρθηκε στην εισαγωγή, η LDL είναι ένας ετερογενής πληθυσμός σωματιδίων τα οποία διαφέρουν ως προς την πυκνότητά τους και τις φυσικοχημικές τους ιδιότητες [18]. Με τη χρήση διαφόρων υπερφυγοκεντρικών τεχνικών διαχωρίσαμε τα υποκλάσματα των λιποπρωτεϊνών πλάσματος (χωρίς ανιχνεύσιμα επίπεδα Lp(a)), και μελετήσαμε την κατανομή της PAF-AH σε αυτά. Αρχικά διαχωρίσαμε τρία υποκλάσματα της LDL και παρατηρήσαμε για πρώτη φορά πως η κατανομή της ενεργότητας της PAF-AH σε αυτά είναι ετερογενής και η μεγαλύτερη ποσότητα του ενζύμου εντοπίζεται στο μικρό και πυκνό υποκλάσμα της LDL (LDL-3). Έπειτα με τη χρήση ισοπυκνικής βαθμίδωσης πυκνοτήτων KBr-NaCl έγινε υποκλασμάτωση του πλάσματος σε 9 υποκλάσματα, στα VLDL, LDL 1-5, HDL-2, HDL-3 και VHDL [19], και μελετήθηκε η κατανομή της ενεργότητας της PAF-AH σε αυτά. Τα αποτελέσματα αυτά βρίσκονται σε απόλυτη συμφωνία με τα αποτελέσματα κατανομής της PAF-AH στα 3 υποκλάσματα της LDL περιοχής πυκνότητας από 1.030-1.048 g/ml. Επιπρόσθετα όσον αφορά την HDL αποδείξαμε για πρώτη φορά πως το μεγαλύτερο ποσοστό της ενεργότητας της PAF-AH υπάρχει σε ένα τμήμα της πυκνής HDL και πιο συγκεκριμένα στο VHDL-1 το οποίο είναι πλούσιο σε apo A-I, $d=1.156-1.179$ g/ml. Η παρατήρηση αυτή δείχνει πως ενεργότητα PAF-AH δεν έχουν μόνο οι apo B φέρουσες λιποπρωτεΐνες αλλά και οι υπόλοιπες. Γιαντό και στην αθηρολιποπρωτεΐναιμία, κατάσταση παντελούς έλλειψης της apo B, όλη η ενεργότητα της PAF-AH εντοπίζεται στη HDL [495], ενώ φυσιολογικά (απουσία Lp(a)) και σε pH 7.4 το 30% της συνολικής ενεργότητας PAF-AH του πλάσματος σχετίζεται με την HDL [482]. Η κατανομή αυτή της PAF-AH στα πυκνά υποκλάσματα των LDL και HDL δεν είναι αποτέλεσμα της υπερφυγοκεντρικής δύναμης ή της ιοντικής ισχύος

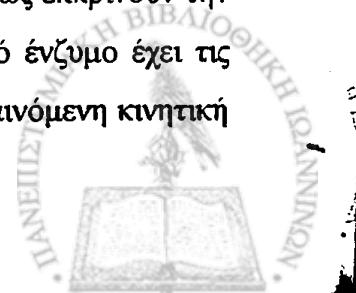
που αναπτύσσονται κατά την υπερφυγοκεντρική απομόνωσή τους, αφού το ένζυμο παραμένει σε αυτές ακόμη και όταν έχουν επωαστεί σε διάλυμα KBr ιοντικής ισχύος μεγαλύτερης από αυτή που επικρατεί κατά την υπερφυγοκέντρωση. Κατά συνέπεια λοιπόν στην αλληλεπίδραση της PAF-AH με τις λιποπρωτεΐνες δεν συμμετέχουν μόνο ηλεκτροστατικές δυνάμεις.

Για να εντοπιστεί κάποιος πιθανός λόγος της προτίμησης του ενζύμου για τα πυκνά υποκλάσματα της LDL και της HDL, μετρήθηκαν οι κινητικές σταθερές του ενζύμου, K_m και V_{max} . Οι κινητικές σταθερές της PAF-AH που βρίσκεται στην LDL-5 και στην VHDL-1 είναι πολύ μεγαλύτερες από τις σταθερές του ενζύμου που υπάρχει στις άλλες λιποπρωτεΐνες. Για τη μέτρηση των κινητικών της σταθερών η PAF-AH δεν απομονώθηκε από τις λιποπρωτεΐνες, γιατί και η υπολογιζόμενη V_{max} μπορεί να εκπροσωπεί το ποσό του ενζύμου που υπάρχει στο σωματίδιο κάθε υποκλάσματος. Επίσης η μεγάλη τιμή K_m της PAF-AH στα πυκνά υποκλάσματα δείχνει μια σαφώς μικρότερη συγγένεια του ενζύμου για το υπόστρωμα συγκριτικά με τα άλλα υποκλάσματα. Μεταξύ των LDL υποκλασμάτων το πυκνό είναι αυτό που έχει την μικρότερη συγγένεια με τον κλασσικό LDL υποδοχέα και παρουσιάζει την μεγαλύτερη οξειδωτική τροποποίηση [82,44]. Λογική ακολουθία αυτών, είναι πως η επιφάνεια του πυκνού LDL παρουσιάζει διαφορές από αυτή των άλλων υποκλασμάτων. Για να δούμε λοιπόν κατά πόσο η διαφορετική δομή και χημική σύσταση των υποκλασμάτων, επηρεάζει την φαινόμενη K_m της PAF-AH, μελετήσαμε τις κινητικές σταθερές του ενζύμου κατά την μεταφορά του από μίγμα LDL-1 και LDL-2 σε LDL-5, το οποίο είχε ανασταλμένη την ενδογενή ενεργότητα της PAF-AH. Οι κινητικές σταθερές του ενζύμου που μεταφέρθηκε στο LDL-5 ήταν αυτές των υποκλασμάτων από τα οποία προήλθε. Η διατήρηση των κινητικών σταθερών του ενζύμου από τα υποκλάσματα που προήλθε δείχνει πως δεν είναι τα δομικά χαρακτηριστικά που επηρεάζουν την τιμή K_m του ενζύμου. Αυτό συμφωνεί και με το γεγονός ότι τα VLDL+IDL και τα LDL1-4 έχουν παρεμφερείς κινητικές σταθερές παρά τις διαφορές στην χημική σύσταση και στην δομή των σωματιδίων του. Φαίνεται λοιπόν πως είτε πρόκειται για διαφορετικά ισοένζυμα της PAF-AH στα υποκλάσματα LDL-5 και VHDL είτε υπάρχει μια συσσώρευση ενζύμου στα υποκλάσματα αυτά, κάτι που επίσης δικαιολογείται από τις υψηλές τιμές V_{max} και K_m . Το φαινόμενο αυτό χρειάζεται περαιτέρω διερεύνηση.



Έχει αποδειχθεί πως η PAF-AH των διαφόρων κυτταρικών πηγών αποτελείται από διάφορες ισομορφές με διακριτά φυσικοχημικά χαρακτηριστικά μεταξύ τους [470]. Νεώτερα δεδομένα με τη χρήση PAF-AH που έχει απομονωθεί από εγκέφαλο βοδιού έδειξαν πως το ενδοκυττάριο ένζυμο υπάρχει σε 3 ισομορφές, εκ των οποίων η μια έχει διαφορετική συμπεριφορά σε $pH = 5$ από ότι οι άλλες (ισομορφές Ia Ib), [574]. Σύμφωνα με τα αποτελέσματά μας το ένζυμο που υπάρχει στα υποκλάσματα των λιποπρωτεϊνών έχει όμοια συμπεριφορά στις διάφορες βιοχημικές κατεργασίες που υποβλήθηκε. Οι κατεργασίες αυτές είχαν σκοπό να πιστοποιήσουν πως οι διαφορές στην κατανομή και στις κινητικές σταθερές του ενζύμου στα διάφορα υποκλάσματα, δεν οφείλονται σε διαφορετικές ισομορφές που να μπορούν να διακριθούν με τις κατεργασίες αυτές. Καμία σημαντική διαφορά δεν παρατηρήθηκε μεταξύ των ποικίλων λιποπρωτεϊνικών πηγών του ενζύμου όταν αυτό κατεργάστηκε με πρωτεολυτικά και αναγωγικά αντιδραστήρια όπως τρυψίνη, ιωδοξικό οξύ διθειοθρεϊτόλη. Επίσης δεν υπήρξαν διαφορές και όταν μελετήθηκε η συμπεριφορά της PAF-AH των διαφόρων λιποπρωτεϊνικών κλασμάτων σε διάφορες τιμές pH . Τα αποτελέσματά μας συμφωνούν με τα μέχρι τώρα βιβλιογραφικά δεδομένα όπου η ακετυλοϋδρολάση ανθρώπινου πλάσματος δεν φαίνεται να επηρεάζεται από την δράση της τρυψίνης και των σουλφιδρυλικών αντιδραστηρίων και η περιοχή του βέλτιστου pH της είναι η ουδέτερη [467,470,501]. Επιπλέον ο κλασικός ανταγωνιστής του PAF (CV 3988) καθώς και ο αναστολέας των σερινοεστερασών (Pefablock) αναστέλλουν πλήρως την ακετυλοϋδρολάση των πυκνών LDL και HDL υποκλασμάτων όπως επίσης και όλων των άλλων. Τα δεδομένα αυτά δείχνουν πως το ένζυμο που κατανέμεται στα LDL-5 και VHDL-1 δεν διαφέρει βιοχημικά από το ένζυμο των άλλων υποκλασμάτων.

Η κυριότερη πηγή της PAF-AH του πλάσματος είναι τα μονοκύτταρα κατά τη διαφοροποίησή τους σε μακροφάγα [463]. Θέλαμε να προσδιορίσουμε αν το ένζυμο που εκκρίνεται από τα κύτταρα αυτά έχει κάποια ιδιαίτερη προτίμηση για κάποια υποκλάσματα των apo B και apo A-I λιποπρωτεϊνών. Για το λόγο αυτό χρησιμοποιήθηκε καλλιέργεια μονοκυττάρων από ανθρώπινο περιφερικό αίμα τα οποία μετά την διαφοροποίησή τους σε μακροφάγα έχει αποδειχθεί πως εκκρίνουν την PAF-AH. Σύμφωνα με τα αποτελέσματά μας, το εκκρινόμενο αυτό ένζυμο έχει τις ίδιες βιοχημικές ιδιότητες όπως και η PAF-AH του πλάσματος. Η φαινόμενη κινητική



σταθερά της PAF-AH που εκκρίνεται από τα μονοκύτταρα είναι όμοια με αυτή της ολικής LDL ($d=1.019-1.063$). Το υπερκείμενο της καλλιέργειας των μονοκυττάρων επώαστηκε με πλάσμα, ολική LDL και ολική HDL (συμπεριλαμβανομένου και του VHDL-1) που είχαν κατεργαστεί με με Pefablock ώστε να έχουν ανασταλμένη την ενδογενή ενεργότητα της PAF-AH. Μετά την επώαση ακολούθησε υπερφυγοκέντρωση σε ισοπυκνική βαθμίδωση πυκνοτήτων, για να διαχωριστούν τα υποκλάσματα των λιποπρωτεϊνών. Σε κάθε περίπτωση η ενεργότητα της PAF-AH, εντοπίστηκε στο LDL-5, δείχνοντας ότι τα μονοκύτταρα είναι η κύρια πηγή της PAF-AH που υπάρχει στην LDL. Οι μελέτες που έχουν γίνει με την PAF-AH του πλάσματος χρησιμοποιούν το ένζυμο που απομονώνεται κυρίως από την LDL [467]. Η ενεργότητα αυτή προέρχεται από τα μονοκύτταρα και τα δικά μας ευρήματα συμφωνούν απόλυτα με τα δεδομένα αυτά.

Συνοψίζοντας λοιπόν παρατηρούμε πως η PAF-AH ανθρώπινου πλάσματος κατανέμεται κυρίως στα πυκνά υποκλάσματα των apoB-100 (LDL-5) και apo A-I (VHDL-1) λιποπρωτεϊνών και μάλιστα έχει διαφορετικές κινητικές σταθερές. Την ίδια προτίμηση για το LDL-5 δείχνει και η PAF-AH που εκκρίνεται από καλλιέργεια μονοκυττάρων. Θα πρέπει να σημειωθεί πως τα πυκνά υποκλάσματα LDL-5 και VHDL-1 μεταφέρουν και τη μεγαλύτερη ποσότητα του αναστολέα του ιστικού παράγοντα του πλασμινογόνου (Tissue factor plasminogen inhibitor TFPI), [575]. Είναι σημαντικό το ότι η κατανομή της PAF-AH και του TFPI μεταξύ των λιποπρωτεϊνικών υποκλασμάτων είναι παρεμφερής και πως και οι δύο αυτοί παράγοντες έχουν αντιθρομβωτικές ιδιότητες. Λαμβάνοντας υπόψη πως εξαιτίας του μικρού μεγέθους τους τα πυκνά υποκλάσματα διέρχονται με μεγαλύτερη ευκολία στον υπενδοθηλιακό χώρο θα μπορούσαμε να υποθέσουμε πως έτσι διευκολύνεται η μεταφορά του TFPI και της PAF-AH στις περιοχές της αθηρωματικής βλάβης [576]. Στις φυσικές τους μορφές μέσα στο αρτηριακό τοίχωμα τόσο το LDL-5 όσο και το VHDL-1 μπορούν να παίξουν ένα αντιφλεγμονώδη και αντιθρομβωτικό ρόλο. Όταν όμως αρχίσει η διαδικασία της οξειδωτικής τροποποίησης του LDL-5 τότε μειώνεται σημαντικά η ενεργότητα της PAF-AH ενώ παράλληλα προκαλείται η παραγωγή πολλών φλεγμονωδών και κυτταροτοξικών μορίων που προάγουν μέσω ποικίλων μηχανισμών την αθηρωμάτωση [168,486,577,578].



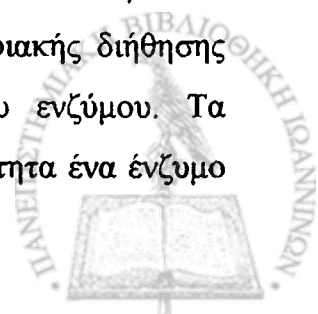
Η οξειδωτική τροποποίηση της LDL είναι το κεντρικό στάδιο στην ανάπτυξη και εξέλιξη της αθηρωμάτωσης [133,204]. Κατά την οξείδωση της LDL λαμβάνει χώρα και η υπεροξείδωση των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων των ενδογενών φωσφολιπιδίων με κυριότερο την PC [526]. Τα οξειδωμένα παράγωγα αυτών περιέχουν μικρές λιπαρές αλυσίδες εστεροποιημένες στην sn-2 θέση του γλυκερινικού σκελετού, έχουν δομή και βιολογική δράση όμοια με αυτή του PAF γιατί αποκαλούνται και PAF-like φωσφολιπίδια [474]. Η PAF-AH που υπάρχει στην LDL υδρολύει αυτά τα φωσφολιπίδια προς Lyso-PC η οποία όμως είναι επίσης ένα εξαιρετικά τοξικό και βιολογικά δραστικό μόριο. Η Lyso-PC υπάρχει στις αθηρωματικές πλάκες και είναι πιθανά υπεύθυνη για κάποιες από τις δράσεις της ox-LDL, όπως για τη χημειοταξία των μονοκυττάρων [579], για τη διαταραχή του αγγειακού τόνου του ενδοθηλίου [580] καθώς και για την παραγωγή μορίων προσκόλλησης [581]. Έτσι λοιπόν ο ρόλος της PAF-AH παραμένει διφορούμενος αφού από την μια υδρολύει τα οξειδωμένα φωσφολιπίδια, από την άλλη όμως είναι υπεύθυνη για την παραγωγή της βιολογικά δραστικής Lyso-PC. Κατά την οξείδωση της LDL η ενεργότητα της PAF-AH μειώνεται, φαινόμενο που πιθανά οφείλεται σε μείωση της ποσότητας του ενεργού ενζύμου που υπάρχει πάνω στην ox-LDL [484,574,577]. Μελετήσαμε την ενεργότητα της PAF-AH στα τρία υποκλάσματα της LDL μετά την οξειδωτική τους τροποποίηση *in vitro*. Κατά τη διάρκεια της οξείδωσης η ενεργότητα του ενζύμου μειώνεται διαρκώς και το φαινόμενο αυτό γίνεται περισσότερο αντιληπτό στο υποκλάσμα LDL-1. Έτσι 4 ώρες μετά την έναρξη της οξείδωσης το μικρότερο ποσοστό 48.3 ± 1.1 % της ενεργότητας της PAF-AH έχει παραμείνει στο LDL-1, ενώ στα LDL-2 και LDL-3 έχει παραμείνει το 60.6 ± 8.4 και το 65.3 ± 9.2 % αντίστοιχα. Για να διερευνήσουμε κατά πόσο οι διαφορές στην κατανομή της PAF-AH μεταξύ των υποκλασμάτων επηρεάζουν την υδρόλυση της ενδογενούς PC, μετρήθηκαν τα επίπεδα της Lyso-PC πριν και μετά την οξείδωση κάθε υποκλάσματος. Επειδή τα επίπεδα της Sph κατά την οξειδωτική τροποποίηση της LDL παραμένουν σταθερά, η Lyso-PC εκφράστηκε ως μοριακός λόγος Lyso-PC/Sph. Όπως αναφέρεται στα αποτελέσματα ο λόγος της Lyso-PC/Sph δεν διαφέρει μεταξύ των 3 υποκλασμάτων πριν την οξείδωση, ενώ 4 ώρες μετά την οξείδωση το υποκλάσμα LDL-3 έχει στατιστικά μεγαλύτερη τιμή μοριακού λόγου Lyso-PC/Sph συγκρινόμενο με τα LDL-2 και LDL-1. Η μεγαλύτερη αυτή παραγωγή Lyso-PC που συνδυάζεται με την μεγαλύτερη ενεργότητα PAF-AH στο LDL-3 επιβεβαιώνουν πως

η PAF-AH και όχι κάποια φωσφολιπάση A_2 είναι υπεύθυνη για την υδρόλυση της PC που λαμβάνει χώρα κατά την οξείδωση της LDL.

Επίσης η μελέτη μας επιβεβαίωσε πως τα τρία υποκλάσματα της LDL έχουν διαφορετική οξειδωτική συμπεριφορά *in vitro* και το LDL-3 είναι το πιο ευένδωτο στην οξείδωση [168,169]. Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν πως η αυξημένη οξειδωτική τροποποίηση του LDL-3 και κατά επέκταση της apoB-100, μπορεί να είναι μια ακόμη εξήγηση για την μεγαλύτερη αθηρωγόνο δράση του, αφού προσλαμβάνεται από τον υποδοχέα εκκαθαριστή με μεγαλύτερους ρυθμούς από ότι τα αραιά και ενδιάμεσης πυκνότητας υποκλάσματα, οδηγώντας έτσι στο σχηματισμό μεγαλύτερου αριθμού αφρωδών κυττάρων [42].

ΥΠΑΡΞΗ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑΣ PAF-AH ΣΤΗΝ Lp(a). Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΟΞΕΙΔΩΣΗ ΤΗΣ Lp(a)

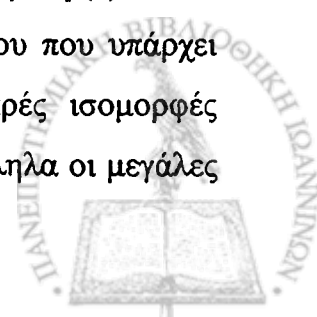
Μέχρι τώρα η ενεργότητα της PAF-AH είχε μελετηθεί στις λιποπρωτεΐνες πλάσματος στο οποίο είτε αγνοούταν η ύπαρξη της Lp(a), είτε δεν υπήρχαν ανιχνεύσιμα επίπεδα Lp(a). Ο επόμενος στόχος μας λοιπόν ήταν να διερευνήσουμε αν η Lp(a) παρουσιάζει ενεργότητα PAF-AH. Το πιο δύσκολο μέρος της ερευνητικής αυτής δουλειάς, ήταν ο διαχωρισμός της Lp(a) από την LDL αφού οι περιοχές πυκνότητάς τους παρουσιάζουν αλληλοεπικάλυψη ($d=1.060-1.110$ g/ml και $d=1.019-1.063$ g/ml, αντίστοιχα), [247]. Έτσι η απομόνωση έγινε υπερφυγοκεντρικά με τη χρήση μιας διαφορετικής βαθμίδωσης πυκνοτήτων από όσες είχαμε χρησιμοποιήσει ως τώρα, η οποία αποσκοπούσε στον καλύτερο διαχωρισμό της Lp(a), από την LDL. Παρόλα αυτά η υπερφυγοκεντρική απομόνωση της Lp(a) περιείχε προσμίξεις με LDL, HDL και πρωτεΐνες, γιατί και ο καθαρισμός της συνεχίστηκε σε στήλη μοριακής διήθησης [252]. Η Lp(a) που απομονώθηκε τελικά ήταν καθαρή, χωρίς προσμίξεις, γεγονός που ταυτοποιήθηκε και με τη χρήση ηλεκτροφορητικών μεθόδων. Για να μελετήσουμε λοιπόν την πιθανή ύπαρξη ενεργότητας PAF-AH στο σωματίδιο της Lp(a), απομονώσαμε Lp(a) από πλάσμα αναμειγμένων ισομορφών και αφού το απαλλάξαμε από προσμίξεις λιποπρωτεϊνών με χρωματογραφία μοριακής διήθησης στη συνέχεια μελετήσαμε τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά του ενζύμου. Τα αποτελέσματά μας δείχνουν ότι στην Lp(a) υπάρχει σε μεγάλη ποσότητα ένα ένζυμο



που υδρολύει τον PAF, το οποίο μοιάζει με την PAF-AH και όχι με την κλασική φωσφολιπάση A_2 , αφού δρα απουσία ιόντων Ca^{2+} , αναστέλλεται από το DPF και PMSF, καθώς και από τον ειδικό ανταγωνιστή του PAF CV 3988. Αυτή η PAF-AH της Lp(a) έχει τις ίδιες ιδιότητες με το ένζυμο που είναι κατανεμημένο στις άλλες λιποπρωτεΐνες του πλάσματος, αφού η ενεργότητά του δεν επηρεάζεται από την πρωτεολυτική δράση της τρυψίνης ή από τα αντιδραστήρια που διασπούν σουλφιδικούς δεσμούς, DTT και IAA. Πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι η LCAT από ανθρώπινο πλάσμα είναι επίσης ικανή να υδρολύει τον PAF [582]. Το ένζυμο αυτό έχει παρόμοιες ιδιότητες με την PAF-AH, είναι όμως ευαίσθητο στη θέρμανση στους $60^\circ C$ για 1 h σε αντίθεση με την PAF-AH που είναι ανθεκτική. Για να αποκλείσουμε το ενδεχόμενο η υδρολυτική δράση της Lp(a) ως προς τον PAF να οφείλεται και στην LCAT, επεξεργαστήκαμε την Lp(a) με θέρμανση στους $60^\circ C$ για 1 h. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η υδρόλυση του PAF, δεν επηρεάστηκε από αυτήν την επεξεργασία, γεγονός που αποδεικνύει ότι η δράση αυτή οφείλεται αποκλειστικά στην PAF-AH. Αφού λοιπόν πιστοποιήσαμε την ύπαρξη ενεργότητας PAF-AH στην Lp(a) στη συνέχεια θελήσαμε να δούμε την κατανομή του ενζύμου σε όλα τα λιποπρωτεϊνικά υποκλάσματα μετά από υπερφυγοκέντρηση βαθμίδωσης πυκνοτήτων, πλάσματος με Lp(a). Σε όλα τα κλάσματα του πλάσματος καθώς και στην Lp(a), μετά την απομόνωσή της, προσδιορίστηκε η ενεργότητα της PAF-AH. Παρατηρήσαμε λοιπόν πως η Lp(a) μεταναστεύει στην περιοχή πυκνότητας $d=1.050-1.100$ g/ml (κλάσματα 9-17) ανεξάρτητα από την ισομορφία της και πως η ενεργότητα του ενζύμου που εντοπίζεται εκεί εξαρτάται από τα επίπεδα της Lp(a) στο πλάσμα. Τα αποτελέσματά μας δείχνουν ότι η παρουσία Lp(a) στο ανθρώπινο πλάσμα διαταράσσει τη μέχρι τώρα γνωστή κατανομή της PAF-AH στις λιποπρωτεΐνες πλάσματος χωρίς ανιχνεύσιμα επίπεδα Lp(a) (70% στην LDL και 30% στη HDL). Έτσι σε πλάσμα με επίπεδα Lp(a) 30-40 mg/dl ή 80-100 mg/dl η ενεργότητα της PAF-AH που εντοπίζεται στην περιοχή πυκνότητας της Lp(a) είναι κατά 4% και 9% μεγαλύτερη συγκρινόμενη με την αντίστοιχη πλάσματος με επίπεδα $Lp(a) < 8$ mg/dl. Έχουμε δείξει πως η ενεργότητα της PAF-AH σε πλάσμα χωρίς ανιχνεύσιμα επίπεδα Lp(a) κατανέμεται στα πυκνά υποκλάσματα των LDL και HDL. Το γεγονός αυτό επιβεβαιώνεται και με τη χρήση αυτής της βαθμίδωσης πυκνοτήτων, πρέπει όμως να λάβουμε υπόψη μας κι ένα επιπλέον στοιχείο. Το πυκνό υποκλάσμα της LDL (LDL-5, $d=1.050-1.063$ g/ml) και η Lp(a) ($d=1.050-1.100$ g/ml) έχουν κοινή περιοχή

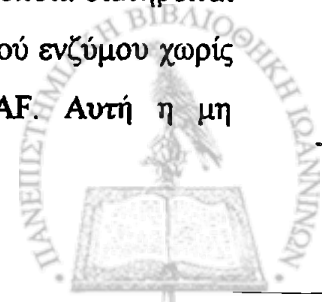
πυκνότητας. Για το λόγο αυτό προσδιορίσαμε την ενεργότητα του ενζύμου σε όλα τα κλάσματα υπερφυγοκεντρικής βαθμίδωσης πυκνοτήτων πλάσματος με Lp(a) το οποίο εμπλουτίσαμε με διαφορετικές ποσότητες LDL-5. Η ενεργότητα του ενζύμου στα κλάσματα 9-17 (κλάσματα στα οποία υπάρχει η Lp(a)) αυξήθηκε γεγονός που αποδεικνύει πως η ενεργότητα της PAF-AH στην περιοχή της Lp(a) επηρεάζεται από τα επίπεδα του πυκνού LDL υποκλάσματος. Λαμβάνοντας υπόψη την αλληλοεπικάλυψη μεταξύ της πυκνότητας της Lp(a) με αυτή της LDL και της HDL καθώς και την επίδραση των επιπέδων της Lp(a) και των ισομορφών της παρατηρούμε πως η υπερφυγοκέντρωση βαθμίδωσης πυκνοτήτων δεν είναι ο ενδεικνύμενος τρόπος για τον προσδιορισμό της κατανομής της PAF-AH στις λιποπρωτεΐνες πλάσματος που έχει και Lp(a).

