



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ
ΤΟΜΕΑΣ ΠΑΘΟΛΟΓΙΑΣ
ΝΕΦΡΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ
ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ: ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ Χ. ΣΙΑΜΟΠΟΥΛΟΣ
ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΝΕΦΡΟΛΟΓΙΑΣ/ ΠΑΘΟΛΟΓΙΑΣ
ΚΑΙ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΥΠΕΥΘΥΝΟΣ: ΑΛΕΞΑΝΔΡΟΣ Δ.ΤΣΕΛΕΠΗΣ, ΑΝΑΠΛΗΡΩΤΗΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ

**«Ποσοτικές μεταβολές των λιποπρωτεϊνών σε ασθενείς
με σημαντικού βαθμού λευκωματουρία. Η ενεργότητα του
ενζύμου ΡΑΓ-ακετυλοϋδρολάσης στα υποκλάσματα των
λιποπρωτεϊνών»**

ΟΛΓΑ Χ. ΜΠΑΛΑΦΑ
ΙΑΤΡΟΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2004



ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ



026000336959



Αρ. ΕΓΧ.:.....11018/2003.





ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ
ΤΟΜΕΑΣ ΠΑΘΟΛΟΓΙΑΣ
ΝΕΦΡΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ
ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ: ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ Χ. ΣΙΑΜΟΠΟΥΛΟΣ
ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΝΕΦΡΟΛΟΓΙΑΣ/ ΠΑΘΟΛΟΓΙΑΣ
ΚΑΙ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΥΠΕΥΘΥΝΟΣ: ΑΛΕΞΑΝΔΡΟΣ Δ.ΤΣΕΛΕΠΗΣ, ΑΝΑΠΛΗΡΩΤΗΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ

**«Ποσοτικές μεταβολές των λιποπρωτεϊνών σε ασθενείς
με σημαντικού βαθμού λευκωματουρία. Η ενεργότητα του
ενζύμου ΡΑΦ-ακετυλοϋδρολάσης στα υποκλάσματα των
λιποπρωτεϊνών»**

**ΟΛΓΑ Χ. ΜΠΑΛΑΦΑ
ΙΑΤΡΟΣ**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2004



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



ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΑΙΤΗΣΗΣ: 9/6/98

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΟΡΙΣΜΟΥ ΤΡΙΜΕΛΟΥΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ: 360α/6/10/98

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ

Σιαμόπουλος Κωνσταντίνος

Καθηγητής Παθολογίας-Νεφρολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

ΜΕΛΗ

Ελισάφ Μωυσής

Αναπληρωτής Καθηγητής Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Τσελέπης Αλέξανδρος

Επίκουρος Καθηγητής Χημικού Τμήματος Ιατρικής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΟΡΙΣΜΟΥ ΘΕΜΑΤΟΣ: 18/11/98

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΚΑΤΑΘΕΣΗΣ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ: 24/6/2004

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

ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Αλέξανδρος Δρόσος

Καθηγητής Παθολογίας-Ρευματολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Μωυσής Ελισάφ

Καθηγητής Παθολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Κωνσταντίνος Σιαμόπουλος

Καθηγητής Παθολογίας-Νεφρολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Επαμεινώνδας Τσιάνος

Καθηγητής Παθολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Αλέξανδρος Τσελέπης

Αναπληρωτής Καθηγητής Χημικού Τμήματος Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Κωνσταντίνος Κατωπόδης

Επίκουρος Καθηγητής Νεφρολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Ελένη Μπαϊρακτάρη

Επίκουρη Καθηγήτρια Βιολογικής Χημείας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων



Στους γονείς μου

Στον Κυριάκο και στη Μαρία



ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η εκπόνηση της διδακτορικής μου διατριβής υπήρξε μια πολύτιμη εμπειρία για μένα. Καταρχήν μου έδωσε την ευκαιρία να ασχοληθώ με βασική έρευνα στο εργαστήριο Βιοχημείας του τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων. Η οργάνωση και η εκπόνηση των πειραμάτων, η ανάλυση των αποτελεσμάτων και η ενδελεχής μελέτη της βιβλιογραφίας υπήρξαν εμπειρίες πρωτόγνωρες αλλά και καθοριστικές στη διαμόρφωση της επιστημονικής μου κατάρτισης.

Νιώθω ευγνωμοσύνη για τον δάσκαλό μου κ. Κωνσταντίνο Σιαμόπουλο, Καθηγητή Παθολογίας /Νεφρολογίας γιατί η συνάντησή μου μαζί του άλλαξε την επαγγελματική μου πορεία, τον τρόπο σκέψης μου και τοποθέτησής μου απέναντι στην Ιατρική. Με βοήθησε όχι μόνο να βάλω σε τάξη την ιατρική μου σκέψη, αλλά μου υπέδειξε την τεκμηριωμένη σε δεδομένα άσκηση της ιατρικής επιστήμης, το σεβασμό στον άνθρωπο και την αγάπη για μελέτη και έρευνα. Τον ευχαριστώ γιατί με εμπιστεύθηκε, με παρότρυνε και στήριξε όλα αυτά τα χρόνια.

Ευχαριστώ θερμά τον κ. Αλέξανδρο Τσελέπη, Αναπληρωτή Καθηγητή Βιοχημείας, για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε εξ αρχής στο χώρο του εργαστηρίου-άγνωστο για μένα τότε-, για τις πολλές ώρες που μοιράστηκε μαζί μου οργανώνοντας τα πειράματα και συζητώντας τα αποτελέσματα. Αποτέλεσε και αποτελεί για μένα παράδειγμα επιστημονικής σκέψης, μεθοδικής δουλειάς και προσήλωσης σε στόχους.

Επίσης ευχαριστώ τον κ. Μωυσή Ελισάφ, Καθηγητή Παθολογίας για τις καίριες παρατηρήσεις του κατά την πορεία εκπόνησης της διατριβής μου καθώς επίσης γιατί από τα φοιτητικά μου χρόνια υπήρξε παράδειγμα επιστημονικού κύρους και ήθους.

Χρωστώ πολλά στη χημικό Δρ. Σόνια-Αθηνά Καραμπίνα που μοιράστηκε μαζί μου το χρόνο της στο εργαστήριο και με βοήθησε ουσιαστικά στην εκπόνηση των πειραμάτων με υπομονή και ενθουσιασμό.

Θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στον κ. Κωνσταντίνο Κατωπόδη, Επίκουρο Καθηγητή Νεφρολογίας για τις συνεχείς συμβουλές του και οδηγίες, καθώς και στη φίλη και συνάδελφο Έλλη Κολιούση για τις ατέλειωτες συζητήσεις, τα όνειρα και τις ανασφάλειες που μοιραστήκαμε.



Ευχαριστώ θερμά τους επιμελητές της Νεφρολογικής Κλινικής-Ι. Θεοδώρου, Χ. Παππά και Χ. Γκούβα για την εμπιστοσύνη με την οποία με αγκάλιασαν, καθώς και το ιατρικό προσωπικό της Νεφρολογικής Κλινικής του Νοσοκομείου Χατζηκώστα για τη βοήθειά τους στην επιλογή των ασθενών. Θα ήθελα επίσης να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στο νοσηλευτικό προσωπικό της Νεφρολογικής Κλινικής του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου καθώς και τους μεταπτυχιακούς συνεργάτες του Εργαστηρίου Βιοχημείας του τμήματος Χημείας, γιατί χωρίς την πολύτιμη βοήθειά τους δεν θα ήταν εφικτή η συλλογή των δειγμάτων και η διενέργεια των πειραμάτων.

Τέλος ας μου επιτραπεί να εκφράσω την ευγνωμοσύνη και αγάπη μου στην οικογένεια μου. Στους γονείς μου για την αμέριστη υλική και ηθική υποστήριξη, στην αδερφή μου γιατί αποτελεί συνειδητά και ασυνείδητα στήριγμα σε όλη μου τη ζωή και τέλος στο σύντροφό μου Κυριάκο χωρίς την αγάπη του και την παρότρυνσή του τίποτα δε θα είχα καταφέρει. Τέλος ευχαριστώ την κόρη μου, γιατί ο ερχομός της κατά την περίοδο της διατριβής μου έδωσε την πραγματική ισορροπία και ευτυχία στη ζωή.



ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

	Σελίδα
I. ΣΠΕΙΡΑΜΑ	3
A. ΑΝΑΤΟΜΙΑ	3
B. ΣΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟΣ ΦΡΑΓΜΟΣ ΔΙΗΘΗΣΗΣ	10
II. ΝΕΦΡΩΣΙΚΟ ΣΥΝΔΡΟΜΟ	12
A. ΚΛΙΝΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ	15
1) Πρωτεΐνουρία	15
2) Υποαλβουμιναιμία	15
3) Οίδημα	17
4) Θρομβοαπποφρακτικές επιπλοκές	19
5) Υπερλιπιδαιμία	21
6) Λιπιδουρία	25
B. ΣΠΕΙΡΑΜΑΤΟΝΕΦΡΙΤΙΔΕΣ ΠΟΥ ΕΚΔΗΛΩΝΟΝΤΑΙ ΜΕ ΝΕΦΡΩΣΙΚΟ ΣΥΝΔΡΟΜΟ	
1) Παθογένεια	31
2) Νόσος ελαχίστων αλλοιώσεων	32
3) Μεσαγγειουπερπλαστική	34
4) Εστιακή και τμηματική σπειραματοσκλήρυνση	36
5) Μεμβρανώδης	39
6) Διαβητική νεφροπάθεια	42



III. ΛΙΠΟΠΡΩΤΕΙΝΕΣ ΚΑΙ ΝΕΦΡΙΚΟΣ ΙΣΤΟΣ	43
A) ΛΙΠΟΠΡΩΤΕΪΝΕΣ ΚΑΙ ΣΠΕΙΡΑΜΑ	44
B) ΣΠΕΙΡΑΜΑΤΟΣΚΛΗΡΥΝΣΗ ΚΑΙ ΑΘΗΡΟΣΚΛΗΡΥΝΣΗ	45
IV. ΑΚΕΤΥΛΟΥΔΡΟΛΑΣΕΣ ΤΟΥ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗΣ ΤΩΝ ΑΙΜΟΠΕΤΑΛΙΩΝ	
A) ΡΑΦ ΚΑΙ ΝΕΦΡΟΣ	
1) Γενικά	46
2) Ο ρόλος του ΡΑΦ στην αιμοδυναμική του νεφρού	50
3) Ο ρόλος του ΡΑΦ στη σπειραματική βλάβη	52
B) ΡΑΦ-ΑΚΕΤΥΛΟΥΔΡΟΛΑΣΕΣ	
1) Γενικά χαρακτηριστικά	57
2) ΡΑΦ-ΑΗ πλάσματος	60
Φυσικοχημικές και ενζυμικές ιδιότητες του ενζύμου	62
Ρύθμιση της έκκρισης της ΡΑΦ-ΑΗ	63
3) Ενδοκυττάρια ΡΑΦ-ΑΗ	65
4) ΡΑΦ-ΑΗ και κλινικές μελέτες	
Καρδιαγγειακά νοσήματα-δυσλιπιδαιμία	68
Σηψαιμία-αυτοάνοσα νοσήματα-άσθμα	73
Παθήσεις γαστρεντερικού	75
Ανασυνδυσασμένη ΡΑΦ-ΑΗ	76
5) ΡΑΦ-ΑΗ και νεφρός	77



ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

I. ΥΛΙΚΟ	83
II. ΜΕΘΟΔΟΙ	84
A. ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΛΙΠΟΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΣΕ	
ΠΗΚΤΩΜΑ ΑΓΑΡΟΖΗΣ	87
B. ΙΣΟΠΥΚΝΙΚΗ ΥΠΕΡΦΥΓΟΚΕΝΤΡΗΣΗ ΒΑΘΜΙΔΩΣΗΣ ΠΥΚΝΟΤΗΤΩΝ	90
Γ. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ BCA	93
Δ. ΕΝΖΥΜΙΚΟΣ ΦΩΤΟΜΕΤΡΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΟΛΙΚΗΣ ΧΟΛΗΣΤΕΡΟΛΗΣ	94
E. ΕΝΖΥΜΙΚΟΣ ΦΩΤΟΜΕΤΡΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ HDL-ΧΟΛΗΣΤΕΡΟΛΗΣ	97
ΣΤ. ΕΝΖΥΜΙΚΟΣ ΦΩΤΟΜΕΤΡΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΡΙΓΛΥΚΕΡΙΔΙΩΝ ΣΤΟ ΠΛΑΣΜΑ	99
Ζ. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑ ΤΗΣ ΡΑΦ-ΑΗ	101
Η. ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ SDS-ΠΟΛΥΑΚΡΥΛΑΜΙΔΙΟΥ ΣΕ ΠΛΑΚΕΣ ΒΑΘΜΙΔΩΣΗΣ 5-19%	105
Θ. ΜΕΤΑΦΟΡΑ ΚΑΙ ΑΝΟΣΟΑΠΟΤΥΠΩΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ	111
I. ΧΡΩΣΗ ΜΕ ΝΙΤΡΙΚΟ ΑΡΓΥΡΟ	114

III. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ



A) ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΟΥ ΠΛΗΘΥΣΜΟΥ	117
B) ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑ ΤΗΣ ΡΑΦ-ΑΗ ΣΤΟ ΠΛΑΣΜΑ ΚΑΙ ΣΤΗΝ HDL	121
Γ) ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑ ΤΗΣ ΡΑΦ-ΑΗ ΣΤΑ ΟΥΡΑ	124
Δ) ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑ ΤΗΣ ΡΑΦ-ΑΗ ΚΑΙ ΛΙΠΟΠΡΩΤΕΙΝΕΣ	125
Ε) ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΡΑΦ-ΑΗ ΤΩΝ ΟΥΡΩΝ	132
IV. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	133
V. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	143
VI. ΠΕΡΙΛΗΨΗ (στην Ελληνική γλώσσα)	145
VII. ΠΕΡΙΛΗΨΗ (στην Αγγλική γλώσσα)	147
VIII. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	149



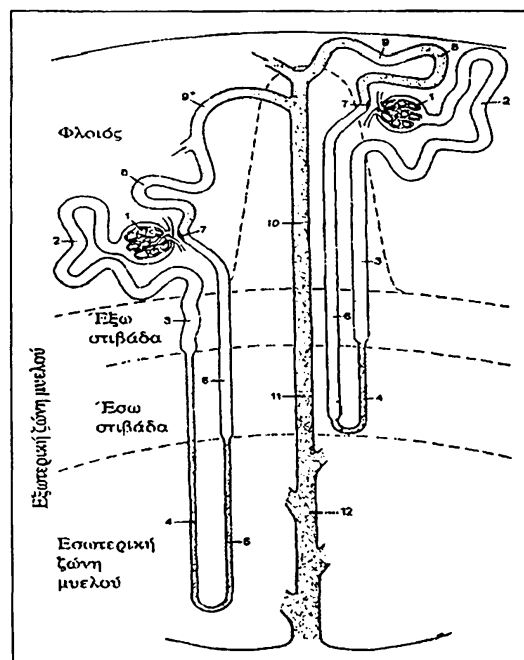
ΕΙΣΑΓΩΓΗ



I. ΣΠΕΙΡΑΜΑ

A. ANATOMIA

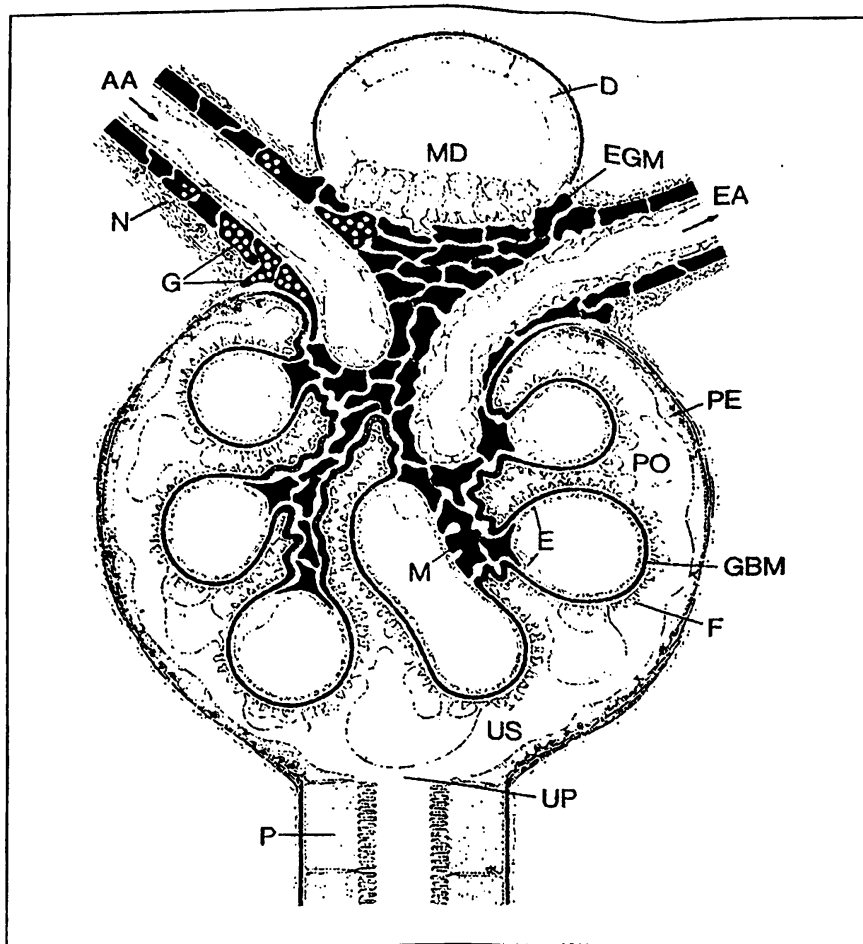
Η ανατομική και λειτουργική μονάδα του νεφρού είναι ο νεφρώνας, ο οποίος αποτελείται από το αγγειώδες σπείραμα, την κάψα του Bowman, το εγγύς εσπειραμένο σωληνάριο, την αγκύλη Henle, το άπω εσπειραμένο σωληνάριο που συνεχίζεται στο αθροιστικό σωληνάριο και την παρασπειραματική συσκευή (σχήμα 1). Σε κάθε φυσιολογικό νεφρό υπάρχουν 700.000 ως 1.000.000 νεφρώνες. Οι νεφρώνες ταξινομούνται σύμφωνα με τη θέση τους σε φλοιώδεις και φλοιομυελώδεις. Οι φλοιώδεις νεφρώνες διαθέτουν βραχεία αγκύλη Henle και απαγωγά αρτηρίδια που καταδύονται μέχρι το μυελό διαμορφώνοντας πλούσιο περισωληναριακό αγγειακό πλέγμα. Οι φλοιομυελώδεις έχουν μακριά αγκύλη Henle και απαγωγά αρτηρίδια που κατερχόμενα διαιρούνται για να σχηματίσουν τα κατιόντα ευθέα αγγεία, τα οποία αιματώνουν τη μυελώδη μοίρα (1).



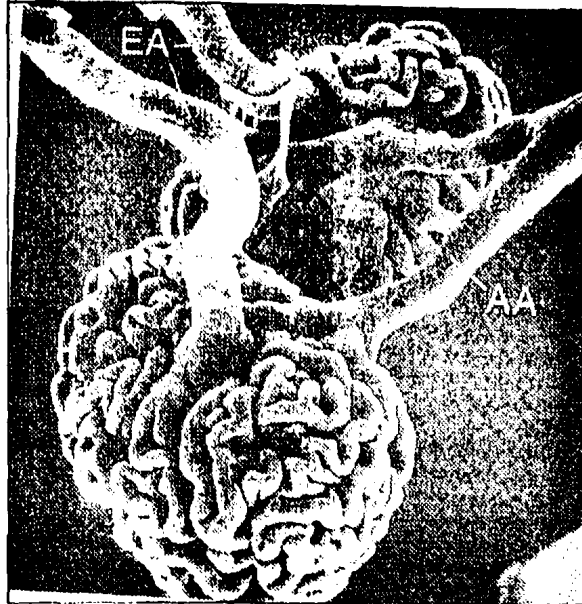
Σχήμα 1 Σχηματική παράσταση του φλοιώδη και φλοιομυελώδη νεφρώνα. 1. Αγγειώδες σπείραμα 2. Εγγύς εσπειραμένο σωληνάριο 3. Εγγύς ευθύ σωληνάριο 4. Λεπτό κατιόν σκέλος 5. Λεπτό ανιόν σκέλος 6. Άπω ευθύ σωληνάριο 7. Παρασπειραματική συσκευή 8. Άπω εσπειραμένο σωληνάριο 9. Συνδετικό σωληνάριο του φλοιομυελώδους νεφρώνα 10,11,12 Αθροιστικά σωληνάρια

Η πρώτη αναφορά για τα σπειράματα έγινε το 1666 από το Malpighi, ενώ το 1841 ο Bowman περιέγραψε το αγγειώδες σπείραμα και τη συνέχειά του με την κάψα και το σωληνάριο. Το σπείραμα είναι ένα σφαιρικό άθροισμα αναστομούμενων τριχοειδών διαμέτρου 200μm που περιβάλλονται από την κάψα του Bowman. Ο χώρος του Bowman –μεταξύ της κάψας και των τριχοειδών-συνέχεται με τα σωληνάρια. Τα τριχοειδή του σπειράματος τροφοδοτούνται από τα προσαγωγά αρτηρίδια με αίμα το οποίο καταλήγει στα απαγωγά αρτηρίδια (σχήμα 2). Η εικόνα που παρουσιάζουν τα τριχοειδή του σπειράματος σε τομές είναι εκείνη του αθροίσματος από ρόγες σταφυλιού γύρω από το μεσάγγειο (σχήμα 3). Τα τριχοειδή κάθε αγκύλης περιελίσσονται γύρω από ένα «στέλεχος», το μεσάγγειο και έτσι έχουν τη μια πλευρά ελεύθερη, στην οποία γίνεται η διήθηση, και την απέναντι πλευρά συνεχόμενη με το μεσάγγειο. Στην ελεύθερη πλευρά και εκ των έξω προς τα έσω διακρίνουμε τρεις στιβάδες: τη στοιβάδα των επιθηλιακών κυττάρων ή ποδοκυττάρων, τη βασική μεμβράνη του σπειράματος (Glomerular Basement Membrane, GBM) και τη στοιβάδα των ενδοθηλιακών κυττάρων. Η απέναντι πλευρά αποτελείται μόνο από το ενδοθήλιο που βρίσκεται σε άμεση σχέση με το μεσάγγειο (σχήμα 2) (2).





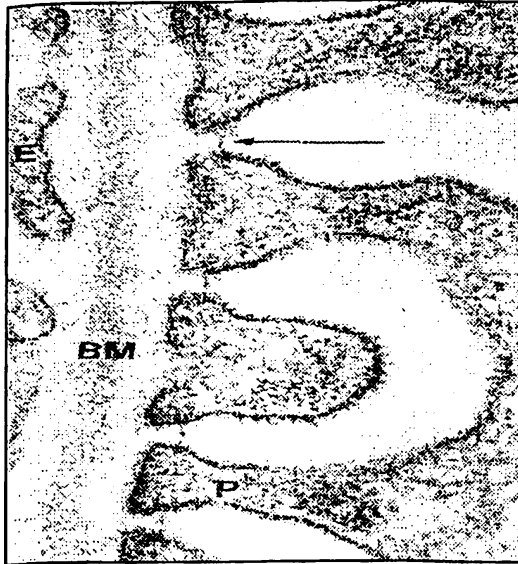
Σχήμα 2. Σχηματική παράσταση διαμήκουσ τομής σπειράματος. Το προσαγωγό αρτηρίδιο AA και το απαγωγό EA, το οποίο εγκαταλείπει το σπείραμα. Τα τριχοειδή του σπειράματος περιβάλλονται από την κάψα του Bowman και καλύπτονται από τα ενδοθηλιακά κύτταρα E. GBM: βασική μεμβράνη σπειράματος. M : μεσάγγειο. PO: ποδοκύτταρα



Σχήμα 3. Φωτογραφία ηλεκτρονικού μικροσκοπίου δύο σπειραμάτων πειραματοζώου. Κάθε σπείραμα τροφοδοτείται με αίμα από το προσαγωγό αρτηριόλιο AA. Το απαγωγό αρτηριόλιο EA αναδύεται από το κέντρο του σπειράματος

Επιθηλιακά κύτταρα ή ποδοκύτταρα

Είναι κύτταρα υψηλής διαφοροποίησης που δεν μπορούν να αντικατασταθούν. Σχηματίζουν την εξωτερική στιβάδα του τοιχώματος των τριχοειδών και προσκολλώνται στο εξωτερικό πέταλο της GBM, η οποία παράγεται κυρίως από τα κύτταρα αυτά. Ονομάστηκαν έτσι γιατί καλύπτουν τη GBM με πλήθος κυτταροπλασματικών προσεκβολών δίνοντας στα κύτταρα την εικόνα που έχουν τα πλοκάμια του χταποδιού. Από τις προσεκβολές αυτές ξεκινά πλήθος δευτερευόντων μικρότερων προσεκβολών που ονομάζονται ποδοειδείς προσεκβολές (σχήμα 4) (2).



Σχήμα 4. Εικόνα ηλεκτρονικού μικροσκοπίου στην οποία απεικονίζεται η βασική μεμβράνη του σπειράματος (GBM), τα ενδοθηλιακά κύτταρα E και οι ποδίσκοι P των ποδοκυττάρων. Το βέλος δείχνει τη μεμβράνη διηθητικής σχισμής.

Οι μικρές τελικές ποδοειδείς προσεκβολές σε σχήμα ράβδου καλούνται ποδίσκοι (pedicels) και εισέρχονται στη GBM σε βάθος 40-60nm. Ο κυτταροσκελετός των ποδίσκων δομείται από ένα πολύπλοκο δίκτυο μικροϊνιδίων αποτελούμενο κυρίως από την ακτίνη, τη μυοσίνη, την α-ακτινίνη, τη βινκουλίνη και την ταλίνη. Τα μόρια αυτά συνδέονται με τη σπειραματική μεμβράνη με συμπλέγματα $\alpha_3\beta_1$ -ιντεγκρινών (3). Ο σκελετός αυτός, αντιδρώντας σε αγγειοδραστικές ορμόνες, επιτρέπει στα ποδοκύτταρα να διαδραματίζουν σοβαρό ρόλο στο σπειραματικό φραγμό διήθησης(4)

Οι ποδίσκοι διαπλέκονται με τους αντίστοιχους των παρακείμενων κυττάρων και αφήνουν μεταξύ τους μικρές σχισμές (slits), οι οποίες επιτρέπουν τη μεταφορά νερού και διαφόρων ουσιών. Οι σχισμές αυτές καλύπτονται από μια λεπτή μεμβράνη γνωστή ως μεμβράνη διηθητικής σχισμής (slit membrane) (σχήμα 4).

Στο σημείο επαφής των σχισμών με το εξωτερικό πέταλο της σπειραματικής



μεμβράνης, μεταξύ των ποδοειδών προσεκβολών, ανευρίσκονται οι πόροι των ενδοθηλιακών κυττάρων διαμέτρου 20-40 nm. Η μεμβράνη της διηθητικής σχισμής αποτελείται από κάθετες ράβδους που συνδέονται στα πλάγια με τα παρακείμενα επιθηλιακά κύτταρα με σχηματισμό που θυμίζει φερμουάρ και συνολικά δημιουργούν ένα χώρο διαστάσεων 4x14 nm, ο οποίος αντιστοιχεί στη διάμετρο του μορίου της λευκωματίνης. Δημιουργείται έτσι ένας φραγμός στη διήθηση ουσιών που σχετίζεται με το μέγεθος των ουσιών (5).

Η επιφάνεια των ποδοκυττάρων, οι προσεκβολές τους και η μεμβράνη της διηθητικής σχισμής καλύπτονται από στρώμα σιαλογλυκοπρωτεϊνών, οι οποίες δημιουργούν ένα ισχυρό αρνητικό φορτίο. Δημιουργείται έτσι ένας δεύτερος φραγμός στη διήθηση ουσιών που σχετίζεται με το φορτίο των διηθούμενων μορίων (6).

Βασική μεμβράνη του σπειράματος

Έχει πάχος 150-350 nm και αποτελείται από τρεις διαφορετικές στιβάδες: μια παχιά κεντρική, το πυκνό πέταλο (Lamina Densa, LD), το έσω πέταλο (Lamina Rara Interna, LRI) που έρχεται σε επαφή με το ενδοθήλιο και το έξω πέταλο (Lamina Rara Externa, LRE) που έρχεται σε επαφή με τα επιθηλιακά κύτταρα. Συντίθεται από τα ποδοκύτταρα και τα ενδοθηλιακά κύτταρα και αποτελείται από κολλαγόνο τύπου IV και V, πρωτεογλυκάνες και γλυκοπρωτεΐνες (7).

Ενδοθηλιακά κύτταρα

Το τοίχωμα των τριχοειδών καλύπτεται από σπιβάδα ενδοθηλιακών κυττάρων που προσκολλώνται στην εσωτερική επιφάνεια της GBM μέσω λεπτών ινιδίων. Το ενδοθήλιο εμφανίζει οπές διαμέτρου 50-100 nm (fenestrations), η πλειονότητα των



οποίων στερείται διαφράγματος. Τα ενδοθηλιακά κύτταρα καλύπτονται από ένα λεπτό στρώμα γλυκοπρωτεΐνης πλούσιας σε σιαλικό οξύ, η οποία φορτίζει αρνητικά την επιφάνεια των κυττάρων. Συμμετέχουν κυρίως στη ρύθμιση της πήξης, της φλεγμονής και σε ανοσολογικούς μηχανισμούς.

Μεσάγγειο

Αποτελεί εξειδικευμένο ιστό των νεφρώνων. Περιέχει μεσαγγειακά κύτταρα και μεταξύ αυτών άμορφη ουσία, η οποία καλείται μεσαγγειακή (matrix). Τοπογραφικά διαιρείται σε σπειραματικό και εξωσπειραματικό μεσάγγειο. Τα κύτταρα του μεσαγγείου διακρίνονται σε αυτόχθονα ή τύπου I, σε κύτταρα τύπου II ή άποικοι και κύτταρα τύπου III. Τα τύπου I προέρχονται πιθανότατα από τα λεία μυϊκά κύτταρα και είναι ικανά να εκτελούν ενδοκύττωση και φαγοκύττωση. Εκκρίνουν κολλαγόνο IV και V, ινονεκτίνη και προσταγλανδίνες. Τα κύτταρα τύπου II εμφανίζουν χαρακτήρες μονοκυττάρων και μακροφάγων, ενώ τα τύπου III παριστούν κυκλοφορούντα μονοκύτταρα τα οποία παγιδεύονται στο μεσάγγειο του σπειράματος.

Η μεσαγγειακή ουσία αποτελείται από πλήθος μορίων που συντίθενται και εκκρίνονται από τα μεσαγγειακά κύτταρα, όπως κολλαγόνο τύπου IV, ινονεκτίνη, ακτινομοσίνη και χονδροϊτίνη της πρωτεογλυκάνης. Ένα τμήμα των τριχοειδών του σπειράματος βρίσκεται σε επαφή με το μεσάγγειο έτσι ώστε η διάμετρός τους να μεταβάλλεται ανάλογα με τη συσπαστική ή διασταλτική δράση του μεσαγγείου. Οι κυριότερες λειτουργίες του μεσαγγείου είναι: α)πρόσληψη και απομάκρυνση μεγαλομοριακών ουσιών, όπως ανόργανα σωματίδια, πολυσακχαρίτες και ανοσοσυμπλέγματα β)ρύθμιση της σπειραματικής κυκλοφορίας γ)παραγωγή



ορμονών και δομικών πρωτεογλυκανών και δ)τοπική ανοσορρύθμιση-παραγωγή ελευθέρων ριζών (8).

B. ΣΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟΣ ΦΡΑΓΜΟΣ ΔΙΗΘΗΣΗΣ

Τα ενδοθηλιακά κύτταρα, η βασική μεμβράνη και τα επιθηλιακά κύτταρα αποτελούν το «φίλτρο» που διηθεί καθημερινά 30% του συνολικού όγκου πλάσματος. Η πολύπλοκη ιστολογική αυτή δομή φαίνεται να λειτουργεί ως φραγμός στη διέλευση ουσιών ως προς το μέγεθος και το φορτίο. Έχει ήδη αναφερθεί ότι ο τρόπος που διαπλέκονται οι ποδοειδείς προσεκβολές αφήνει οπή συγκεκριμένων διαστάσεων. Έτσι νερό και μικρού μοριακού βάρους ουσίες (μοριακό βάρος <10kDa) εύκολα διαπερνούν το «φίλτρο», σε αντίθεση με τις μεγάλου μοριακού βάρους ενώσεις (>70kDa)(9). Όσο αφορά το φορτίο έχει ήδη αναφερθεί ότι τόσο τα ποδοκύτταρα, όσο και τα ενδοθηλιακά κύτταρα είναι αρνητικά φορτισμένα και εμποδίζουν τη διέλευση μορίων με αρνητικό φορτίο. Μείωση του φορτίου έχει παρατηρηθεί σε μοντέλα πειραματικής σπειραματονεφρίτιδας με αμινονουκλεοσίδη και σε ανθρώπους με λευκωματουρία (10-11). Η νεφρική κάθαρση ουδέτερων δεξτρανών κατόπιν ενδαγγειακής έγχυσης σε ασθενείς με νόσο ελαχίστων αλλοιώσεων είναι μικρότερη από ότι σε υγιείς, γεγονός που αποδεικνύει ότι η βλάβη αφορά μόνο το φραγμό διήθησης ως προς το φορτίο (12). Αντιθέτως σε άλλες σπειραματονεφρίτιδες όπως η μεμβρανώδης, η έγχυση δεξτρανών διαφορετικών μοριακών βαρών απέδειξε ότι η βλάβη αφορά το φραγμό μεγέθους και όχι φορτίου (13).

Φαίνεται λοιπόν ότι τα επιθηλιακά κύτταρα έχουν τον κύριο ρόλο στη διήθηση των ουσιών. Η αρχική παρατήρηση αφορούσε κληρονομικές σπειραματονεφρίτιδες, όπως το σύνδρομο ονυχο-οστεοδυστροφίας και το



συγγενές νεφρωσικό σύνδρομο τύπου Φιλανδίας. Κοινό σημείο στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο αυτών των σπειραματονεφριτίδων καθώς και πολλών μη κληρονομικών είναι η βλάβη των ποδοκυττάρων. Τα κύτταρα αυτά υφίστανται σημαντικές δομικές αλλαγές και κατά τόπους οι ποδίσκοι τους διαχωρίζονται από τη μεμβράνη. Το ώριμο επιθηλιακό κύτταρο (ποδοκύτταρο) όχι μόνο αδυνατεί να αντιδράσει στον τραυματισμό του και να διορθώσει τη βλάβη -προκαλώντας έτσι μόνιμη βλάβη του φραγμού- αλλά ενεργοποιεί μηχανισμούς αποδιαφοροποίησης της μεσαγγειακής ουσίας που οδηγούν στη σπειραματοσκλήρυνση (14).

Στα ποδοκύτταρα έχει αναγνωρισθεί mRNA πρωτεϊνών που συσχετίζονται με το σπειραματικό φραγμό διήθησης. Η μεγαλύτερη είναι μία διαμεμβρανική πρωτεΐνη 600kDa που ανήκει στην οικογένεια των υποδοχέων LDL και αποτελεί το στόχο των αντισωμάτων στην πειραματική σπειραματονεφρίτιδα Heyman (15). Η νεφρίνη, μια άλλη πρωτεΐνη 135kDa που έχει εντοπισθεί στη μεμβράνη της διηθητικής σχισμής(16), έχει συσχετισθεί με το συγγενές νεφρωσικό σύνδρομο τύπου Φιλανδίας και έχει αποκωδικοποιηθεί η μετάλλαξη του γονιδίου της (17). Η ποδοπλανίνη και η συναπτοποδίνη είναι επίσης πρωτεΐνες που ανιχνεύθηκαν στα ποδοκύτταρα και των οποίων η έκφραση συσχετίζεται με την άρτια δομή και λειτουργία των ποδοκυττάρων, η δε απουσία τους με εικόνα σπειραματονεφρίτιδας (18,19). Τέλος η GLEPP-1 (glomerular epithelial protein-1) είναι μια μεμβρανική φωσφατάση της τυροσίνης στις προσεκβολές των ώριμων ποδοκυττάρων. Μειωμένη έκφραση της πρωτεΐνης ή μετατόπισή της στη βάση των ποδοκυττάρων έχει βρεθεί σε πειραματικά μοντέλα νεφρίτιδας σε επίμυς, καθώς και σε νεφρικό ιστό ασθενών με συγγενές νεφρωσικό σύνδρομο τύπου Φιλανδίας, νόσο ελαχίστων αλλοιώσεων και εστιακή σπειραματοσκλήρυνση (20, 21).



Αγγειοδραστικές ουσίες όπως η αγγειοτενσίνη II, οι προσταγλανδίνες η αντιδιουρητική ορμόνη και η παραθορμόνη ρυθμίζουν τη σπειραματική διήθηση μέσω του τόνου των αρτηριδίων και του συντελεστή σπειραματικής διήθησης. Η αγγειοτενσίνη II αυξάνει την αποβολή πρωτεΐνης στα ούρα και αλλάζει το φραγμό της μεμβράνης ως προς το μέγεθος (22,23). Ειδικότερα μελέτες σε καλλιέργειες ποδοκυττάρων απέδειξαν ότι η αγγειοτενσίνη II σε διάφορες συγκεντρώσεις εκπολώνει τα ποδοκύτταρα και αλλάζει το σχήμα τους (25). Επιπλέον είναι αυξητικός παράγοντας και ενεργοποιεί τον πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών και μεσαγγειακών κυττάρων, τη σύνθεση κολλαγόνου IV και την παραγωγή μεσοκυττάριας ουσίας (24), ιδιότητες που εμπλέκονται λιγότερο ή περισσότερο στον καταρράκτη αντιδράσεων της σπειραματικής βλάβης. Οι κλινικές μελέτες έχουν επιβεβαιώσει τα πειραματικά αυτά δεδομένα: η φαρμακευτική αναστολή του συστήματος ρενίνης-αγγειοτενσίνης μειώνει την πρωτεϊνουρία και βελτιώνει τη νεφρική λειτουργία σε ασθενείς με σπειραματονεφρίτιδα (26). Για το λόγο αυτό οι αναστολείς του μετατρεπτικού ενζύμου και οι νεώτεροί τους ανταγωνιστές των υποδοχέων της αγγειοτενσίνης II αποτελούν σημαντικά φάρμακα στην εξέλιξη των σπειραματονεφριτίδων.

II. ΝΕΦΡΩΣΙΚΟ ΣΥΝΔΡΟΜΟ

Ο Schreiner όρισε το νεφρωσικό σύνδρομο ως «κλινική οντότητα με πολλές αιτίες, χαρακτηριζόμενη από αυξημένη διαπερατότητα του σπειράματος και εκδηλούμενη κλινικά με μαζική πρωτεϊνουρία και λιπιδουρία. Χαρακτηρίζεται επίσης από οιδήματα, υποαλβουμιναιμία, υπερλιπιδαιμία και υπερπηκτικότητα. Η



πρωτεΐνουρία συνήθως ξεπερνά τα 3,5 g/ημέρα/1,73m² επιφάνειας σώματος σε άτομα με φυσιολογική νεφρική λειτουργία» (27).

Οι κυριότερες νόσοι και αίτια που προκαλούν ή εμφανίζονται κλινικά ως νεφρωσικό σύνδρομο φαίνονται στον πίνακα 1 (28).



Πίνακας 1 Νόσοι και αίτια που προκαλούν ή εμφανίζονται κλινικά ως νεφρωσικό σύνδρομο

I) Ιδιοπαθείς σπειραματονεφρίτιδες	
II) Σπειραματοπάθειες ως επιπλοκή νόσων που εκδηλώνονται με νεφρωσικό	
<u>A. Φάρμακα</u>	<u>E. Πολυσυστηματικές νόσοι</u>
Χρυσός	Συστηματικός ερυθρεματώδης λύκος
Πενικιλλαμίνη	Μικτή νόσος συνδετικού ιστού
Ηρωΐνη	Δερματομυοσίτιδα
Προβενεσίδη	Ρευματοειδής αρθρίτιδα
Μη στεροειδή αντιφλεγμονώδη	Σύνδρομο Goodpasture
Ουαφαρίνη	Πορφύρα Henoch-Schonlein
Ιντερφερόνη	Αγγείιπδες
Σκιαγραφικά	Σύνδρομο Sjogren
Ριφαμπικίνη	Αμυλοείδωση
Λίθιο	Ερπητική Δερματίτιδα
Καπτοπρίλη	Σαρκοείδωση
<u>B. Αλλεργιογόνα, εμβολιασμοί</u>	Ελκώδης Κολίτιδα
Δήγμα όφειας και σφήκας	Λιποδυστροφία
Ορονοσία	<u>ΣΤ) Μεταβολικά και κληρονομικά νοσήματα</u>
Εμβόλια	Σακχαρώδης Διαβήτης
<u>Γ. Λοιμώξεις</u>	Υποθυρεοειδισμός
α) <u>μικροβιακές</u> : λοιμώδης ενδοκαρδίτιδα, λέπτρα, σύφιλη, χρόνια πυελονεφρίτιδα με κυστεοουρητητική παλιινδρόμηση, μεταστρεπτοκοκκική σπειραματονεφρίτιδα	Νόσος Graves
β) <u>ιογενείς</u> : ηπατίτιδα Β, κυτταρομεγαλοϊός, ιός Epstein-Barr, έρπη ζωστήρα, HIV	Σύνδρομο Alport
γ) <u>παρασιτώσεις</u> : ελονοσία, τοξοπλάσμωση, σχιστοσωμίαση, φιλαρίαση, τρυπανοσωμίαση	Σύνδρομο nail-patella
<u>Δ. Νεοπλασμάτα</u>	Νόσος Fabry
<u>Καρκινώματα και σαρκώματα</u> : πνεύμονα, νεφρού, στομάχου, εντέρου, μαστού, τραχήλου, ωοθηκών, θυρεοειδούς, προστάτη, φάρυγγα, φαιοχρωμοκύττωμα και μελάνωμα	Έλλειψη α1-αντιθρυψίνης
Λεμφώματα Hodgkin και non-Hodgkin, λευχαιμία, πολλαπλό μυέλωμα, μακροσφαιριναιμία Waldenstrom	Σύνδρομο Hurler
	Σύνδρομο Weber-Cristian
	Νόσος Charcot-Marie-Tooth
	Δρεπανοκυτταρική αναιμία
	<u>Ζ) Ποικίλα</u>
	Προεκλαμψία
	Χρόνια απόρριψη μοσχεύματος
	Μονόπλευρη νεφρική αρτηριακή υπέρταση
	Λεμφαγγειεκτασία
	Σύνδρομο Gardner-Diamond
	Σύνδρομο Kartagener



A. ΚΛΙΝΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΤΟΥ ΣΥΝΔΡΟΜΟΥ

1) Πρωτεϊνουρία

Είναι αποτέλεσμα των δομικών αλλαγών του σπειραματικού φραγμού. Τα επίπεδα των αποβαλλόμενων πρωτεϊνών στα ούρα ποικίλουν και εξαρτώνται κυρίως από το ρυθμό σπειραματικής διήθησης, την αλβουμίνη του πλάσματος και την πρόσληψη πρωτεϊνών με τη τροφή (29,30). Για παράδειγμα, συχνά στην κλινική πράξη μια σοβαρή υποαλβουμιναιμία οδηγεί σε πρωτεϊνουρία που δεν ξεπερνά το πιο πάνω όριο των 3,5 γραμμαρίων ημερησίως, χωρίς αυτό να σημαίνει ότι το σπείραμα δεν έχει σοβαρή βλάβη. Από την άλλη, μια δίαιτα φτωχή σε πρωτεΐνες συνοδεύεται από μείωση των πρωτεϊνών που αποβάλλονται στα ούρα.

Για το λόγο αυτό έχει προταθεί αντί της μέτρησης πρωτεϊνών σε συλλογές ούρων 24ώρου, η μέτρηση της κάθαρσης αλβουμίνης ή ειδικότερα του λόγου καθάρσεων π.χ κάθαρση αλβουμίνης/κάθαρση κρεατινίνης. Το πλεονέκτημα της τελευταίας μέτρησης είναι ότι δε χρειάζεται ο όγκος των συλλογών ούρων. Ένας άλλος τρόπος αποφυγής της συλλογής ούρων 24ώρου είναι ο υπολογισμός του λόγου συγκεντρώσεων πρωτεΐνης /κρεατινίνης σε τυχαίο δείγμα ούρων. Λόγος μεγαλύτερος του 3,5 δηλώνει πρωτεϊνουρία νεφρωσικού τύπου (31).

2) Υποαλβουμιναιμία

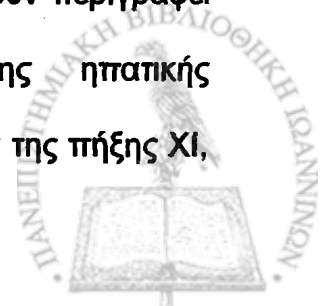
Η μαζική απώλεια των πρωτεϊνών στα ούρα οδηγεί αργά η γρήγορα σε υποαλβουμιναιμία. Υπάρχει θετική συσχέτιση μεταξύ της πρωτεϊνουρίας και της υποαλβουμιναιμίας, αλλά υπάρχουν και εξαιρέσεις, όπως έχει ήδη αναφερθεί. Πολλές παθοφυσιολογικές μελέτες με ραδιοσημασμένη αλβουμίνη ερεύνησαν



τη σύνθεση και τον καταβολισμό της αλβουμίνης σε καταστάσεις υποαλβουμιναιμίας. Η συνολική μάζα της αλβουμίνης καθώς και η μάζα της αλβουμίνης στο πλάσμα είναι μειωμένη, ενώ ο ρυθμός σύνθεσης της αλβουμίνης στο ήπαρ και ο ρυθμός καταβολισμού της είναι αυξημένος (32,33). Ο λόγος της μάζας της αλβουμίνης ενδαγγειακά προς το λόγο της μάζας εξωαγγειακά είναι 1,1 (στους φυσιολογικούς είναι 0,8). Η συγκέντρωση όμως της αλβουμίνης στο διάμεσο χώρο γίνεται ακόμη μικρότερη από αυτή του πλάσματος. Έτσι η κλίση της διατριχοειδικής ογκωτικής πίεσης είναι πολύ λιγότερη από όσο θα περιμέναμε, με αποτέλεσμα αυτό να λειτουργεί ως δικλείδα ασφαλείας στη διατήρηση του όγκου πλάσματος στους ασθενείς με νεφρωσικό σύνδρομο (34).

Εκτός της υποαλβουμιναιμίας, πολλές άλλες πρωτεΐνες του πλάσματος εμφανίζουν διαφορετικές συγκεντρώσεις. Μειωμένες συγκεντρώσεις οφείλονται είτε σε απώλεια στα ούρα πρωτεϊνών μεσαίου μεγέθους, είτε σε μειωμένη σύνθεση, αν και ελάχιστες μελέτες διακίνησης (turnover) έχουν γίνει σε νεφρωσικό σύνδρομο. Τα επίπεδα α_2 και β σφαιρινών στο πλάσμα είναι αυξημένα, ενώ τα επίπεδα α_1 είναι φυσιολογικά ή μειωμένα. Ανοσοχημικές μελέτες έδειξαν ότι οι IgG σφαιρίνες είναι σημαντικά μειωμένες σε νεφρωσικό σύνδρομο, σε αντίθεση με τις IgA, IgM και IgE σφαιρίνες που μπορεί να βρεθούν και αυξημένες. Φαίνεται ότι τα επίπεδα των σφαιρινών σχετίζονται και με την υποκείμενη σπειραματονεφρίτιδα (35).

Όσο αφορά το συμπλήρωμα, μπορεί να είναι μειωμένες οι συγκεντρώσεις των C_{1q} , C_2 , C_8 , C_9 , φυσιολογικά τα επίπεδα των C_{1s} , C_4 και C_1 , ενώ τα επίπεδα C_3 είναι φυσιολογικά παρά την απώλεια C_3 στα ούρα (28). Έχουν περιγραφεί αυξημένες συγκεντρώσεις ινωδογόνου (λόγω αυξημένης ηπατικής σύνθεσης)(32) και παραγόντων X, V, VII και VIII. Οι παράγοντες της πήξης XI,



XII, η προκαλλικρεΐνη, ο ενεργοποιητής του πλασμινογόνου και ο αναστολέας της καλλικρεΐνης είναι μειωμένοι. Οι συγκεντρώσεις των πρωτεϊνών C και S έχουν βρεθεί φυσιολογικές. Έχει περιγραφεί επίσης αυξημένη συσσώρευση των αιμοπεταλίων. Γενικά φαίνεται ότι στο νεφρωσικό σύνδρομο επηρεάζονται κυρίως οι παράγοντες που σχετίζονται με τον ινωδολυτικό και αντιπηκτικό μηχανισμό. Ίσως αυτό να αποτελεί εξήγηση της αυξημένης συχνότητας εμφάνισης θρομβώσεων σε αυτούς τους ασθενείς (36).

Πολλά ιχνοστοιχεία χάνονται στα ούρα, όπως χαλκός, σίδηρος και ψευδάργυρος (37). Η μείωση της τρανσφερίνης συμμετέχει στην υπόχρωμη αναιμία των ασθενών αυτών. Η έλλειψη της σφαιρίνης που συνδέεται με τη θυροξίνη επηρεάζει την ερμηνεία των εργαστηριακών θυρεοειδικών ελέγχων. Έτσι ενώ μπορεί η ολική θυροξίνη (T4) και η τρι-ιωδοθυρονίνη (T3) να είναι μειωμένες, η ελεύθερη θυροξίνη (free T₄) και η θυρεοειδοτρόπος ορμόνη (TSH) να είναι φυσιολογικές (38). Η απώλεια στα ούρα της σφαιρίνης που μεταφέρει τη χοληκαλσιφερόλη(βιταμίνη D₂) μπορεί να εξηγήσει την παρατηρούμενη στους νεφρωσικούς ασθενείς μείωση του ιονισμένου ασβεστίου πλάσματος, τη διαταραγμένη απορρόφηση ασβεστίου από το γαστρεντερικό, τη χαμηλή συγκέντρωση της 25-υδροξυχοληκαλσιφερόλης και την αύξηση της παραθορμόνης (38).

3) Οίδημα

Τα οιδήματα στους ασθενείς με νεφρωσικό σύνδρομο είναι ζυμώδη, με εντύπωμα και εμφανίζονται κυρίως στις περιοχές του σώματος με μεγάλη ελαστικότητα και μικρή διάμεση ιστική πίεση, όπως περικογχικά και εξαρτώνται από τη θέση του σώματος. Είναι ιδιαίτερα έντονα τις πρωινές ώρες και

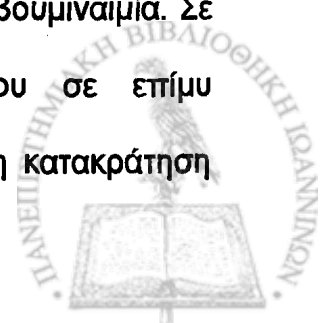


επιδεινώνονται με την ορθοστασία. Γενικά η σοβαρότητα και η έκτασή τους είναι ανάλογη της υποαλβουμιναιμίας, αλλά υπάρχουν και εξαιρέσεις.

Παλαιότερα θεωρούνταν ότι τα οίδημα του νεφρωσικού συνδρόμου οφείλονται στην υποαλβουμιναιμία και στην υπο-ογκαιμία. Η τελευταία είναι αποτέλεσμα της μειωμένης ωσμωτικής πίεσης του πλάσματος που οδηγεί – μέσω του συστήματος ρενίνης-αγγειοτενσίνης και του συμπαθητικού συστήματος- στην επαναρρόφηση νατρίου από τα νεφρικά σωληνάκια.

Τα τελευταία όμως χρόνια νέες παρατηρήσεις θέτουν σε αμφισβήτηση το κατά πόσο οι ασθενείς με νεφρωσικό σύνδρομο είναι υπο-ογκαιμικοί. Για παράδειγμα, μετρήσεις του όγκου πλάσματος σε τέτοιους ασθενείς τον βρίσκουν φυσιολογικό ή και αυξημένο και όχι μειωμένο (39). Τα επίπεδα του κοιλιακού νατριουρητικού πεπτιδίου είναι αυξημένα (40). Η φαρμακευτική αναστολή του συστήματος ρενίνης-αγγειοτενσίνης δεν προκαλεί νατριούρηση, όπως θα περιμέναμε αν η κατακράτηση νατρίου ήταν αποτέλεσμα ενεργοποίησης αυτού του συστήματος (41). Στη σπάνια περίπτωση δημιουργίας πρωτεϊνουρίας λόγω μη νεφρικής βλάβης (πχ. λέμφος να αποχετεύεται στην νεφρική πύελο) δεν δημιουργούνται οίδημα (42). Τέλος, κατά την υποτροπή νεφρωσικού συνδρόμου έχει παρατηρηθεί ότι η κατακράτηση νατρίου αρχίζει πολύ πριν εκδηλωθεί η πρωτεϊνουρία και η υποαλβουμιναιμία (43). Όλες αυτές οι παρατηρήσεις οδηγούν στο συμπέρασμα ότι η κατακράτηση νατρίου στο νεφρωσικό σύνδρομο γίνεται πρωτοπαθώς από το νεφρό και δεν είναι αποτέλεσμα της υπο-ογκαιμίας.

