



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ
ΤΟΜΕΑΣ ΠΑΘΟΛΟΓΙΑΣ**

**Β' ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ
Δ/ντής: Καθηγητής Μ. Σ. Ελισάφ**

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΝΕΦΡΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ
Δ/ντής: Καθηγητής Κ. Χ. Σιαμόπουλος**

**Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΦΑΙΝΟΤΥΠΩΝ ΤΗΣ ΑΠΟΠΡΩΤΕΪΝΗΣ Ε
ΣΤΟ ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟ ΤΩΝ ΛΙΠΟΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΣΕ
ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ΝΕΦΡΙΚΑ ΝΟΣΗΜΑΤΑ**

**ΛΥΜΠΕΡΟΠΟΥΛΟΣ Ν. ΕΥΑΓΓΕΛΟΣ
ΙΑΤΡΟΣ**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2004



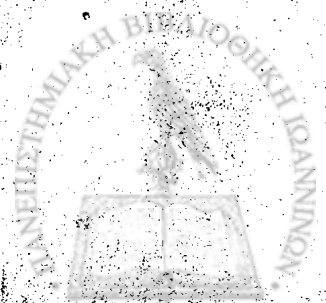
ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ



026008336963



Αρ. εισ.: 11051 / 2013.





ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ
ΤΟΜΕΑΣ ΠΑΘΟΛΟΓΙΑΣ

Β' ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ
Δ/ντής: Καθηγητής Μ. Σ. Ελισάφ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΝΕΦΡΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ
Δ/ντής: Καθηγητής Κ. Χ. Σιαμόπουλος

Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΦΑΙΝΟΤΥΠΩΝ ΤΗΣ ΑΠΟΠΡΩΤΕΪΝΗΣ Ε
ΣΤΟ ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟ ΤΩΝ ΛΙΠΟΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΣΕ
ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ΝΕΦΡΙΚΑ ΝΟΣΗΜΑΤΑ

ΛΥΜΠΕΡΟΠΟΥΛΟΣ Ν. ΕΥΑΓΓΕΛΟΣ
ΙΑΤΡΟΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2004



Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από την Ιατρική Σχολή του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα Ν. 5343/32, άρθρο 202, παράγραφος 2 (νομική κατοχύρωση του Ιατρικού Τμήματος).



ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΑΙΤΗΣΗΣ: 23-6-1997

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΟΡΙΣΜΟΥ ΤΡΙΜΕΛΟΥΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ:

331α / 21-10-1997

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ

Μουσής Ελισάφ

Αναπληρωτής Καθηγητής Παθολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

ΜΕΛΗ

Αλέξανδρος Τσελέπης

Επίκουρος Καθηγητής Βιοχημείας Χημικού Τμήματος Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Ιωάννης Γουδέβενος

Επίκουρος Καθηγητής Καρδιολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΟΡΙΣΜΟΥ ΤΟΥ ΘΕΜΑΤΟΣ: 6-11-1997

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΚΑΤΑΘΕΣΗΣ ΤΗΣ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ: 24-6-2004

ΠΡΟΕΔΡΟΣ ΤΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΣΧΟΛΗΣ: **Επαμεινώνδας Τσιάνος**, Καθηγητής

Παθολογίας

ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ (533α /25-5-2004):

Μουσής Ελισάφ

Καθηγητής Παθολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, επιβλέπων

Κωνσταντίνος Σιαμόπουλος

Καθηγητής Παθολογίας-Νεφρολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Επαμεινώνδας Τσιάνος

Καθηγητής Παθολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Αγαθοκλής Τσατσούλης

Καθηγητής Παθολογίας-Ενδοκρινολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Αλέξανδρος Τσελέπης

Αναπληρωτής Καθηγητής Βιοχημείας Χημικού Τμήματος Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Ιωάννης Γουδέβενος

Αναπληρωτής Καθηγητής Καρδιολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Ελένη Μπαϊρακτάρη

Επίκουρη Καθηγήτρια Βιολογικής Χημείας

ΒΑΘΜΟΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ: ΑΡΙΣΤΑ



Στο Δάσκαλό μου στην ιατρική και τη ζωή
Μουσή Ελισάφ



Στους γονείς μου Νίκο και Φρόσω
και στον αδερφό μου Γιώργο

Στη γυναίκα μου Γεωργία



ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Την επίβλεψη και άμεση καθοδήγηση της παρούσας διατριβής είχε ο Καθηγητής Παθολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, Υπεύθυνος του Ιατρείου Διαταραχών του Μεταβολισμού των Λιπιδίων και Διευθυντής της Β΄ Παθολογικής Κλινικής του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων κ. Μωυσής Ελισάφ. Η συνάντηση μαζί του αποτελεί για μένα το πιο σημαντικό γεγονός στη ζωή μου. Θα ήθελα να τον ευχαριστήσω από τα βάθη της καρδιάς μου για την πολύτιμη διδασκαλία του, αλλά και για την ανιδιοτελή αγάπη του. Τον ευχαριστώ ακόμη για την υπομονή του, για τη συνεχή συμπαράσταση και ενθάρρυνσή του, για την εμπιστοσύνη που έδειξε στο πρόσωπό μου, καθώς και για τις ατελείωτες ώρες που αφιέρωσε στην αξιολόγηση των αποτελεσμάτων και τη διόρθωση του χειρογράφου. Αποτελεί εξαιρετική τιμή για μένα να είμαι μαθητής ενός τόσο σπουδαίου Δασκάλου και τον ευγνωμονώ για αυτό.

Το μεγαλύτερο μέρος της διατριβής εκπονήθηκε στο Ερευνητικό Εργαστήριο Λιπιδίων και Λιποπρωτεϊνών του Τομέα Οργανικής Χημείας και Βιοχημείας του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων υπό την επίβλεψη και καθοδήγηση του Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Αλέξανδρου Τσελέπη. Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον κ. Τσελέπη για τη φιλοξενία που μου προσέφερε στο εργαστήριό του, για την υποστήριξή του, για το ειλικρινές ενδιαφέρον του, για τη διδασκαλία του σε θέματα βασικής έρευνας, αλλά και για την κριτική επεξεργασία των αποτελεσμάτων.

Το μεγαλύτερο μέρος του υλικού της μελέτης αντλήθηκε από τη Νεφρολογική Κλινική του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων. Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Καθηγητή Παθολογίας-Νεφρολογίας κ. Κωνσταντίνο Σιαμόπουλο διότι στάθηκε όλα αυτά τα χρόνια πολύτιμος συμπαρυστάτης στις προσπάθειές μου. Τον ευχαριστώ επίσης για τα όσα με δίδαξε για την προσέγγιση και αντιμετώπιση των ασθενών με χρόνια νεφρική νόσο.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Καθηγητή Παθολογίας, Διευθυντή της Α΄ Παθολογικής Κλινικής του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων και Πρόεδρο της Ιατρικής Σχολής κ. Επαμεινώνδα Τσιάνο για το αμέριστο ενδιαφέρον του κατά τα χρόνια της εκπαίδευσής μου στην Παθολογία. Επίσης, ευχαριστώ τον Αναπληρωτή Καθηγητή Καρδιολογίας κ. Ιωάννη Γουδέβενο για την ενεργή συμβολή του στην εξέλιξη της ερευνητικής μου εργασίας, καθώς και την Επίκουρη Καθηγήτρια Βιολογικής



Χημείας κ. Ελένη Μπαϊρακτάρη και τον Καθηγητή Παθολογίας-Ενδοκρινολογίας κ. Αγαθοκλή Τσατσούλη για τις πολύτιμες υποδείξεις τους.

Χρυστάω ευγνωμοσύνη στο Διευθυντή του Τμήματος Ταυτοποίησης Βιολογικών Δειγμάτων του Ινστιτούτου Νευρολογίας και Γενετικής της Κύπρου κ. Μάριο Καριόλου και τους εξάιρετους συνεργάτες του για τη διεξαγωγή ενός μέρους των πειραμάτων της διατριβής μου στο εργαστήριό τους.

Ευχαριστώ θερμά όλους τους ιατρούς και το νοσηλευτικό προσωπικό των μονάδων εξωνεφρικής κάθαρσης του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων, του Γενικού Νοσοκομείου Χατζηκώστα Ιωαννίνων, καθώς και των Νομαρχιακών Νοσοκομείων Αγρινίου, Άρτας, Πρέβεζας, Φιλιατών και Καβάλας για τη βοήθειά τους στη στρατολόγηση των ασθενών και τη συλλογή των βιολογικών δειγμάτων.

Επιθυμώ ακόμη να ευχαριστήσω όλους όσους με βοήθησαν κατά τη διάρκεια της εκπόνησης της διατριβής μου και ιδιαίτερα τον κ. Γεώργιο Μιλτιάδου, την κ. Σόνια-Αθηνά Καραμπίνα, την κ. Ελένη Παπαβασιλείου, την κ. Άννα Κακαφήκα, τον κ. Χρήστο Τζάλλα, τον κ. Βασίλη Τσιμιχόδημο και τον κ. Δημήτρη Χρηστίδη. Θα ήταν, τέλος, μεγάλη παράλειψη αν δεν ευχαριστούσα τους ίδιους τους ασθενείς με νεφρικά νοσήματα, οι οποίοι έδωσαν πρόθυμα τη συγκατάθεσή τους για τη συμμετοχή τους στη μελέτη.

Τέλος, οφείλω ένα τεράστιο ευχαριστώ στους γονείς μου Νίκο και Φρόσω, στον αδερφό μου Γιώργο και στη σύζυγό μου Γεωργία, γιατί χωρίς την πολύτιμη ηθική τους στήριξη θα ήταν αδύνατο να ολοκληρώσω τη διδακτορική μου διατριβή.

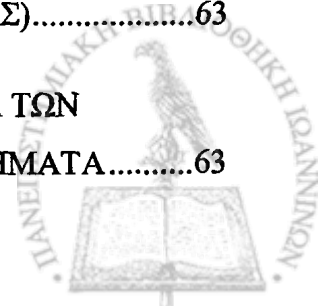


ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

I. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	27
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 ^ο	28
ΕΙΣΑΓΩΓΗ-ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ.....	28
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 ^ο	30
ΔΙΑΤΑΡΑΧΕΣ ΤΟΥ ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΥ ΤΩΝ ΛΙΠΙΔΙΩΝ ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ΧΡΟΝΙΑ ΝΕΦΡΙΚΗ ΑΝΕΠΑΡΚΕΙΑ (ΧΝΑ)	30
2.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	30
2.2. ΠΑΘΟΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΟΙ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΤΗΣ ΔΥΣΛΙΠΙΔΑΙΜΙΑΣ ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ΧΡΟΝΙΑ ΝΕΦΡΙΚΗ ΑΝΕΠΑΡΚΕΙΑ	31
2.3. ΣΥΝΕΠΕΙΕΣ ΤΗΣ ΥΠΕΡΛΙΠΙΔΑΙΜΙΑΣ ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ΧΡΟΝΙΑ ΝΕΦΡΙΚΗ ΑΝΕΠΑΡΚΕΙΑ	34
2.3.1. Καρδιαγγειακή νόσος	35
2.3.2. Εξέλιξη της νεφρικής νόσου	37
2.4. ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ ΤΗΣ ΥΠΕΡΛΙΠΙΔΑΙΜΙΑΣ ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ΧΝΑ.....	39
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 ^ο	42
ΑΠΟΠΡΩΤΕΪΝΗ Ε.....	42
3.1. ΣΥΝΟΨΗ ΤΩΝ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΩΝ ΤΗΣ ΑΡΟΕ	42
3.2. ΣΥΝΔΕΣΗ ΜΕ ΛΙΠΟΠΡΩΤΕΪΝΕΣ ΚΑΙ ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ	44
3.3. ΘΕΣΕΙΣ ΣΥΝΘΕΣΗΣ.....	45
3.4. ΧΗΜΙΚΗ ΔΟΜΗ.....	45
3.5. ΤΟ ΓΟΝΙΔΙΟ ΤΗΣ ΑΡΟΕ.....	47



3.6. ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΛΙΠΟΠΡΩΤΕΪΝΩΝ	49
3.6.1. Μεταφορά του διαιτητικού λίπους από το λεπτό έντερο στους περιφερικούς ιστούς και στο ήπαρ	49
3.6.2. Μεταφορά λιπιδίων από το ήπαρ στους περιφερικούς ιστούς.....	50
3.6.3. Μεταφορά χοληστερόλης από τους περιφερικούς ιστούς στο ήπαρ	53
3.6.4. Ανακατανομή χοληστερόλης στα κύτταρα ενός οργάνου ή ιστού.....	55
3.7. ΣΗΜΑΣΙΑ ΤΩΝ ΚΟΙΝΩΝ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΩΝ ΤΗΣ ΑΡΟΕ	56
3.7.1. Υπερλιποπρωτεΐναιμία τύπου ΙΙΙ (δυσβηταλιποπρωτεΐναιμία).....	56
3.7.2. Επίδραση των πολυμορφισμών της ΑροΕ στα επίπεδα των λιπιδαιμικών παραμέτρων του ορού.....	56
3.7.3. Πολυμορφισμοί της ΑροΕ και αθηρωματική αγγειακή νόσος	58
3.7.4. Πολυμορφισμοί της ΑροΕ και μεταβολή των λιπιδαιμικών παραμέτρων μετά τη χορήγηση φαρμακευτικής αγωγής	58
3.8. Η ΣΗΜΑΣΙΑ ΤΩΝ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΩΝ ΤΗΣ ΑΡΟΕ ΣΤΟΝ ΟΡΟ	59
3.8.1. Επίδραση στο μεταβολισμό των λιποπρωτεϊνών και τα επίπεδα των λιπιδαιμικών παραμέτρων	59
3.8.2. Η ΑροΕ του ορού ως πρωτεΐνη οξείας φάσης.....	60
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4 ^ο	62
ΑΠΟΛΙΠΟΠΡΩΤΕΪΝΗ Ε ΚΑΙ ΝΕΦΡΟΣ	62
4.1. ΓΕΝΙΚΑ.....	62
4.2. ΣΥΧΝΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΩΝ ΤΗΣ ΑΡΟΕ ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ΝΕΦΡΙΚΑ ΝΟΣΗΜΑΤΑ (ΕΚΤΟΣ ΤΗΣ ΔΙΑΒΗΤΙΚΗΣ ΝΕΦΡΟΠΑΘΕΙΑΣ).....	63
4.3. ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΩΝ ΤΗΣ ΑΡΟΕ ΣΤΑ ΕΠΙΠΕΔΑ ΤΩΝ ΛΙΠΙΔΑΙΜΙΚΩΝ ΠΑΡΑΜΕΤΡΩΝ ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ΝΕΦΡΙΚΑ ΝΟΣΗΜΑΤΑ.....	63



4.4. ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΙ ΤΗΣ ΑΡΟΕ ΚΑΙ ΚΑΡΔΙΑΓΓΕΙΑΚΗ ΝΟΣΟΣ ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ΝΕΦΡΙΚΗ ΑΝΕΠΑΡΚΕΙΑ	66
4.5. ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΙΣ ΤΗΣ ΑΡΟΕ ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ΝΕΦΡΙΚΑ ΝΟΣΗΜΑΤΑ	66
4.6. ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΙ ΤΗΣ ΑΡΟΕ ΚΑΙ ΔΙΑΒΗΤΙΚΗ ΝΕΦΡΟΠΑΘΕΙΑ	67
4.7. ΛΙΠΟΠΡΩΤΕΪΝΙΚΗ ΣΠΕΙΡΑΜΑΤΟΠΑΘΕΙΑ	69
4.8. ΑΡΟΕ ΚΑΙ ΑΛΛΕΣ ΠΤΥΧΕΣ ΤΩΝ ΝΕΦΡΙΚΩΝ ΝΟΣΗΜΑΤΩΝ.....	73
4.8.1. ΑροΕ και άλλες νεφροπάθειες	73
4.8.2. ΑροΕ και οστικά κατάγματα σε ασθενείς που υποβάλλονται σε αιμοκάθαρση.....	73
4.8.3. ΑροΕ και αμυλοείδωση που συσχετίζεται με την εξωνεφρική κάθαρση	74
4.8.4. ΑροΕ και νεφρική λειτουργία	74
4.8.5. Ο ρόλος της ΑροΕ στο μικροπεριβάλλον του νεφρού	74
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5 ^ο	76
ΠΑΡΑΟΞΟΝΑΣΗ (PON1).....	76
5.1. Η ΑΘΗΡΟΠΡΟΣΤΑΤΕΥΤΙΚΗ ΔΡΑΣΗ ΤΗΣ HDL.....	76
5.2. ΠΑΡΑΟΞΟΝΑΣΗ (PON1) - ΓΕΝΙΚΑ	77
5.3. ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΤΗΣ PON1	80
5.4. ΓΕΝΕΤΙΚΟΙ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΙ ΤΗΣ PON1	80
5.5. ΑΛΛΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΟΥ ΕΠΗΡΕΑΖΟΥΝ ΤΗΝ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑ ΤΗΣ PON1...81	
5.6. PON1 ΚΑΙ ΣΤΕΦΑΝΙΑΙΑ ΝΟΣΟΣ	82
5.6.1. Γενετικοί πολυμορφισμοί της PON1 και στεφανιαία νόσος.....	83
5.6.2. Ενεργότητα της PON1 στον ορό και στεφανιαία νόσος.....	83
5.7. PON1 ΚΑΙ ΑΛΛΑ ΝΟΣΗΜΑΤΑ.....	84



5.8. PON1 ΚΑΙ ΝΕΦΡΙΚΑ ΝΟΣΗΜΑΤΑ.....	84
5.8.1. Αντιοξειδωτική ικανότητα της HDL σε ασθενείς με νεφρική ανεπάρκεια	84
5.8.2. Ενεργότητα της PON1 σε ασθενείς με χρόνια νεφρική ανεπάρκεια.....	85
5.8.3. Πολυμορφισμοί της PON1 και νεφρικά νοσήματα	87
5.8.4. PON1 και διαβητική νεφροπάθεια	87
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6 ^ο	88
ΑΚΕΤΥΛΟΪΔΡΟΛΑΣΗ ΤΟΥ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗΣ ΤΩΝ ΑΙΜΟΠΕΤΑΛΙΩΝ (PAF-AH)	88
6.1. ΓΕΝΙΚΑ.....	88
6.1.1. Λειτουργία.....	88
6.1.2. Δομή της εκκρινόμενης μορφής της PAF-AH (PAF-AH του πλάσματος)	89
6.1.3. Γονίδιο της PAF-AH και μεταλλάξεις.....	90
6.1.4. Σύνδεση με τις λιποπρωτεΐνες του πλάσματος.....	91
6.1.5. Κυτταρική πηγή προέλευσης και ρύθμιση των επιπέδων της PAF-AH του πλάσματος.	92
6.2. PAF-AH ΚΑΙ ΑΘΗΡΟΓΕΝΕΣΗ	94
6.2.1. Η σημασία της οξειδωμένης LDL (oxLDL)	94
6.2.2. Ο ρόλος της PAF-AH των LDL (PAF-AH του πλάσματος).....	96
6.2.3. Ο ρόλος της PAF-AH των HDL.....	98
6.2.4. Επίδραση των υπολιπιδαιμικών φαρμάκων στα επίπεδα της PAF-AH.....	99
6.3. PAF-AH ΚΑΙ ΝΕΦΡΙΚΑ ΝΟΣΗΜΑΤΑ.....	100



II. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	102
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7 ^ο	103
ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	103
7.1. ΥΛΙΚΟ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ.....	103
7.2. ΜΕΘΟΔΟΙ.....	107
7.2.1. Προσδιορισμός της ολικής χοληστερόλης (T-CHOL) του ορού	107
7.2.2. Προσδιορισμός της χοληστερόλης των υψηλής πυκνότητας λιποπρωτεϊνών (HDL-C) του ορού.....	107
7.2.3. Υπολογισμός της χοληστερόλης των χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεϊνών (LDL-C) και της χοληστερόλης των μη υψηλής πυκνότητας λιποπρωτεϊνών (non HDL-C) του ορού	108
7.2.4. Προσδιορισμός των τριγλυκεριδίων (TRG) του ορού.....	108
7.2.5. Προσδιορισμός των απολιποπρωτεϊνών του ορού	109
7.2.6. Υπολογισμός του προβλεπόμενου ρυθμού σπειραματικής διήθησης (GFR)	109
7.2.7. Προσδιορισμός των γονοτύπων της παραοξονάσης (PON1).....	110
I. Απομόνωση γενετικού υλικού (DNA) απο τα λευκά αιμοσφαίρια του αίματος.....	110
II. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR) για τον προσδιορισμό του πολυμορφισμού PON1 Q192R της παραοξονάσης 1.....	113
III. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης για τον προσδιορισμό του πολυμορφισμού PON1 M55L της παραοξονάσης 1	118
7.2.8. Προσδιορισμός των φαινοτύπων της ApoE.....	120
7.2.8.1. Μέθοδος ισοηλεκτρικής εστίασης (IEF) των πρωτεϊνών των πολύ χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεϊνών (apoVLDL's)	120
7.2.8.2. Μέθοδος της Ανοσοαποτύπωσης (Immunoblotting).....	132



7.2.8.3. Συγκριτική αξιολόγηση των μεθόδων προσδιορισμού των φαινοτύπων (phenotyping) της ApoE.....	139
7.2.9. Προσδιορισμός των γονοτύπων της ApoE.....	140
7.2.10. Προσδιορισμός της ενεργότητας της PAF-AH	147
7.2.11. Προσδιορισμός της ενεργότητας της PON1 με υπόστρωμα το paraoxon [PON1(paraoxon)].....	149
7.2.12. Προσδιορισμός της ενεργότητας της PON1 με υπόστρωμα το phenyl acetate [PON1(phenylacetate)].....	150
7.2.13. Προσδιορισμός των υπολοίπων εργαστηριακών παραμέτρων	151
7.2.14. Μετατροπή των τιμών των εργαστηριακών παραμέτρων σε μονάδες του διεθνούς συστήματος (SI)	152
7.3. ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ.....	153
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8 ^ο	155
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	155
8.1. ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΟΥ ΠΛΗΘΥΣΜΟΥ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ	155
8.2. ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΩΝ ΤΗΣ ΑΡΟΕ ΣΤΙΣ ΛΙΠΙΔΑΙΜΙΚΕΣ ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΥΣ ΤΟΥ ΟΡΟΥ ΤΩΝ ΥΓΙΩΝ ΑΤΟΜΩΝ	158
8.3. ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΩΝ ΤΗΣ ΑΡΟΕ ΣΤΗ ΝΕΦΡΙΚΗ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΤΩΝ ΥΓΙΩΝ ΑΤΟΜΩΝ	163
8.4. ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΤΗΣ ΕΠΙΠΤΩΣΗΣ ΤΩΝ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΩΝ ΤΗΣ ΑΡΟΕ ΜΕΤΑΞΥ ΤΩΝ ΑΣΘΕΝΩΝ ΜΕ ΤΕΛΙΚΟΥ ΣΤΑΔΙΟΥ ΧΝΑ (ΣΤΑΔΙΟ V) ΚΑΙ ΤΗΣ ΟΜΑΔΑΣ ΕΛΕΓΧΟΥ	168
8.5. ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΑΡΟΕ ΣΤΙΣ ΛΙΠΙΔΑΙΜΙΚΕΣ ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΥΣ ΤΟΥ ΟΡΟΥ ΤΩΝ ΑΣΘΕΝΩΝ ΠΟΥ ΥΠΟΒΑΛΛΟΝΤΑΝ ΣΕ ΑΙΜΟΚΑΘΑΡΣΗ	169



8.5.1. Επίδραση των πολυμορφισμών της ApoE στις λιπιδαιμικές παραμέτρους του ορού των ασθενών που υποβάλλονταν σε αιμοκάθαρση.....	169
8.5.2. Συσχέτιση της συγκέντρωσης της ApoE στον ορό με τις λιπιδαιμικές παραμέτρους των ασθενών που υποβάλλονταν σε αιμοκάθαρση.....	171
8.5.2. Συνδυασμένη επίδραση της συγκέντρωσης της ApoE στον ορό και των πολυμορφισμών της ApoE στις λιπιδαιμικές παραμέτρους των ασθενών που υποβάλλονταν σε αιμοκάθαρση	175
8.6. ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΑΡΟΕ ΣΤΙΣ ΛΙΠΙΔΑΙΜΙΚΕΣ ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΥΣ ΤΟΥ ΟΡΟΥ ΤΩΝ ΑΣΘΕΝΩΝ ΠΟΥ ΥΠΟΒΑΛΛΟΝΤΑΝ ΣΕ ΣΥΝΕΧΗ ΦΟΡΗΤΗ ΠΕΡΙΤΟΝΑΪΚΗ ΚΑΘΑΡΣΗ.....	179
8.7. ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΑΡΟΕ ΣΤΙΣ ΛΙΠΙΔΑΙΜΙΚΕΣ ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΥΣ ΤΟΥ ΟΡΟΥ ΤΩΝ ΑΣΘΕΝΩΝ ΜΕ ΠΡΟΤΕΛΙΚΟ ΣΤΑΔΙΟ (III-IV) ΧΡΟΝΙΑΣ ΝΕΦΡΙΚΗΣ ΑΝΕΠΑΡΚΕΙΑΣ	182
8.8. ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΤΗΣ ΕΠΙΠΤΩΣΗΣ ΤΩΝ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΩΝ ΤΗΣ ΠΑΡΑΟΞΟΝΑΣΗΣ 1 (PON1) ΜΕΤΑΞΥ ΤΩΝ ΑΣΘΕΝΩΝ ΜΕ ΤΕΛΙΚΟΥ ΣΤΑΔΙΟΥ ΧΝΑ ΚΑΙ ΤΩΝ ΥΓΙΩΝ ΑΤΟΜΩΝ.....	185
8.8.1. Πολυμορφισμός Q192R της PON1	185
8.8.2. Πολυμορφισμός M55L της PON1.....	186
8.9. ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΩΝ ΤΗΣ PON1 ΣΤΙΣ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΕΣ ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΥΣ ΤΩΝ ΑΣΘΕΝΩΝ ΠΟΥ ΥΠΟΒΑΛΛΟΝΤΑΝ ΣΕ ΑΙΜΟΚΑΘΑΡΣΗ. 187	
8.9.1. Πολυμορφισμός Q192R της PON1	187
8.9.2. Πολυμορφισμός M55L της PON1.....	189
8.9.3. Συσχέτιση της ενεργότητας της PON1 με την ApoE	191
8.9.4. Συσχετίσεις της ενεργότητας της PON1 με διάφορες κλινικοεργαστηριακές παραμέτρους	191



8.10. ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΩΝ ΤΗΣ PON1 ΣΤΙΣ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΕΣ ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΥΣ ΤΩΝ ΑΣΘΕΝΩΝ ΠΟΥ ΥΠΟΒΑΛΛΟΝΤΑΝ ΣΕ ΣΥΝΕΧΗ ΦΟΡΗΤΗ ΠΕΡΙΤΟΝΑΪΚΗ ΚΑΘΑΡΣΗ	194
8.10.1. Πολυμορφισμός Q192R της PON1	194
8.10.2. Πολυμορφισμός M55L της PON1	195
8.10.3. Συσχετίσεις της ενεργότητας της PON1 στους ασθενείς που υποβάλλονταν σε ΣΦΠΚ με διάφορες κλινικοεργαστηριακές παραμέτρους.....	196
8.11. ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΩΝ ΤΗΣ PON1 ΣΤΙΣ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΕΣ ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΥΣ ΤΩΝ ΑΣΘΕΝΩΝ ΠΟΥ ΒΡΙΣΚΟΝΤΑΝ ΣΕ ΠΡΟΤΕΛΙΚΟ ΣΤΑΔΙΟ ΧΝΑ (ΣΤΑΔΙΑ ΙΙΙ-ΙV).....	197
8.12. ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΤΗΣ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑΣ ΤΗΣ PON1 ΜΕΤΑΞΥ ΤΩΝ ΟΜΑΔΩΝ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ	198
8.13. Η ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑ ΤΗΣ ΡΑF-ΑΚΕΤΥΛΟΎΔΡΟΛΑΣΗΣ ΣΤΟΥΣ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ΧΡΟΝΙΑ ΝΕΦΡΙΚΗ ΑΝΕΠΑΡΚΕΙΑ ΚΑΙ ΣΤΗΝ ΟΜΑΔΑ ΕΛΕΓΧΟΥ.....	203
8.14. ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΤΗΣ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑΣ ΤΗΣ ΡΑF-ΑΗ ΜΕ ΔΙΑΦΟΡΕΣ ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΕΣ ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΥΣ	210
8.14.1. Συσχέτιση της ενεργότητας της ΡΑF-ΑΗ με την ΑροΕ	210
8.14.2. Συσχέτιση της ενεργότητας της ΡΑF-ΑΗ με τους πολυμορφισμούς της PON1.....	213
8.14.3. Συσχέτιση της ενεργότητας της ΡΑF-ΑΗ με άλλες κλινικοεργαστηριακές παραμέτρους στους ασθενείς που υποβάλλονταν σε ΑΜΚ	214
8.15. ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΜΙΑΣ ΣΥΝΕΔΡΙΑΣ ΑΙΜΟΚΑΘΑΡΣΗΣ ΚΑΙ ΤΟΥ ΤΥΠΟΥ ΤΗΣ ΜΕΜΒΡΑΝΗΣ ΤΟΥ ΦΙΛΤΡΟΥ ΣΤΗΝ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑ ΤΗΣ PON1 ΚΑΙ ΤΗΣ ΡΑF-ΑΗ	217
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 9 ^ο	224
ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ	224



9.1. ΛΙΠΙΔΑΙΜΙΚΟ ΠΡΟΦΙΛ ΤΩΝ ΑΤΟΜΩΝ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ	224
9.2. ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΑΡΟΕ ΣΤΙΣ ΛΙΠΙΔΑΙΜΙΚΕΣ ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΥΣ ΤΟΥ ΟΡΟΥ ΤΩΝ ΥΓΙΩΝ ΑΤΟΜΩΝ	225
9.3. ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΩΝ ΤΗΣ ΑΡΟΕ ΣΤΗ ΝΕΦΡΙΚΗ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΤΩΝ ΥΓΙΩΝ ΑΤΟΜΩΝ	228
9.4. ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΤΗΣ ΕΠΙΠΤΩΣΗΣ ΤΩΝ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΩΝ ΤΗΣ ΑΡΟΕ ΜΕΤΑΞΥ ΤΩΝ ΑΣΘΕΝΩΝ ΜΕ ΤΕΛΙΚΟΥ ΣΤΑΔΙΟΥ ΧΝΑ (ΣΤΑΔΙΟ V) ΚΑΙ ΤΩΝ ΥΓΙΩΝ ΑΤΟΜΩΝ	231
9.5. ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΑΡΟΕ ΣΤΙΣ ΛΙΠΙΔΑΙΜΙΚΕΣ ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΥΣ ΤΟΥ ΟΡΟΥ ΤΩΝ ΑΣΘΕΝΩΝ ΜΕ ΧΡΟΝΙΑ ΝΕΦΡΙΚΗ ΝΟΣΟ	232
9.5.1. Επίδραση της ΑροΕ στις λιπιδαιμικές παραμέτρους του ορού των ασθενών που υποβάλλονταν σε αιμοκάθαρση	232
9.5.2. Επίδραση της ΑροΕ στις λιπιδαιμικές παραμέτρους του ορού των ασθενών που υποβάλλονταν σε συνεχή φορητή περιτοναϊκή κάθαρση	236
9.5.3. Επίδραση της ΑροΕ στις λιπιδαιμικές παραμέτρους του ορού των ασθενών με προτελικού σταδίου (III-IV) χρόνια νεφρική ανεπάρκεια	237
9.6. ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΤΗΣ ΕΠΙΠΤΩΣΗΣ ΤΩΝ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΩΝ ΤΗΣ ΠΑΡΑΟΞΟΝΑΣΗΣ 1 (PON1) ΜΕΤΑΞΥ ΤΩΝ ΑΣΘΕΝΩΝ ΜΕ ΤΕΛΙΚΟΥ ΣΤΑΔΙΟΥ ΧΡΟΝΙΑ ΝΕΦΡΙΚΗ ΑΝΕΠΑΡΚΕΙΑ ΚΑΙ ΤΩΝ ΥΓΙΩΝ ΑΤΟΜΩΝ	238
9.7. ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΩΝ ΤΗΣ PON1 ΣΤΙΣ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΕΣ ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΥΣ ΤΩΝ ΑΣΘΕΝΩΝ ΜΕ ΧΡΟΝΙΑ ΝΕΦΡΙΚΗ ΝΟΣΟ	239
9.8. ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΟΥ ΕΠΗΡΕΑΖΟΥΝ ΤΗΝ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑ ΤΗΣ PON1 ΣΤΟΥΣ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ΧΡΟΝΙΑ ΝΕΦΡΙΚΗ ΝΟΣΟ	240
9.9. ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΤΗΣ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑΣ ΤΗΣ PON1 ΜΕΤΑΞΥ ΤΩΝ ΟΜΑΔΩΝ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ	241
9.10. Η ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑ ΤΗΣ ΡΑΦ-ΑΚΕΤΥΛΟΨΔΡΟΛΑΣΗΣ ΣΤΙΣ ΔΙΑΦΟΡΕΣ ΟΜΑΔΕΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ	246

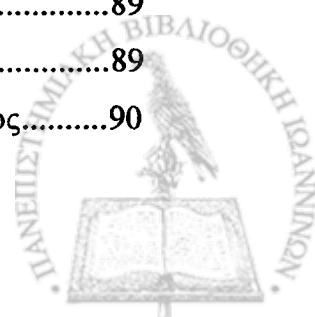


9.11. ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΜΙΑΣ ΣΥΝΕΔΡΙΑΣ ΑΙΜΟΚΑΘΑΡΣΗΣ ΚΑΙ ΤΟΥ ΤΥΠΟΥ ΤΗΣ ΜΕΜΒΡΑΝΗΣ ΤΟΥ ΦΙΛΤΡΟΥ ΣΤΗΝ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑ ΤΗΣ ΡΟΝ1 ΚΑΙ ΤΗΣ ΡΑΦ-ΑΗ	252
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 10 ^ο	255
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	255
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	259
SUMMARY	262
ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ.....	265
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΑΝΑΦΟΡΕΣ	267

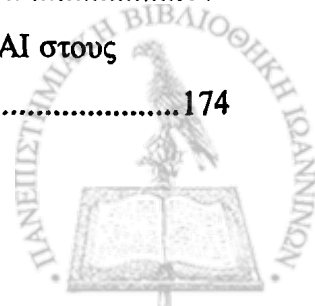


ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

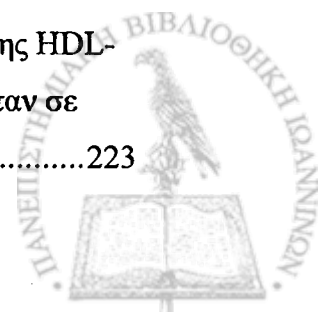
Σχήμα 1. Δράσεις της ApoCIII	32
Σχήμα 2. Διαταραχές του μεταβολισμού των λιπιδίων στην ουραιμία.....	34
Σχήμα 3. Αθηρογενετικότητα των μικρών πυκνών LDL	36
Σχήμα 4. Η σχέση της ApoE με τις πλούσιες σε τριγλυκερίδια λιποπρωτεΐνες	44
Σχήμα 5. Αλληλεπίδραση της ApoE με τους υποδοχείς της.	45
Σχήμα 6. Δευτεροταγής δομή της ApoE	46
Σχήμα 7. Οι κύριες ισομορφές της ApoE.....	47
Σχήμα 8. Σχηματική αναπαράσταση του γονιδίου της ApoE.....	48
Σχήμα 9. Η ApoE και ο μεταβολισμός των λιποπρωτεϊνών.....	49
Σχήμα 10: Μεταβολισμός των χυλομικρών.....	50
Σχήμα 11: Μεταβολισμός των VLDL	52
Σχήμα 12. Πρόσληψη των λιποπρωτεϊνικών καταλοίπων από τα ηπατοκύτταρα.....	53
Σχήμα 13: Μεταφορά χοληστερόλης από τους περιφερικούς ιστούς στο ήπαρ.....	54
Σχήμα 14. Ανάστροφη μεταφορά χοληστερόλης και η λειτουργία του μεταφορέα ABCA1 (ATP-binding cassette transporter A1) και του υποδοχέα SR-BI (scavenger receptor BI)	55
Σχήμα 15. Ο ρόλος των επιπέδων της ApoE στον ορό	61
Σχήμα 16. Γεωγραφική κατανομή των περιστατικών λιποπρωτεϊνικής σπειραματοπάθειας	70
Σχήμα 17. Παθογένεια του σχηματισμού λιποπρωτεϊνικών θρόμβων στη λιποπρωτεϊνική σπειραματοπάθεια.....	72
Σχήμα 18. Η αντιαθηρογόνος δράση της HDL.....	76
Σχήμα 19. Μεταβολισμός της HDL και οδός της ανάστροφης μεταφοράς χοληστερόλης ..	76
Σχήμα 20. Η δομή της PON1	78
Σχήμα 21. Η δομή του ενεργού κέντρου της PON1.....	78
Σχήμα 22. Η σύνδεση της PON1 με την HDL.....	78
Σχήμα 23. Υδρόλυση του παραοxon από την PON1	79
Σχήμα 24. Υδρόλυση του PAF από την PAF-AH	88
Σχήμα 25. Υδρόλυση των οξειδωμένων φωσφολιπιδίων από την PAF-AH.....	89
Σχήμα 26. Η δομή της PAF-AH του πλάσματος	89
Σχήμα 27. Υποθετικό μοντέλο της τριτοταγούς δομής της PAF-AH του πλάσματος.....	90



Σχήμα 28. Πηγές παραγωγής κυτταροκινών, δεικτών φλεγμονής και της PAF-AH (lipoprotein-associated phospholipase A2)	93
Σχήμα 29. Η δημιουργία της αθηρωματικής πλάκας	95
Σχήμα 30. Η διαδικασία της αθηρογένεσης	95
Σχήμα 31. Η οξείδωση των LDL	96
Σχήμα 32. Οι γονοτυπικοί και φαινοτυπικοί πολυμορφισμοί της ApoE.....	120
Σχήμα 33. Σχηματισμός πηκτής πολυακρυλαμίδιου.....	122
Σχήμα 34. Ισοηλεκτρική εστίαση (IEF)	124
Σχήμα 35. Σχηματική αναπαράσταση της ανίχνευσης των ισομορφών της ApoE με τη μέθοδο της ισοηλεκτρικής εστίασης των πρωτεϊνών των VLDL.....	130
Σχήμα 36. Σχηματική αναπαράσταση της ανίχνευσης των ισομορφών της ApoE με τη μέθοδο της ανοσοαποτύπωσης	139
Σχήμα 37. Αρχή της μεθόδου προσδιορισμού των γονοτύπων της ApoE με τη μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR).....	141
Σχήμα 38. Τα επίπεδα της ApoE στις διάφορες ομάδες της μελέτης	157
Σχήμα 39. Επίδραση των πολυμορφισμών της ApoE στα επίπεδα της κρεατινίνης του ορού των υγιών ατόμων.....	166
Σχήμα 40. Επίδραση των πολυμορφισμών της ApoE στην προβλεπόμενη GFR των υγιών ατόμων.....	167
Σχήμα 41. Συσχέτιση της συγκέντρωσης της ApoE με τα επίπεδα της ολικής χοληστερόλης στους ασθενείς που υποβάλλονταν σε αιμοκάθαρση	171
Σχήμα 42. Συσχέτιση της συγκέντρωσης της ApoE με τα επίπεδα των τριγλυκεριδίων στους ασθενείς που υποβάλλονταν σε αιμοκάθαρση	172
Σχήμα 43. Συσχέτιση της συγκέντρωσης της ApoE με τα επίπεδα της HDL χοληστερόλης στους ασθενείς που υποβάλλονταν σε αιμοκάθαρση	172
Σχήμα 44. Συσχέτιση της συγκέντρωσης της ApoE με τα επίπεδα της LDL χοληστερόλης στους ασθενείς που υποβάλλονταν σε αιμοκάθαρση	173
Σχήμα 45. Συσχέτιση της συγκέντρωσης της ApoE με τα επίπεδα της non HDL χοληστερόλης στους ασθενείς που υποβάλλονταν σε αιμοκάθαρση.....	173
Σχήμα 46. Συσχέτιση της συγκέντρωσης της ApoE με τα επίπεδα της ApoB στους ασθενείς που υποβάλλονταν σε αιμοκάθαρση.....	174
Σχήμα 47. Συσχέτιση της συγκέντρωσης της ApoE με τα επίπεδα της ApoAI στους ασθενείς που υποβάλλονταν σε αιμοκάθαρση	174



Σχήμα 48. Η ενεργότητα της PON1 (paraoxon) στους ασθενείς της μελέτης και στην ομάδα ελέγχου	200
Σχήμα 49. Η ενεργότητα της PON1 (paraoxon) ανά συνδυασμένο γονότυπο στους ασθενείς της μελέτης και στην ομάδα ελέγχου.....	200
Σχήμα 50. Η ενεργότητα της PON1 (paraoxon) μετά από τη διόρθωση για τα επίπεδα της ApoA1 στους ασθενείς της μελέτης και στην ομάδα ελέγχου.....	201
Σχήμα 51. Η ενεργότητα της PON1 (phenylacetate) στους ασθενείς της μελέτης και στην ομάδα ελέγχου	201
Σχήμα 52. Η ενεργότητα της PON1 (phenylacetate) μετά από τη διόρθωση για τα επίπεδα της ApoA1 στους ασθενείς της μελέτης και στην ομάδα ελέγχου.....	202
Σχήμα 53. Η ολική ενεργότητα της PAF-AH στους ασθενείς της μελέτης και στην ομάδα ελέγχου	205
Σχήμα 54. Η ολική ενεργότητα της PAF-AH του ορού μετά από τη διόρθωση για τα επίπεδα της LDL-C στους ασθενείς της μελέτης και στην ομάδα ελέγχου	206
Σχήμα 55. Η ενεργότητα της HDL-PAF AH στους ασθενείς της μελέτης και στην ομάδα ελέγχου.....	207
Σχήμα 56. Η ενεργότητα της HDL-PAF AH μετά από τη διόρθωση για τα επίπεδα της HDL-C στους ασθενείς της μελέτης και στην ομάδα ελέγχου.....	208
Σχήμα 57. Ο λόγος ενεργότητας HDL-PAF AH/ ολική PAF-AH στους ασθενείς της μελέτης και στην ομάδα ελέγχου.....	209
Σχήμα 58. Συσχέτιση της συγκέντρωσης της ApoE με την ενεργότητα της HDL-PAF AH στους ασθενείς που υποβάλλονταν σε AMK	211
Σχήμα 59. Συσχέτιση της συγκέντρωσης της ApoE με τη διορθωμένη για τα επίπεδα της HDL-C ενεργότητα της HDL-PAF AH στους ασθενείς που υποβάλλονταν σε AMK	211
Σχήμα 60. Συσχέτιση της συγκέντρωσης της ApoE με τη διορθωμένη για τα επίπεδα της ApoA1 ενεργότητα της HDL-PAF AH στους ασθενείς που υποβάλλονταν σε AMK .	212
Σχήμα 61. Συσχέτιση της ενεργότητας της HDL-PAF AH με τη συγκέντρωση των τριγλυκεριδίων στους ασθενείς που υποβάλλονταν σε AMK.....	216
Σχήμα 62. Μεταβολές της διορθωμένης για τα επίπεδα της HDL-C ενεργότητας της HDL-PAF AH κατά τη διάρκεια μίας συνεδρίας AMK σε ασθενείς που υποβάλλονταν σε AMK με κυτταρινικού τύπου μεμβράνη.....	221
Σχήμα 63. Μεταβολές της διορθωμένης για τα επίπεδα της HDL-C ενεργότητας της HDL-PAF AH κατά τη διάρκεια μίας συνεδρίας AMK σε ασθενείς που υποβάλλονταν σε AMK με συνθετικού τύπου μεμβράνη.....	223



ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1. Διαφορές στη διαμόρφωση στο χώρο των ισομορφών E3 και E4 της ApoE.....	48
Εικόνα 2. Μεγάλες διατάσεις των τριχοειδών του σπειράματος που περιέχουν λιποπρωτεϊνικούς θρόμβους (εικόνα απλού μικροσκοπίου, PAS X 200).....	70
Εικόνα 3. Μελέτη με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο (X 3.000) της βιοψίας της εικόνας 2.....	71
Εικόνα 4. Ηλεκτροφόρηση του προϊόντος της PCR σε πηκτή αγαρόζης	117
Εικόνα 5. Ο γενετικός πολυμορφισμός Q192R της PON1.....	118
Εικόνα 6. Ο γενετικός πολυμορφισμός M55L της PON1	119
Εικόνα 7 (A + B). Οι φαινότυποι της ApoE με τη μέθοδο της ισοηλεκτρικής εστίασης των πρωτεϊνών των VLDL.....	130
Εικόνα 8. Ισομορφές της ApoE με τη μέθοδο της ανοσοαποτύπωσης.	138
Εικόνα 9. Οι γονότυποι της ApoE με τη μέθοδο της PCR.....	145

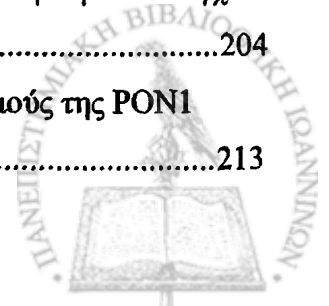


ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1. Διαταραχές των λιπιδίων σε ασθενείς με νεφρικά νοσήματα.....	30
Πίνακας 2. Οι κύριες λειτουργίες της ApoE.....	42
Πίνακας 3. Ο ρόλος της ApoE στα νεφρικά νοσήματα.....	62
Πίνακας 4. Σύνοψη των μελετών για την επίδραση των πολυμορφισμών της ApoE στις λιπιδαιμικές παραμέτρους ασθενών με νεφρικά νοσήματα	65
Πίνακας 5. Σύνοψη των μελετών για την επίδραση των πολυμορφισμών της ApoE στην εμφάνιση και εξέλιξη της διαβητικής νεφροπάθειας (ΔΝ).....	67
Πίνακας 6. Μετατροπή των τιμών των εργαστηριακών παραμέτρων από συμβατικές μονάδες σε μονάδες του διεθνούς συστήματος (SI)	152
Πίνακας 7. Κλινικά και εργαστηριακά χαρακτηριστικά του πληθυσμού της μελέτης	156
Πίνακας 8. Επίδραση των πολυμορφισμών της ApoE στο λιπιδαιμικό προφίλ των υγιών μαρτύρων.....	159
Πίνακας 9. Επίδραση των πολυμορφισμών της ApoE και άλλων παραμέτρων στο λιπιδαιμικό προφίλ του ορού των υγιών ατόμων	161
Πίνακας 10. Συνδυασμένη επίδραση των πολυμορφισμών και της συγκέντρωσης της ApoE στις λιπιδαιμικές παραμέτρους του ορού των υγιών ατόμων.....	162
Πίνακας 11. Επίδραση των πολυμορφισμών της ApoE στη νεφρική λειτουργία των υγιών ατόμων.....	164
Πίνακας 12. Επίδραση των πολυμορφισμών της ApoE στη νεφρική λειτουργία των υγιών ατόμων σε σχέση με το φύλο.....	165
Πίνακας 13. Επίπτωση των πολυμορφισμών της ApoE στους ασθενείς με ΤΣΧΝΑ και στην ομάδα ελέγχου	168
Πίνακας 14. Επίδραση των πολυμορφισμών της ApoE στο λιπιδαιμικό προφίλ των ασθενών που υποβάλλονταν σε αιμοκάθαρση.....	170
Πίνακας 15. Συνδυασμένη επίδραση της συγκέντρωσης και των πολυμορφισμών της ApoE (μοντέλο Β) σε σύγκριση με την επίδραση μόνο των πολυμορφισμών της ApoE (μοντέλο Α) στα επίπεδα των λιπιδαιμικών παραμέτρων των ασθενών που υποβάλλονταν σε ΑΜΚ	176
Πίνακας 16. Συνδυασμένη επίδραση της συγκέντρωσης και των πολυμορφισμών της ApoE (μοντέλο Β) σε σύγκριση με την επίδραση μόνο των πολυμορφισμών της ApoE	



(μοντέλο A) στα επίπεδα των αποπρωτεϊνών των ασθενών που υποβάλλονταν σε AMK	178
Πίνακας 17. Επίδραση των πολυμορφισμών της ApoE στο λιπιδαιμικό προφίλ των ασθενών που υποβάλλονταν σε ΣΦΠΚ.....	180
Πίνακας 18. Συσχέτιση των επιπέδων της ApoE με τις λιπιδαιμικές παραμέτρους του ορού των ασθενών που υποβάλλονταν σε ΣΦΠΚ.....	181
Πίνακας 19. Επίδραση των πολυμορφισμών της ApoE στο λιπιδαιμικό προφίλ των ασθενών με προτελικό στάδιο ΧΝΑ (ΠΤΧΝΑ)	183
Πίνακας 20. Συσχέτιση των επιπέδων της ApoE με τις λιπιδαιμικές παραμέτρους του ορού των ασθενών με ΠΤΧΝΑ.....	184
Πίνακας 21. Επίπτωση του πολυμορφισμού Q192R της PON1 στα άτομα της μελέτης ...	185
Πίνακας 22. Επίπτωση του πολυμορφισμού M55L της PON1 στα άτομα της μελέτης.....	186
Πίνακας 23. Επίδραση του πολυμορφισμού Q192R της PON1 στις λιπιδαιμικές παραμέτρους και την ενεργότητα της PON1 στους ασθενείς που υποβάλλονταν σε AMK	188
Πίνακας 24. Επίδραση του πολυμορφισμού M55L της PON1 στις λιπιδαιμικές παραμέτρους και την ενεργότητα της PON1 στους ασθενείς που υποβάλλονταν σε AMK	190
Πίνακας 25. Συσχέτιση της ενεργότητας της PON1(paraoxon) στους ασθενείς που υποβάλλονταν σε αιμοκάθαρση με διάφορες κλινικοεργαστηριακές παραμέτρους	192
Πίνακας 26. Συσχέτιση της ενεργότητας της PON1(phenylacetate) στους ασθενείς που υποβάλλονταν σε αιμοκάθαρση με διάφορες κλινικοεργαστηριακές παραμέτρους	193
Πίνακας 27. Επίδραση του πολυμορφισμού Q192R της PON1 στην ενεργότητα της PON1 και τα επίπεδα της HDL-C και της ApoAΙ στους ασθενείς που υποβάλλονταν σε ΣΦΠΚ	194
Πίνακας 28. Επίδραση του πολυμορφισμού M55L της PON1 στην ενεργότητα της PON1 και στα επίπεδα της HDL-C και της ApoAΙ στους ασθενείς που υποβάλλονταν σε ΣΦΠΚ.....	196
Πίνακας 29. Ενεργότητα της PON1 στους ασθενείς της μελέτης και στην ομάδα ελέγχου	199
Πίνακας 30. Ενεργότητα της PAF-AH στους ασθενείς της μελέτης και στην ομάδα ελέγχου	204
Πίνακας 31. Η ενεργότητα της PAF-AH σε σχέση με τους πολυμορφισμούς της PON1 στους ασθενείς που υποβάλλονταν σε AMK	213



Πίνακας 32. Συσχέτιση της ολικής ενεργότητας της PAF-AH του ορού με άλλες κλινικοεργαστηριακές παραμέτρους στους ασθενείς που υποβάλλονταν σε AMK.....	214
Πίνακας 33. Συσχέτιση της ενεργότητας της HDL-PAF AH με άλλες κλινικοεργαστηριακές παραμέτρους στους ασθενείς που υποβάλλονταν σε AMK.....	215
Πίνακας 34. Κλινικά και εργαστηριακά χαρακτηριστικά των ασθενών που υποβάλλονταν σε AMK ανάλογα με τον τύπο της μεμβράνης του φίλτρου που χρησιμοποιήθηκε	218
Πίνακας 35. Μεταβολές των λιπιδαιμικών παραμέτρων και των ενεργοτήτων των ενζύμων κατά τη διάρκεια μίας συνεδρίας AMK στους ασθενείς που υποβάλλονταν σε AMK με κυτταρινικού τύπου μεμβράνες	220
Πίνακας 36. Μεταβολές των λιπιδαιμικών παραμέτρων και των ενεργοτήτων των ενζύμων κατά τη διάρκεια μίας συνεδρίας AMK στους ασθενείς που υποβάλλονταν σε AMK με συνθετικού τύπου μεμβράνες	222
Πίνακας 37. Συχνότητες των αλληλίων της ApoE στον Ελληνικό πληθυσμό	225



ΚΕΦΑΛΑΙΟ

Faint, illegible text at the top of the page, possibly bleed-through from the reverse side.

I. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Main body of faint, illegible text, likely bleed-through from the reverse side of the document.

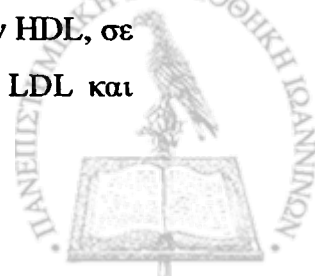


ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1^ο

ΕΙΣΑΓΩΓΗ-ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Η αθηρωματική αγγειακή νόσος αποτελεί την κύρια αιτία νοσηρότητας και θνησιμότητας σε ασθενείς με νεφρικά νοσήματα και κυρίως σε ασθενείς με τελικό στάδιο χρόνιας νεφρικής ανεπάρκειας (στάδιο V). Πολύ συχνά αυτοί οι ασθενείς παρουσιάζουν διαταραχές του μεταβολισμού των λιποπρωτεϊνών, οι οποίες αφενός μεν συνεισφέρουν στην επιτάχυνση της αθηρωματικής διαδικασίας και την εμφάνιση πρόωμης καρδιαγγειακής νόσου, αφετέρου δε συσχετίζονται με την εξέλιξη της νεφρικής βλάβης. Η αποπρωτεΐνη E (ApoE) αποτελεί βασικό συστατικό των περισσότερων λιποπρωτεϊνών και διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο στο μεταβολισμό τους, αφού συνδέεται με τους αντίστοιχους κυτταρικούς υποδοχείς που είναι υπεύθυνοι για τον καταβολισμό των λιποπρωτεϊνικών σωματιδίων. Υπάρχουν τρεις κύριες φαινοτυπικές ισομορφές της ApoE που διαφέρουν μεταξύ τους σε απλές αντικαταστάσεις αμινοξέων: E2, E3 και E4. Αυτοί οι πολυμορφισμοί της ApoE, αλλά και τα επίπεδά της στον ορό, καθορίζουν σε σημαντικό βαθμό τις συγκεντρώσεις των λιποπρωτεϊνών του πλάσματος και κατά συνέπεια τον κίνδυνο εμφάνισης καρδιαγγειακής νόσου στο γενικό πληθυσμό. Τα δεδομένα για το ρόλο των φαινοτύπων της ApoE στο μεταβολισμό των λιποπρωτεϊνών σε ασθενείς με νεφρικά νοσήματα είναι λίγα, ενώ δεν υπάρχει καμία μελέτη για την επίδραση της συγκέντρωσης στον ορό της ApoE στα επίπεδα των λιπιδίων του πλάσματος σε αυτούς τους ασθενείς. Επιπρόσθετα, τα στοιχεία για το ρόλο της ApoE στην εξέλιξη της νεφρικής βλάβης είναι αντικρουόμενα, ενώ δεν υπάρχουν δεδομένα για την επίδραση των φαινοτύπων της ApoE στη νεφρική λειτουργία υγιών ατόμων. Τέλος, δεν υπάρχει καμία μελέτη για την επίπτωση των πολυμορφισμών της ApoE σε Έλληνες ασθενείς με νεφρικά νοσήματα.

Όπως είναι γνωστό, τα χαμηλά επίπεδα της χοληστερόλης των υψηλής πυκνότητας λιποπρωτεϊνών (HDL) στο πλάσμα αποτελούν σημαντικό παράγοντα κινδύνου για την εμφάνιση στεφανιαίας νόσου και σε ασθενείς με νεφρική ανεπάρκεια. Πολλές μελέτες έδειξαν ότι η HDL εμφανίζει αντιφλεγμονώδεις και αντιοξειδωτικές ιδιότητες. Σημαντικό ρόλο σε αυτές τις ιδιότητες της HDL διαδραματίζουν δύο ένζυμα, τα οποία συνδέονται με αυτή τη λιποπρωτεΐνη: η παραοξονάση (PON1) και η PAF-ακετυλοϋδρολάση (PAF-AH). Η παραοξονάση συνδέεται εξ' ολοκλήρου με την HDL, σε αντίθεση με την PAF-ακετυλοϋδρολάση, η οποία κυρίως συνδέεται με την LDL και



μόνο κατά 20% με την HDL και μάλιστα με το κλάσμα εκείνο της HDL που επίσης περιέχει ApoE. Υπάρχουν ελάχιστα δεδομένα για τις μεταβολές των ενεργοτήτων αυτών των ενζύμων σε ασθενείς με νεφρική ανεπάρκεια, για το ρόλο των γενετικών πολυμορφισμών της PON1 στην εξέλιξη της νεφρικής νόσου ή για την επίδραση των φαινοτύπων και της συγκέντρωσης της ApoE στις ενεργότητες αυτών των ενζύμων.

Σκοπός της παρούσας διδακτορικής διατριβής ήταν: α) η εκτίμηση της επίπτωσης των φαινοτύπων της ApoE σε ασθενείς με νεφρική νόσο σε σύγκριση με τους υγιείς μάρτυρες, β) η εκτίμηση της επίδρασης των φαινοτύπων, αλλά και των συγκεντρώσεων της ApoE στα επίπεδα των λιποπρωτεϊνών του ορού σε ασθενείς με νεφρική νόσο και σε υγιή άτομα, γ) η μελέτη της επίδρασης των φαινοτύπων της ApoE στη νεφρική λειτουργία υγιών ατόμων, δ) η εκτίμηση της επίπτωσης των πολυμορφισμών της PON1 σε ασθενείς με νεφρική νόσο σε σύγκριση με τους υγιείς μάρτυρες και ε) η διερεύνηση των μεταβολών των ενεργοτήτων της PON1 και της PAF-AH σε σχέση με την ApoE και με τους γενετικούς πολυμορφισμούς της PON1 σε ασθενείς με νεφρική ανεπάρκεια.



ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2^ο

ΔΙΑΤΑΡΑΧΕΣ ΤΟΥ ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΥ ΤΩΝ ΛΙΠΙΔΙΩΝ ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ΧΡΟΝΙΑ ΝΕΦΡΙΚΗ ΑΝΕΠΑΡΚΕΙΑ (ΧΝΑ)

2.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Οι διαταραχές του μεταβολισμού των λιπιδίων αποτελούν συχνές επιπλοκές της ΧΝΑ και γίνονται έκδηλες όταν ο ρυθμός σπειραματικής διήθησης μειωθεί κάτω από 70 ml/min/1.73m². Οι διαταραχές των λιπιδίων στη ΧΝΑ προσομοιάζουν με αυτές που χαρακτηρίζουν την οικογενή υπερτριγλυκεριδαμία (τύπος IV κατά Fredrickson), παρατηρείται δηλαδή υπερτριγλυκεριδαμία, μείωση των επιπέδων της HDL χοληστερόλης, ενώ τα επίπεδα της LDL χοληστερόλης δεν παρουσιάζουν σημαντικές μεταβολές^{1,2,3,4} (Πίνακας 1).

Πίνακας 1. Διαταραχές των λιπιδίων σε ασθενείς με νεφρικά νοσήματα.

	Νεφρωσικό σύνδρομο	ΧΝΑ	ΑΜΚ	ΣΦΠΚ	Μεταμόσχευση
T-CHOL	↑	-	-	↑	↑
LDL-C	↑	-	-	↑	↑
TRG	↑	↑	↑	↑	↑
HDL-C	-	↓	↓	↓	-
ApoAI	↓	↓	↓	↓	-
ApoAII	↓	↓	↓	↓	-
ApoAIV	↑	↑	↑	↑	-
ApoB	↑	↑	↑	↑↑	↑
Lp(a)	↑	↑	↑	↑	-
ApoCI	↓	↓	↓	↓	-
ApoCII	μικρή ↑	μικρή ↑	μικρή ↑	μικρή ↑	-
ApoCIII	↑	↑	↑	↑	↑

ΧΝΑ; Χρόνια Νεφρική Ανεπάρκεια, ΑΜΚ; Αιμοκάθαρση, ΣΦΠΚ; Συνεχής Φορητή Περιτοναϊκή Κάθαρση, T-CHOL; ολική χοληστερόλη, LDL-C; LDL χοληστερόλη, HDL-C; HDL χοληστερόλη, TRG; Τριγλυκερίδια, Apo; Αποπρωτεΐνη, Lp (a); Λιποπρωτεΐνη (α)



Η δυσλιπιδαιμία σε ασθενείς με ΧΝΑ εκφράζεται κυρίως με μεταβολές των απολιποπρωτεϊνών του ορού. Έτσι, ακόμη και σε περιπτώσεις νορμολιπιδαιμικών ουραιμικών ασθενών παρατηρείται μείωση των ApoAI και ApoAII, ενώ τα επίπεδα της ApoCIII είναι αυξημένα. Παρά την αύξηση των επιπέδων της ApoCII, ο λόγος ApoCII/ApoCIII είναι συχνά μειωμένος, όπως και ο λόγος ApoAI/ApoCIII. Παρατηρείται επίσης αύξηση των επιπέδων της ApoB, ιδιαίτερα σε ασθενείς που υποβάλλονται σε συνεχή φορητή περιτοναϊκή κάθαρση^{5,6}.

Σε ασθενείς με ΧΝΑ, εκτός των ποσοτικών διαταραχών των λιπιδίων, παρατηρούνται επίσης και διαταραχές της σύστασης των λιποπρωτεϊνικών σωματιδίων. Συγκεκριμένα, εμφανίζεται αύξηση των πυκνότερων, πλούσιων σε χοληστερόλη σωματιδίων VLDL και IDL, μείωση του μεγέθους των HDL, οι οποίες είναι πλούσιες σε τριγλυκερίδια και πτωχές σε χοληστερόλη και αύξηση των μικρών και πυκνών LDL.

Τέλος, σε ασθενείς με ΧΝΑ παρατηρείται αύξηση των επιπέδων της Lp(a) σε όλα τα στάδια της νεφρικής ανεπάρκειας (πριν και μετά την έναρξη θεραπείας υποκατάστασης της νεφρικής λειτουργίας)^{7,8,9,10,11}.

2.2. ΠΑΘΟΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΟΙ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΤΗΣ ΔΥΣΛΙΠΙΔΑΙΜΙΑΣ ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ΧΡΟΝΙΑ ΝΕΦΡΙΚΗ ΑΝΕΠΑΡΚΕΙΑ

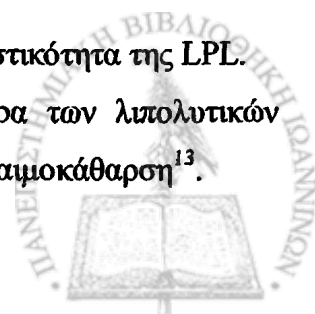
Ο κύριος παθοφυσιολογικός μηχανισμός της δυσλιπιδαιμίας σε ασθενείς με ΧΝΑ είναι η μείωση του καταβολισμού των πλούσιων σε τριγλυκερίδια λιποπρωτεϊνών που περιέχουν ApoB, με αποτέλεσμα τη συσσώρευση λιποπρωτεϊνικών καταλοίπων των πολύ χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεϊνών (VLDL) και των χυλομικρών. Αυτή η διαταραχή οφείλεται σε μείωση της ενεργότητας των λιπολυτικών ενζύμων και κυρίως της λιποπρωτεϊνικής λιπάσης (LPL), καθώς και της ηπατικής λιπάσης των τριγλυκεριδίων (HTGL) και της λεκιθινο-χοληστερολ-ακετυλ-τρανσφεράσης (LCAT)¹².

Η μείωση της δραστηριότητας της λιποπρωτεϊνικής λιπάσης οφείλεται:

α) στη μείωση της σχέσης ApoCII/ApoCIII, τόσο στο πλάσμα όσο και στις VLDL και IDL (ενδιάμεσης πυκνότητας λιποπρωτεΐνες), η οποία έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση της δραστηριότητας της LPL, αφού, όπως είναι γνωστό, η ApoCII ενεργοποιεί την LPL, ενώ η ApoCIII την αναστέλλει (Σχήμα 1).

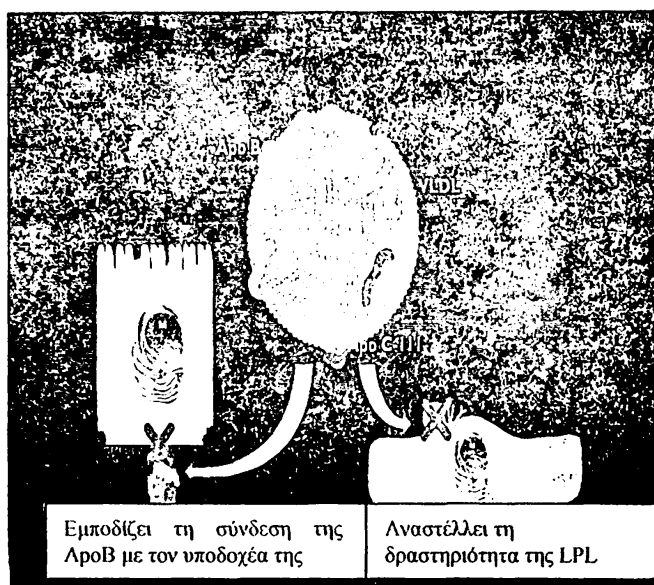
β) στην παρουσία ουραιμικών τοξινών που αναστέλλουν τη δραστηριότητα της LPL.

γ) στην εξάντληση των αποθεμάτων της LPL και γενικότερα των λιπολυτικών ενζύμων από την επαναλαμβανόμενη χορήγηση ηπαρίνης κατά την αιμοκάθαρση¹³.



δ) στην αντίσταση των περιφερικών ιστών στη δράση της ινσουλίνης, η οποία παρατηρείται συχνά σε ασθενείς με ΧΝΑ, δεδομένου ότι η ινσουλίνη υπό φυσιολογικές συνθήκες αυξάνει την ενεργότητα της LPL.

ε) στο δευτεροπαθή υπερπαραθυρεοειδισμό και τα μειωμένα επίπεδα του δραστικού μεταβολίτη της βιταμίνης D, τα οποία προκαλούν διαταραχές στην ομοιοστασία του ασβεστίου και σχετική ανεπάρκεια ινσουλίνης, καταστάσεις οι οποίες συσχετίζονται με μείωση της ενεργότητας των λιπολυτικών ενζύμων.

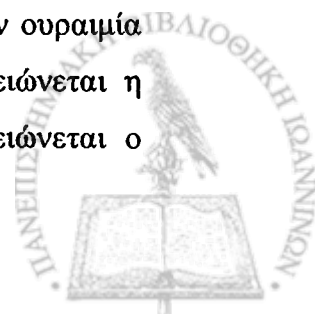


Σχήμα 1. Δράσεις της ApoCIII

Η μειωμένη ενεργότητα της ηπατικής λιπάσης έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση του καταβολισμού των λιποπρωτεϊνικών καταλοίπων των VLDL και των χυλομικρών.

Τέλος, η μειωμένη ενεργότητα της LCAT συσχετίζεται με τα χαμηλά επίπεδα της ApoAI και ευθύνεται τόσο για το μειωμένο καταβολισμό των πλούσιων σε τριγλυκερίδια λιποπρωτεϊνών, όσο και για τις μεταβολές στη σύσταση των HDL, καθώς και για τη μείωση της ικανότητας μεταφοράς χοληστερόλης από τα περιφερικά κύτταρα στο ήπαρ.

Σημαντικό ρόλο στην εμφάνιση της δυσλιπιδαιμίας στη ΧΝΑ, εκτός από τις διαταραχές των λιπολυτικών ενζύμων, διαδραματίζουν και οι διαταραχές της σύστασης των λιποπρωτεϊνικών σωματιδίων. Έτσι, εξαιτίας διαταραχών των LDL στην ουραιμία (π.χ. οξειδωση ή καρβαμυλίωση) ή διαταραχών της δομής της ApoB μειώνεται η ικανότητα σύνδεσής τους με τον LDL υποδοχέα, με αποτέλεσμα να μειώνεται ο



καταβολισμός τους και να αυξάνεται ο χρόνος παραμονής τους στην κυκλοφορία. Πρέπει πάντως να τονισθεί ότι σε ουραιμικούς ασθενείς παρατηρείται μείωση του αριθμού και της ενεργότητας των LDL υποδοχέων, η οποία συνεισφέρει στη μείωση του καταβολισμού των LDL¹⁴.

Η παρατηρούμενη μείωση των επιπέδων της HDL χοληστερόλης αποδίδεται:

α) στη μείωση του καταβολισμού των πλούσιων σε τριγλυκερίδια λιποπρωτεϊνών και την επακόλουθη μειωμένη μεταφορά επιφανειακού υλικού, πλούσιου σε φωσφολιπίδια και αποπρωτεΐνες, στις HDL.

β) στην επιτάχυνση της ετεροανταλλαγής των λιπιδίων, η οποία παρατηρείται όταν υπάρχουν αυξημένες συγκεντρώσεις πλούσιων σε τριγλυκερίδια λιποπρωτεϊνών. Στις περιπτώσεις αυτές παρατηρείται αυξημένη μεταφορά χοληστερόλης από τις HDL στις VLDL και τριγλυκεριδίων από τις VLDL στις HDL με αποτέλεσμα τη δημιουργία μικρών πυκνών HDL με μικρότερη περιεκτικότητα σε χοληστερόλη, οι οποίες καταβολίζονται με ταχύτερο ρυθμό σε σύγκριση με τα μεγαλύτερα HDL σωματίδια.

γ) στη μείωση της ενεργότητας της ηπατικής λιπάσης και της LCAT.

δ) στη μείωση της σύνθεσης της ApoA1.

Τέλος, η δυσλιπιδαιμία σε ασθενείς με ΧΝΑ, οφείλεται επίσης και στην αυξημένη παραγωγή από το ήπαρ πλούσιων σε τριγλυκερίδια λιποπρωτεϊνών^{7,12}. Αυτή αποδίδεται:

α) στην αυξημένη παροχή οξεϊκών με τα διαλύματα της αιμοκάθαρσης, τα οποία είναι πρόδρομες ουσίες για τη σύνθεση λιπαρών οξέων.

β) στην αυξημένη πρόσληψη γλυκόζης από τα διαλύματα τα οποία χρησιμοποιούνται κατά τη διαδικασία της συνεχούς φορητής περιτοναϊκής κάθαρσης (ΣΦΠΚ ή CAPD).

γ) στην αυξημένη διαιτητική πρόσληψη υδατανθράκων.

δ) στην αντίσταση των περιφερικών ιστών στη δράση της ινσουλίνης και στη συνυπάρχουσα υπερινσουλιναίμια.

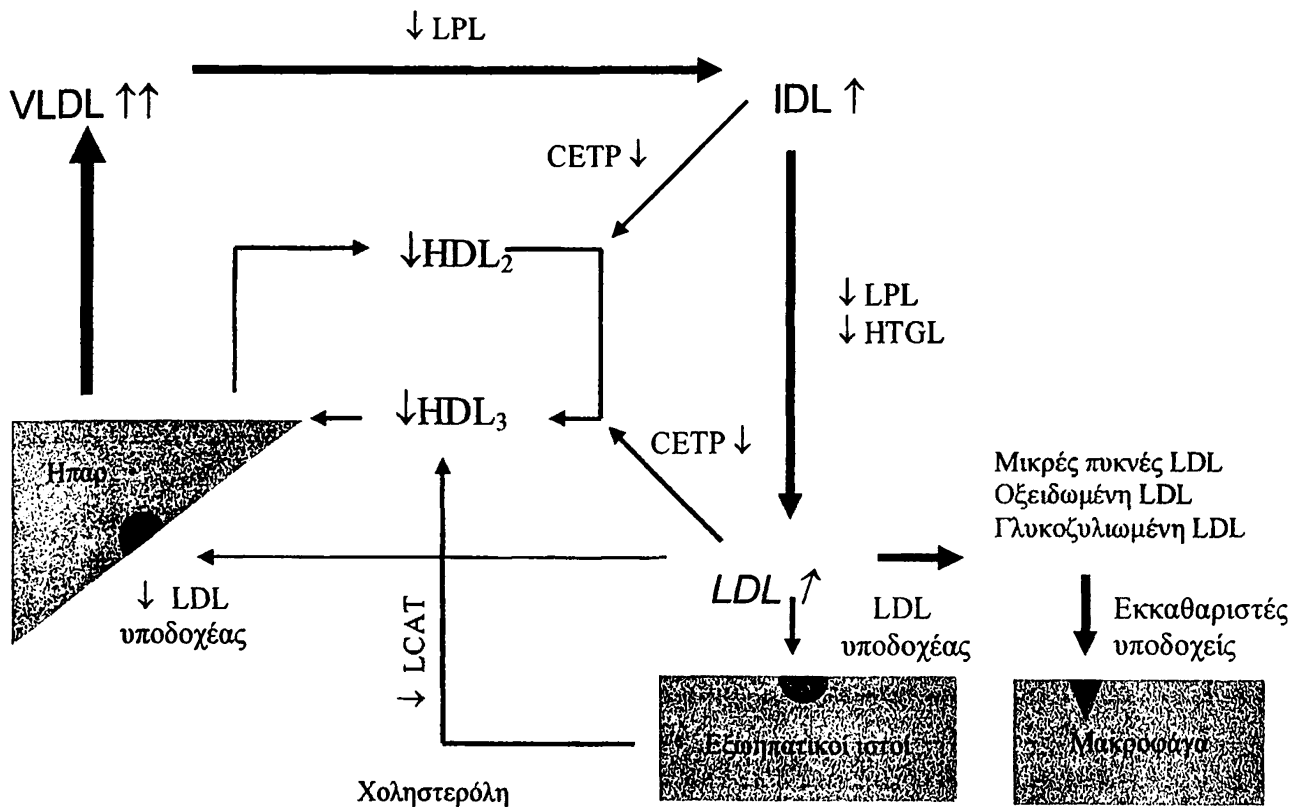
ε) στην αυξημένη λιπόλυση, η οποία αποδίδεται στα αυξημένα επίπεδα γλυκαγόνης και αυξητικής ορμόνης που παρατηρούνται συχνά σε ασθενείς με ΧΝΑ.

Αν και ορισμένες μελέτες έδειξαν ότι υπάρχουν διαφορές στις τιμές των λιπιδίων μεταξύ ασθενών πριν και μετά την ένταξη σε θεραπεία υποκατάστασης της νεφρικής λειτουργίας, οι κύριες ποιοτικές διαταραχές των λιποπρωτεϊνών (όπως η αύξηση των συγκεντρώσεων των VLDL, η μείωση των επιπέδων των HDL και η μείωση του λόγου ApoA1/ApoCIII) φαίνεται ότι παραμένουν σταθερές. Με την πάροδο του χρόνου είναι δυνατόν να παρατηρηθεί μείωση των επιπέδων των τιμών της χοληστερόλης και των τριγλυκεριδίων του πλάσματος σε ορισμένους (κατά κανόνα υποθρεπτικούς) ασθενείς

που υποβάλλονται σε αιμοκάθαρση. Αντίθετα, παρατηρείται επιδείνωση της δυσλιπιδαιμίας σε ασθενείς που υποβάλλονται σε ΣΦΠΚ, η οποία οφείλεται στην αυξημένη παραγωγή VLDL, εξαιτίας απωλειών σημαντικής ποσότητας πρωτεΐνης στα διαλύματα της περιτοναϊκής κάθαρσης και αυξημένης απορρόφησης γλυκόζης από την περιτοναϊκή κοιλότητα. Στις περισσότερες μελέτες οι ασθενείς που υποβάλλονται σε ΣΦΠΚ εμφανίζουν ένα πιο αθηρογόνο λιπιδαιμικό προφίλ σε σύγκριση με αιμοκαθαιρόμενους ασθενείς που έχουν το ίδιο φύλο και την ίδια ηλικία^{7,15} (Πίνακας 1).

Στο Σχήμα 2 φαίνονται οι κύριες διαταραχές του μεταβολισμού των λιπιδίων στην ουραιμία.

Σχήμα 2. Διαταραχές του μεταβολισμού των λιπιδίων στην ουραιμία



Η μείωση της ενεργότητας της LPL προκαλεί μείωση του καταβολισμού των VLDL με αποτέλεσμα την αύξηση της συγκέντρωσής τους. Η μείωση της ενεργότητας της LPL και της HTGL προκαλούν μείωση του καταβολισμού των IDL με αποτέλεσμα την αύξηση της συγκέντρωσής τους. Η μείωση της ενεργότητας της CETP προκαλεί μείωση μεταφοράς επιφανειακού υλικού από τις IDL και LDL στις HDL, ενώ η μείωση της ενεργότητας της LCAT προκαλεί μείωση της μεταφοράς χοληστερόλης από τους περιφερικούς ιστούς στις HDL με αποτέλεσμα μείωση της συγκέντρωσης των HDL. Η μείωση του αριθμού και της δραστηριότητας των LDL υποδοχέων προκαλεί μείωση του καταβολισμού των LDL και αύξηση της συγκέντρωσής τους, ενώ τροποποιήσεις του μορίου των LDL (οξειδωση, γλυκοζυλίωση) τις καθιστά σχετικά μη αναγνωρίσιμες από τον LDL υποδοχέα και εκτρέπει τον καταβολισμό τους προς την κατεύθυνση πρόσληψής τους από κύτταρα που εκφράζουν εκκαθαριστές υποδοχείς (μακροφάγα).

LPL: λιποπρωτεϊνική λιπάση, **HTGL:** ηπατική λιπάση των τριγλυκεριδίων, **CETP:** πρωτεΐνη μεταφοράς εστέρων χοληστερόλης, **LCAT:** λεκιθινο-χοληστερολ-ακυλ-τρανσφεράση



2.3. ΣΥΝΕΠΕΙΕΣ ΤΗΣ ΥΠΕΡΛΙΠΙΔΑΙΜΙΑΣ ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ΧΡΟΝΙΑ ΝΕΦΡΙΚΗ ΑΝΕΠΑΡΚΕΙΑ

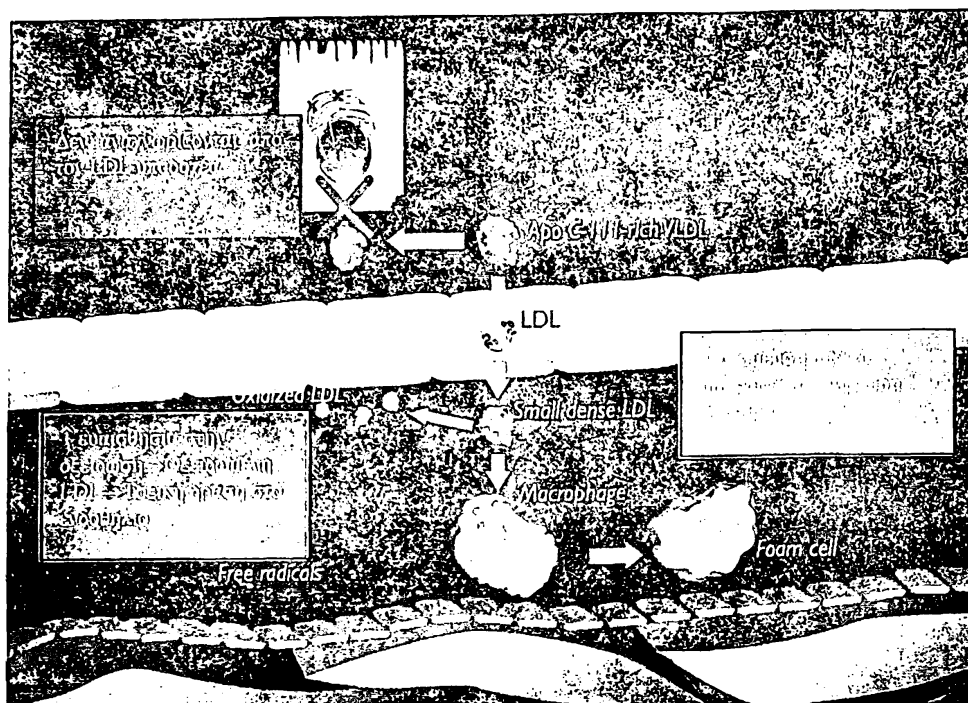
2.3.1. Καρδιαγγειακή νόσος

Η καρδιαγγειακή νόσος αποτελεί την κύρια αιτία νοσηρότητας και θνητότητας σε ασθενείς με χρόνια νεφρική ανεπάρκεια^{16,17}. Θεωρητικά τουλάχιστον, οι ποσοτικές και ποιοτικές διαταραχές των λιπιδίων οι οποίες παρατηρούνται στη ΧΝΑ διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην εμφάνιση και εξέλιξη της καρδιαγγειακής νόσου.

Μελέτες στο γενικό πληθυσμό έδειξαν ότι τα αυξημένα επίπεδα των πλούσιων σε τριγλυκερίδια λιποπρωτεϊνών που περιέχουν ApoB συσχετίζονται θετικά με τις αθηροσκληρωτικές βλάβες στο αρτηριακό τοίχωμα και επομένως με την εμφάνιση στεφανιαίας νόσου. Προκαταρκτικές μελέτες σε ασθενείς με ΧΝΑ τελικού σταδίου έδειξαν ότι τα επίπεδα της IDL χοληστερόλης αποτελούν ανεξάρτητο παράγοντα κινδύνου για την εμφάνιση αθηροσκληρωτικών βλαβών στην αορτή¹². Σημαντικό ρόλο στην εμφάνιση πρόωμης καρδιαγγειακής νόσου στη ΧΝΑ διαδραματίζει η αυξημένη συγκέντρωση ορισμένων λιποπρωτεϊνικών υποκλασμάτων που έχουν μεγάλη αθηρογόνο δυνατότητα, όπως τα κατάλοιπα των χυλομικρών και οι μικρές πυκνές LDL¹⁴. Οι μικρές και πυκνές LDL αποτελούν χαρακτηριστικό παράδειγμα αθηρογόνων λιποπρωτεϊνικών σωματιδίων (έχουν τριπλάσια αθηρογόνο δράση σε σύγκριση με τις μεγάλες LDL). Οι συγκεντρώσεις αυτών των σωματιδίων είναι αυξημένες σε ουραιμικούς ασθενείς και ιδιαίτερα σε ασθενείς με διαβητική νεφροπάθεια ή σε διαβητικούς αιμοκαθαιρόμενους ασθενείς με υπερτριγλυκεριδαιμία. Σε αυτές τις περιπτώσεις, αν και τα επίπεδα της LDL χοληστερόλης μπορεί να είναι φυσιολογικά ή και μειωμένα, ο κίνδυνος εμφάνισης στεφανιαίας νόσου είναι ιδιαίτερα αυξημένος¹⁴ (Σχήμα 3)

Έχει επίσης διατυπωθεί η άποψη ότι το ουραιμικό περιβάλλον ενεργοποιεί τη διαδικασία της φλεγμονής. Έτσι, στην ουραιμία παρατηρούνται αυξημένες συγκεντρώσεις πρωτεϊνών οξείας φάσης, όπως η C-αντιδρώσα πρωτεΐνη (CRP)¹⁸, η ιντερλευκίνη-6 (IL-6)¹⁹, η Lp(a)¹⁰ και το ινωδογόνο¹⁷ και μειωμένα επίπεδα αντιαθηρογόνων παραγόντων, όπως οι HDL και η ApoA1. Όλες αυτές οι διαταραχές συσχετίζονται θετικά με την εμφάνιση και εξέλιξη της στεφανιαίας νόσου και την καρδιαγγειακή και ολική θνητότητα στους ουραιμικούς ασθενείς^{20,21,22}.





Σχήμα 3. Αθηρογενετικότητα των μικρών πυκνών LDL

Εκτός από τις ποσοτικές διαταραχές των λιποπρωτεϊνών στην ουραιμία, οι συνυπάρχουσες ποιοτικές διαταραχές του μεταβολισμού των λιπιδίων πιθανά συμβάλουν σε μεγάλο βαθμό στην επιτάχυνση της αθηρωματικής διαδικασίας. Συγκεκριμένα, οι τροποποιήσεις της ApoB (όπως οξείδωση, καρβαμυλίωση, γλυκοζυλίωση) καθιστούν τα λιποπρωτεϊνικά σωματίδια που την περιέχουν μη αναγνωρίσιμα από τους ειδικούς υποδοχείς τους και εκτρέπουν τον καταβολισμό τους προς την κατεύθυνση της πρόσληψής τους από κύτταρα που εκφράζουν εκκαθαριστές υποδοχείς (scavenger receptors). Η παραπάνω διαδικασία οδηγεί στο σχηματισμό αφρωδών κυττάρων και την επιτάχυνση της αθηροσκλήρωσης. Στο ίδιο πλαίσιο, οι τροποποιήσεις που υφίσταται οι HDL στο ουραιμικό περιβάλλον (αύξηση ApoJ, μείωση της ενεργότητας της παραοξονάσης στους ασθενείς που υποβάλλονται σε αιμοκάθαρση) μειώνουν την αντιοξειδωτική τους δράση και ευοδώνουν την οξειδωτική τροποποίηση των LDL¹⁷.

Πάντως, πρέπει να τονισθεί ότι από τις μέχρι τώρα μελέτες δεν είναι πλήρως αποσαφηνισμένη η συσχέτιση μεταξύ δυσλιπιδαιμίας και αγγειακής νόσου στη ΧΝΑ, εξαιτίας ακριβώς του γεγονότος ότι η δυσλιπιδαιμία των ουραιμικών ασθενών αντανακλά περισσότερο ποιοτικές διαταραχές των λιποπρωτεϊνών και όχι ποσοτικές μεταβολές των τιμών των λιπιδαιμικών παραμέτρων. Η καλά τεκμηριωμένη θετική συσχέτιση μεταξύ των χαμηλών επιπέδων των λιπιδαιμικών παραμέτρων και της

θνητότητας στους υποθρεπτικούς ουραιμικούς ασθενείς αποτελεί χαρακτηριστικό παράδειγμα της πολυπλοκότητας της σχέσης που υπάρχει μεταξύ της δυσλιπιδαιμίας και του αυξημένου καρδιαγγειακού κινδύνου σε ασθενείς με ΧΝΑ²³.

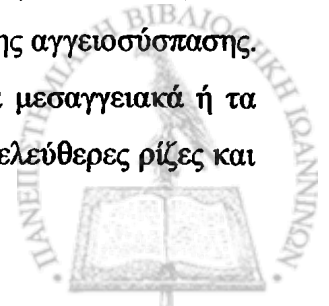
2.3.2. Εξέλιξη της νεφρικής νόσου

Μια μεγάλη σειρά πειραματικών και επιδημιολογικών δεδομένων συσχετίζει τη δυσλιπιδαιμία με την εμφάνιση και εξέλιξη της νεφρικής νόσου.

Έτσι, δεδομένα από εργασίες σε πειραματόζωα έδειξαν ότι υπάρχει θετική συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων της χοληστερόλης του ορού και των δεικτών της σπειραματικής βλάβης. Συγκεκριμένα, η χορήγηση δίαιτας πλούσιας σε κεκορεσμένα λιπαρά οξέα σε πειραματικά μοντέλα νεφροπάθειας είχε ως αποτέλεσμα την επιδείνωση της νεφρικής βλάβης, ενώ αντίθετα η χορήγηση υπολιπιδαιμικών παραγόντων επιβράδυνε την έκπτωση της νεφρικής λειτουργίας, με παράλληλη μείωση των ιστολογικών δεικτών της σπειραματικής και μεσαγγειακής βλάβης²⁴.

Δεδομένα από πειράματα σε κυτταροκαλλιέργειες μεσαγγειακών κυττάρων έδειξαν ότι τα κύτταρα αυτά εκφράζουν υποδοχείς VLDL καθώς και εκκαθαριστές υποδοχείς, με αποτέλεσμα σε περιβάλλον με αυξημένη συγκέντρωση LDL, VLDL ή IDL να επάγεται ο πολλαπλασιασμός τους, ενώ σε περιβάλλον με αυξημένα επίπεδα οξειδωμένης LDL να επάγεται η κυτταρική καταστροφή και ο αποπτωτικός θάνατος²⁵.

Βιοψίες νεφρών σε πειραματικά μοντέλα νεφροπάθειας που συσχετίζεται με υπερλιπιδαιμία και συγκεκριμένα η ανεύρεση αφρωδών κυττάρων σε τμήματα σπειραμάτων τα οποία υφίστανται σκλήρυνση ή σε θέσεις του διάμεσου νεφρικού ιστού, καθώς και η ανεύρεση στις ίδιες θέσεις οξειδωμένων μορφών λιποπρωτεϊνών παρέχουν περαιτέρω ενδείξεις για τους υποκείμενους παθοφυσιολογικούς μηχανισμούς. Έτσι, θεωρείται ότι οι τροποποιημένες και κυρίως οι οξειδωμένες μορφές της LDL διεισδύουν στο νεφρικό ιστό (σπείραμα, σωληνάκια) και πυροδοτούν την έκφραση μιας πλειάδας κυτταροκινών και άλλων διαβιβαστών της φλεγμονής. Στη νεφρική βλάβη συμβάλλει επίσης και η ταυτόχρονη αύξηση της παραγωγής αγγειοσυσπαστικών ουσιών, όπως ενδοθηλίνης, ρενίνης και θρομβοξάνης και η μείωση της παραγωγής αγγειοδιασταλτικών ουσιών, όπως του μονοξειδίου του αζώτου (NO), με αποτέλεσμα να εκτρέπεται ο μικροαγγειακός νεφρικός τόνος προς την κατεύθυνση της αγγειοσύσπασης. Επίσης, τα μακροφάγα που διηθούν το νεφρικό ιστό, καθώς και τα μεσαγγειακά ή τα σωληναρικά κύτταρα κατά τη διαδικασία της φλεγμονής παράγουν ελεύθερες ρίζες και



έτσι οξειδώνουν τοπικά τις LDL, ολοκληρώνοντας το φαύλο κύκλο οξείδωσης, διείσδυσης και ιστικής καταστροφής^{24,25}.

Τέλος, πειραματικά δεδομένα που προκύπτουν από τη χορήγηση υπολιπιδαιμικών παραγόντων ενισχύουν τη συσχέτιση της δυσλιπιδαιμίας με την εξέλιξη της νεφρικής βλάβης. Συγκεκριμένα, η μείωση των επιπέδων των λιπιδίων στον ορό σε πειραματόζωα, με τη χρήση υπολιπιδαιμικών φαρμάκων συνοδεύεται από επιβράδυνση της εξέλιξης της νεφρικής βλάβης. Ενδείξεις επιβράδυνσης της εξέλιξης της νεφρικής βλάβης με τη χρήση στατινών παρατηρείται ακόμη και σε περιπτώσεις στις οποίες δεν υπήρχαν ιδιαίτερος αυξημένα επίπεδα χοληστερόλης, εύρημα που υποδηλώνει την παρουσία επιπρόσθετων βιολογικών δράσεων αυτών των φαρμάκων (πέρα από τη δυνατότητά τους να μειώνουν τα επίπεδα των λιπιδίων)²⁶. Έτσι, φαίνεται ότι τα φάρμακα αυτά μειώνουν τη μεσαγγειακή και ενδοθηλιακή παραγωγή μορίων που εμπλέκονται στη διαδικασία της φλεγμονής, όπως χημειοτακτικών παραγόντων (MCP-1), αυξητικών παραγόντων (M-CSF) και προσκολλητικών μορίων (VCAM-1). Επίσης, οι στατίνες μειώνουν την ενδοκυττάρια παραγωγή ενδιάμεσων προϊόντων των ισοπρενοειδών, όπως το φαρσενυλ-πυροφωσφορικό και το γερανυλ-γερανυλ-πυροφωσφορικό, τα οποία είναι απαραίτητα για τη σύνδεση συγκεκριμένων αυξητικών παραγόντων (πρωτεϊνών G, όπως η p21 gas) στην κυτταρική επιφάνεια των μεσαγγειακών κυττάρων²⁷. Έτσι, διακόπτεται η ενδοκυττάρια μετάδοση μηνυμάτων κατά τη διάρκεια της δράσης αυτών των αυξητικών παραγόντων στα κύτταρα του μεσαγγείου, ενώ παράλληλα μειώνεται αναστρέψιμα και η έκφραση των γονιδίων c-fos και c-jun που δρουν ρυθμιστικά στη διαδικασία του πολλαπλασιασμού και της διαφοροποίησης των παραπάνω κυττάρων. Ανάλογος είναι και ο μηχανισμός με τον οποίο οι στατίνες παρατείνουν τη φάση G και αναστέλλουν τη μετάβαση στη φάση S του κυτταρικού κύκλου των μεσαγγειακών και των λείων μυϊκών κυττάρων²⁶.

Πάντως, μολονότι ο ρόλος της δυσλιπιδαιμίας στην εξέλιξη της νεφρικής βλάβης έχει τεκμηριωθεί πειραματικά, ο ακριβής ρόλος της σε ουραιμικούς ασθενείς αποτελεί ακόμη αντικείμενο έρευνας. Πρόσφατα δεδομένα από ασθενείς με νεφρικά νοσήματα έδειξαν ότι η υπερλιπιδαιμία αποτελεί ανεξάρτητο παράγοντα κινδύνου για την εξέλιξη της νεφρικής νόσου, ενώ η υπερχοληστερολαιμία φαίνεται ότι είναι ανεξάρτητος παράγοντας κινδύνου για την εμφάνιση νεφροπάθειας σε ασθενείς με σακχαρώδη διαβήτη τύπου I αλλά και στο γενικό πληθυσμό²⁸. Τέλος, σε ασθενείς με νεφροπάθεια μη διαβητικής αιτιολογίας, τα αυξημένα επίπεδα των λιπιδαιμικών παραμέτρων



συσχετίζονται με ταχύτερη επιδείνωση της νεφρικής λειτουργίας, ανεξάρτητα από τον καλό έλεγχο της αρτηριακής πίεσης.

2.4. ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ ΤΗΣ ΥΠΕΡΛΙΠΙΔΑΙΜΙΑΣ ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ΧΝΑ

Δεν υπάρχουν σαφείς κατευθυντήριες γραμμές για τη θεραπευτική αντιμετώπιση της δυσλιπιδαιμίας σε ασθενείς με ΧΝΑ. Επιπρόσθετα, δεν υπάρχουν μελέτες παρέμβασης ευρείας κλίμακας που να διερευνούν το ρόλο της υπολιπιδαιμικής αγωγής στην πρόληψη της καρδιαγγειακής νόσου.

Η απόφαση για τη χορήγηση θεραπείας και η επιλογή της θεραπείας πρέπει να βασίζονται στην ηλικία των ασθενών, στην παρουσία υποκείμενης πρωτοπαθούς δυσλιπιδαιμίας και στην παρουσία άλλων σημαντικών παραγόντων κινδύνου, όπως υπέρτασης, σακχαρώδη διαβήτη, καπνίσματος και οικογενειακού ιστορικού καρδιαγγειακής νόσου.

Ιδιαίτερη σημασία έχει η υπολιπιδαιμική διαίτα. Μια διαίτα πτωχή σε υδατάνθρακες και κεκορεσμένα λιπαρά οξέα και πλούσια σε μονο- και πολυακόρεστα λιπαρά οξέα έχει ως αποτέλεσμα σημαντική μείωση των τριγλυκεριδίων του ορού. Ωστόσο, πρέπει να δίνεται ιδιαίτερη έμφαση στην αποφυγή μειωμένης πρόσληψης των απαραίτητων θρεπτικών ουσιών, ώστε να αποφευχθεί η υποθρεψία²⁹.

Η προσεκτική αύξηση της σωματικής δραστηριότητας στους ουραιμικούς ασθενείς βελτιώνει τόσο το λιπιδαιμικό τους προφίλ, όσο και τη δυσανεξία στους υδατάνθρακες.

Η χορήγηση ω-3 λιπαρών οξέων είναι χρήσιμη κυρίως σε περιπτώσεις ανθεκτικής υπερτριγλυκεριδαιμίας, ενώ τα αποτελέσματα της χορήγησης καρνιτίνης σε αιμοκαθαιρόμενους ασθενείς είναι αντικρουόμενα³⁰.

Η χρησιμοποίηση ηπαρίνης χαμηλού μοριακού βάρους σε αντικατάσταση της κλασικής ηπαρίνης ως αντιπηκτικού κατά τη διαδικασία της αιμοκάθαρσης έχει αποδειχθεί ότι βελτιώνει τις λιπιδαιμικές παραμέτρους των αιμοκαθαιρόμενων ασθενών (μείωση ολικής χοληστερόλης, μείωση LDL χοληστερόλης και μείωση ApoB)¹³.

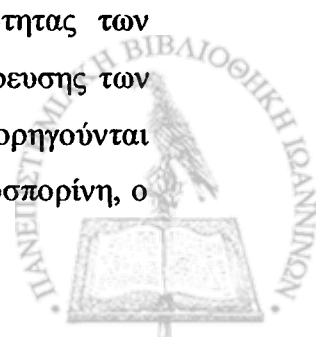
Υπάρχουν λίγες μελέτες για τη φαρμακευτική αντιμετώπιση της δυσλιπιδαιμίας σε ουραιμικούς ασθενείς. Φαίνεται ότι τα παράγωγα του ινικού οξέος αυξάνουν τη δραστηριότητα της LPL και μειώνουν τα επίπεδα των τριγλυκεριδίων, ενώ ταυτόχρονα αυξάνουν τα επίπεδα της HDL χοληστερόλης, τόσο σε ασθενείς με ήπια έως μέτρια έκπτωση της νεφρικής λειτουργίας, όσο και σε ασθενείς που υποβάλλονται σε εξωνεφρική κάθαρση. Απαιτείται, ωστόσο, εξαιρετική προσοχή στη χορήγηση φιβρατών



σε ασθενείς με έκπτωση της νεφρικής λειτουργίας, αφού πρόκειται για φάρμακα τα οποία απεκκρίνονται κυρίως από τους νεφρούς με αποτέλεσμα να αθροίζονται στο πλάσμα των ουραιμικών ασθενών και να αυξάνεται η πιθανότητα εμφάνισης ανεπιθύμητων ενεργειών από το ήπαρ και τους μυς. Από τα διάφορα φάρμακα αυτής της ομάδας, η γεμφιμπροζίλη είναι το φάρμακο του οποίου η απέκκριση επηρεάζεται σε μικρότερο βαθμό στη ΧΝΑ. Πρόκειται για φάρμακο το οποίο έχει χρησιμοποιηθεί με σχετική ασφάλεια σε ασθενείς με έκπτωση της νεφρικής λειτουργίας και σε ασθενείς που υποβάλλονται σε εξωνεφρική κάθαρση με καλά αποτελέσματα όσον αφορά τη μείωση των επιπέδων των τριγλυκεριδίων και την αύξηση της HDL χοληστερόλης⁴. Πρέπει, ωστόσο, να επισημανθεί ότι οι φιβράτες αποτελούν φάρμακα τα οποία πιθανά αναστέλλουν την κυκλοξυγενάση και διαμέσου αυτού του μηχανισμού την τοπική παραγωγή από τους νεφρούς αγγειοδιασταλτικών προσταγλανδινών με αποτέλεσμα τη μείωση της πειραματικής διήθησης³¹. Το γεγονός αυτό επιβάλλει ιδιαίτερη προσοχή στη χορήγησή τους σε ασθενείς με έκπτωση της νεφρικής λειτουργίας.

Τέλος, είναι δυνατή η χορήγηση στατινών ιδιαίτερα σε ασθενείς με ΧΝΑ που εμφανίζουν υψηλές τιμές ολικής και LDL χοληστερόλης (π.χ. σε ασθενείς που υποβάλλονται σε ΣΦΠΚ). Έτσι, σε μια πρόσφατη τυχαίοποιημένη διπλή τυφλή μελέτη η χορήγηση σιμβαστατίνης σε ασθενείς με ΧΝΑ τελικού σταδίου που υποβάλλονταν σε αιμοκάθαρση ή ΣΦΠΚ είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση της ολικής χοληστερόλης (κατά 21.4% και 22.1% αντίστοιχα), της LDL χοληστερόλης (κατά 33% και 36.4% αντίστοιχα) και της μη HDL χοληστερόλης (κατά 25.2% και 24.9% αντίστοιχα). Στην παραπάνω μελέτη, η αρχική δόση της σιμβαστατίνης ήταν 5 mg/ ημέρα, ενώ η δοσολογία διπλασιάζονταν ανά δίμηνο, ανάλογα με τα επίπεδα της μη HDL χοληστερόλης. Η μέγιστη δόση του φαρμάκου ήταν τα 20 mg/ ημέρα και κατά τη διάρκεια της μελέτης δεν παρατηρήθηκαν εργαστηριακά ή κλινικά σημεία τοξικότητας³².

Αν και με βάση φαρμακοκινητικά δεδομένα δεν είναι απαραίτητη η αναπροσαρμογή της δοσολογίας αυτών των φαρμάκων στη ΧΝΑ, εντούτοις συνιστάται η προσεκτική χορήγησή τους σε ασθενείς με τελικού σταδίου ΧΝΑ. Η οδηγία αυτή έχει ιδιαίτερη σημασία αφού στην ουραιμία παρατηρείται μείωση της δραστηριότητας του CYP3A4 (το οποίο είναι το κύριο ενζυμικό σύστημα μεταβολισμού των περισσότερων στατινών), καθώς και μείωση του ηπατικού μεταβολισμού και μείωση της ικανότητας των πρωτεϊνών του πλάσματος να συνδέονται με φάρμακα. Ο κίνδυνος συσσώρευσης των φαρμάκων αυτής της κατηγορίας αυξάνεται σημαντικά όταν οι στατίνες συγχωρηθούν με φάρμακα τα οποία αποτελούν υπόστρωμα για το CYP3A4, όπως η κυκλοσπορίνη, ο



τακρόλιμος, τα αντιμυκητιασικά του τύπου των αζολών, τα μακρολίδια, τα κουμαρινικά αντιπηκτικά, οι αναστολείς των πρωτεασών, οι φιβράτες και τα παράγωγα του νικοτινικού οξέος³³. Στις περιπτώσεις αυτές αυξάνεται ιδιαίτερα ο κίνδυνος εμφάνισης μυοπάθειας και ηπατίτιδας, οι οποίες αποτελούν τις πιο σημαντικές ανεπιθύμητες ενέργειες των στατινών. Η μυοτοξικότητα είναι μια σπάνια δόσοεξαρτώμενη επιπλοκή της θεραπείας με στατίνες, ο ακριβής μηχανισμός της οποίας δεν έχει πλήρως αποσαφηνισθεί. Πιθανά η μυοτοξικότητα συσχετίζεται με διαταραχές των μιτοχονδριακών ενζυμικών συστημάτων παραγωγής ενέργειας και με διαταραχές του ενδοκυττάριου ασβεστίου. Οι ασθενείς μπορεί να εμφανίζουν ήπιες διαταραχές από τους μυς (αδυναμία, άλγη) ή και ραβδομύλυση (με μυοσφαιριναίμια, μυοσφαιρινουρία, υπερκαλαιμία και οξεία νεφρική ανεπάρκεια), μία κατάσταση η οποία είναι δυνητικά θανατηφόρα, ιδιαίτερα όταν προϋπάρχει έκπτωση της νεφρικής λειτουργίας. Δυστυχώς, δεν υπάρχουν επαρκή στοιχεία για την επίπτωση της μυοπάθειας μετά τη χορήγηση στατινών σε ασθενείς με ΧΝΑ, ούτε υπάρχουν πολλές μελέτες χορήγησης αυτών των φαρμάκων σε ουραιμικούς ασθενείς. Αν και οι περισσότερες περιπτώσεις ραβδομύλυσης αφορούν ασθενείς μετά από νεφρική μεταμόσχευση υπό φαρμακευτική αγωγή με κυκλοσπορίνη, πρέπει να υπάρχει αυξημένος βαθμός υποψίας για την έγκαιρη διάγνωση της μυοπάθειας σε όλους τους ουραιμικούς ασθενείς που λαμβάνουν στατίνη και να γίνεται τακτικός έλεγχος των μυϊκών και ηπατικών ενζύμων.



ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3^ο

ΑΠΟΠΡΩΤΕΪΝΗ Ε

3.1. ΣΥΝΟΨΗ ΤΩΝ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΩΝ ΤΗΣ ΑΡΟΕ

Η αποπρωτεΐνη Ε (ΑροΕ) είναι μια πρωτεΐνη με σημαντικές βιολογικές δράσεις που επηρεάζουν κυρίως τον μεταβολισμό των λιποπρωτεϊνών και επεκτείνονται σε πολλές άλλες λειτουργίες του ανθρώπινου οργανισμού³⁴ (Πίνακας 2). Στη συνέχεια θα συζητηθεί μόνο ο ρόλος της ΑροΕ στο μεταβολισμό των λιποπρωτεϊνών.

Πίνακας 2. Οι κύριες λειτουργίες της ΑροΕ

1. Μεταβολισμός των λιποπρωτεϊνών – σύνδεση της ΑροΕ με τους αντίστοιχους κυττατικούς υποδοχείς που είναι υπεύθυνοι για το καταβολισμό των λιποπρωτεϊνών:
 - α) Μεταβολισμός των χυλομικρών και των καταλοίπων των χυλομικρών.
 - β) Μεταβολισμός των VLDL και των καταλοίπων των VLDL.
 - γ) Συμμετοχή στο μηχανισμό ανάστροφης μεταφοράς χοληστερόλης.
 - δ) Ανακατανομή χοληστερόλης ανάμεσα στα κύτταρα ενός ιστού.
2. Νευροτροφικός και νευροτροπικός παράγοντας.
3. Επίδραση στον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση των λείων μυϊκών κυττάρων.
4. Αναστολή (λιποπρωτεϊνική λιπάση) ή ενεργοποίηση (ηπατική λιπάση) των λιπολυτικών ενζύμων.
5. Διέγερση της ηπατικής παραγωγής VLDL και τριγλυκεριδίων.
6. Συμμετοχή στην ανοσορύθμιση.
7. Αθηροπροστατευτική δράση στο τοίχωμα των αγγείων:
 - α) Έξοδος χοληστερόλης από τα μακροφάγα (μαζί με την ΑροΑΙ).
 - β) Αντιοξειδωτική δράση.
 - γ) Αντιφλεγμονώδης δράση.
 - δ) Αντιχημειοτακτική δράση.
 - ε) Αντιαιμοπεταλιακή δράση.



στ) Διέγερση της παραγωγής μονοξειδίου του αζώτου.

8. Επιδράσεις των κοινών πολυμορφισμών της ApoE:

α) Καθορίζουν το 14-17% της γενετικής μεταβλητότητας των επιπέδων της ολικής και LDL χοληστερόλης του πλάσματος.

β) Επηρεάζουν την εντερική απορρόφηση της χοληστερόλης.

γ) Ο ApoE2/E2 γονότυπος αποτελεί το γενετικό υπόστρωμα για την εμφάνιση της υπερλιποπρωτεϊναιμίας τύπου III.

δ) Επηρεάζουν τον κίνδυνο εμφάνισης αθηρωματικής αγγειακής νόσου.

ε) Επηρεάζουν το ρυθμό απώλειας μνήμης με την πάροδο της ηλικίας, τον κίνδυνο εμφάνισης της νόσου του Alzheimer, αλλά και μιας σειράς άλλων νευρολογικών νοσημάτων (αγγειακή άνοια, cortical Lewy body disease, νόσος του Wilson, νόσος του Huntington, νόσος του κινητικού νευρώνα), καθώς και ψυχιατρικών νοσημάτων (σχιζοφρένεια).

στ) Επηρεάζουν την κλινική έκβαση ασθενών με κρανιοεγκεφαλική κάκωση και αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο και τις πιθανότητες υποτροπής ενδοεγκεφαλικής αιμορραγίας.

ζ) Αποτελούν γονίδια που καθορίζουν τη μακροζωία.

η) Επηρεάζουν την εμφάνιση της συστολικής δυσλειτουργίας της αριστερής κοιλίας.

θ) Καθορίζουν την ανταπόκριση των λιπιδαιμικών παραμέτρων στην αγωγή με δίαιτα ή φάρμακα.

ι) Επηρεάζουν την οστική πυκνότητα και τον κίνδυνο εμφάνισης οστεοπορωτικών καταγμάτων.

ια) Επηρεάζουν τον κίνδυνο εμφάνισης αδενώματος και αδenoκαρκινώματος στο εγγύς παχύ έντερο.

ιβ) Επηρεάζουν την εμφάνιση αρτηριακής υπέρτασης και των επιλοκών που συσχετίζονται με την αύξηση της αρτηριακής πίεσης.

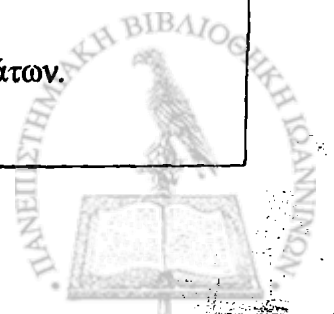
9. Επιδράσεις των επιπέδων της ApoE στον ορό ανεξάρτητα από τους πολυμορφισμούς της ApoE:

α) Καθορίζουν το 20-40% της μεταβλητότητας των επιπέδων των τριγλυκεριδίων στο γενικό πληθυσμό.

β) Επηρεάζουν τα επίπεδα της ολικής χοληστερόλης.

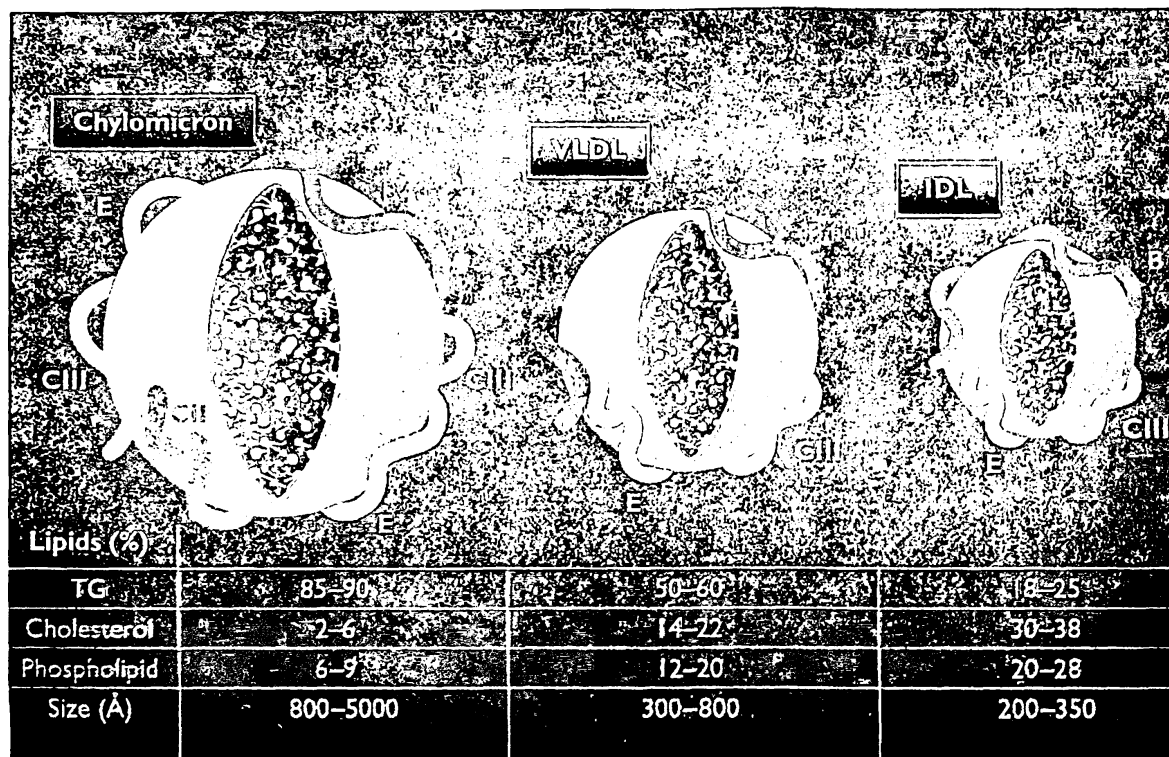
10. Επίδραση στην παθογένεια και την εξέλιξη των νεφρικών νοσημάτων.

11. Πρωτεΐνη οξείας φάσης.



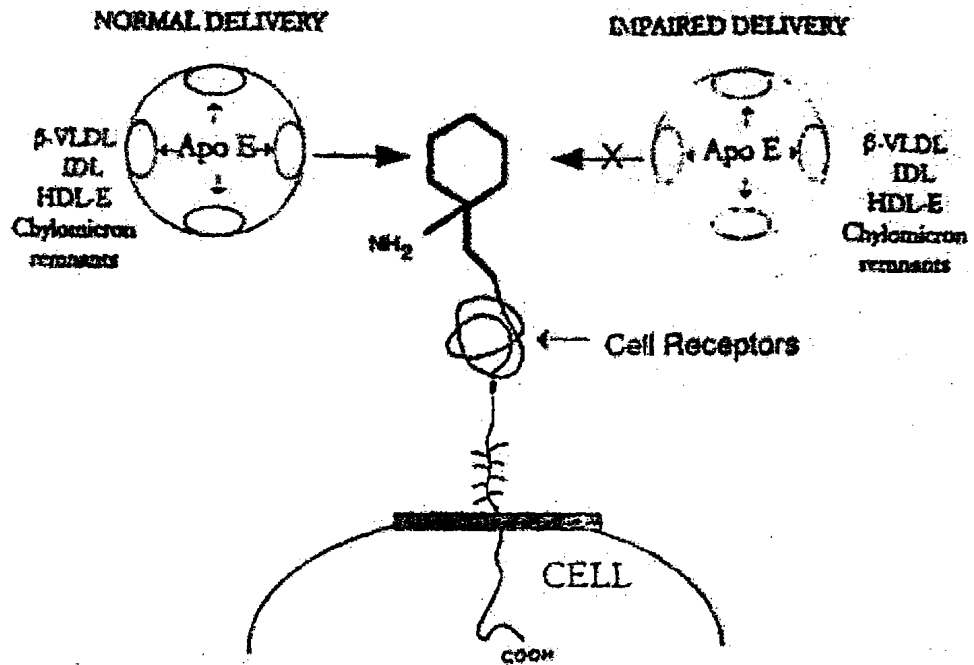
3.2. ΣΥΝΔΕΣΗ ΜΕ ΛΙΠΟΠΡΩΤΕΪΝΕΣ ΚΑΙ ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ

Η ApoE βρίσκεται στα χυλομικρά, στα κατάλοιπα των χυλομικρών (remnants), στις VLDL, στα κατάλοιπα των VLDL (IDL) και σε ένα υποκλάσμα των HDL (HDL-E ή HDL_C) (Σχήμα 4).



Σχήμα 4. Η σχέση της ApoE με τις πλούσιες σε τριγλυκερίδια λιποπρωτεΐνες

Η ApoE των λιποπρωτεϊνών αναγνωρίζεται από ειδικούς υποδοχείς με αποτέλεσμα η ApoE να συμβάλλει στον διαμέσου υποδοχέων καταβολισμό των λιποπρωτεϊνικών σωματιδίων (Σχήμα 5). Οι κυριότεροι υποδοχείς είναι: ο LDL υποδοχέας (LDL-R) (B100/ApoE) (με τον οποίο έχει 25 φορές μεγαλύτερη συγγένεια σε σύγκριση με την ApoB100), ο LRP (LDL-related protein) υποδοχέας (ο οποίος δεν υπόκειται σε αρνητική παλίνδρομη ρύθμιση από την ενδοκυττάρια χοληστερόλη), ο ApoE υποδοχέας 2 (που βρίσκεται κυρίως στο κεντρικό νευρικό σύστημα) και ο VLDL υποδοχέας (η φυσιολογική λειτουργία του οποίου στον άνθρωπο δεν είναι επακριβώς γνωστή)³⁵.