Στη συνέχεια λαμβάνοντας υπόψη πως διαφορετικά επίπεδα Lp(a) στο πλάσμα αντικατοπτρίζουν και διαφορετικές ισομορφές της apo (a) [253], μελετήσαμε την ενεργότητα του ενζύμου σε διάφορες ισομορφές της Lp(a). Παρατηρήσαμε λοιπόν πως μεταξύ των ισομορφών της apo (a) και των επιπέδων της PAF-AH υπάρχει μια αντιστρόφως ανάλογη σχέση. Οι μικρές ισομορφές της apo (a) (χαμηλού μοριακού βάρους) έχουν και τα μεγαλύτερα επίπεδα της PAF-AH. Κατά συνέπεια η ενεργότητα της PAF-AH κατά την υποκλασμάτωση πλάσματος με Lp(a) εξαρτάται τόσο από τα επίπεδα της Lp(a) στο πλάσμα όσο και από τις ισομορφές της. Ίδια επίπεδα Lp(a) αλλά με διαφορετικές ισομορφές δεν επηρεάζουν την κατανομή της PAF-AH. Διερωτηθήκαμε όμως κατά πόσο η apo(a) επηρεάζει την ενεργότητα της PAF-AH, καθώς και τη σύνδεση του ενζύμου με το σωματίδιο της Lp(a). Προσδιορίσαμε λοιπόν τις κινητικές σταθερές του ενζύμου σε Lp(a) διαφόρων ισομορφών και βρήκαμε ότι οι μικρές ισομορφές F ή S₁ [μικρού μεγέθους αλυσίδα apo(a)] έχουν μεγαλύτερες τιμές φαινομένων K_m και V_{max}. Οι κινητικές σταθερές των ισομορφών αυτών μοιάζουν με αυτές του υποκλάσματος LDL-5, είναι όμως πολύ μεγαλύτερες από τις αντίστοιχες των άλλων υποκλασμάτων. Ας σημειωθεί εδώ πως η περιοχή πυκνότητας των μικρών ισομορφών της Lp(a) (F, S₁) είναι παρεμφερής με αυτή του υποκλάσματος LDL-5. Επειδή η PAF-AH δεν έχει απομονωθεί από την Lp(a) και οι φαινόμενες τιμές V_{max} εκφράζουν πιθανά την ποσότητα του ενζύμου που υπάρχει στο σωματίδιο της Lp(a), μπορούμε να υποθέσουμε ότι οι μικρές ισομορφές περιέχουν περισσότερο ένζυμο συγκρινόμενες με τις μεγάλες. Παράλληλα οι μεγάλες



τιμές φαινόμενης K_m που εμφανίζουν οι μικρές ισομορφές $Lp(a)$ αποτελούν ένδειξη ότι η συγκέντρωση μεγάλης ποσότητας ενζύμου στα σωματίδια αυτά μειώνει την συγγένειά του με το υπόστρωμα PAF. Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν πως το μέγεθος του μορίου της $apo(a)$ επηρεάζει αντιστρόφως ανάλογα την ποσότητα της PAF-AH που προσδέεται στην $Lp(a)$. Χρησιμοποιώντας όμως τη μέθοδο της αναγωγικής διάσπασης της $Lp(a)$ η οποία λύει το δισουλφιδικό δεσμό μεταξύ $apoB-100$ και $apo(a)$ και απομακρύνοντας υπερφυγοκεντρικά την $apo(a)$ από την $Lp(a)$ βρήκαμε ότι ένα μικρό μόνο ποσοστό του ενζύμου αποδεσμεύεται από την $Lp(a)$. Αυτή είναι μια ένδειξη ότι η σύνδεση της PAF-AH στην $Lp(a)$ επηρεάζεται κυρίως από την $apoB-100$. Το αποτέλεσμα αυτό μπορεί πιθανά να εξηγηθεί από το ότι η $apo(a)$, σε αντίθεση με την $apoB-100$ είναι ένα υδρόφιλο μόριο που δεν έχει καμία ικανότητα να συνδέει και να μεταφέρει λιπίδια ή λιπόφιλα μόρια όπως είναι η PAF-AH. Δεν υπάρχουν ακόμη δεδομένα για τη σύνδεση και τις φυσικοχημικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ της PAF-AH και της $Lp(a)$ *in vivo*. Δεν είναι επίσης γνωστό ποιοι παράγοντες παίζουν ρόλο κατά την σύνδεση του ενζύμου στην $Lp(a)$ *in vivo* και πως αλληλεπιδρούν οι απολιποπρωτεΐνες της $Lp(a)$ με την PAF-AH. Επίσης άγνωστο παραμένει ακόμη αν η σύνδεση της PAF-AH με την $Lp(a)$ συμβαίνει στο πλάσμα ενδοκυττάρια ή εξωκυττάρια. Γνωρίζουμε όμως πως η κυριότερη πηγή της PAF-AH του πλάσματος είναι τα μονοκύτταρα κατά τη διαφοροποίησή τους σε μακροφάγα και πως τα κύτταρα αυτά δεν βιοσυνθέτουν $Lp(a)$ [463,477,583]. Λαμβάνοντας επίσης υπόψη μας πως οι μικρές ισομορφές της $Lp(a)$ μεταφέρουν μεγαλύτερη ενζυμική ενεργότητα συγκριτικά με τις μεγάλες ισομορφές καθώς και την υδρόφιλη φύση της $apo(a)$ που θα μπορούσε να παρεμποδίζει την δέσμευση του ενζύμου με το σωματίδιο της $Lp(a)$ μπορούμε να υποθέσουμε πως η PAF-AH δεσμεύεται στην $Lp(a)$ μετά τη συγκρότηση του σωματιδίου, άρα στο πλάσμα.

Το επόμενο ερώτημα που μας απασχόλησε στη μελέτη αυτή ήταν η συμπεριφορά της PAF-AH κατά την οξείδωση της $Lp(a)$ και η συμβολή της στην υδρόλυση της ενδογενούς PC προς lyso-PC. Τα αποτελέσματά μας έδειξαν ότι και κατά την οξείδωση της $Lp(a)$ παρατηρείται μια μεγάλη μείωση της ενεργότητας του ενζύμου η οποία οφείλεται στη μείωση της V_{max} και όχι της K_m η οποία διατηρείται σταθερή. Αυτό δείχνει ότι υπάρχει μείωση της ποσότητας του ενεργού ενζύμου χωρίς όμως να επηρεάζεται η συγγένειά του για το υπόστρωμα PAF. Αυτή η μη

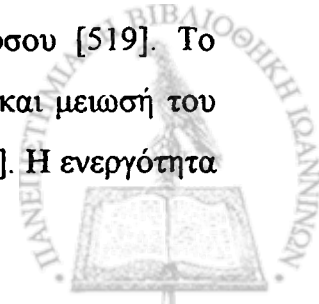


συναγωνιστική αναστολή της PAF-AH που παρατηρείται κατά την οξείδωση της Lp(a), βρίσκεται σε συμφωνία με προηγούμενα αποτελέσματα ως προς τη συμπεριφορά της PAF-AH κατά την οξείδωση της LDL. Παράλληλα, κατά την οξείδωση της Lp(a) παρατηρήθηκε εκτεταμένη υδρόλυση της PC και παραγωγή lyso-PC η οποία οφείλεται στην PAF-AH αφού δεν αναστέλλεται με θέρμανση της Lp(a) για 1h στους 60°C ενώ αναστέλλεται πλήρως από το DFP.

Συμπερασματικά λοιπόν με τη μελέτη αυτή αποδεικνύεται για πρώτη φορά η ύπαρξη ενός ισχυρού αντιφλεγμονώδους ενζύμου (PAF-AH), στην Lp(a) η ενεργότητα του οποίου είναι αντιστρόφως ανάλογη με το μέγεθος της ισομορφής της Lp(a). Το εύρημα αυτό ίσως δημιουργεί μια νέα προοπτική για τον άγνωστο μέχρι τώρα φυσιολογικό ρόλο της Lp(a), υποθέτοντας ότι η Lp(a) στο πλάσμα μπορεί να έχει ένα σημαντικό αντιφλεγμονώδη ρόλο. Κατά την είσοδό της όμως στον υπενδοθηλιακό χώρο των αρτηριών, η Lp(a) συνδέεται με τις πρωτεογλυκάνες, κατακρατείται στον υπενδοθηλιακό χώρο και γίνεται ευένδωτη στην οξείδωση [342]. Κατά την οξείδωσή της η Lp(a) χάνει ένα σημαντικό ποσοστό της αντιφλεγμονώδους αυτής δράσης της, εξαιτίας της μείωσης της ενεργότητας της PAF-AH. Επιπλέον, κατά την οξείδωσή της η Lp(a) εμπλουτίζεται σε lyso-PC (με τη δράση της PAF-AH) που θεωρείται ένα πολύ ισχυρό βιοδραστικό και παράλληλα κυτταροτοξικό μόριο. Είναι πολύ πιθανό οι νέες αυτές ιδιότητες που αποκτά η Lp(a) κατά την οξείδωσή της στο αρτηριακό τοίχωμα, να διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη δημιουργία και ανάπτυξη της αθηρωματικής πλάκας, κάτι που όμως χρειάζεται επιπλέον διερεύνηση.

ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑ PAF-AH ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ΟΙΚΟΓΕΝΗ ΥΠΕΡΧΟΛΗΣΤΕΡΟΛΑΙΜΙΑ

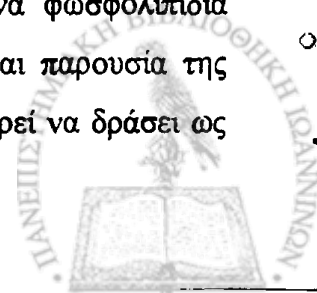
Σύμφωνα με τα αποτελέσματά μας ενεργότητα της PAF-AH στον ορό υπερχοληστερολαιμικών ατόμων είναι στατιστικά μεγαλύτερη από αυτή των νορμολιπιδαιμικών. Διαφορές στην ενεργότητα του ενζύμου έχουν βρεθεί σε διάφορες παθήσεις [492,523,529,538,584], σε κάποιες από τις οποίες υπάρχει θετική συσχέτιση μεταξύ της ενεργότητας της PAF-AH και της ενεργότητας της νόσου [519]. Το ένζυμο σε φυσιολογικές συνθήκες βρίσκεται σε περίσσεια στον ορό και μειωσή του μέχρι και 50% δεν αυξάνει τον χρόνο ημιζωής του PAF στο αίμα [495]. Η ενεργότητα



του ενζύμου επηρεάζεται από τα συστατικά του πλάσματος, αφού η αποικοδόμηση περιορισμένων συγκεντρώσεων PAF στο αίμα γίνεται σε ποσοστό μικρότερο κατά 2% από αυτό που προβλέπεται με βάση τις κινητικές σταθερές της PAF-AH. Με βάση τα δεδομένα αυτά ο παθοφυσιολογικός ρόλος της αυξημένης ενεργότητας PAF-AH στον ορό ατόμων με FH δεν μπορεί πλήρως να διευκρινιστεί. Σε νορμολιπιδαιμικά άτομα η ενεργότητα του ενζύμου κατανέμεται στις LDL και HDL λιποπρωτεΐνες με ποσοστό 70% και 30% αντίστοιχα [467], γιατί και πιθανά η μέτρηση της ενεργότητας στις LDL και HDL να δίνει περισσότερες πληροφορίες λαμβάνοντας υπόψη και το σημαντικό ρόλο της PAF-AH κατά την οξείδωση της LDL [527,577].

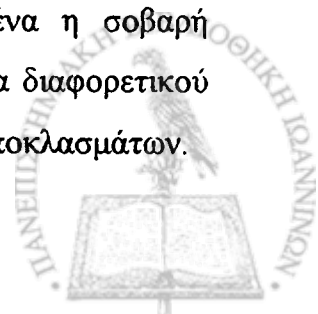
Η μέτρηση της ενεργότητας της PAF-AH στα υποκλάσματα της LDL ασθενών με FH επιβεβαιώνει τα προηγούμενα αποτελέσματά μας που αφορούν την κατανομή της PAF-AH στο πυκνό υποκλάσμα (LDL-3) νορμολιπιδαιμικών ατόμων καθώς και την μεγαλύτερη παραγωγή Lyso-PC που συμβαίνει σε αυτό κατά την οξείδωσή του και συγκριτικά με το LDL-1. Παρατηρούμε λοιπόν για πρώτη φορά πως το ίδιο φαινόμενο παρατηρείται και με τα υποκλάσματα των ατόμων με FH. Επιπλέον καθένα από τα 3 υποκλάσματα των FH έχει μεγαλύτερη ενεργότητα PAF-AH συγκρινόμενο με τα αντίστοιχα των φυσιολογικών, η οποία συνοδεύεται από αυξημένη παραγωγή Lyso-PC κατά την διάρκεια της οξείδωσης. Τα επίπεδα της ενδογενούς PC πριν την οξείδωση είναι παρεμφερή και στις δύο ομάδες. Το γεγονός δείχνει ότι η αυξημένη παραγωγή Lyso-PC οφείλεται αποκλειστικά στην μεγαλύτερη ενεργότητα PAF-AH ανά mg φωσφόρου στην PC και όχι σε διαφορετική ποσότητα υποστρώματος. Έτσι λοιπόν τα υποκλάσματα των ατόμων με FH φέρουν μεγαλύτερες ποσότητες της βιολογικά δραστικής Lyso-PC από τα αντίστοιχα των νορμολιπιδαιμικών και αυτός θα μπορούσε να είναι ένας λόγος για την μεγαλύτερη αθηρωγένεια που εμφανίζουν.

Η ανάπτυξη της αθηρωματικής βλάβης είναι αντιστρόφως ανάλογη με την συγκέντρωση της HDL. Ο μέχρι τώρα γνωστός ρόλος της στην ανάστροφη μεταφορά χοληστερόλης συμπληρώνεται από την προστατευτική δράση που ασκεί στην ox-LDL [585,586]. Πιο συγκεκριμένα σημαντικό ρόλο φαίνεται να διαδραματίζουν δύο ένζυμα, η PAF-AH και η παραοξονάση που υπάρχει μόνο στην HDL [527,587]. Όταν η οξείδωση της LDL συμβαίνει παρουσία HDL, τότε οξειδωμένα φωσφολιπίδια μεταφέρονται από την LDL στην HDL, όπου και αποικοδομούνται παρουσία της ενδογενούς PAF-AH που υπάρχει στην HDL. Επιπλέον η HDL μπορεί να δράσει ως



πηγή για να συμπληρώσει την ενεργότητα της PAF-AH, η οποία μειώνεται κατά την οξείδωση της LDL [587]. Επιπρόσθετα η HDL μπορεί να απομακρύνει την Lyso-PC που παράγεται πάνω στο σωματίδιο της LDL κατά την οξείδωσή της, αναστέλλοντας έτσι κάποια από τις βιολογικές δράσεις της ox-LDL [588]. Στην μελέτη μας τα επίπεδα της HDL χοληστερόλης καθώς και η ενεργότητα της PAF-AH μεταξύ των FH και των νορμολιπιδαιμικών ατόμων είναι παρόμοια. Αντιθέτως τα επίπεδα της LDL χοληστερόλης και της Lyso-PC που παράγεται κατά την οξείδωση της LDL (με την δράση της PAF-AH) των ασθενών με FH είναι στατιστικά μεγαλύτερα από αυτά των φυσιολογικών. Έτσι ο αθηρωγόνος λόγος LDL χοληστερόλη/ HDL χοληστερόλη είναι μεγαλύτερος στους FH, καθώς και ο λόγος ox-LDL/ HDL. Πιθανά λοιπόν η αυξημένη αθηρωμάτωση που εμφανίζουν οι υπερχοληστερολαιμικοί να οφείλεται στην μικρότερη προστασία που προσφέρει η HDL λόγω της μεγαλύτερης συγκέντρωσης LDL σε αυτούς.

Πολλές μελέτες έχουν γίνει στις οποίες φαίνεται πως η ύπαρξη του πυκνού σωματιδίου των LDL σχετίζεται με την επίπτωση της στεφανιαίας νόσου [70]. Σε άλλες μελέτες λαμβάνεται υπόψη η οξείδωση της ολικής LDL η των υποκλασμάτων της και γίνεται συσχέτιση των παραμέτρων της οξείδωσης, (λανθάνων χρόνος, παραγωγή συζυγών διενίων, ολικά παραγόμενα διένια, παραγωγή προϊόντων που αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ) με την ανάπτυξη της αθηρωμάτωσης [589]. Στην μελέτη μας τα άτομα που συμμετείχαν είχαν ως επικρατέστερο το LDL-2 υποκλάσμα της LDL, δηλαδή είχαν ενδιάμεσο φαινότυπο. Μεταξύ των ασθενών με FH και των νορμολιπιδαιμικών δεν υπήρχαν διαφορές ως προς την οξειδωτική τροποποίηση των υποκλασμάτων τους, αν και στο σημείο αυτό η βιβλιογραφία δίσταται. Μερικοί ερευνητές βρίσκουν πως η LDL των ασθενών με FH έχει μεγαλύτερη τάση οξείδωσης ενώ άλλοι υποστηρίζουν πως είναι πιο ανθεκτική από την LDL των φυσιολογικών [181,590]. Στην δική μας μελέτη και κάτω από τις συγκεκριμένες πειραματικές συνθήκες δεν παρατηρήθηκαν διαφορές μεταξύ των υποκλασμάτων FH και των νορμολιπιδαιμικών, και στις δύο όμως ομάδες το LDL-3 υποκλάσμα είναι εκείνο που τροποποιείται περισσότερο και νωρίτερα από το ελαφρύ LDL-1 [168]. Κατά συνέπεια και με βάση τα δικά μας δεδομένα η σοβαρή αθηρωγένεια που εμφανίζουν οι ασθενείς με FH δεν είναι αποτέλεσμα διαφορετικού φαινότυπου, ούτε διαφορετικής οξειδωτικής τροποποίησης των LDL υποκλασμάτων.



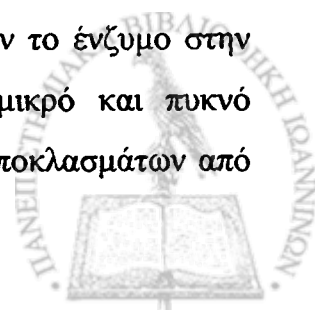
Συμπερασματικά λοιπόν τα αποτελέσματά μας δείχνουν πως τα υποκλάσματα των ασθενών με FH φέρουν μεγαλύτερη ενεργότητα PAF-AH. Η δράση της PAF-AH κατά την οξείδωση των LDL υποκλασμάτων έχει ως αποτέλεσμα τη μεγαλύτερη παραγωγή Lyso-PC, που είναι ένα βιολογικά δραστικό και κυτταροτοξικό μόριο. Το φαινόμενο αυτό σε συνδυασμό και με την μειωμένη αντιαθηρωγόνο και αντιοξειδωτική δράση της HDL στους ασθενείς αυτούς, λόγω της μικρότερης συγκριτικά με την LDL ποσότητάς που περιέχουν, άρα και την μικρότερη ενεργότητα PAF-AH που φέρει η HDL, μπορεί να είναι αιτία της πρόωμης στεφανιαίας νόσου που εμφανίζουν αυτοί οι ασθενείς.



ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Μελετήθηκε η κατανομή της ενεργότητας της PAF-AH στα 3 υποκλάσματα της LDL ανθρώπινου πλάσματος μετά από υπερφυγοκεντρική απομόνωσή τους με βαθμίδωση πυκνοτήτων KBr. Μελετήθηκε επίσης η υδρόλυση της ενδογενούς PC κατά την οξειδωτική τροποποίηση των υποκλασμάτων *in vitro*. Η ενεργότητα της PAF-AH κατανέμεται ετερογενώς στα υποκλάσματα της LDL πριν την οξείδωσή τους και το μεγαλύτερο ποσό της ενεργότητας το φέρει το μικρό και πυκνό υποκλάσμα της LDL, (LDL-3). Κατά την διάρκεια της οξείδωσης των υποκλασμάτων η ενεργότητα του ενζύμου μειώνεται και το φαινόμενο αυτό είναι πιο εμφανές στο υποκλάσμα LDL-1. Η υδρόλυση της PC μελετήθηκε με την παραγωγή της Lyso-PC και εκφράστηκε ως μοριακός λόγος της Lyso-PC/Shp. Πριν την υδρόλυση ο λόγος Lyso-PC/Shp δεν διαφέρει μεταξύ των 3 υποκλασμάτων. Είναι όμως πολύ μεγαλύτερος στα υποκλάσματα LDL-3 και LDL-2 συγκρινόμενος με τον αντίστοιχο λόγο του LDL-1, 4h μετά την έναρξη της οξείδωσης.

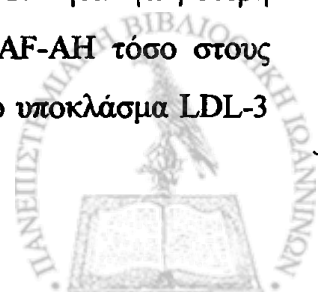
Στη συνέχεια με τη χρήση μιας αναλυτικότερης τεχνικής υπερφυγοκέντρωσης, εξετάστηκε η κατανομή της ενεργότητας της PAF-AH σε όλο το φάσμα των υποκλασμάτων των λιποπρωτεϊνών ανθρώπινου πλάσματος (χωρίς ανιχνεύσιμα επίπεδα Lp(a)). Επιβεβαιώθηκε και με την τεχνική αυτή πως η ενεργότητα της PAF-AH κατανέμεται στο πυκνό υποκλάσματα της LDL (LDL-5), ενώ δείξαμε για πρώτη φορά πως το ένζυμο προτιμά και το πυκνό υποκλάσματα της HDL (VHDL). Οι κινητικές σταθερές του ενζύμου των LDL-5 και VHDL ήταν πολύ μεγαλύτερες από τις αντίστοιχες των άλλων υποκλασμάτων. Αν και μεταξύ των υποκλασμάτων υπάρχουν διαφορές στις καταλυτικές τους ιδιότητες, τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά του ενζύμου είναι κοινά σε όλα τα υποκλάσματα. Η ενεργότητα του ενζύμου σε όλα τα υποκλάσματα δεν επηρεάστηκε από το pH από τη δράση σουλφιδρυλικών αντιδραστηρίων, ή από την τρυψίνη. Επιπλέον παρουσία ειδικών αναστολέων των σερινοεστερασών καθώς και του ειδικού αναστολέα του PAF, CV 3988, η ενεργότητα της PAF-AH σε όλα τα υποκλάσματα, αναστέλλεται πλήρως. Απενεργοποίηση της PAF-AH του LDL-5 με Refabloc και επώασή του με μείγμα LDL-1 και LDL-2 τα οποία είχαν το ένζυμο στην ενεργή του μορφή, έδειξε πως η ενεργότητα μεταφέρεται στο μικρό και πυκνό υποκλάσμα (LDL-5) διατηρώντας όμως τις κινητικές σταθερές των υποκλασμάτων από



τα οποία προέρχεται. Είναι γνωστό πως η κυριότερη πηγή της PAF-AH του πλάσματος είναι τα μονοκύτταρα κατά τη διαφοροποίησή τους σε μακροφάγα. Οι κινητικές σταθερές του εκκρινόμενου ενζύμου είναι όμοιες με αυτές της ολικής LDL. Επώαση πλάσματος στο οποίο προηγουμένως έχει απενεργοποιηθεί η ενδογενής ενεργότητα της PAF-AH με το υπερκείμενο της καλλιέργειας των μονοκυττάρων έδειξε πως το ενζύμο κατανέμεται εκλεκτικά στο μικρό και πυκνό υποκλάσμα της LDL (LDL-5).

