

1950

1950

ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ



026000200259



λ

470

ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΟΝ ΚΑΤΗΓΟΡΙΑΝ
ΙΑΤΡΙΚΗΝ ΕΠΙΣΤΗΜΗΝ
ΤΟΜΟΣ ΠΑΡΑΚΛΗΤΙΚΗΣ
ΚΑΡΔΙΟΛΟΓΙΚΗΣ ΚΑΙΝΕΡΑ

ΑΥΤΟΥΝΤΟΝ ΤΩΝ ΙΟΥΡΑΝΤΩΝ
ΚΑΘΗΜΕΡΗ ΠΑΡΑΚΛΗΤΙΚΗΣ - ΚΑΡΔΙΟΛΟΓΙΑΣ

Η ΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΣΤΑΤΙΝΩΝ
ΕΤΗΣ ΑΠΟΦΟΡΜΑΤΩΝ

ΚΑΡΔΙΟΛΟΓΙΚΗ ΚΑΤΗΓΟΡΙΑ

ΕΚΔΟΣΗ

ΕΚΔΟΣΗ





ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ
ΤΟΜΕΑΣ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΟΣ
ΚΑΡΔΙΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ

ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ: Ι.Α. ΓΟΥΔΕΒΕΝΟΣ
ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΠΑΘΟΛΟΓΙΑΣ - ΚΑΡΔΙΟΛΟΓΙΑΣ

Η ΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΣΤΑΤΙΝΩΝ ΣΤΗΝ ΑΘΗΡΩΜΑΤΩΣΗ

ΑΘΑΝΑΣΙΟΣ Ι. ΠΑΠΑΘΑΝΑΣΙΟΥ
ΚΑΡΔΙΟΛΟΓΟΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2005



«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).



Πρόεδρος Ιατρικής Σχολής: Επαμεινώδας Β. Τσιάνος, Καθηγητής Παθολογίας

Ημερομηνία αίτησης: 18-9-1997

Ημερομηνία ορισμού Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: Γ.Σ. 338α/16-12-97

Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:

- *Ιωάννης Γουδέβενος*, Επίκουρος Καθηγητής Παθολογίας-Καρδιολογίας, Επιβλέπων
- *Μωσής Ελισάφ*, Αναπληρωτής Καθηγητής Παθολογίας, Μέλος
- *Αλέξανδρος Τσελέπης*, Επίκουρος Καθηγητής Χημικού Τμήματος, Μέλος

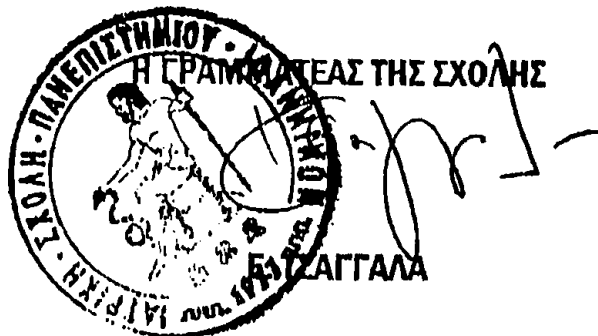
Ημερομηνία ορισμού θέματος: 10-11-1998

Μέλη Επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής: Γ.Σ. 561α/5-7-05

- *Ιωάννης Γουδέβενος*, Καθηγητής Παθολογίας-Καρδιολογίας, Επιβλέπων
- *Μωσής Ελισάφ*, Καθηγητής Παθολογίας, Μέλος
- *Λάμπρος Μιχάλης*, Καθηγητής Καρδιολογίας, Μέλος
- *Αλέξανδρος Τσελέπης*, Αναπληρωτής Καθηγητής Χημικού Τμήματος, Μέλος
- *Θεόφιλος Κωλέττης*, Επίκουρος Καθηγητής Καρδιολογίας, Μέλος
- *Ελένη Μπαϊρακτάρη*, Επίκουρη Καθηγήτρια Βιολογικής Χημείας, Μέλος
- *Χρήστος Κατσούρας*, Λέκτορας Καρδιολογίας, Μέλος

Βαθμός Διδακτορικής Διατριβής: ΑΡΙΣΤΑ

Ημερομηνία κατάθεσης της Διατριβής: 7-12-2005



Στη μνήμη των γονιών μου

Ιωάννη

Μαργαρίτας



ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Τα καρδιαγγειακά νοσήματα αποτελούν την κύρια αιτία θανάτου στις Ηνωμένες Πολιτείες της Αμερικής από το 1900, με εξαίρεση το 1918 όταν παρατηρήθηκε επιδημία γρίπης. Κάθε χρόνο πεθαίνουν 1.000.000 άτομα στις ΗΠΑ από νοσήματα του καρδιαγγειακού συστήματος. Τα νοσήματα αυτά προκαλούν τόσους θανάτους όσους συνολικά οι επόμενες έξι αιτίες θανάτου. Στις Ευρωπαϊκές χώρες η καρδιαγγειακή θνητότητα ποικίλλει από 3 άτομα/1.000 κατοίκους/ έτος (Γαλλία, Ολλανδία, Ιταλία, Ισπανία) έως και 10 άτομα/1.000 κατοίκους/ έτος (Βουλγαρία και Ουκρανία). Η πλειονότητα των νόσων του καρδιαγγειακού συστήματος οφείλεται στην αθηρωμάτωση.

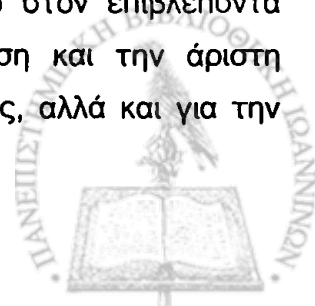
Η αθηρωμάτωση είναι νόσος του έσω χιτώνα των αρτηριών και θεωρείται μια ανοσολογική και φλεγμονώδης απάντηση του έσω χιτώνα των αρτηριών σε μια περιοχική βλάβη του αγγειακού τοιχώματος. Στη παθογένεια της έχουν αναγνωριστεί ένα πλήθος από παράγοντες κινδύνου, όπως το κάπνισμα, ο σακχαρώδης διαβήτης και η δυσλιπιδαιμία. Χαρακτηριστικά η οξειδωμένη LDL διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην παθογένεια της αθηροσκλήρωσης, αφού επηρεάζει τη λειτουργία των κυττάρων του αρτηριακού τοιχώματος. Κατά τη διάρκεια της οξειδωσης της LDL τόσο το λιπιδιακό περιεχόμενο όσο και η απολιποπρωτεΐνη Β-100 (apoB-100), υποβάλλονται σε πλήθος αλλαγών διαμέσου αντιδράσεων για τις οποίες είναι απαραίτητη η παρουσία ελευθέρων ριζών, καθώς και σε τροποποιήσεις οι οποίες οφείλονται στα ενεργά παράγωγα τα οποία σχηματίζονται στο σωματίδιο της oxLDL. Η οξειδωμένη LDL εμφανίζει αντιγονικούς επιτόπους, κατά των οποίων στρέφονται αυτοαντισώματα.

Επιπρόσθετα, είναι γνωστό ότι η χορήγηση στατινών βελτιώνει την πρόγνωση των ασθενών με στεφανιαία νόσο. Τα οφέλη αυτά των στατινών φαίνεται ότι προκύπτουν και από τις πλειοτρόπες δράσεις αυτών των φαρμάκων, ορισμένες από τις οποίες θεωρούνται αντιφλεγμονώδεις.

Η μελέτη της σύστασης των αυτοαντισωμάτων κατά της οξειδωμένης LDL και η επίδραση της χορήγησης ατορβαστατίνης στα επίπεδα τους σε ασθενείς με στεφανιαία νόσο, αποτέλεσε και το κύριο αντικείμενο μελέτης της παρούσας διδακτορικής διατριβής.

Υλικό της μελέτης αποτέλεσαν ασθενείς της Καρδιολογικής Κλινικής του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων και υγιείς εθελοντές. Η πειραματική διαδικασία πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Βιοχημείας του τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.

Από αυτή τη θέση θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στον επιβλέποντα καθηγητή μου κ. Ιωάννη Γουδέβενο, για την αμέριστη συμπαράσταση και την άριστη καθοδήγηση του σε όλες τις φάσεις εκπόνησης της παρούσας διατριβής, αλλά και για την επιστημονική γνώση και ερευνητική εμπειρία που μου μετέδωσε.



Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Αναπληρωτή Καθηγητή Χημείας, κ.Αλέξανδρο Τσελέπη ο οποίος μου μετέφερε την πολύτιμη ερευνητική του εμπειρία και τεχνογνωσία επάνω στις μεθόδους που χρησιμοποιήσαμε. Οι επιστημονικές του γνώσεις και οι τεχνικές του συμβουλές αποτέλεσαν για μένα απαραίτητη βοήθεια χωρίς την οποία δεν θα ήταν δυνατή η διεξαγωγή των πειραμάτων και τη συγγραφή του κειμένου.

Ευχαριστώ επίσης τον Καθηγητή κ.Ελισάφ Μωϋσή, για την κεφαλαιώδους σημασίας βοήθεια του στο σχεδιασμό της μελέτης και τη συγγραφή του κειμένου. Η επιστημονική του κατάρτιση και η ερευνητική του εμπειρία, καθώς και η αγάπη του για κάθε ερευνητική προσπάθεια αποτέλεσε καθοριστικό παράγοντα για την περάτωση αυτής της διδακτορικής διατριβής.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά όλους τους συναδέλφους στο εργαστήριο Βιοχημείας και ιδιαίτερα την Ευαγγελία Λουρίδα, η οποία με τις άριστες επιστημονικές και τεχνικές γνώσεις της και την τέλεια επαγγελματική της συμπεριφορά συντέλεσε καθοριστικά στην άρτια διεξαγωγή της πειραματικής διαδικασίας. Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω την φίλη και φιλόλογο Τσάνα Πέρση και Τορουνίδου Μάρθα για τη φιλολογική επιμέλεια του κειμένου.



ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ.....	I
ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ.....	III
ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ.....	VII
 ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1^ο	
ΛΙΠΟΠΡΩΤΕΪΝΕΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΙΝΟΥ ΠΛΑΣΜΑΤΟΣ.....	3
1.1. Γενικά.....	3
1.2. Μεταβολισμός των Λιποπρωτεϊνών.....	5
1.2.1. Χυλομικρά (CM).....	6
1.2.2. Πολύ χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνες (VLDL).....	6
1.2.3. Χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνες (LDL).....	6
1.2.4. Υψηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνες (HDL).....	10
 ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2^ο	
Η ΟΞΕΙΔΩΜΕΝΗ LDL.....	13
2.1. Γενικά.....	13
2.2. Τρόποι οξειδωσης των LDL.....	14
2.3. Στάδια οξειδωσης LDL.....	19
2.4. Βιοχημικά χαρακτηριστικά της oxLDL in vivo.....	21
2.5. Ο ρόλος της οξειδωμένης LDL στην αθηρωμάτωση.....	22
 ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3^ο	
ΦΩΣΦΟΛΙΠΙΔΙΑ ΚΑΙ Η ΑΚΕΤΥΛΟΥΔΡΟΛΑΣΗ ΤΟΥ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗΣ ΤΩΝ ΑΙΜΟΠΕΤΑΛΙΩΝ (PAF-AH).....	23
3.1. Ο παράγοντας ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων (PAF).....	23
3.2. Οξειδωμένα φωσφολιπίδια.....	24
3.3. Λυσο-φωσφατιδυλοχολίνη (LYSO-PC).....	25
3.4. PAF-Like φωσφολιπίδια.....	26
3.5. Η ακετυλοϋδρολάση του παράγοντα ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων (PAF-AH).....	28
3.5.1. Γενικά.....	28
3.5.2. Δομή της εκκρινόμενης μορφής της PAF-AH(PAF-AH του πλάσματος).....	28
3.5.3. Γονίδιο της PAF-AH και μεταλλάξεις.....	30
3.5.4. Σύνδεση με τις λιποπρωτεΐνες του πλάσματος.....	31



3.5.4. Κυτταρική πηγή προέλευσης και ρύθμιση των επιπέδων της PAF-AH του πλάσματος	31
3.5.5. PAF-AH και αθηρογένεση.....	34

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4^ο

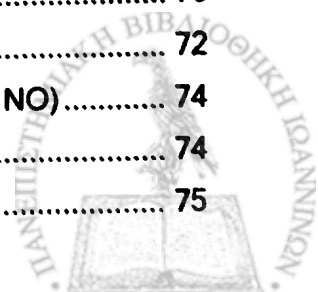
ΑΘΗΡΩΜΑΤΩΣΗ - Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ oxLDL.....	41
4.1. Γενικά	41
4.2. Στάδια της αθηρωμάτωσης	42
4.3. Ο ρόλος της oxLDL στην φλεγμονή και την εξέλιξη της αθηρωμάτωσης	46
4.3.1. Ο ρόλος του ενδοθηλίου στην εξέλιξη της αθηρωμάτωσης.....	48
4.3.2. Μηχανισμοί χημειοτακτισμού των μονοκυττάρων	49
4.3.3. Μηχανισμοί ενεργοποίησης των μακροφάγων στον έσω χιτώνα του αρτηριακού τοιχώματος.....	50
4.3.4. Υποδοχείς εκκαθαριστές στα μακροφάγα και λεία μυϊκά κύτταρα.....	52
4.4. Η αύξηση της αθηρωματικής πλάκας και οι επιπλοκές της	53
4.5. Κλινικές εκδηλώσεις της αθηρωμάτωσης	55

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5^ο

ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ ΚΑΤΑ ΤΗΣ oxLDL.....	59
5.1. Γενικά	59
5.1.1. Φυσιολογία και βιοχημεία των αντισωμάτων κατά oxLDL	59
5.1.2. Κατηγοριοποίηση των αντισωμάτων κατά oxLDL	60
5.2. Μονοκλωνικά αντισώματα κατά oxLDL	60
5.3. Αυτοαντισώματα κατά oxLDL σε διάφορες παθήσεις	62
5.3.1. Αυτοαντισώματα κατά oxLDL και δυσλιπιδαιμίες.....	63
5.3.2. Αυτοαντισώματα κατά oxLDL και σακχαρώδης διαβήτης	64
5.3.3. Αυτοαντισώματα κατά oxLDL και υπέρταση.....	64
5.3.4. Αυτοαντισώματα κατά oxLDL και αθηρωματική νόσος	65
5.4. Ο ρόλος των αυτοαντισωμάτων στην αθηρωμάτωση.....	66

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6^ο

ΣΤΑΤΙΝΕΣ.....	69
6.1. Γενικά	69
6.2. Οι πλειοτροπικές δράσεις των στατινών.....	70
6.2.1. Βελτίωση της λειτουργικότητας του ενδοθηλίου	72
6.2.2. Αύξηση της βιοδιαθεσιμότητας του μονοξειδίου του αζώτου (NO).....	74
6.2.3. Στατίνες και πήξη	74
6.2.3. Αντιοξειδωτικές δράσεις των στατινών	75



6.2.4. Αντιφλεγμονώδεις δράσεις των στατινών	76
6.2.5. Σταθεροποίηση της αθηρωματικής πλάκας.....	77
6.2.6. Επίδραση των στατινών στα επίπεδα αυτοαντισωμάτων κατά oxLDL	77

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7^ο

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ.....	79
-------------------------	----

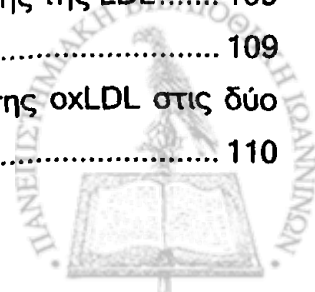
ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8^ο

ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	83
8.1. Πληθυσμός της μελέτης	83
8.1.1. Ομάδα ασθενών με σταθερή στηθάγχη και ομάδα υγιών εθελοντών	83
8.1.2. Ομάδα ασθενών με οξύ στεφανιαίο σύνδρομο	85
8.2. Πειραματική διαδικασία.....	86
8.2.1. Απομόνωση των λιποπρωτεϊνών με διαδοχικές υπερφυγοκεντρήσεις	86
8.2.2. Προσδιορισμός των πρωτεϊνών με τη μέθοδο BCA.....	88
8.2.3. Απενεργοποίηση της PAF-AH της LDL	89
8.2.4. Οξειδωση της LDL	90
8.2.5. Χημική τροποποίηση της LDL με μηλονική διαλδεϋδη.....	91
8.2.6. Προσδιορισμός της ενεργότητας της PAF-AH	93
8.2.7. Ηλεκτροφόρηση λιποπρωτεϊνών σε πήκτωμα αγαρόζης	95
8.2.8. Προσδιορισμός των TBARS	97
8.2.9. Προσδιορισμός αυτοαντισωμάτων με τη μέθοδο ELISA τύπου SANDWICH	99
8.2.10. Προσδιορισμός επιπέδων της oxLDL στον ορό με ELISA.....	101
8.3. Στατιστική Ανάλυση.....	103
8.3.1. Ασθενείς με σταθερή στηθάγχη και υγιείς εθελοντές.....	103
8.3.2. Ασθενείς με οξύ στεφανιαίο σύνδρομο	103

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 9^ο

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	105
9.1. Βιοχημικά χαρακτηριστικά των διαφόρων μορφών oxLDL, οι οποίες χρησιμοποιήθηκαν ως αντιγόνα	105
9.2. Τίτλοι αυτοαντισωμάτων κατά διαφόρων μορφών oxLDL σε ασθενείς με σταθερή στηθάγχη και υγιείς εθελοντές: Ο ρόλος της PAF- ακετυλοϋδρολάσης της LDL.....	109
9.2.1. Χαρακτηριστικά του πληθυσμού της μελέτης.....	109
9.2.2. Τίτλοι αυτοαντισωμάτων κατά των διαφόρων μορφών της oxLDL στις δύο ομάδες πληθυσμού της μελέτης	110



9.2.3. Η επίδραση της λυσοφωσφατιδυλοχολίνης (lyso-PC) στους τίτλους των αυτοαντισωμάτων έναντι της oxLDL	112
9.2.4. Τα αυτοαντισώματα έναντι διαφόρων μορφών oxLDL ως ανεξάρτητοι παράγοντες κινδύνου για στεφανιαία νόσο.....	113
9.3. Τίτλοι αυτοαντισωμάτων κατά διαφόρων μορφών oxLDL σε ασθενείς με οξύ στεφανιαίο σύνδρομο: Ο ρόλος της χορήγησης ατορβαστατίνης	115
9.3.1. Χαρακτηριστικά του πληθυσμού της μελέτης.....	115
9.3.2. Επίπεδα οξειδωμένης LDL (oxLDL) ορού.....	120
9.3.2. Αντισώματα κατά διαφόρων μορφών οξειδωμένης LDL.....	122
9.3.3. Ο ρόλος της PAF-AH.....	134

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 10^ο

ΣΥΖΗΤΗΣΗ	139
----------------	-----

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 11^ο

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	145
-------------------	-----

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	147
----------------	-----

ABSTRACT.....	151
---------------	-----

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	155
-------------------	-----

ΒΡΑΒΕΥΣΕΙΣ.....	185
-----------------	-----

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ.....	187
-------------------	-----



ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ

AcLDL	ακετυλιωμένη LDL
Ala	αλανίνη (αμινοξύ)
AO [•]	φαινοξυ-ρίζα
AOH	φαινολικό αντιοξειδωτικό
Apo	απολιποπρωτεΐνες
Arg	αργινίνη (αμινοξύ)
Asn	ασπαραγίνη (αμινοξύ)
Asp	ασπαρτικό (αμινοξύ)
CCR-2	κυτταρικός υποδοχέας της MCP-1
CD36	υποδοχέας εκκαθαριστής των μακροφάγων για την οξειδωμένη LDL
CD68	υποδοχέας εκκαθαριστής των μακροφάγων για την οξειδωμένη LDL
CETP	πρωτεΐνη μεταφοράς εστέρων χοληστερόλης - cholesterol ester transfer protein
CM	χυλομικρά
CRP	C- αντιδρώσα πρωτεΐνη
Cys	κυστεΐνη (αμινοξύ)
EDTA	αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ
eNOS	ενδοθηλιακή συνθετάση του οξειδίου του αζώτου (NO)
Gln	γλουταμίνη (αμινοξύ)
Glu	γλουταμινικό (αμινοξύ)
Gly	γλυκίνη (αμινοξύ)
GM-CSF	Αυξητικός παράγοντας κοκκιοκυττάρων - μονοκυττάρων - granulocyte monocyte colony stimulating factor
H ₂ O ₂	υπεροξειδίο του υδρογόνου
HDL	υψηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνες
His	ιστιδίνη (αμινοξύ)
HL	ηπατική λιπάση
HOCl	υποχλωριώδες οξύ
ICAM-1	διακυτταρικό μόριο προσκόλλησης - 1
IDL	ενδιάμεσης πυκνότητας λιποπρωτεΐνες
IL-1 - 8	ιντερλευκίνες (1 έως 8)
Ile	ισολευκίνη (αμινοξύ)
INF-γ	ιντερφερόνη - γ
L [•]	ελεύθερη ρίζα λιπαρού οξέος
LCAT	λεκιθινοχοληστερολοακυλοτρανφεράση



LDL	χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνες
Leu	λευκίνη (αμινοξύ)
LH	λιπαρό οξύ
LOO [•]	ρίζα λιποϋπεροξειδίου
LOOH	Υδρο-λιπο-υπεροξίδιο
LOX-1	υποδοχέας εκκαθαριστής για την οξειδωμένη LDL στα ενδοθηλιακά και στα λεία μυϊκά κύτταρα
Lp(a),	λιποπρωτεΐνη (a)
LPL	λιποπρωτεϊνική λιπάση
Lys	λυσίνη (αμινοξύ)
Lyso-PAF	λυσο-PAF
Lyso-PC	λυσοφωσφατιδυλοχολίνη
MCP-1	χημειοτακτική πρωτεΐνη των μονοκυττάρων -1
M-CSF	Αυξητικός παράγοντας μονοκυττάρων - monocyte colony stimulating factor
MDA	μηλονική διαλδεϋδη
Met	μεθειονίνη (αμινοξύ)
MM-LDL	ελάχιστα τροποποιημένη οξειδωμένη LDL
MMP-1,8,13	κολλαγονάσες 1, 8 και 13
mRNA	αγγελιοφόρο RNA (ριβονουκλεϊκό)
NO	νιτρικό οξείδιο
NO ₂	διοξείδιο του αζώτου
ONOO [•]	υπεροξυνιτρικό ανιόν
oxLDL	οξειδωμένη μορφή LDL
oxPAPC	οξειδωμένη 1-παλμιτοϋλο -2- αραχιδοϋλο- 3- φωσφατιδυλο-χολίνη
oxPC	οξειδωμένη φωσφατιδυλοχολίνη
oxPL	οξειδωμένα φωσφολιπίδια
PAF	παράγοντας ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων
PAF-AH	ακετυλοϋδρολάση του παράγοντα ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων
PAF-like PL	οξειδωμένα φωσφολιπίδια με δράση παρόμοια του PAF.
PDGF	αυξητικός παράγοντας των αιμοπεταλίων
PEIPC	1-παλμιτοϋλ -2- (5,6)- εποξυϊσοπροστανο E ₂ - sn- γλυκερο -3- φωσφοχολίνη



PGPC	1-παλμιτοϋλο -2- γλουταρυλ- 3- <i>sn</i> - γλυκερο -3- φωσφορυλοχολίνη
Phe	φαινυλαλανίνη (αμινοξύ)
PONPC	1-παλμιτοϋλο-2-κετονοϋλο- <i>sn</i> -γλυκερο-3-φωσφορυλοχολίνη
POVPC	1- παλμιτοϋλο -2(5-οξοβαλεορυλο)- <i>sn</i> - γλυκερο- φωσφορυλοχολίνη
PPAR-α	ενεργοποιημένος από τον πολλαπλασιασμό των υπεροξυσωματίων υποδοχέας α
Pro	προλίνη (αμινοξύ)
PUFAs	πολυακόρεστα λιπαρά οξέα
Ser	σερίνη (αμινοξύ)
SR-A	υποδοχέας εκκαθαριστής των μακροφάγων για την οξειδωμένη LDL
SH	σουλφιδρυλικές ομάδες
TGF-β	αυξητικός παράγοντας μετασχηματισμού - β
Thr	θρεονίνη (αμινοξύ)
TNF-α	παράγοντας νέκρωσης των όγκων - α
Trp	τρυπτοφάνη (αμινοξύ)
Tyr	τυροσίνη (αμινοξύ)
Val	βαλίνη (αμινοξύ)
VCAM-1	μόριο προσκόλλησης των αγγειακών κυττάρων -1
VEGF	αγγειακός παράγοντας ανάπτυξης του ενδοθηλίου
VLDL	πολύ χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνες
X ^o	ελεύθερη ρίζα
ΛΜΚ	λεία μυϊκά κύτταρα



ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ



ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1^ο

ΛΙΠΟΠΡΩΤΕΪΝΕΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΙΝΟΥ ΠΛΑΣΜΑΤΟΣ

1.1. ΓΕΝΙΚΑ

Οι λιποπρωτεΐνες είναι μακρομοριακά συμπλέγματα λιπιδίων που περιέχουν εξειδικευμένες πρωτεΐνες, τις απολιποπρωτεΐνες (Απο). Ο ρόλος τους είναι η μεταφορά των υδρόφοβων λιπιδίων (εστέρων χοληστερόλης και τριγλυκεριδίων) στο πλάσμα. Οι λιποπρωτεΐνες αποτελούνται από ένα εσωτερικό πυρήνα με υδρόφοβα τριγλυκερίδια και εστέρες χοληστερόλης και από ένα εξωτερικό υδρόφιλο περίβλημα, που περιέχει φωσφολιπίδια (Εικόνα 1).



Εικόνα 1. Η δομή των λιποπρωτεϊνών του ανθρώπινου ορού

Το εξωτερικό περίβλημα περιέχει επίσης ελεύθερη χοληστερόλη και πρωτεΐνες (απολιποπρωτεΐνες). Το φωσφολιπίδια και η ελεύθερη χοληστερόλη είναι αμφίφιλα μόρια, με το ένα άκρο τους να είναι υδρόφοβο και το άλλο υδρόφιλο. Διατάσσονται με τέτοιο τρόπο στο περίβλημα, ώστε το υδρόφοβο άκρο τους να είναι στραμμένο προς τον πυρήνα και το υδρόφιλο προς τα έξω. Έτσι το μόριο γίνεται διαλυτό στο πλάσμα ^[1].

Οι απολιποπρωτεΐνες, οι οποίες συμβολίζονται με τα 5 πρώτα γράμματα της λατινικής αλφαβήτου (A-E), δεν έχουν μόνο δομικό, αλλά και λειτουργικό ρόλο, αφού συμμετέχουν ενεργά στο μεταβολισμό των λιποπρωτεϊνών. Έχουν ρόλο συνενζύμου σε αντιδράσεις του μεταβολισμού των λιποπρωτεϊνών, στις οποίες συμμετέχουν ένζυμα, όπως η λιποπρωτεϊνική λιπάση (LPL), η ηπατική λιπάση (HL) και η λεκιθινοχοληστερολοακυλοτρανφεράση (LCAT). Επίσης συντελούν στην αναγνώριση των λιποπρωτεϊνών από τους κυτταρικούς υποδοχείς και στη σύνδεσή τους με αυτούς ή χρησιμοποιούνται για τη μεταφορά εστέρων χοληστερόλης, φωσφολιπιδίων και τριγλυκεριδίων μεταξύ των λιποπρωτεϊνών ^[2].

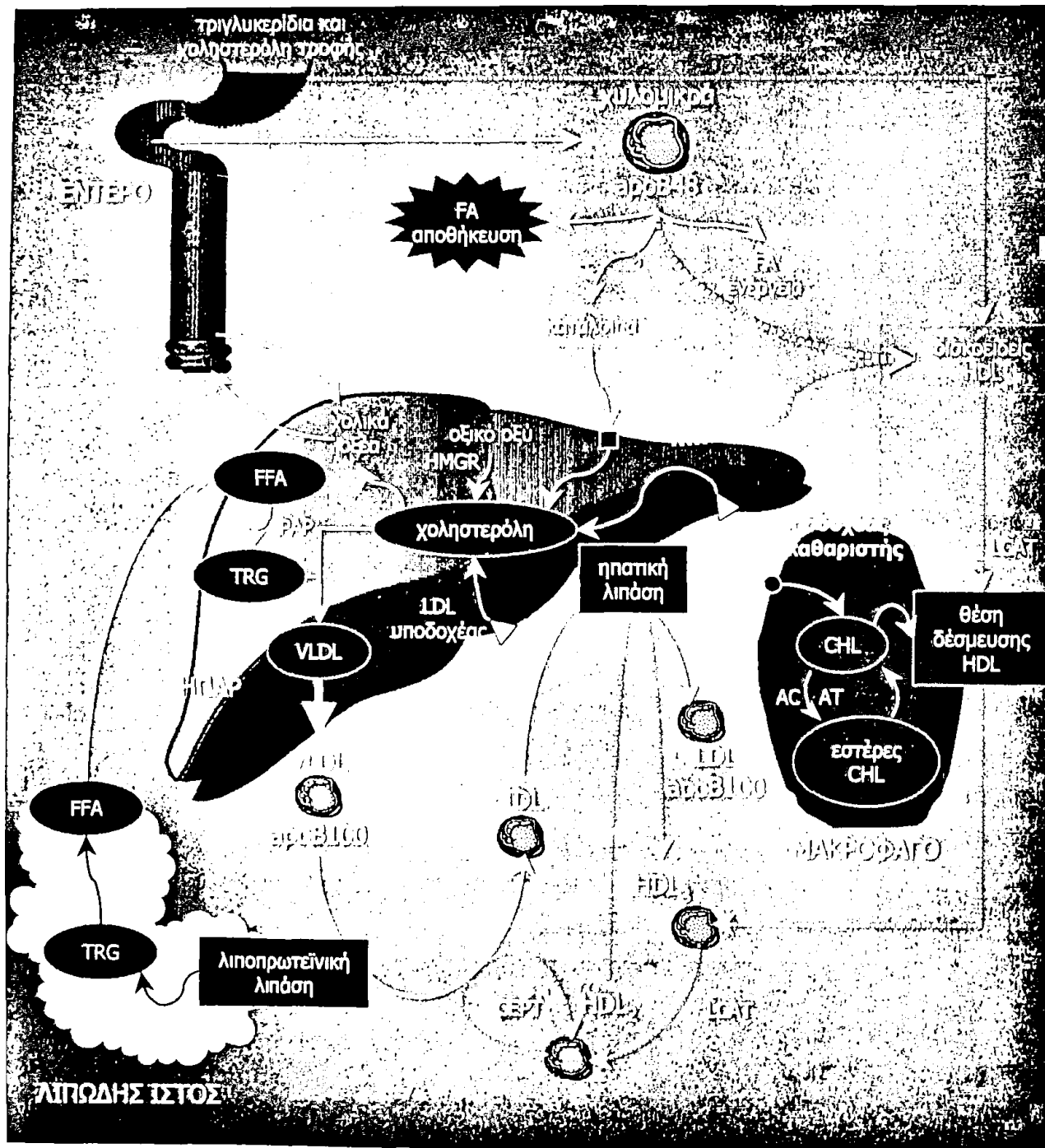
Με βάση τη διαφορά πυκνότητας (d) των σωματιδίων και με τη βοήθεια της υπερφυγοκέντρωσης, οι λιποπρωτεΐνες ταξινομούνται σε 6 κύριες τάξεις: τα χυλομικρά (CM, $d < 0,096 \text{g/ml}$), τις πολύ χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνες (VLDL, $d = 0,096 - 1,006 \text{g/ml}$), τις ενδιάμεσης πυκνότητας λιποπρωτεΐνες (IDL, $d = 1,006 - 1,019 \text{g/ml}$), τις χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνες (LDL, $d = 1,019 - 1,063 \text{g/ml}$), και τις υψηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνες (HDL, $d = 1,063 - 1,210 \text{g/ml}$). Στο βασικό αυτό διαχωρισμό έχει προστεθεί και η λιποπρωτεΐνη (a) (Lp(a), $d = 1,060 - 1,100 \text{g/ml}$) ^[3].

Ο κυριότερος ρόλος των λιποπρωτεϊνών είναι η μεταφορά λιπιδίων. Έτσι τα χυλομικρά μεταφέρουν τα τριγλυκερίδια που προσλαμβάνονται με τις τροφές και παραμένουν στο πλάσμα λιγότερο από 12 ώρες μετά από ένα γεύμα. Οι VLDL αποτελούν την κύρια μορφή μεταφοράς των τριγλυκεριδίων που παράγονται ενδογενώς στο ήπαρ. Οι LDL είναι ο κυριότερος τροφοδότης των ιστών με χοληστερόλη, ενώ ο ρόλος των HDL είναι η ανάστροφη μεταφορά χοληστερόλης από τους ιστούς στο ήπαρ. Κατά τη μεταφορά τους με τις λιποπρωτεΐνες τα λιπίδια υφίσταται ποιοτικές και ποσοτικές μεταβολές, οι οποίες οφείλονται στη δράση ενζύμων και πρωτεϊνών μεταφοράς οι οποίες είναι συνδεδεμένες στα λιποπρωτεϊνικά σωματίδια ^[2,3].



1.2. ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΛΙΠΟΠΡΩΤΕΪΝΩΝ

Ο μεταβολισμός των λιποπρωτεϊνών του πλάσματος φαίνεται στην *Εικόνα 2*. Αναλυτικότερα:



Εικόνα 2. Ο μεταβολισμός των λιποπρωτεϊνών

1.2.1. ΧΥΛΟΜΙΚΡΑ (CM)

Από όλες τις λιποπρωτεΐνες, τα χυλομικρά είναι τα μεγαλύτερα σωματίδια (μέγεθος 100-1000nm). Αποτελούνται κυρίως από τριγλυκερίδια (90%), ενώ περιέχουν σε μικρές ποσότητες ελεύθερη και εστεροποιημένη χοληστερόλη, φωσφολιπίδια και τις απολιποπρωτεΐνες apoA-I, apoB-48, apoC και apoE ^[2]. Τα χυλομικρά συντίθεται από τα κύτταρα του επιθηλίου του εντέρου και στη συνέχεια διαμέσου του μείζονος θωρακικού πόρου εισέρχονται στη συστηματική κυκλοφορία, όπου εμπλουτίζονται με εστέρες χοληστερόλης και απολιποπρωτεΐνες.

Στη συνέχεια, με τη δράση της λιποπρωτεϊνικής λιπάσης (LPL), τα τριγλυκερίδια υδρολύονται σε γλυκερόλη και ελεύθερα λιπαρά οξέα, τα οποία διατίθενται είτε για την άμεση παραγωγή ενέργειας είτε για αποθήκευση στα κύτταρα του μυϊκού και του λιπώδους ιστού^[4] (Εικόνα 2). Τα εναπομείναντα σωματίδια (υπολείμματα-remnants) των χυλομικρών μεταφέρονται στο ήπαρ όπου αποικοδομούνται αφού προσληφθούν από τους υποδοχείς των ηπατοκυττάρων που αναγνωρίζουν την apoE καθώς και την apoB-48 ^[2].

Η apoE των χυλομικρών μπορεί να αναγνωρισθεί και από τους υποδοχείς apoB/E, δηλαδή τους LDL υποδοχείς των περιφερικών κυττάρων και των ηπατοκυττάρων, με αποτέλεσμα τα υπολείμματα των χυλομικρών να μπορούν να καταβολισθούν και διαμέσου των LDL υποδοχέων.

1.2.2. ΠΟΛΥ ΧΑΜΗΛΗΣ ΠΥΚΝΟΤΗΤΑΣ ΛΙΠΟΠΡΩΤΕΪΝΕΣ (VLDL)

Οι VLDL παράγονται στο ήπαρ (Εικόνα 2). Η βασική λειτουργία τους είναι να μεταφέρουν στους ιστούς τα τριγλυκερίδια του ήπατος, τα οποία είτε προέρχονται από τις τροφές είτε συντίθεται ενδογενώς. Αποτελούνται κυρίως από τριγλυκερίδια (65%), αλλά περιέχουν και σε ικανά ποσά ελεύθερη και εστεροποιημένη χοληστερόλη (20%), καθώς και φωσφολιπίδια. Περιέχουν επίσης τις απολιποπρωτεΐνες apoE και apoB-100. Τα σωματίδια VLDL στην κυκλοφορία απελευθερώνουν τριγλυκερίδια με τη βοήθεια της LPL, γίνονται μικρότερα σε μέγεθος και πυκνότερα και τελικά μετατρέπονται στις ενδιάμεσης πυκνότητας λιποπρωτεΐνες (IDL) ^[2]. Το μεγαλύτερο ποσοστό των IDL μετατρέπεται στις χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνες (LDL), ενώ το υπόλοιπο παραλαμβάνεται από το ήπαρ διαμέσου των apo B/E υποδοχέων ^[3].

1.2.3. ΧΑΜΗΛΗΣ ΠΥΚΝΟΤΗΤΑΣ ΛΙΠΟΠΡΩΤΕΪΝΕΣ (LDL)

Η χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνες (LDL) είναι μια ετερογενής ομάδα σφαιρικών πολυμοριακών σωματιδίων με διαφορετικές φυσικοχημικές ιδιότητες και διαφορετικό



μεταβολισμό. Απαρτίζονται από ένα υδρόφοβο πυρήνα που περιέχει περίπου 1600 μόρια εστέρων χοληστερόλης και 170 μόρια τριγλυκεριδίων, ο οποίος περιβάλλεται από μια μονοστοιβάδα που αποτελείται από 700 μόρια φωσφολιπιδίων (63% φωσφατιδυλοχολίνη, 26% σφιγγομυελίνη) και 600 μόρια ελεύθερης χοληστερόλης ^[3,5]. Οι πολικές κεφαλές των φωσφολιπιδίων προσανατολίζονται στην επιφάνεια του λιποπρωτεϊνικού σωματιδίου και έτσι συμβάλλουν στη διαλυτότητα της LDL στο υδρόφιλο περιβάλλον του πλάσματος. Τα μισά περίπου από τα λιπαρά οξέα στο μόριο της LDL είναι πολυακόρεστα (PUFAs) (κύρια λινολεϊκό και σε μικρές ποσότητες αραχιδονικό και δοκοσαεξανοϊκό οξύ ^[6]). Η εξωτερική επιφάνεια της LDL περιβάλλεται από την απολιποπρωτεΐνη B-100 (ApoB-100, *Εικόνα 3*).

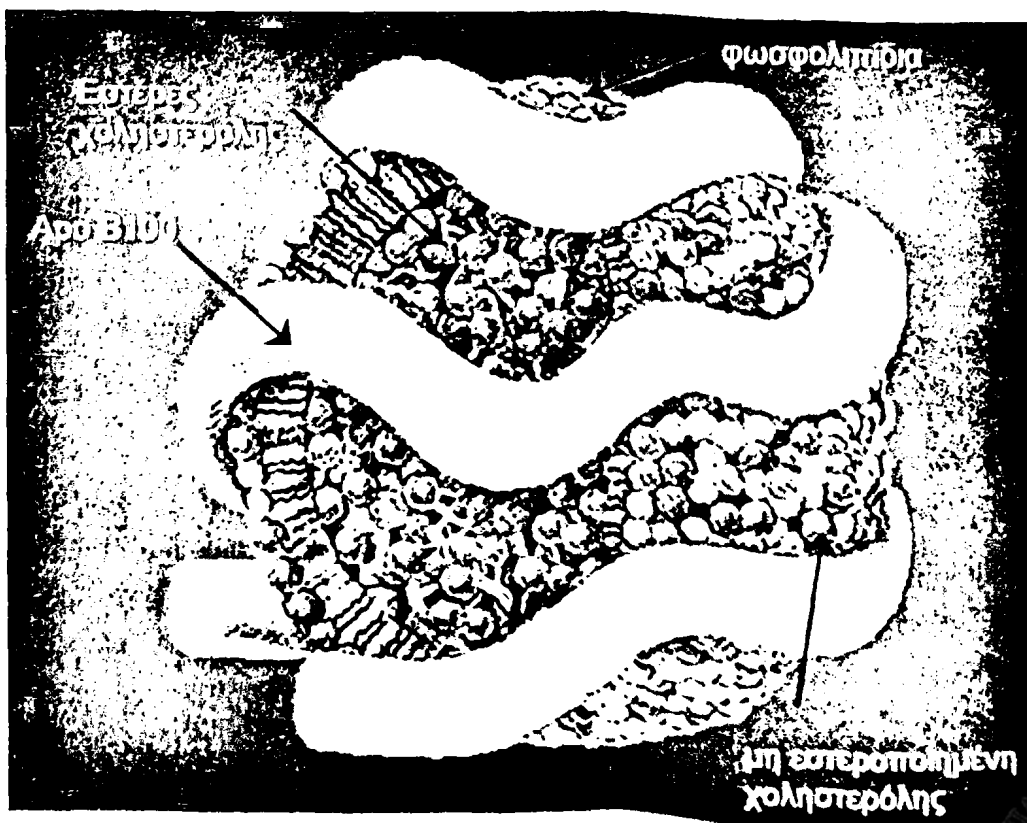
Η LDL μεταφέρει μικρές ποσότητες λιπόφιλων συστατικών, τα οποία δρουν σαν αντιοξειδωτικά και προστατεύουν τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα της LDL, όπως η ουβικινόλη-10, η α-τοκοφερόλη (βιταμίνη E), καθώς και όλες οι υδρογονωμένες και οξυγονωμένες μορφές των καροτενοειδών. Το κυριότερο αντιοξειδωτικό συστατικό που απαντά στην LDL (6 μόρια ανά μόριο LDL) είναι η α-τοκοφερόλη (βιταμίνη E) ^[7]. Η αντιοξειδωτική δράση της βιταμίνης E οφείλεται στην ικανότητα της να μετατρέπει τις αλυσίδες των ριζών υπεροξειδίου που σχηματίζονται σε υδροϋπεροξειδία και ταυτόχρονα να μετατρέπεται αυτή σε ελεύθερη ρίζα της βιταμίνης E, η οποία μπορεί να ανακυκλωθεί σε α-τοκοφερόλη διαμέσου της αντίδρασης της με κάποια άλλη αντιοξειδωτική ουσία, κυρίως ασκορβικό οξύ. Σε μικρότερα ποσά απαντούν η γ-τοκοφερόλη, το α- και β-καροτένιο, καθώς και άλλες υδρογονωμένες και οξυγονωμένες μορφές καροτενοειδών, το λυκοπένιο, η κρυπτοξανθίνη, η λουτεΐνη και η ουβικινόλη-10 ^[7]. Έχει προταθεί ότι η ουβικινόλη-10 έχει ιδιαίτερη σημασία όσον αφορά την προστασία της LDL από την οξείδωση ^[8].

Η apo B-100 συντίθεται στο ήπαρ και αποτελείται από 4536 αμινοξέα. Ο αριθμός των αμινοξέων ανά μόριο ApoB-100 είναι: 266 Ala, 478 Asp+Asn, 148 Arg, 25 Cys, 529 Glu+Gln, 207Gly, 115 His, 288 Ile, 523 Leu, 356 Lys, 78 Met, 223 Phe, 169 Pro, 393 Ser, 298 Thr, 37 Trp, 152 Tyr, 251 Val ^[6]. Από τις 25 κυστεΐνες οι 4 έχουν ελεύθερες σουλφιδρυλικές ομάδες (SH), ενώ οι υπόλοιπες σχηματίζουν δισουλφιδικούς δεσμούς (S-S) ή εστέρες θειόλης. Η ApoB-100 περιβάλλει ολόκληρη την επιφάνεια του λιποπρωτεϊνικού σωματιδίου σαν «χταπόδι» και είναι η μοναδική απολιποπρωτεΐνη της LDL (*Εικόνα 3*). Η apoB-100 είναι γλυκοζυλιωμένη (το συνολικό ποσοστό σε υδατάνθρακες αποτελεί το 8-10% του βάρους της) ^[9]. Οι κυριότεροι υδατάνθρακες που περιέχει είναι η μανόζη, η γαλακτόζη, η γλυκοζαμίνη και το σιαλικό οξύ. Το μοριακό βάρος της γλυκοζυλιωμένης apoB-100 είναι 550.000. Το γονίδιο της apoB100 βρίσκεται στο βραχύ σκέλος του χρωμοσώματος 2 και έχει μήκος 43 kb και η έκφραση του mRNA της πρωτεΐνης περιορίζεται μόνο στο ήπαρ ^[9]. Η apoB100 συντίθεται στα ριβοσωμάτια και μεταφέρεται στο ενδοπλασματικό δίκτυο, ενώ μια ποσότητά της καταβολίζεται χωρίς να εκκρίνεται και είναι υπεύθυνη για την αναγνώριση και πρόσληψη της LDL από τον αντίστοιχο υποδοχέα B/E, ο οποίος βρίσκεται κυρίως στα ηπατοκύτταρα.



Οι LDL προέρχονται από μεγαλύτερα μόρια που περιέχουν ApoB-100, όπως είναι οι VLDL, οι οποίες εκκρίνονται από το ήπαρ (Εικόνα 2). Ο μεταβολισμός των VLDL στην κυκλοφορία αρχίζει με τη συνεχή δράση της LPL, η οποία υδρολύει τα τριγλυκερίδια σε μονογλυκερίδια και λιπαρά οξέα, ενώ ταυτόχρονα οι VLDL αποδίδουν τριγλυκερίδια και προσλαμβάνουν εστέρες χοληστερόλης από τις HDL, με τη δράση της CETP (πρωτεΐνη μεταφοράς εστέρων χοληστερόλης, cholesterol ester transfer protein) ^[10]. Με αυτό τον τρόπο σχηματίζονται οι IDL. Το 50% των IDL προσλαμβάνονται από ηπατικούς υποδοχείς, ενδοκυττάρωνονται και αποδίδουν τα τριγλυκερίδια και τους εστέρες χοληστερόλης. Το υπόλοιπο 50% των IDL μεταβολίζεται στην κυκλοφορία. Στο ήπαρ η ηπατική λιπάση διασπά τα τριγλυκερίδια που οι IDL περιέχουν. Ταυτόχρονα οι IDL στην κυκλοφορία προσλαμβάνουν εστέρες χοληστερόλης από τις HDL, ενώ ταυτόχρονα αποδίδουν σε αυτές τριγλυκερίδια (με τη δράση της CETP) και τις apoC. Τα σωματίδια που προκύπτουν από τον ενδαγγειακό μεταβολισμό των IDL είναι οι LDL ^[11], οι οποίες είναι πλούσιες σε εστέρες χοληστερόλης.

Με τη δράση της CETP οι εστέρες της χοληστερόλης μεταφέρονται από τις LDL στις VLDL με αντάλλαγμα τη μεταφορά τριγλυκεριδίων από τις VLDL στις LDL. Έτσι σχηματίζονται οι LDL οι οποίες είναι πλούσιες σε τριγλυκερίδια ^[1]. Ο κύριος ρόλος των LDL είναι η μεταφορά χοληστερόλης από το ήπαρ στους περιφερικούς ιστούς, στους οποίους η χοληστερόλη καταβολίζεται περαιτέρω με σκοπό την κάλυψη ενεργειακών και δομικών αναγκών των κυττάρων ^[12].



Εικόνα 3. Η δομή του σωματιδίου της LDL

Φαινότυποι LDL

Μέσα στα όρια πυκνοτήτων των LDL (1,019-1,063 g/ml) μπορούν να διαχωρισθούν με υπερφυγοκέντρηση του ορού διάφορα κλάσματα. Συνήθως διαχωρίζονται τρία (LDL₁-LDL₃), ή πέντε (LDL₁-LDL₅) με λίγο διαφορετική πυκνότητα το καθένα (*Εικόνα 4*)^[13].

Ο διαχωρισμός των ατόμων του γενικού πληθυσμού με βάση την πυκνότητα των LDL αποκαλύπτει δύο φαινοτύπους^[14]:

Το φαινότυπο Α, στον οποίο το μεγαλύτερο ποσοστό των μορίων LDL είναι μεγάλα και ελαφρά, αφού περιέχουν πολλούς εστέρες χοληστερόλης με μέγεθος >25,5nm και πυκνότητα 1,019-1,03 g/ml, και

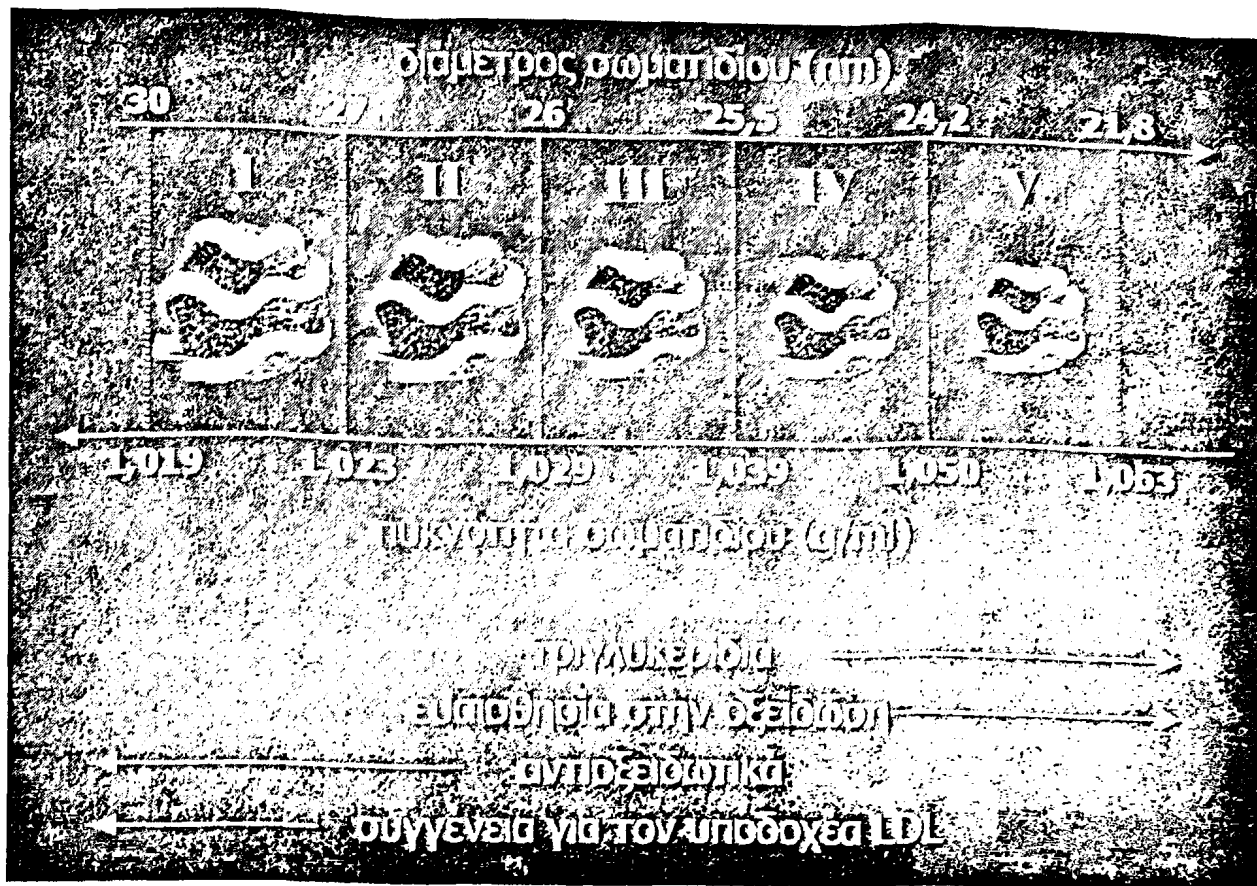
Το φαινότυπο Β, στον οποίο το μεγαλύτερο ποσοστό των μορίων LDL είναι μικρά και πυκνά με λίγους εστέρες χοληστερόλης με μέγεθος <25,5nm και πυκνότητα 1,04-1,063 g/ml.

Η πλειονότητα των ατόμων (85-90%) μπορεί να κατηγοριοποιηθεί σε μια από τις δύο παραπάνω κατηγορίες, ενώ οι υπόλοιποι ανήκουν στον ενδιάμεσο φαινότυπο, με μέγεθος των LDL 25,2-25,5 nm και πυκνότητα 1,03-1,04 g/ml^[15].

Η κλινική σημασία των υποκλασμάτων των LDL είναι μεγάλη, καθώς οι μικρές και πυκνές LDL έχουν μικρότερη συγγένεια με τον υποδοχέα της LDL και συσσωρεύονται στο πλάσμα, εισέρχονται ευκολότερα στο αρτηριακό τοίχωμα, συνδέονται με αυξημένη συγγένεια με τις πρωτεογλυκάνες του αγγειακού τοιχώματος και δεν μπορούν να επανέλθουν στην κυκλοφορία^[16]. Τέλος οξειδώνονται ευκολότερα, μια μετατροπή που είναι αναγκαία για την πρόσληψη των LDL από τα μακροφάγα του αρτηριακού τοιχώματος και το σχηματισμό των αφρωδών κυττάρων.

Συγχρονικές μελέτες έδειξαν διαφορές στο μέγεθος, την πυκνότητα και τη σύσταση των σωματιδίων των LDL μεταξύ ασθενών με στεφανιαία νόσο και υγιών εθελοντών^[15]. Στην Quebec Cardiovascular Study^[17], άνδρες με μέγεθος LDL σωματιδίων <25,6nm είχαν 2,2 φορές μεγαλύτερο κίνδυνο για την εμφάνιση στεφανιαίας νόσου, σε σύγκριση με τους άνδρες με μέγεθος LDL σωματιδίων >25,6nm. Στη μελέτη αυτή, η πολυπαραγοντική ανάλυση έδειξε ότι το μέγεθος των σωματιδίων των LDL ήταν προγνωστικός παράγοντας για την εμφάνιση στεφανιαίας νόσου, ανεξάρτητα από τα επίπεδα της LDL χοληστερόλης, των τριγλυκεριδίων, της HDL χοληστερόλης και της ApoB του πλάσματος. Αντίθετα, στην Physicians Health Study^[18], τα μικρά πυκνά σωματίδια LDL δεν αποτέλεσαν ανεξάρτητο προγνωστικό δείκτη για την εμφάνιση εμφράγματος του μυοκαρδίου. Παρόλα αυτά και σε αυτή τη μελέτη, οι ασθενείς με έμφραγμα του μυοκαρδίου εμφάνισαν μικρότερα LDL σωματίδια σε σύγκριση με τα υγιή άτομα.





Εικόνα 4. Τα υποκλάσματα των LDL σωματιδίων ανάλογα με τη διάμετρο και την πυκνότητά τους

1.2.4. ΥΨΗΛΗΣ ΠΥΚΝΟΤΗΤΑΣ ΛΙΠΟΠΡΩΤΕΪΝΕΣ (HDL)

Τα συστατικά των HDL βρίσκονται σε διαρκή και γρήγορη ανταλλαγή. Οι HDL αποτελούνται από διάφορα υποκλάσματα που προκύπτουν από τη διαδικασία της λιπόλυσης και της ανταλλαγής των συστατικών μεταξύ των HDL και των διαφόρων άλλων λιποπρωτεϊνών. Στο μεταβολισμό των HDL συμμετέχουν κυρίως τα ένζυμα LCAT και CETP^[9]. Τρεις είναι οι κύριες μορφές HDL που κυκλοφορούν στο πλάσμα, οι προ-β HDL και οι HDL₂ και HDL₃. Οι HDL αποτελούνται από ένα πυρήνα εστέρων χοληστερόλης και τριγλυκεριδίων που περιβάλλεται από ελεύθερη χοληστερόλη, φωσφολιπίδια και τις απολιποπρωτεΐνες apo A-I, A-II, AIV, C-I, C-II, C-III και E. Τα διάφορα υποκλάσματα των HDL διαφέρουν μεταξύ τους όσον αφορά την αναλογία πρωτεΐνης / λιπιδίων και την πυκνότητα.

Οι HDL προσλαμβάνουν την περίσσεια της χοληστερόλης από τους περιφερικούς ιστούς και τη μεταφέρουν στο ήπαρ με τη μορφή εστέρων χοληστερόλης με τη δράση της LCAT. Η δράση αυτή της HDL είναι γνωστή ως αναστροφή μεταφορά χοληστερόλης. Μέρος των εστέρων χοληστερόλης μεταβολίζεται στο ήπαρ, αφού πρώτα μεταφερθεί σε σωματίδια που περιέχουν apoB με τη δράση των SR-B1, ABC-A1 και CETP^[19]. Ο καταβολισμός των HDL στο ήπαρ γίνεται διαμέσου των υποδοχέων apoE και apoB/E. Η προ-β-HDL αποτελεί το

μικρότερο υποκλάσμα των HDL (5% της ApoA-I) και διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην ανάστροφη μεταφορά της χοληστερόλης. Η σύνθεση και η αναλογία των HDL₂ και HDL₃ καθορίζονται από τα επίπεδα των τριγλυκεριδίων στον πλάσμα. Έτσι, μετά από ένα γεύμα πλούσιο σε λίπος, τα τριγλυκερίδια από τα χυλομικρά και τις VLDL μεταφέρονται στις HDL με τη βοήθεια της CETP. Έτσι σχηματίζονται οι πλούσιες σε τριγλυκερίδια HDL₂, οι οποίες με τη δράση της ηπατικής λιπάσης μετατρέπονται στις HDL₃ και οι οποίες με τη σειρά τους μπορούν, αφού προσλάβουν φωσφολιπίδια και ελεύθερη χοληστερόλη με τη βοήθεια της LCAT, να μετατραπούν ξανά σε HDL₂^[3].

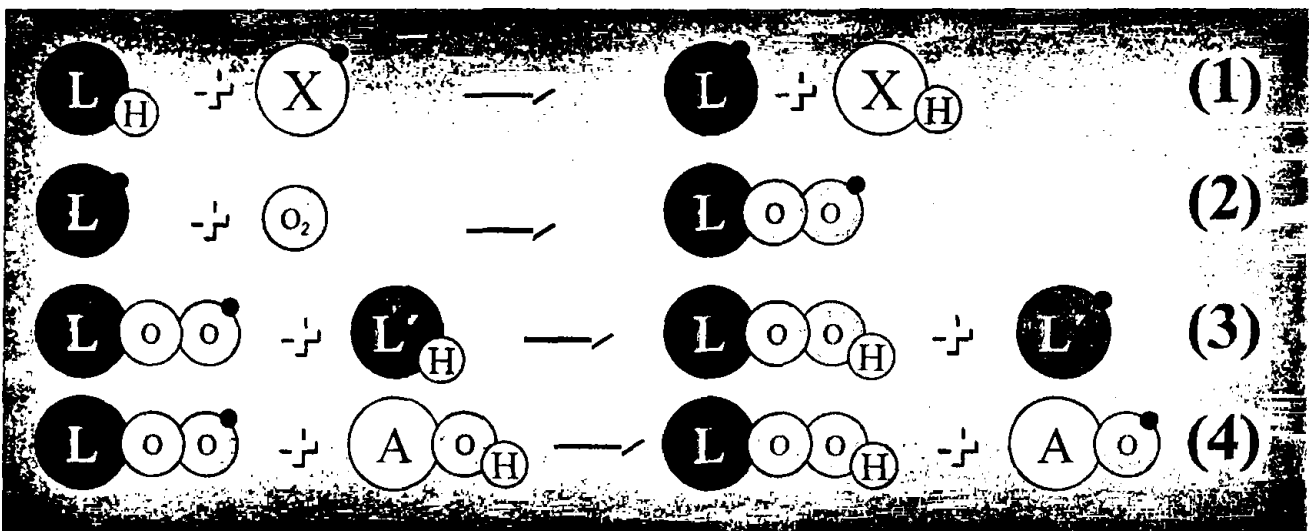


ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2^ο

Η ΟΞΕΙΔΩΜΕΝΗ LDL

2.1. ΓΕΝΙΚΑ

Η οξείδωση της LDL περιλαμβάνει μία διαδικασία υπεροξείδωσης των λιπιδίων, η οποία πυροδοτείται από ελεύθερες ρίζες. Κατά τη διάρκεια της οξείδωσης της LDL τόσο το λιπιδικό, όσο και το πρωτεϊνικό περιεχόμενό της υπόκεινται σε μια ποικιλία από χημικές μεταβολές διαμέσου αντιδράσεων ελευθέρων ριζών, καθώς επίσης και τροποποιήσεων από χημικά δραστικά προϊόντα που σχηματίζονται στην oxLDL ^[11]. Η οξείδωση αρχίζει με την απομάκρυνση ενός ατόμου υδρογόνου από ένα από τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα της LDL από μία αρχική ρίζα X^{*}, σύμφωνα με την *αντίδραση 1* της *Εικόνα 5*. Η ρίζα L^{*} που προκύπτει αντιδρά ταχύτατα με μοριακό οξυγόνο (O₂) για το σχηματισμό ρίζας λιπούπεροξειδίου, LOO^{*} (*Εικόνα 5-αντίδραση 2*).



Εικόνα 5. Αντιδράσεις οξείδωσης LDL

Στη συνέχεια η ρίζα λιπούπεροξειδίου αποσπά ένα άτομο υδρογόνου από ένα παρακείμενο λιπαρό οξύ, LH, για το σχηματισμό υδρολιπούπεροξειδίου, LOOH και μιας νέας ελεύθερης ρίζας, L^{*} (*Εικόνα 5-αντίδραση 3*). Τα υδρολιπούπεροξειδία των λιπιδίων διασπώνται παρουσία μεταλλικών ιόντων σε αλδεύδες (MDA, 4-HNE) και υδρογονάνθρακες. Τα τελικά προϊόντα οξείδωσης των λιπιδίων των LDL αντιδρούν με την apo B-100. Η καρβονυλική ομάδα της μηλονικής διαλδεύδης (MDA) αντιδρά με τις ε-NH₂ λυσινών που περιέχονται στην apo B-100 για το σχηματισμό ευαίσθητων ενώσεων που είναι γνωστές ως βάσεις Schiff. Παρουσία φαινολικών αντιοξειδωτικών, όπως η βιταμίνη E, η υπεροξείδωση των λιπαρών οξέων

αναστέλλεται με την αντίδραση της ελεύθερης ρίζας του υπεροξειδίου με το αντιοξειδωτικό σύμφωνα με την αντίδραση 4-Εικόνα 5). Η φαινοξυ-ρίζα AO^\bullet έχει πολύ μικρή δραστηριότητα και κατά συνέπεια δεν μπορεί να επιμηκύνει την υπεροξείδωση των λιπαρών οξέων ^[20].

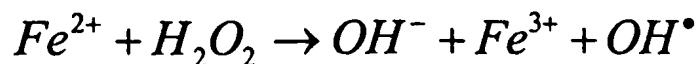
Χαρακτηριστικό των oxLDL είναι ότι το επιφανειακό φορτίο του είναι περισσότερο αρνητικό σε σύγκριση με το αντίστοιχο των φυσικών (μη οξειδωμένων) LDL. Η οξειδωμένη μορφή της LDL (oxLDL) έχει μεγαλύτερη διάμετρο από τη φυσική LDL και παρουσιάζει αυξημένη ηλεκτροφορητική κινητικότητα. Περιέχει επίσης ισχυρά τοξικά προϊόντα των οποίων η απελευθέρωση στο αρτηριακό τοίχωμα μπορεί να προκαλέσει διάφορες αντιδράσεις, όπως τη νέκρωση των ενδοθηλιακών κυττάρων, τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων και την έκκριση αυξητικών παραγόντων ^[21].

2.2. ΤΡΟΠΟΙ ΟΞΕΙΔΩΣΗΣ ΤΩΝ LDL

Η οξείδωση των λιποπρωτεϊνών είναι πολύ δύσκολο να παρατηρηθεί μέσα στο πλάσμα λόγω της υψηλής περιεκτικότητάς του σε αντιοξειδωτικές ουσίες και πρωτεΐνες που δεσμεύουν χηλικά μεταλλικά ιόντα. Αντίθετα, η οξείδωση των LDL παρατηρείται ευκολότερα σε περιοχές με έντονο οξειδωτικό στρες και μειωμένη συγκέντρωση αντιοξειδωτικών ουσιών, όπως είναι το τοίχωμα των αρτηριών (Εικόνα 6).