Θεωρητικά κάθε σπειραματοπάθεια μπορεί να προκαλέσει κατακράτηση νατρίου, αύξηση του όγκου πλάσματος και οίδημα, χωρίς υποαλβουμιναιμία. Σε πειραματικό μοντέλο μονόπλευρου νεφρωσικού συνδρόμου σε επίμου (χορήγηση πυρομυκίνης στον ένα νεφρό) έχει αποδειχθεί ότι η κατακράτηση



νατρίου γίνεται στο άπω εσπειραμένο σωληνάριο. Παρατηρήθηκε ακόμη ότι ο νεφρός που είχε υποστεί τη βλάβη δεν απαντούσε στο κοιλπικό νατριουρητικό πεπτίδιο, σε αντίθεση με τον άλλο φυσιολογικό νεφρό. Κλινικές μελέτες έδειξαν ότι και στον άνθρωπο υπάρχει χαμηλή ανταπόκριση του νεφρού στο κοιλπικό νατριουρητικό πεπτίδιο (44).

Τα παραπάνω βέβαια δεν αποκλείουν την εμφάνιση υποογκαιμικών επεισοδίων στους νεφρωσικούς, ειδικά μετά τη θεραπεία με διουρητικά. Τα επεισόδια αυτά εκδηλώνονται ως ορθοστατική υπόταση, περιφερική αγγειοσύσπαση, ταχυκαρδία, κοιλιακό άλγος, ολιγουρία ακόμη και οξεία νεφρική ανεπάρκεια.

4) Θρομβοεμβολικές επιπλοκές

Είναι συχνές, ιδιαίτερα στους ασθενείς με μεμβρανώδη σπειραματονεφρίτιδα. Μελέτες αναδρομικές και προοπτικές υπολογίζουν την επίπτωση τέτοιων επεισοδίων στο 20-30% των ενήλικων ασθενών. Τα περισσότερα επεισόδια θρομβώσεων φλεβών είναι υποκλινικά και δε γίνονται αντιληπτά. Μόνο 10% ασθενών με θρόμβωση νεφρικής φλέβας εμφανίζει τα κλασικά συμπτώματα όπως πόνο στην οσφύ, αιματουρία, αύξηση του μεγέθους του νεφρού και έκπτωση της νεφρικής λειτουργίας. Πολλές φορές επεισόδια πνευμονικής εμβολής (30% των ασθενών) και εν τω βάθει φλεβοθρόμβωσης δε γίνονται αντιληπτά στην κλινική πράξη (45-47).

Σπανιότερα είναι τα επεισόδια της αρτηριακής θρόμβωσης. Όσο αφορά τα στεφανιαία αγγεία, έχει αποσαφηνισθεί ότι οι ασθενείς με νεφρωσικό σύνδρομο έχουν αυξημένο κίνδυνο στεφανιαίων συμβαμάτων. Οι περισσότερες βέβαια μελέτες είναι αναδρομικές, με ετερογενές υλικό και διαφορετική πρωτοπαθή νεφρική νόσο. Σε μια μελέτη σύγκρισης μη διαβητικών ασθενών με νεφρωσικό



σύνδρομο με υγιείς (λαμβάνοντας υπόψη στη μετα-ανάλυση των δεδομένων την ηλικία, το φύλο, το κάπνισμα και την υπέρταση), ο σχετικός κίνδυνος στους ασθενείς για έμφραγμα μυοκαρδίου είναι 5,3 και ο αντίστοιχος για θάνατο από οξύ στεφανιαίο σύνδρομο είναι 5,5 (48). Σημαντικό ρόλο στην αυξημένη επίπτωση της αθηρωματικής νόσου διαδραματίζει και η δυσλιπιδαιμία των ασθενών αυτών.

Όπως αναφέρθηκε, το νεφρωσικό σύνδρομο χαρακτηρίζεται από μια κατάσταση υπερπηκτικότητας, η οποία συμβάλλει στην εμφάνιση θρομβοεμβολικών επεισοδίων. Βασικοί παράγοντες υπεύθυνοι για την υπερπηκτικότητα αυτή είναι : α) τα χαμηλά επίπεδα παράγοντα ΙΧ και ΧΙ β) οι αυξημένες συγκεντρώσεις των προπηκτικών συνπαραγόντων V και VIII γ) τα αυξημένα επίπεδα ινωδογόνου δ) οι μειωμένες συγκεντρώσεις αντιπηκτικών, όπως η αντιθρομβίνη ΙΙΙ ε) η παθολογική δράση των αιμοπεταλίων (θρομβοκυττάρωση, αύξηση παράγοντα ΙV και θρομβοσφαρίνης in vivo) στ) η δυσλειτουργία του ενδοθηλίου (49).

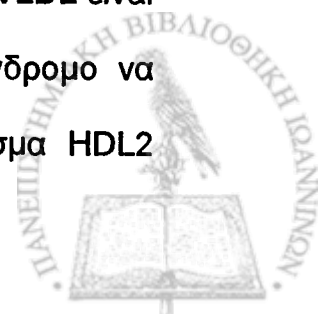
Ο μεγάλος κίνδυνος θρομβοεμβολικών επεισοδίων καθιστά επιτακτική την πρόληψή τους. Δυστυχώς δεν υπάρχουν προοπτικού τύπου μελέτες για προφυλακτική χορήγηση αντιπηκτικής αγωγής στους ασθενείς με νεφρωσικό σύνδρομο. Κακοί προγνωστικοί παράγοντες για θρομβοεμβολικό επεισόδιο φαίνεται να είναι η χαμηλή συγκέντρωση αλβουμίνης (<25g/L), η μαζική πρωτεϊνουρία (>10g/ημέρα), τα αυξημένα επίπεδα ινωδογόνου, τα χαμηλά επίπεδα αντιθρομβίνης-ΙΙΙ και η υπο-ογκαιμία. Οι περισσότεροι πάντως κλινικοί γιατροί επιλέγουν τη χορήγηση μικρών δόσεων ηπαρίνης χαμηλού μοριακού βάρους σε ασθενείς με νεφρωσικό σύνδρομο και αλβουμίνη ορού <25g/L. Η εμφάνιση θρομβοεμβολικών επεισοδίων αντιμετωπίζεται όπως και στους άλλους ασθενείς.



5) Υπερλιπιδαιμία

Η δυσλιπιδαιμία των ασθενών με νεφρωσικό σύνδρομο χαρακτηρίζεται από ποσοτικές και ποιοτικές διαταραχές των λιποπρωτεϊνών. Έχει βρεθεί αυξημένη τιμή συγκέντρωσης ολικής χοληστερόλης, LDL-χοληστερόλης και VLDL-χοληστερόλης καθώς και τριγλυκεριδίων. Τα επίπεδα της HDL-χοληστερόλης έχουν περιγραφεί αυξημένα, φυσιολογικά ή μειωμένα, αν και ο λόγος LDL-χοληστερόλη/HDL-χοληστερόλη είναι γενικά αυξημένος. Επίσης έχουν μετρηθεί αυξημένα επίπεδα: της απολιποπρωτεΐνης B (ApoB), της απολιποπρωτεΐνης C (ApoC) και της απολιποπρωτεΐνης E (ApoE). Όσο αφορά τις λιποπρωτεΐνες είναι αυξημένες οι συγκεντρώσεις των LDL και VLDL, ενώ ποικίλουν στις μελέτες οι τιμές για τις HDL (50-53). Τέλος έχουν βρεθεί αυξημένα επίπεδα λιποπρωτεΐνης(a) [Lp(a)] (54,55). Η λιποπρωτεΐνη αυτή αποτελείται από ένα μόριο LDL, στο οποίο ένα μόριο απολιποπρωτεΐνης apo(a) συνδέεται με δισουλφιδικό δεσμό με την απολιποπρωτεΐνη B-100. Οι ισομορφές της apo(a) καθορίζονται γενετικά και καθορίζουν τα επίπεδα της Lp(a). Τα επίπεδα της ολικής χοληστερόλης και LDL-χοληστερόλης σχετίζονται αντιστρόφως ανάλογα με την αλβουμίνη του ορού –ειδικότερα με το ρυθμό νεφρικής κάθαρσης της αλβουμίνης-και με την ωσμωτική πίεση του πλάσματος (56,57), ενώ για τη Lp(a) οι μελέτες είναι αντικρουόμενες (54,55,58)

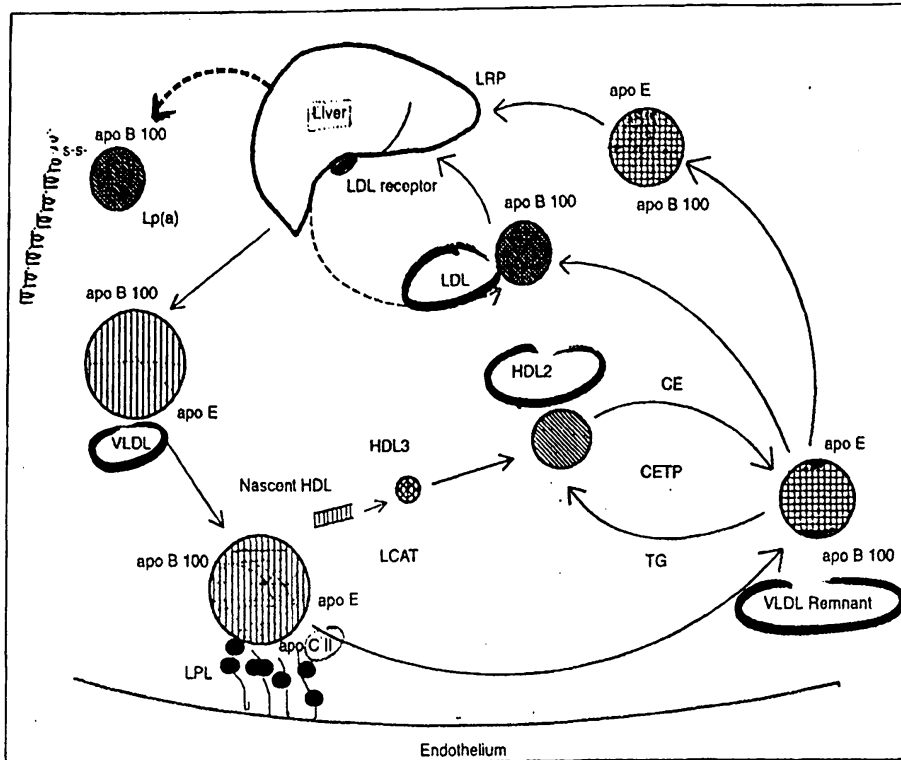
Υπάρχουν όμως και ποιοτικές διαταραχές των λιπιδίων στο νεφρωσικό σύνδρομο. Σε ασθενείς με νεφρωσικό σύνδρομο οι μικρές, πυκνές και πιο αθηρογόνες LDL III είναι περισσότερες από ότι σε φυσιολογικά άτομα, το αντίθετο συμβαίνει με τις μεγάλες LDL I και II. Όλα τα κλάσματα των VLDL είναι αυξημένα (59). Μπορεί τα επίπεδα της HDL στο νεφρωσικό σύνδρομο να βρίσκονται άλλοτε άλλα στις μελέτες, αλλά σταθερά το υποκλάσμα HDL2



(μεγάλο-αραιό σωματίδιο HDL) είναι μειωμένο και έχει αντικατασταθεί από το μικρό-πυκνό σωματίδιο HDL₃, που είναι και το πιο αθηρογόνο (60).

Μηχανισμοί : Γενικά η υπερλιπιδαιμία του νεφρωσικού συνδρόμου οφείλεται σε αυξημένη ηπατική σύνθεση λιποπρωτεϊνών ή μειωμένο λιποπρωτεϊνικό καταβολισμό. Τα επίπεδα της VLDL είναι αυξημένα όχι τόσο λόγω αυξημένης σύνθεσης, αλλά λόγω μειωμένης κάθαρσης (61). Όπως είναι γνωστό, ο καταβολισμός των VLDL γίνεται από την λιποπρωτεϊνική λιπάση (LPL) που βρίσκεται συνδεδεμένη στο ενδοθήλιο και δρα με τη βοήθεια της απολιποπρωτεΐνης C-II(ApoC-II) [σχήμα 5].



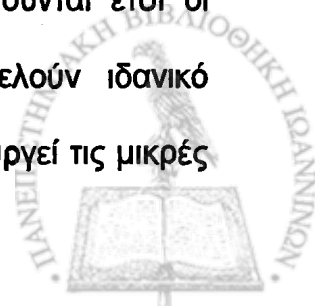


Σχήμα 5. Μεταβολισμός των λιποπρωτεϊνών. Οι VLDL εκκρίνονται από το ήπαρ και στη συνέχεια υδρολύονται στο ενδοθήλιο από τη λιποπρωτεϊνική λιπάση LPL. Η LPL είναι συνδεδεμένη ηλεκτροστατικά με τη θεική ηπαράνη και παρουσία της αποπρωτεΐνης C-II υδρολύει τα τριγλυκερίδια (TG). Η LPL είναι σημαντική στην προσκόλληση της VLDL στο ενδοθήλιο και στον υποδοχέα της. Συστατικά της επιφάνειας της VLDL, ελεύθερη χοληστερόλη και φωσφολιπίδια συμμετέχουν στο σχηματισμό των αρτιγενών (nascent) HDL. Η ελεύθερη χοληστερόλη στη επιφάνεια της HDL εστεροποιείται με τη βοήθεια του ενζύμου LCAT. Οι εστέρες χοληστερόλης που δημιουργούνται βυθίζονται στον πυρήνα της HDL και δημιουργούνται οι πλούσιες σε εστέρες (CE) HDL 2. Τα υπολείμματα της VLDL (τα ελεύθερα τριγλυκεριδίων) είτε προσλαμβάνονται από το ήπαρ απευθείας μέσω υποδοχέων, είτε αλληλεπιδρούν με τη HDL 2. Στην τελευταία περίπτωση οι εστέρες χοληστερόλης της HDL 2 με τη βοήθεια του ενζύμου CETP ανταλλάσσονται με τα τριγλυκερίδια των υπολειμμάτων της VLDL και απελευθερώνεται LDL, η οποία προσλαμβάνεται από το ήπαρ (μέσω υποδοχέα).

Στους νεφρωσικούς ασθενείς η apoC-II στο πλάσμα είναι φυσιολογική, αλλά μειωμένη μετρούμενη ανά σωματίδιο VLDL, αφού τα επίπεδα της VLDL αυξάνονται ενώ της apoC-II όχι (62). Πρόσφατα βρέθηκε ότι η έκφραση mRNA της ηπατικής και λιποπρωτεϊνικής λιπάσης και των υποδοχέων της VLDL ήταν μειωμένη στους ιστούς επίμυων με νεφρωσικό σύνδρομο (63). Στους ίδιους επίμυς μειωμένη ήταν και η κάθαρση των χυλομικρών. In vitro μετρήσεις στους ίδιους επίμυς της ποσότητας της LPL της συνδεδεμένης στο ενδοθήλιο ήταν 90% μικρότερη του φυσιολογικού, ενώ ήταν απολύτως φυσιολογική η ποσότητα της LPL στους άλλους ιστούς. Συνεπώς αυτή η μειωμένη ποσότητα LPL στο ενδοθήλιο πρέπει να είναι υπεύθυνη για τον μειωμένο καταβολισμό των VLDL και των χυλομικρών (64).

Σε αντίθεση με τις VLDL, η σύνθεση των LDL είναι αυξημένη. Ειδικότερα η αυξημένη σύνθεση φαίνεται να αφορά την LDL apoB-100, ενώ η VLDL apoB-100 είναι μειωμένη (61,65). Δεν έχει διευκρινισθεί το ακριβές ερέθισμα που προκαλεί την αυξημένη ηπατική σύνθεση των λιποπρωτεϊνών, αλλά φαίνεται σημαντικό ρόλο να παίζει η υποαλβουμιναιμία και η μειωμένη ογκωτική πίεση του πλάσματος, ενώ η αυξημένη δραστηριότητα της πρωτεΐνης μεταφοράς εστέρων χοληστερόλης (CETP) πιθανά να εξηγεί τη μειωμένη σύνθεση της VLDL apoB-100 (52). Όσο αφορά την Lp(a), τα επίπεδά της είναι αυξημένα ανεξάρτητα ισομορφών και οφείλονται σε αυξημένη σύνθεση (66).

Ο παθογενετικός μηχανισμός που οδηγεί στη δημιουργία των μικρών και πυκνών LDL φαίνεται να σχετίζεται με τα τριγλυκερίδια. Προτείνεται ότι σε υπερτριγλυκεριδαιμία, μέσω της πρωτεΐνης CETP τα τριγλυκερίδια προτιμούν τις LDL με αντάλλαγμα χοληστερόλη για τις VLDL (δημιουργούνται έτσι οι μεγάλες VLDL1). Οι πλούσιες σε τριγλυκερίδια LDL αποτελούν ιδανικό υπόστρωμα για τη δράση της ηπατικής λιπάσης, η οποία δημιουργεί τις μικρές



LDL. Τέλος υπεύθυνη για την υπεροχή των HDL3 φαίνεται ότι είναι η μειωμένη σύνδεση της λεκιθινοχοληστερολο-ακυλοτρανφεράσης (LCAT) –ένζυμο απαραίτητο για την φυσιολογική ωρίμανση της HDL-με την αλβουμίνη λόγω υποαλβουμιναιμίας. Οι αλλαγές αυτές έχουν σαν αποτέλεσμα τη μείωση της λιπόλυσης των πλούσιων σε τριγλυκερίδια λιποπρωτεϊνών αλλά και τον καταβολισμό των χυλομικρών- και VLDL (οι φυσιολογικές HDL μεταφέρουν την apoC-II στις VLDL) (59).

Θεραπεία : Η ύφεση της πρωτεϊνουρίας συνοδεύεται με βελτίωση του λιπιδαιμικού προφίλ. Παρόλα αυτά οι ασθενείς αυτοί έχουν αυξημένο κίνδυνο καρδιαγγειακών νοσημάτων, πολλές δε φορές έχουν και άλλους παράγοντες κινδύνου π.χ αρτηριακή υπέρταση. Επιπλέον η υπερλιπιδαιμία αποτελεί ανεξάρτητο παράγοντα επιδείνωσης της νεφρικής βλάβης (67). Το γεγονός αυτό καθιστά αναγκαία τη φαρμακευτική αγωγή της δυσλιπιδαιμίας τους. Έχουν χορηγηθεί σε πολλές μελέτες φάρμακα όπως παράγωγα νικοτινικού οξέως, προβουκόλη και χολεστυραμίνη με καλά αποτελέσματα στη μείωση κυρίως της ολικής και LDL χοληστερόλης (51,52). Τα τελευταία όμως χρόνια προτιμούνται ως θεραπεία εκλογής οι στατίνες (αναστολείς της ρεδοκτάσης) λόγω της ασφάλειας, της αποτελεσματικότητάς τους (40-47% μείωση της ολικής και LDL χοληστερόλης) και των ελάχιστων παρενεργειών (68-70).

6) Λιπιδουρία

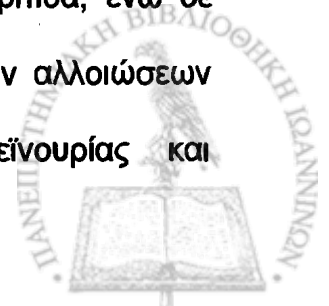
Η λιπιδουρία δεν αποτελεί γνώρισμα μόνο του νεφρωσικού συνδρόμου. Σε πειραματόζωα με φυσιολογική νεφρική λειτουργία σε μελέτη έγχυσης με ραδιοσημασμένη HDL, 1,9 % του εγχυόμενου HDL βρέθηκε στα ούρα (71). Έχει βρεθεί επίσης στα ούρα επίμυων απολιποπρωτεΐνη ApoA I, ApoE και ApoC. Η λιποπρωτεΐνη HDL και η κύρια απολιποπρωτεΐνη της apoA-I βρέθηκε



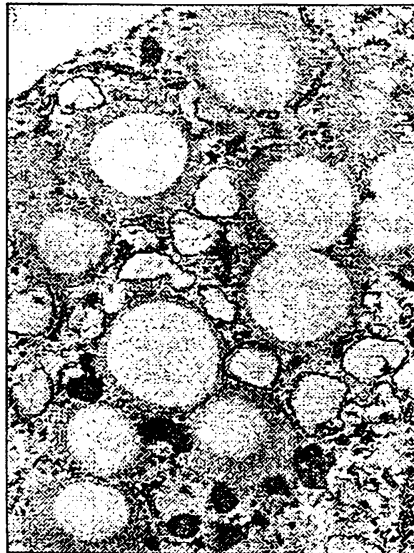
στα ούρα υγιών ανθρώπων με ανοσοηλεκτροφόρηση. Αντιθέτως σε υγιείς δεν έχουν βρεθεί ποτέ απολιποπρωτεΐνες apoB και apoE, γεγονός που σημαίνει ότι VLDL και LDL λιποπρωτεΐνες δε διηθούνται από το φυσιολογικό νεφρό (72).

Σε επίμυς με νεφρωσικό σύνδρομο η αποβολή στα ούρα του ραδιοσημασμένου HDL ήταν σαφώς μεγαλύτερη από ότι στα φυσιολογικά (71). Στα ούρα επίμυων με νεφρωσικό σύνδρομο έχουν βρεθεί ίχνη VLDL και LDL καθώς επίσης απολιποπρωτεΐνες ApoA I, II, E και C (73,74). Όπως αποδείχθηκε όμως οι λιποπρωτεΐνες που αποβάλλονται στα ούρα επίμυων με νεφρωσικό σύνδρομο έχουν διαφορετική σύσταση από τις λιποπρωτεΐνες των ούρων ασθενών με νεφρωσικό σύνδρομο. Άλλωστε η κύρια λιποπρωτεΐνη στο πλάσμα φυσιολογικών επίμυων είναι η HDL και η ίδια λιποπρωτεΐνη είναι κυρίως αυξημένη στο πλάσμα επίμυων σε πειραματικά μοντέλα νεφρωσικού συνδρόμου. Για το λόγο αυτό η χρήση των πειραματικού μοντέλου σπειραματονεφρίτιδας πρέπει να γίνεται με σκεπτικισμό, όσο αφορά τη διεξαγωγή συμπερασμάτων για τον άνθρωπο.

Στους ασθενείς με νεφρωσικό σύνδρομο ακόμη και στην απλή μικροσκόπηση των ούρων αναγνωρίζονται ωοειδή λιπώδη σωματίδια (σωληναριακά κύτταρα με λιπίδια), κύλινδροι λιπιδίων και κρύσταλλοι χοληστερόλης (75) [σχήμα 6]. Σε ασθενείς με νεφρωσικό σύνδρομο πρώτοι ο Klahr και συν περιέγραψαν στα ούρα ευρύ φάσμα λιπιδίων, όπως ελεύθερη χοληστερόλη, εστέρες χοληστερόλης, τριγλυκερίδια, ελεύθερα λιπαρά οξέα και φωσφολιπίδια (76). Σε πολλές μελέτες η κύρια λιποπρωτεΐνη που βρίσκεται στα ούρα νεφρωσικών είναι η HDL (77-82). Οι Lopez-Virella και συν βρήκαν με ηλεκτροφόρηση ApoA1 στα ούρα ασθενών με σπειραματονεφρίτιδα, ενώ δε βρέθηκαν λιποπρωτεΐνες στα ούρα παιδιών με νόσο ελαχίστων αλλοιώσεων (77). Υπήρχε μάλιστα θετική συσχέτιση μεταξύ πρωτεϊνουρίας και



αποβαλλόμενης στα ούρα απολιποπρωτεΐνης, κάτι που παρατήρησαν και άλλοι μελετητές (80). Οι Shore και συν βρήκαν στα ούρα 4 ασθενών με νεφρωσικό σύνδρομο εκτός της HDL, VLDL, IDL και LDL καθώς και τις απολιπρωτεΐνες ApoA1, ApoAII, ApoB, ApoC1, ApoCIII (78). Στη μελέτη αυτή –που ουσιαστικά είναι και η μόνη εμπειριστατωμένη- προσδιορίσθηκε αναλυτικά η σύσταση των αποβαλλόμενων στα ούρα λιποπρωτεϊνών με τεχνικές υπερφυγοκέντρωσης και ηλεκτροφόρησης. Οι λιποπρωτεΐνες των ούρων φαίνεται να έχουν διαφορετική σύσταση από τις αντίστοιχες του πλάσματος, γεγονός που αποδίδεται από τους συγγραφείς στην πιθανή επεξεργασία τους κατά την σπειραματική διήθησή τους. Η μελέτη αυτή είναι και η μοναδική που αναφέρει την ύπαρξη LDL στα ούρα ασθενών με νεφρωσικό σύνδρομο. Η HDL ήταν αναλογικά περισσότερη της LDL, με επικράτηση του υποκλάσματος HDL2.



Σχήμα 6. Έγκλειστα λιπιδίων στο κυτταρόπλασμα σωληναριακού κυττάρου. Το δείγμα προέρχεται από τα ούρα ασθενούς με νεφρωσικό σύνδρομο. Μικροσκόπηση με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σε μεγέθυνση 25000

Την τελευταία δεκαετία ο Kostner μελέτησε ειδικότερα την αποβολή κλασμάτων της apo(a) στα ούρα υγιών ατόμων. Σε υγιείς βρήκε ότι η apo(a)



αποβάλλεται αποδεσμευμένη από την AρoB, σε κλάσματα 30-160kDa, σε θετική συσχέτιση με την κρεατινίνη και τη συγκέντρωση Lp(a) ορού και υπολόγισε ότι η αποβολή αυτή συσχετίζεται λιγότερο από 1% με τον καταβολισμό της Lp(a) (83,84). Οι Charman και συν μελετώντας τα κλάσματα αρo(a) στα ούρα νεφρωσικών, κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι η σύστασή τους είναι διαφορετική από την αρo(a) στα ούρα υγιών. Επιπλέον απέδειξαν ότι τα μεγάλα κλάσματα της αρo(a) περνούν παθητικά το σπειραματικό φραγμό, ενώ τα μικρότερα πιθανά εκκρίνονται στα ούρα με άγνωστο μηχανισμό (85).

Υποστηρίζεται από πολλούς ότι οι λιποπρωτεΐνες που διηθούνται στο σπείραμα επαναρροφούνται στο εγγύς εσπειραμένο σωληνάριο προκαλώντας βλάβη του σωληναρίου. Φυσιολογικά ένα ποσό αλβουμίνης περνά το σπειραματικό φραγμό διήθησης και αποβάλλεται στον ουροφόρο χώρο. Στο εγγύς εσπειραμένο σωληνάριο η αλβουμίνη συνδέεται σε ειδικές θέσεις του επιθηλίου, ενδοκυττώνεται και αποδομείται σε αμινοξέα, έτσι ώστε τελικά μόνο 50-150 mg αλβουμίνης να αποβάλλονται με τα ούρα καθημερινά.

Στο νεφρωσικό σύνδρομο το ποσό των πρωτεϊνών που φθάνει στο εγγύς σωληνάριο αυξάνεται 100 φορές, 80% δε των διηθούμενων πρωτεϊνών είναι αλβουμίνη. Το εγγύς εσπειραμένο σωληνάριο αναγκάζεται να επαναρροφήσει ποσό αλβουμίνης που ξεπερνά τις δυνατότητες του με αποτέλεσμα λύση των λυσοσωματίων, απελευθέρωση λυσοσωματικών ενζύμων και κινητοποίηση παραγόντων φλεγμονής. Πειραματικά μοντέλα απέδειξαν ότι η έκθεση των σωληναριακών κυττάρων σε φορτίο αλβουμίνης επάγει την έκφραση χημειοτακτικών παραγόντων, όπως MCP-1 (Monocyte Chemoattractant Protein-1), TGF (Tumor Growth Factor) και ενδοθηλίνης, οι οποίοι με τη σειρά τους κινητοποιούν διαδικασίες φλεγμονής και ίνωσης στο σωληναριοδιάμεσο ιστό (86,87).



Πειράματα σε σωληναριακά κύτταρα κουνελιού έδειξαν ότι η HDL προσλαμβάνεται και αποικοδομείται στο εγγύς εσπειραμένο σωληνάριο κατά τρόπο όμοιο με την αλβουμίνη (88). Δεν υπάρχουν μελέτες για την LDL που αποβάλλεται στα ούρα. Πάντως σε ιστοκαλλιέργειες φαίνεται ότι τα κύτταρα του εγγύς εσπειραμένου σωληναρίου έχουν τη δυνατότητα να οξειδώνουν την LDL, γεγονός που μπορεί να οδηγήσει στον τραυματισμό και φλεγμονή του σωληναρίου (87).

B. ΙΣΤΟΛΟΓΙΚΟΙ ΤΥΠΟΙ ΣΠΕΙΡΑΜΑΤΟΝΕΦΡΙΤΙΔΩΝ ΠΟΥ ΕΚΔΗΛΩΝΟΝΤΑΙ ΚΛΙΝΙΚΑ ΜΕ ΝΕΦΡΩΣΙΚΟ ΣΥΝΔΡΟΜΟ

Η συνηθέστερη ταξινόμηση των σπειραματοπαθειών που εκδηλώνονται κλινικά ως νεφρωσικό σύνδρομο γίνεται με ιστολογικά κριτήρια, στηρίζεται δηλαδή στα χαρακτηριστικά της σπειραματικής βλάβης, όπως αυτά εμφανίζονται στο κοινό μικροσκόπιο (πίνακας 2). Η σχετική συχνότητα των διαφόρων τύπων σπειραματονεφριτίδων ποικίλει και εξαρτάται από πολλούς παράγοντες, όπως η ηλικία των ασθενών, η κοινωνικο-οικονομική κατάσταση, η γεωγραφική κατανομή, οι ενδείξεις για βιοψία νεφρού κλπ. Υπάρχει σαφώς διαφορετική κατανομή των σπειραματονεφριτίδων στις ηλικιακές ομάδες. Για παράδειγμα η πιο συχνή σπειραματονεφρίτιδα σε παιδιά προσχολικής ηλικίας είναι η νόσος των ελαχίστων αλλοιώσεων, ενώ σε ενήλικες >60 ετών η συχνότερη είναι η μεμβρανώδης (πίνακας 3)



Πίνακας 2 .Ταξινόμηση σπειραματονεφριτίδων (ιστολογική)

1.Νόσος ελαχίστων αλλοιώσεων
2.Μεσαγγειοϋπερπλαστική
3.Εστιακή σπειραματοσκλήρυνση
4.Μεμβρανώδης
5.Μεσαγγειοτριχοειδική (ή μεμβρανοϋπερπλαστική)
Τύπου I : με υποενδοθηλιακές εναποθέσεις
Τύπου II : με ενδομεμβρανικές πυκνές εναποθέσεις
Τύπου III : με παραλλαγές των δύο άλλων τύπων
6.Ενδοτριχοειδική υπερπλαστική

Πίνακας 3. Ηλικιακή κατανομή των σπειραματονεφριτίδων

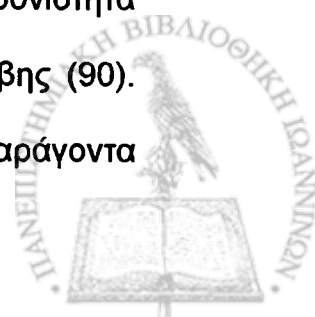
Σπειραματονεφρίτιδα	<15ετών	15-29ετών	30-49ετών	>50ετών
Νόσος ελαχίστων αλλοιώσεων	83	31	30	23
Εστιακή σπειραματοσκλήρυνση	8	22	9	12
Μεμβρανώδης	1	5	32	34
Μεσαγγειοτριχοειδική	5	21	8	8
Λοιπές(πχ ενδοτριχοειδική)	3	21	21	21



1) Παθογένεια

Ο μηχανισμός βλάβης του σπειράματος είναι κατά βάση ανοσολογικός (89,90). Το αντιγόνο-το οποίο μπορεί να είναι γνωστό, όπως ένας αριθμός διαφορετικών συστατικών του στρεπτόκοκκου της ομάδας A που προκαλεί μεταλοιμώδη σπειραματονεφρίτιδα, ή άγνωστο-προκαλεί την ανοσολογική απάντηση του οργανισμού. Η ανοσολογική αυτή απάντηση είναι κυρίως η δημιουργία IgG αντισωμάτων. Τα αντισώματα αυτά δημιουργούν ανοσοσυμπλέγματα με το αντιγόνο με τρεις τρόπους : α) άμεση σύνδεση του αντισώματος με αντιγόνο του σπειράματος π.χ σύνδρομο Goodpasture β) δημιουργία του ανοσοσυμπλέγματος στην κυκλοφορία και παγίδευση στο σπείραμα γ) το αντιγόνο παγιδεύεται στο σπείραμα και *in situ* δημιουργείται ανοσοσύμπλεγμα. Το ανοσοσύμπλεγμα ενεργοποιεί το συμπλήρωμα και αυτό με τη σειρά του τα πολυμορφοπύρρηνα και τα μακροφάγα που κινητοποιούνται στο σπείραμα. Το συμπλήρωμα (ιδίως το κλάσμα C5b9), τα κύτταρα της φλεγμονής και τα T-λεμφοκύτταρα παράγουν κυττοκίνες (ιντερλευκίνη-1 και TNF), μόρια προσκόλλησης (ICAM, VCAM), growth factors (PDGF, TGFβ), πρωτεάσες, ρίζες οξυγόνου και αγγειοδιασταλτικά μόρια (μονοξειδίο του αζώτου, προσταγλανδίνες, ενδοθηλίνη). Όλοι αυτοί οι μεσολαβητές της φλεγμονής προκαλούν τραυματισμό των επιθηλιακών κυττάρων, των ενδοθηλιακών και του μεσαγγείου με αποτέλεσμα δομικές αλλαγές του σπειράματος και κλινική εκδήλωση της σπειραματονεφρίτιδας.

Τέλος επισημαίνεται η σημασία της σωληναριακής βλάβης στην πρόγνωση και πορεία της σπειραματονεφρίτιδας. Η έκτασή της και η χρονιότητά της αποτελούν κακό προγνωστικό παράγοντα στην εξέλιξη της βλάβης (90). Επιπλέον η ίδια η λευκωματουρία αποτελεί ανεξάρτητο παράγοντα



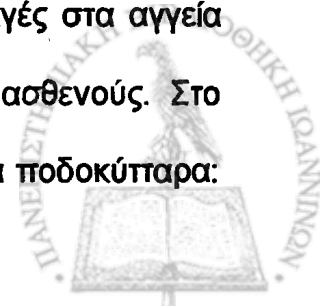
σπειραματικής βλάβης γιατί όχι μόνο προάγει μέσω ποικίλων μηχανισμών τη σπειραματοσκλήρυνση, αλλά και προκαλεί βλάβη στα σωληναριακά κύτταρα και φλεγμονή του διάμεσου ιστού (92).

Στη συνέχεια περιγράφονται τα κυριότερα χαρακτηριστικά των συχνότερων σπειραματονεφριτίδων.

2) Νόσος ελαχίστων αλλοιώσεων

Η σπειραματονεφρίτιδα αυτή ονομάστηκε έτσι γιατί στο κοινό μικροσκόπιο η σπειραματική μεμβράνη φαίνεται άθικτη. Αποτελεί τη συχνότερη σπειραματονεφρίτιδα των παιδιών (80%) με αιχμή εμφάνισης στις ηλικίες 2-6 ετών. Σπάνια αποτελεί δευτεροπαθή νεφρική προσβολή συστηματικότερης νόσου, όπως Hodgkin και non-Hodgkin λεμφώματα, όγκοι συμπαγών οργάνων (καρκίνωμα νεφρού, παγκρέατος, προστάτη και παχέως εντέρου).

Στο μικροσκόπιο ο παθολογοανατόμος μπορεί να δει μέτρια αύξηση των κυττάρων του μεσαγγείου, ενώ τα επιθηλιακά κύτταρα μπορεί να δείχνουν διογκωμένα. Το τοίχωμα των τριχοειδών είναι λεπτό (93). Σπάνια βρίσκονται περιοχές με σκλήρυνση, εύρημα κακής προγνωστικής αξίας. Τα εγγύς εσπειραμένα σωληνάκια περιέχουν συχνά σταγόνες λιπιδίων, ενώ σπάνια μπορεί να βρεθούν εστιακά περιοχές με ατροφία σωληναρίων, παχυσμένη βασική μεμβράνη σωληναρίων και διάμεση νεφρίτιδα. Αν τέτοιες περιοχές είναι πολλαπλές και εκτεταμένες θα πρέπει να συζητηθεί διαφοροδιαγνωστικά η ύπαρξη εστιακής σπειραματοσκλήρυνσης. Σε αυτή την περίπτωση πρέπει να γίνουν επιπρόσθετες και εκτεταμένες τομές του ιστολογικού υλικού προς αναζήτηση περιοχών με αρχόμενα σκληρυντικά στοιχεία. Αλλαγές στα αγγεία δεν παρατηρούνται, παρά οι σχετιζόμενες με την ηλικία του ασθενούς. Στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο αναγνωρίζονται οι βασικές βλάβες στα ποδοκύτταρα:



οίδημα των ποδίσκων και εξαφάνιση της μεμβράνης της διηθητικής σχισμής. Η βασική μεμβράνη παραμένει άθικτη, ενώ συχνά παρατηρούνται συσσωρεύσεις αιμοπεταλίων και ινική στον αυλό των τριχοειδών. Ανοσοϊστοχημικά δεν υπάρχει συνήθως καμία εναπόθεση ανοσοσφαιρίνης ή συμπληρώματος. Επισημαίνεται η δυσκολία διαφοροδιάγνωσης μεταξύ αρχόμενης εστιακής σπειραματοσκλήρυνσης και νόσου ελαχίστων αλλοιώσεων στηριζόμενοι αποκλειστικά σε λιγοστές τομές βιοπτικού υλικού σε ασθενή με αρχόμενο νεφρωσικό σύνδρομο (94). Η ανθεκτικότητα της πρωτεϊνουρίας στη χορήγηση κορτικοστεροειδών αποτελεί ένδειξη νέας βιοψίας και πιθανότατα αλλαγή της αρχικής διάγνωσης.

Πορεία : Η νόσος χαρακτηρίζεται από υφέσεις-εξάρσεις και μεγάλη ευαισθησία στα κορτικοστεροειδή. Αυτόματες υφέσεις περιγράφονται στο 50% των ασθενών, αν και το πραγματικό ποσοστό είναι δύσκολο να υπολογισθεί αφού οι περισσότεροι ασθενείς λαμβάνουν εξαρχής κορτιζόνη. Η νόσος ακολουθεί συνήθως τα εξής πρότυπα : α)πλήρης ύφεση της πρωτεϊνουρίας με τη χορήγηση ενός κύκλου θεραπείας με κορτιζόνη β) ύφεση με την κορτιζόνη, αλλά <2 υποτροπές στο πρώτο εξάμηνο της ύφεσης. γ) ύφεση της πρωτεϊνουρίας, αλλά >2 υποτροπές στο πρώτο εξάμηνο της ύφεσης δ) αρχική ανταπόκριση και ακολούθως αντοχή στη θεραπεία ε) ανθεκτικότητα στην αρχική θεραπεία, αλλά πλήρης ύφεση με το πέρας της θεραπείας στ) καμία ύφεση ζ) αυτόματη ύφεση χωρίς θεραπεία (95,96)

Θεραπεία : Στα παιδιά χορηγείται από το στόμα πρεδνιζόνη 60mg/m²/μέρα σε διαιρεμένες δόσεις, ενώ στους ενήλικες 1,5 mg/kg/ημέρα. Σε 4 εβδομάδες 90% των παιδιών απαντούν στη θεραπεία με πλήρη ύφεση της πρωτεϊνουρίας, οπότε μειώνεται και η δόση στα 35mg/m²/ημέρα σε μία δόση κάθε πρωί. Η θεραπεία συνεχίζεται για 4 ακόμη εβδομάδες μετά την πλήρη ύφεση. Πρώιμη ή



απότομη διακοπή της κορτιζόνης οδηγεί σε υποτροπή της νόσου. Οι ενήλικες απαντούν καθυστερημένα στην κορτιζόνη, μετά τις 8 εβδομάδες συνήθως και συχνά απαιτούνται θεραπείες διάρκειας 16-20 εβδομάδων. Στις υποτροπές επαναχορηγείται κορτιζόνη. Αν ωστόσο δεν παρατηρηθεί ύφεση, μπορεί να χορηγηθούν ανοσοκατασταλτικά, όπως κυκλοφωσφαμίδη ή χλωραμβουκίλη ή κυκλοσπορίνη (97).

3)Μεσαγγειοϋπερπλαστική

Η σπειραματονεφρίτιδα αυτή αποτελεί το 10% των σπειραματονεφριτίδων με ιδιοπαθές νεφρωσικό σύνδρομο. Χαρακτηρίζεται από σημαντική αύξηση της κυτταροβρίθειας του μεσαγγείου. Μικρή αύξηση των μεσαγγειακών κυττάρων παρατηρείται ιστολογικά και στη νόσο των ελαχίστων αλλοιώσεων. Το γεγονός αυτό σε συνδυασμό με την υποκειμενικότητα της μέτρησης της κυτταροβρίθειας εξηγεί την πιθανότητα να καταχωρηθεί μια τέτοια σπειραματονεφρίτιδα ως νόσος ελαχίστων αλλοιώσεων και το αντίστροφο. Η μεσαγγειοϋπερπλαστική σπειραματονεφρίτιδα που συνοδεύεται από εναποθέσεις IgA αποτελεί ιδιαίτερη νόσο που χαρακτηρίζεται ως IgA νεφροπάθεια. Τέλος, η ύπαρξη πολλών κυττάρων στο μεσάγγειο αποτελεί μη ιδιαίτερο γνώρισμα πολλών νόσων πχ ΣΕΛ (πίνακας 4)(98)



Πίνακας 4. Μεσαγγειοϋπερπλαστική σπειραματονεφρίτιδα

A.Ιδιοπαθής

IgA εναποθέσεις (IgA νεφροπάθεια)

IgM / C3 εναποθέσεις (IgM νεφροπάθεια)

Άλλες εναποθέσεις

B.Δευτεροπαθής

Αποδραμούσα μεταλοιμώδης σπειραματονεφρίτιδα

ΣΕΛ, Ρευματοειδής αρθρίτιδα, αγκυλοποιητική σπονδυλίτιδα

Αλκοολική και πρωτοπαθής χολική κίρρωση

Φλεγμονώδεις νόσοι του εντέρου

Σαρκοείδωση, ιδιοπαθής πνευμονική αιμοσιδήρωση, κυστική ίνωση

Ψωρίαση

Καρκίνωμα πνεύμονα, λάρυγγα και παγκρέατος

Henoch-Schonlein πορφύρα

Σύνδρομο Alport

Σύνδρομο Goodpasture

πενικιλλαμίνη

Στο κοινό μικροσκόπιο, εκτός της κυτταροβρίθειας του μεσαγγείου δεν παρατηρείται άλλη σημαντική βλάβη των αγγείων, του διάμεσου ιστού ή της σπειραματικής μεμβράνης. Στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο ιδιαίτερο εύρημα αποτελεί η ύπαρξη κοκκιωδών και ομοιογενών εναποθέσεων στο μεσάγγειο που πιστεύεται ότι είναι IgM. Οι ποδίσκοι των ποδοκυττάρων είναι οιδηματώδεις και περιστασιακά φαίνεται να αποχωρίζονται από το κυτταρόπλασμα. Πάχυνση και ασυνέχεια της βασικής μεμβράνης παρατηρείται σε μερικές βιοψίες. Ανοσοϊστοχημικά παρατηρούνται εναποθέσεις IgM στο μεσάγγειο και στο



τοίχωμα των αγγείων. Οι εναποθέσεις αυτές ίσως διαδραματίζουν βασικό ρόλο στην παθογένεση της σπειραματοπάθειας. Μπορεί επίσης να παρατηρηθούν εναποθέσεις IgG, C3 ή και καθόλου εναποθέσεις.

Θεραπευτικά δίνεται κορτιζόνη, ειδικά όταν υπάρχουν εναποθέσεις IgM και C3. Σε περίπτωση που η πρωτεϊνουρία επιμένει, έχουν δοκιμασθεί διάφορα ανοσοκατασταλτικά φάρμακα.

Ειδικότερα για την IgA νεφροπάθεια, αποτελεί τη συχνότερη ιδιοπαθή σπειραματοπάθεια. Συνήθως οι ασθενείς εμφανίζουν επεισόδια μακροσκοπικής αιματουρίας μετά από λοίμωξη του αναπνευστικού ή μικροσκοπική αιματουρία και πρωτεϊνουρία σε τυχαίο έλεγχο. Περίπου 20% των ασθενών εμφανίζονται με σοβαρή νεφρική ανεπάρκεια και 15-40% του συνόλου των ασθενών καταλήγει σε χρόνια νεφρική ανεπάρκεια (99). Κακοί προγνωστικοί παράγοντες είναι: η πρωτεϊνουρία >1 g/μέρα, η αρτηριακή υπέρταση, η έκπτωση της νεφρικής λειτουργίας και η παρουσία διαμεσοσωληναριακής βλάβης στη βιοψία νεφρού (100). Θεραπευτικά η χορήγηση κορτιζόνης μειώνει μέχρι 50% την πρωτεϊνουρία και την πιθανότητα επιδείνωσης της νεφρικής λειτουργίας (101). Μετα-ανάλυση 4 μελετών που χορήγησαν ω -3 πολυακόρεστα λιπαρά οξέα, έδειξε όφελος ως προς τη διατήρηση σταθερής της νεφρικής λειτουργίας σε ποσοστό 75% (102).

4)Εστιακή και τμηματική σπειραματοσκλήρυνση

Η συχνότητα της σπειραματονεφρίτιδας αυτής στους ενήλικες με ιδιοπαθές νεφρωσικό σύνδρομο είναι 15-20%, ενώ στα παιδιά είναι 7-15%. Στους μαύρους η επίπτωση της νόσου είναι διπλάσια από ότι στους λευκούς. Χαρακτηριστικό γνώρισμα της νόσου αποτελεί η κακή ανταπόκριση στη θεραπεία, η γρήγορη επιδείνωση της νεφρικής λειτουργίας και η αρτηριακή



υπέρταση (103). Πλην της ιδιοπαθούς εστιακής σπειραματοσκλήρυνσης, ποικιλία νόσων εκδηλώνεται με εμφάνιση σκληρυντικών αλλοιώσεων στο νεφρό (πίνακας 5).

Πίνακας 5. Εστιακή και τμηματική σπειραματοσκλήρυνση

A.Ιδιοπαθής

B.Δευτεροπαθής

Κατάχρηση αναλγητικών

HIV νεφροπάθεια

Χρήση ηρωίνης

Δρεπανοκυτταρική αναιμία

Σύνδρομο Alport

Κακοήθεια(λέμφωμα, λευχαιμία, καρκίνωμα)

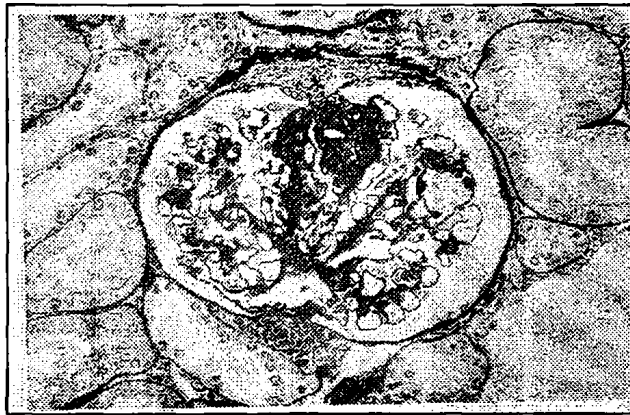
Σαρκοείδωση

Χρόνια απόρριψη μοσχεύματος

Στο κοινό μικροσκόπιο οι βλάβες αφορούν μικρό αριθμό σπειραμάτων, ιδίως στη φλοιομυελώδη μοίρα, και τμήμα του σπειράματος. Πολλά σπειράματα παραμένουν άθικτα ή εμφανίζουν απλά μεσαγγειακή υπερπλασία. Η σκλήρυνση αφορά τον αγγειακό ή τον ουροφόρο πόλο του σπειράματος και ιστολογικά περιγράφει την αύξηση της μεσαγγείου ουσίας και της βασικής μεμβράνης. Μια χαρακτηριστική ζώνη (άλως) οριοθετεί την περιοχή σκλήρυνσης από τη βασική μεμβράνη (104) [σχήμα 5]. Εναποθέσεις πρωτεΐνης (υαλίνωση) παρατηρούνται στον υποενδοθηλιακό χώρο με λιποειδή έγκλειστα. Τα σωληνάρια συχνά εμφανίζουν ατροφία και σκλήρυνση. Στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σχεδόν όλα τα σπειράματα έχουν διάχυτα ή τμηματικά βλάβες στα ποδοκύτταρα και μεσαγγειακή υπερπλασία. Στα σπειράματα με τις αλλοιώσεις στο κοινό



μικροσκόπιο στα αρχικά στάδια παρατηρούνται ενδοτριχοειδικά και μεσαγγειακά αφοκύτταρα με συνοδό αύξηση της μεσαγγείου ουσίας. Τα αφοκύτταρα στη συνέχεια υφίστανται αποσύνθεση και ό,τι απομένει από το κυτταρόπλασμα τους ενσωματώνεται στα τριχοειδή και περιχαρακώνεται από τμήματα της βασικής μεμβράνης. Στη φάση αυτή παρατηρούνται επίσης πολλές εναποθέσεις. Ανοσοϊστοχημικά οι εναποθέσεις αυτές είναι κυρίως IgM, C3, C1q και σπανιότερα IgA και IgG.



Σχήμα 5. Εστιακή τμηματική σπειραματοσκλήρυνση. Διακρίνεται η σκληρυντική περιοχή του σπειράματος που συμφύεται με την κάψα. (χρώση PAS-μεθENAμίνης)

Θεραπευτικά χορηγούνται κορτικοστεροειδή, όπως και στη νόσο ελαχίστων αλλοιώσεων. Περίπου 50% ασθενών εμφανίζουν ύφεση της πρωτεϊνουρίας 5-9 μήνες μετά την έναρξη θεραπείας με κορτιζόνη σε δόση 1mg/kg/ημέρα (105). Ανθεκτικοί στα στεροειδή θεωρούνται οι ασθενείς που εξακολουθούν να εμφανίζουν νεφρωσικού τύπου πρωτεϊνουρία μετά 4 μήνες θεραπεία με κορτιζόνη. Σε αυτούς τους ασθενείς οι εναλλακτικές θεραπείες είναι απογοητευτικές. Μπορεί να χορηγηθεί κυκλοφωσφαμίδη (1-2 mg/kg/ημέρα), αλλά στις περισσότερες μελέτες πέτυχαν ύφεση της πρωτεϊνουρίας σε ποσοστό <20%. Η μοφετίλ μυκοφαινολάτη(Cellcept) είναι ένα νέο ανοσοκατασταλτικό που έχει δοθεί σε περιορισμένο αριθμό ασθενών με καλή ανταπόκριση της

πρωτεϊνουρίας και της έκπτωσης της νεφρικής λειτουργίας, χωρίς όμως σημαντικά ποσοστά πλήρους ύφεσης (106). Σε πολλές προοπτικές μελέτες έχει δοκιμασθεί η κυκλοσπορίνη, και παρότι τα ποσοστά πλήρους ύφεσης παραμένουν χαμηλά (20%), η διατήρηση σταθερής νεφρικής λειτουργίας είναι σημαντικά υψηλή (>50%) συγκρινόμενη με το placebo. Στους ασθενείς που εμφανίζουν πλήρη ύφεση με την κορτιζόνη και υποτροπιάζουν, μπορεί να χορηγηθεί συνδυασμός κορτιζόνης και κυτταροστατικού (ειδικά κυκλοσπορίνης) για 2-3 μήνες με καλά αποτελέσματα (75% ύφεση). Έχει επίσης δοκιμασθεί η πλασμαφαίρεση (σε συνδυασμό με ανοσοκατασταλτική αγωγή) με αντικρουόμενα αποτελέσματα. Όπως σε κάθε σπειραματοπάθεια έτσι και εδώ σημαντικό ρόλο στην πορεία της νόσου παίζουν η καλή ρύθμιση της αρτηριακής πίεσης και η χρήση των αναστολέων του μετατρεπτικού ενζύμου.

Οι ασθενείς με εστιακή σπειραματοσκλήρυνση που δεν ανταποκρίνονται στη θεραπεία καταλήγουν σε τελικό στάδιο χρόνιας νεφρικής ανεπάρκειας (ΧΝΑ) σε 6-8 έτη. Όσοι εμφανίζουν βαριά πρωτεϊνουρία (>10 g/ημέρα), καταλήγουν σε τελικό στάδιο ΧΝΑ νωρίτερα (3 χρόνια). Η εμφάνιση ύφεσης της πρωτεϊνουρίας αποτελεί καλό προγνωστικό παράγοντα (<15% θα εμφανίσουν τελικό στάδιο ΧΝΑ) (105).