Μελετήθηκε η ύπαρξη ενεργότητας PAF-AH στο σωματίδιο της Lp(a) και πιστοποιήθηκε πως οι φυσικοχημικές και καταλυτικές ιδιότητες του ενζύμου αυτού είναι όμοιες με αυτές της PAF-AH που υπάρχει στα υποκλάσματα των LDL και HDL. Στη συνέχεια ελέγχθηκε η κατανομή της PAF-AH μετά από υπερφυγοκέντρηση βαθμίδωσης πυκνοτήτων πλάσματος με Lp(a). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η Lp(a) μεταναστεύει στην περιοχή $d=1.050-1.100$ g/ml και η ενεργότητα της PAF-AH, που εντοπίζεται στην περιοχή αυτή εξαρτάται τόσο από τα επίπεδα της Lp(a) στο πλάσμα όσο και από το μέγεθος της ισομορφής της. Σε πλάσμα με επίπεδα Lp(a) 30-40 mg/dl ή 80-100 mg/dl η ενεργότητα της PAF-AH που εντοπίζεται στην περιοχή αυτή είναι 4% και 9% μεγαλύτερη από την αντίστοιχη πλάσματος χωρίς ανιχνεύσιμα επίπεδα Lp(a). Στη σύνδεση της PAF-AH με την Lp(a) φαίνεται να παίζει καθοριστικό ρόλο η apo B-100 και όχι η apo (a), η οποία όμως επηρεάζει την ειδική ενεργότητα και τις κινητικές σταθερές του ενζύμου. Οι μικρές ισομορφές της Lp(a), F και S1 έχουν μεγαλύτερη ειδική ενεργότητα και τιμές K_m και V_{max} σε σχέση με τις μεγάλες S2 και S2/S3. Κατά τη διάρκεια οξείδωσης της Lp(a) μειώνεται η ενεργότητα της PAF-AH, ενώ παράλληλα παρατηρείται ενζυμική υδρόλυση της ενδογενούς PC προς Lyso-PC, για την οποία κυρίως υπεύθυνη φαίνεται να είναι η PAF-AH.

Μελετήθηκε επίσης η ενεργότητα της PAF-AH στον ορό και την HDL ασθενών με οικογενή υπερχοληστερολαιμία καθώς και η κατανομή του ενζύμου στα 3 υποκλάσματα της LDL συγκριτικά με τα αντίστοιχα νορμολιπιδαιμικών ατόμων. Η ενεργότητα της PAF-AH ήταν αυξημένη στον ορό των ασθενών με οικογενή υπερχοληστερολαιμία ενώ αντίθετα η ενεργότητα της PAF-AH στην HDL (εκφραζόμενη ως % της ολικής ενεργότητας PAF-AH του ορού) των ασθενών με FH ήταν μικρότερη από την αντίστοιχη των νορμολιπιδαιμικών. Η ενεργότητα της PAF-AH τόσο στους ασθενείς όσο και στα νορμολιπιδαιμικά άτομα ήταν μεγαλύτερη στο υποκλάσμα LDL-3



συγκριτικά με τα άλλα δυο υποκλάσματα της LDL. Κατά την διάρκεια της οξείδωσης η ενεργότητα του ενζύμου των τριών υποκλασμάτων μειώνεται, στο τέλος όμως της οξείδωσης παραμένει μεγαλύτερη στους ασθενείς από ότι στους φυσιολογικούς. Αν και μεταξύ των ασθενών και των νορμολιπιδαιμικών δεν παρατηρήθηκαν διαφορές ως προς την οξειδωτική τροποποίηση των υποκλασμάτων αλλά ούτε και ως προς την % κατανομή κάθε υποκλάσματος της LDL στη συνολική μάζα της παρατηρήθηκαν αυξημένα επίπεδα Lyso-PC και στα τρία υποκλάσματα των FH ασθενών συγκριτικά με τα αντίστοιχα των φυσιολογικών στο τέλος της οξείδωσης. Για τις διαφορές αυτές υπεύθυνη φαίνεται να είναι η μεγαλύτερη ενεργότητα της PAF-AH που υπάρχει στα υποκλάσματα των FH. Το φαινόμενο αυτό σε συνδυασμό με τη μειωμένη αντιαθηρωγόνο και αντιοξειδωτική δράση της HDL στους ασθενείς αυτούς εξαιτίας των χαμηλότερων επιπέδων της HDL χοληστερόλης συγκριτικά με τα επίπεδα της LDL χοληστερόλης και τη συγκριτικά μικρότερη ενεργότητα PAF-AH στην HDL (των FH ασθενών), πιθανά συμβάλλουν στην μεγαλύτερη επίπτωση στεφανιαίας νόσου που εμφανίζουν.



SUMMARY

We studied the distribution of PAF-AH in 3 LDL subfractions prepared by density gradient ultracentrifugation as well as the rate of phosphatidylcholine (PC) hydrolysis during oxidation. PAF-AH activity measured before oxidation was much higher in LDL-3 subfraction comparing to LDL-2 and to LDL-1. During oxidation, the enzyme activity was continuously decreased and this phenomenon was more pronounced in LDL-1. PC hydrolysis was studied measuring the Lyso-PC production expressed as Lyso-PC/Shp molar ratio. Before oxidation, the Lyso-PC/Shp molar ratio did not differ significantly among the LDL subfractions, whereas 4h after the onset of oxidation, it was significantly higher in LDL-2 and LDL-3 subfractions.

We have also examined the distribution, catalytic characteristics and transfer of acetylhydrolase activity among plasma lipoprotein subfractions separated by isopycnic density ultracentrifugation; the possibility that the plasma enzyme may be partially derived from adherent monocytes has also been evaluated. In normolipidemic subjects with no detectable Lp(a) levels, acetylhydrolase was associated preferentially with small dense LDL particles (LDL-5) and as we have showed for the first time, with dense HDL subfraction (VHDL). The catalytic properties of the enzyme associated with the dense subfractions (LDL-5 and VHDL) were totally different from those of the other lipoprotein subfractions. No significant differences in the pH dependence of enzyme activity or in sensitivity to protease inactivation, sulfhydryl reagents, the serine protease inhibitor Pefabloc, or the PAF antagonist CV 3988 could be detected between lipoprotein subfractions. Incubation of LDL-1 and LDL-2 subfractions with LDL-5, in which the enzyme had been inactivated by pretreatment with Pefabloc, demonstrated preferential transfer of acetylhydrolase to LDL-5, although the kinetic constants remained those of the particle donors. Also PAF-AH released by adherent human monocytes in culture was found to bind preferentially to small dense LDL subfractions upon incubation of Pefabloc-inactivated plasma with monocyte supernatant. We conclude that a form of PAF-AH with distinct catalytic properties is preferentially associated with small dense LDL-5 and VHDL, in human plasma suggesting that the surface properties of LDL-5 and VHDL particles are distinct from those of the other lipoprotein subfractions.



We next used a density gradient ultracentrifugation procedure to study the distribution of PAF-AH among plasma lipoproteins in plasma containing Lp(a). Lp(a) was migrated as a broad band in the density region of $d=1.050-1.100$ g/ml, independently of its isoform size. In plasma with Lp(a) levels 30-40 mg/dl or 80-100 mg/dl the PAF-AH activity migrated in this density region was 4% and 9% higher as compared to plasma having Lp(a) levels <8 mg/dl. Lp(a) carries a relatively high amount of PAF-AH activity which is related to plasma Lp(a) concentration and to the apo(a) isoform size. The Lp(a) associated PAF-AH has similar physicochemical properties to those reported for the LDL and the HDL-associated enzyme. The enzyme is mainly bound on apo B-100 and not on apo (a). However apo (a) influences the specific activity and the kinetic constants of the enzyme since the small Lp(a) isoforms F and S1 have statistically higher specific activity and K_m and V_{max} values compared to large ones S2 and S2/S3. During oxidative modification of Lp(a) in vitro, PAF-AH activity is decreased. Furthermore during oxidation, Lyso-PC is produced by an enzymatic hydrolysis of the PC content of Lp(a) possibly mediated by PAF-AH.

We next studied total serum and HDL levels of PAF-AH activity as well as the enzyme distribution among the 3 LDL subfractions of FH patients. The total serum activity in heterozygous FH patients was higher than in normolipidemic volunteers, whereas the HDL-associated enzyme expressed as % of total serum activity was lower in the FH patients than in normolipidemic volunteers. Among the LDL subfractions the PAF-AH activity in both groups was higher in the LDL-3 subfraction. Additionally the enzyme activity in each LDL subfraction of the FH patients was higher than in control subjects. No difference was observed in the susceptibility to oxidation of each LDL subfraction between the two groups. During oxidation the enzyme activity was decreased in both groups but remained higher in FH patients. The Lyso-PC/Shp molar ratio in each LDL subfraction of FH patients 3h after the onset of oxidation was higher than in normolipidemic subjects. This phenomenon, in combination with the diminished anti-atherogenic and antioxidant capability of HDL-cholesterol levels compared with LDL-cholesterol levels and, consequently, the relatively low HDL-associated PAF-AH activity, could contribute to the higher atherogenicity and incidence of coronary artery disease observed in FH patients.



ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

1. Η PAF-AH του πλάσματος είναι ανισομερώς κατανεμημένη στα 3 υποκλάσματα της LDL και η μεγαλύτερη ενεργότητα του ενζύμου βρίσκεται στο μικρό και πυκνό υποκλάσμα (LDL-3). Η ετερογενής αυτή κατανομή έχει ως αποτέλεσμα το διαφορετικό βαθμό υδρόλυσης της ενδογενούς PC προς Lyso-PC, η οποία όπως φαίνεται παίζει σημαντικό ρόλο τόσο στην οξειδωτική τροποποίηση των υποκλασμάτων της LDL όσο και στις διαφορετικές βιολογικές τους δράσεις.
2. Αναλυτικότερη απομόνωση όλων των υποκλασμάτων των λιποπρωτεϊνών ανθρώπινου πλάσματος (VLDL+IDL, LDL 1-5, HDL 2-3 και VHDL) επιβεβαίωσε την κατανομή της ενεργότητας της PAF-AH στα μικρά και πυκνά υποκλάσματα της LDL καθώς και της HDL (LDL-5 και VHDL αντίστοιχα).
3. Οι φαινομενικές τιμές K_m και V_{max} των πυκνών υποκλασμάτων της LDL και της HDL είναι πολύ μεγαλύτερες από αυτές των άλλων υποκλασμάτων, χωρίς όμως μεταξύ των υποκλασμάτων να υπάρχουν διαφορές ως προς τις φυσικοχημικές ιδιότητες του ενζύμου.
4. Οι φαινομενικές τιμές K_m και V_{max} της εκκρινόμενης PAF-AH από καλλιέργεια ανθρώπινων μονοκυττάρων είναι όμοιες με αυτές της ολικής LDL. Επώαση υπερκευμένου μονοκυττάρων με πλάσμα στο οποίο έχει απενεργοποιηθεί η ενδογενής ενεργότητα PAF-AH, είχε ως αποτέλεσμα την κατανομή του ενζύμου στο πυκνό υποκλάσμα της LDL (LDL-5).
5. Η γνωστή κατανομή της PAF-AH κατά 70% στην LDL και 30% στην HDL (σε πλάσμα χωρίς ανιχνεύσιμα επίπεδα Lp(a)), μεταβάλλεται όταν το πλάσμα περιέχει Lp(a). Η Lp(a) περιέχει ένα σημαντικό ποσό ενεργότητας PAF-AH, το οποίο εξαρτάται τόσο από τα επίπεδά 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.
6. Τον καθοριστικό ρόλο στη σύνδεση της PAF-AH με το σωματίδιο της Lp(a) φαίνεται να παίζει η apo B-100, αφού αναγωγική απομάκρυνση της apo(a), δεν επηρεάζει ουσιαστικά τη σύνδεση αυτή. Η apo (a) επηρεάζει όμως την ειδική ενεργότητα του ενζύμου και τις κινητικές του σταθερές. Έτσι οι μικρές ισομορφές της Lp(a) (μικρού μεγέθους αλυσίδα apo (a)) έχουν μεγαλύτερες τιμές K_m και V_{max} από τις μεγάλες ισομορφές.



7. Η ενεργότητα της PAF-AH στον ορό ετεροζυγωτών ασθενών με οικογενή υπερχοληστερολαιμία (FH) είναι μεγαλύτερη από την αντίστοιχη των νορμολιπιδαιμικών ατόμων. Αντιθέτως η ενεργότητα της PAF-AH στην HDL (όταν αυτή εκφράζεται ως % ποσοστό της ολικής ενεργότητας του ορού) είναι μικρότερη στους ασθενείς με FH από την αντίστοιχη των νορμολιπιδαιμικών.
8. Η ενεργότητα της PAF-AH σε καθένα από τα 3 υποκλάσματα της LDL των FH ασθενών είναι μεγαλύτερη από την αντίστοιχη των φυσιολογικών. Κατά την οξειδωτική τροποποίηση των υποκλασμάτων η ενεργότητα του ενζύμου μειώνεται, παραμένει όμως μεγαλύτερη στα υποκλάσματα της LDL των ετεροζυγωτών ασθενών με FH.
9. Ο μοριακός λόγος της Lyso-PC/Sph είναι μεγαλύτερος σε όλα τα υποκλάσματα της LDL των FH στο τέλος της οξείδωσης in vitro. Αυτό πιθανά οφείλεται στη μεγαλύτερη ενεργότητα της PAF-AH που έχουν οι υπερχοληστερολαιμικοί, αφού μεταξύ των υποκλασμάτων της LDL των δυο ομάδων, δεν υπάρχουν διαφορές ως προς την οξειδωτική τους τροποποίηση αλλά ούτε και ως προς το % ποσοστό κάθε υποκλάσματος στην ολική μάζα της LDL. Η αυξημένη παραγωγή της Lyso-PC μπορεί να είναι ένας από τους παράγοντες που συμβάλλουν στην πρόωμη και σε μεγαλύτερη έκταση εμφάνιση της αθηρωματικής νόσου στους ασθενείς αυτούς.



Από τη διατριβή αυτή προέκυψαν οι εξής δημοσιεύσεις:

- [1] 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.
- [2] 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
- [3] Karabina SAP, Elisaf M, Goudevenos J, Siamopoulos K, Sideris D, Tselepis A. PAF-acetylhydrolase activity on Lp(a) before and during Cu²⁺ induced oxidative modification in vitro. *Atherosclerosis* 1996, 125: 121-134
- [4] Karabina SAP, Elisaf M, Bairaktari E, Tzallas C, Siamopoulos KC, Tselepis AD. Increased activity of platelet-activating factor acetylhydrolase in low density lipoprotein subfractions induces enhanced lysophosphatidylcholine production during oxidation in patients with heterozygous familial hypercholesterolaemia. *Eur J Clin Inv* 1997, 27: 595-602
- [5] Καραμπίνα ΣΑΠ, Ελισάφ Μ, Γουδέβενος Ι, Σιαμόπουλος Κ, Σιδεράς Δ, Τσελέπης ΑΔ. Ενεργότητα PAF-ακετυλοϋδρολάσης στην Lp(a) πριν και μετά την οξείδωσή της. Μια νέα προοπτική για το φυσιολογικό ρόλο της Lp(a). *Ιατρική* 1998, (υπο έκδοση).

Επίσης η εργασία: PAF-acetylhydrolase activity in human LDL subfractions before and after oxidative modification in vitro. Karabina SAP, Liapikos TA, Grekas G, Goudevenos J, Tselepis A. *Eur J Clin Inv* 1994, 24: (supplement 2) 326; έτυχε τιμητικής διάκρισης «Bayer award», στο 28^ο ετήσιο συνέδριο της European Society for Clinical Investigation, April 20-23, 1994, Toledo Spain.

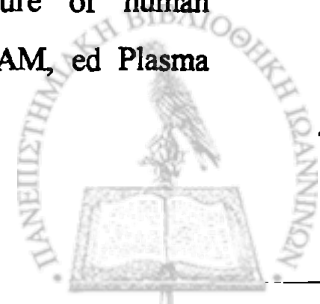


ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

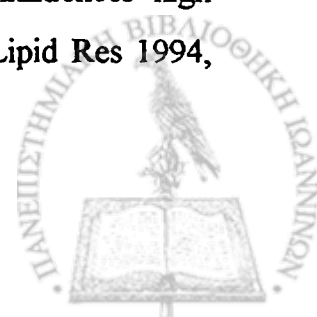
- [1] Stryer L. Biochemistry 3th Eds Freeman and Company, San Francisco 1988
- [2] Betteridge DJ In: Lipids: Current Perspectives, Eds Dunitz M, Group Fournier 1996, 1-21
- [3] Packard CJ, Munro A, Lorimer AR, Gotto AM, Shepherd J. Metabolism of apolipoprotein B in large triglyceride rich very low density lipoproteins of normal and hypertriglyceridemic subjects. J Clin Inv 1984, 74: 2178-2192
- [4] Packard CJ, Gaw A, Demant T, Shepherd J. Development and application of a multicompartmental model to study very low density lipoprotein subfraction metabolism. J Lipid Res 1995, 36: 172-187
- [5] Fisher WR, Zech LA, Kilgore LL, Stacpoole PW. Metabolic pathways of apolipoprotein B in heterozygous familial hypercholesterolemia: Studies with a ³H leukine tracer. J Lipid Res 1991, 32: 1823-1836
- [6] Walsh BW, Schiff I, Rosner B, Greenberg L, Ravnkar V, Sacks FM. Effects of post-menopausal estrogen replacement on the concentration and metabolism of plasma lipoproteins. N Engl J Med 1991, 325: 1196-1204
- [7] Demant T, Betford D, Packard CJ, Shepherd J. Influence of apolipoprotein E polymorphism on apolipoprotein B-100 metabolism in normolipidemic subjects. J Clin Inv 1991, 88: 1490-1501
- [8] Goldberg IJ, Le N-A, Ginsberg HN. Lipoprotein metabolism during acute inhibition of lipoprotein lipase in the cynomologus monkey. J Clin Inv 1988, 81: 561-568
- [9] Eckel RH. Lipoprotein lipase: a multifunctional enzyme relevant to common metabolic diseases. N Engl J Med 1989, 320: 1060-1068
- [10] Brown WV, Baginsky Ml. Inhibition of lipoprotein lipase by an apoprotein of very low density lipoprotein. Biochem Res Commun 1972, 46: 375-381
- [11] Ginsberg HN, Lee N-A, Goldberg IJ, Gibson JC, Rubinstein A, Wang-Iverson P, Norum R, Brown WV. Apolipoprotein B metabolism in subjects with a deficiency of apolipoproteins C-III and A-I. J Clin Inv 1986, 78: 1287-1295



- [12] Beisiegel U, Weber W, Ihrke G, Herz J, Stanley KK. The LDL receptor related protein, LRP, is an apolipoprotein E binding protein. *Nature* 1989, 341: 162-164
- [13] Sakai J, Hishino A, Takahashi S, Miura Y, Ishii H, Suzuki H, Kawarabayasi Y, Yamamoto T. Structure, chromosome location and expression of the human very low density lipoprotein receptor gene. *J Biol Chem* 1994, 269: 2173-2181
- [14] Demant T, Carlson LA, Holmquist L, Karpe F, Nilsson-Ehle P, Packard CJ, Shepherd J. Lipoprotein metabolism in hepatic lipase deficiency: studies on the turnover of apolipoprotein B and on the effect of hepatic lipase on high density lipoprotein. *J Lipid Res* 1988, 29: 1603-1611
- [15] Gianturco SH, Gotto Jr AM, Jackson RL, Patsch JR, Sybers HD, Taunton OD, Yeshurum DL, Smith LC. Control of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase activity in cultured human fibroblasts by very low density lipoproteins of subjects with hypertriglyceridemia. *J Clin Inv* 1978, 61: 320-328
- [16] Schonfeld G, Patsch W, Pfefer B, Witztum JL, Weidman SW. Lipolysis produces changes in the immunoreactivity and cell reactivity of very low density lipoproteins. *J Clin Inv* 1979, 64: 1288-1297
- [17] Sehayek E, Lewin-Velven U, Chazek-Saul T, Eisenberg S. Lipolysis exposes unreactive endogenous apolipoprotein E-3 in human and rat plasma very low density lipoproteins. *J Clin Inv* 1991, 88: 553-560
- [18] Chapman MJ, Guerin M, Bruckert E. 'Atherogenic, dense LDL: Pathophysiology and new therapeutic approaches. *Eur Heart J* 1998, 19 Suppl A: A24-30
- [19] Chapman MJ, Laplaud PM, Forgez P, Bruckette E, Goulinet S, Lagrange D. Further resolution of the low-density lipoprotein spectrum in normal human plasma: Physicochemical characteristics of discrete subspecies separated by density gradient ultracentrifugation. *J Lipid Res* 1988, 29: 442-458
- [20] Shen MS, Krauss RM, Lindgren FT, Forte TM. Heterogeneity of serum low density lipoproteins in normal human subjects. *J Lipid Res* 1981, 22: 236-244
- [21] Yang CY, Chan L, Gotto AM. The complete structure of human apolipoprotein B-100 and its messenger RNA. In : Gotto AM, ed *Plasma Lipoproteins* Amsterdam :Elsevier 1987, 77-93.



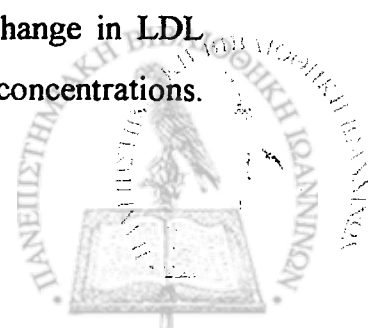
- [22] Esterbauer H, Gebicki J, Puhl H. and Jurgens G. The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL. *Free Rad Biol Med* 1992, 13: 341-390.
- [23] Goebel R, Garnick M, Berman M. A new model for low density apoprotein kinetics: evidence for two labelled moieties. *Circulation* 1976, 54: (suppl) II-4
- [24] Foster DM, Chait A, Albers JJ, Failor RA, Harris C, Brunzell JD. Evidence for kinetic heterogeneity among low density lipoproteins. *Metabolism* 1986, 35(β): 685-696
- [25] Malmendier CL, Delcroix C, Lontie J-F. Kinetics of a heterogeneous population of particles in low density lipoprotein apolipoprotein B. *Atherosclerosis* 1989, 80: 91-100
- [26] Caslake MJ, Packard CJ, Series JJ, Yip B, Dagen MM, Shepherd J. Plasma triglyceride and low density lipoprotein metabolism. *Eur J Clin Inv* 1992, 22: 96-104
- [27] Tall AR. Plasma high density lipoproteins. Metabolism and relation to atherogenesis. *J Clin Inv* 1990, 86: 379-384
- [28] von Eckardstein A, Huang Y, Assman G. Physiological role and clinical relevance of high density lipoprotein subclasses. *Curr Opin Lipidol* 1994, 5: 404-416
- [29] Ishida BY, Frolich J, Fielding CJ. Pre-beta migrating high density lipoprotein : quantitation in normal and hyperlipidemic plasma by solid phase radioimmunoassay following electrophoretic transfer. *J Lipid Res* 1987, 28: 778-786
- [30] Kunitake ST, Mendel CM, Hennessy LK. Interconversion between apolipoprotein AI-containing lipoproteins of pre-beta and alpha electrophoretic mobilities. *J Lipid Res* 1992, 33: 1807-1816
- [31] Castro GR, Fielding CJ. Early incorporation of cell derived cholesterol into pre β-migrating high density lipoproteins. *Biochemistry* 1988, 27: 25-29
- [32] James RW, Pometta D. Postprandial lipaemia differentially influences high density lipoprotein subpopulations LpA-I and LpA-I, A-II. *J Lipid Res* 1994, 35: 1583-1591



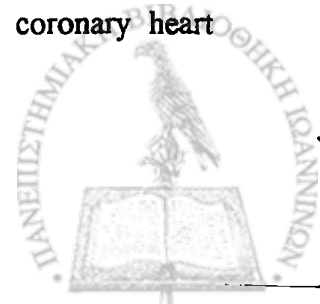
- [33] Liang H-Q, Rye K-A, Barter PJ. Dissociation of lipid free apo A-I from high density lipoproteins. *J Lipid Res* 1994, 35: 1187-1199
- [34] Hana H, Yokoyama S. Role of apolipoproteins in cholesterol efflux from macrophages to lipid micro-emulsion. Proposal of a putative model for the pre- β high density lipoprotein pathway. *Biochemistry* 1992, 31: 2040-2046
- [35] Atmeh RF, Shepherd J, Packard CJ. Subpopulations of apolipoprotein A-I in human high density lipoproteins: their metabolic properties and response to drug therapy. *Biochim Biophys Acta* 1983, 751: 175-188
- [36] Rader DJ, Castro G, Zech LA, Fruchart JC, Brewer HB Jr. In vivo metabolism of apolipoprotein A-I on high density lipoprotein particles LpA-I and LpA-I, A-II. *J Lipid Res* 1991, 32: 1849-1859
- [37] Rader DJ, Ikewaki K, Duvenger N, Schmidt H, Pritchard H, Frohlich J, Clerc M, Dumon MF, Fairwell T, Zech L. Markedly accelerated catabolism of apolipoprotein A-II (apo A-II) and high density lipoproteins containing apo A-II in classic lecithin : cholesterol acyl transferase deficiency and fish eye disease. *J Clin Inv* 1994, 93: 321-330
- [38] Simpson HS, Williamson CM, Olivecrona T, Pringle S, Maclean J, Lorimer AR, Bonnefous F, Bogaievsky Y, Packard CJ, Shepherd J. Postprandial lipemia, fenofibrate and coronary artery disease. *Atherosclerosis* 1990, 85: 193-202
- [39] Patsch JR, Prasad S, Gotto AM Jr, Patsch W. High density lipoprotein. Relationships of the plasma levels of this lipoprotein species to its composition, to the magnitude of postprandial lipemia and to the activity of lipoprotein lipase and hepatic lipase. *J Clin Inv* 1987, 80(2): 341-347
- [40] Brown MS, Goldstein JL. Lipoprotein metabolism in the macrophage. Implications for cholesterol deposition in atherosclerosis. *Ann Rev Biochem* 1983, 52: 223
- [41] Seidel D, Alaupovic P, Furman RH. A lipoprotein characterizing obstructive jaundice. Method for quantitative separation and identification of lipoproteins in jaundiced subjects. *J Clin Inv* 1969, 48: 1211