Μεταλλικά ιόντα

Μελέτες έδειξαν ότι *in vitro*, σε καλλιέργειες ΛΜΚ, είναι απαραίτητη η παρουσία εξωκυττάρων ιόντων σιδήρου ή χαλκού για την οξείδωση των LDL. Πράγματι η παρουσία χαλκού σε καλλιέργειες κυττάρων μπορεί να οδηγήσει στη δημιουργία ελευθέρων ριζών και στην οξείδωση των λιπαρών οξέων διαμέσου της αντίδρασης *Fenton* ^[16]:



Ωστόσο, αυτά τα ιόντα σε μεγάλες συγκεντρώσεις απουσία κυττάρων μπορούν να προκαλέσουν οξείδωση των LDL. Επίσης ιόντα συνδεδεμένα με πρωτεΐνες, όπως η σερουλοπλασμίνη (βασικός μεταφορέας χαλκού *in vivo*) ^[22] και η αίμη μπορούν να προκαλέσουν οξείδωση των LDL *in vitro* ^[23].

Όμως φαίνεται ότι *in vivo* δεν συμβαίνει το ίδιο. Η τρανσφερίνη, κύριος μεταφορέας σιδήρου αλλά και χαλκού στη κυκλοφορία, έχει ισχυρή θέση σύνδεσης με αυτά τα ιόντα και έτσι αυτά τα ιόντα είναι σε πολύ μικρό ποσοστό φορτισμένα. Επιπρόσθετα, ακόμα και μικρές συγκεντρώσεις αλβουμίνης αναστέλλουν την οξείδωση των LDL από μεταλλικά ιόντα *in vitro*. Τέλος, δεν υπάρχουν στοιχεία ότι ιόντα σιδήρου και χαλκού υπάρχουν ελεύθερα στο αίμα, άρα

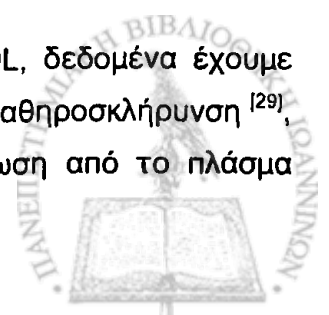
και στο αρτηριακό τοίχωμα, τουλάχιστον κάτω από φυσιολογικές συνθήκες. Επιπρόσθετα, στις αθηρωματικές βλάβες δεν έχουν παρατηρηθεί αυξημένες συγκεντρώσεις ο-τυροσίνης και π-τυροσίνης, τα οποία αποτελούν και το κύριο προϊόν οξειδωσης των LDL από μεταλλικά ιόντα *in vitro* ^[6]. Επιπρόσθετα, ασθενείς με νόσο του Wilson ή αιμοχρωμάτωση δεν εμφανίζουν αυξημένο κίνδυνο για στεφανιαία νόσο. Τέλος τα επίπεδα της σερουλοπλασμίνης είναι χαμηλά στη νόσο του Wilson και η αίμη είναι ενδοκυττάρια ουσία ^[24]. Παρόλα αυτά σε πρόσφατη μελέτη τα επίπεδα του σιδήρου του ορού συσχετίστηκαν με αυξημένα επίπεδα οξειδωμένης LDL ορού και ενεργότητας της 12-λιποξυγονάσης καπνιστών εθελοντών ^[25], ενώ οι Brouwers και συν. ^[26] συσχέτισαν τα επίπεδα της oxLDL με τα επίπεδα της φερριτίνης του ορού σε υγιείς άνδρες εθελοντές.

Θειόλες

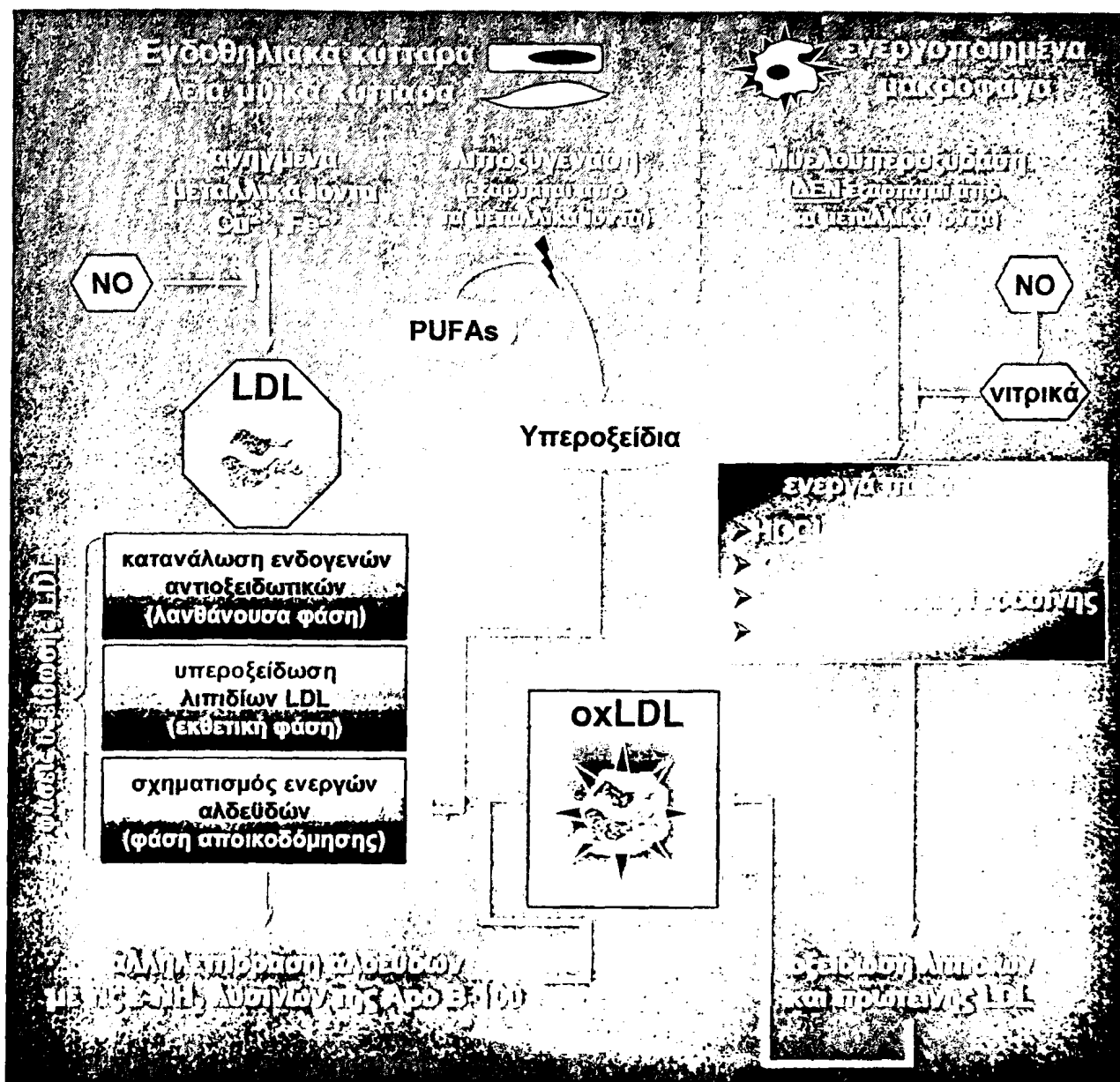
Μελέτες έδειξαν ότι καλλιέργειες ΛΜΚ παράγουν υπεροξειδίο του υδρογόνου και ότι η δισμουτάση του υπεροξειδίου αναστέλλει την οξειδωση των LDL ^[27]. Έτσι φαίνεται ότι ελεύθερες ρίζες οξυγόνου οξειδώνουν τις LDL τουλάχιστον *in vitro* ^[23]. Οι αυτοοξειδούμενες θειόλες παράγουν ελεύθερες ρίζες οξυγόνου και επομένως μπορεί να διαδραματίζουν κάποιο ρόλο στην οξειδωση των LDL *in vivo*. Καλλιέργεια ΛΜΚ σε υπόστρωμα το οποίο είναι ελεύθερο L-κυστίνης (η δισουλφιδική μορφή της L-κυστεΐνης) αναστέλλει την οξειδωση των LDL. Αν προστεθεί στη συνέχεια L-κυστίνη στο μέσο αντιστρέφονται τα αποτελέσματα. Το εύρημα αυτό οδηγεί στην υπόθεση ότι η L-κυστίνη προσλαμβάνεται από τα ΛΜΚ, τα οποία τη μετατρέπουν σε θειόλη και την αποβάλλουν ^[23]. Η αυτοοξειδωση της θειόλης προκαλεί την απελευθέρωση ελευθέρων ριζών (οξυγόνου και υδροξυλίου) και αυτές με τη σειρά τους οξειδώνουν τις LDL. Η ικανότητα των θειολών να οξειδώνουν τις LDL απουσία κυττάρων ενισχύει αυτή την υπόθεση ^[27]. Επιπλέον, μακροφάγα και επιθηλιακά κύτταρα σε καλλιέργειες χρησιμοποιούν οδό βασισμένη στη L-κυστίνη για την παραγωγή εξωκυττάρων θειολών και την οξειδωση των LDL, πάντα σε μέσο που περιέχει μεταλλικά ιόντα.

Αντίθετα οι Lynch και συν. ^[28] έδειξαν ότι συγκεκριμένες θειόλες σε συγκεντρώσεις παρόμοιες με αυτές που βρίσκονται φυσιολογικά στα πλάσμα αναστέλλουν την οξειδωση των LDL από την αίμη, τη φυσική πηγή Fe^{3+} στο αίμα, υποδηλώνοντας ότι εκτός από οξειδωτικές, οι θειόλες μπορεί να έχουν και αντι-οξειδωτικές δράσεις. Καθώς η αίμη προάγει την οξειδωση των λιπιδίων του πυρήνα των LDL, ενώ τα ελεύθερα ιόντα Fe^{3+} τα λιπίδια της επιφάνειας των LDL, η παραπάνω παρατήρηση από τους Lynch και συν. υποδηλώνει ότι η οξειδωτική ή η αντι-οξειδωτική δράση των θειολών μπορεί να σχετίζεται με το σημείο πάνω στο σωματίδιο των LDL στο οποίο επισυμβαίνει η βλάβη από την οξειδωση ^[28].

Για την *in vivo* συμμετοχή των θειολών στην οξειδωση των LDL, δεδομένα έχουμε στους ασθενείς με ομοκυστεϊνουρία στους οποίους παρατηρείται πρώιμη αθηροσκλήρωση ^[29], θρόμβωση και δυσλειτουργία του ενδοθηλίου. Ωστόσο, η μη απομόνωση από το πλάσμα



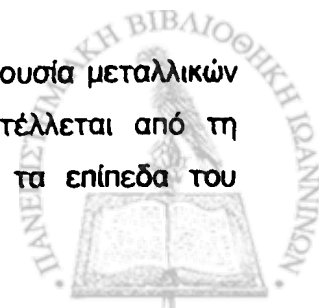
οξειδωμένων λιπιδίων, καθώς και η διαφορετική μορφολογία των αθηρωματικών βλαβών σε αυτούς τους ασθενείς, υποδεικνύουν ένα επιπλέον πιθανό παθοφυσιολογικό μηχανισμό σε ασθενείς με ομοκυστεϊνουρία. Μελέτες έδειξαν ότι η ομοκυστεϊνή σε μικρές συγκεντρώσεις *in vitro* προάγει την οξείδωση των LDL από ιόντα χαλκού, αν και σε μεγάλες συγκεντρώσεις την αναστέλλει δεσμεύοντας τα ιόντα χαλκού [30].



Εικόνα 6. Μηχανισμοί οξείδωσης των LDL (PUFAs: πολυακόρεστα λιπαρά οξέα, NO: μονοξειδίο του αζώτου, HOCl: υποχλωριώδες οξύ)

Υπεροξειδίο του υδρογόνου (ελεύθερες ρίζες οξυγόνου)

Ενδείξεις ότι το υπεροξειδίο του υδρογόνου οξειδώνει τις LDL παρουσία μεταλλικών ιόντων αποτελούν: 1) η οξείδωση των LDL παρουσία κυττάρων αναστέλλεται από τη δισμουτάση του υδροξυλίου, 2) το γεγονός ότι σε ορισμένες μελέτες τα επίπεδα του



υπεροξειδίου συσχετίζονται με τη κυτταροεξααρτώμενη οξειδωση των LDL και 3) η παραγωγή υπεροξειδίου είτε με τη βοήθεια ενζύμων είτε διαμέσου ελευθέρων ριζών ευοδώνει την οξειδωση παρουσία μεταλλικών ιόντων. Ωστόσο, πρέπει να σημειωθεί ότι η δισμουτάση του υπεροξειδίου μπορεί να αναστείλει την οξειδωση δεσμεύοντας ελεύθερα μεταλλικά ιόντα. Πράγματι το υπεροξειδίο αντιδρά με ελεύθερο χαλκό, όταν αυτός βρίσκεται στο υπόστρωμα και προκαλεί οξειδωση *in vitro*. Παρουσία ελευθέρων ιόντων χαλκού δεν είναι δυνατόν να αναδειχθεί η παραγωγή υπεροξειδίου από τα κύτταρα, καθώς και η δράση της δισμουτάσης. Η χρήση EDTA (αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ) οδηγεί στη δέσμευση του ελεύθερου χαλκού ^[23].

Λιποξυγονάση

Οι λιποξυγονάσες είναι ενδοπλασματικά (cytosolic) ένζυμα, τα οποία βρίσκονται στα μακροφάγα, στα ΛΜΚ και στα ενδοθηλιακά κύτταρα και οξειδώνουν απευθείας πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (Εικόνα 6), οδηγώντας στη δημιουργία υπεροξειδίων, που με τη σειρά τους προκαλούν οξειδωση των LDL ^[6,22]. Η 15-λιποξυγονάση οξειδώνει λιπαρά οξέα που βρίσκονται στα φωσφολιπίδια των LDL ^[16], ενώ η υπερέκφρασή της από τα ενδοθηλιακά κύτταρα γενετικά τροποποιημένων ποντικών με έλλειψη του κλασικού υποδοχέα των LDL οδηγεί σε αύξηση του ρυθμού ανάπτυξης αθηρωματικής νόσου^[31]. Η χοίρινη 12-λιποξυγονάση των λευκών αιμοσφαιρίων επίσης οξειδώνει φωσφολιπίδια και βρίσκεται αυξημένη σε μακροφάγα γεμάτα χοληστερόλη. Η δράση των 12/15 λιποξυγονασών συνδέεται με την υπερέκφραση κυτταροκινών (MCP-1, VCAM-1, IL-6) που συμμετέχουν ενεργά στην παθοφυσιολογία της αθηρωματικής πλάκας ^[32], ενώ φαίνεται ότι μακροφάγα *in vitro* σε κατάσταση ιστικής υποξίας (όπως συμβαίνει και *in vivo* στο εσωτερικό της αθηρωματικής πλάκας) εμφανίζουν αυξημένη ενεργότητα της 15-λιποξυγονάσης και υψηλότερους ρυθμούς οξειδωσης των LDL ^[33]. Παλαιότερες μελέτες έδειξαν ότι φυτική (από σόγια) λιποξυγονάση, καθώς και η φωσφολιπάση A₂ οξειδώνουν τις LDL *in vitro* ^[23]. Μελέτες με αναστολείς έδειξαν ότι η 15-λιποξυγονάση μπορεί να προκαλέσει οξειδωση των LDL, αλλά σε άλλες μελέτες παρατηρήθηκε ότι αυτοί οι αναστολείς αναστέλλουν την οξειδωση των LDL απουσία κυττάρων. Καθώς οι λιποξυγονάσες είναι ενδοκυττάρια ένζυμα, φαίνεται ότι προάγουν την οξειδωση των εξωκυττάρων LDL αρχικά οξειδώνοντας τα φωσφολιπίδια της κυτταρικής μεμβράνης, τα οποία στη συνέχεια μεταφέρονται στις LDL. Ταυτόχρονα, ο Takahashi και συν.^[34] έδειξαν πρόσφατα ότι η σύνδεση των LDL, πριν την οξειδωσή τους, με τον αντίστοιχο υποδοχέα των μακροφάγων προκαλεί την έκφραση και τη μεταφορά των 12/15 λιποξυγονασών από το κυτοσόλιο στην κυτταρική επιφάνεια. Επιπρόσθετη ένδειξη για τη συμμετοχή των συγκεκριμένων ενζύμων στην οξειδωση των LDL *in vivo*, αποτελεί η παρουσία τόσο του mRNA όσο και της πρωτεΐνης των 12/15 λιποξυγονασών σε αθηρωματικές πλάκες ^[5]. Μελέτες με ισομορφές του λινελαϊκού οξέος έδειξαν ότι η 15-υδροξυγονάση μπορεί να διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην παθογένεια σε ορισμένα στάδια της αθηρωμάτωσης ^[6,23]. Αντίθετα, μελέτες *in vitro* με κύτταρα

κουελιού, έδειξαν ότι οι λιποξυγονάσες πιθανά μειώνουν την άθροιση των LDL από τα μακροφάγα, αφού μειώνουν τη φαγοκυττάρωση των σωματιδίων LDL και αυξάνουν τον ενδοκυττάριο μεταβολισμό της χοληστερόλης, υποδηλώνοντας ένα πιθανό αντιαθηρωματικό ρόλο των λιποξυγονασών ^[35].

Μυελοϋπεροξειδάση

Τα φαγοκύτταρα εκκρίνουν υπεροξειδίο του υδρογόνου (H_2O_2) και το ένζυμο μυελοϋπεροξειδάση τα οποία αντιδρούν έτσι ώστε να σχηματίσουν αντιμικροβιακούς παράγοντες (τοξίνες). Το ένζυμο χρησιμοποιεί H_2O_2 ώστε να μετατρέψει το χλωριώδες σε υποχλωριώδες οξύ με τη βοήθεια ιόντων Cl^- ^[5] και την L-τυροσίνη σε τυροσυλο-ελεύθερη ρίζα. Επιπλέον το ένζυμο αυτό συμμετέχει στην παραγωγή διοξειδίου του αζώτου (NO_2) και χλωραμινών ^[36] (Εικόνα 6). Τα παραπάνω προϊόντα μπορούν να οξειδώσουν τις LDL χωρίς την παρουσία μεταλλικών ιόντων ^[22,37] και τα προϊόντα της οξειδωσης μπορεί να είναι ειδικά της βλάβης της μυελοϋπεροξειδάσης ^[16,38]. Επειδή η τυροσίνη ανευρίσκεται στο πλάσμα, ο παραπάνω μηχανισμός μπορεί να συμβαίνει *in vivo*. Η ομάδα στο σωματίδιο των LDL που δρα ως υπόστρωμα οξειδωσης από το υποχλωριώδες οξύ είναι η ε- NH_2 ομάδα των λυσινών της ΑροΒ100. Ένα άλλο υπόστρωμα μπορεί να είναι η χοληστερόλη, αφού το υποχλωριώδες οξύ μπορεί να χλωριώσει εκτός από τα ακόρεστα λιπαρά οξέα και τη χοληστερόλη ^[23]. Καθώς η μυελοϋπεροξειδάση είναι ο μοναδικός μέχρι τώρα γνωστός παράγοντας στον άνθρωπο για παραγωγή υποχλωριώδους οξέος, η ανεύρεση χλωριωμένων λιπαρών οξέων και πρωτεϊνών στην αθηρωματική πλάκα ^[39] είναι ισχυρό στοιχείο για τη δράση της μυελοϋπεροξειδάσης *in vivo* ^[6]. Το ένζυμο έχει εντοπισθεί στα ενδοθηλιακά κύτταρα ^[40] και σε αθηρωματικές πλάκες τόσο μαζί με μακροφάγα όσο και σε περιοχές με λίμνες λίπους ^[41] και έχει συσχετισθεί με την εμφάνιση οξέων στεφανιαίων επεισοδίων, καθώς φαίνεται ότι συσχετίζεται με ασταθείς πλάκες με αυξημένη πιθανότητα ρήξης ^[37]. Ταυτόχρονα, το υποχλωριώδες οξύ προκαλεί μείωση της βιοδιαθεσιμότητας του NO από τα ενδοθηλιακά κύτταρα οδηγώντας σε δυσλειτουργία του ενδοθηλίου, η οποία αποτελεί βασικό στοιχείο για την ανάπτυξη της αθηρωματικής πλάκας ^[42].

Μονοξειδίο του αζώτου (NO)

Το NO που παράγεται από τα ενδοθηλιακά κύτταρα είναι μια σχετικά σταθερή ρίζα, η οποία όχι μόνο αποτυγχάνει να οξειδώσει τις LDL σε κανονικό pH, αλλά φαίνεται ότι αναστέλλει την οξειδωση των LDL τόσο διαμέσου της εξαρτώμενης από μεταλλικά ιόντα ^[43], όσο και διαμέσου της κυτταρο-εξαρτώμενης οδού ^[6]. Μπορεί όμως να συμμετέχει στην οξειδωση διαμέσου διαφόρων μηχανισμών. Έτσι μπορεί να αντιδράσει με το υπεροξειδίο του υδρογόνου δημιουργώντας υπεροξυνιτρικό ανιόν ($ONOO^-$) με δράση ανάλογη της ελεύθερης ρίζας του υδροξυλίου. Επίσης διάμεσα παράγωγα του NO μπορεί να επιταχύνουν την οξειδωση των LDL σε όξινο περιβάλλον. Τέλος το $ONOO^-$ μπορεί να μετατρέψει την τυροσίνη διαφόρων

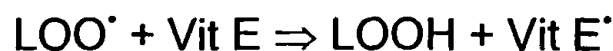
πρωτεϊνών σε νιτροτυροσίνη, η οποία έχει ανιχνευθεί ανοσοιστοχημικά στις αθηρωματικές πλάκες^[44].

Αντίθετα, άλλες μελέτες έδειξαν ότι το NO μπορεί να αναστείλει την οξειδωση των LDL απουσία κυττάρων, διαμέσου αναστολής της οδού οξειδωσης που βασίζεται στα ελεύθερα μεταλλικά ιόντα^[43]. Επίσης φαίνεται ότι προστατεύει τις LDL από την οξειδωση σε κυτταρικές καλλιέργειες, γεγονός που υποδηλώνει ότι πιθανά αναστέλλει και τον ανεξάρτητο των μεταλλικών ιόντων μηχανισμό οξειδωσης των LDL^[6] (Εικόνα 6). Το NO μπορεί να μειώνει την οξειδωση διαμέσου αδρανοποίησης ενζύμων τα οποία περιέχουν αίμη, ή αδρανοποίησης του υπεροξειδίου του υδρογόνου. Επιπλέον, το NO αντιδρά με ελεύθερες ρίζες λιπαρών οξέων και νιτρικά ένζυμα που συμμετέχουν στην οξειδωση. Έτσι μπορεί να εξηγηθεί ο πιθανός αντιοξειδωτικός ρόλος του NO σε πειραματόζωα^[23]. Η παρουσία NO σε περιβάλλον πλούσιο σε οξειδωτικά, προκαλεί μείωση της μετανάστευσης των μακροφάγων και της οξειδωσης των λιπιδίων στο αρτηριακό τοίχωμα (αντιαθηρογόνος ρόλος)^[6]. Αντίθετα, όταν μειωθεί η αντιοξειδωτική δραστηριότητα του περιβάλλοντος ή παρατηρηθεί υπερπαραγωγή οξειδωτικών ουσιών, τότε η παρουσία NO οδηγεί σε δευτερογενή παραγωγή ελευθέρων ριζών με αποτέλεσμα την ευόδωση της οξειδωσης των λιπιδίων και της εξέλιξης της αθηρωματικής πλάκας (αθηρογόνος ρόλος)^[45]. Επιπρόσθετα, η παρουσία oxLDL επάγει την παραγωγή ρίζας υπεροξειδίου (O₂⁻) μέσω της παραγωγής NO από την eNOS^[46].

2.3. ΣΤΑΔΙΑ ΟΞΕΙΔΩΣΗΣ LDL

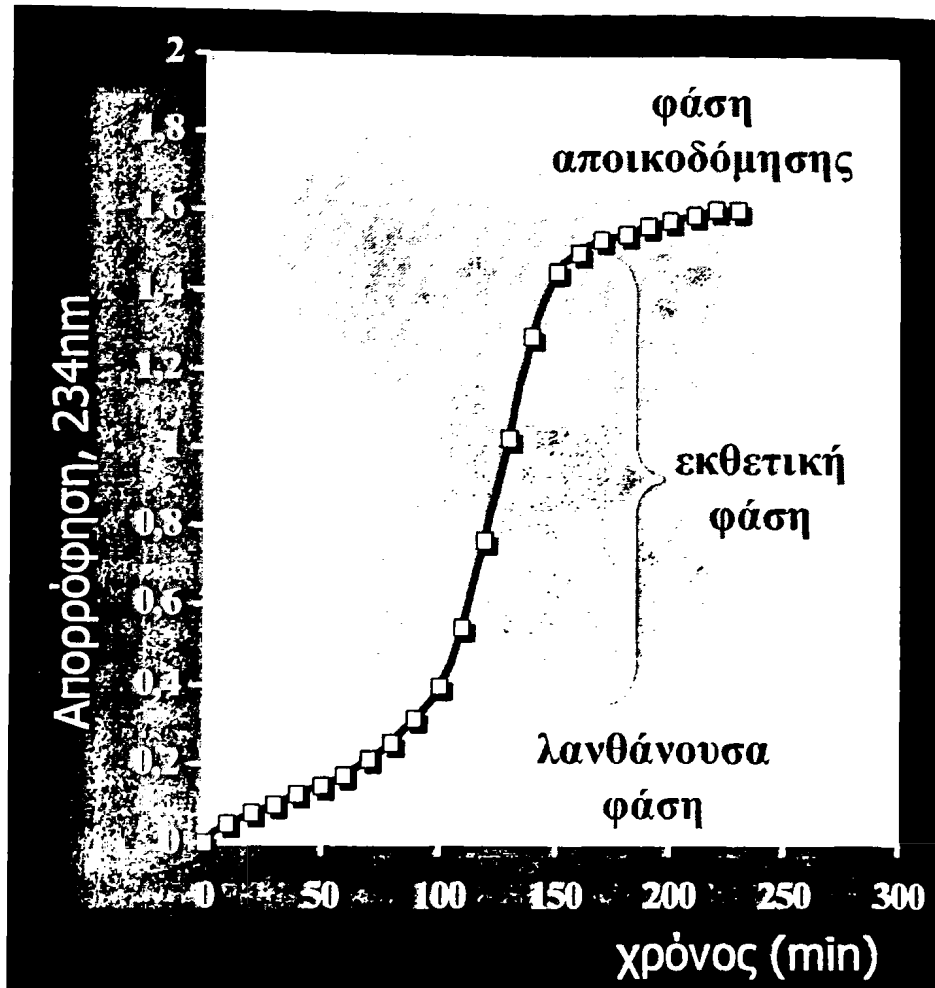
Καθώς οι LDL είναι σωματίδια αποτελούμενα από πλήθος μορίων κατά τη διάρκεια της οξειδωσής τους παρατηρούνται τρεις φάσεις: η λανθάνουσα φάση, η εκθετική ή παραγωγική φάση και η φάση αποικοδόμησης (Εικόνα 7)^[47].

Στη λανθάνουσα φάση συμβαίνει κατανάλωση των ενδογενών αντιοξειδωτικών των LDL. Αρχικά καταναλώνεται η α-τοκοφερόλη και ακολουθούν τα υπόλοιπα αντιοξειδωτικά, με τελευταίο το β-καροτένιο. Κατά τη λανθάνουσα φάση παράγεται ένας πολύ μικρός αριθμός υπεροξειδίων. Η μικρή ποσότητα αυτών οφείλεται στη δράση της βιταμίνης E, η οποία αντιδρά με τις ρίζες των σχηματιζόμενων λιποϋπεροξειδίων:



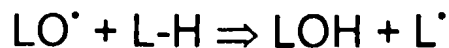
Μετά την κατανάλωση των αντιοξειδωτικών των LDL αρχίζει η υπεροξειδωση των λιπαρών οξέων και η οξειδωση των LDL οδηγείται στην εκθετική (παραγωγική) φάση.





Εικόνα 7. Καμπύλη οξειδωσης μορίου LDL

Οι ρίζες που έχουν σχηματισθεί από τη λανθάνουσα φάση, διαμέσου σειράς αλυσιδωτών αντιδράσεων, σχηματίζουν νέες ελεύθερες ρίζες λιποϋπεροξειδίων ^[47]:



Το σημείο στο οποίο η παραγωγή των συζυγών διενίων είναι μέγιστη σημαίνει το τέλος της παραγωγικής φάσης και την αρχή της φάσης αποικοδόμησης. Στη φάση αυτή τα λιποϋπεροξειδία μετατρέπονται σε αλδεΐδες, όπως η μηλονική διαλδεΐδη (MDA) και η 4-υδροξυνοενάλη (4-HNE). Αυτές με τη σειρά τους θα αντιδράσουν με τις ε-NH₂ λυσινών της apo B-100 ^[47].



2.4. ΒΙΟΧΗΜΙΚΑ ΧΑΡΑΚΗΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΗΣ oxLDL IN VIVO

Η οξειδωμένη LDL (oxLDL), που έχει απομονωθεί από τον ορό ασθενών με στεφανιαία νόσο, εμφανίζει 1,3 φορές υψηλότερη ηλεκτροφορητική κινητικότητα σε πήκτωμα αγαρόζης σε σύγκριση με τις φυσικές LDL των ίδιων ασθενών. Επιπρόσθετα, η oxLDL εμφανίζει σημαντικά μειωμένα επίπεδα αραχιδονικού και λινολεϊκού οξέος, κατά 75% και 80% αντίστοιχα. Στα σωματίδια της oxLDL το ποσοστό υποκατάστασης των υπολειμμάτων λυσινών από αλδεϋδες ήταν περίπου 30-40% του αντίστοιχου ποσοστού που παρατηρήθηκε όταν οι LDL οξειδώθηκαν *in vitro*. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει ότι 60-90 υπολείμματα λυσινών της ApoB-100 αντικαταστάθηκαν από αλδεϋδες. Τα παραπάνω αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι η οξείδωση των LDL *in vivo* οφείλεται κύρια στη δραστηριότητα ορισμένων ενζύμων, όπως η μυελοϋπεροξειδάση και η λιποξυγονάση στα κύτταρα του αγγειακού τοιχώματος, παρά σε επαγόμενη από μεταλλικά ιόντα οξείδωση.^[48,49]



Εικόνα 8. παρουσία oxLDL σε αθηρωματικές πλάκες ^[50]

Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι η oxLDL είναι μια ετερογενής ομάδα που περιλαμβάνει διαφορετικά σωματίδια LDL ως προς τη σύστασή τους, το καθένα από τα οποία έχει οξειδωθεί σε διαφορετικό βαθμό ^[22]. Έτσι, εκτός από την πλήρως οξειδωμένη LDL (oxLDL), η οξείδωση των λιπαρών οξέων μπορεί να οδηγήσει στη δημιουργία ελάχιστα τροποποιημένης LDL (MM-LDL). Στην πράξη MM-LDL είναι ένα σωματίδιο LDL στο οποίο η οξείδωση των λιπιδίων είναι σε αρχική φάση και η ApoB-100 είναι άθικτη. Το αντίθετο συμβαίνει με την πλήρως oxLDL, στην οποία η οξείδωση των λιπιδίων είναι πλήρης και επιπρόσθετα έχει οδηγήσει στην τροποποίηση της ApoB-100 ^[22]. Στην MM-LDL έχουν καταναλωθεί όλα τα αντιοξειδωτικά της LDL, ενώ η οξείδωση των φωσfolιπιδίων αφορά κυρίως αυτά που περιέχουν αραχιδονικό οξύ και πολύ λιγότερο αυτά που περιέχουν λινολεϊκό

^[51]. Η MM-LDL και η πλήρως οxLDL διαφέρουν και ως προς τις βιολογικές τους δράσεις. Η MM-LDL προκαλεί την έκφραση κυτοκινών που ευοδώνουν τη φλεγμονή και τη θρόμβωση, όπως η MCP-1 και η Ρ-σελεκτίνη ^[51]. Επίσης έχει βρεθεί ότι προκαλεί και μετανάστευση ΛΜΚ στον έσω χιτώνα της αορτής ^[51], αλλά δεν προκαλεί συσσώρευση λιπιδίων στα κύτταρα του αρτηριακού τοιχώματος, καθώς συνδέεται με τον Β/Ε υποδοχέα των LDL, αλλά όχι με τους υποδοχείς εκκαθαριστές των μακροφάγων ^[51], σε αντίθεση με την οxLDL που οδηγεί στη δημιουργία αφρωδών κυττάρων ^[22].

2.5. Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΟΞΕΙΔΩΜΕΝΗΣ LDL ΣΤΗΝ ΑΘΗΡΩΜΑΤΩΣΗ

Αυξημένα επίπεδα οxLDL έχουν αναγνωρισθεί στον ορό ατόμων με αυξημένο κίνδυνο για οξύ στεφανιαίο σύνδρομο ^[52], καθώς και ασθενών με αγγειογραφικά τεκμηριωμένη στεφανιαία νόσο ^[53,54]. Τα αυξημένα αυτά επίπεδα μπορούν να διαχωρίσουν τους ασθενείς με OEM τόσο από αυτούς με σταθερή όσο και από αυτούς με ασταθή στηθάγχη ^[50,54]. Σε διάφορες μελέτες με τη βοήθεια της ανοσοϊστοχημείας αναγνωρίστηκε η ύπαρξη της οxLDL σε ανθρώπινες αθηρωματικές πλάκες ^[50] (Εικόνα 8). Ο ρόλος της οξειδωμένης LDL στην αθηρωμάτωση αναλύεται διεξοδικότερα στο κεφάλαιο της Αθηρωμάτωσης.



ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3^ο

ΦΩΣΦΟΛΙΠΙΔΙΑ ΚΑΙ Η ΑΚΕΤΥΛΟΥΔΡΟΛΑΣΗ ΤΟΥ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗΣ ΤΩΝ ΑΙΜΟΠΕΤΑΛΙΩΝ (PAF-AH)

3.1. Ο ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗΣ ΤΩΝ ΑΙΜΟΠΕΤΑΛΙΩΝ (PAF)

Ο παράγοντας ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων (1-*O*-alkyl-2-acetyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine, PAF) είναι το πρώτο φωσφολιπίδιο που περιγράφηκε. Ο PAF είναι ένα αιθερικό φωσφολιπίδιο της χολίνης με μία οξική ομάδα στην *sn*-2 θέση ^[55]. Εκκρίνεται από τα βασεόφιλα, τα αιμοπετάλια, τα ουδετερόφιλα, τα ηωσινόφιλα, τα μονοκύτταρα, τα μακροφάγα και τα ενδοθηλιακά κύτταρα, όταν αυτά διεγείρονται από διάφορους αγωνιστές (χημειοτακτικά πεπτίδια, ζυμοσάνη, θρομβίνη, ιονοφόρα Ca²⁺, αντιγόνα, ATP, κολλαγόνο, κ.τ.λ.), ενώ δεν προϋπάρχει σε αυτά τα κύτταρα σε φυσιολογικές συνθήκες. Επίσης εκκρίνεται και από κύτταρα διαφόρων ιστών και οργάνων, όπως είναι οι πνεύμονες, το ήπαρ, οι νεφροί και ο εγκέφαλος.

Ο PAF συντίθεται μέσω δύο διαφορετικών οδών, την οδό της ανασύνθεσης και της «εκ νέου» (*de novo*) σύνθεσης. Η σύνθεση του PAF μέσω της οδού της ανασύνθεσης πραγματοποιείται ως απάντηση ενός κυττάρου σε φλεγμονώδες ερέθισμα. Η σύνθεσή του μέσω αυτής της πορείας ξεκινά με την ενεργοποίηση μιας φωσφολιπάσης A₂, η οποία υδρολύει την 1-*O*-αλκυλ-2-αραχιδονοϋλ-*sn*-γλυκερο-3-φωσφοχολίνη σε 1-*O*-αλκυλ-*sn*-γλυκερο-3-φωσφοχολίνη (lyso-PAF). Το δεύτερο βήμα στη σύνθεση του PAF πραγματοποιείται με τη δράση της ακετυλο-συνένζυμο A:lyso-PAF ακετυλοτρανσφεράσης. Η *de novo* πορεία βιοσύνθεσης του PAF καταλύεται από μία CDP-φωσφοχολινοτρανσφεράση. Το αρχικό υπόστρωμα 1-*O*-αλκυλο-2-λυσιο-*sn*-γλυκερο-3-φωσφορικό οξύ ακετυλιώνεται στην *sn*-2 θέση με τη δράση της ακετυλοCoA-ακετυλοτρανσφεράσης με την παρουσία ακετυλοCoA. Στη συνέχεια με τη δράση της φωσφοϋδρολάσης του 1-*O*-αλκυλο-2-ακετυλο-*sn*-γλυκερο-3-φωσφορικού οξέος απομακρύνεται η φωσφορική ομάδα από την *sn*-3 θέση του γλυκερινικού σκελετού. Η βιοσύνθεση του PAF ολοκληρώνεται με τη δράση της CDP-φωσφοχολινοτρανσφεράσης, η οποία μεταφέρει την ομάδα της φωσφοχολίνης από τη CDP-χολίνη στην 1-*O*-αλκυλο-2-ακετυλο-*sn*-γλυκερόλη ^[56,57].

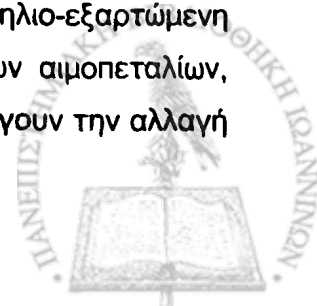
Ο PAF είναι ένα φωσφολιπίδιο που ευοδώνει τη φλεγμονή, το οποίο δεσμεύεται σε ειδικό υποδοχέα που αναγνωρίζει την αιθερική ομάδα στην *sn*-1 θέση και την οξική ομάδα στην *sn*-2 θέση, προκαλώντας τη διέγερση του κυττάρου-στόχου. Τέτοια κύτταρα-στόχοι είναι τα ενδοθηλιακά κύτταρα, τα μακροφάγα, τα μονοκύτταρα, τα ουδετερόφιλα, τα ηωσινόφιλα και τα αιμοπετάλια. Στα περισσότερα από αυτά τα κύτταρα ο PAF δρα σε πολύ χαμηλές

συγκεντρώσεις (10^{-10} - 10^{-12} M). Ο PAF που παράγεται από τα μονοκύτταρα και τα πολυμορφοπύρρηνα λευκοκύτταρα απελευθερώνεται στην κυκλοφορία, ενώ αυτός που παράγεται από αγγειακά ενδοθηλιακά κύτταρα τα οποία ενεργοποιούνται από διάφορους φυσιολογικούς αγωνιστές, όπως είναι η θρομβίνη, η βραδυκινίνη, η ισταμίνη, το H_2O_2 , και τα λευκοτριένια C_3 και C_4 , εκφράζεται στην κυτταρική επιφάνεια και δεν απελευθερώνεται. Αντίθετα, δρα ως σηματοδοτικό μόριο που πυροδοτεί την πρόσδεση των ουδετερόφιλων στα ενδοθηλιακά κύτταρα. Ο PAF εμπλέκεται σε διάφορες φυσιολογικές λειτουργίες, αποτελεί όμως και διαμεσολαβητή διαφόρων παθοφυσιολογικών αντιδράσεων, όπως είναι η φλεγμονή και οι αλλεργικές αντιδράσεις. Προκαλεί συσσώρευση αιμοπεταλίων, ενδοτοξικό σοκ, ενεργοποίηση ουδετερόφιλων μέσω του υποδοχέα του PAF και έχει αντιυπερτασική δράση. Επίσης συμμετέχει στην παθοφυσιολογία διαφόρων νοσημάτων, όπως η καρδιαγγειακή νόσος, το άσθμα και η καρκινογένεση, ενώ συμμετέχει στον μηχανισμό της απόπτωσης^[58-64]. Η ταχεία αποικοδόμησή του από ενδοκυττάριας ή εξωκυττάριας PAF-ακετυλοϋδρολάσες αποτελεί αντιρροπιστικό μηχανισμό των επιπέδων του PAF.

3.2. ΟΞΕΙΔΩΜΕΝΑ ΦΩΣΦΟΛΙΠΙΔΙΑ

Είναι γνωστό ότι διάφορα οξειδωμένα φωσφολιπίδια έχουν έντονη βιοδραστικότητα σε σημεία λιπιδών γραμμώσεων, επάγοντας την έκφραση γονιδίων και πρωτεϊνών. Τέτοια φωσφολιπίδια αποτελούν συστατικά της ελάχιστα οξειδωμένης LDL (MM-LDL). Οι Leitinger και οι συν.^[65] κατάφεραν να χαρακτηρίσουν τρία φωσφολιπίδια: την οξειδωμένη 1-παλμιτούλο-2-αραχιδονοϋλο-3- φωσφατιδυλοχολίνη (oxPAFC), την 1- παλμιτούλο-2(5-οξοβαλεορυλο)- sn- γλυκερο- φωσφορυλοχολίνη (POVPC) και την 1-παλμιτούλο-2- γλουταρυλ-3- sn- γλυκερο-3- φωσφορυλοχολίνη (PGPC), που είναι παρόντα στην MM-LDL και τα οποία εμφανίζουν πλήθος βιολογικών δράσεων^[66]. Όλα τα οξοβαλεορυλο- φωσφολιπίδια που έχουν μελετηθεί επάγουν την πρόσδεση των μονοκυττάρων στα ενδοθηλιακά κύτταρα, ενώ τα γλουταροϋλο- φωσφολιπίδια επάγουν τόσο την πρόσδεση των μονοκυττάρων όσο και των ουδετερόφιλων. Τα γλουταροϋλο- φωσφολιπίδια, αλλά όχι τα οξοβαλεορυλο- φωσφολιπίδια, προκαλούν την έκφραση της E-σελεκτίνης και του αγγειακού κυτταρικού μορίου προσκόλλησης 1 (vascular cell adhesion molecule-1, VCAM-1). Επιπρόσθετα, όλα τα οξοβαλεορυλο- φωσφολιπίδια, αλλά όχι τα γλουταροϋλο- φωσφολιπίδια, επάγουν την προσκόλληση των μονοκυττάρων χωρίς να αυξάνουν τα επίπεδα του VCAM-1.

Όλα τα αλκυλο- αλλά και τα ακυλο- οξειδωμένα φωσφολιπίδια έχουν απομονωθεί από ανθρώπινες αθηρωματικές πλάκες και φαίνεται ότι αναστέλλουν την ενδοθηλιο-εξαρτώμενη αγγειοδιαστολή^[67]. Τα αλκυλο- φωσφολιπίδια επάγουν τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων, διαμέσου του υποδοχέα του PAF, ενώ τα ακυλο- φωσφολιπίδια (POVPC) επάγουν την αλλαγή του σχήματος των αιμοπεταλίων κατά την ενεργοποίησή τους^[65,67].



Η ox-PAPC επάγει το χημειοτακτισμό των μονοκυττάρων διαμέσου των ενδοθηλιακών κυττάρων, την προσκόλληση των μονοκυττάρων στα ενδοθηλιακά κύτταρα και αναστέλλει την έκφραση της P-σελεκτίνης και της χοριακής σωματοτροπίνης-1 (CS-1). Επίσης βρέθηκε ότι αναστέλλει την πρόσληψη της oxLDL από τα μακροφάγα και αναγνωρίζεται από μονοκλωνικά αντισώματα.

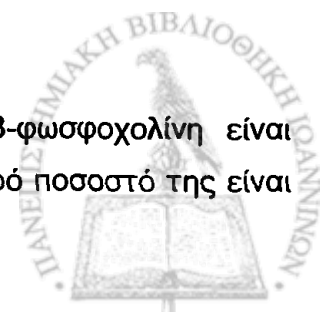
Η POVPC προκαλεί τις ίδιες μεταβολές που προκαλεί και η oxPAPC και επίσης επάγει τον πολλαπλασιασμό των λείων μυϊκών κυττάρων. Σε συγκέντρωση παρόμοια με αυτή όπου είναι παρούσα στην MM-LDL, η POVPC αναστέλλει την επαγόμενη από την PGPC προσκόλληση των ουδετερόφιλων. Επιπρόσθετα, από τα ενδοθηλιακά κύτταρα, που εκτίθενται σε oxPAPC, POVPC ή PGPC, επάγεται η έκφραση της χημειοτακτικής πρωτεΐνης των μονοκυττάρων 1 (monocyte chemoattractant protein-1, MCP-1) και ιντερλευκίνης 8 (IL-8)^[68] με μηχανισμό ο οποίος φαίνεται να περιλαμβάνει τη δράση των ενεργοποιημένων από τον πολλαπλασιασμό των υπεροξυσωματίων υποδοχέα α (peroxisome proliferator-activated receptor- α , PPAR- α)^[69,70]. Οι Watson και συν.^[71] κατάφεραν να χαρακτηρίσουν ένα ακόμη φωσφολιπίδιο που απαντά στην MM-LDL, την 1-παλμιτοϋλ-2-(5,6)-εποξυϊσοπροστανο E₂-sn-γλυκερο-3-φωσφοχολίνη (PEIPC)^[71], η οποία έχει παρόμοιες δράσεις με την oxPAPC και POVPC.

Οι κυτταρικοί υποδοχείς, διαμέσου των οποίων επάγεται η φλεγμονώδης δράση των οξειδωμένων ακυλο-φωσφολιπιδίων δεν είναι ακριβώς γνωστοί. Υπάρχουν ενδείξεις ότι οι δράσεις ορισμένων από αυτά τα oxPL προάγονται είτε διαμέσου των υποδοχέων της πρωτεΐνης G^[72], είτε διαμέσου της επίδρασής τους στην ακεραιότητα της κυτταρικής μεμβράνης, με αποτέλεσμα την επακόλουθη ενεργοποίηση ενδοκυττάρων μηχανισμών. Τέλος, οι δράσεις των oxPL προάγονται και διαμέσου μετανάστευσης στο εσωτερικό των κυττάρων και σύνδεσής τους με ενδοκυττάρους υποδοχείς^[65].

Άλλα βιοδραστικά φωσφολιπίδια που απαντούν στην oxLDL είναι η οξειδωμένη φωσφατιδυλοχολίνη (oxPC), η λυσοφωσφατιδυλοχολίνη (lyso-PC) και η 1-παλμιτοϋλο-2-κετονοϋλο-sn-γλυκερο-3-φωσφορυλοχολίνη (PONPC), της οποίας η κύρια δράση φαίνεται ότι είναι η τροποποίηση διαφόρων πεπτιδίων και πρωτεϊνών^[73-76]. Πιστεύεται ότι τα οξειδωμένα φωσφολιπίδια παράγονται και συσσωρεύονται τοπικά σε περιοχές φλεγμονής^[65]. Αν και έχει αναφερθεί η παρουσία τους στο πλάσμα^[77,78], φαίνεται ότι εκεί η βιολογική τους δράση περιορίζεται σχεδόν ολοκληρωτικά από την παρουσία ενζύμων, όπως η PAF-AH, η παραοξονάση και η φωσφολιπάση A₂ του ορού^[79].

3.3. ΛΥΣΟ-ΦΩΣΦΑΤΙΔΥΛΟΧΟΛΙΝΗ (LYSO-PC)

Η λυσο-φωσφατιδυλοχολίνη (lyso-PC), 1- ακυλο-sn- γλυκερο-3-φωσφοχολίνη είναι παρούσα στο πλάσμα σε σχετικά υψηλά επίπεδα (140- 150 μ M). Ένα μικρό ποσοστό της είναι



συνδεδεμένο με τις LDL. Κατά την οξειδωση των LDL το ποσοστό της lyso-PC αυξάνεται σημαντικά από 1-5% σε 40-50% του περιεχομένου της φωσφατιδυλοχολίνης^[80]. Αν και η oxPC φαίνεται να είναι υπεύθυνη για κάποιες από τις κυτταρικές δράσεις που επάγονται από την oxLDL, η lyso-PC φαίνεται να συνεισφέρει στη δραστηριότητα της oxLDL. Η αύξηση της συγκέντρωσης της lyso-PC είναι το αποτέλεσμα δύο διαδοχικών αντιδράσεων, της οξειδωσης και του κατακερματισμού των λιπαρών αλυσίδων στην *sn*-2 θέση της φωσφατιδυλοχολίνης, η οποία ακολουθείται από την υδρόλυση της οξειδωμένης φωσφατιδυλοχολίνης από την ενδογενή ακετυλοϋδρολάση του παράγοντα ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων της LDL^[74].

Ένας μεγάλος αριθμός από δράσεις της oxLDL έχουν αποδοθεί στη lyso-PC. Αυτές περιλαμβάνουν την έκφραση παραγόντων ανάπτυξης από ενδοθηλιακά κύτταρα και μονοκύτταρα, το χημειοτακτισμό των μονοκυττάρων και T-λεμφοκυττάρων, την καταστολή της ενδοθήλιο-εξαρτώμενης αγγειοδιαστολής, την έκφραση του VCAM-1, του ICAM-1 και VEGF και την ενίσχυση της ενεργοποίησης των T-λεμφοκυττάρων διαμέσου της πρωτεϊνοκινάσης C^[80]. Η lyso-PC απαντά επίσης σε αθηρωματικές βλάβες^[81]. Παρά τις μελέτες που περιγράφουν τις βιολογικές της δράσεις, ο ρόλος της lyso-PC στην ανάπτυξη της αθηροσκλήρωσης είναι διφορούμενος. Είναι πιθανό τα αντισώματα κατά της lyso-PC της oxLDL να σχηματίζουν ανοσοσυμπλέγματα τα οποία προκαλούν την πρόσληψη της oxLDL από τα μακροφάγα στο αρτηριακό τοίχωμα και το σχηματισμό αφρωδών κυττάρων^[82].

Λαμβάνοντας υπόψη τα παραπάνω θα μπορούσε να ειπωθεί ότι η lyso-PC, που παράγεται κατά τη διάρκεια της οξειδωσης των LDL ή ενζυμικά από τη δράση μιας PLA₂, μπορεί να ενεργοποιεί τα B-λεμφοκύτταρα, ώστε να παράγουν αντισώματα^[80]. Έτσι, προάγει χρόνιες φλεγμονώδεις αντιδράσεις οι οποίες συμμετέχουν στην αθηρογένεση και σε άλλες ανοσολογικές διαταραχές^[83-85].

3.4. PAF-LIKE ΦΩΣΦΟΛΙΠΙΔΙΑ

Η οξειδωση ενός μορίου φωσφατιδυλοχολίνης οδηγεί στο σχηματισμό ενός μεγάλου αριθμού φωσφατιδυλοχολινών με κατακερματισμένη τη λιπαρή αλυσίδα στην *sn*-2 θέση. Η οξειδωση τόσο της λιπαρής αλυσίδας στην *sn*-1 θέση όσο και αυτής στην *sn*-2 θέση οδηγεί στο σχηματισμό ενός πολύπλοκου μίγματος οξειδωτικά τροποποιημένων φωσφατιδυλοχολινών. Η οξειδωση φωσφατιδυλοχολινών, οι οποίες φέρουν αιθερικό δεσμό στην *sn*-1 θέση (πρόδρομο μόριο στη βιοσύνθεση του PAF), οδηγεί στο σχηματισμό φωσφατιδυλοχολινών με τα εξής χαρακτηριστικά: έναν αιθερικό δεσμό στην *sn*-1 θέση, μια μικρού μήκους ανθρακική αλυσίδα στην *sn*-2 θέση και μια λειτουργική ομάδα φωσφοχολίνης στην *sn*-3 θέση. Τα χαρακτηριστικά αυτά αναγνωρίζονται από τον υποδοχέα του PAF, με αποτέλεσμα πολλά από αυτά τα οξειδωτικά κατακερματισμένα φωσφολιπίδια να δρουν ως προσδέτες και ενεργοποιητές του υποδοχέα του PAF^[55,74]. Τα PAF-like φωσφολιπίδια, όμοια με τον PAF, προκαλούν τη

συσσώρευση των αιμοπεταλίων και την ενεργοποίηση των λευκοκυττάρων. Διεγείρουν επίσης παροδικά τους διαύλους των ιόντων Ca^{2+} και την έκκριση της ιντερφερόνης- γ (INT- γ) από τα μονοκύτταρα ^[65]. Οι Silva και συν.^[86] έδειξαν σε πειραματόζωα ότι οξειδωμένα PAF-like φωσφολιπίδια, τα οποία απομονώθηκαν από την oxLDL και ενέθηκαν στην υπεζοκωτική κοιλότητα ποντικών, προκάλεσαν την εξαγγείωση ουδετεροφίλων και ηωσινοφίλων - δράση που μπορούσε να ανασταλλεί από αναστολείς του υποδοχέα του PAF. Κυτοκίνες που μεσολαβούν στην παραπάνω διαδικασία είναι η RANTES (regulated upon activation: normal T cell expressed/secreted), η MIP (macrophage inflammatory protein) τύπου 1 α , 1 β και 2 και η IP-10 (interferon- α -inducible chemokine) ^[86]. Επιπρόσθετα είναι κυτταροτοξικά και προκαλούν τη λύση των κυττάρων ^[87]. Συνοπτικά οι βιολογικές δράσεις των οξειδωμένων φωσφολιπιδίων φαίνονται στον *πίνακα 1*.

Πίνακας 1. Βιοδραστικά οξειδωμένα φωσφολιπίδια

Οξειδωμένα φωσφολιπίδια	Βιολογικές δράσεις
oxPAPC	Επάγει την πρόσδεση των ενδοθηλιακών κυττάρων στα μονοκύτταρα, προκαλεί χημειοτακτισμό στα μονοκύτταρα, αναστέλλει την έκφραση της P-σελεκτίνης και του CS-1, παρεμποδίζει την πρόσληψη της oxLDL από τα μακροφάγα
POVPC	Επάγει την πρόσδεση των ενδοθηλιακών κυττάρων στα μονοκύτταρα, προκαλεί χημειοτακτισμό στα μονοκύτταρα, αναστέλλει την έκφραση της P-σελεκτίνης, επάγει την έκφραση της CS-1, παρεμποδίζει την πρόσληψη της oxLDL από τα μακροφάγα και επάγει τον πολλαπλασιασμό των λείων μυϊκών κυττάρων
PONPC	Αναγνωρίζεται από μονοκλωνικά αντισώματα, τροποποιεί πεπτίδια και πρωτεΐνες
PGPC	Επάγει την πρόσδεση των ενδοθηλιακών κυττάρων στα μονοκύτταρα, προκαλεί χημειοτακτισμό στα μονοκύτταρα, επάγει την έκφραση της P-σελεκτίνης και την πρόσδεση των ουδετερόφιλων
PEIPC	Επάγει την πρόσδεση των ενδοθηλιακών κυττάρων στα μονοκύτταρα, προκαλεί χημειοτακτισμό στα μονοκύτταρα, παρεμποδίζει την πρόσδεση των μονοκυττάρων από WEB 2086
PAF-like φωσφολιπίδια	Προκαλούν συσσώρευση αιμοπεταλίων, ενεργοποίηση των λευκοκυττάρων και μονοκυττάρων, έκκριση της ιντερφερόνης γ από ανθρώπινα μονοκύτταρα, είναι κυτταροτοξικά, επάγουν τη λύση των κυττάρων
Lyso-PC	Προκαλεί χημειοτακτισμό στα μονοκύτταρα και T-λεμφοκύτταρα, καταστέλλει την ενδοθήλιο-εξαρτώμενη αγγειοδιαστολή, επάγει την έκφραση του VCAM-1, ICAM-1 και VEGF, απαντά σε αθηρωματικές βλάβες, ενισχύει την ενεργοποίηση των T-λεμφοκυττάρων διαμέσου της πρωτεϊνικής κίνησης C



3.5. Η ΑΚΕΤΥΛΟΥΔΡΟΛΑΣΗ ΤΟΥ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗΣ ΤΩΝ ΑΙΜΟΠΕΤΑΛΙΩΝ (PAF-AH)

3.5.1. ΓΕΝΙΚΑ

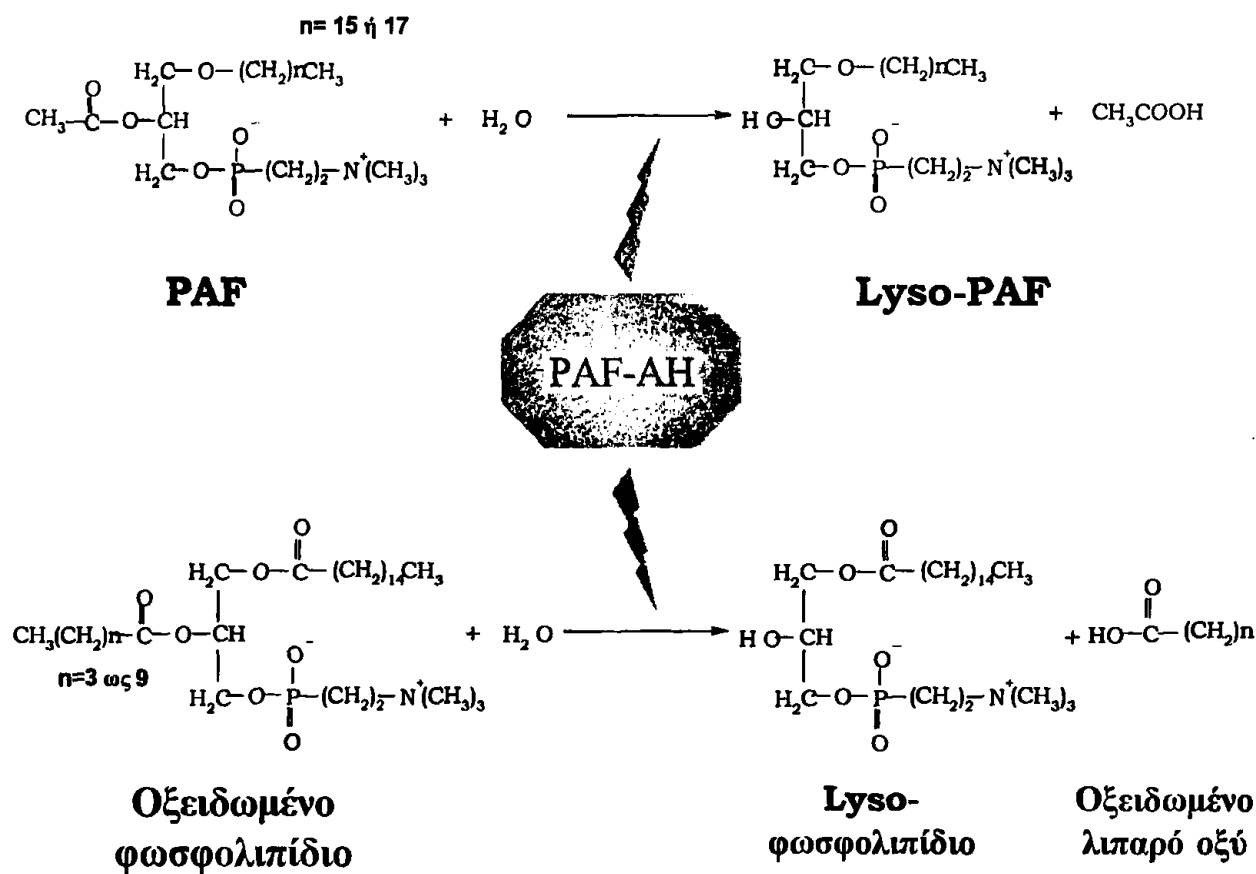
Ο όρος PAF-ακετυλοϋδρολάση (PAF-AH) περιγράφει μια οικογένεια ενζύμων τα οποία έχουν την ικανότητα να αποικοδομούν τόσο τον PAF (παράγοντα ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων, platelet-activating factor), όσο και διάφορα οξειδωμένα φωσφολιπίδια (*Εικόνα 9*), υδρολύοντας ακετυλομάδες βραχείας αλύσου (Cn<6) στη θέση sn-2 του υποστρώματος ανεξάρτητα από την παρουσία ασβεστίου (Ca²⁺)^[88-95]. Το ένζυμο αυτό υδρολύει επίσης τα φωσφολιπίδια τα οποία περιέχουν οξειδωτικά κατακερματισμένα λιπαρά οξέα στην sn-2 θέση^[96-99] (*Εικόνα 9*). Το ένζυμο αυτό δεν υδρολύει φωσφολιπίδια με μεγάλες λιπαρές αλυσίδες. Έχει βρεθεί ότι η ενεργότητα του ενζύμου μειώνεται με την αύξηση του αριθμού ατόμων άνθρακα της ακυλομάδας. Χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι η περίπτωση που η ακυλομάδα στην sn-2 θέση αποτελείται από 5 άτομα άνθρακα και το ένζυμο διατηρεί το 50% της ενεργότητάς του^[90,92,100,101]. Αυτή η μεγάλη εξειδίκευση υποστρώματος είναι απαραίτητη ώστε να αποφεύγεται η συνεχής υδρόλυση των φωσφολιπιδίων των λιποπρωτεϊνών και των κυτταρικών μεμβρανών^[94]. Η οικογένεια αυτή περιλαμβάνει διάφορα ενδοκυττάρια ισοένζυμα^[102], όπως η ενδοκυττάρια ισομορφή II (PAF-AH II)^[103] και η ετεροτριμερής ισομορφή της PAF-AH του εγκεφάλου^[104], καθώς και την PAF-ακετυλοϋδρολάση του πλάσματος (pPAF-AH)^[105,106]. Εκτός από τη δράση της ως φωσφολιπάση A₂, η PAF-AH έχει ακόμη δράσεις εστεράσης, φωσφολιπάσης A₁ και τρανσακετυλάσης^[107].

3.5.2. ΔΟΜΗ ΤΗΣ ΕΚΚΡΙΝΟΜΕΝΗΣ ΜΟΡΦΗΣ ΤΗΣ PAF-AH (PAF-AH ΤΟΥ ΠΛΑΣΜΑΤΟΣ)

Η PAF-ακετυλοϋδρολάση του πλάσματος (pPAF-AH, EC 3.1.1.47) περιγράφηκε για πρώτη φορά το 1980^[108], αλλά η δομή του ενζύμου (*Εικόνα 10*) προσδιορίστηκε για πρώτη φορά το 1995, οπότε και έγινε δυνατή η κλωνοποίησή του^[109].

Το cDNA της PAF-AH κωδικοποιεί μία πρωτεΐνη μεγέθους 441 αμινοξέων και μοριακού βάρους 45.4 Kda. Τα 17 πρώτα αμινοξέα (Met1 μέχρι Ala17) είναι υδρόφοβα και είναι αυτά που καθορίζουν την έκκριση της πρωτεΐνης^[110]. Το ενεργό κέντρο του ενζύμου αποτελείται από τρία αμινοξέα που συνδέονται μεταξύ τους με δεσμούς υδρογόνου: την Ser-273, το Asp-296 και την His-351^[110]. Η πρωτοταγής δομή της PAF-AH του πλάσματος είναι μοναδική και περιλαμβάνει μόνο μια μικρή περιοχή ομολογίας GX SXG (Gly-Xaa-Ser-Xaa-Gly) που απαντά στις σερινοεστεράσες και τις λιπάσες^[111]. Μελέτες μεταλλαξογένεσης πλευρικού σημείου έδειξαν ότι η Ser-273 της αλληλουχίας GX SXG καθώς επίσης και τα αμινοξέα, His-351 και Asp-296 είναι απαραίτητα για την καταλυτική δράση του ενζύμου^[110]. Το αμινοτελικό άκρο

ποικίλλει λόγω περιορισμένης πρωτεόλυσης. Η δομή του μακρομορίου της PAF-AH συμπληρώνεται με την παρουσία N-γλυκοζυλιώσεων^[112,113], δηλαδή υδατανθρακικών αλυσίδων που συνδέονται με τις ασπαραγίνες της πολυπεπτιδικής αλυσίδας^[114]. Η παρουσία των υδατανθρακικών αλυσίδων δεν είναι απαραίτητη για την έκκριση του ενζύμου από τα μακροφάγα, δεν επηρεάζει την ευαισθησία του στις πρωτεάσες και δεν μεταβάλλει την ενζυμική ενεργότητα. Αντίθετα, μελέτες έδειξαν ότι η γλυκοζυλίωση διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη σύνδεση του ενζύμου με τα λιποπρωτεϊνικά σωματίδια, αφού αναστέλλει τη σύνδεσή του με τις HDL και ευνοεί τη σύνδεσή του με τις λιποπρωτεΐνες που περιέχουν ApoB^[106,115].