5)Μεμβρανώδης σπειραματονεφρίτιδα

Η σπειραματοπάθεια αυτή ονομάστηκε έτσι από τη χαρακτηριστική διάχυτη πάχυνση του τοιχώματος των τριχοειδών. Πολλές νόσοι με νεφρική προσβολή εμφανίζουν ίδια ιστολογική εικόνα με την ιδιοπαθή μεμβρανώδη σπειραματονεφρίτιδα (πίνακας 6)



Πίνακας 6. Μεμβρανώδης σπειραματονεφρίτιδα

A Ιδιοπαθής

B Δευτεροπαθής

Λοιμώξεις : ηπατίτιδα Β, σύφιλη, λέπτρα, σχιστοσωμίαση, φιλαρίαση, μεταστρεπτοκοκκική σπειραματονεφρίτιδα

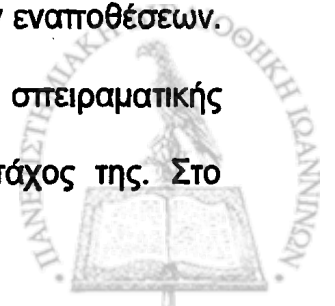
Αυτοάνοσα : συστηματικός ερυθηματώδης λύκος, ρευματοειδής αρθρίτιδα, μικτή νόσος συνδετικού ιστού, δερματομυοσίτιδα, σαρκοείδωση, σύνδρομο Sjogren

Νεοπλάσματα : καρκίνωμα πνεύμονα-παχέως εντέρου-μαστού-στομάχου, λέμφωμα και λευχαιμία

Φάρμακα : χρυσός, D-πενικιλλαμίνη, προβενεσίδη

Μεταβολικά : θυρεοειδίτιδα, δρεπανοκυτταρική αναιμία

Στο κοινό μικροσκόπιο χαρακτηριστική είναι η πάχυνση του τοιχώματος του τριχοειδούς, χωρίς σημαντική υπερπλασία του μεσαγγείου ή των επιθηλιακών κυττάρων. Με ειδικές χρώσεις μπορεί να φανούν οι χαρακτηριστικές ακίδες (spikes), προσεκβολές της βασικής μεμβράνης προς τον ουροφόρο χώρο. Διάμεση ίνωση και ατροφία των σωληναρίων παρατηρείται σε άλλοτε άλλη έκταση. Στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο οι βλάβες είναι αποκαλυπτικές της προόδου της νόσου. Στο στάδιο I η σπειραματική μεμβράνη φαίνεται άθικτη, αλλά πολύ μικρές υποεπιθηλιακές εναποθέσεις εμφανίζονται στο επίπεδο της μεμβράνης της διηθητικής σχισμής. Στο στάδιο II, διακρίνονται οι προσεκβολές της βασικής μεμβράνης μεταξύ των εναποθέσεων. Αυτό δίνει μια ανώμαλη εικόνα της επιθηλιακής πλευράς της σπειραματικής μεμβράνης, η οποία όμως διατηρεί ακόμη φυσιολογικό το πάχος της. Στο



στάδιο III, οι προσεκβολές περικυκλώνουν τις ολοένα αυξανόμενες εναποθέσεις και αποδιοργανώνουν πλήρως τους ποδίσκους. Στο στάδιο IV, οι προσεκβολές περιχαρακώνουν πλήρως τους ποδίσκους και δημιουργούν μία εικόνα που μοιάζει με «ελβετικό τυρί». Ανοσοϊστοχημικά βρίσκουμε εναποθέσεις IgG και λιγότερο συχνά C3 στα τριχοειδή και όχι στο μεσάγγειο (107).

Η νόσος χαρακτηρίζεται από υφέσεις και εξάρσεις της πρωτεϊνουρίας. Οι αυτόματες υφέσεις εμφανίζονται στο 30% των ασθενών, ενώ 30% επιπλέον των ασθενών εμφανίζουν μερική ύφεση (πρωτεϊνουρία <2 g/ημέρα και >200 mg/ημέρα με σταθερή νεφρική λειτουργία). 30% των ασθενών καταλήγει σε νεφρική ανεπάρκεια, ενώ το υπόλοιπο 10% πεθαίνει από μη νεφρικά αίτια (108). Η ανασκόπηση των περισσότερων μελετών έδειξε δεκαετή νεφρική επιβίωση στο 70-90% των ασθενών (109). Βάσει αυτών των δεδομένων, η απόφαση χορήγησης θεραπείας πρέπει να βασίζεται στο κατά πόσο ο ασθενής κινδυνεύει να χάσει νεφρική λειτουργία τα επόμενα έτη (110). Χαμηλού κινδύνου ασθενείς θεωρούνται αυτοί που έχουν φυσιολογική νεφρική λειτουργία και πρωτεϊνουρία ως 3,5 g/24ωρο για 6 μήνες τουλάχιστον και κατά κανόνα δε χρειάζεται να λάβουν ανοσοκατασταλτική αγωγή. Θεραπευτικά βέβαια φροντίζουμε να διατηρούμε χαμηλή την αρτηριακή πίεση ($<130/80$ mmHg) και χορηγούμε αναστολείς του μετατρεπτικού ενζύμου. Οι ασθενείς μεσαίου κινδύνου είναι αυτοί με φυσιολογική νεφρική λειτουργία και πρωτεϊνουρία από 3,5 ως 6 g/24ωρο. Οι μελέτες έχουν αποδείξει σημαντική μείωση της πρωτεϊνουρίας και αύξηση της νεφρικής επιβίωσης σε αυτούς τους ασθενείς με τη χορήγηση ανοσοκατασταλτικών κα τα το σχήμα Ponticelli. Η θεραπεία αυτή έγκειται στη χορήγηση κορτιζόνης εναλλάξ ανά μήνα (1 γραμμάριο ενδοφλέβια τις 3 πρώτες ημέρες του μήνα και ακολούθως 0,5mg/kg/ημέρα κορτιζόνη από το στόμα τις επόμενες μέρες του μήνα) με χλωραμβουκίλη (0,2mg/kg/ημέρα) για 6



μήνες (111). Έχουν δοκιμασθεί επιτυχώς και άλλα κυτταροτοξικά πλην της χλωραμβουκίλης, όπως κυκλοφωσφαμίδη και κυκλοσπορίνη. Υψηλού κινδύνου ασθενείς είναι αυτοί με έκπτωση νεφρικής λειτουργίας ή/και εμμένουσα πρωτεϊνουρία >8 g/24ωρο. Στους ασθενείς αυτούς δε φαίνεται να αποδίδει ούτε η χορήγηση κυκλοσπορίνης ούτε η χορήγηση κορτιζόνης (112).

Διαβητική νεφροπάθεια

Αποτελεί σε πολλές χώρες τη συχνότερη αιτία τελικού σταδίου χρόνιας νεφρικής ανεπάρκειας. Η αυξανόμενη επίπτωσή της την τελευταία δεκαετία οδήγησε πολλούς να τη χαρακτηρίσουν ως «σιωπηλή επιδημία» (113). Η διαβητική νεφροπάθεια αφορά 30-40% των ασθενών με σακχαρώδη διαβήτη τύπου 1, ενώ τα ποσοστά για το σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2 εξαρτώνται κύρια από τη φυλή (5-90%). Δεδομένου όμως ότι η μεγάλη πλειοψηφία των διαβητικών είναι τύπου 2, η διαβητική νεφροπάθεια αφορά κύρια αυτούς τους ασθενείς.

Κλινικά η πορεία της νεφροπάθειας διακρίνεται σε πέντε στάδια:

I) ο ρυθμός σπειραματικής διήθησης είναι αυξημένος και διαλείπουσα μικροαλβουμινουρία μπορεί να επισημανθεί. Ιστολογικά χαρακτηρίζεται από υπερτροφία των σπειραμάτων και αύξηση των διαστάσεων του ορού.

II) ο ρυθμός σπειραματικής διήθησης παραμένει υψηλός και μικροαλβουμινουρία εμφανίζεται μετά από άσκηση. Το στάδιο αυτό διαπιστώνεται 1,5-5 χρόνια μετά τη διάγνωση της νόσου και ιστολογικά χαρακτηρίζεται από πάχυνση της βασικής μεμβράνης και διευρυσμένο μεσάγγειο.

III) ο ρυθμός σπειραματικής διήθησης είναι υψηλός, η μικροαλβουμινουρία αποτελεί σταθερό εύρημα και εμφανίζεται και αρτηριακή



υπέρταση. Διαπιστώνεται 5-15 χρόνια μετά τη διάγνωση και ιστολογικά διακρίνουμε περαιτέρω πάχυνση της βασικής μεμβράνης.

IV) ο ρυθμός σπειραματικής διήθησης μειώνεται σταθερά 5-10ml/min/έτος και η αλβουμινουρία ξεπερνά τα 500mg/24ωρο. Εμφανίζεται 10-20χρόνια από τη διάγνωση και ιστολογικά έχουμε διάχυτη ή οζώδη σπειραματοσκλήρυνση. Η τελευταία χαρακτηρίζεται από περιοχές μεσαγγειακής υπερπλασίας με παράλληλη ανάπτυξη ινδοειδών όζων που συνθλίβουν τα παρακείμενα σπειράματα (όζοι Kimmelstiel-Wilson).

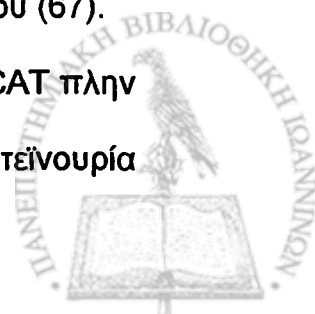
V) είναι το τελικό στάδιο χρόνιας νεφρικής ανεπάρκειας (114).

Η καλή ρύθμιση του σακχάρου, η διατήρηση της αρτηριακής πίεσης σε επίπεδα 125/75 mmHg ανεξαρτήτως του είδους της αγωγής, η διακοπή του καπνίσματος και η αντιμετώπιση της υπερλιπιδαιμίας αποτελούν βασικές παρεμβάσεις για την πρωτοπαθή πρόληψη της εξέλιξης της διαβητικής νεφροπάθειας, δηλαδή στα στάδια I-III (115). Αξίζει να σημειωθεί η υπεροχή των αναστολέων του μετατρεπτικού ενζύμου στη μείωση της λευκωματουρίας και στη νεφροπροστασία στο σακχαρώδη διαβήτη τύπου I καθώς και των νεότερων ανταγωνιστών των υποδοχέων AT1 της αγγειοτενσίνης II.

III.ΛΙΠΟΠΡΩΤΕΙΝΕΣ ΚΑΙ ΝΕΦΡΙΚΟΣ ΙΣΤΟΣ

Η μεγάλη προοπτικού τύπου μελέτη των Samuelsson και συν απέδειξε ότι η δυσλιπιδαιμία των ασθενών με χρόνια νεφρική ανεπάρκεια επιδεινώνει την εξέλιξη της νεφρικής βλάβης. Μάλιστα η επιδείνωση αυτή συσχετίζεται με τα επίπεδα της LDL χοληστερόλης και των apo(B) λιποπρωτεϊνών του ορού (67).

Είναι επίσης γνωστό ότι άτομα με συγγενή έλλειψη του ενζύμου LCAT πλην της δυσλιπιδαιμίας που εμφανίζουν στον ορό τους, αναπτύσσουν πρωτεϊνουρία



και χρόνια νεφρική ανεπάρκεια. Η μελέτη των νεφρικών βιοψιών των ασθενών αυτών έδειξε εναποθέσεις λιπιδίων (lipid droplets) στα σπειράματα, ιδίως στις περιοχές με σκλήρυνση (116).

Πολλές ανοσοϊστοχημικές μελέτες σε βιοψίες νεφρών πειραματοζώων και ανθρώπων με σπειραματοπάθεια απέδειξαν καθήλωση λιποπρωτεϊνών στα σπειράματα. In vitro μελέτες προσπάθησαν να εξηγήσουν την πιθανή συσχέτιση των εναποθέσεων αυτών με μηχανισμούς που προάγουν τη σκλήρυνση του σπειράματος, χωρίς ωστόσο να έχει ακόμη διευκρινισθεί αν οι λιποπρωτεϊνικές εναποθέσεις είναι η αιτία ή το αποτέλεσμα της σκλήρυνσης (117).

A) ΛΙΠΟΠΡΩΤΕΪΝΕΣ ΚΑΙ ΣΠΕΙΡΑΜΑ

Ανοσοϊστοχημικά έχουν βρεθεί σε βιοψίες νεφρικού ιστού ανθρώπων με σπειραματοπάθεια εναποθέσεις λιποπρωτεϊνών, όπως ApoB των LDL και VLDL, Apo(a) της Lp(a), ApoE. Από την άλλη πλευρά δεν έχουν βρεθεί εναποθέσεις ApoB, ApoE και Apo(a) σε φυσιολογικούς νεφρούς. Εναποθέσεις ApoAI έχουν ανιχνευθεί τόσο σε υγιή ιστό όσο και σε μη σκληρωσμένες περιοχές σπειραμάτων από ασθενείς με σπειραματονεφρίτιδα. Οι εναποθέσεις ApoB και ApoE αφορούν κυρίως το μεσάγγειο ασθενών με σπειραματονεφρίτιδα (εκτός από τη νόσο των ελαχίστων αλλοιώσεων), ειδικότερα δε περιοχές με υπερπλασία και σκλήρυνση. Συσχετίζονται με το βαθμό της πρωτεϊνουρίας και της υποαλβουμιναιμίας ενώ δεν έχουν συσχέτιση με τα επίπεδα ολικής χοληστερόλης, apoB και apoE στον ορό. Οι εναποθέσεις Apo(a) αφορούν το μεσάγγειο ασθενών με διάφορες σπειραματονεφρίτιδες, είναι δε εντονότερες σε ασθενείς με σημαντική πρωτεϊνουρία, υποαλβουμιναιμία και αυξημένα επίπεδα Lp(a) ορού (118-121).



Καλλιέργειες επιθηλιακών κυττάρων και ινοβλαστών σπειραμάτων από ανθρώπους με νεφρωσικό σύνδρομο έδειξαν ότι τα κύτταρα αυτά ενώνονται και ενδοκυττώνουν αροΒ λιποπρωτεΐνες μέσω έκφρασης υποδοχέων με ταυτόχρονη καταστολή της σύνθεσης στερολών και ενεργοποίησης σύνθεσης εστέρων χοληστερόλης. Η ύπαρξη LDL-υποδοχέων στο μεσάγγειο ασθενών με σπειραματονεφρίδα ταυτοποιήθηκε αργότερα με ανοσοϊστοχημεία. Μάλιστα οι εναποθέσεις αυτές συμβάδιζαν με τις εναποθέσεις ΑροΒ και συσχετιζόνταν με το βαθμό πρωτεϊνουρίας. Δεν έχουν βρεθεί εναποθέσεις σε υγιή ιστό. Επίσης στους ίδιους ασθενείς ανιχνεύθηκαν εναποθέσεις scavenger υποδοχέων σε υπερπλαστικές περιοχές των σπειραμάτων (122,123).

Τέλος οξειδωμένη LDL βρέθηκε σε σκληρυντικές περιοχές σπειραμάτων και στο μεσάγγειο μαζί με εναποθέσεις ΑροΒ (122).

Β)ΣΠΕΙΡΑΜΑΤΟΣΚΛΗΡΥΝΣΗ ΚΑΙ ΑΘΗΡΟΣΚΛΗΡΥΝΣΗ

Η διαδικασία της σπειραματοσκληρύωσης παρουσιάζει πολλά κοινά σημεία με την αθηροσκληρύωση : προσκόλληση των μονοκυττάρων στα ενδοθηλιακά κύτταρα των σπειραματικών τριχοειδών, διήθηση του μεσαγγείου από μονοκύτταρα και πολλαπλασιασμός των μεσαγγειακών κυττάρων, δημιουργία αφρωδών κυττάρων (124,125).

Τα μεσαγγειακά κύτταρα σε καλλιέργειες προσλαμβάνουν LDL, η οποία ενεργοποιεί τον πολλαπλασιασμό τους με τους εξής μηχανισμούς (127):

- i. Έκφραση των ογκογονιδίων c-fos και c-jun
- ii. Έκφραση του m-RNA των A και B αλυσίδων του PDGF(platelet derived growth factor) στα μεσαγγειακά κύτταρα
- iii. Διέγερση σύνθεσης ινονεκτίνης (fibronectin) μέσω PDGF και TGF-β



iv. Ενεργοποίηση του χημειοτακτικού παράγοντα των μονοκυττάρων MCP-1

Τα τελευταία χρόνια οι μελέτες στράφηκαν στη πρόσληψη και τροποποίηση της LDL από μεσαγγειακά κύτταρα ανθρώπου. Φαίνεται ότι τα τελευταία σε αντίθεση με τα επιθηλιακά κύτταρα οξειδώνουν την LDL η οποία προκαλεί την προσκόλληση και διήθηση του μεσαγγείου από τα μονοκύτταρα. Για παράδειγμα πρόσφατα αποδείχθηκε ότι η οξειδωμένη LDL προάγει μέσω της κινάσης της τυροσίνης (PTK) την έκφραση του m-RNA του ICAM-1 (διακυτταρικό μόριο πρόσληψης-1) στο ενδοθήλιο των σπειραμάτων. Η οξειδωμένη LDL προσλαμβάνεται μέσω των scavenger υποδοχέων από μακροφάγα που τελικά μετατρέπονται σε αφρώδη κύτταρα (128).

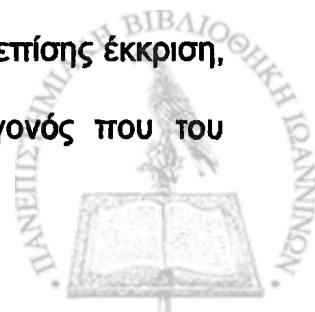
Πειράματα σε μεσαγγειακά κύτταρα επίμυων έδειξαν ότι η επώαση με VLDL οδηγεί μέσω της MCP-1 στη διήθηση του μεσαγγείου από μονοκύτταρα και μετατροπή τους σε αφρώδη κύτταρα (128).

IV. ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗΣ ΑΙΜΟΠΕΤΑΛΙΩΝ (PAF)

A. PAF ΚΑΙ ΝΕΦΡΟΣ

1) Γενικά

Ο Παράγοντας Ενεργοποίησης των Αιμοπεταλίων, PAF (Platelet Activating Factor) περιγράφηκε αρχικά σα δραστικός διαμεσολαβητής που εκκρίνεται από τα βασεόφιλα κύτταρα κουνελιού όταν υποβληθούν σε αναφυλακτικό shock (129,130). Ο παράγοντας αυτός προκαλεί επίσης έκκριση, ενεργοποίηση και συσσώρευση αιμοπεταλίων κουνελιού, γεγονός που του



έδωσε το όνομά του το 1972 (131). Η χημική του δομή ταυτοποιήθηκε αργότερα το 1979 από τους Δημόπουλος και συν ως 1-Ο-αλκυλο-2-ακετυλο-sn-γλυκερο-3-φωσφοχολίνη (132).

Ο PAF είναι μια οικογένεια φωσφολιπιδίων της χολίνης η βιολογική δραστηριότητα των οποίων εξαρτάται από το μήκος των λιπαρών αλυσίδων στη θέση 1 και 2 (486 ως 488). Η οξική ομάδα που είναι συνδεδεμένη στη δεύτερη θέση είναι υπεύθυνη για τη βιολογική δράση του μορίου.

Ο PAF υπό φυσιολογικές συνθήκες υπάρχει σε διάφορα κύτταρα σε μικρές πολλές φορές μη ανιχνεύσιμες ποσότητες. Παράγεται όμως σε μεγάλες ποσότητες όταν αυτά διεγερθούν. Η δράση του δεν περιορίζεται μόνο στο κύτταρο από το οποίο εκκρίθηκε, αλλά και σε παρακείμενα κύτταρα (ενδοκρινής και παρακρινής δράση) (133). Προκαλεί *in vitro* και *in vivo* την ενεργοποίηση διαφόρων κυττάρων σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις (10^{-10} ως 10^{-12} M) μέσω ειδικού υποδοχέα συνδεδεμένου με G-πρωτεΐνη συμμετέχοντας ως διαμεσολαβητής στις φλεγμονώδεις αντιδράσεις (134). Οι κυριότερες κυτταρικές πηγές του είναι τα βασεόφιλα κύτταρα, τα ουδετερόφιλα, τα μακροφάγα/μονοκύτταρα, τα μαστοκύτταρα, τα ηωσινόφιλα, τα αιμοπετάλια και τα ενδοθηλιακά κύτταρα (πίνακας 7).

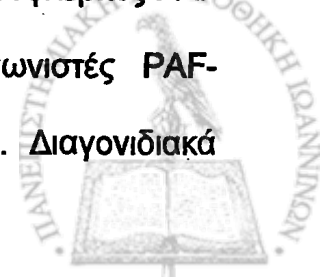


Πίνακας 7. Οι δράσεις του PAF σε διάφορα κύτταρα θηλαστικών

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

TXA₂: θρομβοξάνο A₂, PI: φωσφατιδυλοινωσίτης, LT: λευκοτριένιο, IL: ιντερλευκίνη, HETE: υδροξυεικοσατριένιο, TNF: παράγοντας νέκρωσης όγκων, PG: προσταγλανδίνη.

Οι νόσοι στην παθοφυσιολογία των οποίων έχει εμπλακεί ο PAF είναι πολλές και αφορούν κυρίως φλεγμονώδεις και αλλεργικές διεργασίες που εμπλέκουν το καρδιαγγειακό σύστημα, τον εγκέφαλο, τους πνεύμονες, το πεπτικό και αναπαραγωγικό σύστημα, τους νεφρούς, το ήπαρ και το πάγκρεας, το δέρμα και μεταμοσχευμένους ιστούς (135). Η δράση του PAF στα συστήματα αυτά μελετήθηκε κυρίως είτε με μέτρηση των επιπέδων του σε φλεγμονώδη εξιδρώματα είτε με αναστολή των επιδράσεων του χορηγώντας ανταγωνιστές υποδοχέων PAF. Πρόσφατα πειράματα σε διαγονιδιακά ποντίκια επιβεβαίωσαν το ρόλο του PAF στις φλεγμονώδεις διεργασίες. Διαγονιδιακά ποντίκια με υπερέκφραση υποδοχέων PAF εμφάνισαν πιο έντονο βρογχόσπασμο σε σύγκριση με τα άγριου τύπου ποντίκια όταν τους χορηγήθηκε ενδοφλεβίως PAF (136). Η αντίδραση μετριάστηκε όταν χορηγήθηκαν ανταγωνιστές PAF-υποδοχέων, θρομβοξάνη και αναστολείς λευκοτριενίων (137). Διαγονιδιακά



ποντίκια με έλλειψη υποδοχέων PAF ήταν πολύ λιγότερο ευαίσθητα στην πρόκληση αναφυλαξίας και στη ανάπτυξη πνευμονικής υπερευαισθησίας με εισπνοή οξέως σε σύγκριση με ποντίκια ελέγχου, αλλά παρέμειναν το ίδιο ευαίσθητα στην βακτηριακή ενδοτοξίνη (138,139).

Υπάρχουν κύρια δύο οδοί βιοσύνθεσης του PAF: α) η διαδικασία αναδιαμόρφωσης (remodelling pathway) που παρατηρείται κυρίως σε ενεργοποιημένα κύτταρα στις φλεγμονώδεις διεργασίες και β) η de novo πορεία βιοσύνθεσης που αφορά την παραγωγή PAF σε μικρές ποσότητες σε φυσιολογικές συνθήκες στα διάφορα κύτταρα. Στην πρώτη οδό βιοσύνθεσης, στον ενδοκυττάριο χώρο των ενεργοποιημένων κυττάρων μια φωσφολιπάση παρουσία ιόντων ασβεστίου υδρολύει τον εστερικό δεσμό στη θέση sn-2 παράγοντας τον Lyso-Paf και αραχιδονικό οξύ. Ο παραγόμενος Lyso-Paf είτε επανακυλιώνεται υπό την επίδραση ακυλοτρανφεράσης (140), είτε ακετυλιώνεται με τη δράση μιας ακετυλοτρανσφεράσης σχηματίζοντας PAF (141). Στη δεύτερη οδό βιοσύνθεσης, το αρχικό υπόστρωμα 1-O-αλκυλο-2-λυσω-sn-γλυκερο-3-φωσφορικό οξύ ακετυλιώνεται στη θέση sn-2 θέση με τη δράση της ακετυλοCoA-ακετυλοτρανσφεράσης παρουσία ακετυλοCoA. Στη συνέχεια με τη δράση μιας φωσφοϋδρολάσης απομακρύνεται η φωσφορική ομάδα από τη sn-3 θέση του γλυκερινικού σκελετού, ενώ με τη δράση της CDP-φωσφοχολινοτρανσφεράσης μεταφέρεται η ομάδα της φωσφοχολίνης από τη CDP-χολίνη στην 1-O-αλκυλο-2-ακετυλο-sn-γλυκερόλη (142).

Η συγκέντρωση του PAF στα κύτταρα και στους ιστούς ρυθμίζεται από τον καταβολισμό του παρά από τη βιοσύνθεσή του. Η αποικοδόμηση και απενεργοποίησή του καταλύεται από ένα μοναδικό ένζυμο την PAF-ακετυλοϋδρολάση.

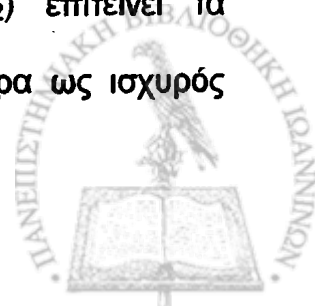


2) Ο ρόλος του PAF στην αιμοδυναμική του νεφρού

Έχει αποδειχθεί η σύνθεση PAF in vitro από απομονωμένο νεφρό (143), απομονωμένα σπειράματα, μεσαγγειακά κύτταρα σπειράματος (144), ενδοθηλιακά σπειραματικά κύτταρα (145), όχι όμως και από τα επιθηλιακά ή σωληναριακά κύτταρα (146) -πάντα μετά από ερέθισμα, όπως ισχαιμία και τοξικές ουσίες. Ο Sanchez-Crespo και συν (147) εντόπισαν στα ούρα φυσιολογικών ατόμων έναν παράγοντα ενεργοποίησης αιμοπεταλίων παρόμοιο με το συνθετικό PAF-acether με υποτασικές ιδιότητες, όταν ενίονταν σε ποντίκια. Η παρουσία PAF στο νεφρό επίμυος επιβεβαιώθηκε και με ανοσοϊστοχημικές μεθόδους (148).

Η ενδοφλέβια έγχυση PAF σε επίμυος μειώνει τη νεφρική ροή πλάσματος, το ρυθμό σπειραματικής διήθησης, την αποβολή νατρίου και την ποσότητα ούρων, λόγω προφανώς πτώσης της συστηματικής αρτηριακής πίεσης και του μειωμένου όγκου παλμού (149). Έχει αποδειχθεί άλλωστε ότι ο PAF προκαλεί υπόταση λόγω μετακίνησης πλάσματος στον διάμεσο χώρο και μείωση του όγκου παλμού λόγω απευθείας δράσης στα στεφανιαία αγγεία (150,151).

Αν ο PAF εγχυθεί σε μία νεφρική αρτηρία σκύλου ή επίμυος—για αποφυγή των συστηματικών επιδράσεων—δεν παρατηρείται πτώση αρτηριακής πίεσης και του ρυθμού σπειραματικής διήθησης (GFR) στον άλλο νεφρό. Αντιθέτως ο νεφρικός ιστός ο διηθούμενος με PAF παρουσιάζει δόσοεξαρτώμενη μείωση στη νεφρική ροή πλάσματος, στο ρυθμό σπειραματικής διήθησης, στην αποβολή νατρίου και νερού και στη ροή ούρων. Η χορήγηση αναστολέων αγγειοδιασταλτικών προσταγλανδινών (πχ PGE₂ και PGI₂) επιτείνει τα φαινόμενα αυτά. Άρα ο PAF σε ενδοαρτηριακή χορήγηση δρα ως ισχυρός



αγγειοσυσπαστικός παράγοντας (152,153). Η χορήγηση αναστολέων του PAF προλαμβάνει την εμφάνιση των φαινομένων αυτών (154).

Αντιθέτως ο Handa και συν (155) βρήκαν αύξηση της νεφρικής ροής αίματος σε bolus χορήγηση PAF σε νεφρική αρτηρία επίμυων (ο PAF δηλαδή δρούσε αγγειοδιασταλτικά), ενώ η χορήγηση PAF σε μοντέλο απομονωμένου νεφρού ποντικίου (isolated perfused rat kidney) προκαλεί δόσοεξαρτώμενη μείωση των νεφραγγειακών αντιστάσεων (156). Ο Juncos και συν(157) έδωσαν μια πιθανή εξήγηση στα αντικρουόμενα αυτά αποτελέσματα με έγχυση PAF σε προσαγωγό αρτηρίδιο σπειράματος κουνελιού. Κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι ο PAF δρα μέσω υποδοχέα αγγειοδιασταλτικά σε μικρές συγκεντρώσεις και αγγειοσυσπαστικά σε μεγαλύτερες. Η αγγειοσύσπασση μάλιστα φαίνεται να ρυθμίζεται από παράγωγα της κυκλοξυγονάσης, ενώ η αγγειοδιαστολή από το μονοξειδίο του αζώτου(NO).

Σε επίπεδο σπειραμάτων η πρόκληση ισχαιμίας συνοδεύεται από παραγωγή PAF(158), κάτι που έχει παρατηρηθεί και σε μοντέλα ισχαιμίας άλλων οργάνων. Η χορήγηση ανταγωνιστών του PAF σε πειραματόζωα με οξεία νεφρική ανεπάρκεια λόγω ισχαιμίας, προστάτεψε σημαντικά τη νεφρική λειτουργία (159-161). Φαίνεται πως στη νεφρική βλάβη που προκαλεί η ισχαιμία, το μεγαλύτερο ρόλο παίζουν τα πολυμορφοπύρρηνα που ενεργοποιούνται από τον PAF. Έτσι αν νεφροί που ισχαιμούν τοποθετηθούν σε διάλυμα επαναιμάτωσης που περιέχει ανταγωνιστή PAF μειώνεται σημαντικά η διήθηση από πολυμορφοπύρρηνα και η νεφρική βλάβη (162). Τέλος η ενδοθηλίνη-ισχυρή αγγειοσυσπαστική ουσία που ενέχεται στην παθοφυσιολογία της οξείας νεφρικής ανεπάρκειας-προάγει in vitro τη σύνθεση PAF, ενώ η δράση της αναστέλλεται μερικώς από ανταγωνιστές του PAF(163,164).

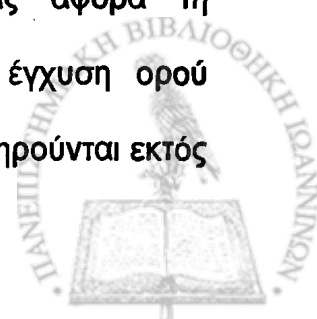


3) Ο ρόλος του PAF στη σπειραματική βλάβη

Οι πρώτες παρατηρήσεις για ανάμειξη του PAF στη σπειραματική βλάβη ανοσολογικής αρχής προήλθαν από την υπεροξεία απόρριψη νεφρικού μοσχεύματος σε πειραματόζωα, όπου αμέσως μετά τη μεταμόσχευση ανιχνεύθηκε PAF στη νεφρική φλέβα (165). Ακόμη σε καλλιέργεια απομονωμένων σπειραμάτων επίμυων με νεφρίτιδα ανιχνεύθηκε PAF, κάτι που δεν παρατηρήθηκε σε υγιείς επίμυς (166). Στην οξεία ορονοσία σε κουνέλια η εναπόθεση ανοσοσυμπλεγμάτων στα σπειράματα είναι ταυτόχρονη με την απελευθέρωση PAF από τα βασεόφιλα κύτταρα (167).

Η χρησιμοποίηση ανταγωνιστών του υποδοχέα PAF σε μοντέλα σπειραματονεφρίτιδας σε πειραματόζωα ενίσχυσε την παρατήρηση σχετικά με το σημαντικό ρόλο του PAF στους ανοσολογικούς μηχανισμούς της σπειραματικής βλάβης (168). Η χορήγηση σε κουνέλια νεφροτοξικού ορού(NTS) από πρόβατα προκαλεί υπερπλαστική σπειραματονεφρίτιδα που διακρίνεται σε δύο φάσεις:α)στην πρώιμη, όπου η σύνδεση του αντισώματος με τη σπειραματική μεμβράνη οδηγεί σε κινητοποίηση του συμπληρώματος και των πολυμορφοπύρηνων, εμφανίζεται πρωτεϊνουρία και μείωση της GFR και β)στην όψιμη, όπου το σπείραμα διηθείται από μακροφάγα, δημιουργείται ινική και καταλήγει σε εμφάνιση νεφρικής ανεπάρκειας (169,170). Η χορήγηση ανταγωνιστή υποδοχέα του PAF στη μεν πρώιμη φάση μειώνει την κυτταροβρίθεια και προλαμβάνει τη μείωση της σπειραματικής διήθησης και την εμφάνιση πρωτεϊνουρίας, στη δε όψιμη φάση μειώνει τη δημιουργία ινικής και τη διήθηση από μακροφάγα (171).

Ένα άλλο μοντέλο πειραματικής σπειραματονεφρίτιδας αφορά τη δημιουργία νεφροτοξικής νεφρίτιδας (NTN) σε κουνέλια με έγχυση ορού εναντίον της σπειραματικής μεμβράνης. Στο μοντέλο αυτό παρατηρούνται εκτός



των άλλων υψηλές συγκεντρώσεις παραγόντων θρομβοξάνης και προσταγλανδινών στα σπειράματα. Η χορήγηση ανταγωνιστή υποδοχέα PAF προκάλεσε μείωση παραγωγής των παραγώγων του αραχιδονικού οξέως με συνοδό μείωση της κυτταροβρίθειας και της ινικής (172). Ενδιαφέρουσα ήταν η παρατήρηση ότι ο ανταγωνιστής αυτός υπερείχε όσον αφορά την προστασία του σπειράματος από τον αναστολέα της θρομβοξάνης. Ο PAF προκαλεί επίσης πρωτεϊνουρία σε μοντέλο απομονωμένου νεφρού επίμυος, δράση που αναστέλλεται από ανταγωνιστή υποδοχέα του (173).

Γιατί ο ανταγωνιστής του PAF αναστέλλει την εμφάνιση της πρωτεϊνουρίας, βασικού γνωρίσματος κάθε σπειραματονεφρίτιδας; Έχει ήδη αναφερθεί ότι τα τριχοειδή του σπειράματος αποτελούν φραγμό ως προς το ηλεκτρικό φορτίο και το μέγεθος στη διήθηση μακρομορίων. Είναι γνωστό ότι στα πειραματικά μοντέλα σπειραματονεφρίτιδας η ουδετεροποίηση ή η καταστροφή των αρνητικών φορτίων του σπειραματικού φραγμού διήθησης προκαλεί πρωτεϊνουρία (5,174). Πρώτοι οι Camussi και συν (175) βρήκαν ότι η έγχυση PAF στα κουνέλια προκαλεί ταυτόχρονα με την κινητοποίηση των αιμοπεταλίων και πολυμορφοπύρηνων στο σπείραμα, την παραγωγή από τα κύτταρα αυτά θετικά φορτισμένων πρωτεϊνών και την εναπόθεσή τους στο σπειραματικό φραγμό διήθησης. Στο μοντέλο όμως του απομονωμένου νεφρού η προκαλούμενη από τον PAF πρωτεϊνουρία δεν είναι αποτέλεσμα αλλαγής του φορτίου του σπειραματικού φραγμού διήθησης, αλλά μάλλον του μεγέθους των πόρων. Αναλυτικότερα, η έγχυση PAF σε μοντέλο IPK έδινε τη δυνατότητα σε μεγάλου μοριακού βάρους ουδέτερες δεξτράνες να διέρχονται το φραγμό, διαδικασία που αναστέλλεται με τη χρήση ανταγωνιστών υποδοχέων του PAF (176). Σε *in vitro* πειράματα ο PAF τροποποιεί το δίκτυο της F-ακτίνης των ενδοθηλιακών κυττάρων, γεγονός που οδηγεί το κύτταρο σε αλλαγή σχήματος



και απώλεια των ιδιοτήτων προσκόλλησης (177). Πιθανά ο ίδιος μηχανισμός να λαμβάνει χώρα στα ποδοκύτταρα της σπειραματικής μεμβράνης και με αυτό τον τρόπο ο PAF να τροποποιεί το μέγεθος των πόρων. Ενισχυτική της θεωρίας αυτής είναι η μελέτη που αναφέρει ότι τα γλυκοκορτικοειδή σταθεροποιούν το σκελετό ακτίνης σε διάφορους τύπους κυττάρων σε καλλιέργειες (178).

Η νεφροτοξικότητα πολλών φαρμάκων υπήρξε ένα άλλο μοντέλο μελέτης του πιθανού ρόλου του PAF στη σπειραματική βλάβη. Είναι γνωστό ότι η κυκλοσπορίνη συχνά προκαλεί επιδείνωση της νεφρικής λειτουργίας. Επιπλέον η κυκλοσπορίνη σε κυτταροκαλλιέργειες μεσαγγειακών κυττάρων επίμυων επάγει τη σύνθεση του PAF (179). Η χορήγηση ανταγωνιστών PAF σε επίμυς στους οποίους δίνεται κυκλοσπορίνη προλαμβάνει τη μείωση του GFR είτε αναστέλλοντας την αγγειοσύσπασση του προσαγωγού αρτηριδίου (180), είτε μειώνοντας την παραγωγή προϊόντων οξειδωσης στη σπειραματική μεμβράνη που προκαλεί η κυκλοσπορίνη (181). Η γενταμικίνη, ένα άλλο νεφροτοξικό φάρμακο, προάγει τη σύνθεση PAF και εικοσανοειδών στα μεσαγγειακά κύτταρα *in vitro* (182). Η χορήγηση ανταγωνιστών PAF σε επίμυς που λαμβάνουν γενταμικίνη προλαμβάνει μερικώς τη μείωση του GFR και τη σωληναριακή βλάβη, βασικό χαρακτηριστικό της νεφρικής βλάβης που προκαλεί το φάρμακο (183). Ανάλογη είναι η δράση των ανταγωνιστών του PAF σε πειραματόζωα που λαμβάνουν ένα άλλο νεφροτοξικό φάρμακο τη σισπλατίνη (184).

Η αγγειοτενσίνη II όπως και ο PAF φαίνεται ότι προκαλούν πρωτεϊνουρία όχι μόνο μέσω αιμοδυναμικών μεταβολών, αλλά και μέσω αλλαγών στο φραγμό σπειραματικής διήθησης. Σε μοντέλα *isolated kidney* (IPK) η αγγειοτενσίνη μειώνει τη νεφρική π्लाσματική ροή (RPF) και αυξάνει το κλάσμα διήθησης, ενώ δε συμβαίνει το ίδιο με τον PAF. Η χορήγηση ανταγωνιστών PAF σε επίπεδο

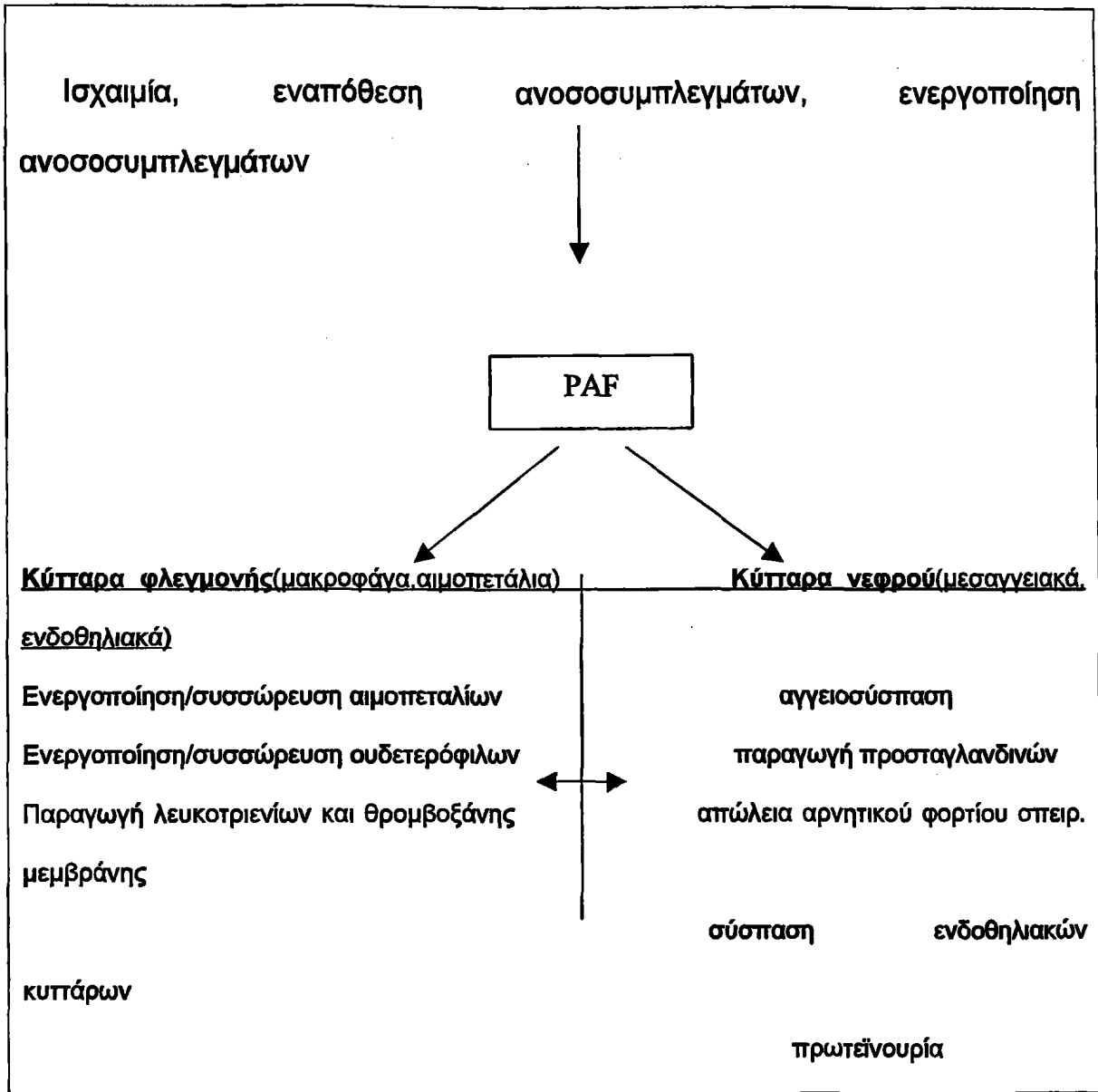


υποδοχέων αναστέλλει τη δράση της αγγειοτενσίνης II. Αρα ο PAF ρυθμίζει τη δράση της αγγειοτενσίνης II στη σπειραματική μεμβράνη χωρίς να επιδρά στις αγγειοκινητικές ιδιότητές της. Η χορήγηση δεξαμεθαζόνης πριν την έγχυση PAF απέτρεψε την εμφάνιση πρωτεϊνουρίας (185).

Βασικό στοιχείο κάθε σπειραματονεφρίτιδας είναι και η βλάβη του σωληναριοδιάμεσου ιστού. Η διάμεση ίνωση αποτελεί κακό προγνωστικό παράγοντα κάθε σπειραματοπάθειας και συμβάλλει στην γένεσή της πλειάδα κυτταροκινών και αυξητικών παραγόντων. Ο Ruiz-Ortega και συν (186) απέδειξαν *in vitro* ότι ο PAF που παράγεται από τα κύτταρα του σπειράματος ή από τα κύτταρα φλεγμονής επάγει τη σύνθεση ινώδους ιστού από τα διαμεσοσωληναριακά κύτταρα μέσω έκφρασης του mRNA της ινονεκτίνης. Η διαδικασία αναστέλλεται αν προηγηθεί χορήγηση ανταγωνιστών PAF.

Συμπερασματικά ο PAF παράγεται κατά την εναπόθεση των ανοσοσυμπλεγμάτων από τα κύτταρα του σπειράματος και προκαλεί μετακίνηση και προσκόλληση στην περιοχή πολυμορφοκυττάρων, ηωσινόφιλων και μονοκυττάρων (Σχήμα 6). Νεότερες μελέτες εστίασαν το ενδιαφέρον τους στην αλληλεπίδραση του PAF με κυτταροκίνες, όπως ιντερλευκίνη-1 και TNF που εμπλέκονται στις φλεγμονώδεις διαδικασίες (187). Σε μοντέλα *isolated kidney* (IPK) η εναπόθεση ανοσοσυμπλεγμάτων στο σπείραμα οδηγεί στην έκφραση mRNA της χημειοκίνης MCP-1 (μονοκυτταρικός χημειοτακτικός παράγων), απολύτως εξαρτώμενη από τον PAF, πιθανότατα μέσω προσταγλανδινών (188). Τέλος σε καλλιέργειες σπειραματικών κυττάρων ο PAF επάγει την παραγωγή ελεύθερων ριζών οξυγόνου οι οποίες πιθανά να συμμετέχουν στη σπειραματική βλάβη αναστέλλοντας τη σύνθεση πρωτεογλυκανών από τα σπείραματα (189).



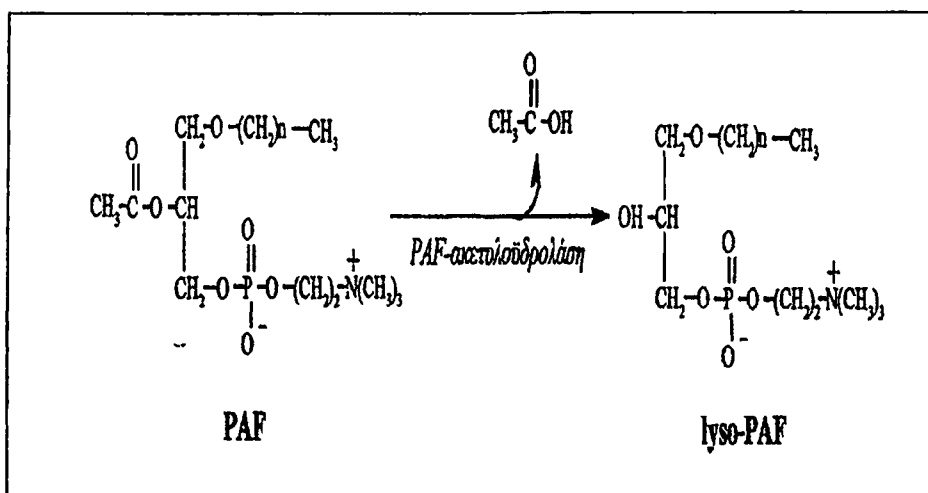


Σχήμα 6. Δράση του PAF στο νεφρικό σπείραμα

B). PAF-ΑΚΕΤΥΛΟΪΔΡΟΛΑΣΕΣ

1) Γενικά χαρακτηριστικά

Οι PAF-ακετυλοϋδρολάσες (PAF-AH) είναι φωσφολιπάσες A_2 , δηλαδή υδρολύουν τον εστερικό δεσμό στην sn-2 θέση του PAF απομακρύνοντας την οξείκη ομάδα και παράγοντας τον βιολογικά ανενεργό λύσο-PAF (σχήμα 7).



Σχήμα 7. Η αποικοδόμηση του PAF από την PAF-AH

Επίσης υδρολύουν τα οξειδωμένα παράγωγα των φωσφολιπιδίων με μικρές αλκυλομάδες στη θέση sn-2 του γλυκερινικού σκελετού, που προέρχονται από την οξείδωση πολυακόρεστων λιπαρών οξέων. Τα οξειδωμένα φωσφολιπίδια έχουν δομικές ιδιότητες παρόμοιες με τον PAF και αναγνωρίζονται από τον υποδοχέα του, έχοντας έτσι όμοιες βιολογικές δράσεις(190,191). Η παραγωγή των οξειδωμένων αυτών παραγώγων είναι σημαντική στο κάπνισμα(192), στη φλεγμονή(193) και στην τραυματική επαναιμάτωση(194). Σε αντίθεση όμως με τον PAF του οποίου τα επίπεδα στο πλάσμα ρυθμίζονται αυστηρά, τα οξειδωμένα φωσφολιπίδια παράγονται ανεξέλεγκτα (143).



Οι PAF-ακετυλοϋδρολάσες είναι ένζυμα διαφορετικά από τις κλασικές φωσφολιπάσες A_2 γιατί δεν απαιτούν την ύπαρξη ιόντων ασβεστίου για να δράσουν. Επίσης σε αντίθεση με τις κλασικές φωσφολιπάσες A_2 , υδρολύουν φωσφολιπίδια με μικρή αλκυλομάδα στην sn-2 θέση τους (<9 άτομα άνθρακα), προστατεύοντας έτσι από την υδρόλυση τα φωσφολιπίδια των κυτταρικών μεμβρανών. Το ένζυμο έχει βρεθεί σε πολλά είδη ιστών και κυττάρων του ανθρώπου αλλά και άλλων θηλαστικών (Πίνακας 8,195).



Πίνακας 8. Κατανομή της PAF-AH σε διάφορα είδη θηλαστικών

Είδος	Κύτταρα-ιστοί	Πηγή της PAF-AH
<u>Άνθρωπος</u>	ουδετερόφιλα, ηωσινόφιλα	Ομογενοποίηση
	αιμοπετάλια	Κυττοσόλιο
	μονοκύτταρα, μακροφάγα	Ομογενοποίηση
	ερυθροκύτταρα	Κυττοσόλιο
	νεφροί	Ομογενοποίηση
	HerG2	υπερκείμενο
	πλάσμα	
Επίμυς	Νεφροί, νεφρικός φλοιός	ΚΥΤΤΟΣΟΛΙΟ
	πνεύμονας	ΚΥΤΤΟΣΟΛΙΟ
	Εγκέφαλος	ΚΥΤΤΟΣΟΛΙΟ
	Σπλήνας	ΚΥΤΤΟΣΟΛΙΟ
	Ήπαρ	ΚΥΤΤΟΣΟΛΙΟ
	Καρδιά	ΚΥΤΤΟΣΟΛΙΟ
	Κοκκιοκύτταρα	ομογενοποίηση
	Μονοκύτταρα-μακροφάγα	ομογενοποίηση
	Λεμφοκύτταρα	ομογενοποίηση
	Αιμοπετάλια, ερυθροκύτταρα	ομογενοποίηση
πλάσμα		
Ποντίκι	Περιτόναιο, αιμοπετάλια	ομογενοποίηση
	Μακροφάγα	
	πλάσμα	
Βόδι	Αιμοπετάλια	υπερκείμενο
Κουνέλι	Νεφροί	ΚΥΤΤΟΣΟΛΙΟ
	Σπλήνας	ΚΥΤΤΟΣΟΛΙΟ
Ινδικό χοιρίδιο	Νεφροί	ΚΥΤΤΟΣΟΛΙΟ
	πλάσμα	



Υπάρχουν δύο μορφές του ενζύμου η εκκρινόμενη (του πλάσματος) και η ενδοκυττάρια (πίνακας 9).

Πίνακας 9. Μορφές του ενζύμου PAF-AH

Μορφή	Ισομορφή	Πηγή	Μοριακό Βάρος(kDa)	Ενεργό Κέντρο
Εκκρινόμενη	-	πλάσμα	45	GHSFG
Ενδοκυττάρια	II	ήπαρ και νεφρός	40	GHSFG
Ενδοκυττάρια	Ib,α ₁ υπομονάδα	εγκέφαλος	29	GDSL _V
Ενδοκυττάρια	Ib,α ₂ υπομονάδα	εγκέφαλος	30	GDSM _V
Ενδοκυττάρια	Ib,β υπομονάδα		45	

2) PAF-AH πλάσματος

Το ένζυμο είναι μια μονομερής πρωτεΐνη 441 αμινοξέων και μοριακού βάρους 45kDa. Το γονίδιο που ρυθμίζει την παραγωγή του ενζύμου κωδικοποιήθηκε το 1995 και εκφράζεται στον θύμο αδένα, στις αμυγδαλές και στον πλακούντα (195). Το γονίδιο δεν ανιχνεύθηκε στο ήπαρ, στο νεφρό, στην καρδιά και στο φλοιό του εγκεφάλου. Η ομάδα των Howard και συν υποστήριξε ότι η ανίχνευση του mRNA της PAF-AH στο ήπαρ με τη μέθοδο Northern blotting είναι όντως αρνητική λόγω χαμηλής ευαισθησίας της μεθόδου και μικρής ποσότητας του mRNA σε συνθήκες ηρεμίας. Οι ίδιοι βρήκαν έκφραση του mRNA της PAF-AH στα κύτταρα Kupffer ήπατος επίμυος με τη μέθοδο της ribonuclease protection, όταν εκτέθηκαν σε λιποπολυσακχαρίδη LPS(δημιουργία ενδοτοξικού shock) (196). Η έγχυση LPS προκαλεί έκφραση της PAF-AH και σε άλλους ιστούς, όπως πνεύμονα, σπλήνα, ήπαρ, νεφρός, θύμος και μακροφάγα του περιτοναίου (197). Επισημαίνεται όμως ότι η έκφραση του ενζύμου σε κυτταροκαλλιέργειες δεν αντανακλά απαραίτητα την παραγωγή του in vivo γιατί οι συνθήκες είναι διαφορετικές πχ προσκόλληση των κυττάρων στα τοιχώματα του δοκιμαστικού σωλήνα.