- [42] Chapman MJ, Lund-Katz S, Phillips MC, Prassl R, Laggner P, Flament C, Goulinet S, Nigon F, Rouis M, Laplaud PM, Guerin M, Bruckert E, Dolphin PJ. LDL subfractions : properties and functions. In: «Atherosclerosis X» Eds Woodford FP, Davignon J and Sniderman A. Elsevier Science 1995, 977-979
- [43] Chen CG, Liu W, Duchateau P, Allaart J, Hamilton RL, Mendel CM, Lau K, Hardman DA, Frost PH, Malloy MJ, et al. Conformational differences in human apolipoprotein B-100 among subspecies of low density lipoprotein. *J Biol Chem* 1994, 269(46): 29121-29128
- [44] Nigon F, Lesnik P, Rouis M, Chapman MJ. Discrete subspecies of human low-density lipoproteins are heterogenous in their interaction with the LDL receptor. *J Lipid Res* 1991, 32: 1741-1754
- [45] Krauss RM and Burke DJ. Identification of multiple subclasses of plasma low-density lipoproteins in normal humans. *J Lipid Res* 1982, 23: 97-104
- [46] Swinkels DW, Demacker PNM, Hendriks JCM, van't Laar A. Low-density lipoprotein subfractions and relationship to other risk factors for coronary artery disease in healthy individuals. *Arteriosclerosis* 1989, 9: 604-613
- [47] Griffin BA, Caslake MJ, Yip B, Tait GW, Packard CJ, Shepherd J. Rapid isolation of low density lipoprotein (LDL) subfractions from plasma by density gradient ultracentrifugation. *Atherosclerosis* 1990, 83: 59-67
- [48] Austin MA, Breslow JL, Hennekens CH, Buring JE, Willet WC, Krauss RM. Low-density lipoprotein subclass patterns and risk of myocardial infraction. *JAMA*. 1988, 26: 1917-1921
- [49] Baumstark MW, Kreutz W, Berg A, Frey I. and Keul J. Structure of human LDL subfractions determined by X ray small angle scattering. *Biochim Biophys Acta* 1990, 1037: 48-57
- [50] Austin MA. Genetics of low density lipoprotein subclasses. *Curr Opin Lipidol* 1993, 4: 125-132
- [51] McNamara JR, Jenner JL, Li Z, Wilson PWF, Schefer EJ. Change in LDL particle size is associated with change in plasma triglyceride concentrations. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1992, 12: 1284-1290



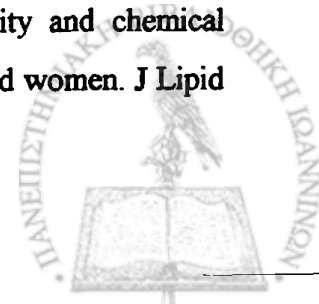
- [52] McNamara JR, Campos H, Ordovas JM, Peterson J, Wilson PWF, Schaefer EJ. Effect of gender, age and lipid status on low density lipoprotein subfraction distribution. Results of the Framingham Offspring Study. *Arteriosclerosis* 1987, 7: 483-490
- [53] Austin MA, King MC, Vranizan KM, Krauss RM. Atherogenic lipoprotein phenotype. A proposed genetic marker for coronary heart disease. *Circulation* 1990, 82: 495-506
- [54] Reaven GM, Ida Chen Y-D, Jeppesen J, Maheux P, Krauss RM. Insulin resistance and hyperinsulinemia in individuals with small dense low density lipoprotein particles. *J Clin Inv* 1993, 92: 141-146
- [55] Tan KCB, Cooper MB, Lin KL, Griffin BA, Freeman DJ, Packard CJ, Shepherd J, Hales CN, Betteridge DJ. Fasting and post prandial determinants for the occurrence of small, dense LDL species in non-insulin dependent diabetic subjects with and without hypertriglyceridemia. *Atherosclerosis* 1995, 113: 273-287
- [56] Campos H, Blijlevens E, McNamara JR, Ordons JM, Posner BM, Wilson PWF, Casteli WP, Schaefer EJ. LDL particle size distribution: Results from the Framingham Offspring Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1992, 12: 1410-1419
- [57] Selby JV, Austin MA, Newman B, Zhang D, Quesenberry CP Jr, Mayer EJ, Krauss RM. LDL subclass phenotype and the insulin resistance syndrome in women. *Circulation* 1993, 88: 381-387
- [58] Watson TDG, Caslake MJ, Freeman DJ, Griffin BA, Hinnie J, Packard CJ, Shepherd J. Determinants of LDL subfraction distribution and concentrations in young normolipidemic subjects. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1994, 14: 902-910
- [59] Griffin BA, Freeman DJ, Tait GW, Thomson J, Caslake MJ, Shepherd J. Role of plasma triglyceride in the regulation of plasma low density (LDL) subfractions : relative contribution of small dense LDL to coronary heart disease. *Atherosclerosis* 1994, 106: 241-253



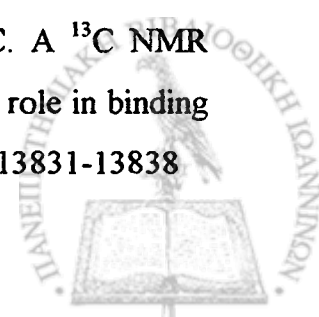
- [59α] Taskinen M-R, Packard CJ, Shepherd J. Effect of insulin therapy on the metabolic fate of apolipoprotein B-containing lipoproteins in NIDDM. *Diabetes* 1990, 39: 1017-1027
- [60] Gaw A, Packard CJ, Murray EF, Lindsay GM, Griffin BA, Caslake MJ, Vallance BD, Lorimer AR, Shepherd J. Effects of simvastatin on apo B metabolism and LDL subfraction distribution. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1993, 13: 170-189
- [61] Yuan J, Tsai MY, Hunninghake DB. Changes in composition and distribution of LDL subspecies in hypertriglyceridemia and hypercholesterolemia patients during gemfibrozil therapy. *Atherosclerosis* 1994, 110: 1-11
- [62] Bruckert E, Dejager S, Chapman MJ. Ciprofibrate therapy normalises the atherogenic low density lipoprotein subspecies profile in combined hyperlipidemia. *Atherosclerosis* 1994, 100: 91-102
- [63] Superko HR, Krauss RM. Differential effects of nicotinic acid in subjects with different LDL subclass patterns. *Atherosclerosis* 1992, 95: 69-76
- [64] Griffin BA, Caslake MJ, Gaw A, Yip B, Packard CJ, Shepherd J. Effects of cholestyramine and acipimox on subfractions of plasma low density lipoprotein. Studies in normolipidaemic and hypercholesterolaemic subjects. *Eur J Clin Inv* 1992, 22: 383-390
- [65] Vega GL, Krauss RM, Grundy SM. Pravastatin therapy in primary moderate hypercholesterolemia: Changes in metabolism of Apolipoprotein -B containing lipoproteins. *J Intern Med* 1990, 227: 81-94
- [66] Cheung MC, Austin MA, Moulin P, Wolf AC, Cryer D, Knoop RH. Effects of pravastatin on apolipoprotein specific high density lipoprotein subpopulations and low density lipoprotein subclass phenotypes in patients with primary hypercholesterolemia. *Atherosclerosis* 1993, 102: 107-119
- [67] Campos H, Sacks FM, Walsh BW, Schiff I, O Hanesian MA, Krauss RM. Differential effects of estrogen on LDL subclasses in healthy postmenopausal women. *Metabolism* 1994, 42: 1153-1158



- [68] Griffin B, Farish E, Walsh D, Barnes J, Caslake M, Shepherd J, Hart D. Response of plasma low density lipoprotein subfractions to estrogen replacement therapy following surgical menopause. *Clin Endocrinol* 1993, 39: 463-468
- [69] Granfone A, Campos H, McNamara JR, Schaefer MM, Lamon Fava S, Ordovas JM, Schaefer EJ. Effects of estrogen replacement on plasma lipoproteins and apolipoproteins in postmenopausal, dyslipidemic women. *Metabolism* 1992, 41: 1193-1198
- [70] Krauss RM. Heterogeneity of plasma low density lipoproteins and atherosclerosis risk. *Curr Opin Lipidol* 1994, 5: 339-349
- [71] De Graaf J, Swinkels DW, Demacker PNM, De Haan AFJ, Stalenhoef AFH. Differences in the low density lipoprotein subfraction profile between oral contraceptive users and controls. *J Clin Endocrinol Metab* 1993, 76: 197-202
- [72] Silliman K, Shore V, Forte TM. Hypertriglyceridemia during late pregnancy is associated with the formation of small dense LDL and the presence of large buoyant HDL. *Metabolism* 1994, 43: 1035-1041
- [73] Fisher WR, Hammond MG, Warmke GL. Measurements of the molecular weight variability of plasma low density lipoprotein manifestations among normals and subjects with hyperbetalipoproteinemia. *Metabolism* 1983, 32: 283-291
- [74] Austin MA, Breslow JL, Hennekens CH, Buring JE, Willett WS, Krauss RM. Low density lipoprotein subclass patterns and risk of myocardial infraction. *JAMA* 1988, 260: 1917-1921
- [75] Campos H, Genest JJ, Blijlevens E, McNamara JR, Jenner JL, Ordovas JM, Wilson PWF, Schaefer EJ. Low density lipoprotein particle size and coronary artery disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1992, 12: 187-195
- [76] Tornvall P, Karpe F, Carlson LA, Hamsten A. Relationship of low density lipoprotein subfractions to angiographically defined coronary artery disease in young survivors of myocardial infraction. *Atherosclerosis* 1991, 90: 67-80
- [77] Coresh J, Kwiterovich PO, Smith HH, and Bachorik PS. Association of plasma triglyceride concentration and LDL particle diameter, density and chemical composition with premature coronary artery disease in men and women. *J Lipid Res* 1993, 34: 1687-1697



- [78] Hayek T, Azrolan N, Verdery RB, Walsh A, Chajek-Shaul T, Agellon LB, Tall AR, Breslow JL. Hypertriglyceridemia and cholesterol ester transfer protein interact to dramatically alter high density lipoprotein levels, particle size and metabolism. *J Clin Inv* 1993, 92: 1143-1152
- [79] Sniderman A, Shapiro S, Marpole D, Skinner B, Teng B, Kwiterovich PO. Association of coronary atherosclerosis with hyperapobetalipoproteinemia (increased protein but normal cholesterol levels in human low density lipoproteins). *Proc Natl Acad USA* 1980, 77: 604-608
- [80] Swinkels DW, Demacker PNM, Hendricks JCM, Brenninkmeijer BJ, Stuyt PMJ. The relevance of a protein-enriched low density lipoprotein as a risk factor for coronary heart disease in relation to other known risk factors. *Atherosclerosis* 1989, 77 : 59-66
- [81] Crouse JR, Parks JS, Schey HM, Kahl FR. Studies of low density lipoprotein molecular weight in human beings with coronary artery disease. *J Lipid Res* 1985, 26: 566-573
- [82] Dejager S, Bruckert E. and Chapman MJ. Dense LDL subspecies with diminished oxidative resistance predominate in combined hyperlipidaemia. *J Lipid Res.* 1993, 34: 295-308
- [83] Luc G, Chapman MJ, De Gennes JL. Further resolution and comparison of the heterogeneity of plasma low density lipoproteins in human hyperlipoproteinemias : type III hyperlipoproteinemia, hypertriglyceridemia, and familial hypercholesterolemia. *Atherosclerosis* 1988, 71: 1543-1567
- [84] Eisenberg S, Gavish D, Oschry Y, Fainary M, Deckelbaum RG. Abnormalities in very low, high density lipoproteins and hypertriglyceridemia. Reverse toward normal with bezafibrate treatment. *J Clin Invest.* 1984, 74: 470-482
- [85] Zambon A, Austin MA, Brown BG, Hokansen JE, Brunzell JD. Effect of hepatic lipase on LDL in normal men and those with coronary artery disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1993, 13: 147-153
- [86] Lund-Katz S, Ibdah JA, Letizia JY, Thomas MJ, Phillips MC. A ¹³C NMR characterization of lysine residues in apolipoprotein B and their role in binding to the low density lipoprotein receptor. *J Biol Chem* 1988, 263: 13831-13838



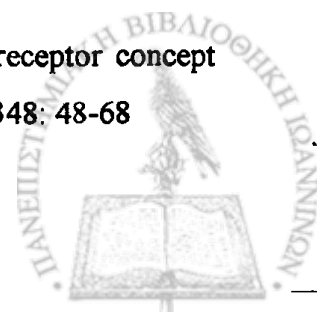
- [87] Campos H, Arnold KS, Balestra ME, Innerarity TL, Krauss RM. Differences in receptor binding of LDL subfractions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1996, 16: 794-801
- [88] Krauss RM. Relationship of intermediate and low-density lipoprotein subspecies to risk of coronary artery disease. *Am Heart J* 1987, 113: 578-582
- [89] Faber M. The human aorta : sulfate-containing polyuronides and the deposition of cholesterol. *Arch Pathol* 1949, 48: 342-350
- [90] Walton K, Williamson N. Histological and immunofluorescent studies on the evolution of the human atheromatous plaque. *J Atheroscler Res* 1968, 599-624
- [91] Hoff H, Bond G. Apolipoprotein B localization in coronary atherosclerotic plaques from cynomolgous monkeys. *Artery* 1983, 12: 104-116
- [92] Bernfeld P, Nisselbaum J. Reaction of human beta lipoglobulin with macromolecular polysulfated esters. *Fed Proc* 1956, 15: 220-227
- [93] Gero S, Gergely J, Szerely L, Virag S. Role of mucoid substances of the aorta in the deposition of lipids. *Nature* 1960, 187: 152-153
- [94] Bihari-Varga M, Vegh M. Quantitative studies on the complexes formed between aortic mucopolysaccharides and serum lipoproteins. *Biochim Biophys Acta* 1967, 144: 202-210
- [95] Iverius P-H. The interaction between human plasma lipoproteins and connective tissue glycosaminoglycans. *J Biol Chem* 1972, 247: 2607-2613
- [96] Hurt-Camejo E, Olsson U, Wiklund O, Bondjers G, Camejo G. Cellular consequences of the association of Apo B lipoprotein with proteoglycans. Potential contribution to atherogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997, 17: 1011-1017
- [97] Avila EM, Lopez F, Camejo G. Properties of low density lipoproteins related to its interaction with arterial wall components : in vitro and in vivo studies. *Artery* 1978, 4: 36-60



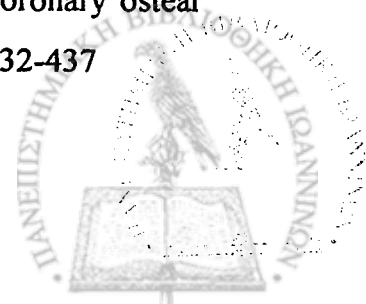
- [98] Camejo G, Lopez A, Lopez F, Quinones J. Interactions of low-density lipoproteins with arterial proteoglycans: The role of charge and sialic acid concentration. *Atherosclerosis* 1985, 55: 93-105
- [99] Camejo G, Linden T, Olsson U, Wiklund O, Lopez, F, Bondjers, G. Binding parameters and concentration modulate formation of complexes between LDL and arterial proteoglycans in serum. *Atherosclerosis* 1989, 79: 121-128
- [100] Olsson U, Camejo G, Bondjers G. Binding of a synthetic apolipoprotein B -100 peptide and peptide analogues to chondroitin 6-sulfate : effects of the lipid environment. *Biochemistry* 1993, 32: 1858-1865
- [101] Olsson U, Camejo G, Hurt-Camejo E, Elfsber K, Wiklund O, Bondjers G. Possible functional interactions of apolipoprotein B-100 segments that associate with cell proteoglycans and the apo B/E receptor. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997, 17: 149-155
- [102] Hurt-Camejo E, Camejo G, Rosengren B, Lopez F, Wiklund O, Bondjers G. Differential uptake of proteoglycan-selected subfractions of low density lipoprotein by human macrophages. *J Lipid Res* 1990, 31: 1387-1398
- [103] Griffin BA and Packard CJ. Metabolism of VLDL and LDL subclasses. *Curr Opin Lipidol* 1994, 5: 200-206
- [104] Nordestergaard B and Zilversmit DB. Comparison of arterial intimal clearance of LDL from diabetic and non diabetic cholesterol fed rabbits. Differences in intimal clearance explained by size differences. *Arteriosclerosis* 1989, 9: 176-183
- [105] Curmi PA, Juan L, Tedgui A. Effect of transmural pressure on LDL and albumin transport and distribution across the intact arterial wall. *Circ Res* 1990, 66: 1692-1702
- [106] Hurt-Camejo E, Camejo G, Rosengren B, Lopez F, Wiklund O, Bondjers G. Differential uptake of proteoglycan-selected subfractions of low density lipoprotein by human macrophages. *J Lipid Res* 1990, 31: 1387-1398



- [107] Anbro V, Griffin BA, McConnell M, Packard CJ, Shepherd J. Influence of plasma lipid and LDL subfraction profile on the interaction between LDL with plasma arterial wall proteoglycans. *Atherosclerosis* 1996, 124: 261-271
- [108] Tailleux A, Torpier G, Caron B, Fruchart JC, Fievet C. Immunological properties of apo B-containing lipoprotein particles in human atherosclerotic arteries. *J Lipid Res* 1993, 34: 719-728
- [109] Rapp J, Lespine A, Hamilton R, Colyvas N, Chaumeton A, Tweedie-Hardman J, Kotite L, Kunitate T, Havel R, Kane J. Triglyceride rich lipoproteins isolated by selected affinity anti-apolipoprotein B immunosorption from human atherosclerotic plaque. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1994, 14: 1767-1774
- [110] Rosenfeld ME, Carew TE, von Hodenberg E, Pittman RC, Ross R, Steinberg D. Autoradiographic analysis of the distribution of ¹²⁵I-tyramine cellobiose-LDL in atherosclerotic lesions of WHHL rabbit. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1992, 12: 985-995
- [111] Young SG and Parthasarathy S. Why are low density lipoproteins atherogenic? *West J Med* 1994, 160: 153-164
- [112] Langer T, Strober W, Levy RI. The metabolism of low density lipoprotein in familial type II hyperlipoproteinaemia. *J Clin Inv* 1972, 51: 1528-1536
- [113] Goldstein JL, and Brown MS. Familial Hypercholesterolaemia : identification of a defect in the regulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase activity associated with overproduction of cholesterol. *Proc Natl Acad Sci USA* 1973, 70: 2804-2808
- [114] Gofman JW, De Lalla O, Glazier F, Freeman NK, Lindgren FT, Nickols AV, Strisower EH, Tamplin AR. The serum lipoprotein transport system in health, metabolic diseases, atherosclerosis and coronary artery disease. *Plasma* 1954, 2: 413-484
- [115] Brown MS, and Goldstein JL. Receptor-mediated control of cholesterol metabolism. *Science* 1976, 191: 150-154
- [116] Brown MS, Kovanen PT, Goldstein JL. Evolution of LDL receptor concept from cultured cells to intact animals. *Ann NY Acad Sci* 1980, 348: 48-68



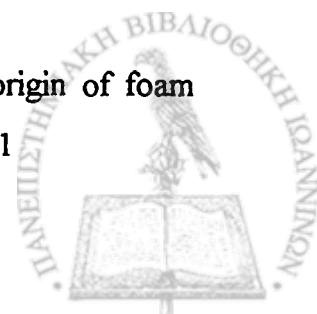
- [117] Goldstein JL, Brown MS. The LDL receptor locus and the genetics of familial hypercholesterolaemia. *Ann Rev Genet* 1979, 13: 259-289
- [118] Thompson GR. Familial hypercholesterolaemia: overcoming the metabolic defect. In : *Atherosclerosis, Vol VII* (eds) Fidge NH, Nestel PJ, Elsevier, Amsterdam 1986, 177-180
- [119] Goldstein JL, Brown MS. Progress in understanding the LDL receptor and the HMG-CoA reductase, two membrane proteins that regulate the plasma cholesterol. *J Lipid Res* 1985, 25: 1450-1461
- [120] Lehrman MA, Schneider WJ, Sudhof TC, Brown MS, Goldstein JL, Russell DW. Mutation in LDL receptor :Alu-Alu recombinant deletes exons encoding transmembrane and cytoplasmatic domains. *Science* 1985, 227: 140-146
- [121] Shepherd J, Bicker S, Lorimer AR, Packard CJ. Receptor mediated low density lipoprotein catabolism in man. *J Lipid Res* 1979, 20: 999-1006
- [122] Packard CJ, Third JL, Shepherd J, Lorimer AR, Morgan HG, Lawrie TD. Low density lipoprotein metabolism in a family of familial hypercholesterolaemic patients. *Metabolism* 1976, 25: 995-1006
- [123] Kesaniemi YA and Grundy SM. Contribution of apoprotein B production rate in the regulation of lipoprotein levels in man. In *Atherosclerosis Vol VI* (eds Schettler FG, Gotto AM, Middlehoff G, Habenicht AJR and Jurutka KR), Springer-Verlag, Berlin 1983, 571-575
- [124] Slack J. Risks of ischaemic heart disease in familial hyperlipoproteinaemia states. *Lancet* 1969, 2: 1380-1382
- [125] Allen JM, Thompson GR, Myant NB, Steiner R, Oakley CM. Cardiovascular complications of homozygous familial hypercholesterolaemia. *Br Heart J* 1980, 44: 361-368
- [126] Ribiero P., Shapiro LM, Gonzalez A, Thompson GR, Oakley CM. Cross sectional echocardiographic assessment of the aortic root and coronary ostial stenosis in familial hypercholesterolaemia. *Br Heart J* 1983, 50: 432-437



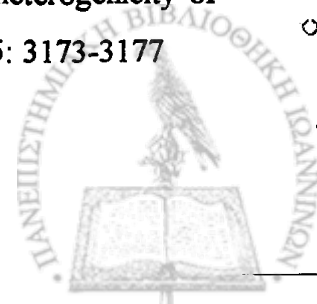
- [127] Otti J, Schrott HG, Goldstein JL, Hazzard WR, Allen FH Jr, Falk CT, Motulsky AG. Linkage studies in a large kindred with familial hypercholesterolaemia. *Am J Hum Genet* 1974, 26: 598-608
- [128] Berg K, Heiberg A. Linkage studies on familial hyperlipoproteinaemia with xanthomatosis : normal lipoprotein markers and the C3 polymorphism. *Cytogenet Cell Genet* 1976, 16: 294-297
- [129] Fuster V, Batimon L, Badimon J, Chesebro JH. The pathogenesis of coronary artery disease and the acute coronary syndromes. *N Engl J Med* 1992, 326: 242-250, 310-318
- [130] Zhang Y, Cliff WJ, Schoeft GI, Higgins G. Plasma protein insudation is an index of early coronary atherogenesis. *Am J Pathol* 1993, 143: 496-506
- [131] Yla-Herttuala S, Lipton BA, Rosenfeld ME, Sarkioja T, Yoshimura T, Leonard EJ, Witztum JL, Steinberg D. Expression of monocyte chemoattractant protein 1 in macrophage rich areas of human and rabbit atherosclerotic lesions. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991, 88: 5252-5256
- [132] Ross, R. The pathogenesis of atherosclerosis: A perspective for the 1990's. *Nature*. 1993, 362: 801-809
- [133] Steinberg D, Parthasarathy S, Carew TE, Khoo JC, Witztum JL. Beyond cholesterol: Modifications of low density, lipoprotein that increase atherogenicity. *N Engl J Med* 1989, 320: 915-924
- [134] Rekhter MD, and Gordon D. Cell proliferation and collagen synthesis are two independent events in human atherosclerotic plaques. *J Vasc Res* 1994, 31: 280-286
- [135] Yla-Herttuala S, Rosenfeld ME, Parthasarathy S, Sarkioja T, Sigal E, Witztum JL, Steinberg D. Gene expression in macrophage-rich human atherosclerotic lesions: 15-lipoxygenase and acetyl-LDL receptor mRNA colocalize with oxidation specific lipid-protein adducts. *J Clin Invest* 1991, 87: 1146-1152
- [136] Witztum JL. The oxidation hypothesis of atherosclerosis. *Lancet* 1994, 344: 793-795



- [137] Demer LL, Watson KE, Borstrom K. Mechanism of calcification in atherosclerosis. *Trends Cardiovasc Med* 1994, 4: 45-49
- [138] Berliner JA, Navab M, Fogelman AM, Frank JS, Demer LL, Edwards PA, Watson AD, Lusis AJ. Atherosclerosis : basic mechanisms : oxidation, inflammation, and genetics. *Circulation* 1995, 91: 2488-2496
- [139] Rabbani LE, Loscanzo J. Recent observations on the role of hemostatic determinants in the development of the atherothrombotic plaque. *Atherosclerosis* 1994, 105: 1-7
- [140] Fernandez-Ortiz A, Falk E. Role of thrombosis in atherosclerosis and its implications. *J Am Coll Cardiol* 1994, 23: 1562-1569
- [141] Esterbauer H, Dieber-Rotheneder M, Waeg G, Striegl G, Jurgens G. Biochemical, structural and functional properties of oxidized low-density lipoprotein. *Chemical Res Toxicol* 1990, 3: 77-92
- [142] Jurgens G, Hoff HF, Chisolm GM, Esterbauer H. Modification of human serum low density lipoprotein by oxidation-Characterization and pathophysiological implications. *Chem Phys Lipid* 1987, 45: 315-336
- [143] Esterbauer H, Rotheneder M, Striegl G, Waeg G, Ashy A, Sattler W, Jurgens G. Vitamin E and other lipophilic antioxidants protect LDL against oxidation. *Fat Sci Technol* 1989, 91: 316-324
- [144] Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: An update. *N Engl J Med* 1986, 314: 488-500
- [145] Flower S, Shio H, Haley NJ. Characterisation of lipid laden aortic cells from cholesterol fed rabbits. IV. Investigation of macrophage like properties of aortic cell populations. *Lab Inv* 1979, 41: 372-378
- [146] Gerrity RG. The role of the monocyte in atherogenesis. Transition of blood-borne monocytes into foam cells in fatty lesions. *Am J Pathol* 1981, 103: 181-190
- [147] Aqel NM, Ball RY, Waldman H, Mitchinson MJ. Monocyte origin of foam cells in atherosclerotic plaques. *Atherosclerosis* 1984, 53: 265-271