Εικόνα 9. Υδρόλυση του PAF και οξειδωμένων φωσφολιπιδίων από την PAF-AH

Οι Min και συν.^[116] πρότειναν έναν υποθετικό μηχανισμό δράσης της PAF-AH σύμφωνα με τον οποίο το ένζυμο προσεγγίζει το υπόστρωμά του από την υδατική φάση. Κατά συνέπεια μόνο υποστρώματα τα οποία βρίσκονται στην υδατική φάση μπορούν να προσδεθούν στην καταλυτική περιοχή. Ο μηχανισμός αυτός εξηγεί την εξειδίκευση του ενζύμου για φωσφολιπίδια (οξειδωμένα ή μη οξειδωμένα) με μικρή ανθρακική αλυσίδα στην sn-2 θέση, τα οποία εμφανίζουν μεγαλύτερη διαλυτότητα^[116]. Η δράση του ενζύμου αναστέλλεται από την παρουσία αναστολέων των σερινοεστερασών, όπως είναι το διισοπροπυλοφθοροφωσφορικό οξύ (DFP) και το φαινυλο-μεθυλο-σουλφονυλο-φθορίδιο (Pefabloc).



Εικόνα 10. Υποθετικό μοντέλο της τριτοταγούς δομής της PAF-AH του πλάσματος

3.5.3. ΓΟΝΙΔΙΟ ΤΗΣ PAF-AH ΚΑΙ ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΙΣ

Το γονίδιο της PAF-AH βρίσκεται στο χρωμόσωμα 6p12-21.1 και είναι οργανωμένο σε 12 εξόνια^[80,110,117]. Στον Ιαπωνικό πληθυσμό έχει περιγραφεί μια σημειακή μετάλλαξη του γονιδίου της PAF-AH του πλάσματος, η οποία κληρονομείται με τον αυτοσωμικό υπολειπόμενο χαρακτήρα και οδηγεί, στην ομόζυγη της μορφή, σε πλήρη εξάλειψη της ενζυμικής ενεργότητας του πλάσματος^[118]. Η μετάλλαξη αυτή συνίσταται σε αντικατάσταση μιας γουανίνης από θυμίνη (G→T) στη θέση 994 του ένατου εξονίου, η οποία στο επίπεδο της πρωτεΐνης μεταφράζεται σε αντικατάσταση μίας βαλίνης από φαινυλαλανίνη στη θέση 279 του ώριμου ενζύμου (Val²⁷⁹→Phe)^[80]. Αν και αρχικά θεωρήθηκε ότι η μετάλλαξη αυτή απαντάται αποκλειστικά στον Ιαπωνικό πληθυσμό (στο 27% των Ιαπώνων στην ετερόζυγη μορφή και στο 4% στην ομόζυγη μορφή), πρόσφατες μελέτες έδειξαν την ύπαρξη αυτής της μετάλλαξης και σε άλλους πληθυσμούς της κεντρικής Ασίας^[119]. Ένας άλλος πολυμορφισμός του γονιδίου της PAF-AH που έχει παρατηρηθεί στους Ιάπωνες και προκαλεί πλήρη εξάλειψη της ενζυμικής ενεργότητας του πλάσματος (Gln²⁸¹→Arg) συνίσταται σε αντικατάσταση μίας αδενίνης από γουανίνη (A→G) στη θέση 1001^[120]. Μεγάλη επιδημιολογική μελέτη σε 4152 Ιάπωνες δεν έδειξε συσχέτιση της συγκεκριμένης μετάλλαξης και της πιθανότητας εμφάνισης στεφανιαίας νόσου^[121]. Τέλος, στη λευκή φυλή έχουν περιγραφεί δύο άλλοι πολυμορφισμοί του γονιδίου της PAF-AH (Ile¹⁹⁸→Thr, εξόνιο 7, θέση 593, T→C και Ala³⁷⁹→Val, εξόνιο 11, θέση 1136, T→C), οι οποίοι ενδεχόμενα

επηρεάζουν τη λειτουργικότητα του ενζύμου του πλάσματος, καθώς και ένας πολυμορφισμός (Arg⁹²→His, εξόνιο 4, θέση 275, G→A) με άγνωστη μέχρι σήμερα λειτουργική σημασία ^[122-124].

3.5.4. ΣΥΝΔΕΣΗ ΜΕ ΤΙΣ ΛΙΠΟΠΡΩΤΕΪΝΕΣ ΤΟΥ ΠΛΑΣΜΑΤΟΣ

Η PAF-AH του πλάσματος είναι ένα υδρόφοβο μόριο το οποίο κυκλοφορεί συνδεδεμένο με τα λιποπρωτεϊνικά σωματίδια ^[93] και για αυτό το λόγο είναι γνωστή στη βιβλιογραφία και ως «συσχετιζόμενη με λιποπρωτεΐνες φωσφολιπάση A2» (lipoprotein-associated phospholipase A2, Lp-PLA2). Ενζυμική ενεργότητα που υδρολύει τον PAF έχει βρεθεί σε όλες τις λιποπρωτεΐνες που περιέχουν την απολιποπρωτεΐνη B100 (VLDL, IDL και LDL), καθώς και στις λιποπρωτεΐνες υψηλής πυκνότητας (HDL) ^[125]. Η PAF-AH συνδέεται στο πλάσμα κυρίως με τις LDL (και μάλιστα περισσότερο με τις μικρές πυκνές αθηρογόνες LDL) και λιγότερο (<20%) με τις HDL (και μάλιστα με το υποκλάσμα εκείνο των HDL που ανήκει στις VHDL-1 και επίσης περιέχει ApoE) ^[126]. Μεταλλάξεις πλευρικού σημείου έδειξαν ότι δύο περιοχές της PAF-AH του πλάσματος, οι Trp-115-Leu-116 και Tyr-205, είναι σημαντικές για τη σύνδεση του ενζύμου με την LDL. Το λιποπρωτεϊνικό σωματίδιο συνδέεται με την PAF-AH διαμέσου του καρβοξυτελικού άκρου της ApoB-100 ^[127]. Ειδικότερα, μια περιοχή 160 αμινοξέων που εκτείνεται μεταξύ των αμινοξέων 4119 και 4279 διαδραματίζει ρόλο κλειδί στη σύνδεση του ενζύμου με την LDL ^[55]. Πρόσφατα περιγράφηκε ότι η PAF-AH των LDL συνδέεται κυρίως με τις ηλεκτροαρνητικά φορτισμένες LDL, οι οποίες ευοδώνουν τη φλεγμονή στα ενδοθηλιακά κύτταρα ^[128]. Μια άλλη λιποπρωτεΐνη η οποία επίσης έχει υψηλά επίπεδα ενεργότητας της PAF-AH είναι η λιποπρωτεΐνη Lp(a) ^[129]. Ωστόσο, η ενεργότητα της Lp(a) μπορεί να συμβάλει σημαντικά στη διαμόρφωση της συνολικής ενεργότητας της PAF-AH του πλάσματος μόνο όταν τα επίπεδα αυτής της λιποπρωτεΐνης είναι σημαντικά αυξημένα ^[130].

3.5.4. ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΠΗΓΗ ΠΡΟΕΛΕΥΣΗΣ ΚΑΙ ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΩΝ ΕΠΙΠΕΔΩΝ ΤΗΣ PAF-AH ΤΟΥ ΠΛΑΣΜΑΤΟΣ

Το ένζυμο του πλάσματος προέρχεται κυρίως από τα κύτταρα του αιμοποιητικού συστήματος (κύτταρα της μυελοειδούς σειράς) και μάλιστα από το σύστημα των μονοκυττάρων-μακροφάγων (Εικόνα 11) ^[131]. Μελέτες έδειξαν ότι μακροφάγα προερχόμενα από περιφερικά μονοκύτταρα, καθώς επίσης και κύτταρα HL-60 ^[132,133] σε καλλιέργεια συνθέτουν και εκκρίνουν μεγάλες ποσότητες PAF-AH, η οποία εμφανίζει χαρακτηριστικά παρόμοια με αυτά της PAF-AH του πλάσματος. Αντίθετα, πρόδρομα μονοκύτταρα δεν παράγουν PAF-AH ^[134-136]. Επιπρόσθετα, πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι τα ηπατοκύτταρα παράγουν σημαντικές ποσότητες PAF-AH μετά από κατάλληλο ερεθισμό, αλλά το μεγαλύτερο μέρος αυτής της ενζυμικής ενεργότητας

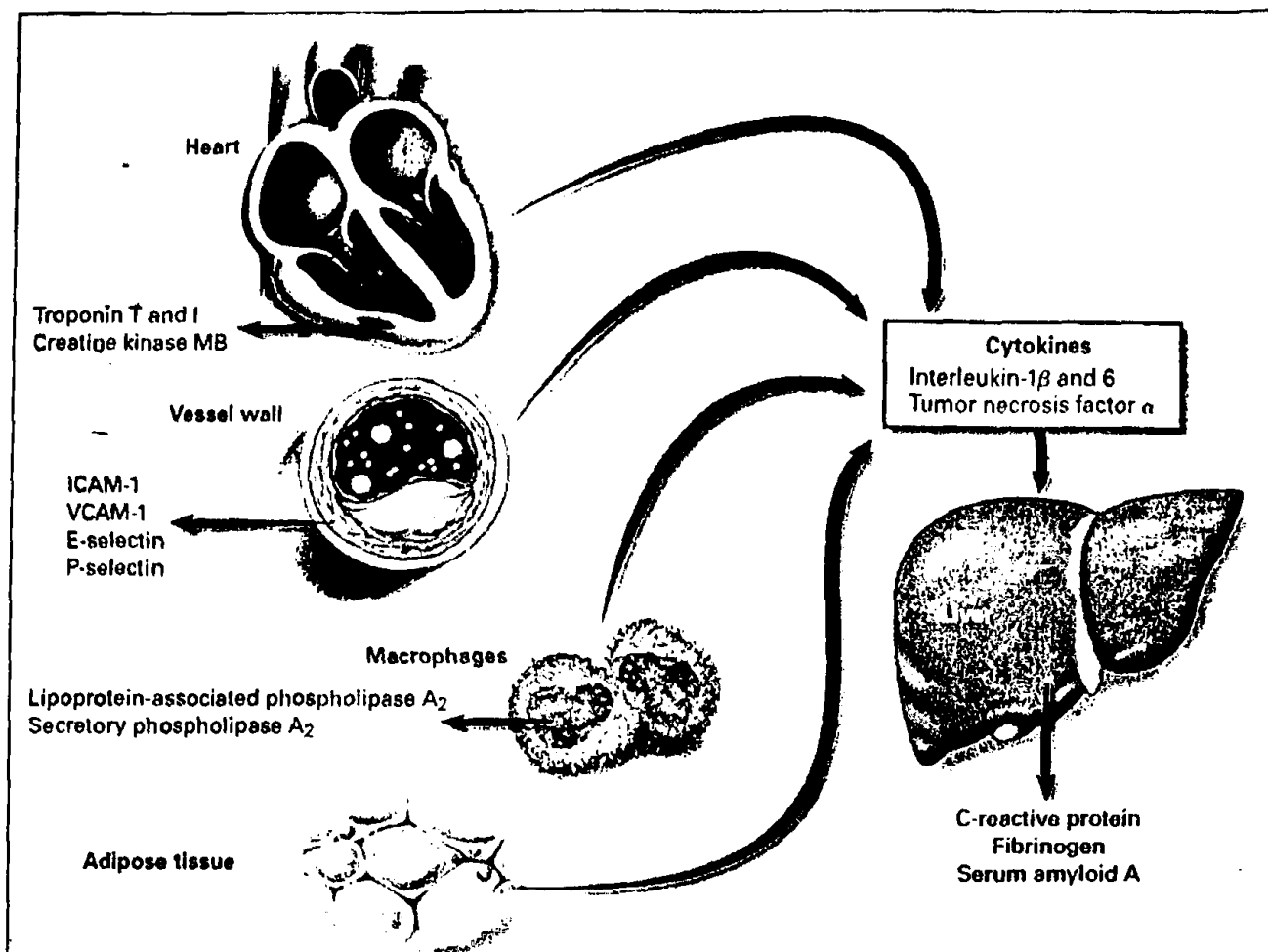
εκκρίνεται στη χολή και όχι στο πλάσμα. Αντίθετα, κύτταρα ηπατώματος HepG2 *in vitro* ^[137,138] και τα κύτταρα Kupffer του ήπατος (τα οποία ανήκουν στο σύστημα μονοκυττάρων-μακροφάγων) μετά από ερεθισμό με ενδοτοξίνη εκκρίνουν μεγάλο ποσοστό του ενζύμου στο πλάσμα ^[139].

Δεδομένου ότι τα αιμοποιητικά κύτταρα δεν παράγουν λιποπρωτεΐνες, είναι προφανές ότι η PAF-AH παράγεται ανεξάρτητα από τα λιποπρωτεϊνικά σωματίδια και ενσωματώνεται σε αυτά σε κάποια φάση του μεταβολισμού τους ^[94]. Μελέτες σε ασθενείς με συγγενείς διαταραχές του μεταβολισμού των λιπιδίων έδειξαν ότι η παρουσία των λιποπρωτεϊνών δεν είναι απαραίτητη προϋπόθεση για την παραγωγή του ενζύμου. Έτσι, τόσο οι ασθενείς με αβηταλιποπρωτεϊναιμία, όσο και οι ασθενείς με νόσο Tangier (οι οποίοι παρουσιάζουν σχεδόν πλήρη έλλειψη των λιποπρωτεϊνών που περιέχουν απολιποπρωτεΐνη Β και των HDL αντίστοιχα) έχουν φυσιολογική ενεργότητα της PAF-AH στο πλάσμα ^[140,141]. Παρόλα αυτά, η παραγωγή και η έκκριση του ενζύμου από τα μακροφάγα αυξάνεται όταν αυτά επωασθούν παρουσία ανθρώπινου ορού ^[142]. Αν και το ακριβές στοιχείο του ορού που διεγείρει την παραγωγή του ενζύμου δεν είναι γνωστό, πιθανολογείται ότι πρόκειται για τα λιποπρωτεϊνικά σωματίδια ^[143]. Η άποψη αυτή υποστηρίζεται από το γεγονός ότι ο ορός που προέρχεται από ασθενείς με δυσλιπιδαιμία προκαλεί σημαντικά μεγαλύτερη αύξηση της παραγωγής του ενζύμου σε σύγκριση με ορό από νορμολιπιδαιμικά άτομα ^[144].

Αν και η επίδραση των λιπιδίων στην παραγωγή της PAF-AH του πλάσματος δεν έχει καθορισθεί με σαφήνεια φαίνεται ότι ο μεταβολισμός των λιποπρωτεϊνών συμβάλλει σημαντικά στη διαμόρφωση της ενεργότητας του πλάσματος, αφού επηρεάζει τον καταβολισμό του ενζύμου. Πράγματι, μια πρόσφατη μελέτη έδειξε ότι ο ρυθμός καταβολισμού των λιποπρωτεϊνών που περιέχουν απολιποπρωτεΐνη Β είναι ο σημαντικότερος ρυθμιστικός παράγοντας της ενεργότητας της PAF-AH του πλάσματος ^[145]. Έτσι, οι ασθενείς με διαταραχές του μεταβολισμού των λιπιδίων που χαρακτηρίζονται από μείωση της κάθαρσης των LDL (οικογενής υπερχοληστερολαιμία) εμφανίζουν σημαντικά υψηλότερη ενεργότητα της PAF-AH στο πλάσμα σε σύγκριση με υγιείς μάρτυρες ^[146]. Πραγματικά, στις περισσότερες μελέτες η ενεργότητα του ενζύμου στο πλάσμα εμφάνισε θετική συσχέτιση με τα επίπεδα της ολικής και LDL χοληστερόλης, καθώς και με τις συγκεντρώσεις της απολιποπρωτεΐνης Β ^[147].

Άλλοι παράγοντες που επηρεάζουν τα επίπεδα της PAF-AH του πλάσματος είναι: α) ο βαθμός διαφοροποίησης των κυττάρων του συστήματος μονοκυττάρων-μακροφάγων ^[148], β) ορμονικοί παράγοντες ^[149,150] (η προγεστερόνη και η δεξαμεθαζόνη προκαλούν σημαντική αύξηση της παραγωγής του ενζύμου από τα μακροφάγα του φθαρτού, ενώ αντίθετα τα οιστρογόνα και η βιταμίνη D προκαλούν μείωση της παραγωγής του ενζύμου), γεγονός που ενδεχόμενα διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην κύηση και στην έναρξη του τοκετού ^[151], γ) οι κυτταροκίνες που ευοδώνουν τη φλεγμονή ^[135,152-155], δ) η ηλικία και το φύλο και ε) η κληρονομικότητα ^[145].





Εικόνα 11. Πηγές παραγωγής κυτταροκινών, δεικτών φλεγμονής και της PAF-AH (lipoprotein-associated phospholipase A₂)

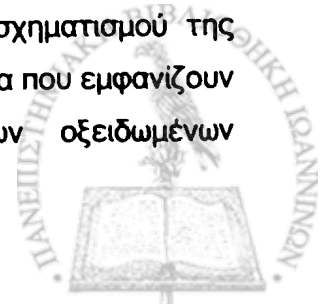
Οι περισσότερες κυτταροκίνες [ιντερφερόνη γ (IFN-γ), παράγοντας νέκρωσης των όγκων (TNF-α) και οι ιντερλευκίνες 1, 6 και 8 (IL-1, IL-6 και IL-8)] προκαλούν ισχυρή αναστολή της παραγωγής και της έκκρισης της PAF-AH του πλάσματος ^[135]. Ο μόνος διαβιβαστής της φλεγμονής που προκαλεί αύξηση της σύνθεσης του ενζύμου σε κυτταροκαλλιέργειες μακροφάγων και ηπατοκυττάρων είναι ο ίδιος ο PAF ^[137]. Έτσι, ασθενείς με υψηλά επίπεδα κυτταροκινών, όπως ασθενείς με ρευματοειδή αρθρίτιδα ^[156], εμφανίζουν σημαντικά χαμηλότερη ενεργότητα της PAF-AH του πλάσματος σε σύγκριση με τους υγιείς μάρτυρες. Η ενεργότητα της PAF-AH του πλάσματος αυξάνεται προοδευτικά με την πάροδο της ηλικίας και οι άνδρες εμφανίζουν σημαντικά υψηλότερη ενεργότητα του ενζύμου σε σύγκριση με τις γυναίκες της ίδιας ηλικιακής ομάδας έως την ηλικία των 50 περίπου ετών, οπότε και η ενεργότητα του ενζύμου εξομοιώνεται ανάμεσα στα δύο φύλα ^[157].

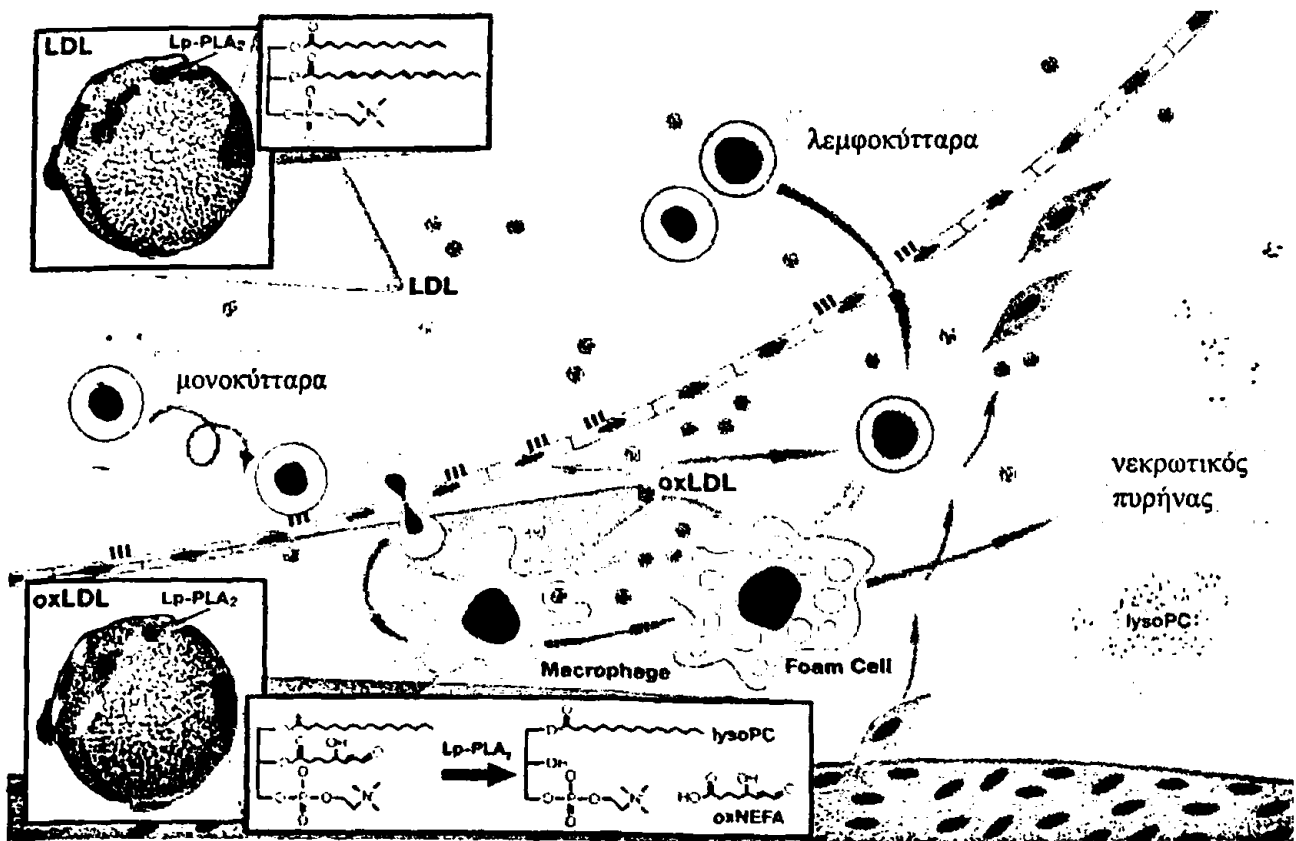
3.5.5. PAF-AH ΚΑΙ ΑΘΗΡΟΓΕΝΕΣΗ

Η PAF-AH διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην αθηρογένεση και στην εμφάνιση καρδιαγγειακής νόσου λόγω της δράσης της στο μεταβολισμό βιοδραστικών φωσφολιπιδίων, όπως είναι ο PAF και τα οξειδωμένα φωσφολιπίδια ^[158]. Οι Tew και οι συν ^[114] πρότειναν ότι η PAF-AH εμφανίζει δύο αντίθετες δράσεις. Από τη μια μεριά αποικοδομεί τον PAF και κατά συνέπεια διαδραματίζει αντιφλεγμονώδη δράση. Ο PAF που παράγεται από τα ενδοθηλιακά κύτταρα ως απάντηση στο οξειδωτικό στρες ή από τη δράση διάφορων φυσιολογικών αγωνιστών, όπως η θρομβίνη, η βραδυκίνη, η ισταμίνη και τα λευκοτριένια C₄ και D₄, ενεργοποιεί την παραγωγή ανιόντων υπεροξειδίου από τα μακροφάγα ^[59,159]. Αυτή η ενεργοποίηση των ανιόντων υπεροξειδίου, έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της οξειδωτικής τροποποίησης των LDL και την ενίσχυση της παθογόνου διαδικασίας.

Έτσι, η PAF-AH, αφού ρυθμίζει τη συγκέντρωση του PAF αλλά και των οξειδωμένων φωσφολιπιδίων, έχει την ικανότητα να καθυστερεί ή να εμποδίζει την οξειδωτική τροποποίηση των LDL, η οποία με τη σειρά της διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη της αθηρωμάτωσης ^[96,160]. Μελέτες στις οποίες είχε απενεργοποιηθεί η ενδογενής PAF-AH της LDL με DFP, πριν το λιποπρωτεϊνικό σωματίδιο υποβληθεί σε οξείδωση, έδειξαν ότι η οξειδωτική τροποποίηση πραγματοποιήθηκε ανεξάρτητα από την παρουσία ή όχι του ενζύμου. Σε περαιτέρω μελέτες βρέθηκε ότι η προσθήκη PAF-AH στο μίγμα της οξείδωσης ανέστειλε την οξείδωση των LDL. Αξιοσημείωτο είναι όμως το γεγονός ότι η ενεργότητα της PAF-AH της LDL σταδιακά μειώνεται κατά την οξείδωση της τελευταίας με αποτέλεσμα να χάνεται έτσι η προστατευτική δράση του ενζύμου. Εκτός όμως από τις LDL το ένζυμο βρίσκεται συνδεδεμένο και στις HDL. Όταν κατά την οξείδωση των LDL είναι παρούσες και οι HDL, τα οξειδωμένα φωσφολιπίδια μεταφέρονται από τις LDL στις HDL και υδρόλύονται από την PAF-AH των τελευταίων. Επιπρόσθετα, οι HDL μπορεί να αποτελούν πηγή αναπλήρωσης του ενζύμου στην oxLDL, η οποία όπως προαναφέρθηκε χάνει την ενεργότητα της PAF-AH κατά την διάρκεια της οξείδωσης ^[99,161,162]. Με αυτό τον τρόπο η PAF-AH δρα ως ένα αντιαθηρογόνο ένζυμο.

Άλλες μελέτες υποστηρίζουν ότι η PAF-AH μπορεί να είναι ένα ένζυμο που προάγει τη φλεγμονή και τη θρόμβωση ^[80]. Το συγκεκριμένο ένζυμο είναι υπεύθυνο για την παραγωγή της lyso-PC και των δράσεων της oxLDL στα μονοκύτταρα, καθώς και για την υδρόλυση των οξειδωμένων φωσφολιπιδίων της LDL. Έτσι θα μπορούσε να ειπωθεί ότι η PAF-AH ασκεί φλεγμονώδη ρόλο ^[114]. Η υποψία αυτή υποστηρίζεται από την παρατήρηση ότι κατά τη διάρκεια της υδρόλυσης της οξειδωμένης φωσφατιδυλοχολίνης (oxPC), η PAF-AH παράγει τη lyso-PC ^[96], ένα φωσφολιπίδιο το οποίο συμμετέχει σε πολλές φάσεις σχηματισμού της αθηρωματικής πλάκας ^[163]. Παράλληλα με τη lyso-PC, οξειδωμένα λιπαρά οξέα που εμφανίζουν αθηρογόνες ιδιότητες, απελευθερώνονται κατά την υδρόλυση των οξειδωμένων φωσφολιπιδίων από αυτό το ένζυμο ^[164] (Εικόνα 12).





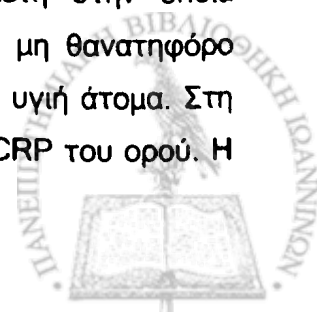
Εικόνα 12. Ο πιθανός αθηρογόνος ρόλος της PAF-AH (Lp-PLA₂) (τροποποιημένο από [80])

Πρώτοι οι Ostermann και συν.^[165] το 1987 ανέφεραν αυξημένη ενεργότητα της PAF-AH του πλάσματος σε ασθενείς με περιφερική αγγειακή νόσο και σε ασθενείς που είχαν υποστεί έμφραγμα του μυοκαρδίου. Επιπρόσθετα τα επίπεδα της PAF-AH είναι χαμηλότερα σε προεμμηνοπαυσιακές γυναίκες σε σύγκριση με αντίστοιχης ηλικίας άνδρες^[80], καθώς επίσης και σε ασθενείς με πρωτοπαθή υπέρταση και σακχαρώδη διαβήτη^[166,167]. Είναι πιθανό η ενεργότητα της PAF-AH να είναι αυξημένη σε ασθενείς με αθηρωμάτωση ως μία αντισταθμιστική απόκριση για την αποικοδόμηση των PAF-like οξειδωμένων φωσφολιπιδίων που παράγονται σε φλεγμονώδεις περιοχές, καθώς επίσης και για την παρεμπόδιση της τροποποίησης της LDL^[59,165]. Τέλος πρέπει να αναφερθεί ότι η χορήγηση φαρμάκων τα οποία είναι γνωστό ότι μειώνουν τον καρδιαγγειακό κίνδυνο, όπως οι στατίνες, σχετίζεται με μείωση των επιπέδων του ενζύμου^[168,169].

Στα πλαίσια διαφόρων τυχαιοποιημένων ελεγχόμενων μελετών (RCT) εξετάστηκε η συσχέτιση της PAF-AH του πλάσματος με την εμφάνιση καρδιαγγειακών νοσημάτων (στεφανιαία νόσος, έμφραγμα του μυοκαρδίου, ισχαιμικά αγγειακά εγκεφαλικά επεισόδια, Πίνακας 2).



- WHS: στα πλαίσια της μελέτης WHS έγινε μία υπομελέτη στην οποία συμμετείχαν 123 γυναίκες που κατά τη διάρκεια της μελέτης νόσησαν από μη θανατηφόρο έμφραγμα του μυοκαρδίου ή πέθαναν από ισχαιμία του μυοκαρδίου ή αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο και 123 υγιή άτομα. Στη μελέτη μετρήθηκαν η μάζα της PAF-AH του πλάσματος και τα επίπεδα της CRP του ορού. Η μελέτη έδειξε ότι η μάζα της PAF-AH του πλάσματος στους ασθενείς ήταν μεγαλύτερη από τη μάζα της PAF-AH του πλάσματος στην ομάδα ελέγχου, όπως επίσης μεγαλύτερη ήταν στις γυναίκες που δεν υποβάλλονταν σε θεραπεία ορμονικής υποκατάστασης. Όμως στην πολυπαραγοντική ανάλυση, είτε σε όλο τον πληθυσμό της μελέτης είτε στα άτομα που βρίσκονταν σε αγωγή με ορμονική υποκατάσταση, μόνο τα επίπεδα της CRP του ορού και όχι η μάζα της PAF-AH του πλάσματος αποτελούσαν ανεξάρτητα παράγοντα κινδύνου για την εμφάνιση καρδιαγγειακών συμβαμάτων ή αγγειακών εγκεφαλικών επεισοδίων ^[170].
- WOSCOPS: στα πλαίσια της μελέτης WOSCOPS έγινε μία υπομελέτη στην οποία συμμετείχαν 580 άνδρες που κατά τη διάρκεια της μελέτης νόσησαν από μη θανατηφόρο έμφραγμα του μυοκαρδίου ή είχαν πεθάνει από ισχαιμία του μυοκαρδίου, ή είχαν υποβληθεί σε επέμβαση επαναγγείωσης και 1160 υγιή άτομα. Στη μελέτη μετρήθηκε η μάζα της PAF-AH του πλάσματος. Η μελέτη έδειξε ότι η μάζα της PAF-AH του πλάσματος αποτελούσε ισχυρό προγνωστικό παράγοντα για την εμφάνιση καρδιαγγειακής νόσου όταν συμπεριλήφθηκαν στην πολυπαραγοντική ανάλυση οι κλασσικοί παράγοντες κινδύνου (ηλικία, αρτηριακή πίεση, λιπιδαιμικό προφίλ). Ειδικότερα, για κάθε αύξηση της μάζας της PAF-AH του πλάσματος κατά μία σταθερή απόκλιση (SD) αυξήθηκε ο κίνδυνος για κάποιο καρδιακό σύμβαμα κατά 18% ^[171].
- ARIC: στα πλαίσια της μελέτης ARIC έγινε μία υπομελέτη στην οποία συμμετείχαν 608 ασθενείς που νόσησαν κατά τη διάρκεια της μελέτης από στεφανιαία νόσο και 740 υγιή άτομα. Το 42% των ασθενών με στεφανιαία νόσο είχε εμφανίσει μη θανατηφόρο έμφραγμα του μυοκαρδίου, το 39% είχε υποστεί επέμβαση επαναγγείωσης και το 10% είχε πεθάνει από καρδιακά αίτια. Στη μελέτη μετρήθηκε η μάζα της PAF-AH του πλάσματος. Η μελέτη έδειξε ότι η μάζα της PAF-AH του πλάσματος και τα επίπεδα της CRP αποτελούσαν ισχυρούς προγνωστικούς παράγοντες για την εμφάνιση καρδιαγγειακής νόσου. Όταν όμως και οι κλασσικοί παράγοντες κινδύνου (ηλικία, φύλο, αρτηριακή πίεση, λιπιδαιμικό προφίλ, κάπνισμα, διαβήτης) συμπεριλήφθηκαν στην πολυπαραγοντική ανάλυση, τότε μόνο η μάζα της PAF-AH του πλάσματος συσχετιζόταν με την αύξηση του καρδιαγγειακού κινδύνου (διπλάσιος κίνδυνος στα άτομα με τη μεγαλύτερη σε σύγκριση με τα άτομα με τη μικρότερη μάζα της PAF-AH), αλλά μόνο για τους ασθενείς με LDL-C < 130 mg/dL ^[172].
- MONICA: στα πλαίσια της μελέτης MONICA έγινε μία υπομελέτη στην οποία συμμετείχαν 97 άνδρες που κατά τη διάρκεια της μελέτης νόσησαν από μη θανατηφόρο έμφραγμα του μυοκαρδίου ή πέθαναν από ισχαιμία του μυοκαρδίου και 837 υγιή άτομα. Στη μελέτη μετρήθηκε η μάζα της PAF-AH του πλάσματος και τα επίπεδα της CRP του ορού. Η



μελέτη έδειξε ότι η μάζα της PAF-AH του πλάσματος και τα επίπεδα της CRP αποτελούσαν ισχυρούς προγνωστικούς παράγοντες για την εμφάνιση καρδιαγγειακής νόσου όταν συμπεριλήφθηκαν στην πολυπαραγοντική ανάλυση οι άλλοι παράγοντες κινδύνου (ηλικία, συστολική αρτηριακή πίεση, λιπιδαιμικό προφίλ, κάπνισμα, διαβήτης, αλκοόλ, BMI, σωματική άσκηση, CRP). Ειδικότερα, η αύξηση της μάζας της PAF-AH κατά 1 σταθερή απόκλιση (SD) αύξησε κατά 21% τον κίνδυνο εμφάνισης καρδιακού επεισοδίου, ανεξάρτητα από τα επίπεδα της CRP ^[173].

Πίνακας 2. Κλινικές μελέτες και PAF-AH

Μελέτη	Καταληκτικά σημεία	Διάρκεια (χρόνια)	Ασθενείς	Υγιείς	Κίνδυνος ανά 1SD
WOSCOPS	ΣΝ	5	580	1160	1.18
ARIC	ΣΝ	6	608	740	1.15*
WHS	ΣΝ ΑΕΕ		123	123	1.17*
MONICA	ΣΝ	14	97	837	1.21
ROTTERDAM	ΣΝ ΑΕΕ	7 6	308 110	1820	1.20 1.24
CARDIA	Ασβεστώσεις στην αξονική τομογραφία		266	266	1.28
EPIC	ΣΝ	6	1105	2209	1.34 ^{&}
Ludwigshafen	ΣΝ		2454	694	1.25
Brilakis et al	ΣΝ-ΑΕΕ	4	61	405	1.28
ARIC-stroke	ΑΕΕ	6	223	766	2.04 ^{&&}
Khuseynova et al	ΣΝ		312	479	1.84 ^{&}

ΣΝ: στεφανιαία νόσος, ΑΕΕ: αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο

SD: σταθερά απόκλιση

[&]: σύγκριση 1^{ου} - 4^{ου} τεταρτημορίου, ^{&&}: σύγκριση 1^{ου} - 3^{ου} τριτημορίου

*: μη στατιστικά σημαντικό αποτέλεσμα



- ROTTERDAM:** στα πλαίσια της μελέτης ROTTERDAM έγινε μία υπομελέτη στην οποία συμμετείχαν 308 άνδρες και γυναίκες που κατά τη διάρκεια της μελέτης νόσησαν από στεφανιαία νόσο, μη θανατηφόρο έμφραγμα του μυοκαρδίου ή πέθαναν από ισχαιμία του μυοκαρδίου, 110 άνδρες και γυναίκες με ισχαιμικό αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο και 1820 υγιή άτομα. Στη μελέτη μετρήθηκε η ενεργότητα της PAF-AH του πλάσματος. Η μελέτη έδειξε ότι η ενεργότητα της PAF-AH του πλάσματος ήταν ισχυρός προγνωστικός παράγοντας για την εμφάνιση καρδιαγγειακής νόσου και ισχαιμικού αγγειακού εγκεφαλικού επεισοδίου όταν συμπεριλήφθηκαν στην πολυπαραγοντική ανάλυση οι άλλοι παράγοντες κινδύνου (ηλικία, φύλο, συστολική αρτηριακή πίεση, λιπιδαιμικό προφίλ, κάπνισμα, διαβήτης, αλκοόλ, BMI, CRP, υπολιπιδιμικά φάρμακα, αριθμός λευκών αιμοσφαιρίων). Ειδικότερα, η αύξηση της μάζας της PAF-AH κατά 1 σταθερή απόκλιση (SD) αύξησε κατά 20% τον κίνδυνο εμφάνισης καρδιακού επεισοδίου και κατά 24% τον κίνδυνο εμφάνισης ισχαιμικού αγγειακού εγκεφαλικού επεισοδίου [174].
- CARDIA:** στα πλαίσια της μελέτης CARDIA έγινε μία υπομελέτη στην οποία συμμετείχαν 266 άνδρες και γυναίκες που κατά τη διάρκεια της μελέτης εμφάνισαν ασβεστώσεις στα στεφανιαία αγγεία κατά την εξέταση με αξονική τομογραφία και 266 υγιή άτομα. Στη μελέτη μετρήθηκε η μάζα και η ενεργότητα της PAF-AH του πλάσματος. Η μελέτη έδειξε ότι η μάζα της PAF-AH του πλάσματος αποτελούσε ισχυρό προγνωστικό παράγοντα για την εμφάνιση ασβεστώσεων στα στεφανιαία αγγεία όταν συμπεριλήφθηκαν στην πολυπαραγοντική ανάλυση οι άλλοι παράγοντες κινδύνου (ηλικία, φύλο, αρτηριακή πίεση, λιπιδαιμικό προφίλ, κάπνισμα, διαβήτης, αλκοόλ, BMI, περίμετρος μέσης, CRP). Ειδικότερα, η αύξηση της μάζας της PAF-AH (και όχι της ενεργότητας) κατά 1 σταθερή απόκλιση (SD) αύξησε κατά 28% τον κίνδυνο εμφάνισης ασβεστώσεων στα στεφανιαία αγγεία [175].
- EPIC-Norfolk:** στα πλαίσια της μελέτης EPIC-Norfolk έγινε μία υπομελέτη στην οποία συμμετείχαν 1105 άνδρες και γυναίκες που κατά τη διάρκεια της μελέτης νόσησαν από στεφανιαία νόσο, μη θανατηφόρο έμφραγμα του μυοκαρδίου ή πέθαναν από ισχαιμία του μυοκαρδίου και 2209 υγιή άτομα. Στη μελέτη μετρήθηκε η μάζα της PAF-AH του πλάσματος. Η μελέτη έδειξε ότι η μάζα της PAF-AH του πλάσματος αποτελούσε ισχυρό προγνωστικό παράγοντα για την εμφάνιση καρδιαγγειακής νόσου όταν συμπεριλήφθηκαν στην πολυπαραγοντική ανάλυση οι άλλοι παράγοντες κινδύνου (ηλικία, συστολική αρτηριακή πίεση, λιπιδαιμικό προφίλ, κάπνισμα, διαβήτης, BMI, CRP). Ειδικότερα, τα άτομα με τη μεγαλύτερη μάζα της PAF-AH είχαν 34% μεγαλύτερη πιθανότητα να εμφανίσουν κάποιο καρδιακό επεισόδιο σε σύγκριση με τα άτομα με τη μικρότερη μάζα της PAF-AH (σύγκριση 1^{ου} - 4^{ου} τεταρτημορίου) [176].
- The Ludwigshafen risk and cardiovascular health study:** στη μελέτη Ludwigshafen συμμετείχαν 2454 άνδρες και γυναίκες με αγγειογραφικά-διαπιστωμένη στεφανιαία νόσο και



694 υγιή άτομα. Στη μελέτη μετρήθηκε η ενεργότητα της PAF-AH του πλάσματος. Η μελέτη έδειξε ότι η ενεργότητα της PAF-AH του πλάσματος αποτελούσε ισχυρό προγνωστικό παράγοντα για την εμφάνιση καρδιαγγειακής νόσου όταν συμπεριλήφθηκαν στην πολυπαραγοντική ανάλυση οι άλλοι παράγοντες κινδύνου (ηλικία, συστολική αρτηριακή πίεση, λιπιδαιμικό προφίλ, κάπνισμα, διαβήτης, BMI, CRP, αριθμός λευκών αιμοσφαιρίων, υπολιπιδαιμικά φάρμακα, ασπιρίνη, β-αποκλειστές, διγοξίνη). Ειδικότερα, τα άτομα με τη μεγαλύτερη μάζα της PAF-AH είχαν 85% μεγαλύτερη πιθανότητα να εμφανίσουν κάποιο καρδιακό επεισόδιο σε σύγκριση με τα άτομα με τη μικρότερη μάζα της PAF-AH (σύγκριση 1^{ου} - 4^{ου} τεταρτημορίου) ^[177].

- Brilakis et al: στη μελέτη αυτή συμμετείχαν 61 άνδρες και γυναίκες με αγγειογραφικά διαπιστωμένη στεφανιαία νόσο και 405 υγιή άτομα. Στη μελέτη μετρήθηκε η μάζα της PAF-AH του πλάσματος. Η μελέτη έδειξε ότι η μάζα της PAF-AH του πλάσματος αποτελούσε ισχυρό προγνωστικό παράγοντα για την εμφάνιση καρδιαγγειακής νόσου όταν συμπεριλήφθηκαν στην πολυπαραγοντική ανάλυση οι άλλοι παράγοντες κινδύνου (ηλικία, φύλο, αρτηριακή πίεση, λιπιδαιμικό προφίλ, κάπνισμα, διαβήτης, BMI, CRP). Ειδικότερα, η αύξηση της μάζας της PAF-AH κατά 1 σταθερή απόκλιση (SD) αύξησε κατά 28% τον κίνδυνο εμφάνισης καρδιαγγειακών επεισοδίων ^[178].

- ARIC-stroke: στη μελέτη αυτή συμμετείχαν 223 ασθενείς με ισχαιμικό αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο και 766 υγιή άτομα. Η μελέτη έδειξε ότι η μάζα της PAF-AH του πλάσματος αποτελούσε ισχυρό προγνωστικό παράγοντα για την εμφάνιση ισχαιμικού αγγειακού εγκεφαλικού επεισοδίου όταν συμπεριλήφθηκαν στην πολυπαραγοντική ανάλυση οι άλλοι παράγοντες κινδύνου (συμπεριλαμβανομένης της CRP). Ειδικότερα, τα άτομα με τη μεγαλύτερη τιμή της PAF-AH είχαν 104% μεγαλύτερη πιθανότητα να εμφανίσουν κάποιο ισχαιμικό αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο σε σύγκριση με τα άτομα με τη μικρότερη τιμή της PAF-AH (σύγκριση 1^{ου} - 3^{ου} τριτημορίου) ^[179].

- Khuseynova et al: στη μελέτη αυτή συμμετείχαν 312 ασθενείς με αγγειογραφικά διαπιστωμένη στεφανιαία νόσο και 479 υγιή άτομα. Η μελέτη έδειξε ότι η μάζα της PAF-AH του πλάσματος αποτελούσε ισχυρό προγνωστικό παράγοντα για την εμφάνιση καρδιαγγειακής νόσου όταν συμπεριλήφθηκαν στην πολυπαραγοντική ανάλυση οι άλλοι παράγοντες κινδύνου. Ειδικότερα, τα άτομα με τη μεγαλύτερη τιμή της PAF-AH είχαν 84% μεγαλύτερη πιθανότητα να εμφανίσουν κάποιο καρδιακό επεισόδιο σε σύγκριση με τα άτομα με τη μικρότερη τιμή της PAF-AH (σύγκριση 1^{ου} - 4^{ου} τεταρτημορίου) ^[180].

Συμπερασματικά, όλες οι μελέτες έδειξαν ότι οι ασθενείς είχαν υψηλότερα επίπεδα PAF-AH στο πλάσμα συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου, ενώ με την εξαίρεση της μελέτης WHS (και της ARIC για τα άτομα με LDL-C > 130 mg/dL), η μάζα/ενεργότητα της PAF-AH του πλάσματος αποτελεί ανεξάρτητο προγνωστικό παράγοντα για την εμφάνιση καρδιαγγειακών συμβαμάτων (στεφανιαίας νόσου ή/και ισχαιμικού αγγειακού εγκεφαλικού επεισοδίου). Έτσι λοιπόν, με βάση τα αποτελέσματα των μεγάλων κλινικών μελετών, φαίνεται ότι η PAF-AH θα

μπορούσε να αποτελέσει ένα χρήσιμο προγνωστικό δείκτη για την εμφάνιση της καρδιαγγειακής νόσου σε συνδυασμό με τον προσδιορισμό των επιπέδων της CRP του ορού, αφού τα επίπεδα της PAFAH δεν συσχετίζονται με τα επίπεδα της CRP του ορού.



ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4^ο

ΑΘΗΡΩΜΑΤΩΣΗ - Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ oxLDL

4.1. ΓΕΝΙΚΑ

Τα καρδιαγγειακά νοσήματα αποτελούν την κύρια αιτία θανάτου στις Ηνωμένες Πολιτείες της Αμερικής από το 1900, με εξαίρεση το 1918, οπότε παρατηρήθηκε επιδημία γρίπης. Κάθε χρόνο πεθαίνουν 1.000.000 άτομα στις ΗΠΑ από νόσο του καρδιαγγειακού συστήματος. Τα νοσήματα αυτά προκαλούν τόσους θανάτους όσους συνολικά οι επόμενες έξι αιτίες θανάτου. Παρά το γεγονός ότι οι νόσοι του καρδιαγγειακού συστήματος θεωρούνται νόσοι των ανδρών, στοιχεία από την ιστοσελίδα του AHA (American Heart Association: www.aha.org) αναφέρουν ότι ο απόλυτος αριθμός των θανάτων ετησίως σε γυναίκες είναι μεγαλύτερος απ' αυτόν των ανδρών (503.000 έναντι 455.000 ατόμων αντίστοιχα). Στις γυναίκες τα καρδιαγγειακά νοσήματα προκαλούν περισσότερους θανάτους ετησίως απ' ό,τι αθροιστικά οι επόμενες 17 αιτίες θανάτου. Η οικονομική επιβάρυνση από τα καρδιαγγειακά νοσήματα είναι εξίσου εντυπωσιακή: υπολογίζεται ότι το συνολικό κόστος για το 2003 στις ΗΠΑ ανήλθε στα \$300.000.000.000 ^[181]. Στις Ευρωπαϊκές χώρες η καρδιαγγειακή θνητότητα ποικίλλει από 3 άτομα/1.000 κατοίκους/ έτος (Γαλλία, Ολλανδία, Ιταλία, Ισπανία) έως και 10 άτομα/1.000 κατοίκους/ έτος (Βουλγαρία και Ουκρανία). Έτσι η θνητότητα από τα καρδιαγγειακά νοσήματα για την περίοδο 1980-2002, εμφανίζει μείωση για τη βόρεια, δυτική και νότια Ευρώπη (με εξαίρεση την Ελλάδα) και αύξηση για την κεντρική και ανατολική Ευρώπη^[182]. Η πλειοψηφία των νόσων του καρδιαγγειακού συστήματος οφείλεται στην αθηρωμάτωση.

Η αθηροσκλήρωση είναι ασθένεια του έσω χιτώνα των αρτηριών και θεωρείται μια ανοσολογική και φλεγμονώδης απάντηση του έσω χιτώνα σε μια περιοχική βλάβη του αγγειακού τοιχώματος. Πρόκειται για μια τοπικά εντοπισμένη βλάβη σε όλο το πάχος του έσω χιτώνα κατά μήκος της αρτηρίας και όχι για μια διάχυτη νόσο. Αφορά αρτηρίες που κυμαίνονται σε μέγεθος από τη ρίζα της αορτής μέχρι και αρτηρίες με εξωτερική διάμετρο 3mm. Η κατανομή της νόσου δεν είναι ομοιόμορφη, αφού φαίνεται ότι κάποιες αρτηρίες, όπως η έσω μαστική αρτηρία, προσβάλλονται σπάνια, ενώ κάποιες άλλες, όπως οι στεφανιαίες αρτηρίες, οι εγκεφαλικές αρτηρίες και η αορτή, πολύ συχνότερα. Ταυτόχρονα ακόμα και στο ίδιο άτομο υπάρχουν διαφορές όσον αφορά το βαθμό προσβολής στις διάφορες αρτηρίες του σώματος.



4.2. ΣΤΑΔΙΑ ΤΗΣ ΑΘΗΡΩΜΑΤΩΣΗΣ

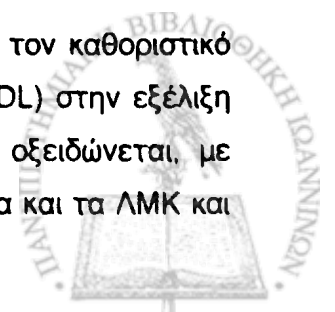
Η αθηροσκλήρωση είναι μια πολυεστιακή νόσος που εξελίσσεται με τη συνδρομή ενός μεγάλου αριθμού παραγόντων κινδύνου, οι οποίοι δρουν σε συγκεκριμένο γενετικό υπόστρωμα. Νεκροτομικές μελέτες έδειξαν ότι η αθηρωμάτωση ξεκινά από τη δεύτερη δεκαετία της ζωής, εξελίσσεται αργά και μπορεί να παραμένει ασυμπτωματική για πολλά χρόνια ^[183]. Η πάθηση χαρακτηρίζεται από την εμφάνιση μονοπύρηνων λευκών αιμοσφαιρίων στο αγγειακό τοίχωμα σε συγκεκριμένες θέσεις αυξημένου τοιχωματικού στρες, όπως είναι οι διχασμοί των αγγείων. Η εξέλιξη της βλάβης χαρακτηρίζεται και από τη μετανάστευση των λείων μυϊκών κυττάρων (ΛΜΚ) από το μέσο στον έσω χιτώνα των αγγείων, τον επακόλουθο πολλαπλασιασμό τους και - στη συνέχεια - την παραγωγή και την εναπόθεση διάμεσης ουσίας, κυρίως ινών κολλαγόνου.

Αυτή η διαδοχή των γεγονότων οδηγεί σε πάχυνση και σκλήρυνση του αγγειακού τοιχώματος (αθηρο-σκλήρωση). Ταυτόχρονα ΛΜΚ και μακροφάγα φαγοκυτταρώνουν την οξειδωμένη μορφή της LDL και μετατρέπονται σε αφρώδη κύτταρα, με αποτέλεσμα το σχηματισμό της βασικής βλάβης στην αθηρωμάτωση, την *αθηρωματική πλάκα*.

Για την πρωταρχική βλάβη, που οδηγεί στη δημιουργία μιας αθηρωματικής πλάκας, έχουν προταθεί διάφορες θεωρίες. Αρχικά, η υπόθεση της «*απάντησης στη βλάβη*» (response to injury hypothesis) θεώρησε ότι μεταβολές του ενδοθηλίου από την επίδραση διαφόρων παραγόντων (μηχανικοί ή τοξικοί παράγοντες, ελεύθερες ρίζες κ.τ.λ.) αποτελούν τις αρχικές συνθήκες δυσλειτουργίας του ενδοθηλίου ^[184], το οποίο χαρακτηρίζεται από αυξημένη διαπερατότητα, υπερέκφραση προσκολλητικών μορίων και απελευθέρωση αυξητικών και χημειοτακτικών παραγόντων ^[185]. Η προσκόλληση λευκοκυττάρων και η διείσδυσή τους στον έσω χιτώνα, σε συνδυασμό με τη μετανάστευση των ΛΜΚ από το μέσο χιτώνα, οδηγούν στο σχηματισμό της αθηρωματικής πλάκας, όπως προαναφέρθηκε.

Στη συνέχεια, μια άλλη θεωρία συμπλήρωσε τη θεωρία της «*απάντησης στη βλάβη*»: Η υπόθεση «*athero-ELAM*» (endothelial - dependent mechanisms of leukocyte recruitment in atherogenesis) ^[186]. Αυτή η υπόθεση εστιάσθηκε στη δυσλειτουργία του ενδοθηλίου, την οποία θεώρησε ως την πρωταρχική διαταραχή που προκαλεί αλληλεπιδράσεις των ενδοθηλιακών κυττάρων με συστατικά του αίματος. Τέτοιες αλληλεπιδράσεις υπεύθυνες για τη δημιουργία αθηρωμάτωσης είναι η αυξημένη διαπερατότητα του ενδοθηλίου και η επακόλουθη οξειδωτική τροποποίηση πρωτεϊνών του πλάσματος, η διαταραχή της ισορροπίας μεταξύ θρομβωτικών και αντιθρομβωτικών μηχανισμών και η αναστολή της εξαρτούμενης από το ενδοθήλιο αγγειοδιαστολής.

Η θεωρία της «*τροποποίησης των λιποπρωτεϊνών*» ^[187] υπογραμμίζει τον καθοριστικό ρόλο των χημικά τροποποιημένων λιποπρωτεϊνών (κύρια της οξειδωμένης LDL) στην εξέλιξη της αθηρωμάτωσης. Η φυσική LDL συσσωρεύεται στον έσω χιτώνα και οξειδώνεται, με αποτέλεσμα να δρα ως χημειοτακτικός παράγοντας για τα λευκά αιμοσφαίρια και τα ΛΜΚ και



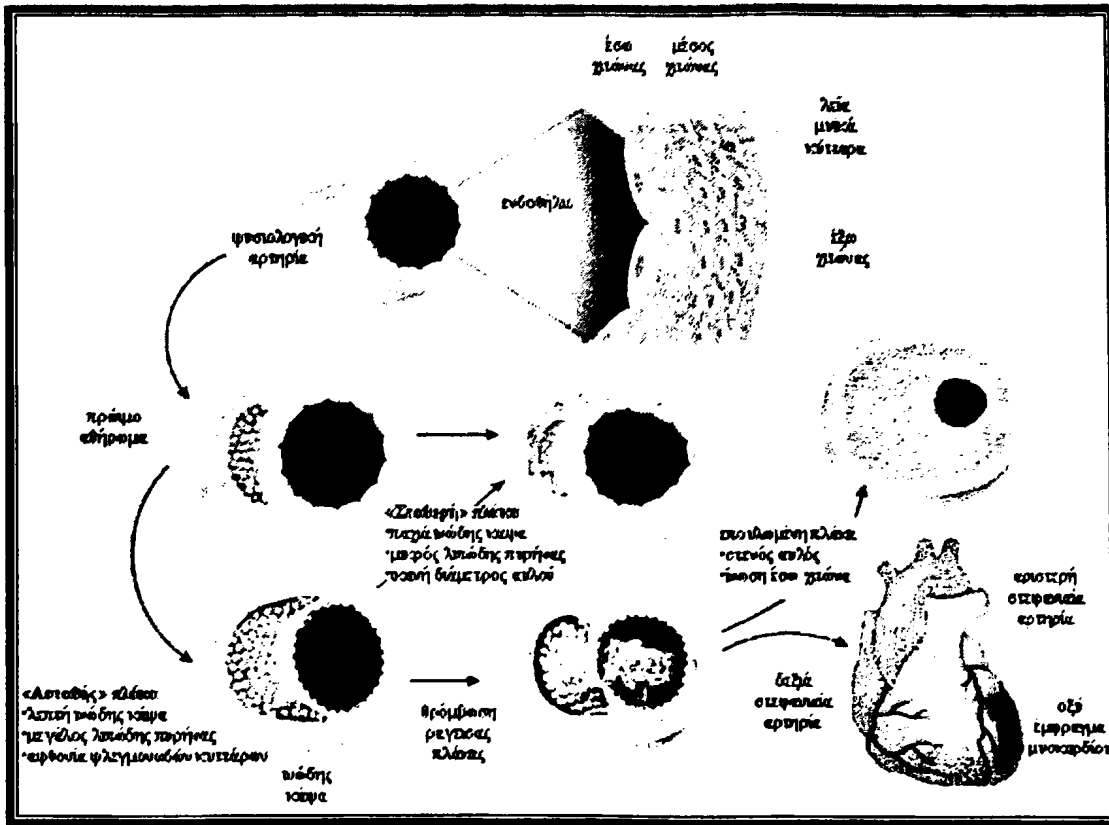
να συμμετέχει στη δημιουργία των αφρωδών κυττάρων. Πράγματι, ήδη από τις αρχές της δεκαετίας του 1980, μελέτες έδειξαν ότι η ακετυλιωμένη και η MDA-LDL, αλλά όχι η φυσική LDL προσλαμβάνεται από τα μακροφάγα μέσω ειδικών υποδοχέων, με αποτέλεσμα το σχηματισμό αφρωδών κυττάρων ^[81,82]. Το 1981 για πρώτη φορά οι Steinberg και συν. ^[188], έδειξαν ότι καλλιέργειες ενδοθηλιακών κυττάρων παρουσία μεταλλικών ιόντων και απουσία αντιοξειδωτικών προκαλούσαν οξειδωση των LDL σε μια μορφή που αναγνωριζόνταν από ειδικούς υποδοχείς των μακροφάγων. Το 1984 διατυπώθηκε η θεωρία της χημικής τροποποίησης των LDL ^[189-191] και μέχρι τα τέλη της δεκαετίας αρκετοί ερευνητές έδειξαν την παρουσία οξειδωμένης LDL στο αρτηριακό τοίχωμα πειραματόζων, αλλά και ανθρώπων με αθηρωμάτωση ^[192-194].

Άλλες θεωρίες που προσπαθούν να συμπληρώσουν κενά στη διαδικασία της αθηρωμάτωσης, είναι η θεωρία της μονοκλωνικής ανάπτυξης κυττάρων στα σημεία της αθηρωματικής πλάκας ^[184] και η θεωρία της μόλυνσης-φλεγμονής, σύμφωνα με την οποία η ανάπτυξη της αθηρωματικής πλάκας παρατηρείται σε σημεία του αγγειακού δικτύου που προσβάλλονται από λοιμογόνους οργανισμούς. Τέτοιοι είναι τα χλαμύδια της πνευμονίας, το ελικοβακτηρίδιο του πυλωρού αλλά και ιοί, όπως αυτοί της ομάδας Coxsackie και της ομάδας του έρπητα ^[184].

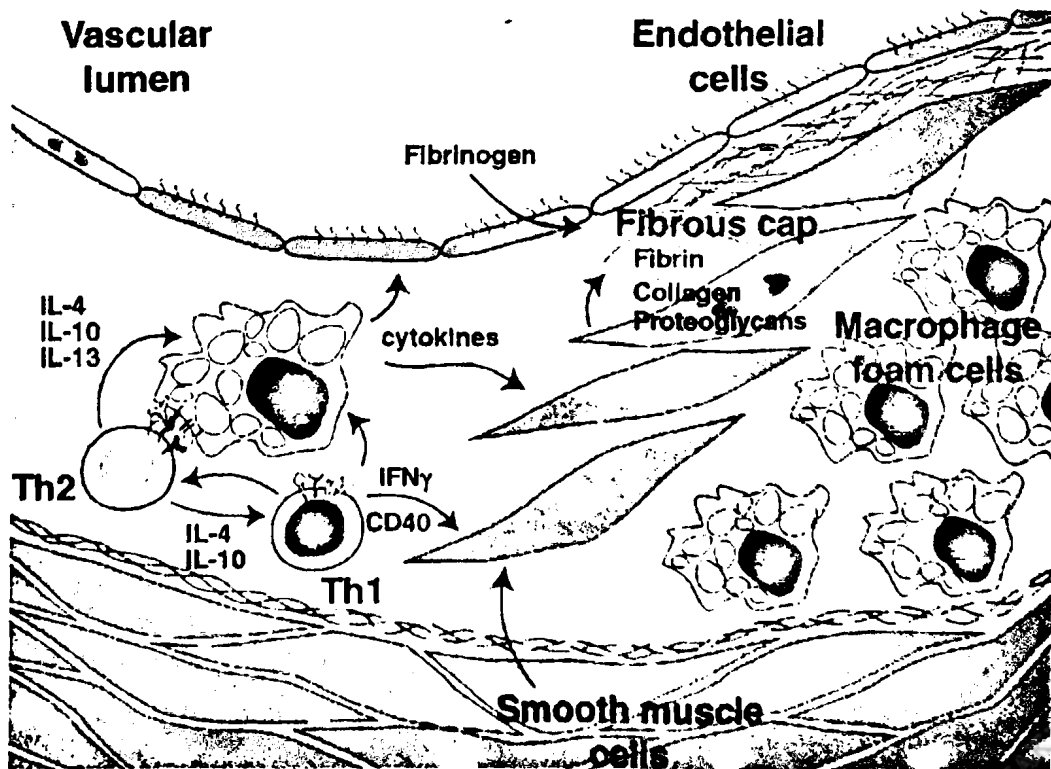
Η φυσική ιστορία της εξέλιξης των αθηρωματικών βλαβών περιλαμβάνει 6 στάδια ^[195,196] (Εικόνα 13). Στον τύπο I παρατηρούνται μικρές συσσωρεύσεις λιπιδίων και λίγων μακροφάγων που δεν είναι ορατές μακροσκοπικά σε περιοχές με δυσλειτουργία του ενδοθηλίου. Οι βλάβες αυτές με την πάροδο του χρόνου μεγαλώνουν σε μέγεθος με αποτέλεσμα τις ορατές πλέον λιπώδεις γραμμώσεις (fatty streaks, τύπος II), οι οποίες θεωρούνται αντιστρέψιμες και στις οποίες παρατηρούνται μακροφάγα γεμάτα με εστεροποιημένη χοληστερόλη (αφρώδη κύτταρα), ενώ η εξωκυττάρια χοληστερόλη είναι κυρίως μη εστεροποιημένη και μπορεί να σχηματίσει κρυστάλλους. Στον τύπο III αυξάνεται ο αριθμός των αφρωδών κυττάρων και η εξωκυττάρια εναπόθεση λίπους. Δεν εξελίσσονται όλες οι βλάβες τύπου III σε πιο προχωρημένα στάδια. Σαν απάντηση σε τέτοιες βλάβες, το αγγείο αλλάζει τη γεωμετρία του (αγγειακή αναδιαμόρφωση - remodeling). Αποτέλεσμα της αγγειακής αναδιαμόρφωσης είναι η αύξηση της εξωτερικής διαμέτρου του αγγείου, ενώ ταυτόχρονα η εσωτερική του διάμετρος δαιτηρείται σταθερή.

Η περαιτέρω εξέλιξη ορισμένων από τις βλάβες τύπου III οδηγεί στον τύπο IV, στον οποίο η εξωκυττάρια συγκέντρωση λιπιδίων είναι πλέον σημαντική και σχηματίζει το λιπώδη πυρήνα στον έσω χιτώνα των αρτηριών. Στο λιπώδη πυρήνα παρατηρούνται επιπλέον κυτταρικά υπολείμματα από νεκρωμένα αφρώδη κύτταρα και διήθηση από T-λεμφοκύτταρα. Ο τύπος V χαρακτηρίζεται επιπρόσθετα από σημαντική εναπόθεση ινώδους ιστού, που σχηματίζει το ινώδες περίβλημα και διαχωρίζει το λιπώδη πυρήνα από το ενδοθήλιο. Αυτή είναι και η σύνθεση της ώριμης, ανεπίπλεκτης αθηρωματικής πλάκας (Εικόνα 14). Στον τύπο VI ανήκουν οι επιπλεγμένες, όπως ονομάζονται, αθηρωματικές πλάκες, οι οποίες χαρακτηρίζονται

από εξελκώσεις, θρομβώσεις και μικρορήξεις και οδηγούν στις κλινικές εκδηλώσεις της αθηρωμάτωσης^[184,197] (Εικόνα 15).