Σχήμα 5. Αλληλεπίδραση της ApoE με τους υποδοχείς της.

X; μεταλλάξεις στο μόριο της ApoE που διακόπτουν την είσοδο χοληστερόλης στα κύτταρα

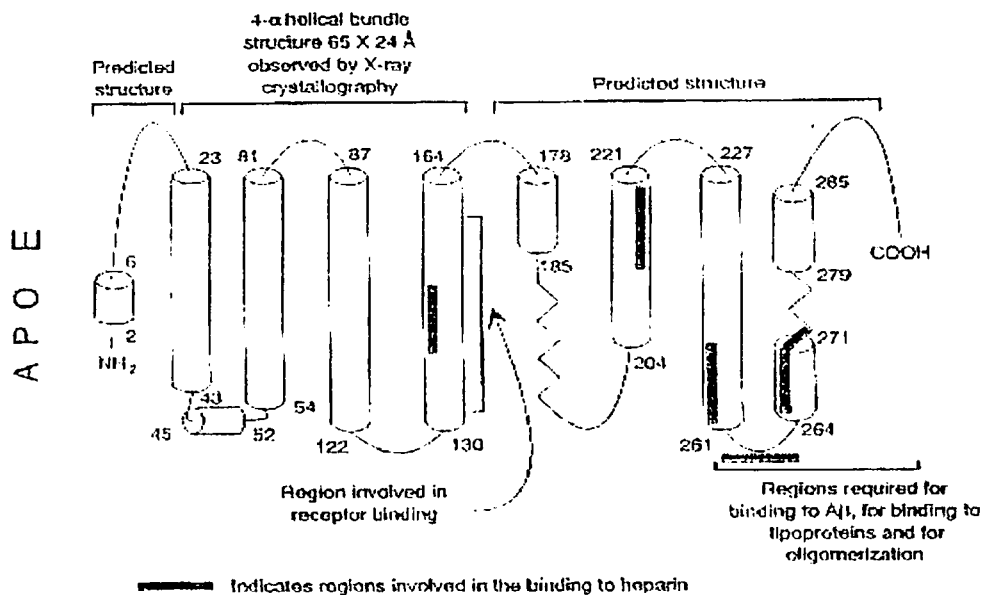
3.3. ΘΕΣΕΙΣ ΣΥΝΘΕΣΗΣ

Η ApoE παράγεται σε πολλά όργανα και κυρίως στο ήπαρ, τον εγκέφαλο, το σπλήνα, τα επινεφρίδια, τις ωθήκες, τους νεφρούς και τους μύες, ενώ δεν παράγεται στο ενδοθήλιο του εντέρου³⁴. Η ηπατική παραγωγή της ευθύνεται για περίπου τα 2/3 ή τα 3/4 της ποσότητας της ApoE στο πλάσμα. Η ApoE βρίσκεται επίσης σε μεγάλες ποσότητες στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό (μάλιστα αποτελεί την κύρια αποπρωτεΐνη του ENY δεδομένου ότι δεν υπάρχει στο ENY ApoB100), αφού παράγεται τοπικά από τα αστροκύτταρα. Τέλος, η ApoE παράγεται και από τα μακροφάγα³⁶.

3.4. ΧΗΜΙΚΗ ΔΟΜΗ

Η ApoE έχει μοριακό βάρος (MB) 34200 daltons και αποτελείται από 299 αμινοξέα. Η διάσπαση της πρωτεΐνης με το πρωτεολυτικό ένζυμο θρομβίνη έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή δύο τελικών τμημάτων: το αμινοτελικό και το καρβοξυλικό άκρο. Το αμινοτελικό άκρο αποτελείται από τα αμινοξέα 1 έως 191 (MB 22 Kda) και το

καρβοξυλικό άκρο περιέχει τα αμινοξέα 216 έως 299 (MB 10 Kda). Αυτά τα δύο δομικά τμήματα της ApoE αποτελούν και διαφορετικές λειτουργικές περιοχές. Το αμινοτελικό άκρο είναι υπεύθυνο για την ένωση της ApoE με τον LDL υποδοχέα, ενώ το καρβοξυλικό άκρο χρησιμεύει για τη σύνδεσή της με το μόριο των λιποπρωτεϊνών³⁷. Με τη χρήση μονοκλωνικών αντισωμάτων έχει βρεθεί ότι το τμήμα του αμινοτελικού άκρου που περιέχει τα αμινοξέα 140 έως 150 αποτελεί το τμήμα της απολιποπρωτεΐνης που ενώνεται με τον LDL υποδοχέα. Η περιοχή αυτή είναι πλούσια σε αμινοξέα με θετικό φορτίο (κυρίως αργινίνη και λυσίνη). Τα αμινοξέα αυτά δεν συμμετέχουν στο σχηματισμό ενδομοριακών ενώσεων, αλλά προβάλλουν στο εξωτερικό του μορίου και συνδέονται με τον αρνητικά φορτισμένο LDL υποδοχέα. Η αντικατάσταση ενός αμινοξέος της περιοχής αυτής δεν οδηγεί σε πλήρη κατάργηση της σύνδεσης της απολιποπρωτεΐνης με τον υποδοχέα. Έτσι, φαίνεται ότι υπάρχουν πολλαπλές θέσεις σύνδεσης της απολιποπρωτεΐνης με τον υποδοχέα³⁷. Η δευτερογενής δομή του μορίου της απολιποπρωτεΐνης είναι επίσης σημαντική για τη χημική συγγένεια του μορίου με τον υποδοχέα (Σχήμα 6).

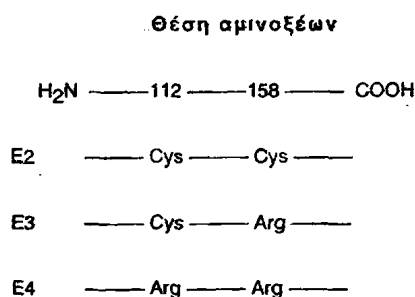


Σχήμα 6. Δευτεροταγής δομή της ApoE

Αντικαταστάσεις αμινοξέων εκτός της συγκεκριμένης περιοχής (140 έως 150), οι οποίες επηρεάζουν τη δευτερογενή δομή του μορίου μεταβάλλουν τη χημική συγγένεια του μορίου με τον υποδοχέα (Σχήμα 7)³⁸. Παράδειγμα αποτελεί η αντικατάσταση της



αργινίνης στη θέση 158 του μορίου με κυστεΐνη. Η κατάργηση του ενδομοριακού δεσμού μεταξύ της αργινίνης στη θέση 158 και της ασπαργίνης στη θέση 154 και η δημιουργία ενός νέου ενδομοριακού δεσμού μεταξύ της αργινίνης στη θέση 150 και της ασπαργίνης στη θέση 154 έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία μιας νέας δομής της πρωτεΐνης. Η νέα αυτή ισομορφή της ApoE, γνωστή ως ApoE2, εμφανίζει μειωμένη χημική συγγένεια με τον LDL υποδοχέα. Τα ίδια φαίνεται ότι ισχύουν και για τη χημική συγγένεια του καρβοξυλικού άκρου με τις λιποπρωτεΐνες. Η αντικατάσταση της κυστεΐνης στη θέση 112 του αμινοτελικού άκρου του μορίου με αργινίνη έχει ως αποτέλεσμα τη μεταβολή της δομής του μορίου. Η νέα αυτή ισομορφή, γνωστή ως ApoE4, εμφανίζει μεγαλύτερη ικανότητα σύνδεσης με τις VLDL σε σύγκριση με τις HDL³⁹. Επίσης, υπάρχει αυξημένη χημική συγγένεια αυτής της ισομορφής με τον LDL υποδοχέα σε σύγκριση με τις άλλες ισομορφές της ApoE⁴⁰.

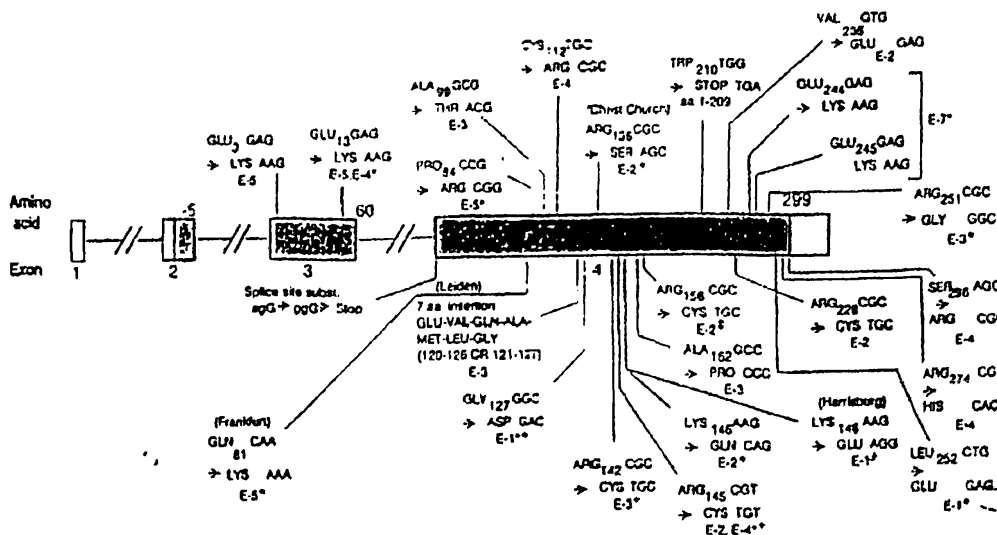


Σχήμα 7. Οι κύριες ισομορφές της ApoE

3.5. ΤΟ ΓΟΝΙΔΙΟ ΤΗΣ ΑΡΟΕ

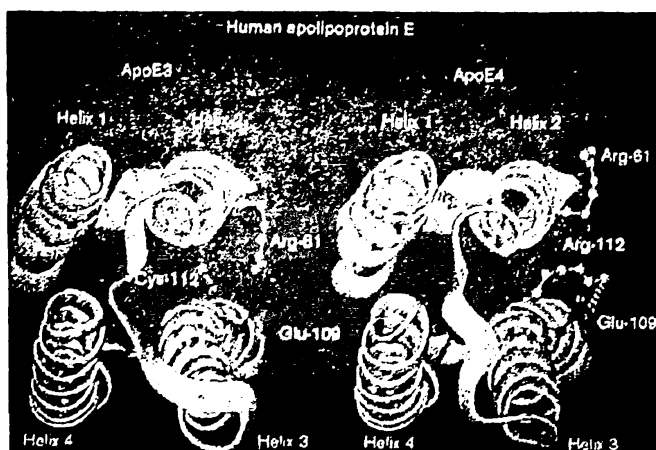
Το γονίδιο που κωδικοποιεί την ApoE βρίσκεται στο χρωμόσωμα 19q13.2, κοντά στα γονίδια που κωδικοποιούν τις ApoCII και ApoCIII⁴¹. Στο ίδιο χρωμόσωμα βρίσκεται και το γονίδιο που κωδικοποιεί τον LDL υποδοχέα. Αποτελείται από 3.7 Kbp και συγκροτείται από τον εναρκτή, 4 εξόνια και 3 ιντρόνια (Σχήμα 8).





Σχήμα 8. Σχηματική αναπαράσταση του γονιδίου της ApoE

Δύο σημειακές μεταλλάξεις στο εξόνιο 4 είναι υπεύθυνες για τα 3 κοινά αλληλία του γονιδίου που κωδικοποιεί την ApoE (αλληλία ε2, ε3 και ε4)⁴¹. Οι αντίστοιχες ισομορφές της ApoE είναι οι E2, E3 και E4. Η ApoE3 έχει κυστεΐνη στη θέση 112 και αργινίνη στη θέση 158. Στην ApoE2 στη θέση 158, η αργινίνη αντικαθίσταται από κυστεΐνη (Arg¹⁵⁸→Cys), ενώ στην ApoE4 στη θέση 112, η κυστεΐνη αντικαθίσταται από αργινίνη (Cys¹¹²→Arg) (Σχήμα 7). Οι μεταλλάξεις αυτές έχουν ως αποτέλεσμα την αλλαγή της τεταρτοταγούς δομής των ApoE ισομορφών (Εικόνα 1). Τα αλληλία ε2, ε3 και ε4 καθορίζουν 6 γονότυπους: 3 ομόζυγους E2/E2, E3/E3 και E4/E4 και 3 ετερόζυγους E2/E3, E2/E4 και E3/E4. Οι συχνότητες των ε2, ε3 και ε4 είναι σχετικά σταθερές στη λευκή φυλή (μέση επίπτωση 8%, 78% και 14% αντίστοιχα)⁴².

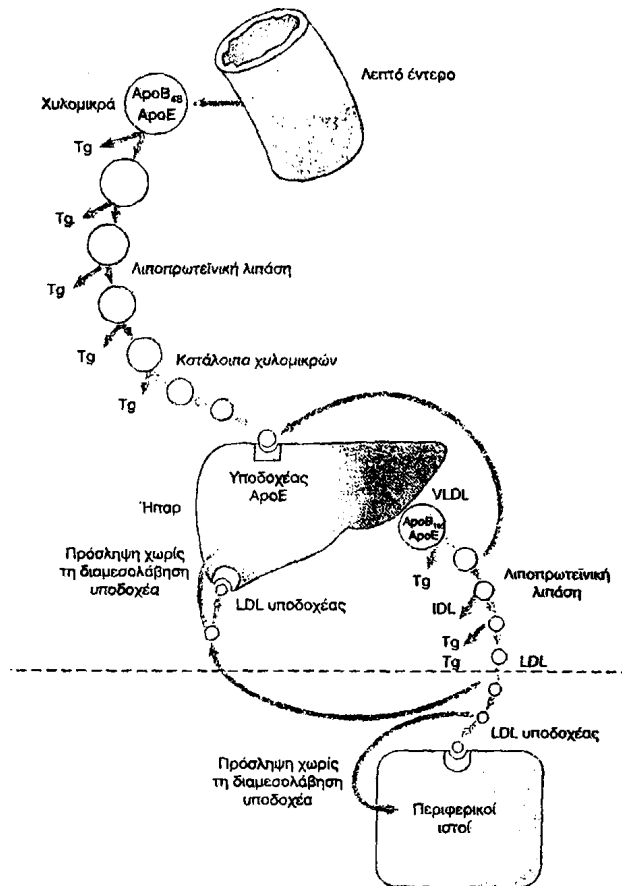


Εικόνα 1. Διαφορές στη διαμόρφωση στο χώρο των ισομορφών E3 και E4 της ApoE



3.6. ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΛΙΠΟΠΡΩΤΕΪΝΩΝ

(Σχήμα 9)

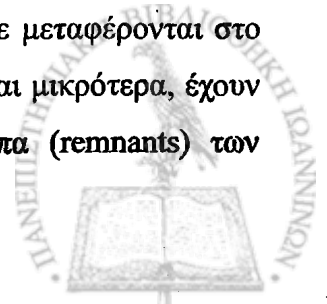


Σχήμα 9. Η ApoE και ο μεταβολισμός των λιποπρωτεϊνών

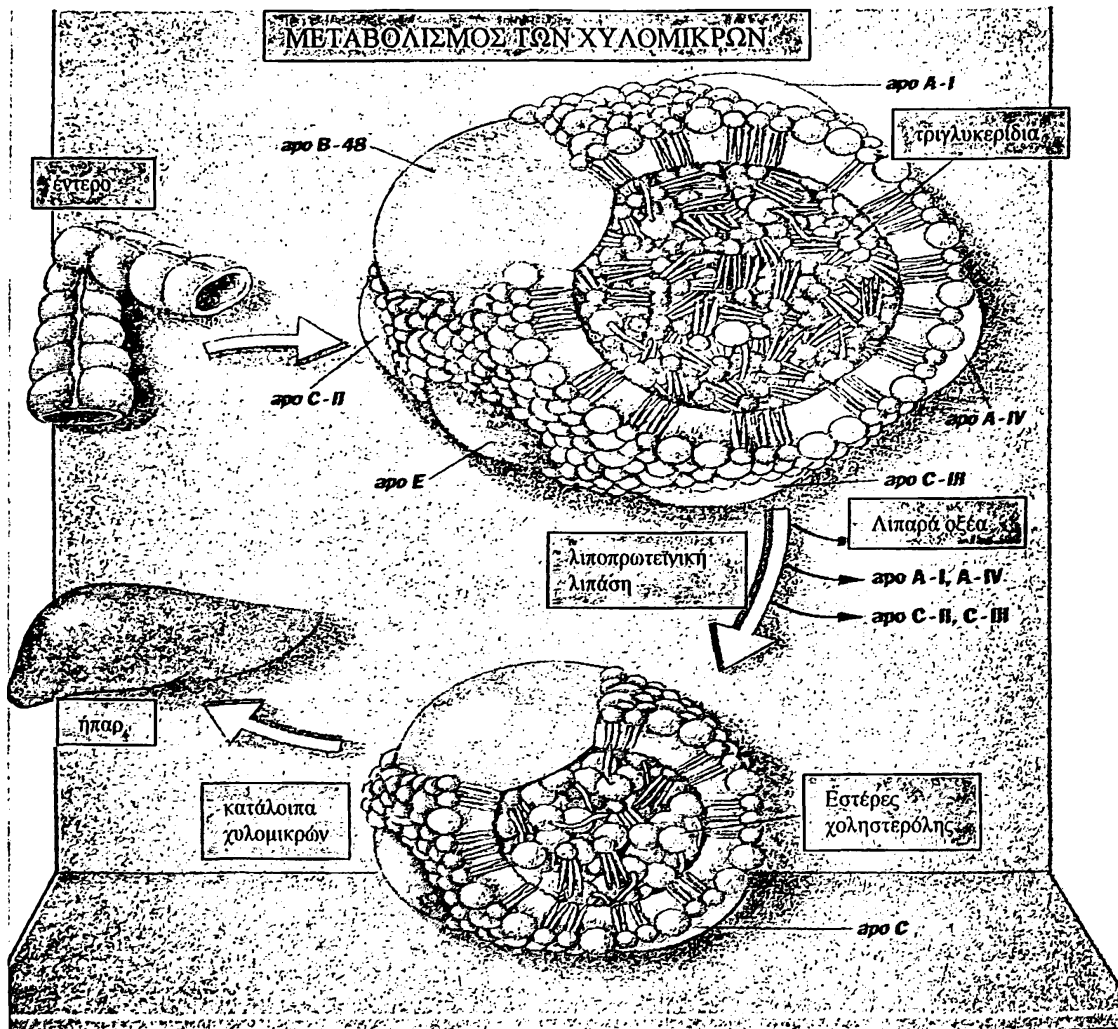
3.6.1. Μεταφορά του διαιτητικού λίπους από το λεπτό έντερο στους περιφερικούς ιστούς και στο ήπαρ

(Σχήμα 10)

Τα χυλομικρά συντίθενται στο λεπτό έντερο και περιέχουν το διαιτητικό λίπος (κυρίως τριγλυκερίδια και χοληστερόλη). Η ενσωμάτωση της ApoE στα χυλομικρά γίνεται μετά την έκκρισή τους στη λεμφική κυκλοφορία. Στα τριχοειδή των μυών και του λιπώδους ιστού, όπου υπάρχει το ένζυμο λιποπρωτεϊνική λιπάση (LPL), υδρολύονται τα τριγλυκερίδια των χυλομικρών και μετατρέπονται σε λιπαρά οξέα. Τα λιπαρά οξέα είτε χρησιμοποιούνται τοπικά στους μύες για την παραγωγή ενέργειας, είτε αποθηκεύονται στο λιπώδη ιστό υπό τη μορφή τριγλυκεριδίων, είτε μεταφέρονται στο ήπαρ. Μετά την υδρόλυση των τριγλυκεριδίων τα χυλομικρά γίνονται μικρότερα, έχουν μεγαλύτερη ποσότητα χοληστερόλης και αποτελούν τα κατάλοιπα (remnants) των



χυλομικρών. Αυτά τα κατάλοιπα εισέρχονται στα ηπατοκύτταρα, αφού η ΑρoE που υπάρχει στην επιφάνειά τους συνδέεται με τους ειδικούς κυτταρικούς υποδοχείς⁴³ και κυρίως τον LRP υποδοχέα (κεφάλαιο 3.2). Απαραίτητη προϋπόθεση για τη σύνδεση της ΑρoE με τον LRP είναι η σύνδεσή της με πρωτεογλυκάνες [heparin sulfate proteoglycans (HSPG)] της κυτταρικής μεμβράνης⁴⁴.



Σχήμα 10: Μεταβολισμός των χυλομικρών

3.6.2. Μεταφορά λιπιδίων από το ήπαρ στους περιφερικούς ιστούς

(Σχήμα 11)

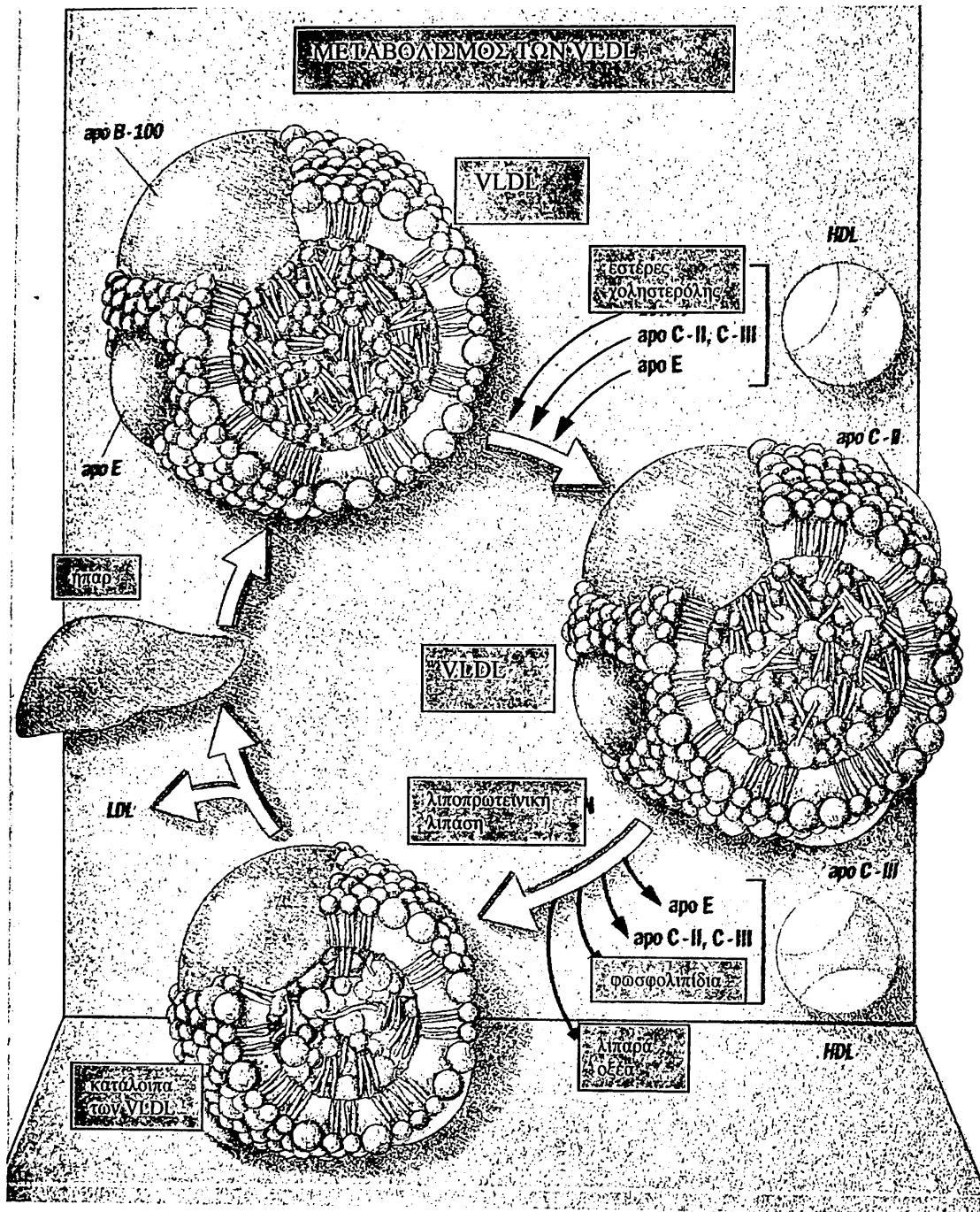
Τα ηπατοκύτταρα συνθέτουν και εκκρίνουν VLDL. Οι VLDL είναι πλούσιες σε τριγλυκερίδια και περιέχουν στο μόριο τους τις ΑρoB100 και ΑρoE. Οι VLDL ακολουθούν τον ίδιο μεταβολικό δρόμο, όπως τα χυλομικρά. Αξίζει να σημειωθεί ότι η



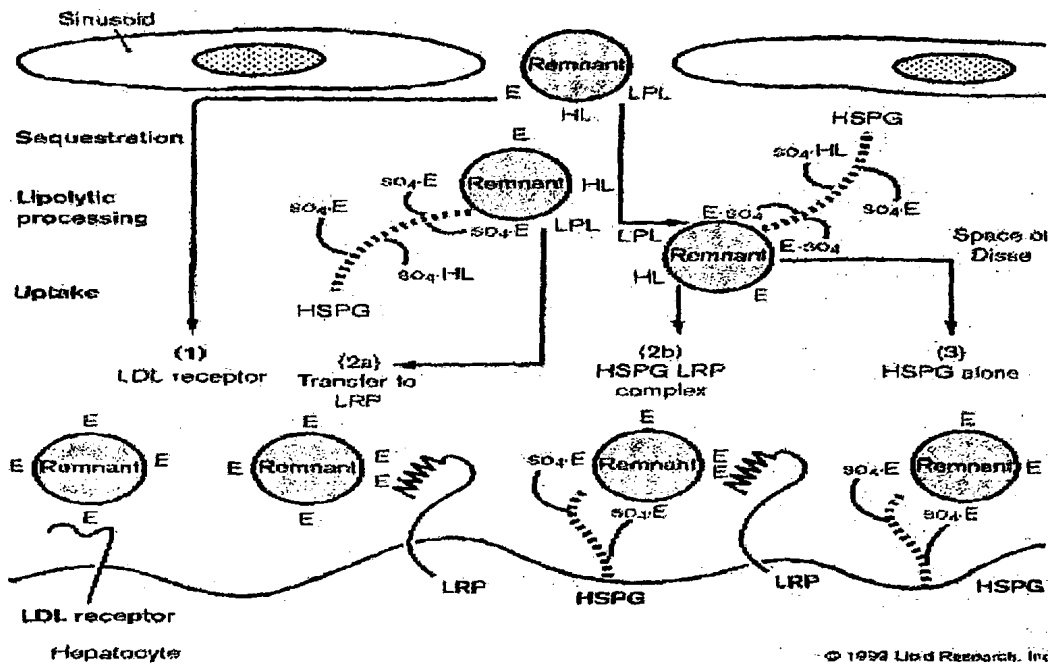
δραστηριότητα της λιποπρωτεϊνικής λιπάσης μειώνεται όταν τα επίπεδα της ApoE στο πλάσμα είναι αυξημένα. Η ApoCII βρίσκεται στο μόριο των VLDL και αποτελεί απαραίτητο συνένζυμο για τη λιποπρωτεϊνική λιπάση. Όταν τα επίπεδα της Apo E στο πλάσμα αυξηθούν, η ApoCII αντικαθίσταται ή εκτοπίζεται από την ApoE με αποτέλεσμα τη μείωση της δραστηριότητας της λιποπρωτεϊνικής λιπάσης⁴⁵. Τα κατάλοιπα των VLDL (IDL) είτε εισέρχονται στα ηπατοκύτταρα διαμέσου της σύνδεσης της ApoE με τον LDL υποδοχέα ή τον LRP υποδοχέα, είτε υφίστανται την επίδραση της ηπατικής λιπάσης (HL) με αποτέλεσμα την υδρόλυση των τριγλυκεριδίων τους στο χώρο του Disse και τελικά το σχηματισμό των πλούσιων σε χοληστερόλη LDL.

Στο Σχήμα 12 απεικονίζεται αναλυτικά η πρόσληψη των λιποπρωτεϊνικών καταλοίπων από το ηπατοκύτταρο διαμέσου του LDL υποδοχέα ή του LRP υποδοχέα.





Σχήμα 11: Μεταβολισμός των VLDL



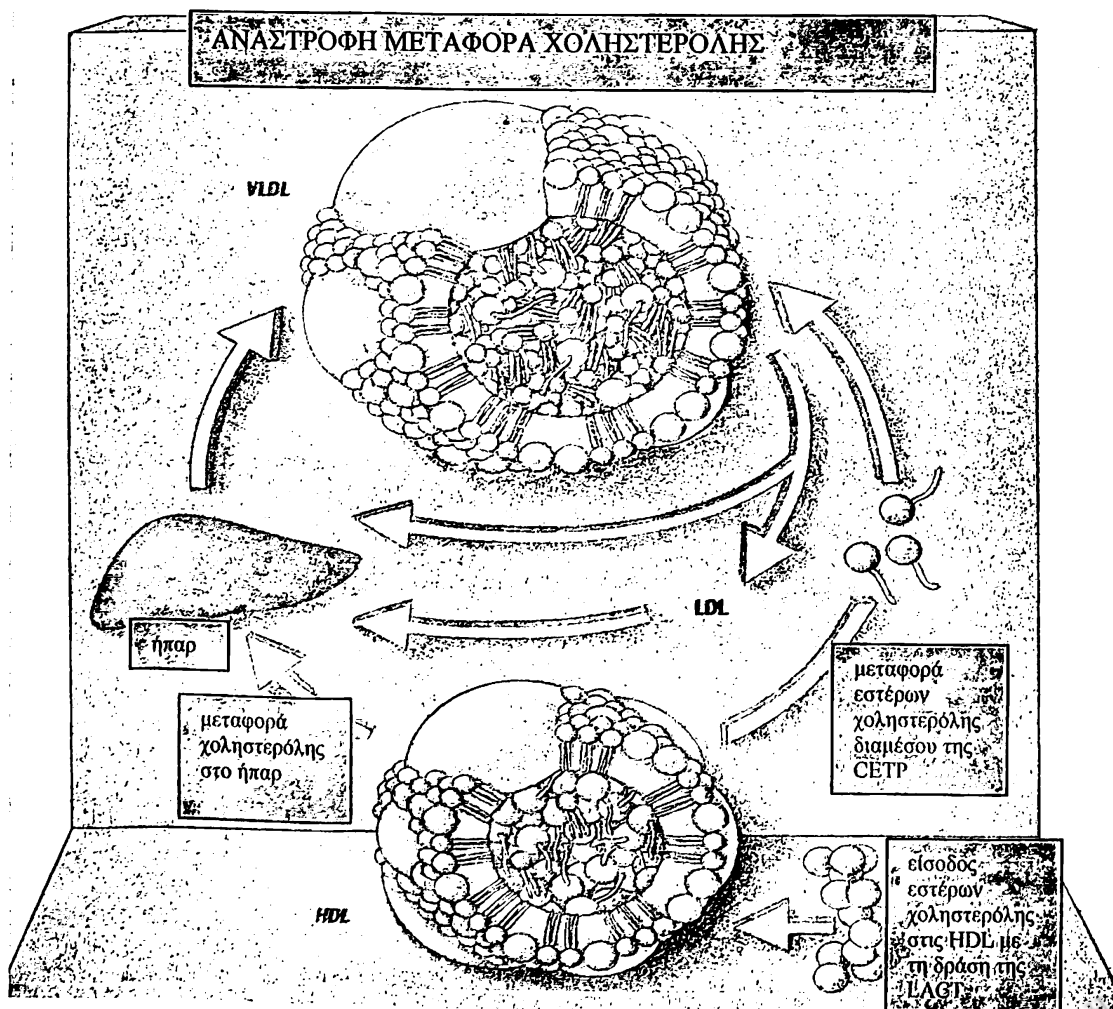
Σχήμα 12. Πρόσληψη των λιποπρωτεϊνικών καταλοίπων από τα ηπατοκύτταρα

3.6.3. Μεταφορά χοληστερόλης από τους περιφερικούς ιστούς στο ήπαρ

(Σχήμα 13)

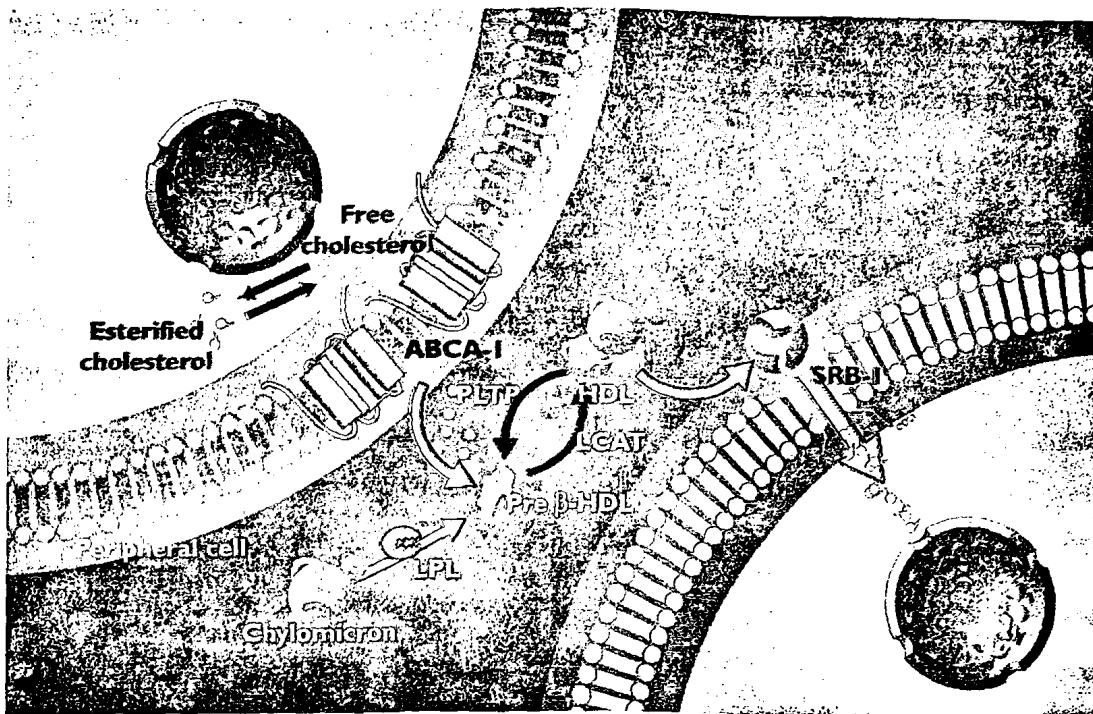
Η μεταφορά της περίσσειας χοληστερόλης από τους περιφερικούς ιστούς στο ήπαρ έχει τεράστια σημασία στη διαδικασία της αθηρογένεσης. Κύτταρα που συσσωρεύουν χοληστερόλη στο κυτταρόπλασμα τους (π.χ τα μακροφάγα) ελευθερώνουν χοληστερόλη στο διάμεσο χώρο. Η χοληστερόλη αυτή μαζί με φωσfolιπίδια δεσμεύεται από τις ApoA1 με αποτέλεσμα τη δημιουργία των πρόδρομων μορφών της HDL (HDL-LpA1). Ρυθμιστής της διαδικασίας εξόδου της χοληστερόλης από τα κύτταρα και επομένως της έναρξης του σχηματισμού των σωματιδίων της HDL είναι ένας μεταφορέας της κυτταρικής μεμβράνης, που ανακαλύφθηκε πρόσφατα και ονομάζεται ABCA1 (ATP-binding cassette transporter A1)⁴⁶. Έτσι, μεταλλάξεις του ABCA1 έχουν ως αποτέλεσμα την οικογενή έλλειψη HDL (familial HDL deficiency) ή τη νόσο της Ταγγέρης (Tangier disease). Επιπρόσθετα, στο διάμεσο χώρο υπάρχει ελεύθερη ApoE, η οποία όπως αναφέρθηκε, παράγεται τοπικά σε διάφορους ιστούς. Η ελεύθερη ApoE ενώνεται με τον ABCA1 και διεγείρει την έξοδο χοληστερόλης από τα κύτταρα, με αποτέλεσμα τη προσθήκη λιπιδίων στην ApoE και τη δημιουργία της HDL-LpE⁴⁷. Κατά συνέπεια η ικανότητα της ApoE να διεγείρει την έξοδο χοληστερόλης από τα κύτταρα πραγματοποιείται διαμέσου διέγερσης του ABCA1. Στη συνέχεια, οι ApoE που βρίσκονται στην επιφάνεια των HDL συνδέονται με τους LDL υποδοχείς στα

ηπατοκύτταρα με τελικό αποτέλεσμα τη μεταφορά χοληστερόλης στα ηπατοκύτταρα⁴⁸. Ενώ σε μερικά ζώα αυτός ο μεταβολικός δρόμος θεωρείται ότι είναι η κύρια οδός μεταφοράς της περίσσειας χοληστερόλης στα ηπατοκύτταρα, στον άνθρωπο πιστεύεται ότι αυτός ο μηχανισμός είναι επικουρικός. Πράγματι, η χοληστερόλη μεταφέρεται από τις HDL στις VLDL και LDL με τη βοήθεια του ενζύμου που μεταφέρει εστέρες χοληστερόλης (CETP, πρωτεΐνη μεταφοράς εστέρων χοληστερόλης), το οποίο υπάρχει στο πλάσμα. Στη συνέχεια, η χοληστερόλη διαμέσου αυτών των σωματιδίων μεταφέρεται τελικά στα ηπατοκύτταρα⁴⁹. Επίσης, πρόσφατα ανακαλύφθηκε ο SR-BI υποδοχέας (scavenger receptor BI) που εκφράζεται στην επιφάνεια των ηπατοκυττάρων και των κυττάρων της στεροειδογένεσης και διαμέσου του οποίου οι εστέρες χοληστερόλης που υπάρχουν στις HDL εισέρχονται στα ηπατοκύτταρα. Ο υποδοχέας αυτός φαίνεται ότι διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη μεταφορά της περίσσειας χοληστερόλης από τους περιφερικούς ιστούς στο ήπαρ⁵⁰ (Σχήμα 14).



Σχήμα 13: Μεταφορά χοληστερόλης από τους περιφερικούς ιστούς στο ήπαρ

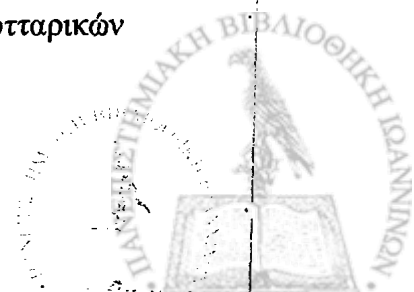




Σχήμα 14. Ανάστροφη μεταφορά χοληστερόλης και η λειτουργία του μεταφορέα ABCA1 (ATP-binding cassette transporter A1) και του υποδοχέα SR-BI (scavenger receptor BI)

3.6.4. Ανακατανομή χοληστερόλης στα κύτταρα ενός οργάνου ή ιστού

Η ApoE φαίνεται ότι διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην ανακατανομή της χοληστερόλης ανάμεσα στα κύτταρα ανάλογα με τις ανάγκες τους σε χοληστερόλη. Παράδειγμα αποτελεί το μοντέλο που παρατηρείται μετά από τραυματισμό ενός περιφερικού νεύρου. Αμέσως μετά τον τραυματισμό, τα μακροφάγα της περιοχής της βλάβης παράγουν μεγάλες ποσότητες ApoE, έτσι ώστε η συγκέντρωση της τοπικά να είναι 100 έως 200 φορές μεγαλύτερη από τη συγκέντρωση στα υγιή νεύρα που βρίσκονται κοντά στο σημείο της βλάβης. Η χοληστερόλη που απελευθερώνεται στην περιοχή εξαιτίας της καταστροφής των κυττάρων συνδέεται με την ApoE και το σύμπλεγμα που δημιουργείται φαγοκυτταρώνεται από τα μακροφάγα. Στη φάση της επούλωσης, οι νευρίτες που ξεκινούν από το κεντρικό κολόβωμα του τραυματισμένου νεύρου εκφράζουν LDL υποδοχείς στην επιφάνεια τους και έτσι δεσμεύουν το σύμπλεγμα χοληστερόλης-ApoE που απελευθερώνεται ταυτόχρονα από τα μακροφάγα. Η χοληστερόλη είναι απαραίτητο δομικό υλικό για τη δημιουργία των κυτταρικών μεμβρανών κατά την επούλωση του νεύρου⁵¹.



3.7. ΣΗΜΑΣΙΑ ΤΩΝ ΚΟΙΝΩΝ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΩΝ ΤΗΣ ΑΡΟΕ

3.7.1. Υπερλιποπρωτεϊναιμία τύπου III (δυσβηταλιποπρωτεϊναιμία)

Η υπερλιποπρωτεϊναιμία τύπου III είναι μια γενετική διαταραχή του μεταβολισμού των λιπιδίων που χαρακτηρίζεται από τη συσσώρευση λιποπρωτεϊνικών καταλοίπων πλούσιων σε χοληστερόλη στο πλάσμα, την παρουσία χαρακτηριστικών ξανθωμάτων και την εμφάνιση πρώιμης αθηρωμάτωσης. Η διαταραχή αυτή οφείλεται σε μειωμένη συγγένεια ορισμένων ισομορφών της ApoE με τους LDL υποδοχείς και τους ApoE υποδοχείς⁵². Η ApoE2, όπως ήδη αναφέρθηκε, εμφανίζει μειωμένη συγγένεια με τους υποδοχείς της ApoE, εξαιτίας της αντικατάστασης του αμινοξέος αργινίνη στη θέση 158 του μορίου της πρωτεΐνης από κυστεΐνη. Ένα ποσοστό περίπου 10% των ατόμων με γονότυπο ApoE2/2 εμφανίζουν υπερλιποπρωτεϊναιμία τύπου III. Αντίθετα, τα περισσότερα άτομα που έχουν αυτό το γονότυπο εμφανίζουν χαμηλά επίπεδα λιπιδίων (ολικής και LDL χοληστερόλης) στο πλάσμα. Πολύ σπάνια το αίτιο της υπερλιποπρωτεϊναιμίας τύπου III μπορεί να είναι η οικογενής έλλειψη της ApoE⁵³. Είναι φανερό ότι χρειάζεται ένας επιπλέον παράγοντας (γενετικός ή περιβαλλοντικός) για την εκδήλωση της νόσου σε ομόζυγα E2/2 άτομα. Οι καταστάσεις που ευοδώνουν την εμφάνιση αυτής της δυσλιποπρωτεϊναιμίας είτε αυξάνουν την παραγωγή των λιποπρωτεϊνικών καταλοίπων είτε μειώνουν τον καταβολισμό τους (παχυσαρκία, σακχαρώδης διαβήτης, υποθυρεοειδισμός, φάρμακα, άλλη συνυπάρχουσα γενετική διαταραχή του μεταβολισμού των λιπιδίων)⁵⁴.

3.7.2. Επίδραση των πολυμορφισμών της ApoE στα επίπεδα των λιπιδαιμικών παραμέτρων του ορού.

Το αλληλόμορφο γονίδιο ApoE2 συσχετίζεται με μειωμένα επίπεδα ApoB, καθώς και ολικής και LDL χοληστερόλης στο πλάσμα σε σύγκριση με τα αλλήλια ε3 και ε4, ενώ αντίθετα τα επίπεδα της ApoE του ορού είναι περισσότερο αυξημένα σε σύγκριση με τα άλλα δύο αλλήλια^{42,55}. Η αύξηση της ApoE του ορού οφείλεται στον ελαττωμένο καταβολισμό των λιποπρωτεϊνών που περιέχουν ApoE2 εξαιτίας της μειωμένης σύνδεσης της ApoE2 με τους υποδοχείς και επομένως στην αύξηση του χρόνου παραμονής της στην κυκλοφορία. Η μείωση της LDL χοληστερόλης στα άτομα που έχουν το αλλήλιο ε2 οφείλεται: α) σε μειωμένη υδρόλυση των VLDL από τη λιποπρωτεϊνική λιπάση εξαιτίας της αντικατάστασης της ApoCII στο μόριο των VLDL



από τα αυξημένα επίπεδα της Apo E στο πλάσμα, με τελικό αποτέλεσμα τη μείωση της παραγωγής των καταλοίπων των VLDL τα οποία είναι πρόδρομα μόρια των LDL⁴⁵, β) στο γεγονός ότι η ApoE2 επάγει τη δράση της ηπατικής λιπάσης σε μικρότερο βαθμό από την ApoE4 με αποτέλεσμα τη μείωση της παραγωγής των LDL⁵⁶, γ) στο γεγονός ότι η ισομορφή ApoE2 είναι ελαττωματική ως προς την ικανότητα σύνδεσής της με τους υποδοχείς, με αποτέλεσμα λιγότερη χοληστερόλη που προέρχεται από τα κατάλοιπα των χυλομικρών και των VLDL να εισέρχεται στα ηπατοκύτταρα. Η μείωση της ενδοκυττάριας συγκέντρωσης χοληστερόλης οδηγεί σε αύξηση του αριθμού των LDL υποδοχέων στην επιφάνεια αυτών των κυττάρων και τελικά σε μείωση των επιπέδων των LDL στον ορό, δ) σε αυξημένο καταβολισμό των LDL εξαιτίας της μείωσης του ανταγωνισμού μεταξύ της ApoB100 και της μειονεκτικής ApoE2 για τον LDL υποδοχέα και ε) στη μειωμένη μετατροπή των IDL σε LDL επειδή για να γίνει η αυτή η μετατροπή είναι απαραίτητη η σύνδεση των IDL με τον LRP υποδοχέα, η οποία σύνδεση στην περίπτωση της ApoE2 είναι ελαττωμένη.

Αντίθετα, η αύξηση της ολικής και LDL χοληστερόλης, καθώς και των επιπέδων της ApoB σε άτομα με το αλληλίο ε4 οφείλεται: α) στην αυξημένη είσοδο των λιποπρωτεϊνικών καταλοίπων στα ηπατοκύτταρα εξαιτίας της αυξημένης συγγένειας της ApoE4 με τους ApoE υποδοχείς και της επιλεκτικής σύνδεσης της ApoE4 με τις VLDL³⁹. Αυτή η αυξημένη είσοδος λιποπρωτεϊνικών καταλοίπων στα ηπατοκύτταρα έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της συγκέντρωσης της ενδοκυττάριας χοληστερόλης και επομένως τη μείωση της έκφρασης των LDL υποδοχέων στην επιφάνεια των ηπατοκυττάρων. Η μείωση του καταβολισμού των LDL έχει ως τελικό αποτέλεσμα την αύξηση της LDL χοληστερόλης⁵⁷ και β) στην αυξημένη εντερική απορρόφηση του διαιτητικού φορτίου χοληστερόλης⁵⁸. Επιπρόσθετα, τα επίπεδα της ApoE στον ορό στα άτομα με το αλληλίο ε4 είναι μειωμένα σε σύγκριση με τα αλληλία ε3 και ε2 εξαιτίας του αυξημένου καταβολισμού των λιποπρωτεϊνών που περιέχουν την ApoE4. Συμπερασματικά, φαίνεται ότι οι πολυμορφισμοί της ApoE αποτελούν τον σημαντικότερο γενετικό παράγοντα που καθορίζει τη μεταβλητότητα των επιπέδων της ολικής χοληστερόλης στους περισσότερους πληθυσμούς: πράγματι, έχει υπολογισθεί ότι ευθύνονται για το 7-14% αυτής της μεταβλητότητας⁵⁹.

Πρέπει να αναφερθεί ότι υπάρχει αρκετή διχογνωμία για την επίδραση των πολυμορφισμών της ApoE στα επίπεδα των υπολοίπων λιπιδαιμικών παραμέτρων. Σε μια μετα-ανάλυση, τα αλληλόμορφα γονίδια ε4 και ε2 συσχετίστηκαν με αυξημένα επίπεδα τριγλυκεριδίων σε σύγκριση με το ε3, ενώ το αλληλίο ε4 με μειωμένα επίπεδα

HDL χοληστερόλης σε σύγκριση με τα αλληλία ε3 και ε2⁶⁰. Τέλος, σε μία μελέτη το αλληλίο ε4 συσχετίστηκε με αυξημένα επίπεδα Lp(a)⁶¹.

3.7.3. Πολυμορφισμοί της ApoE και αθηρωματική αγγειακή νόσος

Είναι γνωστό ότι τα αυξημένα επίπεδα της LDL χοληστερόλης στο πλάσμα αποτελούν ανεξάρτητο παράγοντα κινδύνου για την εμφάνιση στεφανιαίας νόσου. Έτσι, το αλληλίο ε4 θεωρείται παράγοντας κινδύνου για στεφανιαία νόσο, αφού συσχετίζεται με υψηλότερες τιμές LDL χοληστερόλης⁶². Ο αυξημένος κίνδυνος παραμένει και μετά τη διόρθωση για τα επίπεδα της LDL χοληστερόλης, ένα εύρημα που υποδηλώνει ότι το αλληλίο ε4 μπορεί να αποτελεί παράγοντα κινδύνου για στεφανιαία νόσο⁶³, για ισχαιμικά αγγειακά εγκεφαλικά επεισόδια⁶⁴ και για την εμφάνιση συστολικής δυσλειτουργίας της αριστερής κοιλίας σε ηλικιωμένα άτομα⁶⁵ ανεξάρτητα από την επίδραση του στα επίπεδα της LDL χοληστερόλης. Όπως ήδη αναφέρθηκε, οι ασθενείς με υπερλιποπρωτεϊναιμία τύπου III έχουν αυξημένη επίπτωση αθηρωματικής νόσου και κυρίως περιφερικής αγγειοπάθειας⁵⁴, ενώ γενετικά τροποποιημένοι επίμυες (ApoE -/-) που δεν παράγουν ApoE εμφανίζουν εκτεταμένη και επιταχυνόμενη αθηρωμάτωση. Εκτός από τις δράσεις της στο μεταβολισμό των λιπιδίων, η ApoE διαδραματίζει σημαντικό αθηροπροστατευτικό ρόλο τοπικά στο τοίχωμα των αγγείων (πίνακας 2)⁶⁶. Τέλος, το αλληλίο ε2, σε αντίθεση με το αλληλίο ε4, φαίνεται ότι προδιαθέτει στη μακροζωία⁶⁷.

3.7.4. Πολυμορφισμοί της ApoE και μεταβολή των λιπιδαιμικών παραμέτρων μετά τη χορήγηση φαρμακευτικής αγωγής

Οι γονιδιακοί πολυμορφισμοί της ApoE επηρεάζουν την ανταπόκριση των λιπιδίων στη διαίτα, στην άσκηση, αλλά στη χορήγηση υπολιπιδαιμικών φαρμακευτικών ουσιών (στατινών, φιβρατών, χολεστυραμίνης) σε ασθενείς με υπερλιπιδαιμία ή μετά τη χορήγηση ορμονικής θεραπείας υποκατάστασης⁶⁸. Έτσι, πρόσφατη μελέτη έδειξε ότι η χορήγηση ατορβαστατίνης σε ασθενείς με πρωτοπαθή υπερχοληστερολαιμία είχε ως αποτέλεσμα μεγαλύτερη μείωση των τριγλυκεριδίων, της ολικής και LDL χοληστερόλης σε ασθενείς που είχαν το αλληλίο ε2 σε σύγκριση με ασθενείς που είχαν τα αλληλία ε3 και ε4⁶⁹.



Σε μία μελέτη μας εκτιμήσαμε την επίδραση των φαινοτύπων της ApoE στη μεταβολή των λιπιδαιμικών παραμέτρων του ορού μετά τη χορήγηση ταμοξιφαίνης σε μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες με καρκίνο του μαστού. Στη μελέτη αυτή δεν υπήρχε διαφορά στη μεταβολή της ολικής χοληστερόλης, της LDL χοληστερόλης, της HDL χοληστερόλης και της ApoB μεταξύ των ασθενών που είχαν το αλληλίο ε4 [ε4(+)] και εκείνων που δεν είχαν το αλληλίο ε4 [ε4(-)]. Ωστόσο, τα επίπεδα των τριγλυκεριδίων του ορού αυξήθηκαν κατά 23.2% στις ασθενείς που είχαν το αλληλίο ε4 [ε4(+)], ενώ δεν μεταβλήθηκαν σημαντικά στις γυναίκες που δεν είχαν το αλληλίο ε4 [ε4(-)] ($p=0.01$)⁷⁰. Επιπρόσθετα, τα επίπεδα της Lp(a) μειώθηκαν κατά 43.4% στις ασθενείς ε4(-), αλλά δεν μεταβλήθηκαν σημαντικά στις ασθενείς ε4(+)⁷¹ ($p=0.005$), ενώ τα επίπεδα της ApoAI και του λόγου ApoAI/ApoB αυξήθηκαν στις ασθενείς ε4(-) χωρίς να μεταβληθούν σημαντικά στις γυναίκες ε4(+)⁷¹ ($p<0.05$). Συμπερασματικά, η απουσία του αλληλόμορφου γονιδίου ε4 είχε ως αποτέλεσμα μια ευνοϊκότερη μεταβολή του λιπιδαιμικού προφίλ μετά τη χορήγηση της ταμοξιφαίνης.

3.8. Η ΣΗΜΑΣΙΑ ΤΩΝ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΩΝ ΤΗΣ APOE ΣΤΟΝ ΟΡΟ

3.8.1. Επίδραση στο μεταβολισμό των λιποπρωτεϊνών και τα επίπεδα των λιπιδαιμικών παραμέτρων

Τα επίπεδα της ApoE στον ορό καθορίζονται σε μεγάλο βαθμό, όπως ήδη έχει αναφερθεί, από τους γενετικούς της πολυμορφισμούς και ελαττώνονται με τη σειρά: E2E2>E2E3>E3E3>E3E4>E4E4. Άλλοι παράγοντες που επηρεάζουν τη συγκέντρωση της ApoE στο γενικό πληθυσμό είναι η ηλικία, το φύλο, ο δείκτης μάζας σώματος, η σχέση περιμέτρου μέσης προς περίμετρο ισχίων και η λήψη αντισυλληπτικών δισκίων⁷².

Τα επίπεδα της ApoE στον ορό καθορίζουν σε σημαντικό βαθμό τις συγκεντρώσεις των λιπιδαιμικών παραμέτρων του ορού ανεξάρτητα από τους γενετικούς πολυμορφισμούς της ApoE. Έτσι, στη μελέτη του Stanislas βρέθηκε ότι τα επίπεδα της ApoE καθόριζαν το 34.6% της μεταβλητότητας των τριγλυκεριδίων⁷³, ενώ σε μία άλλη μελέτη η συγκέντρωση της ApoE επηρέαζε σημαντικά τα επίπεδα της ολικής χοληστερόλης, των τριγλυκεριδίων, καθώς και των αποπρωτεϊνών B και AI, ανεξάρτητα πάντα από τους γενετικούς πολυμορφισμούς⁷⁴. Επιπρόσθετα, ο συνδυασμός της συγκέντρωσης και των πολυμορφισμών της ApoE μπορεί να εξηγήσει σημαντικά υψηλότερο ποσοστό της μεταβλητότητας της ολικής χοληστερόλης και των



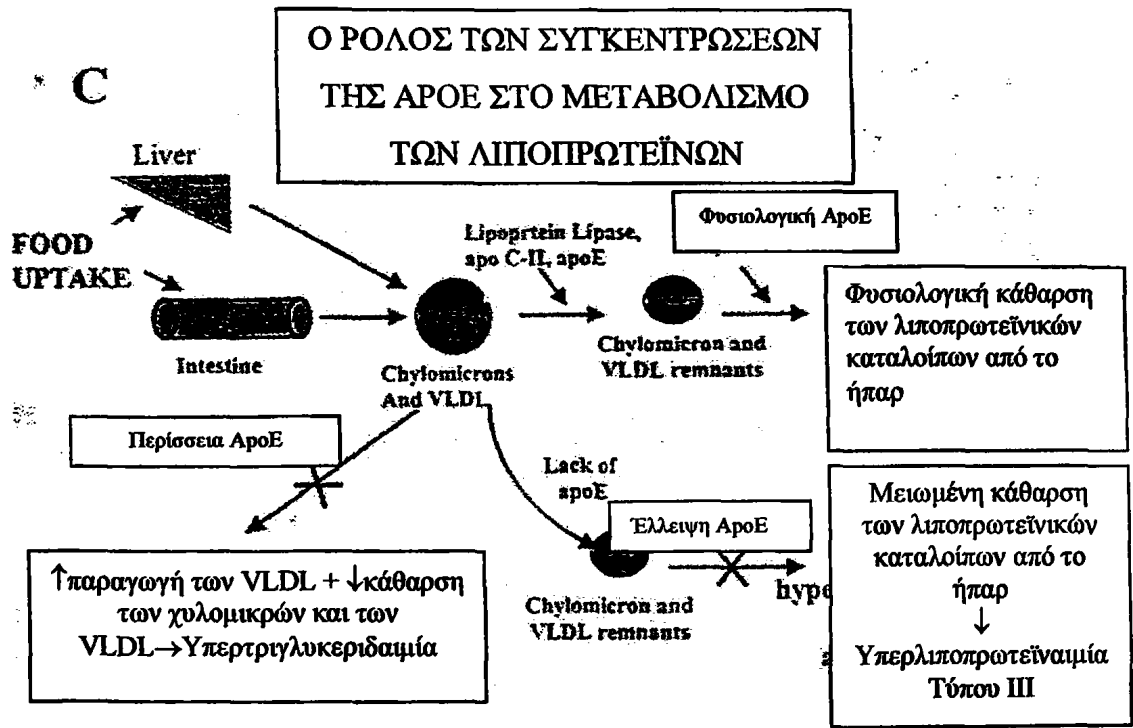
τριγλυκεριδίων από ό,τι μπορούν να ερμηνεύσουν μόνοι τους οι πολυμορφισμοί της ApoE⁷⁵.

Οι μηχανισμοί διαμέσου των οποίων οι συγκεντρώσεις της ApoE επηρεάζουν τα επίπεδα των λιποπρωτεϊνών είναι οι ακόλουθοι: α) Η ApoE διεγείρει απευθείας την ηπατική παραγωγή των VLDL και των τριγλυκεριδίων ανεξάρτητα από τους πολυμορφισμούς της ApoE⁷⁶, ενώ πρόσφατα διατυπώθηκε η άποψη ότι η ApoE διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη μεταφορά των λιπιδίων μεταξύ των διαφόρων ενδοκυττάρων διαμερισμάτων των ηπατοκυττάρων μέχρι την απελευθέρωσή τους στη κυκλοφορία⁷⁷, β) η ApoE, όπως ήδη αναφέρθηκε, αναστέλλει τη δραστηριότητα της λιποπρωτεϊνικής λιπάσης ανεξάρτητα από τους πολυμορφισμούς της ApoE^{45,78} και γ) η συγκέντρωση της ApoE μεταβάλλει την ικανότητα σύνδεσης των VLDL με τους υποδοχείς ανεξάρτητα από τους γενετικούς πολυμορφισμούς της ApoE με τελικό αποτέλεσμα να επηρεάζει τη κάθαρση των VLDL⁷⁹. Συμπερασματικά, φαίνεται ότι υπάρχει κάποιο κριτικό όριο συγκέντρωσης της ApoE για τη διατήρηση φυσιολογικών επιπέδων των λιποπρωτεϊνών του πλάσματος. Αν τα επίπεδα της ApoE είναι πολύ υψηλά τότε η αναστολή της λιπόλυσης και η αυξημένη παραγωγή των VLDL υπερτερούν του οφέλους από την αυξημένη κάθαρση των λιποπρωτεϊνών διαμέσου των υποδοχέων και το τελικό αποτέλεσμα είναι η εμφάνιση υπερλιπιδαιμίας. Εάν, αντίθετα, τα επίπεδα της ApoE είναι πολύ χαμηλά τότε η κάθαρση των λιποπρωτεϊνών διαμέσου των υποδοχέων είναι μειωμένη και το τελικό αποτέλεσμα είναι και πάλι η εμφάνιση υπερλιπιδαιμίας (Σχήμα 15). Στην τελευταία περίπτωση ανήκει χαρακτηριστικά η προαναφερθείσα οικογενής έλλειψη ApoE⁵³.

3.8.2. Η ApoE του ορού ως πρωτεΐνη οξειάς φάσης

Δικές μας μελέτες έδειξαν ότι η ApoE του ορού συμπεριφέρεται ως θετική πρωτεΐνη οξειάς φάσης σε ασθενείς με λοίμωξη^{80,81,82}.





Σχήμα 15. Ο ρόλος των επιπέδων της ΑρoE στον ορό

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4^ο

ΑΠΟΛΙΠΟΠΡΩΤΕΪΝΗ Ε ΚΑΙ ΝΕΦΡΟΣ

4.1. ΓΕΝΙΚΑ

Ο ρόλος της ApoE και των πολυμορφισμών της στα νεφρικά νοσήματα, όπως πρόσφατα έχει ανασκοπηθεί στη βιβλιογραφία⁸³, συνοψίζεται στον Πίνακα 3.

Πίνακας 3. Ο ρόλος της ApoE στα νεφρικά νοσήματα

1. Ρύθμιση των επιπέδων των λιπιδαιμικών παραμέτρων σε ασθενείς με τελικού σταδίου χρόνια νεφρική ανεπάρκεια (ΤΣΧΝΑ, ESRD) και σε μεταμοσχευμένους ασθενείς.
2. Τροποποίηση του κινδύνου για αθηρωματική αγγειακή νόσο σε ασθενείς με ΤΣΧΝΑ και σε μεταμοσχευμένους ασθενείς.
3. Προδιάθεση για την εμφάνιση ΤΣΧΝΑ και επίδραση στην ανάπτυξη, εξέλιξη και ανταπόκριση στη θεραπεία ορισμένων σπειραματοπαθειών.
4. Επίδραση στην ανάπτυξη και την εξέλιξη της διαβητικής νεφροπάθειας σε ασθενείς με σακχαρώδη διαβήτη τύπου I και II.
5. Παθογένεση της λιποπρωτεϊνικής σπειραματοπάθειας.
6. Επίδραση στην εμφάνιση οστικών καταγμάτων σε ασθενείς που υποβάλλονται σε αιμοκάθαρση.
7. Επίδραση στην εμφάνιση αμυλοείδωσης που συσχετίζεται με την εξωνεφρική κάθαρση.
8. Τροποποίηση του κινδύνου εμφάνισης οξείας νεφρικής ανεπάρκειας μετά από εγχείρηση αορτοστεφανιαίας παράκαμψης.
9. Αυτοκρινική ρύθμιση της σπειραματικής και μεσαγγειακής λειτουργίας.



4.2. ΣΥΧΝΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΩΝ ΤΗΣ ΑΡΟΕ ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ΝΕΦΡΙΚΑ ΝΟΣΗΜΑΤΑ (ΕΚΤΟΣ ΤΗΣ ΔΙΑΒΗΤΙΚΗΣ ΝΕΦΡΟΠΑΘΕΙΑΣ)

Η συχνότητα των γενετικών πολυμορφισμών της ΑροΕ σε ασθενείς που υποβάλλονται σε αιμοκάθαρση (ΑΜΚ, HD) ή συνεχή φορητή περιτοναϊκή κάθαρση (ΣΦΠΚ, CAPD) δεν διαφέρει σημαντικά σε σύγκριση με τα υγιή άτομα στις περισσότερες μελέτες^{84,85,86,87}. Επιπρόσθετα δεν παρατηρήθηκαν διαφορές μεταξύ παιδιών ή ενήλικων ασθενών με IgA νεφροπάθεια και υγιών ατόμων^{88,89}.

Ωστόσο, σε μία μελέτη που αφορούσε ένα μεγάλο αριθμό ασθενών με ΤΣΧΝΑ Ιαπωνικής καταγωγής παρατηρήθηκε μία σημαντικά αυξημένη συχνότητα του αλληλίου ε2 και αντίστοιχα μειωμένη συχνότητα του αλληλίου ε4 σε σύγκριση με τους υγιείς μάρτυρες, μία παρατήρηση που έκανε τους ερευνητές να υποθέσουν ότι το αλληλίο ε2 προδιαθέτει στην εμφάνιση ΤΣΧΝΑ τουλάχιστον σε αυτό τον πληθυσμό⁹⁰. Αντίθετα, σε μία μικρή μελέτη που αφορούσε ενήλικες ασθενείς της Καυκάσιας φυλής με νεφρωσικό σύνδρομο βρέθηκε μία κατά 4.8 φορές υπερέκφραση του αλληλίου ε4⁹¹. Επιπρόσθετα, η ανεύρεση μίας αυξημένης συχνότητας του αλληλίου ε4 (44% στους ασθενείς vs 30% στον υγιή πληθυσμό, $p < 0.01$) και του φαινοτύπου E4E3 (38.3% στους ασθενείς vs 16% στον υγιή πληθυσμό, $p < 0.001$) σε Σουηδούς μεταμοσχευμένους ασθενείς οδήγησε στην υπόθεση ότι ο E4E3 γονότυπος αποτελεί παράγοντα κινδύνου για ΤΣΧΝΑ⁹². Τέλος, έχει αναφερθεί μία αυξημένη επίπτωση του αλληλίου ε4 σε παιδιά με νεφρωσικό σύνδρομο σε σύγκριση με υγιείς μάρτυρες^{89,93}.

4.3. ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΩΝ ΤΗΣ ΑΡΟΕ ΣΤΑ ΕΠΙΠΕΔΑ ΤΩΝ ΛΙΠΙΔΑΙΜΙΚΩΝ ΠΑΡΑΜΕΤΡΩΝ ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ΝΕΦΡΙΚΑ ΝΟΣΗΜΑΤΑ

Τα αποτελέσματα των περισσότερων μελετών που εξέτασαν την επίδραση των πολυμορφισμών της ΑροΕ στις συγκεντρώσεις των λιπιδίων του ορού σε ουραιμικούς ασθενείς συμφωνούν με τα αποτελέσματα των αντίστοιχων μελετών στο γενικό πληθυσμό (βλέπε κεφάλαιο 3.7.2). Πιο συγκεκριμένα, σε μία μελέτη 269 αιμοκαθαιρόμενων ασθενών τα επίπεδα της ολικής χοληστερόλης και της LDL χοληστερόλης ήταν υψηλότερα σε ασθενείς με το γονότυπο E4E3 σε σύγκριση με ασθενείς με τους πολυμορφισμούς E3E3 και E3E2, ενώ δεν υπήρχε διαφορά στα επίπεδα των τριγλυκεριδίων, της HDL χοληστερόλης ή της Lp(a)⁸⁴. Σε μία άλλη μελέτη 245 αιμοκαθαιρόμενων ασθενών τα επίπεδα της ολικής χοληστερόλης και των τριγλυκεριδίων του πλάσματος ήταν μεγαλύτερα στους ασθενείς με φαινότυπους E2E2,

E4E4 και E4E3 σε σύγκριση με ασθενείς με τους φαινότυπους E3E3 ή E2E3, ενώ τα επίπεδα της ApoB αυξάνονταν με τη σειρά E2E2<E3E2<E3E3<E4E3<E4E4 και τα επίπεδα της ApoE ελαττώνονταν με την αντίστροφη σειρά⁸⁵.

Η παρουσία της ισομορφής ApoE2 σε ομόζυγη μορφή (E2E2) μπορεί να προκαλέσει περαιτέρω συσσώρευση καταλοίπων των λιποπρωτεϊνών από αυτή που ήδη παρατηρείται σε ασθενείς με ΤΣΧΝΑ (βλέπε κεφάλαια 2.2 και 3.7.2). Έτσι, θα μπορούσε να εξηγηθεί γιατί οι ασθενείς με το φαινότυπο E2E2 της παραπάνω μελέτης είχαν τα πιο αυξημένα επίπεδα ολικής χοληστερόλης και τριγλυκεριδίων⁸⁵. Επιπρόσθετα, ομοζυγώτες ασθενείς E2E2 με νεφρωσικό σύνδρομο ή παιδιά με νεφρική ανεπάρκεια και γονότυπο E2E2 μπορούν να εμφανίσουν την πλήρη εικόνα της υπερλιποπρωτεϊναιμίας τύπου III (βλέπε κεφάλαιο 3.7.1) ή ακόμα και χυλομικροναμία^{94,95,96}. Η υπερλιποπρωτεϊναιμία τύπου III μπορεί να προκαλέσει την εμφάνιση μιας ειδικής σπειραματοπάθειας που ονομάζεται σπειραματική λιπίδωση (glomerular lipidosis) και χαρακτηρίζεται από πρωτεϊνουρία και την παρουσία πολλών αφρωδών κυττάρων εντός των σπειραμάτων^{96,97,98,99}. Για τη θεραπεία αυτής της σπειραματοπάθειας έχουν χρησιμοποιηθεί υπολιπιδαιμικά φάρμακα⁹⁸ ή ακόμη και πλασμαφαίρεση⁹⁹. Τέλος, η υπερλιποπρωτεϊναιμία τύπου III μπορεί να προκαλέσει μία σπειραματοπάθεια που ιστολογικά μοιάζει με τη λιποπρωτεϊνική σπειραματοπάθεια (κεφάλαιο 4.7) (lipoprotein glomerulopathy-like disease). Ωστόσο, στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο δεν ανευρίσκονται οι χαρακτηριστικές δομές που μιμούνται δακτυλικά αποτυπώματα¹⁰⁰.

Τα ευρήματα των υπολοίπων μελετών συνοψίζονται στον Πίνακα 4^{86,87,101,102,103,104,105}.

Είναι ενδιαφέρον ότι δεν υπάρχει καμιά μελέτη για την επίπτωση των πολυμορφισμών της ApoE και την επίδρασή τους στο λιπιδαιμικό προφίλ σε Έλληνες ασθενείς με νεφρική ανεπάρκεια.



Πίνακας 4. Σύνοψη των μελετών για την επίδραση των πολυμορφισμών της ApoE στις λιπιδαιμικές παραμέτρους ασθενών με νεφρικά νοσήματα

Βιβλιογραφία	Πληθυσμός της μελέτης	Αποτελέσματα
84	269 ασθενείς σε AMK	Οι ασθενείς ApoE4/3 είχαν αυξημένα επίπεδα T-CHOL και LDL-C σε σύγκριση με τους ασθενείς 3/3 ή 3/2, ενώ δεν υπήρχε διαφορά στα επίπεδα των TRG, HDL-C και Lp(a)
85	245 ασθενείς σε AMK	Οι ασθενείς ApoE2/2, 3/4 και 4/4 είχαν αυξημένα επίπεδα T-CHOL και TRG σε σύγκριση με τους ασθενείς 3/3 και 3/2
87	493 ασθενείς σε AMK	Οι ασθενείς ApoE3/4 είχαν αυξημένα επίπεδα LDL-C και είχαν μειωμένα επίπεδα HDL-C σε σύγκριση με τους ασθενείς E3/2
101	23 ασθενείς σε ΣΦΠΚ	Οι ασθενείς ApoE4/3 είχαν αυξημένα επίπεδα T-CHOL και LDL-C σε σύγκριση με τους ασθενείς ApoE2/2 και E3/2
86	51 ασθενείς σε ΣΦΠΚ	Οι ασθενείς ApoE4/3 και 4/4 είχαν αυξημένα επίπεδα LDL-C σε σύγκριση με τους ασθενείς E3/3
102	54 ασθενείς σε ΣΦΠΚ	Οι ασθενείς ApoE3/2 είχαν αυξημένα επίπεδα T-CHOL και TRG και μειωμένα επίπεδα ApoB και Lp(a) σε σύγκριση με τους ασθενείς E3/3 και E3/4
94-100	Αναφορές ασθενών ομόζυγων E2/2 με πρωτεϊνουρία ή νεφρική ανεπάρκεια	Υπερλιποπρωτεϊναιμία τύπου III
103	110 μεταμοσχευμένοι ασθενείς	Δεν παρατηρήθηκε διαφορά στην επίπτωση υπερλιπιδαιμίας μεταξύ των γονοτύπων της ApoE
104	45 μεταμοσχευμένοι ασθενείς	Οι ασθενείς με το αλληλίο ε4 είχαν αυξημένα επίπεδα T-CHOL σε σύγκριση με τους ασθενείς με το αλληλίο ε3. Δεν παρατηρήθηκε διαφορά στην ανταπόκριση στη θεραπεία με σεριβαστατίνη
105	118 μεταμοσχευμένοι ασθενείς	Οι ασθενείς που είχαν το αλληλίο ε4 είχαν αυξημένα επίπεδα T-CHOL, TRG και ApoB σε σύγκριση με τους ασθενείς που είχαν τα αλληλία ε2 και ε3

AMK; αιμοκάθαρση, ΣΦΠΚ; Συνεχής φορητή περιτοναϊκή κάθαρση, T-CHOL; ολική χοληστερόλη, TRG; τριγλυκερίδια, HDL-C; HDL χοληστερόλη, LDL-C; LDL χοληστερόλη, ApoB; αποπρωτεΐνη Β, Lp(a); λιποπρωτεΐνη (α)

4.4. ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΙ ΤΗΣ ΑΡΟΕ ΚΑΙ ΚΑΡΔΙΑΓΓΕΙΑΚΗ ΝΟΣΟΣ ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ΝΕΦΡΙΚΗ ΑΝΕΠΑΡΚΕΙΑ

Μονολότι το αλληλίο ε4 συσχετίζεται με ένα πιο αθηρογόνο λιπιδαιμικό προφίλ σε ασθενείς με ΤΣΧΝΑ (βλέπε κεφάλαιο 4.3), υπάρχει αρκετή διχογνωμία στη βιβλιογραφία για την πιθανή συσχέτιση μεταξύ της ApoE4 και της αθηρωματικής αγγειακής νόσου σε αυτούς τους ασθενείς. Έτσι, σε δύο μελέτες με σχετικά μεγάλο αριθμό ασθενών δεν βρέθηκε καμία συσχέτιση μεταξύ των πολυμορφισμών της ApoE και της αθηρωματικής νόσου σε αιμοκαθαιρόμενους ασθενείς^{84,90}.

Ωστόσο, παρατηρήθηκε μια αυξημένη επίπτωση του αλληλίου ε4 σε ένα μικρό αριθμό ασθενών που υποβάλλονταν σε CAPD και είχαν καρδιαγγειακή νόσο⁸⁶. Επιπρόσθετα, παρατηρήθηκε μία αυξημένη συχνότητα του αλληλίου ε4 σε αιμοκαθαιρόμενους ασθενείς με αυξημένο πάχος μέσου-έσω χιτώνα των καρωτίδων¹⁰⁶, ενώ το ίδιο αλληλίο ήταν ισχυρός παράγοντας κινδύνου για στεφανιαία νόσο και γενικευμένη αθηρωμάτωση σε μεταμοσχευμένους ασθενείς, παρά την έλλειψη συσχέτισής του με την εμφάνιση υπερλιπιδαιμίας σε αυτό τον πληθυσμό¹⁰³. Στη μοναδική προοπτική μελέτη που εξέτασε την επίδραση του πολυμορφισμού της ApoE στην εμφάνιση ισχαιμικών αγγειακών εγκεφαλικών επεισοδίων συμπεριλήφθησαν 157 ασθενείς Κινεζικής καταγωγής (119 σε AMK και 38 σε ΣΦΠΚ). Η μελέτη έδειξε ότι μετά από 2 έτη παρακολούθησης η επίπτωση αυτών των επεισοδίων ήταν 36.8% στους ασθενείς που είχαν το αλληλίο ε4 και 5.6% στους ασθενείς που δεν είχαν το αλληλίο ε4 ($p < 0.05$)¹⁰⁷. Τέλος, μία άλλη μελέτη έδειξε ότι μόνο όταν το αλληλίο ε4 συνδυαστεί με τον πολυμορφισμό του ιντρονίου 4 ή τον πολυμορφισμό T⁻⁷⁸⁶→C του γονιδίου της συνθετάσης του μονοξειδίου του αζώτου υπάρχει συσχέτιση με τον κίνδυνο εμφάνισης καρωτιδικής αθηρωματικής νόσου σε αιμοκαθαιρόμενους ασθενείς¹⁰⁸.

4.5. ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΙΣ ΤΗΣ ΑΡΟΕ ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ΝΕΦΡΙΚΑ ΝΟΣΗΜΑΤΑ

Υπάρχουν ελάχιστα δεδομένα για τις συγκεντρώσεις της ApoE σε ασθενείς με νεφρικά νοσήματα. Από τα υπάρχοντα στοιχεία φαίνεται ότι τα επίπεδα της ApoE είναι



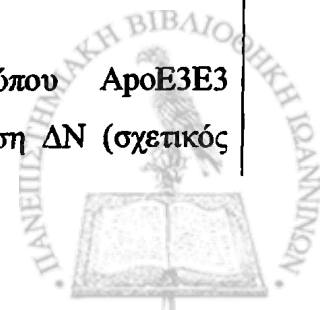
αυξημένα σε αυτούς τους ασθενείς και ότι αυτή η αύξηση αποτελεί ένα πρόσθετο χαρακτηριστικό της ουραιμικής δυσλιπιδαιμίας⁶. Ωστόσο, και παρά την αποδεδειγμένη επίδραση των συγκεντρώσεων της ApoE στο μεταβολισμό των λιποπρωτεϊνών στο γενικό πληθυσμό (βλέπε κεφάλαιο 3.8.1), καμία παρόμοια μελέτη δεν υπάρχει σε ασθενείς με νεφρική ανεπάρκεια.

4.6. ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΙ ΤΗΣ APOE ΚΑΙ ΔΙΑΒΗΤΙΚΗ ΝΕΦΡΟΠΑΘΕΙΑ

Η διαβητική νεφροπάθεια (ΔΝ) αποτελεί την κύρια αιτία νοσηρότητας και θνησιμότητας σε ασθενείς με σακχαρώδη διαβήτη (ΣΔ) τύπου I ή II¹⁰⁹. Επιπρόσθετα, η διαβητική νεφροπάθεια αποτελεί τη συχνότερη αιτία τελικού σταδίου χρόνιας νεφρικής ανεπάρκειας στις αναπτυγμένες χώρες¹¹⁰. Αν και έχουν αναγνωρισθεί πολλοί παράγοντες κινδύνου για την εμφάνιση της διαβητικής νεφροπάθειας (υπέρταση, δυσλιπιδαιμία, υπεργλυκαμία κ.τ.λ), εντούτοις φαίνεται ότι υπάρχει μία ισχυρή γενετική προδιάθεση για την εμφάνιση αυτής της επιπλοκής¹¹¹. Για αυτό το λόγο έχει μελετηθεί αναλυτικά η πιθανή επίδραση των πολυμορφισμών της ApoE στην εμφάνιση και την εξέλιξη της νεφροπάθειας ασθενών με σακχαρώδη διαβήτη τύπου I ή II. Οι μελέτες αυτές συνοψίζονται στον Πίνακα 5.

Πίνακας 5. Σύνοψη των μελετών για την επίδραση των πολυμορφισμών της ApoE στην εμφάνιση και εξέλιξη της διαβητικής νεφροπάθειας (ΔΝ)

Βιβλιογραφική αναφορά	Πληθυσμός της μελέτης	Αποτελέσματα
I. ΣΔ τύπου I		
112	223 Καυκάσιοι ασθενείς	Το αλληλίο ε2 προδιαθέτει για την εμφάνιση ΔΝ (σχετικός κίνδυνος 3.1)
113	252 Καυκάσιοι ασθενείς	Το αλληλίο ε2 προδιαθέτει για την εμφάνιση ΔΝ (σχετικός κίνδυνος 4.3)
114	162 Γερμανοί ασθενείς	Το αλληλίο ε2 συσχετίζεται με μειωμένη κάθαρση κρεατινίνης και αυξημένη αλβουμινουρία
115	56 Καυκάσιοι ασθενείς	Η απουσία του γονοτύπου ApoE3E3 προδιαθέτει για την εμφάνιση ΔΝ (σχετικός



116,117,118,119	> 1,000 Καυκάσιοι ασθενείς	κίνδυνος 7.2) Καμία συσχέτιση μεταξύ των πολυμορφισμών της ApoE και της εμφάνισης ΔN
II. ΣΔ τύπου II		
120	158 Γιαπωνέζοι ασθενείς	Το αλληλίο ε2 είναι ισχυρός προδιαθεσικός παράγοντας για την εμφάνιση ΔN (σχετικός κίνδυνος 10.1), ενώ το αλληλίο ε4 προστατεύει από την εμφάνιση ΔN (σχετικός κίνδυνος 0.129)
121	214 Ταϊβανέζοι ασθενείς	Το αλληλίο ε2 προδιαθέτει για την εμφάνιση ΔN
122	146 Γιαπωνέζοι ασθενείς	Το αλληλίο ε2 είναι συχνότερο σε ασθενείς με ΔN και έκπτωση της νεφρικής λειτουργίας
123	167 Κορεάτες ασθενείς	Το αλληλίο ε2 συσχετίζεται με την εμφάνιση μακρολευκωματουρίας (σχετικός κίνδυνος 3.46)
124	429 Γιαπωνέζοι ασθενείς	Το αλληλίο ε2 είναι προγνωστικός παράγοντας κινδύνου για την εμφάνιση, αλλά και την εξέλιξη της ΔN
125	134 Φιλανδοί ασθενείς	Η απουσία του αλληλίου ε2 αυξάνει τον κίνδυνο εμφάνισης ΔN (σχετικός κίνδυνος 2.0)
126	178 Γιαπωνέζοι ασθενείς	Το αλληλίο ε4 μειώνει τον κίνδυνο εξέλιξης της ΔN
127	84 Καυκάσιοι ασθενείς	Το αλληλίο ε4 επιταχύνει το ρυθμό μείωσης της σπειραματικής διήθησης σε ασθενείς με προϊούσα ΔN

Από την παραπάνω ανασκόπηση προκύπτει ότι στις περισσότερες μελέτες το αλληλόμορφο γονίδιο ε2 πιθανά αποτελεί ανεξάρτητο προγνωστικό παράγοντα κινδύνου για την εμφάνιση ή/και την εξέλιξη της διαβητικής νεφροπάθειας. Οι λόγοι για αυτή τη συσχέτιση δεν είναι γνωστοί. Η παρουσία του αλληλίου ε2 έχει ως αποτέλεσμα την

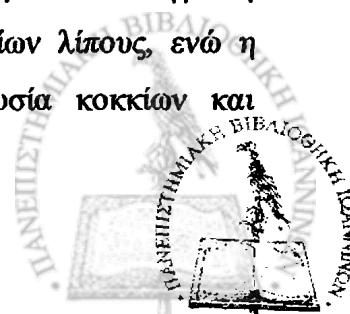


αύξηση των συγκεντρώσεων των πλούσιων σε τριγλυκερίδια λιποπρωτεϊνικών καταλοίπων και η παρουσία αυτών των καταλοίπων διεγείρει τη συσσώρευση εστέρων χοληστερόλης στα μεσαγγειακά κύτταρα του νεφρού¹²⁰. Επιπρόσθετα, η ισομορφή ApoE2 είναι λιγότερο αποτελεσματική από τις άλλες δύο ισομορφές όσον αφορά την αναστολή της υπερπλασίας των μεσαγγειακών κυττάρων που προκαλείται από διάφορα ερεθίσματα¹²⁸. Άλλες μελέτες έδειξαν ότι το αλληλίο ε4 προστατεύει από την εμφάνιση της διαβητικής νεφροπάθειας¹²⁶. Οι πιθανοί υποκείμενοι μηχανισμοί της προστατευτικής δράσης του αλληλίου ε4 είναι: α) η αυξημένη κάθαρση των VLDL και των λιποπρωτεϊνικών καταλοίπων σε σύγκριση με το αλληλίο ε2, β) η τοπική αυτοκρινική προστασία στο μικροπεριβάλλον του νεφρού, γ) η πιθανότητα να βρίσκεται σε γενετική σύνδεση (linkage disequilibrium) με κάποιο άλλο νεφροπροστατευτικό γονίδιο. Τέλος, δεν είναι γνωστοί οι λόγοι για τα αντικρουόμενα αποτελέσματα των μελετών, αλλά μπορεί να συσχετίζονται με την καταγωγή του πληθυσμού που μελετήθηκε, το διαφορετικό περιβάλλον του κάθε πληθυσμού, τα διαφορετικά κριτήρια για τον ορισμό και τη σταδιοποίηση της διαβητικής νεφροπάθειας ή τις διαφορετικές παραμέτρους που χρησιμοποιήθηκαν για την παρακολούθηση της εξέλιξης της διαβητικής νεφροπάθειας.

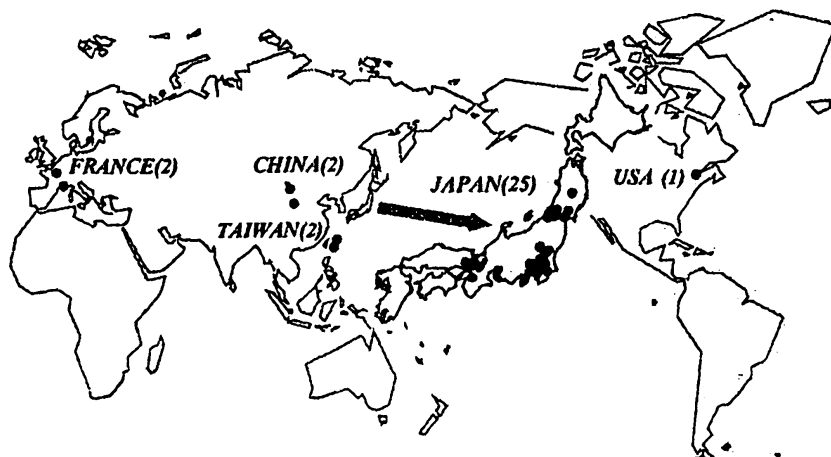
4.7. ΛΙΠΟΠΡΩΤΕΪΝΙΚΗ ΣΠΕΙΡΑΜΑΤΟΠΑΘΕΙΑ

Εναπόθεση λιπιδίων στο νεφρό μπορεί να παρατηρηθεί στα πλαίσια κληρονομικών διαταραχών του μεταβολισμού των λιπιδίων (νόσος του Fabry, νόσος Fish-Eye και νόσος του von Gierke)¹²⁹, νεφρωσικού συνδρόμου¹²⁹ ή στα πλαίσια της υπερλιποπρωτεϊναιμίας τύπου III, όπως έχει ήδη συζητηθεί (βλέπε κεφάλαιο 4.3). Αντίθετα, η λιποπρωτεϊνική σπειραματοπάθεια (Lipoprotein Glomerulopathy, LPG) είναι μια σπάνια νόσος με μοναδικά χαρακτηριστικά, που περιγράφηκε μόλις πρόσφατα στη βιβλιογραφία^{130,131,132,133}. Ως σήμερα έχουν περιγραφεί περίπου 27 περιστατικά, 25 Ασιατικής καταγωγής και μόνο 2 Καυκάσιας καταγωγής (Σχήμα 16)¹³⁴.

Το βασικό ιστολογικό χαρακτηριστικό αυτής της διαταραχής είναι η παρουσία λιποπρωτεϊνικών θρόμβων μέσα στον αυλό των πολύ διατεταμένων σπειραμάτων (Εικόνα 2)¹³⁵. Επιπρόσθετα, στα προχωρημένα στάδια της νόσου μπορεί να παρατηρηθεί εστιακή σκλήρυνση και περισπειραματική ίνωση, ενώ σπάνια ανευρίσκονται αφρώδη κύτταρα¹³⁶. Η χρώση Sudan αποκαλύπτει τη παρουσία σταγονιδίων λίπους, ενώ η μελέτη με το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο αναδεικνύει τη παρουσία κοκκίων και



κυστιδίων, τα οποία σχηματίζουν δομές που θυμίζουν δακτυλικά αποτυπώματα (Εικόνα 3).



Σχήμα 16. Γεωγραφική κατανομή των περιστατικών λιποπρωτεϊνικής σπειραματοπάθειας



Εικόνα 2. Μεγάλες διατάσεις των τριχοειδών του σπειράματος που περιέχουν λιποπρωτεϊνικούς θρόμβους (εικόνα απλού μικροσκοπίου, PAS X 200)



Εικόνα 3. Μελέτη με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο (X 3.000) της βιοψίας της εικόνας 2.

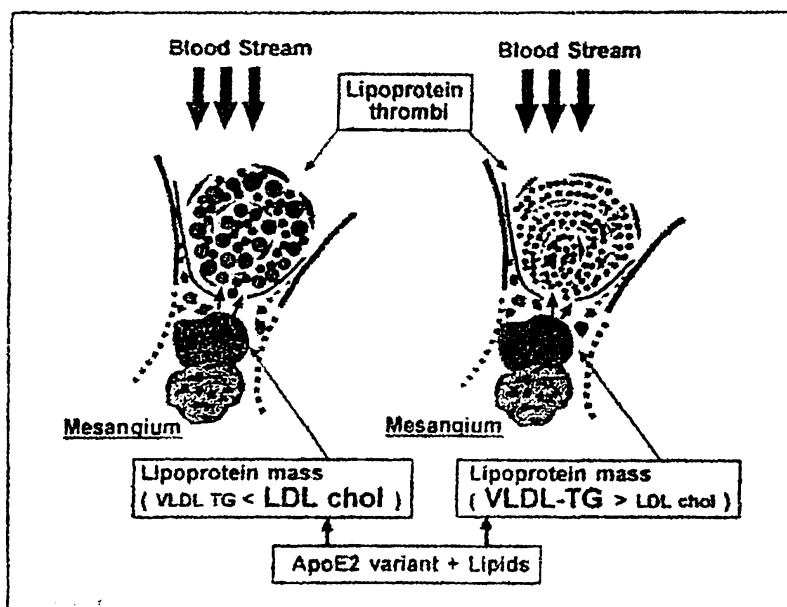
Τα διατεταμένα τριχοειδή αποφράσσονται από πολυάριθμα κοκκία λίπους και συγκεντρικά τοποθετημένα κυστίδια

Οι ασθενείς με λιποπρωτεϊνική σπειραματοπάθεια που έχουν αναφερθεί ήταν ηλικίας 4-69 ετών, ενώ οι άνδρες υπερτερούν σε σύγκριση με τις γυναίκες (αναλογία 2:1). Οι συνήθεις κλινικές εκδηλώσεις της νόσου είναι η εμφάνιση νεφρωσικού τύπου πρωτεϊνουρίας και η εγκατάσταση νεφρικής ανεπάρκειας (1-27 έτη μετά την εμφάνιση της νόσου). Σε δύο περιπτώσεις η νόσος συνυπήρχε με ψωρίαση¹³⁷. Επιπρόσθετα, αυτοί οι ασθενείς εμφανίζουν ένα χαρακτηριστικό λιπιδαιμικό προφίλ με αύξηση των επιπέδων των ενδιάμεσης πυκνότητας λιποπρωτεϊνών και διπλασιασμό της συγκέντρωσης της ApoE στον ορό¹³⁸.

Γενετικές αναλύσεις στους ασθενείς με λιποπρωτεϊνική σπειραματοπάθεια έδειξαν την παρουσία σπάνιων μεταλλάξεων της ApoE: ApoE2 Sendai (Arg¹⁴⁵→Pro)¹³⁹, ApoE Kyoto (Arg²⁵→Cys)¹⁴⁰, ApoE Tokyo (απάλειψη των Leu, Arg και Lys στα κωδόνια 141-143)¹⁴¹, ApoE1 (Gln 156-Gly 173→0)¹⁴² και ApoE Maebashi¹⁴³. Επίσης, ο γονότυπος E2E2 και η υπερλιποπρωτεϊναιμία τύπου III μπορούν να οδηγήσουν σε μία σπειραματοπάθεια που μοιάζει με τη λιποπρωτεϊνική σπειραματοπάθεια (βλέπε κεφάλαιο 4.3).



Για την ApoE2 Sendai υπάρχουν πειραματικές αποδείξεις ότι αυτή η μετάλλαξη της ApoE αποτελεί αίτιο της λιποπρωτεϊνικής σπειραματοπάθειας. Η είσοδος της ApoE2 Sendai διαμέσου ιού σε υπερχοληστερολαιμικά γενετικά τροποποιημένα ποντίκια που δεν παρήγαγαν ApoE είχε ως αποτέλεσμα τη μερική διόρθωση της υπερχοληστερολαιμίας, αλλά και τη σημαντική αύξηση των τριγλυκεριδίων του ορού¹⁴⁴. Η ιστολογική εξέταση των νεφρών αυτών των πειραματοζώων έδειξε αλλοιώσεις χαρακτηριστικές της λιποπρωτεϊνικής σπειραματοπάθειας. Η ApoE2 Sendai έχει ελαττωμένη ικανότητα σύνδεσης με τον LDL υποδοχέα¹⁴⁵, ενώ η ApoE Kyoto έχει αυξημένη ικανότητα σύνδεσης με τα ενδοθηλιακά κύτταρα¹⁴⁶. Η ανώμαλη δομή και οι ιδιότητες αυτών των ισομορφών της ApoE πιθανά οδηγούν στο σχηματισμό των εναποθέσεων που παρατηρούνται στα σπειράματα. Εναλλακτικά, αυτές οι ισομορφές αλληλεπιδρούν με κυτταρικούς υποδοχείς και ουσίες του διάμεσου ιστού και έτσι προκαλούν την καθήλωση των λιποπρωτεϊνών¹³⁴ (Σχήμα 17).



Σχήμα 17. Παθογένεια του σχηματισμού λιποπρωτεϊνικών θρόμβων στη λιποπρωτεϊνική σπειραματοπάθεια

Τέλος, έχουν προταθεί διάφορα θεραπευτικά σχήματα (υπολιπιδαιμικά φάρμακα, LDL αφαίρεση) για την αντιμετώπιση της λιποπρωτεϊνικής σπειραματοπάθειας, αλλά τα περισσότερα ήταν χωρίς επιτυχία. Σε τρεις ασθενείς έχει επιχειρηθεί μεταμόσχευση νεφρού, αλλά ήταν χωρίς επιτυχία εξαιτίας υποτροπής της νόσου¹³⁶. Πρόσφατα,



εντούτοις, έχουν περιγραφεί δύο περιπτώσεις ύφεσης της νόσου με τη χορήγηση μπεζαφιμπράτης¹⁴⁷ ή συνδυασμού υπολιπιδαιμικών φαρμάκων¹⁴⁸.

4.8. ΑΡΟΕ ΚΑΙ ΑΛΛΕΣ ΠΤΥΧΕΣ ΤΩΝ ΝΕΦΡΙΚΩΝ ΝΟΣΗΜΑΤΩΝ

4.8.1. ΑροΕ και άλλες νεφροπάθειες

1) Η ΑροΕ2 έχει συσχετισθεί με τη βαρύτητα της ιστολογικής βλάβης σε ασθενείς με IgA νεφροπάθεια⁸⁸.

2) Το αλλήλιο ε2 και ο γονότυπος E2E3 παρατηρήθηκαν με μεγαλύτερη συχνότητα σε παιδιά με νεφρωσικό σύνδρομο που ήταν ανθεκτικό στη θεραπεία με κορτικοστεροειδή σε σύγκριση με παιδιά με νεφρωσικό σύνδρομο που ανταποκρίθηκε στην ίδια θεραπεία, αλλά και με τους υγιείς μάρτυρες¹⁴⁹.

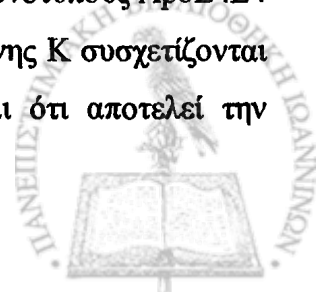
3) Ο γονότυπος της ΑροΕ δεν φαίνεται να επηρεάζει τον κίνδυνο απόρριψης του μοσχεύματος σε ασθενείς που έχουν υποβληθεί σε μεταμόσχευση νεφρού¹⁰².

4) Το αλλήλιο ε2 ήταν συχνότερο σε ασθενείς με σπειραματονεφρίτιδα που συνοδεύονταν από πρωτεϊνουρία, ενώ η επίπτωση του νεφρωσικού συνδρόμου ήταν υψηλότερη στους ασθενείς με πρωτεϊνουρική σπειραματονεφρίτιδα που είχαν το αλλήλιο ε2¹⁰⁰.

5) Αντίθετα, το αλλήλιο ε4 φαίνεται ότι προδιαθέτει στην εμφάνιση νεφρωσικού συνδρόμου σε παιδιά και συσχετίζεται με τη συχνότητα των υποτροπών του⁹³.

4.8.2. ΑροΕ και οστικά κατάγματα σε ασθενείς που υποβάλλονται σε αιμοκάθαρση

Το αλλήλιο ε4 έχει συσχετισθεί με ελαττωμένη οστική πυκνότητα και αυξημένο κίνδυνο καταγμάτων στο γενικό πληθυσμό^{150,151}. Επιπρόσθετα, σε μία μελέτη 219 ασθενών που υποβάλλονταν σε αιμοκάθαρση οι γονότυποι ΑροΕ4Ε4 και ΑροΕ4Ε3 ήταν σημαντικά συχνότεροι σε ασθενείς που είχαν ιστορικό οστικών καταγμάτων σε σύγκριση με τους γονότυπους ΑροΕ2Ε3 και ΑροΕ2Ε2 (44% vs 16%, $p < 0.005$, σχετικός κίνδυνος 3.7)¹⁵². Ένας πιθανός υποκείμενος μηχανισμός είναι τα χαμηλότερα επίπεδα της βιταμίνης Κ στον ορό που παρατηρούνται σε ασθενείς με τους γονότυπους ΑροΕ4Ε4 και ΑροΕ4Ε3, δεδομένου ότι οι χαμηλές συγκεντρώσεις της βιταμίνης Κ συσχετίζονται με αυξημένη επίπτωση καταγμάτων¹⁵³. Έτσι, η ΑροΕ4 φαίνεται ότι αποτελεί την



εξήγηση για τη συσχέτιση που υπάρχει μεταξύ αθηροσκλήρυνσης, αυξημένων επιπέδων LDL χοληστερόλης και μειωμένης οστικής πυκνότητας σε αιμοκαθαιρόμενους ασθενείς^{154,155}.

4.8.3. ApoE και αμυλοείδωση που συσχετίζεται με την εξωνεφρική κάθαρση

Η αμυλοείδωση είναι μια σοβαρή επιπλοκή που παρατηρείται σε ασθενείς που βρίσκονται για μεγάλο χρονικό διάστημα σε θεραπεία με εξωνεφρική κάθαρση. Η παρουσία του αλληλίου ε2 μειώνει την πιθανότητα εμφάνισης αμυλοείδωσης σε αυτούς τους ασθενείς¹⁵⁶.

4.8.4. ApoE και νεφρική λειτουργία

1) Το αλληλίο ε2 συσχετίζεται αρνητικά με την κάθαρση της κρεατινίνης σε ασθενείς με σακχαρώδη διαβήτη τύπου II¹¹⁴.

2) Το αλληλίο ε4 συσχετίζεται με υψηλότερη κάθαρση κρεατινίνης σε ασθενείς που έχουν υποβληθεί σε μεταμόσχευση νεφρού¹⁰⁴.

3) Το αλληλίο ε4 έχει συσχετισθεί με μικρότερη μετεγχειρητική αύξηση των επιπέδων της κρεατινίνης του ορού σε σύγκριση με τα αλληλία ε3 και ε4 σε στεφανιαίους ασθενείς που υποβλήθηκαν σε εγχείρηση αορτοστεφανιαίας παράκαμψης και οι οποίοι προεγχειρητικά είχαν φυσιολογική νεφρική λειτουργία¹⁵⁷.

Πρέπει να επισημανθεί ότι δεν έχει μελετηθεί η επίδραση των πολυμορφισμών της ApoE στη νεφρική λειτουργία φυσιολογικών ατόμων.

4.8.5. Ο ρόλος της ApoE στο μικροπεριβάλλον του νεφρού

Ένα χρήσιμο μοντέλο για τη μελέτη του ρόλου της ApoE στο νεφρό, καθώς επίσης και για τη μελέτη της αθηρωμάτωσης είναι τα γενετικά τροποποιημένα ποντίκια που δεν παράγουν ApoE (ApoE -/-)^{158,159}. Τα αποτελέσματα των μελετών δείχνουν ότι η ApoE ασκεί σημαντική νεφροπροστατευτική δράση. Πιο συγκεκριμένα, βιοψίες νεφρού από αυτά τα πειραματόζωα έδειξαν υπερπλασία των μεσαγγειακών κυττάρων και αυξημένη παραγωγή μεσοκυττάριας ουσίας, αλλαγές καθοριστικής σημασίας για την εξέλιξη των νεφρικών νοσημάτων, ανεξάρτητα από την παρουσία υπερλιπιδαιμίας^{128,160}. Στις μελέτες αυτές η ApoE αύξησε την παραγωγή ηπαρινοσουλφοπρωτεογλυκανών (HSPG) της μεσοκυττάριας ουσίας και της βασικής μεμβράνης, ενώ είναι γνωστό ότι η απώλεια των



HSPG οδηγεί σε βλάβη του νεφρικού ηθμού¹⁶¹. Επιπρόσθετα, η ApoE σταματά την υπερπλασία των μεσαγγειακών κυττάρων και αυτή η δράση εξαρτάται από την ισομορφή της ApoE: οι ισομορφές E3 και E4 είναι οι πιο αποτελεσματικές, ενώ η ισομορφή E2 είναι λιγότερο δραστική. Πρέπει επιπρόσθετα να σημειωθεί ότι η ισομορφή E2 δεν έχει σημαντική αντι-υπερπλαστική δράση στις λείες μυϊκές ίνες σε αντίθεση με τις άλλες δύο ισομορφές¹⁶². Τέλος, η ApoE εμποδίζει την απόπτωση των μεσαγγειακών κυττάρων που προκαλείται από την οξειδωμένη LDL¹²⁸.

Εκτός από τις δράσεις της στα μεσαγγειακά κύτταρα, η ApoE φαίνεται ότι ασκεί σημαντική προστατευτική δράση και στο επίπεδο των ενδοθηλιακών κυττάρων. Έτσι, μελέτες έδειξαν ότι τα ApoE -/- ποντίκια έχουν μειωμένη νεφρική αιματική ροή σε σύγκριση με τα φυσιολογικά ποντίκια¹⁶³. Επιπρόσθετα, όταν τα ApoE -/- ποντίκια τεθούν σε δίαιτα πλούσια σε χοληστερόλη παρατηρείται ενεργοποίηση των ενδοθηλιακών κυττάρων του σπειράματος, προσκόλληση των μονοκυττάρων του αίματος σε αυτά τα ενδοθηλιακά κύτταρα και τελικά μετατροπή αυτών των μονοκυττάρων σε αφρώδη κύτταρα στο μεσαγγειακό χώρο¹⁶⁴.

Η ApoE συντίθεται στο νεφρό και συγκεντρωμένα στη φλοιώδη μοίρα¹⁶⁵. Οι ανεφρικοί ασθενείς έχουν χαμηλότερα επίπεδα ApoE στον ορό σε σύγκριση με τους ασθενείς με τελικού σταδίου νεφρική ανεπάρκεια, εύρημα που υποδηλώνει ότι η νεφρική παραγωγή ApoE συμβάλλει στα επίπεδα της ApoE του ορού¹⁶⁶. Επιπρόσθετα, υπάρχουν ενδείξεις ότι ο νεφρός συμμετέχει στην απομάκρυνση από το πλάσμα της ελεύθερης ApoE¹⁶⁷. Τέλος, ανοσοϊστοχημικές μελέτες έδειξαν εναπόθεση ApoE στο μεσάγγειο, αλλά και στα πειραματικά κύτταρα σε διάφορες πειραματοπάθειες. Αυτή η εναπόθεση γίνεται με τη μεσολάβηση υποδοχέων και μπορεί να συνδυάζεται με τις αλλοιώσεις που παρατηρούνται στο νεφρικό παρέγχυμα^{168,169,170}.

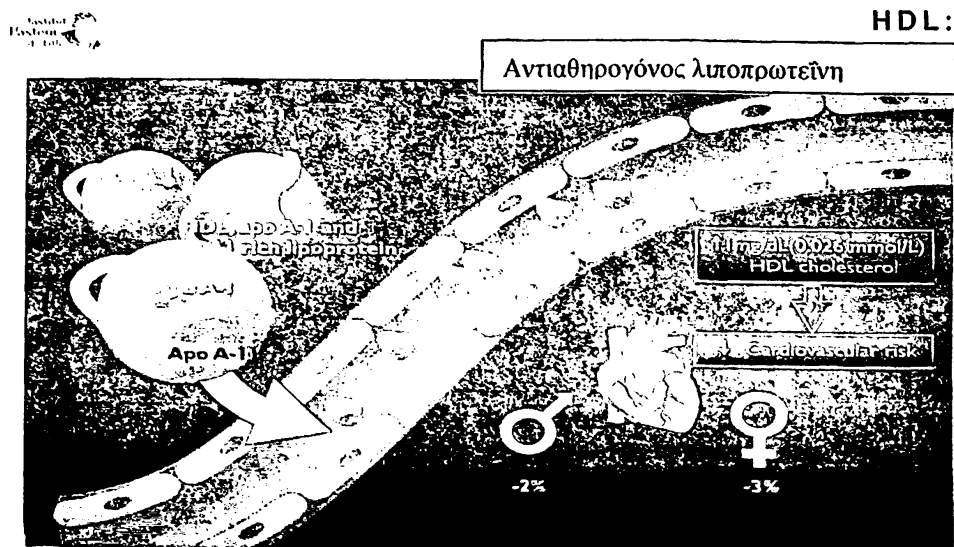


ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5^ο

ΠΑΡΑΘΕΩΝΑΣΗ (PON1)

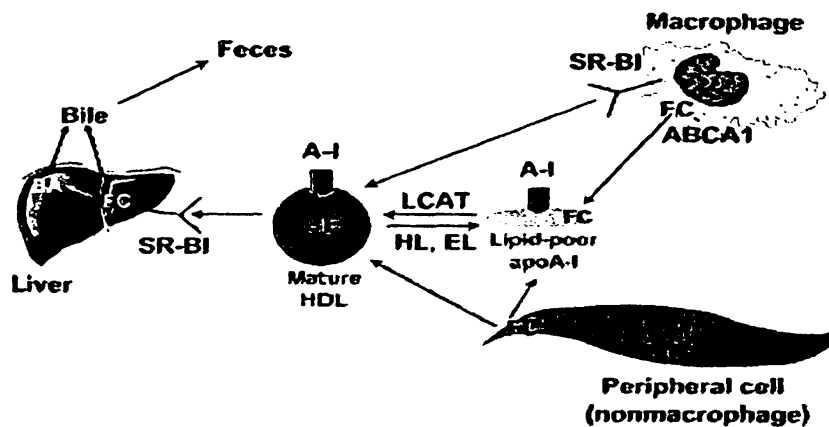
5.1. Η ΑΘΗΡΟΠΡΟΣΤΑΤΕΥΤΙΚΗ ΔΡΑΣΗ ΤΗΣ HDL

Είναι γνωστό ότι η HDL ασκεί σημαντική αθηροπροστατευτική δράση (Σχήμα 18)^{171,172}.



Σχήμα 18. Η αντιαθηρογόνος δράση της HDL

Αυτή η δράση ασκείται κυρίως διαμέσου του μηχανισμού της ανάστροφης μεταφοράς χοληστερόλης από τους περιφερικούς ιστούς στο ήπαρ (Σχήμα 19)^{173,174}.



Σχήμα 19. Μεταβολισμός της HDL και οδός της ανάστροφης μεταφοράς χοληστερόλης

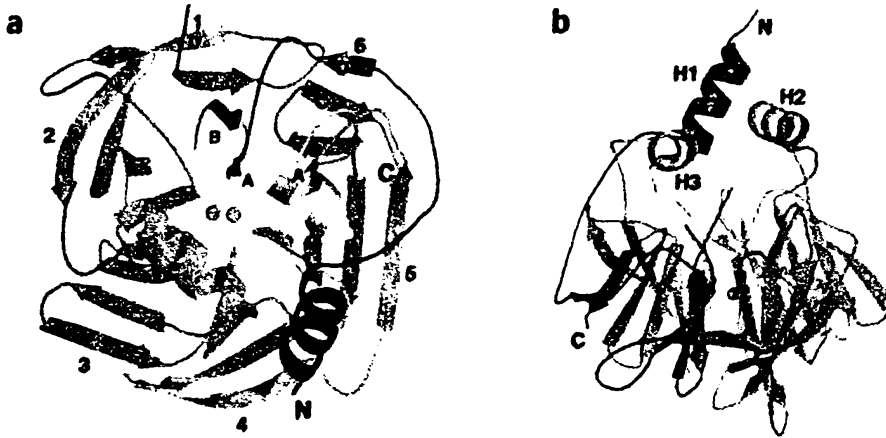


Επιπρόσθετα, υπάρχουν βάσιμες ενδείξεις ότι η HDL έχει σημαντικές αντιφλεγμονώδεις και αντιοξειδωτικές δράσεις¹⁷⁵. Έτσι, μελέτες έδειξαν ότι η HDL προστατεύει την LDL από την οξείδωση^{176,177,178,179}, μία πολύ σημαντική ιδιότητα, αφού είναι γνωστό ότι η οξείδωση της LDL διαδραματίζει ιδιαίτερα σημαντικό ρόλο στη διαδικασία του σχηματισμού της αθηρωματικής πλάκας^{180,181}. Οι αντιοξειδωτικές ιδιότητες της HDL οφείλονται κυρίως στα ένζυμα που βρίσκονται συνδεδεμένα με τα σωματίδια της HDL¹⁸². Τα κυριότερα ένζυμα των HDL που συμβάλλουν στις αντιοξειδωτικές της ιδιότητες είναι η παραοξονάση (PON1), η PAF-ακετυλοϋδρολάση της HDL (HDL-PAF AH) και η λεκιθινο-χοληστερολ-ακυλ-τρανσφεράση (LCAT)¹⁸³. Ο κοινός παρανομαστής της δράσης αυτών των ενζύμων είναι η αποδόμηση των οξειδωμένων φωσφολιπιδίων που δημιουργούνται κατά τη διάρκεια της οξείδωσης των LDL. Επιπρόσθετα, αυτά τα ένζυμα προστατεύουν και την ίδια την HDL από την οξείδωση, αφού είναι γνωστό ότι η οξειδωμένη HDL χάνει πολλές από τις αθηροπροστατευτικές της ιδιότητες και φαίνεται ότι ευοδώνει την αθηρωματική διαδικασία¹⁸⁴.

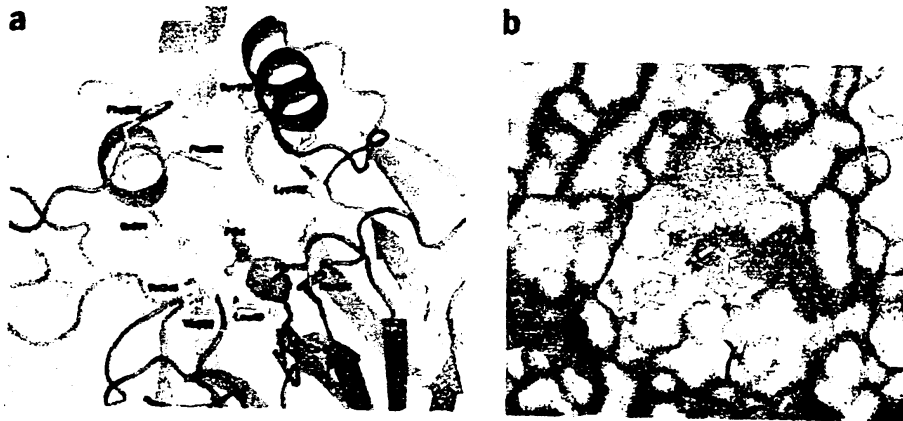
5.2. ΠΑΡΑΟΞΟΝΑΣΗ (PON1) - ΓΕΝΙΚΑ

Η παραοξονάση (PON1) είναι μία εξαρτώμενη από το ασβέστιο (Ca^{2+}) Α-εστεράση (αρυλο-διακυλο-φωσφατάση, E.C.3.1.8.1) μοριακού βάρους 43 Kda που αποτελείται από 354 αμινοξέα¹⁸⁵. Το μόριο της PON1 μπορεί να βρίσκεται σε δύο οξειδωτικές καταστάσεις (μία κατάσταση στην οποία όλες οι κυστεΐνες είναι ελεύθερες και μία κατάσταση στην οποία υπάρχει ένας δισουλφιδικός δεσμός Cys-42-S-Cys-284), περιέχει τρεις υδατανθρακικές αλύσους και στο N-άκρο του υπάρχει μία υδροφοβική περιοχή, με την οποία συνδέεται με την HDL¹⁸⁶. Στα σχήματα 20, 21, 22 φαίνονται η τριτοταγής δομή της PON1, η δομή του ενεργού της κέντρου και η περιοχή σύνδεσης με τις HDL, αντίστοιχα¹⁸⁷.

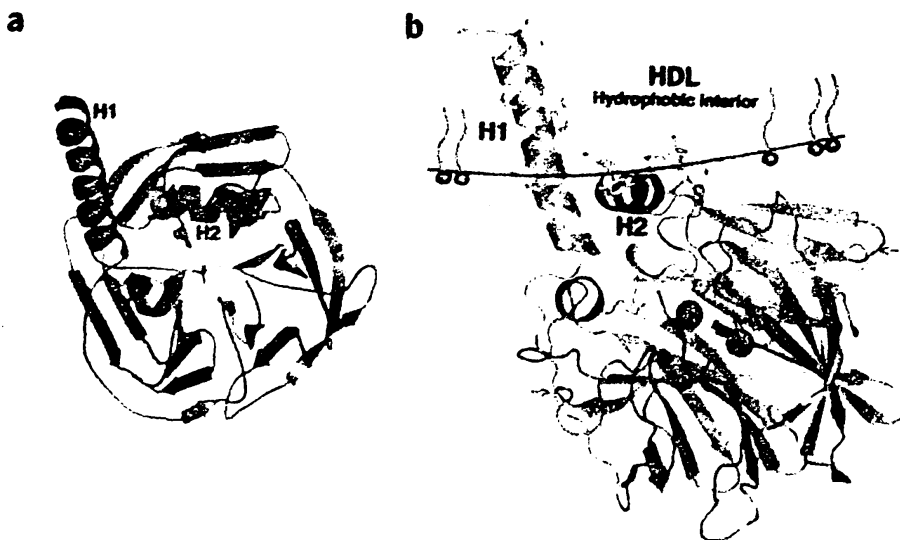




Σχήμα 20. Η δομή της PON1

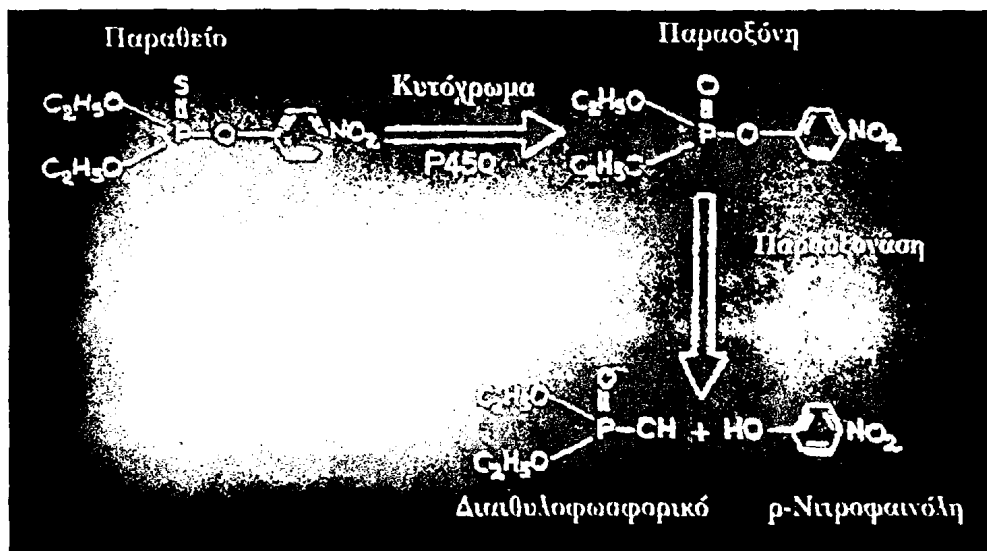


Σχήμα 21. Η δομή του ενεργού κέντρου της PON1



Σχήμα 22. Η σύνδεση της PON1 με την HDL

Η PON1 υδρολύει και αδρανοποιεί οργανοφωσφορικές ενώσεις, όπως το παραοxon του οποίου αποτελεί το δραστικό μεταβολίτη του parathion) (Σχήμα 23).