- [148] Rosenfeld ME, Tsukada T, Gown AM, Ross R. Fatty streak initiation in WHHL and comparably hypercholesterolemic fat-fed rabbits. *Arteriosclerosis* 1987, 7: 9-23
- [149] Wissler RW. Progression and regression of atherosclerotic lesions. *Adv Exp Med Biol* 1978, 104: 77-109
- [150] Goldstein JL, Ho YK, Basu SK, Brown MS. Binding site on macrophages that mediates uptake and degradation of acetylated low density lipoprotein, producing massive cholesterol deposition. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979, 76: 333-337
- [151] Gianturco SH and Bradley WA. Lipoprotein receptors. In *Plasma lipoproteins* (Eds) Gotto AM, Elsevier Publishers BV, Amsterdam 1987, 183-220
- [152] Brown MS, Basu SK, Falck JR, Ho YK Goldstein JL. The scavenger cell pathway for lipoprotein degradation: Specificity of the binding site that mediates the uptake of the negatively-charged LDL by macrophages. *J Supramol Struct* 1980, 13: 67-81
- [153] Haberland ME, Olch CL, Fogelman AM. Role of lysines in mediating interaction of modified low density lipoproteins with scavenger receptor of human monocyte macrophages. *J Biol Chem* 1984, 259: 11305-11311
- [154] Fogelman AM, Shechter I, Saeger J, Hokom M, Child JS, Edwards PA. Malondialdehyde alteration of low density lipoproteins leads to cholesteryl ester accumulation in human monocyte-macrophages. *Proc Natl Acad Sci USA* 1980, 77: 2214-2218
- [155] Haberland ME, Fogelman AM, Edwards PA. Specificity of receptor mediated recognition of malondialdehyde modified low density lipoprotein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1982, 79: 1712-1716
- [156] Haberland ME, Fogelman AM. The role of altered lipoproteins in the pathogenesis of atherosclerosis. *Am Heart J* 1987, 113: 573-577
- [157] Schuh J, Fairclough GF Hashemeyer RH. Oxygen-mediated heterogeneity of apo-low-density lipoprotein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1978, 75: 3173-3177



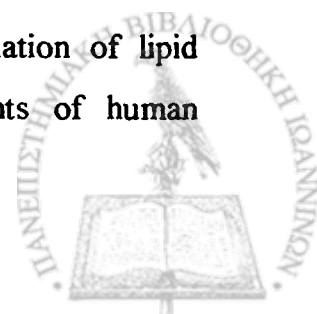
- [158] Steinbrecher UP, Parthasarathy S, Leake DS, Witztum JL, Steinberg D. Modification of low density lipoprotein by endothelial cells involves lipid peroxidation and degradation of low density lipoprotein phospholipids. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984, 81: 3883-3887
- [159] Fong LG, Parthasarathy S, Witztum JL, Steinberg D. Nonenzymatic oxidative cleavage of peptide bonds in apoprotein B 100. *J Lipid Res* 1987, 28: 1466-1477
- [160] Hessler JR, Morel DW, Lewis LJ, Chisolm GM. Lipoprotein oxidation and lipoprotein induced cytotoxicity. *Arteriosclerosis* 1983, 3: 215-222
- [161] Hoff HF, Chisolm GM, Morel DW, Jurgens G, Esterbauer H. Chemical and functional changes in LDL following modification by 4-hydroxynonenal. In: Cerutti PA, McCord JM and Fridovich T, eds. *Oxy-radicals in molecular biology and pathology*. New York: Alan R Liss 1988: 459-472
- [162] Hoff HF, O'Neil JA. Oxidation of LDL : Role in atherogenesis. *Klin Wochenschr* 1991, 69: 1032-1038
- [163] Morel DW, DiCorleto PE, Chisolm GM. Endothelial and smooth muscle cells alter low density lipoprotein in vitro by free radical oxidation. *Arteriosclerosis* 1984, 4: 357-364
- [164] 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
- [165] Kaneko T, Kaji K, Matsuo M. Cytotoxicities of a linoleic acid hydroperoxide and its related aliphatic aldehydes toward cultured human umbilical vein endothelial cells. *Chem-Biol Interact* 1988, 67: 295-304
- [166] Quinn MT, Parthasarathy S, Fong L, Steinberg D. Oxidatively modified low density lipoproteins: A potential role in recruitment and retention of monocyte/macrophages during atherogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987, 84: 2995-2998



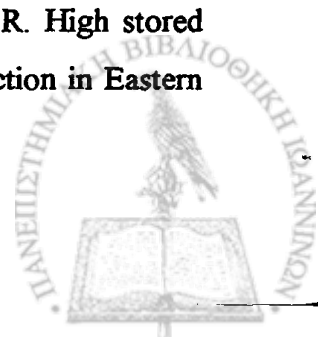
- [167] Goto Y. Lipid peroxides as a cause of vascular disease. In: *Lipid Peroxides in Biology and Medicine* (eds Yagi K) Academic Press, Orlando San Diego and San Francisco 1982, 295-303
- [168] De Graaf J, Hak-Lemmers HLM, Hectors MPL, Demacker PNM, Hendriks JCM, Stalenhoer AFH. Enhanced susceptibility to in vitro oxidation in healthy subjects. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1991, 11: 298-306
- [169] Dejager S, Bruckert E, Chapman MJ. Dense LDL subspecies with diminished oxidative resistance predominate in combined hyperlipidaemia. *J Lipid Res* 1993, 34: 295-308
- [170] Aviram M, Lund-Katz S, Phillips MC, Chait A. The influence of triglyceride content of low density lipoprotein on the interaction of apolipoprotein B-100 with cells. *J Biol Chem* 1988, 263: 16842-16848
- [171] Kinoshita M, Krul ES, Schonfeld G. Modification on the core lipids of low density lipoproteins produces selective alterations in the expression of apo B-100 epitopes. *J Lipid Res* 1990, 31: 701-708
- [172] De Graaf J, Swinkels DW, Haan AFJ, Demacker PNM, Stalenhoef AFH. Both inherited susceptibility and environmental exposure determine the low density lipoprotein subfraction pattern distribution in healthy Dutch families. *Am J Hum Genet* 1992, 51: 1295-1310
- [173] Jialal I, Freeman DA, Grundy SM. Varying susceptibility of different low density lipoproteins to oxidative modification. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1991, 11: 482-488
- [174] De Graaf J, Hendricks JCM, Demacker NM, Stalenhoef AFH. Identification of multiple dense LDL subfractions with enhanced susceptibility to in vitro oxidation among hypertriglyceridemic subjects. Normalization after Clofibrate treatment. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1993, 13: 712-719
- [175] Tribble DL, Holl GL, Wood PD, Krauss RM. Variations in oxidative susceptibility among six low density lipoprotein subfractions of differing density and particle size. *Atherosclerosis* 1992, 93: 189-199



- [176] Tribble DL, Van den Berg JJM, Motchik PA, Ames BN, Lewis DM, Chait A, Krauss RM. Oxidative susceptibility of low density lipoprotein subfractions is related to their ubiquinol-10 and α -tocopherol content. *Proc Natl Acad Sci* 1994, 91: 1183-1187
- [177] Reaven PD, Crasse BJ, Tribble DL. Effects of linoleate enriched and oleate enriched diets in combination with alpha tocopherol on the susceptibility of LDL and LDL subfractions to oxidative modification in humans. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1994, 14: 557-566
- [178] Chait A, Brazg R.L, Tribble DL, Krauss R.M. Susceptibility of small dense LDL to oxidative modification in subjects with atherogenic lipoprotein phenotype, pattern B. *Am J Med* 1993, 94: 350-356
- [179] Jansen H, Ghanem H, Kuypers JHSAM, Birkenhager JC. Autoantibodies against malondialdehyde-modified LDL are elevated in subjects with an LDL subclass pattern B. *Atherosclerosis* 1995, 255-262
- [180] Napoli C, Postiglione A, Triggiani M, Corso G, Palumbo G, Carbone V, Ruocco A, Ambrosio G, Montefusco S, Malorni A, Condorello M. Oxidative structural modifications of low density lipoprotein in homozygous familial hypercholesterolemia. *Atherosclerosis* 1995, 259-273
- [181] Raal FG, Areias AJ, Waisberg R, von Arb M. Susceptibility of low density lipoprotein to oxidation in familial hypercholesterolemia. *Atherosclerosis* 1995, 115: 9-15
- [182] Esterbauer H, Jurgens G, Quehenberger O, Koller E. Autoxidation of human low density lipoproteins: loss of polyunsaturated fatty acids and vitamin E and generation of aldehydes. *J Lipid Res* 1987, 28: 495-509
- [183] Brown MS and Goldstein JL. Lipoprotein metabolism in the macrophage: implications for cholesterol deposition in the Atherosclerosis. *Ann Rev Biochem* 1983, 52: 223-261
- [184] Smith CA, Mitchinson MJ, Ajuoma OI, Halliwell B. Stimulation of lipid peroxidation and hydroxyl-radical generation by the contents of human atherosclerotic lesions. *Biochem J* 1992, 286: 901-905



- [185] Parthasarathy S, Wieland E, Steinberg D. A role of endothelial cell lipoxygenase in the oxidative modification of low density lipoprotein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987, 86: 1046-1050
- [186] Sparrow CP, Olszewski J. Cellular oxidative modification of low density lipoprotein does not require lipoxygenases. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992, 89: 128-131
- [187] Christen S, Thomas SR, Garner B, Stocker R. Inhibition by interferon γ of human mononuclear cell mediated low density lipoprotein oxidation. Participation of tryptophan metabolism along the kynurenine pathway. *J Clin Invest* 1994, 93: 2149-2158
- [188] Heinecke JW, Rosen H, Chait A. Iron and copper promote modification of low density lipoprotein by human arterial smooth muscle cells in culture. *J Clin Invest* 1984, 74: 1890-1894
- [189] Ehrenwald E, Chisolm G, Fox PL. Intact ceruloplasmin oxidatively modifies low density lipoprotein. *J Clin Invest* 1994, 93: 1493-1501
- [190] Balla G, Jacob HS, Eaton JW, Belcher JD, Versellotti GM. Hemin: A possible physiological mediator of low density lipoprotein oxidation and endothelial injury. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1991, 11: 1700-1711
- [191] Aasa R, Malmstrom BG, Saltman P, Vanngard T. The specific binding of iron (III) and copper (II) to transferrin and conalbumin. *Biochim Biophys Acta* 1963, 75: 203-222
- [192] Thomas CE. The influence of medium components on Cu-dependent oxidation of low density lipoproteins and its sensitivity to superoxide dismutase. *Biochim Biophys Acta* 1992, 1128: 50-57
- [193] Peters TJr, Blumenstock FA. Copper binding properties of bovine serum albumin and its amino-terminal peptide fragment. *J Biol Chem* 1967, 242: 1574-1578
- [194] Salonen JT, Nyyssonen K, Korpela H, Tuomilehto J, Salonen R. High stored iron levels are associated with excess risk of myocardial infarction in Eastern Finnish men. *Circulation* 1992, 86: 803-811



- [195] Sempos CT, Looker AC, Gillum RF, Makue DM. Body iron stores and the risk of coronary heart disease. *N Engl J Med* 1994, 330: 1119-1124
- [196] Ascherio A, Willet WC. Are body iron stores related to the risk of coronary heart disease? *N Engl J Med* 1994, 330: 1152-1154
- [197] Bothwell TH, Charlton RW, Cook JD, Finch CA. Iron metabolism in man. Oxford: Blackwell Scientific Pub 1979
- [198] Grootveld M, Bell J, Halliwell B, Aruoma OI, Bomford A, Sadlar PJ. Non transferin bound iron in plasma and serum from patients with idiopathic hemochromatosis. *J Biol Chem* 1989, 264: 4417-4422
- [199] Danks DM. Disorders of copper transport. In Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, (Eds) *The metabolic basis of inherited disease*, 6th ed, NY: McGraw-Hill, Inc 1989, 1411-1422
- [200] Vanlenten BJ, Prieve J, Navab M, Hama S, Lusic AJ, Fogelman AM. Lipid induced changes in intracellular iron homeostasis in vitro and in vivo. *J Clin Inv* 1995, 2104-2110
- [201] Cominacini L, Garbin U, Davoli A, Micciolo R, Bosselo O, Gaviraghi G, Scuro LA, Pastorino AM. A simple test for predisposition to LDL oxidation based on the fluorescence development during copper-catalyzed oxidative modification. *J Lipid Res* 1991, 32; 349-358
- [202] Krilov D, Pifat G, Herak JN. Electron spin resonance spin-trapping study of peroxidation of human low density lipoproteins. *Can J Chem* 1988, 66: 1957-1960
- [203] Kalyanaraman B, Antholine WE, Partasarathy S. Oxidation of low-density lipoprotein by Cu^{++} and lipoxygenase. An electron spin resonance study. *Biochim Biophys Acta* 1990, 1035: 286-292
- [204] Witztum J. Role of oxidized low density lipoprotein in atherogenesis. *Br Heart J* 1993, 69 (suppl) S12-18



- [205] Steinbrecher UP. Role of low density lipoprotein oxidation in foam cell formation. In: Crastes de Paulet, A., Douste-Blazy, L. and Paoletti, R., eds. Free radicals, lipoproteins and membrane lipids. New York: Plenum Press 1990: 193-202
- [205α] Berliner JA, Heinecke JW. The role of oxidised lipoproteins in atherogenesis. Free Rad Biol Med 1996, 5: 7-7-727
- [206] Steinbrecher UP, Witztum JL, Parthasarathy S, Steinberg D. Decrease in reactive amino groups during oxidation or endothelial cell modification of LDL. Arteriosclerosis 1987, 7: 135-143
- [206α] Holvoet P and Desire C. Oxidized lipoproteins in Atherosclerosis and thrombosis. FASEB J 1994, 8: 1279-1284
- [207] Steinbrecher UP. Oxidation of human low density lipoprotein results in derivatisation of lysine residues of apolipoprotein B by lipid peroxide decomposition products. J Biol Chem 1987, 262: 3603-3608
- [207α] Shimano H, Yamada N, Ishibashi S, Mokuno H, Mori N, Gotoda T, Harrada K, Akanuma Y, Murase T, Yasaki Y, Takaku F. Oxidation labile subfraction of human low density lipoprotein isolated by ion exchange chromatography. J Lipid Res 1991, 32: 763-773
- [208] Williams RR, Hunn SC, Hopkins PN, Stults BM, Wu LL, Hasstedt SJ, Barlow GK, Stephenson SH, Lalouel JM, Kuida H. Familial dyslipidemic hypertension. Evidence from 58 Utah families for a syndrome present in approximately 12% of patients with essential hypertension. JAMA 1988, 259: 3379-3386
- [209] Tribble, DL, Krauss, RM, Lansberg MG, Thiel PM, van der Berg JJM. Greater oxidative susceptibility of the surface monolayer in small dense LDL may contribute to differences in copper induced oxidation among LDL density subfractions. J Lipid Res 1995, 36: 662-671
- [210] Cassolato G, Avogaro P, Bittolo-Bon G. Characterization of a more electronegatively charged LDL subfraction by ion exchange HPLC. Free Radic Biol Med 1991, 11: 247-253



- [211] Hodis HN, Kramsch DM, Avogaro P, Bittolo-Bon G, Cassolato G, Hwang J, Peterson H, Sevanian A. Biochemical and cytotoxic characteristics of an in vivo circulating oxidized low density lipoprotein (LDL). *J Lipid Res* 1994, 35: 669-677
- [212] Steinberg D, Lewis A. Conner memorial lecture. Oxidative modification of LDL and atherogenesis. *Circulation* 1997, 95: 1062-1071
- [213] Yla-Herttuala S, Palinski W, Rosenfeld ME, Steinberg D, Witztum JL. Lipoproteins in normal and atherosclerotic aorta. *Eur Heart J* 1990, 11: (Suppl E) 88-99
- [214] Yla-Herttuala S, Palinski W, Rosenfeld ME, Parthasarathy S, Carew TA, Butler SW, Witztum JL, Steinberg D. Evidence for the presence of oxidatively modified low density lipoprotein in atherosclerotic lesions of rabbit and man. *J Clin Invest* 1989, 84: 1086-1095
- [215] Yla-Herttuala S. Macrophages and oxidized low density lipoproteins in the pathogenesis of atherosclerosis. *Ann Med* 1991, 23: 561-567
- [216] Woolf N. Endothelial alterations in atherogenesis. In: *Pathology of atherosclerosis* (Woolf N, eds) Butterworth and Company, London 1982, 261-285
- [217] Holland JA, Pritchard KA, Rogers NJ, Stemerman MB. Atherogenic levels of low density lipoprotein increase endocytotic activity in cultured human endothelial cells. *Am J Pathol* 1992, 140: 551-558
- [218] Carlos TM and Harlan JM. Membrane proteins involved in phagocyte adherence to endothelium. *Immunol Rev* 1990, 114: 5-28
- [219] Rajavashisth TB, Andalibi A, Territo MC, Berliner JA, Navab M, Fogelman AM, Lusis AJ. Induction of endothelial cell expression of granulocyte and macrophage colony-stimulating factors by modified low density lipoproteins. *Nature* 1990, 344: 254-257



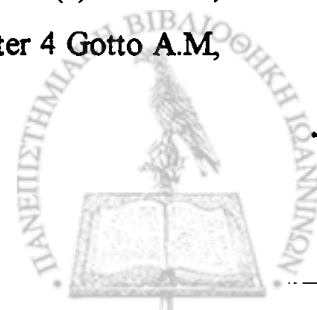
- [220] Ishibash S, Inaba T, Shimano H, Harada K, Inoue I, Mokuno H, Mori N, Gotoda T, Takaku F, Yamada N. Monocyte colony stimulating factor enhances uptake and degradation of acetylated low density lipoproteins and cholesterol esterification in human monocyte derived macrophages. *J Biol Chem* 1990, 265: 14109-14117
- [221] Linder V, Lappi DA, Baird A, Majack RA, Reidy MA. Role of basic fibroblast growth factor in vascular lesion formation. *Circ Res* 1991, 68: 106-113
- [222] Chin JH, Azhar S, Hoffman BB. Inactivation of endothelial derived relaxing factor by oxidized lipoproteins. *J Clin Inv* 1992, 89: 10-18
- [223] Boulanger CM, Tanner FC, Bea ML, Hahn AWA, Werner A, Luscher TF. Oxidized low density lipoproteins induce messenger RNA expression and release of endothelin from human and porcine endothelium. *Circ Res* 1992, 70: 1191-1197
- [224] Weisser B, Locher R, Mengden T, Vetter W. Oxidation of low density lipoprotein enhances its potential to increase intracellular free calcium concentration in vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1992, 12: 231-236
- [225] Burke TM, Sandstrom PA. Oxidative stress as a mediator of apoptosis. *Immunol Today* 1994, 15: 7-10
- [226] Schroit AJ, Tanaka Y, Madsen J, Fidler IJ. The recognition of red blood cells by macrophages: role of phosphatidylserine and possible implications of membrane phospholipid asymmetry. *Biol Cell* 1984, 51: 227-238
- [227] McEvoy L, Williamson P, Schlegel RA. Membrane phospholipid asymmetry as a determinant of erythrocyte recognition by macrophages. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986, 83: 3311-3315
- [228] Devaux PE, Zachowski A, Morrot G, Gribier S, Fellmann P, Geldwerth D, Bithol M, Herve P. Control of the transmembrane phospholipid distribution in eukaryotic cells by aminophospholipid translocase. *Biotechnol Appl Biochem* 1990, 12: 517-522



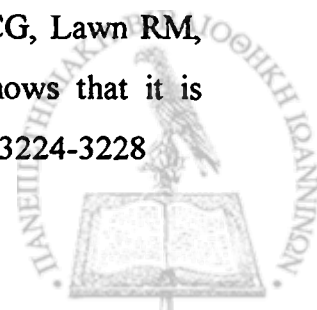
- [229] Armstrong DA. Oxidized LDL ceroid and prostaglandin metabolism in human Atherosclerosis. *Med Hypotheses* 1992, 38: 244-248
- [230] Weis JR, Pitas RE, Wilson BD, Rodgers GM. Oxidized low-density lipoprotein increases cultured human endothelial cell tissue factor activity and reduces protein C activation. *FASEB J* 1991, 5: 2459-2465
- [231] Hamsten A, deFaire U, Walldius G, Dahlen G, Szamosi A, Landau C, Blomback M, Wiman B. Plasminogen activator inhibitor in plasma: risk factor for recurrent myocardial infraction. *Lancet* 1987, 2: 3-9
- [232] Kugiyama K, Sakamoto T, isumi I, Sugiyama S, Ohgushi M, Ogawa H, Horiguchi M, Yasue H. Transferable lipids in oxidized low density lipoprotein stimulate plasminogen activator inhibitor-1 and inhibit tissue type plasminogen activator release from endothelial cells. *Circ Res* 1993, 73: 335-343
- [233] Esterbauer H, Puhl H, Dieber-Rotheneder M, Waeg G, Rabl H. Effect of antioxidants on oxidative modification of LDL. *Annals Med* 1991, 23: 573-581
- [234] Reaven PD, Khouw A, Beltz WF, Parthasarathy S, Witztum JL. Effect of dietary antioxidant combinations in humans. Protection of LDL by vitamin E but not by β -carotene. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1993, 13: 590-600
- [235] Rimm EB, Stampfer MJ, Ascherio A, Giovannucci E, Colditz GA, Willet WC. Vitamin E consumption and the risk of coronary heart disease in men. *N Engl J Med* 1993, 328: 1450-1456
- [236] Stampfer MJ, Hennekens CH, Manson JE, Colditz GA, Rosner B, Willet WC. Vitamin E consumption and the risk of coronary heart disease in women. *N Engl J Med* 1993, 328: 1444-1449
- [237] Stephens NG, Parsons A, Schofield PM, Kelly F, Cheeseman K, Mitchinson MJ, Brown MJ. Randomised controlled trial of vitamin E patients with coronary disease: Cambridge Heart Antioxidant Study (CHAOS). *Lancet* 1996, 347: 781-785



- [238] Freeman M, Ekkel Y, Rohrer L, Penman M, Freedman NJ, Chisolm GM, Krieger M. Expression of type I and type II bovine scavenger receptors in Chinese hamster ovary cells: lipid droplet accumulation and nonreciprocal cross competition by acetylated and oxidized low density lipoprotein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991, 88: 4931-4935
- [239] Reaven P, Parthasarathy S, Grasse BJ, Miller E, Almazan F, Mattson FH, Khoo JC, Steinberg D, Witztum JL. Feasibility of using an oleate rich diet to reduce the susceptibility of low density lipoprotein to oxidative modification in humans. *Am J Clin Nutr* 1991, 54: 701-706
- [240] Bennett MR, Evan GL, Schwartz SM. Apoptosis of human vascular smooth muscle cells derived from normal vessels and coronary atherosclerotic plaques. *J Clin Inv* 1995, 95: 2266-2274
- [241] Omenn GS, Goodman GE, Thornquist MD, Balmes J, Cullen MR, Glass A, Keogh JP, Heyskens FL, Valanis B, Williams JH Jr, Barnhart S, Hamman S. Effects of a combination of beta carotene and vitamin A on lung cancer and cardiovascular disease. *N Engl J Med* 1996, 334: 1150-1155
- [242] Berg K. The Lp system. *Ser Haematol*. 1968, 1:111-136
- [243] Seegers W, Hirschorn K, Burnett L, Robson E, Harris H. *Science* 1965, 149:303-304
- [244] Dahlen G, Ericson C, Furberg C, Lundkvist L, Svardsudd K. Studies on an extra pre-beta lipoprotein fraction. *Acta Med Scand Suppl*. 1972, 531:5-9
- [245] Albers JJ, Cabana VG, Warnick GR. Lp(a) lipoprotein: Relationship to sinking pre- β lipoprotein, hyperlipoproteinemia and apolipoprotein B. *Metabolism* 1975, 24:1047-1054
- [246] Lawn RM. Lipoprotein(a) in heart disease. *Scientific American* June 1992
- [247] 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
- [248] Morrisett JD, Guyton JR, Gaubatz JW, Gotto AM Jr. Lipoprotein (a): structure, Metabolism and epidemiology. In: *Plasma Lipoproteins*. Chapter 4 Gotto A.M, Jr (Eds), Elsevier Science Publishers B.V. 1987, 129-152