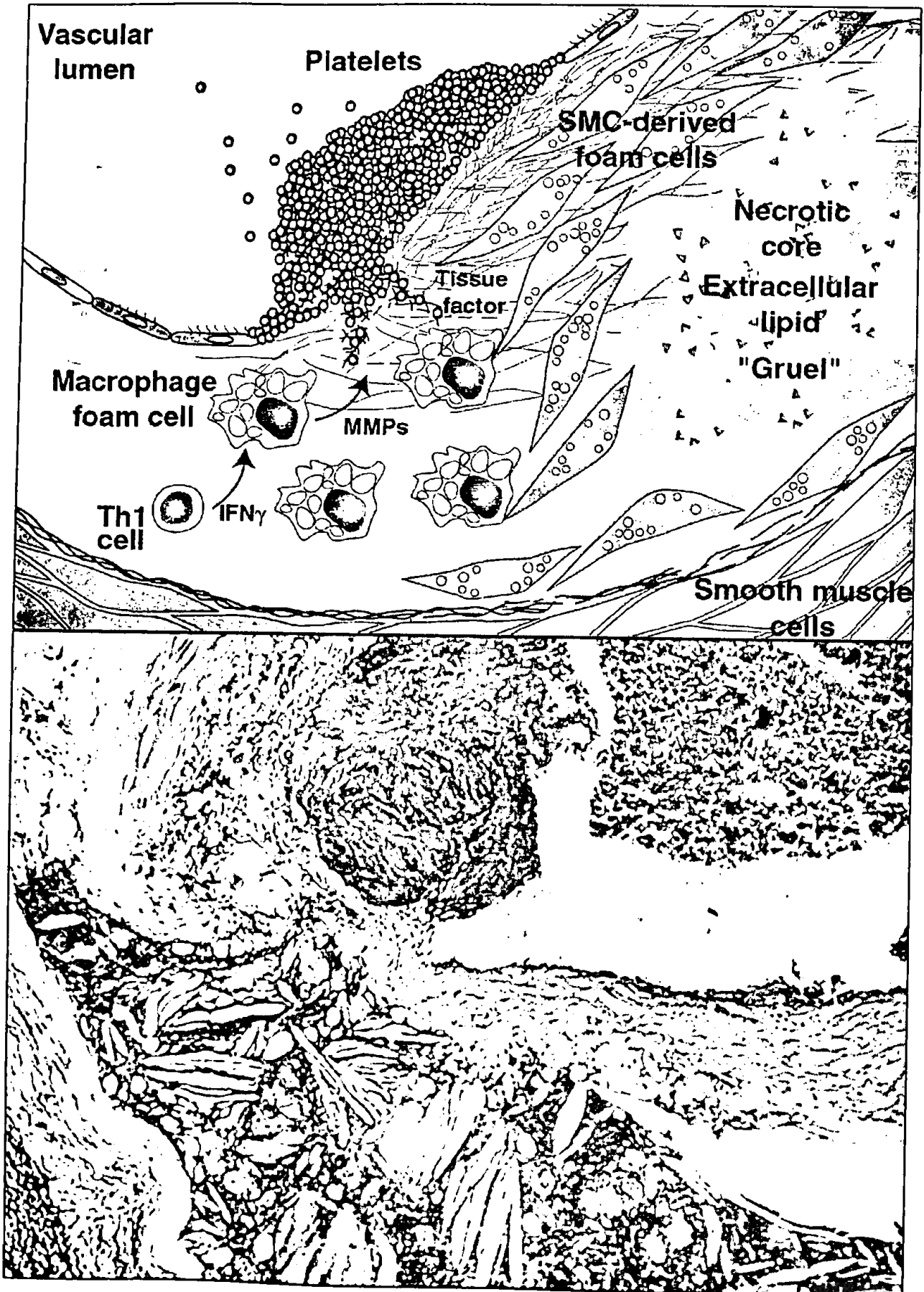


Εικόνα 13. Τα στάδια της εξέλιξης της αθηρωματικής νόσου



Εικόνα 14. Ωριμη ανεπίλεκτη αθηρωματική πλάκα





Εικόνα 15. Επιπλεγμένη αθηρωματική πλάκα (δημιουργία θρόμβου μετά από ρήξη της ινώδους κάψας)



4.3. Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΟΧLDL ΣΤΗΝ ΦΛΕΓΜΟΝΗ ΚΑΙ ΤΗΝ ΕΞΕΛΙΞΗ ΤΗΣ ΑΘΗΡΩΜΑΤΩΣΗΣ

Τα τελευταία χρόνια έχει αναγνωρισθεί ότι στη δυναμική της αθηρωματικής πλάκας και σε όλα τα στάδια ανάπτυξής της συμμετέχουν έντονες φλεγμονώδεις διεργασίες. Βασικό ρόλο στις φλεγμονώδεις αυτές διεργασίες διαδραματίζει η οξειδωμένη LDL (Πίνακας 3). Ταυτόχρονα η φλεγμονή έχει συσχετισθεί και με παράγοντες κινδύνου για αθηρωμάτωση, όπως η υπέρταση, η δυσλιπιδαιμία, ο σακχαρώδης διαβήτης και η παχυσαρκία ^[198]. Η οχLDL προκαλεί μείωση της έκφρασης του mRNA της προΐνσουλίνης στα παγκρεατικά κύτταρα, με αποτέλεσμα τη μείωση της έκκρισης της ινσουλίνης από τα συγκεκριμένα κύτταρα ^[199]. Ταυτόχρονα σε ασθενείς με μεταβολικό σύνδρομο τα αυξημένα επίπεδα οχLDL συσχετίσθηκαν με διπλασιασμό του κινδύνου για καρδιαγγειακό θάνατο και με μείζονα μη θανατηφόρα καρδιαγγειακά συμβάματα ^[200]. Επιπλέον υψηλά επίπεδα οχLDL έχουν ανιχνευθεί σε ασθενείς με καταστάσεις που θεωρούνται κλασικοί παράγοντες κινδύνου για στεφανιαία νόσο, όπως η υπέρταση ^[201-204], η δυσλιπιδαιμία ^[205,208], ο σακχαρώδης διαβήτης ^[209-212] και το κάπνισμα ^[213-215]. Υγιείς μέσης ηλικίας άνδρες με αυξημένα επίπεδα οξειδωμένης LDL ορού εμφανίζουν μειωμένη στεφανιαία εφεδρεία ^[216] και αυξημένο κίνδυνο να εκδηλώσουν ένα οξύ στεφανιαίο επεισόδιο τα επόμενα χρόνια ^[217].

Αυξημένα επίπεδα οχLDL σε σύγκριση με υγιείς εθελοντές έχουν παρατηρηθεί σε άτομα με αυξημένο 10-ετή κίνδυνο για οξύ στεφανιαίο σύνδρομο ^[52], σε ασθενείς με αγγειογραφικά τεκμηριωμένη στεφανιαία νόσο ^[53,54,218-220], καθώς επίσης και σε ασθενείς με σταθερή στηθάγχη ^[221] ή ιστορικό οξέος στεφανιαίου επεισοδίου ^[48,49]. Επιπρόσθετα, αυξημένα επίπεδα οχLDL στο ορό μπορούν να διαχωρίσουν τους ασθενείς με OEM τόσο από αυτούς με σταθερή ^[222] όσο και από αυτούς με ασταθή στηθάγχη ^[50,54]. Σε μια άλλη μελέτη τα αυξημένα επίπεδα της οχLDL βρέθηκαν να είναι πιο ευαίσθητος δείκτης για την ύπαρξη στεφανιαίας νόσου σε σύγκριση με το Global Risk Assessment Score, αν και τα επίπεδα αυτά εμφάνιζαν ισχυρή συσχέτιση με τις περισσότερες από τις παραμέτρους που καθορίζουν το συνολικό κίνδυνο στο συγκεκριμένο μοντέλο ^[223]. Αυξημένα επίπεδα οχLDL έχουν παρατηρηθεί και σε ασθενείς με υποκλινική αθηρωματική νόσο, όταν αυτή εκτιμήθηκε με τη μέτρηση του πάχους του έσω-μέσου χιτώνα (IMT) των καρωτίδων τόσο σε υγιείς εθελοντές ^[224,225], όσο και σε ασθενείς με δυσλιπιδαιμία ^[226]. Παρότι η οχLDL ανιχνεύεται στο αίμα, είναι απίθανο να σχηματίζεται εκεί, καθώς στην κυκλοφορία υπάρχει αφθονία αντιοξειδωτικών ουσιών. Έτσι πιστεύεται ότι η θέση σχηματισμού της οχLDL είναι η αθηρωματική πλάκα και μόνο ένα πολύ μικρό ποσοστό της κυκλοφορεί στον ορό, όπου και ανιχνεύεται.



Πίνακας 3. Ο ρόλος της oxLDL στην εξέλιξη της αθηρωμάτωσης

Δράση	πιθανός μηχανισμός
↑ προσκόλληση μονοκυττάρων	↑ έκφρασης προσκολλητικών μορίων
Χημειοταξία μονοκυττάρων και T-λεμφοκυττάρων	↑ έκφρασης MCP-1 και άμεση χημειοτακτική δράση
↑ έκφρασης υποδοχέων εκκαθαριστών	Ενεργοποίηση ενδοκυττάρων σηματοδοτικών μορίων στα μακροφάγα
↑ της παραγωγής αφρωδών κυττάρων	↑ φαγοκύττωσης της oxLDL μέσω υποδοχέων εκκαθαριστών
Ενεργοποίηση γονιδίων που επάγουν τη φλεγμονή	Ενεργοποίηση πυρηνικού παράγοντα-κΒ (NFκΒ) και ↑ ενδοκυττάριας συγκεντρωσης cAMP
Επαγωγή του κυτταρικού θανάτου	Προαγωγή της απόπτωσης και σχηματισμός κρυστάλλων χοληστερόλης
↑ θρόμβωσης	↑ Ιστοτικού παράγοντα και της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων
Δυσλειτουργία του ενδοθηλίου	↑ της ET-1 και ↓ του NO
↑ πιθανότητας ρήξης της πλάκας	↑ της παραγωγής MMPs

Είναι πιθανό ότι τα αυξημένα επίπεδα oxLDL ορού συσχετίζονται με την αστάθεια μιας αθηρωματικής πλάκας, καθώς ασταθείς πλάκες είναι, όπως έχει ήδη αναφερθεί, αυτές με πλούσιο λιπιδικό πυρήνα και έντονα φλεγμονώδη στοιχεία. Οι Nishi και συν.^[227] έδειξαν ότι αυξημένα επίπεδα oxLDL τόσο στην κυκλοφορία όσο και στο εσωτερικό των αθηρωματικών πλακών σχετίζονται με αυξημένο κίνδυνο για ρήξη των αθηρωματικών αυτών πλακών. Επιπρόσθετα, όπως έχει ήδη αναφερθεί, στην παθογένεια των οξέων στεφανιαίων συνδρόμων συμμετέχουν η ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων και η θρόμβωση. Η έκθεση της oxLDL των αθηρωματικών πλακών μετά τη ρήξη της συνέχειας του ενδοθηλίου ενεργοποιεί την ενδογενή οδό της πήξης^[228] και τα αιμοπετάλια^[229,230]. Κύρια υπεύθυνα για την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων φαίνεται ότι είναι συγκεκριμένα οξειδωμένα φωσφολιπίδια της oxLDL και η lyso-PC^[231]. Στη συνέχεια θα δούμε αναλυτικότερα το ρόλο της φλεγμονής και την επίδραση της oxLDL στην ανάπτυξη και εξέλιξη της αθηρωμάτωσης.

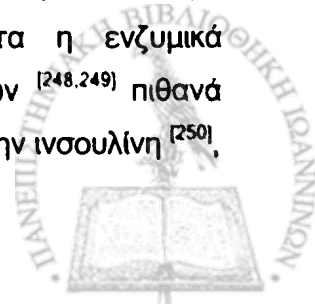


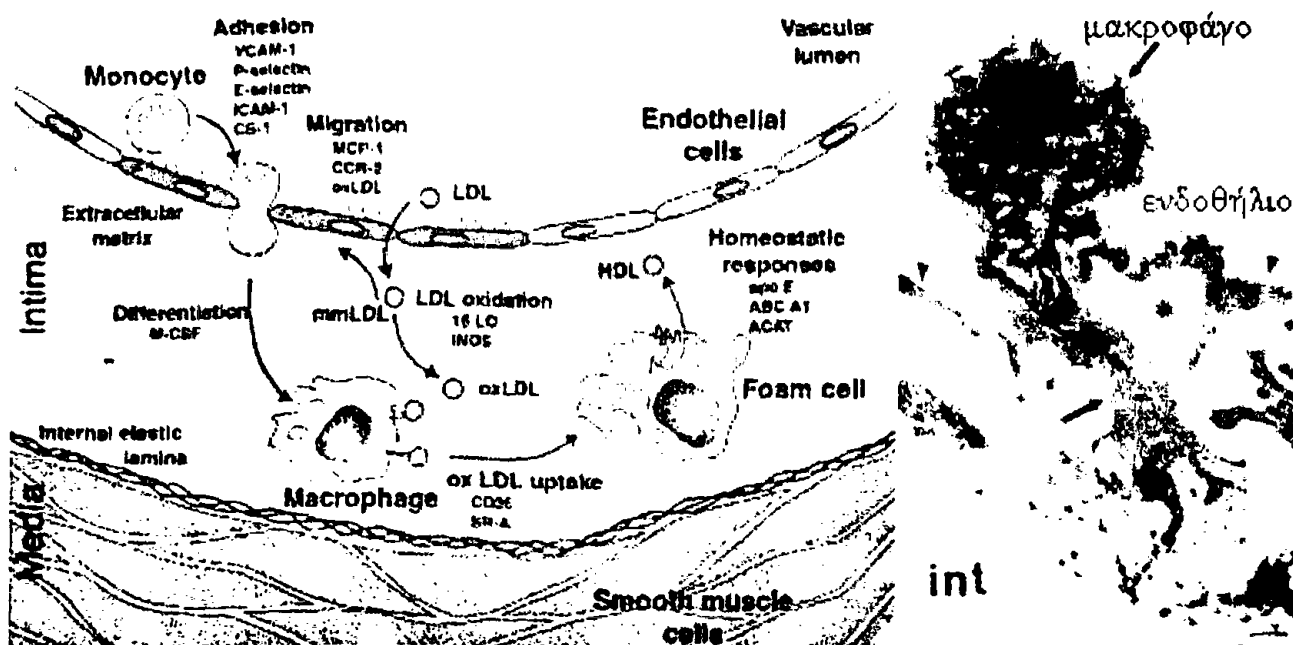
4.3.1. Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ ΕΝΔΟΘΗΛΙΟΥ ΣΤΗΝ ΕΞΕΛΙΞΗ ΤΗΣ ΑΘΗΡΩΜΑΤΩΣΗΣ

Είναι πλέον γνωστό ότι το ενδοθήλιο δεν είναι μια αδρανής στοιβάδα κυττάρων, που απλά επενδύει το εσωτερικό του αυλού των αγγείων, αλλά αντίθετα συμβάλλει δυναμικά στη διατήρηση του τόνου και της αρχιτεκτονικής του αγγείου ^[232]. Συγκεκριμένα, το υγιές ενδοθήλιο αναστέλλει την προσκόλληση των αιμοπεταλίων και των λευκοκυττάρων στην έσω επιφάνεια του αγγειακού αυλού, ενώ ταυτόχρονα συμβάλλει στην ισορροπία μεταξύ θρομβωτικών και θρομβολυτικών μηχανισμών ^[233].

Οι παραπάνω λειτουργίες του ενδοθηλίου φαίνεται να σχετίζονται άμεσα με την παραγωγή του μονοξειδίου του αζώτου (NO) και την ενεργότητα της ενδοθηλιακής συνθετάσης του NO (eNOS) ^[234], ενώ φαίνεται ότι συγκεκριμένοι πολυμορφισμοί του γονιδίου της eNOS σχετίζονται με αυξημένο οξειδωτικό στρες και την εμφάνιση αθηρωματικής νόσου ^[235]. Η oxLDL και ειδικότερα η lysoPC ^[236], μειώνει την ενεργότητα της eNOS ^[237,238]. Παράγοντες κινδύνου για αθηρωμάτωση, όπως το κάπνισμα, η δυσλιπιδαιμία, ο σακχαρώδης διαβήτης και η υπέρταση συνδυάζονται με δυσλειτουργία του ενδοθηλίου. Έτσι, αμέσως μετά την έναρξη μιας αθηρογόνου διαίτας, ένας μεγάλος αριθμός ενδοθηλιακών κυττάρων εκφράζουν στην επιφάνειά τους διάφορα προσκολλητικά μόρια, τα οποία είναι εξειδικευμένα για διάφορες κατηγορίες λευκών αιμοσφαιρίων ^[239]. Ειδικότερα το προσκολλητικό μόριο του αγγειακού τοιχώματος -1 (Vascular Cell Adhesion Molecule -1, VCAM-1), είναι ειδικό για την προσκόλληση των λευκών αιμοσφαιρίων (μονοκύτταρα και T-λεμφοκύτταρα) που ανιχνεύονται στα αρχικά στάδια σχηματισμού της αθηρωματικής πλάκας (Εικόνα 16), τόσο σε ανθρώπους όσο και σε πειραματόζωα ^[240]. Μελέτες έδειξαν ότι τα ενδοθηλιακά κύτταρα που βρίσκονται πάνω από την αθηρωματική πλάκα υπερεκφράζουν το VCAM-1 ^[241], ενώ ποντίκια γενετικά τροποποιημένα ώστε να εκφράζουν ανενεργό VCAM-1 δεν αναπτύσσουν αθηρωματικές βλάβες ^[242].

Οι μηχανισμοί με τους οποίους αυξάνεται η έκφραση VCAM-1 μετά από αθηρογόνο διαίτα, εξαρτώνται από τη φλεγμονώδη δράση των οξειδωμένων λιπιδίων και κυρίως της lysoPC ^[243] που συσσωρεύονται στον έσω χιτώνα των αρτηριών και σχετίζονται με τον πυρηνικό παράγοντα-kB (nuclear factor-kB) ^[244,245]. Εκτός από το VCAM-1 και άλλα μόρια διαδραματίζουν ρόλο στη μετανάστευση των λευκοκυττάρων στο αγγειακό τοίχωμα. Έτσι οι σελεκτίνες (P- και E-σελεκτίνη), συμβάλλουν στην κύλιση (rolling) των λευκοκυττάρων στο αγγειακό τοίχωμα, ενώ οι ιντεγκρίνες (integrins) συμβάλλουν στην πιο σταθερή προσκόλλησή τους στο αγγειακό τοίχωμα ^[198]. Η αναστολή της έκφρασης των σελεκτινών και διαφόρων προσκολλητικών μορίων, όπως τα VCAM-1 και ICAM-1, σε πειραματόζωα έχει ως αποτέλεσμα την αναστολή της εξέλιξης της αθηρωμάτωσης ^[246,247]. Επιπρόσθετα η ενζυμικά τροποποιημένη oxLDL προάγει την απόπτωση των ενδοθηλιακών κυττάρων ^[248,249] πιθανά διαμέσου της πρωτεϊνικής κινάσης p38, μιας οδού η οποία αναστέλλεται από την ινσουλίνη ^[250], και από το σύστημα Fas/FasL και TNF ^[244,251].





Εικόνα 16. Μηχανισμοί χημειοτακτισμού και προσκόλλησης των μακροφάγων και μετατροπή τους σε αφρώδη κύτταρα

4.3.2. ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΧΗΜΕΙΟΤΑΚΤΙΣΜΟΥ ΤΩΝ ΜΟΝΟΚΥΤΤΑΡΩΝ

Διάφορες μελέτες έδειξαν ότι μετά την προσκόλλησή τους στα ενδοθηλιακά κύτταρα, τα λευκοκύτταρα μεταναστεύουν στον έσω χιτώνα του αρτηριακού τοιχώματος, αφού διαπεράσουν τις ενώσεις μεταξύ των ενδοθηλιακών κυττάρων. Υπεύθυνοι για αυτό το φαινόμενο είναι χημειοτακτικοί παράγοντες που παράγονται ή συγκεντρώνονται τοπικά, όπως η oxLDL, η Lp(a) ^[239] και η χημειοτακτική πρωτεΐνη των μονοκυττάρων 1 (monocyte chemoattractant protein-1, MCP-1) ^[252-255]. Μελέτες σε γενετικά τροποποιημένα ποντίκια τα οποία δεν εκφράζουν MCP-1 ή τον υποδοχέα της MCP-1, CCR-2 και είναι επιρρεπή σε αθηρωμάτωση εξαιτίας της έλλειψης του γονιδίου για την apoE ή για τον υποδοχέα των LDL, έδειξαν σημαντική μείωση στη χημειοταξία των μακροφάγων και στη συσσώρευση των LDL στο αγγειακό τοίχωμα ^[253,256].

Κύριο ρόλο στη χημειοταξία των μακροφάγων, διαδραματίζει η oxLDL και ειδικότερα ένα από τα κύρια συστατικά της, η lyso-PC ^[246]. Επιπρόσθετα η oxLDL φαίνεται ότι μειώνει την κινητικότητα των μακροφάγων στον έσω χιτώνα με μηχανισμό ο οποίος δεν είναι απόλυτα γνωστός ^[246]. Πράγματι η lysoPC και τα μη εστεροποιημένα λιπαρά οξέα της oxLDL είναι κυρίως υπεύθυνα για την έκκριση της MCP-1 ^[257]. Ταυτόχρονα από τα μακροφάγα που υπάρχουν στις αθηρωματικές βλάβες παράγονται κυτοκίνες, όπως ο παράγοντας νέκρωσης των όγκων -α (tumor necrosis factor -α, TNF-α) και η ιντερλευκίνη-1 (IL-1) ^[258]. Οι κυτοκίνες

αυτές προάγουν την παραγωγή προσκολλητικών μορίων από τα ενδοθηλιακά κύτταρα (VCAM-1, ICAM-1 και σελεκτινών), καθώς επίσης και την παραγωγή των ενδιάμεσων κυτοκινών, όπως των ιντερλευκινών 6,8 και 10 (IL-6, IL-8, IL-10)(*Εικόνα 16*)^[259]. Η oxLDL πιθανά επάγει την ενεργοποίηση του πυρηνικού παράγοντα κΒ, ο οποίος είναι υπεύθυνος για την έκφραση των γονιδίων των προσκολλητικών μορίων^[260,261]. Επίσης, στο εσωτερικό της αθηρωματικής πλάκας παράγονται χημειοτακτικοί παράγοντες για τα Τ-λεμφοκύτταρα και τα μαστοκύτταρα (IFN-γ και eotaxin αντίστοιχα)^[233].

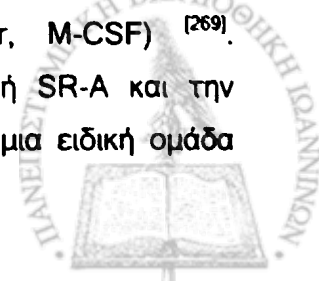
Η IL-6 προάγει την έκφραση γονιδίων στα ηπατοκύτταρα για την παραγωγή πρωτεϊνών οξείας φάσης, όπως η CRP και το αμυλοειδές Α^[258]. Τόσο τα επίπεδα της IL-6 όσο και τα επίπεδα του αμυλοειδούς Α αυξάνονται όταν επισυμβαίνει ρήξη της αθηρωματικής πλάκας, γεγονός το οποίο υποδεικνύει το σημαντικό ρόλο της φλεγμονής σε ασθενείς με οξύ στεφανιαίο επεισόδιο^[262]. Αντίθετα, η IL-10 δρα πιθανά προστατευτικά, καθώς έχει βρεθεί ότι, παρότι ευοδώνει την πρόσληψη της oxLDL από τα μακροφάγα, αναστέλλει την απόπτωση των αφρωδών κυττάρων. Επομένως η δράση της IL-10 σχετίζεται με την σταθεροποίηση της αθηρωματικής πλάκας, τουλάχιστον σε ασθενείς μετά από οξύ στεφανιαίο σύνδρομο^[263].

4.3.3. ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗΣ ΤΩΝ ΜΑΚΡΟΦΑΓΩΝ ΣΤΟΝ ΕΣΩ ΧΙΤΩΝΑ ΤΟΥ ΑΡΤΗΡΙΑΚΟΥ ΤΟΙΧΩΜΑΤΟΣ

Τα μονοκύτταρα στον έσω χιτώνα μετατρέπονται σε μακροφάγα και οδηγούνται διαμέσου μιας σειράς αλλαγών στο σχηματισμό αφρωδών κυττάρων. Τα μονοκύτταρα πολλαπλασιάζονται και εκφράζουν στην επιφάνειά τους ειδικούς υποδοχείς εκκαθαριστές (scavengers receptors).

Οι LDL οι οποίες μεταφέρθηκαν στον έσω χιτώνα των αρτηριών διαμέσου του διάκενου μεταξύ των ενδοθηλιακών κυττάρων^[264] και έχουν τροποποιηθεί χημικά (οξειδωθεί) προσλαμβάνονται από τα μακροφάγα και τα ΛΜΚ διαμέσου των συγκεκριμένων ειδικών υποδοχέων εκκαθαριστών. Αποτέλεσμα της συσσώρευσης της oxLDL στα μακροφάγα και τα ΛΜΚ είναι ο σχηματισμός των αφρωδών κυττάρων^[265,266]. Οι συγκεκριμένοι υποδοχείς εκκαθαριστές φαίνεται ότι αναγνωρίζουν οξειδωμένα φωσφολιπίδια τα οποία είναι προσκολλημένα στην apoB-100 των LDL^[267].

Η ενεργοποίηση των ενδοθηλιακών κυττάρων, κυρίως από την oxLDL, προκαλεί την έκκριση διαφόρων αυξητικών παραγόντων. Οι παράγοντες αυτοί διεγείρουν τον πολλαπλασιασμό των μονοκυττάρων και τη διαφοροποίησή τους σε μακροφάγα. Ανάμεσα σε αυτούς τους παράγοντες είναι ο αυξητικός παράγοντας των κοκκιοκυττάρων και των μονοκυττάρων (granulocyte monocyte colony stimulating factor, GM-CSF)^[268] και ο αυξητικός παράγοντας των μονοκυττάρων (monocyte colony stimulating factor, M-CSF)^[269]. Επιπρόσθετα, ο M-CSF επάγει την έκφραση του υποδοχέα εκκαθαριστή SR-A και την παραγωγή κυτταροκινών από τα μακροφάγα^[252]. Ο GM-CSF ενεργοποιεί μια ειδική ομάδα



μονοκύτταρων φαγοκυττάρων που περιέχουν μυελοϋπεροξειδάση. Η μυελοϋπεροξειδάση είναι ένα ένζυμο το οποίο επάγει την παραγωγή του υποχλωριώδους οξέος, που αποτελεί ισχυρή πηγή οξειδωτικού στρες και παράγοντα φλεγμονής στο εσωτερικό της αθηρωματικής πλάκας^[37]. Επιπλέον, διάφορες κυτοκίνες, όπως ο TNF-α, INF-γ και η IL-6, μειώνουν την έκφραση του υποδοχέα εκκαθαριστή SR-A, ενώ η IL-4 αυξάνει την έκφραση του υποδοχέα εκκαθαριστή CD36. Διαμέσου αυτών των κυτοκινών η φλεγμονή επιδρά στο σχηματισμό αφρωδών κυττάρων στο αρτηριακό τοίχωμα^[254]. Πρέπει να σημειωθεί ότι τα μακροφάγα εμφανίζουν και προστατευτικούς μηχανισμούς έναντι της οξειδωσης. Φαίνεται όμως ότι οι μηχανισμοί αυτοί δεν μπορούν να αντιμετωπίσουν επαρκώς το αυξημένο οξειδωτικό στρες στο εσωτερικό της αθηρωματικής πλάκας^[270].

Ένα από τα βασικά στοιχεία στην εξέλιξη της αθηρωματικής πλάκας είναι η απόπτωση των αφρωδών κυττάρων στο εσωτερικό της, με αποτέλεσμα το σχηματισμό και την αύξηση του λιπιδικού πυρήνα της. Έχει δειχθεί σε πολλές μελέτες ότι η oxLDL και πιο συγκεκριμένα ορισμένα oxPL, όπως η POVPC και η PGPC^[271], προάγουν την απόπτωση των λείων μυϊκών κυττάρων^[272] και των μακροφάγων^[273-275]. Η απόπτωση των κυττάρων αυτών συμβαίνει διαμέσου μηχανισμών που σχετίζονται με την παραγωγή 7-κετο-χοληστερόλης (από το ένζυμο ακετυλοτρανσφεράση της χοληστερόλης) και την επακόλουθη ενεργοποίηση της ενδοκυττάριας φωσφολιπάσης A₂ των μακροφάγων^[276,277] ή την ενεργοποίηση της ενδοκυττάριας οδού της σφιγγολιπίνης^[278].

Συνακόλουθα, η oxLDL προάγει την παραγωγή των μεταλλοπρωτεϊνών (MMPs) 1 και 3 σε ενδοθηλιακά κύτταρα ανθρώπινων στεφανιαίων αγγείων^[279]. Έτσι, αυξάνεται η αστάθεια της αθηρωματικής πλάκας και ο κίνδυνος για την πιθανή ρήξη της^[227]. Η δράση αυτή της oxLDL φαίνεται ότι επάγεται διαμέσου ειδικού υποδοχέα των ενδοθηλιακών κυττάρων, τον LOX-1. Πράγματι, η αναστολή του συγκεκριμένου υποδοχέα έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση της παραγωγής MMPs και των οξέων συμβαμάτων σε πειραματόζωα^[280]. Η σύνδεση της oxLDL με τον συγκεκριμένο υποδοχέα έχει επιπρόσθετα ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση του συστήματος CD40/CD40L, το οποίο ανήκει στην οικογένεια των TNF-α/TNF-α υποδοχέων^[281]. Κύτταρα στο εσωτερικό αθηρωματικών πλακών εκφράζουν CD40 και CD40L^[282]. Ενεργοποίηση του CD40 οδηγεί στην παραγωγή της ιντερφερόνης-γ από τα T-λεμφοκύτταρα, η οποία ενεργοποιεί τα μακροφάγα^[254]. Επιπρόσθετα, η σύνδεση του CD40L των T-λεμφοκυττάρων στον υποδοχέα CD40 των μακροφάγων έχει ως αποτέλεσμα την επαγωγή της παραγωγής MMPs από τα μακροφάγα^[283].

Η oxLDL αποτελεί κύριο αυτοαντιγόνο στην κυτταρική ανοσολογική απάντηση του οργανισμού στην αθηρωμάτωση. Περίπου το 25% των CD4+ T-λεμφοκυττάρων τα οποία καλλιεργούνται από αθηρωματικές πλάκες, αναγνωρίζουν την oxLDL διαμέσου ενός μηχανισμού ο οποίος σχετίζεται με το σύστημα HLA-DR^[252]. T-λεμφοκύτταρα ειδικά για τη αναγνώριση της oxLDL έχουν απομονωθεί από τα λεμφογάγγλια ποντικών με ανεπάρκεια της αρρΕ, τα οποία εμφανίζουν έντονη κυτταρική και χυμική ανοσολογική απάντηση στην oxLDL

[284,285]. Σε ανθρώπους έχει δειχθεί ότι η oxLDL μπορεί να ενεργοποιήσει μια υποομάδα περιφερικών T-λεμφοκυττάρων. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει ότι και στον άνθρωπο η oxLDL διαδραματίζει παρόμοιο ρόλο [252].

Τέλος από τα ενδοθηλιακά, τα λεία μυϊκά κύτταρα και τους ινοβλάστες της αθηρωματικής πλάκας υπερεκφράζεται τόσο το mRNA όσο και η πρωτεΐνη του αυξητικού παράγοντα του συνδετικού ιστού (CTGF), ο οποίος εμφανίζει αγγειογενετικές δράσεις. Επιπλέον, ο CTGF προάγει την παραγωγή εξωκυττάριας διάμεσης ουσίας και αποτελεί ισχυρό χημειοτακτικό παράγοντα για τα μονοκύτταρα [286].

4.3.4. ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ ΕΚΚΑΘΑΡΙΣΤΕΣ ΣΤΑ ΜΑΚΡΟΦΑΓΑ ΚΑΙ ΛΕΙΑ ΜΥΪΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ

Όπως ήδη αναφέρθηκε, η υπενδοθηλιακή συγκέντρωση αφρωδών κυττάρων, τα οποία προέρχονται κυρίως από τα μακροφάγα και τα λεία μυϊκά κύτταρα (ΛΜΚ) όταν αυτά προσλαμβάνουν oxLDL, διαδραματίζει κύριο ρόλο στην παθογένεια της αθηρωμάτωσης. Τα αφρώδη κύτταρα χαρακτηρίζονται από αυξημένο αριθμό δευτερογενών κεντοπιών και κυτταροπλασματικών σταγονιδίων λίπους. Όμως επώαση μακροφάγων και ΛΜΚ με LDL *in vitro* δεν οδηγεί στο σχηματισμό αφρωδών κυττάρων, καθώς η αύξηση της ενδοκυττάριας συγκέντρωσης LDL οδηγεί σε μείωση της έκφρασης των υποδοχέων της στην επιφάνεια αυτών των κυττάρων (αρνητική επανατροφοδότηση - negative feedback) [287]. Αντίθετα, μακροφάγα και ΛΜΚ φαίνεται ότι προσλαμβάνουν αδιάκοπα (χωρίς αρνητική παλίνδρομη ρύθμιση) χημικά τροποποιημένα (οξειδωμένα) LDL μέσω ειδικών υποδοχέων εκκαθαριστών (scavengers receptors) [265] (Πίνακας 4). Την ύπαρξη τέτοιων υποδοχέων είχαν υποθέσει αρχικά οι Brown & Goldstein το 1980, καθώς είχαν ανακαλύψει ότι η ακετυλιωμένη LDL (AcLDL) προσλαμβάνονταν από τα μακροφάγα χωρίς αρνητική παλίνδρομη ρύθμιση, άρα και με διαφορετικό μηχανισμό από αυτόν της LDL.

Μέχρι σήμερα έχουν αναγνωριστεί τουλάχιστον 10 τέτοιοι υποδοχείς εκκαθαριστές. Κυριότεροι υποδοχείς είναι οι υποδοχείς εκκαθαριστές τύπου A (SR-AI & SR-AII), ο CD36 [265,288-290], ο οποίος αναγνωρίζει διάφορα oxPL και τη φωσφατιδυλοχολίνη [291], ο CD68 [5], ο SR-PSOX [292,293] και ο LOX-1 (υποδοχέας εκκαθαριστής στα ενδοθηλιακά κύτταρα και στα ΛΜΚ) [281,294,295], η δράση του οποίου φαίνεται ότι αναστέλλεται από τη χορήγηση ασπιρίνης [295] και στατινών [296]. Σε αντίθεση με τους κλασσικούς υποδοχείς της LDL, οι υποδοχείς εκκαθαριστές είναι ειδικοί για τις oxLDL και η έκφρασή τους δεν επηρεάζεται από την ενδοκυττάρια συγκέντρωση των oxLDL. Αυτό το φαινόμενο έχει ως αποτέλεσμα τη συνεχή συσσώρευση oxLDL στα ΛΜΚ και τα μακροφάγα και το σχηματισμό αφρωδών κυττάρων [265].



Πίνακας 4. Ταξινόμηση υποδοχέων εκκαθαριστών και προσδέτων τους

Υποδοχέας	Προσδέτης
Τάξη Α	
SRA-I/II/III ^a	oxLDL, ακετυλιωμένη LDL, πολυανιόντα, LPS
MARCO ^a	oxLDL, ακετυλιωμένη LDL, βακτήρια
Τάξη Β	
SRB-I ^b	HDL, ox-LDL
CD36 ^{a,c}	oxLDL, αποπτωτικά κύτταρα, μακρές αλυσίδες λιπαρών οξέων
Άλλοι	
CD68 ^a	oxLDL, αποπτωτικά κύτταρα
SRC ^d	oxLDL, ακετυλιωμένη LDL, πολυανιόντα
SREC ^e	oxLDL, ακετυλιωμένη LDL
SR-PSOX	oxLDL
LOX-1 ^e	oxLDL, πολυανιόντα
FcγRIIB2	IgG, oxLDL?

^aστα μακροφάγα, ^bστο ήπαρ και στους αδένες, ^cστα αιμοπετάλια και τα μονοκύτταρα, ^dστην δροσόφιλα (δεν έχει βρεθεί αντίστοιχος υποδοχέας στον άνθρωπο) ^eστα ενδοθηλιακά κύτταρα

4.4. Η ΑΥΞΗΣΗ ΤΗΣ ΑΘΗΡΩΜΑΤΙΚΗΣ ΠΛΑΚΑΣ ΚΑΙ ΟΙ ΕΠΙΠΛΟΚΕΣ ΤΗΣ

Μετά τη δημιουργία των λιπωδών γραμμώσεων (fatty streaks), η εξέλιξη της αθηρωματικής βλάβης περιλαμβάνει τη δημιουργία πιο πολύπλοκων αθηρωματικών πλακών, οι οποίες τελικά θα οδηγήσουν στις κλινικές εκδηλώσεις της νόσου.

Σύμφωνα με την ισχύουσα θεωρία, οι λιπώδεις γραμμώσεις μετατρέπονται στις πιο πολύπλοκες αθηρωματικές πλάκες διαμέσου του πολλαπλασιασμού των ΛΜΚ. Τα ΛΜΚ συγκεντρώνονται στην πλάκα και περιβάλλονται από εξωκυττάρια διάμεση ουσία την οποία παράγουν. Καθώς η αθηρωματική πλάκα αυξάνεται σε μέγεθος, ο αυλός του αγγείου στενεύει σε διάμετρο. Το φαινόμενο αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση της ποσότητας του αίματος που προσφέρεται στους ιστούς. Όταν τελικά αυτή η μείωση υπερβεί ένα κριτικό όριο, τότε προκαλείται ισχαιμία στους ιστούς και κλινική εκδήλωση της νόσου. Ο πολλαπλασιασμός των ΛΜΚ επάγεται από αυξητικούς παράγοντες που εκκρίνονται τοπικά από τα μακροφάγα. Η

διαδικασία αυτή πιστεύεται ότι είναι αναπόφευκτη και προοδευτικά επιδεινούμενη με την πάροδο του χρόνου.

Όμως κλινικές παρατηρήσεις έχουν αμφισβητήσει τη θεωρία της συνεχούς αύξησης της αθηρωματικής πλάκας. Δεδομένα από αγγειογραφικές μελέτες έδειξαν ότι οι αθηρωματικές πλάκες αυξάνουν σε μέγεθος με περιόδους απότομης αύξησης και περιόδους κατά τις οποίες το μέγεθος παραμένει σταθερό^[297]. Παθολογοανατομικές μελέτες έδειξαν ότι μικρές ρήξεις της αθηρωματικής πλάκας και επακόλουθη δημιουργία μικροθρόμβων τοπικά μπορεί να είναι υπεύθυνες για την εμφάνιση των περιόδων ταχείας ανάπτυξης της αθηρωματικής πλάκας. Έχουν περιγραφεί τρεις τύποι ρήξης της αθηρωματικής πλάκας:

1. Επιφανειακή ρήξη, η οποία χαρακτηρίζεται από τοπική λύση της συνέχειας του ενδοθηλίου που καλύπτει την ινώδη κάψα και επακόλουθη δημιουργία μικροθρόμβου τοπικά. Η διαδικασία της θρόμβωσης ενεργοποιείται από την αλληλεπίδραση των στοιχείων της κυκλοφορίας με τον ιστικό παράγοντα (tissue factor, TF) και τον παράγοντα von Willebrand (vWF), οι οποίοι αποκαλύπτονται λόγω της λύσης της συνέχειας του ενδοθηλίου. Η λύση της συνέχειας του ενδοθηλίου μπορεί να οφείλεται σε απόπτωση των ενδοθηλιακών κυττάρων, η οποία επάγεται από διάφορους διαμεσολαβητές της φλεγμονής που δρουν τοπικά και από την απελευθέρωση κυτταροκινών από τα ενεργοποιημένα φονικά T-λεμφοκύτταρα (killers). Επιπρόσθετα, η oxLDL επάγει την παραγωγή μεταλλοπρωτεϊνών, οι οποίες αποικοδομούν τη βασική μεμβράνη. Παρότι τέτοιες ρήξεις είναι αρκετά συχνές και συνήθως ασυμπτωματικές, προκαλούν περίπου το ¼ των θανατηφόρων οξέων στεφανιαίων επεισοδίων.

2. Ένας δεύτερος μηχανισμός απότομης αύξησης της αθηρωματικής πλάκας αφορά τη ρήξη των μικροαγγείων που σχηματίζονται στο εσωτερικό αθηρωματικών πλακών, ως αποτέλεσμα της νεοαγγειογένεσης. Η διαδικασία της νεοαγγειογένεσης επάγεται από την απελευθέρωση ασιδικού οξέος και αγγειακού παράγοντα ανάπτυξης ενδοθηλίου (vascular endothelial growth factor, VEGF) από τα μακροφάγα. Τέτοια αγγεία είναι ιδιαίτερα ευαίσθητα και επιρρεπή σε μικροαιμορραγίες. Υπάρχουν ενδείξεις για την ύπαρξη *in situ* αιμορραγίας και δημιουργίας μικροθρόμβου. Η επακόλουθη διάσπαση του ινωδογόνου και η απελευθέρωση του αυξητικού παράγοντα των αιμοπεταλίων (platelet derived growth factor, PDGF) από τα αιμοπετάλια έχει ως αποτέλεσμα τη μετανάστευση και τον πολλαπλασιασμό των ΛΜΚ. Ταυτόχρονα τα αιμοπετάλια απελευθερώνουν τον αυξητικό παράγοντα μετασχηματισμού -β (transforming growth factor beta, TGF-β), ο οποίος ενεργοποιεί τη σύνθεση κολλαγόνου από τα ΛΜΚ.

3. Ο τρίτος και πιο συχνός τύπος ρήξης της αθηρωματικής πλάκας είναι η ρήξη της ινώδους κάψας, μια διαδικασία στην οποία συμμετέχει και η φλεγμονή στην αντίστοιχη περιοχή. Διάφορες κυτταροκίνες, όπως η INF-γ, μπορούν να προκαλέσουν σημαντική μείωση της παραγωγής κολλαγόνου από τα ΛΜΚ^[298]. Επίσης, σε αθηρωματικές πλάκες παρατηρείται υπερέκφραση καλλαγονενασών, όπως οι MMP-1, 8 και 13. Μελέτες έδειξαν ότι καθεψίνες, όπως οι S και K, οι οποίες ενεργοποιούνται από τη φλεγμονή στην περιοχή και εκφράζονται

στην αθηρωματική πλάκα, αποικοδομούν την ελαστίνη, ένα άλλο σημαντικό συστατικό της θεμέλιας ουσίας της ινώδους κάψας ^[299].

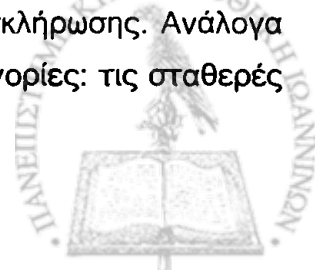
Στις έκκεντρες πλάκες το σημείο ρήξης είναι συνήθως το σημείο στο οποίο η αθηρωματική πλάκα μεταπίπτει στο λιγότερο νοσούν αγγείο, η «ωμική περιοχή της αθηρωματικής πλάκας» όπως ονομάζεται. Η περιοχή αυτή είναι πλούσια σε αφρώδη κύτταρα και το πάχος της ινώδους κάψας είναι λεπτό ^[300]. Η ρήξη της ινώδους κάψας έχει ως αποτέλεσμα την επαφή του ιστικού παράγοντα, ο οποίος βρίσκεται στο εσωτερικό της με τους παράγοντες πήξης της κυκλοφορίας. Τέτοιες ρήξεις προκαλούν τα ¾ των οξέων εμφραγμάτων του μυοκαρδίου, παρότι μπορεί να είναι και ασυμπτωματικές. Η διαδικασία της επούλωσης μιας τέτοιας ρήξης περιλαμβάνει τη διάλυση του θρόμβου, τον πολλαπλασιασμό των ΛΜΚ και την παραγωγή κολλαγόνου από αυτά.

Στην κλινική εκδήλωση της ρήξης της αθηρωματικής πλάκας σημαντικό ρόλο διαδραματίζουν τα αιμοπετάλια. Πρέπει να αναφερθεί ότι η oxLDL έχει σημαντική επίδραση στα αιμοπετάλια. Είναι γνωστό, ότι οι oxLDL της αθηρωματικής πλάκας και κυρίως η lyso-PC που οι oxLDL περιέχουν επάγει την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων ^[301], ενώ oxLDL που έχουν οξειδωθεί παρουσία υποχλωριώδους οξέος επάγουν τόσο την ενεργοποίηση όσο και την προσκόλληση των αιμοπεταλίων ^[302]. Τέλος, έχει βρεθεί ότι ειδικοί ανταγωνιστές του λυσοφωσφατυδυλοχολικού οξέος αναστέλλουν την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων και τη δημιουργία θρόμβων *in vitro* ^[303].

Οι μηχανισμοί με τους οποίους η oxLDL επάγει την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων δεν είναι ακριβώς γνωστοί. Φαίνεται όμως ότι επάγονται διαμέσου ειδικού υποδοχέα εκκαθαριστή, του LOX-1 ^[304], ο οποίος έχει αναδειχθεί στην επιφάνεια τους ^[305,306]. Σχετίζονται μάλιστα με τη μειωμένη ενεργότητα της ενδοθηλιακής συνθετάσης του NO (eNOS) ^[238,307] και με άλλους μηχανισμούς, οι οποίοι αφορούν τα ενδοκυττάρια μικροϊνίδια ^[308,309] και την ενεργότητα της εξαρτώμενης από το Ca⁺⁺ ATPάσης των αιμοπεταλίων ^[310,311].

4.5. ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΕΚΔΗΛΩΣΕΙΣ ΤΗΣ ΑΘΗΡΩΜΑΤΩΣΗΣ

Όπως αναφέρθηκε, η εξέλιξη της αθηρωμάτωσης περνά με την πάροδο του χρόνου από τις λιπώδεις γραμμώσεις στην πλήρη οργάνωση της αθηρωματικής πλάκας. Αυτό συμβαίνει με τη δημιουργία ενός νεκρωτικού λιπιδικού πυρήνα, ο οποίος περιβάλλεται από μια ινώδη κάψα, πλούσια σε ινώδη ιστό και ΛΜΚ. Η ώριμη αυτή αθηρωματική πλάκα μπορεί να παραμείνει για χρόνια ασυμπτωματική και να μεγαλώνει σε μέγεθος μειώνοντας τον αυλό του αγγείου. Κύρια επιπλοκή της αθηρωματικής πλάκας θεωρείται η ρήξη της και η επακόλουθη θρόμβωση, φαινόμενα που αποτελούν την αιτία του κλινικού συνδρόμου της αθηροσκλήρωσης. Ανάλογα με την πιθανότητα ρήξης, οι αθηρωματικές πλάκες χωρίζονται σε 2 κατηγορίες: τις σταθερές και τις ασταθείς.



Η ασταθής αθηρωματική πλάκα έχει κατά κανόνα λεπτή και έκκεντρη ινώδη κάψα και μεγάλο νεκρωτικό πυρήνα από λίπος και νεκρά κύτταρα (*Εικόνα 15*). Τέτοιες πλάκες είναι ασταθείς γιατί αναπτύσσονται δυνάμεις στις θέσεις της λεπτής ινώδους κάψας. Παράλληλα άλλοι παράγοντες, όπως οι μεταλλοπρωτεΐνάσες, υπερεκφράζονται σε περιοχές με λεπτή ινώδη κάψα, ενώ στις ίδιες περιοχές παρατηρείται μεγαλύτερη συγκέντρωση φλεγμονωδών κυττάρων ^[312].

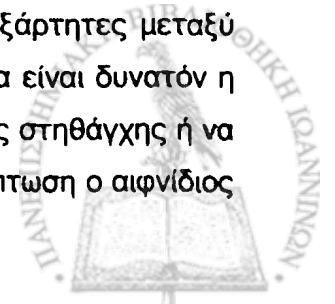
Η αθηρωματική πλάκα είναι ένα δυναμικό περιβάλλον. Σε ένα τέτοιο περιβάλλον παράγοντες που σχετίζονται με τη φλεγμονή και με τη διάσπαση της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας, σε συνδυασμό με παράγοντες και λειτουργίες των ΛΜΚ και του ενδοθηλίου μπορεί να μειώσουν τη σταθερότητα της αθηρωματικής πλάκας ακόμα και όταν ο αυλός δεν εμφανίζει στένωση ικανή να προκαλέσει ισχαιμία ^[313].

Η σταθερότητα της αθηρωματικής πλάκας σχετίζεται με την ισορροπία μεταξύ του μηχανικού στρες, το οποίο αναπτύσσεται στην ινώδη κάψα και των παραγόντων που επηρεάζουν την αντοχή της. Παράγοντες που αυξάνουν το μηχανικό στρες είναι η λεπτή ινώδης κάψα, ο μεγάλος λιπώδης πυρήνας, οι λιγότερο στενωτικές βλάβες και η αυξημένη συγκέντρωση εστέρων (ελεύθερης) χοληστερόλης. Αντίθετα, παράγοντες που προκαλούν μείωση της αντοχής της κάψας είναι η μειωμένη σύνθεση και η αυξημένη αποικοδόμηση (από τις μεταλλοπρωτεΐνάσες) του κολλαγόνου, η αυξημένη συγκέντρωση των μακροφάγων και των T-λεμφοκυττάρων και η μειωμένη συγκέντρωση των ΛΜΚ στο εσωτερικό της αθηρωματικής πλάκας ^[314].

Τα κύτταρα απαντούν στο αυξημένο στρες με έκκριση και οργάνωση της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας (matrix). Κύρια κύτταρα για αυτή την απόκριση είναι τα ΛΜΚ της ινώδους κάψας. Τα ΛΜΚ είναι τα κύρια κύτταρα για την παραγωγή του κολλαγόνου τύπου I και III. Οι συγκεκριμένοι τύποι κολλαγόνου αυξάνουν την αντοχή της αθηρωματικής πλάκας ^[315].

Ο μηχανισμός αυτός αποτυγχάνει στις αθηρωματικές πλάκες που σπάνε λόγω: 1) αυξημένης απόπτωσης ή μειωμένης ανάπτυξης των ΛΜΚ στην ινώδη κάψα, γεγονός που οδηγεί στη μείωση της παραγωγής θεμέλιας ουσίας, 2) περαιτέρω εναπόθεσης λίπους σε μια σταθερή πλάκα που μπορεί να προκαλέσει αστάθεια πριν προλάβουν τα ΛΜΚ να παράγουν επιπλέον matrix και 3) αυξημένης αποικοδόμησης της θεμέλιας ουσίας από ένζυμα τα οποία παράγονται κυρίως από φλεγμονώδη κύτταρα της περιοχής ^[315].

Κλινικές εκδηλώσεις της αθηρωμάτωσης των στεφανιαίων αγγείων αποτελούν η σταθερή στηθάγχη, η ασταθής στηθάγχη και το οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου. Ορισμένες φορές, η κλινική εκδήλωση μπορεί να είναι πιο ήπια οπότε εκδηλώνεται τελικά ως καρδιακή ανεπάρκεια, ενώ άλλες φορές μπορεί να είναι πιο έντονη και δραματική και να εκδηλώνεται ως αιφνίδιος καρδιακός θάνατος. Οι εκδηλώσεις αυτές δεν είναι εντελώς ανεξάρτητες μεταξύ τους, αλλά η μία μπορεί να προηγείται ή να έπεται της άλλης. Συγκεκριμένα είναι δυνατόν η κλινική εικόνα της σταθερής στηθάγχης να μεταπίπτει σε αυτή της ασταθούς στηθάγχης ή να εμφανίζεται μετά από οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου. Υπάρχει ακόμη η περίπτωση ο αιφνίδιος



θάνατος να επέρχεται σε ασθενείς με ιστορικό ασταθούς ή σταθερής στηθάγχης κ.ο.κ. Η καρδιακή ανεπάρκεια συνήθως εμφανίζεται μετά από προηγούμενη κλινική εκδήλωση της νόσου, κυρίως μετά από οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου και σπανιότερα ως πρώτη εκδήλωση της ισχαιμικής καρδιοπάθειας. Τότε ο ασθενής είναι πιθανό να εμφανίζει σιωπηλή ισχαιμία του μυοκαρδίου, δηλαδή επεισόδια ελαττωμένης προσφοράς οξυγόνου στο μυοκάρδιο, τα οποία δεν εκδηλώνονται με πόνο ή άλλο ισοδύναμο στηθάγχης, αλλά με ηλεκτροκαρδιογραφικά ευρήματα συμβατά με μυοκαρδιακή ισχαιμία είτε στην 24ωρη καταγραφή είτε στη δοκιμασία κόπωσης.



Εικόνα 17. Αθηρωματική πλάκα σε στεφανιαίο αγγείο

The first part of the document discusses the importance of maintaining accurate records and the role of the committee in overseeing these processes. It highlights the need for transparency and accountability in all financial transactions and administrative actions.

The second part of the document provides a detailed overview of the current financial status of the organization, including a breakdown of income, expenses, and assets. It also outlines the proposed budget for the upcoming period and the measures being taken to ensure fiscal responsibility.

The final part of the document concludes with a summary of the key findings and recommendations. It emphasizes the need for continued collaboration and communication between all stakeholders to ensure the long-term success and sustainability of the organization.

It is noted that the committee has reviewed the financial statements and found them to be accurate and in compliance with the relevant regulations. The proposed budget is considered reasonable and necessary for the organization's operations.

The committee recommends that the board of directors approve the budget and the financial statements for the current period. It also suggests that the organization should continue to monitor its financial performance closely and report back to the board regularly.

The committee further recommends that the organization should explore opportunities for cost savings and revenue generation to improve its financial health. This could include reviewing contracts, negotiating better terms with suppliers, and seeking out new funding sources.

The committee also notes that the organization has made significant progress in several key areas, including the implementation of new systems and the recruitment of new staff. These achievements are a testament to the hard work and dedication of the organization's employees and volunteers.

However, there are still several challenges that the organization faces, such as the need for additional funding and the need to improve its operational efficiency. The committee believes that these challenges can be overcome through continued effort and collaboration.

In conclusion, the committee is confident that the organization is well-positioned to meet its goals and objectives for the coming year. It encourages all stakeholders to continue to support the organization and work together to create a brighter future.

The committee has also reviewed the organization's policies and procedures and found them to be up-to-date and effective. It recommends that the organization should continue to review and update these documents as needed to ensure they remain relevant and useful.

The committee further recommends that the organization should establish a clear line of communication between the committee and the board of directors. This will ensure that the committee's recommendations are heard and acted upon in a timely manner.

Finally, the committee expresses its appreciation for the support and assistance provided by the board of directors and all other stakeholders. It looks forward to continuing to work with them to improve the organization's performance and achieve its mission.



ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5^ο

ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ ΚΑΤΑ ΤΗΣ oxLDL

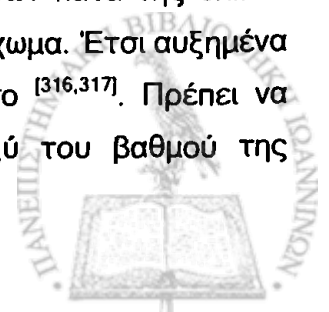
5.1. ΓΕΝΙΚΑ

Μεταξύ των πολλών βιολογικών ιδιοτήτων που εμφανίζει η oxLDL υπάρχουν στοιχεία της έντονης αντιγονικότητας των οξειδωτικά τροποποιημένων μορφών των λιποπρωτεϊνικών αυτών σωματιδίων. Τα αντισώματα κατά της oxLDL ανακαλύφθηκαν τυχαία από τον Beumont σε ένα ασθενή με πολλαπλό μυέλωμα και υπερλιπιδαιμία. Οι συγκεκριμένοι ερευνητές αρχικά απομόνωσαν ένα ανοσοσύμπλεγμα το οποίο όρισαν ως παράγοντα X. Το σύμπλεγμα αυτό ανιχνεύθηκε αργότερα σε θραύσματα β-λιποπρωτεϊνών και γ-σφαιρινών. Δέκα χρόνια αργότερα, μια ερευνητική ομάδα από τη Σουηδία επέκτεινε την παρατήρηση του Beumont κάνοντας αναφορά στην παρουσία αυτοαντισωμάτων κατά της oxLDL και σε άλλα νοσήματα, τα οποία δεν σχετίζονται με την αθηρωματική νόσο. Αυτοαντισώματα κατά της oxLDL ανιχνεύθηκαν σε ασθενείς με πρωτοπαθή χρόνια πολυαρθρίτιδα και καρκίνο του μαστού. Αντισώματα κατά της oxLDL παρατηρήθηκαν επιπλέον σε ασθενείς με σακχαρώδη διαβήτη, νεφρική ανεπάρκεια και ουραιμία. Επίσης το κάπνισμα σε συνδυασμό με την υπερχοληστερολαιμία αυξάνει τους τίτλους των αυτοαντισωμάτων κατά της oxLDL.

5.1.1. ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ ΚΑΙ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑ ΤΩΝ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ ΚΑΤΑ oxLDL

Ο μηχανισμός του σχηματισμού των αυτοαντισωμάτων κατά της oxLDL δεν έχει διευκρινισθεί πλήρως. Στο σωματίδιο των oxLDL περιέχεται ένας μεγάλος αριθμός επιτόπων κατά των οποίων παράγονται πολυκλωνικά αυτοαντισώματα. Τα αυτοαντισώματα αυτά κατευθύνονται κατά διαφόρων οξειδωμένων φωσφολιπιδίων, αλλά και κατά της τροποποιημένης apoB-100 από δραστικές αλδεϋδες, όπως η MDA και η 4-HNE. Τα αυτοαντισώματα κατά της oxLDL ανιχνεύονται είτε στο εσωτερικό αθηρωματικών πλακών είτε ως συστατικά των κυκλοφορούντων ανοσοσυμπλεγμάτων.

Οι ιδιότητες και η σημασία των αντισωμάτων κατά της oxLDL δεν είναι πλήρως γνωστές. Παράγονται κατά τη διάρκεια αλλαγών στη δομή των λιποπρωτεϊνών. Παρόλα αυτά, αντισώματα κατά της oxLDL τόσο τύπου IgG όσο και τύπου IgM είναι παρόντα σε φυσιολογικά υγιή άτομα. Τα δεδομένα αυτά υποδηλώνουν την πολυπλοκότητα της χυμικής ανοσίας στην αθηρογένεση. Είναι πιθανό ότι η φυσιολογική λειτουργία των αντισωμάτων κατά της oxLDL είναι η απομάκρυνση της oxLDL από την κυκλοφορία και το αρτηριακό τοίχωμα. Έτσι αυξημένα επίπεδα αντισωμάτων πιθανά προστατεύουν από την αθηρωματική νόσο^[316,317]. Πρέπει να αναφερθεί ότι, πολλές μελέτες έδειξαν μια θετική συσχέτιση μεταξύ του βαθμού της



αθηροσκλήρωσης και των επιπέδων των αντισωμάτων κατά της oxLDL. Έτσι από διάφορους μελετητές αναφέρεται ότι τα αυτοαντισώματα κατά της oxLDL ευοδώνουν, διαμέσου της διαδικασίας της οψονινοποίησης, τη φαγοκυττάρωση των oxLDL από τα μακροφάγα, επάγοντας έτσι το σχηματισμό των αφρωδών κυττάρων και την εξέλιξη της αθηρωμάτωσης^[198, 233,317].

5.1.2. ΚΑΤΗΓΟΡΙΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ ΚΑΤΑ ΟΧLDL

Τα αντισώματα κατά της oxLDL δεν είναι μια ομογενής ομάδα αλλά ένας ετερογενής πληθυσμός σωματιδίων τα οποία ανάλογα με τον τύπο της ανοσοσφαιρίνης ή ανάλογα με την εκδήλωσή τους χωρίσθηκαν από τους Riesen and Nosedá στις εξής κατηγορίες^[318]:

1. Ισοαντισώματα που παράγονται λόγω πολυμορφισμών της HDL και LDL

Ανακαλύφθηκαν για πρώτη φορά σε ασθενείς με θαλασσαιμία που είχαν υποβληθεί σε επαναλαμβανόμενες μεταγγίσεις αίματος.

2. Αντισώματα που κατευθύνονται κατά του λιπιδαιμικού περιεχομένου της LDL

Αυτού του τύπου τα αντισώματα ανιχνεύονται είτε σε ασθενείς με πολλαπλό μυέλωμα είτε σε ασθενείς με οικογενή υπερλιπιδαιμία με τη μορφή πολυκλωνικών αντισωμάτων. Φαίνεται ότι σε αυτή την περίπτωση τα φωσφολιπίδια των σωματιδίων της oxLDL και ειδικότερα αυτά που έχουν υποστεί τροποποίηση διαμέσου αντιδράσεων οξειδωσης είναι οι αντιγονικοί επίτοποι.

3. Αντισώματα κατά της τροποποιημένης apoB-100

Αυτή η κατηγορία αντισωμάτων κατά της oxLDL συσχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο για αθηροσκλήρωση. Συνήθως ανιχνεύονται σε ασθενείς με οικογενή υπερχοληστερολαιμία, η οποία αποτελεί αιτία πρόωρης αθηροσκλήρωσης. Τα αντισώματα αυτού του τύπου μπορεί να είναι μονοκλωνικά ή πολυκλωνικά.

Τα αντισώματα κατά της oxLDL είναι τύπου IgA, IgM και IgG. Τα αυτοαντισώματα τύπου IgA κατά oxLDL δεν είναι ειδικά για το ανθρώπινο είδος, ενώ τα IgG αντισώματα κατά oxLDL αντιδρούν αποκλειστικά με ανθρώπινες λιποπρωτεΐνες^[318].

5.2. ΜΟΝΟΚΛΩΝΙΚΑ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ ΚΑΤΑ ΟΧLDL

Τα apoE⁺ ποντίκια αποτελούν ένα ευρέως χρησιμοποιούμενο μοντέλο για τη μελέτη της αθηρωμάτωσης. Τα ποντίκια αυτά έχουν την ικανότητα να παράγουν τίτλους αυτοαντισωμάτων κατά της oxLDL χωρίς να χρειάζονται προηγούμενη ανοσοποίηση στα αντίστοιχα αντιγόνα. Οι Shaw και συν.^[319] έδειξαν ότι τα αντισώματα αυτά ανήκουν σε μια

κατηγορία φυσικών αντισωμάτων, τα οποία είναι γνωστά και ως αντισώματα ιδιότυπου T15. Τα αντισώματα αυτά συμμετέχουν στην ανοσολογική απόκριση που προκαλείται από τη φωσφατιδυλοχολίνη^[320].

Στηριζόμενοι σε αυτές τις παρατηρήσεις οι Pallinski και συν.^[321,322] παρήγαγαν μονοκλωνικά αντισώματα από σπλήνες ηλικιωμένων $\text{apoE}^{-/-}$ ποντικών. Όλα τα μονοκλωνικά αντισώματα που απομονώθηκαν ήταν τύπου IgM. Το περισσότερο μελετημένο από αυτά, το E06, αντιδρά με την POVPC που απαντά στην oxLDL, όχι όμως με την μη οξειδωμένη PAPC. Το E06 εμφανίζει διάφορες δράσεις, αφού προσδέεται εξειδικευμένα στην oxLDL και παρεμποδίζει τη συσσώρευση των λιπιδίων στα μακροφάγα. Ένα άλλο χαρακτηριστικό του E06 είναι ότι δεν μπορεί να διαχωρισθεί από τα φυσικά αντισώματα T15 τα οποία εκκρίνονται από τα Β-λεμφοκύτταρα. Κατά συνέπεια το αντίσωμα αυτό αναφέρεται συχνά και ως T15/E06^[323,320].

Οι Binder και συν.^[324] έδειξαν ότι ανοσοποίηση ποντικών τύπου C57BL/6 με MDA-LDL (Εικόνα 18) οδήγησε σε μια αυξημένη επίκτητη ανοσολογική απόκριση και κατά συνέπεια σε αυξημένους τίτλους του T15/E06 φυσικού αντισώματος.