Το ερώτημα είναι ποια κύτταρα αποτελούν πηγή του ενζύμου. *In vitro* τα μακροφάγα και τα Kupffer κύτταρα σε ιστοκαλλιέργειες παράγουν το ένζυμο περισσότερο από τα ηπατοκύτταρα (198). Τα μακροφάγα πρέπει να είναι η πηγή του ενζύμου και *in vivo*, αφού όλοι οι προαναφερθέντες ιστοί με έκφραση mRNA της PAF-AH βρήθουν μακροφάγων. Το mRNA του ενζύμου έχει ανιχνευθεί σε μακροφάγα αθηροσκληρυντικών πλακών ανθρώπου (199) και σε ενεργοποιημένα μαστοκύτταρα μυελού (200). Επίσης το mRNA του ενζύμου δεν εκφράζεται στα μονοκύτταρα, παρά μόνο όταν αρχίζουν να διαφοροποιούνται σε μακροφάγα. Προς επιβεβαίωση των παραπάνω παρατηρήσεων ο Asano και συν(201) παρατήρησαν σε Ιάπωνες λήπτες μυελού των οστών ότι η ενεργότητα του ενζύμου μετά τη μεταμόσχευση καθοριζόταν από την ενεργότητα του δότη. Έτσι ομοζυγώτης δότης με μηδενική ενεργότητα PAF-AH λόγω γενετικής μετάλλαξης «μετέφερε» τη μηδενική ενεργότητα στο φυσιολογικό λήπτη.

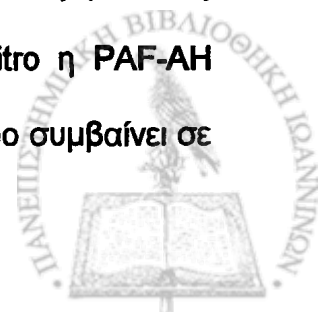
Το cDNA της PAF-AH του πλάσματος ανθρώπου κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη της οποίας τα πρώτα 17 αμινοξέα (Met-1 ως Ala-17) είναι υδρόφοβα και μάλλον αποτελούν το σηματοδοτικό πεπτιδίο υπεύθυνο για την έκκριση της πρωτεΐνης. Τα επόμενα 24 αμινοξέα (Val-18 ως Lys-41) δεν έχουν ανιχνευθεί στην πρωτεΐνη που απομονώθηκε από το πλάσμα, οπότε δεν έχει διευκρινισθεί αν πρόκειται για προ-προπεπτιδίο ή αν το ένζυμο που έχει απομονωθεί από το πλάσμα έχει υποστεί πρωτεόλυση. Η δομή του ενζύμου είναι μοναδική και περιέχει μια μικρή περιοχή ομολογίας με τις σερινοεστεράσες και τις λιπάσες (GX SXG, G: γλυκίνη, S: σερίνη) (202). Η ανάλυση του γονιδίου επιβεβαίωσε τις πειραματικές παρατηρήσεις για παραγωγή του ενζύμου από τα μακροφάγα, αφού θέσεις σύνδεσης για παράγοντες μεταγραφής που βρίσκονται αποκλειστικά σε μονοκύτταρα-μακροφάγα βρέθηκαν στο γονίδιο της PAF-AH.



Το 1988 οι Miwa και συν (203) ανακοίνωσαν ότι 32 στους 816 υγείς Ιάπωνες και 8 στα 211 υγιή παιδιά είχαν μηδενική ενεργότητα του ενζύμου στο πλάσμα. Η έλλειψη ενεργότητας περιοριζόταν στην εκκρινόμενη μορφή και δε συσχετιζόταν με τις λιποπρωτεΐνες. Είναι δε κληρονομούμενη κατά τον αυτοσωματικό υπολειπόμενο χαρακτήρα. Η κλωνοποίηση του γονιδίου της PAF-AH αποκάλυψε τη γενετική ανωμαλία που ήταν υπεύθυνη για την έλλειψη του ενζύμου : πρόκειται για σημειακή μετάλλαξη στο εξόνιο 9 του χρωμοσώματος 6 με αντικατάσταση στη θέση 279 της βαλίνης από φαινυλαλανίνη (V279F) (204). Μετέπειτα μελέτες επιβεβαίωσαν τη σημαντική συσχέτιση των επιπέδων της πλασματικής PAF-AH με το γονότυπο καθώς και την υψηλή συχνότητα εμφάνισης του γονιδίου στην Ιαπωνία (205-208). Στη συνέχεια βρέθηκε και άλλη μετάλλαξη υπεύθυνη για έλλειψη PAF-AH: αντικατάσταση της γλουταμίνης από αργινίνη στη θέση 181 του εξονίου 9(Q281R), αλλά με πολύ μικρότερη συχνότητα εμφάνισης από τη μετάλλαξη V279F (209). Γεγονός είναι ότι και οι δύο μεταλλάξεις βρίσκονται πολύ κοντά στο ενεργό κέντρο της σερίνης επιδρώντας έτσι στην καταλυτική δράση του ενζύμου. Δεν έχει ανακοινωθεί έλλειψη PAF-AH πλάσματος και γενετικές μεταλλάξεις του γονιδίου της σε καυκάσιους πληθυσμούς, αν και έχουν περιγραφεί πολυμορφισμοί (210).

ι) Φυσικοχημικές και ενζυμικές ιδιότητες της PAF-AH

Το ένζυμο είναι υδρόφοβο μόριο συνδεδεμένο με τις χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνες LDL κατά 70% περίπου και τις υψηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνες HDL κατά 30% περίπου(211). Η κατανομή του ενζύμου στις λιποπρωτεΐνες είναι δυναμική και εξαρτάται από το pH. In vitro η PAF-AH μεταφέρεται από την LDL στην HDL σε pH 6,0, ενώ το αντίστροφο συμβαίνει σε



pH 7,4. Τα ένζυμα που εντοπίζονται στις LDL και HDL είναι πιθανότατα τα ίδια αφού εμφανίζουν την ίδια ηλεκτροφορητική κινητικότητα και αναγνωρίζονται πλήρως από το πολυκλωνικό αντίσωμα κατά της PAF-AH που απομονώθηκε από την LDL.

Η PAF-AH του πλάσματος μετά από υπερφυγοκέντρηση κατανέμεται ανισομερώς στα υποκλάσματα της LDL με μεγαλύτερη ενεργότητα στο μικρό πυκνό υποκλάσμα της LDL-5, ενώ μεταξύ των κλασμάτων της HDL κατανέμεται κυρίως στο μικρό πυκνό υποκλάσμα VHDL (212). Η κατανομή της PAF-AH στις λιποπρωτεΐνες του ανθρώπινου πλάσματος μεταβάλλεται όταν το πλάσμα περιέχει λιποπρωτεΐνη Lp(a). Σε επίπεδα Lp(a) ορού >30mg/dL, ποσότητα του ενζύμου αναλογική των επιπέδων της Lp(a) συνδέεται με τη λιποπρωτεΐνη. Μάλιστα η ενεργότητα του ενζύμου είναι μεγαλύτερη στις μικρές ισομορφές της λιποπρωτεΐνης συγκρινόμενη με τις μεγαλύτερες ισομορφές. Η PAF-AH της Lp(a) έχει τις ίδιες φυσικοχημικές και καταλυτικές ιδιότητες με το ένζυμο που συνδέεται με την LDL και HDL (213-214).

Η PAF-AH του πλάσματος άλλων θηλαστικών διαφέρει από αυτή του πλάσματος ανθρώπου. Η PAF-AH του πλάσματος αρουραίων και κουνελιών είναι συνδεδεμένη κυρίως με τις HDL, ενώ η PAF-AH του πλάσματος ποντικών κατανέμεται εκτός από την HDL σε μικρό ποσοστό και στην VHDL (202,215). Θα πρέπει όμως να τονισθεί ότι οι HDL των αρουραίων και ποντικών αποτελούν περισσότερο από 50% των συνολικών λιποπρωτεϊνών του πλάσματός τους. Επίσης η PAF-AH του πλάσματος των ποντικών αποτελείται από δύο διαφορετικού μοριακού βάρους πρωτεΐνες 46 και 63kDa.

ii) Ρύθμιση της έκκρισης της PAF-AH



Πολλοί διαμεσολαβητές της οξείας φάσης της φλεγμονής επιδρούν στην έκφραση της PAF-AH. In vitro η βακτηριακή λιποπολυσακχαρίδη καταστέλλει την παραγωγή PAF-AH από μακροφάγα του αίματος, μακροφάγα του φθαρτού υμένα, Kurpfer κύτταρα και HL-60 κύτταρα (πρόδρομα κύτταρα μυελοειδούς σειράς). Το ίδιο παρατηρείται με τον TNF- α και τις ιντερλευκίνες IL-1 και IL-8, όταν επιδρούν σε μακροφάγα του φθαρτού και με την ιντερφερόνη IFN- γ και ιντερλευκίνη IL-8, όταν δρουν σε μακροφάγα αίματος(216-218). Ο Satoh και συν(219) έδειξαν ότι μόνος του ο PAF μπορεί να ρυθμίσει τη σύνθεση και έκκριση της PAF-AH, γεγονός που πιθανά υποδηλώνει την ύπαρξη παλίνδρομου μηχανισμού ρύθμισης που προστατεύει τον οργανισμό από τη δράση του PAF. Στην αρχή της φλεγμονής οι διαμεσολαβητές της φλεγμονής αναστέλλουν την παραγωγή της PAF-AH, αλλά καθώς αυξάνονται τα επίπεδα του PAF αυξάνεται και το ένζυμο για να επέλθει ισορροπία.

Όπως παραδόξως όλοι αυτοί οι παράγοντες φλεγμονής προάγουν την έκφραση της PAF-AH σε in vivo πειράματα. Για παράδειγμα ο TNF- α και η ιντερλευκίνη IL-1 αυξάνουν την παραγωγή PAF-AH σε hamster(220). Προκαλούν επίσης αυξημένη έκφραση του mRNA PAF-AH στα Kurpfer κύτταρα του ήπατος, στον πνεύμονα, στον σπλήνα, στο έντερο, στο νεφρό, στο θύμο και στα μακροφάγα του περιτοναίου(220,221). Πλήρης εξήγηση για τα αντικρουόμενα αποτελέσματα in vivo και in vitro μελετών δεν έχει δοθεί. Πιθανόν στα αρχικά στάδια της φλεγμονής οι κυττοκίνες να αναστέλλουν την PAF-AH, αλλά στη συνέχεια πολύπλοκες ενδοκυττάρειες οδοί-στις οποίες ρόλο σημαντικό διαδραματίζει ο PAF και που μόνο in vivo εξελίσσονται-να μειώνουν την ενεργότητα του ενζύμου.

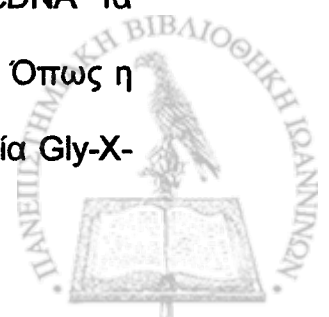
Πολλές μελέτες έχουν δείξει ότι η σύνθεση και έκκριση του ενζύμου ρυθμίζεται ορμονικά in vivo. Οι Miyaura και συν (222) έδειξαν ότι τα οιστρογόνα



μειώνουν την έκκριση της PAF-AH από τα μακροφάγα, ενώ η προγεστερόνη έχει τα αντίθετα αποτελέσματα. Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν με την παρατήρηση ότι η ενεργότητα του ενζύμου στο πλάσμα της μητέρας μειώνεται δραματικά πριν τον τοκετό, ενώ επανέρχεται στα φυσιολογικά αμέσως μετά τον τοκετό (223). Ο Johnston και συν βασιζόμενοι στις παρατηρήσεις αυτές πρότειναν τη θεωρία ότι στην αρχή της εγκυμοσύνης τα υψηλά επίπεδα της PAF-AH διατηρούν τα επίπεδα του PAF χαμηλά έτσι ώστε η μήτρα να μη συσπάται (ο PAF είναι γνωστό ότι προκαλεί σύσπαση της μήτρας). Αντιθέτως στο τέλος της κύησης η συνεχώς μειούμενη ενεργότητα του ενζύμου οδηγεί σε αύξηση του PAF, γεγονός που πιθανώς να προκαλεί έναρξη τοκετού. Επίσης ο ρυθμιστικός ρόλος των οιστρογόνων στα επίπεδα του ενζύμου ενισχύεται από την παρατήρηση ότι σε μεγάλες πληθυσμιακές μελέτες οι γυναίκες έχουν μικρότερα επίπεδα ενεργότητας PAF-AH από τους άνδρες. Σε μελέτες με ποντίκια η χορήγηση δεξαμεθαζόνης αύξησε τα επίπεδα της PAF-AH πλάσματος(224). Η ηλικία αποτελεί επίσης παράγοντα ρύθμισης, αφού στη γέννηση τα επίπεδα του ενζύμου είναι πολύ χαμηλά αλλά αυξάνονται σημαντικά τις πρώτες εβδομάδες ζωής(225).

3) Ενδοκυττάρια PAF-ακετυλοϋδρολάσες

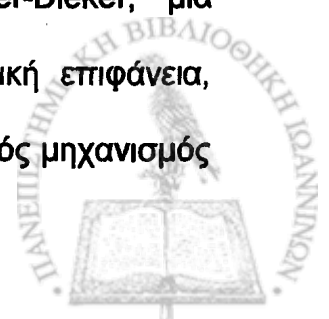
Εκτός από την εκκρινόμενη μορφή του ενζύμου, υπάρχουν οι ενδοκυττάρια μορφές του ενζύμου PAF-AH. Διαχωρίζονται σε δύο ισομορφές : την ισομορφή I που έχει βρεθεί κυρίως στον εγκέφαλο και φαίνεται ότι αποτελείται από δύο υπομονάδες(Ia και Ib) και την ισομορφή II που έχει βρεθεί κυρίως σε ήπαρ και νεφρούς. Έχουν κλωνοποιηθεί τρία διαφορετικά cDNA τα οποία κωδικοποιούν ενδοκυττάρια μορφές PAF-AH (πίνακας 9)(226). Όπως η εκκρινόμενη μορφή έτσι και οι ενδοκυττάρια περιέχουν την αλληλουχία Gly-X-



Ser-X-Gly Gly-X-Ser-X-Val στο ενεργό κέντρο τους, όπως άλλωστε όλες οι λιπάσες και εστεράσες.

Η ισομορφή II είναι μια μονομερής πρωτεΐνη με μοριακό βάρος 40kDa και στο ενεργό κέντρο της φέρει σερίνη και κυστεΐνη. Καταλύει την υδρόλυση φωσφολιπιδίων με ακυλομάδες που έχουν ως πέντε άτομα άνθρακα και πιθανώς υπόστρωμά της να αποτελούν και τα παράγωγα των οξειδωμένων φωσφολιπιδίων. Ενδιαφέρον δε παρουσιάζει το γεγονός ότι η αλληλουχία των αμινοξέων της είναι κατά 43% ίδια με αυτή της PAF-AH του πλάσματος(227). Φαίνεται πως ο ρόλος αυτής της PAF-AH είναι κύρια αντιοξειδωτικός σε πολλά συστήματα. Πειράματα έδειξαν ότι το ένζυμο σε συνθήκες οξειδωτικού stress μεταναστεύει στη μεμβράνη και αναστέλλει την απόπτωση υδρολύοντας τα οξειδωμένα φωσφολιπίδια (228).

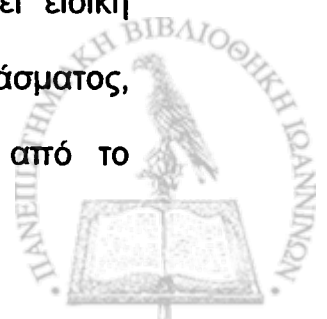
Η ισομορφή Ib –η πιο εκτεταμένως μελετημένη ενδοκυττάρια ισομορφή- έχει τρεις υπομονάδες β,α₁,α₂ και με μοριακά βάρη 45,29και 30kDa αντίστοιχα. Η υπομονάδα Ib-α₂ εμφανίζει 63% ομολογία με την Ib-β και έχει την ίδια με αυτή αλληλουχία αμινοξέων στο ενεργό της κέντρο Υδρολύει αποκλειστικά και μόνο τον PAF και δεν αναγνωρίζει ως υπόστρωμα τα οξειδωμένα φωσφολιπίδια. Η υπομονάδα Ib-α₁ είναι καταλυτικά πιο δραστική από τις υπόλοιπες και περιέχει στο ενεργό της κέντρο τροποποιημένη την αλληλουχία των σερινοεστερασών που υπάρχει και στις άλλες PAF-AH. Η υπομονάδα Ib-β(45kDa) δεν έχει καταλυτική δράση και πιθανά ελέγχει τη δράση, τον εντοπισμό και το μεταβολισμό του ετεροδιμερούς ενζύμου α₁/α₂. Η υπομονάδα αυτή έχει μελετηθεί αρκετά γιατί μια μεταλλαγμένη μορφή της (LIS1 γονίδιο και αντίστοιχη πρωτεΐνη) είναι υπεύθυνη για τη λειεγκεφαλοπάθεια Miller-Dieker, μια νευρολογική ασθένεια που χαρακτηρίζεται από λεία εγκεφαλική επιφάνεια, σπασμούς και σοβαρή παραμόρφωση (191). Ο παθοφυσιολογικός μηχανισμός



της νόσου είναι η παθολογική μετανάστευση των νευρώνων κατά την ανάπτυξη. Υπάρχουν επίσης μελέτες σε πειραματόζωα που αποδεικνύουν τη σύνδεση της υπομονάδας αυτής με την τομπουλίνη και άλλες κυτταροσκελετικές πρωτεΐνες κατά την πρόκληση σπασμών καθώς και τη θετική συσχέτιση ενεργότητας της PAF-AH με έκφραση της LIS1 πρωτεΐνης και καταλυτική δράση της α_2 -υπομονάδας (229). Το εύρημα αυτό μπορεί να συσχετισθεί με τις μελέτες του Kato (230), ότι ο PAF αποτελεί νευροδιαβιβαστή μεγάλης δραστηριότητας που συμμετέχει στην απελευθέρωση νευροδιαβιβαστών, στην ανάπτυξη των νευρώνων και στη δημιουργία της μνήμης. Πολλές άλλες μελέτες επιβεβαίωσαν το βασικό ρόλο της υπομονάδας β της PAF-AH Ib στη ρύθμιση των επιπέδων του PAF στον εγκέφαλο και στην ανάπτυξη του εγκεφάλου (231,232).

Τέλος έχει μελετηθεί η PAF-AH των ερυθροκυττάρων και των αιμοπεταλίων. Η πρώτη αποτελείται από δύο όμοιες υπομονάδες 25kDa. Έχει διαφορετικές φυσικοχημικές ιδιότητες από την PAF-AH πλάσματος, αλλά αποτελεί ισομορφή της οικογένειας των PAF-ακετυλυδρολασών. Ο ρόλος της είναι αντικείμενο μελετών, γιατί τα ερυθροκύτταρα δεν παράγουν PAF, είτε ενεργοποιηθούν είτε όχι (191). Το ένζυμο όμως υδρολύει τα οξειδωμένα παράγωγα των φωσφολιπιδίων που πιθανά παράγονται από αντιδράσεις ελευθέρων ριζών και έκθεση σε υψηλή πίεση οξυγόνου, προστατεύοντας έτσι την ερυθροκυτταρική μεμβράνη από επιπλέον οξειδωτικές αντιδράσεις και οξειδωμένα λιπίδια (233,234). Ενεργότητα του ενζύμου βρέθηκε και στη μεμβράνη των ερυθροκυττάρων (0,2% της ολικής), η οποία μάλιστα μειώνεται όσο ελαττώνεται η ευλυγισία των ερυθρών κατά τη γήρανσή τους (235).

Η PAF-AH του ομογενοποιημένου των αιμοπεταλίων αποτελεί ειδική κατηγορία των φωσφολιπασών και μοιάζει με την PAF-AH του πλάσματος, αφού έχει παρόμοιες φυσικοχημικές ιδιότητες και αναγνωρίζεται από το



αντίστοιχο αντίσωμα της PAF-AH του πλάσματος. Η ενεργότητά της βρίσκεται κυρίως εντοπισμένη στο κυττοσόλιο των αιμοπεταλίων, από όπου εκκρίνεται μόνο όταν ενεργοποιηθούν τα κύτταρα. Κατανέμεται ομοιογενώς στις λιποπρωτεΐνες του πλάσματος και φαίνεται να παίζει προστατευτικό ρόλο στη συσσωρευτική δράση του PAF στα αιμοπετάλια.

4) PAF-AH και κλινικές μελέτες

Μελέτη των επιπέδου του ενζύμου σε όλα τα άτομα 60 οικογενειών έδειξε ότι το 62% των επιπέδων καθορίζεται κληρονομικά, χωρίς να έχουν εντοπισθεί ακόμη τα υπεύθυνα για την κληρονομικότητα γονίδια(236). Μελετήθηκε επίσης η επίδραση του φύλου, της ηλικίας και των λιπιδαιμικών παραμέτρων. Όπως έχει ήδη αναφερθεί τα επίπεδα του ενζύμου είναι χαμηλότερα στις γυναίκες από τους άνδρες, ενώ υπάρχει θετική συσχέτιση μεταξύ της ηλικίας και των συγκεντρώσεων της LDL χοληστερόλης με τα επίπεδα του ενζύμου. Η διακύμανση των επιπέδων του ενζύμου σε φυσιολογικά άτομα οφείλεται κατά 36% στα επίπεδα της LDL χοληστερόλης, αλλά για τα ίδια επίπεδα LDL χοληστερόλης δε φαίνεται να επηρεάζεται η ενεργότητα του ενζύμου. Η χορήγηση λοβαστατίνης-αναστολέα HMG-CoA ρεδουκτάσης-μειώνει τα επίπεδα της PAF-AH στο πλάσμα αναλογικά με τη μείωση της LDL χοληστερόλης(237). Είναι ενδιαφέρον να σημειωθεί ότι οι ασθενείς με συγγενή υποβηταλιποπρωτεϊναιμία –νόσος που χαρακτηρίζεται από την απουσία στο πλάσμα λιποπρωτεϊνών που περιέχουν αποπρωτεΐνη Β, δηλαδή χυλομικρά, VLDL και LDL- έχουν ενεργότητα του ενζύμου στα ίδια επίπεδα με τους φυσιολογικούς, μόνο που η PAF-AH είναι συνδεδεμένη εξ' ολοκλήρου με τη HDL λιποπρωτεΐνη(238,239).



Το ερώτημα που τίθεται είναι αν τα επίπεδα της PAF-AH συσχετίζονται με νόσους, αν δηλαδή προστατεύουν ή οδηγούν σε ασθένεια. Έτσι η ενεργότητα του ενζύμου έχει μελετηθεί σε πολλές νοσολογικές οντότητες με φλεγμονώδη διεργασία. Οι περισσότερες από αυτές τις μελέτες μετρούν μόνο την ενεργότητα του ενζύμου, καθώς το αντίσωμα κατά της PAF-AH κυκλοφόρησε σχετικά πρόσφατα. Σε άλλες η ενεργότητα βρέθηκε αυξημένη πχ αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο και υπέρταση και σε άλλες μειωμένη πχ άσθμα, σηψαιμία, ΣΕΛ, χωρίς να μπορεί να διευκρινισθεί αν η εικόνα αυτή είναι αποτέλεσμα της φλεγμονής ή προϋπάρχουσα κατάσταση που συνέβαλε στην εμφάνιση της νόσου.

i) Καρδιαγγειακά νοσήματα-δυσλιπιδαιμία

Αυξημένη ενεργότητα του ενζύμου παρατηρήθηκε σε άτομα με στεφανιαία νόσο. Η ενεργότητα της PAF-AH έχει θετική συσχέτιση με τα επίπεδα της LDL χοληστερόλης και αρνητική με τα επίπεδα της HDL χοληστερόλης. Για τα ίδια επίπεδα ολικής χοληστερόλης, η PAF-AH πλάσματος ασθενών με στεφανιαία νόσο ήταν μεγαλύτερη από την αντίστοιχη των φυσιολογικών (240). Σε ασθενείς όμως που παρουσιάζονται με οξύ έμφραγμα μυοκαρδίου η ενεργότητα του ενζύμου είναι μικρότερη σε σύγκριση με τους υγιείς(241). Επίσης η ενεργότητα του ενζύμου μειώνεται αμέσως μετά το έμφραγμα (242) και κατά 38% της αρχικής σε ασθενείς που υποβάλλονται σε στεφανιαία παράκαμψη στις 7 πρώτες μετεγχειρητικές μέρες. Η ενεργότητα στους ασθενείς αυτούς συσχετίζεται με την ολική και LDL χοληστερόλη ορού πριν την εγχείρηση καθώς και με τη μείωση των λιπιδαιμικών αυτών παραμέτρων στις 7 πρώτες μετεγχειρητικές μέρες. Η μείωση της ενεργότητας της PAF-AH δε συσχετίζεται με τη μείωση της HDL χοληστερόλης και δεν υπάρχει αύξηση του χρόνου



ημιζωής του PAF στον ορό μετά την εγχείρηση(243). Οι ασθενείς που ανέπτυξαν μετεγχειρητικά σύνδρομο συστηματικής φλεγμονώδους αντίδρασης(SIRS) είχαν μικρότερη ενεργότητα του ενζύμου σε σχέση με όσους είχαν ομαλή μετεγχειρητική πορεία(244).

Έχει επίσης μελετηθεί η έκκριση της PAF-AH από τα αιμοπετάλια ασθενών με στεφανιαία νόσο που υποβλήθηκαν σε αγγειοπλαστική. Οι ασθενείς αυτοί πριν την επέμβαση παρουσίαζαν αυξημένη ενεργότητα του ενζύμου σε σχέση με την ομάδα ελέγχου, ένδειξη ότι τα αιμοπετάλιά τους ήταν υπερδραστικοποιημένα. Στις 48 ώρες μετά την αγγειοπλαστική η ενεργότητα της εκκρινόμενης PAF-AH ήταν αυξημένη σε σύγκριση με την αρχική-πιθανώς τα αιμοπετάλια εμφανίζουν ακόμη μεγαλύτερη ευαισθησία στο διάστημα αυτό και γίνεται ίδια με την ενεργότητα της ομάδας ελέγχου 6 μήνες μετά. Οι διαφορές αυτές της ενεργότητας του ενζύμου πιθανά να δηλώνουν την ύπαρξη αντιφλεγμονώδη μηχανισμού των ενεργοποιημένων αιμοπεταλίων ενάντια στη δράση του PAF στη φλεγμονώδη διεργασία που ακολουθεί την αγγειοπλαστική(245).

Σε ασθενείς με ασταθή στηθάγχη δεν παρατηρήθηκε διαφορά στην ολική ενεργότητα του ενζύμου με τους υγιείς, αλλά η ενεργότητα της PAF-AH που σχετίζεται με τη HDL και τη HDL-χοληστερόλη ήταν σημαντικά μικρότερη στους ασθενείς(246). Αντιθέτως, οι ασθενείς με σταθερή στηθάγχη είχαν υψηλότερη ενεργότητα του ενζύμου σε σύγκριση με τους υγιείς. Η ενεργότητα παρέμεινε υψηλή 4 ώρες μετά την αγγειοπλαστική, αυξανόταν περαιτέρω 48 ώρες μετά και επανερχόταν στα επίπεδα των υγιών 6 μήνες μετά την επέμβαση(247).

Αυξημένη ενεργότητα του ενζύμου έχει βρεθεί στο πλάσμα ασθενών με σοβαρή περιφερική αγγειοπάθεια και αθηρωμάτωση(248). Σε Ιάπωνες ομόζυγους ή ετερόζυγους ως προς τη μετάλλαξη V279F του γονιδίου PAF-AH η



επίπτωση σοβαρής αθηροσκληρυντικής νόσου ήταν υψηλότερη σε σύγκριση με αυτούς που δεν είχαν τη μετάλλαξη, γεγονός που πιθανά να σημαίνει ότι η μετάλλαξη αυτή να είναι ένας από τους γενετικούς παράγοντες που καθορίζουν την εμφάνιση αθηροσκληρυνσης στους Ιάπωνες(249). Είναι γνωστό ότι ο PAF παράγεται από τα ενδοθηλιακά κύτταρα σε καταστάσεις οξειδωτικού stress και προκαλεί την έκκριση από τα μακροφάγα ελεύθερων ριζών οξυγόνου (250). Σε περιοχές αθηρωματικής βλάβης η έκκριση του PAF κάτω από αυτές τις συνθήκες μπορεί να αυξήσει την οξειδωτική τροποποίηση της LDL που λαμβάνει χώρα στον έσω χιτώνα των αγγείων. Κατά τον οξειδωτικό τραυματισμό των ενδοθηλιακών κυττάρων και την οξείδωση της LDL παράγονται οξειδωμένα φωσφολιπίδια με δομή και δράση όμοια με αυτή του PAF (PAF-like φωσφολιπίδια) (109,191). Τα προϊόντα διάσπασης των οξειδωμένων αυτών παραγώγων τροποποιούν την ApoB(100), η οποία αναγνωρίζεται πλέον από τον υποδοχέα εκκαθαριστή των μακροφάγων και οδηγεί στο σχηματισμό αφρωδών κυττάρων. Η PAF-AH απενεργοποιεί υδρολύοντας τόσο τον PAF, όσο και τα PAF-like φωσφολιπίδια, παίζοντας έτσι πιθανά προστατευτικό ρόλο στην εξέλιξη της αθηρωμάτωσης (251).

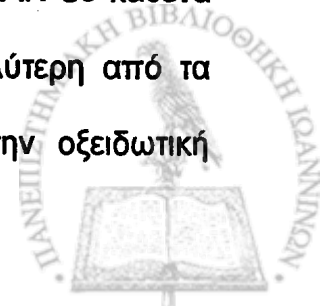
Σε ασθενείς με αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο (ΑΕΕ) βρέθηκε αυξημένη ενεργότητα PAF-AH στο πλάσμα(252,253) και μειωμένη ενεργότητα στο κυττοσόλιο και στις μεμβράνες των ερυθροκυττάρων τους(254,255). Κατά την εγκεφαλική ισχαιμία παράγεται PAF ή και οξειδωμένα φωσφολιπίδια. Η αυξημένη ενεργότητα του ενζύμου οφείλεται κύρια στην αυξημένη σύνδεση του ενζύμου με τις LDL. Πιθανότατα η αυξημένη βιοσύνθεση του PAF στους ασθενείς αυτούς να σχετίζεται με την αυξημένη ενεργότητα του ενζύμου στην LDL.



Αυξημένη ενεργότητα παρατηρήθηκε σε ασθενείς με ινσουλινοεξαρτώμενο σακχαρώδη διαβήτη, συσχετιζόμενη μάλιστα με τη συγκέντρωση της ινσουλίνης(256), καθώς και στα ούρα ασθενών με διαβητική νεφροπάθεια(257). Επιπλέον οι ασθενείς με σακχαρώδη διαβήτη έχουν πιο αυξημένη την ενεργότητα του ενζύμου που συνδέεται με την HDL, σε σύγκριση με τους υγιείς(258), ενώ σε μια άλλη μελέτη η αυξημένη ενεργότητα συσχετιζόταν με την LDL χοληστερόλη και το λόγο LDL/HDL-χοληστερόλη (259)

Ακόμη η ενεργότητα του ενζύμου είναι μεγαλύτερη στους χρόνιους καπνιστές σε σύγκριση με τους μη καπνιστές(250). Σε *in vitro* μελέτες η ενεργότητα της PAF-AH αναστέλλεται από εκχύλισμα καπνού, το οποίο όμως επάγει την οξειδωση των λιποπρωτεϊνών(261). Σε άλλη μελέτη ο καπνός του τσιγάρου αναστέλλει την έκκριση της PAF-AH από ανθρώπινα περιφερικά μονοκύτταρα(262). Το κάπνισμα επίσης διαφοροποιεί την έκκριση και ενεργότητα του ενζύμου και επάγει την οξειδωση της LDL και τη δημιουργία οξειδωμένων παραγώγων φωσφολιπιδίων(263). Η αναστολή του ενζύμου φαίνεται να είναι δόσοεξαρτώμενη, διατηρείται ακόμη και 8 ώρες μετά την έκθεση στον καπνό και πιθανά να αποτελεί έναν από τους μηχανισμούς με τους οποίους το κάπνισμα συμβάλλει στην αθηρογένεση (264).

Όπως έχει ήδη αναφερθεί στους ενήλικες υπάρχει σημαντική συσχέτιση μεταξύ της ενεργότητας του ενζύμου και των επιπέδων της ολικής χοληστερόλης και της LDL χοληστερόλης (236). Σε ασθενείς με ετερόζυγη οικογενή υπερχοληστερολαιμία(FH) η ενεργότητα της PAF-AH είναι μεγαλύτερη σε σύγκριση με τους νορμολιπιδαιμικούς, σε αντίθεση με την ενεργότητα της PAF-AH στη HDL που είναι μικρότερη. Η ενεργότητα της PAF-AH σε καθένα από τα τρία υποκλάσματα της LDL των ασθενών είναι μεγαλύτερη από τα αντίστοιχα υποκλάσματα των φυσιολογικών ατόμων. Κατά την οξειδωτική



τροποποίηση των υποκλασμάτων η ενεργότητα του ενζύμου μειώνεται, αλλά παραμένει μεγαλύτερη στα υποκλάσματα LDL των ασθενών με FH. Στο τέλος της οξείδωσης in vitro ο μοριακός λόγος της Lyso-PC/Sph είναι μεγαλύτερος σε όλα τα υποκλάσματα της LDL των ασθενών, πιθανότατα λόγω της μεγαλύτερης ενεργότητας του ενζύμου στους ασθενείς. Η αυξημένη παραγωγή της Lyso-PC μπορεί να είναι ένας από τους παράγοντες που συμβάλλουν στην πρώιμη-και σε μεγαλύτερη έκταση της αθηρωματικής νόσου στους ασθενείς με FH (265). Σε ασθενείς με υπερτριγλυκεριδαιμία δεν παρατηρήθηκε διαφορά στην ενεργότητα του ενζύμου με τους φυσιολογικούς. Αυξημένη ενεργότητα του ενζύμου παρατηρείται στα άτομα με οικογενή έλλειψη HDL(νόσος Tangier) (266). Η χορήγηση της φαινοφιβράτης σε ασθενείς με υπερλιπιδαιμία τύπου IIA, IIB και IV μείωσε την ενεργότητα του ενζύμου, κύρια λόγω μείωσης της ενεργότητας της PAF-AH της συνδεδεμένης με τις πυκνές LDL (267).

Σε ασθενείς με υπέρταση η ενεργότητα του ενζύμου έχει βρεθεί αυξημένη σε σχέση με τους νορμοτασικούς (268), όπως επίσης αυξημένη παρατηρείται στην προεκλαμψία των εγκύων(269). Δεν έχει διευκρινισθεί αν η αυξημένη ενεργότητα του ενζύμου είναι το αίτιο ή το αποτέλεσμα της υπέρτασης, αφού ο PAF σε συγκεκριμένες συγκεντρώσεις προκαλεί υπόταση. Πιθανά κατά τη διάρκεια αύξησης της πίεσης να επάγεται η έκκριση του PAF -προκειμένου να μειωθεί η αρτηριακή πίεση-και έτσι ενεργοποιείται η έκκριση της PAF-AH, ή διαταραχές στη σύνθεση και κατανομή του ενζύμου να οδηγούν στην υπέρταση(270).

ii) Σηψαιμία-αυτοάνοσα νοσήματα-άσθμα

Σε ασθενείς με σοβαρή σηψαιμία η ενεργότητα του ενζύμου ήταν μικρότερη σε σύγκριση με υγιείς, παρά το ότι δεν παρατηρήθηκαν διαφορές στο



χρόνο ημιζωής του PAF (271). Σε άλλη μελέτη η ενεργότητα βρέθηκε μικρότερη σε ασθενείς με σήψη που πέθαναν σε σύγκριση με αυτούς που επέζησαν (272). Επιπλέον μικρή ενεργότητα του ενζύμου συσχετιζόταν με την ανάπτυξη ανεπάρκειας πολλαπλών οργάνων σε πολυτραυματίες(273).

Σε ασθενείς με ενεργό συστηματικό ερυθματώδη λύκο(ΣΕΛ) η ενεργότητα του ενζύμου βρέθηκε μικρότερη συγκρινόμενη με τη ενεργότητα ασθενών με μη ενεργό ΣΕΛ, υγιών, ασθενών με ρευματοειδή αρθρίτιδα και νεφρωσικών ασθενών. Η ενεργότητα αυτή συσχετιζόταν με τη LDL χοληστερόλη, η οποία ήταν σαφώς μειωμένη στους ασθενείς με ενεργό ΣΕΛ (274). Μικρότερη βρέθηκε και η ενεργότητα της PAF-AH πλάσματος σε παιδιά με ενεργό ρευματοειδή αρθρίτιδα σε σύγκριση με υγιή, καθώς επίσης μικρότερα επίπεδα HDL2 και HDL3 λιποπρωτεϊνών. Τα επίπεδα της ενεργότητας και των λιπιδίων συσχετιζόνταν με τα επίπεδα της CRP (275). Αντίθετα παλαιότερη μελέτη σε ενήλικες με ρευματοειδή αρθρίτιδα βρήκε υψηλότερη ενεργότητα στο πλάσμα και στο αρθρικό υγρό σε σύγκριση με υγιείς (276). Τέλος σε ασθενείς με AIDS η ενεργότητα της PAF-AH του πλάσματος ήταν αυξημένη, συσχετιζόταν με τα επίπεδα της ιντερφερόνης-α και των τριγλυκεριδίων και όχι με την ολική και LDL χοληστερόλη(277). Ενδιαφέρουσα είναι η παρατήρηση ότι τα επίπεδα δεν άλλαζαν σε περίπτωση φλεγμονής ή επιτυχημένης αντιρετροϊκής αγωγής.

Έχει ήδη αναφερθεί ο ρόλος του PAF στη φλεγμονώδη διεργασία των αεραγωγών που κλινικά εκφράζεται ως άσθμα. Πολλές μελέτες βρήκαν υψηλότερα επίπεδα PAF στο αίμα ενηλίκων και παιδιών με κρίση άσματος σε σύγκριση με υγιείς και ασθενείς σε ύφεση (278-280). Στις μελέτες αυτές η ενεργότητα του ενζύμου ήταν μικρότερη στους ασθενείς με κρίση άσματος (281). Ο Miwa και συν(282) βρήκαν ότι τα παιδιά στην Ιαπωνία με σοβαρό άσθμα είχαν υψηλότερη επίπτωση έλλειψης του ενζύμου, παρατήρηση που



επιβεβαίωσε η Stafforini βρίσκοντας υψηλή επίπτωση της μετάλλαξης V279F σε Ιάπωνες ασθματικούς (40,6% έναντι 32,7% σε υγιείς) (283). Αντιθέτως ο Satoh και συν(284) δεν απέδειξε συσχέτιση της μετάλλαξης και της συνεπαγόμενης έλλειψης του ενζύμου με τη σοβαρότητα του άσθματος. Τέλος σε ασθενείς με οξεία αναπνευστική δυσχέρεια (ARDS) βρέθηκε υψηλή ενεργότητα του ενζύμου στο βρογχοκυψελιδικό έκκριμα (BAL), καθώς και έκφραση του mRNA της PAF-AH στα κυψελιδικά μακροφάγα (285).

iii) Παθήσεις γαστρεντερικού

Η ενεργότητα της PAF-AH σε ασθενείς με χρόνια ηπατική νόσο είναι αυξημένη, χωρίς ωστόσο να συσχετίζεται με τα επίπεδα της LDL χοληστερόλης, πιθανά λόγω των σοβαρών διαταραχών του μεταβολισμού των λιπιδίων που παρατηρούνται στις ηπατοπάθειες. Υψηλή ενεργότητα παρατηρήθηκε και στη χρόνια χολόσταση (286,287). Πρόσφατη μελέτη επιβεβαιώνει την αυξημένη ενεργότητα της PAF-AH σε ασθενείς με νόσους των χοληφόρων και του ήπατος και μάλιστα τη συσχετίζει με τα επίπεδα της χολερυθρίνης (288). Μετά από μεταμόσχευση ήπατος τα επίπεδα της PAF-AH επανέρχονται στα φυσιολογικά(289).

Αυξημένα επίπεδα του ενζύμου έχουν βρεθεί στα κόπρανα ασθενών με νόσο Crohn, σε σύγκριση με ασθενείς με διάρροιες λόγω δυσαπορρόφησης ή ευερέθιστου εντέρου(290). Η ενεργότητα PAF-AH στο πλάσμα ασθενών με Crohn ήταν σημαντικά μικρότερη σε σύγκριση με υγιείς και συσχετιζόταν αρνητικά με την ενεργότητα της νόσου(291). Στην ίδια μελέτη στους ασθενείς η ενεργότητα ήταν μικρότερη σε δείγματα εντερικού βλεννογόνου ειλεού.

Στη νεκρωτική εντεροκολίτιδα-μια σοβαρή νόσο των πρώιμων ελλειποβαρών νεογνών όπου κύρια βλάβη είναι η ισχαιμία του εντέρου- έχει



ενοχοποιηθεί ο PAF ως βασικός μεσολαβητής της ιστικής υποξίας και φλεγμονής. Έγχυση PAF σε ποντίκια προκαλεί ισχαιμική νέκρωση του εντέρου, ενώ η χορήγηση ανταγωνιστών του προλαμβάνει τις βλάβες(292-294). Η ενεργότητα του ενζύμου όπως έχει ήδη αναφερθεί, είναι μικρότερη στα νεογνά και ακόμη μικρότερη στα νεογνά με νεκρωτική εντεροκολίτιδα(293). Το μητρικό γάλα που περιέχει PAF-AH(295) παίζει σημαντικό ρόλο στην πρόληψη της νεκρωτικής εντεροκολίτιδας(296).

Τέλος ενεργότητα του ενζύμου του πλάσματος βρέθηκε σε υλικό από το μέσο αυτί σε ασθενείς με μέση ωτίτιδα(297).

iv) Ανασυνδυσασμένη PAF-AH

Η χορήγηση ανασυνδυσασμένης PAF-AH *in vitro* και *in vivo* σε πειραματόζωα μπλοκάρει τις βιολογικές δράσεις του PAF και των οξειδωμένων λιπιδίων σε πολλά πειραματικά μοντέλα φλεγμονωδών νόσων. Αρχικά σε ιστοκαλλιέργειες μαστοκυττάρων η ανασυνδυσασμένη PAF-AH ανέστειλε την έκκριση σεροτονίνης που προκαλείται από τη δράση του PAF (298). Η χορήγησή της σε επίμυς αναστέλλει το προκαλούμενο από τον PAF πνευμονικό οίδημα(195), περιορίζει τη νέκρωση του εντέρου σε μοντέλο νεκρωτικής εντεροκολίτιδας(299,300), μειώνει το μέγεθος του εμφράκτου σε στεφανιαίο αγγείο που ισχαιμεί (301) και την έκταση της ισχαιμίας στον εγκέφαλο σε άμφω στένωση καρωτίδων νεογέννητου επίμυος(302). Επίσης η ενδοπεριτοναϊκή χορήγησή της σε μοντέλο άσθματος ποντικών μειώνει τις φλεγμονώδεις διεργασίες, την έκκριση βλέννας και την υπεραντιδραστικότητα των αεραγωγών (303), ενώ μειώνει κατά 80% τη θνησιμότητα από αλλεργικό σοκ (304,305).

Τα ευνοϊκά αυτά αποτελέσματα οδήγησαν στη σκέψη να χορηγηθεί η ανασυνδυσασμένη PAF-AH στον άνθρωπο με σκοπό να προληφθούν ή να



μειωθούν αποτελέσματα φλεγμονωδών διεργασιών. Αρχικά έγιναν φαρμακοκινητικές μελέτες σε υγιείς ενήλικες χωρίς παρενέργειες. Στη συνέχεια κλινική μελέτη φάσης 2B έλεγξε την αποτελεσματικότητα της ανασυνδυασμένης PAF-AH έναντι placebo σε ασθενείς με κίνδυνο δημιουργίας ARDS. Σε πειραματόζωα ο PAF φαίνεται να είναι βασικός μεσολαβητής στη δημιουργία βλαβών του πνεύμονα που μιμούνται εικόνα ARDS του ανθρώπου (306). Η θνησιμότητα ήταν σημαντικά μικρότερη στην ομάδα που χορηγήθηκε η PAF-AH έναντι της ομάδας placebo (14,5% vs 28,4%), όπως και η επίπτωση εμφάνισης ARDS ήταν μικρότερη στην πρώτη ομάδα.

5) PAF-AH και νεφρός

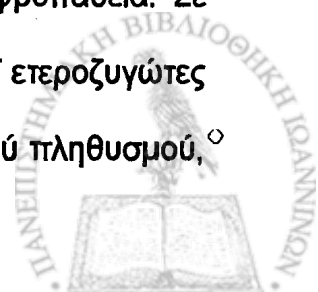
Όπως έχει ήδη αναφερθεί, έχει βρεθεί PAF στα ούρα φυσιολογικών (147). Η ποσότητα αυτή του PAF είναι πολύ μικρή και σε πειραματόζωα στα οποία μεταβάλλεται η διαπερατότητα του σπειράματος δεν επηρεάζεται ο ρυθμός έκκρισης του PAF στα ούρα (307). Ενεργότητα PAF-AH έχει βρεθεί στα ούρα φυσιολογικών (257) καθώς επίσης στο φλοιό και μυελό ανθρώπινου νεφρικού ιστού (308). Ασθενείς με χρόνια νεφρική ανεπάρκεια τελικού σταδίου που υποβάλλονται σε αιμοκάθαρση έχουν ενεργότητα του ενζύμου στο πλάσμα τους (309), αναμενόμενο άλλωστε αφού δεν είναι ο νεφρός η βασική πηγή του ενζύμου στο αίμα. Επιπλέον στη μελέτη του Millionis και συν(310) όλοι οι ασθενείς με μέτρια ως σοβαρή νεφρική ανεπάρκεια έχουν σημαντικά αυξημένη ενεργότητα στο πλάσμα συγκρινόμενη με υγιείς, ενώ συγκρίνοντας τις διάφορες μεθόδους υποκατάστασης νεφρικής λειτουργίας οι ασθενείς που υποβάλλονται σε συνεχή περιτοναϊκή κάθαρση έχουν τη μεγαλύτερη ενεργότητα. Δε βρέθηκε πάντως συσχέτιση της ενεργότητας με την κρεατινίνη ή την κάθαρση κρεατινίνης του ορού.



Ασθενείς με ΣΕΛ παρουσίαζαν αυξημένα επίπεδα PAF και μειωμένη ενεργότητα PAF-AH στο πλάσμα τους (274), ενώ σε μελέτη του Kirschbaum (257) η ενεργότητα του ενζύμου ήταν αυξημένη στα ούρα και συσχετιζόταν με τα επίπεδα της πρωτεΐνουρίας. Στην ίδια μελέτη ασθενείς με σπειραματονεφρίτιδα, νεφρωσικό σύνδρομο και φυσιολογική ή μη νεφρική λειτουργία είχαν αυξημένη ενεργότητα ενζύμου στα ούρα θετικά συσχετιζόμενη με την πρωτεΐνουρία και τη νεφρική βλάβη.

Ασθενείς με μεμβρανώδη σπειραματονεφρίτιδα παρουσίαζαν αυξημένα επίπεδα PAF στα ούρα θετικά συσχετιζόμενα με τη λευκωματουρία, ενώ η ενεργότητα του ενζύμου ήταν περίπου ίδια με τους υγιείς. Στο πλάσμα βρέθηκε μειωμένη ποσότητα PAF που αποδόθηκε σε αυξημένο καταβολισμό του (311). Αντιθέτως σε άλλη μελέτη (312) με ασθενείς με ιδιοπαθή σπειραματονεφρίτιδα και ποικίλου βαθμού πρωτεΐνουρία βρέθηκαν αυξημένα επίπεδα PAF στο αίμα και στα ούρα των ασθενών, μη συσχετιζόμενα με τη πρωτεΐνουρία και με τη βαρύτητα της βλάβης. Η ενεργότητα του ενζύμου βρέθηκε αυξημένη στο πλάσμα και μειωμένη στο φλοιό και στο μυελό του νεφρικού ιστού

Σε 14 παιδιά με νόσο ελαχίστων αλλοιώσεων βρέθηκαν αυξημένα επίπεδα PAF στα ούρα τους σε σύγκριση με παιδιά σε ύφεση νόσου(313), όπως το ίδιο συνέβαινε στα ούρα παιδιών με αιμολυτικό ουραιμικό σύνδρομο (314).

Τα τελευταία χρόνια με την ανακάλυψη της μετάλλαξης V279T έγιναν μελέτες σε ιαπωνικό πληθυσμό με νεφρολογικές νόσους για εύρεση πιθανών συσχετίσεων μεταξύ της μετάλλαξης, της συνεπαγόμενης έλλειψης του ενζύμου και της παθογένειας της νόσου. Μελετήθηκαν παιδιά με νόσο ελαχίστων αλλοιώσεων, με αιμολυτικό ουραιμικό σύνδρομο και με IgA νεφροπάθεια. Σε όλες τις μελέτες η επίπτωση της μετάλλαξης (TT ομοζυγώτες, GT ετεροζυγώτες και GG οι μη έχοντες τη μετάλλαξη) ήταν ίδια με αυτή του γενικού πληθυσμού, 

γεγονός που σημαίνει ότι δεν υπάρχει καμία συσχέτιση μεταξύ της μετάλλαξης και της εμφάνισης της νόσου. Στα παιδιά όμως με νόσο ελαχίστων αλλοιώσεων οι ετερόζυγοι GT παρουσίαζαν αυξημένη τάση για υποτροπή της νόσου σε σύγκριση με τους φυσιολογικούς GG (315), ενώ στο αιμολυτικό ουραιμικό σύνδρομο οι GT είχαν βαρύτερη κλινική εικόνα και χρειάστηκαν αιμοκάθαρση (314). Τέλος στη νεφροπάθεια IgA, οι GT και TT είχαν σημαντικά μεγαλύτερη πρωτεϊνουρία από τους GG και μεγαλύτερη υπερπλασία των μεσαγγειακών κυττάρων στη νεφρική βιοψία, στοιχείο εξέλιξης της νόσου, σε σύγκριση με τους GG (316).

Συμπερασματικά οι κλινικές μελέτες που μετρούν ενεργότητα της PAF-AH στο πλάσμα και στα ούρα ασθενών με νεφρική νόσο είναι λιγοστές, με μικρό αριθμό ασθενών και με μεγάλη ετερογένεια όσον αφορά τη νεφροπάθεια, την ηλικία των ασθενών και το βαθμό έκπτωσης της νεφρικής λειτουργίας με αποτέλεσμα η εξαγωγή οποιουδήποτε γενικού συμπεράσματος να είναι δύσκολη. Παρόλο αυτά είναι σαφής η ανάμειξη πλην του PAF και της PAF-AH στην παθοφυσιολογία της νεφρικής βλάβης.



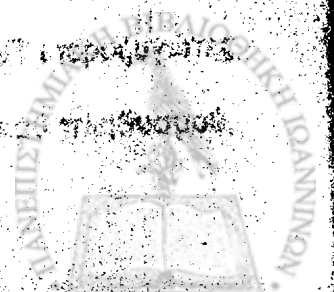
The first part of the document discusses the importance of maintaining accurate records and the role of the auditor in ensuring the integrity of the financial statements. It highlights the need for transparency and accountability in the reporting process.

The second part of the document focuses on the specific requirements for the audit report, including the format and content. It provides detailed guidance on how to structure the report and what information should be included.

The third part of the document addresses the ethical considerations that auditors must adhere to. It emphasizes the importance of objectivity, independence, and confidentiality in the audit process.

The fourth part of the document discusses the role of the audit committee and the board of directors in overseeing the audit process. It outlines the responsibilities of these bodies and how they should interact with the auditors.

The fifth part of the document provides a summary of the key points discussed in the document and offers some final thoughts on the importance of the audit process.



ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ



I. ΥΛΙΚΟ

Μελετήθηκαν 18 ασθενείς που εισήχθησαν στη Νεφρολογική Κλινική, 8 με νεφρωσικό σύνδρομο (ΝΣ) και 10 με πρωτεϊνουρία μη νεφρωσικού τύπου (ΠΜΝΤ). Σε όλους τους ασθενείς της μελέτης αποκλείστηκαν αίτια δευτεροπαθούς νεφρωσικού συνδρόμου ή συστηματικού νοσήματος όπως σακχαρώδης διαβήτης, συστηματικός ερυθηματώδης λύκος, ηπατική νόσος, θυρεοειδοπάθεια, αμυλοείδωση κ.α. Η διάγνωση της ιδιοπαθούς σπειραματονεφρίτιδας επιβεβαιώθηκε ιστολογικά σε 16 ασθενείς που υποβλήθηκαν σε διαδερμική βιοψία νεφρού με διαγνώσεις όπως : νόσος ελαχίστων αλλοιώσεων (n=2), μεμβρανώδη σπειραματονεφρίτιδα (n=6), IgA νεφροπάθεια (n=1), εστιακή και τμηματική σπειραματοσκλήρυνση (n=2), μεσαγγειοϋπερπλαστική σπειραματονεφρίτιδα (n=5). Σε 2 ασθενείς, στους οποίους η διενέργεια διαδερμικής βιοψίας νεφρού κρίθηκε επικίνδυνη λόγω ύπαρξης πολλαπλών νεφρικών κύστεων, ετέθη η διάγνωση της μεμβρανώδους σπειραματονεφρίτιδας βάσει των κλινικών χαρακτηριστικών και των εργαστηριακών εξετάσεων. Στους 5 από τους 6 ασθενείς με νεφρωσικό σύνδρομο, η ιστολογική έκθεση περιέγραφε στο διαμεσοσωληναριακό χώρο μέτριου βαθμού ίνωση και ατροφία σωληναρίων. Κανένας ασθενής δεν λάμβανε αγωγή κατά τη διάρκεια της μελέτης. Επίσης κανένας ασθενής δεν παρουσίαζε αρτηριακή υπέρταση ή νεφρική ανεπάρκεια κατά την εισαγωγή του. Ως ομάδα ελέγχου επιλέχθηκαν 20 υγιή άτομα ίδιας ηλικίας και φύλου.