- [249] Jurgens G, Marth E, Kostner G and Holasek A. *Artery* 1977, 3:13-26
- [250] Gaubatz JW, Heidermann C, Gotto AM, Jr, Morrisett JD and Dahlen GH. Human plasma lipoprotein [a]. Structural properties. *J Biol Chem* 1983, 258:4582-4589
- [251] Karmansky I and Gruener N. Structure and possible biological roles of Lp(a). *Clin Biochem* 1994, 27:3:151-162
- [252] Armstrong VW, Walli AK, Seidel D. Isolation, characterisation and uptake in human fibroblasts of an apo (a) free lipoprotein obtained on reduction of lipoprotein (a). *J Lipid Res* 1985, 26:1314-1324
- [253] Utermann G, Menzel HJ, Kraft HG, Dubatt C, Kemmler HG, Seitz C. Lp(a) glycoprotein phenotypes. Inheritance and relation to Lp(a)-lipoprotein concentrations in plasma. *J Clin Inv* 1987, 80: 458-465
- [254] 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 apo B-100 in human lipoprotein (a). (abstr) The second International Conference on lipoprotein (a) 1992, 19
- [255] Howard G and Pizzo S. Biology of disease, Lipoprotein (a) and its role in atherothrombotic disease. *Laboratory Investigation* 1993, 69: 4:373-385
- [256] Fless GM, ZumMallen ME, Scanu AM. Physicochemical properties of apolipoprotein (a) and lipoprotein (a) derived from the dissociation of human plasma lipoprotein (a). *J Biol Chem* 1986, 261:8712-8718
- [257] Fless GM, Rolih CA, Scanu AM. Heterogeneity of human plasma lipoprotein (a). *J Biol Chem* 1984, 259:11470-11478
- [258] Koschinsky ML, Beisiegel U, Henne-Bruns D, Eaton DL, Lawn RM. Apolipoprotein (a) size heterogeneity is related to variable number of repeat sequences in its mRNA. *Biochemistry* 1990, 29:640-644
- [259] Gaubatz JW, Chari MV, Nava ML, Guyton JR, Morrisett JD. Isolation and characterisation of the two major apoproteins in human lipoprotein (a). *J Lipid Res* 1987, 28:76-79
- [260] Eaton DL, Fless GM, Kohr WJ, Mc Lean JW, Xu Q, Miller CG, Lawn RM, Scanu AM. Partial amino acid sequence of apoprotein (a) shows that it is homologous to plasminogen. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987, 84:3224-3228



- [261] Mc Lean JW, Tomlinson JE, Kuang W, Eaton DL, Chen EY, Fless GM, Scanu AM, Lawn RM. cDNA sequence of human apolipoprotein (a) is homologous to plasminogen. *Nature (London)* 1987, 330:132-137
- [262] Patthy L. Evolution of the proteases of blood coagulation and fibrinolysis by assembly from modules. *Cell* 1985, 41: 657-663
- [263] Morrisett JD, Gaubatz JW, Knapp RD, Guevara LG Jr. Structural properties of apo (a) : a major apoprotein of human lipoprotein (a). In: *Lipoprotein (a)*. (Eds) AM Scanu, San Diego :Academic Press Inc, 1990, 53-74
- [264] Gaw A, Hobbs HH. Molecular genetics of lipoprotein (a) : new pieces to the puzzle. *Curr Opin Lipidol* 1994, 5:149-155
- [265] White AL, Lanford RE. Biosynthesis and Metabolism of lipoprotein (a). *Curr Opin Lipidol* 1995, 6: 75-80
- [266] Kratzin H, Armstrong VW, Niehaus M, Hilschmann N, Seidel D. Structural relationship of an apolipoprotein (a) phenotype (570 kDa) to plasminogen: homologous kringle domains are linked by carbonate-rich regions. *Biol Chem Hoppe-Seyler* 1987, 368:1533-1544
- [267] Fless GM, Snyder ML, Furbee JW, Garcia-Hedo MT, Mora R: Subunit composition of lipoprotein (a) protein. *Biochemistry* 1994, 33:13492-13501
- [268] Lackner C, Cohen JC, Hobbs HH. Molecular definition of the extreme size polymorphism in apolipoprotein (a). *Hum Mol Genet* 1993, 2:933-940
- [269] van der Hoek YY, Wittekoek ME, Beisiegel 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, 2:361-366
- [270] Marcovina SM, Zhang ZH, Gaur 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: 1192-1196
- [271] Gaubatz JW, Ghanem KI, Guevara J Jr, Nava ML, Patsch W, Morrisett JD. Polymorphic forms of human lipoprotein (a) : Inheritance and relationship of their molecular weights to plasma levels of lipoprotein (a). *J Lipid Res* 1990, 31:603-613
- [272] Utermann G. The mysteries of Lipoprotein(a). *Science*1989;246:904-910



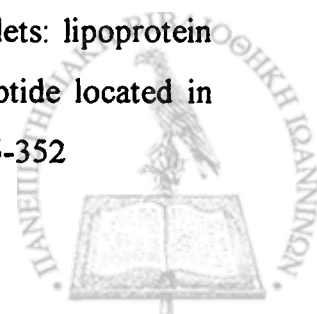
- [273] Boerwinkle E, Menzel HJ, Kraft HG, Utermann G. Genetics of the quantitative Lp(a) lipoprotein trait III. Contribution of Lp(a) glycoprotein phenotypes to normal lipid variations. *Hum Genet* 1989, 82:73-78
- [274] Boerwinkle E, Leffert CC, Lin J, Lackner C, Chiesa G, Hobbs HH. Apolipoprotein (a) gene accounts for greater than 90% of the variation in plasma lipoprotein (a) concentrations. *J Clin Inv* 1992, 90: 52-60
- [275] Magnaghi P, Citterio E, Malgaretti N, Ottolenghi S, Taramelli R. Molecular characterisation of the human apo (a)-plasminogen gene family clustered on the telomeric region of chromosome 6 (6q26-27). *Hum Mol Genet* 1994, 3:437-442
- [276] Byrne CD, Schwartz K, Meer K, Cheng J-F, Lawn RM. The human apolipoprotein (a)/plasminogene gene cluster contains a novel homologue transcribed in liver. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1994, 14:534-541
- [277] Krembler F, Kostner GM, Bolzano K, Sandhofer F. Turnover of lipoprotein (a) Lp(a) in man. *J Clin Inv* 1980, 65:1483-1490
- [278] Gaw A, Boerwinkle E, Cohen JC, Hobbs HH. Comparative analysis of the apo(a) gene, apo(a) glycoprotein and plasma concentrations of Lp(a) in three ethnic groups. Evidence for no common 'null' allele at the apo(a) locus. *J Clin Inv* 1994, 93:2526-2534
- [279] White AL, Hixon 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, 269:9060-9066
- [280] Frank S, Durovic S, Kostner GM. The assembly of lipoprotein Lp(a). *Europ J Clin Inv* 1996, 26:109-114
- [281] Koschinsky ML, Tomlinson JE, Zioncheck TF, Schwartz K, Eaton DL, Lawn RM. Apolipoprotein (a) :expression and characterization of a recombinant form of the protein in mammalian cells. *Biochemistry* 1991, 30:5044-5051
- [282] White AL, Rainwater DL, Lanford RF. Intracellular maturation of apoprotein (a) and assembly of lipoprotein (a) in primary baboon hepatocytes. *J Lipid Res* 1993, 34:509-517



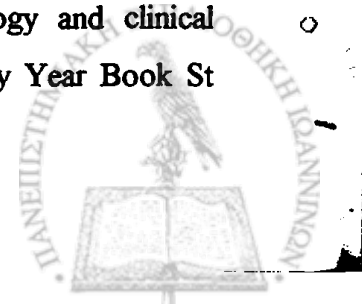
- [283] Frank S, Krasznai K, Durovic S, Loentanz EM, Dieplinger H, Wagner E, Zatloukal K, Cotten M, Utermann G, Kostner GM, et al. High level expression of various apolipoprotein (a) isoforms by «transferrinfection»: the role of kringle-IV sequences in the extracellular association with low density lipoprotein. *Biochemistry* 1994, 33:12329-12339
- [284] Sommer A, Gorges R, Kostner GM, Paltauf JF, Hermetter A. Sulfhydryl-selective fluorescence labelling of lipoprotein (a) reveals evidence for one single disulfid linkage between apo (a) and apo B-100. *Biochemistry* 1991, 30:11245-11249
- [285] Guevara J Jr, Spurlino J, Jan AY, Yang CY, Tulinsky A, Prasad BV, Gaubatz JW, Morrisett JD. Proposed mechanism for binding of apo (a) kringle type 9 to apo B-100 in human lipoprotein (a). *Biophys J* 1993, 64:686-700
- [286] Koschinsky ML, Cote GP, Gabel B, Van der Hoek YY. Identification of the cysteine residue in apolipoprotein (a) that mediates extracellular coupling with apolipoprotein B-100. *J Biol Chem* 1993, 268:19819-19825
- [287] Brunner C, Kraft HG, Utermann G, Muller HJ. Cys 4057 of apolipoprotein (a) is essential for lipoprotein (a) assembly. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993, 90:11643-11647
- [288] Durovic S, Marz W, Frank S, Scharnagl H, Baumstark MW, Zechner R, Kostner GM. Decreased binding of apolipoprotein (a) to familial defective apolipoprotein B-100 (Arg 3500 Glu). *J Biol Chem* 1994, 269: 30320-30325
- [289] 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 integrity of low density lipoproteins is a prerequisite for Lp(a) formation in human plasma. *J Clin Inv* 1994, 94:2330-2340
- [290] Gabel B, Yao Z, McLeod RS, Young SG, Koschinsky ML. Carboxyl-terminal truncation of apolipoprotein B-100 inhibits lipoprotein (a) particle formation. *FEBS Lett* 1994, 350:77-81
- [291] Liu AC, Lawn RM. Lipoprotein (a) and atherogenesis. *Trends Cardiovasc Med* 1994, 4:40-44



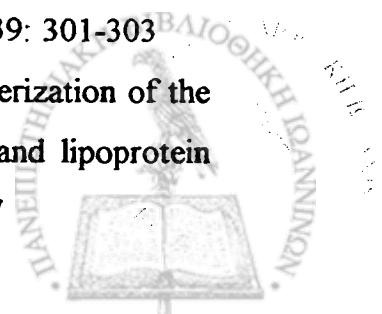
- [292] Snyder ML, Hay RV, Whittington PF, Scanu AM, Fless GM. Binding and degradation of lipoprotein (a) and LDL by primary cultures of human hepatocytes: comparison with cultured human monocyte-macrophages and fibroblasts. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1994, 14: 770-779
- [293] Utermann G, Hoppichler F, Dieplinger H, Seed M, Thompson G, Boerwinkle E. Defects in the low density lipoprotein receptor gene affect lipoprotein (a) levels : Multiplicative interaction of the two gene loci associated with premature Atherosclerosis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1989, 86:4171-4174
- [294] Hoffman SL, Eaton DL, Brown MS, McConathy WJ, Goldstein JL, Hammer RE. Overexpression of human low density lipoprotein receptors leads to accelerated catabolism of Lp(a) lipoprotein in transgenic mice. *J Clin Inv* 1990, 85:1542-1547
- [295] Kostner GM, Grillhofer H. The interaction of Lp(a) with normal and LDL-receptor deficient human skin fibroblasts. *Chem Phys Lipids* 1994, 67/68:153-159
- [296] 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, and nascent lipoproteins :role for low density lipoprotein receptors and heparan sulfate proteoglycans. *J Biol Chem* 1992, 267:13284-13292
- [297] Keesler GA, Li Y, Skiba PJ, Fless GM, Tabas I. Macrophage foam cell lipoprotein (a) /apoprotein (a) receptor : cell-surface localization, dependence of induction on new protein synthesis, and ligand specificity. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1994, 14:1337-1345
- [298] Linton MF, Farese RV Jr, Chiesa G, Grass DS, Chin P, Hammer RE, Hobbs HH, Young SG. Transgenic mice expressing high plasma concentrations of human apolipoprotein B-100 and lipoprotein (a). *J Clin Inv* 1993 92: 3029-3037
- [299] Malle E, Ibovnik A, Steinmetz A, Kostner GM, Sattler W. Identification of glycoprotein IIb as the lipoprotein (a)-binding protein on platelets: lipoprotein (a) binding is independent of an arginyl-glycyl-aspartate tripeptide located in apolipoprotein (a). *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1994, 14:345-352



- [300] Callow MJ, Stoltzfus LJ, Lawn RM, Rubin EM. Expression of human apolipoprotein B and assembly of lipoprotein (a) in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994, 91: 2130-2134
- [301] Chiesa G, Hobbs HH, Koschinsky ML, Lawn RM, Maika SD, Hammer RE. Reconstitution of lipoprotein (a) by infusion of low density lipoprotein into transgenic mice expressing human apolipoprotein (a). *J Biol Chem* 1992, 34:24369-24374
- [302] McArgraves 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 Inv* 1997, 100: 2170-2181
- [303] Kostner GM. The Physiological role of Lp(a). In : Scanu AM (eds) *Lipoprotein (a)* Academic Press Inc San Diego California 1990, 183-204
- [304] Sandholzer C, Feusser G, Brunzell J, Utrmann 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: 1985-1965
- [305] Beil Fu, Terres W, Orgass M, Greten H. Dietary fish oil lowers lipoprotein (a) in primary hypertriglyceridemia. *Atherosclerosis* 1991, 90: 95-97
- [306] Crook MA, Haq S, Chusney G, Hag M, Tutt P. Acute phase proteins and lipoprotein (a) in patients with severe hypercholesterolemia and normal subjects. *Clin Chim Acta* 1994, 224: 199-201
- [307] Dahlen GH. Incidence of Lp(a) among populations. In : *Lipoprotein (a)* Scanu AM, (Eds) Academic Press Inc San Diego California 1990, 151-173
- [308] Meeda 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
- [309] Scanu AM. Lipoprotein (a) : a potential bridge between the fields of Atherosclerosis and thrombosis. *Arch Pathol Lab Med* 1988, 112: 1045-1047
- [310] Scanu AM, Fless GM. Lipoprotein (a) : heterogeneity and biological relevance. *J Clin Inv* 1990: 1709-1715
- [311] 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



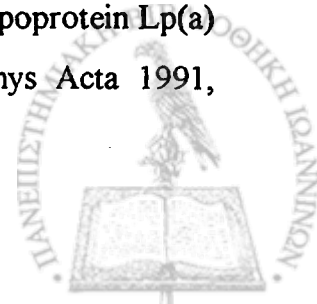
- [312] Seed M, Stubbs D, Stubbs P. Lipoprotein (a) : a prothrombotic risk factor for coronary artery disease. *J Cardiovascul Risk* 1995, 2: 206-215
- [313] Etingin O, Hajjar DP, Hajjar KA, Harpel PC, Nachman RL. Lipoprotein (a) regulates plasminogen activator inhibitor-1 expression in endothelial cells. *J Biol Chem* 1991, 266 : 2459-2465
- [314] Διονυσίου -Αστερίου Α, Μοίρας Κ. Διερεύνηση των επιπέδων της Lp(a) σε άτομα με υπερχοληστερολαιμία. *Materia Medica Greca* 1990, 18: 57-61
- [315] Slunga L, Johnson O, Dahlen GH, Eriksson S. Lp(a) and acute phase proteins in acute myocardial infraction. *Scand J Clin Lab Inv* 1992, 52:95-101
- [316] Naruszewicz N, Selinger E, Davignon J. Oxidative modification of lipoprotein (a) and the effect of beta-carotene. *Metabolism* 1992, 41: 1215-1224
- [317] Henriksson P, Angelin B, Berglund L. Hormonal regulation of serum Lp(a) levels. *J Clin Inv* 1992, 89: 1166-1171
- [318] Rhoads GG, Dahlen G, Berg K, Morton NE, Dannenberg AL. Lp(a) lipoprotein as a risk factor for myocardial infraction. *J Am Med Assoc* 1986, 256: 2540-2544
- [319] Ridker PM, Hennekens CH, Stampfer MJ. A prospective study of lipoprotein (a) and the risk of myocardial infraction. *J Am Med Assoc* 1993, 270: 2195-2199
- [320] Διονυσίου -Αστερίου Α. Αθηροσκλήρυνση. Ιατρικές εκδόσεις Πασχαλίδης 1997, Κεφ 5 : 222-256
- [321] Angles-Cano E, Hervio L, Rouy D, Fournier C, Chapman J, Laplaud M, Koschinsky ML. Effects of lipoprotein (a) on the binding of plasminogen to fibrin and its activation by fibrin-bound tissue-type plasminogen activator. *Chem Phys Lipids* 1994, 67/68: 353-362
- [322] 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
- [323] Miles LA, Fless GM, Levin EG, Scanu AM, Plow EF. A potential basis for the thrombotic risks associated with lipoprotein (a). *Nature* 1989, 339: 301-303
- [324] Gonzalez-Gronow M, Edelberg JM, Pizzo SV. Further characterization of the cellular plasminogen binding site: Evidence that plasminogen and lipoprotein (a) compete for the same site. *Biochemistry* 1989, 28:2374-2377



- [325] Edelberg J, Pizzo S. Why is lipoprotein (a) relevant to thrombosis? *Am J Clin Nutr* 1992, 56: 791S-2S
- [326] Loscalzo J, Weinfeld M, Fless GM, Scanu AM. Lipoprotein (a), fibrin binding and plasminogen activation. *Arteriosclerosis* 1990, 10: 240-245
- [327] Hajjar KA, Hamel NM, Harpel PC, Nachman RL. Binding of tissue type plasminogen activator to cultured endothelial cells. *J Clin Inv* 1987, 80: 1712-1719
- [328] Plow EF, Freaney DE, Plescia J, Miles LA. The plasminogen system and cell surfaces : evidence for plasminogen and urokinase receptors on the same cell type. *J Cell Biol* 1986, 103: 2411-2420
- [329] Hoyalerts M, Rijken DC, Lijnen HR, Collen D. Kinetics of the activation of plasminogen by human tissue plasminogen activator. *J Biol Chem* 1982, 257: 2912-2919
- [330] Rijken DC, Hoyalerts M, Collen D. Fibrinolytic properties of one chain and two chain human extrinsic (tissue type) plasminogen activator. *J Biol Chem* 1982, 257: 2920-2925
- [331] Koppert PW, Koopman J, Haverkate F, Nieuwenhuizen W. Production and characterization of a monoclonal antibody reactive with specific neoantigenic determinant (comprising B beta 54-118) in degradation products of fibrin and fibrinogen. *Blood* 1989, 68: 437-441
- [332] de Serrano VS, Urano T, Gaffney PJ, Castellino FJ. Influence of various structural domains of fibrinogen and fibrin on the potentiation of plasminogen activation by recombinant tissue plasminogen activator. *J Prot Chem* 1989, 8: 61-77
- [333] Edelberg JM, Conrad HE, Pizzo SV. Heparin oligosaccharides enhance tissue type plasminogen activator : a correlation between oligosaccharide length and stimulation of plasminogen activation. *Biochemistry* 1991, 30: 10999-11003
- [334] Edelberg JM, Gonzalez-Gronow M, Pizzo SV. Lipoprotein (a) inhibition of plasminogen activation by tissue-type plasminogen activator. *Thromb Res* 1990, 57: 155-162
- [335] Edelberg JM, Pizzo SV. Lipoprotein (a) promotes plasmin inhibition by α_2 -antiplasmin. *Biochem J* 1992, 286: 79-84



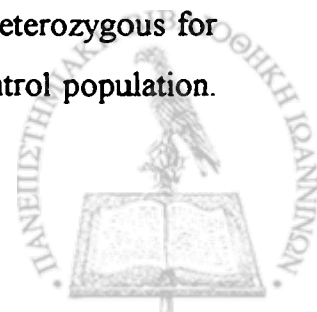
- [336] Wiman B, Collen D. On the kinetics of the reaction between human plasmin and antiplasmin. *Eur J Biochem* 1978, 84: 573-578
- [337] Longstaff C, Gaffney PJ. Serpin-serine protease kinetics: α_2 antiplasmin as a model inhibitor. *Biochemistry* 1991, 30: 979-986
- [338] Nachman RL. Thrombosis and atherogenesis: Molecular connections. *Blood* 1992, 79: 1987-1906
- [339] Kluff C, Jie AFH, Los P, de Wit E, Havekes L. Functional analogy between lipoprotein (a) and plasminogen in the binding to the kringle 4 binding protein, tetranectin. *Biochem Biophys Res Com* 1989, 161: 427-433
- [340] Edelberg JM, Pizzo SV. Lipoprotein (a): the link between impaired fibrinolysis and atherosclerosis. *Fibrinolysis* 1991, 5: 135-143
- [341] Beisiegel U, Niendorf A, Wolf K, Reblin T, Rath M. Lipoprotein (a) in the arterial wall. *Eur Heart J* 1990, 11: 174-183
- [342] Chapman MJ, Huby T, Nigon F, Thillet Joelle. Lipoprotein (a): implication in atherothrombosis. *Atherosclerosis* 110 (suppl) 1994, S69-S75
- [343] Walton KW, Hitchens J, Magnani HN, Khan M. A study of methods of identification and estimation of Lp(a) lipoprotein and of its significance in health, hyperlipidemia and atherosclerosis. *Atherosclerosis* 1974, 20: 323-346
- [344] 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
- [345] Pepin JM, O'Neil JA, Hoff HF. Quantification of apo(a) and apoB in human atherosclerotic lesions. *J Lipid Res* 1991, 32: 317-327
- [346] Haberland ME, Fless GM, Scanu AM, Fogelman AM. Modification of Lp(a) by malondialdehyde leads to avid uptake by human monocyte-macrophages. *Arteriosclerosis (Abs)* 1989, 9: 700a
- [347] Lawn RM. The structure and evolution of apolipoprotein (a), pp 209-211 In: Scanu AM, moderator. *Lipoprotein (a) and atherosclerosis*. *Ann Intern Med* 1991, 115: 209-218
- [348] Sattler W, Kostner GM, Waeg G, Esterbauer H. Oxidation of lipoprotein Lp(a) : a comparison with low density lipoprotein. *Biochim Biophys Acta* 1991, 1081:65



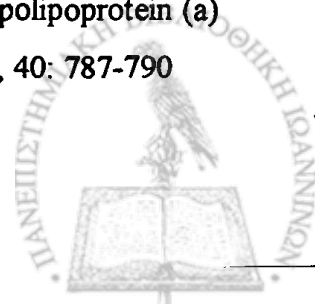
- [349] Haberland ME, Fless GM, Scanu AM, Fogelman AM. Malondialdehyde modification of Lp(a) produces avid uptake by human monocyte-macrophages. *J Biol Chem* 1992, 267: 4143
- [350] Grainer DJ, Metcalfe JC. Transforming growth factor-beta: the key to understanding lipoprotein (a)? *Curr Opin Lipid* 1995, 6: 81-85
- [351] Kojima S, Harpel PC, Rifkin DB. Lipoprotein (a) inhibits the generation of transforming growth factor- β : an endogenous inhibitor of smooth muscle cell migration. *J cell Biol* 1991, 113: 1439-1445
- [352] Grainer DJ, Kirschenlohr HL, Metcalfe JC, Weissberg PL, Wade DP, Lawn RM. Proliferation of smooth muscle cells promoted by lipoprotein (a). *Science* 1993, 260: 1655-1658
- [353] Grainer DJ, Kemp PR, Witchell CM, Weissberg PL, Metcalfe JC. Transforming growth factor- β decreases the rate of proliferation of rat vascular smooth muscle cells by extending the G2 phase of the cell cycle and delays the rise in cAMP before entry into M phase. *Biochem J*. 1994, 299: 227-235
- [354] Bjorkeryd S. Effects of transforming growth factor- β 1 on human arterial smooth muscle cells in vitro. *Arteriosclerosis* 1991, 11: 892-902
- [355] Harvie NR, Schultz JS. Studies of Lp(a) lipoprotein as a quantitative genetic trait. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1970. 66: 99-103
- [356] 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
- [357] Rifai N, Heiss G, Doetsch K. Lipoprotein (a) at birth, in blacks and whites. *Atherosclerosis* 1992, 92: 123-129
- [358] Cobbaert C, Kesteloot H. Serum lipoprotein (a) levels in racially different populations. *Am J Epidemiol* 1992, 136: 441-449
- [359] Brown MS, Goldstein JL. Teaching old dogmas new tricks. *Nature* 1987, 330: 113-114
- [360] Kostner GM, Avogaro P, Cazzolato G, Marth E, Bittolo-bon G, Quinci GB. Lipoprotein Lp(a) and the risk of myocardial infraction. *Atherosclerosis* 1981, 38: 51-61



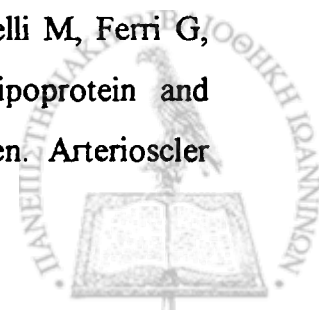
- [361] Sandkamp M, Funke H, Schulte H, Kohler E, Assman G. Lipoprotein (a) is an independent risk factor for myocardial infarction at a young age. *Clin Chem* 1990, 36:20-23
- [362] Hearn JA, DeMaio SJ, Roubin GS, Hammarstrom M, Sgoutas D. Predictive value of lipoprotein (a) and other serum lipoproteins in the angiographic diagnosis of coronary disease. *Am J Cardiol* 1990, 66:1176-1180.
- [363] Hearn JA, Donohue BC, Ba'albaki H, Douglas JS, King SB 3d, Lembo NJ, Roubin GS, Sgoutas DS. Usefulness of serum Lp(a) as a predictor of restenosis after percutaneous transluminal coronary angioplasty. *Am J Cardiol* 1992, 69:736-739
- [364] Hoff HF, Beck GJ, Skibinski CI, Jurgens G, O'Neil J, Kramer J, Lytle B. Serum Lp(a) levels as a predictor of vein graft stenosis after coronary artery bypass surgery in patients. *Circulation* 1988, 77:1238-1244
- [365] Sandholzer C, Saha N, Kark JD, Rees A, Jaross W, Dieplinger H, Hoppichler F, Boerwinkle E, Utermann G. Apo(a) isoforms predict risk for coronary heart disease. A study in six populations. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1992, 12:1214-1226
- [366] Abe A, Noma A, Lee YJ, Yamaguchi H. Studies on apolipoprotein (a) phenotypes. Part 2. Phenotype frequencies and Lp(a) concentrations in different phenotypes in patients with angiographically defined coronary artery disease. *Atherosclerosis* 1992, 96:9-15.
- [367] Boyer H, Cennes JL, Truffert J, Chatellier G, Dairou F, Bruckert E. Lp(a) levels in different types of dyslipidemia in French population. *Atherosclerosis* 1990, 85: 61-69.
- [368] Standholzer 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, 90:1958-1965
- [369] Mbewu AD, Bhatnagar D, Durrington PN, Hunt L, Ishola M, Arrol S, Mackness M, Lockley P, Miller JP. Serum Lp(a) in patients heterozygous for familial hypercholesterolemia, their relatives, and unrelated control population. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1991, 11: 940-946.