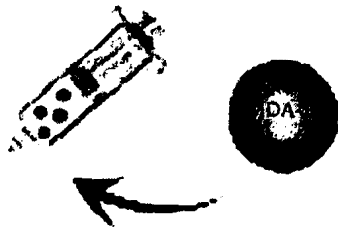
Οι Itabe και οι συν.^[5] προσπάθησαν να παράγουν μονοκλωνικά αντισώματα κατά οποιουδήποτε συστατικού που συσσωρεύεται σε ανθρώπινες αθηροσκληρωτικές βλάβες. Στην προσπάθειά τους αυτή, παρασκεύασαν ένα μονοκλωνικό αντίσωμα κατά της oxLDL. Ποντίκια ανοσοποιήθηκαν με ομογενοποίηση ανθρώπινης αθηρωματικής πλάκας. Στη συνέχεια παρασκευάστηκαν υβριδώματα συντήκοντας μυελωματικά κύτταρα, καθώς και κύτταρα σπληνός από τα ανοσοποιημένα ποντίκια.

Επιλέχθηκαν τα υβριδώματα τα οποία εμφάνισαν δραστικότητα κατά της επαγόμενης από ιόντα χαλκού οξειδωσης των LDL σε μέσο καλλιέργειας. Τελικά κλωνοποίησαν μία κυτταρική σειρά, την DLH3. Η σειρά αυτή παρήγαγε αντισώματα τύπου IgM που προσδένονταν ειδικά στην oxLDL, αλλά όχι στην LDL που είχε υποστεί τροποποίηση με MDA (MDA-LDL).

Οι Holvoet και συν.^[287] επίσης παρασκεύασαν ένα anti-oxLDL μονοκλωνικό αντίσωμα, το 4E6, το οποίο προσδέεται τόσο στην MDA-LDL όσο και στην oxLDL. Τα αντισώματα αυτά χρησιμοποιήθηκαν σε απλούς προσδιορισμούς ELISA για τον προσδιορισμό της oxLDL που είναι παρούσα στο πλάσμα, καθώς επίσης και σε πειράματα ανοσοαποτύπωσης για την ανίχνευση oxLDL σε αθηρωματικές βλάβες.



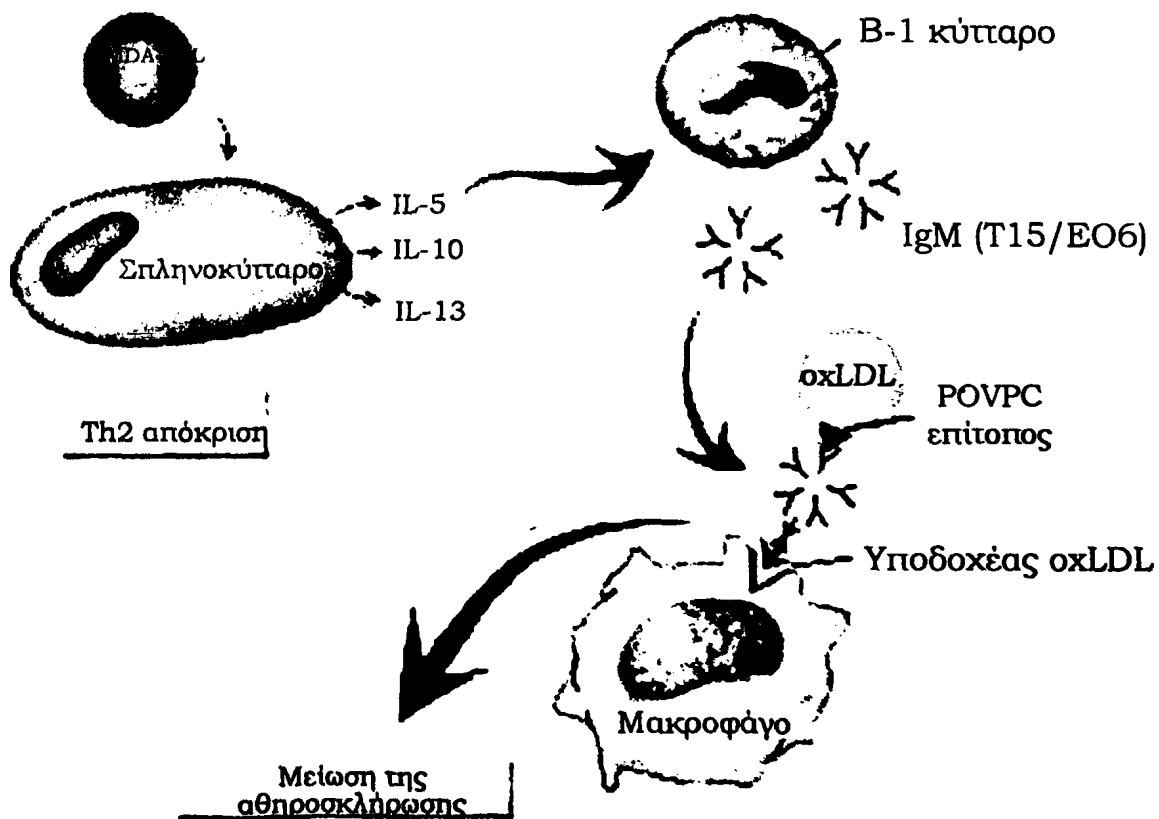
Ανοσοποίηση
με MDA-LDL



LDL receptor-deficient ποντίκι

Επίκτητη ανοσολογική
απόκριση

Φυσική ανοσολογική
απόκριση



Εικόνα 18. Παραγωγή μονοκλωνικών αντισωμάτων

5.3. ΑΥΤΟΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ ΚΑΤΑ oxLDL ΣΕ ΔΙΑΦΟΡΕΣ ΠΑΘΗΣΕΙΣ

Αντισώματα κατά της oxLDL έχουν αναγνωρισθεί σε πολλές παθολογικές καταστάσεις. Οι περισσότερες αποτελούν παράγοντες κινδύνου για την αθηρωμάτωση και την καρδιαγγειακή νόσο ^[325]. Αυτοαντισώματα κατά της oxLDL έχουν επίσης αναγνωρισθεί σε φυσιολογικούς ενήλικες ^[326] και έχουν συσχετιστεί με το πάχος του έσω-μέσου χιτώνα της

καρωτίδας ^[327], σε αθλητές ύστερα από έντονη προπόνηση ^[328], καθώς επίσης και σε παιδιά^[329,330].

5.3.1. ΑΥΤΟΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ ΚΑΤΑ oxLDL ΚΑΙ ΔΥΣΛΙΠΙΔΑΙΜΙΕΣ

Οι ασθενείς με δυσλιπιδαιμίες αποτελούν μια ετερογενή ομάδα ασθενών με αυξημένα επίπεδα λιπιδίων αίματος. Οι διαταραχές αυτές των λιπιδίων μπορεί να είναι κληρονομικές (πρωτοπαθείς) ή επίκτητες (δευτεροπαθείς).

Στις πρωτοπαθείς δυσλιπιδαιμίες ανήκουν η οικογενής δυσλιπιδαιμία, ομόζυγη (συχνότητα 1/1.000.000 άτομα στο γενικό πληθυσμό) ή ετερόζυγη (1/500 - 1/270 άτομα στο γενικό πληθυσμό), διαταραχές της ApoB-100, η οικογενής πολυγονιδιακή υπερχοληστερολαιμία με συχνότητα 1/100-1/20 άτομα στο γενικό πληθυσμό, η οικογενής συνδυασμένη υπερλιπιδαιμία και άλλα πιο ειδικά και σπάνια σύνδρομα. Τέτοια είναι το σύνδρομο της χυλομικροναϊμίας, η οικογενής υπερτριγλυκεριδαϊμία και η οικογενής υπο-αλφα-λιποπρωτεϊναιμία ^[331].

Στις δευτεροπαθείς δυσλιπιδαιμίες ανήκουν οι διαταραχές των επιπέδων των λιπιδίων ορού, που προκαλούνται από άλλες παθολογικές καταστάσεις, όπως ο σακχαρώδης διαβήτης, το νεφρωσικό σύνδρομο και η χρόνια νεφρική ανεπάρκεια, οι διαταραχές του θυρεοειδούς, τα αυτοάνοσα νοσήματα και οι ηπατοπάθειες. Επιπλέον, αιτίες δευτεροπαθούς δυσλιπιδαιμίας αποτελούν ουσίες που επιδρούν στο μεταβολισμό των λιποπρωτεϊνών, όπως το αλκοόλ, τα διουρητικά, οι β-αποκλειστές, τα γλυκοκορτικοειδή και οι στεροειδείς ορμόνες^[332]. Ανεξάρτητα από την αιτιολογία τους, οι δυσλιπιδαιμίες έχουν συσχετισθεί με την εμφάνιση και τις κλινικές εκδηλώσεις της αθηρωματικής νόσου και ειδικότερα της πρώιμης στεφανιαίας νόσου, ήδη από τη δεκαετία του 1970 ^[333, 334].

Υποστηρίζεται ότι οι διαταραχές του μεταβολισμού των λιπιδίων σε ασθενείς με δυσλιπιδαιμία σχετίζονται τόσο με τα αυξημένα επίπεδα oxLDL ^[205-208], όσο και με τους αυξημένους τίτλους αυτοαντισωμάτων κατά της oxLDL. Η πλάσμαφαίρεση της LDL οδηγεί σε μείωση των επιπέδων των αυτοαντισωμάτων κατά της oxLDL ^[335]. Οι Heitzer και συν.^[336] έδειξαν ότι αυξημένοι τίτλοι αυτοαντισωμάτων κατά oxLDL σε ασθενείς με δυσλιπιδαιμία σχετίζονται θετικά με διαταραχές της λειτουργικότητας του ενδοθηλίου. Φαίνεται μάλιστα ότι οι τίτλοι κυρίως των IgM αυτοαντισωμάτων κατά oxLDL σχετίζονται κυρίως με τις μικρές πυκνές LDL ^[337]. Αντίθετα, υπάρχουν μελέτες οι οποίες έδειξαν ότι σε ασθενείς με οικογενή δυσλιπιδαιμία (ομόζυγη ή ετερόζυγη) οι τίτλοι των αυτοαντισωμάτων κατά της oxLDL δεν είναι αυξημένοι σε σύγκριση με υγιείς εθελοντές ^[338]. Επίσης, στην ίδια μελέτη οι τίτλοι των αυτοαντισωμάτων αυτών δεν αποτελούσαν ανεξάρτητο παράγοντα κινδύνου για την εμφάνιση αθηροσκλήρωσης, που εκτιμήθηκε με το πάχος του έσω-μέσου χιτώνα (IMT) των καρωτίδων ^[339].



Τα αντικρουόμενα αποτελέσματα των διαφόρων μελετών μπορούν να ερμηνευθούν τουλάχιστον εν μέρει από το γεγονός ότι στις μελέτες αυτές έχουν χρησιμοποιηθεί διάφορα αντιγόνα και έχουν προσδιορισθεί διαφορετικοί τίτλοι αυτοαντισωμάτων (IgM ή IgG). Πρέπει επίσης να τονισθεί ότι σε ασθενείς με δυσλιπιδαιμία, οι τίτλοι των αυτοαντισωμάτων κατά της oxLDL δεν σχετίζονται με τα επίπεδα της LDL χοληστερόλης του ορού ^[338,339]. Η συγκεκριμένη απουσία συσχέτισης παρατηρήθηκε και σε ασθενείς με επιβεβαιωμένη στεφανιαία νόσο, οι οποίοι υποβλήθηκαν σε επέμβαση επαναγγείωσης των στεφανιαίων αγγείων ^[340]. Η παρατήρηση αυτή μπορεί να υποδηλώνει ότι η συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων της LDL χοληστερόλης του ορού, της ανοσολογικής απάντησης του οργανισμού στην oxLDL και της εξέλιξης της αθηρωματικής νόσου είναι πολύ πιο πολύπλοκη ^[338].

5.3.2. ΑΥΤΟΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ ΚΑΤΑ OXLDL ΚΑΙ ΣΑΚΧΑΡΩΔΗΣ ΔΙΑΒΗΤΗΣ

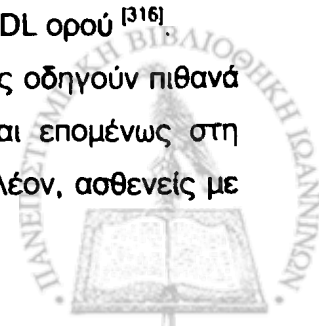
Ο σακχαρώδης διαβήτης αποτελεί έναν από τους κυριότερους ανεξάρτητους παράγοντες κινδύνου για την εμφάνιση καρδιαγγειακής νόσου, παρότι ο υποκείμενος παθοφυσιολογικός μηχανισμός δεν είναι απόλυτα κατανοητός ^[341].

Μελέτες έδειξαν ότι ασθενείς με σακχαρώδη διαβήτη εμφανίζουν αυξημένους τίτλους αυτοαντισωμάτων κατά oxLDL σε σύγκριση με υγιείς εθελοντές ^[342]. Τα ευρήματα αυτά αφορούν τόσο τους ασθενείς με μη ινσουλινοεξαρτώμενο ^[343], όσο και αυτούς με ινσουλινοεξαρτώμενο ^[344,345] σακχαρώδη διαβήτη. Οι τίτλοι αυτοί των αυτοαντισωμάτων πιθανά σχετίζονται με την αυξημένη πυκνότητα των LDL σε πολυακόρεστα λιπαρά οξέα ^[346] και τη γλυκοζυλίωση των LDL ^[343] σε ασθενείς με σακχαρώδη διαβήτη. Οι τίτλοι των αυτοαντισωμάτων αποτελούν ανεξάρτητο παράγοντα κινδύνου για την εμφάνιση μικροαγγειοπάθειας ^[347] και στεφανιαίας νόσου σε αυτούς τους ασθενείς ^[348-350].

5.3.3. ΑΥΤΟΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ ΚΑΤΑ OXLDL ΚΑΙ ΥΠΕΡΤΑΣΗ

Τα αποτελέσματα διαφόρων μελετών για το ρόλο των αυτοαντισωμάτων κατά της oxLDL σε ασθενείς με αρτηριακή υπέρταση είναι αντικρουόμενα. Παλαιότερες μελέτες έδειξαν ότι ασθενείς με χρόνια αρτηριακή υπέρταση εμφάνιζαν αυξημένους τίτλους αυτοαντισωμάτων κατά LDL οξειδωμένης παρουσία Cu^{2+} , καθώς και κατά MDA-LDL σε σύγκριση με υγιείς νορμοτασικούς εθελοντές ^[351]. Όμως νεώτερες μελέτες σε ασθενείς με οριακή υπέρταση δεν επιβεβαίωσαν τα παραπάνω αποτελέσματα. Αντίθετα, έδειξαν ότι οι τίτλοι αυτοαντισωμάτων κατά διαφόρων μορφών της oxLDL είναι μειωμένοι σε σύγκριση με υγιείς εθελοντές ^[316], ενώ παράλληλα οι ασθενείς με οριακή υπέρταση εμφάνιζαν αυξημένα επίπεδα oxLDL ορού ^[316].

Τα αυξημένα αυτά επίπεδα της oxLDL ορού σε αυτούς τους ασθενείς οδηγούν πιθανά σε μεγαλύτερη σύνδεσή τους με τα κυκλοφορούντα αυτοαντισώματα και επομένως στη μείωση των τίτλων των μετρούμενων αυτοαντισωμάτων στο αίμα ^[316]. Επιπλέον, ασθενείς με



χρόνια νεφρική ανεπάρκεια και υπέρταση είχαν αυξημένους τίτλους αυτοαντισωμάτων κατά της oxLDL, οι οποίοι ήταν ανεξάρτητοι προγνωστικοί παράγοντες κινδύνου για καρδιαγγειακή θνητότητα ^[352]. Από τα παραπάνω προκύπτει ότι πιθανά ο ρόλος των αυτοαντισωμάτων είναι προστατευτικός στα πρώιμα αλλά όχι στα όψιμα στάδια της εξέλιξης της αρτηριακής υπέρτασης ^[201].

Οι έγκυες γυναίκες με αυξημένα επίπεδα της αρτηριακής πίεσης είναι μια ιδιαίτερη ομάδα ασθενών με υπέρταση. Γυναίκες με πρωτοεμφανιζόμενη αρτηριακή υπέρταση στην εγκυμοσύνη δεν εμφανίζουν αυξημένους τίτλους αυτοαντισωμάτων κατά της oxLDL ^[353]. Αντίθετα, γυναίκες με προεκλαμψία και εκλαμψία εμφανίζουν αυξημένους τίτλους αυτοαντισωμάτων σε σύγκριση με γυναίκες που έχουν φυσιολογική εγκυμοσύνη. Το εύρημα αυτό συνδυάζεται πιθανά με το αυξημένο οξειδωτικό στρες που παρατηρείται στις παραπάνω καταστάσεις ^[354,355].

5.3.4. ΑΥΤΟΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ ΚΑΤΑ oxLDL ΚΑΙ ΑΘΗΡΩΜΑΤΙΚΗ ΝΟΣΟΣ

Όπως έχει αναφερθεί, η οξείδωση της LDL αποτελεί το κύριο στάδιο στην εξέλιξη της αθηρωματικής πλάκας. Είναι επομένως λογικό ότι σε ασθενείς με έκδηλη στεφανιαία νόσο, η εκτεταμένη αθηρωματική νόσος συνδυάζεται με αυξημένη οξείδωση των LDL και επομένως με αυξημένη παραγωγή αυτοαντισωμάτων κατά των διαφόρων επιτόπων που παράγονται από την οξείδωση. Την τελευταία δεκαετία μεγάλος αριθμός μελετών προσπάθησαν να επιβεβαιώσουν την παραπάνω υπόθεση και να διερευνήσουν τυχόν διαφορές στους τίτλους των αυτοαντισωμάτων μεταξύ ασθενών με διάφορες κλινικές εκδηλώσεις της αθηρωματικής νόσου. Πράγματι σε ασθενείς που υποβλήθηκαν σε αορτοστεφανιαία παράκαμψη βρέθηκε ότι αθηρωματικές πλάκες πλούσιες σε λιπίδια και επομένως πιο επιρρεπείς σε ρήξη σχετίζονταν άμεσα με τους τίτλους των IgM αυτοαντισωμάτων κατά της oxLDL ^[356]. Επιπρόσθετα, μελέτες σε ασθενείς που υποβλήθηκαν σε αγγειοπλαστική έδειξαν μια άμεση συσχέτιση των επιπέδων των αυτοαντισωμάτων κατά της oxLDL τόσο με την εξέλιξη της νόσου βραχυπρόθεσμα σε τμήματα εκτός του τμήματος της αγγειοπλαστικής ^[357], όσο και με την πιθανότητα επαναστένωσης στο σημείο της αγγειοπλαστικής μέσα στο 1^ο εξάμηνο από την επέμβαση ^[358].

5.3.4.1. Αυτοαντισώματα κατά oxLDL και σταθερή στηθάγχη

Ασθενείς με αγγειογραφικά επιβεβαιωμένη στεφανιαία νόσο και συμπτωματολογία συμβατή με σταθερή στηθάγχη εμφανίζουν αυξημένους τίτλους αυτοαντισωμάτων σε σύγκριση με υγιείς εθελοντές ^[48,359], αλλά και με ασθενείς οι οποίοι εμφάνιζαν το κλινικό σύνδρομο αλλά δεν είχαν σημαντικές βλάβες στη στεφανιογραφία ^[360,361].

5.3.4.2. Αυτοαντισώματα κατά oxLDL και οξεία στεφανιαία επεισόδια



Τα οξέα στεφανιαία επεισόδια χωρίζονται τα τελευταία χρόνια σε οξέα στεφανιαία επεισόδια χωρίς εμμένουσα ανάσπαση του ST και σε αυτά με εμμένουσα ανάσπαση του ST διαστήματος στο ηλεκτροκαρδιογράφημα. Υπάρχουν σαφείς παθοφυσιολογικές διαφορές στην παθογένεια των διαφόρων οξέων στεφανιαίων συνδρόμων. Ανεξάρτητα από τους διαφορετικούς παθοφυσιολογικούς μηχανισμούς, κοινό εύρημα στην ενδήλωση ενός στεφανιαίου συνδρόμου είναι η ρήξη της αθηρωματικής πλάκας και η έκθεση των στοιχείων της στην κυκλοφορία. Αυτή είναι πιθανά και η εξήγηση για την άμεση (εντός 6 ωρών) αύξηση των τίτλων των αυτοαντισωμάτων κατά οξειδωμένων φωσφολιπιδίων και κατά της Lp(a) που παρατηρήθηκαν σε ασθενείς που υποβλήθηκαν σε αγγειοπλαστική ^[362], μια διαδικασία που σχετίζεται επίσης με σύνθλιψη της αθηρωματικής πλάκας.

Οι Τσιμίκας και συν. ^[77] μελέτησαν τις μεταβολές στους τίτλους των αυτοαντισωμάτων κατά της oxLDL σε ασθενείς με οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου (OEM), ασταθή στηθάγχη, σταθερή στηθάγχη και υγιείς εθελοντές. Στη μελέτη αυτή παρατηρήθηκε ότι οι τίτλοι των IgM και IgG αυτοαντισωμάτων κατά oxLDL αυξήθηκαν τον πρώτο μήνα μετά το οξύ επεισόδιο τόσο σε ασθενείς με OEM όσο και στους ασθενείς με ασταθή στηθάγχη. Οι τίτλοι αυτοί έδειξαν μια τάση μείωσης προς τις αρχικές τιμές στη διάρκεια του χρόνου παρακολούθησης. Παρόλα αυτά, παρέμειναν υψηλότεροι σε σύγκριση με τους αντίστοιχους τίτλους σε ασθενείς με σταθερή στηθάγχη και τους υγιείς εθελοντές. Τέτοιοι αυξημένοι τίτλοι αυτοαντισωμάτων κατά oxLDL σε παλαιότερες μελέτες φαίνεται ότι αποτελούν ανεξάρτητο παράγοντα κινδύνου για την εμφάνιση μη θανατηφόρου ^[363,364], ή θανατηφόρου OEM ^[365]. Αντίθετα, δεν φαίνονται να συσχετίζονται με τα επίπεδα της LDL χοληστερόλης του ορού ^[340,363,366], αλλά και με τα επίπεδα της θρομβοξάνης-A₂ και της προστακυκλίνης που συμμετέχουν στην παθογένεια του OEM^[364]. Τα αυτοαντισώματα κατά της oxLDL δεν είναι γνωστό αν μπορούν να διαχωρίσουν τους ασθενείς με ασταθή στηθάγχη από αυτούς με σταθερή στηθάγχη. Σε αρκετές μελέτες οι ασθενείς με ασταθές σύνδρομο εμφανίζουν αυξημένους τίτλους αυτοαντισωμάτων σε σύγκριση με τους ασθενείς με σταθερή στηθάγχη ^[48,189,190,367]. Σε κάποιες άλλες μελέτες ωστόσο δεν παρατηρούνται τέτοιες διαφορές ^[368]. Οι διαφορές αυτές πιθανά να οφείλονται στο είδος των αυτοαντισωμάτων που κάθε μελέτη χρησιμοποιεί. Έτσι φαίνεται ότι τόσο τα επίπεδα όσο και οι τίτλοι των αυτοαντισωμάτων κατά της MDA-LDL είναι οι καλύτεροι δείκτες ^[48,369], καθώς και άλλες παράμετροι, όπως ο χρόνος από την έναρξη του οξέος επεισοδίου μέχρι την αιμοληψία.

5.4. Ο ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ ΑΥΤΟΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ ΣΤΗΝ ΑΘΗΡΩΜΑΤΩΣΗ

Υπάρχουν αρκετές μελέτες που καταδεικνύουν την παρουσία αυτοαντισωμάτων κατά της oxLDL τόσο σε ασθενείς με γνωστή στεφανιαία νόσο, όσο και σε ασθενείς με παράγοντες κινδύνου για την εμφάνιση αθηρωμάτωσης. Όμως, όπως ήδη αναφέρθηκε, στη βιβλιογραφία



υπάρχει διχογνωμία για το ρόλο που αυτά τα αυτοαντισώματα διαδραματίζουν, εάν δηλαδή δρουν προστατευτικά ή ευοδώνουν την εξέλιξη της αθηρωμάτωσης.

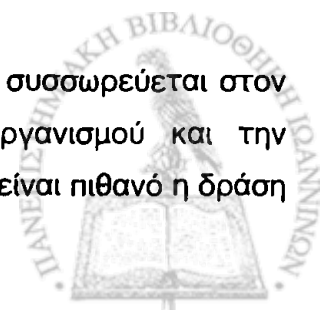
Πράγματι, η oxLDL προάγει τη δημιουργία αυτοαντισωμάτων από τα Β-κύτταρα, τα οποία σε πειραματικά μοντέλα φαίνεται να «αδρανοποιούν» τα αντιγόνα^[370,371]. Πιθανά λοιπόν η χυμική ανοσία με την δημιουργία αυτοαντισωμάτων κατά της oxLDL μπορεί να διαδραματίζει προστατευτικό ρόλο στην εξέλιξη της αθηρωμάτωσης. Πράγματι, τέτοια αυτοαντισώματα ανιχνεύονται σε υγιείς ενήλικες εθελοντές και σε παιδιά. Συγκεκριμένα, παιδιά χωρίς στεφανιαία νόσο, μητέρων με οικογενή δυσλιπιδαιμία εμφανίζουν υψηλότερους τίτλους αυτοαντισωμάτων κατά της oxLDL σε σύγκριση με υγιείς ενήλικες^[330]. Είναι πιθανό τέτοια αντισώματα να «αδρανοποιούν» το αντιγόνο και να προστατεύουν έτσι από την εμφάνιση και την εξέλιξη της αθηρωμάτωσης. Τα αποτελέσματα μελετών σε ασθενείς με οριακή υπέρταση^[316] και σακχαρώδη διαβήτη^[349] υποστηρίζουν αυτή την άποψη. Μάλιστα μελέτες σε υγιείς εθελοντές χωρίς κλινικά σημεία ύποπτα για στεφανιαία νόσο έδειξαν αντίστροφη συσχέτιση μεταξύ των αυτοαντισωμάτων κατά της oxLDL και των επιπέδων της oxLDL ορού^[326], αλλά και του πάχους του έσω-μέσου χιτώνα (IMT) των καρωτίδων^[327].

Αντίθετα, διάφορες μελέτες έδειξαν την ύπαρξη ανοσοσφαιρινών που αναγνωρίζουν την oxLDL σε αθηρωματικές πλάκες^[317]. Επιπρόσθετα, όπως ήδη αναφέρθηκε, υπάρχουν πλήθος μελετών στις οποίες τα επίπεδα αυτοαντισωμάτων κατά της oxLDL είναι ανεξάρτητος παράγοντας κινδύνου τόσο για την ύπαρξη όσο και για την έκταση της αθηρωματικής νόσου. Η ύπαρξή τους σχετίζεται επίσης και με αυξημένη πιθανότητα για επαναστένωση μετά από αγγειοπλαστική στα στεφανιαία αγγεία^[358], αλλά και με τις κλινικές εκδηλώσεις της περιφερικής αρτηριοπάθειας^[368].

Η παρουσία αντισωμάτων μπορεί να οδηγήσει σε οψώνιση των αντιγόνων (των αντιγονικών επιτόπων στο σωματίδιο της oxLDL), με αποτέλεσμα την ευόδωση της σύνδεσης των συμπλεγμάτων αυτών στα φαγοκύτταρα και την αντιγονοπαρουσιαστικότητά τους στα Τ-λεμφοκύτταρα. Με αυτό τον τρόπο είναι δυνατό να πυροδοτούν έντονη ανοσολογική απάντηση που μπορεί να προκαλέσει σημαντική ιστική βλάβη, όπως αυτή που παρατηρείται στις αθηρωματικές πλάκες^[317].

Πρέπει να τονισθεί ότι τα αυτοαντισώματα κατά oxLDL είναι μια ετερογενής ομάδα αντισωμάτων, η οποία περιλαμβάνει διάφορα υποκλάσματα όπως, IgA, IgG1, IgG2, IgG3 και IgM, καθώς και ειδικούς ιδιότυπους^[372]. Είναι πιθανό τα διάφορα αυτά υποκλάσματα να έχουν και διαφορετικές βιολογικές δράσεις. Έτσι είναι πιθανό τα αντικρουόμενα αποτελέσματα των διαφόρων μελετών να σχετίζονται άμεσα με τις πιθανές διαφορετικές δράσεις των διαφόρων υποκλασμάτων των αυτοαντισωμάτων κατά oxLDL που ανιχνεύονται σε αυτές. Αυτή όμως η υπόθεση δεν έχει διερευνηθεί ακόμα πλήρως^[317].

Φαίνεται τελικά ότι η έντονη αντιγονικότητα της oxLDL, η οποία συσσωρεύεται στον υποενδοθηλιακό χώρο, έχει ως αποτέλεσμα την αντίδραση του οργανισμού και την ενεργοποίηση τόσο της κυτταρικής, όσο και της χυμικής ανοσίας. Αρχικά είναι πιθανό η δράση



αυτή του ανοσολογικού μηχανισμού να είναι προστατευτική, αφού αδρανοποιεί τα συστατικά της oxLDL που έχουν έντονη βιολογική δραστικότητα. Όσο όμως αυξάνεται η συσσώρευση της oxLDL στο εσωτερικό της αθηρωματικής πλάκας, τόσο αυτοί οι μηχανισμοί ανεπαρκούν. Αποτέλεσμα αυτής της ανεπάρκειας είναι η εξέλιξη των αθηρωματικών βλαβών, στις οποίες η αυξημένη συγκέντρωση της oxLDL σχετίζεται άμεσα με την αυξημένη συγκέντρωση φλεγμονωδών κυττάρων και αυτοαντισωμάτων. Τα αυτοαντισώματα αυτά πλέον συμμετέχουν στο φαύλο κύκλο της εξέλιξης της αθηρωμάτωσης και των κλινικών επιπλοκών της και αποκτούν έτσι αθηρογόνο παρά προστατευτικό ρόλο.



ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6^ο

ΣΤΑΤΙΝΕΣ

6.1. ΓΕΝΙΚΑ

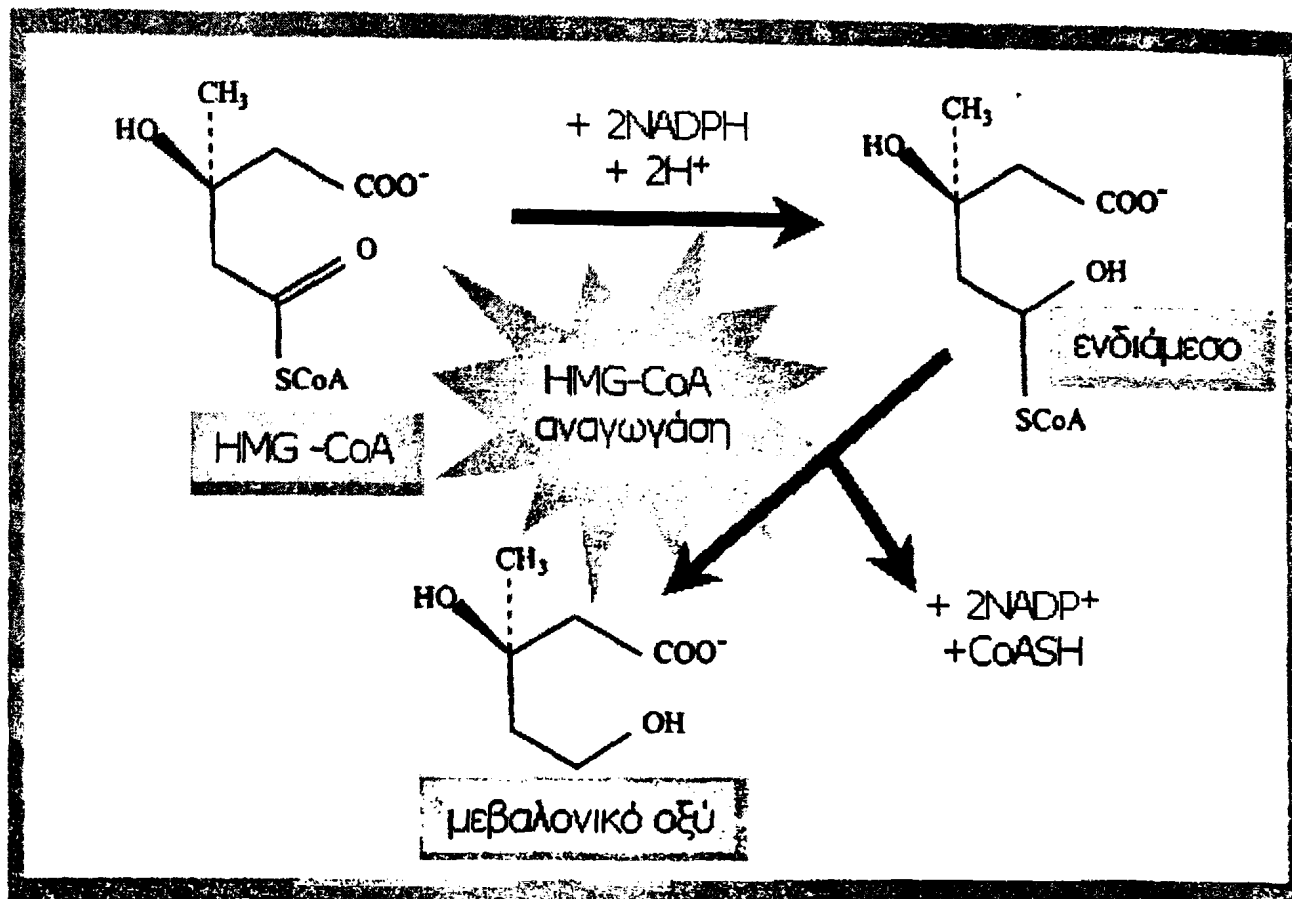
Η χοληστερόλη του αίματος προέρχεται από την εντερική απορρόφηση της χοληστερόλης που περιέχεται στις τροφές (300-500mg ημερησίως) και από *de novo* παραγωγή. Συγκεκριμένα, *de novo* παραγωγή πραγματοποιείται σε πολλά κύτταρα του σώματος, κυρίως όμως στα κύτταρα του εντέρου και του ήπατος (700-900mg ημερησίως) ^[181]. Είναι λογικό λοιπόν ότι για να μειωθούν τα επίπεδα της χοληστερόλης του ορού πρέπει να μειωθεί τόσο η διαιτητική πρόσληψη χοληστερόλης όσο και να περιορισθεί η ενδογενής παραγωγή της.

Η ενδογενής οδός σύνθεσης της χοληστερόλης ξεκινά από το ακετυλο-συνένζυμο Α (acetyl-CoA), το οποίο προέρχεται από τη γλυκόζη, τα λιπαρά οξέα ή τα αμινοξέα. Δύο μόρια ακετυλο-συνένζυμου Α δημιουργούν το ακετο-ακετυλο-συνένζυμο Α, το οποίο με την προσθήκη ενός ακόμα μορίου ακετυλο-συνένζυμου Α δημιουργεί το 3-υδροξυ-3μεθυλο-συνένζυμο Α (HMG-CoA). Η αναγωγή του HMG-CoA από την αντίστοιχη αναγωγή έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό μεβαλονικού οξέος (Εικόνα 19), το οποίο μετά από μια σειρά αντιδράσεων οδηγεί στο σχηματισμό χοληστερόλης.

Όλες οι στατίνες (Εικόνα 20) εμφανίζουν δομικές ομοιότητες με το υπόστρωμα της HMG-CoA αναγωγής και επομένως αποτελούν ισχυρό αναστολέα του ενζύμου. Η χημική συγγένεια του ενζύμου για τα μόρια των στατινών είναι περίπου 10.000 φορές μεγαλύτερη από ότι για το φυσικό υπόστρωμα του, την HMG-CoA ^[181].

Η απομάκρυνση των LDL του ορού γίνεται από τα ηπατοκύτταρα και εξαρτάται από τον αριθμό των ειδικών LDL υποδοχέων που αυτά τα κύτταρα εκφράζουν στην επιφάνειά τους. Ο αριθμός των υποδοχέων αυτών καθορίζεται από τα ενδοκυττάρια επίπεδα της LDL χοληστερόλης των ηπατοκυττάρων. Η δράση των στατινών έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση της ενδοκυττάριας χοληστερόλης και επομένως την αύξηση του αριθμού των LDL υποδοχέων των ηπατοκυττάρων. Με αυτό τον τρόπο αυξάνεται και η απομάκρυνση των LDL από την κυκλοφορία. Επιπρόσθετα, μελέτες έδειξαν ότι η μείωση της συγκέντρωσης της ενδοκυττάριας χοληστερόλης οδηγεί στην ενεργοποίηση ειδικών ενδοκυττάρια παραγόντων των SREBP (sterol response element binding proteins), οι οποίοι μετακινούνται από το κυτταρόπλασμα στον πυρήνα και συνδέονται με πρωτεΐνες που προάγουν τα γονίδια και αυξάνουν τη μεταγραφή του mRNA για τη σύνθεση της HMG-CoA αναγωγής αλλά και των LDL υποδοχέων ^[181].





Εικόνα 19. Αντίδραση σχηματισμού μεβαλονικού οξέος που καταλύεται από το ένζυμο 3-υδροξυ-3-μεθυλο-γλουταράλο-συνένζυμο Α (HMG-CoA) αναγωγάση

Η αύξηση του αριθμού και της ενεργότητας των LDL υποδοχέων έχει ως αποτέλεσμα την απομάκρυνση των καταλοίπων των VLDL και των IDL, αφού ο υποδοχέας των LDL αναγνωρίζει την apoE αυτών των σωματιδίων και επομένως μειώνει τη μετατροπή τους σε LDL. Τέλος, οι στατίνες μειώνοντας το σχηματισμό της ενδοκυττάριας χοληστερόλης μειώνουν και το σχηματισμό των VLDL. Το γεγονός αυτό μπορεί να σχετίζεται με τη μείωση του επιπέδου των τριγλυκεριδίων ορού που παρατηρείται με τη χορήγηση στατινών [373].

6.2. ΟΙ ΠΛΕΙΟΤΡΟΠΙΚΕΣ ΔΡΑΣΕΙΣ ΤΩΝ ΣΤΑΤΙΝΩΝ

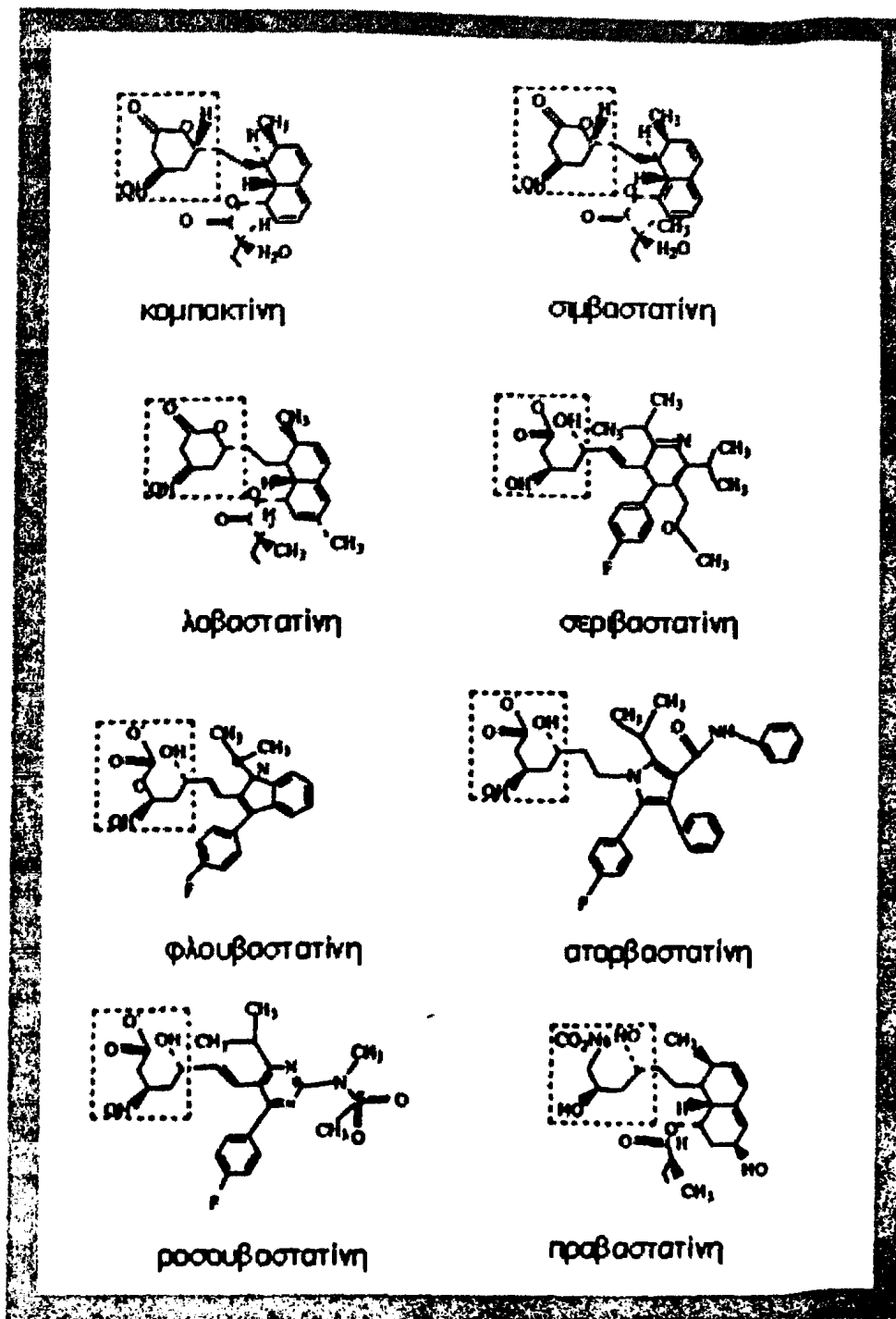
Καθώς η χρήση στατινών αυξάνεται, έγινε κατανοητό ότι τα φάρμακα αυτά έχουν ευεργετικές ιδιότητες, οι οποίες δεν σχετίζονται άμεσα με τη μείωση των επιπέδων των λιπιδίων του ορού. Τέτοιες πλειοτροπικές, όπως ονομάστηκαν, δράσεις περιλαμβάνουν τη βελτίωση της λειτουργικότητας του ενδοθηλίου, την αύξηση της βιοδιαθεσιμότητας του NO, τη σταθεροποίηση της αθηρωματικής πλάκας και τέλος διάφορες αντιοξειδωτικές και αντιφλεγμονώδεις δράσεις (Πίνακας 5). Διάφοροι ερευνητές αναφέρουν ότι κάποιες από τις παραπάνω δράσεις των στατινών δεν σχετίζονται άμεσα με τη μείωση των λιπιδίων που αυτά

τα φάρμακα προκαλούν, ενώ άλλοι υποστηρίζουν ότι δεν σχετίζονται ακόμα και με την αναστολή της HMG-CoA αναγωγάσης^[374].

Πίνακας 5. Πλειοτροπικές δράσεις των στατινών

ΠΛΕΙΟΤΡΟΠΙΚΕΣ ΔΡΑΣΕΙΣ ΤΩΝ ΣΤΑΤΙΝΩΝ
ΒΕΛΤΙΩΣΗ ΤΗΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΟΥ ΕΝΔΟΘΗΛΙΟΥ
Αύξηση της σύνθεσης του NO
Αναστολή της απελευθέρωσης των ελευθέρων ριζών
Μείωση της σύνθεσης της ενδοθηλίνης -1 (ET-1)
Αναστολή της οξειδωσης της LDL
ΜΕΙΩΣΗ ΤΗΣ ΦΛΕΓΜΟΝΩΔΟΥΣ ΔΙΕΡΓΑΣΙΑΣ
Μείωση του αριθμού και της ενεργότητας των φλεγμονωδών κυττάρων
Μείωση των επιπέδων της C-αντιδρώσας πρωτεΐνης (CRP)
ΣΤΑΘΕΡΟΠΟΙΗΣΗ ΤΗΣ ΑΘΗΡΩΜΑΤΙΚΗΣ ΠΛΑΚΑΣ
Μείωση της πρόσληψης χοληστερόλης από τα μακροφάγα
Μείωση της παραγωγής μεταλλοπρωτεϊνών
ΜΕΙΩΣΗ ΤΗΣ ΘΡΟΜΒΟΓΟΝΟΥ ΚΑΤΑΣΤΑΣΗΣ
Μείωση της ενεργοποίησης και της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων
Μείωση των επιπέδων του ινωδογόνου
Μείωση του ιξώδους του αίματος





Εικόνα 20. Η χημική δομή των στατινών

6.2.1. ΒΕΛΤΙΩΣΗ ΤΗΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΟΥ ΕΝΔΟΘΗΛΙΟΥ

Η δυσλειτουργία του ενδοθηλίου αποτελεί το αρχικό στάδιο για την ανάπτυξη της αθηρωμάτωσης. Έχει συσχετισθεί με την παράδοση αγγειοσύσπαση από την ακετυλοχολίνη, η οποία οφείλεται σε διαταραχή στη σύνθεση, απελευθέρωση και ενεργότητα του μονοξειδίου του αζώτου (NO). Τέτοιες διαταραχές στην ενδοθήλιο-εξαρτώμενη ρύθμιση του τόνου των

αγγείων έχουν συσχετισθεί με τη μακροχρόνια εξέλιξη της αθηρωματικής νόσου και τα καρδιαγγειακά συμβάματα ^[375,376].

Οι στατίνες ακόμα και μετά από βραχυχρόνια χορήγηση έδειξαν ότι βελτιώνουν τη λειτουργικότητα του ενδοθηλίου και αυξάνουν την αιμάτωση του μυοκαρδίου. Σε υπερχοληστερολαιμικούς ασθενείς με δυσλειτουργία του ενδοθηλίου, η χορήγηση φλουβαστατίνης (40-80mg/d) για 6 έως 12 εβδομάδες είχε ως αποτέλεσμα σημαντική αύξηση της αιμάτωσης του μυοκαρδίου κυρίως σε περιοχές με στενωτικές βλάβες (30% βελτίωση, $p < 0,001$) ^[377]. Σε ασθενείς με ήπια δυσλιπιδαιμία, η χορήγηση 20mg σιμβαστατίνης για 4 εβδομάδες αύξησε την αγγειοδιασταλτική δράση της ακετυλοχολίνης στη βραχιόνια αρτηρία, σε σύγκριση με την ομάδα του εικονικού φαρμάκου (placebo) ^[378]. Μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες με δυσλιπιδαιμία στις οποίες χορηγήθηκαν 10 mg ατορβαστατίνης για 2 εβδομάδες εμφάνισαν μεγαλύτερη βελτίωση στη δράση της ακετυλοχολίνης, όταν συγκρίθηκαν με αντίστοιχη ομάδα γυναικών οι οποίες ακολούθησαν μόνο υπολιπιδαιμική δίαιτα ^[379]. Σε μια άλλη μελέτη, η χορήγηση 80mg ατορβαστατίνης σε υγιείς νορμοχοληστερολαιμικούς εθελοντές συνοδεύεται από βελτίωση της λειτουργικότητας του ενδοθηλίου, η οποία παρατηρήθηκε το πρώτο 24ωρο της χορήγησης, πριν μειωθούν τα επίπεδα των λιπιδίων και της C-αντιδρώσας πρωτεΐνης του ορού ^[380].

Τα δεδομένα αυτά ενισχύουν την υπόθεση ότι η δράση αυτή των στατινών είναι ανεξάρτητη από τη μείωση των επιπέδων της ολικής και LDL χοληστερόλης του ορού. Οι μηχανισμοί με τους οποίους οι στατίνες βελτιώνουν τη δυσλειτουργία του ενδοθηλίου είναι ποικίλοι και σχετίζονται με τη μείωση των επιπέδων της oxLDL ^[381]. Η σεριβαστατίνη αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών και των ΛΜΚ ^[382]. Αντίθετα, η σιμβαστατίνη και η φλουβαστατίνη αναστέλλουν τον προκαλούμενο από την oxLDL και τη lyso-PC πολλαπλασιασμό ενδοθηλιακών κυττάρων της ομφαλικής αρτηρίας ^[383] με δόσοεξαρτώμενο τρόπο. Ο υποκείμενος μηχανισμός σχετίζεται πιθανά με την αναστολή της HMG-CoA αναγωγής ^[383] που τα φάρμακα αυτά προκαλούν. Επιπρόσθετα όμως φαίνεται ότι αυτή η αναστολή του πολλαπλασιασμού οφείλεται και στη μείωση της προκαλούμενης από την lysoPC αυξημένης ενδοκυττάριας συγκέντρωσης Ca^{2+} ^[384]. Η αυξημένη αυτή ενδοκυττάρια συγκέντρωση Ca^{2+} είναι απαραίτητη για την ολοκλήρωση του κυτταρικού κύκλου των συγκεκριμένων κυττάρων ^[385].

Επίσης οι Seljeflot και συν. ^[386] έδειξαν ότι η μακροχρόνια χορήγηση ατορβαστατίνης ή σιμβαστατίνης σε ασθενείς με στεφανιαία νόσο είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση της έκφρασης διάφορων προσκολλητικών μορίων, όπως των σελεκτινών και των VCAM-1 και ICAM-1, ένα φαινόμενο που δεν συσχετιζόταν με τη μείωση των επιπέδων της LDL χοληστερόλης του ορού ^[386]. Οι στατίνες μειώνουν την παραγωγή των ελεύθερων ριζών οξυγόνου, τη συσσώρευση της oxLDL και των επιπέδων των IgG αυτοαντισωμάτων, καθώς επίσης και την έκφραση των VCAM-1 και MCP-1. Επιπρόσθετα, τα φάρμακα αυτά αυξάνουν τη δραστηριότητα της eNOS και ομαλοποιούν τα ενδοθηλιακά κύτταρα κουνελιών ^[387].

6.2.2. ΑΥΞΗΣΗ ΤΗΣ ΒΙΟΔΙΑΘΕΣΙΜΟΤΗΤΑΣ ΤΟΥ ΜΟΝΟΞΕΙΔΙΟΥ ΤΟΥ ΑΖΩΤΟΥ (NO)

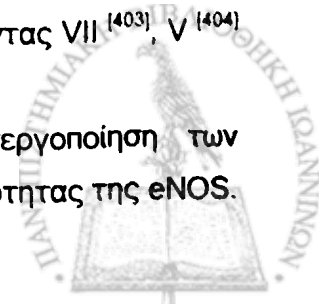
Μελέτες έδειξαν ότι η χορήγηση στατινών έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της παραγωγής του NO από τα ενδοθηλιακά κύτταρα ^[388,389]. Οι μηχανισμοί με τους οποίους αυξάνεται η παραγωγή του NO δεν σχετίζονται μόνο με τη μείωση των επιπέδων της LDL χοληστερόλης του ορού. Έχει αποδειχτεί ότι οι φυσικές LDL (native LDL) αυξάνουν τα επίπεδα της καβεολίνης 1 (caveolin-1), ενός ισχυρού αναστολέα της ενδοθηλιακής συνθετάσης του NO (eNOS) ^[390] και επομένως μειώνουν τη σύνθεση του NO. Οι στατίνες προλαμβάνουν την αναστολή της eNOS, αφού μειώνουν τα επίπεδα των φυσικών LDL.

Επιπρόσθετα, φαίνεται ότι οι στατίνες αυξάνουν άμεσα την ενεργότητα της eNOS με διάφορους μηχανισμούς. Η απευθείας μείωση της caveolin-1 και η αύξηση της πρωτεΐνης θερμικού σοκ 90, Hsp90, ενός μακροχρόνιου ενεργοποιητή της eNOS ^[390], είναι ένας μηχανισμός. Άλλοι μηχανισμοί περιλαμβάνουν τη σταθεροποίηση του mRNA της eNOS ^[391] και τη μείωση της παραγωγής των ελευθέρων ριζών οξυγόνου ^[392] που αδρανοποιούν το NO. Ακόμη οι στατίνες αναστέλλουν την πρενυλίωση της Rho GTPase από μια πυροφωσφατάση, τη GGPP (geranylgeranyl pyrophosphate) και έτσι αναστέλλουν τη μεταφορά της στην κυτταρική επιφάνεια και την επακόλουθη μείωση της ενεργότητας της eNOS ^[393]. Τέλος, οι στατίνες ενεργοποιούν τη σερίνη/θρεονίνη κινάση Akt (πρωτεΐνοκινάση B), με αποτέλεσμα την αύξηση της φωσφορυλίωσης του ενδογενούς Akt. Το ενδογενές Akt αποτελεί υπόστρωμα για την eNOS και επομένως η αύξηση της φωσφορυλίωσής του οδηγεί σε αύξηση της παραγωγής του NO ^[394]. Τέλος, είναι γνωστό ότι η υπερέκφραση του υποδοχέα LOX-1 στα ενδοθηλιακά κύτταρα, που προάγεται από την oxLDL, οδηγεί σε μείωση της παραγωγής του NO. Οι στατίνες μειώνουν την υπερέκφραση του συγκεκριμένου υποδοχέα, φαινόμενο που πιθανά αποτελεί έναν επιπρόσθετο μηχανισμό με τον οποίο οι ουσίες αυτές αυξάνουν τα επίπεδα NO ^[296].

6.2.3. ΣΤΑΤΙΝΕΣ ΚΑΙ ΠΗΞΗ

Όπως αναφέρθηκε, στην παθογένεια των οξέων στεφανιαίων συνδρόμων σημαντικό ρόλο διαδραματίζει η ρήξη μιας αθηρωματικής πλάκας και η επακόλουθη ενεργοποίηση των μηχανισμών της θρόμβωσης. Η χορήγηση στατινών οδηγεί σε μείωση της θρομβογεννητικότητας του πλάσματος ^[395], κυρίως διαμέσου τροποποίησης των επιπέδων του ιστικού παράγοντα ^[396-398], του ιστικού ενεργοποιητή του πλασμινογόνου (tPA) ^[399] και διαφόρων άλλων παραγόντων πήξης, όπως η θρομβίνη ^[400], το ινωδογόνο ^[401,402] και ο παράγοντας VII ^[403], V ^[404] και άλλοι ^[395].

Πρέπει επίσης να σημειωθεί ότι η oxLDL προκαλεί επιπρόσθετα ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων διαμέσου μηχανισμών που σχετίζονται με τη μείωση της ενεργότητας της eNOS.



Επιπρόσθετα, η oxLDL επιδρά άμεσα στα αιμοπετάλια διαμέσου του υποδοχέα LOX-1, ο οποίος είναι γνωστό ότι ανιχνεύεται στην επιφάνειά τους ^[281]. Η βελτίωση της δυσλειτουργίας του ενδοθηλίου και η αύξηση της ενεργότητας της eNOS είναι πιθανοί μηχανισμοί που μπορούν να εξηγήσουν τις αντιαιμοπεταλιακές δράσεις ορισμένων στατινών ^[307]. Επιπρόσθετα η αντιαιμοπεταλιακή αυτή δράση των στατινών μπορεί να σχετίζεται με την μείωση των επιπέδων της oxLDL που εμπεριέχεται στα αιμοπετάλια ^[305,306]. Η μείωση της ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων από την ατορβαστατίνη σχετίζεται με τη μείωση της έκφρασης των υποδοχέων CD36 και LOX-1 ^[306]. Επιπρόσθετοι μηχανισμοί αφορούν τη μείωση της παραγωγής θρομβοξάνης A₂ (ενός ισχυρού ενεργοποιητή των αιμοπεταλίων) ^[405] και τη διαφοροποίηση της λιπιδιακής σύστασης της μεμβράνης των αιμοπεταλίων ^[405,406], η οποία οδηγεί σε μειωμένη προσκόλληση των αιμοπεταλίων στο αγγειακό τοίχωμα ^[407]. Τέλος, η χορήγηση στατινών έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση της έκφρασης του ιστικού παράγοντα από τα μακροφάγα, φαινόμενο το οποίο σχετίζεται με τη μείωση των θρομβωτικών επεισοδίων στο αρτηριακό τοίχωμα ^[408].

6.2.3. ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΕΣ ΔΡΑΣΕΙΣ ΤΩΝ ΣΤΑΤΙΝΩΝ

Είναι γνωστός ο ρόλος του οξειδωτικού στρες και της φλεγμονής στην παθογένεια της αθηρογένεσης. Καθώς, όπως αναφέρθηκε, ο ρόλος της oxLDL στην παραπάνω διαδικασία είναι βασικός, οι αντιοξειδωτικές δράσεις των στατινών παρουσιάζουν μεγάλο ενδιαφέρον.

Η χορήγηση στατινών αυξάνει την αντοχή των σωματιδίων LDL στην οξείδωση ^[409] και μειώνει τις αρνητικές επιδράσεις από την έκφραση βλαπτικών γονιδίων, τα οποία ενεργοποιούνται από τις oxLDL ^[410,411]. Η επίδραση της χορήγησης στατινών στην οξείδωση των LDL μελετήθηκε *in vitro* και *in vivo*, σε πειραματόζωα και σε ασθενείς με δυσλιπιδαιμία. Στις αρχές της δεκαετίας του 1990 οι Aviram και συν. ^[412] έδειξαν για πρώτη φορά, ότι η χορήγηση λοβαστατίνης είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση της παραγωγής TBARS με τρόπο δόσοεξαρτώμενο. Παρόμοια αποτελέσματα παρατηρήθηκαν και με τη σιμβαστατίνη, η οποία προκαλεί μείωση της ικανότητας των μακροφάγων να οξειδώσουν τις LDL ^[411] και μείωση της παραγωγής συζυγών διενίων ^[413]. Οι πιθανοί μηχανισμοί είναι ποικίλοι. Ένας βασικός μηχανισμός σχετίζεται με την υπολιπιδαιμική δράση αυτών των φαρμάκων, καθώς η μείωση των επιπέδων των λιπαρών οξέων και της χοληστερόλης έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση του υποστρώματος για οξείδωση ^[411]. Επιπρόσθετα, οι στατίνες αναστέλλουν την επίδραση της oxLDL στην eNOS ^[391,394], ενώ ταυτόχρονα αναστέλλουν και την οξείδωση των LDL *in vitro* και *ex vivo* ^[414]. Ο υδρόξυ μεταβολίτης της ατορβαστατίνης, αλλά όχι το αρχικό μόριο αναστέλλει την οξείδωση των LDL, VLDL και HDL ^[415]. Σε *in vitro* μελέτες διάφορες στατίνες προκάλεσαν μείωση των δεικτών φλεγμονής και αύξηση της αντοχής του σωματιδίου της LDL στην οξείδωση ^[411]. Σε ασθενείς με δυσλιπιδαιμία η χορήγηση σιμβαστατίνης έχει ως αποτέλεσμα τη

μείωση της παραγωγής των F₂-ισοπροστανίων και των επιπέδων της oxLDL του ορού ^[416]. Όμως σε πρόσφατη μελέτη η χορήγηση 40mg πραβαστατίνης ημερησίως για 4 μήνες σε ασθενείς με σακχαρώδη διαβήτη τύπου I μείωσε την οξειδωση των LDL, αλλά δεν βελτίωσε την αιμάτωση του μυοκαρδίου ^[417]. Επιπρόσθετα, η ατορβαστατίνη και άλλες στατίνες μειώνουν την έκφραση των υποδοχέων εκκαθαριστών CD36 ^[418] και SR-A των μακροφάγων και LOX-1 των ενδοθηλιακών κυττάρων ^[419] και επακόλουθα την πρόσληψη των oxLDL από τα μακροφάγα και το σχηματισμό αφρωδών κυττάρων.

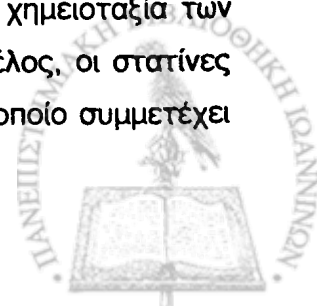
Θα πρέπει να αναφερθεί ότι τα σωματίδια της oxLDL είναι αρνητικά φορτισμένα, πιθανά λόγω γλυκοζυλίωσης και ανώμαλου σιαλικού οξέος. Πιθανά αυτή η ηλεκτροαρνητικότητα να είναι κυτταροτοξική. Η χορήγηση 40mg σιμβαστατίνης για 3 μήνες σε ασθενείς με οικογενή υπερχοληστερολαιμία είχε ως αποτέλεσμα μια σημαντική κατά 29% μείωση της ηλεκτραρνητικότητας των LDL ^[420].

6.2.4. ΑΝΤΙΦΛΕΓΜΟΝΩΔΕΙΣ ΔΡΑΣΕΙΣ ΤΩΝ ΣΤΑΤΙΝΩΝ

Είναι γνωστό ότι ένας από τους κυριότερους δείκτες της φλεγμονής, τα επίπεδα της υψηλής ευαισθησίας C-αντιδρώσας πρωτεΐνης (hsCRP), σχετίζονται άμεσα με την αθηρωματική νόσο και αποτελούν αξιόπιστο δείκτη για μελλοντικά καρδιαγγειακά επεισόδια.

Αναλύσεις υποομάδων ασθενών μεγάλων κλινικών μελετών στις οποίες χορηγήθηκαν στατίνες έδειξαν τη σημαντική επίδραση που έχουν αυτά τα φάρμακα στη μείωση της φλεγμονώδους διεργασίας που επισυμβαίνει στην αθηρωματική πλάκα^[421]. Συγκεκριμένα, ανάλυση μιας υποομάδας 708 μετεφραγματικών ασθενών της μελέτης CARE έδειξε ότι ασθενείς με αυξημένα επίπεδα hsCRP και αμυλοειδούς A (SAA), βρίσκονταν σε μεγαλύτερο καρδιαγγειακό κίνδυνο και ωφελήθηκαν περισσότερο από τη χορήγηση 40mg πραβαστατίνης^[422]. Επιπρόσθετα, στη μελέτη CARE παρατηρήθηκε μια σημαντική κατά 29% μείωση των αρχικών τιμών της hsCRP στην ομάδα της πραβαστατίνης σε σύγκριση με αυτή του εικονικού φαρμάκου (p=0,007) ^[423]. Στη μελέτη PRINCE ^[168] η μείωση των επιπέδων της hsCRP δεν συσχετιζονταν άμεσα με τη μείωση των επιπέδων της LDL χοληστερόλης. Η μείωση λοιπόν της hsCRP, που προκαλείται από τη χορήγηση στατινών φαίνεται ότι είναι ανεξάρτητη από την υπολιπιδαιμική τους δράση, γεγονός που έχει αποδειχθεί από πολλούς ερευνητές τουλάχιστον για τη σιμβαστατίνη ^[424,425] και την ατορβαστατίνη ^[426,427].

Επίσης, οι στατίνες φαίνεται ότι εμφανίζουν τοπική αντιφλεγμονώδη δράση στα σημεία των αθηρωματικών πλακών. Μειώνουν την έκφραση μορίων, όπως το ICAM-1 ^[428], η P-σελεκτίνη και η MCP-1 ^[414], τα οποία συμμετέχουν στην προσκόλληση και χημειοταξία των μακροφάγων, πιθανά διαμέσου ομαλοποίησης των επιπέδων του NO ^[429]. Τέλος, οι στατίνες φαίνεται ότι μειώνουν τη δραστηριότητα του συστήματος CD40/CD40L το οποίο συμμετέχει



στην ενεργοποίηση και τον πολλαπλασιασμό των μακροφάγων και των ΛΜΚ στο εσωτερικό της αθηρωματικής πλάκας ^[430,431].