Σχήμα 23. Υδρολύση του παραοxon από την PON1

Τα οργανοφωσφορικά χρησιμοποιούνται ως εντομοκτόνα, αλλά και ως πολεμικά αέρια και αποτελούν ισχυρά δηλητήρια για τον άνθρωπο και τα ζώα. Επομένως, η PON1 προστατεύει από τη δηλητηρίαση από οργανοφωσφορικά¹⁸⁶. Αντίθετα από τα θηλαστικά, τα ψάρια, τα πουλιά και τα έντομα δεν έχουν PON1 και έτσι αποτελούν εκλεκτικό στόχο των οργανοφωσφορικών εντομοκτόνων.

Το γονίδιο που κωδικοποιεί την PON1 στον άνθρωπο βρίσκεται στο μακρό σκέλος του χρωμοσώματος 7 (μεταξύ q21.3 και q22.1) και ανήκει στην οικογένεια των γονιδίων της παραοξονάσης, η οποία έχει άλλα δύο γνωστά μέλη: την PON2 και την PON3¹⁸⁸. Τα προϊόντα έκφρασης της PON2 και PON3 δεν είναι ακόμη γνωστά, παρά το γεγονός ότι οι πολυμορφισμοί αυτών των γονιδίων αποτελούν ήδη αντικείμενο έρευνας¹⁸⁹. Ωστόσο, είναι γνωστό ότι η PON2 βρίσκεται σε πολλούς ιστούς, ενώ η PON3 βρίσκεται στις HDL. Επιπρόσθετα, τόσο η PON2 όσο και η PON3 έχουν δραστηριότητα λακτονάσης¹⁸⁷. Μεταξύ των θηλαστικών υπάρχει μία κατά 81-91% ομοιότητα σε αυτά τα γονίδια, γεγονός που σημαίνει ότι ο μεταβολικός ρόλος των πρωτεϊνών τις οποίες κωδικοποιούν είναι σημαντικός για τη διατήρηση της ζωής¹⁹⁰.

Η κύρια θέση σύνθεσης της PON1 είναι το ήπαρ, ενώ στον ορό η PON1 συνδέεται σχεδόν αποκλειστικά με την HDL και μάλιστα με το υποκλάσμα εκείνο της HDL που επίσης περιέχει ApoA1 και ApoJ (clusterin)^{191,192,193}.



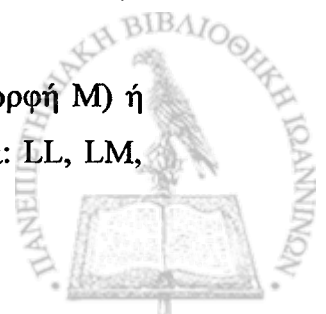
5.3. ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΤΗΣ PON1

Μετά την ανακάλυψη του ρόλου της PON1 στην προστασία από τα οργανοφωσφορικά, η έρευνα στράφηκε προς την κατεύθυνση της εύρεσης της φυσιολογικής λειτουργίας της PON1 στον οργανισμό και της ανακάλυψης των «φυσιολογικών» της υποστρωμάτων. Έτσι, διαπιστώθηκε ότι η PON1 μπορεί να υδρολύει οξειδωμένα φωσφολιπίδια και οξειδωμένους εστέρες χοληστερόλης^{194,195}. Η αντιοξειδωτική αυτή δράση έχει ως αποτέλεσμα η PON1 να προστατεύει την LDL^{196,197} αλλά και την ίδια την HDL¹⁹⁸ από την οξείδωση και συνεπώς να συνεισφέρει σημαντικά στις αθηροπροστατευτικές ιδιότητες της HDL¹⁹⁹ (κεφάλαιο 5.1). Επιπρόσθετα, έχει προταθεί ότι η PON1 έχει και ιδιότητες ακετυλοϋδρολάσης²⁰⁰, αλλά η σχετική της συνεισφορά στην παρατηρούμενη ενεργότητα της ακετυλοϋδρολάσης της HDL παραμένει άγνωστη και αποτελεί αντικείμενο διαφωνίας (κεφάλαιο 6.2.3). Τέλος, η PON1 μπορεί να διασπά το phenylacetate (ιδιότητα αρυλεστεράσης) και το υπεροξειδίου του υδρογόνου (ιδιότητα υπεροξειδάσης)²⁰¹.

5.4. ΓΕΝΕΤΙΚΟΙ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΙ ΤΗΣ PON1

Υπάρχουν δύο κύριοι γενετικοί πολυμορφισμοί της PON1: ένας στη θέση 192 και ένας στη θέση 55 του ενζύμου. Στη θέση 192 μπορεί να υπάρχει γλουταμίνη (ισομορφή Q ή A: 70% συχνότητα στη λευκή φυλή) ή να υπάρχει αργινίνη (ισομορφή R ή B: 30% συχνότητα στη λευκή φυλή). Έτσι, προκύπτουν οι εξής πιθανοί γονότυποι (με σειρά παρατηρούμενης συχνότητας): QQ, QR, RR²⁰². Αυτές οι ισομορφές διαφέρουν μεταξύ τους ως προς την ικανότητά τους να υδρολύουν το paraoxon: η ισομορφή R είναι πιο αποτελεσματική (ταχύτερη) στη διάσπαση του paraoxon από την ισομορφή Q^{203,204}. Με την αλλαγή, όμως, του υποστρώματος διαφοροποιείται η σχετική αποτελεσματικότητα των δύο ισομορφών: αν το υπόστρωμα είναι το phenylacetate δεν υπάρχει διαφορά μεταξύ τους, ενώ αν το υπόστρωμα είναι το diazoxon ή πολεμικά αέρια όπως το sarin ή το soman συμβαίνει ακριβώς το αντίστροφο, δηλαδή η ισομορφή Q είναι πιο αποτελεσματική από την ισομορφή R²⁰⁵. Τέλος, όταν το υπόστρωμα είναι τα οξειδωμένα λιπίδια, τότε η ισομορφή Q είναι αποτελεσματικότερη από την ισομορφή R όσον αφορά τη διάσπασή τους, και επομένως όσον αφορά την προστασία της LDL από την οξείδωση^{206,207,208}.

Στη θέση 55 του μορίου της PON1 μπορεί να υπάρχει μεθειονίνη (ισομορφή M) ή λευκίνη (ισομορφή L) και επομένως υπάρχουν τρεις διαφορετικοί γονότυποι: LL, LM,



MM. Η ισομορφή L είναι πιο συχνή από την ισομορφή M στη λευκή φυλή και συνοδεύεται από μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα όσον αφορά την υδρόλυση του παραοxon²⁰⁹. Αντίθετα, η ισομορφή M συσχετίζεται με πιο αποτελεσματική υδρόλυση των οξειδωμένων λιπιδίων και μεγαλύτερη προστασία της LDL από την οξείδωση σε σύγκριση με την ισομορφή L^{207,210}. Τέλος, ο πολυμορφισμός M55L της PON1 επηρεάζει την ενεργότητα της PON1 όσον αφορά το phenylacetate (ενεργότητα αρυλεστεράσης) [L>M] αλλά και τη συγκέντρωση του ενζύμου^{209,211}. Για το λόγο αυτό και επειδή η ενεργότητα ως προς το phenylacetate δεν επηρεάζεται από τον πολυμορφισμό Q192R, η μέτρηση της ενεργότητας της αρυλεστεράσης θεωρείται ως ένας αξιόπιστος δείκτης της μάζας του ενζύμου.

Επιπρόσθετα, έχουν περιγραφεί αρκετοί πολυμορφισμοί που αφορούν την περιοχή του υποκινητή (promoter region) του γονιδίου της PON1^{212,213,214}. Τέτοιοι πολυμορφισμοί έχουν περιγραφεί στις θέσεις -107/-108, -126, -160/-162, -824/-832 και -907/-909. Από αυτούς τους πολυμορφισμούς, οι -108, -162 και -909 φαίνεται ότι επηρεάζουν την έκφραση του γονιδίου και επομένως και τα επίπεδα της PON1²¹⁵.

Τέλος, σε μία μελέτη σε ένα γενετικά απομονωμένο πληθυσμό της βόρειας Αμερικής (Alberta Hutterites) βρέθηκε ότι ο πολυμορφισμός Q192R της PON1 επηρεάζει τα επίπεδα των λιπιδαιμικών παραμέτρων του ορού: οι ομοζυγώτες QQ είχαν χαμηλότερα επίπεδα τριγλυκεριδίων, LDL χοληστερόλης, ApoB και αθηρωματικού δείκτη σε σύγκριση με τα άτομα που είχαν τους γονοτύπους QR ή RR²¹⁶. Τα ευρήματα όμως αυτά δεν επιβεβαιώθηκαν σε άλλους πληθυσμούς.

5.5. ΑΛΛΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΟΥ ΕΠΗΡΕΑΖΟΥΝ ΤΗΝ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑ ΤΗΣ PON1

1) Η ενεργότητα της PON1 του ορού συμβαδίζει με τις συγκεντρώσεις της HDL χοληστερόλης και της ApoA1. Ωστόσο, η συσχέτιση αυτή δεν είναι πολύ ισχυρή, δεδομένου ότι η PON1 βρίσκεται σε υποκλάσματα και όχι στο σύνολο των HDL²¹⁷. Σε καταστάσεις έλλειψης της HDL (π.χ νόσος της Ταγγέρης), η ενεργότητα της PON1 είναι σημαντικά ελαττωμένη^{218,219}, αλλά αυτό δεν συμβαίνει πάντα στον ίδιο βαθμό²²⁰.

2) Η ενεργότητα της PON1 διαφοροποιείται ανάλογα με την καταγωγή του υπό μελέτη πληθυσμού²²¹. Αυτή η μεταβλητότητα πιθανά συσχετίζεται με περιβαλλοντικούς παράγοντες που μειώνουν την ενεργότητα της PON1, όπως η πλούσια σε χοληστερόλη διαίτα²²², το μαγειρικό λίπος που χρησιμοποιείται²²³, η έκθεση σε οργανοφωσφορικά

(όπως οι στρατιώτες στον πόλεμο του Περσικού κόλπου)^{224,225} και το κάπνισμα^{226,227}. Αντίθετα, η μέτρια κατανάλωση αλκοόλ φαίνεται ότι αυξάνει την ενεργότητα της PON1²²⁸. Τέλος, οι πολυφαινόλες (βρίσκονται στο κρασί, στο τσάι και στους χυμούς των φρούτων) αυξάνουν την ενεργότητα της PON1²²⁹.

3) Έχει αποδειχθεί ότι η ενεργότητα της PON1 μειώνεται κατά τη διάρκεια της αντίδρασης οξειάς φάσης διαμέσου κυρίως μείωσης της ηπατικής της σύνθεσης^{230,231}. Η μεταβολή αυτή οφείλεται πιθανά στις κυτταροκίνες που απελευθερώνονται κατά τη διάρκεια της οξειάς φάσης. Πραγματικά, πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι ο TNF-α και η ιντερλευκίνη-1β καταστέλλουν την έκφραση του γονιδίου της PON1, ενώ η ιντερλευκίνη-6 έχει ακριβώς το αντίθετο αποτέλεσμα²³².

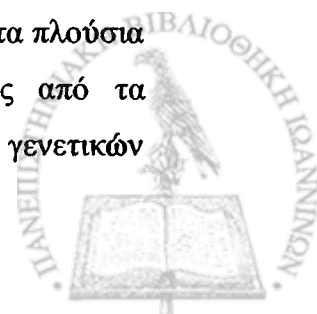
4) Η ενεργότητα της PON1 είναι μειωμένη, ανεξάρτητα πάντα από τους γενετικούς της πολυμορφισμούς, σε ασθενείς με στεφανιαία νόσο^{233,234}, υπερχοληστερολαιμία²³⁵, σε ασθενείς με σακχαρώδη διαβήτη^{236,237,238,239,240}, καθώς και σε γυναίκες με σοβαρή προεκλαμψία²⁴¹. Επιπρόσθετα, η ενεργότητα της PON1 είναι μειωμένη σε ασθενείς με μεταβολικό σύνδρομο²⁴² και σε ασθενείς με υπερθυρεοειδισμό²⁴³. Η θεραπεία του υπερθυρεοειδισμού έχει ως αποτέλεσμα την αποκατάσταση αυτής της χαμηλής ενεργότητας.

5) Από τα υπολιπιδαιμικά φάρμακα²⁴⁴, οι φιμπράτες αυξάνουν την ενεργότητα της PON1^{245,246}, αν και αυτή η αύξηση δεν επιβεβαιώθηκε από άλλες μελέτες²⁴⁷. Τέλος, υπάρχουν ενδείξεις ότι οι στατίνες αυξάνουν την ενεργότητα της PON1²⁴⁸ επάγοντας τη γονιδιακή της έκφραση²⁴⁹. Τέλος, η χορήγηση λεπτίνης μειώνει την ενεργότητα της PON1²⁵⁰.

6) Η οξειδωμένη LDL²⁵¹ και η γλυκοζυλίωση της HDL²⁵² ελαττώνουν την ενεργότητα της PON1.

5.6. PON1 ΚΑΙ ΣΤΕΦΑΝΙΑΙΑ ΝΟΣΟΣ

Η PON1 έχει σημαντική αθηροπροστατευτική δράση εξαιτίας των αντιοξειδωτικών της ιδιοτήτων (κεφάλαιο 5.3). Επιπρόσθετα, η PON1 βρίσκεται στις αθηρωματικές πλάκες παράλληλα με την εξέλιξη της αθηρωμάτωσης²⁵³, στις οποίες η PON1 πιθανά υδρολύει τα οξειδωμένα λιπίδια²⁵⁴. Έτσι, γενετικά τροποποιημένα ποντίκια που δεν εκφράζουν PON1 είναι εξαιρετικά ευαίσθητα στη δηλητηρίαση από οργανοφωσφορικά και επιπλέον αναπτύσσουν επιταχυνόμενη αθηρωμάτωση όταν τεθούν σε δίαιτα πλούσια σε λίπος²⁵⁵. Τέλος, η PON1 αναστέλλει τη βιοσύνθεση χοληστερόλης από τα μακροφάγα²⁵⁶. Σε αυτό το πλαίσιο, έχει μελετηθεί η επίδραση των γενετικών



πολυμορφισμών αλλά και της ενεργότητας της PON1 στον ορό στην εμφάνιση της στεφανιαίας νόσου^{257,258}.

5.6.1. Γενετικοί πολυμορφισμοί της PON1 και στεφανιαία νόσος

Σε αρκετές μελέτες η παρουσία του γονιδίου R του πολυμορφισμού Q192R βρέθηκε ότι αποτελεί ανεξάρτητο παράγοντα κινδύνου για στεφανιαία νόσο σε διαβητικούς και μη ασθενείς^{259,260,261,262,263,264,265,266}. Αντίθετα, άλλες μελέτες δεν επιβεβαίωσαν αυτά τα ευρήματα^{267,268,269,270,271}, ενώ μια πρόσφατη μελέτη έδειξε ότι το γονίδιο R πιθανά προσφέρει ένα πλεονέκτημα επιβίωσης σε σύγκριση με το γονίδιο Q²⁷².

Άλλες μελέτες έδειξαν ότι ο πολυμορφισμός PON1-107T (που έχει ως αποτέλεσμα χαμηλά επίπεδα έκφρασης του γονιδίου της PON1) συσχετίζεται ανεξάρτητα με ισχαιμικά αγγειακά εγκεφαλικά επεισόδια σε νεαρούς ενήλικες και δρα συνεργικά με τον πολυμορφισμό RR^{273,274}, αν και αυτό το εύρημα δεν επιβεβαιώθηκε από άλλες μελέτες²⁷⁵.

Επιπρόσθετα, ο πολυμορφισμός M55L επίσης μπορεί να συσχετίζεται^{276,277,278,279} ή όχι²⁸⁰ με την αθηρωματική νόσο. Μια πρόσφατη νεκροτομική μελέτη σε άνδρες έδειξε ότι ο πολυμορφισμός MM συσχετίζεται με την εμφάνιση πρώιμων αθηρωματικών βλαβών σε μη καπνιστές²⁸¹.

Τέλος, μια πολύ πρόσφατη μεγάλη μετα-ανάλυση 43 μελετών με 11212 στεφανιαίους ασθενείς και 12786 υγιείς μάρτυρες έδειξε ότι το γονίδιο R είναι ασθενής παράγοντας κινδύνου για στεφανιαία νόσο (σχετικός κίνδυνος 1.12), ενώ οι πολυμορφισμοί M55L και T(-107)C της PON1, καθώς και ο πολυμορφισμός S311C της PON2 δεν συσχετίζονταν με την εμφάνιση στεφανιαίας νόσου²⁸².

5.6.2. Ενεργότητα της PON1 στον ορό και στεφανιαία νόσος

Υπάρχουν ενδείξεις ότι η χαμηλή ενεργότητα της PON1 στον ορό είναι παράγοντας κινδύνου για στεφανιαία νόσο, ανεξάρτητα από τους γενετικούς της πολυμορφισμούς^{283,284}. Τέλος, σε μια πρόσφατα δημοσιευμένη προοπτική μελέτη βρέθηκε ότι η χαμηλή ενεργότητα (και όχι η μάζα) της PON1 στον ορό είναι ανεξάρτητος παράγοντας κινδύνου για στεφανιαία συμβάματα σε υψηλού κινδύνου ασθενείς²⁸⁵.



5.7. PON1 ΚΑΙ ΑΛΛΑ ΝΟΣΗΜΑΤΑ

1) Έχει ήδη συζητηθεί η μεταβολή της ενεργότητας της PON1 σε ασθενείς με σακχαρώδη διαβήτη και η συσχέτιση των γενετικών της πολυμορφισμών με τη στεφανιαία νόσο σε αυτούς τους ασθενείς. Επιπρόσθετα, υπάρχουν ενδείξεις ότι η χαμηλή ενεργότητα της PON1 και πιθανά ο πολυμορφισμός LL συσχετίζονται με την εμφάνιση των μικροαγγειακών επιπλοκών του σακχαρώδη διαβήτη και ειδικά με την εμφάνιση της αμφιβληστροειδοπάθειας^{286,287,288,289}. Τέλος, υπάρχουν ενδείξεις ότι ο πολυμορφισμός M55L της PON1 επηρεάζει τη λειτουργία των β-κυττάρων των νησιδίων του παγκρέατος²⁹⁰.

2) PON1 και νευρολογικά νοσήματα. Υπάρχουν αντικρουόμενα αποτελέσματα για τη συσχέτιση μεταξύ της PON1 και της νόσου του Parkinson^{291,292}. Τέλος, πρόσφατα ο συνδυασμός του R και του T-107 πολυμορφισμού της PON1 συσχετίστηκε με την εμφάνιση άνοιας, ειδικά σε ασθενείς που δεν έχουν το αλληλίο ApoE4²⁹³, αλλά και με την εμφάνιση και τη βαρύτητα της αγγώδους νεύρωσης²⁹⁴.

5.8. PON1 ΚΑΙ ΝΕΦΡΙΚΑ ΝΟΣΗΜΑΤΑ

5.8.1. Αντιοξειδωτική ικανότητα της HDL σε ασθενείς με νεφρική ανεπάρκεια

Παρά το γεγονός ότι οι ασθενείς που υποβάλλονται σε εξωνεφρική κάθαρση έχουν μεγαλύτερη επίπτωση αθηρωματικής νόσου, τρεις μελέτες έδειξαν ότι οι HDL ασθενών που υποβάλλονταν σε αιμοκάθαρση^{295,296} και οι HDL ασθενών που υποβάλλονταν σε περιτοναϊκή κάθαρση²⁹⁷ ήταν πιο ανθεκτικές στην *in vitro* οξείδωση από τις HDL φυσιολογικών μαρτύρων και επιπρόσθετα ήταν το ίδιο ικανές στο να προστατεύουν την LDL από την οξείδωση σε σύγκριση πάντα με τις HDL υγιών ατόμων. Αντίθετα, σε μια άλλη μελέτη βρέθηκε ότι η HDL ασθενών που υποβάλλονταν σε αιμοκάθαρση ασκούσε μειωμένη προστατευτική δράση στην οξείδωση των LDL²⁹⁸. Σε κάθε περίπτωση πάντως τα μειωμένα επίπεδα της HDL σε ασθενείς με χρόνια νεφρική ανεπάρκεια (κεφάλαιο 2) πιθανά συνεπάγονται μειωμένη συνολική *in vivo* αντιοξειδωτική ικανότητα.



5.8.2. Ενεργότητα της PON1 σε ασθενείς με χρόνια νεφρική ανεπάρκεια

1) Ασθενείς που υποβάλλονται σε αιμοκάθαρση.

Η ενεργότητα της PON1 είναι μειωμένη στους ασθενείς που υποβάλλονται σε αιμοκάθαρση σε σύγκριση με τους φυσιολογικούς μάρτυρες στο σύνολο σχεδόν των μελετών^{299,300}. Επιπρόσθετα, αυτή η μειωμένη ενεργότητα της PON1 διαπιστώνεται όχι μόνο όταν ως υπόστρωμα προσδιορισμού χρησιμοποιηθεί το παραοxon (ενεργότητα παραοξονάσης), αλλά ακόμη και όταν χρησιμοποιηθεί το phenylacetate (ενεργότητα αρυλεστεράσης)³⁰¹. Αντίθετα, όταν στον προσδιορισμό της PON1 με υπόστρωμα το παραοxon προστεθεί NaCl, τότε η ενεργότητα της PON1 (salt-stimulated paraoxonase activity) μπορεί να είναι αυξημένη στους αιμοκαθαιρόμενους ασθενείς σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου³⁰².

Η μειωμένη ενεργότητα της PON1 σε αυτούς τους ασθενείς θα μπορούσε να οφείλεται στη μείωση της HDL χοληστερόλης, δεδομένου ότι, όπως ήδη έχει αναφερθεί, τα επίπεδα της HDL χοληστερόλης και της ApoA1 επηρεάζουν την ενεργότητα αυτού του ενζύμου (κεφάλαιο 5.5). Έτσι, σε ορισμένες μελέτες ο λόγος της ενεργότητας της PON1(paraoxon)/HDL χοληστερόλη ή της PON1(paraoxon)/ApoA1 δεν ήταν σημαντικά χαμηλότερος στους ασθενείς σε σύγκριση με τους υγιείς μάρτυρες^{301,303}. Επιπρόσθετα, σε μία μελέτη ο λόγος της PON1(phenylacetate)/HDL χοληστερόλη ή PON1(phenylacetate)/ApoA1 βρέθηκε περισσότερο αυξημένος στους ασθενείς σε σύγκριση με τον υγιή πληθυσμό³⁰³. Αντίθετα, στις περισσότερες άλλες μελέτες ο λόγος PON1(paraoxon)/HDL χοληστερόλη ή και PON1(paraoxon)/ApoA1 παρέμενε σημαντικά χαμηλότερος στους αιμοκαθαιρόμενους ασθενείς σε σύγκριση με τα υγιή άτομα^{304,305,306}, αλλά ακόμη και σε σύγκριση με υπερλιπιδαιμικούς ασθενείς, οι οποίοι έχουν ήδη μειωμένη δραστηριότητα της PON1 (βλέπε και κεφάλαιο 5.5)³⁰⁷.

Οι παραπάνω μελέτες έλαβαν υπόψιν τους τα επίπεδα της ολικής HDL χοληστερόλης στη διόρθωση της ενεργότητας της PON1, παρά το γεγονός ότι η PON1 συνδέεται με ένα υποκλάσμα μόνο των HDL. Σε μία σημαντική μελέτη Ιταλοί ερευνητές βρήκαν ότι το 95% της PON1 ενεργότητας της HDL των αιμοκαθαιρόμενων ασθενών βρίσκεται στο υποκλάσμα HDL3, το οποίο όμως είναι μειωμένο σε αυτούς τους ασθενείς. Κατά συνέπεια, όταν διόρθωσαν την PON1 ενεργότητα για τα επίπεδα της HDL3, τότε δεν υπήρχε διαφορά μεταξύ ασθενών και υγιών μαρτύρων³⁰⁸. Έτσι, προτάθηκε ότι τα μειωμένα επίπεδα της HDL3 είναι υπεύθυνα για τη μείωση της ενεργότητας της PON1 στην ουραιμία.



Πρέπει να αναφερθεί ότι διαφορές στους γενετικούς πολυμορφισμούς (Q192R και M55L) μεταξύ των ασθενών και των μαρτύρων θα μπορούσαν να ευθύνονται για τις διαφορές στην ενεργότητα της PON1. Εντούτοις, η χωριστή άνα γονότυπο σύγκριση έδειξε ότι η ενεργότητα της PON1(paraoxon) εξακολουθεί να παραμένει μειωμένη στους ασθενείς σε σύγκριση με τα υγιή άτομα^{303,308,309}.

Μια ομάδα Ιαπώνων ερευνητών μέτρησε τόσο τη μάζα (με ανοσοενζυμικές μεθόδους) όσο και την ενεργότητα της PON1 σε ασθενείς που υποβάλλονταν σε αιμοκάθαρση. Στη μελέτη αυτή βρέθηκε μία κατά 62% μείωση της μάζας του ενζύμου στους ασθενείς σε σύγκριση με τους μάρτυρες, η οποία μείωση παρέμενε και μετά τη διόρθωση για τα επίπεδα της HDL χοληστερόλης ή της ApoA1³¹⁰. Οι ειδικές όμως ενεργότητες (ενεργότητα/μάζα) της PON1(paraoxon) και της PON1(phenylacetate) ήταν αυξημένες στους ασθενείς σε σύγκριση με τα υγιή άτομα.

Τέλος, σε μια προσπάθεια να δοθούν ερμηνείες για την ελάττωση της ενεργότητας της PON1(phenylacetate) στον πληθυσμό των αιμοκαθαιρόμενων ασθενών βρέθηκε ότι η υπερπαραγωγή υποχλωρικού οξέος (HOCl) από τα ενεργοποιημένα ουδετερόφιλα μπορεί να οξειδώνει αμινοξέα (όπως η τρυπτοφάνη) στο ενεργό κέντρο της PON1 που είναι υπεύθυνο για την εκδήλωση αυτής της ενεργότητας²⁹⁶. Επιπρόσθετα, έχει προταθεί ότι η αύξηση των επιπέδων της οξειδωμένης LDL σε αυτό τον πληθυσμό πιθανά συμβάλλει στη μείωση της ενεργότητας της PON1³¹¹.

2) Ασθενείς που υποβάλλονται σε περιτοναϊκή κάθαρση.

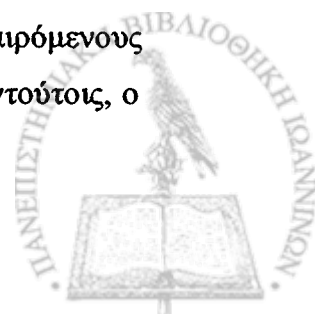
Υπάρχει μία μόνο μελέτη με μικρό αριθμό τέτοιων ασθενών (n=22) που δείχνει μείωση της ενεργότητας της PON1(paraoxon) αλλά όχι και της PON1(phenylacetate) σε σύγκριση με τα φυσιολογικά άτομα³⁰². Εντούτοις, στη μελέτη αυτή δεν προσδιορίστηκαν οι γονότυποι της PON1 ούτε έγινε διόρθωση για τα επίπεδα της HDL χοληστερόλης. Επομένως, δεν υπάρχουν αρκετά δεδομένα για την ενεργότητα της PON1 σε ασθενείς που υποβάλλονται σε ΣΦΠΚ, ενώ δεν έχουν προσδιορισθεί οι γονότυποι της PON1 και η επίδρασή τους στην ενεργότητα του ενζύμου σε αυτό τον πληθυσμό.

3) Ασθενείς με χρόνια νεφρική ανεπάρκεια προτελικού σταδίου.

Στη μοναδική μελέτη που υπάρχει σε αυτό τον πληθυσμό δεν φαίνεται να υπάρχουν διαφορές στις ενεργότητες της PON1 σε σύγκριση με τα φυσιολογικά άτομα³⁰².

4) Ασθενείς που έχουν υποβληθεί σε μεταμόσχευση νεφρού.

Η μείωση της ενεργότητας της PON1 που παρατηρείται στους αιμοκαθαιρόμενους ασθενείς φαίνεται ότι αποκαθίσταται μετά τη μεταμόσχευση νεφρού^{302,304}. Εντούτοις, ο



λόγος PON1(paraoxon)/HDL χοληστερόλη παραμένει μειωμένος στους μεταμοσχευθέντες ασθενείς σε σύγκριση με τα φυσιολογικά άτομα³⁰⁴.

5.8.3. Πολυμορφισμοί της PON1 και νεφρικά νοσήματα

Στις μελέτες στις οποίες προσδιορίστηκαν οι πολυμορφισμοί της PON1 (κεφάλαιο 5.8.2) δεν υπήρχαν διαφορές στη συχνότητα της εμφάνισης αυτών των γονιδίων μεταξύ των ασθενών που υποβάλλονταν σε αιμοκάθαρση και των υγιών μαρτύρων. Η επίδραση, επίσης, αυτών των πολυμορφισμών στην ενεργότητα της PON1 δεν διέφερε από την παρατηρούμενη στο γενικό πληθυσμό (κεφάλαιο 5.4).

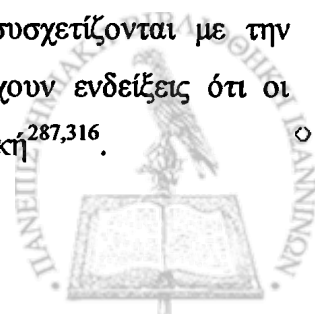
Επιπρόσθετα, οι πολυμορφισμοί της PON1 δεν αποτελούσαν παράγοντα κινδύνου για την εμφάνιση στεφανιαίας νόσου σε ασθενείς που είχαν υποβληθεί σε μεταμόσχευση νεφρού³¹².

Τέλος, ο πολυμορφισμός LL του γονιδίου M55L έχει προταθεί ως παράγοντας κινδύνου για την εμφάνιση και εξέλιξη της εστιακής τμηματικής σπειραματοσκλήρυνσης σε παιδιά Αράβων που μένουν στο Ισραήλ³¹³. Πραγματικά, η επίπτωση του γονότυπου LL σε παιδιά Αραβικής καταγωγής με αυτή τη νόσο ήταν μεγαλύτερη από την αντίστοιχη σε υγιή παιδιά της ίδιας καταγωγής (57.1% vs 28.9%, $p < 0.03$), αλλά και από την επίπτωση του ίδιου γονότυπου σε παιδιά-ασθενείς Εβραϊκής καταγωγής (57.1% vs 26.9%, $p < 0.05$), τα οποία έχουν καλύτερη πρόγνωση παρά την ίδια αντιμετώπιση της νόσου. Αντίθετα, δεν υπήρχαν διαφορές όσον αφορά την επίπτωση του πολυμορφισμού Q192R.

5.8.4. PON1 και διαβητική νεφροπάθεια

Έχει ήδη συζητηθεί η σχέση της PON1 με τις μικροαγγειακές επιπλοκές του σακχαρώδη διαβήτη (κεφάλαιο 5.7). Έτσι, οι ασθενείς με ΣΔ τύπου II και πρωτεϊνουρία είχαν χαμηλότερη ενεργότητα της PON1 από τους διαβητικούς ασθενείς χωρίς πρωτεϊνουρία²⁸⁸. Επιπρόσθετα, οι διαβητικοί ασθενείς που υποβάλλονται σε αιμοκάθαρση είχαν χαμηλότερη ενεργότητα της PON1 σε σύγκριση με τους μη διαβητικούς αιμοκαθαιρόμενους ασθενείς³¹⁴.

Οι γενετικοί πολυμορφισμοί της PON1 δεν φαίνεται να συσχετίζονται με την εμφάνιση της διαβητικής νεφροπάθειας³¹⁵, ενώ αντίθετα υπάρχουν ενδείξεις ότι οι πολυμορφισμοί της PON2 μπορεί να ενέχονται σε αυτή την επιπλοκή^{287,316}.



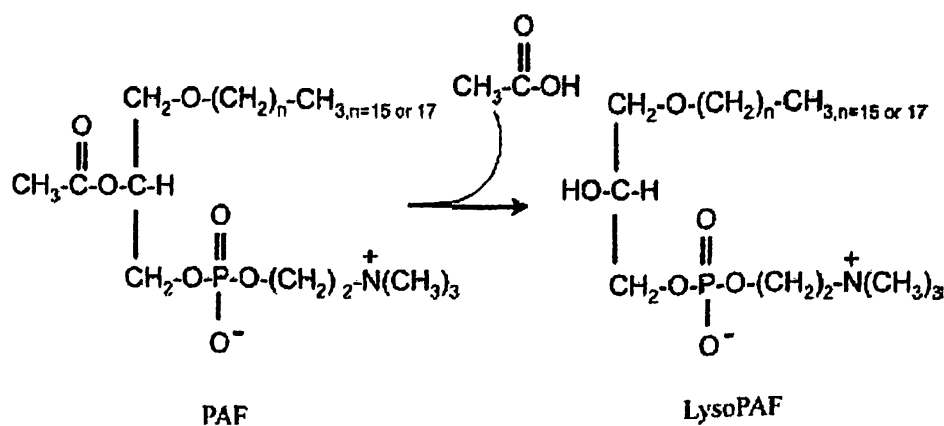
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6^ο

ΑΚΕΤΥΛΟΪΔΡΟΛΑΣΗ ΤΟΥ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗΣ ΤΩΝ ΑΙΜΟΠΕΤΑΛΙΩΝ (PAF-AH)

6.1. ΓΕΝΙΚΑ

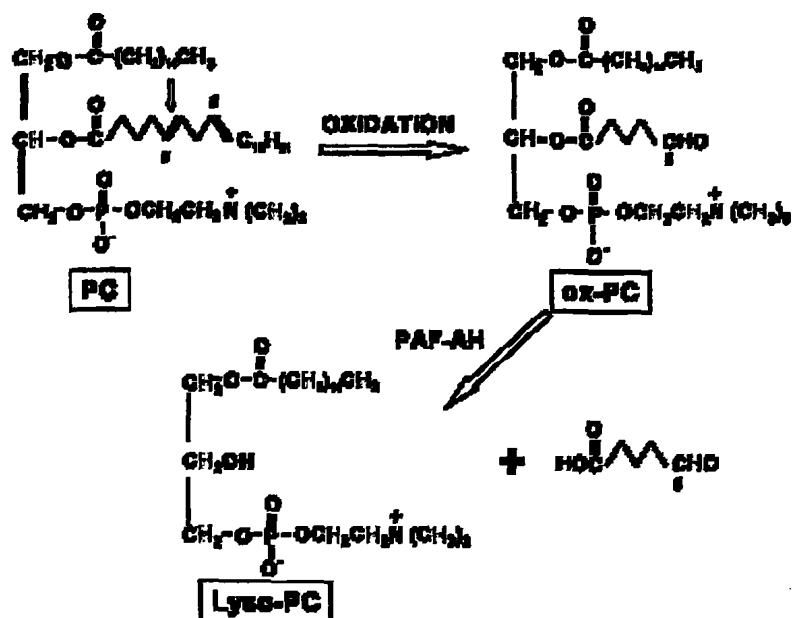
6.1.1. Λειτουργία

Ο όρος PAF-ακετυλοϋδρολάση (PAF-AH) περιγράφει μια οικογένεια ενζύμων τα οποία έχουν την ικανότητα να αποικοδομούν τόσο τον PAF (παράγοντα ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων, platelet-activating factor) (Σχήμα 24) όσο και διάφορα οξειδωμένα φωσφολιπίδια (Σχήμα 25) υδρολύοντας ακετυλομάδες βραχείας αλύσου ($C_n < 6$) στη θέση sn-2 του υποστρώματος ανεξάρτητα από την παρουσία ασβεστίου (Ca^{+2}). Η οικογένεια αυτή περιλαμβάνει διάφορα ενδοκυττάρια ισοένζυμα³¹⁷, καθώς και την PAF-ακετυλοϋδρολάση του πλάσματος³¹⁸. Έκτος από τη δράση του ως φωσφολιπάση A2, η PAF-AH έχει ακόμη δράσεις εστεράσης, φωσφολιπάσης A1 και τρανσακετυλάσης³¹⁹.



Σχήμα 24. Υδρόλυση του PAF από την PAF-AH

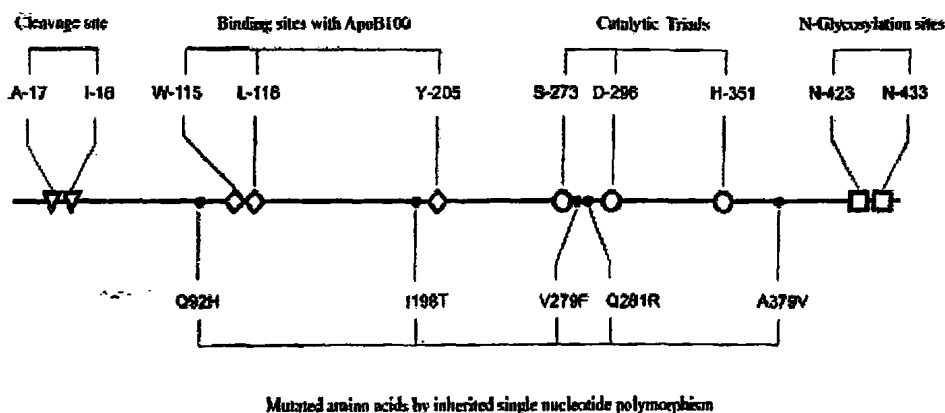




Σχήμα 25. Υδρόλυση των οξειδωμένων φωσφολιπιδίων από την PAF-AH

6.1.2. Δομή της εκκρινόμενης μορφής της PAF-AH (PAF-AH του πλάσματος)

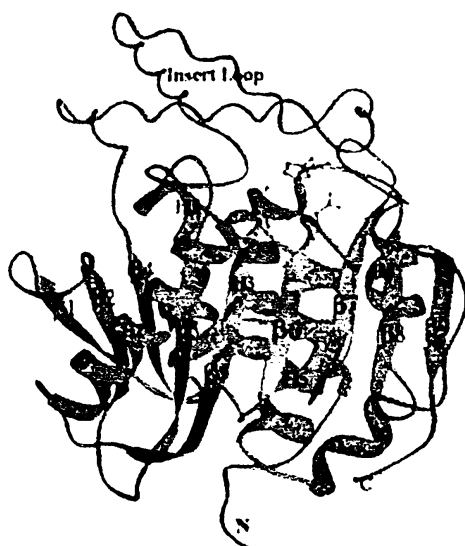
Η PAF-ακετυλοϋδρόλαση του πλάσματος (EC 3.1.1.47) περιγράφηκε για πρώτη φορά το 1980³²⁰, αλλά η δομή του ενζύμου (Σχήματα 26 και 27) προσδιορίστηκε για πρώτη φορά το 1995, οπότε και έγινε δυνατή η κλωνοποίησή του³²¹.



Σχήμα 26. Η δομή της PAF-AH του πλάσματος

Το cDNA της PAF-AH κωδικοποιεί μία πρωτεΐνη μεγέθους 441 αμινοξέων και μοριακού βάρους 45.4 Kda. Το ενεργό κέντρο του ενζύμου αποτελείται από τρία αμινοξέα που συνδέονται μεταξύ τους με δεσμούς υδρογόνου: την Ser-273, το Asp-296 και την His-

351³²². Η δομή του μακρομορίου της PAF-AH συμπληρώνεται με την παρουσία N-γλυκοζυλιώσεων, δηλαδή υδατανθρακικών αλυσίδων που συνδέονται με τις ασπαραγίνες της πολυπεπτιδικής αλυσίδας³²³. Η παρουσία των υδατανθρακικών αλυσίδων δεν είναι απαραίτητη για την έκκριση του ενζύμου από τα μακροφάγα, δεν επηρεάζει την ευαισθησία του στις πρωτεάσες και δεν μεταβάλλει την ενζυμική ενεργότητα. Αντίθετα, μελέτες έδειξαν ότι η γλυκοζυλίωση διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη σύνδεση του ενζύμου με τα λιποπρωτεϊνικά σωματίδια, αφού αναστέλλει τη σύνδεσή του με τις HDL και ευνοεί τη σύνδεσή του με τις λιποπρωτεΐνες που περιέχουν ApoB³²⁴.



Σχήμα 27. Υποθετικό μοντέλο της τριτοταγούς δομής της PAF-AH του πλάσματος

6.1.3. Γονίδιο της PAF-AH και μεταλλάξεις

Το γονίδιο της PAF-AH βρίσκεται στο χρωμόσωμα 6 και είναι οργανωμένο σε 12 εξόνια³²¹. Στον Ιαπωνικό πληθυσμό έχει περιγραφεί μια σημειακή μετάλλαξη του γονιδίου της PAF-AH του πλάσματος, η οποία κληρονομείται με τον αυτοσωμικό υπολειπόμενο χαρακτήρα και οδηγεί, στην ομόζυγη της μορφή, σε πλήρη εξάλειψη της ενζυμικής ενεργότητας του πλάσματος³²⁵. Η μετάλλαξη αυτή συνίσταται σε αντικατάσταση μιας γουανίνης από θυμίνη (G→T) στη θέση 994 του ένατου εξονίου, η οποία στο επίπεδο της πρωτεΐνης μεταφράζεται σε αντικατάσταση μιας βαλίνης από φαινυλαλανίνη στη θέση 279 του ώριμου ενζύμου (Val²⁷⁹→Phe). Αν και αρχικά θεωρήθηκε ότι η μετάλλαξη αυτή



απαντάται αποκλειστικά στον Ιαπωνικό πληθυσμό (στο 27% των Ιαπώνων στην ετερόζυγη μορφή και στο 4% στην ομόζυγη μορφή), πρόσφατες μελέτες έδειξαν την ύπαρξη αυτής της μετάλλαξης και σε άλλους πληθυσμούς της κεντρικής Ασίας³²⁶. Ένας άλλος πολυμορφισμός του γονιδίου της PAF-AH που έχει παρατηρηθεί στους Ιάπωνες και προκαλεί πλήρη εξάλειψη της ενζυμικής ενεργότητας του πλάσματος (Gln²⁸¹→Arg) συνίσταται σε αντικατάσταση μιας αδενίνης από γουανίνη (A→G) στη θέση 1001³²⁷. Τέλος, στη λευκή φυλή έχουν περιγραφεί δύο άλλοι πολυμορφισμοί του γονιδίου της PAF-AH (Ile¹⁹⁸→Thr, εξόνιο 7, θέση 593, T→C και Ala³⁷⁹→Val, εξόνιο 11, θέση 1136, T→C), οι οποίοι ενδεχόμενα επηρεάζουν τη λειτουργικότητα του ενζύμου του πλάσματος, καθώς και ένας πολυμορφισμός (Arg⁹²→His, εξόνιο 4, θέση 275, G→A) με άγνωστη μέχρι σήμερα λειτουργική σημασία^{328,329,330}.

6.1.4. Σύνδεση με τις λιποπρωτεΐνες του πλάσματος

Η PAF-AH του πλάσματος είναι ένα υδρόφοβο μόριο το οποίο κυκλοφορεί συνδεδεμένο με τα λιποπρωτεϊνικά σωματίδια³³¹ και για αυτό το λόγο είναι γνωστή στη βιβλιογραφία και ως «συσχετιζόμενη με λιποπρωτεΐνες φωσφολιπάση A2» (lipoprotein-associated phospholipase A2, Lp-PLA2). Ενζυμική ενεργότητα που υδρολύει τον PAF έχει βρεθεί σε όλες τις λιποπρωτεΐνες που περιέχουν την απολιποπρωτεΐνη B100 (VLDL, IDL και LDL), καθώς και στις λιποπρωτεΐνες υψηλής πυκνότητας (HDL)³³². Η PAF-AH συνδέεται στο πλάσμα κυρίως με τις LDL (και μάλιστα περισσότερο με τις μικρές πυκνές αθηρογόνες LDL) και λιγότερο (<20%) με τις HDL (και μάλιστα με το υποκλάσμα εκείνο των HDL που ανήκει στις VHDL-1 και επίσης περιέχει ApoE)³³³. Πρόσφατα περιγράφηκε ότι η PAF-AH των LDL συνδέεται κυρίως με τις ηλεκτροαρνητικά φορτισμένες LDL, οι οποίες ευοδώνουν τη φλεγμονή στα ενδοθηλιακά κύτταρα³³⁴. Μια άλλη λιποπρωτεΐνη η οποία επίσης έχει υψηλά επίπεδα ενεργότητας της PAF-AH είναι η λιποπρωτεΐνη Lp(a)³³⁵. Ωστόσο, η ενεργότητα της Lp(a) μπορεί να συμβάλει σημαντικά στη διαμόρφωση της συνολικής ενεργότητας της PAF-AH του πλάσματος μόνο όταν τα επίπεδα αυτής της λιποπρωτεΐνης είναι σημαντικά αυξημένα³³⁶.

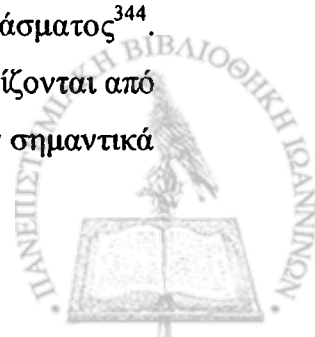


6.1.5. Κυτταρική πηγή προέλευσης και ρύθμιση των επιπέδων της PAF-AH του πλάσματος.

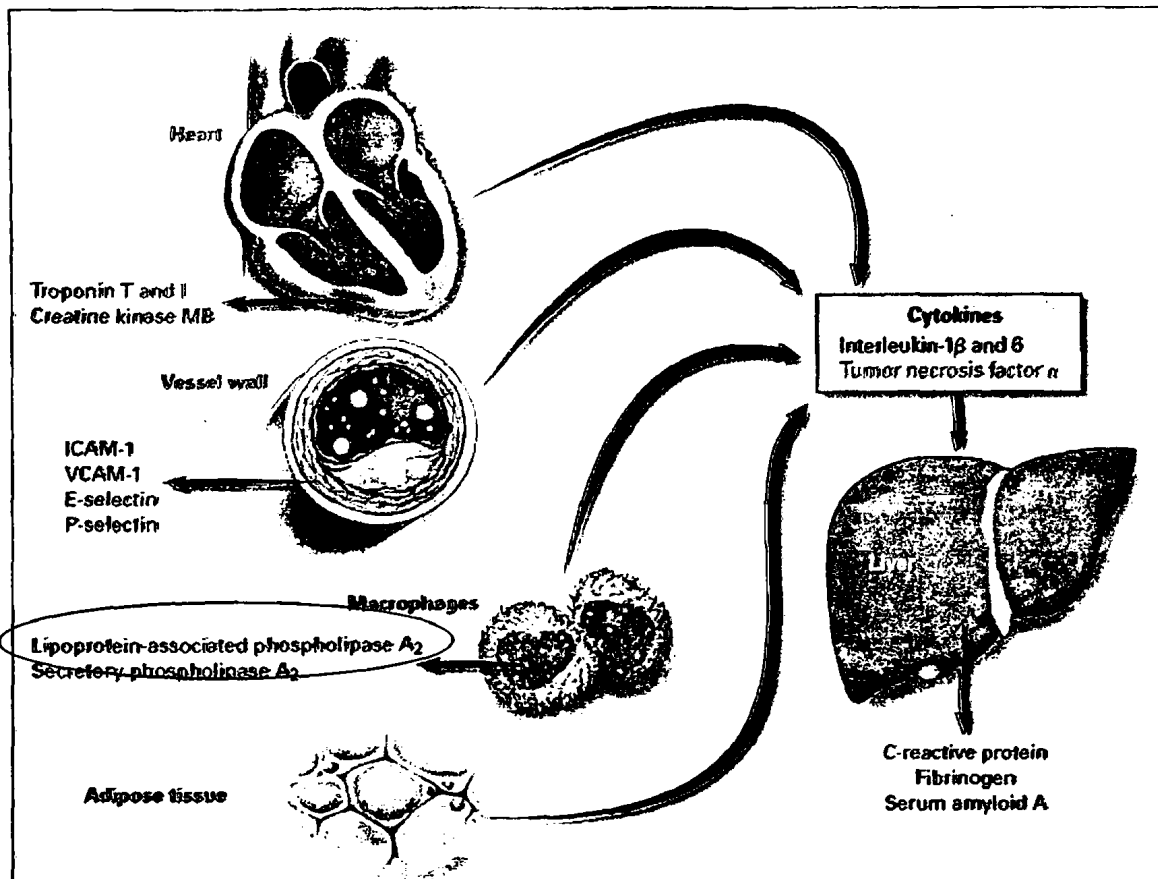
Το ένζυμο του πλάσματος προέρχεται κυρίως από τα κύτταρα του αιμοποιητικού συστήματος (κύτταρα της μυελοειδούς σειράς) και μάλιστα από το σύστημα των μονοκυττάρων-μακροφάγων (Σχήμα 28)³³⁷. Επιπρόσθετα, πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι τα ηπατοκύτταρα παράγουν σημαντικές ποσότητες PAF-AH μετά από κατάλληλο ερεθισμό, αλλά το μεγαλύτερο μέρος αυτής της ενζυμικής ενεργότητας εκκρίνεται στη χολή και όχι στο πλάσμα. Αντίθετα τα κύτταρα Kupffer του ήπατος (τα οποία ανήκουν στο σύστημα μονοκυττάρων-μακροφάγων) μετά από ερεθισμό με ενδοτοξίνη εκκρίνουν μεγάλο ποσοστό του ενζύμου στο πλάσμα³³⁸.

Δεδομένου ότι τα αιμοποιητικά κύτταρα δεν παράγουν λιποπρωτεΐνες, είναι προφανές ότι η PAF-AH παράγεται ανεξάρτητα από τα λιποπρωτεϊνικά σωματίδια και ενσωματώνεται σε αυτά σε κάποια φάση του μεταβολισμού τους. Μελέτες σε ασθενείς με συγγενείς διαταραχές του μεταβολισμού των λιπιδίων έδειξαν ότι η παρουσία των λιποπρωτεϊνών δεν είναι απαραίτητη προϋπόθεση για την παραγωγή του ενζύμου. Έτσι, τόσο οι ασθενείς με αβηταλιποπρωτεΐναιμία, όσο και οι ασθενείς με νόσο Tangier (οι οποίοι παρουσιάζουν σχεδόν πλήρη έλλειψη των λιποπρωτεϊνών που περιέχουν απολιποπρωτεΐνη Β και των HDL αντίστοιχα) έχουν φυσιολογική ενεργότητα της PAF-AH στο πλάσμα^{339,340}. Παρόλα αυτά, η παραγωγή και η έκκριση του ενζύμου από τα μακροφάγα αυξάνεται όταν αυτά επωασθούν παρουσία ανθρώπινου ορού³⁴¹. Αν και το ακριβές στοιχείο του ορού που διεγείρει την παραγωγή του ενζύμου δεν είναι γνωστό, πιθανολογείται ότι πρόκειται για τα λιποπρωτεϊνικά σωματίδια³⁴². Η απόψη αυτή υποστηρίζεται από το γεγονός ότι ο ορός που προέρχεται από ασθενείς με δυσλιπιδαιμία προκαλεί σημαντικά μεγαλύτερη αύξηση της παραγωγής του ενζύμου σε σύγκριση με ορό από νορμολιπιδαιμικά άτομα³⁴³.

Αν και η επίδραση των λιπιδίων στην παραγωγή της PAF-AH του πλάσματος δεν έχει καθορισθεί με σαφήνεια φαίνεται ότι ο μεταβολισμός των λιποπρωτεϊνών συμβάλλει σημαντικά στη διαμόρφωση της ενεργότητας του πλάσματος αφού επηρεάζει τον καταβολισμό του ενζύμου. Πράγματι, μια πρόσφατη μελέτη έδειξε ότι ο ρυθμός καταβολισμού των λιποπρωτεϊνών που περιέχουν απολιποπρωτεΐνη Β είναι ο σημαντικότερος ρυθμιστικός παράγοντας της ενεργότητας της PAF-AH του πλάσματος³⁴⁴. Έτσι, οι ασθενείς με διαταραχές του μεταβολισμού των λιπιδίων που χαρακτηρίζονται από μείωση της κάθαρσης των LDL (οικογενής υπερχοληστερολαιμία) εμφανίζουν σημαντικά



υψηλότερη ενεργότητα της PAF-AH στο πλάσμα σε σύγκριση με υγιείς μάρτυρες³⁴⁵. Πραγματικά, στις περισσότερες μελέτες η ενεργότητα του ενζύμου στο πλάσμα παρουσίασε θετική συσχέτιση με τα επίπεδα της ολικής και LDL χοληστερόλης, καθώς και με τις συγκεντρώσεις της απολιποπρωτεΐνης B³⁴⁶.



Σχήμα 28. Πηγές παραγωγής κυτταροκινών, δεικτών φλεγμονής και της PAF-AH (lipoprotein-associated phospholipase A₂)

Άλλοι παράγοντες που επηρεάζουν τα επίπεδα της PAF-AH του πλάσματος είναι: α) ο βαθμός διαφοροποίησης των κυττάρων του συστήματος μονοκυρήνων-μακροφάγων³⁴⁷, β) ορμονικοί παράγοντες³⁴⁸ (η προγεστερόνη και η δεξαμεθαζόνη προκαλούν σημαντική αύξηση της παραγωγής του ενζύμου από τα μακροφάγα του φθαρτού, ενώ αντίθετα τα οιστρογόνα και η βιταμίνη D προκαλούν μείωση της παραγωγής του ενζύμου), γεγονός που ενδεχόμενα διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην κήση και στην έναρξη του τοκετού³⁴⁹, γ) οι κυτταροκίνες που ευοδώνουν τη φλεγμονή. Οι περισσότερες

κυτταροκίνες [ιντερφερόνη γ (IFN- γ), παράγοντας νέκρωσης των όγκων (TNF- α) και οι ιντερλευκίνες 1, 6 και 8 (IL-1, IL-6 και IL-8)] προκαλούν ισχυρή αναστολή της παραγωγής και της έκκρισης της PAF-AH του πλάσματος³⁵⁰. Ο μόνος διαβιβαστής της φλεγμονής που προκαλεί αύξηση της σύνθεσης του ενζύμου σε κυτταροκαλλιέργειες μακροφάγων και ηπατοκυττάρων είναι ο ίδιος ο PAF³⁵¹. Έτσι, ασθενείς με υψηλά επίπεδα κυτταροκινών, όπως ασθενείς με ρευματοειδή αρθρίτιδα³⁵², εμφανίζουν σημαντικά χαμηλότερη ενεργότητα της PAF-AH του πλάσματος σε σύγκριση με τους υγιείς μάρτυρες, δ) η ηλικία και το φύλο. Η ενεργότητα της PAF-AH του πλάσματος αυξάνεται προοδευτικά με την πάροδο της ηλικίας και οι άνδρες εμφανίζουν σημαντικά υψηλότερη ενεργότητα του ενζύμου σε σύγκριση με τις γυναίκες της ίδιας ηλικιακής ομάδας έως την ηλικία των 50 περίπου ετών, οπότε και η ενεργότητα του ενζύμου εξομειώνεται ανάμεσα στα δύο φύλα³⁵³ και ε) η κληρονομικότητα³⁵⁴.

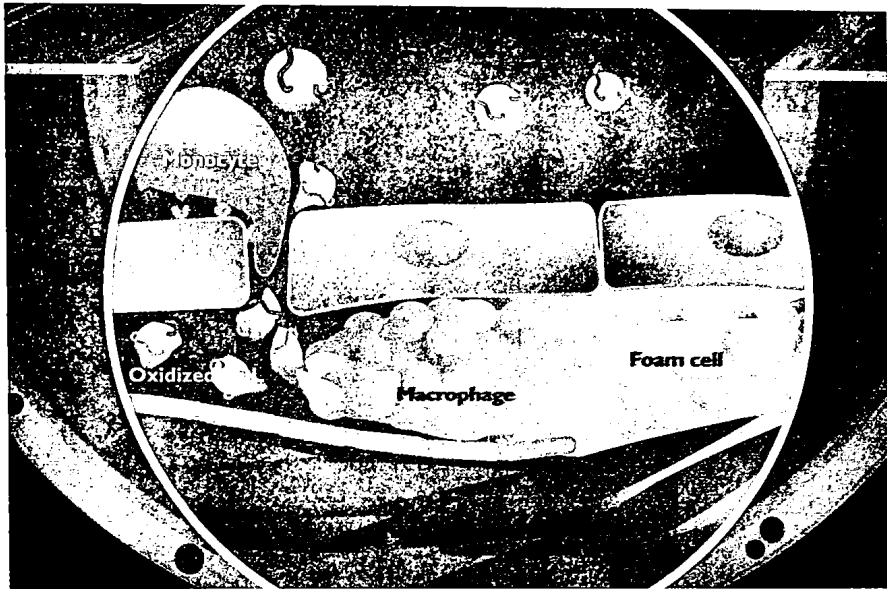
6.2. PAF-AH ΚΑΙ ΑΘΗΡΟΓΕΝΕΣΗ

6.2.1. Η σημασία της οξειδωμένης LDL (oxLDL)

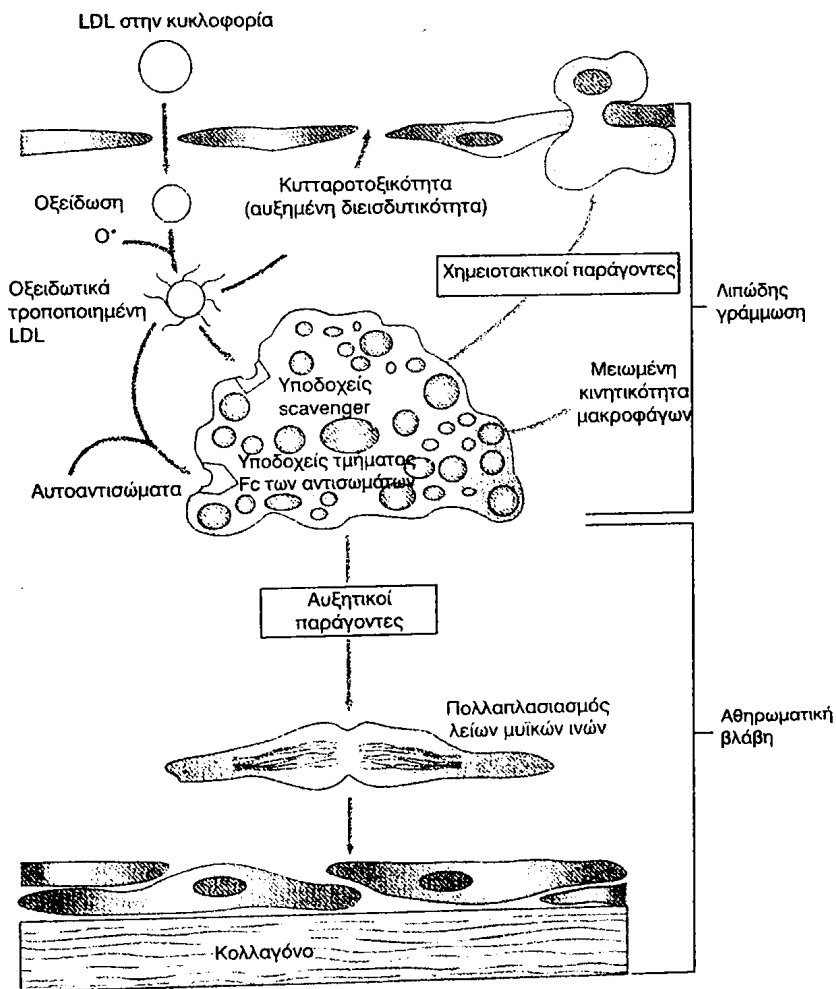
Είναι γνωστό ότι στη δημιουργία της αθηρωματικής πλάκας (Σχήμα 29) συμβάλλουν καθοριστικά η είσοδος των LDL (και ιδιαίτερα των μικρών πυκνών LDL) στον υπενδοθηλιακό χώρο (Σχήμα 30), η οξειδωτική τους τροποποίηση και στη συνέχεια η πρόσληψή τους από τα μακροφάγα διαμέσου των υποδοχέων-εκκαθαριστών με τελικό αποτέλεσμα τη δημιουργία των αφρωδών κυττάρων. Κεντρικό ρόλο στην παραπάνω διαδικασία διαδραματίζει, όπως ήδη αναφέρθηκε, η οξείδωση των LDL σωματιδίων (Σχήμα 31)^{180,181}.

Η ox-LDL, όπως είναι γνωστό, είναι βιολογικά δραστική³⁵⁵ και κυτταροτοξική³⁵⁶. Κατά τη διάρκεια της οξείδωσης της LDL σχηματίζονται οξειδωμένα φωσφολιπίδια και παρατηρείται ενζυμική υδρόλυση αυτών των φωσφολιπιδίων με τελικό αποτέλεσμα το σχηματισμό λυσοφωσφατιδυλοχολίνης (lyso-PC). Υπεύθυνη για αυτή την υδρόλυση είναι η PAF-AH³⁵⁷.



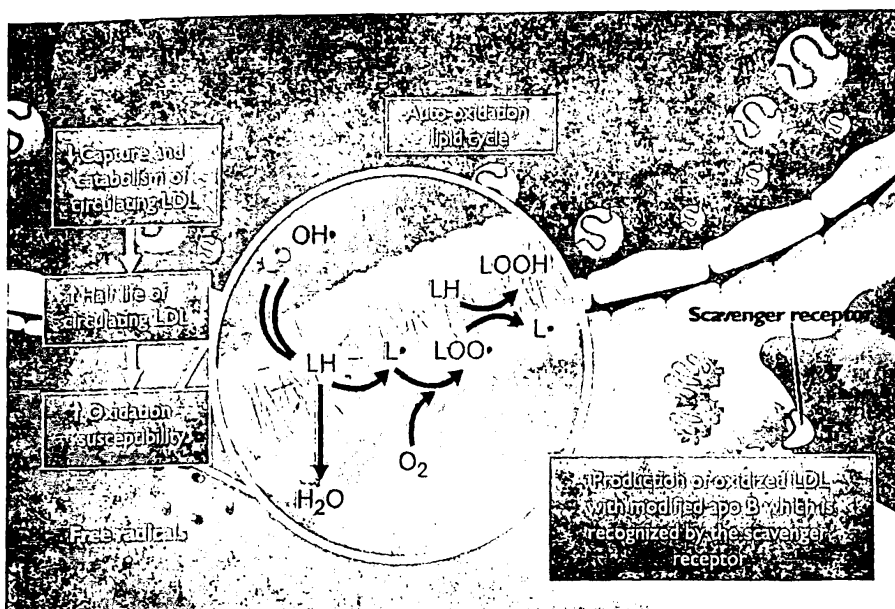


Σχήμα 29. Η δημιουργία της αθηρωματικής πλάκας



Σχήμα 30. Η διαδικασία της αθηρογένεσης





Σχήμα 31. Η οξείδωση των LDL

6.2.2. Ο ρόλος της PAF-AH των LDL (PAF-AH του πλάσματος)

Τα οξειδωμένα φωσφολιπίδια της LDL διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην ικανότητά της να επάγει την αθηρωματική διαδικασία³⁵⁸. Έτσι, έχει διαπιστωθεί ότι η PAF-AH του πλάσματος (που αντικατοπτρίζει κυρίως την PAF-AH των LDL) διαδραματίζει σημαντικό αντιαθηρογόνο ρόλο ακριβώς εξαιτίας της ικανότητάς της να καταβολίζει αυτά τα οξειδωμένα φωσφολιπίδια και να μειώνει τις δράσεις τους που ευοδώνουν την αθηρωματική διαδικασία *in vitro*^{359,360}.

Ωστόσο, έχει διατυπωθεί η άποψη ότι η PAF-AH του πλάσματος θα μπορούσε να ευοδώνει την αθηρωματική διαδικασία. Η άποψη αυτή βασίζεται στην παρατήρηση ότι τα προϊόντα της αντίδρασης που καταλύεται από το ένζυμο [δηλαδή η λυσοφωσφατιδυλχολίνη³⁶¹ (η οποία βρίσκεται σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις στις μικρές πυκνές LDL³⁶²) και τα οξειδωμένα λιπαρά οξέα³⁶³] είναι πιο τοξικά από τα οξειδωμένα φωσφολιπίδια και συνεπώς επάγουν το σχηματισμό της αθηρωματικής πλάκας. Επιπρόσθετα, όπως ήδη αναφέρθηκε, η PAF-AH βρίσκεται εκλεκτικά συνδεδεμένη με τις μικρές πυκνές και τις ηλεκτροαρνητικά φορτισμένες LDL (κεφάλαιο 6.1.4), δηλαδή με τα πιο αθηρογόνα υποκλάσματα των LDL.

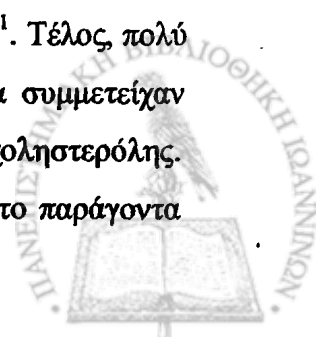
Στο ερώτημα όσον αφορά τον ακριβή ρόλο που διαδραματίζει η PAF-AH του πλάσματος (που, όπως ήδη αναφέρθηκε, αντικατοπτρίζει κυρίως την PAF-AH των LDL) στην αθηρογένεση^{364,365,366} προσπάθησαν να απαντήσουν κλινικές μελέτες που



σχεδιάσθηκαν για αυτό το σκοπό. Έτσι, αναδρομικές μελέτες (cross-sectional) έδειξαν ότι η ενεργότητα της PAF-AH στο πλάσμα είναι υψηλότερη σε ασθενείς με στεφανιαία νόσο,^{346,367,368} αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο³⁶⁹, περιφερική αρτηριοπάθεια³⁷⁰ και σακχαρώδη διαβήτη³⁷¹ σε σύγκριση με υγιή άτομα της ίδιας ηλικίας και φύλου. Αντίθετα, άλλες μελέτες απέτυχαν να αναδείξουν διαφορές μεταξύ των ασθενών και των υγιών μαρτύρων³⁷², ή βρήκαν χαμηλότερα επίπεδα του ενζύμου στα οξέα στεφανιαία συμβάματα³⁷³, ή διαφορές μόνο στην ενεργότητα της PAF-AH της HDL και όχι στην ολική ενεργότητα του πλάσματος³⁷⁴.

Μελέτες στον ιαπωνικό πληθυσμό έδειξαν ότι η ελάττωση της ενεργότητας της PAF-AH εξαιτίας της μετάλλαξης Val²⁷⁹→Phe αποτελεί ανεξάρτητο παράγοντα κινδύνου για την εμφάνιση ισχαιμικής καρδιοπάθειας³⁷⁵, αγγειακού εγκεφαλικού επεισοδίου³⁷⁶, καθώς και για την απόφραξη των μηροϊγνυακών μοσχευμάτων που τοποθετήθηκαν σε ασθενείς με περιφερική αρτηριακή νόσο³⁷⁷. Στον αντίποδα της παραπάνω μελέτης, μία μελέτη σε Ευρωπαϊκό πληθυσμό (HIFMECH Study) έδειξε ότι η ύπαρξη της μετάλλαξης Ala³⁷⁹→Val (αν και σπάνια, συχνότητα 5-6%, η οποία μειώνει τα επίπεδα της PAF-AH του πλάσματος) σε ομόζυγη μορφή, συνδυάζονταν με μειωμένο κίνδυνο για οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου (σχετικός κίνδυνος 0.56)³⁷⁸. Τα τελευταία αυτά τα ευρήματα επιβεβαιώθηκαν από μία πολύ πρόσφατα δημοσιευμένη μελέτη³⁷⁹.

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον έχουν τα αποτελέσματα τριών μεγάλων προοπτικών μελετών που δημοσιεύθηκαν τα τελευταία έτη. Η πρώτη από αυτές αφορούσε ένα υποπληθυσμό της μελέτης WOSCOPS (West of Scotland Coronary Prevention Study), στην οποία συμμετείχαν άνδρες με υπερχοληστερολαιμία. Η πολυπαραγοντική ανάλυση των δεδομένων έδειξε ότι η μάζα (και κατά συνέπεια η ενεργότητα) της PAF-AH του πλάσματος αποτελούσε ανεξάρτητο παράγοντα κινδύνου για την εμφάνιση καρδιαγγειακής νόσου: η αύξηση της μάζας του ενζύμου κατά μία σταθερή απόκλιση είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση του σχετικού κινδύνου για την εμφάνιση καρδιαγγειακής νόσου κατά 18% ($p < 0.005$)³⁸⁰. Στη δεύτερη προοπτική μελέτη, η οποία εξέτασε την προγνωστική σημασία των επιπέδων της PAF-AH για την εμφάνιση καρδιαγγειακής νόσου (Womens' Health Study), συμμετείχαν 28263 υγιείς γυναίκες μέσης ηλικίας. Η πολυπαραγοντική ανάλυση των δεδομένων της μελέτης έδειξε ότι η PAF-AH του πλάσματος δεν αποτελεί ανεξάρτητο παράγοντα κινδύνου για την εμφάνιση καρδιαγγειακής νόσου³⁸¹. Τέλος, πολύ πρόσφατα δημοσιεύθηκαν τα αποτελέσματα της ARIC Study στην οποία συμμετείχαν 12819 υγιείς άνδρες και γυναίκες μέσης ηλικίας με χαμηλά επίπεδα LDL χοληστερόλης. Η μελέτη αυτή έδειξε ότι τα επίπεδα της PAF-AH αποτελούσαν ανεξάρτητο παράγοντα

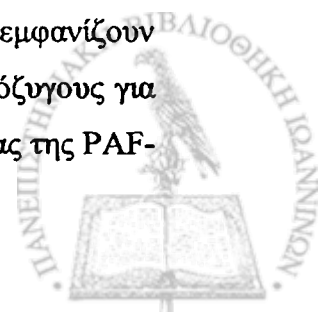


κινδύνου για την εμφάνιση στεφανιαίας νόσου σε άτομα με επίπεδα LDL χοληστερόλης <130 mg/dl³⁸².

6.2.3. Ο ρόλος της PAF-AH των HDL

Σε αντίθεση με την PAF-AH του πλάσματος (αν δεχθούμε τελικά ότι η συνισταμένη των στοιχείων που παρουσιάστηκαν στο κεφάλαιο 6.2.2 είναι ότι η PAF-AH του πλάσματος ευοδώνει την αθηρωματική διαδικασία και αποτελεί ανεξάρτητο παράγοντα κινδύνου για στεφανιαία νόσο), η PAF-AH των HDL έχει σημαντικές αντιαθηρογόνες ιδιότητες και προστατεύει από την εμφάνιση καρδιαγγειακής νόσου. Έτσι, αν και ποσοτικά η ενεργότητα της PAF-AH των HDL σωματιδίων αποτελεί μικρό μόνο ποσοστό της συνολικής ενεργότητας του πλάσματος (κεφάλαιο 6.1.4), μελέτες έδειξαν ότι η ικανότητα της HDL να προστατεύει την LDL από την οξείδωση (κεφάλαιο 5.1) οφείλεται σε πολύ μεγάλο βαθμό στην ιδιότητά της να υδρολύει τον PAF και τα οξειδωμένα φωσφολιπίδια. Επιπρόσθετα, πειράματα σε διαγονιδιακά ποντίκια με γενετική προδιάθεση για την εμφάνιση αθηρωμάτωσης έδειξαν ότι η υπερέκφραση του γονιδίου της PAF-AH οδηγεί σε αύξηση της ενεργότητας του ενζύμου των HDL, η οποία συνοδεύεται από μείωση της προσκόλλησης των μακροφάγων στο αγγειακό τοίχωμα, καθώς και από σημαντική μείωση του αριθμού των αθηρωματικών βλαβών^{383,384}.

Πρέπει ωστόσο να σημειωθεί ότι η δραστηριότητα PAF-AH των HDL μπορεί να οφείλεται σε τρία διαφορετικά ένζυμα, τα οποία έχουν την ικανότητα να υδρολύουν τον PAF και τα οξειδωμένα φωσφολιπίδια *in vitro*: την παραοξονάση 1 (PON1), την λεκιθινοχοληστερολ-ακυλοτρανσφεράση (LCAT) και τέλος την ίδια την PAF-AH (κεφάλαιο 5.1). Η συνεισφορά του καθενός από τα τρία ένζυμα σε αυτές τις δράσεις δεν είναι γνωστή και μάλιστα αποτελεί αντικείμενο έντονων διαφωνιών στη βιβλιογραφία. Έτσι, διατυπώθηκε η άποψη ότι οι HDL δεν περιέχουν πραγματική PAF-AH και ότι η ικανότητά τους να υδρολύουν τον PAF οφείλεται αποκλειστικά στην PON1³⁸⁵. Επιπρόσθετα, υπάρχουν δεδομένα ότι οι πολυμορφισμοί της PON1 επηρεάζουν σημαντικά την PAF-AH ικανότητα των HDL³⁸⁶. Ωστόσο, μελέτες έδειξαν ότι η PON1 δεν έχει ιδιότητες ακετυλοϋδρολάσης του PAF και ότι η ικανότητά της να υδρολύει τον PAF οφείλεται στην παρουσία προσμίξεων PAF-AH κατά την διάρκεια της πειραματικής απομόνωσης της PON1³⁸⁷. Επιπρόσθετα, διαγονιδιακά ποντίκια τα οποία δεν εκφράζουν PON1 εμφανίζουν φυσιολογική ενεργότητα PAF-AH στις HDL²⁵³, ενώ η HDL από ασθενείς ομόζυγους για τη μετάλλαξη Val²⁷⁹→Phe, η οποία προκαλεί πλήρη εξάλειψη της ενεργότητας της PAF-



AH τόσο στο πλάσμα όσο και στις HDL, αν και έχει φυσιολογική ενεργότητα PON1, εντούτοις δεν εμφανίζει καμία υδρολυτική δράση τόσο κατά του PAF όσο και κατά των οξειδωμένων φωσφολιπιδίων³⁸⁷.

Οι λόγοι για τη διαφορά στις βιολογικές δράσεις της PAF-AH των HDL και της PAF-AH των LDL δεν είναι καλά κατανοητοί. Ωστόσο, η παρουσία στα HDL σωματίδια δύο άλλων ενζύμων (PON1 και LCAT) που μπορεί να συμμετέχουν στο μεταβολισμό των οξειδωμένων φωσφολιπιδίων ή των προϊόντων της διάσπασης τους από την PAF-AH, καθώς και η δυνατότητα απομάκρυνσης των τοξικών αυτών προϊόντων από τις HDL διαμέσου της διάχυσης τους στο πλάσμα ή της σύνδεσης τους με μόρια, όπως η αλβουμίνη, μπορεί να συμβάλλουν σημαντικά στην τελική διαμόρφωση της αντιαθηρογόνου δράσης του ενζύμου των HDL σωματιδίων.

Τέλος, λαμβάνοντας υπόψη τις παραπάνω παραδοχές και τα δεδομένα των μελετών σε ασθενείς με υπερχοληστερολαμία³⁴⁵ και ασταθή στηθάγχη³⁷⁴ έχει διατυπωθεί η άποψη ότι ο λόγος HDL-PAF AH/ολική PAF-AH θα μπορούσε να είναι ένας δείκτης της βαρύτητας της υπερχοληστερολαιμίας και πιθανά της αθηρωματικής διαδικασίας³⁴².

6.2.4. Επίδραση των υπολιπιδαιμικών φαρμάκων στα επίπεδα της PAF-AH

Μελέτες έδειξαν ότι η χορήγηση ατορβαστατίνης είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση της ενεργότητας της PAF-AH του πλάσματος εξαιτίας της μείωσης των επιπέδων της LDL χοληστερόλης, αλλά και της επιλεκτικής μείωσης της PAF-AH των μικρών πυκνών LDL, ενώ δεν επηρέασε την ενεργότητα της PAF-AH των HDL³⁸⁸. Επίσης, η χορήγηση φλουβαστατίνης μείωσε την ολική ενεργότητα της PAF-AH του πλάσματος σε ασθενείς με σακχαρώδη διαβήτη τύπου II³⁸⁹. Επιπρόσθετα, η χορήγηση της φαινοφιμπράτης οδήγησε σε αύξηση της ενεργότητας της PAF-AH των HDL και σε παράλληλη μείωση της ενεργότητας της PAF-AH του πλάσματος³⁹⁰. Τα δεδομένα δείχνουν ότι η αύξηση της σχέσης της HDL-PAF AH/ολική PAF-AH αποτελεί πιθανά μία νέα πλειοτρόπο δράση των υπολιπιδαιμικών φαρμάκων³⁹¹.

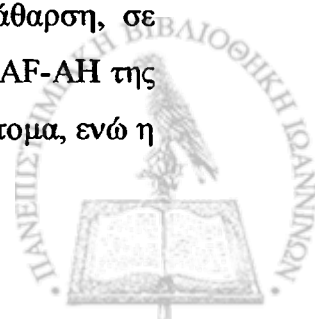


6.3. PAF-AH ΚΑΙ ΝΕΦΡΙΚΑ ΝΟΣΗΜΑΤΑ

Υπάρχουν λίγα δεδομένα για τη σχέση της PAF-AH με τα νεφρικά νοσήματα. Είναι γνωστό ότι τα ενδοθηλιακά³⁹², τα μεσαγγειακά, αλλά και τα κύτταρα της μυελώδους μοίρας του νεφρού παράγουν PAF^{393,394,395,396}. Μελέτες σε πειραματόζωα και ανθρώπους έδειξαν ότι ο PAF μπορεί να διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη νεφρική βλάβη^{397,398}. Έτσι, έχει περιγραφεί αυξημένη απέκκριση PAF στα ούρα παιδιών με ουραιμικό αιμολυτικό σύνδρομο σε συσχέτιση με την ενεργότητα της νόσου³⁹⁹ και στα ούρα ασθενών με μεμβρανώδη σπειραματονεφρίτιδα σε συσχέτιση με το βαθμό της πρωτεϊνουρίας⁴⁰⁰. Επιπρόσθετα, φαίνεται ότι ο vascular permeability factor, που είναι τοξικός για τη βασική μεμβράνη των σπειραμάτων, δρα διαμέσου επαγωγής της σύνθεσης του PAF⁴⁰¹.

Η PAF-AH έχει απομονωθεί στο κυτταρόπλασμα, αλλά κυρίως στην επιφάνεια των μεσαγγειακών κυττάρων όπου υδρολύει τον PAF και έτσι προστατεύει τα κύτταρα από τις βλαπτικές δράσεις του⁴⁰². Επιπρόσθετα, ενεργότητα PAF-AH έχει απομονωθεί τόσο στη φλοιώδη όσο και στη μυελώδη μοίρα του νεφρού⁴⁰³, αλλά και στα ούρα τόσο φυσιολογικών ατόμων όσο και ασθενών με νεφρική νόσο⁴⁰⁴. Ωστόσο, τα επίπεδα της PAF-AH του πλάσματος σε ανεφρικούς ασθενείς είναι φυσιολογικά ή και αυξημένα, γεγονός που υποσημαίνει ότι ο νεφρός δεν αποτελεί σημαντική πηγή παραγωγής της PAF-AH του πλάσματος⁴⁰⁵. Υψηλά επίπεδα PAF-AH του πλάσματος σε συνδυασμό με υψηλά επίπεδα PAF στο πλάσμα και τα ούρα έχουν περιγραφεί σε ασθενείς με πρωτοπαθή σπειραματονεφρίτιδα χωρίς έκπτωση της νεφρικής λειτουργίας⁴⁰⁶. Αντίθετα, σε μια άλλη μελέτη που αφορούσε ασθενείς με IgA νεφροπάθεια τα επίπεδα του PAF στον ορό ήταν αυξημένα στους ασθενείς σε σύγκριση με τους υγιείς μάρτυρες, ενώ τα επίπεδα της PAF-AH του πλάσματος των ασθενών ήταν σημαντικά μειωμένα⁴⁰⁷.

Υπάρχουν δύο μόνο μελέτες αναφορικά με τα επίπεδα της PAF-AH στο πλάσμα ασθενών με τελικού σταδίου χρόνια νεφρική ανεπάρκεια. Έτσι, σε μια μελέτη δεν βρέθηκαν διαφορές στα επίπεδα της PAF-AH του πλάσματος σε ασθενείς που υποβάλλονται σε αιμοκάθαρση σε σύγκριση με υγιείς μάρτυρες²⁹⁸. Στη δεύτερη μελέτη, τα επίπεδα της PAF-AH στο πλάσμα ήταν αυξημένα στους ασθενείς με μέτρια έκπτωση της νεφρικής λειτουργίας και στους αιμοκαθαιρόμενους ασθενείς, ενώ η μεγαλύτερη αύξηση παρουσιάστηκε σε ασθενείς που υποβάλλονταν σε περιτοναϊκή κάθαρση, σε σύγκριση πάντα με τους υγιείς μάρτυρες⁴⁰⁸. Επιπρόσθετα, η ενεργότητα της PAF-AH της HDL ήταν μεγαλύτερη σε όλες τις ομάδες των ασθενών σε σύγκριση με υγιή άτομα, ενώ η



παρουσία υψηλών επιπέδων Lp(a) είχε ως αποτέλεσμα τη διαφοροποίηση της κατανομής της PAF-AH μεταξύ των υποκλασμάτων των λιποπρωτεϊνών.

Τέλος, ορισμένες μελέτες συσχέτισαν τις μεταλλάξεις του γονιδίου της PAF-AH με την κλινική πορεία ορισμένων νεφρικών νόσων. Έτσι, διαπιστώθηκε ότι μεταλλάξεις στη θέση 994 (G994T) επηρεάζουν την κλινική και παθολογοανατομική εικόνα της IgA νεφροπάθειας σε παιδιά Ιαπωνικής καταγωγής. Συγκεκριμένα, ασθενείς με γονότυπο GT ή TT (που οδηγεί σε μηδενικά επίπεδα PAF-AH του πλάσματος) είχαν μεγαλύτερου βαθμού πρωτεϊνουρία και υπερπλασία των μεσαγγειακών κυττάρων από τους ασθενείς που είχαν το γονότυπο GG⁴⁰⁹. Επιπρόσθετα, παιδιά με τον πολυμορφισμό GT και νεφρωσικό σύνδρομο ευαίσθητο στη θεραπεία με κορτικοστεροειδή είχαν μεγαλύτερη πιθανότητα να υποτροπιάσουν κατά τη διάρκεια του πρώτου χρόνου μετά την έναρξη της νόσου από τα παιδιά που είχαν τον πολυμορφισμό GG⁴¹⁰. Ο GT πολυμορφισμός έχει επίσης συσχετισθεί με πιο βαριά κλινική πορεία σε παιδιά με ουραιμικό αιμολυτικό σύνδρομο εξαιτίας λοίμωξης από E.Coli 0157 σε σύγκριση με παιδιά που είχαν τον πολυμορφισμό GG⁴¹¹. Τέλος, ο συνδυασμός του πολυμορφισμού T στο εξόνιο 11 (C1136→T; Ala379Val) του γονιδίου της PAF-AH με τον πολυμορφισμό D του γονιδίου του μετατρεπτικού ενζύμου συσχετίστηκε με χειρότερη πρόγνωση σε ασθενείς με IgA νεφροπάθεια⁴¹². Οι παραπάνω μελέτες έδειξαν ότι τα μειωμένα επίπεδα ή και η πλήρης έλλειψη της PAF-AH εξαιτίας γενετικών παραγόντων συνεπάγονται χειρότερη πρόγνωση για ορισμένα νεφρικά νοσήματα και αναδεικνύουν έμμεσα το νεφροπροστατευτικό ρόλο της PAF-AH.



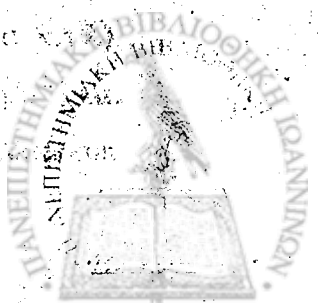
ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ

Το παρόν πρόγραμμα αφορά στην υλοποίηση των εργασιών που αφορούν στην ανάπτυξη της οικονομίας της χώρας...

II. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Το ειδικό μέρος του προγράμματος περιλαμβάνει τις ακόλουθες δράσεις: 1. Ενίσχυση της παραγωγής... 2. Προώθηση της εξαγωγής... 3. Ανομορφωτική εκπαίδευση...



ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7^ο

ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

7.1. ΥΛΙΚΟ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Το υλικό της παρούσας μελέτης αποτέλεσαν τρεις ομάδες ασθενών με έκπτωση της νεφρικής λειτουργίας (χρόνια νεφρική νόσο)⁴¹³ και μία ομάδα υγιών μαρτύρων (ομάδα ελέγχου). Όλα τα άτομα που συμμετείχαν στη μελέτη έδωσαν τη συγκατάθεσή τους για τη γενετική ανάλυση. Η αιμοληψία έγινε μετά 12ωρη νηστεία σε όλα τα άτομα της μελέτης, ενώ τα βασικά τους χαρακτηριστικά φαίνονται στον πίνακα 7.

1. Ομάδα υγιών μαρτύρων (controls)

Αυτή η ομάδα αποτελούνταν από 290 υγιή άτομα, τα οποία ήταν είτε εργαζόμενοι του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων, είτε συνοδοί των ασθενών του Εξωτερικού Ιατρείου Λιπιδίων ή της Παθολογικής Κλινικής, είτε προσήλθαν στο εξωτερικό ιατρείο για ένα τακτικό έλεγχο ρουτίνας (check-up).

Από την ομάδα ελέγχου εξαιρέθηκαν άτομα με νεφρική νόσο (επίπεδα κρεατινίνης ορού > 1.4 mg/dl), μικροαλβουμινουρία (σχέση αλβουμίνης : κρεατινίνη σε τυχαίο δείγμα ούρων ≥ 22 στους άνδρες ή ≥ 31 mg/mg στις γυναίκες), ηπατική νόσο (τιμές τρανσαμινασών μεγαλύτερες του τριπλάσιου των ανώτερων φυσιολογικών τιμών), με διαταραχές της θυρεοειδικής λειτουργίας [θυρεοειδοτρόπος ορμόνη (TSH) > 5 ή < 0.03 μ U/ml], καθώς και άτομα με σακχαρώδη διαβήτη (τουλάχιστον δύο τιμές γλυκόζης νηστείας > 126 mg/dl). Επιπρόσθετα, δεν συμμετείχαν στη μελέτη άτομα με αρτηριακή υπέρταση (ΣΑΠ > 140 mmHg ή/και ΔΑΠ > 90 mmHg ή λήψη αντιυπερτασικής αγωγής), άτομα που έκαναν κατάχρηση αλκοόλ (περισσότερα από 3 ποτά την ημέρα), άτομα με θετικό κληρονομικό ιστορικό πρωτοπαθούς δυσλιπιδαιμίας, καθώς και άτομα που βρίσκονταν ήδη σε υπολιπιδαιμική φαρμακευτική αγωγή ή ελάμβαναν φαρμακευτικά σκευάσματα, τα οποία επηρεάζουν το μεταβολισμό των λιπιδίων ή τη νεφρική λειτουργία (π.χ β-αποκλειστές, διουρητικά, αναστολείς του μετατρεπτικού ενζύμου, ανταγωνιστές των υποδοχέων της αγγειοτενσίνης II, αντισυλληπτικά δισκία κ.τ.λ). Τέλος, η παρουσία παχυσαρκίας [δείκτης μάζας σώματος (ΔΜΣ ή BMI) > 30 kg/m²] και η ύπαρξη ατομικού ιστορικού ή/και η ανεύρεση κλινικών ή ηλεκτροκαρδιογραφικών



ενδείξεων αθηρωματικής νόσου (στεφανιαία νόσος, αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο, περιφερική αγγειοπάθεια) αποτέλεσαν βασικά κριτήρια αποκλεισμού από τη μελέτη.

2. Ομάδα ασθενών με τελικού σταδίου χρόνια νεφρική ανεπάρκεια (στάδιο V) που υποβάλλονταν σε χρόνια αιμοκάθαρση (ΑΜΚ)

Σε αυτή την ομάδα συμμετείχαν 301 ασθενείς που υποβάλλονταν σε χρόνια αιμοκάθαρση για τουλάχιστον 6 μήνες πριν την είσοδό τους στη μελέτη. Το πρόγραμμα της αιμοκάθαρσης περιλάμβανε 3 συνεδρίες την εβδομάδα διάρκειας 4 ωρών/συνεδρία. Τα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οξεικά ή διττανθρακικά και περιείχαν γλυκόζη 2 g/L. Διακόσιοι δύο ασθενείς υποβάλλονταν σε ΑΜΚ με κυτταρινικού τύπου μεμβράνες, ενώ 99 ασθενείς υποβάλλονταν σε ΑΜΚ με συνθετικού τύπου μεμβράνες, οι οποίες θεωρούνται περισσότερο βιοσυμβατές σε σχέση με τις κυτταρινικού τύπου μεμβράνες. Όλες οι συνθετικού τύπου μεμβράνες ήταν του τύπου της χαμηλής ροής (low-flux). Η αποτελεσματικότητα της αιμοκάθαρσης εκτιμήθηκε από τη σχέση Kt/V , η οποία κυμαίνονταν μεταξύ 1.2 έως 1.4. Η υπολειπόμενη νεφρική λειτουργία, όπως εκτιμήθηκε από το μέσο όρο της κάθαρσης της κρεατινίνης και της ουρίας, ήταν πολύ χαμηλή ($< 5.0 \text{ ml/min}$). Οι ασθενείς ήταν ενταγμένοι στις μονάδες τεχνητού νεφρού του Παν/κού Νοσοκομείου Ιωαννίνων, του Γενικού Νοσοκομείου Χατζηκώστα Ιωαννίνων και των Νομαρχιακών Νοσοκομείων Άρτας, Πρέβεζας, Αγρινίου, Καβάλας και Φιλιατών.

Η αιτιολογία της χρόνιας νεφρικής ανεπάρκειας σε αυτούς τους ασθενείς ήταν: χρόνια σπειραματονεφρίτιδα (59 ασθενείς), υπερτασική νεφροπάθεια (62 ασθενείς), χρόνια πυελονεφρίτιδα (35 ασθενείς), πολυκυστική νόσος των νεφρών (30 ασθενείς), αποφρακτική ουροπάθεια (36 ασθενείς), ενώ παρέμενε άγνωστη στους υπόλοιπους 79 ασθενείς της μελέτης. Αποκλείστηκαν οι ασθενείς με ηπατική νόσο (τιμές τρανσαμινασών μεγαλύτερες του τριπλάσιου των ανώτερων φυσιολογικών τιμών), με διαταραχές της θυρεοειδικής λειτουργίας [θυρεοειδοτρόπος ορμόνη (TSH) > 5 ή $< 0.03 \mu\text{U/ml}$], καθώς και οι ασθενείς με σακχαρώδη διαβήτη (τουλάχιστον δύο τιμές γλυκόζης νηστείας $> 126 \text{ mg/dl}$). Επιπρόσθετα, αποκλείστηκαν από τη μελέτη ασθενείς που έκαναν κατάχρηση αλκοόλ (περισσότερα από 3 ποτά την ημέρα), ασθενείς με θετικό κληρονομικό ιστορικό πρωτοπαθούς δυσλιπιδαιμίας, παχύσαρκοι ασθενείς ($\text{BMI} > 30 \text{ kg/m}^2$), καθώς και άτομα που βρίσκονταν ήδη σε υπολιπιδαιμική φαρμακευτική αγωγή ή έπαιρναν φαρμακευτικά σκευάσματα, τα οποία επηρεάζουν το μεταβολισμό των λιπιδίων (π.χ β-αποκλειστές κ.α). Οι ασθενείς ελάμβαναν αγωγή με ερυθροποιητίνη,

σίδηρο, πολυβιταμινούχα σκευάσματα, χαμηλού μοριακού βάρους ηπαρίνη, καλσιτριόλη, δεσμευτικά του φωσφόρου (εκτός από sevelamer hydrochloride), αναστολείς του μετατρεπτικού ενζύμου ή ανταγωνιστές των AT1 υποδοχέων της αγγειοτενσίνης II, ανταγωνιστές ασβεστίου, κεντρικώς δρώντα αντιυπερτασικά φάρμακα, καθώς και ασπιρίνη ή κλοπιδογρέλη. Τέλος, η αιμοληψία σε αυτούς τους ασθενείς έγινε αμέσως πριν την έναρξη της πρώτης για την εβδομάδα συνεδρίας αιμοκάθαρσης, ενώ σε ορισμένους ασθενείς (n=75) έγινε και 2^η αιμοληψία 5 min μετά το τέλος της αιμοκάθαρσης για τη μελέτη της επίδρασης μίας συνεδρίας AMK στις λιπιδαιμικές παραμέτρους και την ενεργότητα των υπό εξέταση ενζύμων, υπό την προϋπόθεση ότι κατά τη διάρκεια της AMK επιτρεπόνταν μόνο η κατανάλωση μικρών ποσοτήτων νερού.

3. Ομάδα ασθενών με τελικού σταδίου χρόνια νεφρική ανεπάρκεια (στάδιο V) που υποβάλλονταν σε συνεχή φορητή περιτοναϊκή κάθαρση (ΣΦΠΚ)

Σε αυτή την ομάδα συμμετείχαν 46 ασθενείς που υποβάλλονταν σε χρόνια συνεχή φορητή περιτοναϊκή κάθαρση για τουλάχιστον 6 μήνες πριν την είσοδό τους στη μελέτη. Αυτοί οι ασθενείς ήταν ενταγμένοι στις μονάδες περιτοναϊκής κάθαρσης του Παν/κού Νοσοκομείου Ιωαννίνων και του Γενικού Νοσοκομείου Χατζηκώστα Ιωαννίνων. Το πρόγραμμα της περιτοναϊκής κάθαρσης περιλάμβανε 4 συνεδρίες την ημέρα με τη χρήση διαλυμάτων 2 L γλυκόζης 1.36%, 1.50% ή 3.86%, ανάλογα με τις ανάγκες κάθε ασθενή για υπερδιήθηση. Η αποτελεσματικότητα της περιτοναϊκής κάθαρσης εκτιμήθηκε από τη σχέση Kt/V, η οποία κυμαίνονταν μεταξύ 1.9 έως 2.0 / εβδομάδα. Η υπολειπόμενη νεφρική λειτουργία, όπως εκτιμήθηκε από το μέσο όρο της κάθαρσης της κρεατινίνης και της ουρίας, ήταν πολύ χαμηλή (< 5.0 ml/min). Όλοι οι ασθενείς δεν είχαν επεισόδια περιτονίτιδας τους τελευταίους 3 μήνες πριν την ένταξή τους στη μελέτη.

Η αιτιολογία της χρόνιας νεφρικής ανεπάρκειας σε αυτούς τους ασθενείς ήταν: χρόνια σπειραματονεφρίτιδα (11 ασθενείς), υπερτασική νεφροπάθεια (9 ασθενείς), χρόνια πυελονεφρίτιδα (6 ασθενείς), πολυκυστική νόσος των νεφρών (3 ασθενείς), αποφρακτική ουροπάθεια (3 ασθενείς), ενώ παρέμενε άγνωστη στους υπόλοιπους 14 ασθενείς. Τα κριτήρια αποκλεισμού από τη μελέτη ήταν τα ίδια με αυτά που έχουν ήδη περιγραφεί για τους ασθενείς που υποβάλλονταν σε αιμοκάθαρση, ενώ τα ίδια ισχύουν και για τη φαρμακευτική αγωγή αυτών των ασθενών.



4. Ομάδα ασθενών με χρόνια νεφρική ανεπάρκεια προτελικού σταδίου (στάδια III-IV)

Σε αυτή την ομάδα συμμετείχαν 48 ασθενείς με χρόνια νεφρική ανεπάρκεια (κρεατινίνη ορού 2.0 – 5.8 mg/dl, υπολογιζόμενος ρυθμός σπειραματικής διήθησης 22-58 ml/min/1.73m²), οι οποίοι επισκέπτονταν το τακτικό ιατρείο χρόνιων νεφρικών νοσημάτων της Νεφρολογικής Κλινικής του Παν/κού Νοσοκομείου Ιωαννίνων. Η αιτιολογία της χρόνιας νεφρικής νόσου ήταν: χρόνια σπειραματονεφρίτιδα (15 ασθενείς), υπερτασική νεφροπάθεια (9 ασθενείς), χρόνια πυελονεφρίτιδα (5 ασθενείς), πολυκυστική νόσος των νεφρών (5 ασθενείς), ενώ παρέμενε άγνωστη στους υπόλοιπους 14 ασθενείς της μελέτης. Τα κριτήρια αποκλεισμού από τη μελέτη και η φαρμακευτική αγωγή των ασθενών δεν διέφεραν σε σχέση με τα όσα έχουν ήδη περιγραφεί για τους ασθενείς που υποβάλλονταν σε AMK ή ΣΦΠΚ, με την επισήμανση ότι ορισμένοι ασθενείς έπαιρναν θεραπεία με φουροσεμίδη. Τέλος, ορισμένοι ασθενείς εμφάνιζαν κάποιου βαθμού πρωτεϊνουρία (500-1680 mg / 24ωρο), αλλά κανένας ασθενής δεν είχε πρωτεϊνουρία της τάξης του νεφρωσικού συνδρόμου.

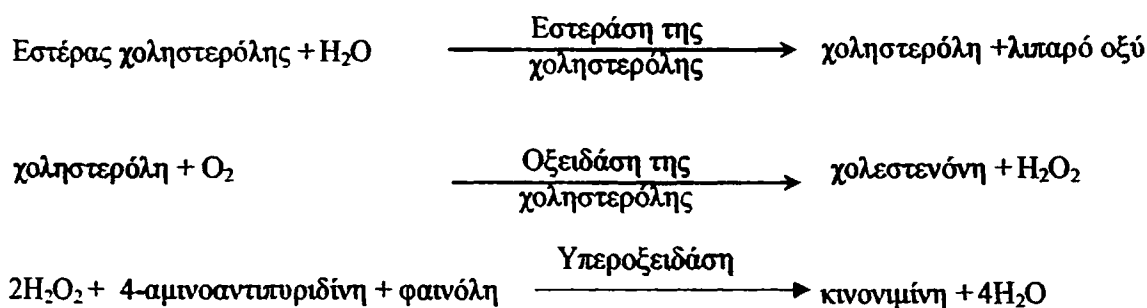


7.2. ΜΕΘΟΔΟΙ

7.2.1. Προσδιορισμός της ολικής χοληστερόλης (T-CHOL) του ορού

Η ολική χοληστερόλη και τα τριγλυκερίδια στον ορό προσδιορίστηκαν με ενζυμικές μεθόδους σε αυτόματο αναλυτή OLYMPUS AU 600 (Olympus Diagnostica, Hamburg, Germany).

Για τον προσδιορισμό της ολικής χοληστερόλης, αρχικά το ποσοστό της χοληστερόλης που είναι εστεροποιημένο υδρολύεται σε ελεύθερη χοληστερόλη και λιπαρά οξέα και στη συνέχεια η ολική χοληστερόλη μετατρέπεται σε χολεστενόνη και υπεροξείδιο το οποίο μετράται ποσοτικά με το σχηματισμό χρωμογόνου (κινονιμίνη) στα 510 nm.



Χρησιμοποιήθηκε βαθμονομητής (calibrator) της Olympus και η καμπύλη βαθμονόμησης είχε ανώτερο όριο γραμμικότητας 700 mg/dl και κατώτερο όριο ανίχνευσης 25 mg/dl.

7.2.2. Προσδιορισμός της χοληστερόλης των υψηλής πυκνότητας λιποπρωτεϊνών (HDL-C) του ορού

Ο προσδιορισμός της HDL χοληστερόλης έγινε ενζυμικά στο υπερκείμενο διάλυμα μετά από καταβύθιση όλων των άλλων λιποπρωτεϊνών με το αντιδραστήριο θειϊκής δεξτράνης / MgCl₂ (Sigma Diagnostics, St. Louis, MO, USA)⁴¹⁴. Αναλυτικά, σε δοκιμαστικό σωλήνα αναμίχθηκαν 500 μl ορού και 50 μl διαλύματος που περιείχε 500 mmol/L MgCl₂ και 10 g/L θειϊκής δεξτράνης (MB 50.000) (Sigma). Μετά την καταβύθιση σε θερμοκρασία δωματίου για 5 min, το μίγμα της αντίδρασης



φυγοκεντρήθηκε σε 1500 στροφές/μίν για 5 μίν και το υπερκείμενο συλλέχθηκε για τον ενζυματικό προσδιορισμό της HDL-C.

7.2.3. Υπολογισμός της χοληστερόλης των χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεϊνών (LDL-C) και της χοληστερόλης των μη υψηλής πυκνότητας λιποπρωτεϊνών (non HDL-C) του ορού

Η τιμή της LDL χοληστερόλης υπολογίστηκε από τον τύπο του Friedewald^{415,416}:

$$\text{LDL-C} = \text{T-CHOL} - (\text{HDL-C} + \text{Τριγλυκερίδια}/5) \text{ (σε mg/dl)}$$

σε δείγματα τα οποία συλλέχθηκαν μετά από 12ωρη νηστεία όταν η τιμή των τριγλυκεριδίων ήταν <400 mg/dl. Σε υπερτριγλυκεριδαιμικούς ασθενείς χρησιμοποιήθηκε η ακόλουθη εξίσωση για τον προσδιορισμό της LDL χοληστερόλης⁴¹⁷:

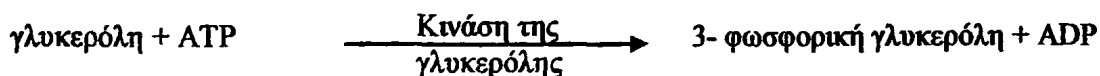
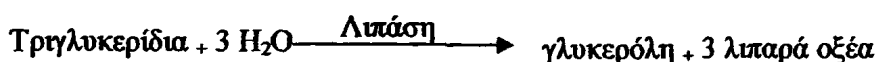
$$\text{LDL-C} = 0.41 \text{ T-CHOL} - 0.32 \text{ TRG} + 1.70 \text{ ApoB} - 0.27 \text{ (σε mmol/L)}$$

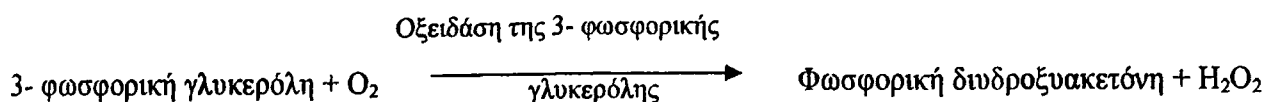
Ο υπολογισμός της non HDL χοληστερόλης έγινε από τον τύπο⁴¹⁸:

$$\text{non HDL-C} = \text{T-CHOL} - \text{HDL-C}$$

7.2.4. Προσδιορισμός των τριγλυκεριδίων (TRG) του ορού

Για τη μέτρηση των τριγλυκεριδίων έγινε αρχικά υδρόλυση των τριγλυκεριδίων σε γλυκερόλη και λιπαρά οξέα και στη συνέχεια ποσοτικός προσδιορισμός της γλυκερόλης σε τρία στάδια:





Χρησιμοποιήθηκε βαθμονομητής (calibrator) της Olympus και η καμπύλη βαθμονόμησης είχε ανώτερο όριο γραμμικότητας 1000 mg/dl και κατώτερο όριο ανίχνευσης 10 mg/dl.

Για τον έλεγχο της ακρίβειας και της αξιοπιστίας των μεθόδων προσδιορισμού της ολικής χοληστερόλης, των τριγλυκεριδίων και της HDL χοληστερόλης χρησιμοποιήθηκαν οι οροί ελέγχου Decision[®] (Levels 1,2,3) της Beckman (Fullerton, CA).

Οι συντελεστές διακύμανσης (CV) στο πρόγραμμα εξωτερικού ποιοτικού ελέγχου (Murex Clinical Chemistry Quality Assessment Programm) κυμαίνονταν μεταξύ 0.99% και 2.14% για την ολική χοληστερόλη και μεταξύ 1.73% και 3.36% για τα τριγλυκερίδια.

7.2.5. Προσδιορισμός των απολιποπρωτεϊνών του ορού

Ο προσδιορισμός των τιμών των απολιποπρωτεϊνών στο πλάσμα έγινε με ανοσονεφελομετρία σε νεφελόμετρο BN100 (Dade Behring, Liederbach, Germany) χρησιμοποιώντας ειδικά αντισώματα για κάθε απολιποπρωτεΐνη⁴¹⁹. Οι συντελεστές ενδοαναλυτικής διακύμανσης (intra-assay) και διαναλυτικής διακύμανσης (inter-assay) της μεθόδου είναι 2.2% και 5.7% αντίστοιχα για την ApoAI και 1.9% και 2.4% για την ApoB.

7.2.6. Υπολογισμός του προβλεπόμενου ρυθμού σπειραματικής διήθησης (GFR)

Ο ρυθμός της σπειραματικής διήθησης (Glomerular Filtration Rate, GFR) στα υγιή άτομα υπολογίστηκε με βάση τον τύπο που προέκυψε από την μελέτη MDRD (Modification of Diet in Renal Disease Study)⁴²⁰:



Προβλεπόμενη GFR σε ml/min/1.73m²=170 x (κρεατινίνη ορού σε mg/dl)^{-0.999} x (ηλικία σε έτη)^{-0.176} x (άζωτο ουρίας ορού σε mg/dl)^{-0.170} x (αλβουμίνη ορού σε g/dl)^{+0.318} (x0.762 σε γυναίκες)

Ο παραπάνω τύπος αρχικά προτάθηκε για ασθενείς με έκπτωση της νεφρικής λειτουργίας. Στη συνέχεια, όμως, διαπιστώθηκε ότι ισχύει και για υγιή ενήλικα άτομα και μάλιστα θεωρείται περισσότερο ακριβής και αξιόπιστος δείκτης της νεφρικής λειτουργίας σε σύγκριση με τη γνωστή εξίσωση των Cockcroft-Gault^{421,422}.

7.2.7. Προσδιορισμός των γονοτύπων της παραοξονάσης (PON1)

I. Απομόνωση γενετικού υλικού (DNA) από τα λευκά αιμοσφαίρια του αίματος

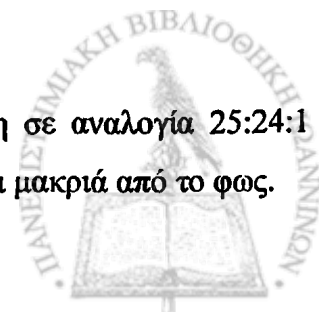
- Χρησιμοποιούμε πάντα ένα αρνητικό δείγμα ελέγχου, δηλαδή ένα μπουκαλάκι χωρίς βιολογικό δείγμα προκειμένου να ελέγξουμε τη παρουσία επιμολύνσεων από DNA (DNA contamination) στα αντιδραστήρια ή τα διαλύματά μας.

A. ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ⁴²³

Το DNA απομονώθηκε από τα λευκοκύτταρα του ολικού αίματος. Πιο συγκεκριμένα, 5 ml φλεβικού αίματος συλλέγονταν σε αποστειρωμένο σωληνάριο χωρητικότητας 14 ml, το οποίο περιείχε 0.5 ml αντιπηκτικού 0.5M EDTA. Το αίμα φυλάχθηκε στους 4°C για 24 ώρες.

B. ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ-ΟΡΓΑΝΑ

- NH₄Cl (MB: 53.49, Merck)
- NH₄HCO₃ (MB: 79.06, Fluka)
- NaCl (MB: 58.44, Merck)
- Tris HCl (MB: 157.6, Merck)
- EDTA (Titriplex III) (MB: 372.24, Merck)
- SDS (MB: 288.38, Merck)
- Πρωτεάση (100mg, 4.8 units/mg solid, Sigma)
- SEVAG (φαινόλη, χλωροφόρμιο, ισοαμυλική αλκοόλη σε αναλογία 25:24:1 v/v/v, 100ml, Sigma-Aldrich). Φυλάσσεται στους 4°C και μακριά από το φως.



- CHCl_3 (MB: 119.38, Merck). Φυλάσσεται σε θερμοκρασία δωματίου.
- Ισοαμυλική αλκοόλη (MB: 88.15, Merck). Φυλάσσεται σε θερμοκρασία δωματίου.
- Αιθανόλη 99%. Φυλάσσεται στους -20°C .
- Αιθανόλη 70%. Φυλάσσεται στους -20°C .
- Φυγόκεντρος πάγκου (Hermle, Z 320)
- Μικροφυγόκεντρος για erppendorf (Hettich, ΜΙΚΡΟ 12-24)
- Υδατόλουτρο 37°C
- Speed-Vac (Συμπυκνωτής υπό κενό αέρος) (SC 100, Savant)

Γ. ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

• **Υπότονο διάλυμα λύσης ερυθρών αιμοσφαιρίων (Red Blood Cell Lysis Buffer):** 10.698g NH_4Cl και 0.236 g NH_4HCO_3 διαλύονται σε 1 L ddH₂O. Το διάλυμα φυλάσσεται σε θερμοκρασία δωματίου.

• **Διάλυμα 5M NaCl:** Σε 100 ml ddH₂O διαλύονται 29.22 g NaCl. Το διάλυμα φυλάσσεται σε θερμοκρασία δωματίου.

• **Διάλυμα 1M Tris HCl:** Σε 100 ml ddH₂O διαλύονται 15.76 g Tris HCl. Το διάλυμα φυλάσσεται σε θερμοκρασία δωματίου.

• **Διάλυμα 0,5M EDTA:** Σε 100 ml ddH₂O διαλύονται 18.612 g EDTA. Το διάλυμα φυλάσσεται σε θερμοκρασία δωματίου.

• **Διάλυμα 20% SDS:** Σε 100 ml ddH₂O διαλύονται 20 g SDS. Το διάλυμα φυλάσσεται σε θερμοκρασία δωματίου.

• **Διάλυμα σαπωνοποίησης μεμβρανών (IP Israel Buffer):**

Για την παρασκευή 200 ml αυτού του διαλύματος αναμιγνύονται 4 ml διαλύματος 5M NaCl, 2 ml διαλύματος 1M Tris chloride, 4 ml διαλύματος 0.5M EDTA και 20 ml διαλύματος 20% SDS. Ο υπόλοιπος όγκος μέχρι τα 200 ml συμπληρώνεται με ddH₂O. Το διάλυμα φυλάσσεται σε θερμοκρασία δωματίου.

• **Διάλυμα Πρωτεάσης:** Η πρωτεάση διαλύεται σε ddH₂O ώστε η τελική της συγκέντρωση να είναι 20 mg/100μl. Φυλάσσεται καλά στεγανοποιημένη στους -20°C σε μορφή aliquots.



Δ. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

ΗΜΕΡΑ ΠΡΩΤΗ

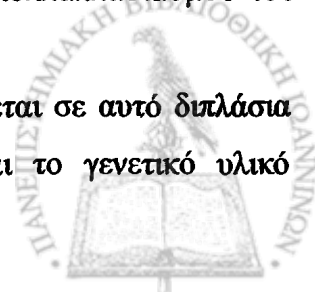
Το ολικό αίμα φυγοκεντρείται στις 3.000 στροφές/min για 20 min. Το πλάσμα απομακρύνεται μέχρι εκεί που αναγνωρίζεται ο δακτύλιος των λευκών αιμοσφαιρίων και στα έμμορφα συστατικά προστίθενται 14 ml υπότονου διαλύματος λύσης των ερυθροκυττάρων, το οποίο αφήνεται να δράσει για 20 min σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 3500 στροφές/min για 5 min και απομάκρυνση του υπερκείμενου. Στα εναπομείναντα έμμορφα συστατικά προστίθενται εκ νέου 7 ml διαλύματος λύσης και γίνεται ανάδευση. Ακολουθεί νέα φυγοκέντρηση στις 3500 στροφές/min για 5 min και απομάκρυνση του υπερκείμενου. Εάν υπάρχουν ακόμη υπολείμματα ερυθροκυττάρων μπορεί να ακολουθήσει και τρίτη πλύση. Η παραπάνω διαδικασία σκοπεύει στην απομάκρυνση των πρωτεϊνών του πλάσματος και της αιμοσφαιρίνης, που είναι πολύ ισχυροί ανασταλτές της DNA πολυμεράσης.

Η λύση των λευκοκυττάρων, τα οποία βρίσκονται στον πυθμένα του σωληναρίου, καθώς και η διάσπαση των κυτταρικών τους μεμβρανών γίνεται με την προσθήκη μίγματος 10 ml διαλύματος πρωτεάσης και 500 ml διαλύματος σαπωνοποίησης των μεμβρανών. Το μίγμα αναδεύεται καλά και επωάζεται σε υδατόλουτρο στους 37°C για 12 ώρες.

ΗΜΕΡΑ ΔΕΥΤΕΡΗ

Το μίγμα εξέρχεται από το υδατόλουτρο και περιέχει μόνο κατάλοιπα πρωτεϊνών και φωσφολιπιδίων, καθώς και αυτούσιο DNA. Προστίθενται 500 ml αντιδραστηρίου SEVAG και ακολουθεί ανάδευση και φυγοκέντρηση στις 3500 στροφές/min για 10 min. Στο στάδιο αυτό γίνεται καθίζηση των προϊόντων διάσπασης πρωτεϊνών και μεμβρανών. Η υπερκείμενη υδατική φάση αποτελεί το γενετικό υλικό, το οποίο μεταφέρεται σε αποστειρωμένο σωληνάριο erpendorf. Στη συνέχεια προστίθενται 500 ml διαλύματος χλωροφορμίου/ισοαμυλικής αλκοόλης σε αναλογία 24:1 v/v (φυλάσσεται σε αλουμινόχαρτο). Ακολουθεί ανάδευση και φυγοκέντρηση στις 10600 στροφές/min για 5 min. Στο στάδιο αυτό δεσμεύεται η φαινόλη που πιθανά παρέμεινε στο διάλυμα και θα μπορούσε να αναστείλει τη DNA πολυμεράση στο στάδιο του πολλαπλασιασμού του γενετικού υλικού.

Το υπερκείμενο μεταφέρεται σε άλλο erpendorf και προστίθεται σε αυτό διπλάσια ποσότητα κρύας αιθανόλης 99%. Γίνεται ήπια ανακίνηση και το γενετικό υλικό



εμφανίζεται να καθιζάνει με τη μορφή λευκών ινιδίων. Ακολουθεί φυγοκέντρωση στις 10600 στροφές/min για 15 min με αποτέλεσμα το γενετικό υλικό να παραλαμβάνεται στον πυθμένα του σωληναρίου.

Η αιθανόλη απομακρύνεται με αργή και προσεκτική απόχυση και στο γενετικό υλικό προστίθενται εκ νέου 500 μl κρύας αιθανόλης 70%. Το διάλυμα φυγοκεντρείται στις 10600 στροφές/min για 5 min. Η αλκοόλη απομακρύνεται ακόμη μία φορά με προσεκτική απόχυση και το erpendorf μεταφέρεται στο speed-vac όπου το γενετικό υλικό αποξηραίνεται για 20 min. Τέλος, το DNA διαλύεται σε 200μl δις απεσταγμένου νερού (ddH₂O) και προστίθενται 10μl χλωροφορμίου. Το δείγμα φυλάσσεται στους 4°C για 24 ώρες. Στη συνέχεια, δημιουργούνται αλίκοτς των 50μl, τα οποία μεταφέρονται στους -20°C για μακροχρόνια αποθήκευση.

II. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR) για τον προσδιορισμό του πολυμορφισμού PON1 Q192R της παραοξονάσης 1

II.A. PCR

A. ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ²⁶²

Με τη μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης γίνεται πολλαπλασιασμός του τμήματος του γονιδίου της παραοξονάσης, το οποίο περιέχει τον αναζητούμενο πολυμορφισμό (Q192R).

B. ΟΡΓΑΝΑ ΚΑΙ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

- Ζεύγος εκκινητών (forward:5'-tat tgt tgc tgt ggg acc tga g-3', reverse:5'-cac gct aaa ccc aaa tac atc tc-3'PE Applied Biosystems CH).
- Νουκλεοτίδια dATP, dCTP, dGTP, dTTP (100mM το καθένα, Amersham Pharmacia Biotech). Φυλάσσονται στους -20°C.
- Taq DNA πολυμεράση (Amersham Pharmacia Biotech). Φυλάσσεται στους -20°C και αποψύχεται λίγο πριν τη χρήση της.
- Ρυθμιστικό διάλυμα της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (PCR buffer) (Amersham Pharmacia Biotech). Φυλάσσεται στους -20°C.
- Θερμοκυκλοποιητής (Programmable Thermal Cycler PTC-100TM, MJ Research, Inc.).



Γ. ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

• **Διάλυμα εκκινητών:** Οι εκκινητές αραιώνονται σε ddH₂O, ώστε η συγκέντρωσή τους (πριν την εισαγωγή τους στο μίγμα της PCR) να είναι 3-6 pmol/μl. Φυλάσσονται στους -20°C.

• **Διάλυμα μίγματος νουκλεοτιδίων (dNTPs):** Για την παρασκευή 1 ml διαλύματος αναμιγνύονται 12.5 μl από κάθε νουκλεοτίδιο. Ο υπόλοιπος όγκος συμπληρώνεται με ddH₂O. Το διάλυμα φυλάσσεται στους -20°C.

Δ. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Το γενετικό υλικό που έχει απομονωθεί προηγουμένως αραιώνεται με ddH₂O σε αναλογία 1 DNA/ 8 ddH₂O v/v. Στη συνέχεια παρασκευάζεται το μίγμα PCR σε eppendorf και τα αντιδραστήρια αναμιγνύονται με την ακόλουθη σειρά:

- ✓ 9.9 μl ddH₂O
- ✓ 1 μl εκκινητής forward
- ✓ 1 μl εκκινητής reverse
- ✓ 2.5 μl διαλύματος dNTPs
- ✓ 2.5 μl PCR buffer
- ✓ 0.1 μl Taq DNA polymerase

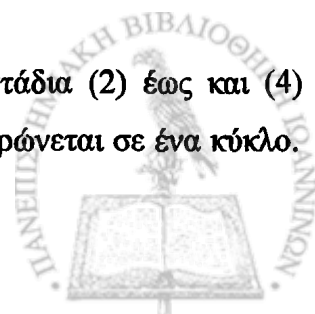
Οι ποσότητες αυτές χρησιμοποιούνται για ένα δείγμα και επομένως πολλαπλασιάζονται ανάλογα με τα δείγματα της PCR.

Μετά από ήπια ανάδευση με πιπέτα, το μίγμα PCR (17 μl) μεταφέρεται στα ειδικά eppendorf για PCR όπου προστίθενται 8 μl του αραιωμένου γενετικού υλικού. Ακολουθεί νέα ανάδευση (με πιπέτα) και τα δείγματα μεταφέρονται στο θερμοκυκλοποιητή.

Το πρόγραμμα της PCR για την ανεύρεση του πολυμορφισμού PON1 192QR της παραοξονάσης έχει ως εξής:

- 5 min στους 95°C (διαχωρισμός της διπλής έλικας του DNA) (1)
- 60 sec στους 94°C (διαχωρισμός της διπλής έλικας του DNA) (2)
- 45 sec στους 56°C (σύνδεση των εκκινητών με το πρότυπο DNA) (3)
- 45 sec στους 72°C (επιμήκυνση) (4)
- 6 min στους 72°C (επιμήκυνση) (5)

Το στάδιο (1) πραγματοποιείται μόνο για ένα κύκλο. Τα στάδια (2) έως και (4) πραγματοποιούνται για 40 κύκλους. Τέλος, το στάδιο (5) ολοκληρώνεται σε ένα κύκλο.



Μετά την παραπάνω διαδικασία, το πολυμερισμένο γενετικό υλικό διατηρείται στους 4°C.

II.B. Ηλεκτροφόρηση αγαρόζης 2% για DNA

- Χρειάζεται εξαιρετική προσοχή στο χειρισμό του βρωμιούχου αιθιδίου (EBt) γιατί είναι δυνητικά μεταλλαξιογόνο.

A. ΓΕΝΙΚΑ

Με την πρώτη αυτή ηλεκτροφόρηση πιστοποιείται η σωστή λειτουργία της PCR διαδικασίας. Το πολυμερισμένο πλέον τμήμα του γενετικού υλικού που θα μελετηθεί εμφανίζεται ως μπάντα ορατή στη UV ακτινοβολία.

B. ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ-ΟΡΓΑΝΑ

- Αγαρόζη (GIBCO BRL)
- Βρωμιούχο Αιθίδιο (EtBr, 10mg/ml, Sigma)
- EDTA (MB:372.24, Merck)
- Tris Base (MB:121.14, Merck)
- Βορικό οξύ (MB:61.83, Merck)
- Ficol Separating Solution (Biochrom AG)
- Μπλε της βρωμοφαινόλης (BB) (FERAK)
- Οριζόντια συσκευή ηλεκτροφόρησης (Fotodyne Incorporated)
- Τροφοδοτικό (BIO-RAD, Power Pac 200)
- Φούρνος μικροκυμάτων
- Φωτογραφική κάμερα (UV ακτινοβολία)

Γ. ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

• **Διάλυμα 0,5M EDTA (pH=8):** 18.6 g EDTA διαλύονται σε 80 ml ddH₂O. Το pH ρυθμίζεται στο 8 και ο όγκος συμπληρώνεται στα 100 ml.

• **Διάλυμα 10X TBE:** 108 g Tris Base, 55 g βορικού οξέος και 40 ml 0.5M EDTA pH=8, διαλύονται σε τελικό όγκο 1 lt ddH₂O. Το διάλυμα φυλάσσεται σε θερμοκρασία δωματίου.

• **Διάλυμα 0.5X TBE:** Σε 950 ml ddH₂O προστίθενται 50 ml διαλύματος 10X TBE. Το διάλυμα φυλάσσεται σε θερμοκρασία δωματίου.

- **Πήκτωμα αγαρόζης 2%:** 2 g αγαρόζης διαλύονται σε 100 ml 0.5X TBE.



• **Χρωστική DNA:** Για την παρασκευή 50 ml χρωστικής, 7.5g Ficol και 0.12 g BB διαλύονται σε 0.5X TBE.

Δ. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

α) Προετοιμασία Πηκτώματος Αγαρόζης

Το πήκτωμα τοποθετείται στο φούρνο μικροκυμάτων και θερμαίνεται μέχρι την πλήρη ομογενοποίησή του. Το διάλυμα επανέρχεται σε θερμοκρασία δωματίου και πολύ προσεχτικά προστίθενται 5ml βρωμιούχου αιθιδίου. Γίνεται ήπια ανάδευση και το διάλυμα αποχύνεται στη θέση τοποθέτησης του πηκτώματος. Αμέσως, εφαρμόζεται το χτενάκι 20 θέσεων και πριν αρχίσει να πήζει (σε ~ 15 min), απομακρύνονται οι φυσαλίδες που τυχόν δημιουργήθηκαν.

β) Προετοιμασία δειγμάτων

Η προετοιμασία των δειγμάτων μετά το PCR γίνεται ως εξής: Σε eppendorf τοποθετούνται 5ml ddH₂O, 5ml χρωστικής και 5 μl κάθε δείγματος. Η ανάδευση γίνεται με πιπέτα.

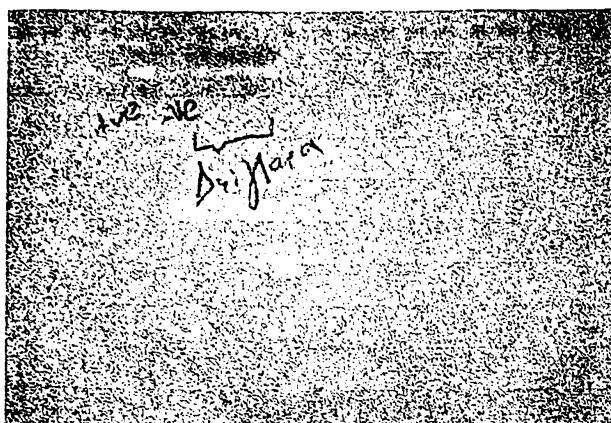
γ) Τοποθέτηση δειγμάτων

Μετά την πήξη, η αγαρόζη τοποθετείται στη θέση εκκίνησης της ηλεκτροφόρησης. Προστίθεται διάλυμα 0.5X TBE, ώστε να καλυφθεί η επιφάνεια του πηκτώματος. Απομακρύνεται το χτένι και σε κάθε θέση (πηγαδάκι) που έχει δημιουργηθεί τοποθετείται το δείγμα.

Η διάρκεια της ηλεκτροφόρησης είναι τουλάχιστον 45 min υπό σταθερή τάση 120 Volts. Μετά την ολοκλήρωση της ηλεκτροφόρησης, το πήκτωμα μεταφέρεται κάτω από ακτινοβολία UV και φωτογραφίζεται σε σκοτεινό θάλαμο.

Όταν έχουμε σωστό προϊόν της PCR, τότε σε κάθε δείγμα, καθώς και στο θετικό δείγμα ελέγχου (positive control) αντιστοιχεί μία έντονη μπάντα (πολυμερισμένο γενετικό υλικό) και μία μικρότερη μπάντα (primers). Στη περίπτωση που λάβουμε πολλές μπάντες, τότε δεν έχουμε σωστό προϊόν της PCR. Τέλος, το αρνητικό δείγμα ελέγχου (negative control) πρέπει να δώσει μόνο μπάντα που να αντιστοιχεί στους εκκινητές (primers), γιατί σε διαφορετική περίπτωση πρόκειται για επιμόλυνση του DNA (Εικόνα 4).





Εικόνα 4. Ηλεκτροφόρηση του προϊόντος της PCR σε πηκτή αγαρόζης

Π.Γ. Ανίχνευση του πολυμορφισμού PON1 Q192R με τη βοήθεια περιοριστικού ενζύμου

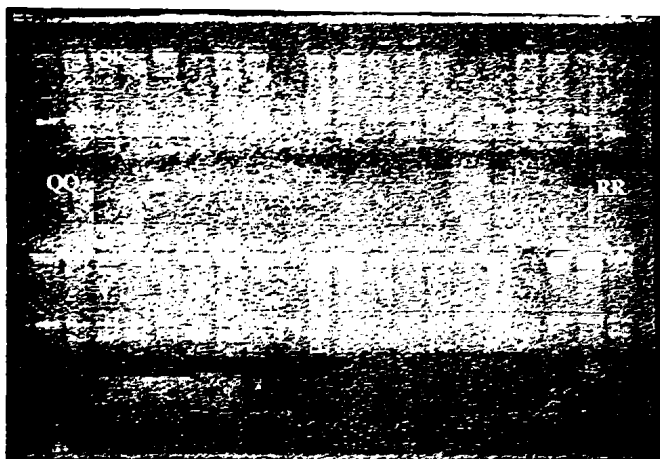
A. ΟΡΓΑΝΑ-ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

- Περιοριστικό ένζυμο Alw I (5U/μl, New England Biolabs)
- Nusieve 3:1 Agarose (Bio-Whittaker, Molecular Applications)

B. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Σε 10 μl κάθε προϊόντος της PCR προστίθενται 2 μl του περιοριστικού ενζύμου AlwI. Το μίγμα επωάζεται στους 37°C για τουλάχιστον 3 ώρες. Ακολουθεί ηλεκτροφόρηση σε πήγμα nusieve agarose. Η ηλεκτροφόρηση αυτή είναι πανομοιότυπη με αυτή του πηγματος απλής αγαρόζης. Η nusieve αγαρόζη επιτρέπει καλύτερο διαχωρισμό των τμημάτων του γενετικού υλικού με μικρό αριθμό βάσεων. Ο πολυμορφισμός PON1 Q192R οφείλεται στην αντικατάσταση του αμινοξέος γλουταμίνη (Q) από αργινίνη (R). Η παρουσία αυτού του πολυμορφισμού αντιστοιχεί σε 2 μπάντες μεγέθους 63 και 36 βάσεων, αντίστοιχα. Αντίθετα, η απουσία του αντιστοιχεί σε μία μπάντα περίπου 99 βάσεων (Εικόνα 5).





Εικόνα 5. Ο γενετικός πολυμορφισμός Q192R της PON1

III. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης για τον προσδιορισμό του πολυμορφισμού PON1 M55L της παραοξονάσης 1

III.A. PCR

Η αρχή της μεθόδου, τα όργανα, τα αντιδραστήρια και τα διαλύματα εργασίας έχουν ήδη περιγραφεί. Το γενετικό υλικό έχει απομονωθεί με τη γνωστή διαδικασία. Οι μόνες αλλαγές αφορούν στο ζεύγος των εκκινητών, στο μίγμα της PCR, καθώς και στο πρόγραμμα της PCR.

- Ζεύγος εκκινητών (forward:5'-gag tga tgt ata gcc cca gtt tc-3'
reverse:5'-agt cca tta ggc agt atc tcc g-3' PE Applied Biosystems CH).

- Σε αυτό το μίγμα PCR, τοποθετούνται 4.5 μl ddH₂O (αντί των 9.9 μl) και 5.5 μl MgCl₂ (50mM, GIBCO BRL). Τα υπόλοιπα αντιδραστήρια προστίθενται στις αναλογίες που έχουν ήδη περιγραφεί.

- Το πρόγραμμα της PCR για την ανεύρεση του πολυμορφισμού PON1 55ML της παραοξονάσης έχει ως εξής:

5 min στους 94°C (διαχωρισμός της διπλής έλικας του DNA) (1)

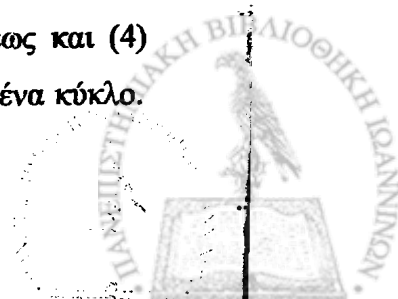
1 min στους 94°C (διαχωρισμός της διπλής έλικας του DNA) (2)

45 sec στους 61°C (σύνδεση των εκκινητών με το πρότυπο DNA) (3)

45 sec στους 72°C (επιμήκυνση) (4)

5 min στους 72°C (επιμήκυνση) (5)

Το στάδιο (1) πραγματοποιείται μόνο για ένα κύκλο. Τα στάδια (2) έως και (4) πραγματοποιούνται για 40 κύκλους. Τέλος, το στάδιο (5) ολοκληρώνεται σε ένα κύκλο.



Μετά την παραπάνω διαδικασία, το πολυμερισμένο γενετικό υλικό διατηρείται στους 4°C.

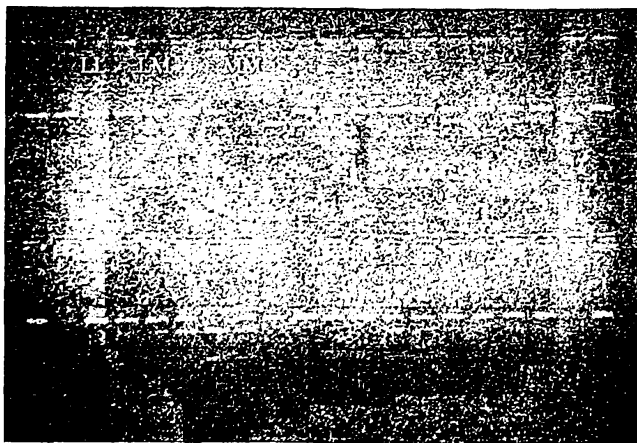
III.B. Ανίχνευση του πολυμορφισμού PON1 M55L με τη βοήθεια περιοριστικού ενζύμου

A. ΟΡΓΑΝΑ-ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

- Περιοριστικό ένζυμο Hinf I (5U/μl, New England Biolabs)
- Agarose (GIBCO BRL)

B. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

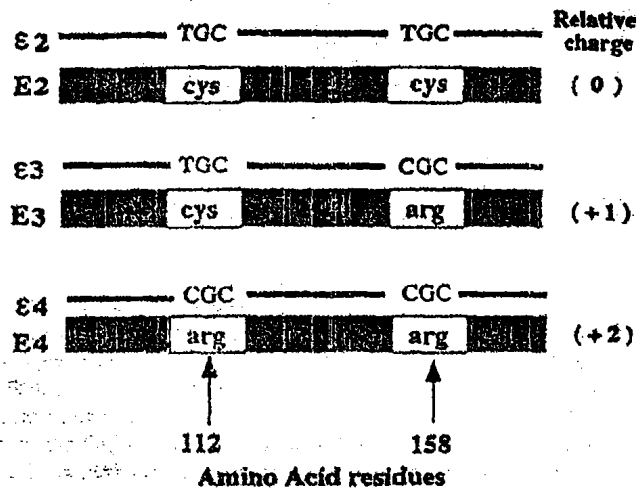
Σε 10 μl κάθε προϊόντος της PCR προστίθεται 1 μl του περιοριστικού ενζύμου Hinf I. Το μίγμα επωάζεται στους 37°C για 12 ώρες. Ακολουθεί ηλεκτροφόρηση σε πήγμα 2% αγαρόζης. Ο πολυμορφισμός PON1 M55L οφείλεται στην αντικατάσταση του αμινοξέος μεθειονίνη (M) από λευκίνη (L). Η παρουσία αυτού του πολυμορφισμού αντιστοιχεί σε 2 μπάντες μεγέθους 122 και 22 βάσεων, αντίστοιχα. Αντίθετα, η απουσία του αντιστοιχεί σε μία μπάντα περίπου 144 βάσεων (Εικόνα 6).



Εικόνα 6. Ο γενετικός πολυμορφισμός M55L της PON1

7.2.8. Προσδιορισμός των φαινοτύπων της ApoE

(Σχήμα 32)



Σχήμα 32. Οι γονοτυπικοί και φαινοτυπικοί πολυμορφισμοί της ApoE

7.2.8.1. Μέθοδος ισοηλεκτρικής εστίασης (IEF) των πρωτεϊνών των πολύ χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεϊνών (apoVLDL's)

A. ANTIΔΡΑΣΤΗΡΙΑ-ΟΡΓΑΝΑ

- Ammonium persulfate [APS] (Bio-Rad Lab)
- Ampholine pH 4.0-6.0 for IEF (Pharmacia Biotech AB, Sweden)
- TEMED [N,N,N',N'-Tetra-methyl-ethylenediamine] (Bio-Rad Lab)
- α-DTT (Sigma Chemical Co)
- Diethylether (MERCK)
- Ethyl-Alcohol (RPE)
- Acetone (LAB-SCAN)
- Urea (MERCK)
- Sodium Hydroxide pellets (MERCK)
- Αλβουμίνη βοδινού ορού (BSA, Sigma)
- Acrylamide 99.9% [CH₂CHCONH₂] (Bio-Rad Lab)
- Bis-acrylamide (Bio-Rad Lab)
- Orthophosphoric acid 85% (MERCK)



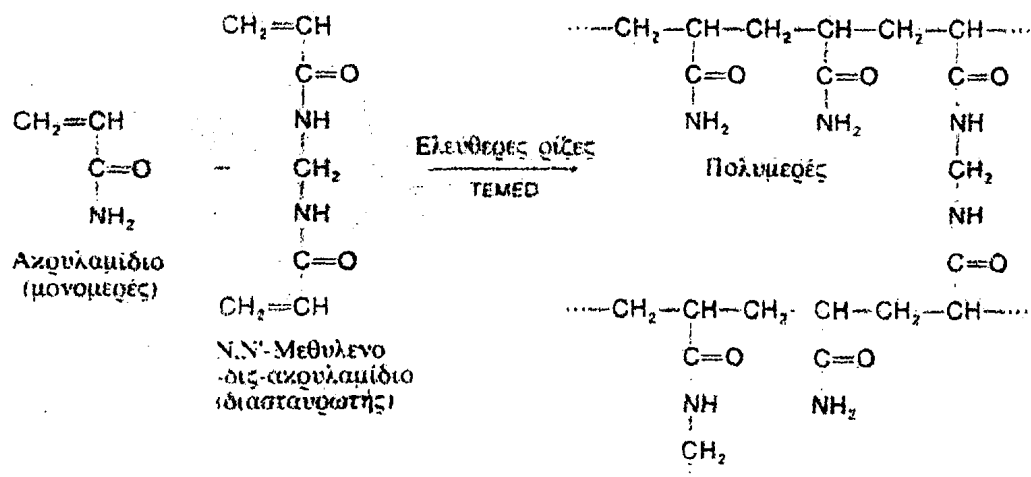
- Acide-acetique (Carlo Erba Reagenti, RDE)
- Garamycin
- KBr (dehydrated)
- Tris HCl (MERCK)
- Tris-Base (MERCK)
- Bleu de Coomassie R250 (SIGMA)
- Φυγόκεντρος πάγκου (Hermle, Z 320)
- Υπερφυγόκεντρος BECKMAN
- Ρότορας NVT-100
- Σωληνάκια υπερφυγοκέντρου BECKMAN
- Φασματοφωτόμετρο SpectraMax 190 (Molecular Devices)
- Συσκευή ηλεκτροφόρησης HOEFER LAGON SE 600 + Τροφοδοτικό
- Χτενάκια: Combs 10 wells/1.5mm (Pharmacia Biotech AB, Sweden)
- Σύριγγα Hamilton
- Recombinant human Apolipoprotein E2 (Catalog No AL02), E3 (AL03), E4 (AL04) (Oxford Biochemical Research)
- Αναλυτικός ζυγός
- pHμετρο

B. ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

1. **Διάλυμα Acrylamide-Bisacrylamide:** Διαλύονται 48.6 gr Acrylamide + 1.3 gr Bisacrylamide σε 100 ml dH₂O. Η διαδικασία γίνεται πάντα με μάσκα και γάντια εξαιτίας του κινδύνου νευροτοξικότητας. Το διάλυμα διατηρείται σε θερμοκρασία δωματίου έως 3 μήνες.
2. **Διάλυμα APS 10% (Ammonium persulfate 10%):** Διαλύεται 1 gr APS σε 10 ml dH₂O. Το διάλυμα διατηρείται στη συντήρηση του ψυγείου (+4 °C).
3. **Διάλυμα α-DTT 1M:** Διαλύεται 0.1542 gr α-DTT σε 1 ml dH₂O. Το διάλυμα διατηρείται στην κατάψυξη.
4. **Διάλυμα Tris-HCl 10 mM/pH 8.6:** Διαλύονται 4.44 gr Tris-HCl + 2.64 gr Tris-Base σε 100 ml dH₂O και το pH ρυθμίζεται στο 8.6. Το διάλυμα διατηρείται στους +4 °C.
5. **Διάλυμα Tampon de Dissolution:** 50 μl DTT (10 mM) + 2.4 gr Urea 8M + 100 μl Tris-HCl 10 mM/ pH 8.6 + dH₂O έως τελικού όγκου 5 ml.



6. **Solution de Depot:** 1 ml Tampon de Dissolution + 1 ml dH₂O + 20 μl Ampholine (pH 4-6).
7. **Tampon Cure Superieure:** 0.74 gr NaOH σε 1 Lt dH₂O (20mM).
8. **Tampon Cure Inferieure:** 5.8 ml Orthophosphoric acid 85% σε 5 Lt dH₂O.
9. **Διάλυμα χρωστικής:** 1 gr Bleu de Coomasie R250 + 250 ml Ethanol + 100 ml AcideAcetique + 450 ml dH₂O.
10. **Διάλυμα αποχρωστικής:** 300 ml Ethanol + 100 ml AcideAcetique + 600 ml dH₂O.
11. **Gel (πηκτική) ηλεκτροφόρησης:** α) Διαλύονται 19.2 gr Urea σε 15 ml dH₂O υπό συνεχή θέρμανση-ανάδευση. Αφού διαλυθεί πλήρως αφήνουμε το διάλυμα να κρυώσει και αφού βεβαιωθούμε ότι είναι διαυγές προσθέτουμε: 6 ml από το διάλυμα Acrylamide-Bisacrylamide + 2 ml Ampholine (pH 4-6) + dH₂O έως τελικό όγκο 40 ml (πάντα υπό ανάδευση), β) την τελευταία στιγμή πριν μεταγγίσουμε το παραπάνω διάλυμα στη συσκευή της ηλεκτροφόρησης προσθέτουμε: 40 μl TEMED + 160 μl διαλύματος APS 10% ώστε να γίνει ο πολυμερισμός του ακρυλαμιδίου και να σχηματιστεί το gel εντός της συσκευής (Σχήμα 33).



Σχήμα 33. Σχηματισμός πηκτής πολυακρυλαμιδίου

12. **10% Na₂EDTA pH 7.4:** 12.8247 gr EDTA Na₂·2H₂O διαλύονται σε 100 ml dH₂O. Το διάλυμα διατηρείται στους 4°C.
13. **Διάλυμα 1006 για την απομόνωση των VLDL:** 6.23 gr KBr (dehydrated) + 2.5 ml 10% Na₂EDTA pH 7.4 + 625 μl Garamycin + dH₂O έως τελικού όγκου 500 ml.

14. Διάλυμα 1.210 για την απομόνωση των HDL: 31.806 gr KBr (dehydrated) + 500 μl 10% Na₂EDTA pH 7.4 + 125 μl Garamycin + dH₂O έως τελικού όγκου 100 ml.

15. Πρότυπα διαλύματα αλβουμίνης βούς (BCA): 2 gr/L, 1 gr/L, 0.8 gr/L, 0.6 gr/L, 0.4 gr/L, 0.2 gr/L (διατηρούνται στη κατάψυξη).

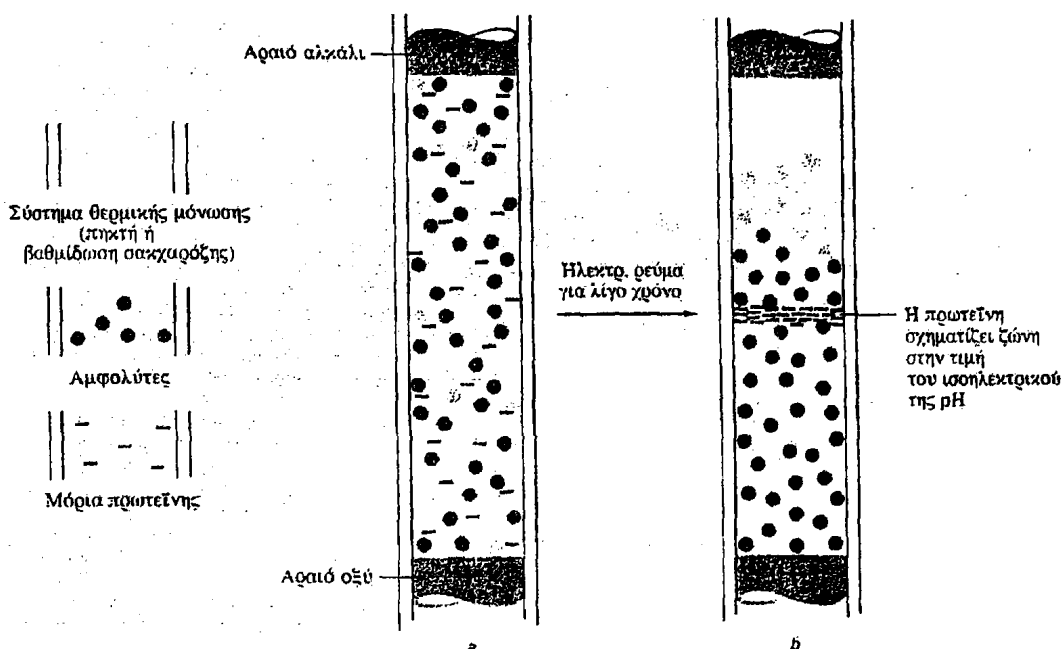
16. Working reagent για τον προσδιορισμό πρωτεΐνης: Reagent A + Reagent B σε αναλογία 50:1.

Γ. ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ^{424,425,426,427}

Το πρώτο βήμα για την εφαρμογή αυτής της μεθόδου είναι η απομόνωση των VLDL σωματιδίων με υπερφυγοκέντρηση. Στη συνέχεια ακολουθεί το στάδιο της απολιπίδωσης, ώστε να έχουμε κεκαθαρωμένες apoVLDL's. Τέλος, γίνεται ηλεκτροφόρηση αυτών των apoVLDL's με τη μέθοδο της ισοηλεκτρικής εστίασης (IEF).

Η μέθοδος της ισοηλεκτρικής εστίασης μπορεί να διαχωρίζει τις ισομορφές της ApoE και στηρίζεται στη σχετική διαφορά ηλεκτρικού φορτίου που υπάρχει μεταξύ τους (Σχήμα 32). Αυτή η μέθοδος βασίζεται στην παρουσία συστήματος αμφολυτών (ampholine) εντός της πηκτής (gel) της ηλεκτροφόρησης. Οι αμφολύτες είναι μικρού μοριακού βάρους πολυμερή (MB ~ 5.000) που περιέχουν τυχαίες κατανομές ασθενών οξέων και βάσεων (καρβοξύλια, ιμιδαζόλια, αμίνες κ.α). Αυτό το σύστημα ενώνεται με ηλεκτρόδια αραιού οξέος και βάσης και εφαρμόζεται ένα δυναμικό με αποτέλεσμα τη ροή ρεύματος (Σχήμα 34a). Έτσι, οι αμφολύτες μετατοπίζονται σύμφωνα με τη κατανομή των φορτίων τους. Η παραπάνω διαδικασία έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία μιας βαθμίδωσης (gradient) pH εντός του gel. Οι πρωτεΐνες που τρέχουν στην ηλεκτροφόρηση μετατοπίζονται σε περιοχές pH, στις οποίες οι ηλεκτροστατικές δυνάμεις που ασκούνται πάνω στο μόριό τους εξισώνονται, δηλαδή εκεί που το pH του gel εξισώνεται με το ισοηλεκτρικό τους σημείο (Σχήμα 34b). Έτσι, τα μόρια της ApoE4 (που έχει σχετικό φορτίο 2+) παραμένουν στην αρχή της πηκτής (αρνητικός πόλος), τα μόρια της ApoE3 (1+ σχετικό φορτίο) μετακινούνται σε ενδιάμεση θέση (που ταυτίζεται με τη θέση που μετακινείται η pre-ApoA1 πρωτεΐνη των HDL, η οποία χρησιμοποιείται ως μάρτυρας), ενώ τα μόρια της ApoE2 (0 σχετικό φορτίο) μετακινούνται προς το τέλος της πηκτής (θετικός πόλος). Τέλος, η εμφάνιση των πρωτεϊνών γίνεται με τη βοήθεια ειδικής χρωστικής (Εικόνα 7).





Σχήμα 34. Ισοηλεκτρική εστίαση (IEF)

Δ. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΑ ΣΤΑΔΙΑ

ΣΤΑΔΙΟ Ι: ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΤΩΝ VLDL ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ ΥΗΣ ΥΠΕΡΦΥΓΟΚΕΝΤΡΗΣΗΣ

- 1) Το ολικό αίμα (~ 12 ml) συλλέγεται σε μπουκαλάκια που περιέχουν ως αντιπηκτικό 1 ml EDTA ανά ml αίματος.
- 2) Το ολικό αίμα φυγοκεντρείται στις 3.000 στροφές/min για 13 min και ακολούθως λαμβάνουμε το πλάσμα.
- 3) Στο πλάσμα προσθέτουμε 5 ml διαλύματος 10% Na₂EDTA pH 7.4 ανά ml πλάσματος + 1.25 ml Garamycin ανά ml πλάσματος και το φυλλάσουμε στους 4 °C για λίγες ημέρες ή στους -80 °C για μεγάλο χρονικό διάστημα.
- 4) Μεταφέρουμε το πλάσμα (~ 3-4 ml) στα ειδικά μπουκαλάκια τύπου Beckman και συμπληρώνουμε με διάλυμα 1006 (για την απομόνωση των VLDL) χωρίς να δημιουργηθούν φυσαλλίδες.
- 5) Ζυγοσταθμίζουμε τα μπουκαλάκια με ακρίβεια ενός πρώτου δεκαδικού ψηφίου και στη συνέχεια τα κλείνουμε με προσοχή χρησιμοποιώντας ειδική συσκευή που αναπτύσσει θερμοκρασία 700 °F.
- 6) Τοποθετούμε τα μπουκαλάκια εντός του ρότορα NVT-100.



- 7) Ρυθμίζουμε τις ενδείξεις της υπερφυγοκέντρου ως εξής: Στροφές = 40.000/min, θερμοκρασία = 15 °C, Break = Off, Hold = Off, Vacuum = On και αρχίζουμε την υπερφυγοκέντρωση (διάρκεια ~ 10 ώρες).
- 8) Μετά το τέλος της υπερφυγοκέντρωσης κόβουμε με το ψαλίδι το πώμα από το κάθε μπουκαλάκι και με σύριγγα ανακτούμε την VLDL που βρίσκεται αμέσως κάτω από το πώμα έως εκεί που αρχίζει η ζώνη της LDL (κίτρινη μπάντα).
- 9) Εάν αντί για VLDL θέλουμε να απομονώσουμε την HDL (η οποία χρησιμοποιείται ως μάρτυρας κατά τη διάρκεια της ηλεκτροφόρησης), τότε η παραπάνω διαδικασία τροποποιείται ως εξής: στο πλάσμα προσθέτουμε διάλυμα 1.210 για την απομόνωση των HDL και μετά το τέλος της υπερφυγοκέντρωσης ανακτούμε μίγμα HDL + πρωτεΐνες. Στο παραπάνω μίγμα προσθέτουμε ποσότητα KBr (gr) = όγκος του μίγματος (ml) x 0.2199 και στη συνέχεια προσθέτουμε εκ νέου διάλυμα 1.210. Ακολουθεί νέα υπερφυγοκέντρωση και στο υπερκείμενο λαμβάνουμε την καθαρή HDL. Κατά αυτό τον τρόπο δημιουργούμε ένα απόθεμα HDL που φυλάσσεται στους 4 °C.

ΣΤΑΔΙΟ ΙΙ: ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ ΠΟΥ ΠΕΡΙΕΧΕΤΑΙ ΣΤΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΤΩΝ VLDL ΚΑΙ HDL

- 1) Αποψύχουμε τα πρότυπα διαλύματα αλβουμίνης βοός (BCA) σε ζεστό νερό και τα ανακινούμε με Vortex.
- 2) Αραιώνουμε τα δείγματά μας με διάλυμα PBS pH 7.4: Συνήθως αραιώνουμε 1:10 την VLDL (50 μl δείγματος + 500 μl PBS) και 1:1 την HDL (50 μl δείγματος + 50 μl PBS).
- 3) Στην 1^η στήλη της ειδικής κυψελίδας τοποθετούμε με τη σειρά: 10 μl dH₂O, 10 μl BCA 1 g/L, 10 μl BCA 0.8 g/L κ.τ.λ και τέλος 10 μl BCA 0.2 g/L.
- 4) Στις υπόλοιπες στήλες τοποθετούμε 10 μl από τα αραιωμένα δείγματα εις διπλούν.
- 5) Παρασκευάζουμε το διάλυμα εργασίας (working reagent) για τον προσδιορισμό της πρωτεΐνης, όπως περιγράφεται παραπάνω. Παίρνουμε 200 μl αυτού του διαλύματος εργασίας με την οκτακάναλη πολυπιπέτα και γεμίζουμε διαδοχικά όλες τις θέσεις της κυψελίδας.
- 6) Επωάζουμε την κυψελίδα στους 37 °C για 30 min.
- 7) Μετράμε φωτομετρικά τις συγκεντρώσεις των πρωτεϊνών στο ειδικό φωτόμετρο, θέτοντας τιμή Mpas = 550 nm και τιμή Ref = 620 nm.



- 8) Με βάση τα παραπάνω αποτελέσματα δημιουργούμε την πρότυπη καμπύλη απορρόφησης-συγκέντρωσης και από αυτή υπολογίζουμε τη συγκέντρωση πρωτεΐνης σε κάθε δείγμα (αφού πρώτα πολλαπλασιάσουμε επί το συντελεστή αραίωσης του δείγματος, π.χ. x 11 για αραίωση 1:10).
- 9) Τέλος, υπολογίζουμε τον όγκο του δείγματος στον οποίο περιέχεται 1 mg πρωτεΐνης.

ΣΤΑΔΙΟ ΙΙΙ: ΑΠΟΛΙΠΙΔΩΣΗ

- Στο στάδιο αυτό δουλεύουμε τα δείγματά πάντα μέσα σε μια λεκάνη με πάγο.
- 1) Τοποθετούμε στα ειδικά βιδωτά σωληνάκια τον επιθυμητό όγκο δείγματος (που περιέχει 1 mg πρωτεΐνης).
 - 2) Προσθέτουμε σε κάθε σωληνάκι 10 ml μίγματος αιθανόλης : ακετόνης 1:1 και τα ανακινούμε με Vortex. Τέλος, τοποθετούμε τα δείγματα όλη τη νύχτα (overnight) στους $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.
 - 3) Την επόμενη ημέρα βγάζουμε τα δείγματα από τους $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ και τα ανακινούμε με Vortex. Φυγοκέντρούμε τα δείγματα στις 2.000 στροφές/min x 10 min. Τέλος, αποχύνουμε το υπερκείμενο και κρατάμε το ίζημα.
 - 4) Προσθέτουμε σε κάθε σωληνάκι επιπρόσθετα 10 ml του μίγματος αιθανόλης : ακετόνης 1:1, ανακινούμε τα δείγματα με Vortex και τα τοποθετούμε στους $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ για 30 min. Ακολούθως, ανακινούμε τα δείγματα με Vortex και τα φυγοκεντρούμε στις 2.000 στροφές/min x 10 min. Τέλος, αποχύνουμε το υπερκείμενο και κρατάμε το ίζημα.
 - 5) Προσθέτουμε σε κάθε σωληνάκι επιπρόσθετα 10 ml αιθέρα, ανακινούμε με Vortex και φυγοκεντρούμε στις 2.000 στροφές/min x 10 min. Τέλος, αποχύνουμε το υπερκείμενο και κρατάμε το ίζημα.
 - 6) Προσθέτουμε στο ίζημα 10 μl α-DTT 1M.
 - 7) Αφήνουμε τα δείγματα στον απαγωγό μέχρι να εξατμισθεί πλήρως ο αιθέρας. Αυτή η διαδικασία μπορεί να επιταχυνθεί με τη χρήση ζεστού νερού και συστήματος αζώτου.
 - 8) Φυλάσσουμε το ίζημα των πρωτεϊνών στους $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.



ΣΤΑΔΙΟ IV: ΕΠΑΝΑΔΙΑΛΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΟΥ ΙΖΗΜΑΤΟΣ

Στο πρωτεϊνικό ίζημα προσθέτουμε 400 μl διάλυμα Tampon de Dissolution και ανακινούμε με Vortex.

ΣΤΑΔΙΟ V: ΙΣΟΗΛΕΚΤΡΙΚΗ ΕΣΤΙΑΣΗ (IEF)

- 1) Προετοιμασία της συσκευής ηλεκτροφόρησης (HOEFER LAGON SE 600)
 - α) Τοποθετούμε εντός της συσκευής το σύστημα ψύξης με τους σωλήνες νερού ώστε τα ηλεκτρόδια να είναι προς τα δεξιά. Στη συνέχεια ανοίγουμε τη βρύση ώστε να γεμίσουν οι σωλήνες με νερό.
 - β) Αλφαδιάζουμε με προσοχή το εξάρτημα της συσκευής για τη στήριξη των υάλινων πλακών. Υπάρχουν δύο θέσεις για να τοποθετηθούν αντίστοιχα gel που θα τρέχουν ταυτόχρονα. Αν όμως χρησιμοποιήσουμε μόνο τη μία θέση, τότε στην άλλη βιδώνουμε μία χοντρή γυάλινη πλάκα.
 - γ) Σε κάθε μία από τις παραπάνω θέσεις βιδώνουμε σφιχτά τις δύο λεπτές γυάλινες πλάκες που ανάμεσά τους θα τοποθετηθεί το gel της ηλεκτροφόρησης, αφού πρώτα έχουν επιμελώς καθαρισθεί με αιθανόλη. Μεταξύ τους τοποθετούμε στο πλάι δύο ειδικά spacer-λαστιχάκια και στο πάνω μέρος το ειδικό χτενάκι (comb 10 wells / 1.5mm).
- 2) Αμέσως μετά την προσθήκη των αντιδραστηρίων πολυμερισμού στο gel της ηλεκτροφόρησης, αρχίζουμε να γεμίζουμε το διάκενο μεταξύ των δύο λεπτών γυάλινων πλακών με μία σύριγγα.
- 3) Περιμένουμε ~ 1 ώρα για να ολοκληρωθεί ο πολυμερισμός του gel και στη συνέχεια αφαιρούμε προσεκτικά το χτενάκι και γεμίζουμε τις κυψέλες που έχουν δημιουργηθεί με dH₂O.
- 4) Αφαιρούμε το dH₂O από τις κυψέλες με τη βοήθεια σύριγγας και διηθητικού χαρτιού.
- 5) Τοποθέτηση των δειγμάτων εντός των κυψελών (από κάτω προς τα επάνω):
 - Χρησιμοποιούμε την ειδική σύριγγα Hamilton.
 - α) 100 μl από το διάλυμα της επαναδιαλυτοποιημένης πρωτεΐνης (περιέχει 250 μg πρωτεϊνών των VLDL ή 100 μg πρωτεϊνών των HDL).
 - β) 100 μl από το διάλυμα Solution de Depot.
 - γ) 100 μl από το διάλυμα Tampon Cure Superieure.



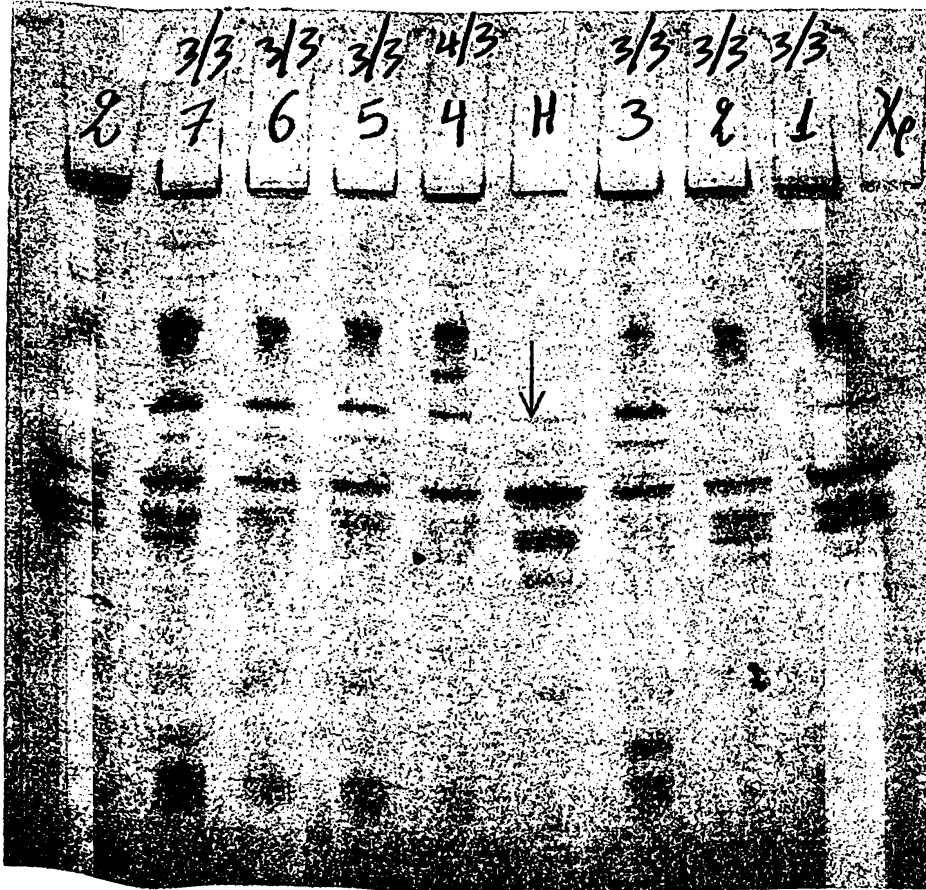
- Μεταξύ αυτών των τριών διαλυμάτων δημιουργείται σαφές επίπεδο διαχωρισμού (gradient).
 - Στη μεσαία κυψέλη τοποθετούμε πάντα δείγμα που περιέχει HDL, γιατί η ανάγνωση των ισομορφών της ApoE γίνεται συγκριτικά με τις μπάντες των αποπρωτεϊνών των HDL.
- 6) Γεμίζουμε το χώρο της συσκευής μεταξύ των σωλήνων του νερού με ~ 3.5 L διαλύματος Tampon Cure Inferieure.
 - 7) Πάνω από τις πλάκες που περιέχουν το gel της ηλεκτροφόρησης και τα δείγματα βιδώνουμε την ειδική σκάφη της συσκευής και τοποθετούμε αυτό το σύστημα μέσα στη συσκευή ιπαστί στο σύστημα των σωλήνων του νερού.
 - 8) Γεμίζουμε την ειδική σκάφη με διάλυμα Tampon Cure Superieure ώστε να επικοινωνούν τα δύο διαμερίσματά της.
 - 9) Κλείνουμε τη συσκευή και συνδέουμε το τροφοδοτικό μηχανήμα.
 - 10) Ρυθμίζουμε το τροφοδοτικό στα 200 V/20 mA για 1 ώρα και μετά στα 400 V/20 mA για 15 ακόμη ώρες.

ΣΤΑΔΙΟ VI: ΕΜΦΑΝΙΣΗ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ ΤΗΣ ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗΣ

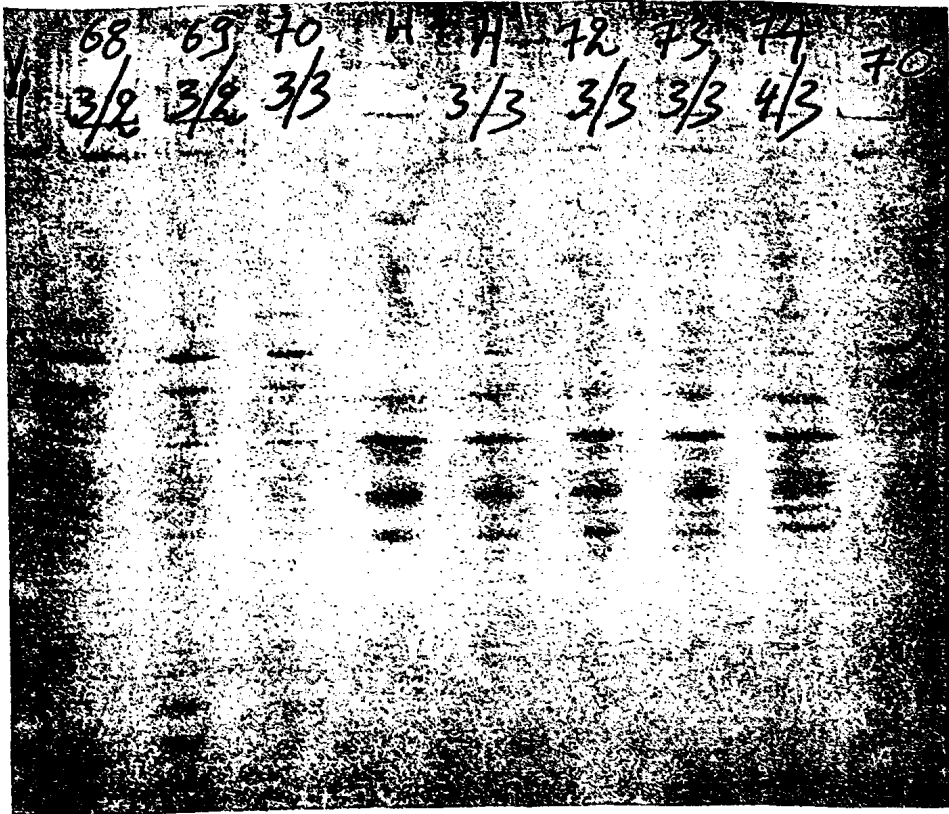
- 1) Παίρνουμε το gel, αφού ξεβιδώσουμε τις γυάλινες πλάκες και (πάντα με γάντια) το τοποθετούμε (με πολλή προσοχή για να μη διαπλώσει και σπάσει) μέσα σε μία λεκάνη που περιέχει το διάλυμα της χρωστικής (Bleu de Coomassie R250) για 2 ώρες.
- 2) Αποχύνουμε τη χρωστική, μετά προσθέτουμε το διάλυμα της αποχρωστικής και αφήνουμε για τουλάχιστον 6 ώρες.
- 3) Αποχύνουμε την αποχρωστική και προσθέτουμε νέα ποσότητα αποχρωστικής για ακόμη μερικές ώρες.
- 4) Αποχύνουμε πάλι την αποχρωστική, προσθέτουμε dH₂O και φωτογραφίζουμε το gel με τις εμφανισθείσες μπάντες (Εικόνα 7).
- 5) Η ανάγνωση των ισομορφών της ApoE γίνεται συγκριτικά με τις μπάντες των αποπρωτεϊνών της HDL που έχει τρέξει στο μέσο της ηλεκτροφόρησης. Πιο συγκεκριμένα, αναγνωρίζουμε τη μπάντα της pre-AI (βέλος στην εικόνα 6A) και ό,τι βρίσκεται στην ίδια θέση με αυτή είναι η ApoE3, ό,τι βρίσκεται υψηλότερα είναι η ApoE4 και ό,τι βρίσκεται χαμηλότερα είναι η ApoE2. Επιπρόσθετα πρέπει να σημειωθεί ότι αξιολογούμε τις έντονες μπάντες γιατί οι ασθενείς μπάντες (faint

bands) αντιστοιχούν στις γλυκοζυλιωμένες μορφές της ApoE (Σχήμα 35). Τέλος, παίρνουμε πληροφορίες και για τις ApoC's των VLDL (Σχήμα 35).

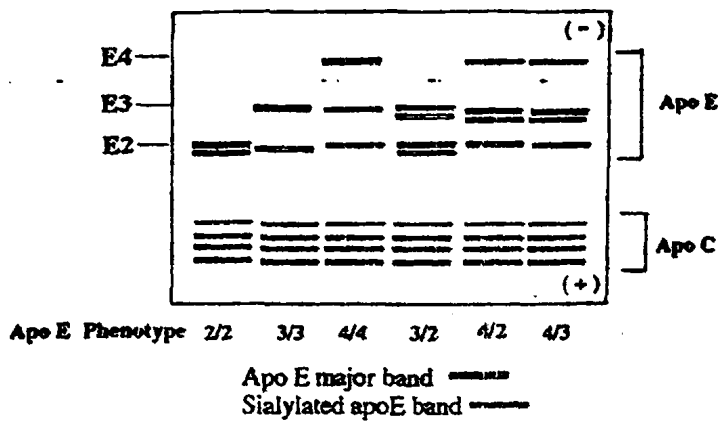
A.



B.



Εικόνα 7 (A + B). Οι φαινότυποι της ApoE με τη μέθοδο της ισοηλεκτρικής εστίασης των πρωτεϊνών των VLDL



Σχήμα 35. Σχηματική αναπαράσταση της ανίχνευσης των ισομορφών της ApoE με τη μέθοδο της ισοηλεκτρικής εστίασης των πρωτεϊνών των VLDL



Ε. ΜΕΙΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

- 1) Απαιτεί μεγάλη ποσότητα ορού (~ 3-4 ml).
- 2) Απαιτεί το χρονοβόρο στάδιο της απομόνωσης των VLDL με τη μέθοδο της υπερφυγοκέντρωσης. Επιπρόσθετα, μόνο το 40-50% της ολικής ApoE του ορού βρίσκεται στις VLDL, ενώ η υπόλοιπη βρίσκεται στις HDL. Έτσι, η μέθοδος χάνει την ευαισθησία της στις περιπτώσεις στις οποίες η συγκέντρωση της VLDL είναι χαμηλή. Ο τελευταίος περιορισμός δεν φαίνεται να αποτελεί ιδιαίτερο πρόβλημα στη μελέτη ασθενών με νεφρικά νοσήματα, οι οποίοι, όπως έχει ήδη αναφερθεί, έχουν αυξημένα επίπεδα VLDL.
- 3) Απαιτεί την απομόνωση των HDL, οι πρωτεΐνες της οποίας χρησιμοποιούνται ως μάρτυρας για την ανάγνωση των ισομορφών της ApoE.
- 4) Απαιτεί χρόνο πολλών ημερών για την ολοκλήρωσή της.
- 5) Δεδομένου του γεγονότος ότι η ανάγνωση των ισομορφών βασίζεται σε βαφή με χρωστική που χρωματίζει όλες τις πρωτεΐνες, η παρουσία επιμολύνσεων στο κλάσμα των VLDL (π.χ από ApoAI) μπορεί να οδηγήσει σε σύγχυση στην αξιολόγηση των αποτελεσμάτων.
- 6) Η παρουσία μετα-μεταφραστικών (post-translational) τροποποιήσεων, και κυρίως γλυκοζυλίωσης, στα μόρια της ApoE αλλάζει την ηλεκτροφορητική κινητικότητα τους (π.χ η γλυκοζυλιωμένη ApoE3 μετακινείται στη θέση της ApoE2), με αποτέλεσμα τη δημιουργία σύγχυσης στην ανάγνωση των αποτελεσμάτων. Επιπρόσθετα, όπως έχει ήδη αναφερθεί, η συγκέντρωση της ApoE είναι μεγαλύτερη όταν υπάρχει η ApoE2 ισομορφή και μικρότερη όταν υπάρχει η ApoE4 ισομορφή. Κατά συνέπεια, η ανάγνωση των ισομορφών στηρίζεται στην υποκειμενική εκτίμηση της σχετικής έντασης του σήματος που δίνουν οι μπάντες των πρωτεϊνών.

ΣΤ. ΠΛΕΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

- 1) Παρέχει πληροφορίες και για τις ισομορφές των ApoC's (π.χ. έλλειψη ApoC-II ως σπάνιο αίτιο χυλομικροναιμίας).
- 2) Παρέχει πληροφορίες για τις μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις των μορίων της ApoE.
- 3) Επιτρέπει τη μέτρηση των ποσοτικών χαρακτηριστικών της VLDL που έχει απομονωθεί και τον ακριβή προσδιορισμό της LDL χοληστερόλης, ιδιαίτερα όταν τα τριγλυκερίδια του ορού είναι >400 mg/dl.



4) Μπορεί εύκολα να εφαρμοσθεί σε ένα συνηθισμένο ερευνητικό βιοχημικό εργαστήριο.

7.2.8.2. Μέθοδος της Ανοσοαποτύπωσης (Immunoblotting)

A. ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ-ΟΡΓΑΝΑ

- Νευραμινιδάση (N-2876, SIGMA)
- Nonidet P40 (Fluha-Biochemika)
- Γάλα αποβουτυρωμένο σε σκόνη
- Sodium acetate
- Rabbit anti-goat IgG (H + L) αντισώματα (ZYMED) [φυλάσσονται στους 4 °C]
- Goat anti-Human anti-ΑροΕ αντισώματα⁴²⁸ (DADE BEHRING) [φυλάσσονται στους -20 °C]
- Bromophenol Blue (FERAK-BERLIN)
- Κιτρικό νάτριο (MERCK)
- β-Mercaptoethanol (SIGMA CHEMICAL Co)
- Ammonium persulfate [APS] (Bio-Rad Lab)
- Ampholine pH 4.0-6.0 for IEF (Pharmacia Biotech AB, Sweden)
- TEMED [N,N,N',N'-Tetra-methyl-ethylenediamine] (Bio-Rad Lab)
- Diethylether (MERCK)
- Ethyl-Alcohol (RPE)
- Acetone (LAB-SCAN)
- Urea (MERCK)
- Sodium Hydroxide pellets (MERCK)
- Acrylamide 99.9% [CH₂CHCONH₂] (Bio-Rad Lab)
- Bis-acrylamide (Bio-Rad Lab)
- α-DTT (Sigma Chemical Co)
- Orthophosphoric acid 85% (MERCK)
- NaCl
- Tris-Base (MERCK)
- Tween-20
- Glycine
- SDS (Sodium Dodecyl Sulfate)



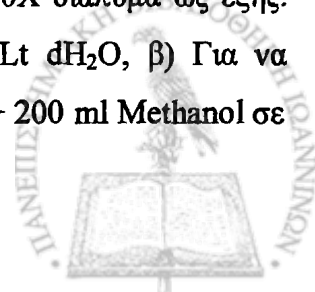
- Αντιδραστήριο χημειοφωταύγειας [Λουμινόλη (μαύρο μπουκάλι)+ αντιδραστήριο οξειδωσης της λουμινόλης (λευκό μπουκάλι)] [Western Blot Chemiluminescence, Reagent plus, NEMTM]
- Developer + Fixer για film (αραίωση 1:5, Kodak)
- PVDF μεμβράνη
- Μεμβράνη Nitrocellulose (pore size) 0.45 μm
- Μεμβράνη τροφίμων
- Films
- Hypercassete
- Ψαλίδι
- Συσκευή ηλεκτροφόρησης (Mini Protean II, BioRad)
- Τροφοδοτικό
- Συσκευή ηλεκτροαποτύπωσης
- Χτενάκια
- Brophenol Blue
- Acide-acetique (Carlo Erba Reagenti, RDE)
- Methanol
- Σφουγγαράκια Schotch Bright
- Διηθητικά χαρτιά (7 x 10 cm)
- Recombinant human Apolipoprotein E2 (Catalog No AL02), E3 (AL03), E4 (AL04) (Oxford Biochemical Research)

B. ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

1. **Διάλυμα Sodium Acetate 20 mM (pH 5.1):** Διαλύουμε 0.1640 gr σε 100 ml dH_2O και ρυθμίζουμε το pH στο 5.1. Διατηρείται σε θερμοκρασία δωματίου.
2. **Διάλυμα νευραμινιδάσης 1 mU/μl:** Διαλύουμε τη στερεή νευραμινιδάση (2.5 U) σε 2.5 ml Sodium Acetate 20 mM (pH 5.1). Ακολουθεί αργή ανακίνηση και μοίρασμα σε erperdoff (360 μl). Αποθηκεύουμε στους -20°C .
3. **Διάλυμα επαναδιαλυτοποίησης του πρωτεϊνικού ιζήματος:** 48 gr Urea + 2 ml Nonidet + 5 ml β -Mercaptoethanol + 800 μl Ampholine + dH_2O έως τελικού όγκου 100 ml. Χρειάζεται μεγάλη προσοχή (γάντια-μάσκα-απαγωγός) στην παρασκευή του διαλύματος, διότι η β -Mercaptoethanol είναι εξαιρετικά τοξική.



4. **Gel (πηκτή) για την ηλεκτροφόρηση:** 5 gr Acrylamide + 0.43 gr Bis-acrylamide + 2.5 ml Ampholine + 48 gr Urea + 0.1 ml Nonidet + dH₂O έως τελικού όγκου 100 ml. Αμέσως πριν την τοποθέτηση του διαλύματος στη συσκευή της ηλεκτροφόρησης προσθέτουμε στα 15 ml αυτού του διαλύματος: 15 μl TEMED + 60 μl APS 10%. Ισχύουν οι προφυλάξεις που έχουν ήδη αναφερθεί για τη χρήση του Acrylamide.
5. **Διάλυμα Buffer που τοποθετείται πάνω από τα δείγματα:** 24 gr Urea + 1 ml Ampholine + 0.025 gr Bromphenol Blue + dH₂O έως τελικού όγκου 100 ml. Πριν την εφαρμογή του το παραπάνω διάλυμα αραιώνεται σε ίσο όγκο dH₂O.
6. **Κατιονικό Buffer φωσφορικού οξέος 10 mmol/L:** 1 ml Orthophosphoric acid 85% σε 1 Lt dH₂O.
7. **Ανιονικό Buffer καυστικού νατρίου 20 mmol/L:** 0.8 gr NaOH σε 1 Lt dH₂O.
8. **Blotting buffer για Nitrocellulose μεμβράνη:** 7 ml Acide-acetique σε 1 Lt dH₂O.
9. **Blotting buffer για PVDF μεμβράνη:** 100 ml διαλύματος Transfer 10x (βλέπε παρακάτω) + 200 ml Methanol + 700 ml dH₂O. Η μεμβράνη PVDF ενεργοποιείται ως εξής: α) εμβαπτίζεται σε μεθανόλη για 5 min (αποκτά γκρι απόχρωση), β) εμβαπτίζεται σε dH₂O για 30 min και γ) λίγο πριν την έναρξη της ηλεκτροαποτόπωσης (electroblotting) εμβαπτίζεται μαζί με τα διηθητικά χαρτιά και τα Schotch Bright σφουγγαράκια στο παραπάνω blotting buffer.
10. **Διάλυμα TBS 10X (Tris-Buffered Saline) pH 7.4:** 5.84 gr NaCl + 2.44 gr Tris-base σε 1 Lt dH₂O και ρυθμίζουμε το pH στο 7.4. Παίρνουμε 100 ml από το stock 10x και προσθέτουμε 900 ml dH₂O. Έτσι, παρασκευάζουμε το διάλυμα TBS 1x (δεν παραλείπουμε να ρυθμίσουμε εκ νέου το pH στο 7.4).
11. **Διάλυμα Tween 20 10%:** 10 ml Tween 20 + 90 ml dH₂O
12. **Διάλυμα TBS-γάλα 5%:** Διαλύονται 5 gr σκόνης αποβουτυρωμένου γάλατος σε TBS 1X έως τελικού όγκου 100ml.
13. **Διάλυμα TBS-γάλα 0.5%:** Διαλύονται 0.5 gr σκόνης αποβουτυρωμένου γάλατος σε TBS 1X έως τελικού όγκου 100ml.
14. **Διάλυμα TBS- Tween 20 0.2 ml/L:** Διαλύεται 1 ml διαλύματος Tween 20 10% σε 100 ml TBS 1x
15. **Διάλυμα Transfer Blot:** α) Πρώτα παρασκευάζονται το 10X διάλυμα ως εξής: 30.3 gr Tris-base + 144 gr Glycine + 5 gr SDS σε 1 Lt dH₂O, β) Για να παρασκευασθεί το 1x διάλυμα: 100 ml από το 10x διάλυμα + 200 ml Methanol σε 1 Lt dH₂O.



Γ. ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ^{429,430,431}

Αυτή η μέθοδος χρησιμοποιεί ολικό ορό ή πλάσμα και όχι απομονωμένες apoVLDL's. Αρχικά γίνεται κατεργασία του δείγματος με νευραμινιδάση, ώστε να διασπασθούν οι σιαλικοί δεσμοί από τα μόρια της ApoE, περιορίζοντας έτσι τις γλυκοζυλιωμένες μορφές της. Μετά από ένα σύντομο στάδιο απολιπίδωσης του δείγματος, ακολουθεί ηλεκτροφόρηση με τη μέθοδο της ισοηλεκτρικής εστίασης, που στηρίζεται στις ίδιες αρχές που έχουν παραπάνω περιγραφεί.

Στη συνέχεια πραγματοποιείται το στάδιο της ηλεκτροαποτύπωσης (electroblotting), στο οποίο με την εφαρμογή διαφοράς δυναμικού μεταφέρουμε τις πρωτεΐνες από το gel της ηλεκτροφόρησης σε ειδική μεμβράνη. Σε αυτή τη μεμβράνη εφαρμόζεται η τεχνική της ανοσοαποτύπωσης (immunoblotting) σε δύο στάδια. Στο πρώτο στάδιο η μεμβράνη επωάζεται με ειδικά πολυκλωνικά goat anti-human anti-ApoE αντισώματα, ώστε να αναγνωρισθούν μόνο τα μόρια της ApoE. Στο δεύτερο στάδιο η μεμβράνη επωάζεται με ειδικά συζευγμένα με υπεροξειδάση rabbit anti-goat IgG (H + L) αντισώματα. Τέλος, η εμφάνιση των αποτελεσμάτων γίνεται σε φωτογραφικό film με τη βοήθεια ειδικών αντιδραστηρίων και η ανάγνωση των ισομορφών της ApoE γίνεται συγκριτικά με πρότυπα δείγματα ApoE2, E3 και E4 που έχουν τρέξει στην ηλεκτροφόρηση (Εικόνα 8).

Δ. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΑ ΣΤΑΔΙΑ

ΣΤΑΔΙΟ Ι: ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΤΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

ΣΤΑΔΙΟ ΙΑ: ΚΑΤΕΡΓΑΣΙΑ ΜΕ ΝΕΥΡΑΜΙΝΙΔΑΣΗ

Αναμιγνύουμε 10 μl ορού + 40 μl (40 mU) από το διάλυμα της νευραμινιδάσης και επωάζουμε στους 37 °C για 30 min.

ΣΤΑΔΙΟ ΙΒ: ΑΠΟΛΙΠΙΔΩΣΗ

- Το στάδιο αυτό γίνεται πάντα με τα αντιδραστήρια και τα δείγματα μέσα σε πάγο.
- α) Προσθέτουμε 1 ml διαλύματος 3 Ethanol: 1 Diethyl Ether, ανακινούμε με Vortex και τα τοποθετούμε στους -20 °C για 2 ώρες.
- β) Φυγοκεντρούμε στις 10.000 στροφές/min για 10 min και αποχύνουμε το υπερκείμενο.



γ) Προσθέτουμε Diethyl Ether, ανακινούμε με Vortex και τα τοποθετούμε στους -20°C για 15 min.

δ) Φυγοκεντρούμε στις 10.000 στροφές/min για 10 min, αποχύνουμε το υπερκείμενο και στεγνώνουμε το ίζημα στον αέρα.

ΣΤΑΔΙΟ Π: ΕΠΑΝΑΔΙΑΛΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥ ΙΖΗΜΑΤΟΣ

Προσθέτουμε 100 μl από το διάλυμα επαναδιαλυτοποίησης του πρωτεϊνικού ιζήματος, επωάζουμε σε θερμοκρασία δωματίου για 30 min και ανακινούμε με Vortex.

ΣΤΑΔΙΟ ΠΙ: ΙΣΟΗΛΕΚΤΡΙΚΗ ΕΣΤΙΑΣΗ (IEF)

1) Παρασκευάζουμε την πηκτή της ηλεκτροφόρησης, προσθέτουμε τα απαραίτητα αντιδραστήρια για τον πολυμερισμό της και την αποχύνουμε εντός των δύο υάλινων πλακιδίων της συσκευής της ηλεκτροφόρησης κατά τρόπο ανάλογο με αυτόν που έχει ήδη περιγραφεί στην προηγούμενη μέθοδο. Στη συνέχεια, αφήνουμε την πηκτή να πολυμερισθεί και τέλος αφαιρούμε τα χτενάκια.

2) Σε κάθε κυψέλη που δημιουργήθηκε προσθέτουμε από κάτω προς τα επάνω: 15 μl από το διάλυμα της επαναδιαλυτοποιημένης πρωτεΐνης (ή από την recombinant human ApoE2, ApoE3 και ApoE4 που τρέχουμε μαζί ως μάρτυρα) + 10 μl από το διάλυμα No 5 + 10 μl από το διάλυμα No 7.

3) Γεμίζουμε το εσωτερικό μέρος της συσκευής με το διάλυμα No 7 και το εξωτερικό μέρος με το διάλυμα No 6.

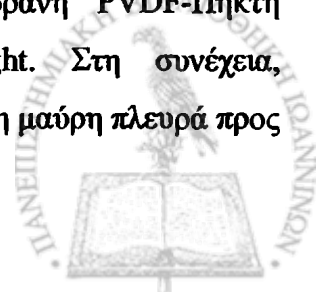
4) Εφαρμόζουμε σταθερή ένταση ρεύματος 2.5 mA/gel (χωρίς ψύξη της συσκευής) ώσπου η τάση να φθάσει ένα σταθερό επίπεδο $\sim 650\text{V}$. Η διάρκεια ηλεκτροφόρησης είναι ~ 2 ώρες.

ΣΤΑΔΙΟ ΠΙΙ: ΗΛΕΚΤΡΟΑΠΟΤΥΠΩΣΗ (ELECTROBLOTTING)

• Το στάδιο αυτό γίνεται σε πάγο και μέσα στη συσκευή τοποθετείται παγοθήκη.

1) Ενεργοποιούμε την PVDF μεμβράνη, όπως περιγράφεται παραπάνω.

2) Τοποθετούμε στην κασέτα της συσκευής της ηλεκτροαποτύπωσης με την ακόλουθη σειρά (από την λευκή προς τη μαύρη πλευρά της κασέτας): Σφουγγαράκι Schotch Bright-Διηθητικό χαρτί-Ειδική ενεργοποιημένη μεμβράνη PVDF-Πηκτή ηλεκτροφόρησης-Διηθητικό χαρτί-Σφουγγαράκι Schotch Bright. Στη συνέχεια, κλείνουμε τη κασέτα και την τοποθετούμε μέσα στη συσκευή (με τη μαύρη πλευρά προς τη μαύρη πλευρά της συσκευής).



3) Εφαρμόζουμε σταθερή τάση 100V για 1 ώρα.

4) Τοποθετούμε τη μεμβράνη σε δοχείο που περιέχει διάλυμα TBS 1x στο οποίο έχει προστεθεί σκόνη αποβουτυρωμένου γάλακτος (5 gr/100 ml) και την αποθηκεύουμε στο ψυχρό θάλαμο.

ΣΤΑΔΙΟ IV: ΑΝΟΣΟΑΠΟΤΥΠΩΣΗ (IMMUNOBLOTTING)

- Χρειάζεται προσοχή να μη στεγνώσει ποτέ η μεμβράνη.

1) PVDF μεμβράνη + TBS-γάλα 5%. Ακολουθεί επώαση-ανάδευση στους 37 °C για 30 min

2) Αποχύνουμε το διάλυμα και ξεπλένουμε με TBS-Tween 20 επί 3 φορές (10 min η καθεμία).

3) Επώαση με το πρωτογενές αντίσωμα.

α) Αναμιγνύουμε σε πλαστικό φιαλίδιο goat anti-human anti-ApoE αντίσωμα με TBS-γάλα 0.5% σε αραιώση 1:1000 (π.χ 7 μl σε 7 ml) και ανακινούμε.

β) Επωάζουμε τη μεμβράνη με το παραπάνω διάλυμα για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου πάνω στο μηχανικό αναδευτήρα.

4) Αποχύνουμε το διάλυμα και ξεπλένουμε με TBS-Tween 20 επί 3 φορές (10 min η καθεμία).

5) Επώαση με το 2^ογενές αντίσωμα.

α) Αναμιγνύουμε σε πλαστικό φιαλίδιο anti-goat αντίσωμα με TBS-γάλα 0.5% σε αραιώση 1:3000 (π.χ 3 μl σε 9 ml) και ανακινούμε.

β) Επωάζουμε τη μεμβράνη με το παραπάνω διάλυμα για 1/2 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου πάνω στο μηχανικό αναδευτήρα.

6) Αποχύνουμε το διάλυμα και ξεπλένουμε με TBS-Tween 20 επί 3 φορές (10 min η καθεμία).

ΣΤΑΔΙΟ V: ΧΗΜΕΙΟΦΩΤΑΥΓΕΙΑ

1) Παρασκευή του αντιδραστηρίου της χημειοφωταύγειας: Αναμιγνύουμε σε πλαστικό φιαλίδιο τα δύο αντιδραστήρια της χημειοφωταύγειας: 1.3 ml λουμινόλη + 1.3 ml διαλύματος που οξειδώνει τη λουμινόλη και ανακινούμε.

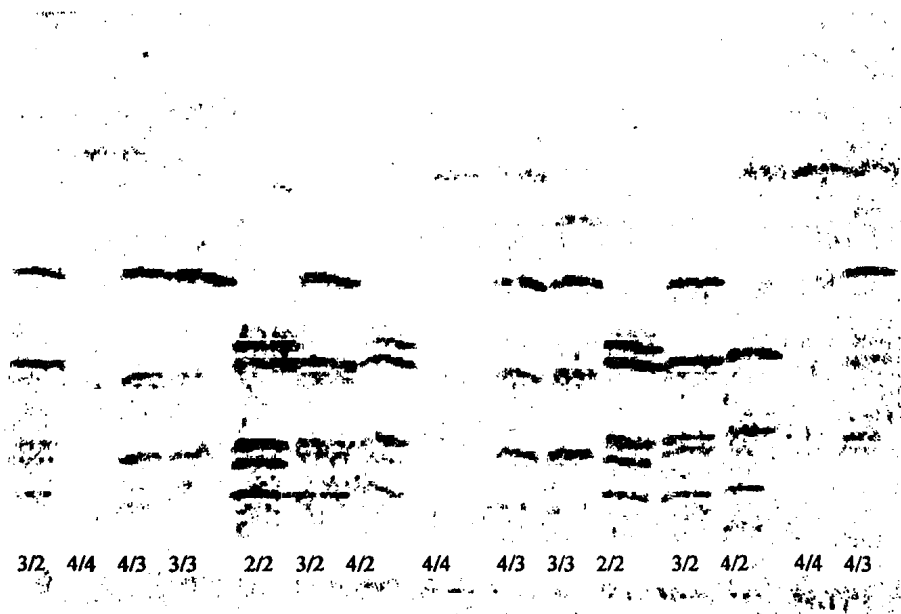
2) Αφού στεγνώσουμε τη μεμβράνη από την περίσσεια υγρού σε διηθητικό χαρτί, στη συνέχεια την επωάζουμε με το αντιδραστήριο της χημειοφωταύγειας για 1.5 min (στο διάστημα αυτό γυρίζουμε συνεχώς τη μεμβράνη με τη βοήθεια λαβίδας).



3) Αφού στεγνώσουμε τη μεμβράνη από την περίσσεια υγρού σε διηθητικό χαρτί, την απλώνουμε πάνω σε μεμβράνη για τρόφιμα και την κλείνουμε καλά χωρίς να δημιουργηθούν φυσαλίδες.

ΣΤΑΔΙΟ VI: ΕΜΦΑΝΙΣΗ ΣΤΟΝ ΣΚΟΤΕΙΝΟ ΘΑΛΑΜΟ

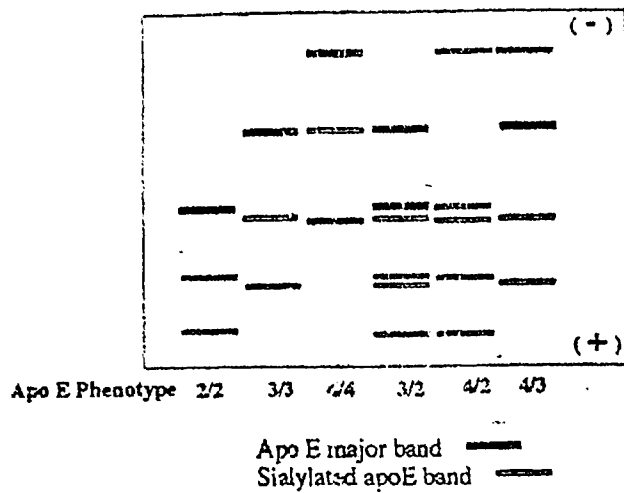
- 1) Κόβουμε ένα κομμάτι από το φιλμ διαστάσεων περίπου όσο της μεμβράνης.
- 2) Τοποθετούμε μέσα στην υπερκασέτα (hypercassete) τη μεμβράνη και πάνω από αυτή το φιλμ. Στη συνέχεια, κλείνουμε την υπερκασέτα (με προσοχή να μη μετακινηθεί το σύμπλεγμα μεμβράνης-φίλμ) και περιμένουμε για 1 min. Τέλος, βγάζουμε το φιλμ από την υπερκασέτα.
- 3) Τοποθετούμε το φιλμ μέσα στο δοχείο με το υγρό ανάπτυξης του φιλμ (developer) μέχρι να αρχίσουν να εμφανίζονται οι μπάντες. Αμέσως μετά τοποθετούμε το φιλμ στο δοχείο με το υγρό σταθεροποίησης του φιλμ (fixer) μέχρι το φόντο να γίνει τελείως λευκό.
- 4) Ξεπλένουμε το φιλμ με νερό βρύσης και διαβάζουμε τις μπάντες σε σχέση με το μάρτυρα (recombinant human ApoE2, ApoE3 και ApoE4) (Εικόνα 8).



Εικόνα 8. Ισομορφές της ApoE με τη μέθοδο της ανοσοαποτύπωσης.

Στο Σχήμα 36 απεικονίζεται η σχηματική αναπαράσταση της αντίχνευσης των ισομορφών της ApoE με τη μέθοδο της ανοσοαποτύπωσης.





Σχήμα 36. Σχηματική αναπαράσταση της ανίχνευσης των ισομορφών της ApoE με τη μέθοδο της ανοσοαποτύπωσης

E. ΠΛΕΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

- 1) Αρκούν μόνο 10 μl ορού ή πλάσματος.
- 2) Δεν απαιτείται το στάδιο της απομόνωσης των VLDL με υπερφυγοκέντρηση.
- 3) Η κατεργασία με νευραμινιδάση λύνει μερικά το πρόβλημα της παρουσίας των γλυκοζυλιωμένων ισομορφών (δεν διασπά όμως τις ισομορφές που έχουν υποστεί μη ενζυματική γλυκοζυλίωση).
- 4) Η μέθοδος ολοκληρώνεται σε σχετικά σύντομο χρονικό διάστημα.
- 5) Ανιχνεύει το σύνολο της ApoE του ορού.
- 6) Εξαλείφεται ο κίνδυνος επιμολύνσεων από άλλες πρωτεΐνες, δεδομένου ότι χρησιμοποιούνται ειδικά anti-ApoE αντισώματα για τον εντοπισμό της ApoE.
- 7) Η ανάγνωση των αποτελεσμάτων στηρίζεται στον αριθμό και τη θέση των bands και όχι στην υποκειμενική εκτίμηση της σχετικής έντασής τους.
- 8) Μπορεί εύκολα να χρησιμοποιηθεί σε ένα κλινικό βιοχημικό εργαστήριο και είναι κατάλληλη για μεγάλους αριθμούς δειγμάτων.

7.2.8.3. Συγκριτική αξιολόγηση των μεθόδων προσδιορισμού των φαινοτύπων (phenotyping) της ApoE

Από την παράθεση των πλεονεκτημάτων και μειονεκτημάτων κάθε μεθόδου είναι φανερό ότι η μέθοδος εκλογής για την ανίχνευση των φαινοτύπων της ApoE σε μεγάλο αριθμό ατόμων είναι αυτή της ανοσοαποτύπωσης. Αντίθετα, η μέθοδος του



ισοηλεκτρικού εστιασμού των apoVLDL's επιφυλάσσεται για τις περιπτώσεις εκείνες που θέλουμε να μελετήσουμε τα ποιοτικά και ποσοτικά χαρακτηριστικά των VLDL, να προσδιορίσουμε επακριβώς τα επίπεδα της LDL-C, να μελετήσουμε το βαθμό της γλυκοζυλίωσης της ApoE ή να αναλύσουμε τις ApoC's (π.χ. έλλειψη ApoCII).

7.2.9. Προσδιορισμός των γονοτύπων της ApoE

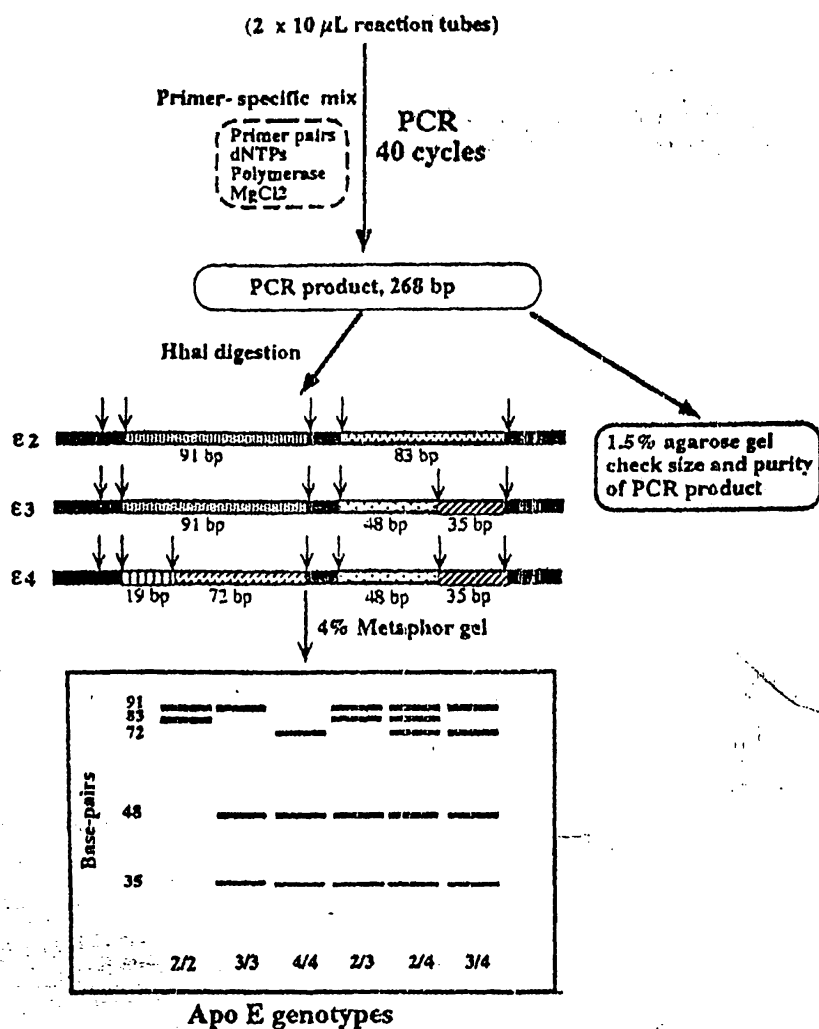
I. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR) για τον προσδιορισμό του γονοτύπου της απολιποπρωτεΐνης E (ApoE)

A. ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ⁴³²

Με τη μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης γίνεται πολλαπλασιασμός του τμήματος του γονιδίου της Apo E που περιέχει τους κοινούς πολυμορφισμούς αυτής της αποπρωτεΐνης (Σχήμα 37). Ακολουθεί επώαση με την περιοριστική ενδονουκλεάση Hha I και τα προϊόντα της διάσπασης διαχωρίζονται με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου. Τέλος, οι μπάντες διαβάζονται σε υπεριώδη ακτινοβολία, αφού βαφούν με βρωμιούχο αιθίδιο.



Genomic DNA



Σχήμα 37. Αρχή της μεθόδου προσδιορισμού των γονοτύπων της ApoE με τη μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR).

B. ΟΡΓΑΝΑ ΚΑΙ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

Τα όργανα και τα αντιδραστήρια είναι παρόμοια με αυτά που έχουν ήδη περιγραφεί με τις εξής διαφορές:

- Ζεύγος εκκινητών (forward: 5'-tcc aag gag ctg cag gcg gcg ca-3', reverse: 5'-aca gaa ttc gcc ccg gcc tgg tac act gcc a-3' PE Applied Biosystems CH)
- DMSO (Dimethylsulfoxide, FERAK)

Γ. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Το γενετικό υλικό που έχει ήδη απομονωθεί αραιώνεται με ddH₂O σε αναλογία



1 DNA/ 9 ddH₂O v/v (20 μ l DNA σε 180 μ l ddH₂O). Στη συνέχεια παρασκευάζεται το μίγμα PCR (PCR mix) σε eppendorf και τα αντιδραστήρια αναμιγνύονται με την ακόλουθη σειρά:

- ✓ 2.5 μ l PCR buffer
- ✓ 1.5 μ l διαλύματος dNTPs
- ✓ 1.9 μ l εκκινητής forward (primer 6)
- ✓ 2.5 μ l εκκινητής reverse (primer 7)
- ✓ 2.5 μ l DMSO
- ✓ 4.0 μ l ddH₂O
- ✓ 0.1 μ l Taq DNA polymerase
- ✓ 0.5 μ l MgCl₂

Οι ποσότητες αυτές χρησιμοποιούνται για ένα δείγμα και για αυτό το λόγο πολλαπλασιάζονται ανάλογα με τα δείγματα της PCR. Επίσης, δεν παραλείπουμε να συμπεριλάβουμε το αρνητικό δείγμα ελέγχου (negative control), καθώς και το θετικό δείγμα ελέγχου (positive control), δηλαδή δείγμα με γνωστό γονότυπο της AroE.

Μετά από ήπια ανάδευση με πιπέτα, το μίγμα PCR (15.5 μ l) μεταφέρεται στα ειδικά eppendorf για PCR όπου προστίθενται 10 μ l του αραιωμένου γενετικού υλικού. Ακολουθεί νέα ανάδευση (με πιπέτα και με προσοχή να μη δημιουργηθούν φυσαλίδες) και τα δείγματα μεταφέρονται στο θερμοκυκλοποιητή (MJR PTC-100 Programmable Thermal Cycler).

Το πρόγραμμα της PCR για την ανεύρεση του γονοτύπου της Aro E έχει ως εξής:

- 5 min στους 94°C (διαχωρισμός της διπλής έλικας του DNA) (1)
- 30 sec στους 65°C (διαχωρισμός της διπλής έλικας του DNA) (2)
- 90 sec στους 72°C (σύνδεση των εκκινητών με το πρότυπο DNA) (3)
- 30 sec στους 94°C (επιμήκυνση) (4)
- 10 min στους 72°C (επιμήκυνση) (5)

Το στάδιο (1) πραγματοποιείται μόνο για ένα κύκλο. Τα στάδια (2) έως και (4) πραγματοποιούνται για 35 κύκλους. Τέλος, το στάδιο (5) ολοκληρώνεται σε ένα κύκλο. Μετά την παραπάνω διαδικασία (~ 2.5 ώρες), το πολυμερισμένο γενετικό υλικό (PCR product, περιέχει περίπου 224 βάσεις) διατηρείται στους 4 °C.

II. Ηλεκτροφόρηση αγαρόζης 2% για DNA

Γίνεται με τον τρόπο που έχει ήδη αναφερθεί (κεφάλαιο 7.2.7).



III. Ανίχνευση του γονοτύπου της ΑροΕ με τη βοήθεια περιοριστικού ενζύμου

A. ΟΡΓΑΝΑ-ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

- **Περιοριστικό ένζυμο Hha I** (10 U/μl, New England Biolabs). Φυλάσσεται πάντα στους -20 °C.
- **Χρωστική DNA:** Για την παρασκευή 50 ml χρωστικής, 7.5g Ficol και 0.12 g BB διαλύονται σε 0.5X TBE.

B. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Σε 10 μl κάθε προϊόντος της PCR προστίθεται 0.5 μl του περιοριστικού ενζύμου Hha

I. Το μίγμα επωάζεται στους 37°C για τουλάχιστον 3 ώρες. Για να σταματήσει η δράση του περιοριστικού ενζύμου, προστίθενται 5 μl χρωστικής DNA σε κάθε δείγμα.

IV. Ηλεκτροφόρηση σε πήγμα ακρυλαμιδίου

A. ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ-ΟΡΓΑΝΑ

- Ακρυλαμίδιο ($\text{CH}_2\text{CHCONH}_2$, MB: 71.08, Merck)
- APS (Ammonium Persulfate, MB: 228.20, BioRad Laboratories)
- TEMED (N,N,N',N'-Tetra-methyl-ethylenediamine, BioRad Laboratories)
- Κάθετη συσκευή ηλεκτροφόρησης (Mini Protean II, BioRad)
- Τροφοδοτικό (BioRad Power Pac 1000)

B. ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

- **Διάλυμα 30% ακρυλαμιδίου:** Σε 100 ml ddH₂O διαλύονται 30 g ακρυλαμιδίου.
- **Διάλυμα 10xTBE**
- **Διάλυμα 0.5xTBE**
- **Διάλυμα 10% APS:** 0.05 g APS διαλύονται σε 500μl dH₂O. Το διάλυμα παρασκευάζεται λίγο από πριν τη χρήση του.
- **Πήγμα ακρυλαμιδίου:** Αναμιγνύονται 4 ml διαλύματος 30% ακρυλαμιδίου με 0.5 ml διαλύματος 10xTBE, 5.44 ml ddH₂O, 60 μl 10% APS και 7 μl TEMED.



Γ. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

1) Προετοιμασία συσκευής

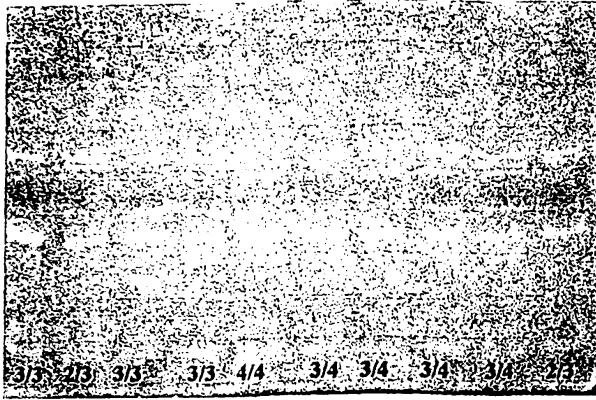
Χρησιμοποιούνται υάλινες πλάκες διαστάσεων 7x10 cm, οι οποίες καθαρίζονται προσεκτικά με H₂O και απόλυτη αιθανόλη. Οι πλάκες τοποθετούνται η μια πάνω στην άλλη και στις δύο πλάγιες άκρες τους τοποθετούνται διαχωριστές (spacers) πάχους 1.5 mm. Στη βάση στήριξης των πλακών της κάθετης συσκευής ηλεκτροφόρησης τοποθετούνται ελάσματα καουτσούκ που εξασφαλίζουν στεγανότητα. Οι γυάλινες πλάκες τοποθετούνται στη βάση στήριξης και σταθεροποιούνται με σφιγκτήρες. Με τη χρήση αλφαδιού εξασφαλίζεται η ευθύγραμμη τοποθέτησή τους.

2) Τοποθέτηση δειγμάτων

Αρχικά, το πήγμα ακρυλαμιδίου τοποθετείται στην πλάκα ηλεκτροφόρησης με τη βοήθεια σύριγγας των 20 ml. Εφαρμόζεται χτένα (Comb 1.5 mm) των 10 θέσεων και το gel αφήνεται να πολυμερισθεί για τουλάχιστο 1 ώρα. Στη συνέχεια, η χτένα απομακρύνεται και η πλάκα μεταφέρεται στη συσκευή ηλεκτροφόρησης. Στις ειδικές θέσεις (πηγαδάκια) τοποθετούνται 11 μl κάθε δείγματος πολυμερισμένου γενετικού υλικού. Ακολουθεί ηλεκτροφόρηση σε ρυθμιστικό διάλυμα 0.5xTBE διάρκειας 100 min υπό σταθερή τάση 90 Volts. Τέλος, το πήγμα ακρυλαμιδίου μεταφέρεται σε λεκάνη, η οποία περιέχει 500 ml απεσταγμένου H₂O και 50 μl EtBr και αφήνεται εκεί για 30 min. Οι αναμενόμενοι γονότυποι που φαίνονται στη UV ακτινοβολία είναι οι εξής: E2/2, E3/3, E4/4, E2/3, E2/4 και E3/4 (Εικόνα 9 και Σχήμα 37).

- ❖ Το αλλήλιο E2 έχει τη μορφή δύο μπαντών, 91 και 83 βάσεων, αντίστοιχα.
- ❖ Το αλλήλιο E3 έχει τη μορφή τριών μπαντών, 91, 48 και 35 βάσεων, αντίστοιχα.
- ❖ Το αλλήλιο E4 έχει τη μορφή τριών μπαντών, 72, 48 και 35 βάσεων, αντίστοιχα.





Εικόνα 9. Οι γονότυποι της ApoE με τη μέθοδο της PCR

V. ΠΛΕΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

- 1) Αποτελεί τον πιο ακριβή τρόπο προσδιορισμού των πολυμορφισμών της ApoE διότι ανιχνεύει απευθείας τις κοινές μεταλλάξεις του γονιδίου της ApoE χωρίς να στηρίζεται στη διαφορά ηλεκτρικού φορτίου των ισομορφών της, όπως συμβαίνει με τις μεθόδους φαινοτυπικής ανάλυσης. Επιπρόσθετα, δεν επηρεάζεται από τις μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις των μορίων της ApoE.
- 2) Ορισμένες σπάνιες μεταλλάξεις της ApoE έχουν ηλεκτροφορητική κινητικότητα E2 (Arg¹³⁶→Ser, Arg¹³⁶→Cys, Arg¹⁴⁵→Cys, Lys¹⁴⁶→Gln) ή E3 [Arg¹⁴²→Cys, ApoE-Leiden (insertion of 7 aminoacids: 121-127)]. Έτσι, αυτές οι μεταλλάξεις θα χαρακτηρίζονταν εσφαλμένα ως E2 ή E3 με τη μέθοδο της ισοηλεκτρικής εστίασης (IEF).
- 3) Μπορεί να χρησιμοποιηθεί ακόμη και ελάχιστη ποσότητα γενετικού υλικού (π.χ. μία σταγόνα αίματος ή δείγμα από το στοματικό βλεννογόνο).
- 4) Το αποθηκευμένο DNA μπορεί να χρησιμοποιηθεί και για την ανίχνευση άλλων γενετικών πολυμορφισμών.

VI. ΜΕΙΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

- 1) Η ύπαρξη μίας σπάνιας μετάλλαξης του γονιδίου της ApoE δεν μπορεί να ανιχνευθεί με τη μέθοδο της περιοριστικής ενδονουκλεάσης που περιγράφηκε προηγουμένως. Αυτή η μέθοδος είναι ειδική στο να ανιχνεύει μόνο τους τρεις κοινούς πολυμορφισμούς του γονιδίου της ApoE. Αντίθετα, αν αυτή η μετάλλαξη οδηγήσει στη δημιουργία μιας νέας ισομορφής με διαφορετικό φορτίο από τις άλλες (π.χ. E1: Lys¹⁴⁶→Glu), τότε μόνο οι φαινοτυπικές μέθοδοι που χρησιμοποιούν IEF θα μπορέσουν να την εντοπίσουν.



- 2) Απαιτούνται ειδικά διαμορφωμένοι χώροι στο εργαστήριο για την αποφυγή επιμολύνσεων του γενετικού υλικού, καθώς και ειδική τεχνική εκπαίδευση του προσωπικού. Επιπρόσθετα, απαιτείται ηλεκτροφόρηση σε πηκτική ακρυλαμιδίου, διαδικασία που συνεπάγεται πρόσθετες τεχνικές δυσκολίες.
- 3) Η διαδικασία ενίσχυσης του γονιδίου της ApoE με τη τεχνική της PCR παρουσιάζει αρκετές δυσκολίες εξαιτίας της παρουσίας μεγάλου αριθμού GC βάσεων σε αυτό το γονίδιο.
- 4) Έχει μεγαλύτερο οικονομικό κόστος.

VII. ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΜΕΤΑΞΥ ΤΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΤΩΝ ΦΑΙΝΟΤΥΠΩΝ ΚΑΙ ΤΩΝ ΓΟΝΟΤΥΠΩΝ ΤΗΣ ΑΡΟΕ

Με βάση όλα όσα έχουν παραπάνω συζητηθεί μπορούμε να συμπεράνουμε ότι η τεχνική της ανίχνευσης των γονιδιακών πολυμορφισμών της ApoE (genotyping) είναι πιο ακριβής από τη μέθοδο του προσδιορισμού των φαινοτυπικών πολυμορφισμών (phenotyping) και αποτελεί πλέον τη μέθοδο εκλογής για τη μελέτη της ApoE. Εντούτοις, κάθε ερευνητικό εργαστήριο που ασχολείται με τη μελέτη αυτής της αποπρωτεΐνης πρέπει να έχει αναπτύξει και τη μέθοδο του προσδιορισμού των φαινοτυπικών πολυμορφισμών, η οποία μπορεί να χρησιμοποιηθεί συμπληρωματικά σε περιπτώσεις όπου: α) δεν θα υπάρχει διαθέσιμο γενετικό υλικό, αλλά μόνο αποθηκευμένα δείγματα ορών, ή β) προκύπτει αμφιβολία στην ανάγνωση των αποτελεσμάτων (όπως συμβαίνει όταν υπάρχουν σπάνιες μεταλλάξεις, π.χ. ApoE1, που δεν ανιχνεύονται με τη τεχνική της περιοριστικής ενδονουκλεάσης αλλά δίνουν ξεχωριστή μπάνα στο phenotyping). Επιπρόσθετα, μελέτες έδειξαν πολύ μικρό ποσοστό διαφωνίας μεταξύ των δύο μεθόδων (της τάξεως του ~ 2%)⁴³³.

Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα διατριβή για την ανίχνευση των πολυμορφισμών της ApoE σε όλα τα άτομα της μελέτης ήταν αυτή του προσδιορισμού των γονιδιακών πολυμορφισμών με τη βοήθεια της περιοριστικής ενδονουκλεάσης. Επιπρόσθετα, σε πολλούς ασθενείς προσδιορίστηκαν και οι φαινότυποι της ApoE με τη χρήση μίας εκ των δύο μεθόδων που έχουν ήδη περιγραφεί. Το ποσοστό διαφωνίας μεταξύ phenotyping-genotyping ήταν της τάξεως του 1.9%. Σε αυτές τις περιπτώσεις χρησιμοποιήθηκε το αποτέλεσμα του γενετικού ελέγχου.



7.2.10. Προσδιορισμός της ενεργότητας της PAF-AH

A. ANTIΔΡΑΣΤΗΡΙΑ-ΟΡΓΑΝΑ

- Μετρητής υγρού σπινθηρισμού, Packard (TriCarb 2100 TR)
- Υδατόλουτρο 37°C
- PAF (1-O-εξαδεκυλο-2-ακετυλο-sn-γλυκερο-3-φωσφοχολίνη M.B. 523.7, Sigma). 25 mg σκόνης διαλύονται σε 2.387 ml αιθανόλης 80% δίνοντας διάλυμα τελικής συγκέντρωσης 20 mM. Το διάλυμα διατηρείται στους -20°C.
- [³H]PAF(1-0-εξαδεκυλο-2-[³H-ακετυλο]-sn-γλυκερο-3-φωσφοχολίνη, 10Ci/mmol, DuPont-New England Nuclear, Boston, MA)
- Αλβουμίνη βοδινού ορού (BSA, Sigma)
- Τριγλωροξικό οξύ (TCA, M.B.: 163.39, Sigma)

B. ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

10% Na₂EDTA pH 7.4: 12.8247 g EDTA Na₂·2H₂O διαλύονται σε 100 ml H₂O. Το διάλυμα διατηρείται στους 4°C.

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

1mM [³H]PAF σε BSA 2.5 mg/ml: Σε πλαστικό σωληνάκι πολυπροπυλενίου αναμιγνύονται 100 μl PAF 20 mM και 30μl [³H]PAF. Ο διαλύτης εξατμίζεται σε ρεύμα N₂ μέχρι ξηρού και αναδιασπείρονται σε 2 ml BSA 2.5 mg/ml. Το μίγμα αναδεύεται ισχυρά σε vortex και επωάζεται για 30 λεπτά στους 37°C. Το διάλυμα διατηρείται στους -20°C.

20% TCA (Τριγλωροξικό οξύ, Sigma): 20 g TCA διαλύονται σε 100 ml H₂O. Το διάλυμα διατηρείται στους 4°C.

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

Υγρό σπινθηρισμού Quicksafe A της Zinsser.

Γ. ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Η μέτρηση της ενεργότητας της PAF-AH βασίζεται στη μέτρηση των ραδιοσημασμένων οξικών ομάδων που παραμένουν στο υπερκείμενο κατά την καταβύθιση του [³H]PAF και όλων των πρωτεϊνών παρουσία 20% TCA. Οι οξικές



ομάδες ελευθερώνονται κατά την επώαση των λιποπρωτεϊνών που είναι η πηγή του ενζύμου με [^3H]PAF.

Προετοιμασία δειγμάτων

Για τη μέτρηση της ενεργότητας της PAF-AH του ορού χρησιμοποιήθηκαν 50μl αραιωμένου ορού (10 μl ορού αραιώνονται με 490μl ρυθμιστικού διαλύματος HEPES pH 7.4, αραιώση 1/50), ενώ για τον αντίστοιχο προσδιορισμό στην HDL χρησιμοποιήθηκαν 50μl από το αραιωμένο υπερκείμενο του ορού (50μl του υπερκείμενου μετά την καταβύθιση της HDL αραιώνονται με 100μl ρυθμιστικού διαλύματος HEPES 7.4, αραιώση 1/3) μετά την ιζηματοποίηση των λιποπρωτεϊνών που περιέχουν από B με θεικό μαγνήσιο-δεξτράνη. Και στα δυο παραπάνω δείγματα προστίθεται διάλυμα HEPES μέχρι τελικού όγκου 90μl.

Δ. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Σε erpendorf 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 HEPES pH 7.4. Τα erpendorf επωάζονται στους 37°C για 10 λεπτά ακριβώς. Μόλις συμπληρωθεί ο απαραίτητος χρόνος επώασης, σε κάθε δείγμα προστίθενται 20 μl BSA 100. Στη συνέχεια τα δείγματα αναδεύονται ισχυρά σε Vortex και τοποθετούνται σε παγόλουτρο για 10 min. Έπειτα, προστίθενται 80 μl 20% TCA, τα δείγματα αναδεύονται ισχυρά σε Vortex και τοποθετούνται σε παγόλουτρο για άλλα 30 λεπτά. Ακολουθεί φυγοκέντρηση, σε μικροφυγόκετρο erpendorf, για 5 λεπτά ώστε να καταβυθισθούν οι πρωτεΐνες. 100 μl του υπερκείμενου μεταφέρονται σε σωληνάκι σπινθηρισμού, προστίθενται 2 ml υγρού σπινθηρισμού, το σωληνάκι αναδεύεται καλά και τοποθετείται στο μετρητή β-ακτινοβολίας.

Επεξεργασία των αποτελεσμάτων

Μετρούνται 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 1mM περιέχουν 10 nmol PAF άρα:

$$E.E. (\text{cpm/nmol}) = \frac{\text{cpm}_\epsilon}{10}$$

Το ίδιο ισχύει για όλες τις συγκεντρώσεις PAF που χρησιμοποιήθηκαν.



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

$$\text{Ενεργότητα PAF-AH (nmol/ml ορού ή HDL/min)} = (\text{cpm}_s - \text{cpm}_c) \times 2 \times 1000 / \text{E.E} \times \alpha \times \beta$$

όπου: cpm_s , είναι οι κρούσεις των 100 μl κάθε δείγματος ή ml εναιωρήματος

cpm_c , είναι οι κρούσεις των 100 μl του δείγματος ελέγχου

α , είναι ο χρόνος επώασης του δείγματος σε λεπτά

β , είναι τα ml του δείγματος

1000, ο συντελεστής για τη μετατροπή των ml σε ml

Η ενεργότητα της PAF-AH εκφράστηκε σαν nmol του [³Ηακετυλο]-PAF που αποικοδομούνται ανά min, ανά mg πρωτεΐνης ή ανά ml ορού.

7.2.11. Προσδιορισμός της ενεργότητας της PON1 με υπόστρωμα το παραοxon [PON1(παραοxon)]

A. ΟΡΓΑΝΑ-ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

- Tris HCl (MB: 156.7, Merck)
- CaCl₂ (MB: 111, Sigma)
- Diethyl p-Nitro Phenyl Phosphate (paraoxon) (C₁₀H₄NO₆P, MB: 275.2, Sigma)
- Φασματοφωτόμετρο SpectraMax 190 (Molecular Devices)
- Κυψελίδα Elisa (96 θέσεων)

B. ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

• **Διάλυμα 1M Tris HCl:** 15.76 g Tris HCl διαλύονται σε 100ml H₂O και το pH ρυθμίζεται στο 8. Το διάλυμα φυλάσσεται στους 4°C.

• **Διάλυμα 100mM CaCl₂:** 1.11 g CaCl₂ διαλύονται σε 100ml H₂O και το διάλυμα φυλάσσεται στους 4°C.

• **Ρυθμιστικό διάλυμα 100mM Tris HCl (pH=8) και 2mM CaCl₂:**

10 ml διαλύματος 1M Tris HCl αναμιγνύονται με 2 ml διαλύματος 100mM CaCl₂ και ο υπόλοιπος όγκος μέχρι τα 100 ml συμπληρώνεται με H₂O. Το διάλυμα φυλάσσεται στους 4°C, αλλά η θερμοκρασία του κατά την έναρξη της πειραματικής διαδικασίας πρέπει να είναι 25°C.



• **Υπόστρωμα αντίδρασης** Για την παρασκευή του υποστρώματος προστίθεται τόση ποσότητα παραοξοπ σε ανάλογο όγκο ρυθμιστικού διαλύματος, ώστε η τελική συγκέντρωση του διαλύματος να είναι 6.11mM. Το υπόστρωμα πρέπει να παρασκευάζεται κάτω από απαγωγό λόγω της μεγάλης τοξικότητας του παραοξοπ.

Γ. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Η ενεργότητα της παραοξονάσης ως προς το παραοξόν υπολογίζεται σε ορό αίματος, ο οποίος συλλέγεται μετά από φυγοκέντρηση ολικού αίματος στα 3500 στροφές/min για 10 min. Σε κάθε θέση της πλάκας elisa τοποθετούνται 25 μl ορού στα οποία προστίθενται 225 μl υποστρώματος. Η πλάκα τοποθετείται στο φασματοφωτόμετρο και η κινητική της αντίδρασης παρακολουθείται σε μήκος κύματος 412 nm για 1.5 min στους 25 °C.

Δ. ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Η ενεργότητα της παραοξονάσης ως προς το παραοξόν υπολογίζεται σε U/l, όπου 1 U ισοδυναμεί με 1 nmol της p-nitrophenol που σχηματίζεται ανά ml αντίδρασης σε 1min. Ο μοριακός συντελεστής του παραοξόν για τις συγκεκριμένες συνθήκες είναι $E_{412} = 17000 \text{ mol/l/cm}$.

7.2.12. Προσδιορισμός της ενεργότητας της PON1 με υπόστρωμα το phenyl acetate [PON1(phenylacetate)]

A. ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ-ΟΡΓΑΝΑ

- Tris HCl (MB: 56.7, Merck)
- CaCl₂ (MB: 111, Sigma)
- Phenyl Acetate 99% (CH₃CO₂C₆H₅, MB: 136.15, Sigma-Aldrich)
- Φασματοφωτόμετρο SpectraMax 190 (Molecular Devices)
- Κυψελίδα UV Elisa (96 θέσεων)

B. ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

- Διάλυμα 1M Tris HCl: Όπως περιγράφεται παραπάνω.
- Διάλυμα 100mM CaCl₂: Όπως περιγράφεται παραπάνω.



- **Ρυθμιστικό διάλυμα 20mM Tris HCl (pH=8) και 2mM CaCl₂:**

2 ml διαλύματος 1M Tris HCl αναμιγνύονται με 2 ml διαλύματος 100mM CaCl₂ και ο υπόλοιπος όγκος μέχρι τα 100 ml συμπληρώνεται με H₂O. Το διάλυμα φυλάσσεται στους 4°C, αλλά η θερμοκρασία του κατά την έναρξη της πειραματικής διαδικασίας πρέπει να είναι 25 °C.

- **Υπόστρωμα αντίδρασης**

Για την παρασκευή του υποστρώματος αναμιγνύουμε 10 ml του παραπάνω ρυθμιστικού διαλύματος με 1.6 ml φαινυλ-οξικού. Το υπόστρωμα παρασκευάζεται ακριβώς πριν την έναρξη της πειραματικής διαδικασίας.

Γ. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Η ενεργότητα της παραοξονάσης ως προς το φαινυλ-οξικό υπολογίζεται σε ορό αίματος, ο οποίος συλλέγεται μετά από φυγοκέντρηση ολικού αίματος στα 3500 στροφές/μίν για 10 μίν. Αρχικά, αναμιγνύουμε 10 μl ορού με 990 μl ρυθμιστικού διαλύματος. Σε κάθε θέση της πλάκας τοποθετούνται 50μl αυτού του διαλύματος, στα οποία προστίθενται 200 μl υποστρώματος. Η πλάκα τοποθετείται στο φασματοφωτόμετρο και η κινητική της αντίδρασης παρακολουθείται σε μήκος κύματος 270 nm για 1.5 μίν στους 25 °C.

Δ. ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Η ενεργότητα της παραοξονάσης ως προς το φαινυλ-οξικό υπολογίζεται σε U/ml, όπου 1 U ισοδυναμεί με 1 μmol του φαινυλ-οξικού που υδρολύθηκε σε 1μl υποστρώματος στο 1 μίν. Ο μοριακός συντελεστής απορρόφησης του φαινυλ-οξικού στις συγκεκριμένες συνθήκες είναι $E_{270} = 1310 \text{ mol/l/cm}$.

7.2.13. Προσδιορισμός των υπολοίπων εργαστηριακών παραμέτρων

Ο προσδιορισμός των μεταβολικών παραμέτρων στον ορό έγινε σε αυτόματο αναλυτή OLYMPUS AU 600 (Olympus Diagnostica, Hamburg, Germany). Η γλυκόζη προσδιορίστηκε με τη μέθοδο της εξοκινάσης, η ουρία με τη μέθοδο της ουρεάσης-GLDH, η κρεατινίνη με τη κινητική μέθοδο Jaffé [kinetic alkaline picrate reaction], το ουρικό οξύ με τη μέθοδο της ουρικής, οι ολικές πρωτεΐνες του ορού με τη μέθοδο της διουρίας, ενώ η αλβουμίνη μετρήθηκε φωτομετρικά με τη μέθοδο bromcresol green.



7.2.14. Μετατροπή των τιμών των εργαστηριακών παραμέτρων σε μονάδες του διεθνούς συστήματος (SI)

Πίνακας 6. Μετατροπή των τιμών των εργαστηριακών παραμέτρων από συμβατικές μονάδες σε μονάδες του διεθνούς συστήματος (SI)

	Συμβατικές μονάδες	Συντελεστής	Μονάδες SI
Χοληστερόλη	mg/dl	0.0259	mmol/L
Τριγλυκερίδια	mg/dl	0.0113	mmol/L
Κρεατινίνη	mg/dl	88.4	μmol/L
Άζωτο ουρίας	mg/dl	0.357	mmol/L
Γλυκόζη	mg/dl	0.055	mmol/L
Αλβουμίνη	g/dl	10	g/L
ApoAI	mg/dl	0.01	g/L
ApoB	mg/dl	0.01	g/L
Lp(a)	mg/dl	0.01	g/L



7.3. ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Για τη στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό πρόγραμμα STATISTICA 6.0. Το όριο της στατιστικής σημαντικότητας σε όλες τις δοκιμασίες τέθηκε στο $p < 0.05$. Όλες οι τιμές εκφράζονται ως μέση τιμή (mean) \pm μία σταθερή απόκλιση (SD), εκτός από τις τιμές της Lp(a) και της PON1 (paraoxon), που εκφράζονται ως ενδιάμεση τιμή (median) – εύρος (range). Η σύγκριση των συχνοτήτων και των ποσοστών μεταξύ των ομάδων της μελέτης έγινε με τις δοκιμασία χ^2 -test. Ο έλεγχος για τη κανονικότητα ή μη της κατανομής κάθε παραμέτρου έγινε με τη δοκιμασία Kolmogorov-Smirnov.

Η σύγκριση των μέσων τιμών των παραμέτρων με κανονική κατανομή (normal distribution) έγινε με τη δοκιμασία Students' t-test for independent samples για σύγκριση μεταξύ δύο ανεξάρτητων ομάδων ή με τη δοκιμασία της ανάλυσης της μεταβλητότητας σε μία διεύθυνση [breakdown & one-way analysis of variance (ANOVA)] για σύγκριση μεταξύ τριών ή περισσότερων ανεξάρτητων ομάδων. Στην τελευταία περίπτωση, εφόσον το αποτέλεσμα ήταν στατιστικά σημαντικό, εφαρμόστηκε η δοκιμασία της ελάχιστης σημαντικής διαφοράς [least significance difference (LSD)] για τις ανά ζεύγη συγκρίσεις των ομάδων.

Η σύγκριση των ενδιάμεσων τιμών των παραμέτρων με μη κανονική κατανομή (skewed distribution) [π.χ των τριγλυκεριδίων, της ApoE, της PON1(paraoxon) και της Lp(a)] έγινε με τη δοκιμασία Mann-Whitney U test για σύγκριση μεταξύ δύο ανεξάρτητων ομάδων ή με τη δοκιμασία Kruskal-Wallis ANOVA median test για σύγκριση μεταξύ 3 ή περισσότερων ανεξάρτητων ομάδων. Στην τελευταία περίπτωση, εφόσον το αποτέλεσμα ήταν στατιστικά σημαντικό, εφαρμόστηκε η δοκιμασία Mann-Whitney U test για τις ανά ζεύγη συγκρίσεις των ομάδων.

Η διόρθωση (adjustment) των μέσων τιμών των υπό μελέτη παραμέτρων για διάφορες άλλες μεταβλητές (π.χ για τα αρχικά επίπεδα της παραμέτρου, το φύλο, την ηλικία, τον δείκτη μάζας σώματος, το κάπνισμα, τη διάρκεια της εξωνεφρικής κάθαρσης κ.τ.λ) και η σύγκριση αυτών των μέσων τιμών μεταξύ των διαφορετικών ομάδων έγινε με τη δοκιμασία της ανάλυσης της συν-μεταβλητότητας [analysis of co-variance (ANCOVA)]. Πρέπει να σημειωθεί ότι σε αυτή τη περίπτωση προηγήθηκε λογαριθμικός μετασχηματισμός των τιμών των παραμέτρων με μη κανονική κατανομή.

Η σύγκριση μεταξύ των μέσων τιμών των παραμέτρων με κανονική κατανομή πριν και μετά την αιμοκάθαρση έγινε με τη δοκιμασία Students' t-test for dependent samples,



ενώ η σύγκριση μεταξύ των ενδιαμέσων τιμών των παραμέτρων με μη κανονική κατανομή πριν και μετά την αιμοκάθαρση έγινε με τη δοκιμασία Wilcoxon matched pairs test.

Ο υπολογισμός του συντελεστή συσχέτισης (r) μεταξύ των διαφόρων παραμέτρων σε μονοπαραγοντική ανάλυση (univariate analysis) έγινε με την εξίσωση του Pearson, ενώ ο έλεγχος της στατιστικής σημαντικότητας του συντελεστή συσχέτισης έγινε με τη χρησιμοποίηση της Student's t-κατανομής με 2 βαθμούς ελευθερίας (df).