- [370] Soutar AK, McCarthy SN, Seed M, Knight BL. Relationship between apolipoprotein (a) phenotype, lipoprotein (a) concentration in plasma, and low density lipoprotein receptor function in a large kindred with familial hypercholesterolemia due to the pro 664 mutation in the LDL receptor gene. *J Clin Inv* 1991, 88: 483-492.
- [371] Schernthaner G, Kostner GM, Dieplinger H, Prager R, Muhlhauser I. Apolipoproteins (A-I, A-II, B), lipoprotein (a) and lecithin cholesterol acyltransferase activity in diabetes mellitus. *Atherosclerosis* 1983, 49:277-293.
- [372] Guillausseau PJ, Peynet J, Chanson P, Legrand A, Altman JJ, Poupon J, N' Guyen M, Rousselet F, Lubetzki J. Lipoprotein (a) in diabetic patients with and without chronic renal failure. *Diabetes Care* 1992, 15: 976-979.
- [373] Ramirez LC, Arauz-Pacheco C, Lackner C, Albright G, Adams BV, Raskin P. Lipoprotein (a) levels in diabetes mellitus : Relationship to metabolic control. *Ann Intern Med* 1992, 117:42-47
- [374] Austin A, Warty V, Janosky J, Arslanian A. The relationship of physical fitness to lipid and lipoprotein (a) levels in adolescents with IDDM. *Diabetes Care* 1993, 16:421-425
- [375] Joven J, Vilella E. Serum levels of lipoprotein (a) in parents with well controlled non-insulin diabetes mellitus. *JAMA* 1991, 265: 1113-1114.
- [376] Haffner SM, Morales PA, Stern MP, Gruber MK. Lp(a) concentrations in NIDDM. *Diabetes* 1992, 11: 1267-1272
- [377] Bruckert E, Davidoff P, Grimaldi A, Truffert J, Giral P, Doumith R, Thervet F, De Gennes JL. Increased serum levels of lipoprotein (a) in diabetes mellitus and their reduction with glycemic control. *JAMA* 1990, 263: 35-36
- [378] Haffner SM, Tuttle KR, Rainwater DL. Decrease of lipoprotein (a) with improved glycemic control in IDDM subjects. *Diabetes Care* 1992, 11: 302-307
- [379] Haffner SM, Tuttle KR, Rainwater DL. Preliminary report : Lack of change of Lp(a) concentrations with improved glycemic control in subjects with type-II diabetes. *Metabolism* 1992, 41:116-120
- [380] Jeckins AJ, Steele JS, Janus ED, Best JD. Increased plasma apolipoprotein (a) levels in IDDM patients with microalbuminuria. *Diabetes* 1991, 40: 787-790



- [381] Kapelrud H, Bangsted HJ, Dahl J, Jorgensen K, Berg K, Hansen KF. Serum Lp(a) lipoprotein concentrations in insulin-dependent diabetic patients with microalbuminuria. *Br Med J* 1991, 303: 675-678
- [382] Wincour PH, Bhatnagar D, Ishola M, Arrol S, Durrington PN. Lipoprotein (a) and macrovascular disease in type I (insulin-dependent) diabetes. *Diabetic Med* 1991, 8: 922-927
- [383] Karadi I, Romics L, Palos G, Doman J, Kaszas I, Hesz A, Kostner GM. Lp(a) lipoprotein concentration in serum of patients with heavy proteinuria of different origin. *Clin Chem* 1989, 35: 2121-2123
- [384] Haffner SM, Gruber KK, Aldrete G Jr, Morales PA, Stern MP, Tuttle KR. Increased lipoprotein (a) concentration in chronic renal failure. *J Am Soc Nephrol* 1992, 3: 1156-1162
- [385] Blank IW, Wilcken DEL. Decreases in apolipoprotein (a) after renal transplantation: Implication for lipoprotein (a) metabolism. *Clin Chem* 1992, 38: 353-357
- [386] Irish AB, Simons LA, Savdie E, Hayes JM, Simons J. Lipoprotein (a) levels in chronic renal disease states, dialysis and transplantation. *Aust NZ J Med* 1992, 22: 243-248
- [387] Albers JJ, Cabana VG, Warnick GR, Hazzard WR. Lipoprotein (a): Relationship to sinking pre- β lipoprotein, hypercholesterolemia, and apolipoprotein B. *Metabolism* 1975, 24:1047-1054
- [388] Albers JJ, Adolphson JL, Hazzard WR. Radioimmunoassay of human Lp(a) lipoprotein. *J Lipid Res* 1977, 18: 331-338
- [389] Brown SA, Morrisett J, Patsch JR, Reeves R, Gotto AM Jr, Patsch W. Influence of short term dietary cholesterol and fat on human plasma Lp(a) and LDL levels. *J Lipid Res* 1991, 32: 1281-1289
- [390] Muls E, Kempen K, Vansant G, Cobbaert C, Saris W. The effects of weight loss and apolipoprotein E polymorphism on serum lipids, apolipoproteins A-I and B, and lipoprotein (a). *Int J Obes* 1993, 17: 711-716
- [391] De Pergola G, Giorgino F, Cospite MR, Giagulli VA, Cignarelli M, Ferri G, Giorgino R. Relation between sex hormones and serum lipoprotein and lipoprotein (a) concentrations in premenopausal obese women. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1993, 13: 675-679



- [392] Mensik RP, Zock PL, Katan MB, Hornstra G. Effect of dietary cis and trans fatty acids on serum lipoprotein (a) levels in humans. *J Lipid Res* 1992, 33: 1493-1501
- [393] Nestel P, Noakes M, Belling B, McArthur R, Clifton P, Janus E, Abbey M. Plasma lipoprotein lipid and Lp(a) changes with substitution of elaidic acid for oleic acid in the diet. *J Lipid Res* 1992, 33: 1029-1036
- [394] Berg Schmidt E, Dalby Kristensen S, De Katerina R, Illingworth DR. The effects of n-3 fatty acids on plasma lipids and lipoproteins and other cardiovascular risk factors in patients with hyperlipidemia. *Atherosclerosis* 1993, 103:107-121
- [395] Berg Schmidt E, Klausen IC, Kristensen SD, Lervang HH, Faergeman O, Dyerberg J. The effects of n-3 polyunsaturated fatty acids on Lp(a). *Clin Chim Acta* 1991, 198: 271-278
- [396] Salvi A, Di Stefano O, Sleiman I, Spandrio S, Balesrieri GP, Scalvini T. Effects of fish oil on serum lipids and lipoprotein (a) levels in heterozygous familial hypercholesterolemia. *Curr Ther Res Clin Exp* 1993, 53: 717-721
- [397] Kostner G, Klein G, Krempler F. Can serum Lp(a) concentrations be lowered by drugs and/or diet? In treatment of hyperlipoproteinemia (Eds) Carlson LA, Olsson AG, New York : Raven Press, 1984, 151-156
- [398] Vessby B, Kostner G, Lithell H, Thomas J. Diverging effects of cholestyramine on apolipoprotein B and lipoprotein (a). A dose-response study of effects of cholestyramine in hypercholesterolemia. *Atherosclerosis* 1982, 44: 61-71
- [399] Kostner GM, Gavish D, Leopold B, Bolzano K, Weintraub MS, Breslow JL. HMG CoA-reductase inhibitors lower LDL- cholesterol levels without reducing Lp(a) levels. *Circulation* 1988, 80:1313-1319.
- [400] Wiklund O, Angelin B, Olofsson SO, Eriksson M, Fager G, Berglund L, Bondjers G. Apolipoprotein (a) and ischaemic heart disease in familial hypercholesterolemia. *Lancet* 1990, 335: 1360-1363
- [401] Broijerssen A, Eriksson M, Larsson PT, Beck O, Berglund L, Angelin B, Hjendahl P. Effects of selective LDL-apheresis and pravastatin therapy on platelet function in familial hypercholesterolemia. *Eur J Clin Inv* 1994, 24: 488-498



- [402] Klausen IC, Gerdes LU, Meinertz H, Hansen FA, Faefeman O. Apolipoprotein (a) polymorphism predicts the increase of Lp(a) by pravastatin in patients with familial hypercholesterolemia treated with bile acid sequestration. *Eur J Clin Inv* 1993, 23: 240-245
- [403] Hunninghake DB, Stein EA, Dujovne CA, Harris WS, Feldman EB, Miller VT, Tobert JA, Laskarzewski PM, Quiter E, Held J, Taylor AM, Hopper S, Leonard SB, Brewer BK. The efficacy of intensive dietary therapy alone or combined with lovastatin in outpatients with hypercholesterolemia. *N Engl J Med* 1993, 328: 1213-1219
- [404] Hunninghake DB, Stein EA, Mellies MJ. Effects of one year of treatment with pravastatin, an HMG-CoA reductase inhibitor, on lipoprotein (a). *J Clin Pharmacol* 1993, 33: 574-580
- [405] Slunga L, Johnson O, Dahlen GH. Changes in lipoprotein (a) lipoprotein during treatment of hypercholesterolemia with pravastatin. *Eur J Clin Pharmacol* 1992, 43: 369-373
- [406] Scanu AM. Lipoprotein (a) : a genetic risk factor for premature coronary heart disease. *JAMA* 1992, 267: 3326-3329
- [407] Mbewu AD, Durrington PN. Lipoprotein (a) structure, properties and possible involvement in thrombogenesis and atherogenesis. *Atherosclerosis* 1990, 85: 1-14
- [408] Gurakar A, Hoeg JM, Kostner G, Papadopoulos N, Brewer HB Jr. Levels of lipoprotein (a) decline with neomycin and niacin treatment. *Atherosclerosis* 1985, 57: 293-301
- [409] Carlson LA, Hamster A, Asplund A. Pronounced lowering of serum lipid levels of lipoprotein (a) in hyperlipidemia subjects treated with nicotinic acid. *J Inter Med* 1989, 226:271-276
- [410] Seed M, O'Connor B, Perombelon N, O'Donnell M, Reaveley D, Knight BL. The effect of nicotinic acid and acipimox on lipoprotein (a) concentration and turnover. *Atherosclerosis* 1993, 101: 61-68
- [411] Bimmermann A, Boerschmann C, Schwartzkopff W, Von Baeyer H, Schleicher J. Effective therapeutic measures for reducing lipoprotein (a) in patients with dislipidemia. Lipoprotein (a) reduction with sustained-release bezafibrate. *Curr Ther Res Clin Exp* 1991, 49: 635-643

- [412] Maggi FM, Biasi GM, Catapano AL. Reduction of Lp(a) plasma levels by bezafibrate. *Atherosclerosis* 1993, 100: 127-128
- [413] 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 Helsinki Heart Study participants. *Atherosclerosis* 1991, 89: 59-67.
- [414] Ramharack R, Spahr MA, Hicks GW, Kieft KA, Brammer DW, Riley JM, Newton RS. Gemfibrozil significantly lowers cynomolgus monkey plasma lipoprotein (a)-protein without concomitant changes in LDL-cholesterol. (Abs) *Circulation* 1993, 88: 1-272
- [415] Maeda S, Okuno M, Abe A, Noma A. Lack of effect of probucol on serum lipoprotein (a) levels. *Atherosclerosis* 1989, 79: 267-269
- [416] Naruszewicz M, Selinger E, Dufour D, Davignon J. Probucol protects lipoprotein (a) against oxidative modification. *Metabolism* 1992, 41: 1225-1228
- [417] Armstrong VW, Schleef J, Thiery J, Muche R, Schuff-Werner P, Eisenhauer T, Seidel D. Effect of HELP-LDL apheresis on serum concentrations of human lipoprotein (a) : Kinetic analysis of the post treatment return to baseline levels. *Eur J Clin Inv* 1989, 19: 235-240
- [418] Lasuncion MA, Teruel JL, Alvarez JJ, Carrero P, Ortuno J, Gomez-Coronado D. Changes in lipoprotein (a), LDL cholesterol and apolipoprotein B in homozygous familial hypercholesterolaemic patients treated with dextran sulfate LDL apheresis. *Eur J Clin Inv* 1993, 23: 819-826
- [419] Daida H, Lee YJ, Yokoi H, Kanoh T, Ishiwata S, Kato K, Nishikawa H, Takatsu F, Kato H, Kutsumi Y, et al. Prevention of restenosis after percutaneous transluminal coronary angioplasty by reducing lipoprotein (a) levels with low-density lipoprotein apheresis. *Am J Card* 1994, 73: 1037-1040
- [420] Pokrovsky SN, Sussekov AV, Afanasieva OI, Adamova IY, Lyakishev AA, Kukharchuk VV. Extracorporeal immunoabsorption for the specific removal of lipoprotein (a) Lp(a) apheresis: preliminary clinical data. *Chem Phys Lipids* 1994, 67/68:323-330



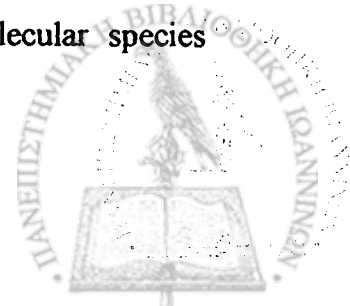
- [421] Albers JJ, Taggart HM, Applebaum-Bowden D, Haffner S, Chesnut CH, Hazzard WR. Reduction of lecithin cholesterol acyltransferase, apolipoprotein D and the Lp(a) lipoprotein with the anabolic steroid stanozolol. *Biochim Biophys Acta* 1984, 795: 293-296
- [422] Crook D, Sidhu M, Seed M, O'Donnell M, Stevenson JC. Lipoprotein Lp(a) levels are reduced by danazol, an anabolic steroid. *Atherosclerosis* 1992, 92: 41-47
- [423] Rymer J, Crook D, Sidhu M, Chapman MJ, Stevenson JC. Effects of tibolone on serum concentrations of lipoprotein (a) in postmenopausal women. *Acta Endocrinol* 1993, 128: 259-262
- [424] Haenggi W, Riesen W, Birkhaeuser. Postmenopausal hormone replacement therapy with tibolone decreases serum lipoprotein (a). *Eur J Chem Clin Biochem* 1993, 31: 645-650
- [425] Henriksson P, Angelin B, Berglund L. Hormonal regulation of serum Lp(a) levels: opposite effects after estrogen treatment and orchidectomy in males with prostatic carcinoma. *J Clin Inv* 1992, 89: 1166-1171
- [426] Seed M, Crook D. Post-menopausal hormone replacement, therapy, coronary heart disease and plasma lipoproteins. *Curr Opin Lipidol* 1994, 5: 48-58
- [427] Sacks FM, Walsh BW. Sex hormones and lipoprotein metabolism. *Curr Opin Lipid* 1994, 5: 236-240
- [428] Shewmon DA, Stock JL, Abusamra LC, Kristan MA, Baker S, Heiniluoma KM. Tamoxifen decreases lipoprotein (a) in patients with breast cancer. *Metabolism* 1994, 43: 531-532
- [429] Eden S, Wiklund O, Oscrsson J, Rosen T, Bengtsson BA. Growth hormone treatment of growth-hormone-deficient adults results in a marked increase in Lp(a) and HDL cholesterol concentrations. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1993, 13: 269-301
- [430] Olivecrona H, Ericksson S, Berglund L, Angelin B. Increased concentrations of serum lipoprotein (a) in reponse to growth hormone treatment. *BMJ* 1993, 306: 1726-1727
- [431] Lam KSL, Pang RWC, Janus ED, Kung AWC, Wang CCL. Serum apolipoprotein (a) correlates with growth hormone levels in Chinese patients with acromegaly. *Atherosclerosis* 1993, 104: 183-188



- [432] Berg A-L, Nilsson-Ehle P. Direct effects of corticotropin on plasma lipoprotein Metabolism in man: studies in vivo and in vitro. *Metabolism* 1994, 43: 90-97
- [433] 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
- [434] Siraganian RP and Osler 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
- [435] Benveniste J, Tence M, Varenne P, Bidault J, Boulet C, Polonsky J. Semi-synthese et structure proposee du facteur activant les plaquettes P.A.F.): PAF-acether un alkyl ether analogue de la lysophosphatidylcholine. *Comptes Rend de l' Acad des Sc (Paris)* 1979, 289:1037-1040
- [436] Demopoulos CA, Pinckard RN, Hanahan DJ. Platelet-activating factor: evidence for 1-O-alkyl-2-acetyl-sn-glycerol-3-phosphocholine as the active components. *J Biol Chem* 1979, 254:9355-9358
- [437] Blank ML, Snyder F, Byers LW, Brooks B, Muirhead EE. Antihypertensive activity of an alkyl ether analogue of phosphatidylcholine. *Biochem Biophys Res Commun* 1979, 90:1194-1200
- [438] Benveniste J, Henson PM, Cochrane 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
- [439] Hanahan DJ, Demopoulos CA, Liehr J and Pinckard RN. Identification of platelet-activating factor isolated from rabbit basophils as acetyl glycerol ether phosphorylcholine. *J Biol Chem* 1980, 255: 5514-5516
- [440] McManus LM. Pathobiology of platelet-activating factors. *Path and Immun Res* 1986, 5: 104-117
- [441] Pinckard RN, Ludwig JC, McManus L. Platelet-Activating Factors. *Inflammation: Basic principles and clinical correlates*. Edited by Gallin JL, Goldstein IM, Snyderman R. Raven Press, LTD. New York 1988, 139-167



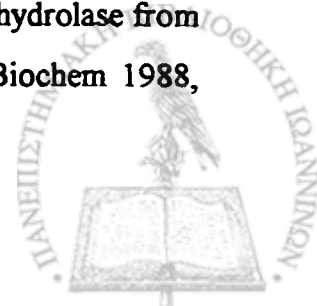
- [442] Ludwig JC, Pinckard RN. Diversity in the chemical structures of neutrophil-derived platelet-activating factors. In :New horizons in Platelet Activating Factor Research, edited by Winslow CM, Lee JL, Wiley J & Sons, New York 1987, 59-71
- [443] Mueller HW, O'Flaherty JT, Wykle RL. The molecular species distribution of platelet-activating factor synthesized by rabbit and human neutrophils. *J Biol Chem* 1984, 259:14554-14559
- [444] Pinckard RN, Jackson EM, Hoppens C, Weintraub ST, Ludwig JC, McManus LM, Mott GE. Molecular heterogeneity of platelet-activating factor produced by stimulated human polymorphonuclear leukocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 1984, 122: 325-332
- [445] Albert DH and Snyder F. Biosynthesis of 1-O-alkyl-2-acetyl-sn-glycero-3-phosphocholine by rat alveolar macrophages. Phospholipase A₂ and acetyltransferase activities during phagocytosis and ionophore stimulation. *J Biol Chem* 1983, 258: 97-102
- [446] Wyckle RL, Olson SC, O'Flaherty JT. Biochemical pathways of platelet-activating factor synthesis and breakdown. *Adv Inflam Res* 1986, 11: 71-81
- [447] 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
- [448] Lee T-C. Biosynthesis of platelet activating factor. Substrate specificity of 1-O-alkyl-2-lyso-sn-glycero-3-phosphorylcholine: acetyl-CoA acetyltransferase in rat spleen microsomes. *J Biol Chem* 1985, 260: 10952-10955
- [449] Uemura Y, Lee T-C, Snyder FA. CoA-independent transacylase is linked to the formation of PAF by generating the lyso-PAF intermediate in the remodeling pathway. *J Biol Chem* 1991, 266: 8268-8272
- [450] Blank ML, Smith ZL, Fitzgerald V, Snyder F. The CoA-independent transacylase in PAF biosynthesis: tissue distribution and molecular species selectivity. *Biochim Biophys Acta* 1995, 1254: 295-301



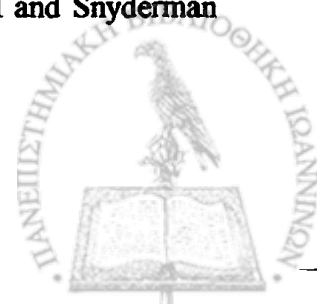
- [451] Nieto ML, Venable ME, Bauldry SA, Greene DG, Kennedy M, Bass DA, Wykle RL. Evidence that hydrolysis of ethanolamine plasmalogens triggers synthesis of platelet-activating factor via a transacylation reaction. *J Biol Chem* 1991, 266: 18699-18706
- [452] Sugiura T, Fukuda T, Masuzawa R, Waku K. Ether lysophospholipid-induced production of platelet-activating factor in human polymorphonuclear leukocytes. *Biochim Biophys Acta* 1990, 1047: 223-232
- [453] Venable ME, Nieto ML, Schmitt JD, Wykle RL. Conversion of 1-O-³H-alkyl-2-arachidonoyl-sn-glycero-phosphorylcholine to lyso platelet-activating factor by the CoA-independent transacylase in membrane fractions. *J Biol Chem* 1991, 266: 18691-18698
- [454] Venable ME, Olson SC, Nieto ML, Wykle RL. Enzymatic studies of lyso platelet-activating factor acylation in human neutrophils and changes upon stimulation. *J Biol Chem* 1993, 268: 7965-7975
- [455] Lee T-C, Uemura Y, Snyder F. A novel CoA-independent transacylase 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
- [456] 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
- [457] 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
- [458] Dennis EA. The growing phospholipase A₂ superfamily of signal transduction enzymes. *Trends Biochem Sci* 1997, 22: 1-3



- [459] Blank ML, Lee Tc, Fitzgerald V, Snyder F. A specific acetylhydrolase for 1-alkyl-2-acetyl-sn-glycero-3-phosphocholine (a hypotensive and platelet-activating lipid). *J Biol Chem* 1981, 256: 175-178
- [460] Farr RS, Wardlow ML, Cox CP, Meng KE, Greene DE. Human serum acid-labile factor is an acylhydrolase that inactivates platelet-activating factor. *Feder Proc* 1983, 42: 3120-3122
- [461] 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
- [462] Elstad MR, Stafforini DM, McIntyre TM, Prescott SM, Zimmerman GA. Platelet-activating factor acetylhydrolase increases during macrophage differentiation. A novel mechanism that regulates accumulation of platelet activating factor. *J Biol Chem* 1989, 264: 8467-70
- [463] Stafforini DM, Elstad MR, McIntyre TM, Zimmerman GA, Prescott SM. Human macrophages secrete platelet-activating factor acetylhydrolase. *J Biol Chem* 1990, 265: 9682-87
- [464] Satoh K, Imaizumi T, Yoshida H, Kawamura Y, Takamatsu S, Takamatsu M. Secretion of platelet-activating factor acetylhydrolase by human hepatoma cell line HepG2. 3rd International Conference on Platelet-Activating Factor and Structurally Related Alkyl Ether Lipids, May 8-12, 1989, Tokuo Japan, I 31 (abs).
- [465] Korth R, Bidault J, Palmantier R, Benveniste J, Ninio E. Human platelets release a PAF-acether. Acetylhydase similar to that in plasma. *Lipids* 1993, 28: 193-199
- [466] 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



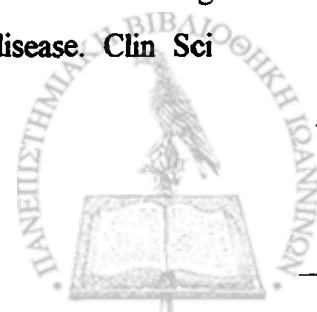
- [467] Stafforini DM, Prescott SM, McIntyre TM. Human plasma platelet-activating factor acetylhydrolase. Purification and properties. *J Biol Chem* 1987, 262: 4223-4230
- [468] Wardlow ML, Cox CP, Meng KE, Greene DE, Farr RS. Substrate specificity and partial characterization of the PAF-acetylhydrolase in human serum that rapidly inactivates platelet-activating factor. *J Immun* 1989, 136: 3441-3446
- [469] Tselepis AD, Pincard RN. PAF-acetylhydrolase: a novel enzyme with biochemical and clinical interest. *Clin Chem Enzym Comms* 1992, 4: 279-290
- [470] Stafforini DM, McIntyre TM, Zimmerman GA, Prescott SM. Platelet-activating Factor Acetylhydrolases. *J Biol Chem* 1997, 272: 17895-17898
- [471] Stafforini, D.M., Prescott, S.M. and McIntyre, T.M. Human plasma platelet-activating factor acetylhydrolase: purification and properties. *J Biol Chem* 1987, 262: 4223-4230
- [472] Stremier KE, Stafforini DM, Prescott SM, Zimmerman GA, McIntyre TM. *J Biol Chem* 1989, 264: 5331-5334
- [473] Patel KD, Zimmerman GA, Prescott SM, McIntyre TM. Novel leukocyte agonists are released by endothelial cells exposed to peroxide. *J Biol Chem* 1992, 267: 15168-15175
- [474] Heery JM, Kozak M, Stafforini DM, Jones DA, Zimmerman GA, McIntyre 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
- [475] Venable ME, Zimmerman GA, McIntyre TM, Prescott SM. Platelet-activating factor: a phospholipid autacoid with diverse actions. *J Lipid Res* 1993, 34: 691-702
- [476] Zimmerman GA, Prescott SM, McIntyre TM. In : *Inflammation : Basic Principles and clinical correlates.* (eds) Gallin JI Goldstein IM and Snyderman R, 2nd Edition Raven Press NY 1992, 149-176