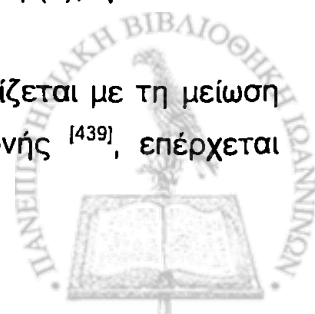
6.2.5. ΣΤΑΘΕΡΟΠΟΙΗΣΗ ΤΗΣ ΑΘΗΡΩΜΑΤΙΚΗΣ ΠΛΑΚΑΣ

Η ρήξη της ινώδους κάψας μιας αθηρωματικής πλάκας και η αποκάλυψη στην κυκλοφορία ενός πλήθους θρομβωτικών ουσιών είναι η κύρια αιτία ενός οξέος στεφανιαίου επεισοδίου. Οι πλειοτροπικές δράσεις των στατινών έχουν ως αποτέλεσμα την αλλαγή του δυναμικού περιβάλλοντος της αθηρωματικής πλάκας ^[405]. Έτσι η επίδρασή τους στην έκφραση των υποδοχέων εκκαθαριστών μειώνει την παραγωγή αφρωδών κυττάρων, ενώ ταυτόχρονα η υπολιπιδαιμική τους δράση έχει συσχετισθεί με μείωση του λιπιδικού πυρήνα των αθηρωματικών πλακών ^[432,433]. Παρόλα αυτά, η μείωση του μεγέθους των αθηρωματικών πλακών από την υπολιπιδαιμική αγωγή φαίνεται ότι αποτελεί μακροχρόνια διαδικασία, με αποτέλεσμα η αγγειογραφική εκτίμηση τέτοιων αλλαγών να είναι εξαιρετικά δύσκολη ^[405]. Αντίθετα, φαίνεται ότι τα κλινικά οφέλη της υπολιπιδαιμικής αγωγής σχετίζονται με τη μείωση της συσσώρευσης των μακροφάγων ^[408] και τη μείωση της παραγωγής MMP's ^[434], δράσεις που οδηγούν σε αύξηση του πάχους της ινώδους κάψας των αθηρωματικών πλακών. Πράγματι, η χορήγηση στατινών συνδυάζεται με μείωση της έκφρασης διαφόρων MMP's και του ιστικού παράγοντα διαμέσου μηχανισμών που σχετίζονται ή όχι με την υπολιπιδαιμική τους δράση ^[433]. Συμπερασματικά, οι αντιοξειδωτικές και αντιφλεγμονώδεις δράσεις των στατινών οδηγούν σε μεταβολές της δομής της αθηρωματικής πλάκας και πιο συγκεκριμένα στην πάχυνση της ινώδους κάψας και στη μείωση του λιπιδαιμικού πυρήνα. Οι παραπάνω αλλαγές σχετίζονται με τη σταθεροποίηση των αθηρωματικών βλαβών και τη μείωση των κλινικών εκδηλώσεων της αθηρωματικής νόσου.

6.2.6. ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΣΤΑΤΙΝΩΝ ΣΤΑ ΕΠΙΠΕΔΑ ΑΥΤΟΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ ΚΑΤΑ oxLDL

Η χορήγηση στατινών μειώνει τα επίπεδα της oxLDL στον ορό ασθενών με στεφανιαία νόσο ^[435]. Οι Τσιμίκας και συν. ^[436] έδειξαν ότι στους ασθενείς της μελέτης MIRACL η ημερήσια χορήγηση 80 mg ατορβαστατίνης μετά από οξύ στεφανιαίο επεισόδιο είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση των επιπέδων των οξειδωμένων λιπιδίων τα οποία είναι προσκολλημένα στο μόριο της ApoB-100. Στην ίδια μελέτη, ο λόγος οξειδωμένων φωσφολιπιδίων προς ApoB αυξήθηκε. Η αύξηση αυτή υποδηλώνει ότι το κάθε μόριο ApoB-100 ήταν εμπλουτισμένο σε οξειδωμένα φωσφολιπίδια. Ταυτόχρονα παρατηρήθηκε αύξηση και των επιπέδων της Lp(a), η οποία είναι γνωστό ότι δεσμεύει οξειδωμένα φωσφολιπίδια ^[77,362,437,438].

Είναι λοιπόν πιθανό ότι, καθώς η χορήγηση ατορβαστατίνης σχετίζεται με τη μείωση των επιπέδων της LDL χοληστερόλης του ορού αλλά και της φλεγμονής ^[439], επέρχεται



κινητοποίηση των οξειδωμένων φωσφολιπιδίων από το αρτηριακό τοίχωμα, διαμέσου σύνδεσης τους με τα μόρια της ApoB-100 και της Lp(a) στην κυκλοφορία και τελικά απομάκρυνσή τους από τον οργανισμό ^[436]. Επιπρόσθετα, η χορήγηση ατορβαστατίνης προκαλεί μείωση του τίτλου των αυτοαντισωμάτων κατά της oxLDL ^[440], ένα φαινόμενο το οποίο έχει παρατηρηθεί και με τη φλουβαστατίνη ^[207]. Η μείωση αυτή είναι πιθανόν να οφείλεται στη μείωση των επιπέδων της LDL χοληστερόλης και των περιεχομένων σε αυτή λιπιδίων (και άρα μείωση του συνολικού υποστρώματος για την οξείδωση), αλλά και σε απευθείας αντιφλεγμονώδεις δράσεις των φαρμάκων ή των ενεργών μεταβολιτών τους ^[415]. Στις παραπάνω μελέτες όμως χρησιμοποιήθηκαν ως αντιγόνα πλήρως oxLDL, δηλαδή LDL που είχαν υποστεί οξείδωση για τουλάχιστον 12 ώρες.



ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7^ο

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

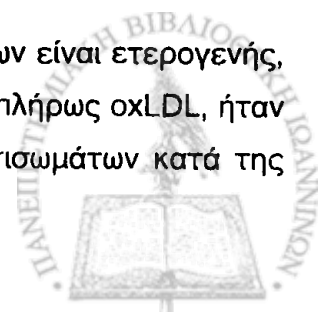
Η oxLDL διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην παθογένεια της αθηροσκλήρωσης, αφού επηρεάζει τη λειτουργία των κυττάρων του αρτηριακού τοιχώματος. Κατά τη διάρκεια της οξειδωσης τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα που συνδέονται με τη φωσφατιδυλοχολίνη στην *sn-2* θέση με εστερικό δεσμό μετατρέπονται στα αντίστοιχα υπεροξειδία. Αυτά στη συνέχεια διασπώνται, παρουσία μεταλλικών ιόντων, με αποτέλεσμα το σχηματισμό οξειδωμένων φωσφολιπιδίων και αλδεϋδών, όπως η μηλονική διαλδεϋδη (MDA) και η 4-υδροξυνοενάλη (4-HNE). Τα προϊόντα αυτά είναι υπεύθυνα για πολλές από τις βιολογικές δράσεις της oxLDL, συμπεριλαμβανομένης και της αντιγονικότητάς της.

Στην αντιγονικότητα των oxLDL σημαντικό ρόλο διαδραματίζουν τα οξειδωμένα φωσφολιπίδια (oxPL) τα οποία συμμετέχουν στο σχηματισμό διαφόρων αντιγονικών επιτόπων στο σωματίδιο της oxLDL, αλλά και η λυσοφωσφατιδυλοχολίνη (lyso-PC), η οποία φαίνεται ότι αλληλεπιδρά με το πρωτεϊνικό περιεχόμενο της oxLDL. Καθώς η ενεργότητα της PAF-AH είναι ο κύριος παράγοντας που καθορίζει τα επίπεδα των oxPL και της lyso-PC κατά τη διάρκεια της οξειδωσης των LDL, το ένζυμο αυτό μπορεί να επηρεάζει το είδος των αντιγονικών επιτόπων, καθώς και τους τίτλους των αυτοαντισωμάτων κατά της oxLDL.

Αυτοαντισώματα κατά της oxLDL έχουν παρατηρηθεί σε υγιείς εθελοντές και παιδιά. Μελέτες έδειξαν ότι τα αντισώματα αυτά είναι αυξημένα σε ασθενείς με οξύ στεφανιαίο σύνδρομο και άλλες καταστάσεις, όπως ο σακχαρώδης διαβήτης, η υπέρταση, η χρόνια νεφρική ανεπάρκεια, καθώς και σε ασθενείς με νοσήματα ρευματικής αιτιολογίας. Σε όλες αυτές τις μελέτες για τον προσδιορισμό του τίτλου των αυτοαντισωμάτων χρησιμοποιήθηκαν ως αντιγόνα πλήρως oxLDL, δηλαδή LDL οι οποίες υποβλήθηκαν σε οξειδωση για τουλάχιστον 12 ώρες. Η πλήρως oxLDL περιέχει όχι μόνο αυξημένα ποσά TBARS, αλλά είναι επίσης εμπλουτισμένη σε οξειδωμένα φωσφολιπίδια. Αυτά δημιουργούνται από την πρώιμη απενεργοποίηση της ενδογενούς PAF-AH της LDL.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα των παραπάνω μελετών, η αύξηση του επιπέδου των οξειδωμένων φωσφολιπιδίων του ορού και η συνακόλουθη αύξηση του τίτλου των αυτοαντισωμάτων κατά της πλήρως oxLDL ή της MDA-LDL σχετίζεται σημαντικά με την εμφάνιση οξέων στεφανιαίων συνδρόμων. Σε αντίθεση με τα οξέα στεφανιαία σύνδρομα, σε ασθενείς με σταθερή στηθάγχη, οι τίτλοι των αυτοαντισωμάτων κατά της oxLDL είναι οριακά ή και καθόλου αυξημένα σε σύγκριση με τους υγιείς εθελοντές.

Έχοντας υπόψη το γεγονός ότι ο πληθυσμός των αυτοαντισωμάτων είναι ετερογενής, καθώς και το ότι οι προηγούμενες μελέτες χρησιμοποιούσαν ως αντιγόνα πλήρως oxLDL, ήταν φανερό η ανάγκη για πιο ακριβή προσδιορισμό του είδους των αυτοαντισωμάτων κατά της



oxLDL που υπάρχουν στην κυκλοφορία και για τη διερεύνηση των διαφόρων παραγόντων που πιθανά τα επηρεάζουν.

Είναι ακόμα γνωστό ότι η χορήγηση στατινών βελτιώνει την πρόγνωση ασθενών με στεφανιαία νόσο. Τα οφέλη αυτά των στατινών φαίνεται ότι προκύπτουν και από τις πλειοτροπικές τους δράσεις, δηλαδή τις δράσεις τους που δεν σχετίζονται άμεσα με τη μείωση της LDL χοληστερόλης του ορού, ορισμένες από τις οποίες θεωρούνται αντιφλεγμονώδεις και ανοσοτροποποιητικές. Είναι λοιπόν πιθανό η χορήγηση στατινών να επηρεάζει τα επίπεδα των αυτοαντισωμάτων κατά της oxLDL.

Έτσι, σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν να εκτιμηθούν οι τίτλοι των αυτοαντισωμάτων κατά της oxLDL σε σχέση με το βαθμό της οξειδωσης και με την ενεργότητα της PAF-AH σε ασθενείς με στεφανιαία νόσο και σε υγιείς εθελοντές, σε μια προσπάθεια να διερευνηθεί ο άγνωστος μέχρι σήμερα ρόλος της PAF-AH στην αντιγονικότητα της oxLDL. Στη συνέχεια σκοπός ήταν να μελετηθεί η συμπεριφορά του τίτλου των αυτοαντισωμάτων αυτών στη διάρκεια του χρόνου σε ασθενείς μετά από οξύ στεφανιαίο επεισόδιο. Τέλος σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν να εκτιμηθεί η επίδραση της χορήγησης ατορβαστατίνης στις μεταβολές του τίτλου των αυτοαντισωμάτων κατά των διαφόρων μορφών της oxLDL σε ασθενείς μετά από οξύ στεφανιαίο σύνδρομο.



ΥΑΠΕΚΑ ΜΕΡΟΣ Β

... ..

... ..

... ..

... ..

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Ε.Τ.

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

... ..



ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8^ο

ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Η παρούσα μελέτη χωρίζεται σε δύο μέρη. Αρχικά εκτιμήθηκαν οι τίτλοι των αυτοαντισωμάτων κατά της oxLDL σε σχέση με το βαθμό της οξειδωσης, την ενεργότητα της PAF-AH, καθώς και ο πιθανός ρόλος της PAF-AH στην αντιγονικότητα της oxLDL. Για αυτό το σκοπό χρησιμοποιήθηκαν ασθενείς με αγγειογραφικά τεκμηριωμένη στεφανιαία νόσο και συμπτωματολογία συμβατή με σταθερή στηθάγχη. Ως ομάδα ελέγχου χρησιμοποιήθηκαν υγιείς εθελοντές παρόμοιας ηλικίας και φύλου.

Στη συνέχεια μελετήθηκε η συμπεριφορά του τίτλου των αυτοαντισωμάτων κατά των διαφόρων μορφών oxLDL μετά από οξύ στεφανιαίο επεισόδιο, καθώς και η επίδραση της χορήγησης ατορβαστατίνης στους τίτλους αυτών των αυτοαντισωμάτων. Για αυτό το σκοπό χρησιμοποιήθηκαν ασθενείς με οξύ στεφανιαίο σύνδρομο χωρίς εμμένουσα ανάσπαση του διαστήματος ST στο καρδιογράφημα (NSTEMI).

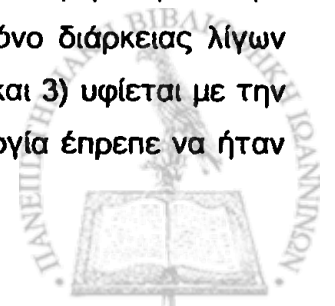
Όλα τα άτομα που συμμετείχαν στη μελέτη έδωσαν την ενυπόγραφη συγκατάθεσή τους για τη συμμετοχή τους, ύστερα από εκτενή ενημέρωσή τους για το σκοπό και τη μεθοδολογία της μελέτης.

Η πειραματική διαδικασία ήταν κοινή και για τα δύο μέρη της μελέτης και αναλύεται διεξοδικότερα στη συνέχεια.

8.1. ΠΛΗΘΥΣΜΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

8.1.1. ΟΜΑΔΑ ΑΣΘΕΝΩΝ ΜΕ ΣΤΑΘΕΡΗ ΣΤΗΘΑΓΧΗ ΚΑΙ ΟΜΑΔΑ ΥΓΙΩΝ ΕΘΕΛΟΝΤΩΝ

Την ομάδα των ασθενών με σταθερή στηθάγχη αποτέλεσαν εξήντα-πέντε (65) διαδοχικοί ασθενείς (58 άνδρες και 7 γυναίκες με μέση ηλικία $62,5 \pm 9,5$ έτη) με ολική χοληστερόλη ορού $< 250 \text{mg/dl}$ και κλινική εικόνα συμβατή με σταθερή στηθάγχη, οι οποίοι προσήλθαν στα εξωτερικά ιατρεία της κλινικής μας αναζητώντας ιατρική βοήθεια για πρώτη φορά σχετικά με τα συμπτώματά τους. Όλοι οι ασθενείς είχαν ελεύθερο ατομικό αναμνηστικό καρδιαγγειακής νόσου και δεν ελάμβαναν κανένα φάρμακο πριν από αυτή την αρχική εκτίμηση. Για την τεκμηρίωση της διάγνωσης της σταθερής στηθάγχης οι ασθενείς έπρεπε να πληρούσαν τουλάχιστον 2 από τα παρακάτω κριτήρια: 1) οπισθοστερνική δυσφορία ή πόνο με αντανάκλαση στον τράχηλο, τη γνάθο, το επιγάστριο ή τα χέρια, 2) πόνο διάρκειας λίγων λεπτών, ο οποίος εκλύεται με την άσκηση ή τη συναισθηματική φόρτιση και 3) υφίεται με την ανάπαυση ή τη χορήγηση νιτρογλυκερίνης. Η παραπάνω κλινική σημειολογία έπρεπε να ήταν



σταθερή για τουλάχιστον 6 μήνες. Όλοι οι ασθενείς υποβλήθηκαν σε δοκιμασία κόπωσης, η οποία ήταν θετική για μυοκαρδιακή ισχαιμία και στη συνέχεια σε διαγνωστική στεφανιογραφία. Ως αγγειογραφικά σημαντική στεφανιαία νόσο ορίστηκε στένωση του αυλού τουλάχιστον ενός επικάρδιου στεφανιαίου αγγείου σε ποσοστό μεγαλύτερο του 50%. Είκοσι-ένας (21) ασθενείς εμφάνισαν νόσο 1 αγγείου, 13 ασθενείς νόσο 2 αγγείων και 23 ασθενείς νόσο 3 αγγείων. Ασθενείς με ύποπτη συμπτωματολογία, οι οποίοι δεν πληρούσαν τα διαγνωστικά κριτήρια της σταθερής στηθάγχης ή η δοκιμασία κόπωσης ήταν αρνητική για μυοκαρδιακή ισχαιμία ή η στεφανιογραφία ανέδειξε «φυσιολογικά στεφανιαία αγγεία» (λεία στεφανιαία αγγεία με φυσιολογική διάμετρο αυλού) αποκλείστηκαν από τη μελέτη.

Επιπρόσθετα από τη μελέτη αποκλείστηκαν ασθενείς με ιστορικό σακχαρώδη διαβήτη (επίπεδα γλυκόζης νηστείας μεγαλύτερα από 140 mg/dl ή λήψη υπογλυκαιμικών φαρμάκων), ηπατικής νόσου (επίπεδα τρανσαμινασών μεγαλύτερα από το διπλάσιο σε σύγκριση με τις φυσιολογικές τιμές) ή νεφρικής νόσου (επίπεδα κρεατινίνης ορού μεγαλύτερα από 1,5mg/dl), κακοήθειας, καθώς και ασθενείς με νόσο ρευματικής αιτιολογίας, αφού είναι γνωστό ότι οι παραπάνω παθολογικές καταστάσεις αποτελούν αιτίες αυξημένων επιπέδων αυτοαντισωμάτων κατά oxLDL. Επιπρόσθετα από τη μελέτη εξαιρέθηκαν ασθενείς που έπαιρναν ήδη υπολιπιδαιμικά φάρμακα, καθώς και ασθενείς οι οποίοι υποβλήθηκαν σε διαγνωστική στεφανιογραφία στα πλαίσια εκτίμησης μυοκαρδιοπάθειας ή βαλβιδοπάθειας και τέλος ασθενείς που υποβλήθηκαν σε στεφανιογραφία εξαιτίας οξέος στεφανιαίου επεισοδίου.

Ως ομάδα ελέγχου χρησιμοποιήθηκαν σαράντα-επτά (47) υγιείς εθελοντές παρόμοιας ηλικίας και φύλου (42 άνδρες και 7 γυναίκες, μέσης ηλικίας $58,4 \pm 17,7$ έτη). Όλοι οι υγιείς εθελοντές ήταν ασυμπτωματικοί, δεν είχαν ιστορικό χρόνιας ή οξείας νόσου, είχαν αρνητική κλινική εξέταση και φυσιολογικό ηλεκτροκαρδιογράφημα.

Στο σύνολο του πληθυσμού της μελέτης (ασθενείς με στεφανιαία νόσο και υγιείς εθελοντές) έγινε καταγραφή όλων των παραγόντων κινδύνου για στεφανιαία νόσο (συνήθεια του καπνίσματος, ιστορικό αρτηριακής υπέρτασης, κληρονομικό ιστορικό πρώιμης καρδιαγγειακής νόσου και δείκτης μάζας σώματος). Ταυτόχρονα έγινε συλλογή δείγματος ορού ύστερα από 12ωρη νηστεία, και προσδιορισμός των επιπέδων της ολικής και HDL χοληστερόλης, καθώς και των τριγλυκεριδίων. Η συλλογή του δείγματος στους ασθενείς με σταθερή στηθάγχη πραγματοποιήθηκε πριν την έναρξη οποιασδήποτε αγωγής. Τα επίπεδα της LDL χοληστερόλης υπολογίστηκαν με τη βοήθεια της εξίσωσης του Fieldwald:

$$LDL(mg / dl) = TCHOL(mg / dl) - \left(HDL(mg / dl) + \frac{TRG(mg / dl)}{5} \right)$$

για ασθενείς με επίπεδα τριγλυκεριδίων μικρότερα του 400mg/dl. Ασθενείς με επίπεδα τριγλυκεριδίων μεγαλύτερα των 400 mg/dl αποκλείστηκαν από τη μελέτη. Ο όρος μετά τον



προσδιορισμό του λιπιδαιμικού προφίλ αποθηκεύθηκε στους -80°C και χρησιμοποιήθηκε στην πειραματική διαδικασία, όπως περιγράφεται παρακάτω.

8.1.2. ΟΜΑΔΑ ΑΣΘΕΝΩΝ ΜΕ ΟΞΥ ΣΤΕΦΑΝΙΑΙΟ ΣΥΝΔΡΟΜΟ

Την ομάδα των ασθενών με οξύ στεφανιαίο σύνδρομο (ΟΣΣ) αποτέλεσαν πενήνταπέντε (55) ασθενείς (μέση ηλικία $58,9 \pm 9$ έτη, 42-78 ετών, 49 άνδρες, 6 γυναίκες). Οι ασθενείς αυτοί είχαν ελεύθερο ατομικό αναμνηστικό καρδιαγγειακής ή άλλης νόσου, δεν είχαν σακχαρώδη διαβήτη, δεν ήταν σε οποιαδήποτε αγωγή πριν από το επεισόδιο και εισήχθησαν στη μονάδα παρακολούθησης καρδιοπαθών του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων με τεκμηριωμένη διάγνωση οξέος στεφανιαίου συνδρόμου χωρίς εμμένουσα ανάσπαση του διαστήματος ST στο ηλεκτροκαρδιογράφημα (NSTEMI) σε διάστημα λιγότερο των 2 ωρών από την έναρξη των συμπτωμάτων. Η διάγνωση του NSTEMI έγινε με βάση την κλινική εικόνα (τυπικό σθηθαγχικό άλγος διάρκειας μεγαλύτερης των 20 λεπτών), την ύπαρξη ηλεκτροκαρδιογραφικών αλλαγών (εκτός της ανάσπασης του ST ≥ 2 mm στις V_1-V_3 και ≥ 1 mm στις άλλες απαγωγές ή πρωτοεμφανιζόμενο αποκλεισμό αριστερού σκέλους) και/ή αυξημένους βιοχημικούς δείκτες (τιμές ολικής κινάσης της κρεατινίνης (CK) ή του μυοκαρδιακού της κλάσματος (CK-MB) διπλάσιες των φυσιολογικών ή θετικές τιμές τροπονίνης $I > 0,3$ ng/ml). Ασθενείς οι οποίοι μετά την αρχική εκτίμηση δεν πληρούσαν τα κριτήρια για τη διάγνωση του NSTEMI αποκλείστηκαν από τη μελέτη.

Όλοι οι ασθενείς υποβλήθηκαν σε διαγνωστική αγγειογραφία των στεφανιαίων αγγείων και διαδερμική αγγειοπλαστική με χρήση ενδοπρόσθεσης (stent) μέσα στο πρώτο 24ωρο νοσηλείας τους. Ασθενείς που υποβλήθηκαν σε αορτοστεφανιαία παράκαμψη είτε στη διάρκεια της νοσηλείας τους, είτε στη διάρκεια της περιόδου παρακολούθησης, καθώς και ασθενείς με «φυσιολογικά» στεφανιαία αγγεία (λεία στεφανιαία αγγεία με φυσιολογική διάμετρο αυλού στη στεφανιογραφία) αποκλείστηκαν επίσης από τη μελέτη.

Οι ασθενείς κατά την περίοδο παρακολούθησης ήταν σε αγωγή με ασπιρίνη (100mg/μέρα), κλοπιδογρέλη (80mg/μέρα) και β-αποκλειστή. Ατορβαστατίνη χορηγήθηκε σε όλους τους ασθενείς σε όλη τη διάρκεια της νοσηλείας τους (3-5 μέρες). Μετά την έξοδο από το νοσοκομείο η συνέχιση της υπολιπιδαιμικής αγωγής ήταν στην ευθύνη των θεραπόντων ιατρών τους.

Οι ασθενείς παρακολουθήθηκαν για διάστημα 6 μηνών. Δείγματα ορού συλλέχθηκαν κατά την έναρξη της μελέτης (baseline, εντός 30 λεπτών από την εμφάνισή τους στα επείγοντα ιατρεία του νοσοκομείου) και στον 1^ο, 3^ο και 6^ο μήνα μετά. Στους ασθενείς έγινε καταγραφή όλων των κλασικών παραγόντων κινδύνου για στεφανιαία νόσο (αρτηριακή υπέρταση, κάπνισμα, κληρονομικό ιστορικό πρώιμης στεφανιαίας νόσου και παχυσαρκία), ενώ προσδιορίστηκε το λιπιδαιμικό προφίλ τους, όπως περιγράφεται παραπάνω, σε κάθε χρονική

στιγμή (κατά την έναρξη της μελέτης, τον 1ο, 3ο, και 6ο μήνα παρακολούθησης). Ο ορός μετά τον προσδιορισμό του λιπιδαιμικού προφίλ αποθηκεύτηκε στους -80°C και χρησιμοποιήθηκε στην πειραματική διαδικασία, όπως περιγράφεται παρακάτω.

Οι ασθενείς χωρίστηκαν σε δύο ομάδες με βάση τη υπολιπιδαιμική αγωγή στην οποία είχαν υποβληθεί κατά την περίοδο της παρακολούθησης. Στην πρώτη ομάδα εντάχθηκαν 34 ασθενείς, οι οποίοι έπαιρναν αγωγή με ατορβαστατίνη σε όλη τη διάρκεια της περιόδου παρακολούθησης χωρίς διακοπές (όλοι οι ασθενείς έλαβαν 40 mg/μέρα). Στη δεύτερη ομάδα συμπεριλήφθηκαν οι 21 ασθενείς, οι οποίοι είχαν διακόψει την υπολιπιδαιμική τους αγωγή εντός δύο έως τεσσάρων ημερών μετά την έξοδό τους από το νοσοκομείο και δεν έλαβαν υπολιπιδαιμική αγωγή σε όλη τη διάρκεια της εξαμήνου περιόδου παρακολούθησης. Ασθενείς οι οποίοι έπαιρναν στατίνες περιστασιακά, ή τέθηκαν σε άλλη υπολιπιδαιμική αγωγή κατά τη διάρκεια της περιόδου παρακολούθησης ($n=18$) αποκλείστηκαν από τη μελέτη.

8.2. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

8.2.1. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΤΩΝ ΛΙΠΟΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΜΕ ΔΙΑΔΟΧΙΚΕΣ ΥΠΕΡΦΥΓΟΚΕΝΤΡΗΣΕΙΣ

Αρχή της μεθόδου

Ο διαχωρισμός των λιποπρωτεϊνών του πλάσματος με υπερφυγοκέντρηση βασίζεται στην παρατήρηση ότι διαφορές στο λιπιδιακό περιεχόμενο των λιποπρωτεϊνών έχουν ως αποτέλεσμα την επίπλευση τους σε διαφορετικές πυκνότητες^[441]. Απομονώνονται οι εξής λιποπρωτεΐνες στις αντίστοιχες πυκνότητες.

VLDL +IDL	$d=0.096-1.019\text{g/ml}$
LDL	$d=1.019-1.063\text{g/ml}$
HDL	$d=1.063-1.210\text{g/ml}$
Lp(a)	$d=1.060-1.107\text{g/ml}$

Αντιδραστήρια-Όργανα

Φυγόκεντρος πάγκου (Hermle, Z 320)

Υπερφυγόκεντρος (L7, Beckman)

Κεφαλή υπερφυγοκέντρου (NVT-65, Beckman)

Σωλήνες υπερφυγοκέντρου (Quickseal, Beckman)

Σωλήνες υπερφυγοκέντρου (Optiseal, Beckman)



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

Titriplex III (Merck)

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

Μεμβράνη διαπίδυσης (Sigma). Η μεμβράνη ενεργοποιείται σε PBS για 3h και κατακρατά οποιοδήποτε συστατικό έχει μοριακό βάρος μεγαλύτερο από 12 kDa

Φίλτρα διήθησης 0.20 μ (Corning)

Διαλύματα εργασίας

- *Διάλυμα 10% EDTA, pH 7.0.* 12.8247 g EDTANa₂·2H₂O (*Titriplex III*) διαλυτοποιούνται σε 90 ml H₂O. Το pH ρυθμίζεται στο 7.0 και ο όγκος συμπληρώνεται στα 100 ml με dH₂O. Το διάλυμα διατηρείται στους 4°C.
- *Διάλυμα KBr πυκνότητας 1.019 g/ml.* 14.92 g KBr διαλυτοποιούνται σε d H₂O μέχρι τελικό όγκο, 500 ml. Το διάλυμα αυτό περιέχει 5μl/ml 10% EDTA και 1.25 μl/ml *Garamycin* και διατηρείται στους 4°C.
- *Διάλυμα KBr πυκνότητας 1.063 g/ml.* 45.99 g KBr διαλυτοποιούνται σε d H₂O μέχρι τελικό όγκο, 500 ml. Το διάλυμα αυτό περιέχει 5μl/ml 10% EDTA και 1.25 μl/ml *Garamycin* και διατηρείται στους 4°C.
- *Ρυθμιστικό διάλυμα 10 mM PBS + 0.05%EDTA, pH 7.4.* 8.1816g NaCl, 1.3800g NaH₂PO₄H₂O και 1.7795g Na₂HPO₄2H₂O διαλυτοποιούνται σε 800 ml dH₂O και αφού ρυθμιστεί το pH σε 7.4 συμπληρώνεται ο όγκος στο 1 L με dH₂O. Στο διάλυμα αυτό προστίθενται 5 ml διαλύματος 10%EDTA. Το διάλυμα διατηρείται στους 4°C.

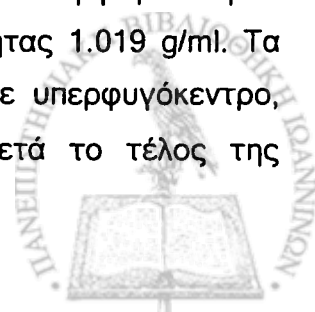
Πειραματική διαδικασία

Απομόνωση του πλάσματος

Η συλλογή του αίματος γίνεται σε πλαστικό σωληνάκι το οποίο περιέχει EDTA σε αναλογία 100 μl ACD για κάθε 10 ml αίματος. Το σωληνάκι φυγοκεντρείται στις 3100 rpm (1500xg) για 20 min, σε θερμοκρασία δωματίου, σε φυγόκεντρο πάγκου για να καταβυθισθούν τα κύτταρα του αίματος. Το πλάσμα συλλέγεται με πιπέτα. Σε αυτό προστίθεται 5 μl 10% EDTA και 1.25 μl *Garamycin* ανά ml πλάσματος.

Απομόνωση της VLDL και IDL

Μετράται ο όγκος του πλάσματος σε ml και πολλαπλασιάζεται με το συντελεστή 0.0212. Ο αριθμός που προκύπτει ισούται με τα g στερεού KBr που προστίθεται στο πλάσμα ώστε η πυκνότητά του να γίνει 1.019 g/ml. Το πλάσμα μοιράζεται σε σωληνάκια υπερφυγοκέντρου *Quickseal*, ο όγκος των οποίων συμπληρώνεται με διάλυμα KBr πυκνότητας 1.019 g/ml. Τα σωληνάκια, αφού ζυγοσταθμισθούν, σφραγίζονται και τοποθετούνται σε υπερφυγόκεντρο, όπου φυγοκεντρούνται στις 40000 rpm, για 10 h, στους 14°C. Μετά το τέλος της



υπερφυγοκέντρωσης οι VLDL έχουν συσσωρευθεί στην κορυφή του σωλήνα. Οι VLDL συλλέγονται προσεκτικά με σύριγγα από την κορυφή του σωλήνα (2-2.5 ml). Στη συνέχεια συλλέγεται και το υπόλειμμα το οποίο περιέχει LDL, HDL και άλλες πρωτεΐνες.

Απομόνωση της LDL

Μετράται ο όγκος του υπολείμματος της πρώτης υπερφυγοκέντρωσης σε ml και πολλαπλασιάζεται με το συντελεστή 0.060. Ο αριθμός που προκύπτει ισούται με τα g στερεού KBr που προστίθεται στο υπόλειμμα, ώστε η πυκνότητά του να μεταβληθεί από 1.019 σε 1.063 g/ml. Το υπόλειμμα μοιράζεται σε σωληνάκια υπερφυγοκέντρου Optiseal, ο όγκος των οποίων συμπληρώνεται με διάλυμα KBr πυκνότητας 1.063 g/ml. Τα σωληνάκια, αφού ζυγοσταθμισθούν, σφραγίζονται και τοποθετούνται σε υπερφυγόκεντρο, όπου φυγοκεντρούνται στις 40000 rpm, για 10 h, στους 14°C. Μετά το τέλος της υπερφυγοκέντρωσης οι LDL συσσωρεύονται στην κορυφή του σωλήνα, αφού έχουν διαχωρισθεί από τα υπόλοιπα συστατικά του πλάσματος. Οι LDL συλλέγονται προσεκτικά με σύριγγα από την κορυφή του σωλήνα (2-2.5 ml).

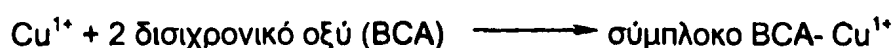
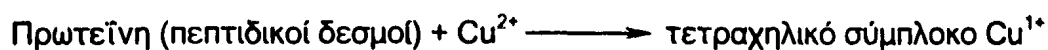
Έκπλυση της LDL

Οι απομονωμένες LDL υπερφυγοκεντρούνται ακόμα μία φορά ώστε να καθαρισθούν όσο το δυνατό περισσότερο από την αλβουμίνη του πλάσματος. Οι LDL μοιράζονται σε σωληνάκια υπερφυγοκέντρου Optiseal, ο όγκος των οποίων συμπληρώνεται με διάλυμα KBr πυκνότητας 1.063 g/ml. Τα σωληνάκια, αφού ζυγοσταθμισθούν, σφραγίζονται και τοποθετούνται σε υπερφυγόκεντρο, όπου φυγοκεντρούνται στις 40000 rpm, για 10 h, στους 14°C. Μετά το τέλος της υπερφυγοκέντρωσης οι LDL έχουν συσσωρευθεί στην κορυφή του σωλήνα από όπου συλλέγονται με σύριγγα (2-2.5 ml). Ακολουθεί διαπίδυση της LDL για 24h στους 4°C στο σκοτάδι έναντι ρυθμιστικού διαλύματος PBS 10mM και μέτρηση της πρωτεΐνης με τη μέθοδο BCA.

8.2.2. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ BCA

Αρχή της μεθόδου

Τα ιόντα Cu^{2+} ανάγονται αρχικά από τις πρωτεΐνες, σε αλκαλικό περιβάλλον, σε ιόντα Cu^+ , κάθε ένα από τα οποία σχηματίζει στη συνέχεια έγχρωμο, υδατοδιαλυτό σύμπλοκο με 2 μόρια δισιχρονικού οξέος, σύμφωνα με την παρακάτω αντίδραση, που απορροφά στα 562 nm.



Αντιδραστήρια- Όργανα

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

Αντιδραστήριο Α. Το αντιδραστήριο Α είναι μείγμα ανθρακικού νατρίου, διττανθρακικού νατρίου, δισυχρονικού οξέος και ταρταρικού νατρίου σε 0.2N NaOH

Αντιδραστήριο Β. Διάλυμα 4% CuSO₄

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

Πλακίδιο ELISA 96 θέσεων (Sarstedt)

Οκτακάναλη πολυπιπέτα σταθερού όγκου 200 μl (Costar)

Μετρητής microelisa (Spectra MAX 190)

Διαλύματα εργασίας

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

Πειραματική διαδικασία

Σε πλακίδιο ELISA 96 θέσεων τοποθετούνται 20 μl προτύπων διαλυμάτων BSA καθώς και 20 μl δείγματος. Στη συνέχεια προστίθενται με πολυπιπέτα 200 μl του διαλύματος εργασίας σε κάθε θέση της πλάκας. Η πλάκα καλύπτεται με αυτοκόλλητη μεμβράνη, ανακινείται ήπια και επωάζεται στους 37°C για 30 min. Έπειτα εισάγεται στον μετρητή microelisa όπου φωτομετρείται στα 562 nm.

Επεξεργασία των αποτελεσμάτων

Με βάση τις απορροφήσεις των προτύπων δειγμάτων σχεδιάζεται με τη βοήθεια ηλεκτρονικού υπολογιστή, η βέλτιστη ευθεία. Από την εξίσωση της πρότυπης καμπύλης και από τις απορροφήσεις των δειγμάτων υπολογίζονται τα mg/ml πρωτεΐνης που περιέχουν τα δείγματα.

8.2.3. ΑΠΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗ ΤΗΣ PAF-AH ΤΗΣ LDL

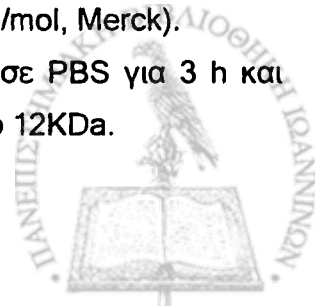
Αντιδραστήρια- Όργανα

LDL. Η LDL απομονώνεται υπερφυγοκεντρικά, όπως έχει περιγραφεί και διατηρείται στο ψυγείο, στους 4°C, παρουσία 0.05% EDTA.

Pefabloc (4-(2-aminoethyl) benzenesulfonyl fluoride, MB: 279g/mol, Merck).

Μεμβράνη διαπίδυσης (Sigma). Η μεμβράνη ενεργοποιείται σε PBS για 3 h και κατακρατά οτιδήποτε συστατικό έχει μοριακό βάρος μεγαλύτερο από 12KDa.

Φίλτρα διήθησης 0.20 μ (Corning).



Διαλύματα εργασίας

- *Ρυθμιστικό διάλυμα 10 mM PBS, pH 7.4.* Το διάλυμα παρασκευάζεται όπως αναφέρεται παραπάνω.
- *Διάλυμα 100 mM Pefabloc.* 0.0187 g pefabloc διαλύονται σε 670.25 μl H₂O. Το διάλυμα διατηρείται στους 4°C.

Πειραματική διαδικασία

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

8.2.4. ΟΞΕΙΔΩΣΗ ΤΗΣ LDL

Αρχή της μεθόδου

Η οξειδωτική τροποποίηση της LDL επιτυγχάνεται με την επώασή της, σε κατάλληλες συνθήκες, με ιόντα Cu²⁺ στους 37°C. Η παρακολούθηση της οξειδωσης γίνεται στα 234 nm, περιοχή όπου απορροφούν τα συζυγή διένια που σχηματίζονται στην LDL κατά την υπεροξειδωση των ενδογενών πολυακόρεστων λιπαρών οξέων^[442].

Αντιδραστήρια- Όργανα

LDL. Οι LDL απομονώνονται υπερφυγοκεντρικά, όπως έχει περιγραφεί και διατηρούνται στο ψυγείο, στους 4°C, παρουσία EDTA 0.05%.

CuSO₄ (M.B: 159.61 g/mol, Riedel-deHaen).

Μεμβράνη διαπίδυσης (Sigma). Η μεμβράνη ενεργοποιείται σε PBS για 3 h και κατακρατά οτιδήποτε συστατικό έχει μοριακό βάρος μεγαλύτερο από 12 kDa.

Φίλτρα διήθησης 0.20 μ (Corning).

Διαλύματα εργασίας

- *Διάλυμα 10% EDTA, pH 7.0.* Το διάλυμα παρασκευάζεται όπως αναφέρεται παραπάνω.



- *Ρυθμιστικό διάλυμα 10 mM PBS, pH 7.4.* Το διάλυμα παρασκευάζεται όπως αναφέρεται παραπάνω.
- *Διάλυμα 20 mM CuSO₄.* 0.0319 g CuSO₄ διαλυτοποιούνται σε 100 ml dH₂O δίνοντας διάλυμα 20 mM CuSO₄. Το διάλυμα διατηρείται στους 4°C.
- *Διάλυμα 0.5 mM CuSO₄.* 0.25 ml του διαλύματος 20 mM CuSO₄ προσθέτονται σε 10 ml dH₂O δίνοντας διάλυμα 0.5 mM CuSO₄. Το διάλυμα διατηρείται στους 4°C.

Πειραματική διαδικασία

Προετοιμασία των LDL για οξείδωση

Οι LDL διατηρούνται στους 4°C παρουσία EDTA 0.05%, οπότε πριν την οξείδωση υφίστανται εκτενή διαπίδυση για την απομάκρυνση του EDTA. Οι LDL μεταφέρονται σε μεμβράνη διαπίδυσης και τοποθετούνται σε ποτήρι που περιέχει 200πλάσιο όγκο, σε σχέση με τον όγκο των LDL, 10 mM PBS, pH 7.4. Η διαπίδυση γίνεται στους 4°C, υπό συνεχή ανάδευση. Μετά από 5h το PBS αντικαθιστάται με καινούργιο και η διαπίδυση συνεχίζεται για άλλες 19h. Μετά το τέλος της διαπίδυσης οι LDL συλλέγονται προσεκτικά με σύριγγα και διηθούνται από φίλτρο 0.20 μ. Ακολουθεί προσδιορισμός της πρωτεΐνης της LDL με τη μέθοδο BCA.

Οξείδωση της LDL

Οι LDL αραιώνονται στα 100 μg πρωτεΐνης/ml με την προσθήκη κατάλληλου όγκου 10 mM PBS, pH 7.4. Η οξείδωση αρχίζει με την προσθήκη διαλύματος 0.5 mM CuSO₄, 10 μl/ml LDL, δίνοντας τελική συγκέντρωση ιόντων 5 μM Cu²⁺. Οι LDL τοποθετούνται σε UV φωτόμετρο στους 37°C για όση ώρα διαρκεί η οξείδωση. Η οξείδωση παρακολουθείται στα 234 nm με καταγραφή της σιγμοειδούς καμπύλης παραγωγής των συζυγών διενίων.

Τερματισμός της οξείδωσης

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

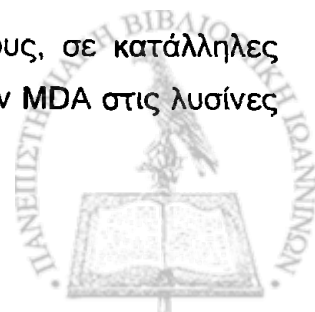
Έλεγχος του βαθμού οξείδωσης

Ο βαθμός της οξειδωτικής τροποποίησης της LDL υπολογίζεται με τη μέτρηση της REM, με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης και με τη μέτρηση των TBARS.

8.2.5. ΧΗΜΙΚΗ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΗ ΤΗΣ LDL ΜΕ ΜΗΛΟΝΙΚΗ ΔΙΑΛΔΕΪΔΗ

Αρχή της μεθόδου

Η χημική τροποποίηση της LDL επιτυγχάνεται με την επώασή τους, σε κατάλληλες συνθήκες, με MDA. Αποτέλεσμα της διαδικασίας είναι η μεταφορά ομάδων MDA στις λυσίνες της apo B με αποτέλεσμα τη χημική τροποποίηση του σωματιδίου της LDL.



Αντιδραστήρια - Όργανα

NaOH (M.B.: 40 g/mol, Merck)

HCl 37% (M.B.: 36.46 g/mol, $d=1.19$ g/ml, Merck)

Μηλονική διαλδεΐδη (MDA) (bis dimethylacetal, M.B.: 164.20 g/mol, $d=0.997$ g/ml, Aldrich)

LDL. Η LDL απομονώνεται υπερφυγοκεντρικά όπως έχει περιγραφεί και έχει υποστεί εκτενή διαπίδυση για την απομάκρυνση του EDTA.

Μεμβράνη διαπίδυσης (Sigma). Η μεμβράνη ενεργοποιείται σε PBS για 3h και κατακρατά οτιδήποτε συστατικό έχει μοριακό βάρος μεγαλύτερο από 12kDa

Φίλτρα διήθησης 0.20 μ (Corning)

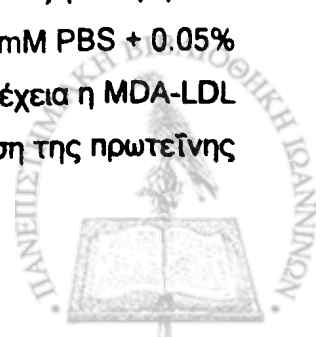
Φυγόκεντρος πάγκου (Hermle, Z 320)

Διαλύματα εργασίας

- *Διάλυμα 4 N HCl*. 39.4 ml HCl 37% αραιώνονται στα 100 ml με την προσθήκη dH₂O.
- *Διάλυμα 1 N NaOH*. 4 g NaOH διαλυτοποιούνται σε 80 ml H₂O. Το διάλυμα αφήνεται να κρυώσει και ο όγκος συμπληρώνεται στα 100 ml με H₂O.
- *Διάλυμα 10% EDTA, pH 7.0*. Το διάλυμα παρασκευάζεται όπως αναφέρεται παραπάνω.
- *Ρυθμιστικό διάλυμα 10 mM PBS +0.05% EDTA, pH 7.4*. Το διάλυμα παρασκευάζεται όπως αναφέρεται παραπάνω.
- *Αντιδραστήριο 0.5 M μηλονικής διαλδεΐδης*. Το αντιδραστήριο αυτό παρασκευάζεται με όξινη υδρόλυση της MDA (bis dimethylacetal). 440 μl MDA αναμιγνύονται με 60 μl HCl και 2 ml H₂O. Το μίγμα επωάζεται στους 37°C για 10 min ακριβώς. Η αντίδραση σταματά με την προσθήκη διαλύματος 1 N NaOH μέχρι το pH να γίνει 7.4 και στη συνέχεια ο όγκος συμπληρώνεται στα 5 ml με H₂O. Το αντιδραστήριο παρασκευάζεται λίγο πριν τη χρήση του.

Πειραματική διαδικασία

Στην LDL προστίθεται αντιδραστήριο 0.5 M MDA, σε αναλογία 100 μl/mg πρωτεΐνης LDL. Το μίγμα επωάζεται στους 37°C για 3h. Η τροποποιημένη LDL (MDA-LDL) μεταφέρεται σε μεμβράνη διαπίδυσης και υποβάλλεται σε εκτενή διαπίδυση για 24h σε 10 mM PBS + 0.05% EDTA, pH 7.4, με αλλαγή του διαλύματος διαπίδυσης στις 5 και 19h. Στη συνέχεια η MDA-LDL παραλαμβάνεται με σύριγγα και διηθείται με φίλτρο 0.20 μ. Ακολουθεί μέτρηση της πρωτεΐνης της. Η MDA-LDL διατηρείται στους 4°C, μέχρι να χρησιμοποιηθεί.



Έλεγχος της τροποποίησης

Ο έλεγχος της χημικής τροποποίησης της LDL γίνεται με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης.

8.2.6. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑΣ ΤΗΣ PAF-AH

Αρχή της μεθόδου

Η ενεργότητα της PAF-AH προσδιορίζεται με την μέθοδο ιζηματοποίησης με τριχλωροξικό οξύ (TCA). Η μέτρηση της ενεργότητας της PAF-AH πραγματοποιείται έμμεσα με τη μέτρηση των ραδιοσημασμένων οξικών ομάδων που ελευθερώνονται κατά την υδρόλυση του υποστρώματος [³H]-PAF από το ένζυμο. Οι ομάδες αυτές παραμένουν στο υπερκείμενο κατά την καταβύθιση με TCA του εναπομείναντος [³H]-PAF και του παραγόμενου Lyso-PAF, οι οποίοι βρίσκονται δεσμευμένοι σε BSA που μετουσιώνεται και καταβυθίζεται από το TCA [443].

Αντιδραστήρια- Όργανα

Μετρητής υγρού σπινθηρισμού, Packard (TriCarb 2100 TR)

Μικροφυγόκεντρος για erpendorf

Υδατόλουτρο 37°C

Φιαλίδια σπινθηρισμού των 4 ml

PAF (1-Ο-δεκαεξάκυλο-2-ακετυλο-ση-γλυκερο-3-φωσφοχολίνη, M.B.: 523.7 g/mol, Sigma)

Πρότυπο διάλυμα [³H]-PAF (1-Ο-δεκαεξέκυλο-2-[³Hακετυλο]-ση-γλυκερο-3-φωσφοχολίνη, 0.25 mCi/0.5 ml, 10 Ci/mmol, DuPont New England Nuclear Boston MA)

Υγρό σπινθηρισμού, Scintillation liquid Optiphase Hisafe 3

Τριχλωροξικό οξύ (TCA, Merck)

Αλβουμίνη βοδινού ορού ελεύθερη λιπαρών οξέων (FFA BSA, Sigma)

Διαλύματα εργασίας

- *Διάλυμα 20 mM PAF.* Διαλύονται 25 mg σκόνης PAF σε 2.387 ml 80% αιθανόλης. Το διάλυμα διατηρείται στους -20°C.
- *Διάλυμα 20% TCA.* 20 g TCA διαλυτοποιούνται σε 100 ml H₂O. Το διάλυμα διατηρείται στους 4°C.
- *Διάλυμα 2.5 mg/ml BSA.* 25 mg BSA διαλυτοποιούνται σε 10 ml φυσιολογικό ορό. Το διάλυμα διατηρείται στους -20°C.
- *Διάλυμα 100 mg/ml BSA.* 1 g BSA διαλυτοποιείται σε 10 ml φυσιολογικό ορό. Το διάλυμα διατηρείται στους -20°C.



- *Ρυθμιστικό διάλυμα Hepes pH 7.4.* Διαλύονται 1.0009 g Hepes, 8.0063 g NaCl, 0.1939 g KCl και 0.7445 g Titriplex III σε 1 lt dH₂O. Το pH ρυθμίζεται στο 7.4 και το διάλυμα διατηρείται στους 4°C.
- *Διάλυμα 1000 μM [³H]-PAF.* Σε πλαστικό σωληνάκι πολυπροπυλενίου αναμιγνύονται 50 μl από τον 20 mM PAF με 15.5 μl από το πρότυπο διάλυμα [³H]-PAF. Εξατμίζονται μέχρι ξηρού σε ρεύμα αζώτου και αναδιασπείρονται σε 1 ml BSA 2.5 mg/ml. Το μίγμα αναδεύεται σε Vortex και επωάζεται στους 37°C. Το διάλυμα διατηρείται στους -20°C.

Πειραματική διαδικασία

Προετοιμασία δειγμάτων

Ως πηγή του ενζύμου χρησιμοποιούνται:

4 μg πρωτεΐνης LDL τα οποία αναμιγνύονται με ρυθμιστικό διάλυμα Hepes pH 7.4 μέχρι τελικού όγκου 90 μl ή

50 μl πλάσματος (αραιωμένου 1/50 v/v με ρυθμιστικό διάλυμα 10mM Hepes, pH 7.4) τα οποία αναμιγνύονται με ρυθμιστικό διάλυμα Hepes pH 7.4 μέχρι τελικού όγκου 90 μl ή

Παράλληλα ετοιμάζεται και δείγμα ελέγχου (τυφλό) όπου περιέχει 90 μl Hepes pH 7.4. Τα erpendorf τοποθετούνται σε υδατόλουτρο. Η ενζυμική αντίδραση ξεκινά με την προσθήκη 10 μl [³H]-PAF σε δείγμα και τυφλό ενώ ακολουθεί επώαση στους 37°C για 10 min ακριβώς για τα δείγματα των λιποπρωτεϊνών ή των πλάσμάτων. Μόλις συμπληρωθεί ο απαραίτητος χρόνος επώασης, η ενζυμική αντίδραση σταματά με την προσθήκη 20 μl διαλύματος 100 mg/ml BSA. Στη συνέχεια τα erpendorf αναδεύονται ισχυρά σε Vortex και τοποθετούνται σε θερμοκρασία 4°C (παγόλουτρο) για 15 min τουλάχιστον. Έπειτα προστίθενται 80 μl διαλύματος 20%TCA, τα erpendorf αναδεύονται ισχυρά σε Vortex και τοποθετούνται σε θερμοκρασία 4°C για άλλα 30 min τουλάχιστον. Ακολουθεί φυγοκέντρηση, σε μικροφυγόκεντρο erpendorf, σε 10000 rpm (7200xg) για 3.5 min ώστε να καταβυθιστούν οι πρωτεΐνες. Στην συνέχεια 100 μl από το υπερκείμενο μεταφέρονται σε σωληνάκι σπινθηρισμού, προστίθενται 2 ml υγρού σπινθηρισμού, το σωληνάκι αναδεύεται καλά και τοποθετείται στο μετρητή υγρού σπινθηρισμού. Η μέτρηση γίνεται για 3 min και τα αποτελέσματα δίνονται σε κρούσεις, cpm.

Υπολογισμός ειδικής ενεργότητας

Στο μετρητή υγρού σπινθηρισμού μετρούνται οι κρούσεις που δίνουν τα 10 μl των διαλυμάτων [³H]-PAF 1000 μM για τον υπολογισμό της ειδικής ενεργότητας (E.E). Έτσι, π.χ τα 10 μl [³H]-PAF 100 μM περιέχουν 10 nmol [³H]-PAF, άρα:

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



Υπολογισμός ενζυμικής ενεργότητας

Στο μετρητή υγρού σπινθηρισμού μετρούνται οι κρούσεις των 100 μl του δείγματος (cpm_{δ}) και του δείγματος ελέγχου (cpm_{τ}). Πριν από τη μέτρηση υπήρχε συνολικά όγκος 200 μl, ο οποίος δίνει 2 x cpm_{δ} κρούσεις από τις οποίες αφαιρούνται οι κρούσεις που οφείλονται στο δείγμα ελέγχου (τυφλό) 2 x cpm_{τ} . Άρα, οι καθαρές κρούσεις που οφείλονται στο δείγμα είναι 2 x ($cpm_{\delta} - cpm_{\tau}$). Έτσι η ενεργότητα της PAF-AH υπολογίζεται από τον παρακάτω τύπο:

$$\text{Ενεργότητα PAF - AH} = 2 \frac{(cpm_{\delta} - cpm_{\tau}) * 1000}{E.E. * \alpha * \beta}$$

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

α, είναι τα μg πρωτεΐνης ή τα μl εναιωρήματος

β, είναι ο χρόνος επώασης του δείγματος σε min

Έτσι, η ενεργότητα της PAF-AH εκφράζεται ως ηmol του [3H]-PAF που αποικοδομούνται ανά mg πρωτεΐνης ή ανά ml εναιωρήματος ή ανά mg λιποπρωτεϊνικής μάζας, ανά min.

8.2.7. 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.

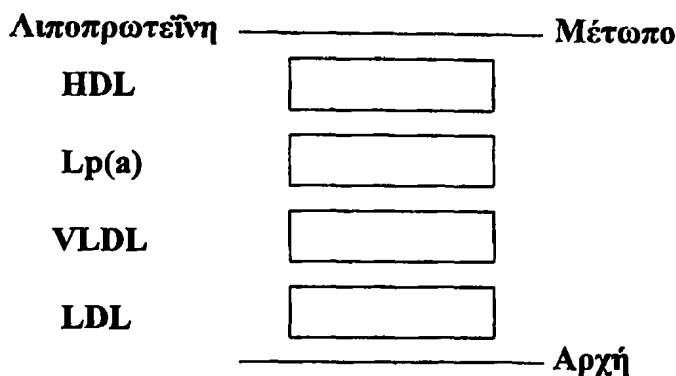
Δείγμα

Χρησιμοποιείται ορός ή πλάσμα με EDTA καθώς και απομονωμένη LDL για τον έλεγχο της καθαροτητας της. Η συντήρηση των δειγμάτων γίνεται στους 4°C το πολύ για 3 μέρες.

Η ηλεκτροφόρηση ενός νορμολιπιδαιμικού ατόμου με Lp(a) εμφανίζεται στην *Εικόνα*

21:





Εικόνα 21. Ηλεκτροφόρηση ενός νορμολιπιδαιμικού ατόμου με Lp(a)

Όργανα- Αντιδραστήρια

Συσκευή ηλεκτροφόρησης Sebia -K20

Τροφοδοτικό (TP-4 POWER SUPPLY).

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

10 πλάκες με πήκτωμα αγαρόζης, έτοιμες για χρήση.

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

Φιαλίδια συμπυκνωμένης χρωστικής 3% Sudan black.

Διάλυμα χρώσης. Η παρασκευή του διαλύματος χρώσης γίνεται ως εξής: Σε κωνική φιάλη αναμιγνύονται 160 ml απόλυτης αιθανόλης (EtOH) με 2 ml 3% Sudan black. Υπο συνεχή ισχυρή ανάδευση ακολουθεί προσθήκη, 140 ml d H₂O.

Ειδική μεμβράνη με θέσεις τοποθέτησης των δειγμάτων.

Διηθητικά χαρτιά

Διάλυμα EtOH 45% σε d H₂O (v/v)

Εκτέλεση της ηλεκτροφόρησης

Η πλάκα με το πήκτωμα αγαρόζης τοποθετείται σε επιφάνεια καθαρισμένη εκ των προτέρων με 45% EtOH. Το πήκτωμα έχει χαραγμένα δύο βέλη τα οποία καθορίζουν τη θέση τοποθέτησης της μεμβράνης των δειγμάτων. Η υγρασία που υπάρχει στην επιφάνεια του πήκτωματος απορροφάται γρήγορα με την εφαρμογή διηθητικού χαρτιού στην θέση που ορίζεται από τα βέλη. Στην συνέχεια εφαρμόζεται η μεμβράνη τοποθέτησης των δειγμάτων πάνω στο πήκτωμα της αγαρόζης ώστε τα βέλη της μεμβράνης να συμπίπτουν με τα βέλη της επιφάνειας της πήκτης. Κατά την εφαρμογή της μεμβράνης στην αγαρόζη πρέπει να αποφεύγεται η δημιουργία φυσαλίδων αέρα γιατί παρεμποδίζουν την μετανάστευση των δειγμάτων. Έπειτα προστίθενται τα δείγματα στις κατάλληλες θέσεις με αυτόματη πιπέτα

χωρίς να τραυματισθεί η αγαρόζη. Ο όγκος των δειγμάτων για ορό ή πλάσμα είναι 2 μl ενώ για άλλο υλικό είναι 5 μl. Χρησιμοποίηση μεγάλων ποσοτήτων δείγματος έχει ως αποτέλεσμα την εμφάνιση υπολειμμάτων που καθιστά δύσκολη την ταυτοποίηση των λιποπρωτεϊνών. Τα δείγματα αφήνονται για 10 min ώστε να προσροφηθούν πλήρως στην αγαρόζη. Στη συνέχεια αφαιρείται η ειδική μεμβράνη και η πηκτή είναι έτοιμη για την ηλεκτροφόρηση. Σε κάθε διαμέρισμα της συσκευής ηλεκτροφόρησης προστίθενται 150 ml ρυθμιστικού διαλύματος Tris-βαρβιτουρικού και η πηκτή της αγαρόζης τοποθετείται ανεστραμμένη πάνω στη γέφυρα της ηλεκτροφόρησης με τα δείγματα προς την καθοδική πλευρά.

Συνθήκες ηλεκτροφόρησης

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

Χρώση των λιποπρωτεϊνών

Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης το πήκτωμα 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.

8.2.8. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ TBARS

Αρχή της μεθόδου

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

Αντιδραστήρια - Όργανα

Τριχλωροξικό οξύ (TCA) (M.B.: 163.39 g/mol, Sigma)

Θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBA) ($\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_2\text{S} \cdot \text{H}_2\text{O}$, M.B.: 162.20 g/mol, Serva)

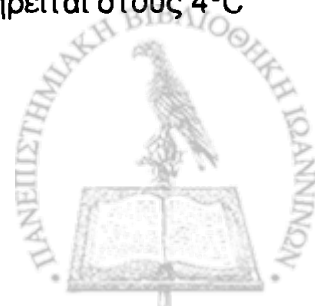
Μηλονική διαλδεΐδη (MDA) (1.1,3,3-tetramethoxy propane, M.B.: 164.20 g/mol, d: 0.997 g/ml, Aldrich)

LDL. Η LDL απομονώνεται υπερφυγοκεντρικά, όπως έχει περιγραφεί και διατηρείται στους 4°C , παρουσία EDTA 0.05%

oxLDL. Η oxLDL παρασκευάζεται όπως έχει περιγραφεί και διατηρείται στους 4°C παρουσία EDTA 0.05%

Γυάλινα σωληνάκια

Φυγόκεντρος πάγκου (Hermle, Z 320)



Διαλύματα εργασίας

- *Διάλυμα 10% TCA.* 10 g TCA διαλυτοποιούνται σε 100 ml dH₂O. Το διάλυμα διατηρείται στους 4°C.
- *Διάλυμα 0.67% TBA.* 0.7539 g TBA διαλυτοποιούνται σε περίπου 80 ml dH₂O υπό θέρμανση. Το διάλυμα αφήνεται να κρυώσει και ο όγκος του συμπληρώνεται στα 100 ml με την προσθήκη dH₂O. Το TBA είναι ευαίσθητο στον αέρα για αυτό μετά από κάθε χρήση και πριν από την αποθήκευσή του αφαιρείται όλος ο αέρας από το μπουκάλι με ρεύμα N₂. Το διάλυμα διατηρείται στους 4°C.
- *Διάλυμα 6 mM MDA.* Μέρος του πυκνού διαλύματος MDA αραιώνεται 1000 φορές με την προσθήκη dH₂O, δίνοντας διάλυμα 6 mM MDA. Το διάλυμα διατηρείται στους 4°C.
- *Πρότυπο διάλυμα 200 μM MDA.* 30 μl διαλύματος MDA 6 μmol/ml προσθέτονται σε 870 μl H₂O δίνοντας διάλυμα 200 μM MDA. Το διάλυμα αυτό παρασκευάζεται λίγο πριν τη χρήση του.

Πειραματική διαδικασία

Προετοιμασία των δειγμάτων

Για τη μέτρηση των TBARS σε LDL, μεταφέρεται σε γυάλινο σωληνάκι ποσότητα φυσικής ή οξειδωμένης LDL, που περιέχει 10 μg πρωτεΐνης. Ο όγκος των δειγμάτων συμπληρώνεται στα 100 μl με την προσθήκη dH₂O.

Προετοιμασία των προτύπων

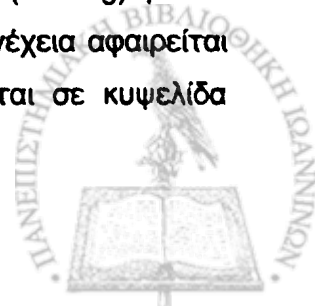
Σε 6 γυάλινα σωληνάκια προσθέτονται 0, 5, 10, 15, 20 και 25 μl διαλύματος 200 μM MDA αντίστοιχα (0-5 nmol MDA αντίστοιχα). Ο όγκος των προτύπων συμπληρώνεται στα 100 μl με την προσθήκη dH₂O. Στη συνέχεια τα πρότυπα κατεργάζονται με τον ίδιο ακριβώς τρόπο όπως και τα προς μέτρηση δείγματα.

Κατεργασία των δειγμάτων και των προτύπων

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

Φωτομέτρηση των δειγμάτων και των προτύπων

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



Επεξεργασία των αποτελεσμάτων

Με βάση τις απορροφήσεις των προτύπων δειγμάτων σχεδιάζεται με τη βοήθεια ηλεκτρονικού υπολογιστή η καλύτερη ευθεία. Από την εξίσωση της πρότυπης καμπύλης και από τις απορροφήσεις των δειγμάτων υπολογίζονται τα ημολ καρβονυλικών ενώσεων που περιέχει η LDL. Ο αριθμός των ημολ πολλαπλασιάζεται με συντελεστή 100 ώστε τα αποτελέσματα να δίνονται σε ημολ MDA/mg πρωτεΐνης LDL.

8.2.9. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΑΥΤΟΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ ELISA ΤΥΠΟΥ SANDWICH

Αρχή της μεθόδου

Ο ορός επωάζεται σε κυψελίδες που περιέχουν ακινητοποιημένη φυσική LDL, oxLDL ή MDA-LDL ως αντιγόνο. Με διαδοχικές εκπλύσεις το αντίσωμα που δεν έχει δεσμευθεί απομακρύνεται και ακολουθεί μια επώαση με πολυκλωνικό αντίσωμα κατά του αντι-oxLDL (ή αντι-MDA-LDL) αντισώματος το οποίο είναι συζευγμένο με υπεροξειδάση αγριοραπανιού. Η περίσσεια της υπεροξειδάσης απομακρύνεται με διαδοχικές εκπλύσεις και στην κυψελίδα παραμένει ακινητοποιημένο το σύμπλοκο του αντιγόνου με το μονοκλωνικό και το πολυκλωνικό αντίσωμα. Ακολουθεί επώαση με υπεροξειδίο του υδρογόνου και χρωμοφόρο (ο-φαινυλοδιαμίνη). Η αντίδραση παραγωγής χρώματος σταματά με την επίδραση HCl και η ένταση του χρώματος μετράται στα 492nm^[444, 445].