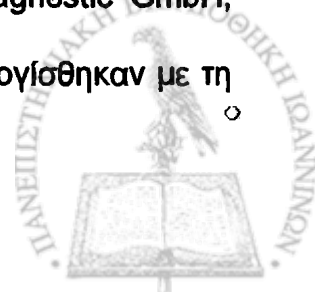
Σε όλους τους ασθενείς διενεργήθηκαν βασικές αιματολογικές και βιοχημικές εξετάσεις. Ειδικότερα προσδιορίστηκαν οι λιπιδαιμικές παράμετροι, η ουρία, η κρεατινίνη, οι ολικές πρωτεΐνες και η αλβουμίνη ορού καθώς και η κρεατινίνη και οι πρωτεΐνες στα ούρα 24ωρης συλλογής.



II. ΜΕΘΟΔΟΙ

Όλοι οι συμμετέχοντες στη μελέτη ακολούθησαν τη συνηθισμένη τους δίαιτα κατά τη διάρκεια της μελέτης. Φλεβικό δείγμα αίματος συλλέχθηκε σε πλαστικό σωλήνα που περιείχε αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ (EDTA) ως αντιπηκτικό από κάθε ασθενή και φυσιολογικό άτομο κατόπιν 14ωρης νηστείας. Επίσης από κάθε άτομο έγινε συλλογή ούρων 24ώρου στα οποία προστέθηκαν EDTA 10 μg/μl και αντιβιοτικό γενταμικίνη 1,25 μg/μl (garamycin).

Δείγμα ορού και δείγμα της 24ωρης συλλογής ούρων χρησιμοποιήθηκαν για έλεγχο ρουτίνας. Υπολογίστηκαν η χοληστερόλη και τα τριγλυκερίδια ορού με ενζυματική χρωματογραφική μέθοδο με τη χρήση αναλυτή RA-1000 (Technicon Instruments, NY, USA). Τα επίπεδα της HDL-χοληστερόλης μετρήθηκαν με την ίδια μέθοδο στο υπερκείμενο κατόπιν καθίζησης των υπόλοιπων λιποπρωτεϊνών με δεξτράνη θειικού μαγνησίου. Ο προσδιορισμός της LDL-χοληστερόλης έγινε με βάση τον τύπο του Friedwald (317) ως εξής: $LDL\text{-}\chiοληστερόλη = \text{Ολική-}\chiοληστερόλη - \text{Τριγλυκερίδια}/5 - HDL\text{-}\chiοληστερόλη$ (mg/100ml). Ο τύπος αυτός δεν ισχύει όταν στο δείγμα υπάρχουν χυλομικρά, όταν το δείγμα προέρχεται από ασθενή με τύπου III υπερλιπιδαιμία, ή όταν τα τριγλυκερίδια υπερβαίνουν τα 400mg/100 ml. Οι αποπρωτεΐνες ApoA1 και ApoB μετρήθηκαν με ανοσονεφελομετρία με τη βοήθεια αναλυτή Beckman (Beckman Instruments, CA, USA). Τα επίπεδα της Lp(a) μετρήθηκαν με την ανοσοενζυμική μέθοδο Macra Lp(a) (Terumo Medical Corporation Diagnostic Division, Elkton, MD, USA). Το χαμηλότερο όριο ανίχνευσης της Lp(a) ήταν 0,8 mg/dl. Η κρεατινίνη ορού και ούρων προσδιορίσθηκε με τη μέθοδο Jaffe με τη βοήθεια αναλυτή Olympus (Olympus Diagnostic GmbH, Ireland), ενώ οι ολικές πρωτεΐνες στα ούρα και στον ορό υπολογίσθηκαν με τη



μέθοδο Biuret. Η αλβουμίνη ορού μετρήθηκε με τη μέθοδο bromocresol green με τη βοήθεια αναλυτή Olympus (Olympus Diagnostica GmbH, Ireland).

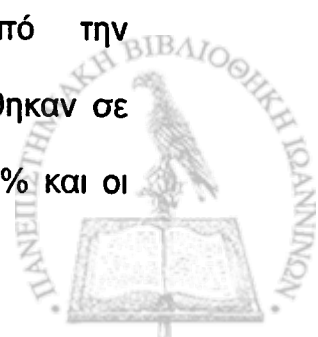
Στη συνέχεια δείγμα αίματος φυγοκεντρήθηκε στις 3100 rpm για 15 λεπτά για διαχωρισμό του πλάσματος, στο οποίο προστέθηκε αντιπηκτικό EDTA 5 μl/ml και αντιβιοτικό γενταμυκίνη 1,25 μl/ml (garamycin). Σε δείγμα 250 μl πλάσματος έγινε καταβύθιση ApoB-λιποπρωτεϊνών με προσθήκη φωσφοβολφραμικού οξέος και ιόντων μαγνησίου με στόχο την απομόνωση HDL-χοληστερόλης. Τα ούρα της συλλογής φυγοκεντρήθηκαν στις 3500rpm για 15 λεπτά για την απομάκρυνση του ιζήματος και ρυθμίστηκε το pH στο 7.4. Δείγμα ούρων διατηρήθηκε στους -80°C για περαιτέρω ανάλυση.

Σε τέσσερις ασθενείς με νεφρωσικό σύνδρομο ο μεγαλύτερος όγκος ούρων συμπυκνώθηκε 60 ως 100 φορές με υπερδιήθηση σε συσκευή Amicon και μεμβράνη φίλτρου 10 kDa. Δείγμα των συμπυκνωμένων ούρων καθώς και πλάσμα των ασθενών υποβλήθηκε σε ηλεκτροφόρηση αγαρόζης.

Δείγμα των συμπυκνωμένων ούρων καθώς και πλάσμα των ασθενών αυτών υποβλήθηκαν επίσης σε ισοπυκνική υπερφυγοκέντρηση βαθμίδωσης πυκνοτήτων. Παράλληλα πλάσμα 6 υγιών ατόμων υποβλήθηκε στην ίδια διαδικασία. Στα κλάσματα που προέκυψαν από την υπερφυγοκέντρηση έγινε προσδιορισμός χημικής σύστασης (πρωτεΐνης, χοληστερόλης, τριγλυκεριδίων) με ενζυματικές μεθόδους χρησιμοποιώντας έτοιμα kits BioMerieux.

Η ενεργότητα του ενζύμου PAF-AH μετρήθηκε στο πλάσμα, στην HDL, σε δείγμα της 24ωρης συλλογής ούρων και σε όλα τα κλάσματα που προέκυψαν από την υπερφυγοκέντρηση πλάσματος και συμπυκνωμένων ούρων.

Στη συνέχεια όλα τα κλάσματα που προέκυψαν από την υπερφυγοκέντρηση πλάσματος και συμπυκνωμένων ούρων υποβλήθηκαν σε ηλεκτροφόρηση SDS-πολυακρυλαμιδίου σε πλάκες βαθμίδωσης 5-19% και οι



ζώνες ανεδείχθησαν με χρώση νιτρικού αργύρου. Πρωτεΐνες με πρότυπα μοριακά βάρη και ανασυνδυασμένη PAF-AH ηλεκτροφορήθηκαν ταυτόχρονα. Μετά την ηλεκτροφόρηση ακολούθησε μεταφορά των πρωτεϊνών και ανοσοαποτύπωση Western με αντισώματα αντι-αποπρωτεΐνης B-100, αντι-αποπρωτεΐνης(a), πολυκλωνικού αντισώματος κατά της PAF-AH του πλάσματος, μονοκλωνικού αντισώματος κατά της ενδοκυττάριας PAF-AH ισομορφής II.

Αναλυτικά οι μέθοδοι που ακολουθήθηκαν έχουν ως εξής :

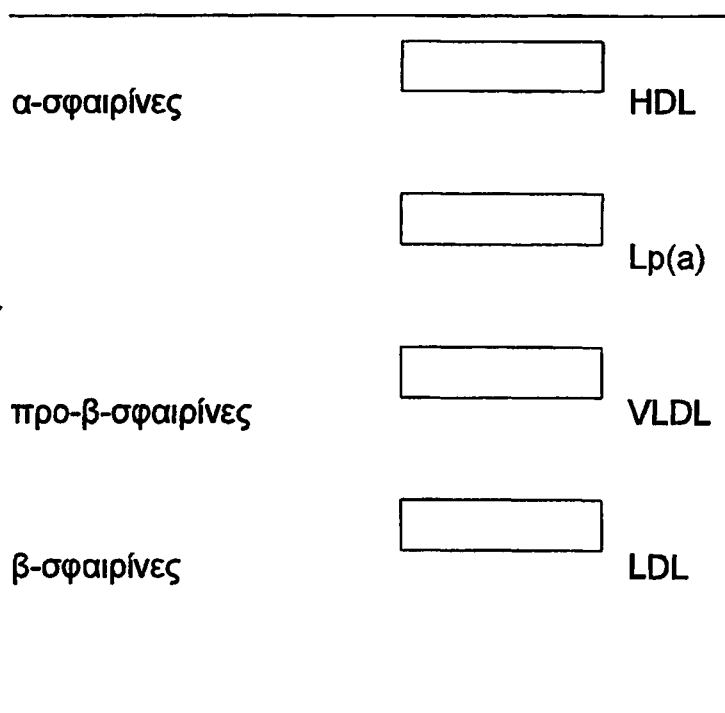


Α. ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΛΙΠΟΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΣΕ ΠΗΚΤΩΜΑ ΑΓΑΡΟΖΗΣ

Αρχή της μεθόδου

Η ηλεκτροφόρηση είναι ποιοτική κυρίως μέθοδος διαχωρισμού των λιποπρωτεϊνών με βάση το ηλεκτρικό φορτίο και το μέγεθός τους. Κατά την ηλεκτροφόρηση των λιποπρωτεϊνών μεταναστεύουν και οι πρωτεΐνες του πλάσματος όμως η χρωστική που χρησιμοποιείται είναι μόνο για λιπίδια. Η ηλεκτροφόρηση ενός νορμολιπιδαιμικού ατόμου με Lp(a) θα είναι ως εξής:

Μέτωπο



Αρχή

Δείγμα

Χρησιμοποιείται πλάσμα με EDTA καθώς και δείγμα συμπυκνωμένων ούρων. Η συντήρηση των δειγμάτων γίνεται στους 4°C το πολύ για 3 μέρες



Όργανα- Αντιδραστήρια

- Συσκευή ηλεκτροφόρησης Sebia -K20,
- Τροφοδοτικό.
- Εμπορική συσκευασία Kit ηλεκτροφόρησης Hydrageel Lipo + Lp(a) (Sebia) που περιλαμβάνει:
 - 10 πλάκες με πηκτή αγαρόζης, έτοιμες για χρήση.
 - Φιαλίδια συμπυκνωμένου ρυθμιστικού διαλύματος Tris-βαρβιτουρικού. Το περιεχόμενο κάθε φιαλιδίου αραιώνεται στα 1000ml με d H₂O
 - Φιαλίδια συμπυκνωμένης χρωστικής 3% Sudan black.
 - Η παρασκευή του διαλύματος χρώσης γίνεται ως εξής: Σε κωνική φιάλη αναμιγνύονται 160 ml απόλυτης αιθανόλης (EtOH) με 2 ml 3% Sudan black. Υπό συνεχή ισχυρή ανάδευση ακολουθεί προσθήκη, 140 ml d H₂O.
- Ειδική μεμβράνη με θέσεις τοποθέτησης των δειγμάτων.
- Διηθητικά χαρτιά
- Διάλυμα EtOH 45% σε d H₂O (v/v)

Εκτέλεση ηλεκτροφόρησης

Η πλάκα με την πηκτή αγαρόζης τοποθετείται σε επιφάνεια καθαρισμένη εκ των προτέρων με 45% EtOH. Η πηκτή έχει χαραγμένα δύο βέλη τα οποία καθορίζουν την θέση τοποθέτησης της μεμβράνης των δειγμάτων. Η υγρασία που υπάρχει στην επιφάνεια της πηκτής απορροφάται γρήγορα με την εφαρμογή διηθητικού χαρτιού στην θέση που ορίζεται από τα βέλη. Στην συνέχεια εφαρμόζεται η μεμβράνη τοποθέτησης των δειγμάτων πάνω στην πηκτή της αγαρόζης ώστε τα βέλη της μεμβράνης να συμπίπτουν με τα βέλη



της επιφάνειας της πηκτής. Κατά την εφαρμογή της μεμβράνης στην αгарόζη πρέπει να αποφεύγεται η δημιουργία φυσαλίδων αέρα γιατί παρεμποδίζουν την μετανάστευση των δειγμάτων. Έπειτα προστίθενται τα δείγματα στις κατάλληλες θέσεις με αυτόματη πιπέτα χωρίς να τραυματιστεί η αгарόζη. Ο όγκος των δειγμάτων για ορό ή πλάσμα είναι 2 μl ενώ για τα ούρα 10 μl. Χρησιμοποίηση μεγάλων ποσοτήτων δείγματος έχει ως αποτέλεσμα την εμφάνιση ουρών που καθιστά δύσκολη την ταυτοποίηση των λιποπρωτεϊνών. Τα δείγματα αφήνονται για 10 min ώστε να προσροφηθούν πλήρως στην αгарόζη. Στη συνέχεια αφαιρείται η ειδική μεμβράνη και η πηκτή είναι έτοιμη για την ηλεκτροφόρηση. Σε κάθε διαμέρισμα της συσκευής ηλεκτροφόρησης προστίθενται 150 ml ρυθμιστικού διαλύματος Tris-βαρβιτουρικού και η πηκτή της αгарόζης τοποθετείται ανεστραμμένη πάνω στη γέφυρα της ηλεκτροφόρησης με τα δείγματα προς την καθοδική πλευρά.

Συνθήκες ηλεκτροφόρησης

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

Τάση σταθερή 50V

Ένταση ρεύματος 3mA για κάθε

δείγμα

Διάρκεια ηλεκτροφόρησης 90min

Χρώση των λιποπρωτεϊνών

Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης η πηκτή στεγνώνεται σε ρεύμα θερμού αέρα ($\leq 80^{\circ}\text{C}$). Η πλάκα υπό μορφή πλέον ζελατίνης τοποθετείται στο ειδικό δοχείο χρώσης που περιέχει το διάλυμα της χρωστικής, όπου αφήνεται για 15 min. Η περίσσεια της χρωστικής ξεπλένεται με νερό βρύσης. Στη συνέχεια η ζελατίνη



τοποθετείται σε λεκάνη που περιέχει 45% EtOH για 5 min. Η περίσσεια της EtOH στεγνώνεται σε ρεύμα θερμού αέρα.

B. ΙΣΟΠΥΚΝΙΚΗ ΥΠΕΡΦΥΓΟΚΕΝΤΡΗΣΗ ΒΑΘΜΙΔΩΣΗΣ ΠΥΚΝΟΤΗΤΩΝ

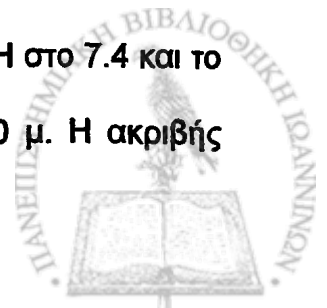
Υλικά – Όργανα

- Πυκνόμετρο
- Υπερφυγόκεντρος (L7, Beckman)
- Κεφαλή υπερφυγοκέντρου (SW41, Beckman)
- Σωλήνες υπερφυγοκέντρου για κεφαλή Ultraclear 13 ml για κεφαλή SW41 (Beckman)
- Μεμβράνη διαπίδυσης (Sigma). Η μεμβράνη ενεργοποιείται σε H₂O για 3 h και έχει όριο αποκλεισμού μεγαλύτερο από 12000
- Φίλτρα διήθησης 0,20 μ (Corning)
- KBr. Το KBr ξηραίνεται σε κλίβανο στους 100°C για 24 h και διατηρείται σε ξηραντήρα
- Garamycin (Gentamycin sulfate, Schering-Plough): Το διάλυμα περιέχει 40mg θειικής γενταμυκίνης/ml σε φιαλίδια των 2 ml

Διαλύματα εργασίας

•10% EDTA. (Titriplex III, pH 7,0) : 12,8247 g EDTANa₂·2H₂O διαλυτοποιούνται σε 90 ml H₂O. Ρυθμίζεται το pH στο 7,0 και ο όγκος συμπληρώνεται στα 100 ml με H₂O. Το διάλυμα διατηρείται στους 4°C.

•Διάλυμα NaCl (d=1.006 g/ml) : 9 g NaCl, 0,4 g EDTA και 100 μl Garamycin διαλυτοποιούνται σε 1 L H₂O. Ρυθμίζεται το pH στο 7.4 και το διάλυμα φιλτράρεται υπό κενό σε φίλτρα διήθησης 0,20 μ. Η ακριβής



πυκνότητα του διαλύματος μετριέται σε πυκνόμετρο. Το διάλυμα διατηρείται στο ψυγείο, στους 4°C.

•Διάλυμα NaCl-KBr ($d=1,357 \text{ g/ml}$) : 153 g NaCl, 354 g KBr, 0,4 g EDTA και 10 ml Garamycin διαλυτοποιούνται σε 1 L H₂O. Ρυθμίζεται το pH στο 7,4 και το διάλυμα φιλτράρεται υπό κενό σε φίλτρα διήθησης 0,20 μ. Η ακριβής πυκνότητα του διαλύματος μετριέται σε πυκνόμετρο. Το διάλυμα διατηρείται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, γιατί λόγω της υψηλής του πυκνότητας σχηματίζει κρυστάλλους στο ψυγείο.

•Διαλύματα NaCl-KBr ($d=1,019, 1,063$ και $1,240 \text{ g/ml}$) : Τα διαλύματα NaCl-KBr διαφόρων πυκνοτήτων παρασκευάζονται με την ανάμειξη κατάλληλων όγκων διαλύματος NaCl $1,006 \text{ g/ml}$ και διαλύματος NaCl-KBr $d=1,357 \text{ g/ml}$. Οι όγκοι των διαλυμάτων υπολογίζονται με τη χρήση του παρακάτω τύπου:

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

όπου: d_x , η επιθυμητή τελική πυκνότητα του διαλύματος

V_A και d_A , ο όγκος και η ακριβής πυκνότητα του διαλύματος NaCl $1,006 \text{ g/ml}$

V_B και d_B , ο όγκος και η ακριβής πυκνότητα του διαλύματος NaCl-KBr $d=1,357 \text{ g/ml}$

Μετά την παρασκευή γίνεται ακριβής μέτρηση της πυκνότητας κάθε διαλύματος και η πυκνότητα ρυθμίζεται στην τελική επιθυμητή τιμή της με την προσθήκη διαλύματος NaCl $d=1,006 \text{ g/ml}$ ή NaCl-KBr $d=1,357 \text{ g/ml}$, ο όγκος του οποίου υπολογίζεται εκ νέου με τη χρήση της εξίσωσης {1} Τα διαλύματα διατηρούνται στους 4°C.



Αρχή της μεθόδου

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

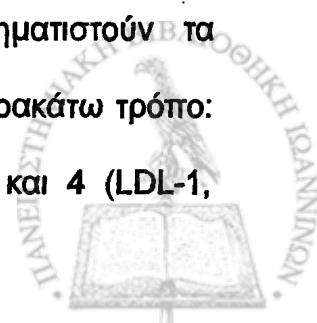
Πειραματική πορεία

Επιστοιίβαση των διαλυμάτων διαφόρων πυκνοτήτων και υπερφυγοκέντρωση

3 ml πλάσματος ή 3 ml ούρων αναμιγνύονται με 0,9660 g στερεού KBr, έτσι ώστε η πυκνότητα του πλάσματος ή των ούρων να γίνει 1,21 g/ml. Ακριβώς 3 ml αυτού του πλάσματος ή των ούρων μεταφέρονται με πιπέτα Pasteur στο σωλήνα της υπερφυγοκέντρου, όπου έχουν ήδη τοποθετηθεί στον πυθμένα 2 ml διαλύματος NaCl-KBr $d=1,24$ g/ml. Η επιστοιίβαση των υπολοίπων διαλυμάτων γίνεται με όργανο αυτόματης ροής. (Auto-densi flow, Buchler Instruments) και επιστοιιβάζονται διαδοχικά 2 ml διαλύματος NaCl-KBr $d=1,063$ g/ml, 2,5 ml διαλύματος NaCl-KBr $d=1,019$ g/ml και τέλος 2,5 ml διαλύματος NaCl $d=1,006$ g/ml. Οι σωλήνες της υπερφυγοκέντρωσης ζυγοσταθμούνται και τοποθετούνται στις υποδοχές του ρότορα SW-41. Ακολουθεί υπερφυγοκέντρωση στις 40000 rpm, στους 15°C για 44 h. Μετά το πέρας της υπερφυγοκέντρωσης συλλέγονται προσεκτικά με τη βοήθεια αυτόματης πιπέτας 30 κλάσματα, όγκου 400 μl το καθένα, από την κορυφή του σωλήνα προς τα κάτω.

Ανασύσταση των υποκλασμάτων των λιποπρωτεϊνών

Συγκεκριμένα κλάσματα αναμιγνύονται ώστε να σχηματιστούν τα υποκλάσματα των λιποπρωτεϊνών. Η ανάμιξη γίνεται με τον παρακάτω τρόπο: κλάσματα 1 και 2 (VLDL+IDL, $d < 1.019$ g/ml), κλάσματα 3 και 4 (LDL-1,



d=1.019-1.023 g/ml), κλάσματα 5 και 6 (LDL-2, d=1.023-1.029 g/ml), κλάσματα 7 και 8 (LDL-3, d=1.029-1.039 g/ml), κλάσματα 9 και 10 (LDL-4, d=1.039-1.050 g/ml), κλάσματα 11 και 12 (LDL-5, d=1.050-1.63 g/ml), κλάσματα 13 έως 16 (HDL-2, d=1.063-1.100 g/ml), κλάσματα 17 έως 22 (HDL-3, d=1.100-1.167 g/ml), κλάσματα 23 και 24 (VHDL, d=1.167-1.190 g/ml).

Γ. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ BSA

Όργανα-Αντιδραστήρια

- Φωτόμετρο Microelisa
- Πλακίδιο 96 θέσεων
- Αντιδραστήριο A : Το αντιδραστήριο A είναι μίγμα ανθρακικού νατρίου, διπτανθρακικού νατρίου, δισιχρονικού οξέως και ταρταρικού νατρίου σε 0,2N NaOH
- Αντιδραστήριο B: Διάλυμα 4% CuSO₄
- Πρότυπο διάλυμα 2mg/ml BSA σε 0,9% NaCl και 0,05%NaN₃

Διαλύματα εργασίας

Πρότυπο διάλυμα BSA : Παρασκευάζονται με κατάλληλη αραίωση του διαλύματος BSA έτσι ώστε να προκύψουν διαλύματα 0,2-1 mg/ml BSA. Τα πρότυπα διαλύματα διατηρούνται στους -20°C

Διάλυμα εργασίας : Προκύπτει από την ανάμειξη των αντιδραστηρίων A και B σε αναλογία 50:1(v/v). Το αντιδραστήριο παρασκευάζεται λίγο πριν τη χρήση του

Αρχή της μεθόδου



Τα ιόντα Cu^{2+} ανάγονται αρχικά από τις πρωτεΐνες σε αλκαλικό περιβάλλον προς ιόντα Cu^+ , καθένα από τα οποία σχηματίζει στη συνέχεια έγχρωμο υδατοδιαλυτό σύμπλοκο με 2 μόρια δισιχρονικού οξέως. Το τελευταίο απορροφά στα 560nm.

Πειραματική διαδικασία

Σε πλακίδια των 96 θέσεων τοποθετούνται 10 μl δείγματος και 10 μl προτύπων. Στη συνέχεια προστίθενται με πολυπιπέτα 200 μl του διαλύματος εργασίας σε κάθε θέση της πλάκας. Η πλάκα ανακινείται ήπια και επωάζεται στους 37°C για 30 λεπτά. Κατόπιν εισάγεται στο φωτόμετρο στα 560nm με φίλτρο αναφοράς τα 620nm.

Επεξεργασία των αποτελεσμάτων

Οι απορροφήσεις των μετρήσεων μετατρέπονται σε συγκεντρώσεις με τη βοήθεια πρότυπης καμπύλης. Απορρόφηση= $a+b \cdot$ συγκέντρωση (όπου a και b οι συντελεστές της ευθείας γραμμής). Από την εξίσωση της πρότυπης καμπύλης και από τις απορροφήσεις των δειγμάτων υπολογίζονται τα $\mu\text{g/ml}$ πρωτεΐνης που περιέχουν τα δείγματα.

Δ. ΕΝΖΥΜΙΚΟΣ ΦΩΤΟΜΕΤΡΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΟΛΙΚΗΣ ΧΟΛΗΣΤΕΡΟΛΗΣ

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ-ΌΡΓΑΝΑ

Ο προσδιορισμός γίνεται με τη χρήση εμπορικής συσκευασίας kit (bioMerieux) που περιλαμβάνει τα παρακάτω αντιδραστήρια:

- R1 0,1 mM ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών, pH 6,9, 15 mM φαινόλη, 3,75 mM χολικό Na.



- R2 0,5 mM 4-αμινο-αντιπιρρίνη, εστεράση της χοληστερόλης ≥ 125 U/L, οξειδάση της χοληστερόλης ≥ 200 U/L, υπεροξειδάση ≥ 1000 U/L.
- R3 πρότυπο διάλυμα χοληστερόλης, 200mg/100ml. Γίνονται αραιώσεις του προτύπου με απεσταγμένο H₂O ώστε η κλίμακα συγκεντρώσεων των προτύπων να κυμαίνεται από 0,2 mg/ml μέχρι 2 mg/ml.
- Φωτόμετρο microelisa.

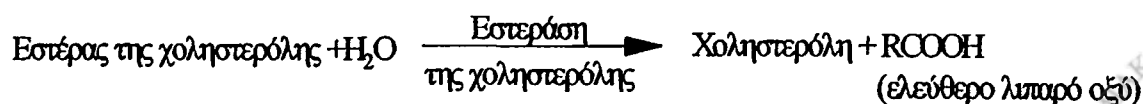
Διάλυμα εργασίας

Το περιεχόμενο του R2 διαλυτοποιείται με την προσθήκη 25 ml του R1 και αφήνεται για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου υπό ήπια ανάδευση. Το διάλυμα που προκύπτει είναι σταθερό για 3 μήνες στους 4°C.

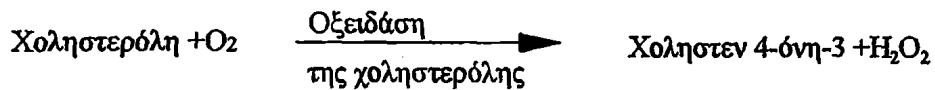
Αρχή της μεθόδου

Οι ενζυμικές μέθοδοι φωτομετρικών προσδιορισμών που θα περιγραφούν στηρίζονται στην παραγωγή H₂O₂ μετά την επίδραση εξειδικευμένου οξειδωτικού ενζύμου. Το παραγόμενο H₂O₂ παρουσία υπεροξειδάσης οξειδώνει παράγωγα της φαινόλης προς παράγωγα κινόνης τα οποία εξαιτίας των συζυγών διπλών δεσμών τους είναι χρωμοφόρα και απορροφούν στο ορατό (118). Η παρακάτω ακολουθία αντιδράσεων δίνει την αρχή του ενζυμικού φωτομετρικού προσδιορισμού της χοληστερόλης.

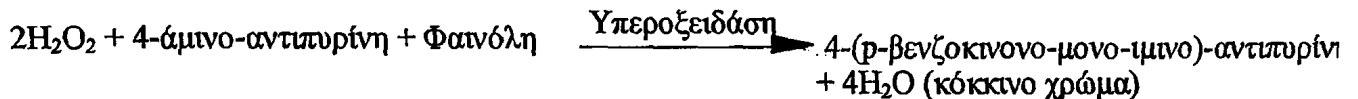
Υδρόλυση της εστεροποιημένης χοληστερόλης:



Οξείδωση της χοληστερόλης παρουσία εξειδικευμένης οξειδάσης:



Αντίδραση ανίχνευσης χρώματος. Αναγωγή του H_2O_2 :



Πειραματική διαδικασία

Σε πλάκα των 96 θέσεων τοποθετούνται 10 μl δείγματος καθώς και 10 μl από κάθε συγκέντρωση προτύπων. Στη συνέχεια προσθέτονται με πολυκάναλη πιπέτα σταθερού όγκου, 200 μl του διαλύματος εργασίας σε κάθε θέση της πλάκας. Η πλάκα ανακινείται ήπια, και επωάζεται στους 37°C για 5 λεπτά. Έπειτα εισάγεται στο φωτόμετρο microelisa όπου και φωτομετρείται στα 492 nm με φίλτρο αναφοράς τα 620 nm.

Επεξεργασία των αποτελεσμάτων

Με βάση τις απορροφήσεις των προτύπων δειγμάτων σχεδιάζεται με την βοήθεια ηλεκτρονικού υπολογιστή, η βέλτιστη ευθεία που έχει στον άξονα των X την συγκέντρωση της χοληστερόλης των προτύπων και στον άξονα των Y τις απορροφήσεις των προτύπων. Από την εξίσωση της πρότυπης καμπύλης και από τις απορροφήσεις των δειγμάτων υπολογίζεται η συγκέντρωση χοληστερόλης των δειγμάτων.



Ε. ΕΝΖΥΜΙΚΟΣ ΦΩΤΟΜΕΤΡΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ HDL-ΧΟΛΗΣΤΕΡΟΛΗΣ

Αντιδραστήρια

Ο προσδιορισμός γίνεται με τη χρήση εμπορικής συσκευασίας kit (Sigma diagnostics) που περιλαμβάνει το διάλυμα καταβύθισης το οποίο περιέχει θειική δεξτράνη και ιόντα μαγνησίου. Είναι σταθερό στη συντήρηση μέχρι την ημερομηνία λήξης του.

Αρχή της μεθόδου

Οι λιποπρωτεΐνες που περιέχουν apo B, όπως τα χυλομικρά, οι VLDL οι LDL και η Lp(a) κροκιδώνονται και καταβυθίζονται με την προσθήκη θειικής δεξτράνης και ιόντων μαγνησίου στο πλάσμα (119). Μετά από φυγοκέντρηση παραμένει στο υπερκείμενο μόνο η HDL της οποίας η περιεκτικότητα σε χοληστερόλη προσδιορίζεται ενζυμικά.

Πειραματική διαδικασία

Σε πλαστικό κωνικό σωλήνα erpendorf αναμιγνύονται 250 μl πλάσματος με 200μl διαλύματος Heparin και 25μl διάλυμα καταβύθισης. Ακολουθεί καλή ανάδευση και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά ακριβώς. Στην συνέχεια γίνεται φυγοκέντρηση στις 3000 στροφές για 5 λεπτά. Το υπερκείμενο της φυγοκέντρησης περιέχει την HDL και χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό της περιεχόμενης χοληστερόλης. Ο προσδιορισμός γίνεται όπως έχει ήδη περιγραφεί με μόνη διαφορά ότι χρησιμοποιούμε 20 μl δείγματος και προτύπων διαλυμάτων. Η HDL είναι σταθερή για 5 μέρες στους 4°C ή για 2 εβδομάδες στους -20°C.



Επεξεργασία αποτελεσμάτων

Η τιμή της συγκέντρωσης χοληστερόλης που υπολογίζεται πολλαπλασιάζεται με τον συντελεστή 1.5 που εκφράζει την αραίωση λόγω προσθήκης του αντιδραστηρίου καταβύθισης.



ΣΤ. ΕΝΖΥΜΙΚΟΣ ΦΩΤΟΜΕΤΡΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΡΙΓΛΥΚΕΡΙΔΙΩΝ ΣΤΟ ΠΛΑΣΜΑ

Αντιδραστήρια-Όργανα

Ο προσδιορισμός γίνεται με τη χρήση εμπορικής συσκευασίας kit (bioMerieux) που περιλαμβάνει τα παρακάτω αντιδραστήρια:

- R1 2,29 mM γλυκερόλη
- R2 100 mM διάλυμα Tris pH 7,6; 2,7 mM παραχλωροφαινόλη και 4 mM μαγνήσιο
- R3 0,4 mM 4-αμινο-αντιπυρίνη, λιπάση ≥ 1000 U/L, γλυκεροκινάση ≥ 200 U/L, οξειδάση της 3-φωσφογλυκερόλης ≥ 2000 U/L, υπεροξειδάση ≥ 200 U/L και 0.8 mM ATP
- R4 Πρότυπο διάλυμα τριγλυκεριδίων, 200mg/100ml. Γίνονται αραιώσεις του προτύπου διαλύματος με απεσταγμένο H₂O για να πάρουμε συγκεντρώσεις από 0,2 mg/ml μέχρι 2 mg/ml.
- Φωτόμετρο microelisa.

Διάλυμα εργασίας

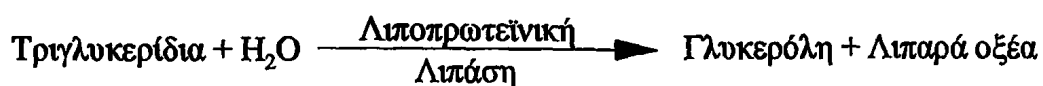
Το περιεχόμενο του R2 διαλυτοποιείται με την προσθήκη 25 ml του R1. Αφήνεται για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου υπό ήπια ανάδευση. Είναι σταθερό για 4 εβδομάδες στους 4°C.

Αρχή της μεθόδου

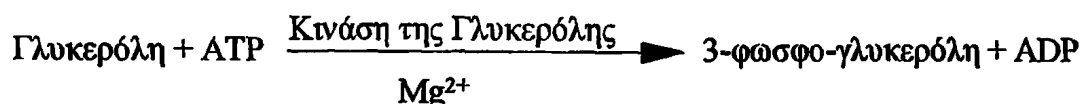
Η παρακάτω ακολουθία αντιδράσεων δίνει την αρχή του ενζυμικού φωτομετρικού προσδιορισμού των τριγλυκεριδίων ().



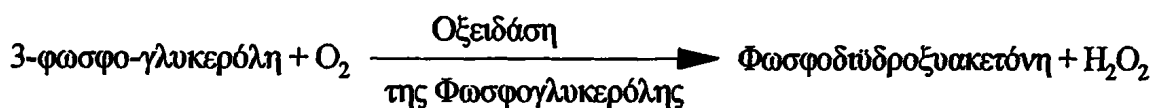
Υδρόλυση των τριγλυκεριδίων:



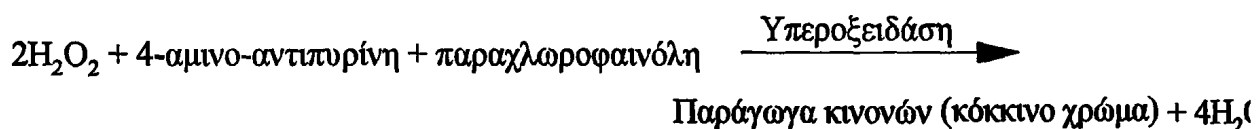
Φωσφορυλίωση της γλυκερόλης:



Οξειδωση της φωσφογλυκερόλης:



Μέτρηση του παραγόμενου H_2O_2 :



Πειραματική διαδικασία

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



Επεξεργασία των αποτελεσμάτων

Με βάση τις απορροφήσεις των προτύπων δειγμάτων σχεδιάζεται με την βοήθεια ηλεκτρονικού υπολογιστή, η βέλτιστη ευθεία της μορφής $\psi = \alpha x + \beta$ που έχει στον άξονα των X την συγκέντρωση των προτύπων τριγλυκεριδίων και στον άξονα των Ψ τις απορροφήσεις των προτύπων. Από την εξίσωση που δίνει η πρότυπη καμπύλη και από τις απορροφήσεις των δειγμάτων υπολογίζεται η συγκέντρωση των τριγλυκεριδίων που περιέχουν τα δείγματα.

Z. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑΣ ΤΗΣ PAF-AH

Υλικά-Όργανα

- Μετρητής υγρού σπινθηρισμού, Packard (TriCarb 2100 TR)
- Μικροφυγόκεντρος για erpendorf
- Υδατόλουτρο 37°C
- PAF (1-Ο-εξαδεκυλο-2-ακετυλο-ση-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.
- Πρότυπο διάλυμα [³H]PAF(1-0-εξαδεκυλο-2-[³H-ακετυλο]-ση-γλυκερο-3-φωσφοχολίνη, 10Ci/mmol, DuPont-New England Nuclear, Boston, MA)
- Αλβουμίνη βοδινού ορού ελεύθερη λιπαρών οξέων (BSA, Sigma)
- Τριχλωροξικό οξύ (TCA, M.B.:163.39, Sigma)
- Υγρό σπινθηρισμού, Scintillation liquid Optiphase Hisafe 3



Διαλύματα εργασίας

- 20 mM PAF 16:0: Διαλύονται 25 mg σκόνης σε 2,387 ml 80% αιθανόλης μέχρι τελικής συγκέντρωσης 20mM. Διατηρείται στους -20°C
- 2,5 mg/ml BSA/saline : Σε 80ml φυσιολογικού ορού διαλύονται 250mg BSA υπό ήπια ανάδευση. Ο όγκος συμπληρώνεται με ακρίβεια στα 100ml. Διατηρείται στους -20°C
- 10% Na_2EDTA pH 7.4: 12.8247 g EDTA $\text{Na}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ διαλύονται σε 100 ml H_2O . 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 (ειδικής ενεργότητας 18000 cpm) : Σε πλαστικό σωληνάκι πολυπροπυλενίου αναμιγνύονται 100 μl PAF 20 mM και 30μl [^3H]PAF. Ο διαλύτης εξατμίζεται σε ρεύμα N_2 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 (Τριχλωροξικό οξύ, Sigma) 20 g TCA διαλύονται σε 100 ml H_2O . Το διάλυμα διατηρείται στους 4°C .
- 100 mg/ml BSA/saline. 1 g BSA διαλυτοποιείται σε 10 ml H_2O . Το διάλυμα διατηρείται στους -20°C .



Αρχή της μεθόδου

Η ενεργότητα της PAF-AH προσδιορίζεται με τη μέθοδο ιζηματοποίησης με TCA. Η μέτρηση της ενεργότητας της PAF-AH πραγματοποιείται έμμεσα με τη μέτρηση των ραδιοσημασμένων με [³H] οξεικών ομάδων που απελευθερώνονται κατά την υδρόλυση του υποστρώματος [³H]-PAF από το ένζυμο. Οι ομάδες αυτές παραμένουν στο υπερκείμενο. Ο εναπομείναν [³H]-PAF και ο παραγόμενος Lyso-PAF βρίσκονται δεσμευμένοι με BSA, η οποία μετουσιώνεται και καταβυθίζεται με TCA.

Προετοιμασία δειγμάτων

Για την μέτρηση της ενεργότητας της PAF-AH του πλάσματος χρησιμοποιήθηκαν 50μl αραιωμένου πλάσματος (10 μl πλάσματος 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 πλάσματος (50μl του υπερκείμενου μετά την καταβύθιση της HDL αραιώνονται με 200μl ρυθμιστικού διαλύματος HEPES 7.4, αραιώση 1/5) μετά την ιζηματοποίηση των λιποπρωτεϊνών που περιέχουν apo B με θειικό μαγνήσιο-δεξτράνη. Και στα δυο παραπάνω δείγματα προστίθεται διάλυμα HEPES μέχρι τελικού όγκου 90 μl. Για την μέτρηση της ενεργότητας της PAF-AH των ούρων χρησιμοποιήθηκαν 90 μl δείγματος. Ομοίως 90 μl χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό της ενζυμικής ενεργότητας σε κλάσματα υπερφυγοκέντρησης πλάσματος και ούρων.

Η αντίδραση αρχίζει με την προσθήκη 10 μl 1mM [³H]PAF στα 90μl του μίγματος των αντιδρώντων σε σωλήνες πολυπροπυλενίου eppendorf. 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 και 60 λεπτά ακριβώς για τα δείγματα πλάσματος και ούρων αντίστοιχα. Μόλις συμπληρωθεί ο χρόνος επώασης προστίθενται σε κάθε δείγμα 20 μl 100mg/ml BSA. Στη συνέχεια τα δείγματα αναδεύονται ισχυρά σε Vortex και τοποθετούνται σε παγόλουτρο για 10 λεπτά. Έπειτα προστίθενται 80 μl 20% TCA, τα δείγματα αναδεύονται ισχυρά σε Vortex και τοποθετούνται σε παγόλουτρο για άλλα 30 λεπτά. Ακολουθεί φυγοκέντρηση, σε μικροφυγόκεντρο erpendorf (10000rpm), για 5 λεπτά ώστε να καταβυθιστούν οι πρωτεΐνες. 100 μl του υπερκείμενου μεταφέρονται σε σωληνάκι σπινθηρισμού, προστίθενται 2 ml υγρού σπινθηρισμού, το σωληνάκι αναδεύεται καλά και τοποθετείται στον μετρητή υγρού σπινθηρισμού.

Επεξεργασία των αποτελεσμάτων

Μετριοούνται οι κρούσεις που δίνουν 10 μl διαλύματος [³H]PAF (cpm_ε) για τον υπολογισμό της ειδικής ενεργότητας (E.E.) του διαλύματος. Π.χ τα 10 μl [³H]PAF 1mM περιέχουν 10 nmol PAF άρα:

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

Το ίδιο ισχύει για όλες τις συγκεντρώσεις PAF που χρησιμοποιήθηκαν

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

$$\text{Ενεργότητα PAF - AH} = \frac{(cpm_{\delta} - cpm_{\epsilon}) \times 2 \times 1000}{E.E. \times \alpha \times \beta} \text{ nmol/ml πλάσματος ή HDL/min}$$

όπου: cpm_δ, είναι οι κρούσεις των 100 μl κάθε δείγματος

cpm_ε, είναι οι κρούσεις των 100 μl του δείγματος ελέγχου

α, είναι ο χρόνος επώασης του δείγματος σε λεπτά/ώρες

β, είναι τα μl του δείγματος



1000, ο συντελεστής για τη μετατροπή των ml σε ml

Η ενεργότητα της PAF-AH εκφράστηκε σαν ημοί του [³Ηακετυλο]-PAF που αποικοδομούνται ανά min/hr, ανά ml κλάσματος βαθμίδωσης ή ανά ml πλάσματος/ούρων.

Η. ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ SDS-ΠΟΛΥΑΚΡΥΛΑΜΙΔΙΟΥ ΣΕ ΠΛΑΚΕΣ ΒΑΘΜΙΔΩΣΗΣ 5-19%

Όργανα-Αντιδραστήρια

- Κάθετη συσκευή ηλεκτροφόρησης (Mini Protean II, Bio-Rad)
- Τροφοδοτικό
- Διάλυμα N,N-τετραμεθυλοαιθυλενοδιαμίνη, TEMED (Bio-Rad)
- Υπερθειικό αμμώνιο (Ammonium Persulfate) (Bio-Rad)
- Πρότυπα μοριακά βάρη (Broad Range) (Bio-Rad)

Διαλύματα εργασίας

Διάλυμα Α : 29,2% ακρυλαμίδιο, 0,8% δις ακρυλαμίδιο. 58,4 g ακρυλαμιδίου και 1,6g δις ακρυλαμιδίου διαλύονται σε dH₂O μέχρι τελικού όγκου 200ml. Το διάλυμα διατηρείται σε σκοτεινόχρωμο δοχείο στους 4°C για ένα μήνα

Διάλυμα Β (ρυθμιστικό διάλυμα διαδρομής, running, pH 8,8) : 34,64 g Tris Base και 0,8g SDS διαλύονται σε 100ml dH₂O. Ρυθμίζεται το pH στο 8,8 και συμπληρώνεται ο όγκος στα 200ml. Το διάλυμα είναι σταθερό για ένα μήνα σε θερμοκρασία δωματίου.

Διάλυμα Γ (ρυθμιστικό διάλυμα επιστοίβασης, stacking, pH 6,8) : 6,6 g Tris Base διαλύονται σε 50ml dH₂O, ρυθμίζεται το pH στο 6,8 και συμπληρώνεται ο όγκος στα 100ml με dH₂O. Το διάλυμα είναι σταθερό για ένα μήνα σε θερμοκρασία δωματίου.



Διάλυμα Δ (ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης) : 72,5g γλυκίνης, 7,5 g SDS και 15g Tris Base διαλύονται σε 5L dH₂O. Το pH επιβεβαιώνεται ότι είναι 8,2. Προσοχή δεν πρέπει να ρυθμίζεται. Το διάλυμα παρασκευάζεται λίγο πριν τη χρήση του.

Διάλυμα Ε (διάλυμα δειγμάτων) : 6,61g SDS και 0,32g Tris Base διαλύονται σε 120ml dH₂O. Το pH ρυθμίζεται στο 6,8 και ο όγκος συμπληρώνεται στα 200ml με dH₂O. Το διάλυμα είναι σταθερό για ένα μήνα σε θερμοκρασία δωματίου.

Διάλυμα 1M DTT : 0,3086g DTT διαλύονται σε 2 ml dH₂O. Διατηρείται στους -20°C σε δείγματα των 20μl.

Διάλυμα 1M μερκαπτοαιθανόλης : 70μl μερκαπτοαιθανόλης προσθέτονται σε 930 μl dH₂O με πολύ μεγάλη προσοχή. Διατηρείται σε θερμοκρασία δωματίου.

Διάλυμα κατεργασίας δειγμάτων υπό αναγωγικές συνθήκες : Σε 2ml διαλύματος δειγμάτων προσθέτονται 20μl από το διάλυμα 1M DTT ή 1M μερκαπτοαιθανόλης, έτσι ώστε η τελική συγκέντρωση της DTT στο διάλυμα να είναι 10mM. Το διάλυμα παρασκευάζεται λίγο πριν τη χρήση του.

Διάλυμα 10% υπερθειικού αμμωνίου (APS) : 0,1g υπερθειικού αμμωνίου διαλύεται σε 1ml dH₂O. Το διάλυμα παρασκευάζεται λίγο πριν τη χρήση του

Διάλυμα φόρτωσης δειγμάτων : Το διάλυμα περιέχει 50% γλυκόζη σε dH₂O και σε αυτό προστίθεται μικρή ποσότητα μπλε βρωμοφαινόλης

Διάλυμα 10% SDS : 10g SDS διαλύονται σε 100ml dH₂O. Διατηρείται σε θερμοκρασία δωματίου

Πρότυπα μοριακά βάρη

Μυοσίνη

210kDa

Β-γαλακτοζαμίνη

127kDa

Αλβουμίνη βοδιού

84kDa



Αλβουμίνη αυγού	49,5kDa
Καρβονική ανυδράση	35,3kDa
Αναστολέας της τρυψίνης	28,1kDa
Λυσοζύμη	20,5kDa
Απροτινίνη	7kDa

Αρχή της μεθόδου

Η ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου (PAGE), κάτω από συνθήκες αποδιάταξης (SDS), συνδυάζει την ηλεκτροφόρηση με βάση το μοριακό βάρος με την υψηλή διαχωριστική ικανότητα. Η παρουσία του ιοντικού απορρυπαντικού SDS έχει ως αποτέλεσμα την πλήρη αποδιάταξη των πρωτεϊνών και των υπομονάδων τους ώστε να προκύψουν πολύ ανιοντικές πρωτεϊνικές αλυσίδες λόγω της συμπλοκοποίησης με SDS. Το SDS που ενώνεται με τις πρωτεΐνες δίνει ένα σταθερό λόγο ανιοντικού φορτίου προς μάζα για όλες τις πρωτεΐνες και τις αλυσίδες τους οι οποίες μεταναστεύουν προς την άνοδο με βάση το μοριακό τους βάρος. Η συγκέντρωση του PAGE δρα ως μοριακό κόσκινο και είναι τέτοια ώστε τα μόρια να εισέρχονται πρώτα σε μια περιοχή χαμηλής συγκέντρωσης PAGE και μεγάλων πόρων και στη συνέχεια καθώς προχωρούν στο πήκτωμα η συγκέντρωση του PAGE αυξάνει και μειώνεται το μέγεθος των πόρων. Τα μόρια ανάλογα με το μέγεθός τους παγιδεύονται όταν φτάνουν σε περιοχές πηκτώματος όπου το μέγεθος των πόρων είναι τέτοιο ώστε δεν μπορούν να εισέλθουν.

Πειραματική διαδικασία

Προετοιμασία συσκευής



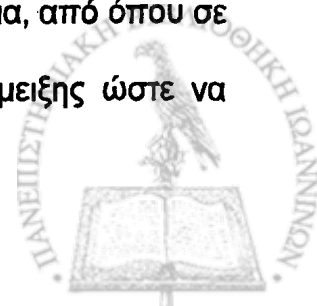
Χρησιμοποιούνται γυάλινες πλάκες διαστάσεων 7*10cm οι οποίες καθαρίζονται προσεκτικά με νερό και στη συνέχεια με απόλυτη αιθανόλη. Οι πλάκες τοποθετούνται η μία πάνω στην άλλη και στις δύο πλάγιες άκρες τους τοποθετούνται διαχωριστές πάχους 1,5mm. Στη βάση στήριξης των πλακών της κάθετης συσκευής ηλεκτροφόρησης τοποθετούνται ελάσματα καουτσούκ που εξασφαλίζουν στεγανότητα. Οι γυάλινες πλάκες τοποθετούνται στη βάση στήριξης και σταθεροποιούνται με σφιγκτήρες. Με τη χρήση αλφαδιού εξασφαλίζεται η ευθύγραμμη τοποθέτησή τους.

Προετοιμασία διαλυμάτων πηκτώματος 5% και 19%

Σε δυο ποτηράκια τοποθετούνται οι ποσότητες των διαλυμάτων του πίνακα.

	5%	19%
Διάλυμα Α	0,63ml	2,38ml
Διάλυμα Β	0,93ml	0,94ml
H ₂ O	2,19ml	0,43ml
APS	16μl	16μl
TEMED	2μl	2μl

Το APS και το TEMED προστίθενται λίγο πριν γίνει η επιστοίβαση των δύο διαλυμάτων, αφού και τα δύο δρουν καταλυτικά στον πολυμερισμό του πολυακρυλαμιδίου. Μόλις παρασκευασθούν τα διαλύματα τοποθετούνται στα διαμερίσματα της συσκευής που θα δημιουργήσει τη βαθμίδωση πυκνοτήτων (gradient former). Στο διαμέρισμα ανάμειξης των διαλυμάτων του gradient former τοποθετείται το διάλυμα 19% που είναι και η τελευταία πυκνότητα της βαθμίδωσης, ενώ το διάλυμα 5% διατηρείται στο άλλο διαμέρισμα, από όπου σε μικρές ποσότητες διοχετεύεται αυτόματα στο διαμέρισμα ανάμειξης ώστε να δημιουργηθούν όλες οι πυκνότητες της βαθμίδωσης.



Αρχικά τα δύο διαμερίσματα δεν επικοινωνούν μεταξύ τους και αυτό διασφαλίζεται με την προσθήκη ίχνους χρωστικής μπλε βρωμοφαινόλης στο διάλυμα 19%. Αν δεν υπάρχει στεγανότητα η χρωστική βάφει και το 5%. Ο gradient former συνδέεται με περισταλτική αντλία η οποία μεταφέρει και επιστοιβάσει τα διαλύματα στο χώρο σχηματισμού του πηκτώματος.

Όταν όλα είναι έτοιμα αρχίζει η παροχή από τον gradient former και αρχίζει ο σχηματισμός της βαθμίδωσης πυκνοτήτων ανάμεσα στις γυάλινες πλάκες. Κατά την επιστοίβαση πρέπει να αποφεύγεται η δημιουργία φυσαλίδων αέρα οι οποίες καθιστούν ασυνεχές το πήκτωμα και παρεμποδίζουν τον πολυμερισμό. Μόλις ολοκληρωθεί η επιστοίβαση των διαλυμάτων, η επιφάνεια του πηκτώματος καλύπτεται με νερό το οποίο επιστοιβάζεται αργά και προσεκτικά ώστε να μη διαταραχθεί η επιφάνεια του πολυακρυλαμιδίου. Το στάδιο αυτό αποβλέπει στην προστασία του πηκτώματος από την επαφή του με τον αέρα που επιταχύνει τον πολυμερισμό. Ο πολυμερισμός ολοκληρώνεται σε μια περίπου ώρα και το νερό αφαιρείται ποσοτικά με σύριγγα. Στο χρόνο αυτό γίνεται η προετοιμασία του διαλύματος επιστοίβασης 3% (stacking gel).

3% stacking gel	
Διάλυμα Α	0,75ml
Διάλυμα Γ	1,87ml
H ₂ O	4,87ml
Ακολουθεί απαέρωση	
10% SDS	75μl
10% APS	50μl
TEMED	7,5μl



Το προκύπττον διάλυμα αναδεύεται και επιστοιβάζεται με τη χρήση σύριγγας πάνω από το πολυμερισμένο πήκτωμα. Μεταξύ των γυάλινων πλακών έχει ήδη τοποθετηθεί χτένι πάχους 1,5mm, ώστε μόλις πολυμερισθεί το διάλυμα επιστοιβάσης να έχουν δημιουργηθεί οι θέσεις στις οποίες θα τοποθετηθούν τα δείγματα. Ο πολυμερισμός του διαλύματος επιστοιβάσης ολοκληρώνεται σε 30-60 λεπτά. Στο χρόνο αυτό ετοιμάζονται τα δείγματα.