Για τον έλεγχο της επίδρασης σε μία μεταβολική παράμετρο (dependent variable) διαφόρων παραγόντων (regressors) που την επηρεάζουν σημαντικά σε μονοπαραγοντική ανάλυση εφαρμόσθηκε η δοκιμασία της πολλαπλής γραμμικής εξάρτησης (multiple linear regression analysis). Χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος για την ταυτόχρονη είσοδο όλων των παραγόντων στο μοντέλο της πολυπαραγοντικής ανάλυσης. Από αυτή την ανάλυση υπολογίσθηκε ο συντελεστής beta (b) και η στατιστική σημαντικότητα (p) κάθε παράγοντα χωριστά. Το ολικό ποσοστό (%) της μεταβλητότητας της υπό μελέτη παραμέτρου που μπορεί να εξηγηθεί από τους παράγοντες που συνεκτιμήθηκαν στο πολυπαραγοντικό μοντέλο ορίσθηκε ως $R^2 \times 100$. Τέλος, πρέπει να σημειωθεί ότι τόσο στα μονοπαραγοντικά όσο και στα πολυπαραγοντικά μοντέλα προηγήθηκε ο λογαριθμικός μετασχηματισμός των τιμών των παραμέτρων που δεν εμφάνιζαν κανονική κατανομή [π.χ των τριγλυκεριδίων, της ApoE, της PON1(paraoxon) και της Lp(a)].



ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8^ο

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

8.1. ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΟΥ ΠΛΗΘΥΣΜΟΥ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Τα κλινικά και εργαστηριακά χαρακτηριστικά του πληθυσμού της μελέτης φαίνονται στον πίνακα 7.

Τα άτομα που συμμετείχαν στις 4 υποομάδες της μελέτης δεν διέφεραν μεταξύ τους όσον αφορά την ηλικία, την κατανομή του φύλου, τις καπνιστικές συνήθειες και τη γλυκόζη νηστείας του ορού. Οι υγιείς μάρτυρες (ομάδα ελέγχου) είχαν μεγαλύτερο δείκτη μάζας σώματος σε σύγκριση με τους ασθενείς της μελέτης, ενώ οι ασθενείς που υποβάλλονταν σε αιμοκάθαρση (ΑΜΚ) είχαν μικρότερο δείκτη μάζας σώματος σε σύγκριση με τους ασθενείς με προτελικό στάδιο χρόνιας νεφρικής ανεπάρκειας (ΠΤΧΝΑ) (στάδια III και IV της χρόνιας νεφρικής νόσου) και με τους ασθενείς που υποβάλλονταν σε συνεχή φορητή περιτοναϊκή κάθαρση (ΣΦΠΚ). Επιπρόσθετα, οι ασθενείς της μελέτης είχαν υψηλότερες τιμές συστολικής και διαστολικής αρτηριακής πίεσης σε σύγκριση με τους υγιείς μάρτυρες, ενώ τα επίπεδα της αλβουμίνης του ορού ήταν χαμηλότερα στους ασθενείς με τελικού σταδίου ΧΝΑ (ΤΣΧΝΑ) (στάδιο V χρόνιας νεφρικής νόσου, δηλαδή οι ασθενείς που υποβάλλονταν σε ΑΜΚ και ΣΦΠΚ) σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου και τους ασθενείς με ΠΤΧΝΑ.

Οι ασθενείς που υποβάλλονταν σε ΑΜΚ είχαν χαμηλότερα επίπεδα ολικής χοληστερόλης, LDL χοληστερόλης, HDL χοληστερόλης, non HDL χοληστερόλης και αποπρωτεϊνών Β (ApoB) και ΑΙ (ApoAI), ενώ αντίθετα οι ασθενείς που υποβάλλονταν σε ΣΦΠΚ είχαν υψηλότερα επίπεδα ολικής χοληστερόλης, LDL χοληστερόλης, non HDL χοληστερόλης και ApoB σε σύγκριση με τα άτομα των υπολοίπων ομάδων της μελέτης. Οι ασθενείς με ΤΣΧΝΑ είχαν υψηλότερα επίπεδα τριγλυκεριδίων του ορού καθώς και χαμηλότερα επίπεδα HDL χοληστερόλης σε σύγκριση με τους υγιείς μάρτυρες. Επιπρόσθετα, τα επίπεδα της λιποπρωτεΐνης (α) [Lp(a)] ήταν αυξημένα στους ασθενείς με ΤΣΧΝΑ (και κυρίως στους ασθενείς που υποβάλλονταν σε ΣΦΠΚ) σε σύγκριση με τους υγιείς μάρτυρες και τους ασθενείς με ΠΤΧΝΑ.



Πίνακας 7. Κλινικά και εργαστηριακά χαρακτηριστικά του πληθυσμού της μελέτης

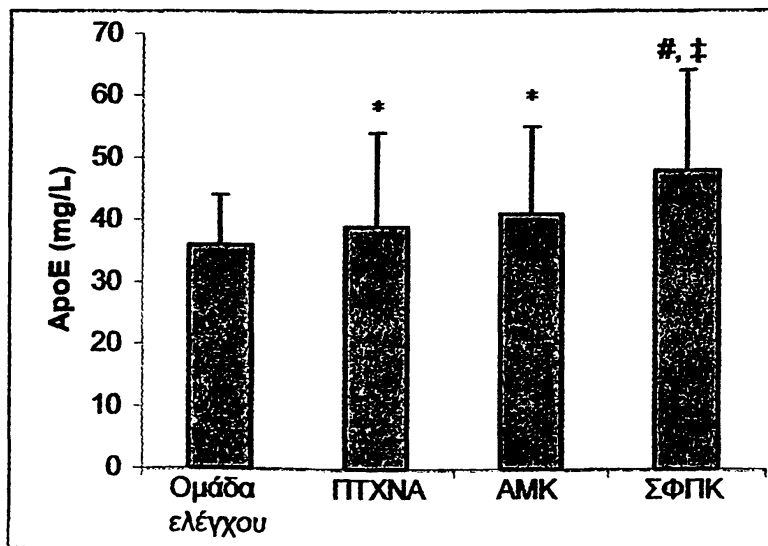
	Ομάδα ελέγχου	ΠΤΧΝΑ	ΑΜΚ	ΣΦΠΚ	P
Αριθμός ατόμων	290	48	301	46	-
Ηλικία (έτη)	60.3±17.2	62.9±13.4	62.5±15.2	61.4±13.4	NS
Φύλο (Α/Γ)	154/136	28/20	168/133	25/21	NS
Κάπνισμα (Ν/Ο)	80/210	16/32	104/197	15/31	NS
BMI (Kg/m ²)	26.2±3.1	25.4±3.1 [#]	24.2±2.9 ^{*,†‡}	25.1±2.9 [∞]	0.01
Γλυκόζη ορού (mg/dl)	92±8	95±21	90±18	96±21	NS
Κρεατινίνη ορού (mg/dl)	0.92±0.13	3.15±1.01 [#]	10.4±2.7 ^{*,†}	9.5±2.8 ^{∞,®}	0.000
Ουρία ορού (mg/dl)	33±9	103±34 [#]	179±48 ^{*,†}	151±39 ^{∞,®}	0.000
Αλβουμίνη ορού (g/dl)	4.1±0.4	4.1±0.3	3.7±0.3 ^{*,†}	3.7±0.4 ^{∞,®}	0.01
ΣΑΠ (mmHg)	132±7	148±22 [#]	146±22 [*]	147±20 [∞]	0.01
ΔΑΠ (mmHg)	83±4	93±7 [#]	92±7 [*]	93±7 [∞]	0.01
T-CHOL (mg/dl)	202±33	206±42	176±46 ^{*,†‡}	240±57 ^{∞,®,\$}	0.000
TRG (mg/dl)	103±54	157±69 [#]	180±118 ^{*,†}	178±90 ^{∞,®}	0.000
HDL-C (mg/dl)	52±11	43±11 [#]	36±9 ^{*,†‡}	46±16 ^{∞,\$}	0.000
LDL-C (mg/dl)	135±32	132±29	104±37 ^{*,†‡}	159±46 ^{∞,®,\$}	0.000
non HDL-C (mg/dl)	150±37	163±36 [#]	139±44 ^{*,†‡}	195±53 ^{∞,®,\$}	0.000
ΑποAI (mg/dl)	144±24	129±22 [#]	119±22 ^{*,†‡}	140±38 ^{®,\$}	0.01
ΑποB (mg/dl)	96±21	107±38 [#]	87±27 ^{*,†‡}	120±26 ^{∞,®,\$}	0.000
ΑποE (mg/L)	36±8	39±15 [#]	41±14 ^{*,†‡}	48±16 ^{∞,®,\$}	0.001
Lp(a) (mg/dl)	7.8(0.8-56)	7.8(0.8-37)	12(3-171) ^{*,†‡}	23(3-53) ^{∞,®,\$}	0.000
Διάρκεια εξωνεφρικής κάθαρσης (μήνες)	-	-	59±53	53±20	NS

ΠΤΧΝΑ; Χρόνια νεφρική ανεπάρκεια προτελικού σταδίου (III-IV), ΑΜΚ; Αιμοκάθαρση, ΣΦΠΚ; Συνεχής φορητή περιτοναϊκή κάθαρση, Α; Άνδρες, Γ; Γυναίκες, Ν; Ναι, Ο; Όχι, BMI; Δείκτης μάζας σώματος, ΣΑΠ, ΔΑΠ; Συστολική και διαστολική αρτηριακή πίεση, T-CHOL; Ολική χοληστερόλη, LDL-C; LDL χοληστερόλη, HDL-C; HDL χοληστερόλη, non HDL-C; non HDL χοληστερόλη, TRG; Τριγλυκερίδια, Απο; Αποπρωτεΐνη, Lp(a); Λιποπρωτεΐνη (α), NS; Όχι στατιστικά σημαντική διαφορά.

p < 0.05 για τη σύγκριση: #; μεταξύ ΠΤΧΝΑ και ομάδας ελέγχου, *; μεταξύ ΑΜΚ και ομάδας ελέγχου, †; μεταξύ ΑΜΚ και ΠΤΧΝΑ, ‡; μεταξύ ΑΜΚ και ΣΦΠΚ, ∞; μεταξύ ΣΦΠΚ και ομάδας ελέγχου, ®; μεταξύ ΣΦΠΚ και ΠΤΧΝΑ, \$; μεταξύ ΣΦΠΚ και ΑΜΚ.



Τα επίπεδα της αποπρωτεΐνης E (ApoE) ήταν υψηλότερα στους ασθενείς σε σύγκριση με τους υγιείς μάρτυρες, ενώ οι ασθενείς που υποβάλλονταν σε ΣΦΠΚ εμφάνιζαν τις υψηλότερες τιμές αυτής της αποπρωτεΐνης (σχήμα 38). Αξίζει, τέλος, να σημειωθεί ότι όλες οι παραπάνω διαφορές μεταξύ των ομάδων της μελέτης ήταν στατιστικά σημαντικές ακόμη και μετά τη διόρθωση για το δείκτη μάζας σώματος, την ηλικία, το φύλο και τις καπνιστικές συνήθειες.



Σχήμα 38. Τα επίπεδα της ApoE στις διάφορες ομάδες της μελέτης

ΠΤΧΝΑ; Χρόνια νεφρική ανεπάρκεια προτελικού σταδίου (III-IV), ΑΜΚ; Αιμοκάθαρση, ΣΦΠΚ; Συνεχής φορητή περιτοναϊκή κάθαρση. * $p < 0.05$ για τη σύγκριση μεταξύ ΑΜΚ ή ΠΤΧΝΑ και υγιών μαρτύρων, # $p < 0.01$ για τη σύγκριση μεταξύ ΣΦΠΚ και υγιών μαρτύρων, ‡ $p < 0.01$ για τη σύγκριση μεταξύ ΣΦΠΚ και ΑΜΚ ή ΠΤΧΝΑ.





Πίνακας 8. Επίδραση των πολυμορφισμών της ApoE στο λιπιδαιμικό προφίλ των υγιών μαρτύρων

	Αλλήλιο ε2 (N=29) ApoE2/3, E2/2	Αλλήλιο ε3 (N=187) ApoE3/3	Αλλήλιο ε4 (N=71) ApoE3/4, E4/4	p
Ηλικία (έτη)	60.8±13.2	60.2±12.9	60.4±18.1	NS
Φύλο (Α/Γ)	15/14	98/89	39/32	NS
Κάπνισμα (N/O)	8/21	52/135	20/51	NS
BMI (Kg/m ²)	26.1±2.8	26.2±3.0	26.3±2.9	NS
Γλυκόζη ορού (mg/dl)	92.6±7.6	92.5±8.3	91.3±8.0	NS
T-CHOL (mg/dl)	187.8±31.3 ^{a,b}	203.5±35.0	219.5±29.1 ^c	0.02
TRG (mg/dl)	143.4±88.5 ^{a,b}	98.2±48.6	101.6±55.1	0.03
HDL-C (mg/dl)	51.4±9.7	52.4±10.7	51.7±10.1	NS
LDL-C (mg/dl)	115.0±24.8 ^{a,b}	134.7±34.5	145.3±27.5 ^c	0.001
non HDL-C (mg/dl)	140.1±32.1 ^{a,b}	152.1±42.0	169.6±31.2 ^c	0.001
ApoAI (mg/dl)	128.7±13.2 ^a	148.7±23.9	133.0±20.8 ^c	0.007
ApoB (mg/dl)	90.7±18.7 ^{a,b}	95.0±21.8	103.2±22.2 ^c	0.01
ApoE (mg/L)	50.2±6.7 ^{a,b}	35.7±6.7	32.6±7.7 ^c	0.000
Lp(a) (mg/dl)	7.2(0.8-34)	8.8(0.8-56)	7.8(0.8-48)	NS

A; Άνδρες, Γ; Γυναίκες, N; Ναι, O; Όχι, BMI; Δείκτης μάζας σώματος, T-CHOL; Ολική χοληστερόλη, LDL-C; LDL χοληστερόλη, HDL-C; HDL χοληστερόλη, non HDL-C; non HDL χοληστερόλη, TRG; Τριγλυκερίδια, Apo; Αποπρωτεΐνη, Lp(a); Λιποπρωτεΐνη (α), NS; Όχι στατιστικά σημαντική διαφορά.

a; p<0.05 για τη σύγκριση μεταξύ των ατόμων με το αλλήλιο ε2 και των ατόμων με το αλλήλιο ε3, b; p<0.05 για τη σύγκριση μεταξύ των ατόμων με το αλλήλιο ε2 και των ατόμων με το αλλήλιο ε4, c; p<0.05 για τη σύγκριση μεταξύ των ατόμων με το αλλήλιο ε4 και των ατόμων με το αλλήλιο ε3.

Τα άτομα με τον πολυμορφισμό ApoE4/2 (n=3) αποκλείστηκαν από την ανάλυση.



Ο πίνακας 9 δείχνει τα αποτελέσματα της πολυπαραγοντικής ανάλυσης της επίδρασης των πολυμορφισμών της ApoE, καθώς και της ηλικίας, του φύλου και του δείκτη μάζας σώματος στις λιπιδαιμικές παραμέτρους του ορού των υγιών ατόμων. Από αυτή την ανάλυση φαίνεται ότι οι πολυμορφισμοί της ApoE επηρεάζουν ανεξάρτητα και σημαντικά τις τιμές των λιπιδαιμικών παραμέτρων του ορού [εκτός από τα επίπεδα της HDL χοληστερόλης και της Lp(a)].

Στον πίνακα 10 φαίνεται η συνδυασμένη επίδραση των πολυμορφισμών και της συγκέντρωσης στον ορό της ApoE στις λιπιδαιμικές παραμέτρους του ορού των υγιών ατόμων, όταν στο μοντέλο πολυπαραγοντικής ανάλυσης του πίνακα 9 (μοντέλο A) προστεθεί η συγκέντρωση της ApoE στον ορό (μοντέλο B). Σε αυτή τη περίπτωση, αφενός μεν η επίδραση των πολυμορφισμών της ApoE στις λιπιδαιμικές παραμέτρους αποκτά μεγαλύτερη στατιστική σημαντικότητα (μικρότερη τιμή του p) και αφετέρου ο συνδυασμός της συγκέντρωσης και των πολυμορφισμών της ApoE εξηγεί ένα μεγαλύτερο ποσοστό ($R^2 \times 100$) της μεταβλητότητας των λιπιδαιμικών παραμέτρων σε σύγκριση με το ποσοστό που εξηγείται από την επίδραση μόνο των πολυμορφισμών της ApoE. Τέλος, η συγκέντρωση της ApoE (μετά από λογαριθμικό μετασχηματισμό) συσχετίζεται θετικά με τις λιπιδαιμικές παραμέτρους του ορού [εκτός από τα επίπεδα της HDL χοληστερόλης: $\beta=0.045$, $p=NS$ και της Lp(a): $\beta=0.003$, $p=NS$] ανεξάρτητα από τους πολυμορφισμούς της ApoE: με την ολική χοληστερόλη ($\beta=0.62$, $p=0.000$), με την LDL χοληστερόλη ($\beta=0.482$, $p=0.000$), με το δεκαδικό λογάριθμο των τριγλυκεριδίων ($\beta=0.509$, $p=0.000$), με την ApoAI ($\beta=0.14$, $p=0.05$) και με την ApoB ($\beta=0.47$, $p=0.000$).



Πίνακας 9. Επίδραση των πολυμορφισμών της ApoE και άλλων παραμέτρων στο λιπιδαιμικό προφίλ του ορού των υγιών ατόμων

	R ² X 100*	Πολυμορφισμός της ApoE **	Ηλικία **	Φύλο **	BMI **
T-CHOL	3.8	0.001	0.02	NS	0.05
LogTRG	22.9	0.006	NS	NS	0.000
LDL-C	3	0.002	NS	NS	NS
HDL-C	17	NS	0.03	0.03	0.000
ApoAI	20.2	0.000	0.02	0.04	NS
ApoB	6	0.000	NS	NS	0.003
LogApoE	33	0.000	NS	NS	0.029
LogLp(a)	1	NS	NS	NS	NS

BMI; Δείκτης μάζας σώματος, T-CHOL; Ολική χοληστερόλη, LDL-C; LDL χοληστερόλη, HDL-C; HDL χοληστερόλη, TRG; Τριγλυκερίδια, Apo; Αποπρωτεΐνη, Lp(a); Λιποπρωτεΐνη (α), NS; Όχι στατιστικά σημαντική διαφορά. Log; Λογαριθμικός μετασχηματισμός των παραμέτρων με μη κανονική κατανομή. *R² x 100; % ποσοστό της μεταβλητότητας της υπό εξέταση παραμέτρου που εξηγείται από τους ανεξάρτητους παράγοντες που εισάγονται στο μοντέλο της ανάλυσης, **τιμή του p.





—



8.3. ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΩΝ ΤΗΣ ΑΡΟΕ ΣΤΗ ΝΕΦΡΙΚΗ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΤΩΝ ΥΓΙΩΝ ΑΤΟΜΩΝ

Η νεφρική λειτουργία των υγιών ατόμων εκτιμήθηκε με βάση τα επίπεδα της κρεατινίνης του ορού και από τον προβλεπόμενο ρυθμό σπειραματικής διήθησης (GFR), όπως αυτός προσδιορίζεται από την εξίσωση MDRD (βλ. Κεφάλαιο 7.2.).

Όπως φαίνεται στον πίνακα 11, οι τρεις ομάδες των υγιών ατόμων (ε2, ε3 και ε4) δεν διέφεραν μεταξύ τους όσον αφορά την ηλικία, την κατανομή του φύλου, το δείκτη μάζας σώματος, τις καπνιστικές συνήθειες, τις τιμές της συστολικής και διαστολικής αρτηριακής πίεσης και τα επίπεδα της αλβουμίνης του ορού. Ωστόσο, τα άτομα που είχαν το αλληλίο ε2 είχαν υψηλότερες τιμές κρεατινίνης του ορού σε σύγκριση με τα άτομα που είχαν το αλληλίο ε3, καθώς και με τα άτομα που είχαν το αλληλίο ε4 (1.04 ± 0.13 vs 0.92 ± 0.13 vs 0.88 ± 0.11 mg/dl, αντίστοιχα, $p=0.0077$)⁴³⁵. Επιπρόσθετα, η παρουσία του αλληλίου ε2 συσχετιζόταν με χαμηλότερη προβλεπόμενη κάθαρση κρεατινίνης σε σύγκριση με την παρουσία των αλληλίων ε3 και ε4 (80.3 ± 10.2 vs 88.1 ± 9.6 vs 89.3 ± 9.7 ml/min/1.73m², αντίστοιχα, $p=0.031$). Αντίθετα, η παρουσία του αλληλίου ε4 συσχετιζόταν με χαμηλότερες τιμές κρεατινίνης του ορού και υψηλότερες τιμές προβλεπόμενης κάθαρσης κρεατινίνης σε σύγκριση με το αλληλίο ε3, αν και αυτές οι διαφορές δεν ήταν στατιστικά σημαντικές.

Ο πίνακας 12 και τα σχήματα 39 και 40 δείχνουν ότι οι παραπάνω διαφορές παρέμεναν στατιστικά σημαντικές και μετά από τη διόρθωση των επιπέδων της κρεατινίνης του ορού και της προβλεπόμενης κάθαρσης κρεατινίνης για την ηλικία και το δείκτη μάζας σώματος (BMI) χωριστά στα δύο φύλα.

Τέλος, η πολυπαραγοντική ανάλυση των δεδομένων έδειξε ότι το φύλο ($\beta=-0.60$, $p=0.000$), ο BMI ($\beta=0.18$, $p=0.02$) και οι πολυμορφισμοί της ApoE ($\beta=-0.17$, $p=0.012$) επηρεάζουν σημαντικά και ανεξάρτητα τα επίπεδα της κρεατινίνης του ορού αυτών των ατόμων.



Πίνακας 10. Συνδυασμένη επίδραση των πολυμορφισμών και της συγκέντρωσης της ApoE στις λιπιδαιμικές παραμέτρους του ορού των υγιών ατόμων

	Μοντέλο A		Μοντέλο B	
	R ² X 100*	p [#]	R ² X 100**	p [#]
T-CHOL	3.8	0.001	24.3	0.000
LogTRG	22.9	0.006	43.1	0.000
LDL-C	3	0.002	20.5	0.000
HDL-C	17	NS	21	NS
ApoAI	20.2	0.000	20.6	0.000
ApoB	6	0.000	26.3	0.000

T-CHOL; Ολική χοληστερόλη, LDL-C; LDL χοληστερόλη, HDL-C; HDL χοληστερόλη, TRG; Τριγλυκερίδια, Apo; Αποπρωτεΐνη, Log; Λογαριθμικός μετασχηματισμός των παραμέτρων με μη κανονική κατανομή. *R² x 100; % ποσοστό της μεταβλητότητας της υπό εξέταση παραμέτρου που εξηγείται από τους πολυμορφισμούς της ApoE, την ηλικία, το φύλο και το δείκτη μάζας σώματος (BMI) (μοντέλο A), **R² x 100; % ποσοστό της μεταβλητότητας της υπό εξέταση παραμέτρου που εξηγείται από τους πολυμορφισμούς της ApoE, την ηλικία, το φύλο, τον BMI και τη συγκέντρωση της ApoE (μοντέλο B), [#]p; τιμή του p για τους πολυμορφισμούς της ApoE στα μοντέλα της πολυπαραγοντικής ανάλυσης, NS; Όχι στατιστικά σημαντική διαφορά.



8.3. ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΩΝ ΤΗΣ ΑΡΟΕ ΣΤΗ ΝΕΦΡΙΚΗ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΤΩΝ ΥΓΙΩΝ ΑΤΟΜΩΝ

Η νεφρική λειτουργία των υγιών ατόμων εκτιμήθηκε με βάση τα επίπεδα της κρεατινίνης του ορού και από τον προβλεπόμενο ρυθμό σπειραματικής διήθησης (GFR), όπως αυτός προσδιορίζεται από την εξίσωση MDRD (βλ. Κεφάλαιο 7.2.).

Όπως φαίνεται στον πίνακα 11, οι τρεις ομάδες των υγιών ατόμων (ε2, ε3 και ε4) δεν διέφεραν μεταξύ τους όσον αφορά την ηλικία, την κατανομή του φύλου, το δείκτη μάζας σώματος, τις καπνιστικές συνήθειες, τις τιμές της συστολικής και διαστολικής αρτηριακής πίεσης και τα επίπεδα της αλβουμίνης του ορού. Ωστόσο, τα άτομα που είχαν το αλληλίο ε2 είχαν υψηλότερες τιμές κρεατινίνης του ορού σε σύγκριση με τα άτομα που είχαν το αλληλίο ε3, καθώς και με τα άτομα που είχαν το αλληλίο ε4 (1.04 ± 0.13 vs 0.92 ± 0.13 vs 0.88 ± 0.11 mg/dl, αντίστοιχα, $p=0.0077$)⁴³⁵. Επιπρόσθετα, η παρουσία του αλληλίου ε2 συσχετιζόταν με χαμηλότερη προβλεπόμενη κάθαρση κρεατινίνης σε σύγκριση με την παρουσία των αλληλίων ε3 και ε4 (80.3 ± 10.2 vs 88.1 ± 9.6 vs 89.3 ± 9.7 ml/min/1.73m², αντίστοιχα, $p=0.031$). Αντίθετα, η παρουσία του αλληλίου ε4 συσχετιζόταν με χαμηλότερες τιμές κρεατινίνης του ορού και υψηλότερες τιμές προβλεπόμενης κάθαρσης κρεατινίνης σε σύγκριση με το αλληλίο ε3, αν και αυτές οι διαφορές δεν ήταν στατιστικά σημαντικές.

Ο πίνακας 12 και τα σχήματα 39 και 40 δείχνουν ότι οι παραπάνω διαφορές παρέμεναν στατιστικά σημαντικές και μετά από τη διόρθωση των επιπέδων της κρεατινίνης του ορού και της προβλεπόμενης κάθαρσης κρεατινίνης για την ηλικία και το δείκτη μάζας σώματος (BMI) χωριστά στα δύο φύλα.

Τέλος, η πολυπαραγοντική ανάλυση των δεδομένων έδειξε ότι το φύλο ($\beta=-0.60$, $p=0.000$), ο BMI ($\beta=0.18$, $p=0.02$) και οι πολυμορφισμοί της ApoE ($\beta=-0.17$, $p=0.012$) επηρεάζουν σημαντικά και ανεξάρτητα τα επίπεδα της κρεατινίνης του ορού αυτών των ατόμων.



Πίνακας 11. Επίδραση των πολυμορφισμών της ApoE στη νεφρική λειτουργία των υγιών ατόμων

	Αλλήλιο ε2 (N=29) ApoE2/3, E2/2	Αλλήλιο ε3 (N=187) ApoE3/3	Αλλήλιο ε4 (N=71) ApoE3/4, E4/4	p
Ηλικία (έτη)	60.8±13.2	60.2±12.9	60.4±18.1	NS
Φύλο (Α/Γ)	15/14	98/89	39/32	NS
Κάπνισμα (N/O)	8/21	52/135	20/51	NS
BMI (Kg/m ²)	26.1±2.8	26.2±3.0	26.3±2.9	NS
Κρεατινίνη ορού (mg/dl)	1.04±0.13 ^{a,b}	0.92±0.13	0.88±0.11	0.0077
Προβλεπόμενη GFR από την εξίσωση MDRD (ml/min/1.73m ²)	80.3±10.2 ^{a,b}	88.1±9.6	89.3±9.7	0.031
Αλβουμίνη ορού (g/dl)	4.1±0.3	4.1±0.4	4.1±0.3	NS
ΣΑΠ (mmHg)	133±9	132±7	134±8	NS
ΔΑΠ (mmHg)	84±6	83±4	85±9	NS

A; Άνδρες, Γ; Γυναίκες, N; Ναι, O; Όχι, BMI; Δείκτης μάζας σώματος, NS; Όχι στατιστικά σημαντική διαφορά. ΣΑΠ, ΔΑΠ; Συστολική και διαστολική αρτηριακή πίεση, GFR; Ρυθμός σπειραματικής διήθησης, MDRD; Modification of Diet in Renal Disease study.

a; p<0.05 για τη σύγκριση μεταξύ των ατόμων με το αλλήλιο ε2 και των ατόμων με το αλλήλιο ε3, b; p<0.05 για τη σύγκριση μεταξύ των ατόμων με το αλλήλιο ε2 και των ατόμων με το αλλήλιο ε4.

Τα άτομα με τον πολυμορφισμό ApoE4/2 (n=3) αποκλείστηκαν από την ανάλυση.



Πίνακας 12. Επίδραση των πολυμορφισμών της ApoE στη νεφρική λειτουργία των υγιών ατόμων σε σχέση με το φύλο

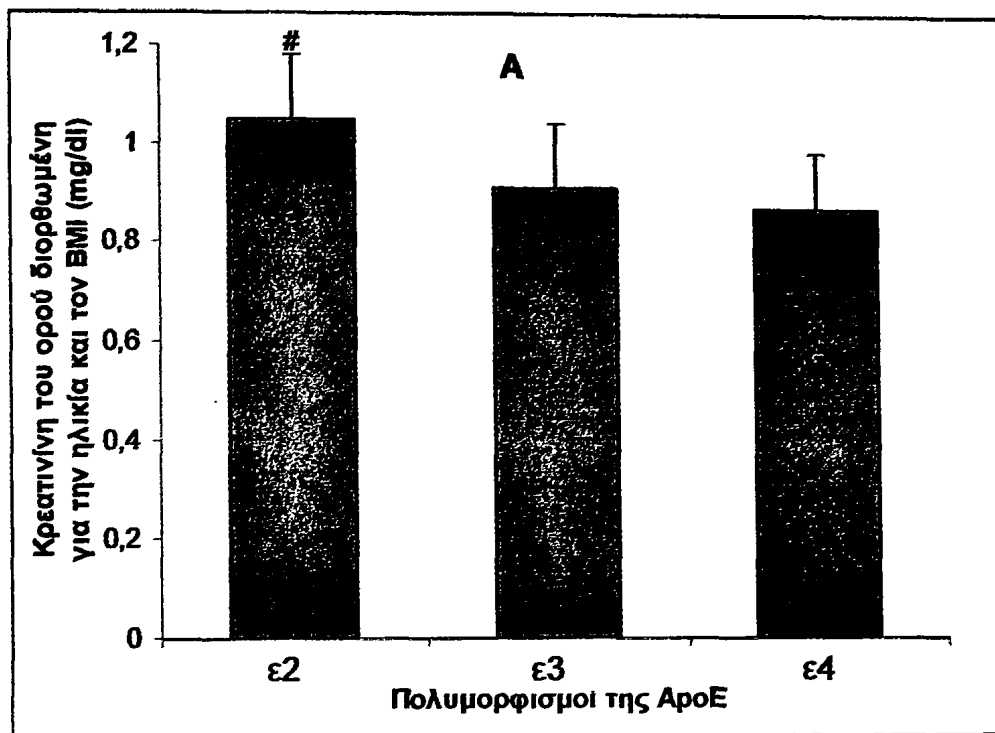
Άνδρες (n=152)				
	Αλληλίο ε2 (n=15) ApoE2/2, E2/3	Αλληλίο ε3 (n=98) ApoE3/3	Αλληλίο ε4 (n=39) ApoE4/3, E4/4	p
Κρεατινίνη του ορού διορθωμένη για την ηλικία και τον BMI (mg/dl)	1.20±0.10 ^{ab}	1.02±0.09	0.97±0.08	0.009
Προβλεπόμενη GFR από την εξίσωση MDRD διορθωμένη για την ηλικία και τον BMI (ml/min/1.73m ²)	83.4±10.3 ^{ab}	89.2±9.2	91.2±7.0	0.04
Γυναίκες (n=135)				
	Αλληλίο ε2 (n=14) ApoE2/2, E2/3	Αλληλίο ε3 (n=89) ApoE3/3	Αλληλίο ε4 (n=32) ApoE4/3, E4/4	p
Κρεατινίνη του ορού διορθωμένη για την ηλικία και τον BMI (mg/dl)	0.90±0.09 ^{ab}	0.80±0.09	0.78±0.06	0.01
Προβλεπόμενη GFR από την εξίσωση MDRD διορθωμένη για την ηλικία και τον BMI (ml/min/1.73m ²)	72.2±12.9 ^{ab}	83.7±9.5	86.5±13.7	0.03

BMI; Δείκτης μάζας σώματος, GFR; Ρυθμός σπειραματικής διήθησης, MDRD; Modification of Diet in Renal Disease study.

a; p<0.05 για τη σύγκριση μεταξύ των ατόμων με το αλληλίο ε2 και των ατόμων με το αλληλίο ε3, b; p<0.05 για τη σύγκριση μεταξύ των ατόμων με το αλληλίο ε2 και των ατόμων με το αλληλίο ε4.

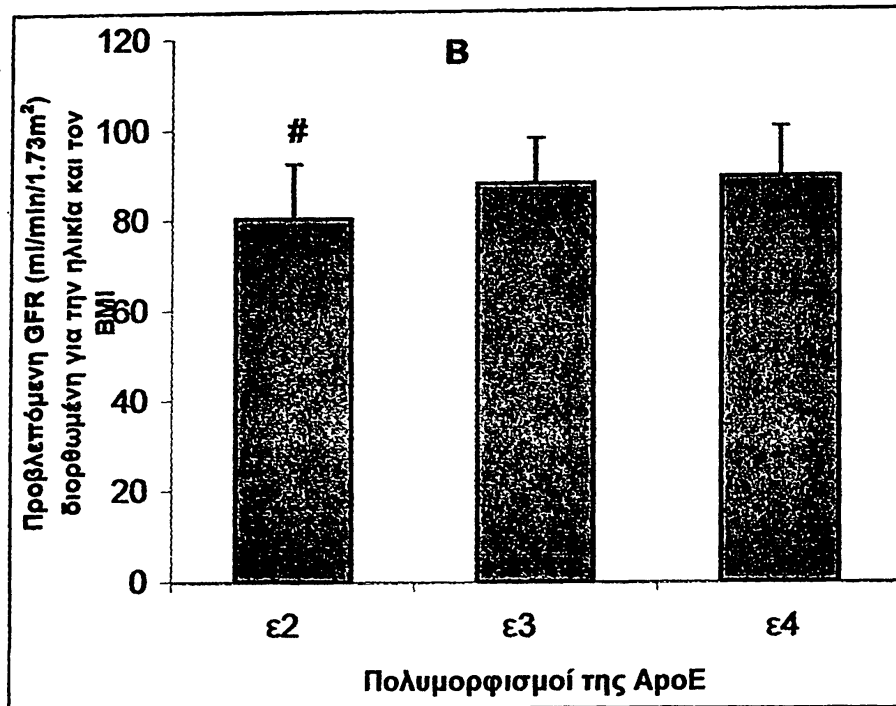
Τα άτομα με τον πολυμορφισμό ApoE4/2 (n=3) αποκλείστηκαν από την ανάλυση.





Σχήμα 39. Επίδραση των πολυμορφισμών της ApoE στα επίπεδα της κρεατινίνης του ορού των υγίων ατόμων

$p < 0.001$ για τη σύγκριση μεταξύ των ατόμων με το αλληλίο ε2 και των ατόμων με τα αλληλία ε3 και ε4.



Σχήμα 40. Επίδραση των πολυμορφισμών της ApoE στην προβλεπόμενη GFR των υγιών ατόμων

$p < 0.001$ για τη σύγκριση μεταξύ των ατόμων με το αλληλίο ε2 και των ατόμων με τα αλληλία ε3 και ε4.
GFR; Ρυθμός σπειραματικής διήθησης.

8.4. ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΤΗΣ ΕΠΙΤΩΣΗΣ ΤΩΝ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΩΝ ΤΗΣ ΑΡΟΕ ΜΕΤΑΞΥ ΤΩΝ ΑΣΘΕΝΩΝ ΜΕ ΤΕΛΙΚΟΥ ΣΤΑΔΙΟΥ ΧΝΑ (ΣΤΑΔΙΟ V) ΚΑΙ ΤΗΣ ΟΜΑΔΑΣ ΕΛΕΓΧΟΥ

Από τα δεδομένα που φαίνονται στον πίνακα 13 προκύπτει το συμπέρασμα ότι το αλληλίο ε4 και οι πολυμορφισμοί ΑροΕ4/3 και 4/4 υποεκφράζονται στους ασθενείς με τελικό στάδιο χρόνιας νεφρικής ανεπάρκειας (ΤΣΧΝΑ, δηλαδή το σύνολο των ασθενών που υποβάλλονταν σε ΑΜΚ και ΣΦΠΚ) σε σύγκριση με τους υγιείς μάρτυρες της ίδιας ηλικίας και φύλου⁴³⁶.

Πίνακας 13. Επίπτωση των πολυμορφισμών της ΑροΕ στους ασθενείς με ΤΣΧΝΑ και στην ομάδα ελέγχου

	ΤΣΧΝΑ (N=347)	Ομάδα ελέγχου (N=290)	p
E3/3	257 (74.0%)	187 (64.5%)	
E3/4	47 (13.6%)*	64 (22.0%)*	
E2/3	34 (9.8%)	28 (9.7%)	0.01
E2/2	5 (1.4%)	1 (0.3%)	
E2/4	3 (0.9%)	3 (1.0%)	
E4/4	1 (0.3%)*	7 (2.5%)*	
ε3	85.7%	80.3%	
ε4	7.5%*	14.0%*	0.0000
ε2	6.8%	5.7%	

*p; Στατιστικά σημαντικές διαφορές με τη δοκιμασία χ^2 . ΤΣΧΝΑ; Τελικού σταδίου χρόνια νεφρική ανεπάρκεια.



8.5. ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΑΡΟΕ ΣΤΙΣ ΛΙΠΙΔΑΙΜΙΚΕΣ ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΥΣ ΤΟΥ ΟΡΟΥ ΤΩΝ ΑΣΘΕΝΩΝ ΠΟΥ ΥΠΟΒΑΛΛΟΝΤΑΝ ΣΕ ΑΙΜΟΚΑΘΑΡΣΗ

8.5.1. Επίδραση των πολυμορφισμών της ΑροΕ στις λιπιδαιμικές παραμέτρους του ορού των ασθενών που υποβάλλονταν σε αιμοκάθαρση

Στον πίνακα 14 φαίνεται η επίδραση των πολυμορφισμών της ΑροΕ στα επίπεδα των λιπιδαιμικών παραμέτρων του ορού στους ασθενείς που υποβάλλονταν σε αιμοκάθαρση (ΑΜΚ). Τα άτομα με τον πολυμορφισμό ΑροΕ2/4 (n=3) αποκλείστηκαν από την ανάλυση εξαιτίας του μικρού τους αριθμού, αλλά και των δυσκολιών που υπάρχουν στην ταξινόμησή τους.

Οι τρεις ομάδες των ασθενών που υποβάλλονταν σε ΑΜΚ δεν διέφεραν μεταξύ τους όσον αφορά την ηλικία, την κατανομή του φύλου, το δείκτη μάζας σώματος, τη γλυκόζη νηστείας του ορού, το χρονικό διάστημα από την ένταξη στην ΑΜΚ και τις καπνιστικές συνήθειες. Τα άτομα με το αλληλίο ε2 είχαν σημαντικά χαμηλότερα επίπεδα ολικής χοληστερόλης, LDL χοληστερόλης, non HDL χοληστερόλης, τριγλυκεριδίων και ΑροΒ σε σύγκριση με τις υπόλοιπες δύο ομάδες⁴³⁶. Αντίθετα, τα άτομα με το αλληλίο ε4 είχαν τις υψηλότερες τιμές αυτών των παραμέτρων, αν και οι διαφορές δεν ήταν στατιστικά σημαντικές σε σύγκριση με τους ασθενείς που είχαν το αλληλίο ε3. Επιπρόσθετα, τα επίπεδα της HDL χοληστερόλης, της ΑροΑΙ και της Lp(a) δεν διέφεραν σημαντικά μεταξύ των παραπάνω ομάδων. Τέλος, η παρουσία του αλληλίου ε2 συσχετιζόταν με τα υψηλότερα επίπεδα ΑροΕ, ενώ η παρουσία του αλληλίου ε4 με τα χαμηλότερα επίπεδα ΑροΕ του ορού.

Πρέπει να επισημανθεί ότι 4 από τους 5 ομοζυγώτες ασθενείς ΑροΕ2/2 είχαν λιπιδαιμικό προφίλ συμβατό με τη διάγνωση της υπερλιποπρωτεϊναιμίας τύπου III (ολική χοληστερόλη 256.0±48.9 mg/dl, τριγλυκερίδια 293.0±39.9 mg/dl, HDL χοληστερόλη 30.0±5.3 mg/dl, ΑροΕ 102.1±21.4 mg/L). Σε αυτό το σημείο αξίζει επίσης να αναφερθεί ότι η συσχέτιση του αλληλίου ε2 με χαμηλότερα επίπεδα ολικής χοληστερόλης και τριγλυκεριδίων γίνονταν ισχυρότερη όταν από την ανάλυση εξαιρέθηκαν οι ομοζυγώτες ασθενείς ΑροΕ2/2.

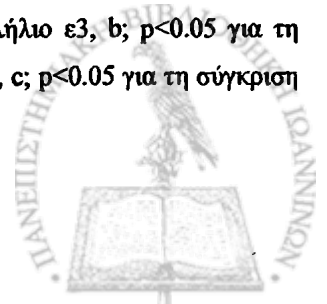
Τέλος, η επίδραση των πολυμορφισμών της ΑροΕ στα επίπεδα των λιπιδαιμικών παραμέτρων του ορού αυτών των ασθενών παρέμεινε στατιστικά σημαντική και μετά από τη διόρθωση για την ηλικία, το φύλο, το δείκτη μάζας σώματος, τις καπνιστικές συνήθειες και το χρόνο από την ένταξη στην αιμοκάθαρση.



Πίνακας 14. Επίδραση των πολυμορφισμών της ApoE στο λιπιδαιμικό προφίλ των ασθενών που υποβάλλονταν σε αιμοκάθαρση

	Αλληλίο ε2 (n=38) ApoE2/3, E2/2	Αλληλίο ε3 (n=222) ApoE3/3	Αλληλίο ε4 (n=38) ApoE3/4, 4/4	p
Ηλικία (έτη)	60.1±20.2	63.2±14.1	60.3±15.7	NS
Φύλο (Α/Γ)	24/14	118/103	24/15	NS
Κάπνισμα (Ν/Ο)	14/24	80/142	10/28	NS
BMI (Kg/m ²)	24.8±2.5	24.2±2.9	24.1±2.5	NS
Χρόνος από την ένταξη στην ΑΜΚ (μήνες)	58.2±51.4	59.1±52.4	59.8±52.4	NS
Γλυκόζη νηστείας ορού (mg/dl)	89.9±13.3	90.1±19.0	90.3±16.2	NS
T-CHOL (mg/dl)	150.9±44.6 ^{ab}	176.7±44.9	183.2±48.7	0.014
TRG (mg/dl)	158.0±72.5 ^{ab}	172.8±76.6	181.6±87.0	0.047
HDL-C (mg/dl)	33.7±9.8	36.3±9.1	35.0±7.7	NS
LDL-C (mg/dl)	85.5±35.8 ^{ab}	105.4±37.2	108.7±32.6	0.020
non HDL-C (mg/dl)	117.2±43.3	140.4±42.4	143.7±51.6	0.030
ApoAΙ (mg/dl)	115.4±23.7	119.8±21.3	114.7±21.1	NS
ApoB (mg/dl)	71.0±22.3 ^{ab}	88.0±25.4	88.6±31.7	0.007
ApoE (mg/L)	50.4±21.8 ^{ab}	39.5±13.2	33.3±11.7 ^c	0.0000
Lp(a) (mg/dl)	12.4 (2.6-46.2)	13.0 (2.6-171.0)	11.0 (2.6-68.4)	NS

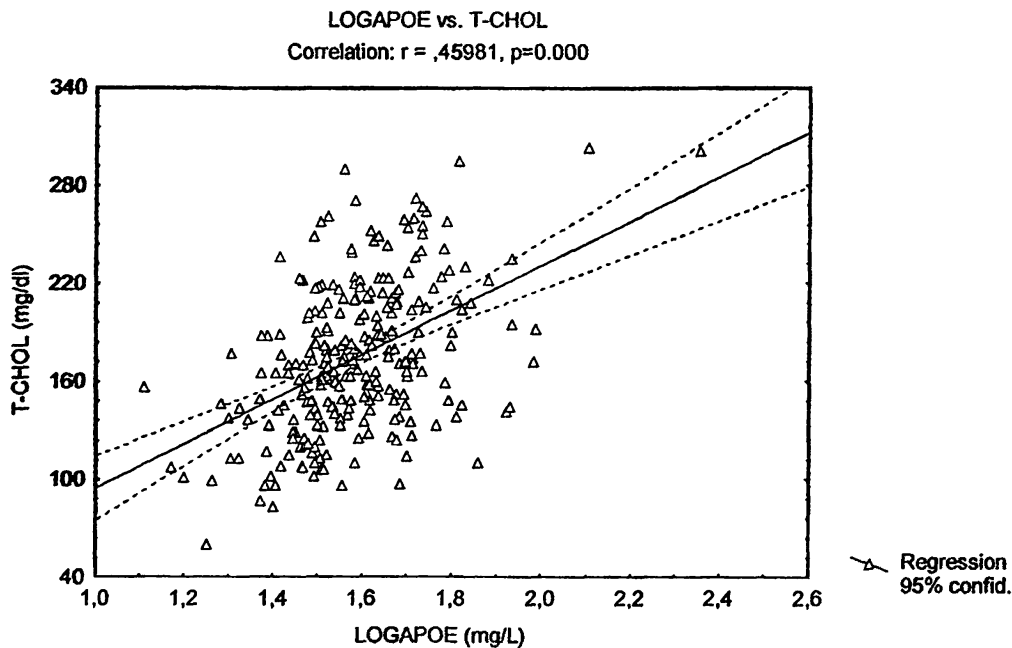
A; Άνδρες, Γ; Γυναίκες, Ν; Ναι, Ο; Όχι, BMI; Δείκτης μάζας σώματος, NS; Όχι στατιστικά σημαντική διαφορά, T-CHOL; Ολική χοληστερόλη, LDL-C; LDL χοληστερόλη, HDL-C; HDL χοληστερόλη, non HDL-C; non HDL χοληστερόλη, TRG; Τριγλυκερίδια, Apo; Αποπρωτεΐνη, Lp(a); Λιποπρωτεΐνη (α). a; p<0.05 για τη σύγκριση μεταξύ των ατόμων με το αλληλίο ε2 και των ατόμων με το αλληλίο ε3, b; p<0.05 για τη σύγκριση μεταξύ των ατόμων με το αλληλίο ε2 και των ατόμων με το αλληλίο ε4, c; p<0.05 για τη σύγκριση



μεταξύ των ατόμων με το αλληλίο ε4 και των ατόμων με το αλληλίο ε3. Τα άτομα με τον πολυμορφισμό ApoE4/2 (n=3) αποκλείστηκαν από την ανάλυση.

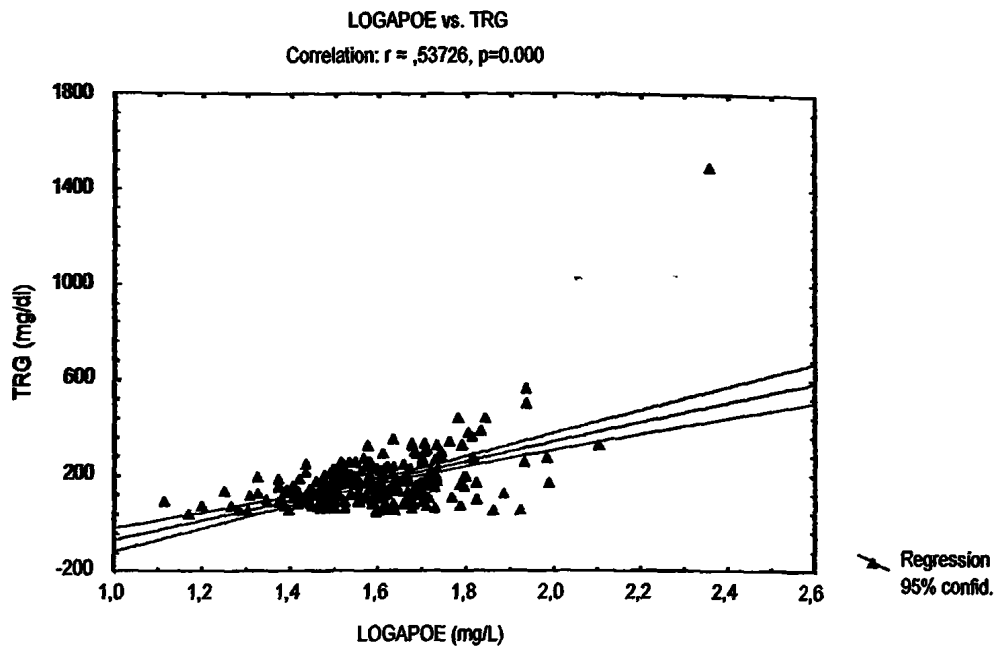
8.5.2. Συσχέτιση της συγκέντρωσης της ApoE στον ορό με τις λιπιδαιμικές παραμέτρους των ασθενών που υποβάλλονταν σε αιμοκάθαρση

Η συγκέντρωση της ApoE του ορού είχε πολύ καλή συσχέτιση σε μονοπαραγοντική ανάλυση με τις λιπιδαιμικές παραμέτρους του ορού των ασθενών που υποβάλλονταν σε αιμοκάθαρση [εκτός από την Lp(a): $r=0.004$, $p=NS$] (σχήματα 41-47).

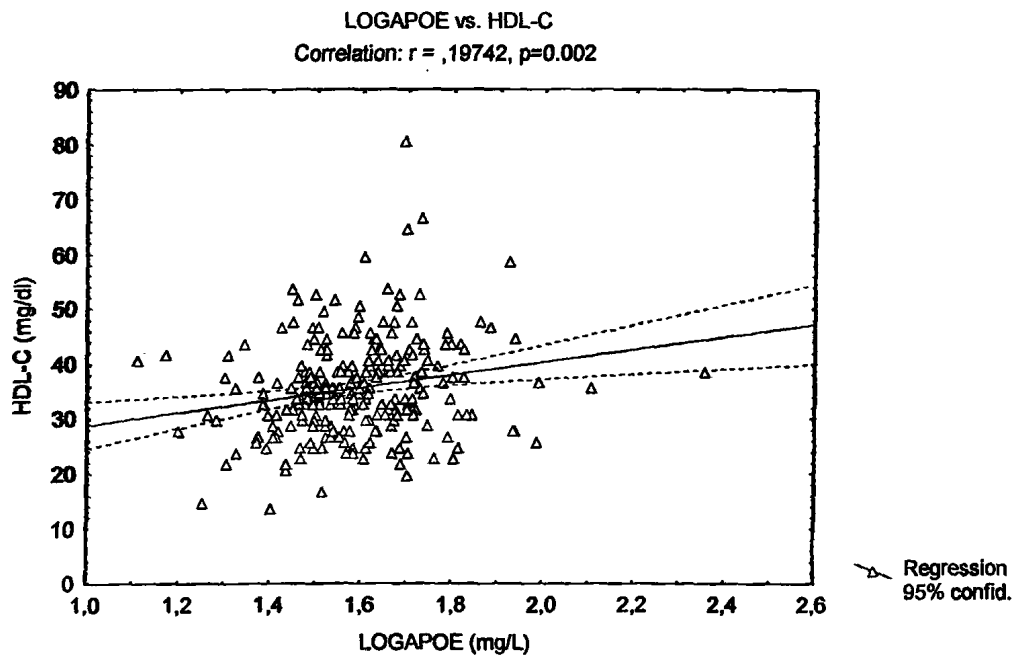


Σχήμα 41. Συσχέτιση της συγκέντρωσης της ApoE με τα επίπεδα της ολικής χοληστερόλης στους ασθενείς που υποβάλλονταν σε αιμοκάθαρση



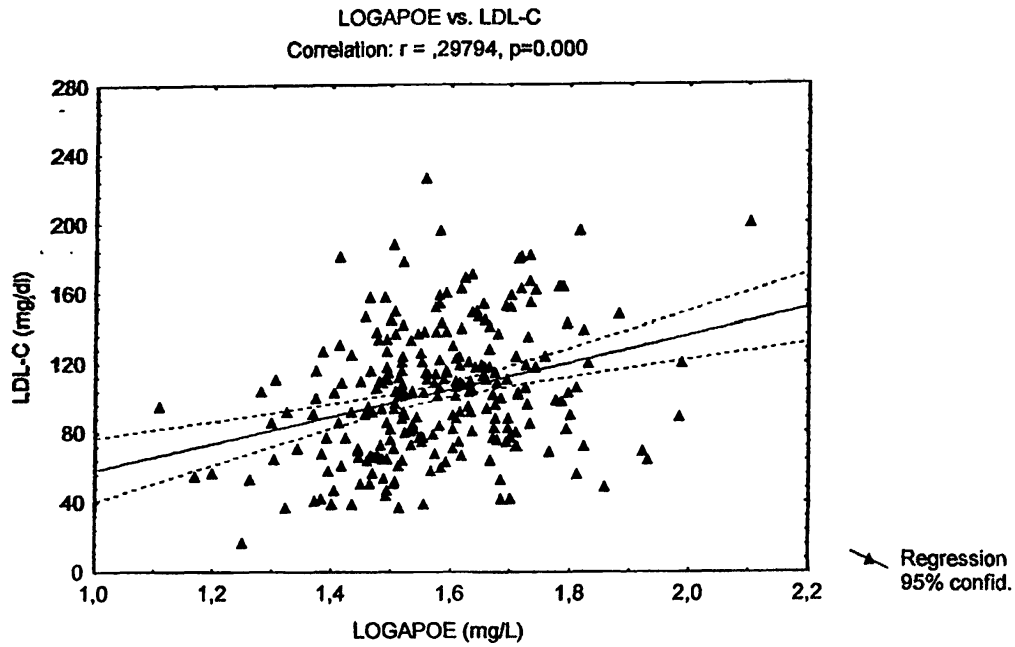


Σχήμα 42. Συσχέτιση της συγκέντρωσης της ΑροΕ με τα επίπεδα των τριγλυκεριδίων στους ασθενείς που υποβάλλονταν σε αιμοκάθαρση

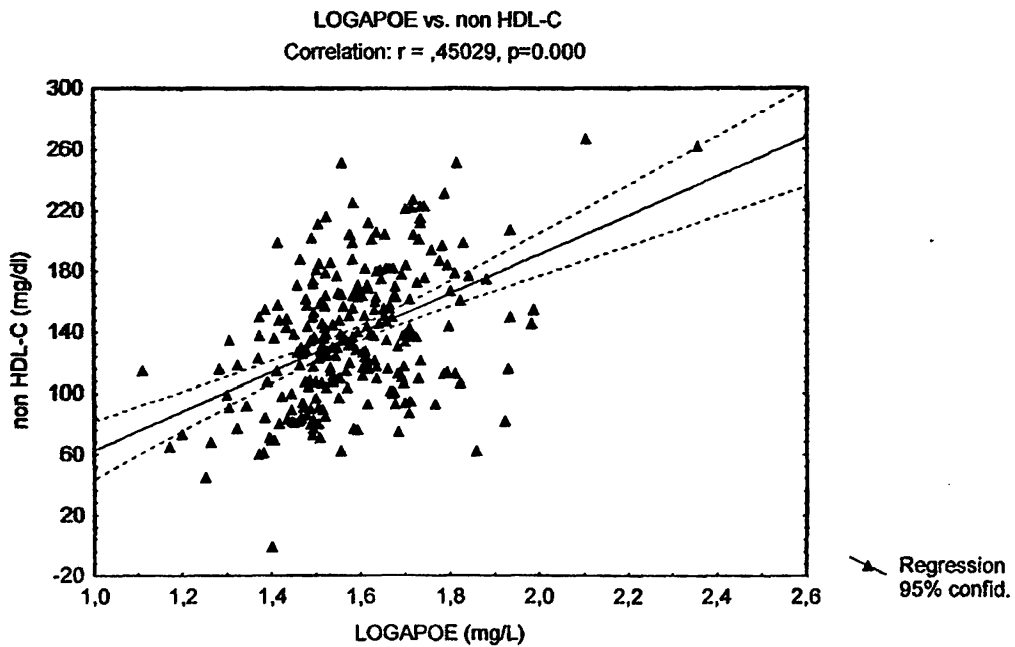


Σχήμα 43. Συσχέτιση της συγκέντρωσης της ΑροΕ με τα επίπεδα της HDL χοληστερόλης στους ασθενείς που υποβάλλονταν σε αιμοκάθαρση



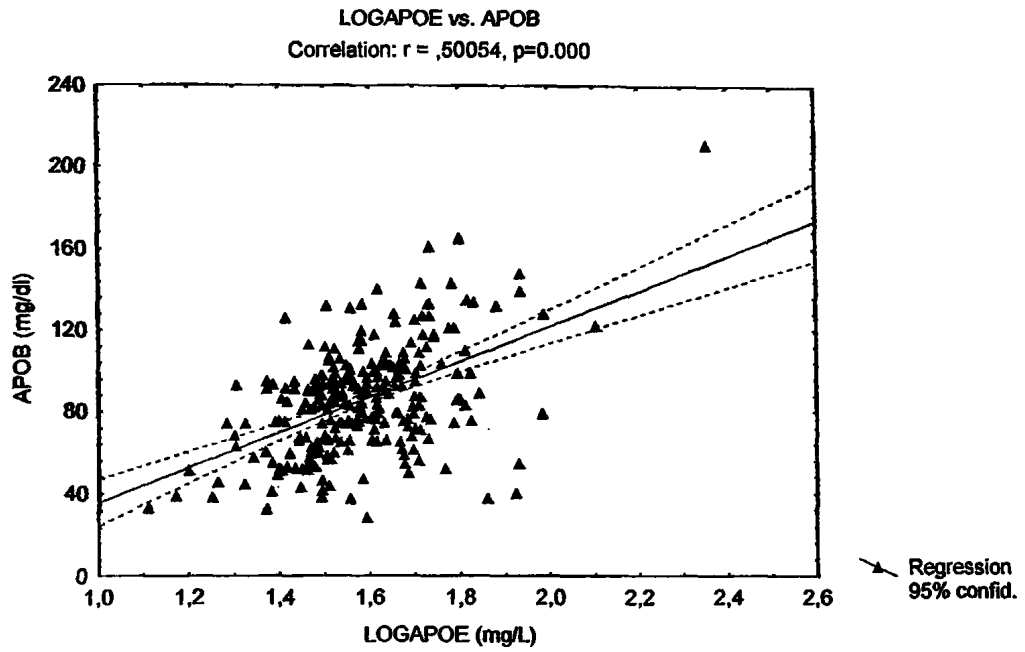


Σχήμα 44. Συσχέτιση της συγκέντρωσης της ApoE με τα επίπεδα της LDL χοληστερόλης στους ασθενείς που υποβάλλονταν σε αιμοκάθαρση

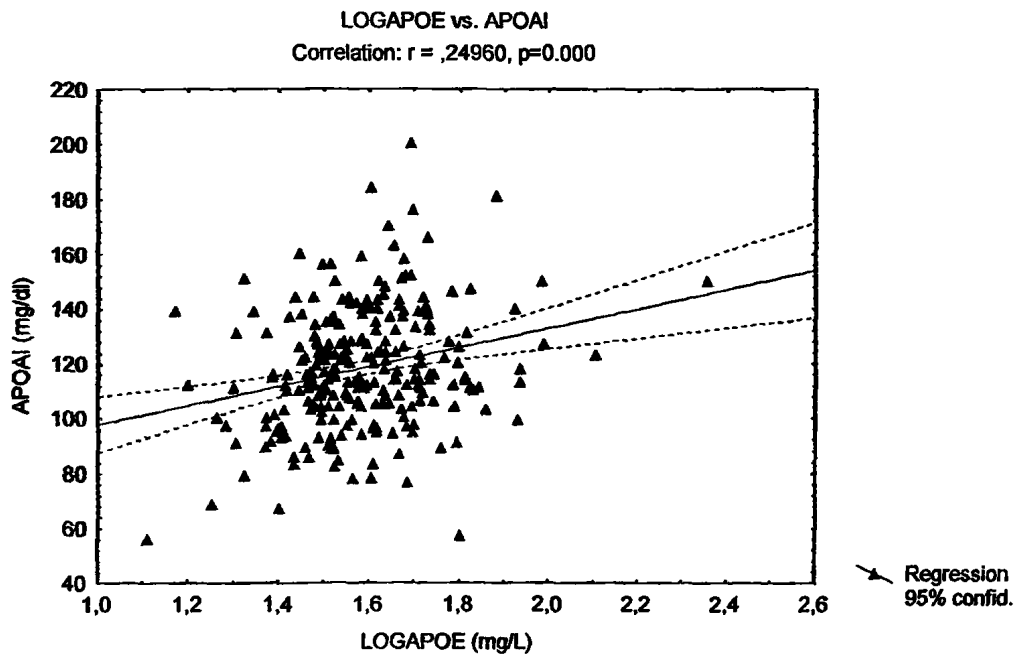


Σχήμα 45. Συσχέτιση της συγκέντρωσης της ApoE με τα επίπεδα της non HDL χοληστερόλης στους ασθενείς που υποβάλλονταν σε αιμοκάθαρση





Σχήμα 46. Συσχέτιση της συγκέντρωσης της ApoE με τα επίπεδα της ApoB στους ασθενείς που υποβάλλονταν σε αιμοκάθαρση



Σχήμα 47. Συσχέτιση της συγκέντρωσης της ApoE με τα επίπεδα της ApoAI στους ασθενείς που υποβάλλονταν σε αιμοκάθαρση



8.5.2. Συνδυασμένη επίδραση της συγκέντρωσης της ApoE στον ορό και των πολυμορφισμών της ApoE στις λιπιδαιμικές παραμέτρους των ασθενών που υποβάλλονται σε αιμοκάθαρση

Από τα αποτελέσματα που εκτέθηκαν παραπάνω φαίνεται ότι τόσο οι πολυμορφισμοί της ApoE όσο και τα επίπεδά της στον ορό ασκούν σημαντική επίδραση στις τιμές των λιπιδαιμικών παραμέτρων των ασθενών που υποβάλλονται σε αιμοκάθαρση. Επιπρόσθετα, οι πολυμορφισμοί της ApoE επηρεάζουν σημαντικά τα επίπεδά της στον ορό. Έτσι, η επίδραση των πολυμορφισμών της ApoE στο λιπιδαιμικό προφίλ αυτών των ασθενών θα μπορούσε να συγχέεται ή να αποκρύπτεται από τα επίπεδά της στον ορό. Για αυτό το λόγο έγινε πολυπαραγοντική ανάλυση των δεδομένων, στην οποία συνεκτιμήθηκαν οι πολυμορφισμοί της ApoE και άλλες παραμέτροι που επηρεάζουν τα επίπεδα των λιπιδίων στη μονοπαραγοντική ανάλυση (μοντέλο A), καθώς και η συγκέντρωση της ApoE, η οποία προστέθηκε στους παράγοντες του μοντέλου A (μοντέλο B) (πίνακες 15 και 16).

Οι πολυμορφισμοί της ApoE επηρεάζουν σημαντικά και ανεξάρτητα από άλλους παράγοντες τα επίπεδα της ολικής χοληστερόλης, της LDL και non HDL χοληστερόλης, των τριγλυκεριδίων και της ApoB (μοντέλο A). Με την είσοδο στην ανάλυση των επιπέδων της ApoE (μοντέλο B) παρατηρούνται τρία σημαντικά γεγονότα: α) η επίδραση των πολυμορφισμών της ApoE στις λιπιδαιμικές παραμέτρους γίνεται στατιστικά πιο ισχυρή (μεγαλύτερη τιμή του beta και μικρότερη τιμή του p), β) τα ίδια τα επίπεδα της ApoE επιδρούν σημαντικά και ανεξάρτητα από τους πολυμορφισμούς της ApoE στα επίπεδα των λιπιδαιμικών παραμέτρων και γ) αυξάνεται σημαντικά το ποσοστό της μεταβλητότητας των λιπιδαιμικών παραμέτρων ($R^2 \times 100$) που μπορεί να εξηγηθεί από το συνδυασμό των πολυμορφισμών και της συγκέντρωσης της ApoE σε σύγκριση με αυτό που μπορεί να εξηγηθεί μόνο από τους πολυμορφισμούς της ApoE: από 7% σε 30% για την ολική χοληστερόλη, από 30% σε 51.7% για τα τριγλυκερίδια, από 7% σε 14.9% για την LDL χοληστερόλη, από 4% σε 27% για την non HDL χοληστερόλη και από 4.9% σε 22% για την ApoB. Επιπρόσθετα, μόνο η συγκέντρωση της ApoE και όχι οι πολυμορφισμοί της επηρεάζουν σημαντικά τα επίπεδα της HDL χοληστερόλης και της ApoAI, ενώ τα επίπεδα της Lp(a) δεν συσχετίζονται με τα επίπεδα ή τους πολυμορφισμούς της ApoE. Τέλος, οι πολυμορφισμοί της ApoE είναι ο πιο σημαντικός παράγοντας που καθορίζει τη μεταβλητότητα (~30%) της συγκέντρωσης της ApoE σε αυτούς τους ασθενείς⁴³⁶.



Πίνακας 15. Συνδυασμένη επίδραση της συγκέντρωσης και των πολυμορφισμών της ApoE (μοντέλο B) σε σύγκριση με την επίδραση μόνο των πολυμορφισμών της ApoE (μοντέλο A) στα επίπεδα των λιπιδαιμικών παραμέτρων των ασθενών που υποβάλλονταν σε AMK

	T-CHOL		LogTRG		HDL-C		LDL-C		non HDL-C	
	Model A	Model B	Model A	Model B	Model A	Model B	Model A	Model B	Model A	Model B
	beta (p)	beta (p)	beta (p)	beta (p)	beta (p)	beta (p)	beta (p)	beta (p)	beta (p)	beta (p)
Αλληλία της ApoE (ε2→ε4)	0.16 (0.009)	0.276 (0.000)	0.184 (0.014)	0.240 (0.000)	0.082 (NS)	0.168 (NS)	0.194 (0.026)	0.245 (0.005)	0.136 (0.028)	0.251 (0.000)
Φύλο (Α→Γ)	0.17 (0.006)	0.11 (0.04)	0.258 (0.001)	0.228 (0.000)	0.378 (0.000)	0.331 (0.000)	0.125 (NS)	0.082 (NS)	0.127 (0.041)	0.069 (NS)
Ηλικία	0.026 (NS)	0.00 (NS)	0.12 (NS)	0.112 (NS)	0.06 (NS)	0.078 (NS)	0.104 (NS)	0.093 (NS)	0.005 (NS)	-0.02 (NS)
BMI	0.125 (0.046)	0.042 (NS)	0.368 (0.000)	0.27 (0.000)	0.13 (NS)	0.12 (NS)	0.094 (NS)	0.066 (NS)	0.112 (0.049)	0.031 (NS)
Κάπνισμα (N→O)	0.06 (NS)	0.04 (NS)	0.05 (NS)	0.04 (NS)	0.18 (0.048)	0.13 (NS)	0.081 (NS)	0.071 (NS)	0.03 (NS)	0.002 (NS)
Διάρκεια AMK	-0.059 (NS)	-0.10 (NS)	0.11 (NS)	0.073 (NS)	0.09 (NS)	0.074 (NS)	0.091 (NS)	0.045 (NS)	-0.05 (NS)	-0.09 (NS)
HDL-C	-	-	-0.368 (0.000)	-0.52 (0.000)	-	-	-	-	-	-
LogTRG	-	-	-	-	-0.41 (0.000)	-0.61 (0.000)	-	-	-	-
LogApoE	-	0.506 (0.0000)	-	0.476 (0.000)	-	0.462 (0.000)	-	0.291 (0.001)	-	0.498 (0.000)
R ² x 100	7	30	30	51.7	25	42.9	7	14.9	4	27

A; Άνδρες, Γ; Γυναίκες, N; Ναι, O; Όχι, BMI; Δείκτης μάζας σώματος, NS; Όχι στατιστικά σημαντική διαφορά, T-CHOL; Ολική χοληστερόλη, LDL-C; LDL χοληστερόλη, HDL-C; HDL χοληστερόλη, non HDL-



C; non HDL χοληστερόλη, TRG; Τριγλυκερίδια, Apo; Αποπρωτεΐνη. $R^2 \times 100$; % ποσοστό της μεταβλητότητας της υπό εξέταση παραμέτρου που εξηγείται από τους ανεξάρτητους παράγοντες που εισάγονται στο μοντέλο της ανάλυσης. Log; Λογαριθμικός μετασχηματισμός των δεδομένων με μη κανονική κατανομή. AMK; Αιμοκάθαρση.



Πίνακας 16. Συνδυασμένη επίδραση της συγκέντρωσης και των πολυμορφισμών της ApoE (μοντέλο Β) σε σύγκριση με την επίδραση μόνο των πολυμορφισμών της ApoE (μοντέλο Α) στα επίπεδα των αποπρωτεϊνών των ασθενών που υποβάλλονταν σε ΑΜΚ

	ApoB		ApoAΙ		LogApoE
	Model A	Model B	Model A	Model B	
	beta (p)	beta (p)	beta (p)	beta (p)	
Αλληλία της ApoE (ε2→ε4)	0.15 (0.016)	0.25 (0.002)	0.062 (NS)	0.111 (NS)	-0.29 (0.0002)
Φύλο (Α→Γ)	0.078 (NS)	0.086 (NS)	0.304 (0.000)	0.292 (0.000)	0.021 (NS)
Ηλικία	0.047 (NS)	0.123 (NS)	0.072 (NS)	0.064 (NS)	0.013 (NS)
BMI	0.129 (0.042)	0.139 (NS)	0.093 (NS)	0.072 (NS)	0.093 (NS)
Κάπνισμα (N→O)	0.06 (NS)	0.04 (NS)	0.19 (0.045)	0.11 (NS)	0.09 (NS)
Διάρκεια ΑΜΚ	-0.06 (NS)	0.016 (NS)	0.147 (NS)	0.121 (NS)	0.099 (NS)
LogTRG	-	-	-0.14 (NS)	-0.22 (0.02)	-
LogApoE	-	0.36 (0.000)	-	0.194 (0.04)	-
R ² x 100	4.9	22	12	15	31

A; Άνδρες, Γ; Γυναίκες, N; Ναι, O; Όχι, BMI; Δείκτης μάζας σώματος, NS; Όχι στατιστικά σημαντική διαφορά, TRG; Τριγλυκερίδια, Apo; Αποπρωτεΐνη, R² x 100; % ποσοστό της μεταβλητότητας της υπό εξέταση παραμέτρου που εξηγείται από τους ανεξάρτητους παράγοντες που εισάγονται στο μοντέλο της ανάλυσης. Log; Λογαριθμικός μετασχηματισμός των δεδομένων με μη κανονική κατανομή. ΑΜΚ; Αιμοκάθαρση.



8.6. ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΑΡΟΕ ΣΤΙΣ ΛΙΠΙΔΑΙΜΙΚΕΣ ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΥΣ ΤΟΥ ΟΡΟΥ ΤΩΝ ΑΣΘΕΝΩΝ ΠΟΥ ΥΠΟΒΑΛΛΟΝΤΑΝ ΣΕ ΣΥΝΕΧΗ ΦΟΡΗΤΗ ΠΕΡΙΤΟΝΑΪΚΗ ΚΑΘΑΡΣΗ

Ο πίνακας 17 δείχνει την επίδραση των πολυμορφισμών της ΑροΕ στα επίπεδα των λιπιδαιμικών παραμέτρων του ορού των ασθενών που υποβάλλονταν σε συνεχή φορητή περιτοναϊκή κάθαρση (ΣΦΠΚ). Αυτοί οι ασθενείς ταξινομήθηκαν σε δύο ομάδες: σε άτομα που είχαν το αλληλίο ε4 (ε4) και σε άτομα που δεν είχαν το αλληλίο ε4 (non-ε4).

Οι δύο ομάδες των ασθενών που υποβάλλονταν σε ΣΦΠΚ δεν διέφεραν μεταξύ τους όσον αφορά την ηλικία, την κατανομή του φύλου, το δείκτη μάζας σώματος, τη γλυκόζη νηστείας του ορού, τη χρονική διάρκεια από την ένταξη στη ΣΦΠΚ και τις καπνιστικές συνήθειες. Τα άτομα με το αλληλίο ε4 είχαν υψηλότερες τιμές ολικής χοληστερόλης, τριγλυκεριδίων, HDL χοληστερόλης, LDL χοληστερόλης, non HDL χοληστερόλης και ΑροΒ σε σύγκριση με τα άτομα που δεν είχαν το αλληλίο ε4. Αντίθετα, τα επίπεδα της HDL χοληστερόλης, της ΑροΑΙ και της Lp(a) δεν διέφεραν μεταξύ των δύο ομάδων, ενώ η παρουσία του αλληλίου ε4 συσχετιζόταν με μειωμένα επίπεδα ΑροΕ του ορού σε σύγκριση με τους ασθενείς που δεν είχαν το αλληλίο ε4. Επιπρόσθετα, η επίδραση των πολυμορφισμών της ΑροΕ στα επίπεδα των λιπιδαιμικών παραμέτρων του ορού αυτών των ασθενών παρέμεινε στατιστικά σημαντική και μετά από τη διόρθωση για την ηλικία, το φύλο, το δείκτη μάζας σώματος, τις καπνιστικές συνήθειες και τη χρονική διάρκεια από την ένταξη στην ΣΦΠΚ.

Στον πίνακα 18 φαίνεται η συσχέτιση των επιπέδων της ΑροΕ με τις λιπιδαιμικές παραμέτρους του ορού αυτών των ασθενών. Η πολυπαραγοντική ανάλυση των δεδομένων όταν ελήφθησαν υπόψη τόσο οι πολυμορφισμοί της ΑροΕ όσο και η συγκέντρωση της στον ορό οδήγησε σε αποτελέσματα παρόμοια με αυτά που περιγράφηκαν για τους ασθενείς που υποβάλλονταν σε ΑΜΚ (κεφάλαιο 8.5.3), αν και οι συσχετίσεις δεν ήταν στατιστικά σημαντικές σε όλες τις περιπτώσεις, πιθανά εξαιτίας του μικρού αριθμού των ασθενών.



Πίνακας 17. Επίδραση των πολυμορφισμών της ApoE στο λιπιδαιμικό προφίλ των ασθενών που υποβάλλονταν σε ΣΦΠΚ

	Αλληλία non-ε4 (n=36) ApoE3/3, E3/2	Αλληλία ε4 (n=10) ApoE3/4	p
Ηλικία (έτη)	61.6±13.2	60.7±14.7	NS
Φύλο (Α/Γ)	19/17	6/4	NS
Κάπνισμα (N/O)	12/24	3/7	NS
BMI (Kg/m ²)	25.2±2.9	24.9±2.5	NS
Χρονική διάρκεια από την έναρξη στη ΣΦΠΚ (μήνες)	53.1±22.4	52.9±23.3	NS
Γλυκόζη ορού (mg/dl)	96.1±21.2	95.9±16.2	NS
T-CHOL (mg/dl)	223.7±46.0	279.0±45.0	0.029
TRG (mg/dl)	138.8±30.6	278.3±115.4	0.000
HDL-C (mg/dl)	47.9±17.3	39.3±7.7	NS
LDL-C (mg/dl)	148.0±37.4	184.3±56.0	0.020
non HDL-C (mg/dl)	175.7±37.8	239.8±67.8	0.000
ApoAI (mg/dl)	149.3±39.6	122.5±16.3	NS
ApoB (mg/dl)	110.7±21.9	144.5±25.3	0.000
ApoE (mg/L)	50.8±17.2	45.1±12.1	0.01
Lp(a) (mg/dl)	20.9(3-53)	30.5(4-49)	NS

A; Άνδρες, Γ; Γυναίκες, N; Ναι, O; Όχι, BMI; Δείκτης μάζας σώματος, NS; Όχι στατιστικά σημαντική διαφορά, T-CHOL; Ολική χοληστερόλη, LDL-C; LDL χοληστερόλη, HDL-C; HDL χοληστερόλη, non HDL-C; non HDL χοληστερόλη, TRG; Τριγλυκερίδια, Apo; Αποπρωτεΐνη, Lp(a); Λιποπρωτεΐνη (α). ΣΦΠΚ; Συνεχής φορητή περιτοναϊκή κάθαρση.



Πίνακας 18. Συσχέτιση των επιπέδων της ApoE με τις λιπιδαιμικές παραμέτρους του ορού των ασθενών που υποβάλλονταν σε ΣΦΠΚ

	LogApoE	
	r	p
T-CHOL	0.72	0.000
TRG	0.48	0.02
HDL-C	0.20	NS
LDL-C	0.63	0.001
non HDL-C	0.72	0.000
ApoA1	0.05	NS
ApoB	0.50	0.013
LogLp(a)	0.005	NS

NS; Όχι στατιστικά σημαντική διαφορά, T-CHOL; Ολική χοληστερόλη, LDL-C; LDL χοληστερόλη, HDL-C; HDL χοληστερόλη, non HDL-C; non HDL χοληστερόλη, TRG; Τριγλυκερίδια, Apo; Αποπρωτεΐνη, Lp(a); Λιποπρωτεΐνη (α), r; συντελεστής συσχέτισης.



8.7. ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΑΡΟΕ ΣΤΙΣ ΛΙΠΙΔΑΙΜΙΚΕΣ ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΥΣ ΤΟΥ ΟΡΟΥ ΤΩΝ ΑΣΘΕΝΩΝ ΜΕ ΠΡΟΤΕΛΙΚΟ ΣΤΑΔΙΟ (III-IV) ΧΡΟΝΙΑΣ ΝΕΦΡΙΚΗΣ ΑΝΕΠΑΡΚΕΙΑΣ

Στον πίνακα 19 φαίνεται η επίδραση των πολυμορφισμών της ApoE στα επίπεδα των λιπιδαιμικών παραμέτρων του ορού σε ασθενείς με προτελικού σταδίου ΧΝΑ (στάδια III-IV). Οι ασθενείς ταξινομήθηκαν σε δύο ομάδες: σε άτομα που είχαν το αλληλίο ε4 (ε4) και σε άτομα που δεν είχαν το αλληλίο ε4 (non-ε4).

Οι δύο ομάδες των ασθενών δεν διέφεραν μεταξύ τους όσον αφορά την ηλικία, την κατανομή του φύλου, το δείκτη μάζας σώματος, τη γλυκόζη νηστείας του ορού, την κρεατινίνη του ορού και τις καπνιστικές συνήθειες. Τα άτομα με το αλληλίο ε4 είχαν υψηλότερες τιμές ολικής χοληστερόλης, τριγλυκεριδίων, HDL χοληστερόλης, LDL χοληστερόλης, non HDL χοληστερόλης και ApoB σε σύγκριση με τα άτομα που δεν είχαν το αλληλίο ε4. Αντίθετα, τα επίπεδα της HDL χοληστερόλης, της ApoAI και της Lp(a) δεν διέφεραν μεταξύ των δύο ομάδων, ενώ η παρουσία του αλληλίου ε4 συσχετιζόταν με χαμηλότερα επίπεδα της ApoE του ορού σε σύγκριση με τους ασθενείς που δεν είχαν το αλληλίο ε4. Επιπρόσθετα, η επίδραση των πολυμορφισμών της ApoE στα επίπεδα των λιπιδαιμικών παραμέτρων του ορού αυτών των ασθενών παρέμεινε στατιστικά σημαντική και μετά από τη διόρθωση για την ηλικία, το φύλο, το δείκτη μάζας σώματος, τις καπνιστικές συνήθειες και την κρεατινίνη του ορού.

Στον πίνακα 20 φαίνεται η συσχέτιση των επιπέδων της ApoE με τις λιπιδαιμικές παραμέτρους του ορού αυτών των ασθενών. Η πολυπαραγοντική ανάλυση των δεδομένων όταν ελήφθησαν υπόψη τόσο οι πολυμορφισμοί της ApoE όσο και η συγκέντρωση της στο ορό οδήγησε σε αποτελέσματα παρόμοια με αυτά που περιγράφηκαν για τους ασθενείς που υποβάλλονταν σε AMK (κεφάλαιο 8.5.3), αν και οι συσχετίσεις δεν ήταν στατιστικά σημαντικές σε όλες τις περιπτώσεις, πιθανά εξαιτίας του μικρού αριθμού των ασθενών.



Πίνακας 19. Επίδραση των πολυμορφισμών της ApoE στο λιπιδαιμικό προφίλ των ασθενών με προτελικό στάδιο ΧΝΑ (ΠΤΧΝΑ)

	Αλληλία non-ε4 (n=36) ApoE3/3, E3/2	Αλληλία ε4 (n=12) ApoE3/4	p
Ηλικία (έτη)	62.9±13.4	62.8±13.7	NS
Φύλο (Α/Γ)	21/15	7/5	NS
Κάπνισμα (Ν/Ο)	12/24	4/8	NS
BMI (Kg/m ²)	25.5±3.2	25.2±2.5	NS
Γλυκόζη ορού (mg/dl)	95.1±21.2	94.9±16.2	NS
Κρεατινίνη ορού (mg/dl)	3.18±1.00	3.14±1.01	NS
T-CHOL (mg/dl)	199.3±42.1	251.2±38.9	0.02
TRG (mg/dl)	115.4±65.2	220.3±63.8	0.000
HDL-C (mg/dl)	43.4±11.3	39.3±7.7	NS
LDL-C (mg/dl)	121.8±29.2	146.9±33.2	0.02
non HDL-C (mg/dl)	159.3±37.8	185.4±40.1	0.03
ApoA1 (mg/dl)	131.3±22.1	122.5±16.3	NS
ApoB (mg/dl)	103.2±38.1	132.6±39.8	0.04
ApoE (mg/L)	44.2±20.2	33.1±12.1	0.01
Lp(a) (mg/dl)	7.7(0.8-37)	7.9(0.8-30)	NS

Α; Άνδρες, Γ; Γυναίκες, Ν; Ναι, Ο; Όχι, BMI; Δείκτης μάζας σώματος, NS; Όχι στατιστικά σημαντική διαφορά, T-CHOL; Ολική χοληστερόλη, LDL-C; LDL χοληστερόλη, HDL-C; HDL χοληστερόλη, non HDL-C; non HDL χοληστερόλη, TRG; Τριγλυκερίδια, Apo; Αποπρωτεΐνη, Lp(a); Λιποπρωτεΐνη (α). ΠΤΧΝΑ; Προτελικό στάδιο χρόνιας νεφρικής ανεπάρκειας (III-IV).



Πίνακας 20. Συσχέτιση των επιπέδων της ApoE με τις λιπιδαιμικές παραμέτρους του ορού των ασθενών με ΠΤΧΝΑ

	LogApoE	
	r	p
T-CHOL	0.51	0.000
TRG	0.59	0.000
HDL-C	0.076	NS
LDL-C	0.42	0.004
non HDL-C	0.56	0.000
ApoAI	0.31	0.039
ApoB	0.65	0.000
LogLp(a)	0.19	NS

NS; Όχι στατιστικά σημαντική διαφορά, T-CHOL; Ολική χοληστερόλη, LDL-C; LDL χοληστερόλη, HDL-C; HDL χοληστερόλη, non HDL-C; non HDL χοληστερόλη, TRG; Τριγλυκερίδια, Apo; Αποπρωτεΐνη, Lp(a); Λιποπρωτεΐνη (α), r; συντελεστής συσχέτισης. ΠΤΧΝΑ; Προτελικό στάδιο χρόνιας νεφρικής ανεπάρκειας (III-IV).



8.8. ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΤΗΣ ΕΠΙΠΤΩΣΗΣ ΤΩΝ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΩΝ ΤΗΣ ΠΑΡΑΟΞΟΝΑΣΗΣ 1 (PON1) ΜΕΤΑΞΥ ΤΩΝ ΑΣΘΕΝΩΝ ΜΕ ΤΕΛΙΚΟΥ ΣΤΑΔΙΟΥ ΧΝΑ ΚΑΙ ΤΩΝ ΥΓΙΩΝ ΑΤΟΜΩΝ

8.8.1. Πολυμορφισμός Q192R της PON1

Δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές στην κατανομή των γονοτύπων του πολυμορφισμού Q192R της PON1 μεταξύ των ασθενών με τελικού σταδίου (στάδιο V) χρόνιας νεφρικής ανεπάρκειας (ΤΣΧΝΑ, δηλαδή το σύνολο των ασθενών που υποβάλλονταν σε ΑΜΚ και ΣΦΠΚ) και της ομάδας ελέγχου (πίνακας 21).

Πίνακας 21. Επίπτωση του πολυμορφισμού Q192R της PON1 στα άτομα της μελέτης

	ΤΣΧΝΑ (N=347)	Ομάδα ελέγχου (N=290)	p
QQ	183 (52.7%)	140 (48.3%)	
QR	136 (39.2%)	121 (41.7%)	NS
RR	28 (8.1%)	29 (10.0%)	
Q	72.3%	69.1%	NS
R	27.7%	30.9%	

ΤΣΧΝΑ; Τελικού σταδίου χρόνια νεφρική ανεπάρκεια.



8.8.2. Πολυμορφισμός M55L της PON1

Οι ασθενείς με τελικού σταδίου ΧΝΑ είχαν σημαντικά μικρότερη επίπτωση του αλληλίου M και του γονότυπου MM της PON1 σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου (πίνακας 22).

Πίνακας 22. Επίπτωση του πολυμορφισμού M55L της PON1 στα άτομα της μελέτης

	ΤΣΧΝΑ (N=347)	Υγιείς μάρτυρες (N=290)	p
LL	156 (44.9%)	107 (36.9%)	
LM	153 (44.1%)	117 (40.4%)	0.01
MM	38 (11.0%) [#]	66 (22.7%) [#]	
L	67.1%	57.0%	0.001
M	32.9% [#]	43.0% [#]	

ΤΣΧΝΑ; Τελικού σταδίου χρόνια νεφρική ανεπάρκεια. #p; με τη δοκιμασία χ^2 .



8.9. ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΩΝ ΤΗΣ PON1 ΣΤΙΣ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΕΣ ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΥΣ ΤΩΝ ΑΣΘΕΝΩΝ ΠΟΥ ΥΠΟΒΑΛΛΟΝΤΑΝ ΣΕ ΑΙΜΟΚΑΘΑΡΣΗ

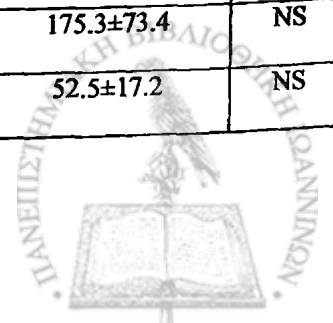
8.9.1. Πολυμορφισμός Q192R της PON1

Ο πίνακας 23 δείχνει την επίδραση του πολυμορφισμού Q192R της PON1 στην ενεργότητα του ενζύμου και στις λιπιδαιμικές παραμέτρους του ορού των ασθενών που υποβάλλονταν σε ΑΜΚ. Οι τρεις ομάδες των ασθενών δεν διέφεραν μεταξύ τους όσον αφορά την ηλικία, την κατανομή του φύλου, το δείκτη μάζας σώματος, τη γλυκόζη νηστείας του ορού, το χρονικό διάστημα από την ένταξη στην ΑΜΚ ή τις καπνιστικές συνήθειες. Επιπρόσθετα, αυτός ο πολυμορφισμός δεν επηρέασε τις τιμές των λιπιδαιμικών παραμέτρων του ορού. Εντούτοις, η ενεργότητα της PON1(paraoxon) ήταν διαφορετική μεταξύ των τριών ομάδων. Συγκεκριμένα, οι ασθενείς με το γονότυπο RR εμφάνιζαν υψηλότερη ενεργότητα της PON1(paraoxon) σε σύγκριση με τους ασθενείς που είχαν τους γονοτύπους QR και QQ, ενώ οι ασθενείς με το γονότυπο QQ εμφάνιζαν μικρότερη ενεργότητα της PON1(paraoxon) σε σύγκριση με τις υπόλοιπες δύο ομάδες των ασθενών, δηλαδή $RR > QR > QQ$. Αυτή η διαφορά παρέμενε σημαντική και μετά από τη διόρθωση για τα επίπεδα της HDL χοληστερόλης ή της ApoA1. Αντίθετα, αυτός ο πολυμορφισμός δεν είχε καμία σημαντική επίδραση στην ενεργότητα της PON1(phenylacetate).



Πίνακας 23. Επίδραση του πολυμορφισμού Q192R της PON1 στις λιπιδαιμικές παραμέτρους και την ενεργότητα της PON1 στους ασθενείς που υποβάλλονταν σε AMK

	QQ (n=159)	QR (n=118)	RR (n=24)	p
Ηλικία (έτη)	61.1±21.2	63.2±14.1	60.3±15.7	NS
Φύλο (Α/Γ)	88/71	65/53	15/9	NS
Κάπνισμα (N/O)	55/104	41/77	8/16	NS
BMI (Kg/m ²)	24.4±2.5	24.2±2.9	24.3±2.5	NS
Χρόνος από την ένταξη στην AMK (μήνες)	59.2±51.4	58.9±52.4	59.8±52.4	NS
Γλυκόζη ορού (mg/dl)	90.0±13.3	90.1±19.0	90.3±16.2	NS
T-CHOL (mg/dl)	177.5±45.1	172.8±46.1	170.1±49.1	NS
TRG (mg/dl)	181.8±86.5	184.4±157.2	168.2±49.1	NS
HDL-C (mg/dl)	35.5±8.5	35.9±9.7	38.2±8.7	NS
LDL-C (mg/dl)	106.1±36.7	102.6±36.6	100.3±38.3	NS
non HDL-C (mg/dl)	141.9±42.6	135.5±45.1	131.2±47.5	NS
ApoAI (mg/dl)	118.0±20.4	118.5±23.5	123.4±17.0	NS
ApoB (mg/dl)	87.7±26.9	86.0±26.5	82.2±24.2	NS
ApoE (mg/L)	39.7±14.2	42.0±23.9	40.5±16.4	NS
Lp(a) (mg/dl)	12.2(3-171)	13.4(3-139)	10.0(3-69)	NS
PON1(paraoxon) (U/L)	39(9-139)	102.5(18-192)	177.5(66-271)	0.000
PON1(phenylacetate) (U/ml)	61.2±15.2	62.5±14.7	64.8±18.8	NS
PON1(paraoxon)/HDL-C (U/mg)	0.1(0.02-0.48)	0.28(0.06-0.60)	0.45(0.2-1.0)	0.000
PON1(paraoxon)/ApoAI (U/mg)	0.03(0.009-0.109)	0.08(0.01-0.17)	0.14(0.06-0.23)	0.000
PON1(phenylacetate)/HDL-C (U/mg)	182.5±67.3	181.6±52.8	175.3±73.4	NS
PON1(phenylacetate)/ApoAI (U/mg)	52.9±14.8	53.7±13.0	52.5±17.2	NS



A; Άνδρες, Γ; Γυναίκες, N; Ναι, O; Όχι, BMI; Δείκτης μάζας σώματος, NS; Όχι σημαντική στατιστικά διαφορά, T-CHOL; Ολική χοληστερόλη, LDL-C; LDL χοληστερόλη, HDL-C; HDL χοληστερόλη, non HDL-C; non HDL χοληστερόλη, TRG; Τριγλυκερίδια, Apo; Αποπρωτεΐνη, Lp(a); Λιποπρωτεΐνη (α). AMK; Αιμοκάθαρση.

8.9.2. Πολυμορφισμός M55L της PON1

Στον πίνακα 24 φαίνεται η επίδραση του πολυμορφισμού M55L της PON1 στην ενεργότητα του ενζύμου και τις λιπιδαιμικές παραμέτρους του ορού των ασθενών που υποβάλλονταν σε AMK. Οι τρεις ομάδες των ασθενών δεν διέφεραν μεταξύ τους όσον αφορά την ηλικία, την αναλογία φύλου, το δείκτη μάζας σώματος, τη γλυκόζη νηστείας του ορού, τη διάρκεια ένταξης στην AMK ή τις καπνιστικές συνήθειες. Επιπρόσθετα, αυτός ο πολυμορφισμός δεν επηρέασε τις τιμές των λιπιδαιμικών παραμέτρων του ορού. Εντούτοις, η ενεργότητα της PON1(paraoxon) ήταν διαφορετική μεταξύ των τριών ομάδων. Συγκεκριμένα, οι ασθενείς με το γονότυπο LL εμφάνιζαν υψηλότερη ενεργότητα της PON1(paraoxon) σε σύγκριση με τους ασθενείς που είχαν τους γονοτύπους LM και MM, ενώ οι ασθενείς με το γονότυπο MM εμφάνιζαν μικρότερη ενεργότητα της PON1(paraoxon) σε σύγκριση με τις υπόλοιπες δύο ομάδες των ασθενών, δηλαδή LL>LM>MM. Αυτή η διαφορά παρέμενε σημαντική και μετά από τη διόρθωση για τα επίπεδα της HDL χοληστερόλης ή της ApoA1. Τέλος, αυτός ο πολυμορφισμός ασκούσε παρόμοια σημαντική επίδραση και στην ενεργότητα της PON1(phenylacetate), δηλαδή LL>LM>MM. Αυτή η διαφορά παρέμενε σημαντική και μετά από τη διόρθωση για τα επίπεδα της HDL χοληστερόλης ή της ApoA1.



Πίνακας 24. Επίδραση του πολυμορφισμού M55L της PON1 στις λιπιδαιμικές παραμέτρους και την ενεργότητα της PON1 στους ασθενείς που υποβάλλονταν σε AMK

	LL (n=135)	LM (n=133)	MM (n=33)	p
Ηλικία (έτη)	62.1±22.2	62.9±14.3	61.7±14.2	NS
Φύλο (Α/Γ)	76/59	74/59	18/15	NS
Κάπνισμα (N/O)	46/89	46/87	12/21	NS
BMI (Kg/m ²)	24.3±2.5	24.2±2.9	24.1±2.5	NS
Διάρκεια από την έναρξη στην AMK (μήνες)	58.2±51.4	59.0±52.4	59.8±52.4	NS
Γλυκόζη ορού (mg/dl)	90.1±13.3	90.1±19.0	90.3±16.2	NS
T-CHOL (mg/dl)	175.9±48.8	176.4±44.7	174.7±40.0	NS
TRG (mg/dl)	183.7±151.3	179.0±90.6	171.1±51.4	NS
HDL-C (mg/dl)	36.3±9.8	35.9±8.4	36.3±8.3	NS
LDL-C (mg/dl)	104.3±37.9	105.3±37.7	104.1±31.7	NS
non HDL-C (mg/dl)	138.4±47.1	140.5±43.3	138.5±35.4	NS
ApoAI (mg/dl)	117.6±22.4	119.7±20.9	120.0±19.6	NS
ApoB (mg/dl)	86.7±27.9	87.6±26.2	85.5±22.1	NS
ApoE (mg/L)	41.6±23.2	40.3±12.6	38.9±16.2	NS
Lp(a) (mg/dl)	13.5(3-171)	12.1(3-77.6)	11.0(3-49.9)	NS
PON1(paraoxon) (U/L)	87(9-271)	48(18-179)	28.5(18-94)	0.000
PON1(phenylacetate) (U/ml)	66.6±16.6	59.4±14.5	54.9±8.0	0.000
PON1(paraoxon)/HDL-C (U/mg)	0.27(0.02-1.00)	0.15(0.04-0.62)	0.09(0.04-0.25)	0.000
PON1(paraoxon)/ApoAI (U/mg)	0.08(0.009-0.230)	0.04(0.01-0.14)	0.025(0.013-0.073)	0.000
PON1(phenylacetate)/HDL-C (U/mg)	194.5±66.5	173.0±58.4	158.7±40.6	0.000
PON1(phenylacetate)/ApoAI (U/mg)	57.5±14.4	50.5±13.5	46.9±10.0	0.000

A; Άνδρες, Γ; Γυναίκες, N; Ναι, O; Όχι, BMI; Δείκτης μάζας σώματος, NS; Όχι στατιστικά σημαντική διαφορά, T-CHOL; Ολική χοληστερόλη, LDL-C; LDL χοληστερόλη, HDL-C; HDL χοληστερόλη, non HDL-C; non HDL χοληστερόλη, TRG; Τριγλυκερίδια, Apo; Αποπρωτεΐνη, Lp(a); Λιποπρωτεΐνη (α). AMK; Αιμοκάθαρση.

8.9.3. Συσχέτιση της ενεργότητας της PON1 με την ApoE

Οι πολυμορφισμοί της ApoE δεν είχαν καμία επίδραση στην ενεργότητα της PON1(paraoxon) ή της PON1(phenylacetate). Επιπρόσθετα, δεν παρατηρήθηκε σημαντική συσχέτιση μεταξύ της συγκέντρωσης της ApoE και της ενεργότητας της PON1(paraoxon) ($r=0.08$, $p=NS$). Αντίθετα, υπήρχε μία στατιστικά σημαντική ($r=0.19$, $p=0.002$) συσχέτιση μεταξύ της συγκέντρωσης της ApoE και της ενεργότητας της PON1(phenylacetate), η οποία όμως εξαλείφονταν όταν έγινε διόρθωση για τα επίπεδα της HDL χοληστερόλης ($r=0.003$, $p=NS$) ή της ApoAI ($r=0.024$, $p=NS$). Η παραπάνω παρατήρηση δείχνει ότι η συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων της ApoE και της ενεργότητας της PON1(phenylacetate) οφείλεται στη συσχέτιση που υπάρχει μεταξύ της συγκέντρωσης της ApoE και των επιπέδων της HDL χοληστερόλης ή της ApoAI (κεφάλαιο 8.7).

8.9.4. Συσχετίσεις της ενεργότητας της PON1 με διάφορες κλινικοεργαστηριακές παραμέτρους

A) Συσχέτιση της ενεργότητας της PON1(paraoxon)

Στον πίνακα 25 φαίνονται οι συσχετίσεις της ενεργότητας της PON1(paraoxon) με διάφορες κλινικοεργαστηριακές παραμέτρους στους ασθενείς που υποβάλλονταν σε AMK. Η πολυπαραγοντική ανάλυση, στην οποία συνεκτιμήθηκαν οι παράμετροι που σε μονοπαραγοντική ανάλυση συσχετίζονταν σημαντικά με την ενεργότητα της PON1(paraoxon), καθώς και οι πολυμορφισμοί της PON1 έδειξε ότι οι παράγοντες που σημαντικά και ανεξάρτητα επηρεάζουν την ενεργότητα της PON1(paraoxon) σε αυτούς τους ασθενείς είναι ο πολυμορφισμός Q192R ($\beta=0.67$, $p=0.000$), ο πολυμορφισμός M55L ($\beta=-0.18$, $p=0.000$) και τα επίπεδα της ApoAI ($\beta=0.14$, $p=0.002$).

B) Συσχέτιση της ενεργότητας της PON1(phenylacetate)

Στον πίνακα 26 φαίνονται οι συσχετίσεις της ενεργότητας της PON1(phenylacetate) με διάφορες κλινικοεργαστηριακές παραμέτρους στους ασθενείς που υποβάλλονταν σε



ΑΜΚ. Η πολυπαραγοντική ανάλυση, στην οποία συνεκτιμήθηκαν οι παράμετροι που σε μονοπαραγοντική ανάλυση συσχετίζονταν σημαντικά με την ενεργότητα της PON1(phenylacetate) καθώς και οι πολυμορφισμοί της PON1 έδειξε ότι οι παράγοντες που σημαντικά και ανεξάρτητα επηρεάζουν την ενεργότητα της PON1(phenylacetate) σε αυτούς τους ασθενείς είναι ο πολυμορφισμός M55L ($\beta=-0.31$, $p=0.000$) και τα επίπεδα της ApoA1 ($\beta=0.275$, $p=0.000$).

Πίνακας 25. Συσχέτιση της ενεργότητας της PON1(paraoxon) στους ασθενείς που υποβάλλονταν σε αιμοκάθαρση με διάφορες κλινικοεργαστηριακές παραμέτρους

	LogPON1(paraoxon)	
	r	p
T-CHOL	0.04	NS
LogTRG	-0.05	NS
HDL-C	0.09	NS
LDL-C	0.05	NS
ApoA1	0.20	0.001
ApoB	0.06	NS
LogLp(a)	0.00	NS
TPR	0.22	0.007
ALB	0.07	NS
Ουρία	0.157	0.035
Κρεατινίνη	0.03	NS
BMI	-0.02	NS
Γλυκόζη	0.00	NS
Ηλικία	-0.12	NS
Διάρκεια από την ένταξη στην ΑΜΚ	0.06	NS
Φύλο	0.07	NS
Κάπνισμα	0.09	NS
RRF	0.07	NS

NS; Όχι στατιστικά σημαντική διαφορά, T-CHOL; Ολική χοληστερόλη, LDL-C; LDL χοληστερόλη, HDL-C; HDL χοληστερόλη, non HDL-C; non HDL χοληστερόλη, TRG; Τριγλυκερίδια, Apo; Αποπρωτεΐνη, Lp(a); Λιποπρωτεΐνη (α), r; συντελεστής συσχέτισης, Log; Λογαριθμικός μετασχηματισμός

των παραμέτρων με μη κανονική κατανομή, AMK; Αιμοκάθαρση, TPR; Ολικά λευκώματα του ορού, ALB; Αλβουμίνη του ορού, BMI; Δείκτης μάζας σώματος, RRF; Υπολειπόμενη νεφρική λειτουργία.

Πίνακας 26. Συσχέτιση της ενεργότητας της PON1 (phenylacetate) στους ασθενείς που υποβάλλονταν σε αιμοκάθαρση με διάφορες κλινικοεργαστηριακές παραμέτρους

	PON1 (phenylacetate)	
	r	p
T-CHOL	0.26	0.000
LogTRG	0.15	0.013
HDL-C	0.17	0.07
LDL-C	0.21	0.000
ApoAI	0.27	0.000
ApoB	0.23	0.000
LogLp(a)	0.00	NS
TPR	0.24	0.003
ALB	0.15	NS
Ουρία	0.17	0.016
Κρεατινίνη	0.11	NS
BMI	0.03	NS
Γλυκόζη	-0.02	NS
Ηλικία	-0.16	0.018
Διάρκεια από την ένταξη στην AMK	0.02	NS
Φύλο	0.05	NS
Κάπνισμα	0.08	NS
RRF	0.09	NS

NS; Όχι στατιστικά σημαντική διαφορά, T-CHOL; Ολική χοληστερόλη, LDL-C; LDL χοληστερόλη, HDL-C; HDL χοληστερόλη, non HDL-C; non HDL χοληστερόλη, TRG; Τριγλυκερίδια, Apo; Αποπρωτεΐνη, Lp(a); Λιποπρωτεΐνη (α), r; συντελεστής συσχέτισης. Log; Λογαριθμικός μετασχηματισμός των παραμέτρων με μη κανονική κατανομή, AMK; Αιμοκάθαρση, TPR; Ολικά λευκώματα του ορού, ALB; Αλβουμίνη του ορού, BMI; Δείκτης μάζας σώματος, RRF; Υπολειπόμενη νεφρική λειτουργία.



8.10. ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΩΝ ΤΗΣ PON1 ΣΤΙΣ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΕΣ ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΥΣ ΤΩΝ ΑΣΘΕΝΩΝ ΠΟΥ ΥΠΟΒΑΛΛΟΝΤΑΝ ΣΕ ΣΥΝΕΧΗ ΦΟΡΗΤΗ ΠΕΡΙΤΟΝΑΪΚΗ ΚΑΘΑΡΣΗ

8.10.1. Πολυμορφισμός Q192R της PON1

Στον πίνακα 27 φαίνεται η επίδραση του πολυμορφισμού Q192R της PON1 στην ενεργότητα του ενζύμου στους ασθενείς που υποβάλλονταν σε ΣΦΠΚ⁴³⁷. Δεν υπήρχαν σημαντικές διαφορές στις τρεις ομάδες των ασθενών όσον αφορά την ηλικία, την κατανομή του φύλου, το δείκτη μάζας σώματος, τη γλυκόζη νηστείας του ορού, τη χρονική διάρκεια από την ένταξη στην ΣΦΠΚ ή τις καρπιοστικές συνήθειες. Επιπρόσθετα, αυτός ο πολυμορφισμός δεν επηρέασε τις τιμές των λιπιδαιμικών παραμέτρων του ορού. Ωστόσο, η ενεργότητα της PON1(paraoxon) ήταν σημαντικά διαφορετική μεταξύ των τριών ομάδων. Συγκεκριμένα, οι ασθενείς με το γονότυπο RR εμφάνιζαν υψηλότερη ενεργότητα της PON1(paraoxon) σε σύγκριση με τους ασθενείς που είχαν τους γονότυπους QR και QQ, ενώ οι ασθενείς με το γονότυπο QQ εμφάνιζαν μικρότερη ενεργότητα της PON1(paraoxon) σε σύγκριση με τις υπόλοιπες δύο ομάδες των ασθενών, δηλαδή RR>QR>QQ. Αυτή η διαφορά παρέμενε σημαντική και μετά από τη διόρθωση για τα επίπεδα της HDL χοληστερόλης ή της ApoA1. Αντίθετα, ο πολυμορφισμός Q192R δεν είχε καμία σημαντική επίδραση στην ενεργότητα της PON1(phenylacetate).

Πίνακας 27. Επίδραση του πολυμορφισμού Q192R της PON1 στην ενεργότητα της PON1 και τα επίπεδα της HDL-C και της ApoA1 στους ασθενείς που υποβάλλονταν σε ΣΦΠΚ

	QQ (n=24)	QR (n=18)	RR (n=4)	P
PON1(paraoxon) (U/L)	50.0(25-160)	132(43-230)	214(170-259)	0.010
PON1(phenylacetate) (U/ml)	83.2±25.9	89.8±19.4	85.5±23.3	NS
HDL-C (mg/dl)	44.9±11.9	47.5±19.5	46.0±10.8	NS
ApoA1 (mg/dl)	144±30	144±44	140±28	NS
PON1(paraoxonase)/HDL-C (U/mg)	0.11(0.05-0.46)	0.32(0.06-0.60)	0.47(0.35-0.62)	0.019
PON1(paraoxonase)/ApoA1 (U/mg)	0.03(0.02-0.22)	0.11(0.02-0.16)	0.16(0.12-0.19)	0.019

NS; Όχι στατιστικά σημαντική διαφορά, HDL-C; HDL χοληστερόλη, Apo; Αποπρωτεΐνη.



8.10.2. Πολυμορφισμός M55L της PON1

Ο πίνακας 28 δείχνει την επίδραση του πολυμορφισμού M55L της PON1 στην ενεργότητα του ενζύμου στους ασθενείς που υποβάλλονταν σε ΣΦΠΚ. Δεν υπήρχαν σημαντικές διαφορές στις τρεις ομάδες των ασθενών όσον αφορά την ηλικία, την κατανομή του φύλου, το δείκτη μάζας σώματος, τη γλυκόζη νηστείας του ορού, τη χρονική διάρκεια από την ένταξη στην ΣΦΠΚ ή τις καπνιστικές συνήθειες. Επιπρόσθετα, αυτός ο πολυμορφισμός δεν επηρέασε τις τιμές των λιπιδαιμικών παραμέτρων του ορού. Ωστόσο, η ενεργότητα της PON1(paraoxon) ήταν σημαντικά διαφορετική μεταξύ των τριών ομάδων. Συγκεκριμένα, οι ασθενείς με το γονότυπο LL εμφάνιζαν υψηλότερη ενεργότητα της PON1(paraoxon) σε σύγκριση με τους ασθενείς που είχαν τους γονότυπους LM και MM, ενώ οι ασθενείς με το γονότυπο MM εμφάνιζαν μικρότερη ενεργότητα της PON1(paraoxon) σε σύγκριση με τις υπόλοιπες δύο ομάδες των ασθενών, δηλαδή LL>LM>MM. Αυτή η διαφορά παρέμενε σημαντική και μετά από τη διόρθωση για τα επίπεδα της HDL χοληστερόλης ή της ApoA1. Τέλος, αυτός ο πολυμορφισμός ασκούσε παρόμοια σημαντική επίδραση και στην ενεργότητα της PON1(phenylacetate), δηλαδή LL>LM>MM και αυτή η διαφορά παρέμενε σημαντική και μετά από τη διόρθωση για τα επίπεδα της HDL χοληστερόλης ή της ApoA1.



Πίνακας 28. Επίδραση του πολυμορφισμού M55L της PON1 στην ενεργότητα της PON1 και στα επίπεδα της HDL-C και της ApoAI στους ασθενείς που υποβάλλονταν σε ΣΦΠΚ

	LL (n=20)	LM (n=20)	MM (n=6)	p
PON1(paraoxon) (U/L)	152(43-320)	64(35-167)	44(25-47)	0.030
PON1(phenylacetate) (U/ml)	101.9±21.1	83.6±15.4	67.0±17.3	0.019
HDL-C (mg/dl)	47.8±19.0	46.9±12.4	46.8±9.7	NS
ApoAI (mg/dl)	146±4	147±31	147±10	NS
PON1(paraoxon)/HDL-C (U/mg)	0.32(0.06-0.76)	0.12(0.05-0.41)	0.09(0.05-0.14)	0.030
PON1(paraoxon)/ApoAI (U/mg)	0.11(0.02-0.22)	0.04(0.02-0.12)	0.03(0.02-0.03)	0.030
PON1(phenylacetate)/HDL-C (U/mg)	238.3±86.4	192.8±62.1	173.9±73.1	0.01
PON1(phenylacetate)/ApoAI (U/mg)	73.9±20.7	59.3±16.5	54.6±16.8	0.01

NS; Όχι στατιστικά σημαντική διαφορά, HDL-C; HDL χοληστερόλη, Apo; Αποπρωτεΐνη, ΣΦΠΚ; Συνεχής φορητή περιτοναϊκή κάθαρση.

8.10.3. Συσχετίσεις της ενεργότητας της PON1 στους ασθενείς που υποβάλλονταν σε ΣΦΠΚ με διάφορες κλινικοεργαστηριακές παραμέτρους

A) Συσχέτιση της ενεργότητας της PON1(paraoxon)

Η πολυπαραγοντική ανάλυση, στην οποία συνεκτιμήθηκαν οι παράμετροι που σε μονοπαραγοντική ανάλυση συσχετίζονταν σημαντικά με την ενεργότητα της PON1(paraoxon), καθώς και οι πολυμορφισμοί της PON1 έδειξε ότι οι παράγοντες που σημαντικά και ανεξάρτητα επηρεάζουν την ενεργότητα της PON1(paraoxon) σε αυτούς τους ασθενείς είναι ο πολυμορφισμός Q192R ($\beta=0.51$, $p=0.007$), ο πολυμορφισμός M55L ($\beta=-0.46$, $p=0.022$) και ο χρόνος από την ένταξη στην ΣΦΠΚ ($\beta=0.34$, $p=0.05$).



B) Συσχέτιση της ενεργότητας της PON1(phenylacetate)

Η πολυπαραγοντική ανάλυση, στην οποία συνεκτιμήθηκαν οι παράμετροι που σε μονοπαραγοντική ανάλυση συσχετίζονταν σημαντικά με την ενεργότητα της PON1(phenylacetate), καθώς και οι πολυμορφισμοί της PON1 έδειξε ότι οι παράγοντες που σημαντικά και ανεξάρτητα επηρεάζουν την ενεργότητα της PON1(phenylacetate) σε αυτούς τους ασθενείς είναι ο πολυμορφισμός M55L ($\beta=-0.46$, $p=0.035$) και ο χρόνος από την ένταξη στην ΣΦΠΚ ($\beta=0.42$, $p=0.03$).

8.11. ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΩΝ ΤΗΣ PON1 ΣΤΙΣ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΕΣ ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΥΣ ΤΩΝ ΑΣΘΕΝΩΝ ΠΟΥ ΒΡΙΣΚΟΝΤΑΝ ΣΕ ΠΡΟΤΕΛΙΚΟ ΣΤΑΔΙΟ ΧΝΑ (ΣΤΑΔΙΑ III-IV)

Η επίδραση των πολυμορφισμών της PON1 στις εργαστηριακές παραμέτρους και την ενεργότητα του ενζύμου είναι παρόμοια με αυτή που έχει ήδη περιγραφεί για τους ασθενείς με τελικού σταδίου ΧΝΑ.



8.12. ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΤΗΣ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑΣ ΤΗΣ PON1 ΜΕΤΑΞΥ ΤΩΝ ΟΜΑΔΩΝ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Στον πίνακα 29 φαίνονται οι διαφορές στην ενεργότητα της PON1 μεταξύ των ομάδων της μελέτης. Συγκεκριμένα, οι ασθενείς με ΠΤΧΝΑ καθώς οι ασθενείς που υποβάλλονταν σε ΑΜΚ είχαν χαμηλότερη ενεργότητα της PON1(paraoxon) σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου. Αντίθετα, οι ασθενείς που υποβάλλονταν σε ΣΦΠΚ είχαν σημαντικά μεγαλύτερη ενεργότητα της PON1(paraoxon) σε σύγκριση τόσο με την ομάδα ελέγχου όσο και με τους ασθενείς με ΠΤΧΝΑ και τους ασθενείς που υποβάλλονταν σε ΑΜΚ (σχήμα 48). Αυτή η διαφορά στην ενεργότητα της PON1(paraoxon) θα μπορούσε να οφείλεται στη διαφορετική κατανομή των πολυμορφισμών της PON1 μεταξύ των ατόμων της μελέτης. Κάτι τέτοιο όμως δεν φαίνεται να ισχύει, αφού η σύγκριση της ενεργότητας της PON1(paraoxon) μεταξύ των διαφόρων ομάδων ανά συγκεκριμένους γονότυπους [που περιλαμβάνουν συνδυασμούς των δύο πολυμορφισμών (Q192R και M55L της PON1)] δεν οδήγησε σε μεταβολή αυτών των αποτελεσμάτων (σχήμα 49). Αντίθετα, μετά από τη διόρθωση για τα επίπεδα της ApoA1 ή της HDL χοληστερόλης, η ενεργότητα της PON1(paraoxon) δεν ήταν διαφορετική μεταξύ των υγιών ατόμων, των ασθενών με ΠΤΧΝΑ και των ασθενών που υποβάλλονταν σε ΑΜΚ, αλλά εξακολουθούσε να είναι υψηλότερη στους ασθενείς που υποβάλλονταν σε ΣΦΠΚ (πίνακας 29 και σχήμα 50).

Η ενεργότητα της PON1(phenylacetate) δεν ήταν διαφορετική μεταξύ των υγιών ατόμων, των ασθενών με ΠΤΧΝΑ και των ασθενών που υποβάλλονταν σε ΑΜΚ, αλλά ήταν υψηλότερη στους ασθενείς που υποβάλλονταν σε ΣΦΠΚ (σχήμα 51). Επιπρόσθετα, μετά τη διόρθωση για τα επίπεδα της ApoA1 ή της HDL χοληστερόλης, η ενεργότητα της PON1(phenylacetate) εξακολουθούσε να είναι υψηλότερη στους ασθενείς που υποβάλλονταν σε ΣΦΠΚ. Επιπρόσθετα, η διορθωμένη ενεργότητα της PON1(phenylacetate) ήταν μεγαλύτερη στους ασθενείς που υποβάλλονταν σε ΑΜΚ σε σύγκριση με τους υγιείς μάρτυρες και τους ασθενείς με ΠΤΧΝΑ (πίνακας 29 και σχήμα 52).