Αντιδραστήρια -Όργανα

Κιτρικό οξύ (C₆H₈O₇, M.B.: 192.13 g/mol, Merck)

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

Πλακίδια ELISA 96 θέσεων (Corning Costar)

Ζελατίνη (Sigma)

30% Υπεροξειδίο του υδρογόνου (H₂O₂, Merck)

Ταμπλέτες ο-φαινυλενοδιαμίνης (o-phenylenediamine dihydrochloride (OPD), Sigma)

Δευτερογενές αντίσωμα (Rabbit anti-human IgG) επισημασμένο με υπεροξειδάση αγριοραπανιού (Dako)

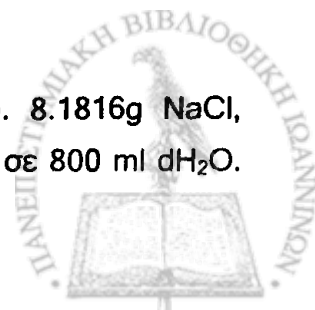
Οκτακάναλη πολυπιπέτα μεταβαλλόμενου όγκου 20-200 μl (Costar)

Οκτακάναλη πολυπιπέτα σταθερού όγκου 200 μl (Costar)

Μετρητής microELISA (Spectra MAX 190)

Διαλύματα εργασίας

- *Αντιδραστήριο έκπλυσης* (10 mM PBS /BHT/EDTA, pH 7.4). 8.1816g NaCl, 1.3800g NaH₂PO₄·H₂O και 1.7795g Na₂HPO₄·2H₂O διαλυτοποιούνται σε 800 ml dH₂O.



Στο διάλυμα αυτό προστίθενται 0.1005g EDTA και 0.0044g βουτυλοϋδροξυ-τολουόλιο (BHT) και αφού ρυθμιστεί το pH σε 7.4 συμπληρώνεται ο όγκος στο 1 L με dH₂O. Το διάλυμα διατηρείται στους 4°C.

- *Διάλυμα 0.2M Na₂HPO₄·2H₂O.* Διαλύονται 3.5598g Na₂HPO₄·2H₂O σε 100 ml dH₂O.
- *Διάλυμα 0.1M κιτρικό οξύ.* Διαλύονται 1.9213g κιτρικού οξέος σε 100ml dH₂O.
- *Διάλυμα 1% ζελατίνης.* 1ml ζελατίνης αραιώνεται σε 100ml 10mM PBS/BHT/EDTA.
- *Ρυθμιστικό διάλυμα κιτρικών. pH 5.0.* Σε 50 ml dH₂O προστίθενται 25.7ml διαλύματος 0.2M Na₂HPO₄·2H₂O και 24.3ml διαλύματος 0.1M κιτρικού οξέος. Το pH ρυθμίζεται στο 5.0. Το διάλυμα διατηρείται στους 4°C.
- *Αντιδραστήριο ανάπτυξης χρώματος.* Σε 10ml διαλύματος κιτρικών προστίθενται μία ταμπλέτα OPD και 5ml H₂O₂ 30%.
- *Διάλυμα 2N HCl.* Προστίθενται 10ml HCl σε 50ml dH₂O. Το διάλυμα διατηρείται σε θερμοκρασία δωματίου.

Πειραματική διαδικασία

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

1. Το πλακίδιο ELISA καλύπτεται με το αντιγόνο σε συγκέντρωση 10μg/ml PBS/BHT/EDTA/well και φυλάσσεται στους 4°C για 24h.
2. Ακολουθούν δυο εκπλύσεις με το αντιδραστήριο έκπλυσης και απομάκρυνση του υπερκειμένου με τέτοιο τρόπο ώστε να απομακρυνθεί η ποσότητα του αντιγόνου που δεν έχει δεσμευθεί και να εξασφαλισθεί με τον τρόπο αυτό η μεγαλύτερη ακρίβεια της μεθόδου.
3. Προστίθενται 100μl διαλύματος ζελατίνης 1% για τη δέσμευση των κενών θέσεων. Γίνεται επώαση για 1h σε θερμοκρασία δωματίου.
4. Ακολουθούν δυο εκπλύσεις με το αντιδραστήριο έκπλυσης και απομάκρυνση του υπερκειμένου με τέτοιο τρόπο ώστε να απομακρυνθεί η μέγιστη δυνατή ποσότητα υγρού και να εξασφαλισθεί με τον τρόπο αυτό η μεγαλύτερη ακρίβεια της μεθόδου.
5. Προστίθενται 50 μl του ορού σε αραιώση 1/50 στο διάλυμα 1% ζελατίνης. Γίνεται επώαση για 1h σε θερμοκρασία δωματίου.



6. Ακολουθούν πέντε εκπλύσεις με το αντιδραστήριο έκπλυσης και απομάκρυνση του υπερκείμενου με τέτοιο τρόπο ώστε να απομακρυνθεί η μέγιστη δυνατή ποσότητα υγρού και να εξασφαλισθεί με τον τρόπο αυτό η μεγαλύτερη ακρίβεια της μεθόδου.
7. Προστίθενται 50 μl του αντισώματος συζευγμένου με υπεροξειδάση αγριοραπανιού αραιωμένου σε όγκο 1/1000 στο διάλυμα 1% ζελατίνης. Η επώαση γίνεται για 1h σε θερμοκρασία δωματίου.
8. Ακολουθούν πέντε εκπλύσεις με το αντιδραστήριο έκπλυσης και απομάκρυνση του υπερκείμενου με τέτοιο τρόπο ώστε να απομακρυνθεί η μέγιστη δυνατή ποσότητα υγρού και να εξασφαλισθεί με τον τρόπο αυτό η μεγαλύτερη ακρίβεια της μεθόδου.
9. 50μl από το αντιδραστήριο ανάπτυξης χρώματος προστίθενται σε κάθε κυψελίδα. Ακολουθεί επώαση για 4 min σε θερμοκρασία δωματίου.
10. 50μl από το αντιδραστήριο τερματισμού της αντίδρασης (2N HCl) προστίθενται σε κάθε κυψελίδα με τέτοιο τρόπο ώστε για κάθε δείγμα ο χρόνος ανάπτυξης χρώματος να είναι 4 min.
11. Μετράται η απορρόφηση στα 492 nm σε φωτόμετρο microELISA.

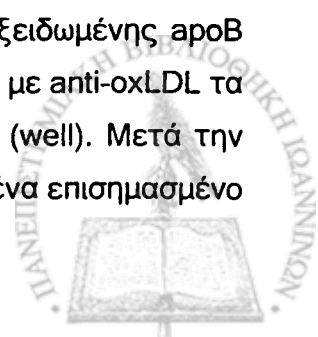
Επεξεργασία αποτελεσμάτων

Ο τίτλος των αυτοαντισωμάτων κατά των τροποποιημένων μορφών LDL δίνεται ως ο λόγος της απορρόφησης όταν ως αντιγόνο χρησιμοποιείται η oxLDL (ή MDA-LDL) προς την απορρόφηση όταν ως αντιγόνο χρησιμοποιείται η φυσική LDL.

8.2.10. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΙΠΕΔΩΝ ΤΗΣ oxLDL ΣΤΟΝ ΟΡΟ ΜΕ ELISA

Αρχή μεθόδου

Τα επίπεδα της oxLDL στον ορό προσδιορίστηκαν με ELISA με τη χρήση εμπορικού kit (Mercodia® Oxidized LDL ELISA, Mercodia AB). Ο προσδιορισμός των επιπέδων της oxLDL με ELISA στηρίζεται στην άμεση τεχνική τύπου σάντουιτς στην οποία δύο μονοκλωνικά αντισώματα κατευθύνονται κατά διαφορετικών αντιγονικών επιτόπων της οξειδωμένης apoB 100. Κατά τη διάρκεια της επώασης η oxLDL που υπάρχει στο δείγμα αντιδρά με anti-oxLDL τα οποία είναι ακινητοποιημένα στον πυθμένα της θήκης του πλακιδίου ELISA (well). Μετά την έκπλυση, η οποία απομακρύνει τα μη αντιδρώντα συστατικά του πλάσματος, ένα επισημασμένο



με υπεροξειδάση αντίσωμα κατά της apoB-100 (anti-human) αναγνωρίζει την oxLDL που είναι ακινητοποιημένη στη στερεά επιφάνεια. Μετά από δεύτερη επώαση και έκπλυση η οποία απομακρύνει το επισημασμένο αντίσωμα που δεν έχει αντιδράσει, γίνεται η ανίχνευση του προσδεμένου επισημασμένου αντισώματος με την προσθήκη της 3,3',5, 5'-τετραμεθυλβενζιδίνης (TMB). Η αντίδραση διακόπτεται με την προσθήκη οξέος δίνοντας ένα έγχρωμο προϊόν το οποίο απορροφά στα 450 nm

Αραίωση των δειγμάτων

Χρησιμοποιείται πλάσμα ή ορός. Τα δείγματα αραιώνονται την ίδια μέρα που πραγματοποιείται ο προσδιορισμός. Κάθε δείγμα αραιώνεται σε δύο βήματα. Ο ορός αραιώνεται αρχικά 1/81 στο ρυθμιστικό διάλυμα δείγματος (sample buffer). Ακολουθεί δεύτερη αρραίωση 1/6561 (αραίωση του 1/81 αραιωμένου δείγματος) στο ρυθμιστικό διάλυμα δείγματος. Το 1/81 αραιωμένο δείγμα είναι σταθερό για 4 ημέρες στους 2-8 °C ενώ το 1/6561 αραιωμένο δείγμα είναι σταθερό για 1 ημέρα.

Πειραματική πορεία

Όλα τα αντιδραστήρια αφήνονται να αποκτήσουν θερμοκρασία δωματίου πριν τη χρήση τους.

1. Προετοιμασία αρκετών θέσεων στο πλακίδιο για τα πρότυπα (standard), τα δείγματα ελέγχου (controls) και τα δείγματα εις διπλούν
2. Προσθέτουμε 25 μl από το κάθε πρότυπο, δείγμα ελέγχου και αραιωμένο δείγμα.
3. Προσθέτουμε 100 μl από το διάλυμα προσδιορισμού σε κάθε θήκη του πλακιδίου.
4. Επωάζουμε σε αναδευτήρα για 2 h σε θερμοκρασία δωματίου
5. Έκπλυση 6 φορές με το διάλυμα έκπλυσης
6. Ακολουθεί προσθήκη 100 μl του επισημασμένου ενζύμου
7. Επώαση σε αναδευτήρα για 1h σε RT
8. Έκπλυση 6 φορές με το διάλυμα έκπλυσης
9. Προσθήκη 200 μl του υποστρώματος TMB
10. Επωάζουμε για 15 min σε RT χωρίς ανάδευση
11. Προσθέτουμε 50 μl από το διάλυμα διακοπής της αντίδρασης
12. Μέτρηση της απορρόφησης στα 450 nm

Η μέτρηση γίνεται σε μονάδες ανά λίτρο (U/l, Mercodia® Oxidized LDL ELISA, Mercodia AB) μέσα σε 30 min από την προσθήκη του διαλύματος διακοπής της αντίδρασης.



8.3. ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Η στατιστική επεξεργασία έγινε με τη βοήθεια του στατιστικού λογισμικού SPSS® 11.0 software (SPSS INC Chicago, Ill). Το όριο της στατιστικής σημαντικότητας σε όλες τις δοκιμασίες τέθηκε στο $p < 0,05$.

Οι συνεχείς μεταβλητές και οι τίτλοι αυτοαντισωμάτων εκφράσθηκαν ως μέσες τιμές \pm μία τυχική απόκλιση (mean \pm standard deviation), εκτός από τις τιμές της $L_p(a)$ και των τριγλυκεριδίων στους ασθενείς με ασταθή στηθάγχη που εκφράσθηκαν ως ενδιάμεση τιμή (median) - εύρος (range). Ο έλεγχος για την κανονικότητα ή μη της κατανομής κάθε παραμέτρου έγινε με τη δοκιμασία Kolmogorov-Smirnov.

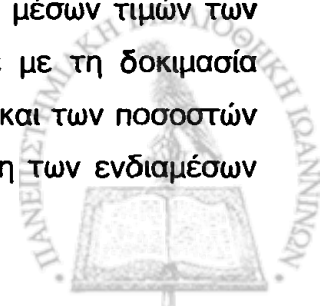
8.3.1. ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ΣΤΑΘΕΡΗ ΣΤΗΘΑΓΧΗ ΚΑΙ ΥΓΙΕΙΣ ΕΘΕΛΟΝΤΕΣ

Η σύγκριση των μέσων τιμών των παραμέτρων με κανονική κατανομή (normal distribution) στις δύο ομάδες της μελέτης έγινε με τη δοκιμασία Students' t-test for independent samples. Η σύγκριση των συχνοτήτων και των ποσοστών μεταξύ των ομάδων της μελέτης έγινε με τη δοκιμασία χ^2 -test.

Επιπρόσθετα πραγματοποιήθηκε πολυπαραγοντική λογιστική ανάλυση παλινδρόμησης (multivariate logistic regression analysis) για τον προσδιορισμό των σχετικών κινδύνων (adjusted risk ratios - RR) και των 95% διαστημάτων εμπιστοσύνης (95% confidence intervals - CI). Στην πολυπαραγοντική ανάλυση χρησιμοποιήθηκαν στατιστικά προσαρμοσμένες ομάδες, όπως αυτές προέκυψαν λαμβάνοντας υπόψη όλες τις στατιστικά σημαντικές μεταβλητές οι οποίες προέκυψαν στη μονοπαραγοντική λογιστική ανάλυση παλινδρόμησης (univariate logistic regression analysis). Η επιλογή του μοντέλου έγινε με τη μέθοδο backward stepwise (likelihood ratios) και μεταβλητές με p-value $< 0,05$ εκτιμήθηκαν ως ανεξάρτητοι παράγοντες όσον αφορά την εμφάνιση στεφανιαίας νόσου.

8.3.2. ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ΟΞΥ ΣΤΕΦΑΝΙΑΙΟ ΣΥΝΔΡΟΜΟ

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, οι ασθενείς χωρίσθηκαν σε δύο ομάδες: στην ομάδα ασθενών που έπαιρνε ατορβαστατίνη και στην ομάδα ασθενών που δεν έπαιρνε υπολιπιδαιμική αγωγή. Τη χρονική στιγμή κατά την έναρξη της μελέτης, η σύγκριση των μέσων τιμών των παραμέτρων με κανονική κατανομή στις δύο ομάδες της μελέτης έγινε με τη δοκιμασία Students' t-test for independent samples, ενώ η σύγκριση των συχνοτήτων και των ποσοστών μεταξύ των ομάδων της μελέτης έγινε με τη δοκιμασία χ^2 -test. Η σύγκριση των ενδιάμεσων



τιμών της $Lp(a)$ και των τριγλυκεριδίων έγινε με τη δοκιμασία Mann-Whitney U test για σύγκριση μεταξύ δύο ανεξάρτητων ομάδων.

Κατά τη διάρκεια της περιόδου παρακολούθησης για κάθε ομάδα ασθενών χωριστά οι διαφορές των τιμών των μεταβλητών σε κάθε χρονική στιγμή εκτιμήθηκαν με τη βοήθεια της ανάλυσης της διακύμανσης για επαναλαμβανόμενες μετρήσεις (repeated measures analysis of variances - ANOVA). Ειδικότερα οι διαφορές των τιμών της $Lp(a)$ και των τριγλυκεριδίων του ορού για κάθε ομάδα χωριστά σε κάθε χρονική στιγμή εκτιμήθηκαν με τη βοήθεια του μη παραμετρικού ελέγχου Wilcoxon signed ranks test.

Για την εκτίμηση τυχόν διαφορών στις μεταβολές των διαφόρων παραμέτρων σε κάθε χρονική στιγμή μεταξύ των δύο ομάδων ασθενών της μελέτης πραγματοποιήθηκε δοκιμασία ανάλυσης της συν-μεταβλητότητας (analysis of co-variance, ANCOVA), λαμβάνοντας ως συνμεταβλητές (covariates) τις τιμές κάθε μεταβλητής κατά την έναρξη της μελέτης ώστε να γίνει διόρθωση για τις αρχικές τιμές.



ΚΕΦΑΛΑΙΟ 9^ο

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

9.1. ΒΙΟΧΗΜΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΩΝ ΔΙΑΦΟΡΩΝ ΜΟΡΦΩΝ oxLDL, ΟΙ ΟΠΟΙΕΣ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΗΘΗΚΑΝ ΩΣ ΑΝΤΙΓΟΝΑ

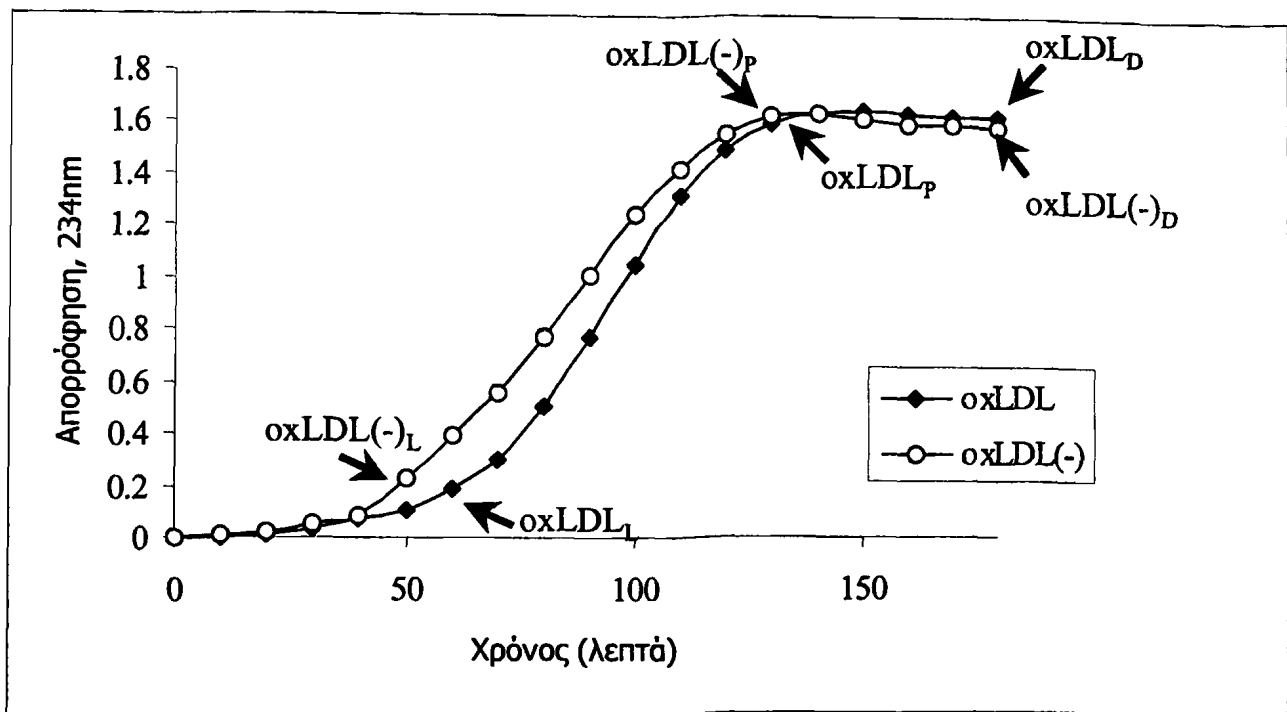
Για τον προσδιορισμό του τίτλου των αυτοαντισωμάτων κατά των διαφόρων μορφών oxLDL παρασκευάστηκαν τα αντίστοιχα αντιγόνα, όπως περιγράφεται στην πειραματική διαδικασία. Τα αντιγόνα αυτά χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό του τίτλου των αυτοαντισωμάτων σε όλες τις ομάδες της μελέτης, δηλαδή στους ασθενείς με σταθερή στηθάγχη, στους υγείς εθελοντές και στους ασθενείς με οξύ στεφανιαίο σύνδρομο. Στη συνέχεια θα αναφερθούμε στα χαρακτηριστικά των συγκεκριμένων αντιγόνων.

Η LDL που χρησιμοποιήθηκε, απομονώθηκε από μια δεξαμενή προσφάτως απομονωμένων ορών υγιών εθελοντών ηλικίας 23 έως 30 ετών διαφορετικών από την ομάδα των υγιών εθελοντών που συμμετείχε στη μελέτη και υποβλήθηκε σε οξειδωση σύμφωνα με την πειραματική διαδικασία, όπως προαναφέρθηκε.

Παρασκευάστηκαν τρεις (3) τύποι οξειδωμένης LDL (oxLDL), οι oxLDL_L, oxLDL_P και oxLDL_D οι οποίες απομονώθηκαν στο τέλος της λανθάνουσας (LAG) φάσης, της εκθετικής (PROPAGATION) φάσης και της φάσης αποικοδόμησης (DECOMPOSITION) της οξειδωσης της LDL αντίστοιχα. Επιπρόσθετα παρασκευάστηκαν και 3 αντίστοιχοι τύποι oxLDL, αφού πρώτα είχε απενεργοποιηθεί η ενδογενής PAF-AH της LDL. Αυτές οι μορφές θα αναφέρονται στη συνέχεια ως oxLDL(-), δηλαδή oxLDL(-)_L, oxLDL(-)_P και oxLDL(-)_D για τις αντίστοιχες φάσεις οξειδωσης της LDL (*Εικόνα 22*).

Πρέπει να αναφερθεί ότι η διάρκεια της λανθάνουσας φάσης της οξειδωσης της oxLDL(-) ήταν σημαντικά μικρότερη σε σύγκριση με την αντίστοιχη φάση οξειδωσης της oxLDL (54 ± 5 min έναντι $86,9 \pm 9$ min αντίστοιχα, $p < 0,001$, *Εικόνα 22*). Αντίθετα δεν παρατηρήθηκαν διαφορές στο ρυθμό της οξειδωσης της LDL ($3,0 \pm 0,1$ έναντι $2,7 \pm 0,3$ αντίστοιχα, $p = NS$) και στο συνολικό αριθμό σχηματισθέντων συζυγών διενίων ($506,8 \pm 47,7$ έναντι $492,9 \pm 18,5$ αντίστοιχα, $p = NS$).



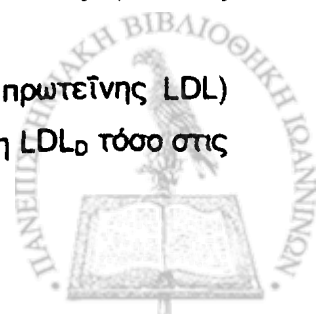


Εικόνα 22. Σιγμοειδής καμπύλη οξειδωσης της LDL και σημεία απομόνωσης των αντιγόνων oxLDL και oxLDL(-)

Η ηλεκτροφορητική κινητικότητα τόσο των μορφών της oxLDL, όσο και των μορφών της oxLDL(-) εμφάνισε προοδευτική αύξηση με αποτέλεσμα οι oxLDL_D και oxLDL(-)_D να εμφανίζουν τις μεγαλύτερες τιμές. Επιπρόσθετα δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στην ηλεκτροφορητική κινητικότητα των διαφόρων μορφών oxLDL και oxLDL(-) σε κάθε φάση της οξειδωσης (Πίνακας 6). Ένα αντιπροσωπευτικό ηλεκτροφορητικό προφίλ των διαφόρων μορφών oxLDL και oxLDL(-) φαίνεται στην Εικόνα 23. Επιπλέον, κατά τη διάρκεια της οξειδωσης της LDL παρατηρήθηκε προοδευτική μείωση της ενεργότητας της ενδογενούς PAF-AH, ένα φαινόμενο που έχει παρατηρηθεί και προηγουμένως^[44], με την oxLDL_D να εμφανίζει τη μικρότερη ενεργότητα του ενζύμου σε σύγκριση με τις άλλες δύο μορφές της oxLDL (Πίνακας 6).

Επιπρόσθετα, όλοι οι τύποι της oxLDL ήταν πλούσιοι σε λυσοφωσφατιδυλοχολίνη (lyso-PC) με ταυτόχρονη μείωση της περιεχόμενης φωσφατιδυλοχολίνης σε σύγκριση με τη φυσική LDL (Πίνακας 6), ένα φαινόμενο που αποδίδεται στην υδρόλυση της οξειδωμένης φωσφατιδυλοχολίνης (oxPC), αντίδραση που καταλύεται από την PAF-AH της LDL^[44]. Σε αντίθεση με την oxLDL, οι τρεις μορφές της oxLDL(-) δεν ήταν εμπλουτισμένες σε lyso-PC, δεδομένου ότι η περιεχόμενη φωσφατιδυλοχολίνη (PC), πλούσια σε μόρια λιπαρών οξέων οξειδωμένα στην sn-2 θέση, δεν αυξήθηκε κατά τη διάρκεια της οξειδωσης (Πίνακας 6), καθώς είχε απενεργοποιηθεί η ενδογενής PAF-AH πριν την έναρξη της οξειδωσης.

Οι τιμές των TBARS (εκφραζόμενα σε nmol ισοδύναμης MDA/mg πρωτεΐνης LDL) εμφάνισαν προοδευτική αύξηση από την LDL_L στην LDL_P και στη συνέχεια στη LDL_D τόσο στις τρεις μορφές της oxLDL όσο και στις τρεις μορφές της oxLDL(-) (Πίνακας 6).



Τέλος, στην oxLDL_p, ο λόγος TBARS / lyso-PC είναι $1,42 \pm 0,9$ nmol ισοδύναμης MDA / nmol lyso-PC, ενώ στην oxLDL_D είναι $2,10 \pm 0,8$ nmol ισοδύναμης MDA / nmol lyso-PC ($p=0,001$).



Εικόνα 23. Ηλεκτροφόρηση σε gel αгарόζης των διαφόρων μορφών οξειδωμένης LDL που χρησιμοποιήθηκαν ως αντιγόνα

Πίνακας 6. Βιοχημικά χαρακτηριστικά των διαφόρων μορφών oxLDL και oxLDL(-) που χρησιμοποιήθηκαν ως αντιγόνα

Παράμετρος	Μορφές οξειδωμένης LDL							
	LDL	oxLDL _L	oxLDL _P	oxLDL _D	LDL(-)	oxLDL(-) _L	oxLDL(-) _P	oxLDL(-) _D
Ενεργότητα PAF-AH (nmol/mg LDL πρωτεΐνης/min)	26,1±2,3	19,7±1,0*	13,1±3,7*	9,4±3,6†	0,0	0,0	0,0	0,0
Lyso-PC (nmol/mg LDL πρωτεΐνης)	21,5±4,5	38,3±6,2†	69,5±9,3†	87,8±8,4†	20,7±2,8	20,9±3,0	21,5±4,6	22,1±3,5
PC (nmol/mg LDL πρωτεΐνης)	530±97	486±92†	405±76†	369±68†	527±86	520±88	504±65	487±82
REM values	-	1,60±0,13	3,17±0,31	3,71±0,34	-	1,63±0,16	3,19±0,41 ^{**}	3,53±0,37 ^{**}
TBARS (nmol ισοδύναμης MDA/mg πρωτεΐνης LDL)	1,4±0,3	47,9±15,2 [§]	98,4±12,7*	145,7±13,6*	1,3±0,4	14,8±4,5 ^{†§}	79,2±9,4 ^{#§}	111,8±12,1 [#]

*p<0,001, †p<0,03, ‡p<0,01 and §p<0,05 σε σύγκριση με την LDL, ||p<0,01 σε σύγκριση με την oxLDL_L, ¶p<0,01 and #p<0,005 σε σύγκριση με την LDL(-), **p<0,01 σε σύγκριση με την oxLDL(-), §p<0,05 σε σύγκριση με τον αντίστοιχο τύπο της oxLDL.

PAF-AH: ακετυλοϋδρόλυση του παράγοντα ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων, Lyso-PC: λυσοφωσφατιδυλοχολίνη, PC: φωσφατιδυλοχολίνη, REM: σχετική ηλεκτροφορητική κινητικότητα TBARS: δραστικές ενώσεις που αντιδρούν με θειοβαρβιτουρικό οξύ

9.2. ΤΙΤΛΟΙ ΑΥΤΟΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ ΚΑΤΑ ΔΙΑΦΟΡΩΝ ΜΟΡΦΩΝ oxLDL ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ΣΤΑΘΕΡΗ ΣΤΗΘΑΓΧΗ ΚΑΙ ΥΓΙΕΙΣ ΕΘΕΛΟΝΤΕΣ: Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ PAF-ΑΚΕΤΥΛΟΪΔΡΟΛΑΣΗΣ ΤΗΣ LDL

9.2.1. ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΟΥ ΠΛΗΘΥΣΜΟΥ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Συμμετείχαν 65 ασθενείς με σταθερή στηθάγχη και 47 υγιείς εθελοντές οι οποίοι χρησιμοποιήθηκαν ως ομάδα ελέγχου. Τα κλινικά και βιοχημικά χαρακτηριστικά των δύο ομάδων φαίνονται στον *πίνακα 7*.

Πίνακας 7. Κλινικά και βιοχημικά χαρακτηριστικά του πληθυσμού της μελέτης

	Υγιείς εθελοντές (n=47)	Ασθενείς με σταθερή στηθάγχη (n=65)
Φύλο (άνδρες/γυναίκες)	42/5	58/7
Ηλικία (έτη)	58,4±17,7	62,5±9,5
Δείκτης μάζας σώματος (Kg/m ²)	25,8±3,8	25,5±3,3
Υπέρταση (Αριθμός ατόμων)	7	21*
Καπνιστές (ενεργοί/πρώην)	18/7	22/12
Ολική χοληστερόλη, mg/dl	206,1±33,9	210,9±40,1
LDL-χοληστερόλη, mg/dl	134,6±31,3	153,0±41,2
HDL-χοληστερόλη, mg/dl	44,1±7,4	38,2±9,4 [†]
Τριγλυκερίδια, mg/dl	97,1±28,3	115,5±38,4
Ενεργότητα PAF-AH της LDL, nmol/ml/min	58,1±14,0	51,8±22,4

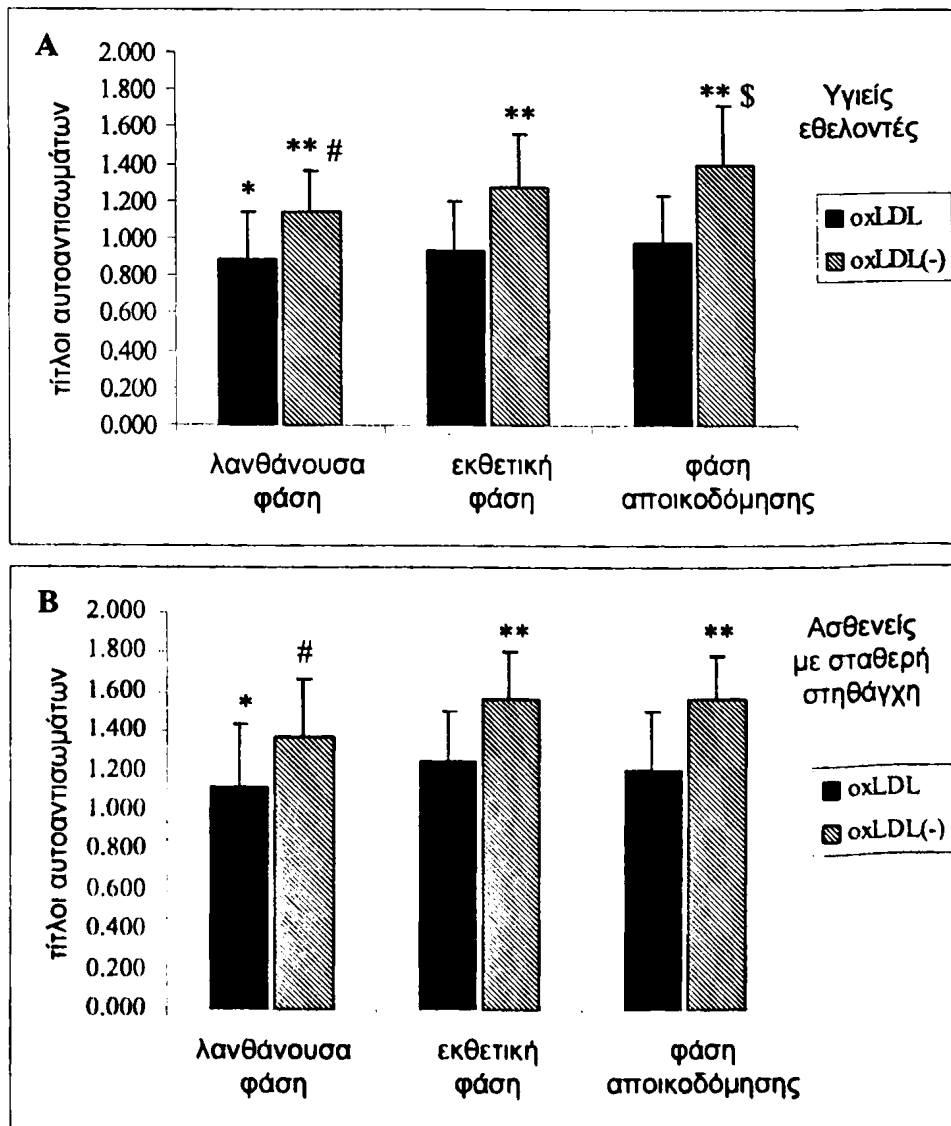
*p<0,001 †p<0,02 σε σύγκριση με τους υγιείς εθελοντές

Οι ασθενείς με σταθερή στηθάγχη σε σύγκριση με τους υγιείς εθελοντές εμφάνιζαν σε μεγαλύτερο ποσοστό αρτηριακή υπέρταση (32,3% έναντι 14,8% αντίστοιχα, p<0,001) και χαμηλότερα επίπεδα HDL χοληστερόλης ορού (38,2±9,4 mg/dl έναντι 44,1±7,4 mg/dl, p<0,02). Αντίθετα, δεν παρατηρήθηκαν διαφορές μεταξύ των δύο ομάδων όσον αφορά την ηλικία, το δείκτη μάζας σώματος, τη συνήθεια του καπνίσματος και τα επίπεδα της ολικής, LDL χοληστερόλης και τριγλυκεριδίων ορού, καθώς και την ενεργότητα της PAF-AH.



9.2.2. ΤΙΤΛΟΙ ΑΥΤΟΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ ΚΑΤΑ ΤΩΝ ΔΙΑΦΟΡΩΝ ΜΟΡΦΩΝ ΤΗΣ oxLDL ΣΤΙΣ ΔΥΟ ΟΜΑΔΕΣ ΠΛΗΘΥΣΜΟΥ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Τίτλοι αυτοαντισωμάτων κατά όλων των μορφών της oxLDL, παρατηρήθηκαν τόσο στους ασθενείς με σταθερή στηθάγχη, όσο και στους υγιείς εθελοντές. Και στις δύο ομάδες της μελέτης οι τίτλοι ήταν αυξημένοι όταν ως αντιγόνα χρησιμοποιήθηκαν η oxLDL_p και η oxLDL_D σε σύγκριση με την oxLDL_L (0,915±0,243 και 0,969±0,180 έναντι 0,873±0,154 αντίστοιχα, $p < 0,04$ για τους υγιείς εθελοντές, 1,197±0,216 και 1,209±0,277 έναντι 1,102±0,191 αντίστοιχα, $p < 0,04$ για τους ασθενείς με σταθερή στηθάγχη) και το ίδιο φαινόμενο παρατηρήθηκε όταν ως αντιγόνα χρησιμοποιήθηκαν οι τρεις μορφές της oxLDL(-) (Εικόνα 24).



Εικόνα 24. Τίτλοι αυτοαντισωμάτων κατά των διαφόρων αντιγόνων της oxLDL και oxLDL(-). [$p < 0,04$ σε σύγκριση με oxLDL_p και oxLDL_D, $^{\#}p < 0,0001$ σε σύγκριση με την oxLDL(-)_p και oxLDL(-)_D, $^{**}p < 0,00001$ σε σύγκριση με τον αντίστοιχο τύπο oxLDL, $^{\$}p < 0,0001$ σε σύγκριση με την oxLDL_p]

Επιπρόσθετα, στην ομάδα των υγιών εθελοντών οι τίτλοι αυτοαντισωμάτων κατά των oxLDL_D και oxLDL(-)_D ήταν στατιστικά σημαντικά υψηλότεροι από τους τίτλους κατά των oxLDL_P και oxLDL(-)_P αντίστοιχα ($0,969 \pm 0,180$ και $1,270 \pm 0,269$ έναντι $0,915 \pm 0,243$ και $1,154 \pm 0,249$ αντίστοιχα, $p < 0,00001$), ένα φαινόμενο το οποίο δεν παρατηρήθηκε στην ομάδα των ασθενών με σταθερή στηθάγχη (Εικόνα 24). Πρέπει επίσης να σημειωθεί, ότι και στις δυο ομάδες της μελέτης οι τίτλοι των αυτοαντισωμάτων κατά κάθε μορφής oxLDL(-) ήταν υψηλότεροι σε σύγκριση με τους αντίστοιχους τύπους της oxLDL για κάθε φάση της οξειδωσης (Εικόνα 24).

Οι ασθενείς με σταθερή στηθάγχη σε σύγκριση με τους υγιείς εθελοντές είχαν υψηλότερους τίτλους αυτοαντισωμάτων κατά όλων των μορφών τόσο της oxLDL όσο και της oxLDL(-) (Πίνακας 8). Αντίθετα, όταν ως αντιγόνο χρησιμοποιήθηκε η MDA-LDL, δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στους τίτλους των αυτοαντισωμάτων μεταξύ των δυο ομάδων της μελέτης. Τέλος, δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στους τίτλους αυτοαντισωμάτων, όταν οι ασθενείς με σταθερή στηθάγχη κατηγοριοποιήθηκαν ανάλογα με την έκταση της αγγειογραφικά διαπιστωμένης στεφανιαίας νόσου (νόσος 1, 2 ή 3 αγγείων).

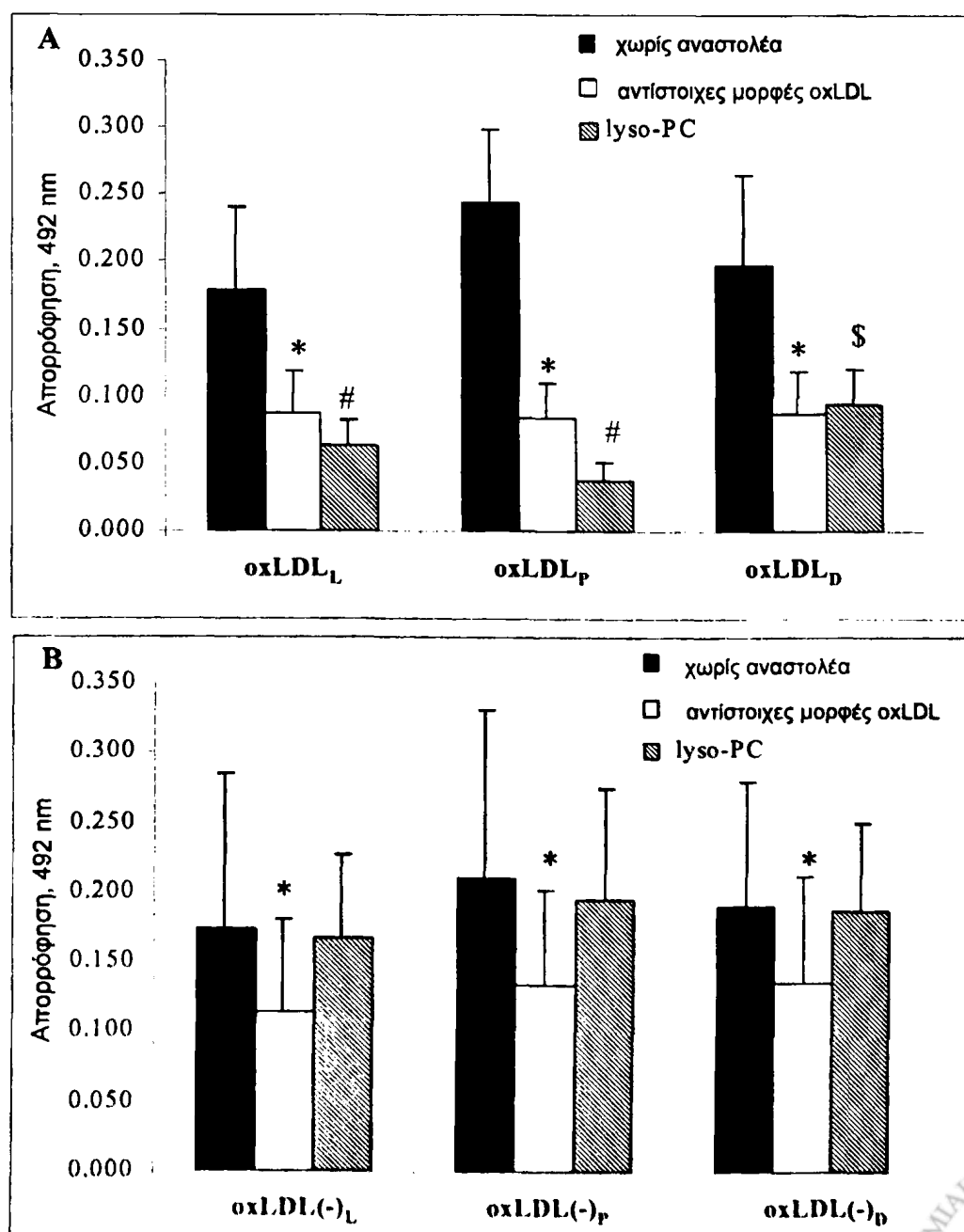
Πίνακας 8. Τίτλοι αυτοαντισωμάτων κατά διαφόρων μορφών oxLDL σε ασθενείς με σταθερή στηθάγχη και υγιείς εθελοντές

	Υγιείς εθελοντές (n=47)	Ασθενείς με σταθερή στηθάγχη (n=65)	p
OxLDL _L	$0,873 \pm 0,154$	$1,102 \pm 0,191$	0,001
OxLDL _P	$0,915 \pm 0,243$	$1,197 \pm 0,216$	0,0005
OxLDL _D	$0,969 \pm 0,180$	$1,209 \pm 0,277$	0,002
OxLDL(-) _L	$1,043 \pm 0,226$	$1,334 \pm 0,234$	0,0001
OxLDL(-) _P	$1,154 \pm 0,249$	$1,567 \pm 0,232$	0,0001
OxLDL(-) _D	$1,270 \pm 0,269$	$1,570 \pm 0,304$	0,001
MDA-LDL	$1,282 \pm 0,205$	$1,298 \pm 0,329$	NS



9.2.3. Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΛΥΣΟΦΩΣΦΑΤΙΔΥΛΟΧΟΛΙΝΗΣ (LYSO-PC) ΣΤΟΥΣ ΤΙΤΛΟΥΣ ΤΩΝ ΑΥΤΟΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ ΕΝΑΝΤΙ oxLDL

Για να διαπιστωθεί ο ρόλος της lyso-PC, η οποία παράγεται κατά την οξειδωση της LDL με τη δράση της ενδογενούς PAF-AH, στην αντιγονικότητα των διαφόρων μορφών της oxLDL, διενεργήθηκαν πειράματα αναστολής. Στα πειράματα αυτά ως αναστολείς χρησιμοποιήθηκαν τόσο η lyso-PC, όσο και οι αντίστοιχες μορφές των oxLDL και oxLDL(-). Στα πειράματα αυτά παρατηρήθηκε σημαντική μείωση στους τίτλους των αυτοαντισωμάτων όταν ως αναστολέας χρησιμοποιήθηκε ο αντίστοιχος τύπος των oxLDL (Εικόνα 25A).



Εικόνα 25. Πειράματα αναστολής. Η ανασταλτική επίδραση της lyso-PC και του αντίστοιχου τύπου οξειδωμένης LDL στα επίπεδα των αυτοαντισωμάτων κατά Α. όλων των μορφών της oxLDL και Β. όλων των μορφών της oxLDL(-). * $p < 0,03$, # $p < 0,01$, \$ $p < 0,05$ σε σύγκριση με την απουσία του αναστολέα

Επιπρόσθετα, παρατηρήθηκε σημαντική μείωση των επιπέδων των αυτοαντισωμάτων κατά όλων των μορφών της oxLDL, όταν ως αναστολέας χρησιμοποιήθηκε η lyso-PC. Η μείωση αυτή ήταν περισσότερο εμφανής όταν ως αντιγόνα χρησιμοποιήθηκαν η oxLDL_L και η oxLDL_P (Εικόνα 25A). Αντίθετα, η παρουσία lyso-PC δεν προκάλεσε μείωση του τίτλου των αυτοαντισωμάτων κατά όλων των μορφών της oxLDL(-), ενώ αντίθετα αυτά παρουσίασαν σημαντική μείωση όταν ως αναστολείς χρησιμοποιήθηκαν οι αντίστοιχες μορφές της oxLDL(-) (Εικόνα 25B).

9.2.4. ΤΑ ΑΥΤΟΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ ΕΝΑΝΤΙ ΔΙΑΦΟΡΩΝ ΜΟΡΦΩΝ ΟΧΛDL ΩΣ ΑΝΕΞΑΡΤΗΤΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΚΙΝΔΥΝΟΥ ΓΙΑ ΣΤΕΦΑΝΙΑΙΑ ΝΟΣΟ

Για τη διερεύνηση της συγκεκριμένης υπόθεσης πραγματοποιήθηκε πολυπαραγοντική λογιστική ανάλυση παλινδρόμησης (multivariate logistic regression analysis). Για την δημιουργία του στατιστικού μοντέλου ελήφθησαν υπόψη όλες οι στατιστικά σημαντικές μεταβλητές, όπως αυτές προέκυψαν από τη μονοπαραγοντική λογιστική ανάλυση παλινδρόμησης (univariate logistic regression analysis).

Στη μονοπαραγοντική λογιστική ανάλυση παλινδρόμησης συμπεριλήφθηκαν οι εξής παράμετροι: τα επίπεδα της ολικής, HDL και LDL χοληστερόλης ορού, τα επίπεδα των τριγλυκεριδίων ορού και οι τίτλοι των αυτοαντισωμάτων κατά των oxLDL_L, oxLDL_P, oxLDL_D, oxLDL(-)_L, oxLDL(-)_P, oxLDL(-)_D και MDA-LDL. Τα αποτελέσματα της μονοπαραγοντικής λογιστικής ανάλυσης παλινδρόμησης φαίνονται στον *πίνακα 9*. Με βάση τα αποτελέσματα αυτά στην πολυπαραγοντική λογιστική ανάλυση παλινδρόμησης ελήφθησαν υπόψη οι τίτλοι των αυτοαντισωμάτων κατά των oxLDL_L, oxLDL_P, oxLDL_D, oxLDL(-)_L, oxLDL(-)_P και oxLDL(-)_D και τα επίπεδα της HDL χοληστερόλης του ορού. Ύστερα από προσαρμογή για την ηλικία και τους άλλους παράγοντες κινδύνου για στεφανιαία νόσο, μόνο τα αυξημένα επίπεδα αυτοαντισωμάτων κατά oxLDL_P και τα χαμηλά επίπεδα της HDL χοληστερόλης ορού συσχετίστηκαν με αυξημένο κίνδυνο για την εμφάνιση στεφανιαίας νόσου (RR=0,043, 0,004-0,461 95%CI, p=0,009 και RR=1,136, 1,039-1,242 95%CI, p=0,005 αντίστοιχα) (*Πίνακας 10*).



Πίνακας 9. Μονοπαραγοντική λογιστική ανάλυση παλινδρόμησης όσον αφορά την εμφάνιση στεφανιαίας νόσου

	β	95%CI (β)	p
Ολική χοληστερόλη	0,995	0,987-1,004	0,275
LDL-χοληστερόλη	0,993	0,983-1,002	0,140
HDL-χοληστερόλη	-0,056	-0,106- -0,008	0,021
τριγλυκερίδια	0,995	0,989-1,001	0,10
oxLDL _L	0,085	0,019-0,385	0,01
oxLDL _P	0,028	0,005-0,146	0,001
oxLDL _D	0,165	0,052-0,524	0,002
oxLDL(-) _L	0,147	0,042-0,517	0,003
oxLDL(-) _P	0,096	0,027-0,342	0,001
oxLDL(-) _D	0,270	0,090-0,808	0,019
MDA-LDL	0,759	0,893-1,113	0,10

Πίνακας 10. Πολυπαραγοντική λογιστική ανάλυση παλινδρόμησης όσον αφορά την εμφάνιση στεφανιαίας νόσου

	β	95%CI (β)	p
HDL- χοληστερόλη	1,136	1,039-1,242	0,005
oxLDL _P	0,043	0,004-0,461	0,009



9.3. ΤΙΤΛΟΙ ΑΥΤΟΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ ΚΑΤΑ ΔΙΑΦΟΡΩΝ ΜΟΡΦΩΝ ΟΧLDL ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ΟΞΥ ΣΤΕΦΑΝΙΑΙΟ ΣΥΝΔΡΟΜΟ: Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΧΟΡΗΓΗΣΗΣ ΑΤΟΡΒΑΣΤΑΤΙΝΗΣ

9.3.1. ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΟΥ ΠΛΗΘΥΣΜΟΥ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Στη μελέτη συμμετείχαν συνολικά 55 ασθενείς με επιβεβαιωμένο οξύ στεφανιαίο επεισόδιο, οι οποίοι χωρίστηκαν σε δύο ομάδες ανάλογα με το αν έπαιρναν ατορβαστατίνη ή δεν έπαιρναν καμία υπολιπιδαιμική αγωγή κατά τη διάρκεια της περιόδου παρακολούθησης. Τα χαρακτηριστικά του πληθυσμού της μελέτης φαίνονται στον *πίνακα 11*. Δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των δύο ομάδων ασθενών της μελέτης, όσον αφορά την ηλικία, το φύλο, το δείκτη μάζας σώματος και την επίπτωση της αρτηριακής υπέρτασης, του καπνίσματος και του κληρονομικού ιστορικού πρώιμης καρδιαγγειακής νόσου. Όλοι οι ασθενείς της μελέτης δεν εμφάνισαν καρδιαγγειακά συμβάντα σε όλη τη διάρκεια της εξαμήνου περιόδου παρακολούθησης.

Οι ασθενείς που έπαιρναν ατορβαστατίνη, σε σύγκριση με αυτούς που δεν έπαιρναν καμία υπολιπιδαιμική αγωγή εμφάνιζαν κατά την έναρξη της μελέτης υψηλότερα επίπεδα ολικής χοληστερόλης ($248,5 \pm 52,7$ mg/dl έναντι $212,2 \pm 42,2$ mg/dl αντίστοιχα, $p=0,007$), LDL χοληστερόλης ($165,5 \pm 49,4$ mg/dl έναντι $134,9 \pm 28,8$ mg/dl αντίστοιχα, $p=0,013$) και απολιποπρωτεΐνης Β ($119,5 \pm 28,1$ έναντι $101,4 \pm 31,2$ mg/dl αντίστοιχα, $p=0,005$, *Πίνακας 11*). Αντίθετα, στην ίδια χρονική στιγμή δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές μεταξύ των δύο ομάδων, όσον αφορά το λόγο LDL χοληστερόλης/ΑpoB ($1,36 \pm 0,27$ έναντι $1,4 \pm 0,37$ για τους ασθενείς που έπαιρναν ατορβαστατίνη και αυτούς που δεν έπαιρναν υπολιπιδαιμική αγωγή αντίστοιχα, $p=0,534$) και τα επίπεδα στον ορό της HDL χοληστερόλης, των τριγλυκεριδίων, των απολιποπρωτεϊνών A1 και E και της Lp(a) (*Πίνακας 11*).

Κατά τη διάρκεια της περιόδου παρακολούθησης παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική μείωση των λιπιδαιμικών παραμέτρων στην ομάδα των ασθενών που έπαιρναν ατορβαστατίνη (*Πίνακας 12*). Η σημαντική αυτή μείωση αφορούσε τα επίπεδα ορού της ολικής, LDL και HDL χοληστερόλης του ορού, καθώς επίσης και τα επίπεδα των ApoA1, ApoB και ApoE. Οι διαφορές αυτές παρατηρήθηκαν από τον πρώτο μήνα και διατηρήθηκαν σε όλη τη διάρκεια της περιόδου παρακολούθησης (*Πίνακας 12, Εικόνα 26*). Αντίθετα δεν παρατηρήθηκαν διαφορές όσον αφορά στα επίπεδα των τριγλυκεριδίων και της Lp(a) του ορού, καθώς και στο λόγο LDL χοληστερόλη/ApoB (*Πίνακας 12*).



Πίνακας 11. Χαρακτηριστικά του πληθυσμού της μελέτης

	Ασθενείς που έπαιρναν ατορβαστατίνη (n=34)	Ασθενείς που δεν έπαιρναν υπολιπιδαιμική αγωγή (n=21)	p
Ηλικία (έτη)	58,2±8,97	60,1±9,22	0,453
Άνδρες/Γυναίκες	30/4	19/2	0,285
<i>Παράγοντες κινδύνου για στεφανιαία νόσο</i>			
Υπέρταση (n,%)	11 (32,3%)	7 (33,3%)	0,584
Ενεργοί καπνιστές (n,%)	26 (76,4%)	14 (66,7%)	0,252
Κληρονομικό ιστορικό πρώιμης καρδιαγγειακής νόσου (n,%)	6 (17,6%)	6 (28,5%)	0,266
BMI (kg/m ²)	26,9±2,37	27,8±2,24	0,218
<i>Λιπιδαιμικό προφίλ</i>			
Ολική χοληστερόλη (mg/dl)	248,5±52,7	212,2±42,2	0,007
LDL χοληστερόλη (mg/dl)	165,5±49,4	134,9±28,8	0,013
HDL χοληστερόλη (mg/dl)	49,2±8,7	45,8±11,0	0,240
Τριγλυκερίδια (mg/dl) Ενδιάμεση τιμή (εύρος)	182,4 (61-395)	154,1 (77-389)	0,259
Απολιποπρωτεΐνη A1 (mg/dl)	133,6±23,7	128,6±22,7	0,474
Απολιποπρωτεΐνη B (mg/dl)	119,5±28,1	101,4±31,2	0,005
Απολιποπρωτεΐνη E (mg/dl)	44,3±21,9	37,4±28,6	0,387
LDL χοληστερόλη / ApoB	1,36±0,27	1,4±0,37	0,534
Lp(a) (mg/dl) Ενδιάμεση τιμή (εύρος)	9,9 (2,4-26,5)	8,6 (2,4-15,8)	0,462
hsCRP (mg/l)	2,11±1,48	2,73±1,18	0,274

Στην ομάδα των ασθενών που δεν έπαιρναν υπολιπιδαιμική αγωγή, τα επίπεδα των λιπιδαιμικών παραμέτρων δεν παρουσίασαν στατιστικά σημαντικές μεταβολές σε σύγκριση με τα επίπεδα κατά την έναρξη της μελέτης (Πίνακας 12). Πράγματι, οι ποσοστιαίες μεταβολές των επιπέδων των λιπιδίων του ορού των ασθενών που έπαιρναν ατορβαστατίνη ήταν μεγαλύτερες από τις αντίστοιχες των ασθενών που δεν έπαιρναν υπολιπιδαιμική αγωγή σε κάθε χρονική στιγμή (Εικόνα 26).



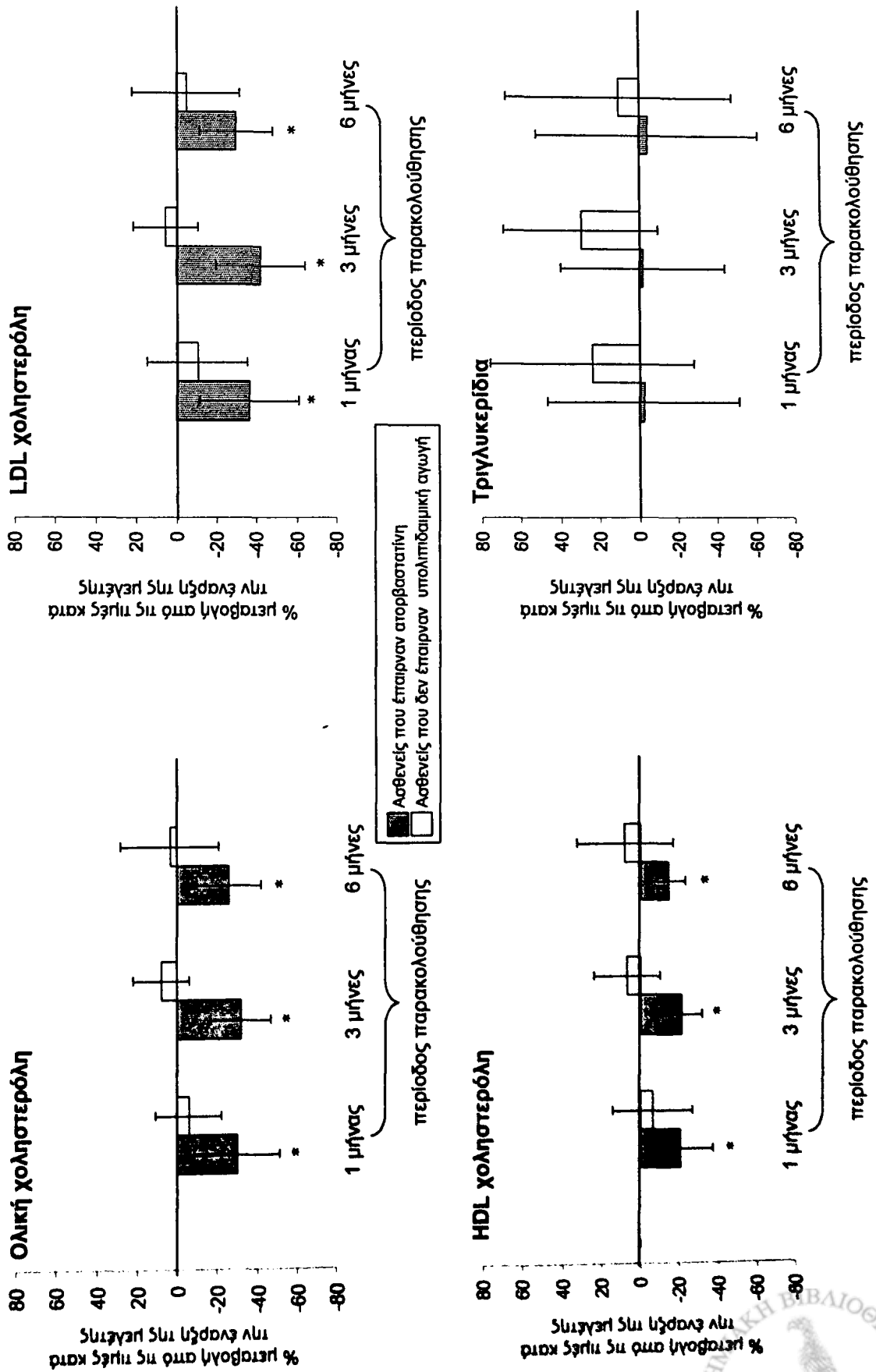
Πίνακας 12. Μεταβολές των λιπιδαιμικών παραμέτρων και της hsCRP κατά τη διάρκεια της περιόδου παρακολούθησης

	Ασθενείς που έπαιρναν ατορβαστατίνη				Ασθενείς που δεν έπαιρναν υπολιπιδαιμική αγωγή			
	κατά την έναρξη		κατά τη διάρκεια της περιόδου παρακολούθησης		κατά την έναρξη		κατά τη διάρκεια της περιόδου παρακολούθησης	
	της μελέτης	1 μήνας	3 μήνες	6 μήνες	της μελέτης	1 μήνας	3 μήνες	6 μήνες
TCHOL (mg/dl)	248,5±52,7	169,5±55 [*]	158,4±32,4 [*]	188,5±42,3 [*]	212,2±42,2	201,3±29,3	227,0±31,1	220,9±52,3
LDL-C (mg/dl)	165,5±49,4	100,0±40 [*]	90,4±27,4 [*]	110,1±30,9 [*]	134,9±28,8	121,6±32,7	138,7±22,5	134,6±43,3
HDL-C (mg/dl)	49,2±8,7	38,6±8,6 [*]	39,8±7,6 [*]	42,3±7,7 [*]	45,8±11,0	42,6±7,8	38,7±8,7	53,7±16,5
TRG (mg/dl)	182,4 (61-395)	154,9 (57-347)	129 (59-199)	130,4 (59-246)	154,4 (77-389)	185,2 (65-352)	192,8 (88-390)	162,5 (45,364)
ενδιάμεση τιμή (εύρος) Apo A1 (mg/dl)	133,6±23,7	127,5±21,1 [*]	128,9±21,7 [*]	130,1±23,7 [*]	128,6±22,7	135,5±18,3	140,1±23,1	141,2±23,2
Apo B (mg/dl)	119,5±28,1	90,4±43,2 [*]	76,48±24,15 [*]	92,5±28,3 [*]	101,4±31,2	93,6±24,7	97,9±35,2	98,4±33,2
Apo E (mg/dl)	44,3±21,9	29,8±13 [*]	26,6±10,6 [*]	32,7±14,1 [*]	37,4±28,6	33,4±12,2	46,0±39,0	44,1±38,4
LDL / ApoB	1,36±0,27	1,14±0,29	1,25±0,27	1,19±0,29	1,40±0,37	1,39±0,82	1,75±1,58	1,36±1,2
Lp(a) (mg/dl)	9,9(2,4-26,5)	9,4(2,7-24,2)	9,5(2,6-23,5)	9,5(2,4-21,5)	8,6(2,4-15,8)	8,5(2,4-14,2)	8,1(2,4-12,74)	8,4(2,7-13,7)
ενδιάμεση τιμή (εύρος) hsCRP (mg/l)	2,11±1,48	0,90±0,58 [§]	0,91±0,60 [§]	0,93±0,64 [§]	2,73±1,18	1,49±0,79 [*]	1,62±0,77 [*]	1,64±0,85 [*]

όπου TCHOL: ολική χοληστερόλη, LDL-C: LDL χοληστερόλη, HDL-C: HDL χοληστερόλη και TRG: τριγλυκερίδια.