Προετοιμασία δειγμάτων

Ποσότητα δείγματος που περιέχει 5-10μg πρωτεΐνης τοποθετείται σε σωλήνα erpendorf και λυοφιλοποιείται. Σε κάθε δείγμα προσθέτονται 20μl από το διάλυμα κατεργασίας και ακολουθεί βρασμός (100 °C) για 5 λεπτά, αφού τρυπηθούν τα καπάκια των erpendorf. Στη συνέχεια προσθέτονται 12μl από το διάλυμα φόρτωσης. Τα δείγματα αναδεύονται και είναι έτοιμα για ηλεκτροφόρηση. Η ίδια προετοιμασία γίνεται και για την ανασυνδυασμένη PAF-AH, χωρίς όμως να προηγηθεί λυοφιλοποίηση. Τα πρότυπα μοριακών βαρών, από τα οποία χρησιμοποιούνται 10μl, δεν υποβάλλονται σε καμία κατεργασία.

Τοποθέτηση δειγμάτων

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



Συνθήκες ηλεκτροφόρησης

Τάση

200V

Ένταση

ρεύματος

25mA/πήκτωμα

Χρόνος 1 ώρα περίπου(μέχρι να εξέλθει η χρωστική από το πήκτωμα)

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

Θ. ΜΕΤΑΦΟΡΑ ΚΑΙ ΑΝΟΣΟΑΠΟΤΥΠΩΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ

Όργανα-Αντιδραστήρια

- Κάθετη συσκευή ηλεκτροφόρησης για μεταφορά πρωτεϊνών και κασέτα (Mini Protean II, Bio Rad)
- Τροφοδοτικό
- Υπερφιλμ ECL(Enhanced Chemiluminescence Detection Film, Amersam)
- Διηθητικό χαρτί Whatman 3MM
- Μembrάνη μεταφοράς πρωτεϊνών Polyscreen PVDF (Polyvinylidene difluoride Du Pont)
- Πρωτογενές πολυκλωνικό αντίσωμα κουνελιού για την PAF-AH του πλάσματος(Cayman) σε αραιώση 1:1000 (v/v)



- Πρωτογενές πολυκλωνικό αντίσωμα κουνελιού αντι-αροB και αντι-αρο(a) σε αραίωση 1:2000 (v/v)
- Δευτερογενές αντίσωμα donkey anti-rabbit IgG HRP-conjugated (Serotec) σε αραίωση 1:2500 (v/v)
- Διαλύματα εμφάνισης του φιλμ (Kodak)

Διαλύματα εργασίας

- Ρυθμιστικό διάλυμα μεταφοράς 10X : Tris-Base 30,3g/L, γλυκίνη 144g/L, SDS 5g/L
- Ρυθμιστικό διάλυμα μεταφοράς 1X : Αναμιγνύονται 100ml του 10X με 200ml μεθανόλης. Ο όγκος συμπληρώνεται στα 100ml με νερό.
- Ρυθμιστικό διάλυμα TBS (Tris-Base, Saline) : Το διάλυμα περιέχει 20mM (2,422g/L) Tris-Base, 100mM (5,84g/L) NaCl. Το pH ρυθμίζεται στο 7,5
- Ρυθμιστικό διάλυμα TBS-BSA 5% : Το διάλυμα περιέχει 20mM (2,422g/L) Tris-Base, 100mM (5,84g/L) NaCl και 5%BSA. Το pH ρυθμίζεται στο 7,5
- Αντιδραστήριο χημειοφωταύγειας ECL : Η εμπορική του συσκευασία περιέχει δύο αντιδραστήρια το Enhanced luminol reagent και το Oxidizing reagent, τα οποία αναμιγνύονται σε αναλογία 1:1 (v/v) λίγο πριν τη χρήση. Απαιτούνται 0,125 ml μείγματος για κάθε cm^2 μεμβράνης (1,5ml από το καθένα)

Προετοιμασία της μεμβράνης

Η μεμβράνη κόβεται προσεκτικά στις διαστάσεις του πηκτώματος (7*10cm) και ενεργοποιείται για 5 λεπτά σε 100% μεθανόλη. Στη συνέχεια εκπλένεται με dH₂O και αφήνεται στο ρυθμιστικό διάλυμα μεταφοράς πρωτεϊνών, όπου και



πρέπει να είναι απόλυτα βυθισμένη για μισή ώρα τουλάχιστον. Η μεμβράνη πρέπει σε όλα τα στάδια να είναι υγρή. Στο σημείο αυτό κόβονται και διηθητικά χαρτιά Whatman επίσης στις διαστάσεις του πηκτώματος και διαποτίζονται με το ρυθμιστικό διάλυμα μεταφοράς των πρωτεϊνών.

Μεταφορά πρωτεϊνών

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

Ανοσοαποτύπωση

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

Στη συνέχεια γίνεται επώαση της μεμβράνης με το πρωτογενές αντίσωμα, το οποίο αραιώνεται 1:2000 και 1:2500 σε TBS/BSA 5% για την PAF-AH και την apo-B/apo(a) αντίστοιχα. Η επώαση αυτή διαρκεί 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου υπό ανάδευση. Ακολουθούν 3 εκπλύσεις των 10 λεπτών με TBS.

Η μεμβράνη επωάζεται με το δευτερογενές αντίσωμα, το οποίο αραιώνεται 1:3000 ΚΑΙ 1:2500 σε TBS/BSA 5% για την PAF-AH και την apo-B/apo(a) αντίστοιχα. Η επώαση αυτή διαρκεί 30 min σε θερμοκρασία δωματίου υπό ανάδευση. Ακολουθούν 3 εκπλύσεις των 10 λεπτών με TBS.



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

Η μεμβράνη ακουμπά όρθια σε διηθητικό χαρτί για να απομακρυνθεί η περίσσεια του διαλύματος έκπλυσης και στη συνέχεια μεταφέρεται σε πλαστική θέση ίσων διαστάσεων με αυτή όπου γίνεται η αντίδραση της χημειοφωταύγειας. Ετοιμάζεται το αντιδραστήριο χημειοφωταύγειας και αποχύνεται σε όλη την επιφάνεια της μεμβράνης έτσι ώστε να διαποτίσει και τις δύο πλευρές της. Η επώαση γίνεται υπό ανάδευση για 1,5 λεπτά ακριβώς. Η περίσσεια του αντιδραστήριου χημειοφωταύγειας απομακρύνεται με διηθητικό χαρτί.

Η μεμβράνη περιβάλλεται με διαφανή λεπτή μεμβράνη και μεταφέρεται μέσα σε κασέτα σε σκοτεινό θάλαμο για την ανάπτυξη της χημειοφωταύγειας. Μέσα στην κασέτα και πάνω στη μεμβράνη τοποθετείται το υπερφιλμ, χωρίς να έχει αγγίξει πουθενά πιο πριν, και γίνεται επώαση για 5 λεπτά. Το φιλμ τοποθετείται αρχικά στο υγρό εμφάνισης έως ότου εμφανιστούν οι μπάντες, στη συνέχεια στο υγρό σταθεροποίησης για 5 λεπτά και τέλος εκπλένεται με νερό βρύσης.

I. ΧΡΩΣΗ ΜΕ ΝΙΤΡΙΚΟ ΑΡΓΥΡΟ

Όργανα – Αντιδραστήρια

- Silver Stain Plus Kit (Bio-Rad): Περιέχει το συμπυκνωμένο διάλυμα σταθεροποίησης (Fixative Enhancer), το αντιδραστήριο της ανάπτυξης (Development Accelerator Reagent) και τα διαλύματα ανάπτυξης και χρώσης (Silver Complex Solution, Reduction Moderator και Image Development Reagent)
- Μεθανόλη, οξεικό οξύ, νιτρικό οξύ
-



Διαλύματα εργασίας

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

- **Διάλυμα σταθεροποίησης (Fixative Solution) (200ml/πήκτωμα) :**
Αποτελείται από 100 ml μεθανόλης, 20 ml οξικού οξέως, 20 ml συμπυκνωμένου διαλύματος σταθεροποίησης και 60 ml dH₂O
- **Διάλυμα επιτάχυνσης ανάπτυξης (Development Accelerator Solution) :** 5 g αντιδραστηρίου ανάπτυξης προσθέτονται σιγά σιγά και διαλύονται σε 80 ml dH₂O. Κατόπιν συμπληρώνεται ο όγκος στα 100 ml και το διάλυμα διατηρείται μέχρι 3 μήνες στους 4⁰C. Χρησιμοποιείται πάντα σε θερμοκρασία δωματίου.
- **Διάλυμα χρώσης και ανάπτυξης (Staining and Developing) (50ml/πήκτωμα) :** 5 λεπτά πριν τη χρώση σε καλά προστατευμένο από το φως γυάλινο ποτήρι των 50 ml, 2,5 ml από το κάθε διάλυμα ανάπτυξης και χρώσης αναμιγνύονται με 17,5 ml dH₂O. Μόλις 3 λεπτά πριν τη χρώση προσθέτονται 25 ml από το διάλυμα επιτάχυνσης ανάπτυξης και αναδεύονται.
- **Διάλυμα οξικού οξέως 5% (τερματισμού της αντίδρασης) :** 10ml οξικού οξέως αναμιγνύονται με 190 ml dH₂O.

Αρχή της μεθόδου

Η χρώση με νιτρικό άργυρο είναι γρήγορη, υψηλής ευαισθησίας και απλή μέθοδος για τον προσδιορισμό πρωτεϊνών ή νουκλειικών οξέων σε πήκτωμα αγαρόζης ή πολυακρυλαμιδίου μετά από ηλεκτροφόρηση. Οι πρωτεΐνες και τα νουκλειικά οξέα εμφανίζονται μέσα σε μία ώρα. Είναι 30-50 φορές πιο ευαίσθητη



από τη χρώση Coomassie Blue και μπορεί να ανιχνεύσει ως και ηg πρωτεϊνών και DNA. Η χρώση με νιτρικό άργυρο γίνεται με την αναγωγή του νιτρικού αργύρου σε μεταλλικό άργυρο από τον πεπτιδικό δεσμό των πρωτεϊνών με αποτέλεσμα την εναπόθεσή του σε αυτές.

Πειραματική διαδικασία

Μετά την ηλεκτροφόρηση SDS-page ακολουθούν τα εξής στάδια :

Σταθεροποίηση

Τα πήκτωμα τοποθετείται σε λεκάνη παρουσία του διαλύματος σταθεροποίησης για 30 λεπτά υπό ανάδευση. Κατόπιν απομακρύνεται το διάλυμα σταθεροποίησης και το πήκτωμα εκπλύνεται δύο φορές με νερό για 20 λεπτά τη φορά.

Χρώση και ανάπτυξη χρώματος

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

Τερματισμός της ανάπτυξης χρώματος

Κατόπιν το πήκτωμα τοποθετείται σε 200ml διαλύματος οξικού οξέως 5% για τουλάχιστον 15 λεπτά με σκοπό να τερματισθεί η περαιτέρω ανάπτυξη χρώματος. Το πήκτωμα τοποθετείται για τουλάχιστον 5 λεπτά σε νερό πριν την επεξεργασία του και διατηρείται σε θερμοκρασία δωματίου.



III. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

A) ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΟΥ ΠΛΗΘΥΣΜΟΥ

Οι ασθενείς μας χωρίστηκαν σε δύο ομάδες: σε ασθενείς με νεφρωσικό σύνδρομο (ΝΣ) και σε ασθενείς με πρωτεϊνουρία μη νεφρωσικού τύπου (ΠΜΝΤ). Στον πίνακα 10 αναγράφονται τα βασικά χαρακτηριστικά των δύο ομάδων. Δεν υπήρχαν διαφορές στην κατανομή των ηλικιών και του φύλου στις δύο ομάδες. Οι ασθενείς όλων των ομάδων είχαν φυσιολογική νεφρική λειτουργία όπως φαίνεται όχι μόνο από την κρεατινίνη του ορού, αλλά και από την ειδικότερη μέτρηση της κάθαρσης κρεατινίνης.

Όπως ήταν αναμενόμενο οι ασθενείς με ΝΣ είχαν στατιστικά σημαντική διαφορά με την ομάδα ελέγχου όσον αφορά τα επίπεδα των ολικών πρωτεϊνών και της αλβουμίνης ορού. Αντιθέτως η διαφορά αυτή δεν ήταν στατιστικά σημαντική συγκρίνοντας την ομάδα με ΠΜΝΤ με την ομάδα ελέγχου. Όσον αφορά τις λιποπρωτεΐνες (πίνακας 11), οι ασθενείς με ΝΣ είχαν υψηλότερες τιμές συγκεντρώσεων ολικής και LDL-χοληστερόλης καθώς και του αθηρωματικού δείκτη ολικής/HDL-χοληστερόλης. Οι ασθενείς με ΝΣ είχαν επίσης υψηλότερα επίπεδα απολιποπρωτεΐνης Β και Ε συγκρινόμενα με τις αντίστοιχες τιμές της ομάδας ελέγχου και της ομάδας με ΠΜΝΤ. Οι δύο τελευταίες ομάδες δεν παρουσίαζαν διαφορές στις λιπιδαιμικές παραμέτρους, πλην των συγκεντρώσεων των τριγλυκεριδίων και της απολιποπρωτεΐνης Ε που ήταν υψηλότερες στην ομάδα με τη ΠΜΝΤ. Η συσχέτιση των επιπέδων της LDL-χοληστερόλης καθώς και της



συγκέντρωσης της απολιποπρωτεΐνης Β με τα επίπεδα της αλβουμίνης ορού

ήταν επίσης στατιστικά σημαντική ($r=-0,7$ και $r=-0,73$ αντίστοιχα, $P<0,05$).

...

...

...

...

...

...

...

...

...

...

...

...

...

...

...

...

...

...

...

...

...

...

...

...

...

...



Πίνακας 10. ΚΛΙΝΙΚΑ ΚΑΙ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΟΥ ΠΛΗΘΥΣΜΟΥ ΜΕΛΕΤΗΣ

	Ομάδα ελέγχου	Ασθενείς	
		ΝΣ	ΠΜΝΤ
Αριθμός	20	8	10
Ηλικία (έτη)	50 (25-79) ^α	49 (18-78) ^α	53 (41-61) ^α
Φύλο (Α/Θ)	11/9	5/3	5/5
Ουρία ορού (mg/dl)	35,2±6,6	37,2±16	40±16,8
Κρεατινίνη ορού (mg/dl)	0,9±0,09	1±0,3	1,1±0,3
Ολικές πρωτεΐνες ορού (g/dl)	7,2±1,0	5,5±0,9 ^β	7,4±0,9
Αλβουμίνη ορού (g/dl)	4,5±0,3	2,9±0,8 ^β	4,3±0,5
Κάθαρση κρεατινίνης (ml/min)	90,0±10,0	87,8±20,0	88,0±15,0
Πρωτεΐνες 24ωρης συλλογής ούρων (g/24ωρο)	<0,150	3,65 (2,1 -11,8) ^{α,γ}	2,5 (2., 5-3,1) ^α

Οι τιμές αντιπροσωπεύουν μέση τιμή ± σταθερά απόκλισης (SD), ή τη ^αδιάμεση τιμή (range).

^β P=0.001 μεταξύ ασθενών με νεφρωσικό σύνδρομο (ΝΣ) και ομάδας ελέγχου ή ασθενών με μη νεφρωσικού τύπου πρωτεϊνουρία (ΠΜΝΤ) και ομάδας ελέγχου, όπως υπολογίσθηκε με τη μέθοδο πολλαπλής σύγκρισης (multiple comparison) (Scheffe type)

^γ P<0.05 μεταξύ ασθενών με νεφρωσικό σύνδρομο (ΝΣ) και ασθενών με μη νεφρωσικού τύπου πρωτεϊνουρία (ΠΜΝΤ), όπως υπολογίσθηκε με το Kruskal-Wallis test



Πίνακας 11. ΛΙΠΟΠΡΩΤΕΪΝΙΚΟ ΠΡΟΦΙΛ ΤΟΥ ΠΛΗΘΥΣΜΟΥ ΜΕΛΕΤΗΣ

	Ομάδα ελέγχου	Ασθενείς ΝΣ	Ασθενείς ΠΜΝΤ
Ολική-C (mg/dl)	220±35	388±170 ^{α,β}	255±64
Τριγλυκερίδια (mg/dl)	108±44	161±53 ^α	267±162 ^γ
HDL-C (mg/dl)	45,6±12,0	56,0±21,02	
	45,5.7±14,1		
LDL-C (mg/dl)	153±33	300±164 ^{α,β}	134±73
Total-C/HDL-C	5,1±1,6	8,0±5,8 ^{α,β}	5,4±2,0
Apo AI (mg/dl)	146±25	143±48	129±18
Apo B (mg/dl)	108±21	181±55 ^{α,β}	125±19
Apo E (mg/dl)	36.5±5.3	53±14 ^{α,β}	72.5±38 ^γ
Lp(a) (mg/dl)	15,25 (0,3-48)	35,25 (4-80)	20,2 (4-55)

Ολική-C, ολική χοληστερόλη; HDL-C, HDL-χοληστερόλη; LDL-C, LDL-χοληστερόλη; ApoAI, απολιποπρωτεΐνη AI; ApoB, απολιποπρωτεΐνη B; ApoE απολιποπρωτεΐνη E; Lp(a), λιποπρωτεΐνη(a). Οι τιμές αντιπροσωπεύουν μέση τιμή ± σταθερά απόκλισης(SD), εκτός από την Lp(a) που εκφράζεται ως "διάμεση τιμή (range). Η στατιστική ανάλυση έγινε με one-way ANOVA, εκτός από την Lp(a) για την οποία χρησιμοποιήθηκε το Kruskal-Wallis test.

Στατιστικά σημαντική διαφορά:

^αp<0.001 ασθενείς με νεφρωσικό σύνδρομο (ΝΣ) έναντι ομάδας ελέγχου

^βp<0.001 ασθενείς με νεφρωσικό σύνδρομο (ΝΣ) έναντι ασθενών με ΠΜΝΤ

^γp<0.05 ασθενείς με μη νεφρωσικού τύπου πρωτεϊνουρία (ΠΜΝΤ) έναντι ομάδας ελέγχου



B) ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑ ΤΗΣ PAF-AH ΣΤΟ ΠΛΑΣΜΑ ΚΑΙ ΣΤΗΝ HDL

Στη βιβλιογραφία, η μέτρηση της ενεργότητας του ενζύμου PAF-AH στο πλάσμα ασθενών με πρωτεϊνουρία έχει γίνει χωρίς να διαχωρίζονται οι ασθενείς με νεφρωσικού τύπου πρωτεϊνουρία από τους ασθενείς με ΠΜΝΤ. Οι λιγοστές μελέτες που υπάρχουν συχνά συμπεριλαμβάνουν ασθενείς με σπειραματονεφρίτιδα δευτεροπαθή π.χ ΣΕΛ με επακόλουθο τα αποτελέσματα της μέτρησης της ενεργότητας του ενζύμου να μην είναι αξιολογίσιμα (257,274,311,312).

Στη μελέτη μας μετρήθηκε η ενεργότητα του ενζύμου PAF-AH στο πλάσμα των ομάδων των ασθενών και των υγιών με την τεχνική καταβύθισης με TCA. Η ενεργότητα του ενζύμου στους ασθενείς με ΝΣ ήταν στατιστικά σημαντικά μεγαλύτερη σε σύγκριση με τους ασθενείς με ΠΜΝΤ και την ομάδα ελέγχου, ενώ δεν παρατηρήθηκε καμία διαφορά στην ενεργότητα του ενζύμου μεταξύ των ασθενών με ΠΜΝΤ και την ομάδα ελέγχου (σχήμα 8Α).

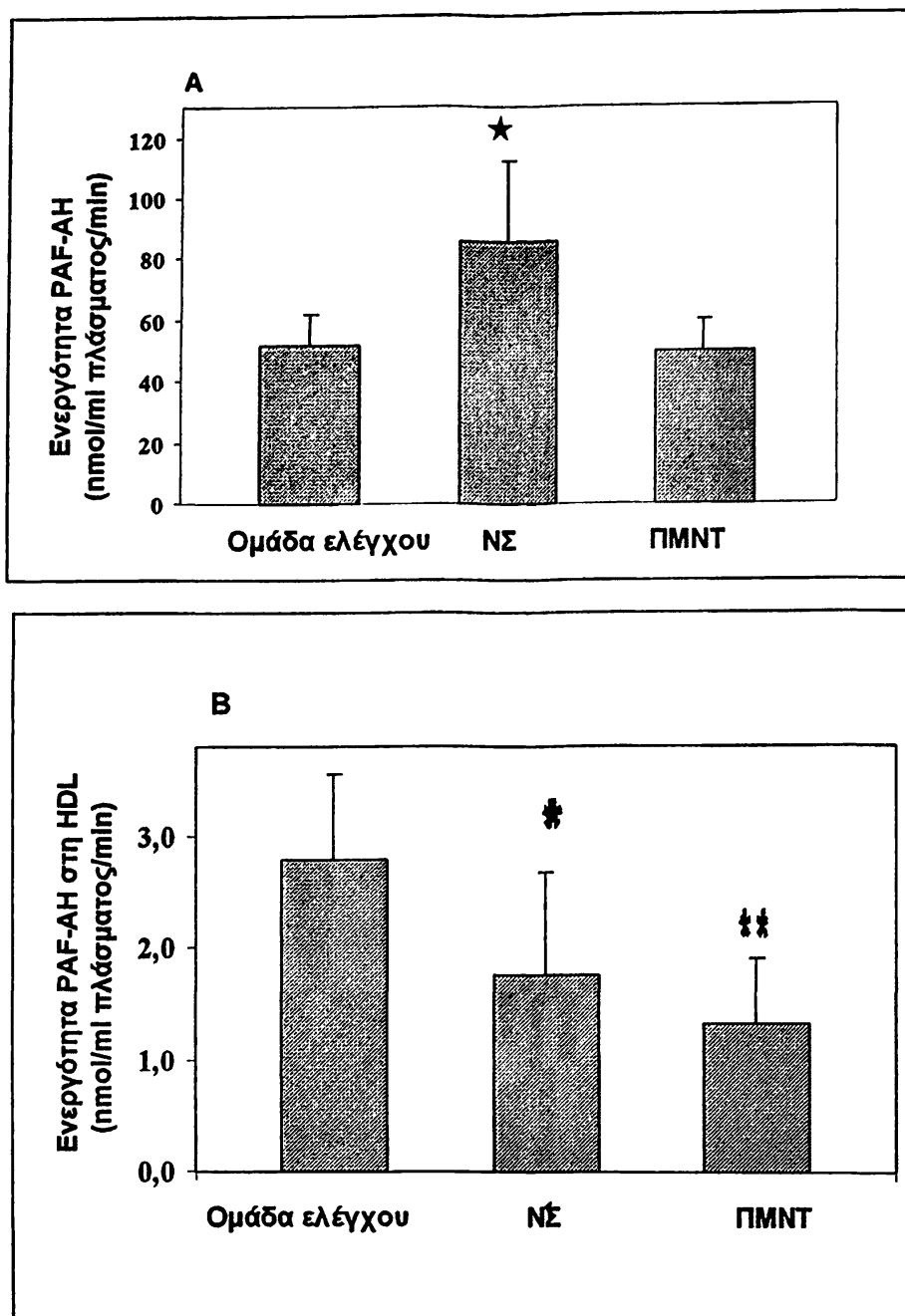
Όπως ήταν αναμενόμενο, η ενεργότητα του ενζύμου σε όλους τους ασθενείς συσχετιζόταν θετικά με τη συγκέντρωση της ολικής χοληστερόλης του ορού ($r=0,91/ P<0,05$), της LDL-χοληστερόλης ($r=0,89/ P<0,05$) και της απολιποπρωτεΐνης Β ($r=0,9/ P=0,02$). Η ενεργότητα του ενζύμου συσχετιζόταν αρνητικά με τη συγκέντρωση της αλβουμίνης του ορού ($r=-0,8/ P<0,05$), γεγονός που πρέπει να συνδέεται με την αρνητική συσχέτιση της συγκέντρωσης της αλβουμίνης ορού και της συγκέντρωσης της απολιποπρωτεΐνης Β (Σχήμα 9).

Στη συνέχεια μελετήσαμε για πρώτη φορά στους ασθενείς μας την ενεργότητα του ενζύμου στη HDL. Οι τελευταίες βιβλιογραφικές αναφορές



σαφώς συσχετίζουν την αντιαθηρωματική δράση της HDL με τη συνδεδεμένη σε αυτή PAF-AH (318,321). Οι ασθενείς με ΝΣ και οι ασθενείς με ΠΜΝΤ είχαν στατιστικά σημαντική μικρότερη ενεργότητα της PAF-AH στην HDL (ανά ml HDL-χοληστερόλης πλάσματος) σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου ($P < 0,01$ για τους ασθενείς με ΝΣ και $P < 0,05$ για τους ασθενείς με ΠΜΝΤ), ενώ καμία διαφορά δεν παρατηρήθηκε μεταξύ των δύο ομάδων των ασθενών (Σχήμα 8B). Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι όταν η ενεργότητα του ενζύμου εκφραζόταν ανά mg HDL-χοληστερόλης ορού ήταν σημαντικά μικρότερη στους ασθενείς με ΝΣ σε σύγκριση με τους υγιείς ($5,25 \pm 2,2$ nmol/mg HDL/min έναντι $6,3 \pm 3,3$ nmol/mg HDL/min/ $P < 0,05$), κάτι το οποίο δεν παρατηρήσαμε μεταξύ των υγιών και των ασθενών με ΠΜΝΤ. Τα ευρήματα αυτά συνηγορούν -μαζί με το ήδη γνωστό επιβαρυνόμενο λιπιδαιμικό προφίλ των ασθενών με ΝΣ- στο ότι οι ασθενείς αυτοί είναι υψηλού καρδιαγγειακού κινδύνου. Είναι επίσης φανερό ότι οι ασθενείς με ΝΣ έχουν μια διαφορετική συμπεριφορά όσο αφορά την ενεργότητα του ενζύμου, σε σύγκριση με τους ασθενείς με ΠΜΝΤ.





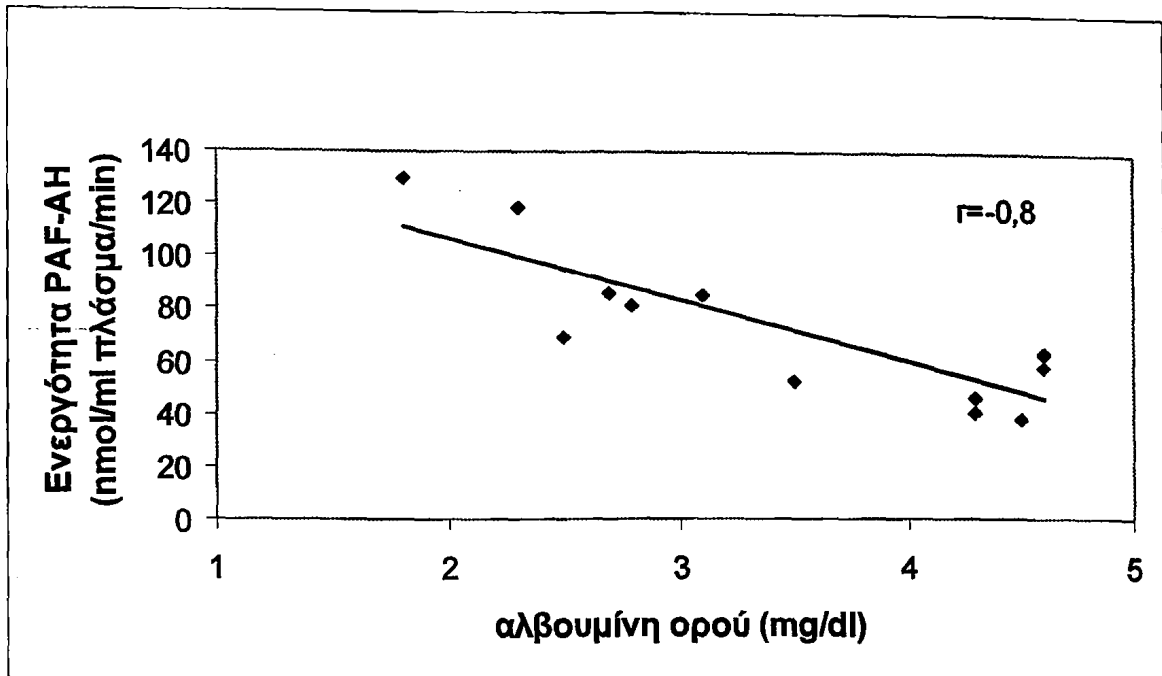
Σχήμα 8. Η ενεργότητα της PAF-AH

A. στο πλάσμα. Οι τιμές εκφράζονται ως μέση τιμή. * $p < 0.05$ συγκρινόμενη είτε με την ομάδα ελέγχου είτε με τους ασθενείς με μη νεφρωσικού τύπου πρωτεϊνουρία.

B. στη HDL. Οι τιμές εκφράζονται ως μέση τιμή. * $p < 0.01$ και ** $p < 0.05$ σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου

ΝΣ : ασθενείς με νεφρωσικό σύνδρομο ΠΜΝΤ : ασθενείς με πρωτεϊνουρία μη νεφρωσικού τύπου





Σχήμα 9. Συσχέτιση ενεργότητας του ενζύμου PAF-AH με την αλβουμίνη ορού. Ο συντελεστής συσχέτισης ήταν $r=-0,8$

Γ) ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑ ΤΗΣ PAF-AH ΣΤΑ ΟΥΡΑ

Σε δείγματα των 24ωρων συλλογών ούρων των ασθενών προσδιορίσθηκε η ύπαρξη ή μη ολικής χοληστερόλης. Όλοι οι ασθενείς με ΝΣ εμφάνιζαν λιπιδουρία (συγκέντρωση χοληστερόλης 0,7-2,0 mg/24ωρο), ενώ δεν ανιχνεύθηκε χοληστερόλη στους υπόλοιπους ασθενείς της μελέτης. Το γεγονός ότι η ενεργότητα του ενζύμου παρουσίαζε διαφορές στο πλάσμα των ασθενών της μελέτης καθώς και η γνώση ότι οι ασθενείς με ΝΣ εμφάνιζαν λιπιδουρία, μας ώθησε να μελετήσουμε την ενεργότητα του ενζύμου και στα ούρα. Έτσι συλλέχθησαν ούρα 24ώρου όλων των συμμετεχόντων στη μελέτη και η ενεργότητα μετρήθηκε με την μέθοδο καταβύθισης με TCA. Ανιχνεύσιμη ενεργότητα παρατηρήθηκε μόνο στα ούρα



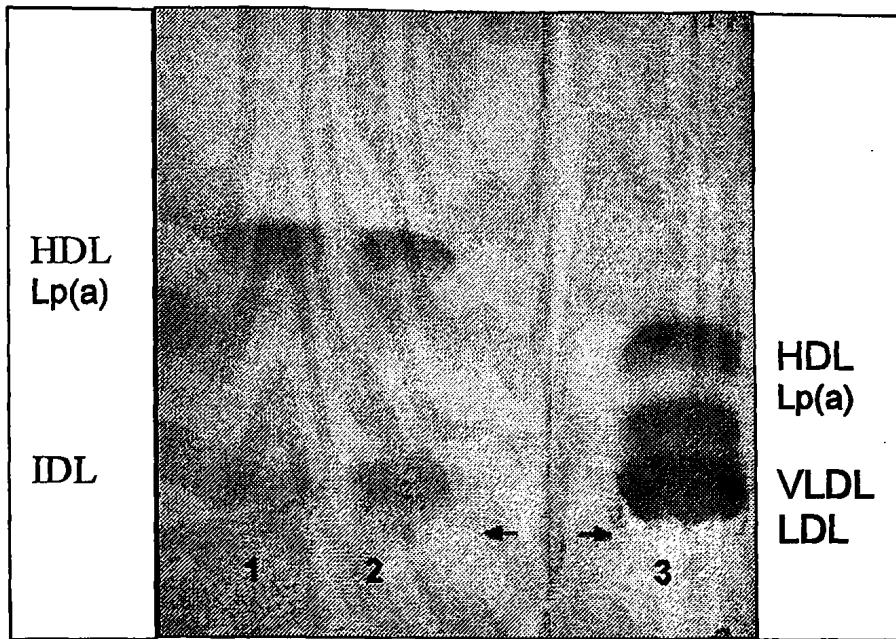
ασθενών με ΝΣ και κυμαινόταν από 1,5 ως 9 nmol/ml ούρων /ώρα. Δε βρέθηκε ενεργότητα του ενζύμου στα ούρα ούτε της ομάδας ελέγχου ούτε των ασθενών με ΠΜΝΤ.

Παρά το μικρό αριθμό ασθενών με ΝΣ, συσχετίσαμε την τιμή της ενεργότητας του ενζύμου στα ούρα με την αποβαλλόμενη στα ούρα ολική χοληστερόλη και βρέθηκε θετική συσχέτιση, ενώ καμία συσχέτιση δε βρέθηκε με τα επίπεδα της πρωτεϊνουρίας, της χοληστερόλης ορού και της ενεργότητας της PAF-AH στο πλάσμα. Τέλος δε βρέθηκε συσχέτιση των επιπέδων της πρωτεϊνουρίας με τη συγκέντρωση της ολικής χοληστερόλης των ούρων καθώς και της συγκέντρωσης της ολικής χοληστερόλης του ορού με τα επίπεδα της χοληστερόλης των ούρων.

Δ) ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑ ΤΗΣ PAF-AH ΚΑΙ ΛΙΠΟΠΡΩΤΕΪΝΕΣ

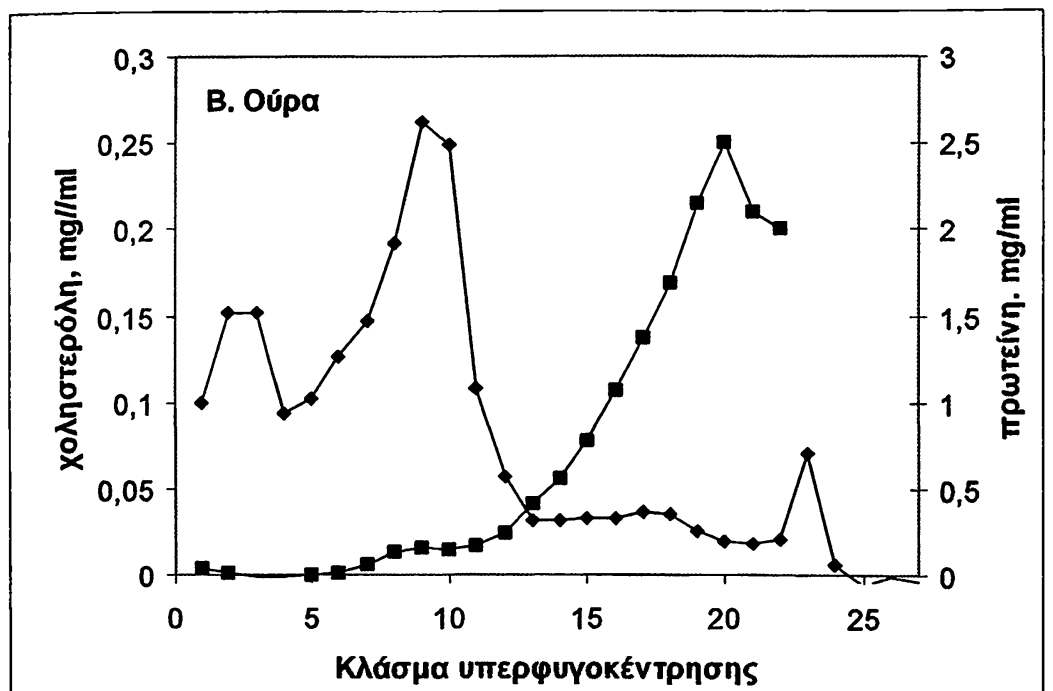
Η παρουσία ενεργότητας της PAF-AH στα ούρα των ασθενών με νεφρωσικό σύνδρομο και η συσχέτισή της με τα επίπεδα χοληστερόλης μας οδήγησε στη μελέτη της πιθανής σχέσης του ενζύμου με τις αποβαλλόμενες στα ούρα λιποπρωτεΐνες. Έτσι 24ωρες συλλογές ούρων τεσσάρων ασθενών με νεφρωσικό σύνδρομο και χοληστερόλη ούρων >1mg συμπυκνώθηκαν 60-100 φορές. Αρχικά, δείγματα των συμπυκνωμένων αυτών ούρων υπεβλήθησαν σε ηλεκτροφόρηση αγαρόζης και ανεδείχθησαν μπάντες LDL, Lp(a) και HDL λιποπρωτεϊνών (σχήμα 10). Στη συνέχεια δείγματα των συμπυκνωμένων ούρων και των αντίστοιχων πλάσμάτων υπεβλήθησαν σε ισοπυκνική υπερφυγοκέντρωση βαθμίδωσης πυκνοτήτων και ακολούθησε λιποπρωτεϊνική ανάλυση.





Σχήμα 10. Ηλεκτροφόρηση αγαρόζης πλάσματος και ούρων

Δείγματα συμπυκνωμένων ούρων ασθενών με νεφρωσικό σύνδρομο (αντιπροσωπευτικά δείγματα δύο ασθενών 1 και 2 αντίστοιχα) υποβλήθηκαν σε ηλεκτροφόρηση αγαρόζης. Ως μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε στη θέση 3 δείγμα πλάσματος του ασθενούς 1. Αναδείχθησαν μπάντες που αντιστοιχούν σε λιποπρωτείνες LDL, Lp(a) και HDL.



Σχήμα 11. Αντιπροσωπευτική καμπύλη λιποπρωτεϊνικού προφίλ

A. πλάσματος και

B. ούρων ασθενούς με νεφρωσικό σύνδρομο μετά από ισοπυκνική υπερφυγοκέντρωση

βαθμίδωσης πυκνοτήτων. Τα κλάσματα 1 και 2 αντιστοιχούν στη VLDL και IDL, τα

κλάσματα 3 ως 12 στην LDL, τα κλάσματα 13 ως 24 στην HDL και τα κλάσματα >24

στις πρωτεΐνες.

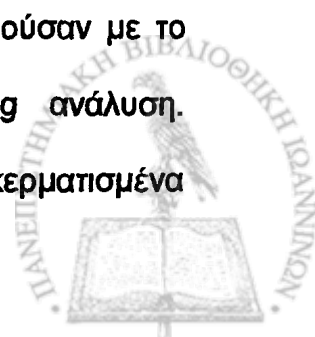
◆ Χοληστερόλη ■ πρωτεΐνη



Μία μόνο εμπειριστατωμένη μελέτη (78) προσδιόρισε αναλυτικά τη σύσταση των αποβαλλόμενων στα ούρα λιποπρωτεϊνών με τεχνικές υπερφυγοκέντρωσης και ηλεκτροφόρησης και έδειξε ότι στα ούρα ασθενών με ΝΣ αποβάλλονται VLDL, IDL και LDL καθώς και οι απολιπρωτεΐνες ApoA1, ApoAII, ApoB, ApoC1, ApoCIII. Τα αποτελέσματα της υπερφυγοκέντρωσης στη δική μας μελέτη έδειξαν ότι στα ούρα των ασθενών με νεφρωσικό σύνδρομο υπάρχουν –όπως και στο πλάσμα- όλες οι απολιπρωτεΐνες B και A1. Χαρακτηριστικό λιποπρωτεϊνικό προφίλ πλάσματος και ούρων ασθενούς με ΝΣ φαίνεται στο σχήμα 11A και 11B αντίστοιχα.

Στη συνέχεια τα λιποπρωτεϊνικά κλάσματα πλάσματος και ούρων αναλύθηκαν περαιτέρω με ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE 5-19%. Η ανάδειξη των μπαντών έγινε με χρώση νιτρικού αργύρου. Τα κλάσματα του πλάσματος από 1 ως 8 περιείχαν αποκλειστικά απολιπρωτεΐνη B-100, ενώ τα κλάσματα 9-12 περιείχαν 2 επιπλέον μπάντες με μοριακό βάρος να αναλογεί στην απολιπρωτεΐνη(a). Η ανάλυση Western blotting που ακολούθησε απέδειξε πράγματι την ύπαρξη της apo(a) στα κλάσματα αυτά γεγονός που σημαίνει ότι πλην της LDL υπάρχει και Lp(a) στα κλάσματα αυτά, κάτι που αναμενόταν και από τη μέτρηση των επιπέδων της Lp(a) στον ορό. (σχήμα 12). Οι απολιπρωτεΐνες B και apo(a) ήταν επίσης παρούσες στα κλάσματα 13-18. Τα κλάσματα αυτά όπως ήταν αναμενόμενο περιείχαν και απολιπρωτεΐνη A1, η οποία βρέθηκε επίσης και στα κλάσματα 19-24 (σχήμα 12).

Σε αντίθεση με το πλάσμα, τα κλάσματα των ούρων 1 ως 12 είχαν πολλαπλές μπάντες στη χρώση νιτρικού αργύρου που αντιδρούσαν με το αντίσωμα της απολιπρωτεΐνης B στη Western blotting ανάλυση. Πιθανότατα οι μπάντες αυτές να αντιπροσωπεύουν κατακερματισμένα

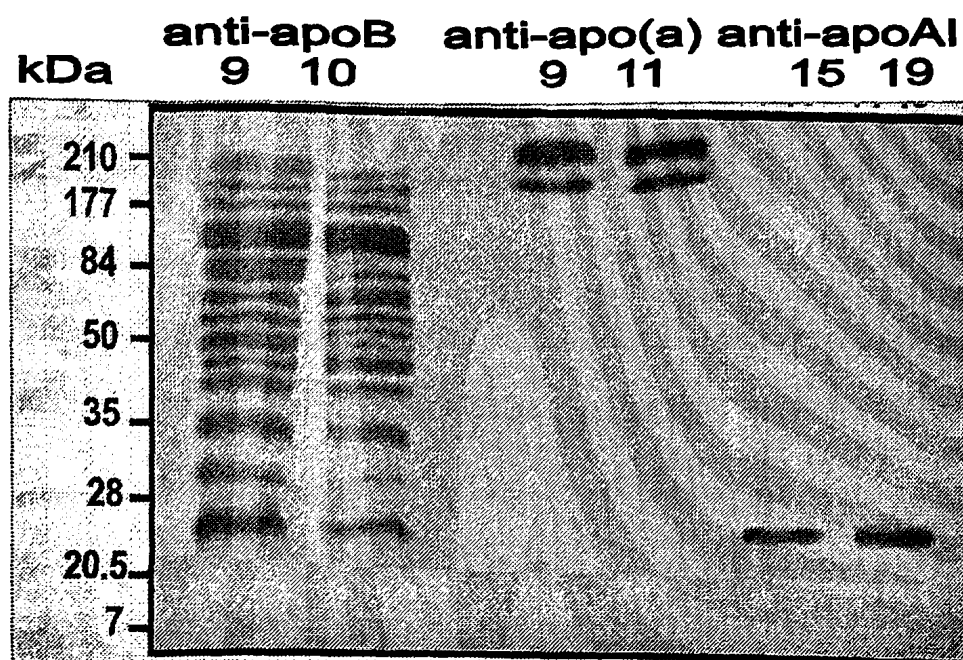


παράγωγα της απολιποπρωτεΐνης Β. Τα κλάσματα των ούρων 9-12 περιείχαν 2 μπάντες που αντιδρούσαν με το αντίσωμα έναντι apo(a), ένδειξη παρουσίας Lp(a) με άθικτη apo(a) (σχήμα 12). Στα κλάσματα 13 ως 25 υπήρχε απολιποπρωτεΐνη ΑΙ (σχήμα 12).

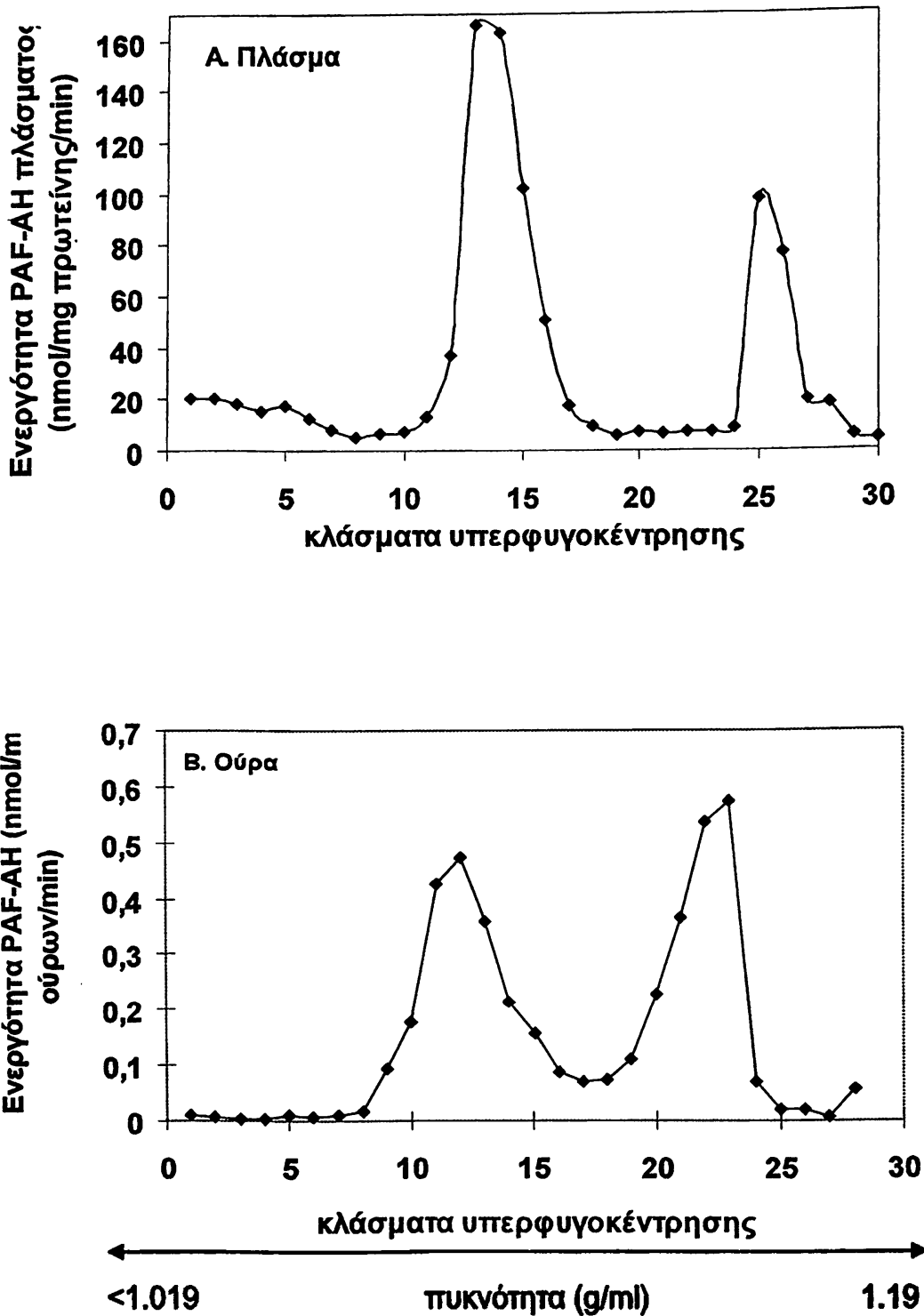
Είναι γνωστό ότι το ένζυμο PAF-AH είναι υδρόφοβο μόριο συνδεδεμένο στο πλάσμα με τις χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνες LDL κατά 70% περίπου και τις υψηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνες HDL κατά 30% περίπου (211). Η PAF-AH του πλάσματος μετά από υπερφυγοκέντρηση κατανέμεται ανισομερώς στα υποκλάσματα της LDL με μεγαλύτερη ενεργότητα στο μικρό πυκνό υποκλάσμα της LDL-5, ενώ μεταξύ των κλασμάτων της HDL κατανέμεται κυρίως στο μικρό πυκνό υποκλάσμα VHDL (212).

Μελετήθηκε η κατανομή της ενεργότητας του ενζύμου PAF-AH στο πλάσμα και στα ούρα ασθενών με ΝΣ. Η ενεργότητα στο πλάσμα ήταν κυρίως κατανομημένη στα κλάσματα 3-12 που περιέχουν LDL. Σε αντίθεση όμως με το πλάσμα όπου 30% του ενζύμου είναι συνδεδεμένο με τις πυκνές LDL, στα ούρα το μεγαλύτερο τμήμα της ενεργότητας (περίπου 75%) κατανέμεται στα κλάσματα 13 ως 25 (σχήμα 13). Επιβεβαιώσαμε με αυτό τον τρόπο ότι σε ασθενείς με ΝΣ η αποβαλλόμενη στα ούρα PAF-AH συνδέεται με τις αποβαλλόμενες λιποπρωτεΐνες κατά τρόπο παρόμοιο με αυτό που συμβαίνει στο πλάσμα. Ποια μορφή όμως του ενζύμου είναι στα ούρα;





Σχήμα 12. Western blotting ανάλυση λιποπρωτεϊνών ούρων ασθενούς με νεφρωσικό σύνδρομο. Οι αριθμοί αντιστοιχούν στα κλάσματα 9, 10, 11, 15 και 19 που ελήφθησαν από υπερφυγοκέντρηση ούρων και υποβλήθηκαν σε ηλεκτροφόρηση SDS-page 5-19%. Η ανοσοαποτύπωση έγινε με αντισώματα εναντίον απολιποπρωτεΐνης B (anti-apoB), απολιποπρωτεΐνης (a) (anti-apo(a)) και απολιποπρωτεΐνης AI (anti-apoAI).



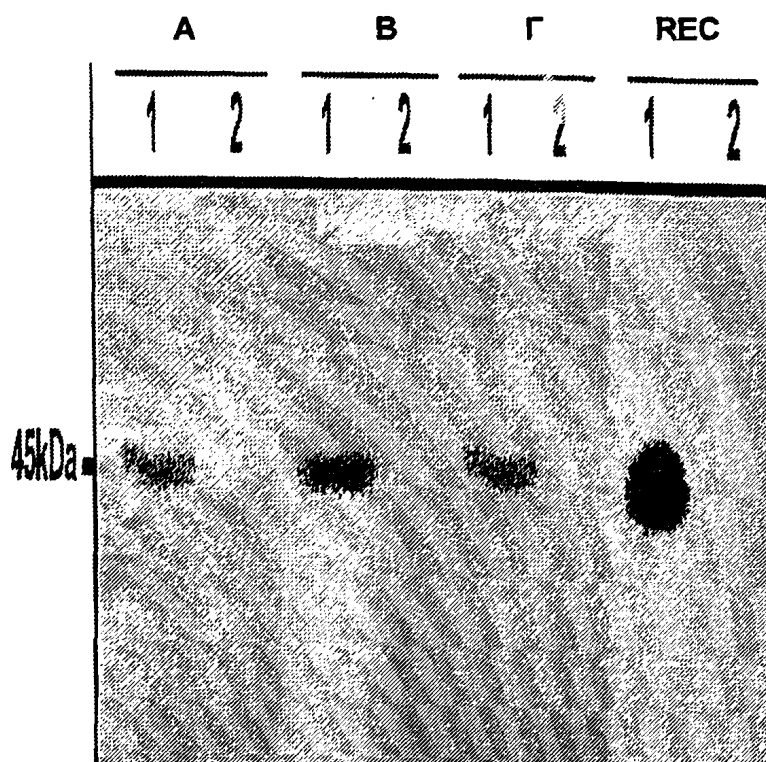
Σχήμα 13. Κατανομή της ενεργότητας της PAF-AH στα λιποπρωτεϊνικά κλάσματα

A πλάσματος και *B* ούρων σε ασθενή με νεφρωσικό σύνδρομο. Η ενεργότητα προσδιορίστηκε με τη μέθοδο καταβύθισης με TCA, όπως περιγράφηκε.



Ε) ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ PAF-AH ΤΩΝ ΟΥΡΩΝ

Για να απαντηθεί το ερώτημα αν η PAF-AH των ούρων είναι ίδια με αυτή του πλάσματος ή ενδοκυτάρια, κλάσματα των ούρων με τη μεγαλύτερη ενεργότητα του ενζύμου (11, 12, 22 και 23) υπεβλήθησαν σε Western blotting ανάλυση. Χρησιμοποιήσαμε πολυκλωνικό αντίσωμα για την PAF-AH του πλάσματος και μονοκλωνικό αντίσωμα για την ενδοκυτάρια II PAF-AH. Ως μάρτυρες χρησιμοποιήσαμε τα αντίστοιχα κλάσματα του πλάσματος 11 και 12. Όλα τα κλάσματα αντέδρασαν με το αντίσωμα της PAF-AH του πλάσματος, ενώ καμία αντίδραση δεν παρατηρήθηκε με την ενδοκυτάρια μορφή(σχήμα 14).



Σχήμα 14. Χαρακτηρισμός PAF-AH στα ούρα ασθενών με νεφρωσικό σύνδρομο.