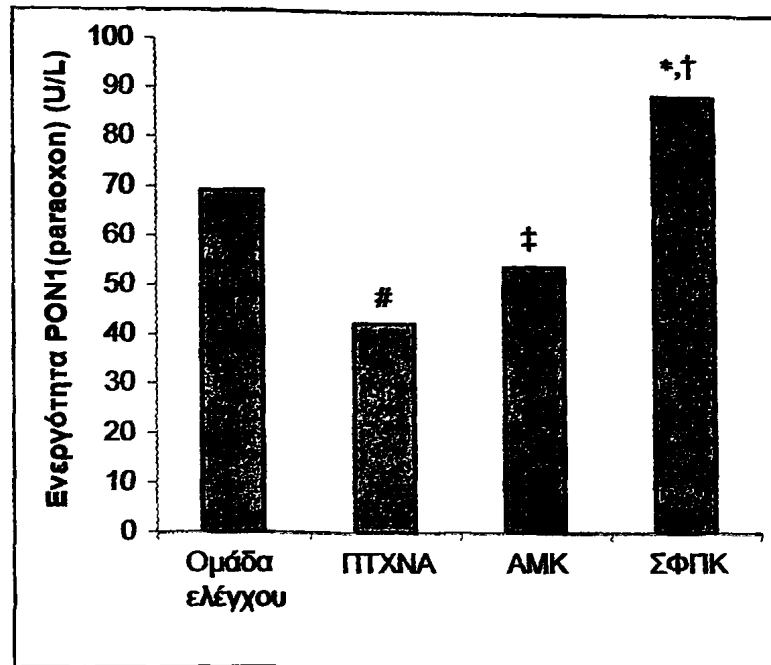
Πίνακας 29. Ενεργότητα της PON1 στους ασθενείς της μελέτης και στην ομάδα ελέγχου

	Ομάδα ελέγχου (n=290)	ΠΤΧΝΑ (n=48)	ΑΜΚ (n=301)	ΣΦΠΚ (n=46)	p
PON1(paraoxon) (U/L)	69.1(9.9-167)	42.5(15-182) [#]	54(25-271) [‡]	89(25-320) ^{*.†}	0.019
PON1(phenylacetate) (U/ml)	63.9±21.7	58.9±16.9	62.1±15.4	90.8±21.9 ^{*.†}	0.000
PON1 (paraoxon)/HDL-C (U/mg)	0.15(0.01-0.52)	0.10(0.03-0.47)	0.19(0.05-1.08)	0.25(0.08-0.76) ^{*.†}	0.038
PON1 (paraoxon)/ApoAI (U/mg)	0.05(0.005-0.149)	0.04(0.01-0.18)	0.05(0.02-0.23)	0.10(0.04-0.22) ^{*.†}	0.04
PON1 (phenylacetate)/HDL (U/mg)	147.7±63.9	141.9±44.2	181.5±61.9 ^{‡.±}	218.6±79.0 ^{*.†}	0.000
PON1(phenylacetate) /ApoAI (U/mg)	45.5±16.2	46.5±15.7	53.2±14.2 ^{‡.±}	68.0±20.6 ^{*.†}	0.000

ΠΤΧΝΑ; Χρόνια νεφρική ανεπάρκεια προτελικού σταδίου (III-IV), ΑΜΚ; Αμοκάθαρση, ΣΦΠΚ; Συνεχής φορητή περιτοναϊκή κάθαρση, HDL-C; HDL χοληστερόλη, Apo; Αποπρωτεΐνη, NS; Όχι στατιστικά σημαντική διαφορά.

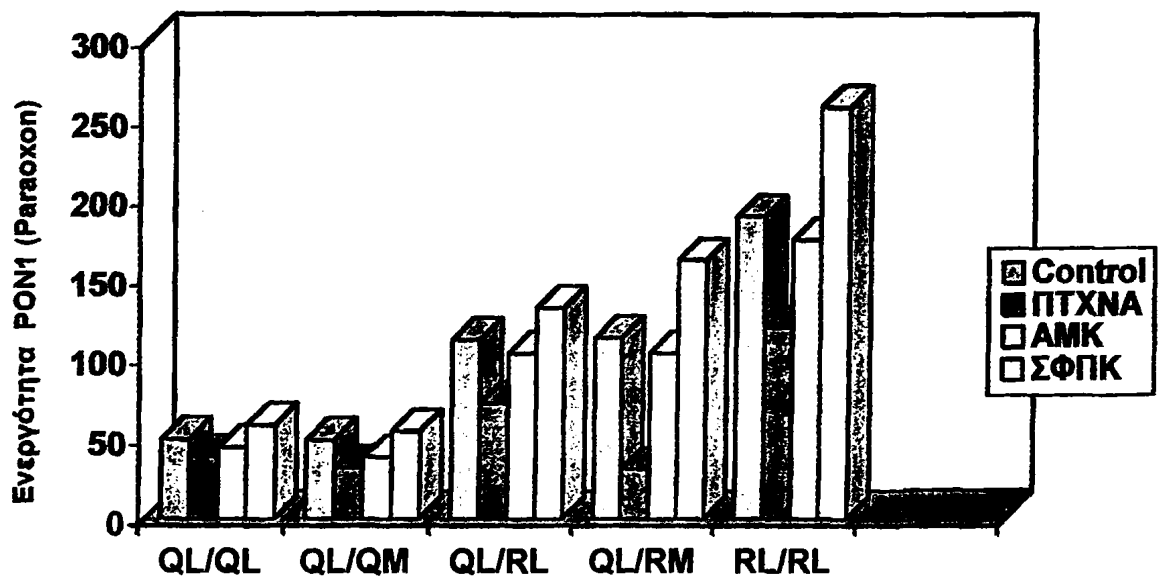
#p<0.05 για τη σύγκριση μεταξύ ΠΤΧΝΑ και της ομάδας ελέγχου, ‡p<0.05 για τη σύγκριση μεταξύ ΑΜΚ και της ομάδας ελέγχου, ±p<0.05 για τη σύγκριση μεταξύ ΑΜΚ και ΠΤΧΝΑ, *p<0.05 για τη σύγκριση μεταξύ ΣΦΠΚ και της ομάδας ελέγχου, †p<0.05 για τη σύγκριση μεταξύ ΣΦΠΚ και ΠΤΧΝΑ ή ΑΜΚ.





Σχήμα 48. Η ενεργότητα της PON1(παραοxon) στους ασθενείς της μελέτης και στην ομάδα ελέγχου

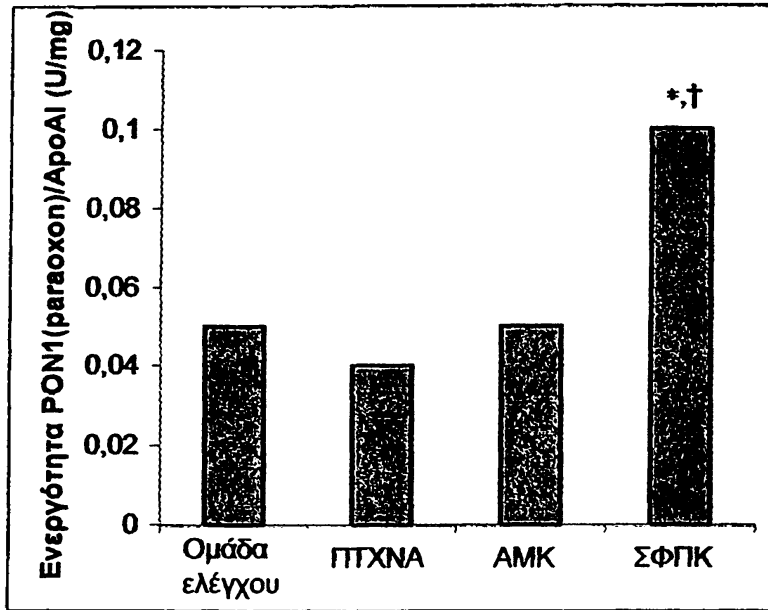
ΠΤΧΝΑ; Χρόνια νεφρική ανεπάρκεια προτελικού σταδίου (III-IV), ΑΜΚ; Αιμοκάθαρση, ΣΦΠΚ; Συνεχής φορητή περιτοναϊκή κάθαρση. # $p < 0.05$ για τη σύγκριση μεταξύ ΠΤΧΝΑ και της ομάδας ελέγχου, ‡ $p < 0.05$ για τη σύγκριση μεταξύ ΑΜΚ και της ομάδας ελέγχου, * $p < 0.05$ για τη σύγκριση μεταξύ ΣΦΠΚ και της ομάδας ελέγχου, † $p < 0.05$ για τη σύγκριση μεταξύ ΣΦΠΚ και ΠΤΧΝΑ ή ΑΜΚ.



Σχήμα 49. Η ενεργότητα της PON1(παραοxon) ανά συνδυασμένο γονότυπο στους ασθενείς της μελέτης και στην ομάδα ελέγχου

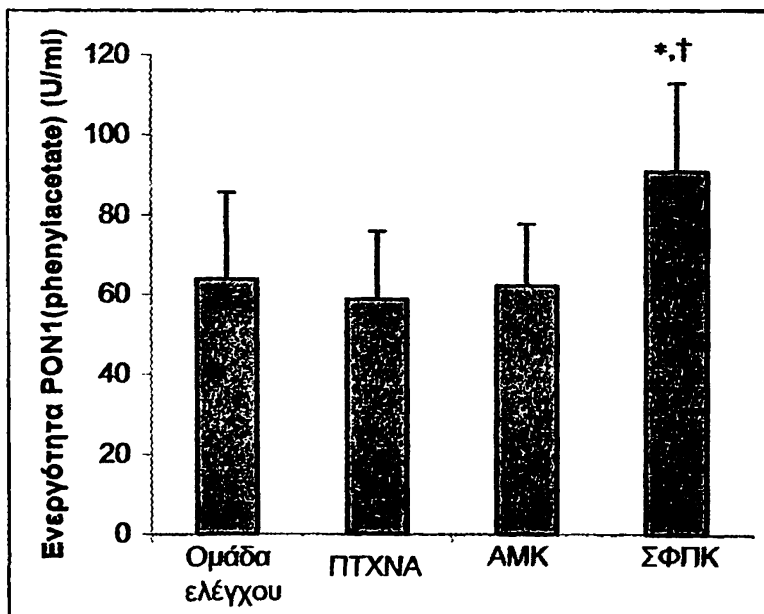


Control; Ομάδα ελέγχου, ΠΤΧΝΑ; Χρόνια νεφρική ανεπάρκεια προτελικού σταδίου (III-IV), ΑΜΚ; Αιμοκάθαρση, ΣΦΠΚ; Συνεχής φορητή περιτοναϊκή κάθαρση.



Σχήμα 50. Η ενεργότητα της PON1(παραοξον) μετά από τη διόρθωση για τα επίπεδα της ΑποΑΙ στους ασθενείς της μελέτης και στην ομάδα ελέγχου

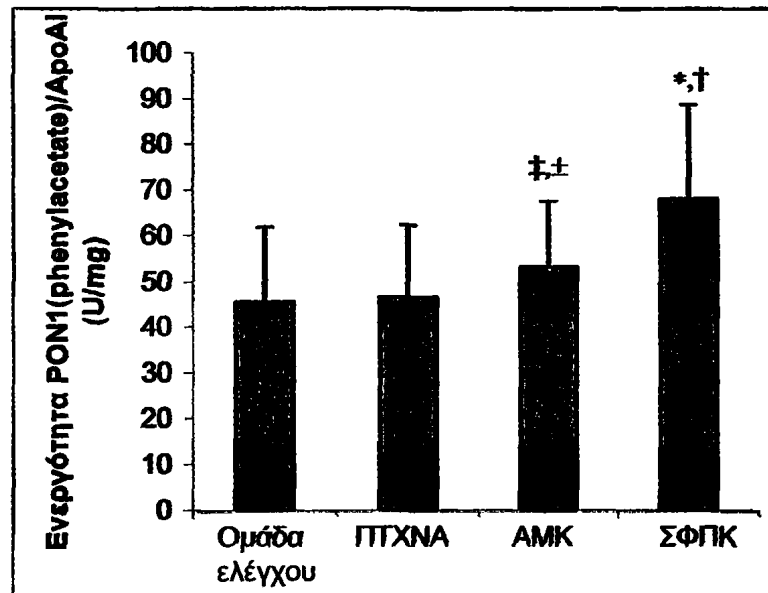
ΠΤΧΝΑ; Χρόνια νεφρική ανεπάρκεια προτελικού σταδίου (III-IV), ΑΜΚ; Αιμοκάθαρση, ΣΦΠΚ; Συνεχής φορητή περιτοναϊκή κάθαρση. * $p < 0.05$ για τη σύγκριση μεταξύ ΣΦΠΚ και της ομάδας ελέγχου, † $p < 0.05$ για τη σύγκριση μεταξύ ΣΦΠΚ και ΠΤΧΝΑ ή ΑΜΚ.



Σχήμα 51. Η ενεργότητα της PON1(phenylacetate) στους ασθενείς της μελέτης και στην ομάδα ελέγχου



ΠΤΧΝΑ; Χρόνια νεφρική ανεπάρκεια προτελικού σταδίου (III-IV), ΑΜΚ; Αιμοκάθαρση, ΣΦΠΚ; Συνεχής φορητή περιτοναϊκή κάθαρση. * $p < 0.05$ για τη σύγκριση μεταξύ ΣΦΠΚ και της ομάδας ελέγχου, † $p < 0.05$ για τη σύγκριση μεταξύ ΣΦΠΚ και ΠΤΧΝΑ ή ΑΜΚ.



Σχήμα 52. Η ενεργότητα της PON1(phenylacetate) μετά από τη διόρθωση για τα επίπεδα της ApoAI στους ασθενείς της μελέτης και στην ομάδα ελέγχου

ΠΤΧΝΑ; Χρόνια νεφρική ανεπάρκεια προτελικού σταδίου (III-IV), ΑΜΚ; Αιμοκάθαρση, ΣΦΠΚ; Συνεχής φορητή περιτοναϊκή κάθαρση. * $p < 0.05$ για τη σύγκριση μεταξύ ΣΦΠΚ και της ομάδας ελέγχου, † $p < 0.05$ για τη σύγκριση μεταξύ ΣΦΠΚ και ΠΤΧΝΑ ή ΑΜΚ, ‡ $p < 0.05$ για τη σύγκριση μεταξύ ΑΜΚ και της ομάδας ελέγχου, † $p < 0.05$ για σύγκριση μεταξύ ΑΜΚ και ΠΤΧΝΑ.

8.13. Η ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑ ΤΗΣ PAF-ΑΗ ΚΑΤΕΥΛΟΨΔΡΟΛΑΣΗΣ ΣΤΟΥΣ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ΧΡΟΝΙΑ ΝΕΦΡΙΚΗ ΑΝΕΠΑΡΚΕΙΑ ΚΑΙ ΣΤΗΝ ΟΜΑΔΑ ΕΛΕΓΧΟΥ

Η ολική ενεργότητα της PAF-AH του ορού ήταν αυξημένη σε όλους τους ασθενείς της μελέτης σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου. Επιπρόσθετα, οι ασθενείς που υποβάλλονταν σε ΣΦΠΚ είχαν μεγαλύτερη ολική ενεργότητα της PAF-AH του ορού σε σύγκριση με τους ασθενείς που υποβάλλονταν σε ΑΜΚ και οι τελευταίοι είχαν μεγαλύτερη ενεργότητα σε σύγκριση με τους ασθενείς με ΠΤΧΝΑ (πίνακας 30, σχήμα 53). Αυτές οι διαφορές θα μπορούσαν να αντανακλούν διαφορές στα επίπεδα της LDL χοληστερόλης, αφού η PAF-AH του ορού είναι κυρίως συνδεδεμένη με τα LDL σωματίδια. Μετά από τη διόρθωση για τα επίπεδα της LDL χοληστερόλης και της ApoB, η ολική ενεργότητα της PAF-AH του ορού ήταν ιδιαίτερα αυξημένη στους ασθενείς που υποβάλλονταν σε ΑΜΚ και ακολουθούσαν οι ασθενείς που υποβάλλονταν σε ΣΦΠΚ⁴³⁷, οι ασθενείς με ΠΤΧΝΑ και τέλος οι υγιείς μάρτυρες (πίνακας 30, σχήμα 54).

Η ενεργότητα της PAF-AH των HDL ήταν μεγαλύτερη στους ασθενείς που υποβάλλονταν σε ΣΦΠΚ και σε ΑΜΚ σε σύγκριση με τους υγιείς μάρτυρες και τους ασθενείς με ΠΤΧΝΑ (πίνακας 30 και σχήμα 55). Επιπρόσθετα, η διορθωμένη για τα επίπεδα της HDL χοληστερόλης ή της ApoAΙ ενεργότητα της PAF-AH των HDL ήταν μεγαλύτερη στους ασθενείς που υποβάλλονταν σε ΑΜΚ και ακολουθούσαν οι ασθενείς που υποβάλλονταν σε ΣΦΠΚ (πίνακας 30, σχήμα 56).

Τέλος, ο λόγος ενεργότητας HDL-PAF ΑΗ/ολική PAF-AH ήταν μικρότερος στους ασθενείς που υποβάλλονταν σε ΣΦΠΚ και στους ασθενείς με ΠΤΧΝΑ σε σύγκριση με τους ασθενείς που υποβάλλονταν σε ΑΜΚ και τους υγιείς μάρτυρες (πίνακας 30, σχήμα 57).



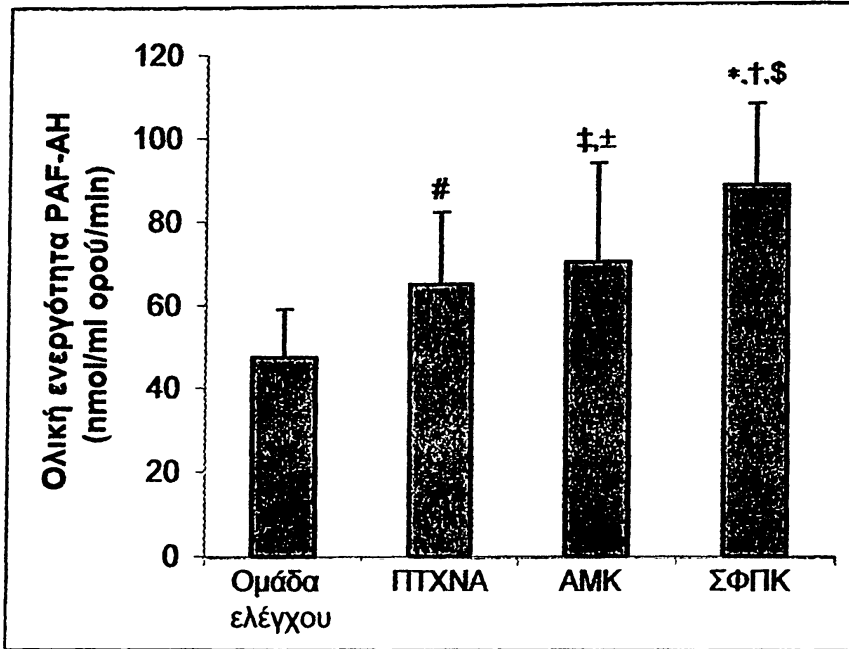
Πίνακας 30. Ενεργότητα της PAF-AH στους ασθενείς της μελέτης και στην ομάδα ελέγχου

	Ομάδα ελέγχου (n=290)	ΠΤΧΝΑ (n=48)	ΑΜΚ (n=301)	ΣΦΠΚ (n=46)	p
Ολική PAF-AH (nmol/ml ορού/min)	47.3±11.7	64.8±17.2 [#]	70.0±23.4 ^{‡±}	88.1±19.4 ^{*,†,§}	0.0002
Ολική PAF-AH/LDL-C (nmol/mg/min)	35.4±10.6	49.3±13.5 [#]	72.2±27.9 ^{‡±}	58.5±16.5 ^{*,†,§}	0.0000
Ολική PAF-AH/ApoB (nmol/mg/min)	49.8±14.5	63.2±18.7 [#]	83.5±25.5 ^{‡±}	73.9±12.0 ^{*,†,§}	0.000
HDL-PAF AH (nmol/ml ορού/min)	3.3±1.2	3.1±1.5	5.7±4.3 ^{‡±}	4.3±1.9 ^{*,†,§}	0.0001
HDL-PAF AH/HDL-C (nmol/mg/min)	7.4±2.7	7.8±4.5	16.1±8.4 ^{‡±}	9.6±3.8 ^{*,†,§}	0.0000
HDL-PAF AH/ApoAI (nmol/mg/min)	2.3±0.9	2.4±1.3	4.9±3.7 ^{‡±}	3.1±1.2 ^{*,†,§}	0.0000
HDL-PAF AH/Total PAF-AH	0.07±0.03	0.05±0.02 [#]	0.08±0.04 [‡]	0.05±0.02 ^{*,§}	0.0003
HDL-PAF AH/LDL-C (nmol/mg/min)	2.66±1.43	2.55±1.69	6.05±2.77 ^{‡±}	2.95±1.75 ^{*,†,§}	0.0000

ΠΤΧΝΑ; Χρόνια νεφρική ανεπάρκεια προτελικού σταδίου (III-IV), ΑΜΚ; Αμοκάθαρση, ΣΦΠΚ; Συνεχής φορητή περιτοναϊκή κάθαρση, HDL-C; HDL χοληστερόλη, Apo; Αποπρωτεΐνη.

#p<0.05 τη για σύγκριση μεταξύ ΠΤΧΝΑ και της ομάδας ελέγχου, ‡p<0.05 για τη σύγκριση μεταξύ ΑΜΚ και της ομάδας ελέγχου, ±p<0.05 για τη σύγκριση μεταξύ ΑΜΚ και ΠΤΧΝΑ, *p<0.05 για τη σύγκριση μεταξύ ΣΦΠΚ και της ομάδας ελέγχου, †p<0.05 για τη σύγκριση μεταξύ ΣΦΠΚ και ΠΤΧΝΑ, §p<0.05 για τη σύγκριση μεταξύ ΣΦΠΚ με ΑΜΚ.

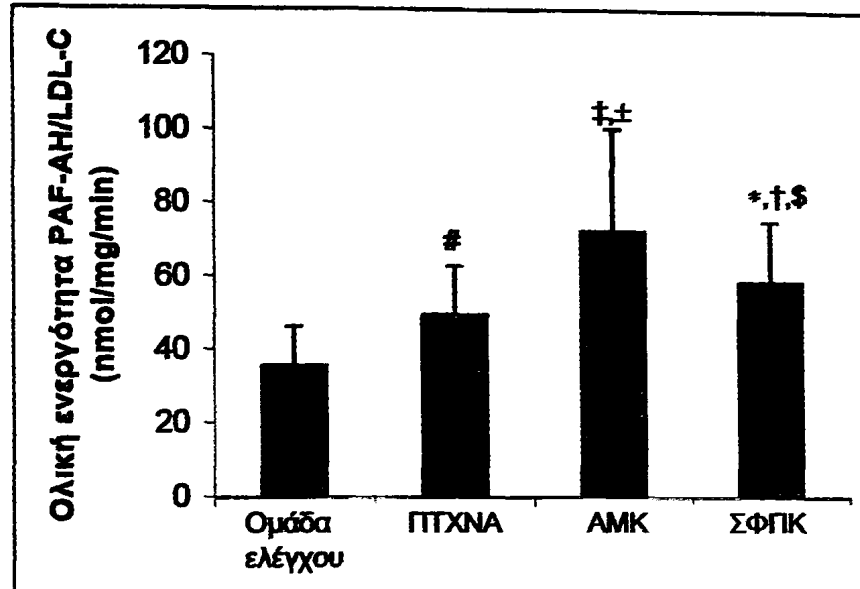




Σχήμα 53. Η ολική ενεργότητα της PAF-AH στους ασθενείς της μελέτης και στην ομάδα ελέγχου

ΠΤΧΝΑ; Χρόνια νεφρική ανεπάρκεια προτελικού σταδίου (III-IV), ΑΜΚ; Αμοκάθαρση, ΣΦΠΚ; Συνεχής φορήτη περιτοναϊκή κάθαρση, HDL-C; HDL χοληστερόλη.

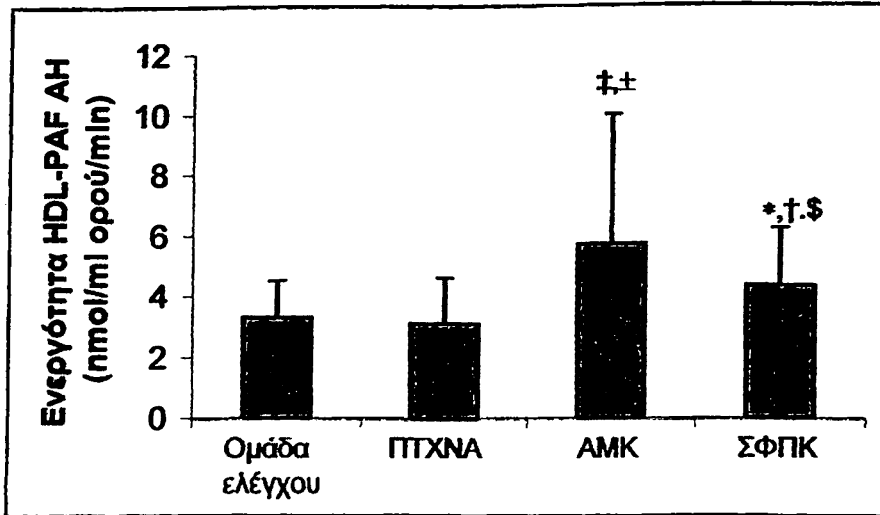
$p < 0.05$ για τη σύγκριση μεταξύ ΠΤΧΝΑ και της ομάδας ελέγχου, ‡ $p < 0.05$ για τη σύγκριση μεταξύ ΑΜΚ και της ομάδας ελέγχου, ± $p < 0.05$ για τη σύγκριση μεταξύ ΑΜΚ και ΠΤΧΝΑ, * $p < 0.05$ για τη σύγκριση μεταξύ ΣΦΠΚ και της ομάδας ελέγχου, † $p < 0.05$ για τη σύγκριση μεταξύ ΣΦΠΚ και ΠΤΧΝΑ, § $p < 0.05$ για τη σύγκριση μεταξύ ΣΦΠΚ με ΑΜΚ.



Σχήμα 54. Η ολική ενεργότητα της PAF-AH του ορού μετά από τη διόρθωση για τα επίπεδα της LDL-C στους ασθενείς της μελέτης και στην ομάδα ελέγχου

ΠΤΧΝΑ; Χρόνια νεφρική ανεπάρκεια προτελικού σταδίου (III-IV), ΑΜΚ; Αμοκάθαρση, ΣΦΠΚ; Συνεχής φορητή περιτοναϊκή κάθαρση, LDL-C; LDL χοληστερόλη.

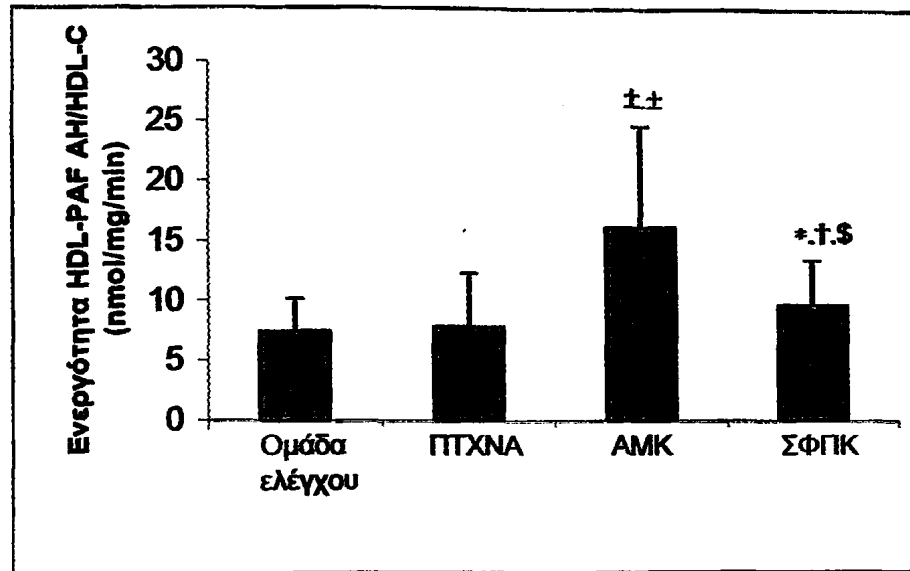
$p < 0.05$ για τη σύγκριση μεταξύ ΠΤΧΝΑ και της ομάδας ελέγχου, ‡ $p < 0.05$ για τη σύγκριση μεταξύ ΑΜΚ και της ομάδας ελέγχου, † $p < 0.05$ για τη σύγκριση μεταξύ ΑΜΚ και ΠΤΧΝΑ, * $p < 0.05$ για τη σύγκριση μεταξύ ΣΦΠΚ και της ομάδας ελέγχου, † $p < 0.05$ για τη σύγκριση μεταξύ ΣΦΠΚ και ΠΤΧΝΑ, \$ $p < 0.05$ για τη σύγκριση μεταξύ ΣΦΠΚ με ΑΜΚ.



Σχήμα 55. Η ενεργότητα της HDL-PAF AH στους ασθενείς της μελέτης και στην ομάδα ελέγχου

ΠΤΧΝΑ; Χρόνια νεφρική ανεπάρκεια προτελικού σταδίου (III-IV), ΑΜΚ; Αιμοκάθαρση, ΣΦΠΚ; Συνεχής φορητή περιτοναϊκή κάθαρση, HDL-C; HDL χοληστερόλη.

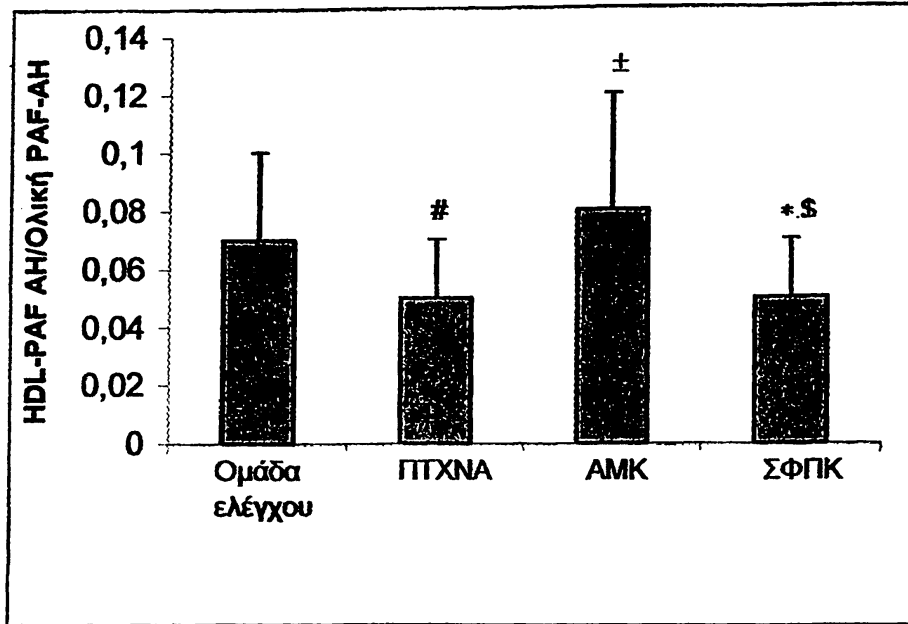
‡ $p < 0.05$ για τη σύγκριση μεταξύ ΑΜΚ και της ομάδας ελέγχου, † $p < 0.05$ για τη σύγκριση μεταξύ ΑΜΚ και ΠΤΧΝΑ, * $p < 0.05$ για τη σύγκριση μεταξύ ΣΦΠΚ και της ομάδας ελέγχου, † $p < 0.05$ για τη σύγκριση μεταξύ ΣΦΠΚ και ΠΤΧΝΑ, \$ $p < 0.05$ για τη σύγκριση μεταξύ ΣΦΠΚ και ΑΜΚ



Σχήμα 56. Η ενεργότητα της HDL-PAF AH μετά από τη διόρθωση για τα επίπεδα της HDL-C στους ασθενείς της μελέτης και στην ομάδα ελέγχου

ΠΤΧΝΑ; Χρόνια νεφρική ανεπάρκεια προτελικού σταδίου (III-IV), ΑΜΚ; Αμιοκάθαρση, ΣΦΠΚ; Συνεχής φορητή περιτοναϊκή κάθαρση, HDL-C; HDL χοληστερόλη.

† $p < 0.05$ για τη σύγκριση μεταξύ ΑΜΚ και της ομάδας ελέγχου, † $p < 0.05$ για τη σύγκριση μεταξύ ΑΜΚ και ΠΤΧΝΑ, * $p < 0.05$ για τη σύγκριση μεταξύ ΣΦΠΚ και της ομάδας ελέγχου, † $p < 0.05$ για τη σύγκριση μεταξύ ΣΦΠΚ και ΠΤΧΝΑ, \$ $p < 0.05$ για τη σύγκριση μεταξύ ΣΦΠΚ με ΑΜΚ



Σχήμα 57. Ο λόγος ενεργότητας HDL-PAF AH/ ολική PAF-AH στους ασθενείς της μελέτης και στην ομάδα ελέγχου

ΠΤΧΝΑ; Χρόνια νεφρική ανεπάρκεια προτελικού σταδίου (III-IV), ΑΜΚ; Αιμοκάθαρση, ΣΦΠΚ; Συνεχής φορητή περιτοναϊκή κάθαρση.

$p < 0.05$ για τη σύγκριση μεταξύ ΠΤΧΝΑ και της ομάδας ελέγχου, ‡ $p < 0.05$ για τη σύγκριση μεταξύ ΑΜΚ και της ομάδας ελέγχου, ± $p < 0.05$ για τη σύγκριση μεταξύ ΑΜΚ και ΠΤΧΝΑ, * $p < 0.05$ για τη σύγκριση μεταξύ ΣΦΠΚ και της ομάδας ελέγχου, \$ $p < 0.05$ για τη σύγκριση μεταξύ ΣΦΠΚ και ΑΜΚ.

8.14. ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΤΗΣ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑΣ ΤΗΣ PAF-AH ΜΕ ΔΙΑΦΟΡΕΣ ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΕΣ ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΥΣ

8.14.1. Συσχέτιση της ενεργότητας της PAF-AH με την ApoE

A) Με τους πολυμορφισμούς της ApoE

Η ολική ενεργότητα της PAF-AH του ορού ή της HDL-PAF AH δεν συσχετιζόταν σημαντικά με τους πολυμορφισμούς της ApoE σε καμία από τις ομάδες της μελέτης. Για παράδειγμα, στους ασθενείς που υποβάλλονταν σε AMK η ολική PAF-AH του ορού ήταν 64.5 ± 21.8 στους ασθενείς με το αλληλίο ε2 vs 69.9 ± 23.7 στους ασθενείς με το αλληλίο ε3 vs 72.4 ± 25.3 nmol/ml ορού/min στους ασθενείς με το αλληλίο ε4, $p=NS$ και η ενεργότητα της HDL-PAF AH ήταν 6.3 ± 3.1 στους ασθενείς με το αλληλίο ε2 vs 5.5 ± 4.6 στους ασθενείς με το αλληλίο ε3 vs 5.9 ± 3.8 nmol/ml ορού/min στους ασθενείς με το αλληλίο ε4, $p=NS$.

B) Με τα επίπεδα της ApoE

1) Στους υγιείς μάρτυρες

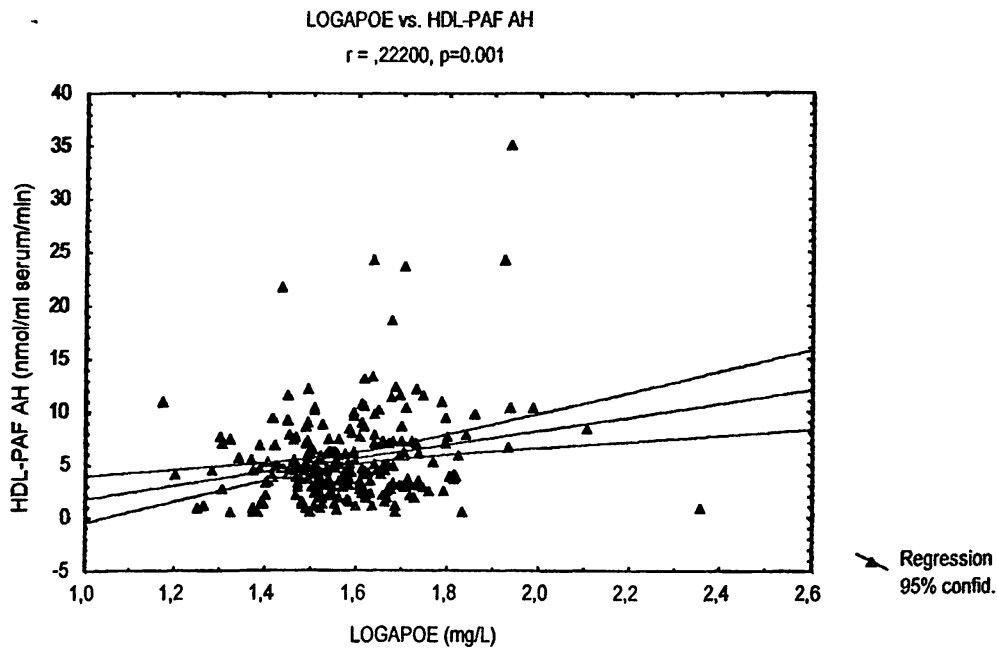
Τα επίπεδα της ApoE του ορού (μετά από λογαριθμικό μετασχηματισμό) συσχετιζόταν σημαντικά με την ενεργότητα της HDL-PAF AH ($r=-0.23$, $p=0.036$). Ωστόσο, μετά από τη διόρθωση της ενεργότητας της HDL-PAF AH για τα επίπεδα της HDL χοληστερόλης δεν υπήρχε συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων της ApoE και της ενεργότητας της HDL-PAF AH ($r=-0.05$, $p=NS$). Έτσι, η αρχική συσχέτιση θα πρέπει να αποδοθεί στην επίδραση της ApoE στα επίπεδα της HDL χοληστερόλης. Επιπρόσθετα, δεν υπήρχε σημαντική συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων της ApoE και της ολικής ενεργότητας της PAF-AH του ορού ($r=0.20$, $p=NS$).

2) Στους ασθενείς που υποβάλλονταν σε AMK

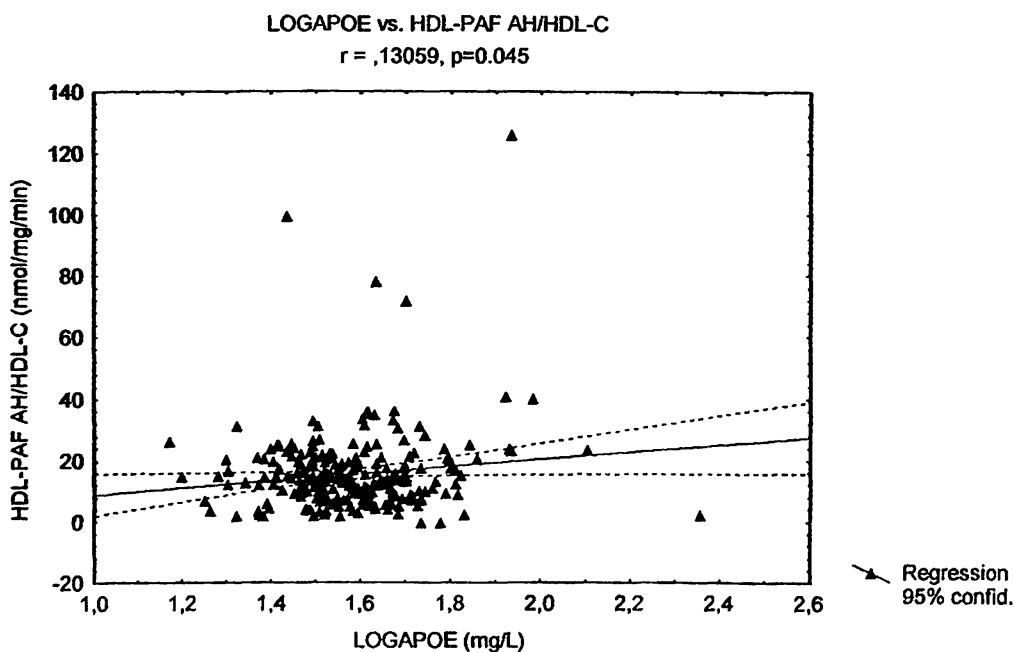
Τα επίπεδα της ApoE του ορού (μετά από λογαριθμικό μετασχηματισμό) συσχετιζόταν σημαντικά με την ολική ενεργότητα της PAF-AH του ορού ($r=0.387$, $p=0.000$). Μετά από τη διόρθωση της ολικής ενεργότητας της PAF-AH για τα επίπεδα της ApoB δεν υπήρχε σημαντική συσχέτιση μεταξύ επιπέδων της ApoE και της ολικής ενεργότητας της PAF-AH του ορού ($r=-0.05$, $p=NS$). Έτσι, η αρχική συσχέτιση θα πρέπει να αποδοθεί στην επίδραση της ApoE στα επίπεδα της ApoB. Όπως φαίνεται στα σχήματα 58-60, η συγκέντρωση της ApoE στον ορό συσχετιζόταν με την ενεργότητα της HDL-PAF AH ανεξάρτητα από τα επίπεδα της HDL χοληστερόλης ή της ApoAI.

3) Στους ασθενείς με ΠΤΧΝΑ και στους ασθενείς που υποβάλλονταν σε ΣΦΠΚ

Παρατηρήθηκαν παρόμοιες συσχετίσεις με εκείνες που περιγράφονται για τους ασθενείς που υποβάλλονταν σε ΑΜΚ. Ωστόσο, αυτές οι συσχετίσεις δεν ήταν στατιστικά σημαντικές, πιθανά εξαιτίας του μικρού αριθμού των ασθενών.

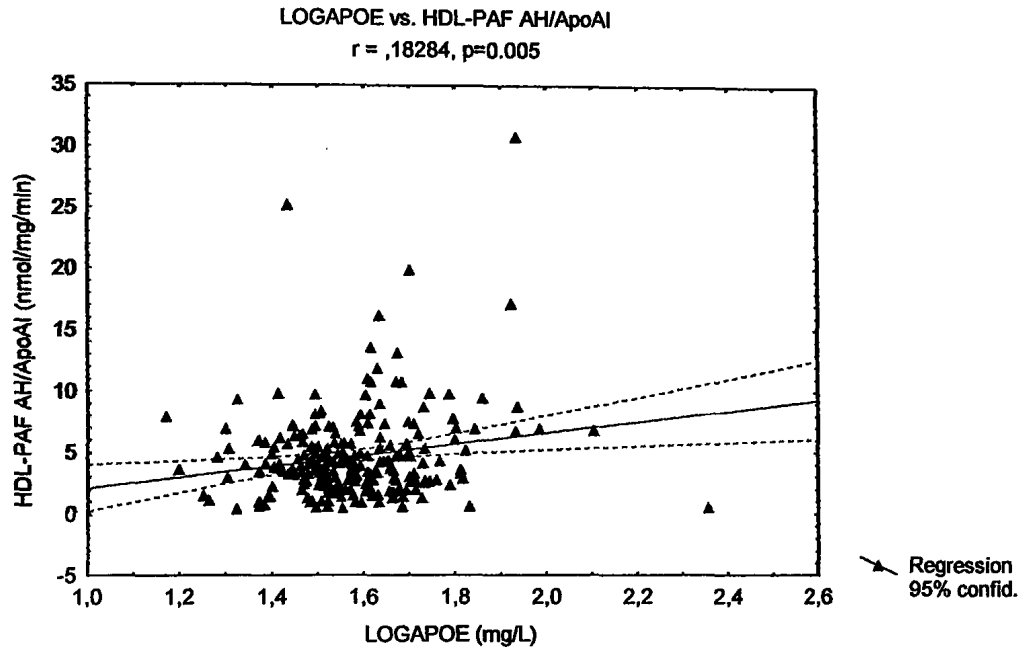


Σχήμα 58. Συσχέτιση της συγκέντρωσης της ApoE με την ενεργότητα της HDL-PAF AH στους ασθενείς που υποβάλλονταν σε ΑΜΚ



Σχήμα 59. Συσχέτιση της συγκέντρωσης της ApoE με τη διορθωμένη για τα επίπεδα της HDL-C ενεργότητα της HDL-PAF AH στους ασθενείς που υποβάλλονταν σε ΑΜΚ





Σχήμα 60. Συσχέτιση της συγκέντρωσης της ApoE με τη διορθωμένη για τα επίπεδα της ApoAI ενεργότητα της HDL-PAF AH στους ασθενείς που υποβάλλονταν σε AMK

8.14.2. Συσχέτιση της ενεργότητας της PAF-AH με τους πολυμορφισμούς της PON1

Οι πολυμορφισμοί της PON1 δεν επηρεάζουν την ενεργότητα της PAF-AH του ορού ή της HDL-PAF AH σε καμία από τις τρεις ομάδες των ασθενών. Στον πίνακα 30 φαίνεται η κατανομή της ενεργότητας της PAF-AH σε σχέση με τον πολυμορφισμό της PON1 στους ασθενείς που υποβάλλονταν σε AMK.

Πίνακας 31. Η ενεργότητα της PAF-AH σε σχέση με τους πολυμορφισμούς της PON1 στους ασθενείς που υποβάλλονταν σε AMK

	QQ (n=159)	QR (n=118)	RR (n=24)	P
Ολική ενεργότητα της PAF-AH του ορού (nmol/ml ορού/min)	72.4±25.5	66.4±20.8	67.9±20.5	NS
Ενεργότητα HDL-PAF AH (nmol/ml ορού/min)	5.3±4.0	5.8±4.2	7.8±6.2	NS
	LL (n=135)	LM (n=133)	MM (n=33)	
Ολική ενεργότητα της PAF-AH του ορού (nmol/ml ορού/min)	67.9±21.5	71.3±25.5	71.1±24.4	NS
Ενεργότητα HDL-PAF AH (nmol/ml ορού/min)	6.1±5.1	5.3±3.7	5.0±2.7	NS



8.14.3. Συσχέτιση της ενεργότητας της PAF-AH με άλλες κλινικοεργαστηριακές παραμέτρους στους ασθενείς που υποβάλλονταν σε AMK

1) Ολική ενεργότητα της PAF-AH του ορού

Η συσχέτιση της ολικής ενεργότητας της PAF-AH του ορού με άλλες κλινικοεργαστηριακές παραμέτρους στους ασθενείς που υποβάλλονταν σε AMK φαίνεται στον πίνακα 32.

Πίνακας 32. Συσχέτιση της ολικής ενεργότητας της PAF-AH του ορού με άλλες κλινικοεργαστηριακές παραμέτρους στους ασθενείς που υποβάλλονταν σε AMK

	Ολική ενεργότητα της PAF-AH του ορού	
	r	p
T-CHOL	0.50	0.000
LogTRG	0.34	0.000
HDL-C	0.03	NS
LDL-C	0.51	0.000
non HDL-C	0.54	0.000
ApoAI	0.05	NS
ApoB	0.59	0.000
LogLp(a)	0.05	NS
TPR	-0.02	NS
ALB	0.07	NS
Ουρία	-0.00	NS
Κρεατινίνη	-0.03	NS
BMI	0.05	NS
Γλυκόζη	-0.02	NS
Ηλικία	-0.10	NS
Διάρκεια από την ένταξη σε AMK	0.06	NS
Φύλο	0.05	NS
Κάπνισμα	0.08	NS
RRF	0.09	NS

NS; Όχι στατιστικά σημαντική διαφορά, T-CHOL; Ολική χοληστερόλη, LDL-C; LDL χοληστερόλη, HDL-C; HDL χοληστερόλη, non HDL-C; non HDL χοληστερόλη, TRG; Τριγλυκερίδια, Apo; Αποπρωτεΐνη, Lp(a); Λιποπρωτεΐνη (α), r; συντελεστής συσχέτισης. TPR; Ολικά λευκώματα ορού, ALB; Αλβουμίνη ορού, AMK; Αιμοκάθαρση, RRF; Υπολειπόμενη νεφρική λειτουργία.

Σε πολυπαραγοντική ανάλυση, ο παράγοντας που ανεξάρτητα επηρεάζει την ολική ενεργότητα της PAF-AH του ορού στους ασθενείς που υποβάλλονταν σε AMK ήταν μόνο τα επίπεδα της ApoB ($\beta=0.573$, $p=0.000$) και όχι το φύλο ($\beta=0.073$, $p=NS$), τα επίπεδα των τριγλυκεριδίων ($\beta=-0.06$, $p=NS$) ή τα επίπεδα της ApoE του ορού ($\beta=0.116$, $p=NS$).

2) Ενεργότητα της HDL-PAF AH

Η συσχέτιση της ενεργότητας της HDL-PAF AH με άλλες κλινικοεργαστηριακές παραμέτρους στους ασθενείς που υποβάλλονταν σε AMK φαίνεται στον πίνακα 33.

Πίνακας 33. Συσχέτιση της ενεργότητας της HDL-PAF AH με άλλες κλινικοεργαστηριακές παραμέτρους στους ασθενείς που υποβάλλονταν σε AMK

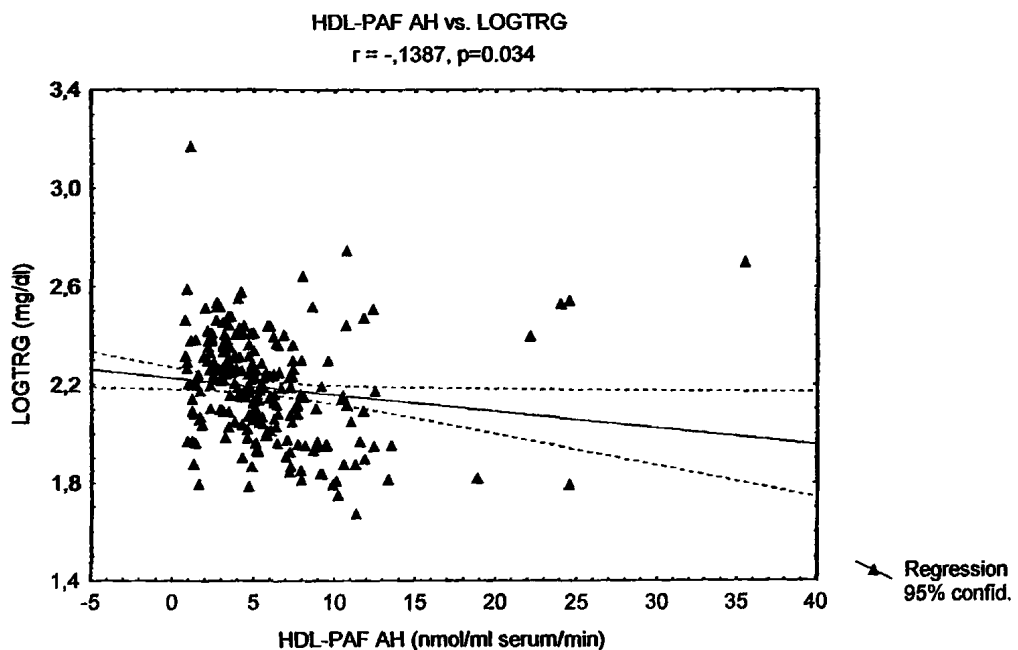
	Ενεργότητα της HDL-PAF AH	
	r	p
T-CHOL	0.07	NS
LogTRG	-0.14	0.034
HDL-C	0.247	0.000
LDL-C	0.04	NS
non HDL-C	0.03	NS
ApoAI	0.138	0.034
ApoB	-0.02	NS
LogLp(a)	0.04	NS
TPR	-0.11	NS
ALB	-0.07	NS
Ουρία	-0.03	NS
Κρεατινίνη	-0.10	NS
BMI	-0.00	NS
Γλυκόζη	-0.14	NS
Ηλικία	-0.06	NS



Διάρκεια από την ένταξη στην AMK	0.17	0.012
Φύλο	0.02	NS
Κάπνισμα	0.03	NS
RRF	0.07	NS

NS; Όχι στατιστικά σημαντική διαφορά, T-CHOL; Ολική χοληστερόλη, LDL-C; LDL χοληστερόλη, HDL-C; HDL χοληστερόλη, non HDL-C; non HDL χοληστερόλη, TRG; Τριγλυκερίδια, Apo; Αποπρωτεΐνη, Lp(a); Λιποπρωτεΐνη (α), γ; συντελεστής συσχέτισης, TPR; Ολικά λευκώματα ορού, ALB; Αλβουμίνη ορού, AMK; Αιμοκάθαρση, RRF; Υπολειπόμενη νεφρική λειτουργία.

Σε πολυπαραγοντική ανάλυση, οι παράγοντες που ανεξάρτητα επηρεάζουν την ενεργότητα της HDL-PAF AH στους ασθενείς που υποβάλλονταν σε AMK ήταν τα επίπεδα της ApoE του ορού ($\beta=0.34$, $p=0.000$), τα επίπεδα των τριγλυκεριδίων του ορού ($\beta=-0.22$, $p=0.007$, σχήμα 61), ο χρόνος από την ένταξη στην AMK ($\beta=0.158$, $p=0.016$) και όχι τα επίπεδα της HDL χοληστερόλης ($\beta=0.12$, $p=NS$).



Σχήμα 61. Συσχέτιση της ενεργότητας της HDL-PAF AH με τη συγκέντρωση των τριγλυκεριδίων στους ασθενείς που υποβάλλονταν σε AMK

Τέλος, πρέπει να σημειωθεί ότι παρόμοιες συσχετίσεις παρατηρήθηκαν και στους ασθενείς με ΠΤΧΝΑ, καθώς και στους ασθενείς που υποβάλλονταν σε ΣΦΠΚ (ωστόσο, στους τελευταίους ο χρόνος από την ένταξη στην ΣΦΠΚ δεν συσχετιζόταν με την ενεργότητα της HDL-PAF AH).



8.15. ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΜΙΑΣ ΣΥΝΕΔΡΙΑΣ ΑΙΜΟΚΑΘΑΡΣΗΣ ΚΑΙ ΤΟΥ ΤΥΠΟΥ ΤΗΣ ΜΕΜΒΡΑΝΗΣ ΤΟΥ ΦΙΛΤΡΟΥ ΣΤΗΝ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑ ΤΗΣ PON1 ΚΑΙ ΤΗΣ PAF-AH

Στον πίνακα 34 φαίνονται τα κλινικά και εργαστηριακά χαρακτηριστικά των ασθενών που υποβάλλονταν σε αιμοκάθαρση ανάλογα με τον τύπο της μεμβράνης του φίλτρου. Διακόσιοι δύο ασθενείς υποβάλλονταν σε ΑΜΚ με κλασικές κυτταρινικού τύπου μεμβράνες, ενώ 99 ασθενείς υποβάλλονταν σε ΑΜΚ με συνθετικού τύπου μεμβράνες, οι οποίες θεωρούνται περισσότερο βιοσυμβατές από τις πρώτες. Πρέπει να σημειωθεί ότι όλες οι συνθετικού τύπου μεμβράνες ήταν του τύπου της χαμηλής ροής (low-flux). Οι ασθενείς υποβάλλονταν σε ΑΜΚ με τον ίδιο τύπο μεμβράνης για τουλάχιστον έξι μήνες. Οι δύο ομάδες των ασθενών δεν διέφεραν σημαντικά όσον αφορά τα κλινικά χαρακτηριστικά, τις τιμές των λιπιδαιμικών παραμέτρων ή τις ενεργότητες της PON1, της ολικής PAF-AH και της HDL-PAF AH.

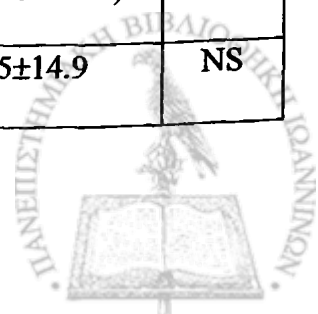
Σε 35 ασθενείς που υποβάλλονταν σε ΑΜΚ με κυτταρινικού τύπου μεμβράνες και σε 40 ασθενείς που υποβάλλονταν σε ΑΜΚ με συνθετικού τύπου μεμβράνες προσδιορίστηκαν οι τιμές των λιπιδαιμικών παραμέτρων και οι ενεργότητες των ενζύμων πριν την έναρξη μίας συνεδρίας ΑΜΚ (πριν-ΑΜΚ), καθώς και 5 min μετά το τέλος της συνεδρίας ΑΜΚ (μετά-ΑΜΚ). Πρέπει να σημειωθεί ότι όλες οι μετά-ΑΜΚ τιμές διορθώθηκαν για το βαθμό της αιμοσυμπύκνωσης με βάση τις μεταβολές των ολικών λευκωμάτων του ορού.

Όπως φαίνεται στους πίνακες 35 και 36 δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές μεταβολές στις τιμές των λιπιδαιμικών παραμέτρων του ορού, καθώς και στις ενεργότητες της PON1 (paraoxon), PON1 (phenylacetate) και της ολικής PAF-AH του ορού κατά τη διάρκεια της ΑΜΚ σε καμία από τις δύο ομάδες των ασθενών. Εντούτοις, παρατηρήθηκε μία σημαντική αύξηση της ενεργότητας της HDL-PAF AH κατά τη διάρκεια μίας συνεδρίας ΑΜΚ και στις δύο ομάδες των ασθενών. Η αύξηση αυτή παρέμενε σημαντική και μετά από τη διόρθωση της ενεργότητας της HDL-PAF AH για τα επίπεδα της HDL χοληστερόλης (σχήματα 62 και 63). Αξίζει, τέλος, να σημειωθεί ότι αυτή η αύξηση της διορθωμένης ενεργότητας της HDL-PAF AH ήταν μεγαλύτερη στους ασθενείς που υποβάλλονταν σε ΑΜΚ με συνθετικού τύπου μεμβράνες (+50%) σε σύγκριση με τους ασθενείς που υποβάλλονταν σε ΑΜΚ με κυτταρινικού τύπου μεμβράνες (+38%, $p=0.01$ για τη σύγκριση της ποσοστιαίας αύξησης της ενεργότητας της HDL-PAF AH μεταξύ των δύο ομάδων)⁴³⁸.



Πίνακας 34. Κλινικά και εργαστηριακά χαρακτηριστικά των ασθενών που υποβάλλονταν σε ΑΜΚ ανάλογα με τον τύπο της μεμβράνης του φίλτρου που χρησιμοποιήθηκε

	Κυτταρινικού τύπου μεμβράνη (n=202)	Συνθετικού τύπου μεμβράνη (n=99)	p
Ηλικία (έτη)	62.5±15.4	62.4±13.7	NS
Φύλο (Α/Γ)	117/85	51/48	NS
Κάπνισμα (Ν/Ο)	61/141	43/56	NS
BMI (Kg/m ²)	24.2±2.9	24.1±2.5	NS
Γλυκόζη νηστείας ορού (mg/dl)	90.1±21.2	89.9±16.2	NS
Χρόνος ΑΜΚ (μήνες)	58.0±37.9	62.1±60.9	NS
T-CHOL (mg/dl)	179.3±42.1	172.4±38.9	NS
TRG (mg/dl)	185.4±76.2	179.3±118.0	NS
HDL-C (mg/dl)	36.1±11.3	35.9±7.7	NS
LDL-C (mg/dl)	105.2±39.2	103.9±33.2	NS
non HDL-C (mg/dl)	139.3±44.8	138.8±40.1	NS
ApoAI (mg/dl)	119.7±22.1	118.8±16.3	NS
ApoB (mg/dl)	87.9±28.1	86.7±29.8	NS
ApoE (mg/L)	41.2±20.2	40.9±12.1	NS
Lp(a) (mg/dl)	12.3(3-171)	11.9(3-156)	NS
PON1(paraoxon) (U/L)	57(25-271)	49(25-256)	NS
PON1(paraoxon)/ApoAI (U/mg)	0.06(0.02-0.23)	0.05(0.02-0.19)	NS
PON1(phenylacetate) (U/ml)	63.2±15.9	60.5±14.9	NS



PONI(phenylacetate)/ApoAI (U/mg)	55.0±14.6	52.7±14.5	NS
Ολική PAF-AH (nmol/ml ορού/min)	70.1±25.3	69.2±21.4	NS
Ολική PAF-AH/ApoB (nmol/mg/min)	82.9±21.8	84.1±31.0	NS
HDL-PAF AH (nmol/ml ορού/min)	5.6±5.4	5.8±4.0	NS
HDL-PAF AH/HDL-C (nmol/mg/min)	16.0±12.8	16.2±9.4	NS
HDL-PAF AH/ολική PAF-AH	0.08±0.06	0.09±0.07	NS

NS; Μη σημαντική στατιστικά διαφορά, T-CHOL; Ολική χοληστερόλη, LDL-C; LDL χοληστερόλη, HDL-C; HDL χοληστερόλη, non HDL-C; non HDL χοληστερόλη, TRG; Τριγλυκερίδια, Apo; Αποπρωτεΐνη, Lp(a); Λιποπρωτεΐνη (α), AMK; Αιμοκάθαρση, A; Άνδρες, Γ; Γυναίκες, N; Ναι, O; Όχι.

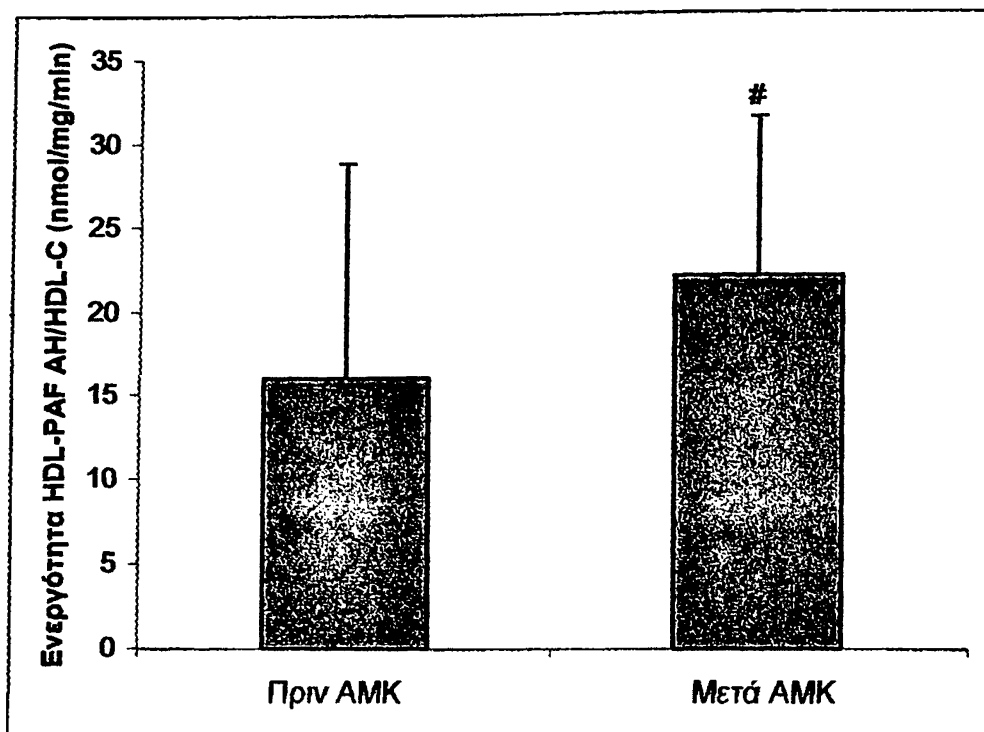


Πίνακας 35. Μεταβολές των λιπιδαιμικών παραμέτρων και των ενεργοτήτων των ενζύμων κατά τη διάρκεια μίας συνεδρίας AMK στους ασθενείς που υποβάλλονταν σε AMK με κυτταρινικού τύπου μεμβράνες (N=35)

	Πριν-AMK	Μετά-AMK	p
T-CHOL (mg/dl)	179.3±42.1	175.4±36.9	NS
TRG (mg/dl)	185.4±76.2	176.3±70.0	NS
HDL-C (mg/dl)	36.1±11.3	37.9±8.3	NS
LDL-C (mg/dl)	105.2±39.2	104.9±23.2	NS
PON1(paraoxon) (U/L)	57(25-271)	59(25-256)	NS
PON1(paraoxon)/HDL-C (U/mg)	0.21(0.05-1.08)	0.23(0.05-1.19)	NS
PON1(phenylacetate) (U/ml)	63.2±15.9	65.5±17.9	NS
PON1(phenylacetate)/HDL-C (U/mg)	183.5±60.6	185.7±62.3	NS
Ολική PAF-AH (nmol/ml ορού/min)	70.1±25.3	69.7±23.4	NS
Ολική PAF-AH/LDL-C (nmol/mg/min)	73.9±27.8	73.1±31.0	NS
HDL-PAF AH (nmol/ml ορού/min)	5.6±5.4	7.3±4.0	0.01
HDL-PAF AH/HDL-C (nmol/mg/min)	16.0±12.8	22.0±9.4	0.01

NS; Μη σημαντική στατιστικά διαφορά, T-CHOL; Ολική χοληστερόλη, LDL-C; LDL χοληστερόλη, HDL-C; HDL χοληστερόλη. AMK; Αιμοκάθαρση. Όλες οι μετά-AMK τιμές έχουν διορθωθεί για το βαθμό της αιμοσυνμπύκνωσης με βάση τη μεταβολή της συγκέντρωσης των ολικών λευκωμάτων.





Σχήμα 62. Μεταβολές της διορθωμένης για τα επίπεδα της HDL-C ενεργότητας της HDL-PAF AH κατά τη διάρκεια μίας συνεδρίας AMK σε ασθενείς που υποβάλλονταν σε AMK με κυτταρινικού τύπου μεμβράνη

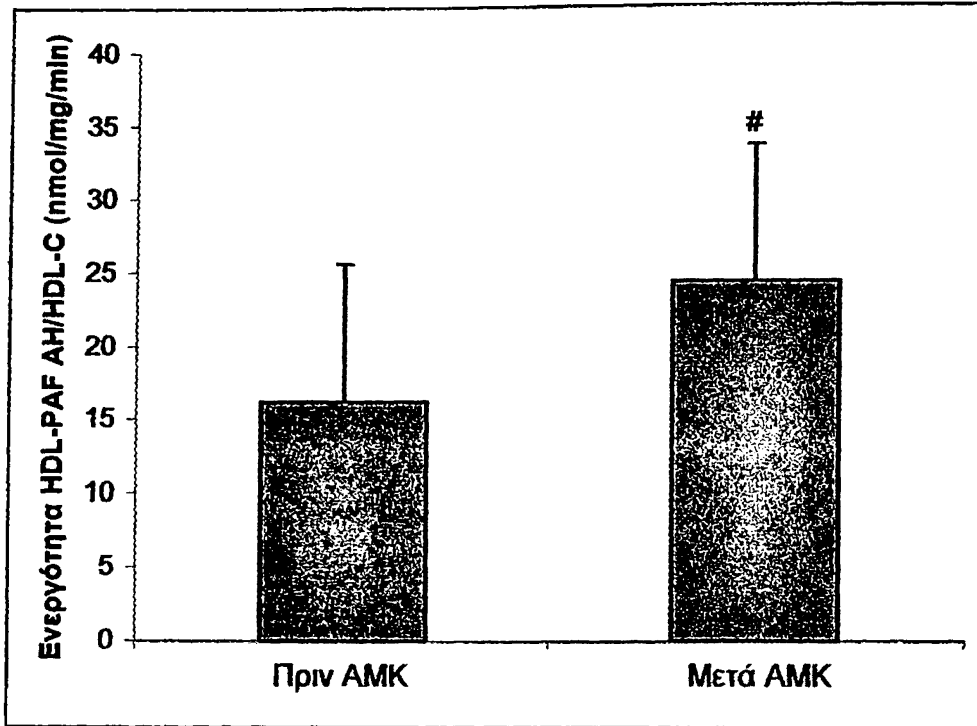
HDL-C; HDL χοληστερόλη, AMK; Αιμοκάθαρση. Όλες οι μετά-AMK τιμές έχουν διορθωθεί για το βαθμό της αιμοσυμπύκνωσης με βάση τη μεταβολή της συγκέντρωσης των ολικών λευκωμάτων. # $p=0.01$

Πίνακας 36. Μεταβολές των λιπιδαιμικών παραμέτρων και των ενεργιοτήτων των ενζύμων κατά τη διάρκεια μίας συνεδρίας AMK στους ασθενείς που υποβάλλονταν σε AMK με συνθετικού τύπου μεμβράνες (N=40)

	Πριν-AMK	Μετά-AMK	p
T-CHOL (mg/dl)	172.4±38.9	171.1±37.8	NS
TRG (mg/dl)	179.3±118.0	169.2±99.3	NS
HDL-C (mg/dl)	35.9±7.7	36.1±7.6	NS
LDL-C (mg/dl)	103.9±33.2	104.1±33.1	NS
PON1(paraoxon) (U/L)	49(25-256)	51(25-156)	NS
PON1(paraoxon)/HDL-C (U/mg)	0.18(0.05-0.95)	0.20(0.05-0.98)	NS
PON1(phenylacetate) (U/ml)	60.5±14.9	62.3±13.8	NS
PON1(phenylacetate)/HDL-C (U/mg)	180.1±62.3	182.3±61.8	NS
Ολική PAF-AH (nmol/ml ορού/min)	69.2±21.4	66.3±22.4	NS
Ολική PAF-AH/LDL-C (nmol/mg/min)	71.9±30.0	68.9±23.3	NS
HDL-PAF AH (nmol/ml ορού/min)	5.8±4.0	8.4±4.2	0.001
HDL-PAF AH/HDL-C (nmol/mg/min)	16.2±9.4	24.3±9.3	0.000

NS; Μη σημαντική στατιστικά διαφορά, T-CHOL; Ολική χοληστερόλη, LDL-C; LDL χοληστερόλη, HDL-C; HDL χοληστερόλη, non HDL-C; non HDL χοληστερόλη, TRG; Τριγλυκερίδια, Apo; Αποπρωτεΐνη, Lp(a); Λιποπρωτεΐνη (α), AMK; Αιμοκάθαρση. Όλες οι μετά-AMK τιμές έχουν διορθωθεί για το βαθμό της αιμοσυμπύκνωσης με βάση τη μεταβολή της συγκέντρωσης των ολικών λευκωμάτων.





Σχήμα 63. Μεταβολές της διορθωμένης για τα επίπεδα της HDL-C ενεργότητας της HDL-PAF AH κατά τη διάρκεια μίας συνεδρίας AMK σε ασθενείς που υποβάλλονταν σε AMK με συνθετικού τύπου μεμβράνη

HDL-C; HDL χοληστερόλη, AMK; Αιμοκάθαρση. Όλες οι μετά-AMK τιμές έχουν διορθωθεί για το βαθμό της αιμοσυμπύκνωσης με βάση τη μεταβολή της συγκέντρωσης των ολικών λευκωμάτων. # $p=0.001$

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 9^ο

ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

9.1. ΛΙΠΙΔΑΙΜΙΚΟ ΠΡΟΦΙΛ ΤΩΝ ΑΤΟΜΩΝ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Σε απόλυτη συμφωνία με τα δεδομένα της βιβλιογραφίας^{1,2}, οι ασθενείς με χρόνια νεφρική ανεπάρκεια (ΧΝΑ) είχαν χαμηλότερα επίπεδα HDL χοληστερόλης και ApoA1 και υψηλότερα επίπεδα τριγλυκεριδίων και Lp(a) σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου (πίνακας 7). Επιπρόσθετα, οι ασθενείς που υποβάλλονταν σε συνεχή φορητή περιτοναϊκή κάθαρση (ΣΦΠΚ) εμφάνιζαν ένα περισσότερο αθηρογόνο λιπιδαιμικό προφίλ [αυξημένα επίπεδα ολικής χοληστερόλης, LDL χοληστερόλης, non HDL χοληστερόλης, ApoB και Lp(a)] σε σύγκριση με τους ασθενείς που υποβάλλονταν σε αιμοκάθαρση (ΑΜΚ), μία διαπίστωση που επίσης συμφωνεί με τα αποτελέσματα παλαιότερων μελετών^{6,7,20}. Αξίζει να σημειωθεί ότι οι ασθενείς που υποβάλλονταν σε ΑΜΚ είχαν χαμηλότερα επίπεδα ολικής χοληστερόλης, LDL χοληστερόλης, non HDL χοληστερόλης και ApoB σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου και τους ασθενείς με προτελικού σταδίου χρόνια νεφρική ανεπάρκεια (ΠΤΧΝΑ), παρά το γεγονός ότι κανείς από αυτούς τους ασθενείς δεν έπαιρνε υπολιπιδαιμική φαρμακοθεραπεία.

Τέλος, ένα πολύ ενδιαφέρον εύρημα της μελέτης μας ήταν η ανεύρεση αυξημένων επιπέδων της ApoE στον ορό στους ασθενείς με ΧΝΑ (και ιδιαίτερα στους ασθενείς που υποβάλλονταν σε ΣΦΠΚ) σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου (σχήμα 38), μία παρατήρηση στην οποία δεν έχει δοθεί ιδιαίτερη έμφαση στη βιβλιογραφία⁶. Οι λόγοι για αυτή την αύξηση των επιπέδων της ApoE στους ασθενείς με ΧΝΑ δεν είναι γνωστοί. Ωστόσο, υπάρχουν ενδείξεις ότι ο φυσιολογικός νεφρός συμμετέχει στην απομάκρυνση από το πλάσμα της ελεύθερης ApoE¹⁶⁷. Επιπρόσθετα, η αυξημένη ηπατική παραγωγή πρωτεϊνών και ενδεχόμενα και της ApoE εξαιτίας της σημαντικής απώλειας λευκωμάτων από την περιτοναϊκή μεμβράνη κατά τη διάρκεια της ΣΦΠΚ θα μπορούσε να εξηγήσει τα ιδιαίτερα αυξημένα επίπεδα της ApoE στον ορό των ασθενών που υποβάλλονται σε ΣΦΠΚ⁴³⁹. Πρέπει να αναφερθεί ότι τα αυξημένα επίπεδα της ApoE πιθανά διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην παθοφυσιολογία της ουραμικής δυσλιπιδαιμίας (κεφάλαιο 9.4.1).



9.2. ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΑΡΟΕ ΣΤΙΣ ΛΙΠΙΔΑΙΜΙΚΕΣ ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΥΣ ΤΟΥ ΟΡΟΥ ΤΩΝ ΥΓΙΩΝ ΑΤΟΜΩΝ

Η παρούσα μελέτη ήταν η πρώτη που εξέτασε την επίδραση των πολυμορφισμών της ΑροΕ στις λιπιδαιμικές παραμέτρους του ορού σε Ελληνικό πληθυσμό. Δύο παλαιότερες εργασίες μελέτησαν τη συχνότητα των αλληλίων της ΑροΕ σε άτομα Ελληνικής καταγωγής (πίνακας 37). Στην πρώτη από αυτές τις μελέτες διαπιστώθηκε μία ελαττωμένη συχνότητα του αλληλίου ε4 σε εθελοντές αιμοδότες σε σύγκριση με τη συχνότητα που έχει αναφερθεί σε άλλες Ευρωπαϊκές χώρες⁴⁴⁰, ενώ στη δεύτερη μελέτη η συχνότητα του αλληλίου ε4 ήταν 10.2% στα υγιή άτομα⁴⁴¹, μία συχνότητα που είναι παρόμοια με αυτή που έχει αναφερθεί σε άλλες χώρες της Νότιας Ευρώπης⁴⁴². Η συχνότητα του αλληλίου ε4 στη δική μας μελέτη ήταν 14.0%, ήταν δηλαδή μεγαλύτερη από τη συχνότητα που έχει αναφερθεί στις προηγούμενες δύο εργασίες⁴³⁴. Αυτή η διαφορά μπορεί πιθανά να αποδοθεί στο γεγονός ότι ο πληθυσμός της δικής μας μελέτης κατάγεται από τη βορειοδυτική Ελλάδα, μία περιοχή που μέχρι πρόσφατα ήταν γεωγραφικά απομονωμένη.

Πίνακας 37. Συχνότητες των αλληλίων της ΑροΕ στον Ελληνικό πληθυσμό

	Αλληλίο ε2 (%)	Αλληλίο ε3 (%)	Αλληλίο ε4 (%)	Αριθμός ατόμων
Σκλαβούνου και συν, 1997 ⁴⁴⁰	5.3	88.2	6.5	216
Κολοβού και συν, 2002 ⁴⁴¹	8.1	81.7	10.2	240
Λυμπερόπουλος και συν (παρούσα μελέτη), 2004 ⁴³⁴	5.7	80.3	14.0	290

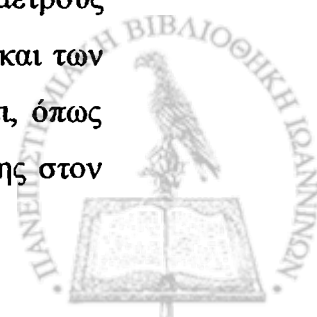
Τα κύρια ευρήματα της δικής μας μελέτης συνοψίζονται στον πίνακα 8. Τα άτομα με το αλληλίο ε2 είχαν χαμηλότερα επίπεδα ολικής χοληστερόλης, LDL χοληστερόλης, non HDL χοληστερόλης και ΑροΒ, καθώς και υψηλότερα επίπεδα τριγλυκεριδίων και ΑροΕ σε σύγκριση με τα άτομα που είχαν το αλληλίο ε3 ή το αλληλίο ε4. Αντίθετα, η παρουσία του αλληλίου ε4 συσχετιζόταν με αυξημένα επίπεδα ολικής χοληστερόλης, LDL χοληστερόλης, non HDL χοληστερόλης και ΑροΒ, καθώς και με χαμηλότερα επίπεδα ΑροΕ σε σύγκριση με τα άτομα που είχαν το αλληλίο ε3 ή το αλληλίο ε2, ενώ τα τριγλυκερίδια του ορού δεν διέφεραν σε σύγκριση με τα άτομα που είχαν το αλληλίο

ε3. Επιπρόσθετα, η επίδραση των πολυμορφισμών της ApoE στις λιπιδαιμικές παραμέτρους ήταν ανεξάρτητη από την επίδραση άλλων γνωστών παραγόντων (πίνακας 9).

Πολλές μελέτες έδειξαν παρόμοια αποτελέσματα όσον αφορά τη συσχέτιση των αλληλίων ε2 και ε4 με τα επίπεδα της ολικής χοληστερόλης, της LDL χοληστερόλης, της ApoB και της ApoE στο γενικό πληθυσμό, εξαιτίας της διαφορετικής ικανότητας σύνδεσης των αντίστοιχων ισομορφών της ApoE με τους υποδοχείς της στα ηπατοκύτταρα (κεφάλαιο 3.7.2)^{443,444,445,446,447}. Ωστόσο, οι μελέτες που εξέτασαν την επίδραση των πολυμορφισμών της ApoE στα επίπεδα των τριγλυκεριδίων έδειξαν αντικρουόμενα αποτελέσματα. Σε μία μεταανάλυση πολλών μελετών, τα αλλήλια ε2 και ε4 συσχετίστηκαν με αυξημένα επίπεδα τριγλυκεριδίων σε σύγκριση με το αλλήλιο ε3⁶⁰, ενώ στην παρούσα μελέτη μόνο το αλλήλιο ε2 συσχετίστηκε με αυξημένα επίπεδα τριγλυκεριδίων. Αυτή η αύξηση των τριγλυκεριδίων στα άτομα που έχουν το αλλήλιο ε2 πιθανά οφείλεται στην ελαττωμένη διαμέσου των ηπατικών υποδοχέων κάθαρση των πλούσιων σε τριγλυκερίδια λιποπρωτεϊνών, εξαιτίας της μειωμένης ικανότητας σύνδεσης της ApoE2 με αυτούς τους υποδοχείς.

Αντικρουόμενα, επίσης, είναι και τα δεδομένα της βιβλιογραφίας όσον αφορά την επίδραση των πολυμορφισμών της ApoE στα επίπεδα της HDL χοληστερόλης ή της ApoA1. Ορισμένες μελέτες έδειξαν ότι το αλλήλιο ε4 συσχετίζεται με χαμηλότερα επίπεδα HDL χοληστερόλης σε σύγκριση με τα αλλήλια ε3 και ε2^{60,448,449}, ενώ στην παρούσα μελέτη αφενός μεν τα επίπεδα της HDL χοληστερόλης δεν συσχετίζονταν με τους πολυμορφισμούς της ApoE και αφετέρου τα επίπεδα της ApoA1 ήταν χαμηλότερα στα άτομα που είχαν το αλλήλιο ε2 ή το αλλήλιο ε4 σε σύγκριση με τα άτομα που είχαν το αλλήλιο ε3. Τέλος, τα επίπεδα της Lp(a) δεν συσχετίζονταν με τους πολυμορφισμούς της ApoE στην παρούσα μελέτη και σε πολλές άλλες μελέτες⁴⁵⁰, παρά τα ευρήματα μίας παλαιότερης εργασίας που έδειξε ότι τα επίπεδα της Lp(a) ήταν αυξημένα στα άτομα που είχαν το αλλήλιο ε4 σε σύγκριση με τα άτομα που είχαν το αλλήλιο ε3 ή το αλλήλιο ε2⁶¹.

Επιπρόσθετα, στη μελέτη μας εκτιμήθηκε η επίδραση των συγκεντρώσεων της ApoE στο λιπιδαιμικό προφίλ των υγιών ατόμων, καθώς και η επίδραση του συνδυασμού των πολυμορφισμών και των συγκεντρώσεων της ApoE στις λιπιδαιμικές παραμέτρους (πίνακας 10). Η συνεκτίμηση της ταυτόχρονης επίδρασης των πολυμορφισμών και των συγκεντρώσεων της ApoE στο λιπιδαιμικό προφίλ κρίνεται επιβεβλημένη διότι, όπως αναφέρθηκε, οι πολυμορφισμοί της ApoE επηρεάζουν σημαντικά τα επίπεδά της στον



ορό. Έτσι, η επίδραση των πολυμορφισμών της ApoE στο λιπιδαιμικό προφίλ των ατόμων θα μπορούσε να συγχέεται ή να αποκρύπτεται από τα επίπεδά της στον ορό. Τα αποτελέσματα της μελέτης μας έδειξαν ότι η επίδραση των πολυμορφισμών της ApoE στις λιπιδαιμικές παραμέτρους αποκτά μεγαλύτερη στατιστική σημαντικότητα, ενώ ο συνδυασμός της συγκέντρωσης και των πολυμορφισμών της ApoE εξηγεί ένα μεγαλύτερο ποσοστό της μεταβλητότητας των λιπιδαιμικών παραμέτρων σε σύγκριση με την επίδραση μόνο των πολυμορφισμών της ApoE (από 3.8% σε 24.3% για τα επίπεδα της ολικής χοληστερόλης, από 22.9% σε 43.1% για τα επίπεδα των τριγλυκεριδίων, από 3% σε 20.5% για τα επίπεδα της LDL χοληστερόλης και από 6% σε 26.3% για τα επίπεδα της ApoB). Τέλος, η συγκέντρωση της ApoE συσχετίζεται θετικά με τις λιπιδαιμικές παραμέτρους του ορού [εκτός από τα επίπεδα της HDL χοληστερόλης και της Lp(a)].

Τα παραπάνω ευρήματα είναι σύμφωνα με τα αποτελέσματα μελετών σε άλλους πληθυσμούς. Έτσι, στη μελέτη του Stanislas βρέθηκε ότι τα επίπεδα της ApoE καθόριζαν το 34.6% της μεταβλητότητας των τριγλυκεριδίων⁷³, ενώ σε μία άλλη μελέτη η συγκέντρωση της ApoE επηρέαζε σημαντικά τα επίπεδα της ολικής χοληστερόλης, των τριγλυκεριδίων, καθώς και των αποπρωτεϊνών B και AI, ανεξάρτητα από τους γενετικούς πολυμορφισμούς της ApoE⁷⁴. Επιπρόσθετα, σε μία άλλη μελέτη ο συνδυασμός της συγκέντρωσης και των πολυμορφισμών της ApoE μπορούσε να εξηγήσει ένα σημαντικά υψηλότερο ποσοστό της μεταβλητότητας της ολικής χοληστερόλης και των τριγλυκεριδίων από ό,τι μπορούσαν να εξηγήσουν μόνο οι πολυμορφισμοί της ApoE⁷⁵. Στη μελέτη μας σε Ελληνικό πληθυσμό ο συνδυασμός της συγκέντρωσης και των πολυμορφισμών της ApoE μπορούσε να εξηγήσει ένα σημαντικά υψηλότερο ποσοστό της μεταβλητότητας όχι μόνο της ολικής χοληστερόλης και των τριγλυκεριδίων, αλλά και της LDL χοληστερόλης, της ApoA I και της ApoB από ό,τι μπορούσαν να εξηγήσουν μόνο οι πολυμορφισμοί της ApoE⁴³⁴. Η επίδραση της συγκέντρωσης της ApoE στα επίπεδα των λιπιδαιμικών παραμέτρων οφείλεται στο γεγονός ότι η ApoE επηρεάζει την παραγωγή και τον καταβολισμό των πλούσιων σε τριγλυκερίδια λιποπρωτεϊνών και μάλιστα κατά τρόπο ανεξάρτητο από τους γονιδιακούς της πολυμορφισμούς (κεφάλαιο 3.8.1, σχήμα 15).

Συμπερασματικά, περιβαλλοντικοί παράγοντες, όπως η καταγωγή του υπό μελέτη πληθυσμού, αλλά και τα διαφορετικά επίπεδα της ApoE στον ορό μπορούν να τροποποιήσουν την επίδραση των πολυμορφισμών της ApoE στο λιπιδαιμικό προφίλ και



επομένως να ερμηνεύσουν τα πολλές φορές αντικρουόμενα αποτελέσματα των διαφόρων μελετών.

9.3. ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΩΝ ΤΗΣ ΑΡΟΕ ΣΤΗ ΝΕΦΡΙΚΗ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΤΩΝ ΥΓΙΩΝ ΑΤΟΜΩΝ

Στην παρούσα μελέτη εξετάσθηκε για πρώτη φορά στη βιβλιογραφία η επίδραση των πολυμορφισμών της ΑροΕ στη νεφρική λειτουργία των υγιών ατόμων⁴³⁵. Τα αποτελέσματα της μελέτης μας έδειξαν ότι η παρουσία του αλληλίου ε2 συσχετιζονταν με υψηλότερες τιμές κρεατινίνης του ορού και χαμηλότερες τιμές προβλεπόμενου ρυθμού σπειραματικής διήθησης (όπως αυτή εκτιμήθηκε από την εξίσωση MDRD, κεφάλαιο 7.2.6) σε σύγκριση με το αλληλίο ε3 ή το αλληλίο ε4 (πίνακας 11). Οι παραπάνω διαφορές παρέμεναν στατιστικά σημαντικές και μετά από τη διόρθωση των επιπέδων της κρεατινίνης του ορού και του προβλεπόμενου ρυθμού σπειραματικής διήθησης για την ηλικία και το δείκτη μάζας σώματος και στα δύο φύλα (πίνακας 12 και σχήματα 39-40).

Σε μία παλαιότερη μελέτη εκτιμήθηκε η επίδραση των πολυμορφισμών της ΑροΕ στα επίπεδα της κρεατινίνης του ορού. Η μελέτη αυτή δεν έδειξε διαφορές στα προεγχειρητικά επίπεδα της κρεατινίνης του ορού ασθενών που επρόκειτο να υποβληθούν σε εγχείρηση αορτοστεφανιαίας παράκαμψης¹⁵⁷. Ωστόσο, ο πληθυσμός αυτής της μελέτης αποτελούνταν από ασθενείς με στεφανιαία νόσο και σακχαρώδη διαβήτη, ενώ δεν υπήρχε καμία αναφορά για την επίπτωση της υπέρτασης και της δυσλιπιδαιμίας σε αυτούς τους ασθενείς. Επιπρόσθετα, η παρουσία του αλληλίου ε2 συσχετιζονταν με ελαττωμένη κάθαρση κρεατινίνης σε ασθενείς με διαβήτη τύπου Ι σε σύγκριση με τα αλληλία ε3 και ε4, αλλά αυτή η συσχέτιση δεν παρατηρήθηκε σε ασθενείς με διαβήτη τύπου ΙΙ¹¹⁴. Τέλος, το αλληλίο ε4 έχει συσχετισθεί με υψηλότερη κάθαρση κρεατινίνης σε ασθενείς που υποβλήθηκαν σε μεταμόσχευση νεφρού σε σύγκριση με τα άλλα δύο αλληλία¹⁰⁴.

Τα αποτελέσματα της μελέτης μας υποδηλώνουν ότι το αλληλίο ε2 πιθανά ασκεί δυσμενή επίδραση στη νεφρική λειτουργία. Αυτή η παρατήρηση βρίσκεται σε συμφωνία με την προαναφερθείσα μελέτη σε ασθενείς με διαβήτη τύπου Ι¹¹⁴, καθώς και με μελέτες που έδειξαν ότι το αλληλίο ε2 αποτελεί παράγοντα κινδύνου για την εμφάνιση και την εξέλιξη της νεφρικής νόσου σε ασθενείς με διαβήτη τύπου Ι^{112,113,114}, σε ασθενείς με διαβήτη τύπου ΙΙ^{120,121,122,123,124}, σε ασθενείς με IgA νεφροπάθεια⁸⁸, σε παιδιά με



νεφρωσικό σύνδρομο¹⁴⁹, σε ασθενείς με πρωτεϊνουρική σπειραματονεφρίτιδα¹⁰⁰ και σε ασθενείς με διάφορα νεφρικά νοσήματα⁹⁰. Ωστόσο, τα παραπάνω ευρήματα δεν επιβεβαιώθηκαν από άλλες μελέτες (πίνακας 5)⁸³.

Τα άτομα που είχαν το αλλήλιο ε4 στη μελέτη μας εμφάνιζαν χαμηλότερες τιμές κρεατινίνης του ορού και υψηλότερες τιμές προβλεπόμενου ρυθμού σπειραματικής διήθησης σε σύγκριση με τα άτομα που είχαν το αλλήλιο ε3, αν και αυτές οι διαφορές δεν ήταν στατιστικά σημαντικές (κεφάλαιο 8.3). Αυτά τα δεδομένα πιθανά υποδηλώνουν μία ευεργετική δράση για τη νεφρική λειτουργία του αλληλίου ε4 και είναι συμβατά με τα αποτελέσματα παλαιότερων μελετών που έδειξαν ότι το αλλήλιο ε4 προστατεύει από την εμφάνιση και εξέλιξη της διαβητικής νεφροπάθειας σε ασθενείς με διαβήτη τύπου II^{120,126} και από την εμφάνιση μετεγχειρητικής οξείας νεφρικής ανεπάρκειας σε ασθενείς που υποβλήθηκαν σε εγχείρηση αορτοστεφανιαίας παράκαμψης¹⁵⁷, καθώς και με τα αποτελέσματα μίας μελέτης που έδειξε ότι το αλλήλιο ε4 συσχετίζονταν με υψηλότερη κάθαρση κρεατινίνης σε ασθενείς που υποβλήθηκαν σε μεταμόσχευση νεφρού σε σύγκριση με τα άλλα δύο αλλήλια¹⁰⁴. Επιπρόσθετα, η μειωμένη επίπτωση του αλληλίου ε4 στους ασθενείς με τελικό στάδιο χρόνιας νεφρικής ανεπάρκειας (ΤΣΧΝΑ) στη μελέτη μας σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου (πίνακας 13) μπορεί επίσης να συσχετίζεται με την πιθανή νεφροπροστατευτική δράση αυτού του αλληλίου (κεφάλαιο 9.4). Ωστόσο, άλλες μελέτες έδειξαν ότι το αλλήλιο ε4 αποτελεί παράγοντα κινδύνου για την εξέλιξη της νεφρικής νόσου σε ασθενείς με διαβητική νεφροπάθεια¹²⁷, σε ασθενείς με νεφρωσικό σύνδρομο^{89,91,93} και σε ασθενείς με χρόνια νεφρική ανεπάρκεια που οδηγούνται σε μεταμόσχευση νεφρού⁹².

Οι υποκείμενοι παθοφυσιολογικοί μηχανισμοί που μπορούν να ερμηνεύσουν τη συσχέτιση του αλληλίου ε2 με μειωμένο προβλεπόμενο ρυθμό σπειραματικής διήθησης και αυξημένη κρεατινίνη ορού στο γενικό πληθυσμό δεν είναι γνωστοί. Στη μελέτη μας το αλλήλιο ε2 συσχετίζονταν με αυξημένα επίπεδα τριγλυκεριδίων (κεφάλαιο 9.2) και επομένως με αυξημένα επίπεδα των πλούσιων σε τριγλυκερίδια λιποπρωτεϊνών. Αυτή η αύξηση των επιπέδων των πλούσιων σε τριγλυκερίδια λιποπρωτεϊνών θα μπορούσε να οδηγήσει σε συσσώρευση εστέρων χοληστερόλης στα μεσαγγειακά κύτταρα του νεφρού, με αποτέλεσμα τη μεταβολή των ιδιοτήτων της μεσοκυττάριας ουσίας και την εμφάνιση σπειραματοσκλήρυνσης. Πραγματικά, οι πλούσιες σε τριγλυκερίδια λιποπρωτεΐνες διαβητικών ασθενών που έχουν το αλλήλιο ε2 προκαλούν μεγαλύτερη συσσώρευση εστέρων χοληστερόλης στα μεσαγγειακά κύτταρα του νεφρού σε σύγκριση με τις λιποπρωτεΐνες διαβητικών ασθενών που έχουν το αλλήλιο ε3¹²⁰. Επιπρόσθετα, η

υπερλιποπρωτεΐναιμία τύπου III που συσχετίζεται με το γονότυπο ApoE2/2 μπορεί να οδηγήσει σε σπειραματική λιπίδωση^{96,97,98,99}. Αντίθετα, η ισομορφή ApoE4 συσχετίζεται με μειωμένα επίπεδα των πλούσιων σε τριγλυκερίδια λιποπρωτεϊνών και επομένως με μικρότερη νεφρική βλάβη¹²⁶. Τέλος, σε μία μεγάλη πληθυσμιακή μελέτη τα αυξημένα επίπεδα των τριγλυκεριδίων αποτελούσαν ανεξάρτητο παράγοντα κινδύνου για την εμφάνιση νεφρικής δυσλειτουργίας⁴⁵¹. Είναι, επομένως, πολύ πιθανό η συσχέτιση μεταξύ της συγκέντρωσης των τριγλυκεριδίων και της νεφρικής δυσλειτουργίας να μπορεί να εξηγηθεί από την επίδραση των γονιδιακών πολυμορφισμών της ApoE στο μεταβολισμό των πλούσιων σε τριγλυκερίδια λιποπρωτεϊνών.

Όπως έχει ήδη περιγραφεί, η ApoE ασκεί σημαντική νεφροπροστατευτική δράση τοπικά στο μικροπεριβάλλον του νεφρού (κεφάλαιο 4.8.5). Συγκεκριμένα, η ApoE παρεμποδίζει την υπερπλασία των μεσαγγειακών κυττάρων που επάγεται από κυτταροκίνες ή από την LDL και αυτή η δράση εξαρτάται από την ισομορφή της ApoE: οι ισομορφές ApoE3 και ApoE4 είναι οι πιο αποτελεσματικές, ενώ η ισομορφή ApoE2 είναι λιγότερο δραστική¹²⁸. Πρέπει επιπρόσθετα να σημειωθεί ότι η ισομορφή ApoE2 δεν έχει σημαντική αντι-υπερπλαστική δράση στις λείες μυϊκές ίνες σε αντίθεση με τις άλλες δύο ισομορφές¹⁶². Επομένως, η αδυναμία της ισομορφής ApoE2 να εμποδίσει τον πολλαπλασιασμό των μεσαγγειακών κυττάρων μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα την εμφάνιση μεσαγγειακής υπερπλασίας, η οποία οδηγεί σε στένωση του αυλού του σπειράματος και τελικά σε μείωση του ρυθμού σπειραματικής διήθησης.

Μία τρίτη πιθανή εξήγηση της δυσμενούς επίδρασης της ApoE2 στη νεφρική λειτουργία θα μπορούσε να είναι η παρουσία κάποιου άλλου γονιδίου κοντά στο γονίδιο της ApoE που επηρεάζει τη νεφρική λειτουργία και το οποίο είναι γενετικά συνδεδεμένο (linkage disequilibrium) με το γονίδιο της ApoE. Ωστόσο, αυτή η υπόθεση έχει μερικά απορριφθεί από μία εργασία που εξέτασε την επίδραση των πολυμορφισμών της ApoE στην εμφάνιση της διαβητικής νεφροπάθειας και η οποία στηρίχθηκε στη μελέτη του τρόπου κληρονομικής μετάδοσης των αλληλίων της ApoE από τους γονείς στους απογόνους που έπασχαν από διαβητική νεφροπάθεια (transmission/disequilibrium test, TDT)¹¹².



9.4. ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΤΗΣ ΕΠΙΠΤΩΣΗΣ ΤΩΝ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΩΝ ΤΗΣ ΑΡΟΕ ΜΕΤΑΞΥ ΤΩΝ ΑΣΘΕΝΩΝ ΜΕ ΤΕΛΙΚΟΥ ΣΤΑΔΙΟΥ ΧΝΑ (ΣΤΑΔΙΟ V) ΚΑΙ ΤΩΝ ΥΓΙΩΝ ΑΤΟΜΩΝ

Στην παρούσα μελέτη εξετάστηκε για πρώτη φορά σε Ελληνικό πληθυσμό η επίπτωση των πολυμορφισμών της ΑροΕ στους ασθενείς με τελικό στάδιο χρόνιας νεφρικής ανεπάρκειας (ΤΣΧΝΑ, δηλαδή το σύνολο των ασθενών που υποβάλλονταν σε ΑΜΚ και ΣΦΠΚ). Τα δεδομένα που φαίνονται στον πίνακα 13 δείχνουν ότι το αλληλίο ε4 και οι πολυμορφισμοί ΑροΕ4/3 και 4/4 υποεκφράζονται στους ασθενείς με ΤΣΧΝΑ σε σύγκριση με τους υγιείς μάρτυρες της ίδιας ηλικίας και φύλου⁴³⁶.

Η επίπτωση των γενετικών πολυμορφισμών της ΑροΕ μεταξύ των ασθενών με ΤΣΧΝΑ και των υγιών ατόμων δεν διαφέρει στις περισσότερες μελέτες^{84,85,86,87}. Επιπρόσθετα δεν βρέθηκαν διαφορές μεταξύ παιδιών ή ενήλικων ασθενών με IgA νεφροπάθεια και υγιών ατόμων^{88,89}. Ωστόσο, σε μία μελέτη που αφορούσε ένα μεγάλο αριθμό ασθενών με ΤΣΧΝΑ Ιαπωνικής καταγωγής παρατηρήθηκε μία σημαντικά αυξημένη συχνότητα του αλληλίου ε2 και αντίστοιχα μειωμένη συχνότητα του αλληλίου ε4 σε σύγκριση με τους υγιείς μάρτυρες, μία παρατήρηση που έκανε τους ερευνητές να υποθέσουν ότι το αλληλίο ε2 προδιαθέτει στην εμφάνιση ΤΣΧΝΑ τουλάχιστον σε αυτό τον πληθυσμό⁹⁰. Αντίθετα, σε μία μικρή μελέτη που αφορούσε ενήλικες ασθενείς της Καυκάσιας φυλής με νεφρωσικό σύνδρομο βρέθηκε μία κατά 4.8 φορές υπερέκφραση του αλληλίου ε4⁹¹. Επιπρόσθετα, η ανεύρεση μίας αυξημένης συχνότητας του αλληλίου ε4 (44% στους ασθενείς vs 30% στον υγιή πληθυσμό, $p < 0.01$) και του φαινοτύπου Ε4Ε3 (38.3% στους ασθενείς vs 16% στον υγιή πληθυσμό, $p < 0.001$) σε Σουηδούς μεταμοσχευμένους ασθενείς οδήγησε στην υπόθεση ότι ο γονότυπος Ε4Ε3 αποτελεί παράγοντα κινδύνου για ΤΣΧΝΑ⁹². Τέλος, έχει αναφερθεί μία αυξημένη επίπτωση του αλληλίου ε4 σε παιδιά με νεφρωσικό σύνδρομο σε σύγκριση με υγιείς μάρτυρες^{89,93}. Οι παραπάνω διαφορές πιθανά συσχετίζονται με τη διαφορετική καταγωγή των πληθυσμών που μελετήθηκαν⁸³.

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, το αλληλίο ε4 πιθανά έχει νεφροπροστατευτικές ιδιότητες (κεφάλαιο 9.3). Επομένως, οι ασθενείς που έχουν το αλληλίο ε4 πιθανά προστατεύονται από την εμφάνιση τελικού σταδίου ΧΝΑ και επομένως η επίπτωση του αλληλίου ε4 είναι μικρότερη σε αυτό τον πληθυσμό.

Εναλλακτικά, η μειωμένη επίπτωση του αλληλίου ε4 και των πολυμορφισμών ΑροΕ 4/3 και 4/4 στους ασθενείς με ΤΣΧΝΑ θα μπορούσε να οφείλεται στη μεγαλύτερη

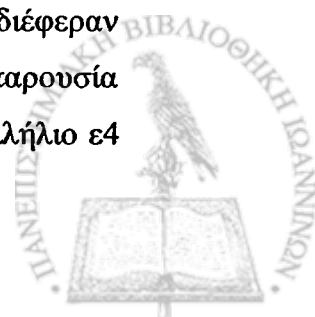


θνησιμότητα των ασθενών που έχουν το αλληλίο ε4 σε σύγκριση με τους ασθενείς που έχουν τα αλληλία ε3 ή ε2. Πραγματικά, στο γενικό πληθυσμό το αλληλίο ε4 έχει συσχετισθεί με την εμφάνιση στεφανιαίας νόσου^{63,452}, ισχαιμικών αγγειακών εγκεφαλικών επεισοδίων⁶⁴ και συστολικής δυσλειτουργίας της αριστερής κοιλίας⁶⁵ ανεξάρτητα από την επίδρασή του στα επίπεδα της LDL χοληστερόλης. Συνεπώς, η πιθανότητα μακροβιότητας για τα άτομα που έχουν το αλληλίο ε4 είναι μειωμένη σε σύγκριση με τα άτομα που έχουν το αλληλίο ε2⁶⁷. Επιπρόσθετα, οι ασθενείς που είχαν το αλληλίο ε4 στη δική μας μελέτη είχαν αυξημένα επίπεδα LDL χοληστερόλης και επομένως μεγαλύτερο κίνδυνο εμφάνισης καρδιαγγειακής νόσου (κεφάλαιο 9.5), ενώ σε άλλες μελέτες το αλληλίο ε4 συσχετίστηκε με αυξημένη επίπτωση αθηρωματικής νόσου σε ασθενείς με τελικού σταδίου χρόνια νεφρική ανεπάρκεια^{86,106,107}. Όπως είναι γνωστό, οι ασθενείς με ΤΣΧΝΑ εμφανίζουν αυξημένη καρδιαγγειακή νοσηρότητα και θνησιμότητα¹⁶. Έτσι, οι ουραιμικοί ασθενείς με το αλληλίο ε4 έχουν μεγαλύτερη πιθανότητα να εμφανίσουν πρόωμη αθηρωματική νόσο σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου, με αποτέλεσμα τη μειωμένη επίπτωση του αλληλίου ε4 στους ασθενείς της μελέτης μας.

9.5. ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΑΡΟΕ ΣΤΙΣ ΛΙΠΙΔΑΙΜΙΚΕΣ ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΥΣ ΤΟΥ ΟΡΟΥ ΤΩΝ ΑΣΘΕΝΩΝ ΜΕ ΧΡΟΝΙΑ ΝΕΦΡΙΚΗ ΝΟΣΟ

9.5.1. Επίδραση της ΑροΕ στις λιπιδαιμικές παραμέτρους του ορού των ασθενών που υποβάλλονταν σε αιμοκάθαρση

Στην παρούσα μελέτη εξετάστηκε για πρώτη φορά σε Ελληνικό πληθυσμό η επίδραση των πολυμορφισμών της ΑροΕ στο λιπιδαιμικό προφίλ των ασθενών που υποβάλλονταν σε ΑΜΚ. Οι ασθενείς που υποβάλλονταν σε αιμοκάθαρση και είχαν το αλληλίο ε2 είχαν χαμηλότερα επίπεδα ολικής χοληστερόλης, LDL χοληστερόλης, non HDL χοληστερόλης, τριγλυκεριδίων και ΑροΒ σε σύγκριση με τους ασθενείς που είχαν το αλληλίο ε3 ή το αλληλίο ε4 (πίνακας 14)⁴³⁶. Αντίθετα, τα άτομα με το αλληλίο ε4 είχαν τις υψηλότερες τιμές αυτών των παραμέτρων, αν και οι διαφορές δεν ήταν στατιστικά σημαντικές σε σύγκριση με τους ασθενείς που είχαν το αλληλίο ε3. Επιπρόσθετα, τα επίπεδα της HDL χοληστερόλης, της ΑροΑΙ και της Lp(a) δεν διέφεραν σημαντικά μεταξύ των παραπάνω ομάδων. Πρέπει επίσης να σημειωθεί ότι η παρουσία του αλληλίου ε2 συσχετιζόταν με τα υψηλότερα επίπεδα της ΑροΕ, ενώ το αλληλίο ε4



με τα χαμηλότερα επίπεδα της ApoE του ορού. Τέλος, η επίδραση των πολυμορφισμών της ApoE στα επίπεδα των λιπιδαιμικών παραμέτρων του ορού αυτών των ασθενών παρέμεινε στατιστικά σημαντική και μετά από τη διόρθωση για την ηλικία, το φύλο, το δείκτη μάζας σώματος, τις καπνιστικές συνήθειες και το χρόνο από την ένταξη στην αιμοκάθαρση (πίνακες 16 και 16, μοντέλο A).

Αυτή η «υποχοληστερολαιμική» δράση του αλληλίου ε2 διαπιστώθηκε και στις τέσσερις μελέτες που είχαν προηγουμένως εκτιμήσει την επίδραση των πολυμορφισμών της ApoE στο λιπιδαιμικό προφίλ των ασθενών που υποβάλλονταν σε AMK^{84,85,87,101}, αλλά και στη δική μας μελέτη των υγιών ατόμων⁴³⁴. Η μείωση της LDL χοληστερόλης στα άτομα που έχουν το αλληλίο ε2 οφείλεται: α) σε μειωμένη υδρόλυση των VLDL από τη λιποπρωτεϊνική λιπάση εξαιτίας της αντικατάστασης της ApoCII στο μόριο των VLDL από τα αυξημένα επίπεδα της ApoE στο πλάσμα, με τελικό αποτέλεσμα τη μείωση της παραγωγής των καταλοίπων των VLDL, τα οποία είναι πρόδρομα μόρια των LDL⁴⁵, β) στο γεγονός ότι η ApoE2 επάγει τη δράση της ηπατικής λιπάσης σε μικρότερο βαθμό από την ApoE4 με αποτέλεσμα τη μείωση της παραγωγής των LDL⁵⁶, γ) στο γεγονός ότι η ισομορφή ApoE2 είναι ελαττωματική ως προς την ικανότητα σύνδεσής της με τους ηπατικούς υποδοχείς, με αποτέλεσμα λιγότερη χοληστερόλη που προέρχεται από τα κατάλοιπα των χυλομικρών και των VLDL να εισέρχεται στα ηπατοκύτταρα. Η μείωση της ενδοκυττάριας συγκέντρωσης χοληστερόλης οδηγεί σε αύξηση του αριθμού των LDL υποδοχέων στην επιφάνεια αυτών των κυττάρων και τελικά σε μείωση των επιπέδων των LDL στον ορό, δ) σε αυξημένο καταβολισμό των LDL εξαιτίας της μείωσης του ανταγωνισμού μεταξύ της ApoB100 και της μειονεκτικής ApoE2 για τον LDL υποδοχέα και ε) στη μειωμένη μετατροπή των IDL σε LDL, αφού για να γίνει αυτή η μετατροπή είναι απαραίτητη η σύνδεση των IDL με τον LRP υποδοχέα. Στην περίπτωση της ApoE2 αυτή η σύνδεση είναι ελαττωμένη. Αντίθετα, η αύξηση της ολικής και LDL χοληστερόλης, καθώς και των επιπέδων της ApoB σε άτομα με το αλληλίο ε4 οφείλεται: α) στην αυξημένη είσοδο των λιποπρωτεϊνικών καταλοίπων στα ηπατοκύτταρα εξαιτίας της αυξημένης συγγένειας της ApoE4 με τους ApoE υποδοχείς και της επιλεκτικής σύνδεσης της ApoE4 με τις VLDL³⁹. Αυτή η αυξημένη είσοδος λιποπρωτεϊνικών καταλοίπων στα ηπατοκύτταρα έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της συγκέντρωσης της ενδοκυττάριας χοληστερόλης και επομένως τη μείωση της έκφρασης των LDL υποδοχέων στην επιφάνεια των ηπατοκυττάρων. Η μείωση του καταβολισμού των LDL έχει ως τελικό αποτέλεσμα την αύξηση της LDL χοληστερόλης⁵⁷ και β) στην αυξημένη εντερική απορρόφηση του διαιτητικού φορτίου χοληστερόλης⁵⁸. Επιπρόσθετα,

τα επίπεδα της ApoE στον ορό στα άτομα με το αλληλίο ε4 είναι μειωμένα σε σύγκριση με τα αλληλία ε3 και ε2 εξαιτίας του αυξημένου καταβολισμού των λιποπρωτεϊνών που περιέχουν ApoE4.

Οι ασθενείς που είχαν το αλληλίο ε2 είχαν τα χαμηλότερα επίπεδα τριγλυκεριδίων και οι ασθενείς που είχαν το αλληλίο ε4 είχαν τα υψηλότερα επίπεδα τριγλυκεριδίων, ενώ αυτή η διαφορά γίνονταν ακόμη μεγαλύτερη όταν εξαιρέθηκαν από την ανάλυση οι ασθενείς που ήταν ομόζυγοι ApoE2/2. Σε παλαιότερες μελέτες βρέθηκε μία συσχέτιση μεταξύ των γονοτύπων ApoE2/2, ApoE4/3 και ApoE4/4⁸⁵ ή του γονοτύπου ApoE4/3¹⁰¹ και της αύξησης της συγκέντρωσης των τριγλυκεριδίων. Αντίθετα, οι πολυμορφισμοί της ApoE δεν συσχετίστηκαν με τα επίπεδα των τριγλυκεριδίων σε ασθενείς που υποβάλλονταν σε AMK σε δύο άλλες μελέτες^{84,87}. Πρέπει να σημειωθεί ότι η ισομορφή ApoE4 είναι επιλεκτικά συνδεδεμένη με τις VLDL³⁹ και επομένως μπορεί να επηρεάζει το μεταβολισμό των πλούσιων σε τριγλυκερίδια λιποπρωτεϊνών. Αντίθετα, το αλληλίο ε2 συσχετίστηκε με αυξημένα επίπεδα τριγλυκεριδίων στα υγιή άτομα της μελέτης μας (κεφάλαιο 9.2). Οι λόγοι για τη διαφορετική επίδραση των πολυμορφισμών της ApoE στα επίπεδα των τριγλυκεριδίων μεταξύ των διαφόρων μελετών, αλλά και μεταξύ των ασθενών που υποβάλλονταν σε AMK και της ομάδας ελέγχου της μελέτης μας δεν είναι γνωστοί. Ωστόσο, έχει διατυπωθεί η άποψη ότι περιβαλλοντικοί παράγοντες, η καταγωγή του υπό μελέτη πληθυσμού και το ουραιμικό περιβάλλον μπορούν να τροποποιούν την επίδραση των πολυμορφισμών της ApoE στα τριγλυκερίδια του ορού⁸³.

Παρά το γεγονός ότι μία μελέτη σε ασθενείς που υποβάλλονταν σε AMK έδειξε ότι το αλληλίο ε4 συσχετιζόταν με μειωμένα επίπεδα HDL χοληστερόλης⁸⁷, άλλες μελέτες^{84,85,101}, καθώς και η δική μας μελέτη, δεν επιβεβαίωσαν αυτή τη συσχέτιση. Επίσης, οι πολυμορφισμοί της ApoE δεν συσχετίστηκαν με τα επίπεδα της ApoAI στη δική μας μελέτη, καθώς και σε άλλες μελέτες^{85,87}. Επιπρόσθετα, σε καμία μελέτη δεν υπήρξε συσχέτιση μεταξύ των πολυμορφισμών της ApoE και των επιπέδων της Lp(a) σε αυτούς τους ασθενείς. Τέλος, τα επίπεδα της ApoE στον ορό ήταν ιδιαίτερα αυξημένα στους ομόζυγους ασθενείς ApoE2/2 και ελαττώνονταν με την σειρά E2/2>E2/3>E3/3>E4/3>E4/4, όπως διαπιστώθηκε και σε άλλες μελέτες^{85,87}. Πράγματι, οι πολυμορφισμοί της ApoE είναι ο πιο σημαντικός παράγοντας που καθορίζει τη μεταβλητότητα (~30%) της συγκέντρωσης της ApoE σε αυτούς τους ασθενείς (πίνακας 16).

Ένα ενδιαφέρον εύρημα της μελέτης μας ήταν ότι τέσσερις από τους πέντε ομόζυγους ασθενείς ApoE2/2 εμφάνιζαν ένα λιπιδαιμικό προφίλ συμβατό με τη διάγνωση της



υπερλιποπρωτεϊναιμίας τύπου ΙΙΙ (κεφάλαιο 8.5.1). Πραγματικά, μελέτες έδειξαν ότι τόσο το νεφρωσικό σύνδρομο όσο και η νεφρική ανεπάρκεια σε παιδιά επάγουν την εμφάνιση της υπερλιποπρωτεϊναιμίας τύπου ΙΙΙ σε ομόζυγους ασθενείς ApoE2/2^{94,95,96}. Πρέπει να σημειωθεί ότι κανένας από τους ομόζυγους ασθενείς ApoE2/2 δεν είχε νεφρωσικό σύνδρομο. Επομένως, η νεφρική ανεπάρκεια ήταν ο εκλυτικός παράγοντας για την εκδήλωση της υπερλιποπρωτεϊναιμίας τύπου ΙΙΙ σε αυτούς τους ασθενείς⁴³⁶.

Στην παρούσα μελέτη εξετάστηκε για πρώτη φορά στη βιβλιογραφία η επίδραση των επιπέδων της ApoE στις λιπιδαιμικές παραμέτρους των ασθενών που υποβάλλονταν σε AMK⁴³⁶, ενώ οι μέχρι τότε μελέτες αφορούσαν μόνο το γενικό πληθυσμό (κεφάλαιο 9.2). Τα επίπεδα της ApoE συσχετιζόνταν θετικά με όλες τις λιπιδαιμικές παραμέτρους του ορού, εκτός από την Lp(a) (σχήματα 41-47), ενώ η μεγαλύτερη συσχέτιση παρατηρήθηκε με τα τριγλυκερίδια του ορού (σχήμα 42). Επιπρόσθετα, τα επίπεδα της ApoE συσχετιζόνταν επίσης με τα επίπεδα της ApoAI και της HDL χοληστερόλης, δηλαδή με παραμέτρους οι οποίες δεν συσχετιζόνταν με τους πολυμορφισμούς της ApoE (σχήματα 43 και 47). Η επίδραση αυτή των επιπέδων της ApoE στις προαναφερθείσες λιπιδαιμικές παραμέτρους ήταν ανεξάρτητη από άλλους γνωστούς παράγοντες, καθώς και από τους πολυμορφισμούς της ApoE (πίνακες 15 και 16, μοντέλο Β). Αξίζει μάλιστα να σημειωθεί ότι η επίδραση αυτή των επιπέδων της ApoE στις λιπιδαιμικές παραμέτρους ήταν μεγαλύτερη από την επίδραση των πολυμορφισμών της ApoE (μεγαλύτερη τιμή του beta και μικρότερη τιμή του p στην πολυπαραγοντική ανάλυση των δεδομένων). Κατά συνέπεια, τα αυξημένα επίπεδα της ApoE στους ασθενείς που υποβάλλονται σε AMK σε σύγκριση με τους υγιείς μάρτυρες (κεφάλαιο 9.1) πιθανά συμβάλλουν στην παθογένεια ορισμένων τουλάχιστον από τις διαταραχές των λιπιδίων που παρατηρούνται σε αυτούς τους ασθενείς, π.χ στην εμφάνιση της υπερτριγλυκεριδαιμίας.