- [477] 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
- [478] Marcheselli VL, Bazaan NG. Platelet-activating factor is a messenger in the electroconvulsive shock-induced transcriptional activation of c-fos and zif-268 in hippocampus. *J Neurosci Res* 1994, 37: 54-61
- [479] Hattori M, Adachi H, Tsujimoto M, Arai H, Inoue K. The catalytic subunit of bovine brain platelet-activating factor acetylhydrolase is a novel type of serine esterase. *J Biol Chem* 1994, 269: 23150-23155
- [480] Hattori M, Adachi H, Aoki J, Tsujimoto M, Arai H, Inoue K. Cloning and expression of a cDNA encoding the beta-subunit (30-kDa subunit) of bovine brain platelet-activating factor acetylhydrolase. *J Biol Chem* 1995, 270:31345-31352
- [481] Tjoelker LW, Eberhardt C, Unger J, Trong HL, Zimmermann GA, McIntyre TM, Stafforini DM, Prescott SM, Gray PW. Plasma platelet-activating factor acetylhydrolase is a secreted phospholipase A₂ with a catalytic triad. *J Biol Chem* 270: 25481-25487
- [482] Stafforini DM, McIntyre TM, Carter ME, 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, 262:4215-4222
- [483] Aron L, Jones S, Fielding CJ. Human plasma lecithine cholesterol acyltransferase. *J Biol Chem* 1978, 253: 7220-7222
- [484] Dentan C, Tselepis AD, Chapman JM, Ninio E. Pefabloc, 4-[2-aminoethyl] benzenesulfonyl fluoride, is a new potent nontoxic and irreversible inhibitor of PAF-degrading acetylhydrolase. *Biochim Biophys Acta* 1995



- [485] 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
- [486] Dentan C, Lesnik P, Chapman MJ, Ninio E. PAF-acether degrading acetylhydrolase in plasma LDL is inactivated by copper and cell mediated oxidation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1994, 14: 353-360
- [487] Miyaura S, Maki N, Byrd W, Johnston JM. The hormonal regulation of platelet-activating factor acetylhydrolase activity in plasma. *Lipids* 1991, 26:1015-20
- [488] Maki N, Hoffman D, Johnston J. Platelet activating factor acetylhydrolase in maternal fetal and newborn rabbit plasma during pregnancy and lactation. *M Proc Natl Acad Sci USA* 1988, 85:728-32
- [489] Satoh K, Imaizumi T-a, Yoshida Y, Kawamura Y, Takamatsu S, Takamatsu M, Mizuno S. Platelet-activating factor acetylhydrolase in plasma lipoproteins of healthy men and women. *Clin Chim Acta* 1991, 202:95-104
- [490] Narahara H, Frenkel RA, Johnston JM. Secretion of platelet-activating factor acetylhydrolase following phorbol ester-stimulated differentiation of HL-60 cells. *Arch Biochem Biophys* 1993, 301: 275-81
- [491] Caplan M, Hsueh W, Kelly A, Donovan M. Serum PAF acetylhydrolase increases during neonatal maturation. *Prostaglandins* 1990, 39: 705-713
- [492] Satoh K, Imaizumi T-a, Kawamura Y, Yoshida Y, Takamatsu S, Takamatsu M. Increased activity of the platelet-activating factor acetylhydrolase in plasma low density lipoprotein from patients with essential hypertension. *Prostaglandins* 1989, 37: 673-682
- [493] Graham RM, Stephens CJ, Strum MJ, Taylor RR. Plasma platelet activating factor degradation in patients with severe coronary heart disease. *Clin Sci* 1992, 82: 535-541



- [494] Satoh K, Yoshida Y, Imaizumi T-a, Takamatsu S, Mizuno S. Platelet-activating factor acetylhydrolase in plasma lipoproteins from patients with ischemic stroke. *Stroke* 1992, 23: 1090-1092
- [495] Stafforini DM, Carter ME, Zimmerman GA, McIntyre TM, Prescott SM. Lipoproteins alter the catalytic behavior of platelet activating factor acetylhydrolase in human plasma. *Proc Natl Acad Sci U.S.A* 1989, 8:2393-2397
- [496] Satoh K, Imaizumi T-a, Kawamura Y, Yoshida Y, 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
- [497] Narahara H, Johnston JM. Effects of endotoxins and cytokines on the secretion of platelet-activating factor acetylhydrolase by human decidual macrophages. *Am J Obst Gynecol* 1993, 169: 531-537
- [498] 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
- [499] Banka C. High density lipoprotein and lipoprotein oxidation. *Curr Opin Lipid* 1996, 7: 139-142
- [500] Pritchard PH. The degradation of platelet-activating factor by high-density lipoprotein in rat plasma. *Biochem J* 1987, 246: 791-794
- [501] Elstad M, Stafforini DM, McIntyre TM, Prescott SM, Zimmerman GA. Platelet activating factor acetylhydrolase increase during macrophage differentiation: a novel mechanism that regulates accumulation of platelet activating factor. *J Biol Chem* 1989, 264: 8467-8470



- [502] Palmantier R, Dulioust A, Maiza H, Benveniste J, Ninio E. Biosynthesis of paf-acether. XIV. Paf-acether output in murine peritoneal macrophages is regulated by the level of acetylhydrolase. *Biochem Biophys Res Commun* 1989, 162:475-482
- [503] 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
- [504] Touqui L, Hatmi M, Vargaftig B. Human platelets stimulated by thrombin produce platelet-activating factor (1-O-alkyl-2-acetyl-sn-glycero-3-phosphocholine) when the degrading enzyme acetyl hydrolase is blocked. *Biochem J* 1985, 229:811-816
- [505] Stafforini DM, Prescott SM, Zimmerman GA McIntyre TM. Mammalian platelet-activating factor acetylhydrolases. *Biochim Biophys Acta* 1996, 1301:161-173
- [506] Hattori K, Adachi H, Matsuzawa A, Yamamoto K, Tsujimoto M, Aoki J, Hattori M, Arai H, Inoue K. cDNA cloning and expression of intracellular platelet-activating factor (PAF) acetylhydrolase II. Its homology with plasma PAF acetylhydrolase. *J Biol Chem* 1996, 271:33032-33038
- [507] Hattori M, Arai H, Inoue K. Purification and characterization of bovine brain platelet-activating factor acetylhydrolase. *J Biol Chem* 1993, 268:18748-18753
- [508] Ho YS, Swenson L, Derewenda U, Serre L, Wei Y, Dauter Z, Hattori M, Adachi T, Aoki J, Arai H, Inoue K, Derewenda ZS. Brain acetylhydrolase that inactivates platelet-activating factor is a G-protein like trimer. *Nature* 1997, 385:89-93
- [509] Albrecht U, Abu-Issa R, Ratz B, Hattori M, Aoki J, Arai H, Inoue K Eichele G. Platelet-activating factor acetylhydrolase expression and activity suggest a link between neuronal migration and platelet-activating factor. *Dev Biol* 1996, 180:579-593



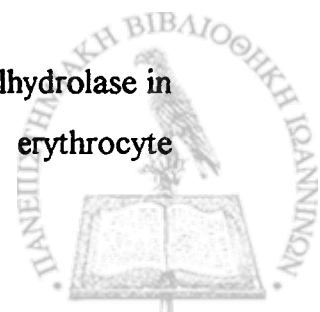
- [510] Stafforini DM, Rollins EN, Prescott SM, McIntyre TM. The platelet-activating factor acetylhydrolase from human erythrocytes. Purification and properties. *J Biol Chem* 1993, 268:3857-3865
- [511] McIntyre TM, Stafforini DM, Stremler KE, Prescott SM. Erythrocyte PAF-acetylhydrolase: Characterization and function of the second major source in blood. 3rd International Conference on Platelet-Activating Factor and Structurally Related Alkyl Ether Lipids, May 8-12, 1989, Tokuo Japan, L26 (abs)
- [512] Hattori M, Hatori K, Adachi H, Tsujimoto M, Arai H, Inoue K. Purification and characterization of platelet-activating factor acetylhydrolase II from bovine liver cytosol. *J Biol Chem* 1995, 270:22308-22313
- [513] Hattori M, Adachi H, Tsujimoto M, Arai H, Inoue K. Miller-Dieker lissencephaly gene encodes a subunit of brain platelet-activating factor acetylhydrolase. *Nature* 1994, 370:216-218
- [514] Reiner O, Albrecht U, Gordon M, Chianese KA, Wong C, Gal-Gerber O, Sapir T, Siracusa LD, Buchberg AM, Caskey CT, Eichele G. Lissencephaly gene (LIS1) expression in the CNS suggests a role in neuronal migration. *J Neurosci* 1995, 15:3730-3738
- [515] Kato K, Clark GD, Bazaan NG, Zorumski CF. Platelet-activating factor as a potential retrograde messenger in CA1 hippocampal long-term potentiation. *Nature* 1994, 367:175-179
- [516] Guerra R, Zhao B, Mooser V, Stafforini D, Johnston J, Cohen J. Determinants of plasma platelet-activating factor acetylhydrolase: heritability and relationship to plasma lipoproteins. *J Lipid Res* 1997, 38: 2281-2288
- [517] Graham RM, Stephens CJ, Silvester W, Leong LLL, Strum MJ, Taylor RR. Plasma degradation of platelet-activating factor in severely ill patients with clinical sepsis. *Crit Care Med* 1994, 22: 204-212



- [518] Diez FL, Nieto ML, Fernandez-Gallardo S, Gijon MA, Sanchez Crespo M. Occupancy of platelet receptors for platelet-activating factor in patients with septicemia. *J Clin Invest* 1989, 83: 1733-1740
- [519] Tetta C, Bussolino F, Modena V, Montrucchio G, Segoloni G, Pescarmora G, Camussi G. Release of platelet-activating factor in systemic lupus erythematosus. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1990, 91: 244-256
- [520] Dulioust A, Hilliquin P, Mekes CJ, Benveniste J, Arnoux B. PAF-acether acetylhydrolase activity is increased in patients with rheumatic diseases. *Scand J Rheumatol* 1992, 21:161-164
- [521] Miwa M, Miyake T, Yamanaka T, Sugatani J, Suzuki Y, Sakata S, Araki Y, Matsumoto M. Characterization of serum platelet-activating factor (PAF) acetylhydrolase. Correlation between deficiency of serum PAF acetylhydrolase and respiratory symptoms in asthmatic children. *J Clin Invest* 1995, 95:774-782
- [522] Stafforini DM, Satoh K, Atkinson DL, Tjoelker LW, Eberhardt C, Yoshida H, Imaizumi T, Takamatsu S, Zimmerman GA, McIntyre TM, Gray PW, Prescott SM. Platelet-activating factor acetylhydrolase deficiency. A missense mutation near the active site of an anti-inflammatory phospholipase. *J Clin Inv* 1996, 97: 2784-2791
- [523] Satoh K, Imaizumi T, Kawamura Y, Yoshida H, Takamatsu S, Takamatsu M. Increased activity of platelet-activating factor acetylhydrolase in plasma low density lipoproteins from patients with essential hypertension. *Prostaglandines* 1989, 37: 673-82
- [524] Maki N, Magness RR, Miyaura S, Gant NF, Johnston JM. Platelet-activating factor acetylhydrolase in normotensive and hypertensive pregnancies. *Am J Obst Gynecol* 1993, 168: 50-54
- [525] Dzau VJ, Gibbons GH, Morishita R, Pratt RE. New perspectives in hypertension research. Potentials of vascular biology. *Hypertension* 1994, 23: 1132-40



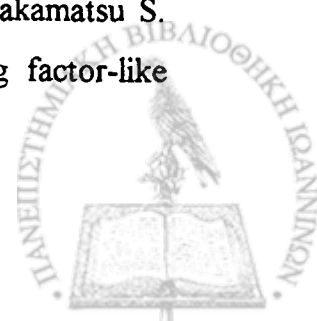
- [526] Stremler KE, Stafforini DM, Prescott SM, McIntyre TM. Human plasma platelet-activating factor acetylhydrolase: oxidatively fragmented phospholipids as substrates. *J Biol Chem* 1991, 266: 11095-11103
- [527] Stafforini DM, Zimmerman GA, McIntyre TM, Prescott SM. The platelet-activating factor acetylhydrolase from human plasma prevents oxidative modification of low-density lipoproteins. *Trans Assoc Amer Phys* 1992, 105: 44-63
- [528] Osterman G, Ruhling K, Zabel-Langhenning R, Winkler L, Schlag B, Till U. Plasma from atherosclerotic patients exerts an increased degradation of platelet-activating factor. *Thromb Res* 1987, 47: 279-285
- [529] Satoh K, Yoshida H, Imaizumi T, Takamatsu S, Mizumo S. Platelet-activating factor acetylhydrolase from patients with ischemic stroke. *Stroke* 1992, 23:1090-1092
- [530] Pritchard PH, Chronn A, Yeung CCH. The degradation of platelet-activating factor in the plasma of a patient with familial high density lipoprotein deficiency (Tangier disease). *Blood* 1985, 66:1476-1478
- [531] Satoh K, Imaizumi T, Kawamura Y, Yoshida H, Takamatsu S, Mizumo S. Activity of platelet-activating factor (PAF) acetylhydrolase in plasma from patients with ischemic cerebrovascular disease. *Prostaglandins* 1988, 35: 685-698
- [532] Satoh K, Imaizumi T, Yoshida H, Hiramoto M, Takamatsu S. Increased levels of blood platelet-activating factor (PAF) and PAF-like lipids in patients with ischemic stroke. *Acta Neurol Scand* 1992, 85:122-127
- [533] Yoshida H, Satoh K, Imaizumi T, Takamatsu S, Hiramoto M, Shoji B, Takamatsu M. Platelet-activating factor acetylhydrolase in red blood cell stroma from patients with cerebral thrombosis. *Acta Neurol Scand* 1992, 86:199-203
- [534] Yoshida H, Satoh K, Takamatsu S. Platelet-activating factor acetylhydrolase in red blood cell membranes: does decreased activity impair erythrocyte deformability in ischemic stroke patients? *Stroke* 1993, 24:14-18



- [535] Satoh K, Yoshida H, Imaizumi T, Takamatsu S, Mizuno S. Platelet-activating factor acetylhydrolase in plasma lipoproteins from patients with ischemic stroke. *Stroke* 1992, 23: 1090-1092
- [536] Hofmann B, Ruhling K, Spangeberg P, Osterman G. Enhanced degradation of platelet-activating factor in serum from diabetic patients. *Haemostasis* 1989, 19:180-184
- [537] Kirschbaum B. Platelet-activating factor acetylhydrolase activity in the urine of patients with renal disease. *Clin Chim Acta* 1991, 199:139-146
- [538] Hoffman Ruhling K, Spangenberg P, Osterman G. Enhanced degradation of platelet activating factor in serum from diabetic Patients. *Haemostasis* 1989, 19: 180-184
- [539] Meade CJ, Birke F, Metcalfe S, Watson C, Jamieson N, Neild G. Serum PAF-acetylhydrolase in severe renal or hepatic disease in man: Relationship to circulating levels of PAF and effects of nephrectomy or transplantation. *J Lipid Med Cell Sign* 1994, 9: 205-215
- [540] Benigni A, Boccardo P, Noris M, Remuzzi G, Siegler RL. Urinary excretion of platelet-activating factor in hemolytic uraemic syndrome. *Lancet* 1992,339:835-836
- [541] Meade CJ, Metcalfe S, Svvennsen R, Jamieson N, Watson C, Calne RY, Kleber G, Neild G. Serum PAF acetylhydrolase and chronic cholestasis. *Lancet* 1991, 338:1016-1017
- [542] Moreno P, Gijon MA, Fradera GR, Fabregat J, Rafecas A, Biondo S, Figueras J, Sanchez-Cresp M, Jaurrieta E. Changes in peripheral blood levels of platelet-activating factor after orthotopic liver transplantation. *Transplant Proc* 1993, 25:2642-2643
- [543] Caplan MS, Sun XM, Hsueh W, Hageman JR. Role of platelet-activating factor and tumor necrosis factor-alpha in neonatal necrotizing enterocolitis. *J Pediatr*. 1990, 116: 960-964
- [544] Sugatani J, Fujimura T, Mizuno Y, Sameshita Y, Saitoh K. The role of platelet-activating factor (PAF) in the pathogenesis of gastric ulcers. *Prostaglandines Leukot Essnt Fatty Acids* 1991, 44: 135-147



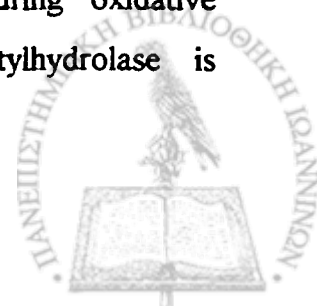
- [545] Imaizumi TA, Stafforini D, Yamada Y, McIntyre TM, Prescott ST, Zimmerman GA. Platelet -activating factor: a mediator for clinicians. *Journal of Internal Medicine* 1995, 238:5-20
- [546] Denizot Y, Chaussade S, Nathan N, Colombel JF, Bossant MJ, Cherouki N, Benveniste J, Couturier D. PAF-acether and acetylhydrolase in stool of patients with Crohns disease. *Digestiv Dis and Sc* 1992, 37:432-437
- [547] Billah MM, Johnston JM. Identification of phospholipid-activating factor (1-O-alkyl-2-acetyl-sn-glycero-3-phosphocholine) in human amniotic fluid and urine. *Biochem Biophys Res Commun* 1983, 113:51-8
- [548] Maki N, Hoffman D, Johnston JM. Platelet-activating factor acetylhydrolase activity during pregnancy and lactation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988, 85:728-32
- [549] Hoffman DR, Romero R. Detection of platelet-activating factor in amniotic fluid of complicated pregnancies. *Am J Obstet Gynecol* 1990, 162: 525-528
- [550] Imaizumi T, Satoh K, Yoshida H, Kawamura Y, Hiramoto M, Koyanagi M, Takamatsu S, Takamatsu M. Activity of platelet-activating factor (PAF) acetylhydrolase in plasma from healthy habitual cigarette smokers. *Heart Vessels* 1990, 5:81-86
- [551] Yokode M, Kita T, Arai H, Kawai C, Narumiya s, Fujiwara M. Cholesteryl ester accumulation in macrophages incubated with low density lipoprotein pretreated with cigarette smoke extract. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988, 85:2344-2348
- [552] Miyaura S, Egucgi H, Johnston JM. Effect of cigarette smoke extract on the Metabolism of the proinflammatory autacoid, platelet-activating factor. *Circ Res* 1992, 70:341-347
- [553] Narahara H, Johnston JM. Smoking and preterm labor: effect of cigarette smoke extract on the secretion of platelet-activating factor acetylhydrolase by human decidual macrophages. *Am J Obst Gynecol* 1993, 169:1321-1326
- [554] Imaizumi T, Satoh K, Yoshida H, Kawamura Y, Hiramoto M, Takamatsu S. Effect of cigarette smoking on the levels of platelet-activating factor-like lipid(s) in plasma lipoproteins. *Atherosclerosis* 1991, 87: 47-55



- [555] Knipping G, Birchbauer A, Streyer E, Groener J, Zechner R, Costner GM. Studies on the substrate specificity of human and pig lecithin: cholesterol acyltransferase: role of low density lipoproteins. *Biochemistry* 1986, 25: 5242
- [556] Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall, R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951, 193: 265-275
- [557] Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK and Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 1985, 150: 76-85
- [558] 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
- [559] Bligh EG and Dyer WJA. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J Biochem Physiol* 1959, 37: 911-917
- [560] Marinetti GV. Chromatographic separation, identification and analysis of phosphatidates. *J Lipid Res* 1962, 3: 1-17
- [561] Barlett GR. Phosphorus assay in column chromatography. *J Biol Chem* 1959, 234: 466-468
- [562] Tselepis AD, Lekka ME, Tsoukatos D. A PAF-acetylhydrolase activity in *Tetrahymena pyriformis* cells. *FEBS Letts* 1991, 288: 147-150
- [563] Fraenkel-Conrat, H. Methods for investigating the essential groups for enzyme activity. In: Colowick SP and Kaplan MO, eds. *Methods Enzymol* San Diego: Academic Press. 1957, IV: 247-269
- [564] 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: 1350-1356
- [565] Lipid Res Clinics Program. *Manual of Laboratory Operations, Vol 1: Lipid and lipoprotein Analysis.* Washington, DC: US Dept of Health Education and Welfare publication NIH 1974, 75: 628
- [566] Burstein M. *J Lipid Res* 1970, 11: 583



- [567] Fossati P, Prencipe L. Serum triglycerides determined colorimetrically with an enzyme that produces hydrogen peroxide. *Clin Chem* 1982, 28(10): 2077-80
- [568] Trinder P. *Ann Biochem* 1969, 6: 24
- [569] Takayama M, Itoh S, Nagasaki T, Tanimizu I. A new enzymatic method for determination of serum choline-containing phospholipids. *Clin Chim Acta* 1977, 79(1): 93-98
- [570] Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low density lipoprotein in plasma without use of the preparative ultracentrifugation. *Clin Chem* 1972, 18: 499-502
- [571] Doucet C, Huby T, Chapman J, Thillet J. Lipoprotein (a) in the chimpanzee: relationship of apo (a) phenotype to elevated plasma Lp (a) levels. *J Lipid Res* 1994, 35: 263
- [572] Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970, 227: 680-685
- [573] Nichols AV, Krauss RM, Musliner TA. Non-denaturing polyacrylamide gradient gel electrophoresis. *Methods Enzymol* 1986, 128: 417-431
- [574] Hattori M, Arai H, Inoue K. Purification and characterization of bovine brain platelet-activating factor acetylhydrolase. *J Biol Chem*. 1993, 268: 18748-18753
- [575] Lesnik P, Vonika A, Guerin M, Moreau M, Chapman MJ. Anticoagulant activity of tissue factor pathway inhibitor in human plasma is preferentially associated with dense subspecies of LDL and HDL and with Lp(a). *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1993, 13: 1066-1075
- [576] Stender S, Zilversmit DB. Transfer of plasma lipoprotein components and of plasma proteins into aortas of cholesterol fed rabbits: molecular size as determinant of plasma lipoprotein influx. *Arteriosclerosis* 1981, 1: 38-49
- [577] Liapikos TA, Antonopoulou S, Karabina SAP, Tsoukatos DC, Demopoulos CA, Tselepis AD. Platelet-activating factor formation during oxidative modification of low-density lipoprotein when PAF-acetylhydrolase is inactivated. *Biochim Biophys Acta* 1994, 1212: 353-360



- [578] Lesnik P, Dentan C, Vonika A, Moreau M, Chapman MJ. Tissue factor pathway inhibitor activity with LDL is inactivated by cell and copper mediated oxidation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995, 15: 1121-1130
- [579] Quinn MT, Parthasarathy S, Steinberg D. Lysophosphatidylcholine: A chemotactic factor for human monocytes and its potential role in atherogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988, 85: 2805-2809
- [580] Yokoyama M, Hirata K, Miyake R, Akita H, Ishikawa Y, Fukuzaki H. Lysophosphatidylcholine: essential role in the inhibition of endothelium dependent vasorelaxation by oxidized low density lipoprotein. *Biochem Biophys Res Comm* 1990, 168: 301-308
- [581] Kume N, Cybulsky MI, Gimbrone MA. Lysophosphatidylcholine, a component of atherogenic lipoproteins, induces mononuclear adhesion molecules in cultured human and rabbit arterial endothelial cells. *J Clin Inv* 1992, 90: 1138-1144
- [582] Subbaiah PV, Albers JJ, Chen CH, Bagdade JD. Low density lipoprotein-activated lysolecithin acylation by human plasma lecithin-cholesterol acyltransferase. *J Biol Chem* 1980, 255: 9275-9280
- [583] Wang-Iverson P, Gibson JC, Brown WV. Plasma apolipoprotein secretion by monocyte-derived macrophages. *Biochim Biophys Acta* 1985, 834: 256
- [584] Goudevenos J, Tselepis AD, Tsoukatos DC, Grękas G, Kritikakos J, Sideris D. Platelet aggregability to platelet activating factor at rest and after exercise in patients with coronary Artery disease. *Eur Heart J* 1995, 16: 1036-1043
- [585] Gordon DJ, Probstfield JL, Garrison RJ, Neaton JD, Castelli WP, Knoke JD, Jacobs DR Jr, Bangdiwala S, Tyroler HA. High density lipoprotein cholesterol and cardiovascular disease. *Circulation* 1989, 79: 8-15
- [586] Parthasarathy S, Barnat J, Fong LG. High density lipoprotein inhibits the oxidative modification of low density lipoprotein. *Biochim Biophys Acta* 1990, 1044: 275-283



- [587] Watson AD, Navab M, Hama SY, Sevanian A, Prescott SM, Stafforini DM, McIntyre TM, Du BN, Fogelman AM, Berliner JA. Effect of platelet activating factor-acetylhydrolase on the formation and action of minimally oxidized low density lipoprotein. *J Clin Inv* 1995, 95: 774-782
- [588] Sakai M, Miyazaki A, Hakamata H, Sasaki T, Yui S, Yamazaki M, Shichiri M, Horiuchi S. Lysophosphatidylcholine plays essential role in the mitogenic effect of oxidized low density lipoprotein on murine macrophages. *J Biol Chem* 1994, 269: 31430-31435
- [589] Regenstrom J, Nilsson J, Tomvall P, Landou C, Hamsten A. Susceptibility to low density lipoprotein oxidation and coronary atherosclerosis in man. *Lancet* 1992, 239: 1183-1185
- [590] Streinbrecher UP, Parthasarathy S, Leak DS, Witzum JL, Steinberg D. Modification of low density lipoprotein by endothelial cells involves lipid peroxidation and degradation of low density lipoprotein phospholipids. *Proc Natl Acad USA* 1984, 81: 3883-3887