Ανοσοηλεκτροφόρηση (Western Blotting) έγινε στα κλάσματα χρησιμοποιώντας αντισώματα: 1. πολυκλωνικό αντίσωμα κατά της PAF-AH του πλάσματος (Cayman, διάλυση 1/1000 v/v) και 2. μονοκλωνικό αντίσωμα κατά της ενδοκυττάριας II PAF-AH (διάλυση 1/500, v/v).

A: κλάσμα πλάσματος 11. B: κλάσμα ούρων 11. Γ: κλάσμα ούρων 22. REC: ανασυνδυασμένη PAF-AH



IV.ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Είναι γνωστό ότι οι ασθενείς με νεφρωσικό σύνδρομο παρουσιάζουν ποσοτικές και ποιοτικές διαταραχές των λιπιδίων του ορού. Οι ασθενείς με νεφρωσικό σύνδρομο της μελέτης μας εμφάνιζαν το αναμενόμενο λιποπρωτεϊνικό προφίλ : αύξηση της ολικής και της LDL- χοληστερόλης, της απολιποπρωτεΐνης Β και Ε και του αθηρωματικού δείκτη ολική/HDL χοληστερόλη. Η HDL χοληστερόλη, η απολιποπρωτεΐνη ΑΙ καθώς και η απολιποπρωτεΐνη Lp(a) δεν παρουσίασαν διαφορές σε σύγκριση με τους υγιείς και τους ασθενείς με μη νεφρωσικού τύπου πρωτεϊνουρία. Οι ασθενείς με νεφρωσικό σύνδρομο καθώς και οι ασθενείς με μη νεφρωσικού τύπου πρωτεϊνουρία εμφάνιζαν υψηλότερα επίπεδα τριγλυκεριδίων σε σύγκριση με τους υγιείς. Τα επίπεδα της ολικής και της LDL- χοληστερόλης συσχετιζόνταν αρνητικά με την αλβουμίνη του ορού, γεγονός που έχει επισημανθεί και σε άλλες μελέτες (56,57).

Οι περισσότερες μελέτες, αν και είναι αναδρομικές και με μικρό αριθμό ασθενών, συμφωνούν ότι οι ασθενείς με νεφρωσικό σύνδρομο παρουσιάζουν αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης καρδιαγγειακής νόσου, σε σύγκριση με τους υγιείς (49,50). Στεφανιαία αγγεία (νεκροτομικό υλικό) ασθενών με νεφρωσικό σύνδρομο είχαν εκτεταμένες βλάβες σε σύγκριση με άτομα ίδιας ηλικίας και φύλου (50). Στην καλύτερη σχεδιασμένη μελέτη όπου παράμετροι όπως κάπνισμα, σακχαρώδης διαβήτης και υπέρταση διορθώθηκαν στη στατιστική ανάλυση (48), ο σχετικός κίνδυνος εμφάνισης εμφράγματος μυοκαρδίου σε ασθενείς με νεφρωσικό σύνδρομο βρέθηκε να είναι κατά 5 φορές αυξημένος σε σύγκριση με τους υγιείς. Οι κυριότεροι παράγοντες κινδύνου πρώιμης εμφάνισης καρδιαγγειακής νόσου στους ασθενείς αυτούς είναι η αρτηριακή



υπέρταση, η υπερπηκτικότητα και οι διαταραχές των λιπιδίων-κυρίως η υπερχοληστερολαιμία, η αυξημένη LDL χοληστερόλη και απολιποπρωτεΐνη Β.

Τα τελευταία χρόνια μελετήθηκαν και άλλοι παράγοντες που εμπλέκονται στη διαδικασία της αθηρογένεσης, όπως το ένζυμο PAF-AH. Μελέτες έδειξαν ότι η ενεργότητα του ενζύμου στο πλάσμα ασθενών με στεφανιαία νόσο ή αθηροσκλήρυνση είναι αυξημένη. Η οξείδωση της LDL αποτελεί καθοριστικό βήμα στη διαδικασία της αθηρωμάτωσης γιατί προκαλεί: α) τη διήθηση του ενδοθηλίου από τα μακροφάγα μέσω της έκφρασης των μορίων προσκόλλησης VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule-1) και ICAM-1 (intercellular cell adhesion molecule-1) β) τη μετανάστευση και πολλαπλασιασμό των λείων μυικών κυττάρων στο ενδοθήλιο γ) τη προσκόλληση και συσσώρευση των αιμοπεταλίων στην περιοχή της βλάβης (318). Στις περιοχές αθηρωματικής βλάβης η έκκριση του PAF μπορεί να αυξήσει την οξειδωτική τροποποίηση της LDL που λαμβάνει χώρα στον έσω χιτώνα των αγγείων. Κατά τον οξειδωτικό τραυματισμό των ενδοθηλιακών κυττάρων και την οξείδωση της LDL παράγονται οξειδωμένα φωσφολιπίδια με δομή και δράση όμοια με αυτή του PAF (PAF-like φωσφολιπίδια) (109,191). Τα προϊόντα διάσπασης των οξειδωμένων αυτών παραγώγων τροποποιούν την ApoB(100), η οποία αναγνωρίζεται πλέον από τον υποδοχέα εκκαθαριστή των μακροφάγων και οδηγεί στο σχηματισμό αφρωδών κυττάρων. Η PAF-AH απενεργοποιεί, υδρολύοντας, τόσο τον PAF, όσο και τα PAF-like φωσφολιπίδια, παίζοντας έτσι πιθανά προστατευτικό ρόλο στην εξέλιξη της αθηρωμάτωσης (251).

Η ενεργότητα του ενζύμου PAF-AH στο πλάσμα ασθενών με νεφρωσικό σύνδρομο βρέθηκε αυξημένη, όπως άλλωστε διαπιστώθηκε και σε άλλες μελέτες (257,312). Μάλιστα οι τιμές της ενεργότητας του ενζύμου συσχετιζόνταν με τις συγκεντρώσεις της ολικής, LDL-χοληστερόλης και της απολιποπρωτεΐνης



B του πλάσματος. Διαπιστώσαμε επίσης ότι οι ασθενείς με πρωτεϊνουρία μη νεφρωσικού τύπου δεν παρουσίαζαν αυξημένες τιμές ενεργότητας PAF-AH, πιθανά λόγω του ότι το λιποπρωτεϊνικό προφίλ τους δε διέφερε ουσιαστικά από αυτό των υγιών. Η αυξημένη ενεργότητα του ενζύμου –που πιθανά αντικατοπτρίζει την απάντηση του οργανισμού στην αυξημένη παραγωγή των οξειδωμένων φωσφολιπιδίων στην περιοχή της αθηρωματικής βλάβης- καθώς και το λιποπρωτεϊνικό προφίλ των ασθενών με νεφρωσικό σύνδρομο εμπλέκονται στην αυξημένη επίπτωση καρδιαγγειακής νόσου σε αυτούς τους ασθενείς.

Στην εργασία μας μελετήσαμε την ενεργότητα της PAF-AH που συνδέεται με τη HDL. Είναι γνωστό από μεγάλες μελέτες, όπως η Framingham Heart Study, ότι τα επίπεδα της HDL-χοληστερόλης συσχετίζονται αντιστρόφως ανάλογα με τον κίνδυνο καρδιαγγειακής νόσου (319). Σε κυτταρικό επίπεδο η HDL φαίνεται να αποτρέπει την επίδραση της οξειδωμένης LDL στη διήθηση του ενδοθηλίου από τα μονοκύτταρα. Μάλιστα τα επίπεδα της είναι αντιστρόφως ανάλογα με τα επίπεδα της οξειδωμένης LDL. Μελέτες έχουν δείξει ότι η συνδεδεμένη με την HDL PAF-AH-σε αντίθεση με την ολική PAF-AH και την LDL συνδεδεμένη PAF-AH- είναι ένας από τους παράγοντες που συμβάλλει σημαντικά στην προστασία της LDL από την οξείδωση (318,320). Πρόσφατα επίσης δημοσιεύθηκε ότι η PAF-AH που συνδέεται με την HDL διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη μείωση της ικανότητας προσκόλλησης στο ενδοθήλιο και της διήθησης από μακροφάγα του υποενδοθηλιακού χώρου σε ποντίκια apoE^{-/-} καταστέλοντας την έκφραση των μορίων VCAM-1 και ICAM-1(321). Η μελέτη μας έδειξε για πρώτη φορά στη βιβλιογραφία ότι οι ασθενείς με νεφρωσικό σύνδρομο εμφανίζουν μειωμένη ενεργότητα της PAF-AH που συνδέεται με τη HDL (εκφρασμένη ανά mg HDL-χοληστερόλης). Πιθανά η



συνδεδεμένη στη HDL PAF-AH –που είναι μειωμένη- να συμβάλλει και αυτή στη διαδικασία της αθηρογένεσης στους ασθενείς με νεφρωσικό σύνδρομο.

Για πρώτη φορά επίσης μελετήθηκε η κατανομή του ενζύμου PAF-AH στις λιποπρωτεΐνες του ορού στους νεφρωσικούς ασθενείς. Είναι γνωστό ότι η LDL είναι ένας ετερογενής πληθυσμός σωματιδίων τα οποία διαφέρουν ως προς την πυκνότητά τους και τις φυσικοχημικές ιδιότητες. Τα μικρά και πυκνά σωματίδια της LDL είναι τα πλέον αθηρωγόνα. Με τη χρήση ισοπυκνικής βαθμίδωσης πυκνοτήτων έχει γίνει υποκλασμάτωση του πλάσματος σε 9 υποκλάσματα : VLDL, LDL 1-5, HDL-2, HDL-3 και VHDL και έχει μελετηθεί η κατανομή του ενζύμου στα υποκλάσματα αυτά. Η PAF-AH κατανέμεται κυρίως στην πυκνή LDL-5 καθώς και στο πυκνό τμήμα της HDL, στο VHDL (212). Στους ασθενείς με νεφρωσικό σύνδρομο της μελέτης μας ακολουθήσαμε την ίδια τεχνική ισοπυκνικής βαθμίδωσης πυκνοτήτων για υποκλασμάτωση των λιποπρωτεϊνών και μελέτη κατανομής του ενζύμου. Χαρακτηριστικά φαίνεται να επικρατούν τα πιο πυκνά και αθηρωγόνα υποκλάσματα των λιποπρωτεϊνών, LDL-4 και LDL-5 καθώς και HDL-2, η δε PAF-AH είναι συνδεδεμένη κυρίως με τις πυκνές LDL.

Η PAF-AH δεν είναι ένα ένζυμο που εμπλέκεται μόνο στη διαδικασία της αθηρωμάτωσης, αλλά και σε πολλές άλλες φλεγμονώδεις διεργασίες, όπως στη διαδικασία της σπειραματικής βλάβης σε ασθενείς με νεφρωσικό σύνδρομο. Όλοι οι ασθενείς μας με νεφρωσικό σύνδρομο είχαν ενζυμική ενεργότητα στα ούρα, ενώ σε αντίθεση με άλλη μελέτη (257), δεν παρατηρήθηκε ενζυμική ενεργότητα στα ούρα φυσιολογικών ατόμων και στους ασθενείς με μη νεφρωσικού τύπου πρωτεϊνουρία. Επιπλέον βασικό χαρακτηριστικό των ασθενών με νεφρωσικό σύνδρομο είναι η εμφάνιση λιπιδουρίας. Όλοι οι ασθενείς με νεφρωσικό σύνδρομο εμφάνισαν λιπιδουρία που αρχικά εκφράστηκε ως ανιχνεύσιμη χοληστερόλη στα ούρα 24 ώρου. Η ενεργότητα του



ενζύμου στα ούρα συσχετιζόταν θετικά με τη συγκέντρωση της χοληστερόλης στα ούρα, γεγονός που σημαίνει ότι η παρουσία του ενζύμου στα ούρα καθορίζεται από την έκκριση των λιποπρωτεϊνών. Η παρατήρηση αυτή ενισχύεται από το γεγονός ότι α) ο βαθμός πρωτεϊνουρίας δε συσχετίζεται με την ενεργότητα του ενζύμου και β) δε βρέθηκε ενεργότητα του ενζύμου στα ούρα ασθενών με μη νεφρωσικού τύπου πρωτεϊνουρία. Συνεπώς η ενεργότητα του ενζύμου αποτελεί ευαίσθητο δείκτη της λιπιδουρίας ασθενών με σπειραματονεφρίτιδα.

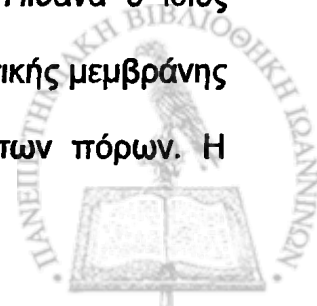
Δύο ερωτήματα δημιουργήθηκαν: ποια ισομορφή του ενζύμου αποβάλλεται στα ούρα και ποια η σχέση των αποβαλλόμενων στα ούρα λιποπρωτεϊνών με το ένζυμο. Είναι γνωστό ότι το ένζυμο χαρακτηρίζεται από δύο ισομορφές, την ενδοκυττάρια και την πλασματική. Η ανοσοηλεκτροφόρηση των ούρων απέδειξε ότι η PAF-AH των ούρων ασθενών με νεφρωσικό σύνδρομο είναι όμοια με αυτή του πλάσματος. Δε γνωρίζουμε την πηγή του ενζύμου, αν δηλαδή προέρχεται από το νεφρικό φλοιό ή εκκρίνεται από το σωληνάριο. Το γεγονός όμως ότι δεν ανιχνεύθηκε καθόλου η ενδοκυττάρια μορφή του ενζύμου μας απομακρύνει από την πιθανότητα το ένζυμο να προέρχεται από το νεφρικό φλοιό.

Για να απαντήσουμε στο δεύτερο ερώτημα, τη σχέση δηλαδή PAF-AH και λιποπρωτεϊνών στα ούρα ασθενών με νεφρωσικό σύνδρομο, χρησιμοποιήσαμε στα ούρα τις τεχνικές υπερφυγοκέντρωσης του πλάσματος. Τα αποτελέσματά μας έδειξαν ότι η PAF-AH των ούρων βρίσκεται κυρίως συνδεδεμένη με λιποπρωτεϊνικά σωματίδια των οποίων η υπερφυγοκεντρική συμπεριφορά είναι όμοια με αυτή της LDL του πλάσματος, φαίνεται δε η PAF-AH να συνδέεται εκλεκτικά με τα πυκνά και μεγάλα σωματίδια της LDL (κλάσματα 9-11).



Η ανεύρεση της χαρακτηριστικής ενζυμικής κατανομής στα ούρα των ασθενών με νεφρωσικό σύνδρομο μας έδωσε το ερέθισμα να ασχοληθούμε περαιτέρω με τη σύσταση των λιποπρωτεϊνών των ούρων. Στη βιβλιογραφία αναφέρεται εκτενώς ότι στα ούρα των νεφρωσικών ασθενών παρατηρούνται λιποπρωτεΐνες που περιέχουν απολιποπρωτεΐνη AI (77-82) και μοιάζουν με την HDL. Μόνο σε μία μελέτη (78) αναφέρεται η ύπαρξη απολιποπρωτεΐνης B-100 και σωματιδίων που μοιάζουν με την LDL στα ούρα ενός νεφρωσικού ασθενούς. Στην παρούσα μελέτη δείξαμε ότι στα ούρα των ασθενών με νεφρωσικό σύνδρομο αποβάλλονται εκτός από HDL και λιποπρωτεΐνες που περιέχουν απολιποπρωτεΐνη B-100, όπως VLDL, IDL και LDL, των οποίων όμως η απολιποπρωτεΐνη B-100 φαίνεται να είναι κατακερματισμένη σε πρωτεΐνες μικρότερου μοριακού βάρους. Ο κατακερματισμός αυτός δεν επηρεάζει ούτε το προφίλ των LDL λιποπρωτεϊνών ούτε τη σύνδεση της PAF-AH με την LDL. Φαίνεται όμως να ευθύνεται για την εκλεκτική σύνδεση της PAF-AH με τα πυκνά και μεγάλα σωματίδια της LDL (κλάσματα 9-11), όπως χαρακτηριστικά αποκαλύπτει η κατανομή ενεργότητας του ενζύμου στα κλάσματα της υπερφυγοκέντρωσης.

Ποιος ο ρόλος του ενζύμου στα ούρα των ασθενών με νεφρωσικό σύνδρομο; Είναι γεγονός ότι σε πειραματικά μοντέλα σπειραματονεφρίτιδας η έγχυση του PAF προκαλεί πρωτεϊνουρία πιθανά μέσω αλλαγής του μεγέθους των πόρων του σπειραματικού φραγμού διήθησης και όχι του φορτίου. Πιο συγκεκριμένα σε *in vitro* πειράματα ο PAF τροποποιεί το δίκτυο της F-ακτίνης των ενδοθηλιακών κυττάρων, γεγονός που οδηγεί το κύτταρο σε αλλαγή σχήματος και απώλεια των ιδιοτήτων προσκόλλησης (177). Πιθανά ο ίδιος μηχανισμός να λαμβάνει χώρα στα ποδοκύτταρα της σπειραματικής μεμβράνης και με αυτό τον τρόπο ο PAF να τροποποιεί το μέγεθος των πόρων. Η



χορήγηση αναστολέων του PAF μειώνει την πρωτεϊνουρία. Η εύρεση του ενζύμου PAF-AH στα ούρα ασθενών με νεφρωσικό σύνδρομο αποτελεί μηχανισμό εξισορρόπησης στην αυξημένη σύνθεση του PAF στα σημεία της σπειραματικής βλάβης; Είναι απάντηση στα αυξημένα επίπεδα PAF στο πλάσμα αυτών των ασθενών; Μία μελέτη έδειξε ότι δεν υπάρχει συσχέτιση της ενεργότητας του ενζύμου PAF-AH και του PAF στα ούρα (312).

Στη δική μας μελέτη δείξαμε ότι το ένζυμο στα ούρα των ασθενών με νεφρωσικό σύνδρομο προέρχεται από το πλάσμα και σχετίζεται με τη λιπιδουρία. Πιθανά ο PAF στα ούρα των ασθενών αυτών να αντιπροσωπεύει οξειδωμένη μορφή του PAF. Άλλωστε έχει αποδειχθεί ότι τόσο τα ενδοθηλιακά κύτταρα, τα μακροφάγα και τα λεία μυϊκά κύτταρα στο σπείραμα όσο και τα σωληναριακά κύτταρα μπορούν να οξειδώνουν την LDL (in vitro) και να ενεργοποιούν μηχανισμούς φλεγμονής (87). Η οξειδωμένη LDL πιθανά να εξηγεί και τον κατακερματισμό της αποβαλλόμενης στα ούρα απολιποπρωτεΐνης Β που βρήκαμε στη μελέτη μας.

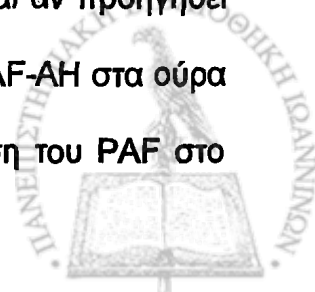
Είναι γνωστό ότι η δυσλιπιδαιμία της χρόνιας νεφρικής ανεπάρκειας ποικίλης αιτιολογίας, αποτελεί επιβαρυντικό παράγοντα στην εξέλιξη της νεφρικής βλάβης (67). Φαίνεται ότι η διαδικασία της σπειραματοσκλήρυνσης μοιάζει με αυτήν της αθηροσκλήρυνσης, δηλαδή παγίδευση και οξείδωση της LDL στα μεσαγγειακά κύτταρα, πολλαπλασιασμός των μεσαγγειακών κυττάρων, διήθηση από μακροφάγα, σχηματισμός σπειραματικών αφρωδών κυττάρων (foam cells) και ινικής (124-128). Εξάλλου σε ιστολογικό υλικό νεφρικών βιοψιών ασθενών με σπειραματονεφρίτιδα βρέθηκαν με ανοσοϊστοχημικές μεθόδους ενδοσπειραματικές εναποθέσεις απολιποπρωτεΐνης Β-100, απολιποπρωτεΐνης (α) και οξειδωμένης LDL (118-121). Η εύρεση στα ούρα κατακερματισμένης απολιποπρωτεΐνης Β-καθώς και



των άλλων λιποπρωτεϊνών-πιθανά αποτελεί άλλη μια ένδειξη ότι στο σωληνάριο αποβάλλονται προϊόντα οξειδωσης λιποπρωτεϊνών-διαδικασία που γίνεται στο σπείραμα και που εμπλέκεται στη σκλήρυνση του σπειράματος. Δυστυχώς όμως στη μελέτη μας δεν ήταν εφικτή η ανοσοϊστοχημική μελέτη των λιποπρωτεϊνών στο υλικό της νεφρικής βιοψίας.

Είναι ενδιαφέρουσα μια τελευταία μελέτη στην οποία η χορήγηση μιας στατίνης (σεριβαστατίνη) σε ασθενείς με πρωτεϊνουρία λόγω μεσαγγειοϋπερπλαστικής σπειραματονεφρίτιδας μείωσε όχι μόνο την πρωτεϊνουρία αλλά και τον αριθμό των αποβαλλόμενων στα ούρα τραυματισμένων ποδοκυττάρων (322). Αποτελεί αυτό ένδειξη ότι η στατίνη σταθεροποιεί τα ποδοκύτταρα της σπειραματικής μεμβράνης μέσω κυτταρικών μηχανισμών φλεγμονής στους οποίους εμπλέκονται και ένζυμα όπως η PAF-AH; Είναι σίγουρο πάντως ότι οι στατίνες μειώνουν τον κίνδυνο καρδιαγγειακής νόσου όχι μόνο μέσω της μείωσης των επιπέδων των λιποπρωτεϊνών, αλλά καταστέλλοντας σε κυτταρικό επίπεδο μόρια φλεγμονής και προσκόλλησης (323).

Τέλος η παρουσία στα ούρα της απολιποπρωτεΐνης B-100 μπορεί να συσχετισθεί και με τους μηχανισμούς της διαμεσοσωληναριακής βλάβης. Οι βλάβες του σωληναρίου και του διάμεσου χώρου που συνοδεύουν κάθε σπειραματονεφρίτιδα σε άλλοτε άλλο βαθμό αποτελούν σημαντικό παράγοντα εξέλιξης της νεφρικής βλάβης (90). Μελέτες in vitro έδειξαν ότι ο PAF που παράγεται από τα κύτταρα του σπειράματος ή από τα κύτταρα φλεγμονής επάγει τη σύνθεση ινώδους ιστού από τα διαμεσοσωληναριακά κύτταρα μέσω έκφρασης του mRNA της ινονεκτίνης. Η διαδικασία αναστέλλεται αν προηγηθεί χορήγηση ανταγωνιστών PAF (186). Πιθανά η παρουσία της PAF-AH στα ούρα των ασθενών με νεφρωσικό σύνδρομο να αντιρροπεί τη δράση του PAF στο



σωληνάριο. Επίσης είναι γνωστό ότι σε περιπτώσεις λευκωματουρίας ένα μεγάλο ποσοστό των διηθούμενων από το σπείραμα πρωτεϊνών και λιποπρωτεϊνών επαναρροφάται από το εγγύς εσπειραμένο σωληνάριο κινητοποιώντας διαδικασία φλεγμονής και κυτταρικού θανάτου στα νεφρικά σωληνάρια. Η επαναρρόφηση της απολιποπρωτεΐνης B-100 από τα εγγύς εσπειραμένα σωληνάρια πιθανά να ευθύνεται για τις διαμεσοσωληναριακές βλάβες οι οποίες βρέθηκαν στις νεφρικές βιοψίες των ασθενών μας με νεφρωσικό σύνδρομο.



Υ.ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Τα συμπεράσματα που προκύπτουν από τη μελέτη μας είναι:

1. οι ασθενείς με νεφρωσικό σύνδρομο παρουσιάζουν αυξημένη ενεργότητα του ενζύμου PAF-AH στο πλάσμα σε σύγκριση με υγιείς και με ασθενείς με μη νεφρωσικού τύπου λευκωματουρία
2. οι ασθενείς με νεφρωσικό σύνδρομο εμφανίζουν μικρότερη ενεργότητα του ενζύμου PAF-AH που συνδέεται με τη HDL, σε σύγκριση με τους υγιείς
3. η PAF-AH πλάσματος των ασθενών με νεφρωσικό σύνδρομο κατανέμεται κυρίως στα πυκνά και αθηρωγόνα υποκλάσματα της LDL
4. στα ούρα ασθενών με νεφρωσικό σύνδρομο βρίσκεται ενεργότητα του ενζύμου PAF-AH, κάτι το οποίο δεν παρατηρήθηκε στα ούρα υγιών και ασθενών με μη νεφρωσικού τύπου λευκωματουρία.
5. η ισομορφή της PAF-AH των ούρων είναι ίδια με αυτή του πλάσματος
6. η PAF-AH των ούρων συνδέεται με τις αποβαλλόμενες στα ούρα λιποπρωτεΐνες, κυρίως με υποκλάσματα που έχουν συμπεριφορά ίδια με τη LDL του πλάσματος
7. στα ούρα ασθενών με νεφρωσικό σύνδρομο αποβάλλονται εκτός από HDL και λιποπρωτεΐνες που περιέχουν απολιποπρωτεΐνη B-100, όπως VLDL, IDL και LDL, των οποίων όμως η απολιποπρωτεΐνη B-100 φαίνεται να είναι κατακερματισμένη σε πρωτεΐνες μικρότερου μοριακού βάρους



VI. ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο παράγοντας ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων (PAF) αποτελεί ένα διαμεσολαβητή της φλεγμονής. Η ενεργότητά του ρυθμίζεται από το ένζυμο PAF-ακετυλοϋδρολάση (PAF-AH), μια A_2 φωσφολιπάση που συνδέεται με τις λιποπρωτεΐνες του πλάσματος και θεωρείται ότι ασκεί αντιαθηρωματική και αντιφλεγμονώδη δράση. Η ενεργότητα της PAF-AH στο πλάσμα και στα ούρα ασθενών με πρωτοπαθή σπειραματονεφρίτιδα είναι αυξημένη σε σύγκριση με τους υγιείς, χωρίς ωστόσο να έχει διευκρινισθεί η σχέση της με την λιπιδιουρία του νεφρωσικού συνδρόμου. Η λιπιδιουρία - συνηθισμένο εύρημα στους ασθενείς με νεφρωσικό σύνδρομο - χαρακτηρίζεται σύμφωνα με βιβλιογραφικά δεδομένα κυρίως από την ύπαρξη υψηλής πυκνότητας λιποπρωτεϊνών (HDL).

Σκοπός της μελέτης μας ήταν να προσδιορισθεί το είδος και η σύσταση των αποβαλλόμενων στα ούρα λιποπρωτεϊνών καθώς και η κατανομή της ενεργότητας του ενζύμου PAF-AH στο πλάσμα και ούρα ασθενών με νεφρωσικό σύνδρομο.

Μελετήσαμε 8 ασθενείς με νεφρωσικό σύνδρομο λόγω πρωτοπαθούς σπειραματονεφρίτιδας και 10 ασθενείς με μη νεφρωσικού τύπου λευκωματουρία. Ως ομάδα ελέγχου χρησιμοποιήσαμε 20 υγιή άτομα.

Αρχικά προσδιορίσθηκε η ενεργότητα του ενζύμου στο ολικό πλάσμα καθώς και στην HDL πλάσματος. Στη συνέχεια οι λιποπρωτεΐνες του πλάσματος και συμπυκνωμένων ούρων 24ωρης συλλογής υποβλήθηκαν σε ισοπυκνική υπερφυγοκέντρηση βαθμίδωσης πυκνοτήτων. Στη συνέχεια όλα τα κλάσματα που προέκυψαν από την υπερφυγοκέντρηση πλάσματος και συμπυκνωμένων ούρων υποβλήθηκαν σε ηλεκτροφόρηση SDS-πολυακρυλαμιδίου σε πλάκες βαθμίδωσης 5-19% και οι ζώνες ανεδείχθησαν με



χρώση νιτρικού αργύρου. Πρωτεΐνες με πρότυπα μοριακά βάρη και ανασυνδυασμένη PAF-AH ηλεκτροφορήθηκαν ταυτόχρονα. Μετά την ηλεκτροφόρηση ακολούθησε μεταφορά των πρωτεϊνών και ανοσοαποτύπωση Western με αντισώματα αντι-αποπρωτεΐνης B-100, αντι-αποπρωτεΐνης(a), πολυκλωνικού αντισώματος κατά της PAF-AH του πλάσματος, μονοκλωνικού αντισώματος κατά της ενδοκυττάριας PAF-AH ισομορφής II.

Οι ασθενείς με νεφρωσικό σύνδρομο παρουσιάζουν αυξημένη ενεργότητα του ενζύμου PAF-AH στο πλάσμα σε σύγκριση με υγιείς και με ασθενείς με μη νεφρωσικού τύπου λευκωματουρία, ενώ εμφανίζουν μικρότερη ενεργότητα του ενζύμου PAF-AH που συνδέεται με τη HDL, σε σύγκριση με τους υγιείς. Η PAF-AH του πλάσματος των ασθενών με νεφρωσικό σύνδρομο κατανέμεται κυρίως στα πυκνά και αθηρωγόνα υποκλάσματα της LDL. Στα ούρα ασθενών με νεφρωσικό σύνδρομο βρίσκεται ενεργότητα του ενζύμου PAF-AH, κάτι το οποίο δεν παρατηρήθηκε στα ούρα υγιών και ασθενών με μη νεφρωσικού τύπου λευκωματουρία. Η ισομορφή της PAF-AH των ούρων είναι ίδια με αυτή του πλάσματος. Η PAF-AH των ούρων συνδέεται με τις αποβαλλόμενες στα ούρα λιποπρωτεΐνες, κυρίως με υποκλάσματα που έχουν συμπεριφορά ίδια με τη LDL του πλάσματος. Τέλος στα ούρα ασθενών με νεφρωσικό σύνδρομο αποβάλλονται εκτός από HDL και λιποπρωτεΐνες που περιέχουν απολιποπρωτεΐνη B-100, όπως VLDL, IDL και LDL, των οποίων όμως η απολιποπρωτεΐνη B-100 φαίνεται να είναι κατακερματισμένη σε πρωτεΐνες μικρότερου μοριακού βάρους

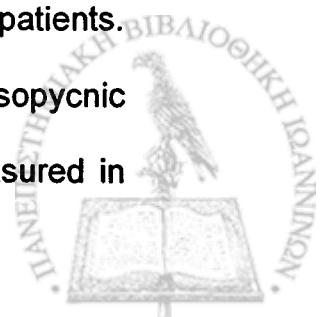


VII. SUMMARY

Platelet-activating factor (PAF) is a phospholipid mediator involved in inflammatory responses including pathogenesis of glomerulonephritis (GN). Its activity is regulated by paf-acetylhydrolase (PAF-AH), a phospholipase A₂-like enzyme, which is associated with plasma lipoproteins and exhibits a potent antiatherogenic and anti-inflammatory activity. Most of the plasma enzymatic activity is associated with apolipoprotein B-containing lipoproteins (predominantly with low-density lipoprotein, LDL); the remainder is associated with high density lipoprotein (HDL). Within these lipoprotein pools it appears that the enzyme is preferentially associated with small-dense LDL particles and with a very high density lipoprotein-1 subfraction. Changes in plasma PAF-AH activity have been reported in various disorders, including renal diseases. The enzyme activity in plasma of patients with GN has been found decreased or increased, while PAF-AH activity has also been found in urine of patients with primary GN.

In the present study we characterized the type of PAF-AH excreted in the urine of patients with primary GN and we studied the relationship of proteinuria and lipiduria observed in these patients with the enzyme activity. Eighteen patients with primary GN [8 with nephrotic syndrome (NS) and 10 with non-nephrotic range proteinuria (NNRP)] and 20 normolipidemic age and sex-matched controls participated in the study.

Basic biochemical and lipid parameters were measured in all patients. Lipoproteins in concentrated urine and plasma, were fractionated by isopycnic density gradient ultracentrifugation method. PAF-AH activity was measured in



plasma, in HDL, in urine samples as well as in the gradient fractions of plasma and concentrated urine by the trichloroacetic acid precipitation procedure. Samples from concentrated urine and from plasma of the same patient were submitted to SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) on 5% to 19% gradient gels, under reducing conditions. The protein bands were visualized with Silver stain. In some experiments, plasma and urine lipoprotein fractions were analyzed by the same SDS-PAGE followed by Western blot analysis. Immunoblotting was performed using anti-apoB-100 or polyclonal goat antibody against human apoAI or anti-apo(a) or a rabbit polyclonal antibody against the plasma type recombinant PAF-AH or a monoclonal antibody against the intracellular type II PAF-AH.

Plasma PAF-AH activity was higher in NS patients compared to NNRP patients and controls, whereas the HDL-associated enzyme activity was significantly decreased in NS and NNRP patients compared to controls. Enzyme activity was found only in the urine of NS patients, associated with LDL and HDL particles. Urine PAF-AH activity was positively correlated to urine cholesterol levels. The urine of NS patients exhibited all the range of plasma apo B- and apo AI-containing lipoproteins. Urine lipoprotein fractions contained multiple bands which were immunoreactive with the anti-apo B antibody in the Western blotting analysis, an evidence that these bands are fragmentation products of apo B. Finally Western-blotting analysis of PAF-AH in the urine of NS patients showed that the enzyme is similar to the plasma type.



VIII. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Clapp WL, Abrahamson DR. Development and gross anatomy of the kidney. In: Tisher CC and Brenner BM (Eds), *Renal pathology with clinical and functional correlations*, 2nd edition, 1994:1-59
2. Tisher CC, Brenner BM. Structure and function of the glomerulus. In: Tisher CC and Brenner BM (Eds), *Renal pathology with clinical and functional correlations*, 2nd edition, 1994:143-161
3. Pavenstadt H. Roles of the podocyte in glomerular function. *AJP-Renal Physiology* 2000; 278(2): F173-F179
4. Kriz W, Hackenthal E, Nobiling R, Sakai T, Elger M. A role for podocytes to counteract capillary wall distention. *Kidney Int.* 1994; 45: 369-376
5. Brenner BM, Hostetter TH, Humes HD. Glomerular perm selectivity: barrier function based on discrimination of molecular size and charge. *Am J Physiol.* 1978; 234(6) : F455-F460
6. Kanwar YS, Liu ZZ, Kashihara N, Wallner EI. Current status of the structural and functional basis of glomerular filtration and proteinuria. *Semin Nephrol* 1991; 11(4): 390-413
7. Miner JH. Renal basement membrane components. *Kidney Int* 1999; 56(6): 2016-2024
8. Rosenblum ND. The mesangial matrix in the normal and sclerotic glomerulus. *Kidney Int Suppl* 1994; 45: S73-S77



9. Deen WM, Bridges CR, Brenner BM, Myers BD. Heteroporous model of glomerular size selectivity: Application to normal and nephrotic humans. *Am J Physiol.* 1985; 249:F374-F389
10. Myers BD, Winetz JA, Chui F, Michaels AS. Mechanisms of proteinuria in diabetic nephropathy: a study of glomerular barrier function. *Kidney Int* 1982; 21:96-105
11. Comper W, Glasgow EF. Charge selectivity in kidney ultrafiltration *Kidney Int* 1995; 47: 1242-1251
12. Guasch A, Hashimoto H, Sibley RK, Deen WM, Myers BD. Glomerular dysfunction in nephrotic humans with minimal changes or focal glomerulosclerosis. *Am J Physiol* 1991; 260(5 Pt 2): F728-F737
13. Shemesh O, Ross JC, Deen WM, Grant GW, Myers BD. Nature of the glomerular capillary injury in human membranous glomerulopathy. *J Clin Invest* 1986; 77(3): 868-877.
14. Endlich K, Kriz W, Witzgall R. Update in podocyte biology. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2001; 10:331-340
15. Farquhar MG, Saito A, Kerjaschki D, Orlando A. The Heymann nephritis antigenic complex: megalin (gp330) and RAP. *J Am Soc Nephrol* 1995; 6: 35-47
16. Holzman LB, St. John PL, Kovari IA, Verma R, Holthofer H, Abrahamson DR. Nephritin localizes to the slit pore of the glomerular epithelial cell. *Kidney Int* 1999; 56: 1481-1491
17. Kestila M, Lenkkeri U, Mannikko M, Lamerdin J, McCready P, Putaala H, Ruotsalainen V, Morita T, Nissinen M, Herva R, Kashtan CE, Peltonen L, Holmberg C, Olsen A, Tryggvason K. Positionally cloned

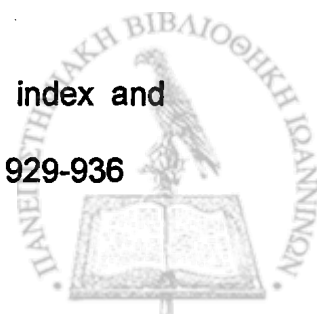


gene for a novel glomerular protein-nephrin-is mutated in congenital nephrotic syndrome. *Mol Cell* 1998;1: 575-582

18. Matsui K, Breiteneder-Geleff S, Kerjaschki D. Epitope-specific antibodies to the 43-kDa glomerular membrane protein podoplanin cause proteinuria and rapid flattening of podocytes. *J Am Soc Nephrol* 1998; 9: 2013-2026
19. Mundel P, Heid HW, Myndel TM, Kruger M, Reiser J, Kriz W. Synaptopodin: an actin-associated protein in telencephalic dendrites and renal podocytes. *J Biol Chem* 1997; 139:193-204
20. Thomas PE, Wharram BL, Goyal M, Wiggins JE, Holzman LB, Wiggins RC. GLEPP-1, a renal glomerular epithelial cell membrane protein-tyrosine phosphatase. *J Biol Chem* 1994; 2269:19953-19962
21. Yang D-H, Goyal M, Sharif K, Kershaw D, Thomas P, Dysko R, Wiggins R. Glomerular epithelial protein 1 and podocalyxin-like protein 1 in inflammatory glomerular disease in rabbit and man. *Lab Invest* 1996; 74: 571-584
22. Macconi D, Ghilardi M, Bonassi ME, Mohamed EI, Abbate M, Colombi F, Remuzzi G, Remuzzi A. Effect of angiotensin-converting enzyme inhibition on glomerular basement membrane permeability and distribution of zonula occludens-1 in MWF rats. *J Am Soc Nephrol* 2000; 11: 447-489
23. Remuzzi A, Fassi A, Bertani T, Perico N, Remuzzi G. ACE inhibition induces regression of proteinuria and halts progression of renal damage in a genetic model of progressive nephropathy. *Am J Kidney Dis* 1999; 34: 626-632



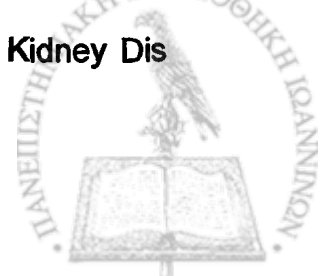
24. Ingami T. Molecular biology and signaling of angiotensin receptors: an overview. *J Am Soc Nephrol* 1999; 10: S2-S7
25. Gloy J, Henger A, Fisher KG, Nitschke R, Mundel P, Bleich M, Schollmeyer P, Greger R, Pavenstadt H. Angiotensin II depolarizes podocytes in the intact glomerulum. *J Clin Invest* 1997; 99: 2772-2781
26. Maschio G, Alberti D, Janin G, Locatelli F, Mann JF, Motolese M, Ponticelli C, Ritz E, Zucchelli P. Effect of the angiotensin-converting-enzyme inhibitor benazepril on the progression of the chronic renal insufficiency. *New Engl J Med* 1996; 334: 939-945
27. Schreiner GE. The nephrotic syndrome. In: Strauss MB and Welt LG (Eds), *Diseases of the kidney*, 2nd edition. Little, Brown & Company, Boston, 1971: 503
28. Glassock, Adler Ward and Cohen. Primary glomerular diseases. In: S. Massry and RJ. Glassock (Eds). *Pathogenesis of renal disease*, 3rd edition, 1994
29. Brenner BM, Meyer TW, Hostetter TH. Dietary protein intake and the progressive nature of kidney disease: the role of hemodynamically mediated glomerular injury in the pathogenesis of progressive glomerular sclerosis in aging, renal ablation, and intrinsic renal disease. *N Engl J Med* 1982; 9, 307(11): 652-659
30. Kaysen GA, Jones H, Martin V, Hutchison F. A low-protein diet restricts albumin synthesis in nephrotic rats. *J Clin Invest* 1989; 83: 1623-1632
31. Shaw A, Pison B, Lewis-Jackson J. Protein-creatinine index and albugin in assessment of proteinuria. *Br Med J* 1983; 287: 929-936



32. Castellino P, Cataliotti A. Changes of protein kinetics in nephrotic patients. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2002; 5(1): 43-45
33. Kaysen GA. Albumin turnover in renal disease. *Miner Electrolyte Metab* 1998; 24(1): 55-63
34. Koomans H, Kortland W, Geers AB Lowered protein content of tissue fluid in patients with the nephrotic syndrome. Observations during disease and recovery. *Nephron* 1985; 40: 391-398
35. Kaysen GA, Bander H. Metabolism of albumin and immunoglobulins in the nephrotic syndrome. *Am J Nephrol* 1990; 10: S36-S42
36. Sagripanti A, Barsotti G. Hypercoagulability, intraglomerular coagulation and thromboembolism in nephrotic syndrome. *Nephron* 1995; 70(3): 271-281
37. Mahajan SK. Zinc in kidney disease. *J Am Coll Nutr* 1989; 8(4): 296-304
38. Vaziri ND. Endocrinological consequences of the nephrotic syndrome. *Am J Nephrol* 1993; 13 (5): 360-364
39. Geers AB, Koomans HA, Roos JC, Boer P, Dorhout Mees EJ. Functional relationships in the nephrotic syndrome. *Kidney Int* 1984; 26: 324-330
40. Plum J, Mirzaian Y, Grabensee B. Atrial natriuretic peptide, sodium retention and proteinuria in nephrotic syndrome. *Nephrol Dial Transplant* 1996; 11: 1034-1042
41. Dussing R, Vetter H, Krammer HJ. The renin-angiotensin-aldosterone system in patients with the nephrotic syndrome. *Nephron* 1980; 25: 187-192



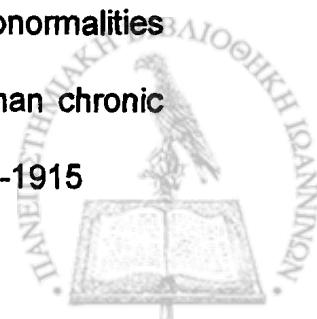
42. Poll MO, Gans ROB, Donker AJM. Treatment of intractable chyluria by stripping of the kidney. *N Engl J Med* 1990; 323: 552-553
43. Vande Walle JG, Donckerwolke RAMG, van Isselt JW, Derkx FHM, Joles JA, Koomans HA. Volume regulation in children with early relapse of minimal-change nephrosis with or without hypovolaemic symptoms. *Lancet* 1995; 346: 148-152
44. Peterson C, Madsen B, Perlman A, Chan AYM, Myers BD. Atrial natriuretic peptide and the renal response to hypovolaemia in nephrotic humans. *Kidney Int* 1988; 34: 825-831
45. Bellomo R, Atkins RC. Membranous nephropathy and thromboembolism: is prophylactic anticoagulation warranted? *Nephron* 1993; 63: 249-254
46. Llach F, Paper S, Massry SG. The clinical spectrum of renal vein thrombosis. *Am J Med* 1980; 69:819-827
47. Bernard DB. Extrarenal complications of the nephrotic syndrome. *Kidney Int* 1988; 33: 1184-1202
48. Ordonez JD, Hiatt RA, Killebrew EJ, Fireman BH. The increased risk of coronary heart disease associated with nephrotic syndrome. *Kidney Int* 1993; 44(3): 638-642
49. Orth SR, Ritz E. The nephrotic syndrome. *N Eng J Med* 1998; 338:1202-1211
50. Warwick GL, Packard CJ. Lipoprotein metabolism in the nephrotic syndrome. *Nephrol Dial Transplant* 1993; 8: 385-396
51. Wheeler DC, Bernard D. Lipid abnormalities in the nephrotic syndrome: Causes, consequences and treatment. *Am J Kidney Dis* 1994; 23(3) : 331-346



52. Elisaf M, Mikhailidis DP, Siamopoulos KC. Dyslipidaemia in patients with renal diseases. *J Drug Dev Clin Pract* 1996; 7: 331-348
53. Kasiske BL. Hyperlipidemia in patients with chronic renal disease. *Am J Kidney Dis* 1998 Nov; 32 (5 Sup3): S142-56
54. Stenvinkel P, Berglund L, Heimbürger O, Pettersson E, Alvestrand A. Lipoprotein (a) in nephrotic syndrome. *Kidney Int* 1993; 44: 1116-1123
55. Wanner C, Bartens W, Nauck M, Zauner I, Greiber S, Schollmeyer P. Lipoprotein (a) in patients with the nephrotic syndrome: influence of immunosuppression and proteinuria. *Miner Electrolyte Metab* 1996;22(1-3):26-30
56. Appel GB, Blum CB, Chien S, Kunis C, Appel AS. The hyperlipidemia of the nephrotic syndrome. Relation to plasma albumin concentration, oncotic pressure and viscosity. *New Engl J Med* 1985; 312: 1544-1548
57. Kaysen GA, Don B, Schambelan M. Proteinuria, albumin synthesis and hyperlipidemia in the nephrotic syndrome. *Nephrol Dial Transplant* 1991; 6: 141-149
58. Noto D, Barbagallo CM, Cascio AL, Cafalu AB, Cavera G, Cardarella R, Marino G, Travali S, Cutaia I, Maringhini S, Notarbartolo A, Averna M. Lipoprotein (a) levels in relation to albumin concentration in childhood nephrotic syndrome. *Kidney Int* 1999; 55: 2433-2439
59. Deighan CJ, Caslake MJ, Mc Connell M, Boulton-Jones M, Packard C. Increased atherogenicity of low-density lipoprotein in heavy proteinuria. *Nephrol Dial Transplant* 1998; 13; 1183-1188



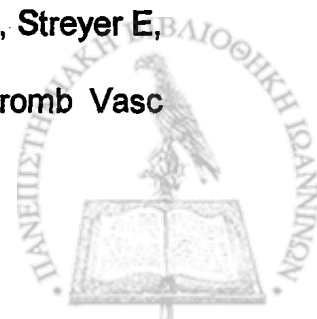
60. Joven J, Rubies-Prat J, Espinel E, Ras MR, Piera L. High density lipoproteins in untreated idiopathic nephrotic syndrome without renal failure. *Nephrol Dial Transplant* 1987; 2: 149-153
61. De Sain-Van Der Velden MG, Kaysen GA, Barrett HA, Gadellaa MM, Voorbij H, Stellaard F, Reijngoud DJ, Rabelink TJ. Increased VLDL in nephrotic patients results from a decreased catabolism while increased LDL results from increased synthesis. *Kidney Int* 1998; 53: 994-1001
62. Kashyap ML, Srivastava LS, Hynd BA, Brady D, Perisutti F, Glueck CJ, Gartside PS. Apolipoprotein C II and lipoprotein lipase in human nephrotic syndrome. *Atherosclerosis* 1980; 35: 29-40
63. Liang K, Vaziri ND. Down-regulation of hepatic lipase expression in experimental nephrotic syndrome. *Kidney Int* 1997; 51: 1933-1937
64. Kaysen GA, De Sain-Van Der Velden MG. New insights into lipid metabolism in the nephrotic syndrome, *Kidney Int* 1999; 55: S18-S21
65. Kaysen GA. Nephrotic hyperlipidemia: primary abnormalities in both lipoprotein catabolism and synthesis. *Miner Electrolyte Metab* 1992; 18: 212-216
66. De Sain-Van Der Velden MG, Reijngoud DJ, Kaysen GA, Gadellaa MM, Voorbij H, Stellaard F, Koomans HA, Rabelink TJ. Evidence for increased synthesis of lipoprotein (a) in the nephrotic syndrome. *J Am Soc Nephrol* 1998 Aug; 9(8): 1474-81
67. Samuelson O, Mulec H, Knight-Gibson C, Attman P-O, Kron B, Larsson R, Weiss L, Wedel H, Alaupovic P. Lipoprotein abnormalities are associated with increased rate of progression of human chronic renal insufficiency. *Nephrol Dial Transplant* 1997; 12: 1908-1915



68. Wheeler DC. Lipid abnormalities in the nephrotic syndrome: the therapeutic role of statins. *J Nephrol* 2001 Nov-Dec; 14 Suppl 4:S70-S75
69. Olbricht CJ, Wanner C, Thiery J, Basten A. Simvastatin in nephrotic syndrome. Simvastatin in Nephrotic Syndrome Study Group. *Kidney Int Suppl* 1999 Jul; 71: S113-6
70. Prata MM, Nogueira AC, Pinto JR, Correia AM, Vicente O, Rodrigues MC, Miguel MJ. Long-term effect of lovastatin on lipoprotein profile in patients with primary nephrotic syndrome. *Clin Nephrol* 1994 May; 41(5): 277-83
71. Saku K, Reddy GS, Hynd BA, Kashyap ML. Renal handling of high density lipoproteins by isolated perfused kidneys. *Metabolism* 1984; 33: 432-438
72. Streather CP, Varghese Z, Moorhead JF, Scoble JE. Lipiduria in renal disease. *Am J Hypertension* 1993; 6(11): S353-S357
73. Gherardi E, Calandra S. Plasma and urinary lipids and lipoproteins during the development of nephrotic syndrome induced in the rat by puromycin aminonucleoside. *Biochem Biophys Acta* 1981; 710: 188-196
74. Shafrir E, Levy E, Deckelbaum R. Urinary excretion of apolipoproteins bound to HDL-like particles in rat nephrotic urine and their relation to plasma HDL. *Nephron* 1990; 56: 24-29
75. Blackburn V, Grignani S, Fogazzi GB. Lipiduria as seen by transmission electron microscopy. *Nephrol Dial Transplant* 1998; 13: 2682-2684



76. Klahr S, Tripathy K, Bolanos O. Qualitative and quantitative analysis of urinary lipids in the nephrotic syndrome. *J Clin Invest* 1967; 46(9): 1475-1481
77. Lopes-Virella M, Virella G, Debeukelaer M, Owens CJ, Colwell JA. Urinary high density lipoprotein in minimal change glomerular disease and chronic glomerulopathies. *Clin Chim Acta* 1979; 94: 73-81
78. Shore VG, Forte T, Licht H, Lewis SB. Serum and urinary lipoproteins in the human nephrotic syndrome: Evidence for renal catabolism of lipoproteins. *Metabolism* 1982; 31(3): 258-268
79. Moorhead JF, El-Nahas M, Harry D, Persaud JW, Mayne K, Chan MK, Varghese Z. Focal glomerular sclerosis and nephrotic syndrome with partial lecithin-cholesterol acyltransferase deficiency and discoidal high density lipoprotein in plasma and urine. *Lancet* 1983; 23: 936-937
80. Short CD, Durrington PN, Mallick NP, Hunt L, Tetlow L, Ishola M. Serum and urinary high density lipoproteins in glomerular disease with proteinuria. *Kidney Int* 1986; 29: 1224-1228
81. Saku K, Mendoza SG, Laver M. High-density lipoprotein apolipoprotein A-I and A-II turnover in moderate and severe proteinuria. *Nephron* 1988; 50: 112-115
82. Joven J, Villabona C, Virella E, Masana L, Alberti R, Valles M. Abnormalities of lipoprotein metabolism in patients with the nephrotic syndrome. *New Engl J Med* 1990; 323: 579-584
83. Kostner KM, Maurer G, Huber K, Stefenelli T, Dieplinger H, Streyer E, Kostner GM. Role in apo(a) catabolism. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1996; 16: 905-911



84. Kostner KM, Banyai S, Banyai M, Boodlaj G, Maurer G, Derfler K, Horl Wh, Oberbauer R. Urinary apo(a) excretion in patients with proteinuria. *Ann Med* 1998; 30: 497-502
85. Douchet C, Mooser V, Gonbert S, Raymond F, Chapman J, Jacobs C, Thillet J: Lipoprotein(a) in the Nephrotic Syndrome: Molecular Analysis of Lipoprotein(a) and Apolipoprotein(a) Fragments in Plasma and Urine. *J Am Soc Nephrol* 2000; 11:507-513
86. Remuzzi G. Abnormal protein traffic through the glomerular barrier induces proximal tubular cell dysfunction and causes renal injury *Curr Opin in Nephrol Hypert* 1995; 4: 339-342
87. Ong A, Moorhead J. Tubular lipidosis: epiphenomenona or pathogenetic lesion in human renal disease. *Kidney Int* 1994; 45: 753-762
88. Schreiner GF. Renal toxicity of albumin and other lipoproteins. *Curr Opin in Nephrol Hypert* 1995; 4: 369-373
89. Couser WG. Mechanisms of immune glomerular injury. *Ελληνική Νεφρολογία* 2002; 14: 100-108
90. Couser WG, Pathogenesis of glomerulonephritis. *Kidney Int* 1993; 44(S42): 19-26
91. Remuzzi G. Pathophysiology of progressive nephropathy. *N Engl J Med* 1998; 339: 1448-1456
92. Kikuchi H, Kawachi H, Ito Y. Severe proteinuria sustained for 6 months, induces tubular epithelial cell injury and cell filtration in rats but not progressive interstitial fibrosis. *Nephrol Dial Transplant* 2000; 15: 799-810
93. Grupe WE. Minimal change disease. *Sem Nephrol* 1982; 2: 241-255