Οι μηχανισμοί διαμέσου των οποίων οι συγκεντρώσεις της ApoE επηρεάζουν τα επίπεδα των λιποπρωτεϊνών είναι: α) Η ApoE διεγείρει απευθείας την ηπατική παραγωγή των VLDL και των τριγλυκεριδίων ανεξάρτητα από τους πολυμορφισμούς της ApoE⁷⁶, ενώ πρόσφατα διατυπώθηκε η άποψη ότι η ApoE διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη μεταφορά των λιπιδίων μεταξύ των διαφόρων ενδοκυττάρων διαμερισμάτων των ηπατοκυττάρων μέχρι την απελευθέρωσή τους στην κυκλοφορία⁷⁷, β) η ApoE, όπως ήδη αναφέρθηκε, αναστέλλει τη δραστηριότητα της λιποπρωτεϊνικής λιπάσης ανεξάρτητα από τους πολυμορφισμούς της ApoE^{45,78} και γ) η συγκέντρωση της ApoE μεταβάλλει την ικανότητα σύνδεσης των VLDL με τους υποδοχείς ανεξάρτητα από τους

γενετικούς πολυμορφισμούς της ApoE με τελικό αποτέλεσμα τη μείωση της κάθαρσης των VLDL⁷⁹ (σχήμα 15).

Τέλος, στην παρούσα μελέτη εξετάστηκε για πρώτη φορά στη βιβλιογραφία η συνδυασμένη επίδραση των επιπέδων της ApoE και των πολυμορφισμών της ApoE στις λιπιδαιμικές παραμέτρους των ασθενών που υποβάλλονταν σε AMK⁴³⁶. Ο λόγος που καθιστά επιβεβλημένη μια τέτοια συνδυασμένη ανάλυση είναι ότι οι πολυμορφισμοί της ApoE επηρεάζουν σημαντικά τα επίπεδά της στον ορό και επομένως η επίδραση των πολυμορφισμών της ApoE στο λιπιδαιμικό προφίλ αυτών των ασθενών θα μπορούσε να συγχέεται ή να αποκρύπτεται από τα επίπεδά της στον ορό. Η συνδυασμένη αυτή ανάλυση των δεδομένων (πίνακες 15 και 16, μοντέλο Β) έδειξε ότι όταν τα επίπεδα της ApoE ληφθούν υπόψη στην πολυπαραγοντική ανάλυση τότε: α) η επίδραση των πολυμορφισμών της ApoE στις λιπιδαιμικές παραμέτρους γίνεται στατιστικά πιο ισχυρή (μεγαλύτερη τιμή του beta και μικρότερη τιμή του p), β) τα ίδια τα επίπεδα της ApoE επιδρούν σημαντικά και ανεξάρτητα από τους πολυμορφισμούς της ApoE στα επίπεδα των λιπιδαιμικών παραμέτρων και γ) αυξάνεται σημαντικά το ποσοστό της μεταβλητότητας των λιπιδαιμικών παραμέτρων ($R^2 \times 100$) που μπορεί να εξηγηθεί από το συνδυασμό των πολυμορφισμών και της συγκέντρωσης της ApoE σε σύγκριση με αυτό που μπορεί να εξηγηθεί μόνο από τους πολυμορφισμούς της ApoE. Τέλος, όπως έχει ήδη αναφερθεί, μόνο η συγκέντρωση της ApoE και όχι οι πολυμορφισμοί της επηρεάζουν σημαντικά τα επίπεδα της HDL χοληστερόλης και της ApoAI, ενώ τα επίπεδα της Lp(a) δεν συσχετίζονται με τα επίπεδα ή τους πολυμορφισμούς της ApoE.

9.5.2. Επίδραση της ApoE στις λιπιδαιμικές παραμέτρους του ορού των ασθενών που υποβάλλονταν σε συνεχή φορητή περιτοναϊκή κάθαρση

Οι ασθενείς που υποβάλλονταν σε συνεχή φορητή περιτοναϊκή κάθαρση (ΣΦΠΚ) και είχαν το αλληλίο ε4 είχαν υψηλότερες τιμές ολικής χοληστερόλης, τριγλυκεριδίων, HDL χοληστερόλης, LDL χοληστερόλης, non HDL χοληστερόλης και ApoB σε σύγκριση με τους ασθενείς που δεν είχαν το αλληλίο ε4 (πίνακας 17). Αντίθετα, τα επίπεδα της HDL χοληστερόλης, της ApoAI και της Lp(a) δεν διέφεραν μεταξύ των δύο ομάδων, ενώ η παρουσία του αλληλίου ε4 συσχετιζόταν με μειωμένα επίπεδα ApoE σε σύγκριση με τους ασθενείς που δεν είχαν το αλληλίο ε4. Τα ευρήματα αυτά συμφωνούν με τα αποτελέσματα άλλων δύο μελετών που εξέτασαν την επίδραση των πολυμορφισμών της ApoE στο λιπιδαιμικό προφίλ των ασθενών που υποβάλλονταν σε ΣΦΠΚ^{86,101}. Αντίθετα,



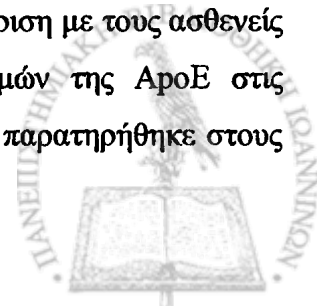
μία άλλη μελέτη έδειξε ότι οι ασθενείς που είχαν το γονότυπο ApoE3/2 είχαν αυξημένα επίπεδα ολικής χοληστερόλης και τριγλυκεριδίων και μειωμένα επίπεδα ApoB και Lp(a) σε σύγκριση με τους ασθενείς που είχαν τους γονότυπους ApoE3/3 και 3/4¹⁰².

Επιπρόσθετα, μελετήθηκε για πρώτη φορά στη βιβλιογραφία η συσχέτιση των επιπέδων της ApoE με τις λιπιδαιμικές παραμέτρους του ορού των ασθενών που υποβάλλονταν σε ΣΦΠΚ (πίνακας 18). Τα επίπεδα της ApoE συσχετιζόνταν θετικά με όλες τις λιπιδαιμικές παραμέτρους του ορού, εκτός από την Lp(a), την HDL χοληστερόλη και την ApoAΙ. Αξίζει να σημειωθεί ότι η ApoE του ορού συσχετιζόνταν κυρίως με την ολική χοληστερόλη ($r=0.72$) και την non HDL χοληστερόλη ($r=0.72$). Επομένως, τα αυξημένα επίπεδα της ApoE στους ασθενείς που υποβάλλονται σε ΣΦΠΚ σε σύγκριση με τους υγείς μάρτυρες ή τους ασθενείς που υποβάλλονται σε AMK (κεφάλαιο 9.1) πιθανά συμβάλλουν στην παθογένεια ορισμένων τουλάχιστον από τις διαταραχές των λιπιδίων που παρατηρούνται κυρίως σε αυτούς τους ασθενείς, π.χ στην εμφάνιση της υπερχοληστερολαιμίας ή της σημαντικού βαθμού υπερτριγλυκεριδαϊμίας.

Η πολυπαραγοντική ανάλυση των δεδομένων όταν ελήφθησαν υπόψη τόσο οι πολυμορφισμοί της ApoE όσο και η συγκέντρωσή της στον ορό έδειξε αποτελέσματα παρόμοια με αυτά που περιγράφηκαν για τους ασθενείς που υποβάλλονταν σε AMK (κεφάλαιο 9.5.1), αν και οι συσχετίσεις δεν ήταν στατιστικά σημαντικές σε όλες τις περιπτώσεις, πιθανότατα εξαιτίας του μικρού αριθμού των ασθενών που υποβάλλονταν σε ΣΦΠΚ και συμμετείχαν στη μελέτη μας.

9.5.3. Επίδραση της ApoE στις λιπιδαιμικές παραμέτρους του ορού των ασθενών με προτελικού σταδίου (III-IV) χρόνια νεφρική ανεπάρκεια

Στην παρούσα μελέτη εξετάστηκε για πρώτη φορά στη βιβλιογραφία η επίδραση των πολυμορφισμών της ApoE στο λιπιδαιμικό προφίλ των ασθενών με προτελικού σταδίου (III-IV) χρόνια νεφρική ανεπάρκεια (ΠΤΧΝΑ). Τα άτομα με το αλλήλιο ε4 είχαν υψηλότερες τιμές ολικής χοληστερόλης, τριγλυκεριδίων, HDL χοληστερόλης, LDL χοληστερόλης, non HDL χοληστερόλης και ApoB σε σύγκριση με τα άτομα που δεν είχαν το αλλήλιο ε4 (πίνακας 19). Αντίθετα, τα επίπεδα της HDL χοληστερόλης, της ApoAΙ και της Lp(a) δεν διέφεραν μεταξύ των δύο ομάδων, ενώ η παρουσία του αλληλίου ε4 συσχετιζόνταν με χαμηλότερα επίπεδα ApoE σε σύγκριση με τους ασθενείς που δεν είχαν το αλλήλιο ε4. Η επίδραση των πολυμορφισμών της ApoE στις λιπιδαιμικές παραμέτρους δεν διαφέρει ουσιαστικά από αυτή που παρατηρήθηκε στους



ασθενείς που υποβάλλονταν σε AMK ή σε ΣΦΠΚ. Σε αντίθεση με την ομάδα ελέγχου, η παρουσία του αλληλίου ε4 συσχετίστηκε και σε αυτούς τους ασθενείς με υψηλότερα επίπεδα τριγλυκεριδίων του ορού.

Επιπρόσθετα, μελετήθηκε για πρώτη φορά στη βιβλιογραφία η συσχέτιση των επιπέδων της ApoE με τις λιπιδαιμικές παραμέτρους του ορού αυτών των ασθενών (πίνακας 20). Τα επίπεδα της ApoE συσχετίζονταν θετικά με όλες τις λιπιδαιμικές παραμέτρους, εκτός από την Lp(a) και την HDL χοληστερόλη. Αξίζει να σημειωθεί ότι η ApoE συσχετίζονταν κυρίως με την ApoB ($r=0.65$) και τα τριγλυκερίδια ($r=0.59$). Επομένως, τα αυξημένα επίπεδα της ApoE στους ασθενείς με ΠΤΧΝΑ σε σύγκριση με τους υγιείς μάρτυρες (κεφάλαιο 9.1) πιθανά συμβάλλουν στην παθογένεια ορισμένων τουλάχιστον από τις διαταραχές των λιπιδίων που παρατηρούνται σε αυτούς τους ασθενείς, π.χ στην εμφάνιση αυξημένων επιπέδων ApoB και τριγλυκεριδίων.

Η πολυπαραγοντική ανάλυση των δεδομένων όταν ελήφθησαν υπόψη τόσο οι πολυμορφισμοί της ApoE όσο και η συγκέντρωση της στο ορό οδήγησε σε αποτελέσματα παρόμοια με αυτά που περιγράφηκαν για τους ασθενείς που υποβάλλονταν σε AMK (κεφάλαιο 9.5.1), αν και οι συσχετίσεις δεν ήταν στατιστικά σημαντικές σε όλες τις περιπτώσεις, πιθανότατα εξαιτίας του μικρού αριθμού των ασθενών με ΠΤΧΝΑ που συμμετείχαν στη μελέτη μας.

9.6. ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΤΗΣ ΕΠΙΠΤΩΣΗΣ ΤΩΝ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΩΝ ΤΗΣ ΠΑΡΑΘΕΟΝΑΣΗΣ 1 (PON1) ΜΕΤΑΞΥ ΤΩΝ ΑΣΘΕΝΩΝ ΜΕ ΤΕΛΙΚΟΥ ΣΤΑΔΙΟΥ ΧΡΟΝΙΑ ΝΕΦΡΙΚΗ ΑΝΕΠΑΡΚΕΙΑ ΚΑΙ ΤΩΝ ΥΓΙΩΝ ΑΤΟΜΩΝ

Στην παρούσα μελέτη εξετάστηκε για πρώτη φορά σε Ελληνικό πληθυσμό η επίπτωση των πολυμορφισμών Q192R και M55L του γονιδίου της PON1 στους ασθενείς με τελικό στάδιο χρόνιας νεφρικής ανεπάρκειας (ΤΣΧΝΑ, δηλαδή το σύνολο των ασθενών που υποβάλλονταν σε AMK και ΣΦΠΚ). Τα δεδομένα που φαίνονται στους πίνακες 21 και 22 δείχνουν ότι ενώ δεν υπήρχε διαφορά στην επίπτωση των αλληλίων Q και R, εντούτοις, το αλληλίο M και ο πολυμορφισμός MM υποεκφράζονται στους ασθενείς με ΤΣΧΝΑ σε σύγκριση με τους υγιείς μάρτυρες της ίδιας ηλικίας και φύλου, ένα εύρημα που περιγράφεται για πρώτη φορά στη βιβλιογραφία. Αντίθετα, στις μέχρι τώρα μελέτες στις οποίες προσδιορίστηκαν οι πολυμορφισμοί της PON1 (κεφάλαιο 5.8.2) δεν υπήρχαν διαφορές στην επίπτωση αυτών των αλληλίων μεταξύ των ασθενών που υποβάλλονταν σε αιμοκάθαρση και των υγιών μαρτύρων.



Τα αποτελέσματα της μελέτης μας θα μπορούσαν να εξηγηθούν με την παραδοχή ότι το αλληλίο Μ έχει νεφροπροστατευτικές ιδιότητες και επομένως, οι ασθενείς με νεφρική νόσο που έχουν το αλληλίο Μ και τον πολυμορφισμό ΜΜ προστατεύονται όσον αφορά την εξέλιξη της νεφρικής βλάβης και έτσι εμφανίζουν μικρότερη επίπτωση ΤΣΧΝΑ. Αντίθετα, μία μελέτη έδειξε ότι ο πολυμορφισμός LL του γονιδίου M55L είναι παράγοντας κινδύνου για την εμφάνιση και εξέλιξη της εστιακής τμηματικής σπειραματοσκλήρυνσης σε παιδιά Αράβων που μένουν στο Ισραήλ³¹³. Πραγματικά, η επίπτωση του γονότυπου LL σε παιδιά Αραβικής καταγωγής με αυτή τη νόσο ήταν μεγαλύτερη από την αντίστοιχη σε υγιή παιδιά της ίδιας καταγωγής, αλλά και από την επίπτωση του ίδιου γονότυπου σε παιδιά-ασθενείς Εβραϊκής καταγωγής, τα οποία έχουν καλύτερη πρόγνωση παρά την ίδια αντιμετώπιση της νόσου.

Εναλλακτικά, η μειωμένη επίπτωση του αλληλίου Μ και του πολυμορφισμού ΜΜ στους ασθενείς με ΤΣΧΝΑ θα μπορούσε να οφείλεται στη μεγαλύτερη θνησιμότητα των ασθενών που έχουν το αλληλίο Μ σε σύγκριση με τους ασθενείς που δεν έχουν αυτό το αλληλίο. Ωστόσο, μία πρόσφατη μελέτη έδειξε ότι δεν υπάρχουν διαφορές στην κατανομή των γονιδίων L και Μ σε άτομα μεγάλης ηλικίας σε σύγκριση με νεότερα άτομα²⁷², ενώ σε μία πρόσφατη μεταανάλυση πολλών μελετών ο πολυμορφισμός M55L της PON1 δεν συσχετίστηκε με την εμφάνιση στεφανιαίας νόσου²⁸².

9.7. ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΩΝ ΤΗΣ PON1 ΣΤΙΣ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΕΣ ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΥΣ ΤΩΝ ΑΣΘΕΝΩΝ ΜΕ ΧΡΟΝΙΑ ΝΕΦΡΙΚΗ ΝΟΣΟ

Στην παρούσα μελέτη εξετάστηκε για πρώτη φορά σε Ελληνικό πληθυσμό η επίδραση των πολυμορφισμών Q192R και M55L του γονιδίου της PON1 στις κλινικοεργαστηριακές παραμέτρους των ασθενών με χρόνια νεφρική νόσο, ενώ για πρώτη φορά στη βιβλιογραφία προσδιορίστηκαν οι πολυμορφισμοί της PON1 σε ασθενείς που υποβάλλονταν σε ΣΦΠΚ⁴³⁷ και σε ασθενείς με ΠΤΧΝΑ. Όπως φαίνεται στους πίνακες 23 και 27, ο πολυμορφισμός Q192R της PON1 επηρέασε σημαντικά την ενεργότητα της PON1(paraoxon) στους ασθενείς που υποβάλλονταν σε ΑΜΚ, στους ασθενείς που υποβάλλονταν σε ΣΦΠΚ και στους ασθενείς με ΠΤΧΝΑ. Συγκεκριμένα, οι ασθενείς με το γονότυπο RR εμφάνισαν υψηλότερη ενεργότητα της PON1(paraoxon) σε σύγκριση με τους ασθενείς που είχαν τους γονότυπους QR ή QQ, ενώ οι ασθενείς με το γονότυπο QQ εμφάνισαν μικρότερη ενεργότητα της PON1(paraoxon) σε σύγκριση με τις

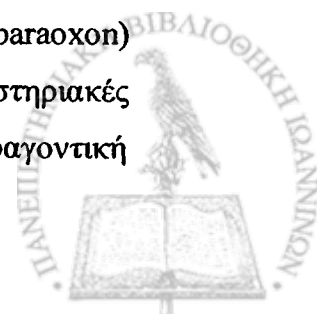
υπόλοιπες δύο ομάδες ασθενών, δηλαδή RR>QR>QQ. Αυτή η διαφορά παρέμενε σημαντική και μετά από τη διόρθωση για τα επίπεδα της HDL χοληστερόλης ή της ApoA1. Αντίθετα, αυτός ο πολυμορφισμός δεν είχε καμία σημαντική επίδραση στην ενεργότητα της PON1(phenylacetate).

Επίσης, όπως φαίνεται στους πίνακες 24 και 28, ο πολυμορφισμός M55L της PON1 επηρέασε σημαντικά την ενεργότητα της PON1(paraoxon), αλλά και της PON1(phenylacetate) στους ασθενείς που υποβάλλονταν σε AMK, στους ασθενείς που υποβάλλονταν σε ΣΦΠΚ⁴³⁷ και στους ασθενείς με ΠΤΧΝΑ. Συγκεκριμένα, οι ασθενείς με το γονότυπο LL εμφάνισαν υψηλότερη ενεργότητα της PON1(paraoxon) σε σύγκριση με τους ασθενείς που είχαν τους γονότυπους LM ή MM, ενώ οι ασθενείς με το γονότυπο MM εμφάνισαν μικρότερη ενεργότητα της PON1(paraoxon) σε σύγκριση με τις υπόλοιπες δύο ομάδες ασθενών, δηλαδή LL>LM>MM. Αυτή η διαφορά παρέμενε σημαντική και μετά από τη διόρθωση για τα επίπεδα της HDL χοληστερόλης ή της ApoA1. Τέλος, αυτός ο πολυμορφισμός ασκούσε παρόμοια σημαντική επίδραση και στην ενεργότητα της PON1(phenylacetate), δηλαδή LL>LM>MM. Αυτή η διαφορά παρέμενε σημαντική και μετά από τη διόρθωση για τα επίπεδα της HDL χοληστερόλης ή της ApoA1.

Τα παραπάνω ευρήματα συμφωνούν με τα αποτελέσματα των μελετών που εξέτασαν την επίδραση των πολυμορφισμών της PON1 στην ενεργότητα του ενζύμου τόσο στο γενικό πληθυσμό (κεφάλαιο 5.4) όσο και σε ασθενείς με νεφρικά νοσήματα (κεφάλαιο 5.8.2). Επιπρόσθετα, η μελέτη μας δεν έδειξε καμία επίδραση των πολυμορφισμών της PON1 στις λιπιδαιμικές παραμέτρους του ορού των ασθενών σε αντίθεση με μία μελέτη σε ένα γενετικά απομονωμένο πληθυσμό της βόρειας Αμερικής (Alberta Hutterites), στην οποία βρέθηκε ότι ο πολυμορφισμός Q192R της PON1 επηρεάζει τα επίπεδα των λιπιδαιμικών παραμέτρων του ορού: οι ομοζυγώτες QQ είχαν χαμηλότερα επίπεδα τριγλυκεριδίων, LDL χοληστερόλης, ApoB και αθηρωματικού δείκτη σε σύγκριση με τα άτομα που είχαν τους γονότυπους QR ή RR²¹⁶.

9.8. ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΟΥ ΕΠΗΡΕΑΖΟΥΝ ΤΗΝ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑ ΤΗΣ PON1 ΣΤΟΥΣ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ΧΡΟΝΙΑ ΝΕΦΡΙΚΗ ΝΟΣΟ

Στους πίνακες 25 και 26 φαίνεται η συσχέτιση της ενεργότητας της PON1(paraoxon) και της PON1(phenylacetate), αντίστοιχα, με διάφορες κλινικοεργαστηριακές παραμέτρους στους ασθενείς που υποβάλλονταν σε AMK. Η πολυπαραγοντική



ανάλυση, στην οποία συνεκτιμήθηκαν οι παράμετροι που σε μονοπαραγοντική ανάλυση συσχετιζόνταν σημαντικά με την ενεργότητα της PON1(paraoxon) και οι πολυμορφισμοί της PON1 έδειξε ότι οι παράγοντες που σημαντικά και ανεξάρτητα επηρεάζουν την ενεργότητα της PON1(paraoxon) σε αυτούς τους ασθενείς ήταν ο πολυμορφισμός Q192R, ο πολυμορφισμός M55L και τα επίπεδα της ApoA1. Επιπρόσθετα, η πολυπαραγοντική ανάλυση, στην οποία συνεκτιμήθηκαν οι παράμετροι που σε μονοπαραγοντική ανάλυση συσχετιζόνταν σημαντικά με την ενεργότητα της PON1(phenylacetate) και οι πολυμορφισμοί της PON1 έδειξε ότι οι παράγοντες που σημαντικά και ανεξάρτητα επηρεάζουν την ενεργότητα της PON1(phenylacetate) σε αυτούς τους ασθενείς ήταν ο πολυμορφισμός M55L και τα επίπεδα της ApoA1. Αντίθετα, οι πολυμορφισμοί της ApoE δεν είχαν καμία επίδραση στην ενεργότητα της PON1(paraoxon) ή της PON1(phenylacetate), ενώ δεν παρατηρήθηκε καμία σημαντική συσχέτιση μεταξύ της συγκέντρωσης της ApoE και της ενεργότητας της PON1(paraoxon) ή της PON1(phenylacetate)/ApoA1. Τα παραπάνω ευρήματα είναι σύμφωνα με τη βασική γνώση ότι η PON1 συνδέεται με το υποκλάσμα εκείνο των HDL που επίσης περιέχει ApoA1^{191,192,193} και όχι με το υποκλάσμα των HDL που περιέχει ApoE.

Για πρώτη φορά στη βιβλιογραφία προσδιορίστηκαν οι παράγοντες που επηρεάζουν την ενεργότητα της PON1 στους ασθενείς που υποβάλλονταν σε ΣΦΠΚ⁴³⁷. Οι παράγοντες που σημαντικά και ανεξάρτητα επηρεάζουν την ενεργότητα της PON1(paraoxon) σε αυτούς τους ασθενείς ήταν ο πολυμορφισμός Q192R, ο πολυμορφισμός M55L και ο χρόνος από την ένταξη στην ΣΦΠΚ, ενώ οι παράγοντες που σημαντικά και ανεξάρτητα επηρεάζουν την ενεργότητα της PON1(phenylacetate) σε αυτούς τους ασθενείς ήταν ο πολυμορφισμός M55L και ο χρόνος από την ένταξη στην ΣΦΠΚ. Οι λόγοι για τους οποίους ο χρόνος από την ένταξη στην ΣΦΠΚ και όχι ο χρόνος από την ένταξη στην AMK επηρεάζει (και μάλιστα θετικά) την ενεργότητα της PON1 στους αντίστοιχους ασθενείς δεν είναι γνωστοί, αλλά πρέπει να συσχετίζονται με τη διαδικασία της εξωνεφρικής κάθαρσης σε κάθε μία περίπτωση.

9.9. ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΤΗΣ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑΣ ΤΗΣ PON1 ΜΕΤΑΞΥ ΤΩΝ ΟΜΑΔΩΝ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

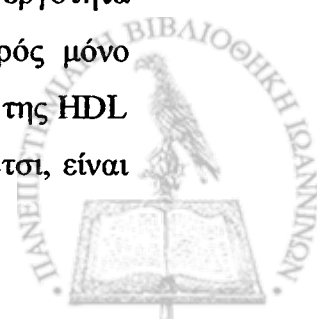
Το πιο σημαντικό εύρημα της μελέτης μας όσον αφορά την ενεργότητα της PON1 ήταν ότι οι ασθενείς που υποβάλλονταν σε ΣΦΠΚ είχαν σημαντικά μεγαλύτερη



ενεργότητα της PON1(paraoxon) σε σύγκριση τόσο με την ομάδα ελέγχου όσο και με τους ασθενείς με ΠΤΧΝΑ και τους ασθενείς που υποβάλλονταν σε ΑΜΚ (πίνακας 29 και σχήμα 48)⁴³⁷. Αυτή η διαφορά στην ενεργότητα της PON1(paraoxon) θα μπορούσε να οφείλεται στα διαφορετικά επίπεδα της HDL χοληστερόλης και κυρίως της ApoAI, που όπως αναφέρθηκε, επηρεάζουν την ενεργότητα του ενζύμου. Εντούτοις, μετά από τη διόρθωση για τα επίπεδα της ApoAI ή της HDL χοληστερόλης, η ενεργότητα της PON1(paraoxon) εξακολουθούσε να είναι υψηλότερη στους ασθενείς που υποβάλλονταν σε ΣΦΠΚ σε σύγκριση τόσο με την ομάδα ελέγχου, όσο και με τους ασθενείς με ΠΤΧΝΑ και τους ασθενείς που υποβάλλονταν σε ΑΜΚ (πίνακας 29 και σχήμα 50). Επιπρόσθετα, αυτή η διαφορά στην ενεργότητα της PON1(paraoxon) θα μπορούσε να οφείλεται στη διαφορετική κατανομή των πολυμορφισμών της PON1 μεταξύ των ατόμων της μελέτης. Κάτι τέτοιο όμως δεν φαίνεται να ισχύει, αφού η σύγκριση της ενεργότητας της PON1(paraoxon) μεταξύ των διαφόρων ομάδων ανά συγκεκριμένους γονότυπους [που περιλαμβάνουν συνδυασμούς των δύο πολυμορφισμών (Q192R και M55L της PON1)] δεν οδήγησε σε μεταβολή αυτών των αποτελεσμάτων (σχήμα 49). Πρέπει να σημειωθεί ότι οι μεγαλύτερες διαφορές στην ενεργότητα της PON1(paraoxon) μεταξύ των διαφόρων ομάδων παρατηρήθηκαν μεταξύ των ατόμων που είχαν το γονότυπο RL/RL, ο οποίος συσχετίζεται με τη μεγαλύτερη ενεργότητα της PON1(paraoxon) (σχήμα 49).

Η ενεργότητα της PON1(phenylacetate) (που αποτελεί ένα δείκτη της μάζας του ενζύμου) ήταν υψηλότερη στους ασθενείς που υποβάλλονταν σε ΣΦΠΚ σε σύγκριση τόσο με την ομάδα ελέγχου όσο και με τους ασθενείς με ΠΤΧΝΑ και τους ασθενείς που υποβάλλονταν σε ΑΜΚ (σχήμα 51). Επιπρόσθετα, μετά τη διόρθωση για τα επίπεδα της ApoAI ή της HDL χοληστερόλης, η ενεργότητα της PON1(phenylacetate) εξακολουθούσε να είναι υψηλότερη στους ασθενείς που υποβάλλονταν σε ΣΦΠΚ (πίνακας 29 και σχήμα 52).

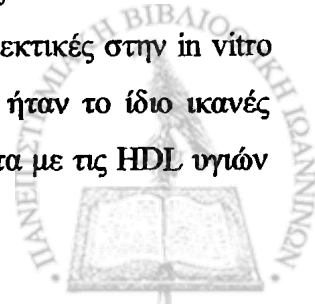
Τα αποτελέσματα της μελέτης μας έρχονται σε αντίθεση με τα ευρήματα της μοναδικής μελέτης στην οποία είχε προσδιορισθεί η ενεργότητα της PON1 σε ασθενείς που υποβάλλονταν σε ΣΦΠΚ³⁰². Στη μελέτη αυτή διαπιστώθηκε ότι η ενεργότητα της PON1(4-nitrophenylacetate) ήταν χαμηλότερη στους ασθενείς που υποβάλλονταν σε ΣΦΠΚ σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου, ενώ δεν υπήρχαν διαφορές στην ενεργότητα της PON1(phenylacetate). Ωστόσο, στη μελέτη αυτή συμμετείχε ένας μικρός μόνο αριθμός ασθενών (n=22), ενώ δεν έγινε διόρθωση για τα επίπεδα της ApoAI ή της HDL χοληστερόλης. Επιπρόσθετα, δεν προσδιορίστηκαν οι γονότυποι της PON1. Έτσι, είναι



πιθανό ότι ακόμη και μικρές διαφορές στην επίπτωση των γονοτύπων της PON1 μεταξύ των ατόμων της μελέτης μπορεί να επηρεάσουν σημαντικά τα αποτελέσματα, ιδίως όταν πρόκειται για μελέτη με τόσο μικρό αριθμό ασθενών.

Οι λόγοι για αυτή την αύξηση της ενεργότητας αλλά και της μάζας της PON1 στους ασθενείς που υποβάλλονταν σε ΣΦΠΚ σε σύγκριση τόσο με την ομάδα ελέγχου, όσο και με τους ασθενείς με ΠΤΧΝΑ και τους ασθενείς που υποβάλλονταν σε ΑΜΚ δεν είναι γνωστοί. Ωστόσο, στους ασθενείς που υποβάλλονται σε ΣΦΠΚ παρατηρείται μία αυξημένη μη ειδική παραγωγή πρωτεϊνών από το ήπαρ εξαιτίας της απώλειας σημαντικής ποσότητας λευκωμάτων από την περιτοναϊκή μεμβράνη, αλλά και εξαιτίας του αυξημένου φορτίου γλυκόζης, η οποία περιέχεται στα διαλύματα της περιτοναϊκής κάθαρσης^{20,439,453}. Έτσι, η αύξηση της παραγωγής της PON1 από το ήπαρ θα μπορούσε να είναι ο υποκείμενος μηχανισμός, δεδομένου ότι το ήπαρ αποτελεί την κύρια θέση σύνθεσης της PON1¹⁹¹. Επιπρόσθετα, μία πολύ πρόσφατη μελέτη έδειξε ότι η ιντερλευκίνη-6 επάγει την έκφραση του αγγελιοφόρου RNA (m-RNA) της PON1 από τα ηπατοκύτταρα και άρα και την ηπατική παραγωγή της PON1²³², ενώ είναι γνωστό ότι οι ασθενείς που υποβάλλονται σε ΣΦΠΚ έχουν αυξημένα επίπεδα ιντερλευκίνης-6⁴⁵⁴. Πρέπει επίσης να επισημανθεί ότι αυτή η αυξημένη ενεργότητα της PON1 στους ασθενείς που υποβάλλονταν σε ΣΦΠΚ θα μπορούσε να αποτελεί έναν αντιροπιστικό μηχανισμό προστασίας από τη χρόνια φλεγμονή, η οποία είναι συχνή σε αυτούς τους ασθενείς (αυξημένα επίπεδα της C-αντιδρώσας πρωτεΐνης⁴⁵⁵). Τέλος, η αυξημένη ενεργότητα της PON1 στους ασθενείς που υποβάλλονταν σε ΣΦΠΚ σε σύγκριση με εκείνους που υποβάλλονταν σε ΑΜΚ θα μπορούσε να εξηγηθεί από τα αποτελέσματα της ανάλυσης των παραγόντων που επηρεάζουν αυτή την ενεργότητα στις δύο ομάδες των ασθενών (κεφάλαιο 9.8). Έτσι διαπιστώθηκε ότι ο χρόνος από την ένταξη στην ΣΦΠΚ και όχι ο χρόνος από την ένταξη στην ΑΜΚ συσχετίζεται (και μάλιστα θετικά) με την ενεργότητα της PON1. Επομένως, φαίνεται ότι η ίδια η διαδικασία της ΣΦΠΚ με κάποιο άγνωστο μηχανισμό επάγει την αύξηση της μάζας και της ενεργότητας της PON1.

Στο σημείο αυτό πρέπει να τονισθεί ότι η αυξημένη ενεργότητα της PON1 [αλλά και της PAF-AH των HDL (κεφάλαιο 9.10)] στους ασθενείς που υποβάλλονται σε ΣΦΠΚ συμφωνεί με τα αποτελέσματα παλαιότερης μελέτης που έδειξε ότι οι HDL των ασθενών που υποβάλλονταν σε περιτοναϊκή κάθαρση ήταν πιο ανθεκτικές στην *in vitro* οξειδωση από τις HDL φυσιολογικών μαρτύρων και επιπρόσθετα ήταν το ίδιο ικανές στο να προστατεύουν την LDL από την οξειδωση σε σύγκριση πάντα με τις HDL υγιών

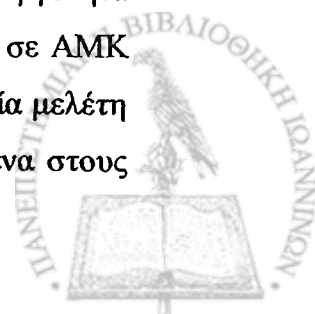


ατόμων²⁹⁷. Σε κάθε περίπτωση πάντως τα μειωμένα επίπεδα της HDL σε αυτούς τους ασθενείς πιθανά συνεπάγονται μειωμένη συνολική in vivo αντιοξειδωτική ικανότητα.

Οι ασθενείς που υποβάλλονταν σε AMK είχαν χαμηλότερη ενεργότητα της PON1(paraoxon) σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου (σχήμα 48). Αυτή η διαφορά στην ενεργότητα της PON1(paraoxon) θα μπορούσε να οφείλεται στη διαφορετική κατανομή των πολυμορφισμών της PON1 μεταξύ των ατόμων της μελέτης. Κάτι τέτοιο όμως δεν φαίνεται να ισχύει, αφού η σύγκριση της ενεργότητας της PON1(paraoxon) μεταξύ των ασθενών που υποβάλλονταν σε AMK και των υγιών μαρτύρων ανά συγκεκριμένους γονότυπους [που περιλαμβάνουν συνδυασμούς των δύο πολυμορφισμών (Q192R και M55L της PON1)] δεν οδήγησε σε μεταβολή αυτών των αποτελεσμάτων (σχήμα 49). Αντίθετα, μετά από τη διόρθωση για τα επίπεδα της ApoA1 ή της HDL χοληστερόλης, η ενεργότητα της PON1(paraoxon) δεν ήταν διαφορετική μεταξύ των υγιών ατόμων και των ατόμων που υποβάλλονταν σε AMK (πίνακας 29 και σχήμα 50). Η ενεργότητα της PON1(phenylacetate) δεν ήταν διαφορετική μεταξύ των υγιών ατόμων και των ασθενών που υποβάλλονταν σε AMK (σχήμα 51). Επιπρόσθετα, μετά από τη διόρθωση για τα επίπεδα της ApoA1 ή της HDL χοληστερόλης, η ενεργότητα της PON1(phenylacetate) ήταν υψηλότερη στους ασθενείς που υποβάλλονταν σε AMK σε σύγκριση με τους υγιείς μάρτυρες και τους ασθενείς με ΠΤΧΝΑ (πίνακας 29 και σχήμα 52).

Τα παραπάνω αποτελέσματα συμφωνούν με τις μελέτες που έδειξαν ότι η ενεργότητα της PON1(paraoxon) είναι μειωμένη στους ασθενείς που υποβάλλονται σε AMK σε σύγκριση με τους υγιείς μάρτυρες^{299,300}, ακόμη και αν η σύγκριση γίνει ανά γονότυπο της PON1^{303,308,309}. Στη μελέτη μας, ωστόσο, η ενεργότητα της PON1(paraoxon) μετά από τη διόρθωση για τα επίπεδα της ApoA1 ή της HDL χοληστερόλης δεν ήταν διαφορετική μεταξύ των υγιών ατόμων και των ασθενών που υποβάλλονταν σε AMK. Τα ευρήματα αυτά συμφωνούν με τα αποτελέσματα ορισμένων παλαιότερων μελετών^{301,304}. Αντίθετα, άλλες μελέτες έδειξαν ότι τα διορθωμένα επίπεδα της PON1(paraoxon) εξακολουθούν να είναι μειωμένα στους ασθενείς σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου^{304,305,306} ή με υπερλιπιδαιμικούς ασθενείς³⁰⁷.

Επιπρόσθετα, στη μελέτη μας η ενεργότητα της PON1(phenylacetate) δεν ήταν διαφορετική μεταξύ των υγιών ατόμων και εκείνων που υποβάλλονταν σε AMK, ενώ μετά τη διόρθωση για τα επίπεδα της ApoA1 ή της HDL χοληστερόλης, η ενεργότητα της PON1(phenylacetate) ήταν υψηλότερη στους ασθενείς που υποβάλλονταν σε AMK σε σύγκριση με τους υγιείς μάρτυρες. Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν με μία μελέτη που έδειξε ότι τα διορθωμένα επίπεδα της PON1(phenylacetate) είναι αυξημένα στους



ασθενείς σε σύγκριση με τους υγιείς μάρτυρες³⁰³. Αντίθετα, σε μία άλλη μελέτη παρατηρήθηκε μείωση της ενεργότητας της PON1(phenylacetate) στους ασθενείς που υποβάλλονταν σε AMK σε σύγκριση με τους υγιείς μάρτυρες.³⁰¹ Επιπρόσθετα, μία Ιαπωνική μελέτη έδειξε ότι η μάζα της PON1 ήταν κατά 62% μειωμένη στους ασθενείς σε σύγκριση με τους μάρτυρες, η οποία μείωση παρέμενε και μετά από τη διόρθωση για τα επίπεδα της HDL χοληστερόλης ή της ApoAI³¹⁰. Οι ειδικές όμως ενεργότητες (ενεργότητα/μάζα) της PON1(paraoxon) και της PON1(phenylacetate) ήταν αυξημένες στους ασθενείς σε σύγκριση με τα υγιή άτομα. Τέλος, έχει προταθεί ότι τα μειωμένα επίπεδα της HDL3 είναι υπεύθυνα για τη μείωση της ενεργότητας της PON1 στους ουραιμικούς ασθενείς³⁰⁸.

Συμπερασματικά, φαίνεται ότι η ενεργότητα της PON1(paraoxon) είναι γενικά μειωμένη στους ασθενείς που υποβάλλονται σε AMK σε σχέση με το γενικό πληθυσμό και αυτή η μείωση πιθανά συμβάλλει στην αυξημένη εμφάνιση καρδιαγγειακών συμβαμάτων σε αυτούς τους ασθενείς^{285,456}. Η μείωση αυτή της ενζυμικής ενεργότητας πιθανά οφείλεται στην ελάττωση των υποκλασμάτων των HDL³⁰⁸, στην υπερπαραγωγή υποχλωρικού οξέος (HOCl) και ελεύθερων ριζών οξυγόνου από τα ενεργοποιημένα ουδετερόφιλα, που μπορεί να οξειδώνουν αμινοξέα (όπως η τρυπτοφάνη) στο ενεργό κέντρο της PON1²⁹⁶, στην αύξηση των επιπέδων της οξειδωμένης LDL που έχει παρατηρηθεί σε αυτούς τους ασθενείς^{251,311} και στα αυξημένα τελικά προϊόντα προχωρημένης γλυκοζυλίωσης (advanced glycation end products, AGEs) που συσσωρεύονται στις πρωτεΐνες του πλάσματος και των ιστών των ουραιμικών ασθενών⁴⁵⁷ και αδρανοποιούν την PON1²⁵². Επιπρόσθετα, διαφορές στην εργαστηριακή μεθοδολογία μέτρησης της ενεργότητας της PON1, στα χρησιμοποιούμενα υποστρώματα της αντίδρασης, στα επίπεδα της HDL χοληστερόλης, στα υποκλάσματα της HDL ή στα επίπεδα της ApoAI, καθώς και στην καταγωγή των πληθυσμών που μελετήθηκαν ή στην επίπτωση των πολυμορφισμών της PON1 που επηρεάζουν την ενεργότητα του ενζύμου μπορούν να εξηγήσουν τα αντικρουόμενα αποτελέσματα των παραπάνω μελετών.

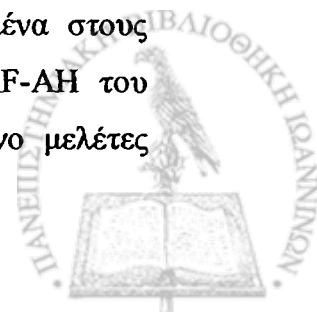
Τέλος, όσον αφορά τους ασθενείς με ΠΤΧΝΑ υπάρχει μία μόνο μελέτη που έδειξε ότι δεν υπάρχει διαφορά στην ενεργότητα της PON1 σε σύγκριση με τα φυσιολογικά άτομα³⁰². Στη δική μας μελέτη, οι ασθενείς με ΠΤΧΝΑ είχαν χαμηλότερη ενεργότητα της PON1(paraoxon) σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου (σχήμα 48). Αυτή η διαφορά στην ενεργότητα της PON1(paraoxon) θα μπορούσε να οφείλεται στη διαφορετική κατανομή των πολυμορφισμών της PON1 μεταξύ των ατόμων της μελέτης. Κάτι τέτοιο

όμως δεν φαίνεται να ισχύει, αφού η σύγκριση της ενεργότητας της PON1(paraoxon) μεταξύ των διαφόρων ομάδων ανά συγκεκριμένους γονότυπους [που περιλαμβάνουν συνδυασμούς των δύο πολυμορφισμών (Q192R και M55L της PON1)] δεν μετέβαλε τα αποτελέσματα (σχήμα 49). Αντίθετα, μετά από τη διόρθωση για τα επίπεδα της ApoA1 ή της HDL χοληστερόλης, η ενεργότητα της PON1(paraoxon) δεν ήταν διαφορετική μεταξύ των υγιών ατόμων και των ασθενών με ΠΤΧΝΑ (πίνακας 29 και σχήμα 50). Επιπρόσθετα, η ενεργότητα της PON1(phenylacetate) δεν ήταν διαφορετική μεταξύ των υγιών ατόμων και των ασθενών με ΠΤΧΝΑ (σχήμα 51), ενώ το ίδιο παρατηρήθηκε και μετά από τη διόρθωση για τα επίπεδα της ApoA1 ή της HDL χοληστερόλης (πίνακας 29 και σχήμα 52). Οι πιθανοί λόγοι της μείωσης της ενεργότητας της PON1 σε αυτούς τους ασθενείς είναι παρόμοιοι με αυτούς που έχουν ήδη περιγραφεί για τους ασθενείς που υποβάλλονταν σε AMK.

9.10. Η ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑ ΤΗΣ PAF-ΑΚΕΤΥΛΟΎΔΡΟΛΑΣΗΣ ΣΤΙΣ ΔΙΑΦΟΡΕΣ ΟΜΑΔΕΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Πρέπει να αναφερθεί ότι η ολική ενεργότητα της PAF-AH του ορού ήταν αυξημένη σε όλους τους ασθενείς της μελέτης σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου. Επιπρόσθετα, οι ασθενείς που υποβάλλονταν σε ΣΦΠΚ είχαν σημαντικά μεγαλύτερη ολική ενεργότητα της PAF-AH του ορού σε σύγκριση με τους ασθενείς που υποβάλλονταν σε AMK και οι τελευταίοι είχαν μεγαλύτερη ενεργότητα σε σύγκριση με τους ασθενείς με ΠΤΧΝΑ (πίνακας 30, σχήμα 53). Αυτές οι διαφορές θα μπορούσαν να αντανακλούν διαφορές στα επίπεδα της LDL χοληστερόλης ή της ApoB, αφού η PAF-AH του ορού είναι κυρίως συνδεδεμένη με τα LDL σωματίδια. Μετά από τη διόρθωση για τα επίπεδα της LDL χοληστερόλης και της ApoB, η ολική ενεργότητα της PAF-AH του ορού ήταν ιδιαίτερα αυξημένη στους ασθενείς που υποβάλλονταν σε AMK και ακολουθούσαν οι ασθενείς που υποβάλλονταν σε ΣΦΠΚ⁴³⁷, οι ασθενείς με ΠΤΧΝΑ και τέλος οι υγιείς μάρτυρες (πίνακας 30, σχήμα 54).

Υψηλά επίπεδα PAF-AH του πλάσματος σε συνδυασμό με υψηλά επίπεδα PAF στο πλάσμα και τα ούρα έχουν περιγραφεί σε ασθενείς με πρωτοπαθή σπειραματονεφρίτιδα χωρίς έκπτωση της νεφρικής λειτουργίας⁴⁰⁶. Αντίθετα, σε μια άλλη μελέτη που αφορούσε ασθενείς με IgA νεφροπάθεια τα επίπεδα του PAF στον ορό ήταν αυξημένα στους ασθενείς σε σύγκριση με τους υγιείς μάρτυρες, ενώ τα επίπεδα της PAF-AH του πλάσματος των ασθενών ήταν σημαντικά μειωμένα⁴⁰⁷. Υπάρχουν δύο μόνο μελέτες



αναφορικά με τα επίπεδα της PAF-AH στο πλάσμα ασθενών με τελικού σταδίου χρόνια νεφρική ανεπάρκεια. Έτσι, σε μια μελέτη δεν βρέθηκαν διαφορές στα επίπεδα της PAF-AH του πλάσματος σε ασθενείς που υποβάλλονταν σε αιμοκάθαρση σε σύγκριση με τους υγιείς μάρτυρες²⁹⁸. Αντίθετα, στη δεύτερη μελέτη τα επίπεδα της PAF-AH στο πλάσμα ήταν αυξημένα στους ασθενείς με μέτρια έκπτωση της νεφρικής λειτουργίας και στους αιμοκαθαρόμενους ασθενείς, ενώ η μεγαλύτερη αύξηση παρατηρήθηκε στους ασθενείς που υποβάλλονταν σε περιτοναϊκή κάθαρση, σε σύγκριση πάντα με τους υγιείς μάρτυρες⁴⁰⁸. Στη συγκεκριμένη μελέτη, η αύξηση της ολικής ενεργότητας της PAF-AH του ορού δεν συσχετιζόταν με τη μείωση της νεφρικής λειτουργίας⁴⁰⁸. Παρόμοια ήταν και τα δικά μας δεδομένα που έδειξαν ότι η ολική ενεργότητα της PAF-AH του ορού δεν συσχετίζεται με τα επίπεδα της κρεατινίνης του ορού ή με την κάθαρση της κρεατινίνης ($r=0.05$, $p=NS$) στους ασθενείς με ΠΤΧΝΑ ή με την υπολειπόμενη νεφρική λειτουργία στους ασθενείς που υποβάλλονταν σε ΑΜΚ και ΣΦΠΚ. Τέλος, αν και ενεργότητα PAF-AH έχει απομονωθεί τόσο στη φλοιώδη όσο και στη μυελώδη μοίρα του νεφρού⁴⁰³, αλλά και στα ούρα τόσο φυσιολογικών ατόμων όσο και ασθενών με νεφρική νόσο⁴⁰⁴, τα επίπεδα της PAF-AH του πλάσματος σε ανεφρικούς ασθενείς είναι φυσιολογικά ή και αυξημένα, γεγονός που υποσημαίνει ότι ο νεφρός δεν αποτελεί σημαντική πηγή παραγωγής της PAF-AH του πλάσματος⁴⁰⁵.

Εναλλακτικά, η αύξηση της ολικής ενεργότητας της PAF-AH του ορού στους ασθενείς με νεφρική ανεπάρκεια θα μπορούσε να οφείλεται στην περίσσεια κυτταροκινών που ευοδώνουν τη φλεγμονή, η οποία παρατηρείται σε αυτούς τους ασθενείς. Ωστόσο, οι περισσότερες κυτταροκίνες [ιντερφερόνη γ (IFN- γ), παράγοντας νέκρωσης των όγκων (TNF- α) και οι ιντερλευκίνες 1, 6 και 8 (IL-1, IL-6 και IL-8)] προκαλούν ισχυρή αναστολή της παραγωγής και της έκκρισης της PAF-AH του πλάσματος³⁵⁰. Ο μόνος διαβιβαστής της φλεγμονής που προκαλεί αύξηση της σύνθεσης του ενζύμου σε κυτταροκαλλιέργειες μακροφάγων και ηπατοκυττάρων είναι ο ίδιος ο PAF³⁵¹. Έτσι, τα αυξημένα επίπεδα του PAF που έχουν περιγραφεί σε ασθενείς με νεφρικά νοσήματα^{405,406,407,458,459} θα μπορούσαν να ευθύνονται για τα αυξημένα επίπεδα της PAF-AH του πλάσματος αυτών των ασθενών. Επιπρόσθετα, οι ασθενείς της μελέτης μας είχαν υψηλότερη αρτηριακή πίεση σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου και έχει περιγραφεί αύξηση της ενεργότητας της PAF-AH σε ασθενείς⁴⁶⁰ ή πειραματόζωα⁴⁶¹ με υπέρταση. Επίσης, όπως ήδη αναφέρθηκε, στους ασθενείς που υποβάλλονται σε ΣΦΠΚ υπάρχει μία αυξημένη μη ειδική παραγωγή πρωτεϊνών από το ήπαρ εξαιτίας της απώλειας σημαντικής ποσότητας λευκομάτων από την περιτοναϊκή μεμβράνη, αλλά και εξαιτίας της αυξημένης

απορρόφησης γλυκόζης, η οποία περιέχεται στα διαλύματα της περιτοναϊκής κάθαρσης^{20,439}. Έτσι, μία αυξημένη παραγωγή της PAF-AH από το ήπαρ θα μπορούσε να είναι ο υποκείμενος μηχανισμός που μπορεί να ερμηνεύσει την μεγαλύτερη αύξηση της PAF-AH του ορού σε αυτούς τους ασθενείς, αν και το μεγαλύτερο μέρος της PAF-AH που παράγεται από τα ηπατοκύτταρα εκκρίνεται στη χολή και όχι στο πλάσμα (κεφάλαιο 6.1.5).

Ένας άλλος πιθανός μηχανισμός που μπορεί να εξηγήσει την αύξηση της ολικής ενεργότητας της PAF-AH του ορού στους ασθενείς της μελέτης μας και ιδιαίτερα στους ασθενείς που υποβάλλονταν σε ΣΦΠΚ είναι η αύξηση των επιπέδων της LDL και της ApoB. Πραγματικά, η πολυπαραγοντική ανάλυση των δεδομένων έδειξε ότι τα επίπεδα της ApoB ήταν ο μόνος παράγοντας που συσχετιζόταν ανεξάρτητα με την ολική ενεργότητα της PAF-AH του ορού. Αν και η επίδραση των λιπιδίων στην παραγωγή της PAF-AH του πλάσματος δεν έχει καθορισθεί με σαφήνεια, φαίνεται ότι ο μεταβολισμός των λιποπρωτεϊνών συμβάλλει σημαντικά στη διαμόρφωση της ενεργότητας του πλάσματος, αφού επηρεάζει τον καταβολισμό του ενζύμου. Έτσι, μια πρόσφατη μελέτη έδειξε ότι ο ρυθμός καταβολισμού των λιποπρωτεϊνών που περιέχουν απολιποπρωτεΐνη Β είναι ο σημαντικότερος ρυθμιστικός παράγοντας της ενεργότητας της PAF-AH του πλάσματος³⁴⁴. Σε αυτό το πλαίσιο, οι ασθενείς με διαταραχές του μεταβολισμού των λιπιδίων που χαρακτηρίζονται από μείωση της κάθαρσης των LDL (οικογενής υπερχοληστερολαιμία) εμφανίζουν σημαντικά υψηλότερη ενεργότητα της PAF-AH στο πλάσμα σε σύγκριση με τους υγιείς μάρτυρες³⁴⁵. Πράγματι, στις περισσότερες μελέτες η ενεργότητα του ενζύμου στο πλάσμα συσχετιζόταν θετικά με τα επίπεδα της ολικής και LDL χοληστερόλης, καθώς και με τις συγκεντρώσεις της απολιποπρωτεΐνης Β³⁴⁶. Επιπρόσθετα, μελέτες έδειξαν ότι η σύνθεση της PAF-AH από τα μακροφάγα αυξάνεται όταν αυτά επωασθούν με ορό³⁴¹ και υπάρχουν δεδομένα που δείχνουν ότι η LDL του ορού είναι υπεύθυνη για αυτή την αύξηση³⁴². Η απόψη αυτή υποστηρίζεται από το γεγονός ότι ο ορός που προέρχεται από ασθενείς με δυσλιπιδαιμία προκαλεί σημαντικά μεγαλύτερη αύξηση της παραγωγής του ενζύμου σε σύγκριση με ορό από νορμολιπιδαιμικά άτομα³⁴³. Έναλλακτικά, είναι γνωστό ότι τα επίπεδα της οξειδωμένης LDL είναι αυξημένα στους ασθενείς με νεφρική ανεπάρκεια^{462,463}, ενώ η οξειδωμένη LDL περιέχει PAF⁴⁶⁴, ο οποίος με τη σειρά του διεγείρει την παραγωγή της PAF-AH³⁵¹. Επομένως, τα αυξημένα επίπεδα LDL στους ασθενείς που υποβάλλονται σε ΣΦΠΚ πιθανά διεγείρουν την παραγωγή της PAF-AH από τις κυτταρικές πηγές της. Αντίθετα, μετά από τη διόρθωση για τα επίπεδα της LDL χοληστερόλης και της ApoB, η ολική ενεργότητα της PAF-AH του ορού ήταν



ιδιαίτερα αυξημένη στους ασθενείς που υποβάλλονταν σε AMK και ακολουθούσαν οι ασθενείς που υποβάλλονταν σε ΣΦΠΚ, οι ασθενείς με ΠΤΧΝΑ και τέλος οι υγιείς μάρτυρες (πίνακας 30, σχήμα 54). Με άλλα λόγια, τα σωματίδια των LDL είχαν μεγαλύτερη ενεργότητα PAF-AH στους ασθενείς που υποβάλλονταν σε AMK σε σύγκριση με τους ασθενείς που υποβάλλονταν σε ΣΦΠΚ. Οι λόγοι για αυτή τη διαφορά δεν είναι γνωστοί, αλλά φαίνεται ότι εκτός από τα επίπεδα της ApoB και της LDL, το ίδιο ουραιμικό περιβάλλον και ο τύπος της εξωνεφρικής κάθαρσης διαδραματίζουν καθοριστικό ρόλο στην αύξηση της ολικής ενεργότητας της PAF-AH του ορού.

Η δεύτερη σημαντική παρατήρηση της μελέτης μας ήταν ότι η ενεργότητα της PAF-AH των HDL ήταν μεγαλύτερη στους ασθενείς που υποβάλλονταν σε ΣΦΠΚ⁴³⁷ και σε AMK σε σύγκριση με τους υγιείς μάρτυρες και τους ασθενείς με ΠΤΧΝΑ (πίνακας 30 και σχήμα 55). Επιπρόσθετα, η διορθωμένη για τα επίπεδα της HDL χοληστερόλης ή της ApoAI ενεργότητα της PAF-AH των HDL ήταν μεγαλύτερη στους ασθενείς που υποβάλλονταν σε AMK και ακολουθούσαν οι ασθενείς που υποβάλλονταν σε ΣΦΠΚ (πίνακας 30, σχήμα 56).

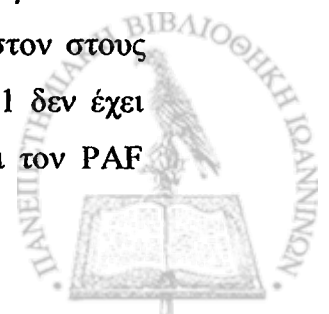
Οι λόγοι για αυτή την αύξηση της ενεργότητας της PAF-AH των HDL των ασθενών που υποβάλλονταν σε εξωνεφρική κάθαρση σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου και με τα άτομα με ΠΤΧΝΑ δεν είναι γνωστοί. Η πολυπαραγοντική ανάλυση των δεδομένων έδειξε ότι οι παράγοντες που ανεξάρτητα επηρεάζουν την ενεργότητα της HDL-PAF AH στους ασθενείς που υποβάλλονταν σε AMK ήταν τα επίπεδα της ApoE του ορού, τα επίπεδα των τριγλυκεριδίων του ορού, ο χρόνος από την ένταξη στην AMK και όχι τα επίπεδα της HDL χοληστερόλης. Επομένως, διαφορές στα επίπεδα της HDL χοληστερόλης ή στα επίπεδα των τριγλυκεριδίων (δεδομένου ότι η συσχέτιση με τα τελευταία είναι αρνητική) δεν μπορούν να εξηγήσουν αυτήν την αύξηση της ενεργότητας της HDL-PAF AH.

Αντίθετα, μία πολύ ενδιαφέρουσα παρατήρηση, η οποία γίνεται για πρώτη φορά στη βιβλιογραφία, είναι ότι τα επίπεδα της ApoE του ορού συσχετίζονταν θετικά και ανεξάρτητα με την ενεργότητα της HDL-PAF AH (σχήματα 58-60) στους ασθενείς της μελέτης (αλλά όχι στα υγιή άτομα), ενώ δεν βρέθηκε καμία παρόμοια συσχέτιση με την ολική ενεργότητα της PAF AH (κεφάλαιο 8.16.1). Επιπρόσθετα, η ολική ενεργότητα της PAF-AH του ορού ή της HDL-PAF AH δεν συσχετίζονταν σημαντικά με τους πολυμορφισμούς της ApoE σε καμία από τις ομάδες της μελέτης. Όπως είναι γνωστό, η PAF-AH συνδέεται στο πλάσμα κυρίως με τις LDL (και κυρίως με τις μικρές πυκνές αθηρογόνες LDL) και λιγότερο (<20%) με τις HDL (και μάλιστα με το υποκλάσμα εκείνο των HDL που ανήκει στις VHDL-1 και επίσης περιέχει ApoE)³³³. Κατά συνέπεια, τα

αυξημένα επίπεδα της ApoE στον ορό και ενδεχομένως στο συγκεκριμένο υποκλάσμα των HDL θα μπορούσαν να αυξήσουν την ικανότητα σύνδεσης της PAF-AH με αυτό το υποκλάσμα των HDL και επομένως και την ενεργότητα της HDL-PAF AH. Εναλλακτικά, η ApoE πιθανά έχει την ικανότητα να επάγει την παραγωγή από τα μακροφάγα ή τα ηπατοκύτταρα μίας μορφής της PAF-AH που μπορεί στη συνέχεια να συνδέεται με τις HDL. Πραγματικά, η ApoE είναι ένα πολυδύναμο μόριο που ασκεί σημαντικές επιδράσεις στον κυτταρικό μεταβολισμό^{36,465}. Σε κάθε περίπτωση, η παραπάνω παρατήρηση χρειάζεται εργαστηριακή μελέτη και επιβεβαίωση.

Πρέπει να αναφερθεί ότι η γλυκοζυλίωση διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη σύνδεση του ενζύμου με ορισμένα λιποπρωτεϊνικά σωματίδια, αφού αναστέλλει τη σύνδεσή του με τις HDL και ευνοεί τη σύνδεσή του με τις λιποπρωτεΐνες που περιέχουν ApoB³²⁴. Επομένως, διαφορετικοί βαθμοί γλυκοζυλίωσης του ενζύμου στους ασθενείς με ΤΣΧΝΑ θα μπορούσαν να ευθύνονται για την αύξηση της ενεργότητας της HDL-PAF AH. Επιπρόσθετα, ο τύπος της εξωνεφρικής κάθαρσης πιθανά επηρεάζει την ενεργότητα της HDL-PAF AH, αφού ο χρόνος από την ένταξη στην AMK αποτελεί ανεξάρτητο παράγοντα που επηρεάζει την ενζυμική ενεργότητα και μπορεί να εξηγήσει τη μεγαλύτερη ενεργότητα της HDL-PAF AH που διαπιστώθηκε στους ασθενείς που υποβάλλονταν σε AMK σε σύγκριση με τους ασθενείς που υποβάλλονταν σε ΣΦΠΚ. Τέλος, αυτή η αύξηση της ενεργότητας της PAF-AH των HDL θα μπορούσε να είναι ένας μηχανισμός προστασίας από το αυξημένο οξειδωτικό stress που παρατηρείται στους ουραιμικούς ασθενείς.

Πρέπει να σημειωθεί ότι η δραστηριότητα PAF-AH των HDL μπορεί να οφείλεται σε τρία διαφορετικά ένζυμα, τα οποία έχουν την ικανότητα να υδρολύουν τον PAF και τα οξειδωμένα φωσφολιπίδια *in vitro*: την παραοξονάση-1 (PON-1), την λεκιθινοχοληστερολ-ακυλοτρανσφεράση (LCAT) και τέλος την ίδια την PAF-AH. Η συνεισφορά του καθενός από τα τρία ένζυμα σε αυτές τις δράσεις δεν είναι γνωστή και μάλιστα αποτελεί αντικείμενο έντονων διαφωνιών στη βιβλιογραφία. Έτσι, διατυπώθηκε η άποψη ότι οι HDL δεν περιέχουν πραγματική PAF-AH και ότι η ικανότητά τους να υδρολύουν τον PAF οφείλεται αποκλειστικά στην PON1³⁸⁵. Επιπρόσθετα, υπάρχουν δεδομένα ότι οι πολυμορφισμοί της PON-1 επηρεάζουν σημαντικά την PAF-AH ικανότητα των HDL σε υγιή άτομα³⁸⁶. Επομένως, η αυξημένη ενεργότητα της HDL-PAF AH θα μπορούσε να οφείλεται στην αυξημένη ενεργότητα PON1, η οποία διαπιστώθηκε τουλάχιστον στους ασθενείς που υποβάλλονταν σε ΣΦΠΚ. Ωστόσο, μελέτες έδειξαν ότι η PON1 δεν έχει ιδιότητες ακετυλοϋδρολάσης του PAF και ότι η ικανότητά της να υδρολύει τον PAF



οφείλεται στην παρουσία προσμίξεων PAF-AH κατά τη διάρκεια της πειραματικής απομόνωσης της PON1³⁸⁷. Επιπρόσθετα, διαγονιδιακά ποντίκια τα οποία δεν εκφράζουν PON-1 εμφανίζουν φυσιολογική ενεργότητα της PAF-AH των HDL²⁵³, ενώ η HDL από ασθενείς ομόζυγους για τη μετάλλαξη Val²⁷⁹→Phe, η οποία προκαλεί πλήρη εξάλειψη της ενεργότητας της PAF-AH τόσο στο πλάσμα όσο και στις HDL, αν και έχει φυσιολογική ενεργότητα PON1, δεν εμφανίζει καμία υδρολυτική δράση τόσο κατά του PAF όσο και κατά των οξειδωμένων φωσφολιπιδίων³⁸⁷. Επίσης, η υπόθεση ότι η ενεργότητα της HDL-PAF AH οφείλεται στην PON1 δεν μπορεί να εξηγήσει γιατί οι ασθενείς που υποβάλλονταν σε AMK είχαν τη μεγαλύτερη ενεργότητα της HDL-PAF AH, αλλά ταυτόχρονα και τη μικρότερη ενεργότητα της PON1. Τέλος, οι πολυμορφισμοί της PON1 δεν συσχετίστηκαν με την ενεργότητα της HDL-PAF AH στους ασθενείς που υποβάλλονταν σε AMK (πίνακας 31). Τα παραπάνω δεδομένα δείχνουν ότι, τουλάχιστο στους ασθενείς με ΤΣΧΝΑ, η αύξηση της ενεργότητας της HDL-PAF AH οφείλεται στον εμπλουτισμό των HDL με «πραγματική» PAF AH.

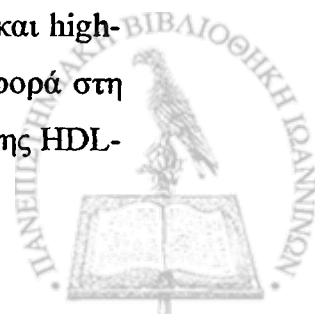
Παρά το γεγονός ότι οι ασθενείς που υποβάλλονται σε εξωνεφρική κάθαρση έχουν μεγαλύτερη επίπτωση αθηρωματικής νόσου, τρεις μελέτες έδειξαν ότι οι HDL ασθενών που υποβάλλονταν σε αιμοκάθαρση^{295,296} και οι HDL ασθενών που υποβάλλονταν σε περιτοναϊκή κάθαρση²⁹⁷ ήταν πιο ανθεκτικές στην *in vitro* οξείδωση από τις HDL φυσιολογικών μαρτύρων και επιπρόσθετα ήταν το ίδιο ικανές στο να προστατεύουν τις LDL από την οξείδωση σε σύγκριση πάντα με τις HDL υγιών ατόμων. Αντίθετα, σε μια άλλη μελέτη βρέθηκε ότι οι HDL ασθενών που υποβάλλονταν σε αιμοκάθαρση ασκούσε μειωμένη προστατευτική δράση στην οξείδωση των LDL²⁹⁸. Ο εμπλουτισμός των HDL με PAF AH θα μπορούσε να εξηγήσει ως ένα βαθμό αυτή την αντίσταση των HDL στην οξείδωση. Σε κάθε περίπτωση πάντως τα μειωμένα επίπεδα της HDL σε ασθενείς με χρόνια νεφρική ανεπάρκεια πιθανά συνεπάγονται μειωμένη συνολική *in vivo* αντιοξειδωτική ικανότητα.

Από τα δεδομένα που αναφέρθηκαν στα κεφάλαια 6.2.2 και 6.2.3 φαίνεται ότι η PAF-AH των LDL (που αντιπροσωπεύεται από την ολική ενεργότητα της PAF-AH του ορού) διαδραματίζει πιθανά έναν ευοδωτικό ρόλο στην αθηρωματική διαδικασία, ενώ η PAF-AH των HDL ασκεί σημαντικές αντιαθηρογόνες δράσεις και προστατεύει από την εμφάνιση της στεφανιαίας νόσου⁴⁶⁶. Έτσι, έχει διατυπωθεί η άποψη ότι ο λόγος HDL-PAF AH/ολική PAF-AH θα μπορούσε να είναι ένας δείκτης της βαρύτητας της υπερχοληστερολαιμίας και πιθανά της αθηρωματικής διαδικασίας³⁴². Σε αυτό το πλαίσιο εξετάστηκε η σχέση HDL-PAF AH/ολική PAF-AH στα άτομα των διαφόρων ομάδων της

μελέτης μας και διαπιστώθηκε ότι η σχέση αυτή ήταν μικρότερη στους ασθενείς που υποβάλλονταν σε ΣΦΠΚ⁴³⁷ και στους ασθενείς με ΠΤΧΝΑ σε σύγκριση με τους ασθενείς που υποβάλλονταν σε ΑΜΚ και τους υγιείς μάρτυρες (πίνακας 30, σχήμα 57). Η παραπάνω διαφορά θα μπορούσε να συνεισφέρει στην αυξημένη επίπτωση καρδιαγγειακών συμβαμάτων στους ασθενείς με νεφρική ανεπάρκεια¹⁷ και ιδιαίτερα στους ασθενείς που υποβάλλονται σε ΣΦΠΚ⁴⁶⁷.

9.11. ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΜΙΑΣ ΣΥΝΕΔΡΙΑΣ ΑΙΜΟΚΑΘΑΡΣΗΣ ΚΑΙ ΤΟΥ ΤΥΠΟΥ ΤΗΣ ΜΕΜΒΡΑΝΗΣ ΤΟΥ ΦΙΛΤΡΟΥ ΣΤΗΝ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑ ΤΗΣ PON1 ΚΑΙ ΤΗΣ PAF-AH

Οι ασθενείς που υποβάλλονταν σε ΑΜΚ με κυτταρινικού τύπου μεμβράνη και οι ασθενείς που υποβάλλονταν σε ΑΜΚ με συνθετικού τύπου low-flux μεμβράνη δεν διέφεραν σημαντικά ως προς τα βασικά κλινικά χαρακτηριστικά, τις τιμές των λιπιδαιμικών παραμέτρων ή τις ενεργότητες της PON1, της ολικής PAF-AH και της HDL-PAF AH (πίνακας 34). Πρέπει να σημειωθεί ότι υπάρχουν αρκετά αντικρουόμενες απόψεις στη βιβλιογραφία σχετικά με την επίδραση της μεμβράνης του φίλτρου στις λιπιδαιμικές παραμέτρους του ορού αυτών των ασθενών. Για παράδειγμα, μία μελέτη έδειξε ότι η ΑΜΚ με συνθετικού τύπου μεμβράνη συνοδεύεται από υψηλότερα επίπεδα HDL χοληστερόλης και ApoA1 σε σύγκριση με την ΑΜΚ με κυτταρινικού τύπου μεμβράνη⁴⁶⁸. Επιπρόσθετα, η ΑΜΚ με συνθετικές high-flux μεμβράνες συσχετίζονταν με μείωση των τριγλυκεριδίων⁴⁶⁹ ή και αύξηση των επιπέδων της HDL χοληστερόλης⁴⁷⁰ του ορού σε σύγκριση με την ΑΜΚ με κυτταρινικού τύπου μεμβράνη. Η καλύτερη διαπερατότητα των συνθετικών μεμβρανών και άρα η απομάκρυνση πιθανών αναστολέων της λιποπρωτεϊνικής λιπάσης (LPL), καθώς και η μεγαλύτερη βιοσυμβατότητα τους, η οποία πιθανά οδηγεί σε μειωμένη παραγωγή κυτταροκινών που αναστέλλουν την LPL, προτάθηκαν για να ερμηνεύσουν τα παραπάνω ευρήματα. Επίσης, διαφορές μεταξύ των κυτταρινικών low-flux μεμβρανών όσον αφορά την ικανότητα κάθαρσης των μεγάλου μοριακού βάρους μορίων μπορούν να οδηγήσουν σε μεταβολές του λιπιδαιμικού προφίλ των ασθενών⁴⁷¹. Αντίθετα, σε άλλες μελέτες δεν υπήρχαν σημαντικές διαφορές στις λιπιδαιμικές παραμέτρους μεταξύ high-flux συνθετικών μεμβρανών και κυτταρινικού τύπου μεμβρανών⁴⁷² ή μεταξύ low- και high-flux συνθετικών μεμβρανών⁴⁷³. Τέλος, στη δική μας μελέτη έγινε για πρώτη φορά στη βιβλιογραφία σύγκριση των ενεργοτήτων της PON1, της ολικής PAF-AH και της HDL-



PAF AH μεταξύ συνθετικών και κυτταρινικών μεμβρανών και, όπως αναφέρθηκε, δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές.

Επιπρόσθετα, υπάρχουν λίγες αναφορές στη βιβλιογραφία για τις μεταβολές των λιπιδαιμικών παραμέτρων του ορού πριν και μετά μία συνεδρία AMK με πολλές φορές αντικρουόμενα αποτελέσματα^{474,475}. Στη δική μας μελέτη, όπως φαίνεται στους πίνακες 35 και 36, δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές μεταβολές στις τιμές των λιπιδαιμικών παραμέτρων του ορού, καθώς και των ενεργοτήτων της PON1(paraoxon), PON1(phenylacetate) και ολικής PAF-AH του ορού κατά τη διάρκεια της AMK σε καμία από τις δύο ομάδες των ασθενών. Εντούτοις, παρατηρήθηκε μία σημαντική αύξηση της ενεργότητας της HDL-PAF AH κατά τη διάρκεια της AMK και στις δύο ομάδες των ασθενών, η οποία αύξηση παρέμενε σημαντική ακόμη και μετά από τη διόρθωση της ενεργότητας της HDL-PAF AH για τα επίπεδα της HDL χοληστερόλης (σχήματα 62 και 63). Αξίζει, τέλος, να σημειωθεί ότι αυτή η αύξηση της διορθωμένης ενεργότητας της HDL-PAF AH ήταν μεγαλύτερη στους ασθενείς που υποβάλλονταν σε AMK με συνθετικού τύπου μεμβράνες (+50%) σε σύγκριση με τους ασθενείς που υποβάλλονταν σε AMK με κυτταρινικού τύπου μεμβράνες (+38%, $p=0.01$ για τη σύγκριση της ποσοστιαίας αύξησης της ενεργότητας της HDL-PAF AH μεταξύ των δύο ομάδων)⁴³⁸. Σε μία παλαιότερη μελέτη δεν παρατηρήθηκε σημαντική μεταβολή της ολικής ενεργότητας της PAF-AH του ορού κατά τη διάρκεια μίας συνεδρίας AMK⁴⁰⁸, αλλά σε καμία μελέτη δεν εκτιμήθηκαν οι μεταβολές των ενεργοτήτων της PON1 και της HDL-PAF AH κατά τη διάρκεια της AMK.

Οι λόγοι για αυτή την αύξηση της ενεργότητας της HDL-PAF AH κατά τη διάρκεια μίας συνεδρίας AMK δεν είναι γνωστοί. Δεδομένου ότι δεν παρατηρήθηκε μεταβολή της ολικής ενεργότητας της PAF-AH του ορού, πρέπει να υποθέσουμε ότι παρατηρείται κάποιου βαθμού ανακατανομή της PAF-AH από τις λιποπρωτεΐνες που περιέχουν ApoB προς τις HDL κατά τη διάρκεια της AMK. Εναλλακτικά, η μείωση της συγκέντρωσης κάποιου άγνωστου αναστολέα της ενεργότητας της HDL-PAF AH κατά τη διάρκεια μίας συνεδρίας AMK θα μπορούσε να ευθύνεται για αυτή την αύξηση. Επιπρόσθετα, δεν είναι επακριβώς γνωστοί οι λόγοι για τη μεγαλύτερη ποσοστιαία αύξηση της HDL-PAF AH στους ασθενείς που υποβάλλονταν σε AMK με συνθετικού τύπου μεμβράνες σε σύγκριση με τους ασθενείς που υποβάλλονταν σε AMK με κυτταρινικού τύπου μεμβράνες. Όπως είναι γνωστό, οι συνθετικές μεμβράνες είναι περισσότερο βιοσυμβατές σε σύγκριση με τις κυτταρινικού τύπου μεμβράνες και επομένως προκαλούν μικρότερη παραγωγή κυτταροκινών, οι οποίες με τη σειρά τους αναστέλλουν την HDL-PAF AH³⁵⁰.

Δεν είναι γνωστό εάν αυτή η διαφορετική αύξηση της HDL-PAF ΑΗ μεταφράζεται και σε κλινικό όφελος, δηλαδή σε μείωση των καρδιαγγειακών συμβαμάτων. Για να απαντηθεί αυτό το ερώτημα απαιτούνται προοπτικές μελέτες με μεγάλους αριθμούς ασθενών. Τέλος, αυτή η αύξηση της HDL-PAF ΑΗ που παρατηρείται κατά τη διαδικασία της ΑΜΚ πιθανά συμμετέχει στην αύξηση της ενεργότητας της HDL-PAF ΑΗ στους ασθενείς που υποβάλλονται σε ΑΜΚ σε σύγκριση με τους ασθενείς που υποβάλλονται σε ΣΦΠΚ (κεφάλαιο 9.10).



ΚΕΦΑΛΑΙΟ 10^ο

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στην παρούσα μελέτη:

1. Επιβεβαιώθηκαν τα ευρήματα παλαιότερων μελετών όσον αφορά τις διαταραχές του μεταβολισμού των λιποπρωτεϊνών σε ασθενείς με χρόνια νεφρική νόσο. Επιπρόσθετα, αναδείχθηκε η αύξηση των επιπέδων της ApoE του ορού, που αποτελεί μία σημαντική διαταραχή του μεταβολισμού των λιποπρωτεϊνών σε αυτούς τους ασθενείς.

2. Μελετήθηκε για πρώτη φορά σε Ελληνικό πληθυσμό η επίδραση των πολυμορφισμών της ApoE στις λιπιδαιμικές παραμέτρους του ορού και βρέθηκε ότι αυτή η επίδραση δεν διέφερε γενικά από εκείνη που έχει περιγραφεί σε άλλους πληθυσμούς. Επιπρόσθετα, εξετάστηκε για πρώτη φορά σε Ελληνικό πληθυσμό η συνδυασμένη επίδραση των πολυμορφισμών και της συγκέντρωσης της ApoE στο λιπιδαιμικό προφίλ υγιών ατόμων και διαπιστώθηκε ότι τα επίπεδα της ApoE αποτελούν σημαντικό παράγοντα που επηρεάζει τις λιπιδαιμικές παραμέτρους αυτών των ατόμων και μάλιστα ανεξάρτητα από τους πολυμορφισμούς της ApoE. Ο συνδυασμός των πολυμορφισμών και της συγκέντρωσης της ApoE μπορεί να εξηγήσει ένα πολύ μεγαλύτερο ποσοστό της μεταβλητότητας των λιπιδαιμικών παραμέτρων σε σύγκριση με τη μεταβλητότητα που συσχετίζεται μόνο με τους γονιδιακούς πολυμορφισμούς. Τέλος, η συχνότητα του αλληλίου ε4 στον υγιή πληθυσμό μας είναι μεγαλύτερη από αυτή που έχει αναφερθεί σε άλλες μελέτες στον Ελληνικό πληθυσμό.

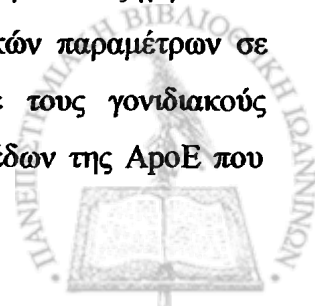
3. Εξετάστηκε για πρώτη φορά στη βιβλιογραφία η επίδραση των πολυμορφισμών της ApoE στη νεφρική λειτουργία υγιών ατόμων. Συγκεκριμένα, το αλληλίο ε2 συσχετίστηκε με αυξημένα επίπεδα κρεατινίνης του ορού και μειωμένο προβλεπόμενο ρυθμό σπειραματικής διήθησης σε σύγκριση με το αλληλίο ε3 ή το αλληλίο ε4. Η συσχέτιση αυτή παρατηρήθηκε και στα δύο φύλα και μάλιστα ήταν ανεξάρτητη από την επίδραση άλλων παραγόντων που επηρεάζουν τη νεφρική λειτουργία. Επιπρόσθετα, το αλληλίο ε4 συσχετίστηκε με μειωμένα επίπεδα κρεατινίνης του ορού και υψηλότερο προβλεπόμενο ρυθμό σπειραματικής διήθησης σε σύγκριση με το αλληλίο ε3, αν και αυτή η διαφορά δεν ήταν στατιστικά σημαντική.



4. Εξετάσθηκε για πρώτη φορά σε Ελληνικό πληθυσμό η επίπτωση των πολυμορφισμών της ApoE σε ασθενείς με τελικό στάδιο χρόνιας νεφρικής ανεπάρκειας και διαπιστώθηκε ότι το αλληλίο ε4 και οι πολυμορφισμοί ApoE4/3 και 4/4 υποεκφράζονται στους ασθενείς με τελικό στάδιο χρόνιας νεφρικής ανεπάρκειας σε σύγκριση με τους υγιείς μάρτυρες της ίδιας ηλικίας και φύλου. Αυτή η διαφορά πιθανά συσχετίζεται με τις ενδεχόμενες νεφροπροστατευτικές ιδιότητες του αλληλίου ε4 ή με την αυξημένη καρδιαγγειακή νοσηρότητα και θνησιμότητα των ασθενών που έχουν αυτό το αλληλίο.

5. Εξετάσθηκε για πρώτη φορά σε Ελληνικό πληθυσμό η επίδραση των πολυμορφισμών της ApoE στο λιπιδαιμικό προφίλ ασθενών που υποβάλλονταν σε αιμοκάθαρση ή συνεχή φορητή περιτοναϊκή κάθαρση και για πρώτη φορά στη βιβλιογραφία σε ασθενείς με προτελικό στάδιο χρόνιας νεφρικής ανεπάρκειας. Η παρουσία του αλληλίου ε2 στους ασθενείς που υποβάλλονταν σε αιμοκάθαρση συσχετίστηκε με χαμηλότερα επίπεδα χοληστερόλης (ολικής, LDL και non HDL) και χαμηλότερα επίπεδα τριγλυκεριδίων, καθώς και υψηλότερα επίπεδα ApoE του ορού σε σύγκριση αντίστοιχα με τους ασθενείς που είχαν το αλληλίο ε3 ή το αλληλίο ε4. Επιπρόσθετα, η απουσία του αλληλίου ε4 στους ασθενείς που υποβάλλονταν σε συνεχή φορητή περιτοναϊκή κάθαρση ή βρίσκονταν στο προτελικό στάδιο χρόνιας νεφρικής ανεπάρκειας συσχετίστηκε με χαμηλότερα επίπεδα χοληστερόλης (ολικής, LDL και non HDL) και χαμηλότερα επίπεδα τριγλυκεριδίων, καθώς και υψηλότερα επίπεδα ApoE του ορού σε σύγκριση με τους ασθενείς που είχαν το αλληλίο ε4. Τέλος, η μελέτη μας έδειξε ότι η νεφρική ανεπάρκεια αποτελεί εκλυτικό παράγοντα για την εμφάνιση της υπερλιποπρωτεϊναιμίας τύπου III σε ομόζυγους ApoE2/2 ασθενείς.

6. Εξετάσθηκε για πρώτη φορά στη βιβλιογραφία η επίδραση των επιπέδων της ApoE στον ορό στις λιπιδαιμικές παραμέτρους ασθενών με χρόνια νεφρικά νοσήματα, καθώς και η συνδυασμένη επίδραση των πολυμορφισμών και της συγκέντρωσης της ApoE σε αυτές τις παραμέτρους. Η μελέτη μας έδειξε ότι τα επίπεδα της ApoE επηρεάζουν το λιπιδαιμικό προφίλ αυτών των ασθενών ανεξάρτητα και πιο σημαντικά από τους πολυμορφισμούς της ApoE, ενώ ο συνδυασμός των επιπέδων και των πολυμορφισμών της ApoE μπορεί να εξηγήσει ένα πολύ μεγαλύτερο ποσοστό της μεταβλητότητας των λιπιδαιμικών παραμέτρων σε σύγκριση με τη μεταβλητότητα που συσχετίζεται μόνο με τους γονιδιακούς πολυμορφισμούς. Πρέπει να αναφερθεί ότι η αύξηση των επιπέδων της ApoE που



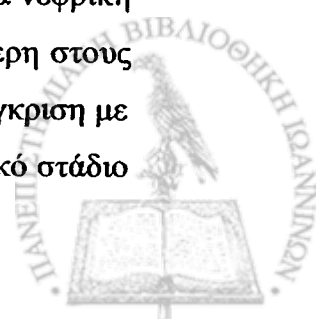
παρατηρείται στους ασθενείς με χρόνια νεφρική ανεπάρκεια πιθανά διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην παθοφυσιολογία της ουραιμικής δυσλιπιδαιμίας.

7. Προσδιορίστηκαν οι πολυμορφισμοί Q192R και M55L της PON1 και διαπιστώθηκε για πρώτη φορά στη βιβλιογραφία ότι το αλληλίο M και ο πολυμορφισμός MM υποεκφράζονται στους ασθενείς με τελικού σταδίου χρόνια νεφρική ανεπάρκεια σε σύγκριση με τα υγιή άτομα της ίδιας ηλικίας και φύλου. Οι λόγοι για αυτή τη διαφορά δεν είναι γνωστοί και απαιτούνται περισσότερες μελέτες για να διαπιστωθεί εάν το αλληλίο M ασκεί κάποια νεφροπροστατευτική δράση.

8. Εξετάστηκε η επίδραση των πολυμορφισμών της PON1 στην ενεργότητα του ενζύμου και στις λιπιδαιμικές παραμέτρους του ορού σε ασθενείς που υποβάλλονταν σε αιμοκάθαρση, ενώ για πρώτη φορά στη βιβλιογραφία προσδιορίστηκαν οι πολυμορφισμοί της PON1 και η επίδρασή τους στις εργαστηριακές παραμέτρους σε ασθενείς που υποβάλλονταν σε συνεχή φορητή περιτοναϊκή κάθαρση ή βρίσκονταν σε προτελικό στάδιο χρόνιας νεφρικής ανεπάρκειας. Τα αποτελέσματα δεν διέφεραν από αυτά που έχουν περιγραφεί σε άλλους πληθυσμούς υγιών ατόμων ή ασθενών με νεφρικά νοσήματα. Επιπρόσθετα, εξετάστηκαν οι παράγοντες που επηρεάζουν την ενεργότητα της PON1 σε αυτούς τους ασθενείς.

9. Εξετάστηκε η ενεργότητα της PON1 σε ασθενείς που υποβάλλονταν σε αιμοκάθαρση, η οποία ήταν μειωμένη σε σύγκριση με τα υγιή άτομα. Επιπρόσθετα, η μελέτη μας έδειξε για πρώτη φορά στη βιβλιογραφία ότι η ενεργότητα της PON1 είναι αυξημένη στους ασθενείς που υποβάλλονται σε συνεχή φορητή περιτοναϊκή κάθαρση σε σύγκριση όχι μόνο με τους ασθενείς που υποβάλλονται σε αιμοκάθαρση ή βρίσκονται σε προτελικό στάδιο χρόνιας νεφρικής ανεπάρκειας, αλλά ακόμη και σε σύγκριση με τα υγιή άτομα. Αυτή η αύξηση ήταν ανεξάρτητη από τους γενετικούς πολυμορφισμούς της PON1, από τα επίπεδα της HDL χοληστερόλης ή της ApoA1 ή από το υπόστρωμα μέτρησης της ενεργότητας του ενζύμου. Τέλος, διαπιστώθηκε ότι η ενεργότητα της PON1 είναι μειωμένη στους ασθενείς που βρίσκονται σε προτελικό στάδιο χρόνιας νεφρικής ανεπάρκειας σε σύγκριση με τα υγιή άτομα.

10. Επιβεβαιώθηκαν τα ευρήματα παλαιότερης μελέτης που έδειξε ότι η ολική ενεργότητα της PAF-AH του ορού είναι αυξημένη στους ασθενείς με χρόνια νεφρική ανεπάρκεια σε σύγκριση με τα υγιή άτομα. Αυτή η αύξηση ήταν μεγαλύτερη στους ασθενείς που υποβάλλονταν σε συνεχή φορητή περιτοναϊκή κάθαρση σε σύγκριση με τους ασθενείς που υποβάλλονταν σε αιμοκάθαρση ή βρίσκονταν σε προτελικό στάδιο



χρόνιας νεφρικής ανεπάρκειας. Αντίθετα, η αύξηση της ενεργότητας της PAF-AH των σωματιδίων που περιέχουν ApoB ήταν μεγαλύτερη στους ασθενείς που υποβάλλονταν σε αιμοκάθαρση σε σύγκριση με τις άλλες δύο ομάδες των ασθενών. Επιπρόσθετα, διαπιστώθηκε ότι οι HDL των ασθενών που υποβάλλονταν σε εξωνεφρική κάθαρση είχαν μεγαλύτερη ενεργότητα PAF-AH σε σύγκριση με τις HDL των ασθενών που βρίσκονταν σε προτελικό στάδιο χρόνιας νεφρικής ανεπάρκειας και την ομάδα ελέγχου, ενώ αυτή η αύξηση ήταν μεγαλύτερη στους ασθενείς που υποβάλλονταν σε αιμοκάθαρση σε σύγκριση με τους ασθενείς που υποβάλλονταν σε περιτοναϊκή κάθαρση. Για πρώτη φορά στη βιβλιογραφία βρέθηκε ότι τα επίπεδα της ApoE επηρεάζουν σημαντικά και ανεξάρτητα την ενεργότητα της HDL-PAF AH. Τέλος, ο πιθανά αντιαθηρογόνος δείκτης HDL-PAF AH/ολική PAF-AH ήταν μειωμένος στους ασθενείς που υποβάλλονταν σε συνεχή φορητή περιτοναϊκή κάθαρση ή βρίσκονταν σε προτελικό στάδιο χρόνιας νεφρικής ανεπάρκειας σε σύγκριση με τους ασθενείς που υποβάλλονταν σε αιμοκάθαρση και την ομάδα ελέγχου. Απαιτούνται περαιτέρω μελέτες για να απαντηθεί το ερώτημα αν αυτές οι διαφορές στις ενζυμικές ενεργότητες της PAF-AH συσχετίζονται με την εμφάνιση στεφανιαίας νόσου σε αυτό τον πληθυσμό.

11. Εξετάσθηκε για πρώτη φορά στη βιβλιογραφία η μεταβολή των ενεργοτήτων της PON1 και της HDL-PAF AH κατά τη διάρκεια μίας συνεδρίας αιμοκάθαρσης και διαπιστώθηκε ότι η ενεργότητα της HDL-PAF AH αυξάνεται ακόμη και μετά τη διόρθωση για τις μεταβολές του όγκου ή τα επίπεδα της HDL χοληστερόλης, ενώ δεν μεταβάλλεται σημαντικά η ενεργότητα της PON1. Τέλος, αυτή η αύξηση της ενεργότητας της HDL-PAF AH συσχετίστηκε με τον τύπο της μεμβράνης του φίλτρου που χρησιμοποιήθηκε κατά τη διάρκεια της AMK και διαπιστώθηκε ότι αυτή η αύξηση ήταν μεγαλύτερη όταν χρησιμοποιήθηκαν συνθετικού τύπου μεμβράνες σε σύγκριση με τις κυτταρινικού τύπου μεμβράνες.

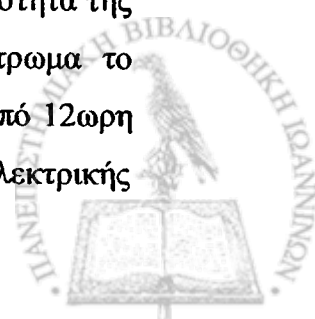


ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η αθηρωματική αγγειακή νόσος αποτελεί την κύρια αιτία νοσηρότητας και θνησιμότητας σε ασθενείς με χρόνια νεφρική νόσο. Η αποπρωτεΐνη E (ApoE) αποτελεί βασικό συστατικό των περισσοτέρων λιποπρωτεϊνών και διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο στο μεταβολισμό τους. Υπάρχουν τρεις κύριες φαινοτυπικές ισομορφές της ApoE: E2, E3 και E4. Αυτοί οι πολυμορφισμοί της ApoE, αλλά και τα επίπεδά της στον ορό, καθορίζουν σε σημαντικό βαθμό τις συγκεντρώσεις των λιποπρωτεϊνών του πλάσματος και κατά συνέπεια τον κίνδυνο εμφάνισης καρδιαγγειακής νόσου στο γενικό πληθυσμό. Επιπρόσθετα, σημαντικό ρόλο στη διαδικασία της αθηρογένεσης διαδραματίζουν δύο ένζυμα που συνδέονται με τις λιποπρωτεΐνες: η παραοξονάση (PON1) και η PAF-ακετυλοϋδρολάση (PAF-AH). Υπάρχουν λίγα δεδομένα στη βιβλιογραφία για το ρόλο της ApoE στο μεταβολισμό των λιποπρωτεϊνών, καθώς και για τις μεταβολές των ενεργοτήτων της PON1 και της PAF-AH σε ασθενείς με χρόνια νεφρική νόσο.

Σκοπός της παρούσας διδακτορικής διατριβής ήταν η εκτίμηση της επίπτωσης των φαινοτύπων της ApoE σε ασθενείς με νεφρική νόσο σε σύγκριση με τους υγιείς μάρτυρες, η εκτίμηση της επίδρασης των φαινοτύπων, αλλά και των συγκεντρώσεων της ApoE στα επίπεδα των λιποπρωτεϊνών του ορού σε ασθενείς με νεφρική νόσο και σε υγιή άτομα, η μελέτη της επίδρασης των φαινοτύπων της ApoE στη νεφρική λειτουργία υγιών ατόμων, η εκτίμηση της επίπτωσης των πολυμορφισμών της PON1 σε ασθενείς με νεφρική νόσο σε σύγκριση με τους υγιείς μάρτυρες και η διερεύνηση των μεταβολών των ενεργοτήτων της PON1 και της PAF-AH σε σχέση με την ApoE και με τους γενετικούς πολυμορφισμούς της PON1 σε ασθενείς με νεφρική ανεπάρκεια.

Μελετήθηκαν 301 ασθενείς με τελικού σταδίου χρόνια νεφρική ανεπάρκεια (ΤΣΧΝΑ, στάδιο V) που υποβάλλονταν σε αιμοκάθαρση (ΑΜΚ), 46 ασθενείς με ΤΣΧΝΑ που υποβάλλονταν σε συνεχή φορητή περιτοναϊκή κάθαρση (ΣΦΠΚ) και 48 ασθενείς με χρόνια νεφρική ανεπάρκεια προτελικού σταδίου (ΠΤΧΝΑ, στάδια ΙΙΙ και ΙV), ενώ 290 υγιή άτομα της ίδιας ηλικίας και φύλου αποτέλεσαν την ομάδα ελέγχου. Σε όλα τα άτομα της μελέτης προσδιορίστηκαν οι λιπιδαιμικές παράμετροι και τα επίπεδα της ApoE του ορού, καθώς και η ολική ενεργότητα της PAF-AH του ορού, η ενεργότητα της PAF-AH των HDL (HDL-PAF AH), η ενεργότητα της PON1 με υπόστρωμα το παραοξον και η ενεργότητα της PON1 με υπόστρωμα το phenylacetate μετά από 12ωρη νηστεία. Οι φαινότυποι της ApoE προσδιορίστηκαν με τη μέθοδο της ισοηλεκτρικής



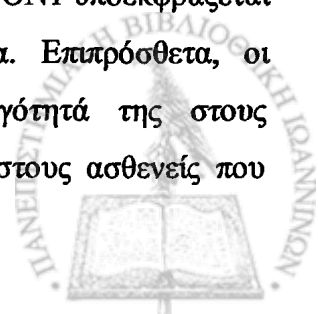
εστίασης των πρωτεϊνών των πολύ χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεϊνών του ορού ή με τη μέθοδο της ανοσοαποτύπωσης των πρωτεϊνών του ορού. Επιπρόσθετα, γενετικό υλικό απομονώθηκε από όλα τα άτομα της μελέτης και προσδιορίστηκαν με τη μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης και τη χρήση ειδικών περιοριστικών ενδονουκλεασών οι γονιδιακοί πολυμορφισμοί της ApoE, καθώς και οι γονιδιακοί πολυμορφισμοί Q192R και M55L της PON1. Τέλος, η εκτίμηση του ρυθμού της σπειραματικής διήθησης στα υγιή άτομα έγινε με τη χρήση της εξίσωσης που προτάθηκε από τη μελέτη MDRD.

Οι ασθενείς με XNA είχαν χαμηλότερα επίπεδα HDL χοληστερόλης και ApoA1 και υψηλότερα επίπεδα τριγλυκεριδίων και Lp(a) σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου. Επιπρόσθετα, οι ασθενείς που υποβάλλονταν σε ΣΦΠΚ εμφάνιζαν ένα περισσότερο αθηρογόνο λιπιδαιμικό προφίλ σε σύγκριση με τους ασθενείς που υποβάλλονταν σε AMK, ενώ η συγκέντρωση της ApoE στον ορό ήταν αυξημένη στους ασθενείς με XNA (και ιδιαίτερα σε όσους υποβάλλονταν σε ΣΦΠΚ) σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου.

Η συχνότητα του αλληλίου ε4 στην ομάδα ελέγχου της μελέτης μας ήταν 14.0%, δηλαδή μεγαλύτερη από αυτή που έχει αναφερθεί σε δύο προηγούμενες μελέτες σε Ελληνικό πληθυσμό. Αντίθετα, το αλλήλιο ε4 υποεκφράζονταν στους ασθενείς με ΤΣΧΝΑ σε σύγκριση με τους υγιείς μάρτυρες. Τα υγιή άτομα με το αλλήλιο ε2 είχαν χαμηλότερα επίπεδα ολικής χοληστερόλης και LDL χοληστερόλης, καθώς και υψηλότερα επίπεδα τριγλυκεριδίων και ApoE σε σύγκριση με τα άτομα που είχαν το αλλήλιο ε3 ή το αλλήλιο ε4. Επιπρόσθετα, η παρουσία του αλληλίου ε2 στα άτομα της ομάδας ελέγχου συσχετιζόταν με υψηλότερες τιμές κρεατινίνης του ορού και χαμηλότερες τιμές προβλεπόμενου ρυθμού σπειραματικής διήθησης σε σύγκριση με το αλλήλιο ε3 ή το αλλήλιο ε4.

Η μελέτη μας επίσης έδειξε ότι τα επίπεδα της ApoE επηρεάζουν το λιπιδαιμικό προφίλ των ασθενών με XNA ανεξάρτητα και πιο σημαντικά από τους πολυμορφισμούς της ApoE, ενώ ο συνδυασμός των επιπέδων και των πολυμορφισμών της ApoE μπορεί να εξηγήσει ένα πολύ μεγαλύτερο ποσοστό της μεταβλητότητας των λιπιδαιμικών παραμέτρων σε σύγκριση με τη μεταβλητότητα που συσχετίζεται μόνο με τους γονιδιακούς πολυμορφισμούς της ApoE.

Ένα ακόμη εύρημα της μελέτης μας ήταν ότι το αλλήλιο M της PON1 υποεκφράζεται στους ασθενείς με ΤΣΧΝΑ σε σύγκριση με τα υγιή άτομα. Επιπρόσθετα, οι πολυμορφισμοί της PON1 επηρεάζουν σημαντικά την ενεργότητα της στους ουραμικούς ασθενείς. Η ενεργότητα της PON1 ήταν μειωμένη στους ασθενείς που



υποβάλλονταν σε ΑΜΚ σε σύγκριση με τα υγιή άτομα, ενώ ήταν αυξημένη στους ασθενείς που υποβάλλονταν σε ΣΦΠΚ σε σύγκριση με τα άτομα των υπολοίπων ομάδων της μελέτης.

Η ολική ενεργότητα της PAF-AH του ορού ήταν αυξημένη στους ασθενείς με ΧΝΑ σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου και αυτή η αύξηση ήταν μεγαλύτερη στους ασθενείς που υποβάλλονταν σε ΣΦΠΚ σε σύγκριση με τα άτομα των υπολοίπων ομάδων της μελέτης. Επιπρόσθετα, διαπιστώθηκε ότι οι HDL των ασθενών με ΤΣΧΝΑ είχαν μεγαλύτερη ενεργότητα PAF-AH σε σύγκριση με τις HDL των ασθενών με ΠΤΧΝΑ και της ομάδας ελέγχου, ενώ τα επίπεδα της ApoE στον ορό επηρεάζουν σημαντικά και ανεξάρτητα την ενεργότητα της HDL-PAF AH. Επίσης, ο πιθανά αντιαθηρογόνος δείκτης HDL-PAF AH/ολική PAF-AH ήταν μειωμένος στους ασθενείς που υποβάλλονταν σε ΣΦΠΚ σε σύγκριση με τους ασθενείς που υποβάλλονταν σε ΑΜΚ και την ομάδα ελέγχου. Τέλος, διαπιστώθηκε ότι κατά τη διάρκεια μίας συνεδρίας αιμοκάθαρσης η ενεργότητα της PON1 δεν μεταβάλλεται σημαντικά, ενώ η ενεργότητα της HDL-PAF AH αυξάνεται και αυτή η αύξηση συσχετίστηκε με τον τύπο της μεμβράνης του φίλτρου που χρησιμοποιήθηκε.

Συμπερασματικά, η ApoE ασκεί σημαντική επίδραση στο λιπιδαιμικό προφίλ, αλλά και στη νεφρική λειτουργία των υγιών ατόμων. Επιπρόσθετα, τόσο οι πολυμορφισμοί όσο και η συγκέντρωση της ApoE καθορίζουν σε σημαντικό βαθμό τις τιμές των λιπιδαιμικών παραμέτρων του ορού σε ασθενείς με χρόνια νεφρική νόσο και επομένως και τον κίνδυνο εμφάνισης καρδιαγγειακής νόσου. Κατά συνέπεια, η αύξηση των επιπέδων της ApoE του ορού που παρατηρείται σε ασθενείς με ΧΝΑ αποτελεί μία κύρια διαταραχή του μεταβολισμού των αποπρωτεϊνών σε αυτούς τους ασθενείς που πιθανά συμβάλλει στην παθογένεια ορισμένων τουλάχιστον από τις διαταραχές της ουραιμικής δυσλιπιδαιμίας. Τέλος, παρατηρήθηκαν σημαντικές μεταβολές των ενεργοτήτων της PON1 και της PAF-AH στους ασθενείς με ΧΝΑ, οι οποίες πιθανά συσχετίζονται με την εμφάνιση αθηρωματικής νόσου σε αυτό τον πληθυσμό.



SUMMARY

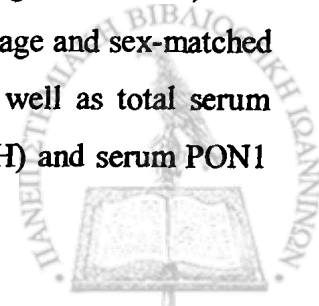
Evangelos N. Liberopoulos, MD: Doctoral Thesis

THE INFLUENCE OF APOLIPOPROTEIN E POLYMORPHISM ON LIPOPROTEIN METABOLISM IN PATIENTS WITH CHRONIC RENAL DISEASES

Atherosclerotic vascular disease is the leading cause of death in patients with chronic renal disease. Apolipoprotein E (ApoE) is a major constituent of most plasma lipoproteins, serving as a ligand to their receptor-mediated catabolism. There are three common isoforms of the ApoE protein: E2, E3 and E4. These ApoE polymorphisms, as well as the serum ApoE levels significantly influence serum lipoprotein levels, and thus affect the cardiovascular risk in the general population. Furthermore, two lipoprotein-associated enzymes have been shown to play an important role in the atherogenic process: the human paraoxonase 1 (PON1) and the platelet-activating factor acetylhydrolase (PAF-AH). There are limited data in the literature concerning the role of ApoE in lipoprotein metabolism in patients with chronic kidney disease, as well as on the possible alterations in the activities of PON1 and PAF-AH in these individuals.

Thus, we undertook the present study in order to determine: a) the frequency of the ApoE polymorphisms in Greek patients with chronic kidney disease compared to the control population, b) the effect of both ApoE concentration and polymorphisms on lipoprotein metabolism in renal patients and control subjects, c) the influence of ApoE polymorphisms on renal function in healthy individuals, d) the frequency of PON1 polymorphisms in Greek patients with chronic kidney disease compared to the control population, and e) possible alterations in the activities of PON1 and PAF-AH, with respect to PON1 genetic polymorphisms and both serum ApoE levels and polymorphisms, in patients with chronic renal failure.

Three hundred-one patients with end stage renal disease (ESRD, stage V) on chronic maintenance hemodialysis (HD), 46 ESRD patients on continuous ambulatory peritoneal dialysis (CAPD) and 48 patients with chronic renal failure (CRF, stages III and IV) were included in the study, while the control population consisted of 290 age and sex-matched healthy individuals. Serum lipid parameters and ApoE levels, as well as total serum PAF-AH activity, HDL-associated PAF-AH activity (HDL-PAF AH) and serum PON1



activity towards paraoxon and phenylacetate were measured in all subjects after an overnight fast. ApoE phenotypes were determined either by isoelectric focusing of delipidated very low-density lipoproteins or by immunoblotting of serum proteins. Additionally, DNA was isolated from all participants and ApoE, as well as PON1 Q192R and M55L genotypes were determined by the polymerase chain reaction (PCR) and the use of specific restriction enzymes. Finally, glomerular filtration rate (GFR) of the healthy subjects was predicted by means of the MDRD-derived equation.

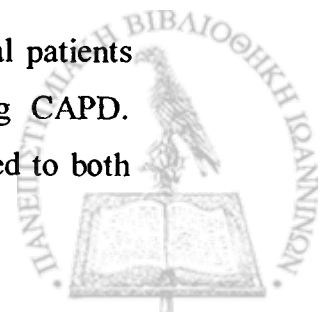
Patients with renal failure exhibited lower levels of HDL cholesterol and ApoAI, as well as higher levels of triglycerides and Lp(a) compared to the controls. Furthermore, patients on CAPD had a more atherogenic lipid profile compared with HD patients, while serum ApoE levels were increased in chronic renal failure patients (and particularly in CAPD patients) compared to the healthy population.

ApoE4 allele frequency was 14% in our healthy population and this frequency is higher than that reported in two previous studies in Greek individuals. On the contrary, ApoE4 allele frequency was decreased in our ESRD patients compared to the control subjects. Healthy subjects carrying the ApoE2 allele exhibited lower serum levels of total and LDL cholesterol, as well as higher levels of triglycerides and ApoE compared to those carrying the ApoE3 or the ApoE4 allele. Moreover, the ApoE2 allele was associated with increased levels of serum creatinine and decreased predicted GFR value compared to both the ApoE3 and ApoE4 alleles.

In addition, our study clearly showed that serum ApoE concentration significantly and independently of the ApoE polymorphisms can influence serum lipid levels in patients with renal failure, while the combination of both ApoE concentration and polymorphisms explains a much higher percentage of the lipid parameters' variability than the ApoE polymorphisms alone in these patients.

Furthermore, the frequency of the M allele of the M55L PON1 genetic polymorphism was decreased in our ESRD patients compared to the control population. PON1 polymorphisms significantly influenced PON1 activity in all patients with renal failure. However, PON1 activity was decreased in HD patients compared to the healthy subjects, whereas it was elevated in our CAPD patients compared to both HD and CRF patients and to controls.

On the other hand, total serum PAF-AH activity was increased in all renal patients compared to controls and this increase was higher in patients undergoing CAPD. Moreover, HDL-PAF AH activity was elevated in our ESRD patients compared to both



CRF patients and healthy individuals, while serum ApoE levels were proved to be an independent regulator of this activity. Additionally, the possible anti-atherogenic ratio of HDL-PAF AH/total serum PAF-AH was decreased in CAPD patients compared to both HD patients and controls. Finally, PON1 activity was unaltered during a single hemodialysis session, while the HDL-PAF AH activity increased during the HD session and this elevation was associated with the biocompatibility of the filter membrane used.

In conclusion, ApoE exerts a major influence on lipoprotein metabolism and renal function in healthy subjects. Furthermore, both ApoE concentration and polymorphisms significantly affect serum lipid parameters in patients with renal failure, thus modifying the cardiovascular risk in this population. In this context, the elevated serum ApoE levels in patients with renal failure may contribute to the pathogenesis of lipid disorders seen in uremic patients. Finally, the observed alterations in PON1 and PAF-AH activities in our renal patients may be associated with an increased risk for atherosclerotic disease in this population.



ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ

Από τα αποτελέσματα της μελέτης και από την μεθοδολογία που αναπτύχθηκε κατά την εκπόνηση της παρούσας διατριβής προέκυψαν οι παρακάτω δημοσιεύσεις:

1. **Liberopoulos E**, Pavlidis N, Elisaf M. The effect of tamoxifen therapy on serum apolipoprotein A-I level is modified by the apolipoprotein E phenotype. *Clin Biochem* 2001; 34: 161
2. **Liberopoulos E**, Karabina S-A, Tselepis A, Bairaktari E, Nikolaidis C, Pavlidis N, Elisaf M. Are the effects of tamoxifen on serum lipid profile modified by apolipoprotein E phenotypes? *Oncology* 2002; 62: 115-120
3. **Liberopoulos EN**, Elisaf MS. Could apolipoprotein E polymorphisms be hidden behind the relation between bone mineral density and atherosclerosis in hemodialysis patients? *Osteoporos Int* 2003; 14: 957
4. **Liberopoulos E**, Siamopoulos K, Elisaf M. Apolipoprotein E and renal disease. *Am J Kidney Dis* 2004; 43: 223-233
5. **Liberopoulos EN**, Miltiados GA, Cariolou M, Tselepis AD, Siamopoulos KC, Elisaf MS. The influence of apolipoprotein E concentration and polymorphism on serum lipid parameters in hemodialysis patients. *Am J Kidney Dis* 2004 (in press)
6. **Liberopoulos E**, Miltiados G, Hatzivassiliou M, Ayrton N, Bairaktari E, Cariolou M, Elisaf M. Apolipoprotein E polymorphism in Northwestern Greece: Frequency and effect on lipid parameters. *Ann Clin Lab Med* 2004 (in press)
7. **Liberopoulos EN**, Miltiados GA, Cariolou M, Kalaitzidis R, Siamopoulos KC, Elisaf MS. Influence of apolipoprotein E polymorphisms on serum creatinine levels and predicted glomerular filtration rate in healthy subjects. *Nephrol Dial Transplant* 2004 (in press)
8. **Liberopoulos EN**, Papavasiliou E, Miltiados GA, Cariolou M, Siamopoulos KC, Tselepis AD, Elisaf MS. Alterations of paraoxonase and platelet-activating factor acetylhydrolase activities in patients on peritoneal dialysis. *Perit Dial Int* 2004 (accepted for publication pending minor revision)



ΔΗΜΟΣΙΕΥΜΕΝΕΣ ΠΕΡΙΛΗΨΕΙΣ

1. **Liberopoulos E, Papavasiliou E, Tzallas C, Katopodis K, Gouva C, Christidis D, Tselepis A, Siamopoulos K, Elisaf M.** Increase of HDL-associated platelet-activating factor acetylhydrolase (PAF-AH) activity but not of paraoxonase (PON1) during haemodialysis. *Atherosclerosis Suppl* 2003; 4: 336

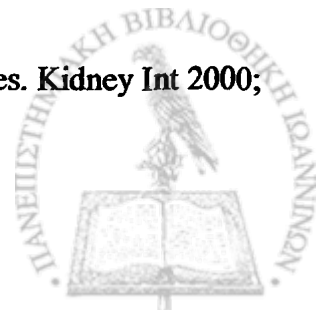


ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΑΝΑΦΟΡΕΣ

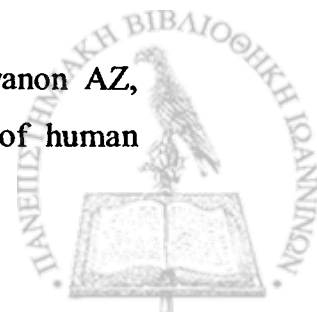
1. Elisaf M, Mikhailidis DP, Siamopoulos KC. Dyslipidaemia in patients with renal diseases. *J Drug Dev Clin Pract* 1996; 7: 331-348
2. Wanner C, Quaschnig T. Dyslipidemia and renal disease: pathogenesis and clinical consequences. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2001; 10: 195-201
3. Elisaf MS, Bairaktari HT, Tziallas CS, Germanos NK, Siamopoulos KC. Atherogenic lipid and lipoprotein parameters in hemodialysis patients. *Dial Transplant* 1995; 24: 642-650
4. Elisaf MS, Dardamanis MA, Papagalani ND, Siamopoulos KC. Lipid abnormalities in chronic uremic patients. Response to treatment with gemfibrozil. *Scand J Urol Nephrol* 1993; 27: 101-108
5. Lee DM, Knight-Gibson C, Samuelsson O, Attman PO, Wang CS, Alaupovic P. Lipoprotein particle abnormalities and the impaired lipolysis in renal insufficiency. *Kidney Int* 2002; 61: 209-218
6. Attman P-O, Samuelson O, Moberly J, Johansson AC, Ljungman S, Weiss LG, Knight-Gibson C, Alaupovic P. Apolipoprotein B-containing lipoproteins in renal failure: The relation to mode of dialysis. *Kidney Int* 1999; 55: 1536-1542
7. Siamopoulos KC, Elisaf MS, Bairaktari HT, Pappas MB, Sferopoulos GD, Nikolakakis NG. Lipid parameters including lipoprotein (a) in patients undergoing CAPD and hemodialysis. *Perit Dial Int* 1995; 15: 342-347
8. Elisaf MS, Bairaktari HT, Tsolas OE, Siamopoulos KC. Lipoprotein (a) levels in diabetics on chronic hemodialysis. *J Nephrol* 1995; 8: 198-205
9. Bairaktari E, Elisaf M, Tsolas O, Siamopoulos KC. Serum Lp(a) levels in patients with moderate renal failure. *Nephron* 1998; 79: 367-368
10. Milionis HJ, Elisaf MS, Tselepis A, Bairaktari E, Karabina SA, Siamopoulos KC. Apolipoprotein (a) phenotypes and lipoprotein (a) concentrations in patients with renal failure. *Am J Kidney Dis* 1999; 33: 1100-1106
11. Elisaf MS, Bairaktari HT, Tziallas CS, Milionis HJ, Siamopoulos KC. Increased lipoprotein (a) levels in patients with proteinuria. *Cardiovasc Risk Fact* 1996; 6: 289-293
12. Shoji T, Ishimura E, Inaba M, Tabata T, Nishizawa Y. Atherogenic lipoproteins in end-stage renal disease. *Am J Kidney Dis* 2001; 38 (Suppl 1): S30-S33



13. Elisaf MS, Germanos NP, Bairaktari HT, Pappas MB, Koulouridis EI, Siamopoulos KC. Effects of conventional vs low-molecular-weight heparin on lipid profile in hemodialysis patients. *Am J Nephrol* 1997; 17: 153-157
14. Quaschnig T, Krane V, Metzger T, Wanner C. Abnormalities in uremic lipoprotein metabolism and its impact on cardiovascular disease. *Am J Kidney Dis* 2001; 38 (Suppl 1): S14-S19
15. Moberly JB, Attman PO, Samuelsson O, Johansson AC, Knight-Gibson C, Alaupovic P. Alterations in lipoprotein composition in peritoneal dialysis patients. *Perit Dial Int* 2002; 22: 220-228
16. Scharf S, Wexler J, Longnecker RE, Blafox MD. Cardiovascular disease in patients on hemodialytic therapy. *Prog Cardiovasc Dis* 1980; 22: 343-356
17. Baigent C, Burbury K, Wheeler D. Premature cardiovascular disease in chronic renal disease. *Lancet* 2000; 356: 147-152
18. Koenig W. Update on C-reactive protein as a risk marker in cardiovascular disease. *Kidney Int* 2003; 84 (Suppl): S58-S61
19. Libetta C, De Nicola L, Rampino T, De Simone W, Memoli B. Inflammatory effects of peritoneal dialysis: evidence of systemic monocyte activation. *Kidney Int* 1996; 49: 506-511
20. Siamopoulos KC, Elisaf M. Is CAPD atherogenic? *Perit Dial Int* 1997; 17: 227-231
21. Prichard SS. Impact of dyslipidemia in end-stage renal disease. *J Am Soc Nephrol* 2003; 14 (9 Suppl 4): S315-S320
22. Kennedy R, Case C, Fathi R, Johnson D, Isbel N, Marwick TH. Does renal failure cause an atherosclerotic milieu in patients with end-stage renal disease? *Am J Med* 2001; 110: 198-204
23. Nishizawa Y, Shoji T, Ishimura E, Inaba M, Morii H. Paradox of risk factors for cardiovascular mortality in uremia: Is a higher cholesterol level better for atherosclerosis in uremia? *Am J Kidney Dis* 2001; 38 (Suppl 1): S4-S7
24. Attman PO, Alaupovic P, Samuelsson O. Lipoprotein abnormalities as a risk factor for progressive nondiabetic renal disease. *Kidney Int* 1999; 56 (Suppl 71): S14-S17
25. Keane WF. The role of lipids in renal disease: future challenges. *Kidney Int* 2000; 57 (Suppl 75): S27-S31



26. Oda H, Keane WF. Recent advances in statins and the kidney. *Kidney Int* 1999; 56 (Suppl 71): S2-S5
27. Wheeler DC. Statins and the kidney. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 1998; 7: 579-584
28. Schaeffner ES, Kurth T, Curhan GC, Glynn RJ, Rexrode KM, Baignet C, Buring JE, Gaziano JM. Cholesterol and the risk of renal dysfunction in apparently healthy men. *J Am Soc Nephrol* 2003; 14: 2084-2091
29. Saltissi D, Morgan C, Knight B, Chang W, Rigby R, Westhuyzen J. Effect of lipid-lowering dietary recommendations on the nutritional intake and lipid profiles of chronic peritoneal dialysis and hemodialysis patients. *Am J Kidney Dis* 2001; 37: 1209-1215
30. Elisaf M, Bairaktari E, Katopodis K, Pappas M, Sferopoulos G, Tzallas C, Tsolas O. Effect of L-carnitine supplementation on lipid parameters in hemodialysis patients. *Am J Nephrol* 1998; 18: 416-42
31. Tsimihodimos V, Bairaktari E, Elisaf M. Fibrate induced increase in serum urea and creatinin levels. *Nephrol Dial Transplant* 2002; 17: 682
32. Masterson TM. Safety and efficacy of simvastatin in patients undergoing chronic renal dialysis: Are we ready to treat hypercholesterolemia? *Am J Kidney Dis* 2002; 39: 419-421
33. Sica DA, Gehr TWB. 3-Hydroxy-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors and rhabdomyolysis: considerations in the renal failure patient. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2002; 11: 123-133
34. Mahley RW. Apolipoprotein E: Cholesterol transport protein with expanding role in cell biology. *Science* 1988; 240: 622-630
35. Yamamoto T, Bujo H. Close encounters with apolipoprotein E receptors. *Curr Opin Lipidol* 1996; 7: 298-302
36. Mazzone T. Apolipoprotein E secretion by macrophages: its potential physiological functions. *Curr Opin Lipidol* 1996; 7: 303-307
37. Wilson C, Wardell MR, Weisgraber KH, Mahley RW, Agard DA. Three-dimensional structure of the LDL receptor-binding domain of human apolipoprotein E. *Science* 1991; 252: 1817-1822
38. Lalazar A, Weisgraber KH, Rall SC, Gilandi H, Innerarity TL, Levanon AZ, Boyles JK, Amit B, Gorecki M, Mahley RW. Site-specific mutagenesis of human



apolipoprotein E. Receptor binding activity of variants with single amino acid substitutions. *J Biol Chem* 1988; 263: 3542-3545

39. Dong LM, Weisgraber KH. Human apolipoprotein E4 domain interaction. Arginine 61 and glutamic acid 255 interact to direct the preference for very low density lipoproteins. *J Biol Chem* 1996; 271: 19053-19057

40. Weisgraber KH, Innerarity TL, Mahley RW. Abnormal lipoprotein receptor-binding activity of the human apoprotein E due to cysteine-arginine interchange at a single site. *J Biol Chem* 1982; 257: 2518-2521

41. Das HK, McPherson J, Bruns GA, Karathanasis SK, Breslow JL. Isolation, characterization and mapping to chromosome 19 of human apolipoprotein E gene. *J Biol Chem* 1985; 260: 6240-6247

42. Utermann G. Apolipoprotein E polymorphism in health and disease. *Am Heart J* 1987; 113: 433-440

43. Mahley RW, Huang Y. Apolipoprotein E: from atherosclerosis to Alzheimer's disease and beyond. *Curr Opin Lipidol* 1999; 10: 207-217

44. Mahley RW, Ji Z-S. Remnant lipoprotein metabolism: key pathways involving cell-surface heparin sulfate proteoglycans and apolipoprotein E. *J Lipid Res* 1999; 40: 1-16

45. Huang Y, Liu XQ, Rall SC Jr, Mahley RW. Apolipoprotein E2 reduces the low density lipoprotein level in transgenic mice by impairing lipoprotein-lipase-mediated lipolysis of triglyceride-rich lipoproteins. *J Biol Chem* 1998; 273: 17483-17490

46. Knight BL. ATP-binding cassette transporter A1: regulation of cholesterol efflux. *Biochem Soc Trans* 2004; 32: 124-127

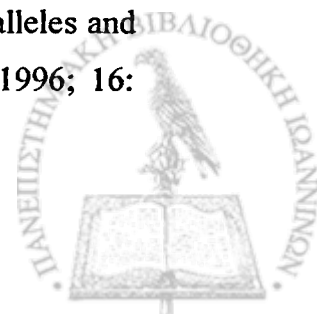
47. Krimbou L, Denis M, Haidar B, Carrier M, Marcil M, Genest J Jr. Molecular interactions between apolipoprotein E and the ATP-binding cassette transporter A1 (ABCA1): Impact on ApoE lipidation. *J Lipid Res* 2004 (in press)

48. Koo C, Innerarity TL, Mahley RW. Obligatory role of cholesterol and apolipoprotein E in the formation of large cholesterol-enriched and receptor-active high density lipoproteins. *J Biol Chem* 1985; 260: 11934-11943

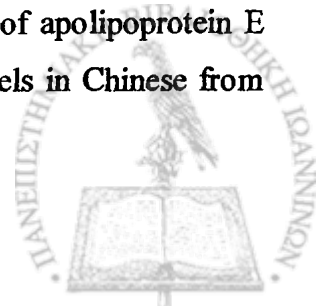
49. Stein O, Stein Y. Atheroprotective mechanisms of HDL. *Atherosclerosis* 1999; 144: 285-301



50. Kozarsky KF, Donahee MH, Rigotti A, Iqbal SH, Edelman ER, Krieger M. Overexpression of the HDL receptor SR-BI alters plasma HDL and bile cholesterol levels. *Nature* 1997; 387: 414-417
51. Ignatius MJ, Gebicke-Harter PJ, Skene JH, Schilling JW, Weisgraber KH, Mahley RW, Shooter EM. Expression of apolipoprotein E during nerve degeneration and regeneration. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; 83: 1125-1129
52. Civeira F, Pocovi M, Cenarro A, Casao E, Vilella E, Joven J, Gonzalez J, Garcia-Otin AL, Ordovas JM. ApoE variants in patients with type III hyperlipoproteinemia. *Atherosclerosis* 1996; 127: 273-282
53. Schaefer EJ, Gregg RE, Ghiselli G, Forte TM, Ordovas JM, Zech LA, Brewer HB Jr. Familial apolipoprotein E deficiency. *J Clin Invest* 1986; 78: 1206-1219
54. Λυμπερόπουλος Ε, Τσιμιχόδημος Β, Ελισάφ Μ. Δυσλιπιδαιμίες: ταξινόμηση, παθοφυσιολογία, κλινική εικόνα, διάγνωση, θεραπεία. *Καρδιολογία* 2001; 3: 201-215
55. Utermann G, Kindermann H, Kaffarnic H, Steinmetz A. Apolipoprotein E phenotypes and hyperlipidemia. *Hum Genet* 1984; 65: 232-236
56. Thuren T, Wilcox RW, Sisson P, Waite M. Hepatic lipase hydrolysis of lipid monolayers. Regulation by apolipoproteins. *J Biol Chem* 1991; 266: 4852-4861
57. Gregg RE, Brewer HB. The role of apolipoprotein E and lipoprotein receptors in modulating the in vivo metabolism of apolipoprotein B-containing lipoproteins in humans. *Clin Chem* 1988; 34: 28-32
58. Kesaniemi YA, Ehnholm C, Miettinen TA. Intestinal cholesterol absorption efficiency in man is related to apolipoprotein E phenotype. *J Clin Invest* 1987; 80: 578-581
59. Davignon J, Gregg RE, Sing CF. Apolipoprotein E and atherosclerosis. *Arteriosclerosis* 1988; 8: 1-21
60. Dallongeville J, Lussier-Cacan S, Davignon J. Modulation of plasma triglyceride levels by apoE phenotype: a meta-analysis. *J Lipid Res* 1992; 33: 447-454
61. De knijff P, Kaptein A, Boomsma D, Princen HMG, Frants RR, Havekes LM. Apolipoprotein E polymorphism affects plasma levels of lipoprotein (a). *Atherosclerosis* 1991; 90: 169-174
62. Wilson PW, Schaefer EJ, Larson MG, Ordovas JM. Apolipoprotein E alleles and risk of coronary disease. A meta-analysis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1996; 16: 1250-1255



63. Wilson PWF, Myers RH, Larson MG, Ordovas JM, Wolf PA, Schaefer EJ. Apolipoprotein E alleles, dyslipidemia, and coronary heart disease. The Framingham Offspring Study. *JAMA* 1994; 272: 1666-1671
64. McCarron MO, DeLong D, Alberts MJ. APOE genotype as a risk factor for ischemic cerebrovascular disease. A meta-analysis. *Neurology* 1999; 53: 1308-1311
65. Bleumink GS, Van Duijn CM, Kingma JH, Witteman JC, Hofman A, Stricker BH. Apolipoprotein E epsilon4 allele is associated with left ventricular systolic dysfunction. *Am Heart J* 2004; 147: 685-689
66. Curtiss LK and Boisvert WA. Apolipoprotein E and atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol* 2000; 11: 243-251
67. Kervinen K, Savolainen MJ, Salokannel J, Hynninen A, Heikkinen J, Ehnholm C, Koistinen MJ, Kesaniemi YA. Apolipoprotein E and B polymorphisms – longevity factors assessed in nonagenarians. *Atherosclerosis* 1994; 105: 89-95
68. Hagberg JM, Wilund KR, Ferrell RE. APO E gene and gene-environment effects on plasma lipoprotein-lipid levels. *Physiol Genomics* 2000; 4: 101-108
69. Pedro-Botet J, Schaefer EJ, Bakker-Arkema RG, Black DM, Stein EM, Corella D, Ordovas JM. Apolipoprotein E genotype affects plasma lipid response to atorvastatin in a gender specific manner. *Atherosclerosis* 2001; 158: 183-193
70. Liberopoulos E, Karabina S-A, Tselepis A, Bairaktari E, Nikolaidis C, Pavlidis N, Elisaf M. Are the effects of tamoxifen on serum lipid profile modified by apolipoprotein E phenotypes? *Oncology* 2002; 62: 115-120
71. Liberopoulos E, Pavlidis N, Elisaf M. The effect of tamoxifen therapy on serum apolipoprotein A-I level is modified by the apolipoprotein E phenotype. *Clin Biochem* 2001; 34: 161
72. Vincent-Viry M, Schiele F, Gueguen R, Bohnet K, Visvikis S, Siest G. Biological variations and genetic reference values for apolipoprotein E serum concentrations: results from the STANISLAS cohort study. *Clin Chem* 1998; 44: 957-965
73. Salah D, Bohnet K, Gueguen R, Siest G, Visvikis S. Combined effects of lipoprotein lipase and apolipoprotein E polymorphisms on lipid and lipoprotein levels in the Stanislas cohort. *J Lipid Res* 1997; 38: 904-912
74. Xia Y, Sass C, Shen X, Siest G, Visvikis S. Associations of apolipoprotein E concentration and polymorphism with lipids and apolipoprotein levels in Chinese from Beijing and Shanghai. *Clin Chem Lab Med* 2000; 38: 655-659



75. Schiele F, De Bacquer D, Vincent-Viry M, Beisiegel U, Ehnholm C, Evans A, Kafatos A, Martins MC, Sans S, Sass C, Visvikis S, De Backer G, Siest G. Apolipoprotein E serum concentration and polymorphism in six European countries: the ApoEurope Project. *Atherosclerosis* 2000; 152: 475-488
76. Mensenkamp AR, Jong MC, Van Goor H, Van Luyn MJ, Bloks V, Havinga R, Voshol PJ, Hofker MH, Van Dijk KW, Havekes LM, Kuipers F. Apolipoprotein E participates in the regulation of very low density lipoprotein-triglyceride secretion by the liver. *J Biol Chem* 1999; 274: 35711-35718
77. Mensenkamp AR, van Luyn MJA, Havinga R, Teusink B, Waterman IJ, Mann CJ, Elzinga BM, Verkade HJ, Zammit VA, Havekes LM, Shoulders CC, Kuipers F. The transport of triglycerides through the secretory pathway of hepatocytes is impaired in apolipoprotein E deficient mice. *J Hepatol* 2004; 40: 599-606
78. Huang Y, Liu XQ, Rall SC Jr, Taylor JM, van Eckardstein A, Assmann G, Mahley RW. Overexpression and accumulation of apolipoprotein E as a cause of hypertriglyceridemia. *J Biol Chem* 1998; 273: 26388-26393
79. Bohnet K, Pillot T, Visvikis S, Sabolovic N, Siest G. Apolipoprotein (apo) E genotype and apoE concentration determine binding of normal very low density lipoproteins to HepG2 cell surface receptors. *J Lipid Res* 1996; 37: 1316-1324
80. Liberopoulos E, Alexandridis G, Bairaktari E, Elisaf M. Severe hypocholesterolemia along with reduced lipoprotein (a) levels in a patient with visceral leishmaniasis. *Ann Clin Lab Sci* 2002; 32: 305-308
81. Liberopoulos E, Apostolou F, Elisaf M. Serum lipid profile in patients with severe leptospirosis. *Nephrol Dial Transplant* 2004; 19: 1328-1329
82. Liberopoulos E, Pappas G, Alexandridis G, Tsiara S, Milionis H, Tzalas C, Bairaktari E, Tsianos E, Elisaf M. Changes in serum lipids, lipoproteins and apolipoproteins in patients with acute infection. *Pharmacotherapy* 2001; 21 (11 Pt 3): S371
83. Liberopoulos E, Siamopoulos K, Elisaf M. Apolipoprotein E and renal disease. *Am J Kidney Dis* 2004; 43: 223-233
84. Guz G, Ozdemir FN, Sezer S, Isiklar I, Arat Z, Turan M, Haberal M. Effect of apolipoprotein E polymorphism on serum lipid, lipoproteins, and atherosclerosis in hemodialysis patients. *Am J Kidney Dis* 2000; 36: 826-836



85. Feussner G, Wey S, Bommer J, Deppermann D, Grutzmacher P, Ziegler R. Apolipoprotein E phenotypes and hyperlipidemia in patients under maintenance hemodialysis. *Hum Genet* 1992; 88: 307-312
86. Eggertsen G, Heimbürger O, Stenvinkel P, Berglund L. Influence of variation at the apolipoprotein E locus on lipid and lipoprotein levels in CAPD patients. *Nephrol Dial Transplant* 1997; 12: 141-144
87. Imura T, Kimura H, Gejyo F. Apolipoprotein E phenotypes in hemodialysis patients. *Kidney Int* 1999; 56(suppl): S245-S247
88. Yorioka N, Nishida Y, Oda H, Watanabe T, Yamakido M. Apolipoprotein E polymorphism in IgA nephropathy. *Nephron* 1999; 83: 246-249
89. Asami T, Ciomartan T, Hayakawa H, Uchiyama M, Tomisawa S. Apolipoprotein E ϵ 4 allele and nephrotic glomerular diseases in children. *Pediatr Nephrol* 1999; 13: 233-236
90. Oda H, Yorioka N, Ueda C, Kushihata S, Yamakido M. Apolipoprotein E polymorphism and renal disease. *Kidney Int* 1999; 56 (Suppl): S25-S27
91. Lericque B, Moulin B, Delperro C, Purgus R, Olmer M, Boyer J. Apolipoprotein E phenotype and hyperlipoproteinemia in nephrotic syndrome. *Clin Chem* 1994; 40: 849-850
92. Roussos L, Floren CH, Carlson J, Svensson PJ, Wallmark A, Ekberg H. Increased prevalence of apolipoprotein E3/E4 genotype among Swedish renal transplant recipients. *Nephron* 1999; 83: 25-30
93. Kim SD, Kim IS, Lee BC, Choi KD, Chung JH, Ihm CG, Cho BS. Apolipoprotein E polymorphism and clinical course in childhood nephrotic syndrome. *Pediatr Nephrol* 2003; 18: 230-233
94. Joven J, Vilella E. The influence of apoprotein ϵ 2 homozygosity on nephrotic hyperlipidemia. *Clin Nephrol* 1997; 48: 141-145
95. Feussner G, Wingen AM, Ziegler R. Type III hyperlipoproteinemia in a child with hemolytic uremic syndrome. *Metabolism* 1990; 39: 1196-1199
96. Ellis D, Orchard TJ, Lombardozi S, Yunis EJ, McCauley J, Agostini R, Diamond JR. Atypical hyperlipidemia and nephropathy associated with apolipoprotein E homozygosity. *J Am Soc Nephrol* 1995; 6: 1170-1177
97. Amatruda JM, Margolis S, Hutchins GM. Type 3 hyperlipoproteinemia with mesangial foam cells in renal glomeruli. *Arch Pathol* 1976; 98: 51-54



98. Balson KR, Niall JF, Best JD. Glomerular lipid deposition and proteinuria in a patient with familiar dysbetalipoproteinaemia. *J Intern Med* 1996; 240: 157-159
99. Suzaki K, Kobori S, Ueno S, Uehara M, Kayashima T, Takeda H, Fukuda S, Takahashi K, Nakamura N, Uzawa H. Effects of plasmapheresis on familiar type III hyperlipoproteinemia associated with glomerular lipodosis, nephrotic syndrome and diabetes mellitus. *Atherosclerosis* 1990; 80: 181-189
100. Sakatsume M, Kadomura M, Sakata I, Imai N, Kondo D, Osawa Y, Shimada H, Ueno M, Miida T, Nishi S, Arakawa M, Gejyo F. Novel glomerular lipoprotein deposits associated with apolipoprotein E2 homozygosity. *Kidney Int* 2001; 59: 1911-1918
101. Oda H, Yorioka N, Ueda C, Nishida Y, Yamakido M. Apolipoprotein E phenotype and renal disease. *Contrib Nephrol* 1997; 120: 22-29
102. Choi KH, Song HY, Shin SK, Noh H, Kang SW, Kim JH, Lee HY, Han DS. Influence of apolipoprotein E genotype on lipid and lipoprotein levels in continuous ambulatory peritoneal dialysis patients. *Adv Perit Dial* 1999; 15: 243-246
103. Rodrigo E, Gonzalez-Lamuno D, Ruiz JC, Fernandez-Fresnedo G, Isla D, Gonzalez-Gotorruelo J, Zubimendi JA, De Francisco AL, Garcia-Fuentes M, Arias M. Apolipoprotein C-III and E polymorphisms and cardiovascular syndrome, hyperlipidemia, and insulin resistance in renal transplantation. *Am J Transplant* 2002; 2: 343-348
104. Bayes B, Pastor MC, Lauzurica R, Riutort N, Bonal J, Bonet J, Romero R. Apolipoprotein E alleles, dyslipemia and kidney transplantation. *Transplant Proc* 2002; 34: 373
105. Kahraman S, Kiykim AA, Altun B, Genctoy G, Arici M, Gulsun M, Erdem Y, Yasavul U, Turgan C, Caglar S. Apolipoprotein E gene polymorphism in renal transplant recipients: effects on lipid metabolism, atherosclerosis and allograft function. *Clin Transplant* 2004; 18: 288-294
106. Olmer M, Renucci JE, Planells R, Bouchouareb D, Purgus R. Preliminary evidence for a role of apolipoprotein E alleles in identifying haemodialysis patients at high vascular risk. *Nephrol Dial Transplant* 1997; 12: 691-693
107. Lim PS, Liu CS, Hong CJ, Wei YH. Prevalence of apolipoprotein E genotypes in ischaemic cerebrovascular disease in end-stage renal disease patients. *Nephrol Dial Transplant* 1997; 12: 1916-1920



108. Asakimori Y, Yorioka N, Tanaka J, Kohno N. Effect of polymorphism of the endothelial nitric oxide synthase and apolipoprotein E genes on carotid atherosclerosis in hemodialysis patients. *Am J Kidney Dis* 2003; 41: 822-832

109. Rossing P, Hougaard P, Borch-Johnsen K, Parving HH. Predictors of mortality in insulin dependent diabetes mellitus: 10 year observational follow up study. *BMJ* 1996; 313: 779-784

110. US Renal Data System. *USRDS 2001 Annual Data Report: atlas of end-stage renal disease in the United States*. Bethesda, Md: National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases, 2001.

111. Borch-Johnsen K, Norgaard K, Hommel E, Mathiesen ER, Jensen JS, Deckert T, Parving HH. Is diabetic nephropathy an inherited complication? *Kidney Int* 1992; 41: 719-722

112. Araki SI, Moczulski DK, Hanna L, Scott LJ, Warram JH, Krolewski AS. APOE polymorphisms and the development of diabetic nephropathy in type 1 diabetes: Results of case-control and family-based studies. *Diabetes* 2000; 49: 2190-2195

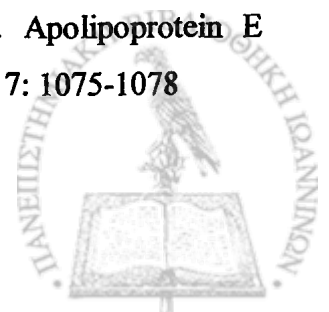
113. Chowdhury TA, Dyer PH, Kumar S, Gibson SP, Rowe BR, Davies SJ, Marshall SM, Morris PJ, Gill GV, Feeney S, Maxwell P, Savage D, Boulton AJM, Todd JA, Dunger D, Barnett AH, Bain SC. Association of apolipoprotein $\epsilon 2$ allele with diabetic nephropathy in Caucasian subjects with IDDM. *Diabetes* 1998; 47: 278-280

114. Werle E, Fiehn W, Hasslacher C. Apolipoprotein E polymorphism and renal function in German type 1 and type 2 diabetic patients. *Diabetes Care* 1998; 21: 994-998

115. Orchard TJ, Chang YF, Ferrell RE, Petro N, Ellis DE. Nephropathy in type 1 diabetes: A manifestation of insulin resistance and multiple genetic susceptibilities? Further evidence from the Pittsburgh Epidemiology of Diabetes Complication Study. *Kidney Int* 2002; 62: 963-970

116. Hadjadj S, Gallois Y, Simard G, Bouhanick B, Passa P, Grimaldi A, Drouin P, Tichet J, Marre M. Lack of relationship in long-term type 1 diabetic patients between diabetic nephropathy and polymorphisms in apolipoprotein epsilon, lipoprotein lipase and cholesteryl ester transfer protein (GENEDIAB Study). *Nephrol Dial Transplant* 2000; 15: 1971-1976

117. Onuma T, Laffel LMB, Angelico MC, Krolewski AS. Apolipoprotein E genotypes and risk of diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 1996; 7: 1075-1078



118. Tarnow L, Stehouwer CD, Emeis JJ, Poirier O, Cambien F, Hansen BV, Parving HH. Plasminogen activator inhibitor-1 and apolipoprotein E gene polymorphisms and diabetic angiopathy. *Nephrol Dial Transplant* 2000; 15: 625-630

119. Soedamah-Muthu SS, Colhoun HM, Taskinen MR, Idzior-Walus B, Fuller JH. Differences in HDL-cholesterol: apoA-I + apoA-II ratio and apoE phenotype with albuminuric status in type I diabetic patients. *Diabetologia* 2000; 43: 1353-1359

120. Eto M, Saito M, Okada M, Kume Y, Kawasaki F, Matsuda M, Yoneda M, Matsuki M, Takigami S, Kaku K. Apolipoprotein E genetic polymorphism, remnant lipoproteins, and nephropathy in type 2 diabetic patients. *Am J Kidney Dis* 2002; 40: 243-251

121. Hsieh, MC, Lin SR, Yang YC, Chen HC, Lin JN, Shin SJ. Higher frequency of apolipoprotein E2 allele in type 2 diabetic patients with nephropathy in Taiwan. *J Nephrol* 2002; 15: 368-373

122. Eto M, Horita K, Morikawa A, Nakata H, Okada M, Saito M, Nomura M, Abiko A, Iwashima Y, Ikoda A, Makino I. Increased frequency of apolipoprotein ε2 allele in non-insulin dependent diabetic (NIDDM) patients with nephropathy. *Clin Genet* 1995; 48: 288-292

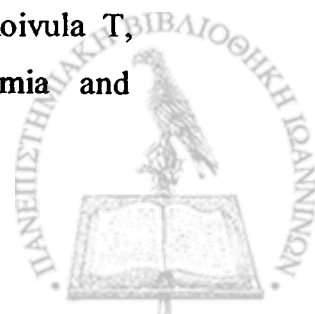
123. Ha SK, Park HS, Kim KW, Kim SJ, Kim DH, Kim JH, Lee HY, Han DS. Association between apolipoprotein E polymorphism and macroalbuminuria in patients with non-insulin dependent diabetes mellitus. *Nephrol Dial Transplant* 1999; 14: 2144-2149

124. Araki SI, Koya D, Makiishi T, Sugimoto T, Isono M, Kikkawa R, Kashiwagi A, Haneda M. APOE polymorphism and the progression of diabetic nephropathy in Japanese subjects with type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2003; 26: 2416-2420

125. Boize R, Benhamou PY, Corticelli P, Valenti K, Bosson JL, Halimi S. ApoE polymorphism and albuminuria in diabetes mellitus: a role for LDL in the development of nephropathy in NIDDM? *Nephrol Dial Transplant* 1998; 13: 72-75

126. Kimura H, Suzuki Y, Gejyo F, Karasawa R, Miyazaki R, Suzuki S, Arakawa M. Apolipoprotein E4 reduces risk of diabetic nephropathy in patients with NIDDM. *Am J Kidney Dis* 1998; 31: 666-673

127. Lehtinen S, Rantalaiho V, Wirta O, Pasternack A, Laippala P, Koivula T, Lehtimäki T. Apolipoprotein e gene polymorphism, hypercholesterolemia and



glomerular filtration rate in type 2 diabetic subjects: a 9-year follow-up study. *J Biomed Sci* 2003; 10: 260-265

128. Chen G, Paka L, Kako Y, Singhal P, Duan W, Pillarisetti S. A protective role for kidney apolipoprotein E. Regulation of mesangial cell proliferation and matrix expansion. *J Biol Chem* 2001; 276: 49142-49147

129. Farrangiana T, Churg J. Renal lipidoses: A review. *Hum Pathol* 1987; 18: 661-679

130. Oikawa S, Suzuki N, Sakuma E, Saito T, Namai K, Kotake H, Fujii Y, Toyota T. Abnormal lipoprotein and apolipoprotein pattern in lipoprotein glomerulopathy. *Am J Kidney Dis* 1991; 18: 553-558

131. Siato T, Sato H, Oikawa S, Kudo H, Kurihara I, Nakayama K, Abe K, Yoshinaga K, Sakaguchi H. Lipoprotein glomerulopathy: Report of a normolipidemic case and review of the literature. *Am J Nephrol* 1993; 13: 64-68

132. Maruyama K, Arai H, Ogawa T, Tomizawa S, Morikawa A. Lipoprotein glomerulopathy: a pediatric case report. *Pediatr Nephrol* 1997; 11: 213-214

133. Zhang P, Malaton R, Kaplan L, Kumar A, Gallo G. Lipoprotein glomerulopathy: First report in a Chinese male. *Am J Kidney Dis* 1994; 24: 942-950

134. Saito T, Ishigaki Y, Oikawa S, Yamamoto TT. Etiologic significance of apolipoprotein E mutations in lipoprotein glomerulopathy. *Trend Cardiovasc Med* 2002; 12: 67-70

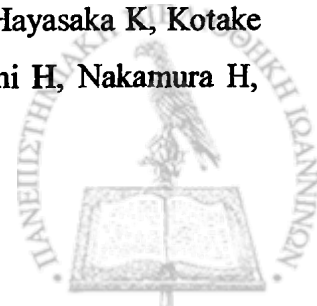
135. Saito T, Oikawa S, Sato H, Sato T, Ito S, Sasaki J. Lipoprotein glomerulopathy: Significance of lipoprotein and ultrastructural features. *Kidney Int* 1999; 55 (Suppl): S37-S41

136. Saito T, Oikawa S, Sato H, Sasaki J. Lipoprotein glomerulopathy: Renal lipodosis induced by novel apolipoprotein E variants. *Nephron* 1999; 83: 193-201

137. Chang CF, Lin CC, Chen JY, Yang AH, Shiao MS, Kao JT, Yang WC. Lipoprotein glomerulopathy associated with psoriasis vulgaris: report of 2 cases with apolipoprotein E3/3. *Am J Kidney Dis* 2003; 42: E18-E23

138. Karet FE, Lifton RP. Lipoprotein glomerulopathy: A new role for apolipoprotein E? *J Am Soc Nephrol* 1997; 8: 840-842

139. Oikawa S, Matsunaga A, Saito T, Sato H, Seki T, Hshi K, Hayasaka K, Kotake H, Midorikawa H, Sekikawa A, Hara S, Abe K, Toyota T, Jingami H, Nakamura H,



Sasaki J. Apolipoprotein E Sendai (Arginine 145→Proline): A new variant associated with lipoprotein glomerulopathy. *J Am Soc Nephrol* 1997; 8: 820-823

140. Ando M, Sasaki J, Hua H, Matsunaga A, Uchida K, Jou K, Oikawa S, Saito T, Nihei H. A novel 18-amino acid deletion in apolipoprotein E associated with lipoprotein glomerulopathy. *Kidney Int* 1999; 56: 1317-1323

141. Konishi K, Saruta T, Kuramochi S, Oikawa S, Saito T, Han H, Matsunaga A, Sasaki J. Association of a novel 3-amino acid deletion of apolipoprotein E (Apo E Tokyo) with lipoprotein glomerulopathy. *Nephron* 1999; 83: 214-218

142. Matsunaga A, Sasaki J, Komatsu T, Kanatsu K, Tsuji E, Moriyama K, Koga T, Arakawa K, Oikawa S, Saito T, Kita T, Doi T. A novel apolipoprotein E mutation, E2 (Arg25Cys), in lipoprotein glomerulopathy. *Kidney Int* 1999; 56: 421-427

143. Ogawa T, Maruyama K, Hattori H, Arai H, Kondoh I, Egashira T, Watanabe T, Kobayashi Y, Morikawa A. A new variant of apolipoprotein E (apo E Maebashi) in lipoprotein glomerulopathy. *Pediatr Nephrol* 2000; 14: 149-151

144. Ishigaki Y, Oikawa S, Suzuki T, Usui S, Magoori K, Kim DH, Suzuki H, Sasaki J, Sasano H, Okazaki M, Toyota T, Saito T, Yamamoto TT . Virus-mediated transduction of apolipoprotein E (ApoE)-sendai develops lipoprotein glomerulopathy in ApoE-deficient mice. *J Biol Chem* 2000; 275: 31269-31273

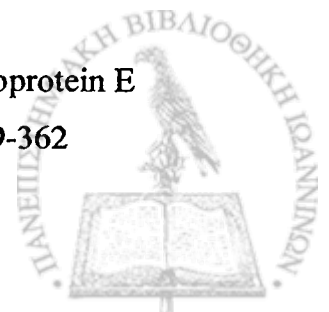
145. Hoffmann M, Scharnagl H, Panagiotou E, Banghard W, Wieland H, Marz W. Diminished LDL receptor and high heparin binding of apolipoprotein E2 Sendai associated with lipoprotein glomerulopathy. *J Am Soc Nephrol* 2001; 12: 524-530

146. Murano T, Matsumura R, Misawa Y, Ozaki H, Miyashita Y, Yoshida S, Sueioshi M, Sugiyama T, Shirai K. Interaction of endothelial cells and triglyceride-rich lipoproteins with apolipoprotein E (Arg→Cys) from a patient with lipoprotein glomerulopathy. *Metabolism* 2002; 51: 201-205

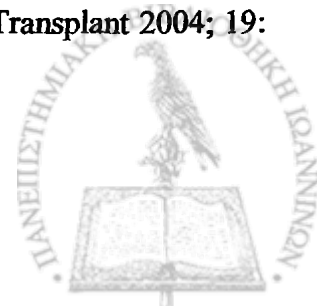
147. Arai T, Yamashita S, Yamane M, Manabe N, Matsuzaki T, Kiriya K, Kanayama Y, Himeno S, Matsuzawa Y. Disappearance of intraglomerular lipoprotein thrombi and marked improvement of nephrotic syndrome by bezafibrate treatment in a patient with lipoprotein glomerulopathy. *Atherosclerosis* 2003; 169: 293-299

148. Ieiri N, Hotta O, Taguma Y. Resolution of typical lipoprotein glomerulopathy by intensive lipid-lowering therapy. *Am J Kidney Dis* 2003; 41: 244-249

149. Attila G, Noyan A, Karabay Bayazit A, Acarturk E, Anarat A. Apolipoprotein E polymorphism in childhood nephrotic syndrome. *Pediatr Nephrol* 2002; 17: 359-362



150. Shiraki M, Shiraki Y, Aoki C, Hosoi T, Inoue S, Kaneki M, Ouchi Y. Association of bone mineral density with apolipoprotein E phenotype. *J Bone Miner Res* 1997; 12: 1438-1445
151. Cauley JA, Zmuda JM, Yaffe K, Kuller LH, Ferrell RE, Wisniewski SR, Cummings SR. Apolipoprotein E polymorphism: A new genetic marker of hip fracture risk-The Study of Osteoporotic Fractures. *J Bone Miner Res* 1999; 14: 1175-1181
152. Kohlmeier M, Saupe J, Schaefer K, Asmus G. Bone fracture history and prospective bone fracture risk of hemodialysis patients are related to apolipoprotein E genotype. *Calcif Tissue Int* 1998; 62: 278-281
153. Saupe J, Shearer MJ, Kohlmeier M. Phylloquinone transport and its influence on γ -carboxyglutamate residues of osteocalcin in patients on maintenance hemodialysis. *Am J Clin Nutr* 1993; 58: 204-208
154. Nakashima A, Yorioka N, Tanjii C, Asakimori Y, Ago R, Usui K, Shigemoto K, Harada S. Bone mineral density may be related to atherosclerosis in hemodialysis patients. *Osteoporos Int* 2003; 14: 369-373
155. Liberopoulos EN, Elisaf MS. Could apolipoprotein E polymorphisms be hidden behind the relation between bone mineral density and atherosclerosis in hemodialysis patients? *Osteoporos Int* 2003; 14: 957
156. Gejyo F, Kimura H, Suzuki S, Miyazaki R, Naiki H, Nakakuki K. Apolipoprotein E and alpha 1-antichymotrypsin in dialysis-related amyloidosis. *Kidney Int* 1997; 62 (Suppl): S75-S78
157. Chew STH, Newman MF, White WD, Conlon PJ, Saunders AM, Strittmatter WJ, Landolfo K, Grocott HP, Stafford-Smith M. Preliminary report on the association of apolipoprotein E polymorphisms, with postoperative peak serum creatinine concentrations in cardiac surgical patients. *Anesthesiology* 2000; 93: 325-331
158. Buzello M, Toring J, Faulhaber J, Ehmke H, Ritz E, Amann K. The apolipoprotein E knockout mouse: a model documenting accelerated atherosclerosis in uremia. *J Am Soc Nephrol* 2003; 14: 311-316
159. Buzello M, Haas CS, Hauptmann F, Gross ML, Faulhaber J, Schultze-Mosgau S, Ehmke H, Ritz E, Amann K. No aggravation of renal injury in apolipoprotein E knockout mice (ApoE^{-/-}) after subtotal nephrectomy. *Nephrol Dial Transplant* 2004; 19: 566-573



160. Wen M, Segerer S, Dantas M, Brown PA, Hudkins KL, Goodpaster T, Kirk E, LeBoeuf RC, Alpers CE. Renal injury in apolipoprotein E-deficient mice. *Lab Invest* 2002; 82: 999-1006

161. Ivanovski O, Nguyen-Khoa T, Phan O, Massy ZA. Could proteinuria evaluation be helpful in predicting renal progression in apolipoprotein E-deficient (E^{-/-}) mice with chronic renal failure? *Nephrol Dial Transplant* 2004; 19: 1013-1014

162. Paka L, Goldberg IJ, Obunike JC, Choi SY, Saxena U, Goldberg ID, Pillarisetti S. Perlecan mediates the antiproliferative effect of apolipoprotein E on smooth muscle cells. An underlying mechanism for the modulation of smooth muscle cell growth? *J Biol Chem* 1999; 274: 36403-36408

163. Gervais M, Pons S, Nicoletti A, Cosson C, Giudicelli JF, Richer C. Fluvastatin prevents renal dysfunction and vascular NO deficit in apolipoprotein E-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003; 23: 183-189

164. Bruneval P, Bariety J, Belair M-F, Mandet C, Heudes D, Nicoletti A. Mesangial expansion associated with glomerular endothelial cell activation and macrophage recruitment is developing in hyperlipidaemic apoE null mice. *Nephrol Dial Transplant* 2002; 17: 2099-2107

165. Blue ML, Williams DL, Zucker S, Khan SA, Blum CB. Apolipoprotein E synthesis in human kidney, adrenal gland, and liver. *Proc Natl Acad Sci USA* 1983; 80: 283-287

166. Alsayed N, Rebourcet R. Abnormal concentrations of CII, CIII, and E apolipoproteins among apolipoprotein B-containing, B-free, and A-I-containing lipoprotein particles in hemodialysis patients. *Clin Chem* 1991; 37: 387-393

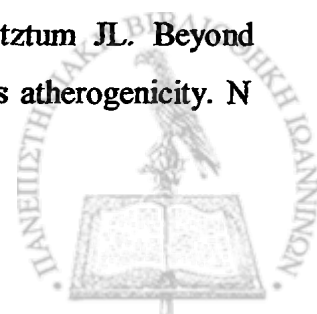
167. Kandoussi AM, Hugue V, Parra HJ, Dracon M, Fruchart JC, Tacquet A, Cachera C. Apolipoprotein AI and apolipoprotein B containing particle analysis in normolipidemic hemodialyzed patients: evidence of free apolipoprotein E. *Am J Nephrol* 1996; 16: 287-292

168. Takemura T, Yoshioka K, Aya N, Murakami K, Matumoto A, Itakura H, Kodama T, Suzuki H, Maki S. Apolipoproteins and lipoprotein receptors in glomeruli in human kidney diseases. *Kidney Int* 1993; 43: 918-927

169. Sato H, Suzuki S, Kobayashi H, Ogino S, Inomata A, Arakawa M. Immunohistological localization of apolipoproteins in the glomeruli in renal disease: specifically apoB and apoE. *Clin Nephrol* 1991; 36: 127-133



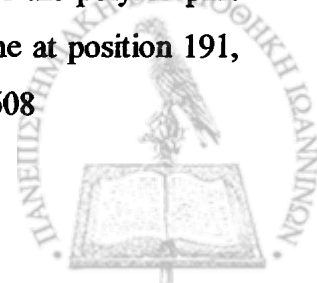
170. Grone HJ, Walli AK, Grone E, Kramer A, Clemens MR, Seidel D. Receptor mediated uptake of apo B and apoE rich lipoproteins by human glomerular epithelial cells. *Kidney Int* 1990; 37: 1449-1459
171. Gordon T, Castelli WP, Hjortland MC, Kannel WB, Dawber TR. High density lipoprotein as a protective factor against coronary heart disease: the Framingham study. *Am J Med* 1977; 62: 707-714
172. Gordon DJ, Rifkind BM. High-density lipoproteins — the clinical implications of recent studies. *N Engl J Med* 1989; 321: 1311–1316
173. Barter PJ, Rye K. Molecular mechanisms of reverse cholesterol transport. *Curr Opin Lipidol* 1996; 7: 82–87
174. Rader DJ. High-density lipoproteins and atherosclerosis. *Am J Cardiol* 2002; 90 (Suppl 1): 62-70
175. Stein O, Stein Y. Atheroprotective mechanisms of HDL. *Atherosclerosis* 1999; 144: 285-301
176. Navab M, Berliner JA, Subbanagounder G, Hama S, Lusis AJ, Castellani LW, Reddy S, Shih D, Shi W, Watson A.D. HDL and the inflammatory response induced by LDL-derived oxidized phospholipids. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001; 21: 481–488
177. Navab M, Hama SY, Cooke CJ, Anantharamaiah GM, Chaddha M, Jin L, Subbanagounder G, Faull KF, Reddy ST, Miller NE. Normal high density lipoprotein inhibits three steps in the formation of mildly oxidized low density lipoprotein: step 1. *J Lipid Res* 2000; 41: 1481–1494
178. Navab M, Hama SY, Anantharamaiah GM, Hassan K, Hough GP, Watson AD, Reddy ST, Sevanian A, Fonarow GC, Fogelman AM. Normal high density lipoprotein inhibits three steps in the formation of mildly oxidized low density lipoprotein: steps 2 and 3. *J Lipid Res* 2000; 41: 1495–1508
179. Parthasarathy S, Barnett J, Fong LG. High-density lipoprotein inhibits the oxidative modification of low-density lipoprotein. *Biochim Biophys Acta*. 1990; 1044: 275–283
180. Witztum JL, Steinberg D. Role of oxidized low density lipoprotein in atherogenesis. *J Clin Invest* 1991; 88: 1785-1792
181. Steinberg D, Parthasarathy S, Carew TE, Khoo JC, Witztum JL. Beyond cholesterol modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity. *N Engl J Med* 1989; 320: 915–924



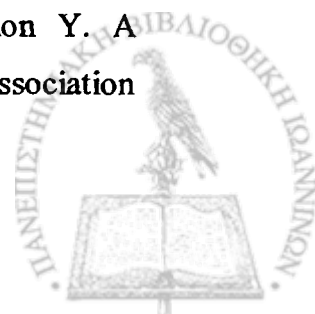
182. Mackness MI, Durrington PN. High density lipoprotein, its enzymes and its potential to influence lipid peroxidation. *Atherosclerosis* 1995; 115: 243–253
183. Navab M, Hama SY, Hough GP, Hedrick CC, Sorenson R, La Du BN, Kobashigawa JA, Fonarow GC, Berliner JA, Laks H, Fogelman AM. High density associated enzymes: their role in vascular biology. *Curr Opin Lipidol* 1998; 9: 449-456
184. Nagano Y, Arai H, Kita T. High density lipoprotein loses its effect to stimulate efflux of cholesterol from foam cells after oxidative modification. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 6457-64661
185. Durrington PN, Mackness B, Mackness MI. Paraonase and atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001; 21; 473–480
186. Li WF, Costa L, Furlong CE. Serum paraonase status: a major factor in determining resistance to organophosphates. *J Tox Envir Hlth* 1993; 40: 337-346
187. Harel M, Aharoni A, Gaidukov L, Brumshtein B, Khersonsky O, Meged R, Dvir H, Ravelli RBG, McArthy A, Toker L, Silman S, Sussman JL, Tawfik DS. Structure and evolution of the serum paraonase family of detoxifying and anti-atherosclerotic enzymes. *Nat Struct Mol Biol* 2004; 11: 412-419
188. Primo-Parma SL, Sorenson RC, Teiber J, La Du BN. The human serum paraonase/arylesterase gene (PON1) is one member of a multigene family. *Genomics* 1996; 33: 498–509
189. Hegele RA, Connelly PW, Scherer SW, Hanley AJG, Harris SB, Tsui L-C, Zinman B. Paraonase-2 gene (PON2) G148 variant associated with elevated fasting plasma glucose in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab.* 1997; 82: 3373–3377
190. La Du BN, Aviram M, Billecke S, Navab M, Primo-Parma S, Sorenson RC, Standiford TJ. On the physiological role(s) of the paraonasese. *Chemico-Biol Interac* 1999; 119–120: 379–38
191. Mackness MI, Walker CH. "A"-esterase activity in the lipoprotein fraction of sheep serum. *Biochem Pharmacol* 1981; 30: 903–906
192. Kelso GJ, Stuart WD, Richter RJ, Furlong CE, Jordan-Starck TC, Harmony JAK. Apolipoprotein J is associated with paraonase in human plasma. *Biochemistry* 1994; 33: 832–839



192. Kelso GJ, Stuart WD, Richter RJ, Furlong CE, Jordan-Starck TC, Harmony JAK. Apolipoprotein J is associated with paraoxonase in human plasma. *Biochemistry* 1994; 33: 832–839
193. Blatter M-C, James RW, Messmer S, Barja F, Pometta D. Identification of a distinct human high-density lipoprotein subspecies defined by a lipoprotein-associated protein, K-85: identity of K-85 with paraoxonase. *Eur J Biochem* 1993; 211: 871–879
194. Mackness MI, Arrol S, Durrington PN. Paraoxonase prevents accumulation of lipoperoxides in low-density lipoprotein. *FEBS Lett* 1991; 286: 152–154
195. Mackness MI, Abbott CA, Arrol S, Durrington PN. The role of high density lipoprotein and lipid-soluble antioxidant vitamins in inhibiting low-density lipoprotein oxidation. *Biochem J* 1993; 294: 829–835
196. Watson AD, Berliner JA, Hama SY, La Du BN, Fault KF, Fogelman AM, Navab M. Protective effect of high density lipoprotein associated paraoxonase: inhibition of the biological activity of minimally oxidised low-density lipoprotein. *J Clin Invest* 1995; 96: 2882–2891
197. Arrol S, Mackness MI, Durrington PN. High-density lipoprotein associated enzymes and the prevention of low-density lipoprotein oxidation. *Eur J Lab Med* 1996; 4: 33–38.
198. Aviram M, Rosenblat M, Bisgaier CL, Newton RS, Primo-Paromo SL, La Du BN. Paraoxonase inhibits high-density lipoprotein and preserves its functions. *J Clin Invest* 1998; 101: 1581–1590
199. Mackness MI, Durrington PN. High density lipoprotein, its enzymes and its potential to influence lipid peroxidation. *Atherosclerosis* 1995; 115: 243–253
200. Rodrigo L, Mackness B, Durrington PN, Hernandez A, Mackness MI. Hydrolysis of platelet-activating factor by human serum paraoxonase. *Biochem J* 2001; 354: 1–7
201. Aviram M, Hardak E, Vaya J, Mahmood S, Milo S, Hoffmann A, Billicke S, Draganov D, Rosenblat M. Human serum paraoxonases (PON1) Q and R selectively decrease lipid peroxides in human coronary and carotid atherosclerotic lesions: PON1 esterase and peroxide-like activities. *Circulation* 2000; 101: 2510–2517.
202. Adkins S, Gan KN, Mody M, La Du BN. Molecular basis for the polymorphic forms of human serum paraoxonase/arylesterase: glutamine or arginine at position 191, for the respective A or B allozymes. *Am J Hum Genet* 1993; 52: 598–608



203. Humbert R, Adler DA, Disteché CK, Hassett C, Omiecinski CJ, Furlong EC. The molecular basis of the human serum paraoxonase activity polymorphism. *Nat Genet* 1993; 3: 73–76.
204. Mackness B, Mackness MI, Arrol S, Turkie W, Durrington PN. Effect of the molecular polymorphisms of human paraoxonase (PON1) on the rate of hydrolysis of paraoxon. *Br J Pharmacol* 1997; 112: 265–268
205. Davies HG, Richter RJ, Keifer M, Broomfield CA, Sowalla J, Furlong CE. The effect of the human serum paraoxonase polymorphism is reversed with diazoxon, soman and sarin. *Nat Genet* 1996; 14: 334–336
206. Mackness MI, Arrol S, Mackness B, Durrington PN. The alloenzymes of paraoxonase determine the effectiveness of high-density lipoprotein in protecting low density lipoprotein against lipid-peroxidation. *Lancet* 1997; 349: 851–852
207. Mackness B, Mackness MI, Arrol S, Turkie W, Durrington PN. Effect of the human serum paraoxonase 55 and 192 genetic polymorphisms on the protection by high density lipoprotein against low density lipoprotein oxidative modification. *FEBS Lett* 1998; 423: 57–60
208. Aviram M, Billecke S, Sorenson R, Bisgaier C, Newton R, Rosenblat M, Eroglu J, Hsu C, Dunlop C, La Du BN. Paraoxonase active site required for protection against LDL oxidation involves its free sulfhydryl group and is different from that required for its arylesterase/paraoxonase activities: selective active of human paraoxonase alloenzymes Q and R. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998; 10: 1617–1624
209. Blatter Garin, M-C., James RW, Dussoix P, Blanche H, Ruiz J. Paraoxonase polymorphism Met-Leu54 is associated with modified concentrations of the enzyme. *J Clin Invest* 1997; 99: 62–66
210. Mackness B, Durrington PN Mackness MI. Polymorphisms of paraoxonase genes and low-density lipoprotein lipid peroxidation. *Lancet* 1999; 353: 468–469
211. Leviev I, Negro F, James RW. Two alleles of the human paraoxonase gene produce different amounts of mRNA. An explanation for differences in serum concentrations of paraoxonase associated with the (Leu-Met54) polymorphism. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17: 2935–2939
212. Suehiro T, Nakamura T, Inoue M, Shiinoki T, Ikeda Y, Kuunon Y. A polymorphism upstream from the human paraoxonase (PON1) gene and its association with PON1 expression. *Atherosclerosis* 2000; 150: 295–298



213. Leviev I, James R.W. Promoter polymorphisms of human paraoxonase PON1 gene and serum activities and concentrations. *Arterioscl Thromb Vasc Biol* 2000; 20: 516–521
214. Brophy V.H, Hastings M.D, Clendenning J.B, Richter R.J, Jarvik G.P, Furlong C.E. Polymorphisms in the human paraoxonase (PON1) promoter. *Pharmacogenetics* 2001; 11: 77–84
215. Brophy V.H, Jampsa R.L, Clendenning J.B, McKinstry L.A, Jarvik G.P, Furlong C.E. Effects of 5' regulatory-region polymorphisms on paraoxonase-gene (PON1) expression. *Am J Hum Genet* 2001; 68: 1428–1436
216. Boright AP, Connelly PW, Brunt JH, Scherer SW, Tsui L-C, Hegele RA. Genetic variation in paraoxonase-1 and paraoxonase-2 is associated with variation in plasma lipoproteins in Alberta Hutterites. *Atherosclerosis* 1998; 139:131-136
217. Mackness B, Mackness MI, Durrington PN, Arrol S, Evans AE, McMaster D, Ferrières J, Ruidavets J-B, Williams NR, Howard AN. Paraoxonase activity in two healthy populations with differing rates of coronary heart disease. *Eur J Clin Invest* 2000; 30: 4–10
218. Mackness MI, Walker CH, Carlson LA. Low A-esterase activity in serum of patients with fish-eye disease. *Clin Chem* 1987; 33: 587–588
219. Mackness MI, Peuchant E, Dumon M-F, Walker CH, Clerc M. Absence of A-esterase activity in the serum of a patient with Tangier disease. *Clin Biochem* 1989; 22: 475–478
220. James RW, Blatter Garin MC, Calabresi L, Miccoli R, von Eckardstein A, Tilly-Kiesi M, Taskinen MR, Assmann G, Franceschini G. Modulated serum activities and concentrations of paraoxonase in high density lipoprotein deficiency states. *Atherosclerosis* 1998; 139: 77–82
221. Mackness MI, Mackness B, Durrington PN, Connelly PW, Hegele RA. Paraoxonase: biochemistry, genetics and relationship to plasma lipoproteins. *Curr Opin Lipidol* 1996; 7: 69–76
222. Mackness MI, Bouiller A, Hennuyer M, Mackness B, Hall M, Tailleux A, Duriez P, Delfly B, Durrington PN, Fruchart, J-C. Paraoxonase activity is reduced by a pro-atherosclerotic diet in rabbits. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 269: 232–236



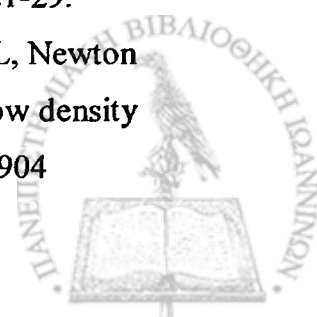
223. Sutherland WHF, Walker RJ, de Jong SA, van Rij AM, Phillips V, Walker HL. Reduced postprandial serum paraoxonase activity after a meal rich in used cooking fat. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999; 19: 1340–1347
224. Mackness B, Durrington PN, Mackness MI. Low paraoxonase in Persian Gulf War veterans self-reporting Gulf War syndrome. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 276: 729–733
225. Haley RW, Billecke S, La Du BN. Association of low PON1 type Q (type A) arylesterase activity with neurologic symptom complexes in Gulf War veterans. *Toxicol Appl Pharmacol* 1999; 157: 227–233.
226. Ferre N, Camps J, Fernandez-Ballart J, Arijia V, Murphy MM, Ceruelo S, Biarnes E, Vilella E, Tous M, Joven J. Regulation of serum paraoxonase activity by genetic, nutritional, and lifestyle factors in the general population. *Clin Chem* 2003; 49: 1491-1497
227. Boemi M, Sirolla C, Testa R, Cenerelli S, Fumelli P, James RW. Smoking is associated with reduced serum levels of the antioxidant enzyme, paraoxonase, in type 2 diabetic patients. *Diabet Med* 2004; 21: 423-427
228. Van der Gaag MS, van Tol A, Scheek LM, James RW, Urgert R, Schaafsma G, Hendriks HF. Daily moderate alcohol consumption increases serum paraoxonase activity: a diet-controlled, randomised intervention study in middle-aged men. *Atherosclerosis* 1999; 147: 405–410
229. Hayek T, Fuhrman B, Vaya J, Rosenblat M, Belinky P, Coleman R, Elis A, Aviram M. Reduced progression of atherosclerosis in apolipoprotein E deficient mice following consumption of red wine, or its polyphenols quercetin or catechin, is associated with reduced susceptibility of LDL to oxidation and aggregation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17: 2744–2752
230. Van Lenten BJ, Hama SY, de Beer FC, Stafforini DM, McIntyre TM, Prescott SM, La Du BN, Fogelman AM, Navab M. Anti-inflammatory HDL becomes pro-inflammatory during the acute phase response. *J Clin Invest* 1995; 96: 2758–2767
231. Feingold KR, Memon RA, Moser AH, Grunfeld C. Paraoxonase activity in the serum and hepatic mRNA levels decrease during the acute phase response. *Atherosclerosis* 1998; 139: 307–315



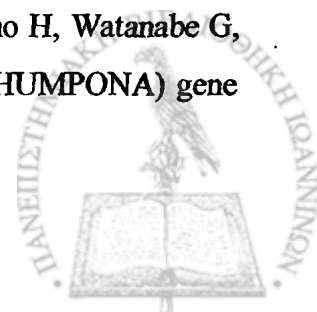
232. Kumon Y, Suehiro T, Ikeda Y, Hashimoto K. Human paraoxonase-1 gene expression by HepG2 cells is downregulated by interleukin-1 β and tumor necrosis factor- α , but is upregulated by interleukin-6. *Life Sci* 2003; 73:2807-2815
233. McElveen J, Mackness MI, Colley CM, Peard T, Warner S, Walker CH. Distribution of paraoxon hydrolysing activity in the serum of patients after myocardial infarction. *Clin Chem* 1986; 32: 671-673
234. Ayub A, Mackness MI, Arrol S, Mackness B, Patel J, Durrington PN. Serum paraoxonase after myocardial infarction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999; 19: 330-335
235. Mackness MI, Harty D, Bhatnagar D, Winocour PH, Arrol S, Ishola M, Durrington PN. Serum paraoxonase activity in familial hypercholesterolaemia and insulin-dependent diabetes mellitus. *Atherosclerosis* 1991; 86: 193-199
236. Abbott CA, Mackness MI, Kumar S, Boulton AJM, Durrington PN. Serum paraoxonase activity, concentration, and phenotype distribution in diabetes mellitus and its relationship to serum lipids and lipoproteins. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995; 15: 1812-1818
237. Mackness B, Mackness MI, Arrol S, Turkie W, Julier K, Abuashia B, Miller JE, Boulton AJM, Durrington PN. Serum paraoxonase (PON1) 55 and 192 polymorphism and paraoxonase activity and concentration in non-insulin dependent diabetes mellitus. *Atherosclerosis* 1998; 139: 341-349
238. Ikeda Y, Suehiro T, Inoue M, Nakauchi Y, Morita T, Arai K, Hiroyuki I, Kumon Y, Hashimoto K. Serum paraoxonase activity and its relationship to diabetic complications in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Metabolism* 1998; 47: 598-602
239. Mackness B, Durrington PN, Abuashia B, Boulton AJM, Mackness MI. Low paraoxonase activity in type II diabetes complicated by retinopathy. *Clin Sci* 2000; 98: 355-363
240. Agachan B, Yilmaz H, Karaali Z, Isbir T. Paraoxonase 55 and 192 polymorphism and its relationship to serum paraoxonase activity and serum lipids in Turkish patients with non-insulin dependent diabetes mellitus. *Cell Biochem Funct* 2004; 22: 163-168



241. Kumru S, Aydin S, Gursu MF, Ozcan Z. Changes of serum paraoxonase (an HDL-cholesterol-associated lipophilic antioxidant) and arylesterase activities in severe preeclamptic women. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2004; 114: 177-181
242. Senti M, Tomas M, Fito M, Weinbrenner T, Covas MI, Sala J, Masia R, Marrugat J. Antioxidant paraoxonase 1 activity in the metabolic syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88: 5422-5426
243. Raiszadeh F, Solati M, Etemadi A, Azizi F. Serum paraoxonase activity before and after treatment of thyrotoxicosis. *Clin Endocrinol* 2004; 60: 75-80
244. Durrington P.N, Mackness B, Mackness M.I. The Hunt for Nutritional and Pharmacological Modulators of Paraoxonase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*2002; 22: 1248-1250
245. Aviram M, Rosenblat M, Bisgaier CL, Newton RS. Atorvastatin and gemfibrozil metabolites, but not the parent drugs are potent antioxidants against lipoprotein oxidation. *Atherosclerosis* 1998; 138: 271–280
246. Paragh G, Balogh Z, Seres I, Harangi M, Boda J, Kovacs P. Effect of gemfibrozil on HDL-associated serum paraoxonase activity and lipoprotein profile in patients with hyperlipidaemia. *Clin Drug Invest* 2000; 19: 277–282.
247. Durrington PN, Mackness MI, Bhatnagar D, Julier K, Prais H, Arrol S, Morgan J, Wood GNI. Effects of two different fibric acid derivatives on lipoproteins, cholesteryl ester transfer, fibrinogen, plasminogen activator inhibitor and paraoxonase activity in type IIb hyperlipoproteinaemia. *Atherosclerosis* 1998; 138: 217–225
248. Tomas M, Senti M, Garcia-Faria F, Vila J, Torrents A, Covas M, Marrugat J. Effect of simvastatin therapy on paraoxonase activity and related lipoproteins in familial hypercholesterolaemic patients. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20: 2113–2119
249. Deakin S, Leviev I, Guernier S, James RW. Simvastatin modulates expression of the PON1 gene and increases serum paraoxonase. A role for sterol regulatory element-binding protein-2. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003; 23: 2083-2089
250. Beltowski J, Wojcicka G, Jamroz A. Leptin decreases plasma paraoxonase 1 (PON1) activity and induces oxidative stress: the possible novel mechanism for proatherogenic effect of chronic hyperleptinemia. *Atherosclerosis* 2003 ; 170 :21-29.
251. Aviram M, Rosenblat M, Billecke S, Eroglu J, Sorenson R, Bisgaier CL, Newton RS, La Du B. Human serum paraoxonase (PON1) is inactivated by oxidized low density lipoprotein and preserved by antioxidants. *Free Radic Biol Med* 1999; 26: 892-904



252. Hedrick CC, Thorpe SR, Fu MX, Harper CM, Yoo J, Kim SM, Wong H, Peters AL. Glycation impairs high-density lipoprotein function. *Diabetologia* 2000; 43: 312-320
253. Mackness B, Hunt R, Durrington PN, Mackness MI. Increased immunolocalisation of paraoxonase, clusterin and apolipoprotein AI in the human artery wall with progression of atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17: 1233-1238
254. Aviram M, Hardak E, Vaya J, Mahmood S, Milo S, Hoffmann A, Billicke S, Draganov D, Rosenblat M. Human serum paraoxonases (PON1) Q and R selectively decrease lipid peroxides in human coronary and carotid atherosclerotic lesions: PON1 esterase and peroxide-like activities. *Circulation* 2000; 101: 2510-2517
255. Shih D.M, Gu L, Xia Y.-R, Navab M, Li W-F, Hama S, Castellani L.W, Furlong C.E, Costa L.G, Fogelman A.M, Lusis A.J. Mice lacking serum paraoxonase are susceptible to organophosphate toxicity and atherosclerosis. *Nature* 1998; 394: 284-287
256. Rozenberg O, Shih DM, Aviram M. Human serum paraoxonase 1 decreases macrophage cholesterol biosynthesis. Possible role for its phospholipase-A2-like activity and lysophosphatidylcholine formation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003; 23: 461-467
257. Durrington PN, Mackness B, Mackness MI. Paraoxonase and atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001; 21: 473-480
258. Mackness MI, Mackness B, Durrington PN. Paraoxonase and coronary heart disease. *Atherosclerosis Suppl* 2002; 3: 49-55
259. Ruiz J, Blanche H, James RW, Garin, M-CB, Vaisse C, Charpentier G, Cohen N, Morabia A, Passa P, Froguel P. Gln-Arg192 polymorphism of paraoxonase and coronary heart disease in type 2 diabetes. *Lancet* 1995; 346: 869-872
260. Serrato M, Marian AJ. A variant of human paraoxonase/arylesterase (HUMPONA) gene is a risk factor for coronary artery disease. *J Clin Invest* 1995; 96: 3005-3008
261. Odawara M, Tachi Y, Yamashita K. Paraoxonase polymorphism (Gln¹⁹²-Arg) is associated with coronary heart disease in Japanese non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82: 2257-2260.
262. Zama T, Murata M, Matsubara Y, Kawano K, Aoki N, Yoshino H, Watanabe G, Ishikawa K, Ikeda Y. A 192-Arg variant of the human paraoxonase (HUMPONA) gene



polymorphism is associated with an increased risk for coronary artery disease in the Japanese. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17: 3565–3569

263. Pfohl M, Koch M, Euderle MD, Kühn R, Füllhase J, Karsch KR, Haring HU. Paraoxonase 192 Glu/Arg Gene polymorphism, coronary artery disease, and myocardial infarction in type 2 diabetes. *Diabetes* 1999; 48: 623–627

264. Pati N, Pati U. Paraoxonase gene polymorphism and coronary artery disease in Indian subjects. *Int J Cardiol* 1998; 66: 165–168

265. Imai Y, Marita H, Kurihara H, Sugiyama T, Kato N, Ebihara A, Hamada C, Kurihara Y, Shindo T, Oh-hashii Y, et al. Evidence for association between paraoxonase gene polymorphisms and atherosclerotic diseases. *Atherosclerosis* 2000; 149: 435–442

266. Sanghera DK, Saha N, Aston CE, Kamboh MI. Genetic polymorphism of paraoxonase and the risk of coronary heart disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17: 1067–1073

267. Antikainen M, Murtomäki S, Syväne M, Pahlman R, Tahvanainen E, Jauhiainen M, Frick MH, Ehnholm C. The Gln-Arg 191 polymorphism of human paraoxonase gene (HUMPONA) is not associated with the risk of coronary artery disease in Finns. *J Clin Invest* 1996; 98: 883–885

268. Aubó C, Sentí M, Marragut J, Tomás M, Vila J, Sala J, Masiá R. Risk of myocardial infarction with Gln/Arg 192 polymorphisms in the human paraoxonase gene and diabetes mellitus. *Eur Heart J* 2000; 21: 31–38

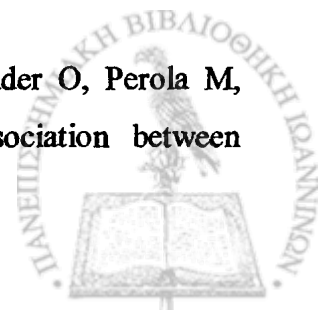
269. Herrmann SM, Blanc H, Poirier O, Arveiter D, Luc G, Evans A, Marques-Vidal P, Bard JM, Cambien F. The Gln/Arg polymorphism of human paraoxonase (PON 192) is not related to myocardial infarction in the ECTIM study. *Atherosclerosis* 1996; 126: 299–304

270. Ombres D, Pannitteri G, Moutali A, Candeloro A, Seccareccia F, Campagna F, Cantini R, Campa PP, Ricci G, Arca M. The Gln-Arg 192 polymorphism of the human paraoxonase gene is not associated with coronary artery disease in Italian patients. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998; 18: 1611–1616

271. Ko Y-L, Ko Y-S, Wang S-M, Hsu L-A, Chang C-J, Chu P-H, Cheng NJ, Chen WJ, Chiang CW, Lee YS. The Gln-Arg 191 polymorphism of the human paraoxonase gene is not associated with the risk of coronary artery disease among Chinese in Taiwan. *Atherosclerosis* 1998; 141: 259–264



272. Rea IM, McKeown PP, McMaster D, Young IS, Patterson C, Savage MJ, Belton C, Marchegiani F, Olivieri F, Bonafe M, Franceschi C. Paraoxonase polymorphisms PON1 192 and 55 and longevity in Italian centenarians and Irish nonagenarians. A pooled analysis. *Exp Gerontol* 2004; 39: 629-635
273. Voetsch B, Benke KS, Panhuysen CI, Damasceno BP, Loscalzo J. The combined effect of paraoxonase promoter and coding region polymorphisms on the risk of arterial ischemic stroke among young adults. *Arch Neurol* 2004; 61: 351-356
274. Voetsch B, Benke K. S, Damasceno B. P, Siqueira L. H, Loscalzo J. Paraoxonase 192 Gln->Arg Polymorphism: An Independent Risk Factor for Nonfatal Arterial Ischemic Stroke Among Young Adults. *Stroke* 2002; 33: 1459-1464
275. Campo S, Sardo MA, Trimarchi G, Bonaiuto M, Castaldo M, Fontana L, Bonaiuto A, Bitto A, Saitta C, Saitta A. The paraoxonase promoter polymorphism (-107)T>C is not associated with carotid intima-media thickness in Sicilian hypercholesterolemic patients. *Clin Biochem* 2004; 37: 388-394
276. Sanghera DK, Aston CE, Saha N, Kamboh MI. DNA polymorphisms in two paraoxonase genes (PON1 and PON2) are associated with the risk of coronary heart disease. *Am J Hum Genet* 1998; 62: 36-44
277. Salonen JT, Malin R, Toumaineu T-P, Nyysönen K, Lakka TA, Lehtimäki T. Polymorphism in high density lipoprotein gene and risk of acute myocardial infarction in men: prospective nested case-control study. *BMJ* 1999; 319: 487-488
278. Schmidt H, Schmidt R, Niederkorn K, Gradert GA, Schumacher M, Watzinger N, Hartung HP, Kostner GM. Paraoxonase PON1 polymorphism Leu-Met54 is associated with carotid atherosclerosis: results of Austrian Stroke Prevention Study. *Stroke* 1998; 29: 2043-2048
279. Schmidt R, Schmidt H, Fazekas F, Kapeller P, Roob G, Lechner A, Kostner GM, Hartung HP. MRI cerebral white matter lesions and paraoxonase PON1 polymorphisms: three-year follow-up of the Austrian Stroke Prevention Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20: 1811-1816
280. Sanghera DK, Saha N, Kamboh MI. The codon 55 polymorphism of the paraoxonase 1 gene is not associated with risk of coronary heart disease in Asian Indians and Chinese. *Atherosclerosis* 1998; 136: 217-223
281. Rontu R, Karhunen PJ, Ilveskoski E, Mikkelsen J, Kajander O, Perola M, Penttilä A, Koivisto AM, Lehtimäki T. Smoking-dependent association between



paraoxonase 1 M/L55 genotype and coronary atherosclerosis in males: an autopsy study. *Atherosclerosis* 2003; 171: 31-37

282. Wheeler JG, Keavney BD, Watkins H, Collins R, Danesh J. Four paraoxonase gene polymorphisms in 11212 cases of coronary heart disease and 12786 controls: meta-analysis of 43 studies. *Lancet* 2004; 363: 689-695

283. Jarvik GP, Rozek LS, Brophy VH, Hatsukami TS, Richter RJ, Schellenberg GD, Furlong CE. Paraoxonase (PON1) phenotype is a better predictor of vascular disease than is PON1₁₉₂ or PON1₅₅ genotype. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20: 2441-2447

284. Mackness B, Davies G.K, Turkie W, Lee E, Roberts D.H, Hill E, Roberts C, Durrington P.N, Mackness M.I. Paraoxonase status in coronary heart disease—are activity and concentration more important than genotype? *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001; 21: 1451-1457

285. Mackness B, Durrington P, McElduff P, Yarnell J, Azam N, Watt M, Mackness M. Low paraoxonase activity predicts coronary events in the Caerphilly prospective study. *Circulation* 2003; 107: 2775-2779

286. Kao Y-L, Donaghue K, Chan A, Knight J, Silink A. A variant of paraoxonase (PON1) gene is associated with diabetic retinopathy in IDDM. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; 83: 2589-2592

287. Kao Y, Donaghue KC, Chan A, Bennetts BH, Knight J, Silink M. Paraoxonase gene cluster is a genetic marker for early microvascular complications in type 1 diabetes. *Diabet Med* 2002; 19: 212-215

288. Ikeda Y, Suehiro T, Inoue M, Nakauchi Y, Morita T, Arie K, Ito H, Kumon Y, Hashimoto K. Serum paraoxonase activity and its relationship to diabetic complications in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Metabolism* 1998; 47: 598-602

289. Mackness B, Durrington PN, Abuashia B, Boulton AJM, Mackness MI. Low paraoxonase activity in type II diabetes mellitus complicated by retinopathy. *Clin Sci* 2000; 98: 355-363

290. Chiu KC, Chuang LM, Chu A, Lu J, Hu J, Fernando S. Association of paraoxonase 1 polymorphism with beta-cell function: a case of molecular heterosis. *Pancreas* 2004; 28: e96-e103

291. Akhmedova S, Anisimov S, Yakimovsky A, Schwartz E. Gln/Arg 191 polymorphism of paraoxonase and Parkinson's disease. *Hum Hered* 1999; 49: 178-180



292. Konda I, Yamamoto M. Genetic polymorphism of paraoxonase 1 (PON1) and susceptibility to Parkinson's disease. *Brain Res* 1998; 806: 271-273
293. Helbecque N, Cottel D, Codron V, Berr C, Amouyel P. Paraoxonase 1 gene polymorphisms and dementia in humans. *Neurosci Lett* 2004; 18: 41-44
294. Sklan EH, Lowenthal A, Korner M, Ritov Y, Landers DM, Rankinen T, Bouchard C, Leon AS, Rice T, Rao DC, Wilmore JH, Skinner JS, Soreq H. Acetylcholinesterase/paraoxonase genotype and expression predict anxiety scores in Health, Risk Factors, Exercise Training, and Genetics study. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004 (Epub ahead of print)
295. Hasselwander O, McEneny J, McMaster D, Fogarty DG, Nicholls DP, Maxwell AP, Young IS. HDL composition and HDL antioxidant capacity in patients on regular haemodialysis. *Atherosclerosis* 1999; 143: 125-133
296. Sutherland WHF, De Jong SA, Walker RJ. Hypochlorous acid and low serum paraoxonase activity in hemodialysis patients: an in vitro study. *Nephrol Dial Transplant* 2004; 19: 75-82
297. Serdyuk AP, Morton RE. Resistance of lipoproteins from continuous ambulatory peritoneal dialysis patients to in vitro oxidation. *Metabolism* 1997; 46: 833-839
298. Morena M, Cristol J-P, Dantoine T, Carbonneau MA, Descomps B, Canaud B. Protective effects of high-density lipoprotein against oxidative stress are impaired in haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant* 2000; 15: 389-395
299. Dantoine TF, Debord J, Charmes J-P, Merle L, Marquet P, Lachatre G, Leroux-Robert C. Decrease of serum paraoxonase activity in chronic renal failure. *J Am Soc Nephrol* 1998; 9: 2082-2088
300. Hasselwander O, McMaster D, Fogarty DG, Maxwell AP, Nicholls DP, Young IS. Serum paraoxonase and platelet-activating factor acetylhydrolase in chronic renal failure. *Clin Chem* 1998; 44: 179-181
301. Juretic D, Tadijanovic M, Rekić B, Simeon-Rudolf V, Reiner E, Baricic M. Serum paraoxonase activities in hemodialyzed uremic patients: cohort study. *Croat Med J* 2001; 42: 146-150
302. Dantoine T, Debord J, Charmes J-P, Merle L, Leroux-Robert C. Paraoxonase activity stimulation by salts is higher in chronic renal failure patients than in controls. *Nephrol Dial Transplant* 1998; 13: 816



303. Itahara T, Suehiro T, Ikeda Y, Inoue M, Nakamura T, Kumon Y, Kawada M, Hashimoto K. Serum paraoxonase and arylesterase activities in hemodialysis patients. *J Atheroscler Thromb* 2000; 7: 152-158
304. Paragh G, Asztalos L, Seres I, Balogh Z, Locsey L, Karpati I, Matyus J, Katona E, Harangi M, Kakuk G. Serum paraoxonase activity changes in uremic and kidney-transplanted patients. *Nephron* 1999; 83: 126-131
305. Paragh G, Seres I, Balogh Z, Varga Z, Karpati I, Matyus J, Ujhelyi L, Kakuk G. The serum paraoxonase activity in patients with chronic renal failure and hyperlipidemia. *Nephron* 1998; 80: 166-170
306. Schiavon R, De Fanti E, Giavarina D, Biasioli S, Cavalcanti G, Guidi G. Serum paraoxonase activity is decreased in uremic patients. *Clin Chim Acta* 1996; 247: 71-80
307. Paragh G, Seres I, Balogh Z, Varga Z, Karpati I, Matyus J, Ujhelyi L, Kakuk G. The serum paraoxonase activity in patients with chronic renal failure and hyperlipidemia. *Nephron* 1998; 80: 166-170
308. Schiavon R, Battaglia P, De Fanti E, Fasolin A, Biasioli S, Targa L, Guidi G. HDL3-related decreased serum paraoxonase (PON) activity in uremic patients: comparison with the PON1 allele polymorphism. *Clin Chim Acta* 2002; 324: 39-44
309. Biasioli S, Schiavon R, Petrosino L, De Fanti E, Cavalcanti G, Battaglia P, Fasolin A. Paraoxonase activity and paraoxonase 1 gene polymorphism in patients with uremia. *ASAIO J* 2003; 49: 295-299
310. Suehiro T, Ikeda Y, Shiinoki T, Inoue M, Kumon Y, Itahara T, Hashimoto K. Serum paraoxonase (PON1) concentration in patients undergoing hemodialysis. *J Atheroscler Thromb* 2002; 9: 133-138
311. Golnin AK, Φζζφνοl M, Σφζμεn EY, Aslan SL, Σφζμεn B. Renal cortical thickness and PON1 activity both decrease in chronic renal failure. *J Nephrol* 2002; 15: 144-149
312. Hasselwander O, Savage DA, McMaster D, Loughrey CM, McNamee PT, Middleton D, Nicholls DP, Maxwell AP, Young IS. Paraoxonase polymorphisms are not associated with cardiovascular risk in renal transplant recipients. *Kidney Int* 1999; 56: 289-298
313. Frishberg Y, Toledano H, Becker-Cohen R, Feigin E, Halle D. Genetic polymorphism in paraoxonase is a risk factor for childhood focal segmental glomerulosclerosis. *Am J Kidney Dis* 2000; 36: 1253-1261



314. Zhang B, Eto S, Fan P, Bian C, Shimoji E, Saito T, Saku K. Paraoxonase (Pon1) Q192R polymorphism and serum Pon1 activity in diabetic patients on maintenance hemodialysis. *Clin Nephrol* 2003; 60: 257-265
315. Araki S, Makita Y, Canani L, Ng D, Warram JH, Krolewski AS. Polymorphisms of human paraoxonase 1 gene (PON1) and susceptibility to diabetic nephropathy in type I diabetes mellitus. *Diabetologia* 2000; 43: 1540-1543
316. Pinizzotto M, Castillo E, Fiaux M, Temler E, Gaillard RC, Ruiz J. Paraoxonase2 polymorphisms are associated with nephropathy in type II diabetes. *Diabetologia* 2001; 44: 104-107
317. Arai H, Koizumi H, Aoki J, Inoue K. Platelet activating factor-acetylhydrolase (PAF-AH). *J Biochem* 2002; 131: 635-640
318. Ken Karasawa, Ayako Harada, Noriko Satoh, Keizo Inoue, Morio Setaka. Plasma platelet activating factor-acetylhydrolase (PAF-AH). *Prog Lipid Res* 2003; 42: 93-114
319. Tsoukatos DC, Liapikos TA, Tselepis AD, Chapman MJ, Ninio E. Platelet-activating factor acetylhydrolase and transacetylase activities in human plasma low-density lipoprotein. *Biochem J* 2001; 357: 457-464
320. Farr RS, Cox CP, Wardlow ML, Jorgensen R. Preliminary studies of an acid-labile factor (ALF) in human sera that inactivates platelet-activating factor (PAF). *Clin Immunol Immunopathol* 1980; 15: 318-330
321. Tjoelker LW, Wilder C, Eberhardt C, Stafforini DM, Dietsch G, Schimpf B, Hooper S, Le Trong H, Cousens LS, Zimmerman GA. Anti-inflammatory properties of a platelet-activating factor acetylhydrolase. *Nature* 1995; 374: 549-553
322. Tjoelker LW, Eberhardt C, Unger J, Trong HL, Zimmerman 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* 1995; 270: 25481-25487.
323. Tew DG, Southan C, Rice SQ, Lawrence MP, Li H, Boyd HF, Moores K, Gloger IS, Macphee CH. Purification, properties, sequencing, and cloning of a lipoprotein-associated, serine-dependent phospholipase involved in the oxidative modification of low-density lipoproteins. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1996; 16: 591-599.



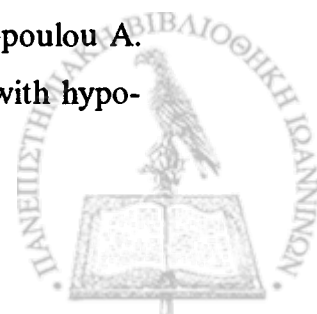
324. Tselepis AD, Karabina SA, Stengel D, Piedagnel R, Chapman MJ, Ninio E. N-linked glycosylation of macrophage-derived PAF-AH is a major determinant of enzyme association with plasma HDL. *J Lipid Res* 2001; 42: 1645-1654.
325. Miwa M, Miyake T, Yamanaka T, Sugatani J, Suzuki Y, Sakata S, Araki Y, 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* 1988; 82: 1983-1991
326. Balta G, Gurgey A, Kudayarov DK, Tunc B, Altay C. Evidence for the existence of the PAF acetylhydrolase mutation (Val279Phe) in non-Japanese populations: a preliminary study in Turkey, Azerbaijan, and Kyrgyzstan. *Thromb Res* 2001; 101: 231-234
327. Yamada Y, Yokota M. Loss of activity of plasma platelet-activating factor acetylhydrolase due to a novel Gln281-->Arg mutation. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; 236: 772-775
328. Bell R, Collier DA, Rice SQ, Roberts GW, MacPhee CH, Kerwin RW, Price J, Gloger IS. Systematic screening of the LDL-PLA2 gene for polymorphic variants and case-control analysis in schizophrenia. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; 241: 630-635
329. Kruse S, Mao XQ, Heinzmann A, Blattmann S, Roberts MH, Braun S, Gao PS, Forster J, Kuehr J, Hopkin JM, Shirakawa T, Deichmann KA. The Ile198Thr and Ala379Val variants of plasmatic PAF-acetylhydrolase impair catalytical activities and are associated with atopy and asthma. *Am J Hum Genet* 2000; 66: 1522-1530
330. Rubin AH, Smith LJ, Patterson R. The bronchoconstrictor properties of platelet-activating factor in humans. *Am Rev Respir Dis* 1987; 136: 1145-1151
331. 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
332. Lee C, Sigari F, Segrado T, Horkko S, Hama S, Subbaiah PV, Miwa M, Navab M, Witztum JL, Reaven PD. All ApoB-containing lipoproteins induce monocyte chemotaxis and adhesion when minimally modified. Modulation of lipoprotein bioactivity by platelet-activating factor acetylhydrolase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999; 19: 1437-1446



333. Tselepis AD, Dentan C, Karabina SA, Chapman MJ, 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. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995; 15: 1764-1773
334. Benítez S, Sanchez-Quesada JL, Ribas V, Jorda O, Blanco-Vaca F, Gonzalez-Sastre F, Ornodez-Llanos J. Platelet-activating factor acetylhydrolase is mainly associated with electronegative low-density lipoprotein subfraction. *Circulation* 2003; 108: 92-96
335. Blencowe C, Hermetter A, Kostner GM, Deigner HP. Enhanced association of platelet-activating factor acetylhydrolase with lipoprotein (a) in comparison with low density lipoprotein. *J Biol Chem* 1995; 270: 31151-31157
336. Karabina SA, Elisaf MC, Goudevenos J, Siamopoulos KC, Sideris D, Tselepis AD. PAF-acetylhydrolase activity of Lp(a) before and during Cu(2+)-induced oxidative modification in vitro. *Atherosclerosis* 1996; 125: 121-134
337. Asano K, Okamoto S, Fukunaga K, Shiomi T, Mori T, Iwata M, Ikeda Y, Yamaguchi K. Cellular source(s) of platelet-activating-factor acetylhydrolase activity in plasma. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 261: 511-514
338. Svetlov SI, Sturm E, Olson MS, Crawford JM. Hepatic regulation of platelet-activating factor acetylhydrolase and lecithin:cholesterol acyltransferase biliary and plasma output in rats exposed to bacterial lipopolysaccharide. *Hepatology* 1999; 30: 128-136
339. Pritchard PH, Chonn A, Yeung CC. 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
340. Stafforini DM, Carter ME, Zimmerman GA, McIntyre TM, Prescott SM. Lipoproteins alter the catalytic behavior of the platelet-activating factor acetylhydrolase in human plasma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989; 86: 2393-2397
341. Stafforini DM, Elstad MR, McIntyre TM, Zimmerman GA, Prescott SM. Human macrophages secrete platelet-activating factor acetylhydrolase. *J Biol Chem* 1990; 265: 9682-9687
342. Tselepis AD, Chapman MJ. Inflammation, bioactive lipids and atherosclerosis: potential roles of a lipoprotein-associated phospholipase A2, platelet activating factor-acetylhydrolase. *Atheroscler Suppl* 2002; 3: 57-68



343. Russwurm S, Krause S, Finkelberg L, Ruhling K, Schauer U, Losche W. Generation of reactive oxygen species and activity of platelet-activating factor acetylhydrolase in human monocyte-derived macrophages. *Thromb Res* 1994; 74: 505-514
344. Guerra R, Zhao B, Mooser V, Stafforini D, Johnston JM, Cohen JC. Determinants of plasma platelet-activating factor acetylhydrolase: heritability and relationship to plasma lipoproteins. *J Lipid Res* 1997; 38: 2281-2288
345. Tsimihodimos V, Karabina S-AP, Tambaki AP, Bairaktari E, Miltiadous G, Goudevenos JA, Cariolou MA, Chapman MJ, Tselepis AD, Elisaf M. Altered distribution of PAF-acetylhydrolase activity between LDL and HDL as a function of the severity of hypercholesterolemia. *J Lipid Res* 2002; 43: 256-263
346. Caslake MJ, Packard CJ, Suckling KE, Holmes SD, Chamberlain P, Macphee CH. Lipoprotein-associated phospholipase A(2), platelet-activating factor acetylhydrolase: a potential new risk factor for coronary artery disease. *Atherosclerosis* 2000; 150: 413-419
347. Wu X, McIntyre TM, Zimmerman GA, Prescott SM, Stafforini DM. Molecular characterization of the constitutive expression of the plasma PAF-acetylhydrolase gene in macrophages. *Biochem J* 2003; 375: 351-363
348. Yasuda K, Johnston JM. The hormonal regulation of platelet-activating factor-acetylhydrolase in the rat. *Endocrinology* 1992; 130: 708-716
349. Maki N, Hoffman DR, Johnston JM. Platelet-activating factor acetylhydrolase activity in maternal, fetal, and newborn rabbit plasma during pregnancy and lactation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988; 85: 728-732
350. Narahara H, Johnston JM. Effects of endotoxins and cytokines on the secretion of platelet-activating factor-acetylhydrolase by human decidual macrophages. *Am J Obstet Gynecol* 1993; 169: 531-537
351. 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
352. Tselepis AD, Elisaf M, Basis S, Karabina SA, Chapman MJ, Siamopoulou A. Association of the inflammatory state in active juvenile rheumatoid arthritis with hypo-



high-density lipoproteinemia and reduced lipoprotein-associated platelet-activating factor acetylhydrolase activity. *Arthritis Rheum* 1999; 42: 373-383

353. Kosaka T, Yamaguchi M, Miyanaga K, Mizuno K. Serum platelet-activating factor acetylhydrolase (PAF-AH) activity in more than 3000 healthy Japanese. *Clin Chim Acta* 2001; 312: 179-183

354. Guerra R, Zhao B, Mooser V, Stafforini D, Johnston JM, Cohen JC. Determinants of plasma platelet-activating factor acetylhydrolase: heritability and relationship to plasma lipoproteins. *J Lipid Res* 1997; 38: 2281-2288

355. McMurray HF, Parthasarathy S, Steinberg D. Oxidatively modified low density lipoprotein is a chemoattractant for human T lymphocytes. *J Clin Invest* 1993; 92: 1004-1008

356. Hessler JR, Morel DW, Lewis LJ, Chisolm GM. Lipoprotein oxidation and lipoprotein-induced cytotoxicity. *Arteriosclerosis* 1983; 3: 215-222

357. Steinbrecher UP, Pritchard PH. Hydrolysis of phosphatidylcholine during LDL oxidation is mediated by platelet-activating factor acetylhydrolase. *J Lipid Res* 1989; 30: 305-315

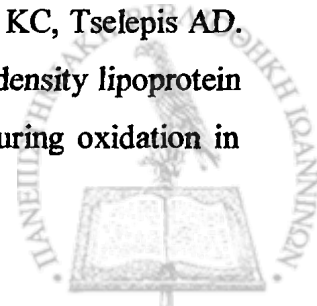
358. Marathe GK, Harrison KA, Murphy RC, Prescott SM, Zimmerman GA, McIntyre TM. Bioactive phospholipid oxidation products. *Free Radic Biol Med* 2000; 28: 1762-1770

359. Schmitt A, Negre-Salvayre A, Trolly M, Valdiguie P, Salvayre R. Phospholipid hydrolysis of mildly oxidized LDL reduces their cytotoxicity to cultured endothelial cells. Potential protective role against atherogenesis. *Biochim Biophys Acta* 1995; 1256: 284-292

360. Tsoukatos DC, Arborati M, Liapikos T, Clay KL, Murphy RC, Chapman MJ, Ninio E. Copper-catalyzed oxidation mediates PAF formation in human LDL subspecies. Protective role of PAF:acetylhydrolase in dense LDL. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17: 3505-3512

361. Wu R, Huang YH, Elinder LS, Frostegard J. Lysophosphatidylcholine is involved in the antigenicity of oxidized LDL. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998; 18: 626-630

362. Karabina SA, Elisaf M, Bairaktari E, Tzallas C, Siamopoulos KC, Tselepis AD. Increased activity of platelet-activating factor acetylhydrolase in low-density lipoprotein subfractions induces enhanced lysophosphatidylcholine production during oxidation in



patients with heterozygous familial hypercholesterolaemia. *Eur J Clin Invest* 1997; 27: 595-602

363. MacPhee CH, Moores KE, Boyd HF, Dhanak D, Ife RJ, Leach CA, Leake DS, Milliner KJ, Patterson RA, Suckling KE, Tew DG, Hickey DM. Lipoprotein-associated phospholipase A2, platelet-activating factor acetylhydrolase, generates two bioactive products during the oxidation of low-density lipoprotein: use of a novel inhibitor. *Biochem J* 1999; 338: 479-487

364. Yamada Y, Yokota M. Roles of plasma platelet-activating factor acetylhydrolase in allergic, inflammatory and atherosclerotic diseases. *Jpn Circ J* 1998; 62: 328-335

365. Muriel CJ, Packard CL. Lipoprotein-associated phospholipase A2 (platelet-activating factor acetylhydrolase) and cardiovascular disease. *Curr Opin Lipidol* 2003; 14: 347-352

366. Macphee CH. Lipoprotein-associated phospholipase A2: a potential new risk factor for coronary artery disease and a therapeutic target. *Curr Opin Pharmacol* 2001; 1: 121-125

367. Ostermann G, Lang A, Holtz H, Ruhling K, Winkler L, Till U. The degradation of platelet-activating factor in serum and its discriminative value in atherosclerotic patients. *Thromb Res* 1988; 52: 529-540

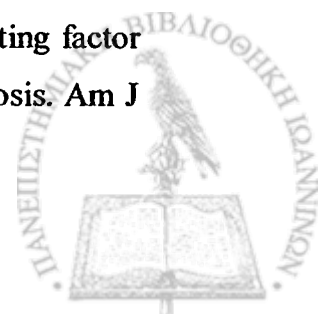
368. Blankenberg S, Stengel D, Rupprecht HJ, Bickel C, Meyer J, Cambien F, Tiret L, Ninio E. Plasma PAF-acetylhydrolase in patients with coronary artery disease: results of a cross-sectional analysis. *J Lipid Res* 2003; 44: 1381-1386

369. 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

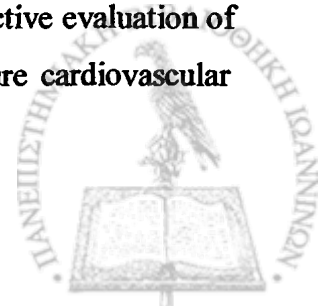
370. Unno N, Nakamura T, Kaneko H, Uchiyama T, Yamamoto N, Sugatani J, Miwa M, Nakamura S. Plasma platelet-activating factor acetylhydrolase deficiency is associated with atherosclerotic occlusive disease in Japan. *J Vasc Surg* 2000; 32: 263-267

371. Kudolo GB, Bressler P, DeFronzo RA. Plasma PAF acetylhydrolase in non-insulin dependent diabetes mellitus and obesity: effect of hyperinsulinemia and lovastatin treatment. *J Lipid Mediat Cell Signal* 1997; 17: 97-113

372. Shohet RV, Anwar A, Johnston JM, Cohen JC. Plasma platelet-activating factor acetylhydrolase activity is not associated with premature coronary atherosclerosis. *Am J Cardiol* 1999; 83: 109



373. Serebruany VL, Gurbel PA, Murugesan SR, Lowry DR, Sturm E, Svetlov SI. Depressed plasma platelet-activating factor acetylhydrolase in patients presenting with acute myocardial infarction. *Cardiology* 1998; 90: 127-130
374. Tselepis AD, Goudevenos JA, Tambaki AP, Michalis L, Stroumbis CS, Tsoukatos DC, Elisaf M, Sideris DA. Platelet aggregatory response to platelet activating factor (PAF), ex vivo, and PAF-acetylhydrolase activity in patients with unstable angina: effect of c7E3 Fab (abciximab) therapy. *Cardiovasc Res* 1999; 43: 183-191
375. Yamada Y, Yoshida H, Ichihara S, Imaizumi T, Satoh K, Yokota M. Correlations between plasma platelet-activating factor acetylhydrolase (PAF-AH) activity and PAF-AH genotype, age, and atherosclerosis in a Japanese population. *Atherosclerosis* 2000; 150: 209-216
376. Hiramoto M, Yoshida H, Imaizumi T, Yoshimizu N, Satoh K. A mutation in plasma platelet-activating factor acetylhydrolase (Val279-->Phe) is a genetic risk factor for stroke. *Stroke* 1997; 28: 2417-2420
377. Unno N, Nakamura T, Mitsuoka H, Saito T, Miki K, Ishimaru K, Sugatani J, Miwa M, Nakamura S. Single nucleotide polymorphism (G994-->T) in the plasma platelet-activating factor-acetylhydrolase gene is associated with graft patency of femoropopliteal bypass. *Surgery* 2002; 132: 66-71
378. Abuzeid AM, Hawe E, Humphries SE, Talmud PJ. Association between Ala379Val variant of the lipoprotein-associated phospholipase A2 and risk of myocardial infarction in the north and south Europe. *Atherosclerosis* 2003; 168: 283-288
379. Ninio E, Tregouet D, Carrier JL, Stengel D, Bickel C, Perret C, Rupprecht HJ, Cambien F, Blankenberg S, Tiret L. Platelet-activating factor-acetylhydrolase (PAF-AH) and PAF-receptor gene haplotypes in relation to future cardiovascular event in patients with coronary artery disease. *Hum Mol Genet* 2004 (Epub ahead of print)
380. Packard CJ, O'Reilly DS, Caslake MJ, McMahan AD, Ford I, Cooney J, Macphee CH, Suckling KE, Krishna M, Wilkinson FE, Rumley A, Lowe GD. Lipoprotein-associated phospholipase A2 as an independent predictor of coronary heart disease. West of Scotland Coronary Prevention Study Group. *N Engl J Med* 2000; 343: 1148-1155
381. Blake GJ, Dada N, Fox JC, Manson JE, Ridker PM. A prospective evaluation of lipoprotein-associated phospholipase A(2) levels and the risk of future cardiovascular events in women. *J Am Coll Cardiol* 2001; 38: 1302-1306



382. Ballantyne CM, Hoogeveen RC, Bang H, Coresh J, Folsom AR, Heiss G, Sharrett AR. Lipoprotein-associated phospholipase A₂, high-sensitivity C-reactive protein, and risk for incident coronary heart disease in middle-aged men and women in the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study. *Circulation* 2004; 109: 837-842

383. Theilmeier G, De Geest B, Van Veldhoven PP, Stengel D, Michiels C, Lox M, Landeloos M, Chapman MJ, Ninio E, Collen D, Himpens B, Holvoet P. HDL-associated PAF-AH reduces endothelial adhesiveness in apoE^{-/-} mice. *FASEB J* 2000; 14: 2032-2039

384. Quarck R, De Geest B, Stengel D, Mertens A, Lox M, Theilmeier G, Michiels C, Raes M, Bult H, Collen D, Van Veldhoven P, Ninio E, Holvoet P. Adenovirus-mediated gene transfer of human platelet-activating factor-acetylhydrolase prevents injury-induced neointima formation and reduces spontaneous atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation* 2001; 103: 2495-2500

385. Rodrigo L, Mackness B, Durrington PN, Hernandez A, Mackness MI. Hydrolysis of platelet-activating factor by human serum paraoxonase. *Biochem J* 2001; 354: 1-7

386. Kakafika AI, Xenofontos S, Tsimihodimos V, Tambaki AP, Lourida ES, Kalaitzidis R, Cariolou MA, Elisaf M, Tselepis AD. The PON1 M55L gene polymorphism is associated with reduced HDL-associated PAF-AH activity in normolipidemic and dyslipidemic populations. *J Lipid Res* 2003; 44: 1919-1926

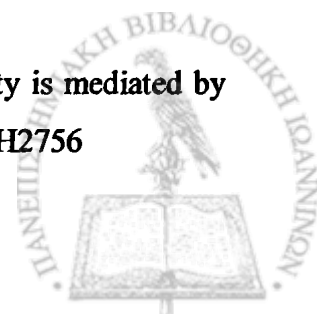
387. Marathe GK, Zimmerman GA, McIntyre TM. Platelet-activating factor acetylhydrolase, and not paraoxonase-1, is the oxidized phospholipid hydrolase of high density lipoprotein particles. *J Biol Chem* 2003; 278: 3937-3947

388. Tsimihodimos V, Karabina SA, Tambaki AP, Bairaktari E, Goudevenos JA, Chapman MJ, Elisaf M, Tselepis AD. Atorvastatin preferentially reduces LDL-associated platelet-activating factor acetylhydrolase activity in dyslipidemias of type IIA and type IIB. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002; 22: 306-311

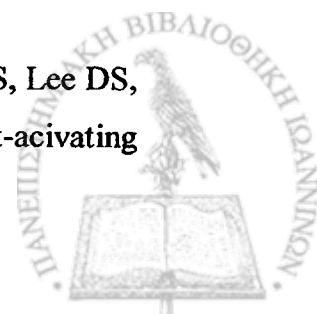
389. Winkler K, Abletshauser C, Friedrich I, Hoffmann MM, Wieland H, Marz W. Fluvastatin slow-release lowers platelet-activating factor acetyl hydrolase activity: a placebo-controlled trial in patients with type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89: 1153-1159.



390. Tsimihodimos V, Kakafika A, Tambaki AP, Bairaktari E, Chapman MJ, Elisaf M, Tselepis AD. Fenofibrate induces HDL-associated PAF-AH but attenuates enzyme activity associated with apoB-containing lipoproteins. *J Lipid Res* 2003; 44: 927-934
391. Elisaf M, Tselepis AD. Effect of hypolipidemic drugs on lipoprotein-associated platelet activating factor acetylhydrolase. Implication for atherosclerosis. *Biochem Pharmacol* 2003; 66: 2069-2073
392. Kester M, Nowinski RJ, Holthofer H, Marsden PA, Dunn MJ. Characterization of platelet-activating factor synthesis in glomerular endothelial cell lines. *Kidney Int* 1994; 46: 1404-1412
393. Camussi G, Salvidio G, Tetta C. Platelet activating factor in renal diseases. *Am J Nephrol* 1989; 9 (Suppl 1): 23-26
394. Caramelo C, Fernandez-Gallardo S, Marin-Cao D, Inarrea P, Santos JC, Lopez-Novoa J, Crespo MS. Presence of platelet activating factor in blood from human and experimental animals: Its absence in anephric individuals. *Biochem Biophys Res Commun* 1984; 120: 789-796
395. Pirotzky E, Edigo J, Colliez P, Hosford D, Plante G, Braquet P. Involvement of platelet activating factor in renal processes. *Adv Lipid Res* 1989; 23: 277-293
396. Lee TC, Malone B, Woodard D, Snyder F. Renal necrosis and involvement of a single enzyme of the de novo pathway for the biosynthesis of platelet activating factor in the rat kidney inner medulla. *Biochem Biophys Res Commun* 1989; 163: 1002-1005
397. Camussi G, Pawlowski I, Saunders R, Brentjens J, Andres G. Receptor antagonist of platelet activating factor inhibits inflammatory injury induced by in situ formation of immune complexes in renal glomeruli and in the skin. *J Lab Clin Med* 1987; 110: 196-206
398. Lopez-Novoa JM. Potential role of platelet-activating factor in acute renal failure. *Kidney Int* 1999; 55: 1672-1682
399. Benigni A, Boccardo P, Noris M, Remuzzi G, Siegler RL. Urinary excretion of platelet-activating factor in haemolytic uraemic syndrome. *Lancet* 1992; 339: 835-6
400. Noris M, Benigni A, Boccardo P, Gotti E, Benfenati E, Aiello S, Todeschini M, Remuzzi G. Urinary excretion of platelet activating factor in patients with immune-mediated glomerulonephritis. *Kidney Int* 1993; 43: 426-429
401. Sirois MG, Edelman ER. VEGF effect on vascular permeability is mediated by synthesis of platelet-activating factor. *Am J Physiol* 1997; 272: H2746-H2756



402. Neuwirth R, Ardaillou N, Schlondorff D. Extra- and intracellular metabolism of platelet-activating factor by cultured mesangial cells. *Am J Physiol* 1989; 256: F735-F741
403. Antonopoulou S, Demopoulos CA, Iatrou C, Moustakas G, Ziropiannis P. Platelet-activating factor acetylhydrolase (PAF-AH) in human kidney. *Int J Biochem* 1994; 26: 1157-1162
404. Kirschbaum B. Platelet activating factor acetylhydrolase activity in the urine of patients with renal disease. *Clin Chim Acta* 1991; 199: 139-144
405. 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 Mediat Cell Signal* 1994; 9: 205-215
406. Iatrou C, Moustakas G, Antonopoulou S, Demopoulos CA, Ziropiannis P. Platelet-activating factor levels and PAF acetylhydrolase activities in patients with primary glomerulonephritis. *Nephron* 1996; 72: 611-616
407. Denizot Y, Aupetit C, Bridoux F, Alphonse J-C, Cogne M, Aldigier JC. Deregulated platelet-activating factor levels and acetylhydrolase activity in patients with idiopathic IgA nephropathy. *Nephrol Dial Transplant* 2000; 15: 1344-1347
408. Milionis HJ, Elisaf MS, Karabina SA, Bairaktari E, Tselepis AD, Siamopoulos KC. Plasma and Lp(a)-associated PAF-acetylhydrolase activity in uremic patients undergoing different dialysis procedures. *Kidney Int* 1999; 56: 2276-2285
409. Tanaka R, Iijima K, Xu H, Inoue Y, Murakami R, Shirakawa T, Nishiyama K, Miwa M, Shiozawa S, Nakamura H, Yoshikawa N. Role of platelet-activating factor acetylhydrolase gene mutation in Japanese childhood IgA nephropathy. *Am J Kidney Dis* 1999; 34: 289-295
410. Xu H, Iijima K, Shiozawa S, Tanaka SS, Inoue Y, Shirakawa T, et al. Platelet-activating factor acetylhydrolase gene mutation in Japanese nephritic children. *Kidney Int* 1998; 54: 1867-71
411. Xu H, Iijima K, Shirakawa T, Shiozawa S, Miwa M, Yamaoka K, Kawamura N, Nakamura H, Yoshikawa N. Platelet-activating factor acetylhydrolase gene mutation in Japanese children with *Escherichia coli* O157-associated hemolytic uremic syndrome. *Am J Kidney Dis* 2000; 36:42-46
412. Yoon HJ, Kim H, Lee SG, Zheng SH, Shin JH, Lim CS, Kim S, Lee JS, Lee DS, Kim YS. Interdependent effect of angiotensin-converting enzyme and platelet-activating



factor acetylhydrolase gene polymorphisms on the progression of immunoglobulin A nephropathy. *Clin Genet* 2002; 62: 128-134

413. National Kidney Foundation. K/DOQI Working Group. Definition and classification of stages of chronic kidney disease. *Am J Kidney Dis* 2002; 39 (2 Suppl 1): S46-S75

414. Warnick GR, Benderson J, Albers JJ. Dextran sulfate-Mg²⁺ precipitation procedure for quantitation of high-density lipoprotein cholesterol. *Clin Chem* 1982; 28: 1379-1388

415. Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem* 1972; 18: 409-502

416. Bairaktari E, Elisaf M, Tzallas C, Karabina SA, Tselepis AD, Siamopoulos KC, Tsolas O. Evaluation of five methods for determining low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C) in hemodialysis patients. *Clin Biochem* 2001; 34: 593-602

417. Planneta T, Cortes M, Martinez-Bru C, Gonzalez-Sastre F, Ordonez-Llanos J. Calculation of LDL-cholesterol by using apolipoprotein B for classification of nonchylomicronemic dyslipemia. *Clin Chem* 1997; 43: 808-815

418. Nishizawa Y, Shoji T, Kakiya R, Tsujimoto Y, Tabata T, Ishimura E, Nakatani T, Miki T, Inaba M. Non-high-density lipoprotein cholesterol (non-HDL-C) as a predictor of cardiovascular mortality in patients with end-stage renal disease. *Kidney Int* 2003; 63 (Suppl 84): S117-S120

419. Laker MF, Evans K. Analysis of apolipoproteins. *Ann Clin Biochem.* 1996; 33: 5-22

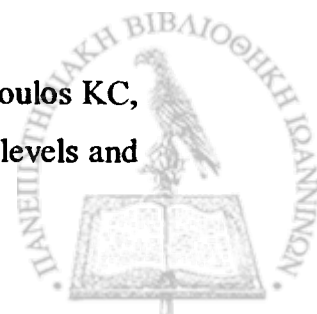
420. Levey AS, Bosch JP, Lewis JB, Green T, Rogers N, Roth D. A more accurate method to estimate glomerular filtration rate from serum creatinine: a new prediction equation. Modification of Diet in Renal Disease Study Group. *Ann Intern Med* 1999; 130: 461-470

421. Lin J, Knight EL, Hogan ML, Singh AK. A comparison of prediction equations for estimating glomerular filtration rate in adults without kidney disease. *J Am Soc Nephrol* 2003; 14: 2573-2580

422. Manjunath G, Sarnak MJ, Levey AS. Prediction equations to estimate glomerular filtration rate: an update. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2001; 10: 785-792



423. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 1988; 16: 1215.
424. Utermann G, Hees M, Steinmetz A. Polymorphism of apoE and occurrence of dysbetalipoproteinemia in man. *Nature* 1977; 269: 604-607
425. Warnick GR, Mayfield C, Albers JJ, Hazzard WR. Gel isoelectric focusing method for specific diagnosis of familiar hyperlipoproteinemia type 3. *Clin Chem* 1979; 25: 279-284
426. Zannis VI, Breslow JL. Human very low density lipoprotein apolipoprotein E isoprotein polymorphism is explained by genetic variation and post-translational modification. *Biochemistry* 1981; 20: 1033-1041
427. Zannis VI. Genetic polymorphism in human apolipoprotein E. *Methods Enzymol* 1986; 128: 823-851
428. Milne RW, Douste-Blazy P, Marcel YL, Retegui L. Characterization of monoclonal antibodies against human apolipoprotein E. *J Clin Invest* 1981; 68: 111-117
429. Kataoka S, Paidi M, Howard BV. Simplified isoelectric focusing/immunoblotting determination of apolipoprotein E phenotype. *Clin Chem* 1994; 40: 11-13
430. Kamboh MI, Ferrell RE, Kottke B. Genetic studies of human apolipoproteins. V. A novel rapid procedure to screen apolipoprotein E polymorphisms. *J Lipid Res* 1988; 29: 1535-1543
431. Havekes LM, De Knijff P, Beisiegel U, Havinga J, Smit M, Klasen E. A rapid micromethod for apolipoprotein E phenotyping directly in serum. *J Lipid Res* 1987; 28: 455-463
432. Hixson JE, Vernier DT. Restriction isotyping of human apolipoprotein E by gene amplification and cleavage with HhaI. *J Lipid Res* 1990; 31: 545-548
433. Hansen PS, Gerdes LU, Klausen IC, Gregersen N, Faergeman O. Genotyping compared with protein phenotyping of the common apolipoprotein E polymorphism. *Clin Chim Acta* 1994; 224: 131-137
434. Liberopoulos E, Miltiados G, Hatzivassiliou M, Ayrton N, Bairaktari E, Cariolou M, Elisaf M. Apolipoprotein E polymorphism in Northwestern Greece: Frequency and effect on lipid parameters. *Ann Clin Lab Med* 2004 (in press)
435. Liberopoulos EN, Miltiados GA, Cariolou M, Kalaitzidis R, Siamopoulos KC, Elisaf MS. Influence of apolipoprotein E polymorphisms on serum creatinine levels and



predicted glomerular filtration rate in healthy subjects. *Nephrol Dial Transplant* 2004 (in press)

436. Liberopoulos EN, Miltiados GA, Cariolou M, Tselepis AD, Siamopoulos KC, Elisaf MS. The influence of apolipoprotein E concentration and polymorphism on serum lipid parameters in hemodialysis patients. *Am J Kidney Dis* 2004 (in press)

437. Liberopoulos EN, Papavasiliou E, Miltiados GA, Cariolou M, Siamopoulos KC, Tselepis AD, Elisaf MS. Alterations of paraoxonase and platelet-activating factor acetylhydrolase activities in patients on peritoneal dialysis. *Perit Dial Int* 2004 (accepted for publication pending minor revision)

438. Liberopoulos E, Papavasiliou E, Tzallas C, Katopodis K, Gouva C, Christidis D, Tselepis A, Siamopoulos K, Elisaf M. Increase of HDL-associated platelet-activating factor acetylhydrolase (PAF-AH) activity but not of paraoxonase (PON1) during haemodialysis. *Atherosclerosis Suppl* 2003; 4: 336

439. Kagan A, Bar-Khayim Y, Schafer Z, Fainaru M. Kinetics of peritoneal protein loss during CAPD. II. Lipoprotein leakage and its impact on plasma lipid levels. *Kidney Int* 1990; 37: 980-990

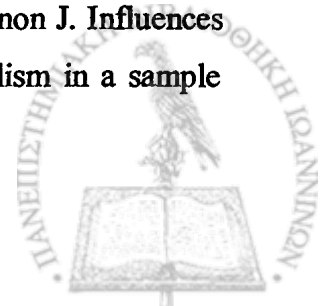
440. Sklavounou E, Economou-Petersen E, Karadima G, Panas M, Avramopoulos D, Varsou A, Vassilopoulos D, Petersen MB. Apolipoprotein E polymorphism in the Greek population. *Clin Genet* 1997; 52: 216-218

441. Kolovou G, Yiannakouris N, Hatzivassiliou M, Malakos J, Daskalova D, Hatzigeorgiou G, Cariolou MA, Cokkinos DV. Association of apolipoprotein E polymorphism with myocardial infarction in Greek patients with coronary artery disease. *Curr Med Res Opin* 2002; 18: 118-124

442. Tiret L, de Knijff P, Menzel HJ, Ehnholm C, Nicaud V, Havekes LM. ApoE polymorphism and predisposition to coronary heart disease in youths of different European populations. The EARS study. European Atherosclerosis Research study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1994; 14: 1617-1624

443. Ehnholm C, Lukka M, Kuusi T, Nikkilä E, Utermann G. Apolipoprotein E polymorphism in the Finnish population: gene frequencies and relation to lipoprotein concentrations. *J Lipid Res* 1986; 27: 227-235

444. Xhignesse M, Lussier-Cacan S, Sing CF, Kessling AM, Davignon J. Influences of common variants of apolipoprotein E on measures of lipid metabolism in a sample selected for health. *Arterioscler Thromb* 1991; 11: 1100-1110



445. Smit M, de Knijff P, Rosseneu M, Bury J, Klasen E, Frants R, Havekes L. Apolipoprotein E polymorphism in the Netherlands and its effect on serum lipid and apolipoprotein levels. *Hum Genet* 1988; 80: 287-292
446. Utermann G. Apolipoprotein E mutants, hyperlipidemia and arteriosclerosis. *Adv Exp Med Biol* 1985; 183: 173-188
447. Utermann G. Genetic polymorphism in apolipoprotein E - impact on plasma lipoprotein metabolism. Diabetes, obesity and hyperlipidemias-III. In: Crepaldi G, ed. New York: Elsevier Science Publishers, 1985; 1-28
448. James WR, Boemi M, Giansanti R, Fumelli P, Pometta D. Underexpression of the apolipoprotein E4 isoform in an Italian population. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1993; 13: 1456-1459
449. Miltiados G, Cariolou M, Elisaf M. HDL cholesterol levels in patients with molecularly defined familial hypercholesterolemia. *Ann Clin Lab Sci* 2002; 31: 50-54
450. Friedlander Y, Leitersdorf E. Influence of apolipoprotein E genotypes on plasma lipid and lipoprotein concentrations: Results from a segregation analysis in pedigrees with molecularly defined familial hypercholesterolemia. *Genet Epidemiol* 1996; 13: 159-177
451. Muntner P, Coresh J, Smith JC, Eckfeldt J, Klag MJ. Plasma lipids and risk of developing renal dysfunction: the atherosclerosis risk in communities study. *Kidney Int* 2000; 58: 293-301
452. Scuteri A, Bos AJG, Zonderman AB, Brant LJ, Lakatta EG, Fleg JL. Is the apoE4 allele an independent predictor of coronary events? *Am J Med* 2001; 110: 28-32
453. Wheeler DC. Abnormalities of lipoprotein metabolism in CAPD patients. *Kidney Int* 1996; 50 (Suppl 56): S41-S46
454. Libetta C, De Nicola L, Rampino T, De Simone W, Memoli B. Inflammatory effects of peritoneal dialysis: evidence of systemic monocyte activation. *Kidney Int* 1996; 49: 506-11
455. Ducloux D, Bresson-Vautrin C, Kribs M, Abdelfatah A, Chalopin JM. C-reactive protein and cardiovascular disease in peritoneal dialysis patients. *Kidney Int* 2002; 62: 1417-1422
456. Getz GS, Reardon CA. Paraoxonase, a cardioprotective enzyme: continuing issues. *Curr Opin Lipidol*. 2004; 15: 261-267



457. Peppas M, Uribarri J, Cai W, Lu M, Vlassara H. Glycooxidation and inflammation in renal failure patients. *Am J Kidney Dis* 2004; 43: 690-695
458. Iatrou C, Afentakis N, Nomikos T, Dinas C, Stavropoulos-Giokas C, Antonopoulou S. Is platelet-activating factor produced during hemodialysis with AN-69 polyacrylonitrile membrane? *Nephron* 2002; 91: 86-93
459. Gastaldello K, Husson C, Wens R, Vanherweghem JL, Tielemans C. Role of complement and platelet-activating factor in the stimulation of phagocytosis and reactive oxygen species production during haemodialysis. *Nephrol Dial Transplant* 2000; 15: 1638-1646
460. Satoh K, Imaizumi T, Kawamura Y, Yoshida H, 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
461. Zukowska-Grojek Z, Blank ML, Snyder F, Feuerstein G. The adrenergic system and the cardiovascular effects of platelet activating factor (1-O-hexadecyl-2-acetyl-sn-glycero-3-phosphocholine) in SHR and WKY rats. *Clin Exp Hypertens* 1985; 7: 1015-1031
462. Maggi E, Bellazzi R, Falaschi F, Frattoni A, Perani G, Finardi G, Gazo A, Nai M, Romanini D, Bellomo G.. Enhanced LDL oxidation in uremic patients: An additional mechanism for accelerated atherosclerosis? *Kidney Int* 1994; 45: 876-883
463. Futatsuyama M, Oiwa T, Komatsu Y. Correlation between oxidized low-density lipoprotein and other factors in patients on peritoneal dialysis. *Adv Perit Dial* 2002; 18: 192-194
464. Liapikos ThA, Antonopoulou S, Karabina S-AP, Tsoukatos DC, Demopoulos CA, Tselepis AD. Platelet-activating factor formation during oxidative modification of low-density lipoprotein when PAF-acetylhydrolase has been inactivated. *Biochim Biophys Acta* 1994; 1212: 353-360
465. Obunike JC, Pillarisetti S, Paka L, Kako Y, Butteri MJ, Ho YY, Wagner WD, Yamada N, Mazzone T, Deckelbaum RJ, Goldberg IJ. The heparin-binding proteins apolipoprotein E and lipoprotein lipase enhance cellular proteoglycan production. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20: 111-118
466. Chen, Chu-Huang Platelet-activating factor acetylhydrolase: is it good or bad for you? *Curr Opin Lipidol* 2004; 15: 337-341



467. Ozdemir FN, Guz G, Sezer S, Arat Z, Turan M, Haberal M. Atherosclerosis risk is higher in continuous ambulatory peritoneal dialysis patients than in hemodialysis patients. *Artif Org* 2001; 25: 448-452
468. Docci D, Capponcini C, Mengozzi S, Baldrati L, Neri L, Feletti C. Effects of different dialysis membranes on lipid and lipoprotein serum profiles in hemodialysis patients. *Nephron* 1995; 69: 323-326
469. Josephson MA, Fellner SK, Dasgupta A. Improved lipid profiles in patients undergoing high-flux hemodialysis. *Am J Kidney Dis* 1992; 20: 361-364
470. Seres DS, Strain GW, Hashim SA, Goldberg IJ, Levin NW. Improvement of plasma lipoprotein profiles during high-flux dialysis. *J Am Soc Nephrol* 1993; 3: 1409-1415
471. Ingram AJ, Parbtani A, Churchill DN. Effects of two low-flux cellulose acetate dialysers on plasma lipids and lipoproteins-a cross-over trial. *Nephrol Dial Transplant* 1998; 13: 1452-1457
472. Ottosson P, Attman PO, Knight C, Samuelsson O, Weiss L, Alaupovic P. Do high-flux dialysis membranes affect renal dyslipidemia? *ASAIO J* 2001; 47: 229-234
473. House AA, Wells GA, Donnelly JG, Nadler SP, Hebert PC. Randomized trial of high-flux vs low-flux haemodialysis: effects on homocysteine and lipids. *Nephrol Dial Transplant* 2000; 15: 1029-1034
474. Teraoka J, Matsui N, Nakagawa S, Takeuchi J. The role of heparin in the changes of lipid patterns during a single hemodialysis. *Clin Nephrol* 1982; 17: 96-99
475. Tzanatos H, Fourtounas C, Agroyannis B, Chondros K, Dalamangas A, Bossiolis B, Kopelias I, Koutsikos D. Alterations of plasma lipoprotein (a) concentration. Do they arise from the hemodialysis procedure? *Nephrol Dial Transplant* 1996; 11: 1490-1491