94. Lim VS, Sibley R, Spargo B. Adult lipid nephrosis: clinopathological correlations. *Ann Intern Med* 1974; 81: 314-319
95. Report of International study of Kidney Disease in Children. Primary nephrotic syndrome in children: Clinical significance of histopathological variants of minimal change disease. *Kidney Int* 1981; 20: 765-769
96. Report of International study of Kidney Disease in Children. Primary nephrotic syndrome in children: Identification of patients, from initial response to prednisone. *J Pediatr* 1981; 98: 561-566
97. Korbet SM, Schwartz M, Lewis M. Minimal change glomerulopathy of adulthood. *Am J Nephrol* 1988; 8: 29-35
98. Mota-Hernandez F, Jimenez R, Munoz-Arispe R, Gordillo-Pantagua G. Idiopathic nephrotic syndrome with diffuse mesangial proliferation. In Strauss J (ed): *Pediatric Nephrology, Vol 5: Nephrotic syndrome. Current concepts in diagnosis and treatment.* New York Press, 1979
99. Donadio JV, Grande JP. IgA nephropathy. *New Engl J Med* 2002; 347(10): 738-748
100. Nicholls KM, Fairley KF, Dowling JP, Kincaid-Smith P. The clinical course of mesangial IgA associated nephropathy in adults. *Q J Med* 1984; 53: 227-250
101. Pozzi C, Bolasco PG, Foggazzi GB, Andrulli S, Altieri P, Ponticelli C, Locatelli F. Corticosteroids in IgA nephropathy: a randomized controlled trial. *Lancet* 1999; 353: 883-887
102. Dillon JJ. Fish oil therapy for IgA nephropathy: efficacy and interstudy variability. *J Am Soc Nephrol* 1997; 8: 1739-1744



- 103.** Korbet SM. Primary focal segmental glomerulosclerosis. *J Am Soc Nephrol* 1998; 9:1333-1340
- 104.** Schwartz MM, Korbet SM. Primary focal segmental glomerulosclerosis: Pathology, histological variants and pathogenesis. *Am J Kidney Dis* 1993; 22: 874-883
- 105.** Rydel JJ, Korbet SM, Borok RZ, Schwartz MM. Focal segmental glomerulosclerosis in adults: Presentation, course and response to treatment. *Am J Kidney Dis* 1995; 25: 534-542
- 106.** Briggs WA, Choi MG, Scheel PJ. Successful mycophenolate mofetil treatment of glomerular disease. *Am J Kidney Dis* 1998; 31: 213-217
- 107.** Zucchelli P, Cagnoli L, Pasquali S, Casanova S, Donini U. Clinical and morphologic evolution of idiopathic membranous nephropathy. *Clin Nephrol* 1986; 25:282
- 108.** Honkanen E, Tornroth T, Gronhagen-Riska C. Natural history, clinical course and morphological evolution of membranous nephropathy. *Nephrol Dial Transplant (suppl)* 1992; 35-41
- 109.** Cattran DC, Pei Y, Greenwood C. Predicting progression in membranous glomerulonephritis. *Nephrol Dial Transplant (suppl)* 1992; 48-52
- 110.** Cattran DC. Idiopathic membranous glomerulonephritis. *Kidney Int* 2001; 59: 1983-1994
- 111.** Ponticelli C, Zucchelli P, Passerini P, Cesana B, Locatelli F, Pasquali S, Sasdelli M, Redaelli B, Grassi C, Pozzi C, et al. A 10-year follow-up of a randomized study with methylprednisolone and chlorambukil in membranous nephropathy. *Kidney Int* 1995; 48: 1600-1604



- 112.** Mathieson PW, Turner AN, Maidment CG, Evans DJ, Rees AJ. Prednisolone and chlorambukil treatment in idiopathic membranous nephropathy with deteriorating renal function. *Lancet* 1988; 2:869-872
- 113.** Ritz E, Rychlik I, Locatelli F, Halimi S. End-stage renal failure in type 2 diabetes: a medical catastrophe of worldwide dimensions. *Am J Kidney Dis* 1999; 34: 795-808
- 114.** Ismail N, Becker B, Strzelczyk P, Ritz E. Renal disease, hypertension in non-insulin dependent diabetes mellitus. *Kidney Int* 1999; 55: 1-28
- 115.** Locatelli F, Canaud B, Eckardt KU, Stenvinkel P, Wanner C, Zoccali C. The importance of diabetic nephropathy in current nephrological practice. *Nephrol Dial Transplant* 2003; 18: 1716-1725
- 116.** Kasiske BL, O' Donnell MP, Schmitz PG, Keane WF. The role of lipid abnormalities in the pathogenesis of chronic progressive renal disease. *Adv Nephrol* 1991; 20: 109-125
- 117.** Wheeler DC. Lipids- What is the evidence for their role in progressive renal disease? *Nephrol Dial Transplant* 1995; 3: 14-16
- 118.** 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(3): 127-133
- 119.** Lee HS, Lee JS, Koh HI, KO KW. Intraglomerular lipid deposition in routine biopsies. *Clin Nephrol* 1991; 36(2): 67-75
- 120.** Sato H, Suzuki S, Ueno M, Shimada H, Karasawa R, Nishi SI, Arakawa M. Localization of apolipoprotein(a) and B-100 in various renal diseases. *Kidney Int* 1993; 43: 430-435



121. Takemura T, Yoshioka K, Aya N, Murakami K, Matumoto A, Itakura H, Kodama T, Suzuki H, Maki S. Apolipoproteins and lipoproteins receptors in glomeruli in human kidney diseases. *Kidney Int* 1993; 43: 918-927
122. Kramer A, Nauck M, Pavenstadt H, Schwedler S, Wieland H, Schollmeyer P, Wanner C. Receptor-mediated uptake of IDL and LDL from nephrotic patients by glomerular epithelial cells. *Kidney Int* 1993; 44: 1341-1351
123. Lee HS, Kim YS. Identification of oxidized low density lipoprotein in human renal biopsies. *Kidney Int* 1998; 54: 848-856
124. Gröne EF, Walli AK, Gröne HJ, Miller B, Seidel D. The role of lipids in nephrosclerosis and glomerulosclerosis. *Atherosclerosis* 1994; 107: 1-13
125. Moorhead JF, Brunton C, Varghese Z. Glomerular atherosclerosis. *Miner Electrolyte Metab* 1997; 23: 287-290
126. Rovin BH, Tan LC. LDL stimulates mesangial fibronectin production and chemoattractant expression. *Kidney Int* 1993; 43: 218-225
127. Kamanna VS, Pai R, Ha H, Kirschenbaum MA, Roh D. Oxidized low-density lipoprotein stimulates monocyte adhesion to glomerular endothelial cells. *Kidney Int* 1999; 55: 2192-2202
128. Lynn EG, Siow YL, O Kamin. Very low-density lipoprotein stimulates the expression of monocyte chemoattractant protein-1 in mesangial cells. *Kidney Int* 2000; 57: 1472-1483



129. Henson PM. Release of vasoactive amines from rabbit platelets induced by sensitized mononuclear leucocytes and antigen. *J Exp Med* 1970; 131(2): 287-306
130. Siraganian RP, Osler AG. Destruction of rabbit platelets in the allergic response of sensitized leukocytes. I. Demonstration of a fluid phase intermediate. *J Immunol* 1971; 106(5): 1244-1251
131. Benveniste J, Henson PM, Cochrane CG. Leukocyte-dependent histamine release from rabbit platelets. The role of IgE, basophils and a platelet-activating factor. *J Exp Med* 1972; 136(6): 1356-1377
132. Demopoulos CA, Pinckard RN, Hanahan DJ. Platelet-activating factor. Evidence for 1-O-alkyl-2-acetyl-sn-glycerol-3-phosphorylcholine as the active component (a new class of lipid chemical mediators). *J Biol Chem* 1979; 254(19): 9355-9358
133. McManus LM. Pathobiology of platelet-activating factors. *Pathol Immunopathol Res* 1986; 5(2): 104-117
134. Izumi T, Shimizu T. Platelet-activating factor receptor: gene expression and signal transduction. *Biochim Biophys Acta* 1995; 1259(3): 313-333
135. Imaizumi TA, Stafforini DM, Yamada Y, McIntyre TM, Prescott SM, Zimmerman GA. Platelet-activating factor: a mediator for clinicians. *J Intern Med* 1995; 238(1): 5-20
136. Ishii S, Nagase T, Tashiro F, Ikuta K, Sato S, Waga I, Kume K, Miyazaki J, Shimizu T. Bronchial hyperreactivity, increased endotoxin lethality and tumorigenesis in transgenic mice overexpressing platelet-activating factor receptor. *EMBO J* 1997; 16(1): 133-142



137. Nagase T, Ishii S, Katayama H, Fukuchi Y, Ouchi Y, Shimizu T. Airway responsiveness in transgenic mice overexpressing platelet-activating factor receptor. Roles of thromboxanes and leukotrienes. *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 156(5): 1621-1627
138. Ishii S, Kuwaki T, Nagase T, Maki M, Tashiro F, Synaga S, Cao WH, Ikuta K, Kume K, Fukuchi Y, Miyazaki J, Kumada M, Shimizu T. Impaired anaphylactic responses with intact sensitivity to endotoxin in mice lacking a platelet-activating factor receptor. *J Exp Med* 1998; 187(11): 1779-1788
139. Nagase T, Ishii S, Kume K, Uozumi N, Izumi T, Ouchi Y, Shimizu T. Platelet-activating factor mediates acid-induced lung injury in genetically engineered mice. *J Clin Invest* 1999; 104(8): 1019-1020
140. Wykle RL, Olson SC, Flaherty JT. Biochemical pathways of platelet-activating factor synthesis and breakdown. *Adv Inflam Res* 1986; 11:71-81
141. Wykle RL, Malone B, Snyder F. Enzymatic synthesis of 1-O-alkyl-2-acetyl-sn-glycerol-3-phosphorylcholine, a hypotensive and platelet-aggregating lipid. *J Biol Chem* 1980; 255(21): 10256-10260
142. Renooij W, Snyder F. Biosynthesis of 1-alkyl-2-acetyl-sn-glycerol-3-phosphocholine (platelet-activating factor and a hypotensive lipid) by cholinephosphotransferase in various rat tissues. *Biochim Biophys Acta* 1981; 663(2): 545-556
143. Pirotzky E, Bidault J, Burtin C, Gubler MC, Benveniste J. Release of platelet-activating factor, slow-reacting substance and vasoactive amines from isolated rat kidneys. *Kidney Int* 1984; 25(2): 404-410



- 144.** Pirotzky E, Ninio E, Bidault J, Pfister A, Benveniste J. Biosynthesis of platelet-activating factor. VI. Precursor of platelet-activating factor and acetyltransferase activity in isolated rat kidney cells. *Lab Invest* 1984; 51(5): 567-572
- 145.** 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(5): 1404-1412
- 146.** Schlondorff D, Goldwasser P, Neuwirth R, Satriano JA, Clay KL. Production of platelet-activating factor in glomeruli and cultured glomerular mesangial cells. *Am J Physiol* 1986;250:F1123-F1127
- 147.** Sanchez-Crespo M, Inarrea P, Alvarez V, Alonso F, Egido J, Hernando L. Presence in normal human urine of a hypotensive and platelet-activating phospholipid. *Am J Physiol* 1983;244:F706-F711
- 148.** Hirashima Y, Kato R, Endo S, Takaku A, Karasawa K, Nojima S. Immunofluorescent localization of platelet-activating factor in the rat. *Histochem* 1993; 25(11): 830-833
- 149.** Bessin P, Bonnet J, Apffel D, Soulard C, Desgroux L, Pelas I, Benveniste J. Acute circulatory collapse caused by platelet-activating factor in dogs. *Eur J Pharmacol* 1983;869(3-4):403-413
- 150.** Feuerstein G, Boyd LM, Ezra D, Goldstein RE. Effect of platelet-activating factor on coronary circulation of the domestic pig. *Am J Physiol* 1984; 246(3 Pt 2): H466-H471
- 151.** Kenzora JL, Perez JE, Bergmann SR, Lange LG. Effects of acetyl glyceryl ether of phosphorylcholine (platelet-activating factor) on ventricular preload, afterload and contractility in dogs. *J Clin Invest* 1984;74(4):1193-1203



- 152.** Santos JC, Sanz E, Caramelo C, Lopez-Novoa. Effect of intrarenal infusion of synthetic PAF-acether in dogs. *Rev Esp Fisiol* 1988; 44(3): 273-277
- 153.** Badr KF, DeBoer DK, Takahashi K, Harris RC, Fogo A, Jacobson HR. Glomerular responses to platelet-activating factor in the rat: role of thromboxane A₂. *Am J Physiol* 1989; 256(1 PT 2): F35-F43
- 154.** Yoo J, Schlondorff D, Neugarten J. Thromboxane mediates the renal hemodynamic effects of platelet-activating factor. *J Pharmacol Exp Ther* 1990; 253(2): 743-748
- 155.** Handa RK, Strandboy JW, Buckalew VM Jr. Platelet-activating factor is a renal vasodilator in the anesthetized rat. *Am J Physiol.* 1990; 258(6 Pt 2):F1504-F4509
- 156.** Schwertschlag U, Scherf H, Gerber JG, Mathias M, Nies AS. L-platelet activating factor induces changes on renal vascular resistance, vascular reactivity and renin release in the isolated perfused rat kidney. *Circ Res* 1987; 60(4): 534-539
- 157.** Juncos LA, Ren YL, Arima S, Ito S. Vasodilator and constrictor actions of platelet-activating factor in the isolated microperfused afferent arteriole of the rabbit kidney. Role of endothelium-derived relaxing factor/nitric oxide and cyclooxygenase products. *J Clin Invest* 1993; 91(4): 1374-1379
- 158.** Lopez-Farre A, Torralbo M, Lopez-Novoa JM. Glomeruli from ischemic rat kidneys produce increased amounts of platelet activating factor *Biochem Biophys Res Commun* 1988; 152(1): 129-135
- 159.** Torras J, Bordalba JR, Seron D, Moliner R, Carrera M, Valles J, Martinez-Castelao A, Alsina J, Grino JM. Protective effect of the PAF



antagonist BN52021 in an experimental renal warm ischemia model.

Transpl Int 1993;6(4):236-238

160. Yin M, Kurves HA, Bourman WA, Tangelder GJ, Tiebosch AT, Daemen JH, Kootstra G. Platelet-activating factor antagonist TCV-309 protects rat kidneys against ischemia-reperfusion injury. Transplant Proc 1995; 27(5): 2844-2846
161. Gonzalez-Fajardo JA, Fernandez L, Alvarez T, Aguirre B, Ramos G, Vaquerro C. Ann Vasc Surg 1996; 10(1): 16-21
162. Riera M, Torras J, Herrero I, Valles J, Paubert-Braquet M, Cruzardo JM, Alsina J, Grinyo JM. Neutrophils accentuate renal cold ischemia-reperfusion injury. Dose-dependent protective effect of a platelet-activating factor receptor antagonist. J Pharmacol Exp Ther 1997; 280(2): 786-794
163. Lopez-Farre A, Gomez-Garre D, Bernabeu F, Lopez-Novoa JM. A role for endothelin in the maintenance of post-ischaemic renal failure in the rat. J Physiol 1991; 444:513-522
164. Lopez-Farre A, Gomez-Garre D, Bernabeu F, Montanes I, Millas I, Lopez-Novoa JM. Renal effects and mesangial cell contraction induced by endothelin are mediated by PAF. Kidney Int 1991; 39(4): 624-630
165. Ito O, Camussi G, Tetta C. Hyperacute renal allograft rejection in the rabbit: the role of platelet-activating factor and cationic proteins derived from polymorphonuclear leukocytes and from platelets. Lab Invest 1984; 51:148-161



166. Hruby Z, Lowry RP, Blais D. Effect of platelet-activating factor antagonist CV3988 in an autologous nephrotoxic nephritis model. *Clin Res* 1986; 34:602a
167. Sanchez-Crespo M, Alonso F, Barat A, Egido J. Rat serum sickness: possible role of inflammatory mediators allowing deposition of immune complexes in the glomerular basement membrane. *Clin Exp Immunol* 1982; 49:631-638
168. Perico N, Remuzzi G. Role of platelet-activating factor in renal immune injury and proteinuria. *Am J Nephrol* 1990; 10(suppl 1): 98-104
169. Cochrane CG, Unanue ER, Dixon FJ. A role of polymorphonuclear leukocytes and complement in nephrotoxic nephritis. *J Exp Med* 1965; 122:99-116
170. Schreiner GF, Cotran RS, Pardo V. A mononuclear cell component in experimental immunological glomerulonephritis. *J Exp Med* 1978; 147: 369-384
171. Bertani T, Livio M, Macconi D, Morigi M, Bisogno G, Patrono C, Remuzzi G. Platelet-activating factor (PAF) as a mediator of injury in nephrotoxic nephritis. *Kidney Int* 1987; 31(6): 1248-1256
172. Macconi D, Benigni A, Morigi M, Ubiali A, Orisio S, Livio M, Perico N, Bertani T, Remuzzi G, Patrono C. Enhanced glomerular thromboxane A₂ mediates some pathophysiologic effect of platelet-activating factor in rabbit nephrotoxic nephritis: evidence from biochemical measurements and inhibitor trials. *J Lab Clin Med* 1989; 113(5): 549-560



- 173.** Perico N, Delaini F, Tagliaferri M, Abbate M, Cucchi M, Bertani T, Remuzzi G. Effect of platelet-activating factor and its specific receptor antagonist on glomerular permeability to proteins in isolated perfused rat kidney. *Lab Invest* 1988; 58 (2): 163-171
- 174.** Hunsicker LG, Shearer TP, Shaffer SY. Acute reversible proteinuria induced by infusion of the polycation hexamedrine. *Kidney Int* 1981; 20:7-17
- 175.** Camussi G, Tetta C, Coda R, Segoloni GP, Vercellone A. Platelet-activating factor-induced loss of glomerular anionic charges. *Kidney Int* 1984; 25: 73-81
- 176.** Perico N, Dadan J, Battaglia C. Platelet-activating factor (PAF) enhances glomerular permeability to neutral dextrans in isolated perfused rat kidney (IPK). (abstract). *Kidney Int* 1990; 37:377
- 177.** Bussolino F, Camussi G, Aglietta M Human endothelial cells are target for platelet-activating factor. I. Platelet-activating factor induces changes in cytoskeleton structures. *J Immunol* 1987; 139: 2439-2446
- 178.** Clark AF, Lane D, Wilson K, Miggins ST, McCartney MD. Inhibition of dexamethasone-induced cytoskeletal changes in cultured human trabecular meshwork cells by tetrahydrocortizol. *Invest Ophthalmol Visual Sci* 1996; 37: 805-813
- 179.** Rodriguez-Puyol D, Lamas S, Olivera A, Ortega G, Lopez-Farre A, Hernando L, Lopez-Novoa JM. Actions of cyclosporin A on cultured rat mesangial cells. *Kidney Int* 1989; 35:632-638
- 180.** Lanese DM, Falk SA, Conger JD. Sequential agonist activation and site-specific mediation of acute cyclosporin constriction in rat renal arterioles. *Transplantation* 1994;58:1373-1378

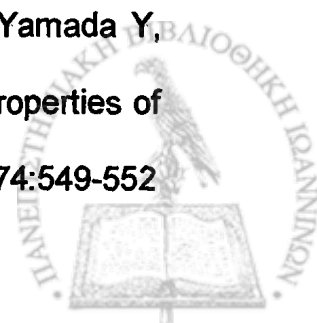


181. Massicot F, Lamouri A, Martin C, Pham-Huy C, Heymans F, Warnet JM, Godfroid JJ, Claude JR. Preventive effects of two PAF antagonists PMS 536 and PMS 549, on cyclosporin-induced LLC-PK1 oxidative injury. *J Lipid Med Cell Signal* 1997; 15:203-214
182. Rodriguez-Barbero A, Martinez-Salgado C, Rodriguez-Puyol D, Perez de Lema G, Lopez-Novoa JM. Involvement of phospholipase A2 in gentamycin-induced rat mesangial cell activation. *Am J Physiol* 1997;273:F60-F66
183. Pavao Dos Santos OF, Boim M, Barros EJG, Schor N. Role of platelet activating factor in gentamycin and cisplatin nephrotoxicity. *Kidney Int* 1991; 40: 742-747
184. Pirotzky E, Guilnard C, Sidoti C, Ivanow F, Principe P, Braquet P. Platelet activating factor antagonist BN52021 protects against cis-diamminedichloroplatinum nephrotoxicity in the rat. *Renal Fail* 1990; 12: 171-176
185. Perico N, Lapinski R, Konopka K, Aiello S, Noris M, Remuzzi G: Platelet-activating factor mediates angiotensin-induced proteinuria in isolated perfused rat kidney. *J of American Society of Nephrology*. 1997;3:1391-1398
186. Ruiz-Ortega M, Bustos C, Plaza J, Egido J. Overexpression of extracellular matrix proteins in renal tubulointestinal cells by platelet-activating factor stimulation. *Nephrol Dial Transplant* 1998; 13: 886-892
187. McColl SH, Drump E, Naccache PH, Poubelle PE, Braquet P, Borgeat P. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor



enhances the synthesis of leukotriene B₄ by humans neutrophils in response to PAF-acether. *J Immunol* 1991; 146: 1204-1211

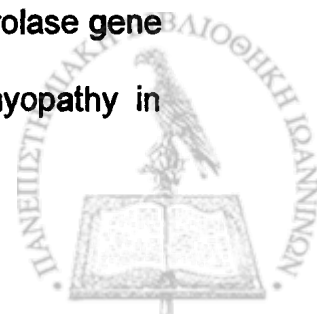
188. Jocks T, Freudenberg J, Zahner G, Stahl R: Platelet-activating factor mediates monocyte chemoattractant protein -1 expression in glomerular immune injury. *Nephrol Dial Transplant* 1998; 13: 37-43
189. Duque I, Garcia Escribano C, Rodriguez-Puoyl D, Diez-Marques ML, Lopez-Novoa JM, Arribas I, Hernando L, Rodriguez-Puoyl D. Effects of reactive oxygen species on cultured rat mesangial cells and isolated rat glomeruli. *Am J Physiol* 1992; 263: F466-F473
190. Stafforini DM, Prescott SM, Zimmerman GA, McIntyre TM. Mammalian platelet-activating factor acetylhydrolases. *BBA* 1996; 1301: 161-173
191. Tjoelker LW, Stafforini DM. Platelet-activating factor acetylhydrolase in health and disease. *BBA-Molecular and cell biology of lipids* 2000; 1488: 102-123
192. Clemens MR, Waller HD. Lipid peroxidation in erythrocytes. *Chem Phys Lipids* 1987; 45: 251-268
193. Klebanoff SJ in: Gallin JI, Goldstein IM (Eds), *Inflammation: Basic Principles and Clinical Correlates*. New York, 1992: 541-588
194. Kloner RA, Przyklenk K, Whittaker P. Deleterious effects of oxygen radicals in ischemia/reperfusion. Resolved and unresolved issues. *Circulation* 1989; 80: 1115-1127
195. Tjoelker L, Wilder C, Eberhardt C, Stafforini DM, Dietsch G, Schimpf B, Hooper S, Trong HL, Cousens LS, Zimmerman GA, Yamada Y, McIntyre TM, Prescott SM, Gray PW. Anti-inflammatory properties of a platelet-activating factor acetylhydrolase. *Nature* 1995, 374:549-552



196. Howard KM, Miller JE, Miwa M, Olson MS. Cell-specific regulation of expression of plasma-type platelet-activating factor acetylhydrolase in the liver. *J Biol Chem* 1997; 272(44): 27543-27548
197. Howard KM, Olson MS. The expression and localization of plasma platelet-activating factor acetylhydrolase in endotoxemic rats. *J Biol Chem* 2000; 275: 19891-19896
198. 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
199. Hakkinen T, Luoma JS, Hiltunen MO, Macphee CH, Milliner KJ, Patel L, Rice SQ, Tew DG, Karkola K, Yla-Hettuala S. Lipoprotein-associated phospholipase A(2), platelet-activating factor acetylhydrolase, is expressed by macrophages in human and rabbit atherosclerotic lesions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999; 19: 2909-2917
200. Nakajima K, Murakami M, Yanoshita R, Samejima Y, Karasawa K, Setaka M, Nojima S, Kudo I. Activated mast cells release extracellular type platelet-activating factor acetylhydrolase that contributes to autocrine inactivation of platelet-activating factor. *J Biol Chem* 1997; 272:19708-19713
201. Asano K, Okamoto S, Fukunaga K, Shiomi T, Mori T, Iwata M, Ikeda Y, Yamaguchi K. Cellular sources of platelet-activating factor acetylhydrolase activity in plasma. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 261: 511-514



- 202.** Tjoelker L, 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
- 203.** Miwa M, Miyake T, Yamanaka T, Sugatami J, Suzuki Y, Sakata S, Araki Y, Matsumoto M. Characterization of serum platelet-activating factor acetylhydrolase: correlation between deficiency of serum PAF-AH and respiratory symptoms in asthmatic children. *J Clin Invest* 1988; 82: 1983-1991
- 204.** Stafforini DM, Satoh K, Atkinson DL, Tjoelker LW, Eberhardt C, Yoshida H, Imaizumi T, Takamatsu S, Zimmerman A, McIntyre TM, Gray PW, Prescott SM. Platelet-activating factor acetylhydrolase deficiency: a missense mutation near the active site of an anti-inflammatory phospholipase. *J Clin Invest* 1996; 97: 2784-2791
- 205.** 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(12): 2417-2420.
- 206.** Yamada Y, Ichihara S, Fujimura T, Yokota M. Identification of the G994→T missense in exon 9 of the plasma platelet-activating factor acetylhydrolase gene as an independent risk factor for coronary artery disease in Japanese men. *Metabolism*. 1998; 47(2) : 177-181.
- 207.** Ichihara S, Yamada Y, Yokota M. Association of a G994→T missense mutation in the plasma platelet-activating factor acetylhydrolase gene with genetic susceptibility to nonfamilial dilated cardiomyopathy in Japanese. *Circulation*. 1998; 98(18): 1881-1885.



208. Satoh N, Asano K, Naoki K, Fukunaga K, Iwata M, Kanazawa M, Yamaguchi K. Plasma platelet-activating factor acetylhydrolase deficiency in Japanese patients with asthma. *Am J Respir Crit Care Med.* 1999; 159(3): 974-979.
209. 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 (30); 236(3): 772-775.
210. 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(5): 1522-1530
211. Stafforini DM, McIntyre TM, Carter ME, Prescott SM. Human platelet-activating factor acetylhydrolase. Association with lipoprotein particles and role in the degradation of platelet activating factor. *J Biol Chem* 1987; 262: 4215-4222
212. Tselepis AD, Dentan C, Karabina SAP, Chapman MJ, Ninio E. PAF-degrading acetylhydrolase is preferentially associated with dense LDL and VLDL-1 in human plasma. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995; 15: 1764-1773
213. Karabina SAP, Elisaf M, Goudevenos J, Siamopoulos KC, Sideris D, Tselepis AD. PAF-acetylhydrolase activity on Lp(a) before and during Cu²⁺-induced oxidative modification in vitro. *Atherosclerosis* 1996; 125: 121-134
214. Stafforini DM, Tjoelker LW, McCormick SP, Vaitkus D, McIntyre TM, Gray PW, Young SG, Prescott SM. Molecular basis of the interaction



between plasma platelet-activating factor acetylhydrolase and low density lipoprotein. *Biol Chem*. 1999; 274(11): 7018-7024.

- 215.** Karasawa K, Yato M, Setaka M, Nojima S. Purification and characterization of platelet-activating factor acetylhydrolase from peritoneal fluid obtained from guinea pigs after endotoxin shock. *J Biochem (Tokyo)*. 1994; 116(2): 374-379.
- 216.** Cao Y, Stafforini DM, Zimmerman GA, McIntyre TM, Prescott SM. Expression of plasma platelet-activating factor acetylhydrolase is transcriptionally regulated by mediators of inflammation. *J Biol Chem* 1998; 273(7): 4012-4020
- 217.** Narahara H, Nishioka Y, Johnston JM. Secretion of platelet-activating factor acetylhydrolase by human decidual macrophages. *J Clin Endocrinol Metab* 1993; 77(5): 1258-1262
- 218.** Kawano Y, Narahara H, Johnston JM. Inhibitory effect of interleukin-8 on the secretion of platelet-activating factor acetylhydrolase by human decidual macrophages. *J Soc Gynecol Invest* 1999; 6(6): 328-332
- 219.** 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(2): 476-481
- 220.** Memon RA, Fuller J, Moser AH, Feingold KR, Grunfeld C. In vivo regulation of plasma platelet-activating factor acetylhydrolase during the acute phase response. *Am J Physiol* 1999; 277: R94-R103



221. Howard KM, Miller JE, Miwa M, Olson MS. Cell-specific regulation of expression of plasma-type platelet-activating factor acetylhydrolase in the liver. *J Biol Chem* 1997; 272(44): 227543-227548
222. Miyaura S, Maki N, Byrd W, Johnston JM. The hormonal regulation of platelet-activating factor acetylhydrolase activity in plasma. *Lipids* 1991; 26: 1015-1020
223. Maki N, Hoffman D, Johnston J. Platelet activating factor acetylhydrolase in maternal fetal and newborn rabbit plasma during pregnancy and lactation. *M Proc Natl Acad Sci USA* 1988; 85: 728-732
224. Narahara H, Frenkel RA, Johnston JM. Secretion of platelet-activating factor acetylhydrolase following phorbol ester-stimulated differentiation of HL-60 cells. *Arch Biochem Biophys* 1993;301: 275-281
225. Caplan M, Hsueh W, Kelly A, Donovan M. Serum PAF acetylhydrolase increases during neonatal maturation. *Prostaglandins* 1990; 39: 705-713
226. Stafforini DM, Prescott SM, Zimmerman GA, McIntyre TM. Mammalian platelet-activating factor acetylhydrolases. *Biochim Biophys Acta* 1996; 1301: 161-173
227. Hattori K, Adachi H, Matsuzawa A, Yamamoto K, Tsujimoto M, Aoki J, Hattori M, Arai H, Inoue K. cDNA cloning and expression of intracellular platelet-activating factor acetylhydrolase II. Its omology with plasma PAF acetylhydrolase. *J Biol Chem* 1996; 271: 333032-333038



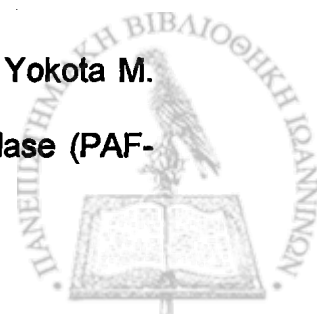
- 228.** Matsuzawa A, Hattori J, Aoki J, Arai H, Inoue K. Protection against oxidative stress-induced cell death by intracellular platelet-activating factor-acetylhydrolase II. *J Biol Chem* 1997; 272(51): 32315-32320
- 229.** Shmueli O, Cahana A, Reiner O. Platelet-activating factor (PAF) acetylhydrolase activity, LIS1 expression, and seizures. *J Neurosci Res* 1999; 57(2): 176-184
- 230.** Kato K, Clark GD, Bazan NG, Zorumski CF. Platelet-activating factor as a potential retrograde messenger in CA1 hippocampal long-term potentiation. *Nature* 1994; 367 (6459): 175-179
- 231.** Epstein LG, Gendelman HE. Human immunodeficiency virus type 1 infection of the nervous system: pathogenetic mechanisms. *Ann Neurol* 1993; 33(5): 429-436
- 232.** Lipton SA. HIV-related neuronal injury. Potential therapeutic intervention with calcium channel antagonists and NMDA antagonists. *Mol Neurobiol* 1994; 8: 181-196
- 233.** Kobayashi T, Itabe H, Inoue K, Nojima S. Peroxidation of liposomes in the presence of human erythrocytes and induction of membrane damage of erythrocytes by peroxidized liposomes. *Biochim Biophys Acta* 1985; 814(1): 170-178
- 234.** Inoue K, Itabe H, Kudo I. *Oxygen Radicals in Biology and Medicine*. MG Simic, KA Taylor, JF Ward, C von Sonntag (Eds), Plenum NY 1998: 291-300
- 235.** Yoshida H, Satoh K, Imaizumi T. Activity of platelet-activating factor acetylhydrolase exists in red cell membrane. *Am J Hematol* 1992; 40(1): 61-63



236. Guerra R, Zhao B, Mooser V, Stafforini D, Johnston J, Cohen J. Determinants of plasma platelet-activating factor acetylhydrolase: heritability and relationship to plasma lipoproteins. *J Lipid Res* 1997; 38: 2281-2288
237. Kudolo GB, Bressler P, DeFronzo RA. *J Lipid Mediat Cell Signal* 1997;17: 97-113
238. Steinbrecher UP, Pritchard PH. Hydrolysis of phosphatidylcholine during LDL oxidation is mediated by platelet-activating factor acetylhydrolase. *J Lipid Res.* 1998; 30: 305-315
239. Surya II, Mommersteeg M, Erkelens DW, Akkerman JW. PAF-acetylhydrolase, predominately present in LDL in healthy subjects, is associated with HDL in a patient with LDL deficiency. *J Lipid Mediat* 1991; 3: 27-38
240. Graham RM, Stephens CJ, Strum MJ, Taylor RR. Plasma platelet activating factor degradation in patients with severe coronary disease. *Clin Sci* 1992; 82: 535-541
241. Serebruany VL, Gurbel PA, Murugesan SR, Lowry DR, Sturm E, Svetlov SI. Depressed plasma platelet-activating factor acetylhydrolase in patients presenting with acute myocardial infraction. *Cardiology* 1998; 90(2): 127-130
242. Stephens CJ, Graham RM, Sturm MJ, Richardson M, Taylor RR. Variation in plasma platelet-activating factor degradation and serum lipids after acute myocardial infarction. *Coron Artery Dis.* 1993; 4(2): 187-93



- 243.** Stephens CJ, Graham RM, Yadava OP, Leong LL, Sturm MJ, Taylor RR. Plasma platelet activating factor degradation and serum lipids after coronary bypass surgery. *Cardiovasc Res.* 1992; 26(1): 25-31.
- 244.** Schlame M, Schmid AB, Haupt R, Ruestow B, Kox WJ. Study of platelet-activating factor acetylhydrolase in the perioperative period of patients undergoing cardiac surgery. *Shock* 1998; 9(5): 313-319
- 245.** Vini MP, Goudevenos J, Liapikos Th, Tsoukatos D, Michalis L, Sideris D, Tselepis AD. Secretion of PAF-acetylhydrolase activity during platelet aggregation in patients undergoing coronary angioplasty. *Atherosclerosis*, 134: Nos 1.2,2 P337
- 246.** Tselepis AD, Goudevenos JA, Tambaki AR, 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(1): 183-191
- 247.** Goudevenos JA, Tselepis AD, Vini MP, Michalis L, Tsoukatos DC, Elisaf M, Ninio E, Sideris DA. Platelet- associated and secreted PAF-acetylhydrolase activity in patients with stable angina: sequential changes of the enzyme activity after angioplasty. *Eur J Clin Invest* 2001; 31: 15-23
- 248.** Osterman G, Ruhling K, Zabel-Langhenning R, Winkler L, Schlag B, Tillu. Plasma from atherosclerotic patients exerts an increased degradation of platelet-activating factor. *Thromb Res* 1987; 47: 279-285
- 249.** Yamada Y, Yoshida H, Ichihara S, Imaizumi T, Satoh K, Yokota M. Correlations between plasma-activating factor acetylhydrolase (PAF-



- AH) activity and PAF-AH genotype, age, and atherosclerosis in a Japanese population. *Atherosclerosis* 2000; 150(1): 209-216
250. Zimmerman GA, Prescott SM, McIntyre TM. Basic principles and clinical correlates Gallin JI, Goldstein IM and Snyderman R (Eds), *Inflammation*, 2nd Edition Raven Press NY 1992; 149-176
251. Stafforini DM, Zimmerman GA, McIntyre TM, Prescott SM. The platelet-activating factor acetylhydrolase from human plasma prevents oxidative modification of low-density lipoproteins. *Trans Assoc Amer Phys* 1992; 105: 44-63
252. Satoh K, Imaizumi T, Yoshida H, Hiramoto M, Takamatsu S. Increased levels of blood platelet-activating factor (PAF) and PAF-like lipids in patients with ischemic stroke. *Acta Neurol Scand* 1992; 85: 122-127
253. 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(8): 1090-1092
254. Yoshida H, Satoh K, Imaizumi T, Takamatsu S, Hiramoto M, Shoji B, Takamatsu M. Platelet-activating factor acetylhydrolase in red blood cell stroma from patients with cerebral thrombosis. *Acta Neurol Scand* 1992; 86: 199-203
255. Yoshida H, Satoh K, Takamatsu S. Platelet-activating factor acetylhydrolase in red cell membranes: does decrease activity in ischemic stroke patients? *Stroke*; 24: 14-18
256. Kudolo GB, Bressler P, DeFronzo RA. Plasma PAF-acetylhydrolase in non-insulin dependent diabetes mellitus and obesity: effect of



hyperinsulinemia and lovostatin therapy. *J Lipid Mediat Cell Signal* 1997; 17(2): 97-113

257. Kirschbaum B. Platelet-activating factor acetylhydrolase activity in the urine of patients with renal disease. *Clin Chim Acta* 1991; 199: 139-146
258. Kujiraoka T, Iwasaki T, Ishihara M, Ito M, Nagano M, Kawaguchi A, Takahashi S, Ishi J, Tsuji M, Egashira T, Stepanova IP, Miller NE, Hattori H. Altered distribution of plasma PAF-AH between HDLs and other lipoproteins in hyperlipidemia and diabetes mellitus. *J Lipid Res* 2003; 44(10): 2006-2014
259. Serban M, Tanaseanu C, Kosaka T, Vidulescu C, Stoian I, Marta DS, Tanaseanu S, Moldoveanu E. Significance of platelet-activating factor acetylhydrolase in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J Cell Mol Med* 2002; 6: 643-647
260. Imaizumi T, Satoh K, Yoshida H, Kawamura Y, Hiramoto M, Koyanagi M, Takamatsu S, Takamatsu M. Activity of platelet-activating factor acetylhydrolase in plasma from healthy habitual cigarette smokers. *Heart Vessels* 1990; 5: 81-86
261. Yokode M, Kita T, Arai H, Kawai C, Narumiya S, Fujiwara M. Cholesteryl ester accumulation in macrophages incubated with low density lipoprotein pretreated with cigarette smoke extract. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; 85: 2344-2348
262. Mirayaura S, Egucgi H, Johnston JM. Effect of cigarette smoke extract on the metabolism of the proinflammatory autacoid platelet-activating factor. *Circ Res* 1992; 70: 341-347



263. Imaizumi T, Satoh K, Yoshida H, Kawamura Y, Hiramoto M, Takamatsu S. Effect of cigarette smoking on the levels of platelet-activating factor-like lipids in plasma lipoproteins. *Atherosclerosis* 1991; 87: 47-55
264. Bielicki JK, Knoff LJ, Tribble DL, Forte TM. Relative sensitivities of plasma lecithin: cholesterol acyltransferase, platelet-activating factor acetylhydrolase, and paraoxonase to in vitro gas-phase cigarette smoke exposure. *Atherosclerosis* 2001; 155(1): 71-78
265. Karabina SAP, Elisaf M, Bairaktari E, Tzallas C, Siamopoulos KC, Tselepis AD. Increased activity of platelet-activating factor acetylhydrolase in low-density lipoprotein subfractions induces enhanced lysophosphatidylcholine production during oxidation in patients with familial hypercholesterolemia. *Eur J Clin Invest* 1997; 27: 595-602
266. Pritchard PH, Chronon A, Yeung CCH. The degradation of platelet-activating factor in the plasma of a patient with familial high density lipoprotein deficiency (Tangier disease). *Blood* 1985; 66: 1476-1478
267. 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(5): 927-934
268. Satoh K, Imaizumi T, Kawamura Y, Yoshida H, Takamatsu S, Takamatsu M. Increased activity of platelet-activating factor acetylhydrolase in plasma low-density lipoproteins from patients with essential hypertension. *Prostaglandins* 1989; 37: 673-682



- 269.** Maki N, Magneww RR, Miyaura S, Gant NF, Johnston JM. Platelet-activating factor acetylhydrolase in normotensive and hypertensive pregnancies. *Am J Obst Gynecol* 1993; 168: 50-54
- 270.** Dzau VJ, Gibbons GH, Morishita R, Pratt RE. New prospectives in hypertension research. Potentials of vascular biology. *Hypertension* 1994; 23: 1132-1140
- 271.** Graham RM, Stephens CJ, Silvester W, Leong LLL, Sturm MJ, Taaylor RR. Plasma degradation of platelet-activating factor in severely ill patients with clinical sepsis. *Crit Care Med* 1994; 22: 204-212
- 272.** Endo S, Inada K, Yamashita H, Takakuwa T, Nakae H, Kasai T, Kikuchi M, Ogawa M, Uchida K, Yoshida M. Platelet-activating factor acetylhydrolase activity, type II phospholipase A2 and cytokine levelw in patients with sepsis. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* 1994; 83: 289-295
- 273.** Partrick DA, Moore EE, Moore FA, Biffi WL, Barnett CC. Reduced PAF-acetylhydrolase activity is associated with postinjury multiple organ failure. *Shock* 1997; 7(3): 170-174
- 274.** Tetta C, Bussolino F, Modena V, Montrucchio G, Segoloni G, Pescarmona G, Camussi G. Release of platelet-activating factor in systemic lupus erythematosus. *Int Arch Allergy Immunol* 1990; 91(3): 244-256
- 275.** 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(2): 373-383

276. Dulioust A, Hilliquin P, Menkes CJ, Benveniste J, Arnoun B. Paf-acether acetylhydrolase activity is increased in patients with rheumatic diseases. *Scand J Rheumatol* 1992; 21(4): 161-164
277. Khovidhunkit W, Memon RA, Shigenaga JK, Pang M, Schambelan M, Mulligan K, Feingold KR, Grunfeld C. Plasma platelet-activating factor acetylhydrolase activity in human immunodeficiency virus infection and the acquired immunodeficiency syndrome. *Metabolism* 1999; 48(12): 1524-1531
278. Kurosawa M, Yamashita T, Kurimoto F. Increased levels of platelet-activating factor in bronchial asthmatic patients with active symptoms. *Allergy* 1994; 49:60-63
279. Nakamura T. Platelet-activating factor in late asthmatic response. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1987; 82: 57-61
280. Hsieh KH, Ng CK. Increased platelet-activating factor in children with acute asthmatic attacks and decreased in vivo and in vitro production of platelet-activating factor after immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol* 1993; 91: 650-657
281. Tsukioka K, Matsuzaki M, Nakamata M, Kayahara H, Nakagawa T. Increased plasma level of platelet-activating factor (PAF) and decreased serum PAF acetylhydrolase (PAF-AH) activity in adults with bronchial asthma. *J Investig Allergol Clin Immunol* 1996; 6(1): 22-29
282. Miwa M, Miyake T, Yamanaka T, Sugatani J, Suzuki Y, Sakata S, Araki Y, Matsumoto M. Characterization of serum platelet-activating



factor acetylhydrolase. Correlation between deficiency of serum PAF acetylhydrolase and respiratory symptoms in asthmatic children. *J Clin Invest* 1988; 82: 1983-1991

283. Stafforini DM, Numao T, Tsodikov A, Vaitkus D, Fukuda T, Watanabe N, Fueki N, McIntyre TM, Zimmerman GA, Makino S, Prescott SM. Deficiency of platelet-activating factor acetylhydrolase is a severity factor for asthma. *J Clin Invest*. 1999;103(7): 989-97.
284. Satoh N, Asano K, Naoki K, Fukunaga K, Iwata M, Kanazawa M, Yamaguchi K. Plasma platelet-activating factor acetylhydrolase deficiency in Japanese patients with asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 159: 974-979
285. Grisson CK, Orme JF Jr, Richer LD, Mc Intyre TM, Zimmerman GA, Elstad MR. Platelet-activating factor acetylhydrolase is increased in lung lavage fluid from patients with acute respiratory distress syndrome. *Crit Care Med* 2003; 31(3): 770-775
286. Benigni A, Bocardo P, Noris M, Remuzzi G, Siegler RL. Urinary excretion of platelet-activating factor inn hemolytic uraemic syndrome. *Lancet* 1991; 339: 835-836
287. Meade CJ, Metcalfe S, Svenssen R, Jamieson N, Watson C, Calne RY, Kleber G, Neild G. Serum PAF acetylhydrolase and chronic cholestasis. *Lancet* 1991; 338: 1016-1017
288. Kamisako T, Takeuchi K, Ito T, Tamaki S, Kosaka T, Adachi Y. Serum platelet-activating factor acetylhydrolase activity in patients with hyperbilirubinemic hepatobiliary disease. *Hepatol Res* 2003; 26(1): 23-27



289. Moreno P, Gijon MA, Fradera GR, Fabregat J, Rafecas A, Biondo S, Figueras J, Sanchez-Cresp M, Jaurrieta E. Changes in peripheral blood levels of platelet-activating factor after orthotopic liver transplantation. *Transplant Proc* 1993; 25: 2642-2643
290. Denizot Y, Chaussade S, Naathan N, Colombel JF, Bossant MJ, Cherouki N, Benveniste J, Couturier D. PAF-acether and acetylhydrolase in stool of patients with Crohn disease. *Digestive Disease and Science* 1992; 37(3): 432-437
291. Kald B, Smedh K, Olaison G, Sjobahl R, Tagesson C. Platelet-activating factor acetylhydrolase activity in intestinal mucosa and plasma of patients with Crohn disease. *Digestion* 1996; 57(6): 472-477
292. Caplan MS, Sun XM, Hseuh W, Hageman JR. Role of platelet activating factor and tumor necrosis factor-alpha in neonatal necrotizing enterocolitis. *J Pediatr* 1990; 16(6): 960-964
293. Caplan MS, McKendrick W. Necrotizing enterocolitis: a review of pathogenetic mechanisms and implications for prevention. *Ped Pathol* 1993; 13: 357-360
294. Caplan MS, Hedlund E, Adler L, Lickerman M, Wei H. The platelet-activating factor receptor antagonist WEB 2170 prevents neonatal necrotizing enterocolitis in rats. *J Ped Gastroent Nutr* 1997; 24: 296-301
295. Furukawa M, Narahara H, Yasuda K, Johnston JM. Presence of platelet-activating factor acetylhydrolase in milk. *J Lipid Res* 1993; 34: 1603-1609



296. Lucas A, Cole TJ. Breast milk and necrotizing enterocolitis. *Lancet* 1990; 336: 1519-1523
297. Tsuji H, Furukawa M, Ikeda H, Asako M, Yamashita T. The presence of platelet-activating factor acetylhydrolase in human middle ear effusions. *ORL* 1998; 60(1): 25-29
298. Nakajima K, Murakami M, Yanoshita R, Samejima Y, Karasawa K, Setaka M, Nojima S, Kudo I. Activated mast cells release extracellular type platelet-activating factor acetylhydrolase that contributes to autocrine inactivation of platelet-activating factor. *J Biol Chem* 1997; 272: 19708-19713
299. Muguruma K, Gray PW, Tjoelker LW, Johnston JM. The central role of PAF in necrotizing enterocolitis development. *Adv Exp Med Biol* 1997; 407: 379-382
300. Caplan MS, Lickerman M, Adler L, Dietch GN, Yu A. The role of recombinant platelet-activating factor acetylhydrolase in a neonatal rat model of necrotizing enterocolitis. *Pediatr Res* 1997; 42: 779-783
301. Morgan EN, Boyle EM, Yun W, Kovacich JC, Canty TG, Chi E, Pohlman TH, Verrier ED. Platelet-activating factor acetylhydrolase prevents myocardial ischemia-reperfusion injury. *Circulation* 1999; 100: 365-368
302. Liu XH, Eun BL, Barks JD. Platelet-activating factor antagonist BN 50730 attenuates hypoxic-ischemic brain injury in neonatal rats. *Pediatr Res*. 2001;49(6):804-811
303. Henderson WR, Lu J, Poole KM, Dietsch GN, Chi EY. Recombinant human platelet-activating factor-acetylhydrolase inhibits airway

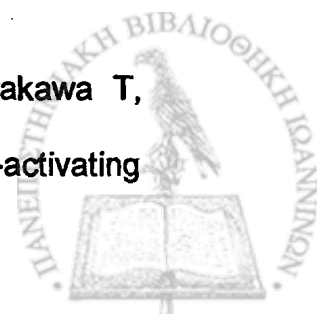


inflammation and hyperreactivity in mouse asthma model. *J Immunol* 2000; 164: 3360-3367

- 304.** Fukuda Y, Kawashima H, Saito K, Inomata N, Matsui M, Nakanishi T. Effect of human plasma-type platelet-activating factor acetylhydrolase in two anaphylactic shock models. *Eur J Pharmacol* 2000; 390: 203-207
- 305.** Bleeker WK, Teeling JL, Verhoeven AJ, Rigter GM, Agterberg J, Tool AT, Koenderman AH, Kuijpers TW, Hack CE. Vasoactive side effects of intravenous immunoglobulin preparations in a rat model and their treatment with recombinant platelet-activating factor acetylhydrolase. *Blood* 2000; 95: 1856-1861
- 306.** Schuster DP, Metzler M, Opal S, Lowry S, Balk R, Abraham E, Levy H, Slotman G, Coyne E, Souza S, Pribble J. Pafase ARDS Prevention Study Group. Recombinant platelet-activating factor acetylhydrolase to prevent acute respiratory distress syndrome and mortality in severe sepsis: Phase IIb, multicenter, randomized, placebo-controlled, clinical trial. *Crit Care Med.* 2003; 31(6): 1612-1619
- 307.** Noris M, Perico N, Macconi D, Nanni V, Dadan J, Peterlongo F, Remuzzi G. Renal metabolism and urinary excretion of platelet-activating factor in the rat. *J Biol Chem* 1990; 265: 19414-19419
- 308.** Antonopoulou S, Demopoulos CA, Iatrou C, Moustakas G, Ziogiannis P. Platelet-activating factor acetylhydrolase in human kidney. *Int J Biochem* 1994; 26: 1157-1162
- 309.** 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
- 310.** Millionis HJ, Elisaf MS, Karabina SAP, Bairaktari E, Tselepis AD, Siamopoulos KC. Plasma and Lp(a)-associated PAF-acetylhydrolase activity in uremic patients undergoing different dialysis procedures. *Kidney Int* 1999; 56: 2276-2285
- 311.** Norris 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
- 312.** Iatrou C, Moustakas G, Antonopoulou S, Demopoulos CA, Ziroyiannis P. Platelet-activating factor levels and PAF acetylhydrolase activities in patients with primary glomerulonephritis. *Nephron* 1996; 72: 611-616
- 313.** Bustos C, Gonzalez E, Gonzalez-Cuadrado S, Ortiz A, Muley R, R.de.Nicolas, Plaza JJ, Egido J. Urinary excretion of platelet-activating factor in human and experimental nephrosis. *Nephrol Dial Transplant* 1996; 11: 282-286
- 314.** 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
- 315.** Xu H, Iijima K, Shiozawa S, Tanaka R, Inoue Y, Shirakawa T, Nishiyama K, Miwa M, Nakamura H, Yoshikawa N. Platelet-activating



factor acetylhydrolase gene mutation in Japanese nephrotic children.

Kidney Int 1998; 54: 1867-1871

316. 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
317. 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
318. Mertens A, Holvoet P. Oxidized LDL and HDL: antagonists in atherothrombosis. *FASEB* 2001; 15: 2073-2084
319. Castelli WP, Garrison RJ, Wilson PW, Abbott RD, Kalousdian S, Kannel WB. Incidence of coronary heart disease and lipoprotein cholesterol levels. The Framingham Study. *J Am Med Assoc* 1986; 256: 2835-2838
320. Stafforini DM, Zimmerman GA, McIntyre TM, Prescott SM. The plasma PAF acetylhydrolase prevents oxidative modification of low density lipoprotein. *J Lipid Mediators Cell Signalling*. 1994; 10: 53-56
321. Theilmeyer G, De Geest B, Van Veldhoven PP, Stengel D, Michielis C, Lox M, Landeloos M, Chapman MJ, Ninio E, Himpens B, Holvoet P. HDL-associated PAF-AH reduces endothelial adhesiveness in apoE^{-/-} mice. *FASEB J* 2000; 14(13): 2032-2039
322. Nakamura T, Ushiyama C, Hirokawa K, Osada S, Inoue T, Shimada M, Koide H. Effect of cerivastatin on proteinuria and urinary



podocytes in patients with chronic glomerulonephritis. *Nephrol Dial Transplant* 2002; 17(5): 798-802

- 323.** Rezaie-Majd A, Prager GW, Bucek RA, Schemthaler GH, Maca T, Kress HG, Valent P, Binder BR, Minar E, Baghestanian M. Simvastatin reduces the expression of adhesion molecules in circulating monocytes from hypercholesterolemic patients. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003; 23(3): 397-403



Endothelium in patients with chronic glomerulonephritis. *Nephrol Dial*

Transplant 2000; 17(5): 711-712

10. Kowalewski A, Frager DM, Grotto RA, Schachner H, Nave E, Pagan H, Galant P, Blumberg PM, Anwar E, Bagdasarian K

Expression and localization of adhesion molecules in

kidney allografts. *Am J Transplant* 2001; 1(1): 1-10

11. Kowalewski A, Frager DM, Grotto RA, Schachner H, Nave E, Pagan H, Galant P, Blumberg PM, Anwar E, Bagdasarian K

Expression and localization of adhesion molecules in