^{*} p=0,0001, [§] p=0,01, [§] p=0,02, [§] p=0,04, σε σύγκριση με την αντίστοιχη τιμή κατά την έναρξη της μελέτης

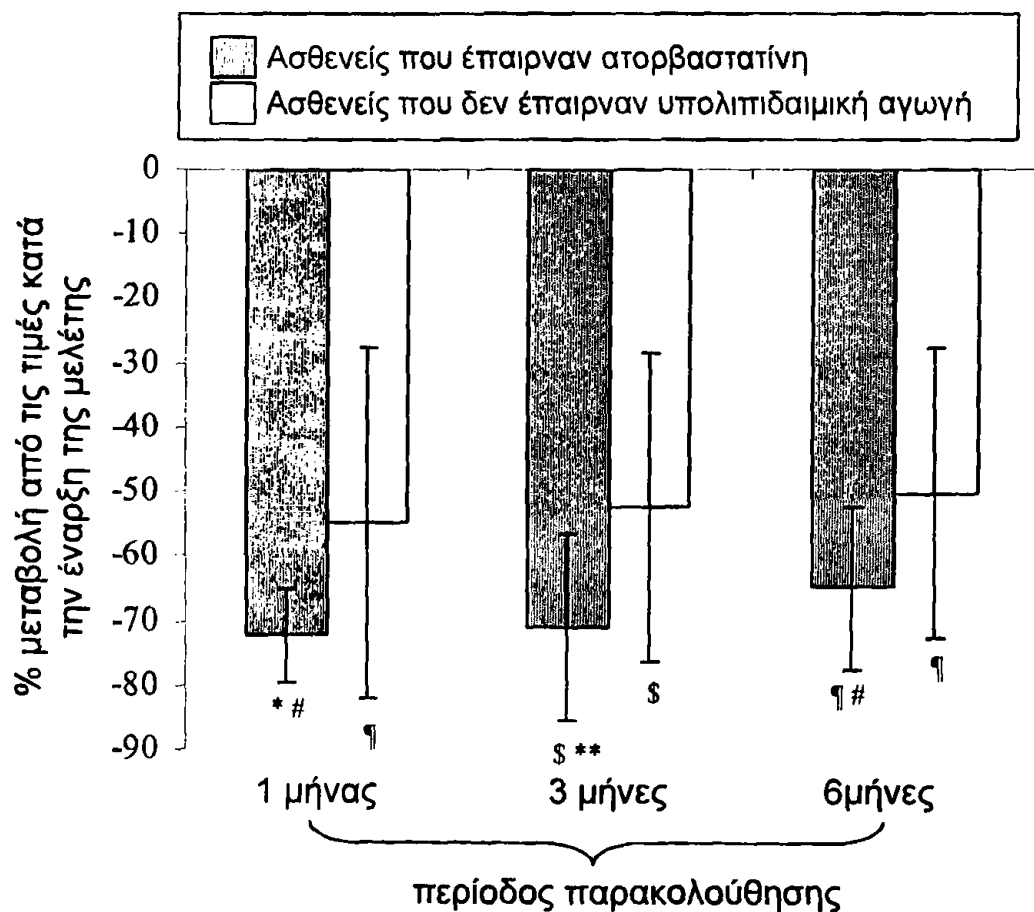




Εικόνα 26. Ποσοστιαίες μεταβολές των επιπέδων των λιπιδίων ορού κατά τη διάρκεια της περιόδου παρακολούθησης ($p=0,0001$ σε σύγκριση με τις αντίστοιχες μεταβολές της ομάδας των ασθενών που δεν έπαιρναν υπολιπιδαιμική αγωγή)



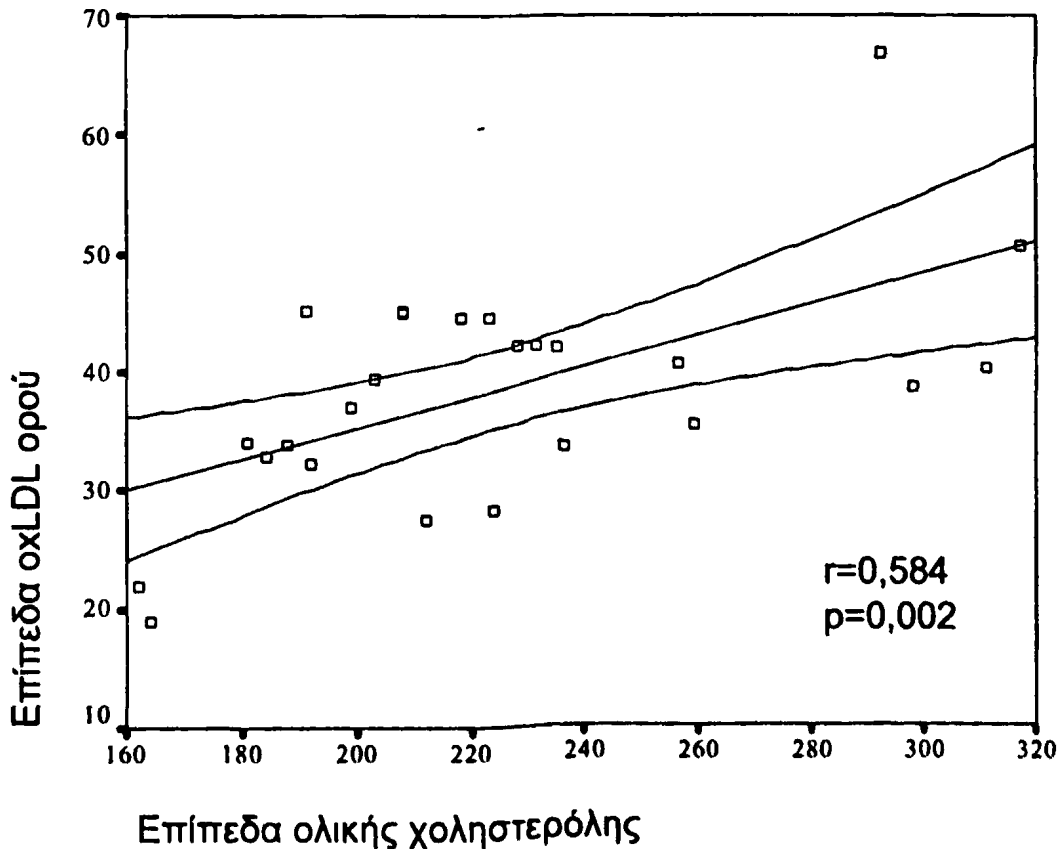
Τα επίπεδα της hsCRP κατά την έναρξη της μελέτης ήταν χαμηλά και δεν διέφεραν μεταξύ των δύο ομάδων ($2,11 \pm 1,48$ mg/l έναντι $2,73 \pm 1,18$ mg/l για τους ασθενείς που έπαιρναν ατορβαστατίνη και τους ασθενείς που δεν έπαιρναν υπολιπιδαιμική αγωγή αντίστοιχα, $p=0,274$, Πίνακας 11). Τα επίπεδα αυτά μειώθηκαν στατιστικά σημαντικά και στις δύο ομάδες της μελέτης κατά τη διάρκεια της περιόδου παρακολούθησης (Πίνακας 12). Χαρακτηριστικά, στην ομάδα των ασθενών που δεν έπαιρνε υπολιπιδαιμική αγωγή η μείωση της hsCRP ορού σε σύγκριση με την τιμή κατά την έναρξη της μελέτης ήταν $54,9\% \pm 27,1\%$ στον πρώτο μήνα ($p=0,05$), $52,4\% \pm 23,9\%$ στον τρίτο μήνα ($p=0,03$) και $50,2\% \pm 22,5\%$ ($p=0,05$) στον έκτο μήνα παρακολούθησης αντίστοιχα. Οι αντίστοιχες μειώσεις στην ομάδα των ασθενών που έπαιρνε ατορβαστατίνη ήταν $72,4\% \pm 7,4\%$ ($p=0,01$), $71,0\% \pm 14,5\%$ ($p=0,03$) και $65\% \pm 12,5\%$ ($p=0,05$) για τον πρώτο, τρίτο και έκτο μήνα παρακολούθησης αντίστοιχα. Οι παραπάνω μειώσεις ήταν μεγαλύτερες στους ασθενείς που έπαιρναν ατορβαστατίνη σε σύγκριση με αυτούς που δεν έπαιρναν υπολιπιδαιμική αγωγή σε κάθε χρονική στιγμή, όπως προέκυψε από τη στατιστική ανάλυση (ANCOVA) (Εικόνα 27).



Εικόνα 27. Μεταβολές των επιπέδων της CRP μεταξύ των δύο ομάδων της μελέτης. ($p=0,01$, $^{\S}p=0,03$, $^{\#}p=0,05$, σε σύγκριση με την αντίστοιχη τιμή κατά την έναρξη της μελέτης, $p=0,01$, $^{\#}p=0,05$, σε σύγκριση με την αντίστοιχη τιμή των ασθενών που δεν ελάμβαναν υπολιπιδαιμική αγωγή)

9.3.2. ΕΠΙΠΕΔΑ ΟΞΕΙΔΩΜΕΝΗΣ LDL (oxLDL) ΟΡΟΥ

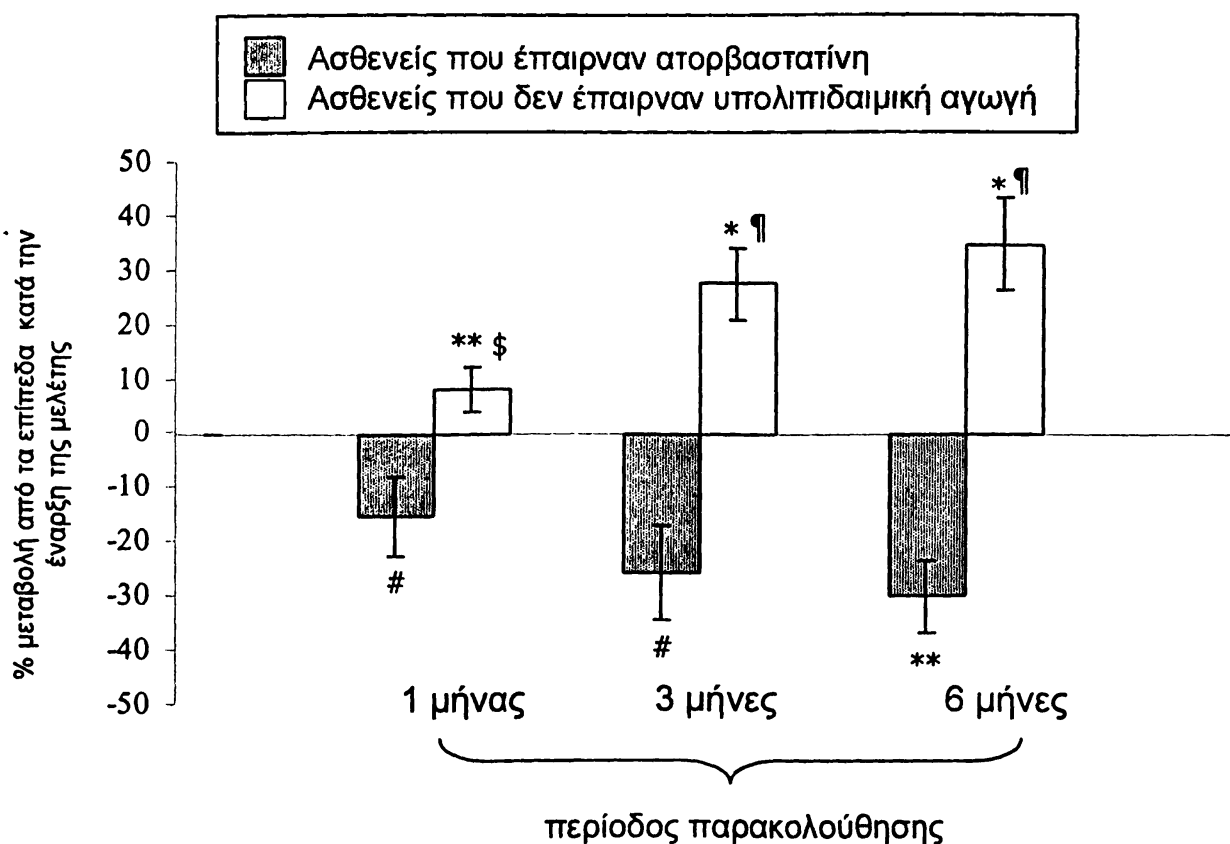
Στη μέτρηση κατά την έναρξη της μελέτης οι ασθενείς που έπαιρναν ατορβαστατίνη σε σύγκριση με τους ασθενείς που δεν έπαιρναν υπολιπιδαιμική αγωγή εμφάνιζαν υψηλότερα επίπεδα oxLDL ορού ($41,7 \pm 10,1$ U/l έναντι $32,8 \pm 7,3$ U/l αντίστοιχα, $p=0,02$ - Πίνακας 13), γεγονός που φαίνεται ότι οφείλεται στα υψηλότερα επίπεδα της ολικής χοληστερόλης τα οποία εμφάνιζαν αυτοί οι ασθενείς, καθώς παρατηρήθηκε ισχυρή συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων της oxLDL και των επιπέδων της ολικής χοληστερόλης του ορού τόσο κατά την έναρξη της μελέτης ($r=0,584$, $p=0,002$, *Εικόνα 28*), όσο και στον πρώτο, τρίτο και έκτο μήνα παρακολούθησης ($r=0,430$, $p=0,036$ - $r=0,505$, $p=0,012$ και $r=0,512$, $p=0,021$ αντίστοιχα). Αντίθετα δεν παρατηρήθηκε καμία συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων της oxLDL ορού με τα επίπεδα της LDL και HDL χοληστερόλης, με τους τίτλους των αυτοαντισωμάτων κατά των διαφόρων μορφών oxLDL και με την ενεργότητα της PAF-AH, τόσο στις μετρήσεις κατά την έναρξη της μελέτης όσο και κατά τη διάρκεια της παρακολούθησης.



Εικόνα 28. Συσχέτιση των επιπέδων της ολικής χοληστερόλης και των επιπέδων της οξειδωμένης LDL (oxLDL) του ορού κατά την έναρξη της μελέτης



Κατά τη διάρκεια της παρακολούθησης στους ασθενείς που δεν έπαιρναν υπολιπιδαιμική αγωγή παρατηρήθηκε σταδιακή αύξηση των επιπέδων της oxLDL ορού σε σύγκριση με τα αντίστοιχα επίπεδα κατά την έναρξη της μελέτης, τον 1^ο μήνα ($35,4 \pm 12$ U/l αύξηση $+8,2\% \pm 4,1\%$, $p=0,03$), τον 3^ο μήνα ($41,4 \pm 16,8$ U/l, αύξηση $+27,4\% \pm 6,8\%$, $p=0,01$) και τον 6^ο μήνα παρακολούθησης ($44,2 \pm 17,2$ U/l, αύξηση $+34,7\% \pm 8,3\%$ $p=0,01$, *Εικόνα 29*). Αντίθετα στην ομάδα των ασθενών που έπαιρνε ατορβαστατίνη παρατηρήθηκε προοδευτική μείωση αυτών των επιπέδων σε σύγκριση με τα αντίστοιχα επίπεδα κατά την έναρξη της μελέτης, τον 1^ο μήνα ($35,2 \pm 12,7$ U/l, μείωση $-15,3\% \pm 7,2\%$, $p=0,04$), τον 3^ο μήνα (31 ± 12 U/l, μείωση $-25,6\% \pm 8,7\%$, $p=0,04$) και τον 6^ο μήνα παρακολούθησης ($29,2 \pm 11,7$ U/l, μείωση $-30\% \pm 6,7\%$, $p=0,03$, *Εικόνα 29*).



Εικόνα 29. Ποσοστιαίες μεταβολές των επιπέδων της oxLDL ορού κατά τη διάρκεια της παρακολούθησης ($p=0,01$, $p=0,03$, $p=0,04$ σε σύγκριση με τα αντίστοιχα επίπεδα κατά την έναρξη της μελέτης, $^{\#}p=0,003$, $^{\$}p=0,01$ σε σύγκριση με την αντίστοιχη τιμή των ασθενών που ελάμβαναν ατορβαστατίνη)



Οι μεταβολές αυτές διέφεραν στατιστικά σημαντικά μεταξύ των δύο ομάδων της μελέτης σε κάθε χρονική στιγμή, δηλαδή στον 1^ο μήνα (-15,3%±7,2%, έναντι +8,2%±4,1%, για τους ασθενείς που έπαιρναν ατορβαστατίνη και τα άτομα που δεν έπαιρναν υπολιπιδαιμική αγωγή αντίστοιχα, $p=0,01$), στον 3^ο μήνα (-25,6±8,7% έναντι +27,4±6,8%, για τους ασθενείς που έπαιρναν ατορβαστατίνη και τα άτομα που δεν έπαιρναν υπολιπιδαιμική αγωγή αντίστοιχα $p=0,003$) και στον 6^ο μήνα παρακολούθησης (-30%±6,7% έναντι +34,7%±8,3%, για τους ασθενείς που έπαιρναν ατορβαστατίνη και τα άτομα που δεν έπαιρναν υπολιπιδαιμική αγωγή αντίστοιχα, $p=0,003$, *Εικόνα 29*), όπως προέκυψε από την ανάλυση ANCOVA (τα αντίστοιχα επίπεδα κατά την έναρξη της μελέτης συμπεριλήφθηκαν ως συνμεταβλητές).

9.3.2. ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ ΚΑΤΑ ΔΙΑΦΟΡΩΝ ΜΟΡΦΩΝ ΟΞΕΙΔΩΜΕΝΗΣ LDL

Τα χαρακτηριστικά των αντιγόνων που χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό του τίτλου των αυτοαντισωμάτων κατά των διαφόρων μορφών οξειδωμένης LDL περιγράφονται στο κεφάλαιο 9.1.

Στη μέτρηση κατά την έναρξη της μελέτης οι ασθενείς που έπαιρναν ατορβαστατίνη σε σύγκριση με τους ασθενείς που δεν έπαιρναν υπολιπιδαιμική αγωγή εμφάνιζαν υψηλότερους τίτλους anti-oxLDL_P (1,089±0,226 έναντι 0,962±0,186 αντίστοιχα, $p=0,05$), anti-oxLDL_D (1,222±0,380 έναντι 0,994±0,284 αντίστοιχα, $p=0,03$) και anti-oxLDL(-)_P (1,205±0,278 έναντι 1,033±0,250 αντίστοιχα, $p=0,03$). Αντίθετα, δεν παρατηρήθηκαν διαφορές μεταξύ των δύο ομάδων της μελέτης όσον αφορά τους τίτλους των αυτοαντισωμάτων κατά την έναρξη της μελέτης κατά oxLDL_L (0,986±0,179 έναντι 0,893±0,163 αντίστοιχα, $p=0,08$), oxLDL(-)_L (1,047±0,154 έναντι 0,953±0,208 αντίστοιχα, $p=0,07$), oxLDL(-)_D (1,307±0,319 έναντι 1,220±0,382 αντίστοιχα, $p=0,391$) και MDA-LDL (1,274±0,211 έναντι 1,208±0,155 αντίστοιχα, $p=0,248$, *Πίνακας 13*).

Και στις δύο ομάδες της μελέτης τα επίπεδα των anti-oxLDL_P και anti-oxLDL_D ήταν υψηλότερα σε σύγκριση με τα επίπεδα των anti-oxLDL_L, ένα φαινόμενο που παρατηρήθηκε όταν ως αντιγόνα χρησιμοποιήθηκαν και οι αντίστοιχες μορφές oxLDL(-) (*Εικόνα 30*). Στους ασθενείς που έπαιρναν ατορβαστατίνη παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των επιπέδων των anti-oxLDL_P και anti-oxLDL_D (1,089±0,226 έναντι 1,222±0,380 αντίστοιχα, $p=0,006$) και anti-oxLDL(-)_P και anti-oxLDL(-)_D (1,205±0,278 έναντι 1,307±0,319, αντίστοιχα, $p=0,05$), ενώ αντίθετα στους ασθενείς που δεν έπαιρναν υπολιπιδαιμική αγωγή παρόμοιες διαφορές παρατηρήθηκαν μόνο στα επίπεδα των anti-oxLDL(-)_P και anti-oxLDL(-)_D (1,033±0,250 έναντι 1,220±0,382 αντίστοιχα, $p=0,02$, *Εικόνα 30*).



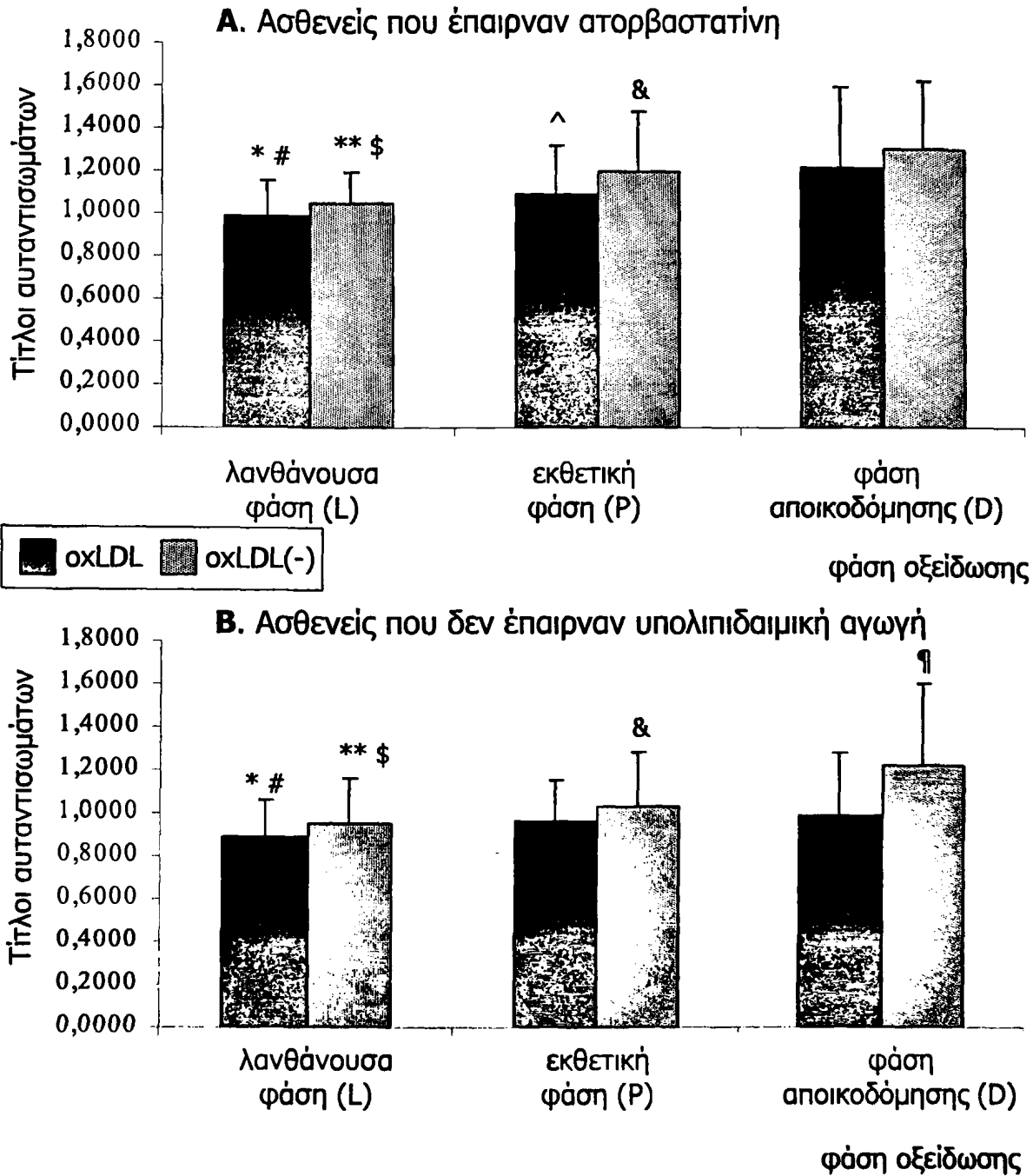
Πίνακας 13. Επίπεδα των διαφόρων παραμέτρων της oxLDL των δύο ομάδων της μελέτης κατά την έναρξη της μελέτης

		Ασθενείς που έπαιρναν ατορβαστατίνη (n=34)	Ασθενείς που δεν έπαιρναν υπολιπιδαιμική αγωγή (n=21)	p
Επίπεδα ορού (U/l)	OxLDL	41,7±10,0	32,8±7,3	0,02
	Anti- oxLDL _L	0,986±0,179	0,893±0,163	0,08
	Anti- oxLDL _P	1,089±0,226	0,962±0,186	0,05
	Anti- oxLDL _D	1,222±0,380	0,994±0,284	0,03
	Anti- oxLDL(-) _L	1,047±0,154	0,953±0,208	0,07
	Anti- oxLDL(-) _P	1,205±0,278	1,033±0,250	0,03
	Anti- oxLDL(-) _D	1,307±0,319	1,220±0,382	0,391
	Anti-MDA-LDL	1,274±0,211	1,208±0,155	0,248
Ενεργότητα LDL-PAF-AH (nmol/ml/min)		62,26±15,42	61,42±22,52	0,877

Τέλος και στις δύο ομάδες της μελέτης δεν παρατηρήθηκαν διαφορές μεταξύ των τίτλων των αυτοαντισωμάτων κατά των διαφόρων μορφών οξειδωμένης LDL, όταν αυτοί συγκρίθηκαν με τους αντίστοιχους τίτλους της oxLDL(-), με την εξαίρεση αυτή των anti-oxLDL(-)_D οι οποίοι ήταν σημαντικά υψηλότεροι σε σύγκριση με αυτούς των anti-oxLDL_D στους ασθενείς που δεν έπαιρναν υπολιπιδαιμική αγωγή (1,220±0,382 έναντι 0,994±0,284 αντίστοιχα, p=0,01, *Εικόνα 30*).

Πρέπει επίσης να σημειωθεί ότι οι παραπάνω διαφορές των τίτλων των αυτοαντισωμάτων μεταξύ των δύο ομάδων της μελέτης δεν συσχετίζονται με τα επίπεδα της ολικής και LDL χοληστερόλης, καθώς επίσης και με την ενεργότητα της PAF-AH και τα επίπεδα της oxLDL του ορού.





Εικόνα 30. Διαφορές στους τίτλους των αυτοαντισωμάτων κατά των διαφόρων μορφών oxLDL και oxLDL(-) κατά την έναρξη της μελέτης στους ασθενείς που έπαιρναν ατορβαστατίνη (A) και στους ασθενείς που δεν έπαιρναν υπολιπιδαιμική αγωγή (B)

A: * $p=0,005$ έναντι anti-oxLDL_P, # $p=0,0001$ έναντι anti-oxLDL_D, ^ $p=0,006$ έναντι anti-oxLDL_D, & $p=0,0001$ έναντι anti-oxLDL(-)_D, ^ $p=0,001$ έναντι anti-oxLDL(-)_P, & $p=0,05$ έναντι anti-oxLDL(-)_D

B: * $p=0,03$ έναντι anti-oxLDL_P, # $p=0,05$ έναντι anti-oxLDL_D, ^ $p=0,001$ έναντι anti-oxLDL(-)_D, & $p=0,05$ έναντι anti-oxLDL(-)_P, & $p=0,02$ έναντι anti-oxLDL(-)_D, ^ $p=0,01$ έναντι anti-oxLDL_D



Μεταβολές του τίτλου των αυτοαντισωμάτων κατά τη διάρκεια της περιόδου παρακολούθησης.

Στην ομάδα των ασθενών που δεν έπαιρναν υπολιπιδαιμική αγωγή παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές αυξήσεις σε σύγκριση με τις αντίστοιχες τιμές κατά την έναρξη της μελέτης τον πρώτο μήνα παρακολούθησης στα επίπεδα των anti-oxLDL_L (από 0,893±0,163 σε 1,066±0,982, αύξηση 24,8%, p=0,014), των anti-oxLDL_P (από 0,962±0,186 σε 1,127±1,136, αύξηση 21,2%, p=0,01), των anti-oxLDL_D (από 0,994±0,284 σε 1,224±0,481, αύξηση 35,0%, p=0,03), των anti-oxLDL(-)_P (από 1,033±0,250 σε 1,246±0,440, αύξηση 26,8%, p=0,01) και των anti-oxLDL(-)_D (από 0,994±0,284 σε 1,224±1,232, αύξηση 31,1%, p=0,02) (Πίνακας 14, Εικόνα 31, Εικόνα 32).

Στην ίδια ομάδα ασθενών οι τίτλοι των αυτοαντισωμάτων κατά των διαφόρων μορφών oxLDL, δηλαδή κατά των oxLDL_L, oxLDL_P και oxLDL_D, εμφάνισαν φθίνουσα πορεία τόσο στους 3 όσο και στους 6 μήνες παρακολούθησης, με αποτέλεσμα να μην παρατηρούνται στους συγκεκριμένους μήνες στατιστικά σημαντικές διαφορές σε σύγκριση με τους αντίστοιχους τίτλους κατά την έναρξη της μελέτης (Πίνακας 14, Εικόνα 31, Εικόνα 32). Αντίθετα, οι τίτλοι των αυτοαντισωμάτων κατά των anti-oxLDL(-)_P και anti-oxLDL(-)_D δεν μειώθηκαν μετά τον πρώτο μήνα παρακολούθησης, αλλά παρέμειναν υψηλότεροι σε σύγκριση με τους αντίστοιχους τίτλους κατά την έναρξη της μελέτης τόσο στους 3 μήνες (anti-oxLDL(-)_P: 1,236±0,268 έναντι 1,033±0,250, p=0,01, anti-oxLDL(-)_D: 1,452±0,309 έναντι 1,220±0,382, p=0,02), όσο και στους 6 μήνες παρακολούθησης (anti-oxLDL(-)_P: 1,158±0,413 έναντι 1,033±0,250, p=0,04, anti-oxLDL(-)_D: 1,379±0,244 έναντι 1,220±0,382, p=0,04) (Πίνακας 14, Εικόνα 31, Εικόνα 32).

Σε αντίθεση με τα παραπάνω, οι τίτλοι των αυτοαντισωμάτων κατά oxLDL(-)_L αυξανόταν συνεχώς σε όλη τη διάρκεια της παρακολούθησης (Πίνακας 14, Εικόνα 32). Η συνεχής αυτή αύξηση ήταν στατιστικά σημαντική στους 3 μήνες (από 0,953±0,208 σε 1,122±0,210, αύξηση 15,5%, p=0,027) και τους 6 μήνες (από 0,953±0,208 σε 1,178±0,175, αύξηση 28%, p=0,014), αλλά όχι στον πρώτο μήνα παρακολούθησης (από 0,953±0,208 σε 1,055±0,213, αύξηση 8%, p=0,198) (Πίνακας 14, Εικόνα 32).

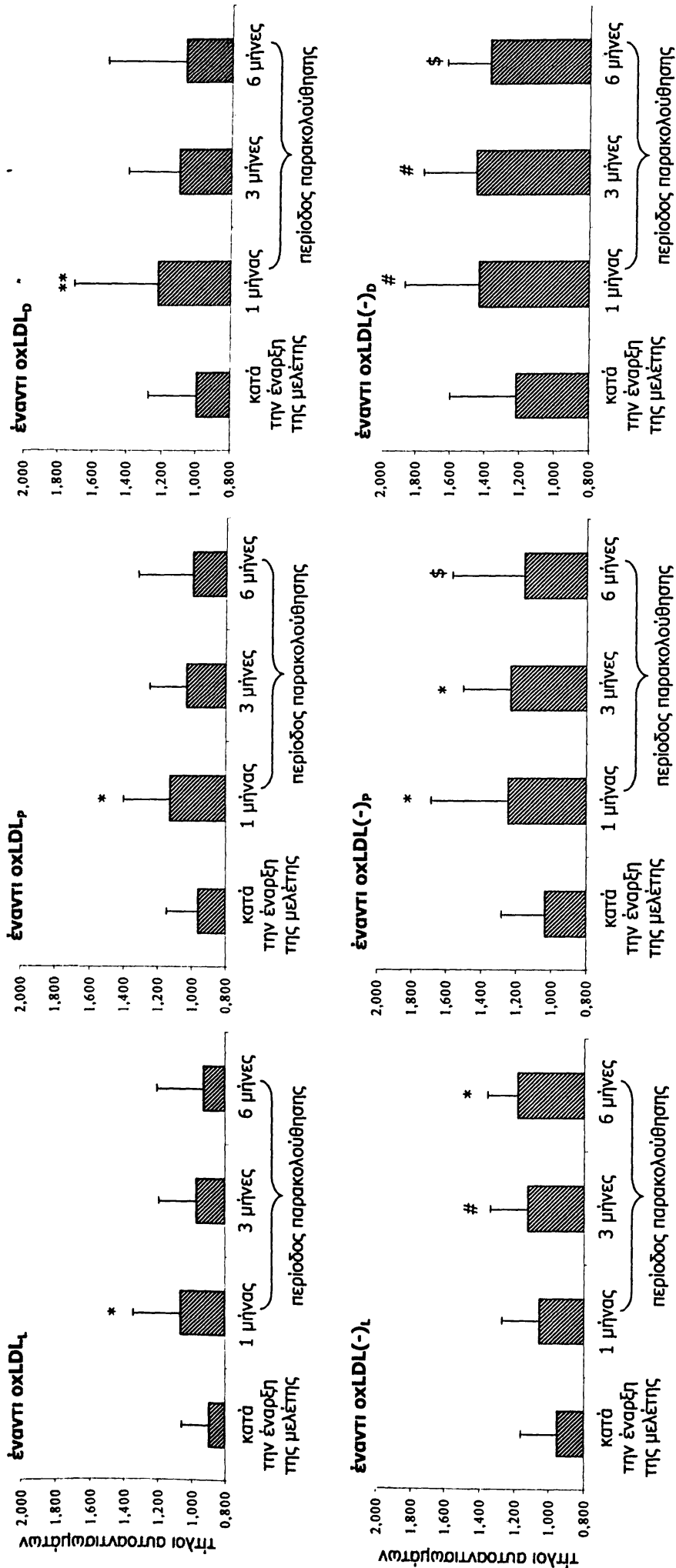


Πίνακας 14. Τίτλοι των αυτοαντισωμάτων κατά διαφόρων μορφών LDL κατά τη διάρκεια της περιόδου παρακολούθησης στους ασθενείς της μελέτης

	Ασθενείς που έπαιρναν atorvastatίνη				Ασθενείς που δεν έπαιρναν υπολιπιδαιμική αγωγή			
	κατά την έναρξη της μελέτης		κατά τη διάρκεια της περιόδου παρακολούθησης		κατά την έναρξη της μελέτης		κατά τη διάρκεια της περιόδου παρακολούθησης	
	1 μήνας	3 μήνες	6 μήνες	12 μήνες	1 μήνας	3 μήνες	6 μήνες	
Αντι-oxLDL _L	0,986±0,179	0,982±0,194	1,041±0,216	1,019±0,110	0,893±0,163	1,066±0,276*	0,968±0,223	0,925±0,278
Αντι-oxLDL _P	1,089±0,226	1,137±0,247	1,073±0,181	1,110±0,158	0,962±0,186	1,127±0,274*	1,032±0,218	1,001±0,316
Αντι-oxLDL _Q	1,222±0,380	1,232±0,351	1,187±0,261	1,169±0,298	0,994±0,284	1,224±0,481**	1,103±0,293	1,068±0,455
Αντι-oxLDL(-λ)	1,047±0,154	1,023±0,179	1,066±0,185	1,026±0,168	0,953±0,208	1,055±0,213	1,122±0,210*	1,178±0,175*
Αντι-oxLDL(-ρ)	1,205±0,278	1,213±0,289	1,210±0,276	1,202±0,287	1,033±0,250	1,246±0,440*	1,236±0,268*	1,158±0,413 [§]
Αντι-oxLDL(-β)	1,307±0,319	1,376±0,372	1,243±0,309	1,312±0,398	1,220±0,382	1,434±0,431 [#]	1,452±0,309 [#]	1,379±0,244 [§]
Αντι-MDA-LDL	1,274±0,211	1,214±0,189	1,292±0,206	1,299±0,201	1,208±0,155	1,197±0,158	1,197±0,139	1,182±0,121

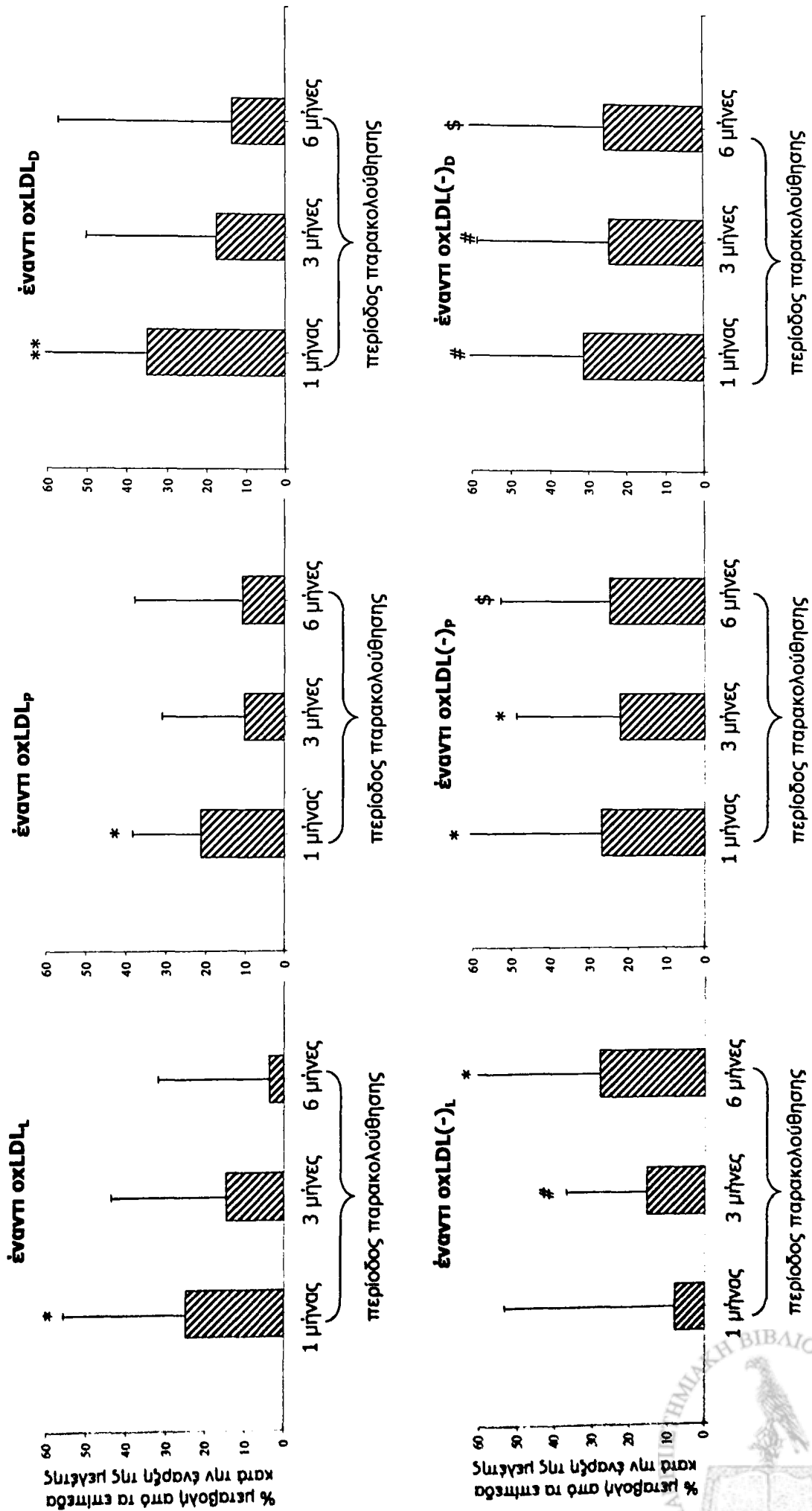
* p=0,01, # p=0,02, ** p=0,03, § p=0,04 σε σύγκριση με την αντίστοιχη τιμή κατά την έναρξη της μελέτης





Εικόνα 31. Τίτλοι αυτοαντισωμάτων κατά διαφόρων μορφών oxLDL κατά τη διάρκεια της περιόδου παρακολούθησης στους ασθενείς που δεν έπαιρναν υπολιπιδαιμική αγωγή (p=0,01, #p=0,02, \$p=0,03, *p=0,04 σε σύγκριση με τους αντίστοιχους τίτλους κατά την έναρξη της μελέτης)



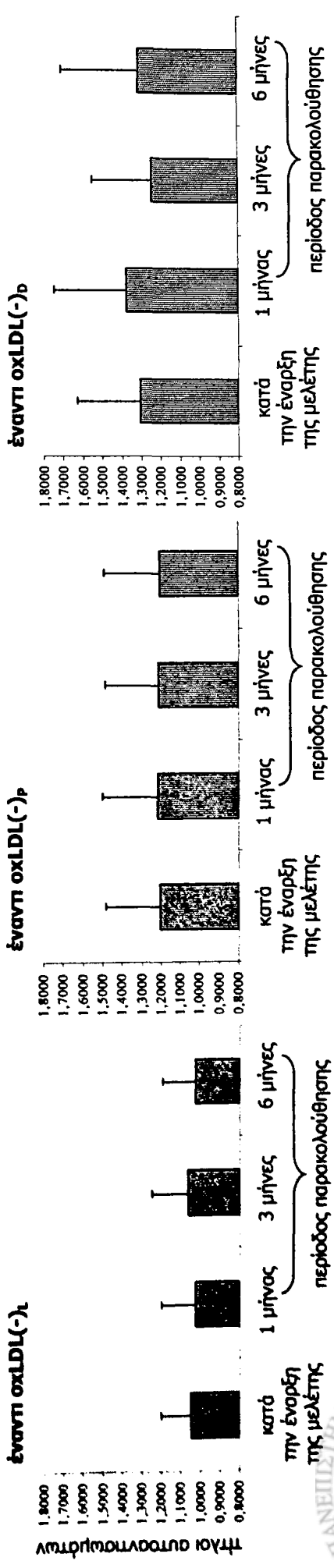
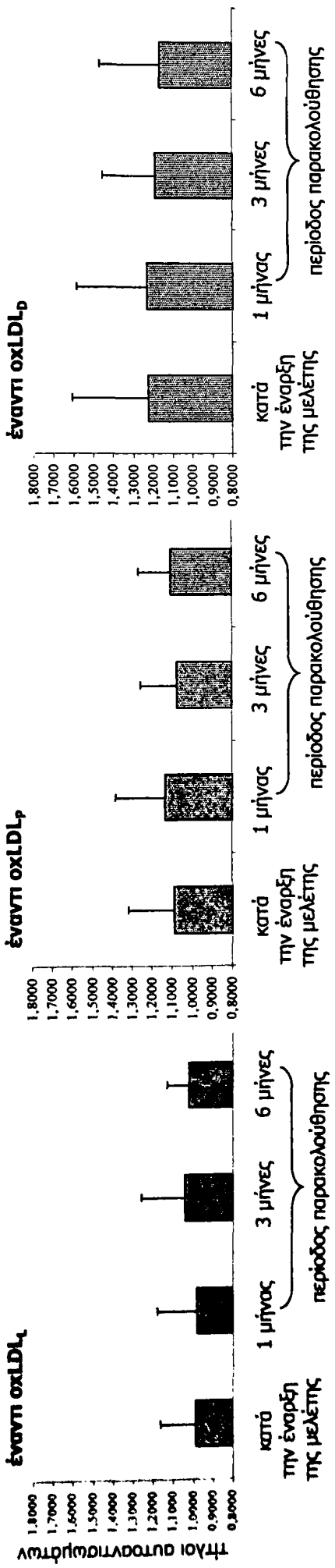


Εικόνα 32. Ποσοστιαίες μεταβολές του τίτλου των αυτοαντισωμάτων κατά διαφόρων μορφών LDL κατά τη διάρκεια της περιόδου παρακολούθησης στους ασθενείς που δεν έπαιρναν υπολιπιδαιμική αγωγή (p=0,01, *p=0,02, #p=0,03, \$p=0,04 σε σύγκριση με τους αντίστοιχους τίτλους κατά την έναρξη της

Πρέπει να σημειωθεί ότι στους ασθενείς που έπαιρναν ατορβαστατίνη οι τίτλοι των αυτοαντισωμάτων κατά όλων των μορφών της oxLDL δεν παρουσίασαν μεταβολές, αλλά παρέμειναν σταθεροί σε σύγκριση με τους αντίστοιχους τίτλους κατά την έναρξη της μελέτης σε όλη τη διάρκεια της παρακολούθησης (*Πίνακας 14, Εικόνα 33*).

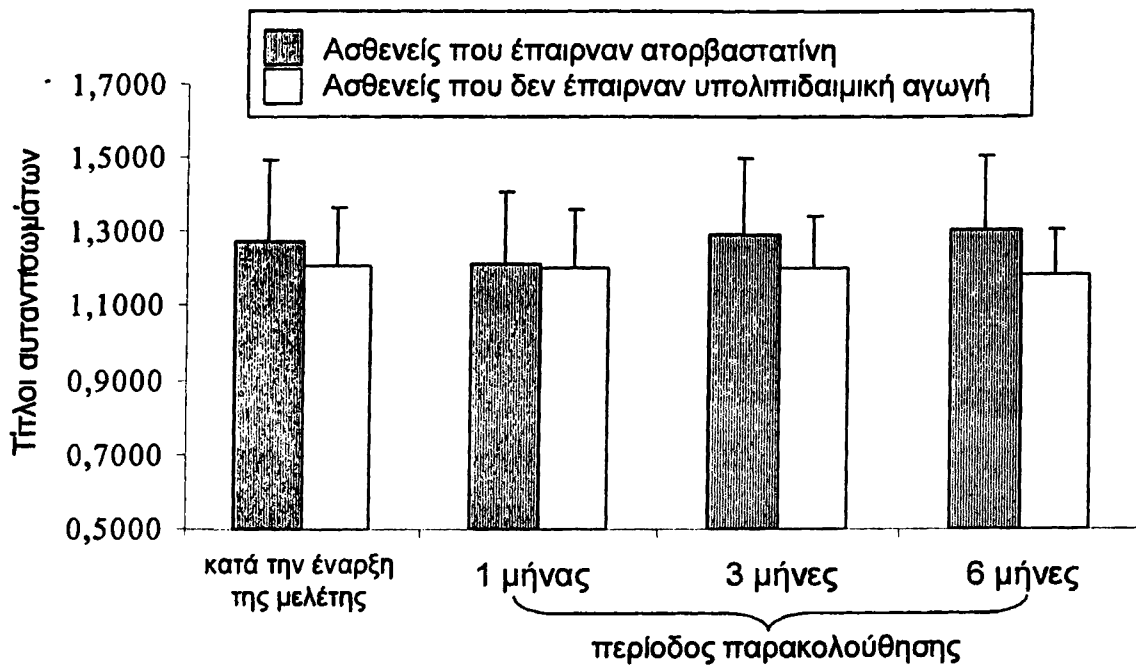
Τέλος, δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές τόσο στους τίτλους των αυτοαντισωμάτων κατά της MDA-LDL όσο και στις ποσοστιαίες μεταβολές των τίτλων αυτών στη διάρκεια της παρακολούθησης μεταξύ των δύο ομάδων της μελέτης (*Πίνακας 14, Εικόνα 34, Εικόνα 35*).



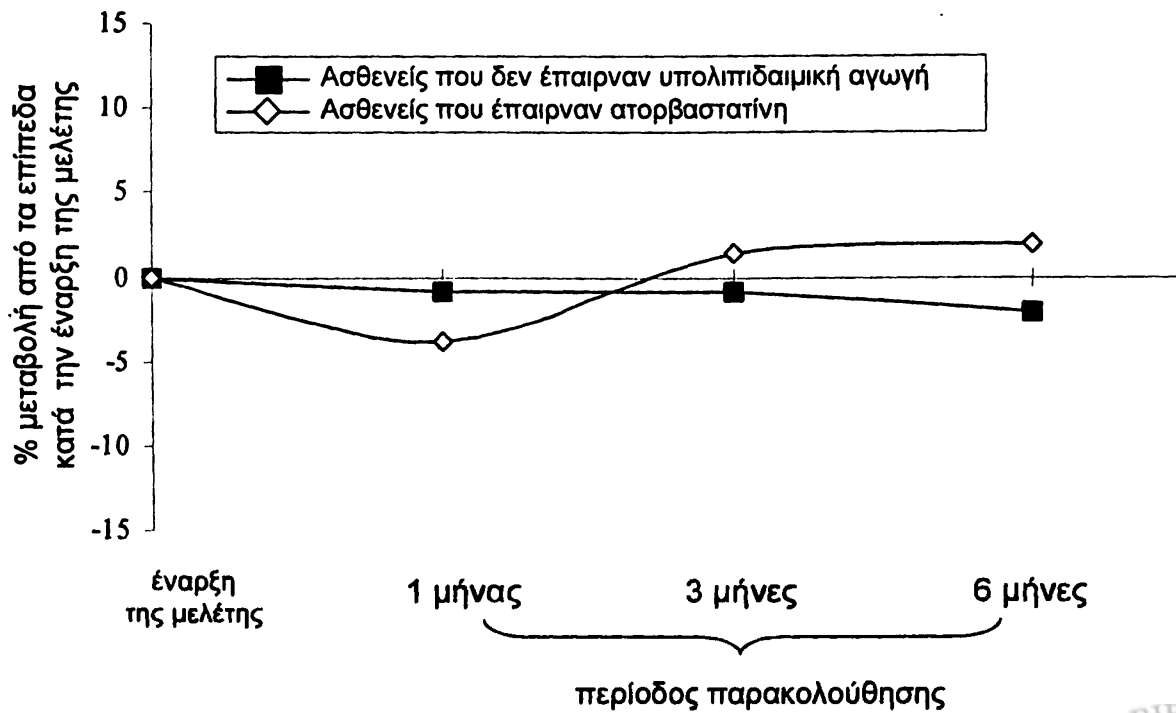


Εικόνα 33. Τίτλοι αυτοαντισωμάτων κατά διαφόρων μορφών oxLDL κατά τη διάρκεια της περιόδου παρακολούθησης στους ασθενείς που έπαιρναν atorvastatίνη





Εικόνα 34. Τίτλοι αυτοαντισωμάτων κατά MDA-LDL στις δύο ομάδες της μελέτης κατά τη διάρκεια της παρακολούθησης των ασθενών (6 μήνες).

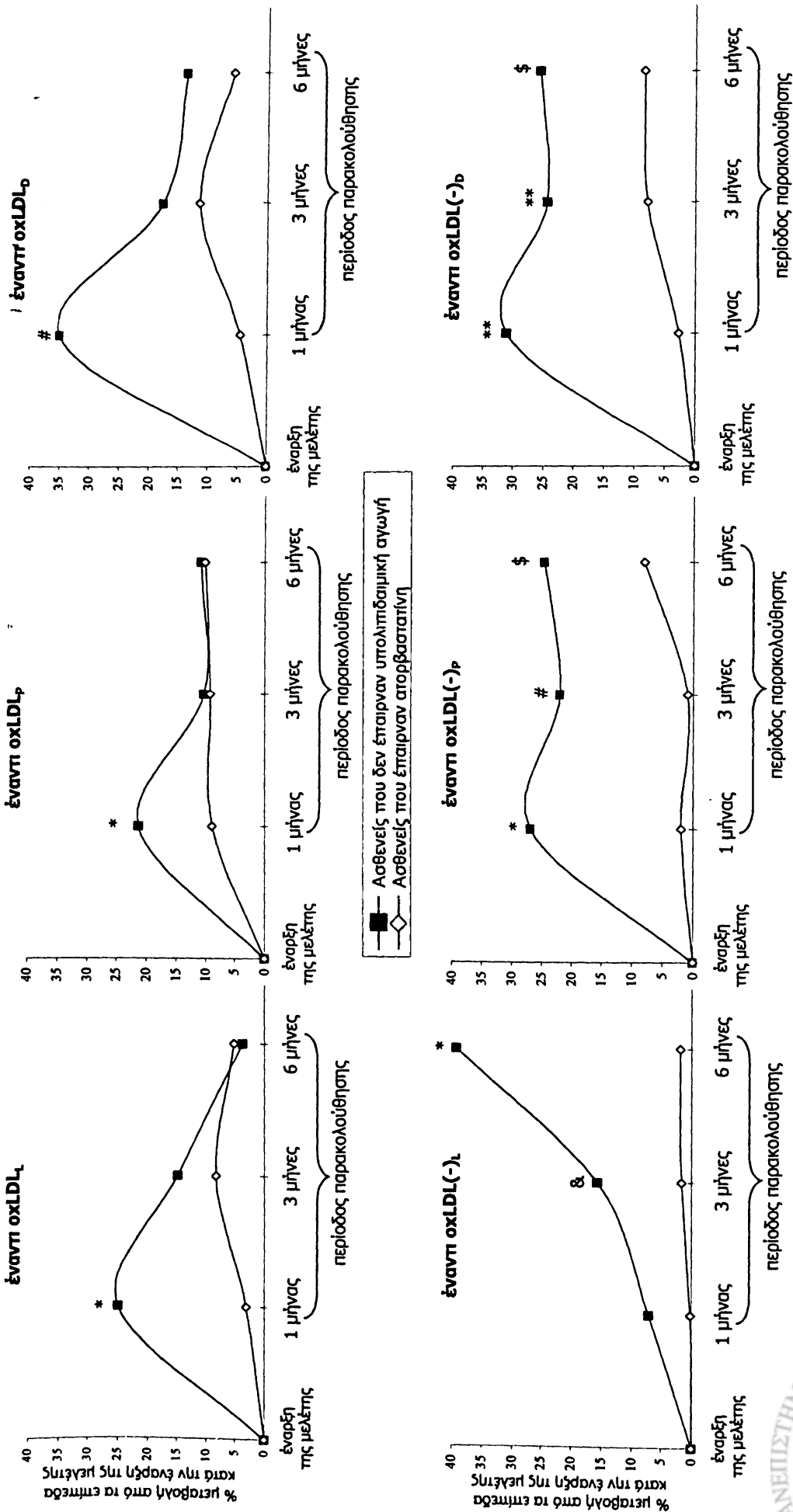


Εικόνα 35. Ποσοστιαίες μεταβολές του τίτλου των αυτοαντισωμάτων κατά MDA-LDL στις δύο ομάδες της μελέτης κατά τη διάρκεια της παρακολούθησης των ασθενών (6 μήνες).

Όπως αναφέρθηκε, οι διαφορές των ποσοστιαίων μεταβολών των τίτλων των αυτοαντισωμάτων κατά των διαφόρων μορφών της oxLDL σε κάθε χρονική στιγμή μεταξύ των δύο ομάδων της μελέτης εκτιμήθηκαν με τη βοήθεια ANCOVA, με τους αντίστοιχους τίτλους των αυτοαντισωμάτων κατά την έναρξη της θεραπείας να λαμβάνονται ως συνμεταβλητές. Με βάση αυτά τα αποτελέσματα, οι ασθενείς που δεν έπαιρναν υπολιπιδαιμική αγωγή σε σύγκριση με τους ασθενείς που έπαιρναν ατορβαστατίνη, εμφάνισαν στον 1^ο μήνα παρακολούθησης στατιστικά μεγαλύτερες ποσοστιαίες μεταβολές των τίτλων των αυτοαντισωμάτων κατά oxLDL_L ($24,8 \pm 30,6\%$ έναντι $3 \pm 25\%$ αντίστοιχα, $p=0,012$), oxLDL_P ($21,2 \pm 17\%$ έναντι $8,8 \pm 30\%$ αντίστοιχα, $p=0,012$), oxLDL_D ($34,9 \pm 47,5\%$ έναντι $4,5 \pm 28,2\%$ αντίστοιχα, $p=0,035$). Οι παραπάνω μεταβολές δεν ήταν πλέον στατιστικά σημαντικές στον 3^ο και 6^ο μήνα παρακολούθησης (*Εικόνα 36*).

Όσον αφορά τους τίτλους των αυτοαντισωμάτων κατά των διαφόρων μορφών oxLDL(-), οι ασθενείς που δεν έπαιρναν υπολιπιδαιμική αγωγή σε σύγκριση με αυτούς που έπαιρναν ατορβαστατίνη εμφάνισαν στατιστικά μεγαλύτερες ποσοστιαίες μεταβολές των τίτλων των αυτοαντισωμάτων κατά της oxLDL(-)_P ($26,8 \pm 55,2\%$ έναντι $2 \pm 28,6\%$ αντίστοιχα, $p=0,012$) και oxLDL(-)_D ($31,1 \pm 41,5\%$ έναντι $2,72 \pm 23,4\%$ αντίστοιχα, $p=0,022$) στον 1^ο μήνα παρακολούθησης. Οι διαφορές αυτές παρέμειναν στατιστικά μεγαλύτερες για τους ασθενείς που δεν έπαιρναν υπολιπιδαιμική αγωγή τόσο στον 3^ο μήνα (oxLDL(-)_P: $21,8 \pm 26,9\%$ έναντι $0,9 \pm 25,4\%$ αντίστοιχα, $p=0,031$, oxLDL(-)_D: $24,5 \pm 34,1\%$ έναντι $7,8 \pm 27,4\%$ αντίστοιχα, $p=0,02$) όσο και στον 6^ο μήνα παρακολούθησης (oxLDL(-)_P: $24,6 \pm 27,9\%$ έναντι $8,1 \pm 32,1\%$ αντίστοιχα, $p=0,04$, oxLDL(-)_D: $25,7 \pm 40,3\%$ έναντι $8,5 \pm 27,3\%$ αντίστοιχα, $p=0,04$, *Εικόνα 36*). Επιπρόσθετα, οι ασθενείς που δεν έπαιρναν υπολιπιδαιμική αγωγή σε σύγκριση με τους ασθενείς που έπαιρναν ατορβαστατίνη, εμφάνισαν στατιστικά υψηλότερες ποσοστιαίες μεταβολές του τίτλου των αυτοαντισωμάτων κατά της oxLDL(-)_L, στον 3^ο μήνα ($15,5 \pm 21,4\%$ έναντι $1,65 \pm 18\%$ αντίστοιχα, $p=0,05$) και στον 6^ο μήνα ($28 \pm 43,2\%$ έναντι $1,7 \pm 23,9\%$ αντίστοιχα, $p=0,01$) αλλά όχι στον 1^ο μήνα παρακολούθησης ($8 \pm 45,6\%$ έναντι $0,13 \pm 23,7\%$ αντίστοιχα, $p=0,152$, *Εικόνα 36*).





Εικόνα 36. Ποσοστιαίες μεταβολές του τίτλου των αυτοαντισωμάτων κατά τη διάρκεια της παρακολούθησης στις δύο ομάδες της μελέτης ($p=0,01$, $p=0,02$, # $p=0,03$, \$ $p=0,04$, & $p=0,05$ σε σύγκριση με την αντίστοιχη ποσοστιαία μεταβολή στους ασθενείς που έπαιρναν ατορβαστατίνη τη δεδομένη χρονική στιγμή)



9.3.3. Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ PAF-AH

Όπως αναφέρθηκε, οι μορφές oxLDL(-) οι οποίες χρησιμοποιήθηκαν ως αντιγόνα παρασκευάστηκαν αφού πρώτα είχε απενεργοποιηθεί η ενδογενής PAF-AH (βλ. πειραματική διαδικασία). Οι μορφές αυτές είναι πλούσιες σε oxPL αλλά όχι σε lyso-PC (Πίνακας 6). Αντίθετα οι μορφές της oxLDL είναι πλούσιες σε lyso-PC, η οποία αποτελεί το προϊόν της επίδρασης της PAF-AH στην PC που υπάρχει στις LDL.

Τα επίπεδα της ενεργότητας της PAF-AH του ορού κατά την έναρξη της μελέτης δεν διέφεραν μεταξύ των δύο ομάδων της μελέτης ($61,4 \pm 22,5$ nmol/ml/min στους ασθενείς που δεν έπαιρναν υπολιπιδαιμική αγωγή έναντι $62,3 \pm 15,4$ nmol/ml/min στους ασθενείς που έπαιρναν ατορβαστατίνη, $p=0,877$).

Κατά τη διάρκεια της παρακολούθησης, η ενεργότητα του ενζύμου δεν μεταβλήθηκε σημαντικά στους ασθενείς που δεν έπαιρναν υπολιπιδαιμική αγωγή, αλλά παρέμεινε σταθερή σε σύγκριση με τα επίπεδα κατά την έναρξη της μελέτης ($61,4 \pm 22,5$ nmol/ml/min), τον 1^ο μήνα ($64,2 \pm 23,8$ nmol/ml/min, $p=0,646$), τον 3^ο μήνα ($66,5 \pm 19,5$ nmol/ml/min, $p=0,800$) και τον 6^ο μήνα παρακολούθησης ($57,7 \pm 22,8$ nmol/ml/min, $p=0,661$, Πίνακας 15). Αντίθετα, στους ασθενείς που έπαιρναν ατορβαστατίνη παρατηρήθηκε μια σημαντική μείωση της ενεργότητας του ενζύμου σε σύγκριση με την ενεργότητα κατά την έναρξη της μελέτης από τον πρώτο μήνα παρακολούθησης (από $62,3 \pm 15,4$ nmol/ml/min σε $47,5 \pm 16,1$ nmol/ml/min, μείωση κατά $23 \pm 11,1\%$, $p=0,004$). Η μείωση αυτή διατηρήθηκε τον 3^ο μήνα ($51,8 \pm 15,2$ nmol/ml/min, μείωση κατά $16 \pm 7,4\%$ σε σύγκριση με την ενεργότητα κατά την έναρξη της μελέτης, $p=0,02$) και τον 6^ο μήνα παρακολούθησης ($50,5 \pm 15,8$ nmol/ml/min, μείωση κατά $18 \pm 6,2\%$ σε σύγκριση με την ενεργότητα κατά την έναρξη της μελέτης, $p=0,005$, Πίνακας 15, Εικόνα 37).

Έτσι, σε κάθε χρονική στιγμή η ενεργότητα του ενζύμου ήταν μικρότερη στους ασθενείς που έπαιρναν ατορβαστατίνη σε σύγκριση με τους ασθενείς που δεν έπαιρναν υπολιπιδαιμική αγωγή, δηλαδή $47,5 \pm 16,1$ nmol/ml/min έναντι $64,2 \pm 23,8$ nmol/ml/min αντίστοιχα, $p=0,005$ για τον 1^ο μήνα, $51,8 \pm 15,2$ nmol/ml/min έναντι $66,5 \pm 19,5$ nmol/ml/min αντίστοιχα, $p=0,01$ για τον 3^ο μήνα και $50,5 \pm 15,8$ nmol/ml/min έναντι $57,7 \pm 22,8$ nmol/ml/min αντίστοιχα, $p=0,05$ για τον 6^ο μήνα παρακολούθησης (Εικόνα 37, Πίνακας 15).

Οι ποσοστιαίες μεταβολές της ενεργότητας του ενζύμου στους ασθενείς που έπαιρναν ατορβαστατίνη σε σύγκριση με τους ασθενείς που δεν έπαιρναν υπολιπιδαιμική αγωγή, διέφεραν στατιστικά σημαντικά σε κάθε χρονική στιγμή κατά τη διάρκεια της παρακολούθησης ($-23 \pm 11,1\%$ έναντι $4 \pm 2,1\%$ αντίστοιχα, $p=0,002$ για τον πρώτο μήνα, $-16 \pm 7,4\%$ έναντι $7,8 \pm 3,1$ αντίστοιχα, $p=0,03$ για τον 3^ο μήνα και $-18 \pm 6,2\%$ έναντι $-6 \pm 4,2\%$ αντίστοιχα, $p=0,04$ για τον 6^ο μήνα, Εικόνα 38).



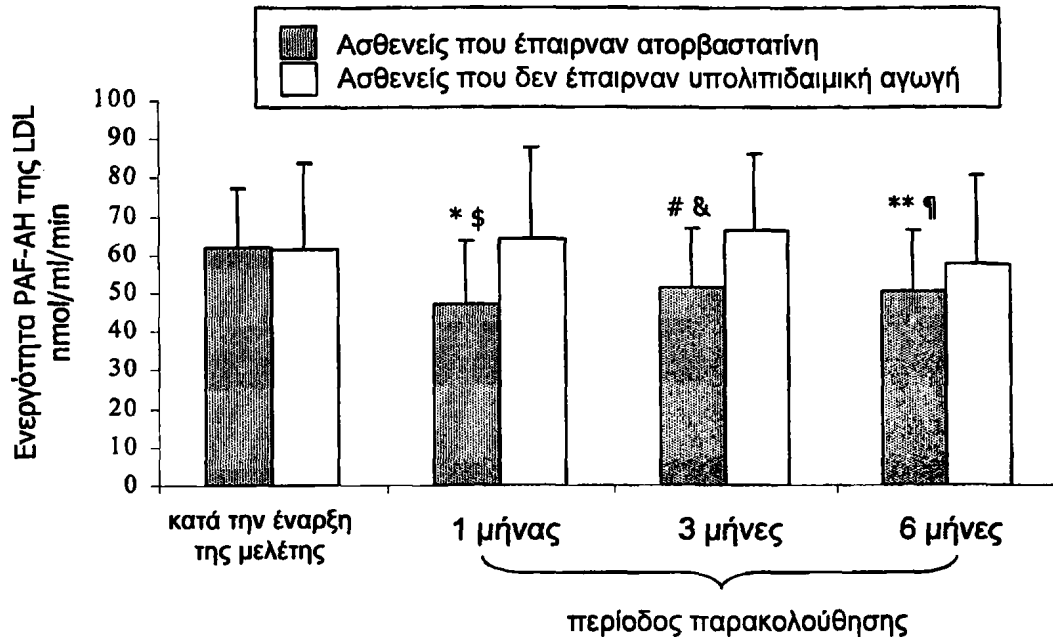
Πίνακας 15. Ενεργότητα της ενδογενούς PAF-AH μεταξύ των δύο ομάδων της μελέτης

	Ενεργότητα PAF-AH (nmol/ml/min)	
	Ασθενείς που έπαιρναν ατορβαστατίνη (n=34)	Ασθενείς που δεν έπαιρναν υπολιπιδαιμική αγωγή (n=21)
Έναρξη της μελέτης	62,3±15,4	61,4±22,5
1 ^{ος} μήνας	47,5±16,1*	64,2±23,8
3 ^{ος} μήνας	51,8±15,2 [#]	66,5±19,5
6 ^{ος} μήνας	50,5±15,8 ^{**}	57,7±22,8

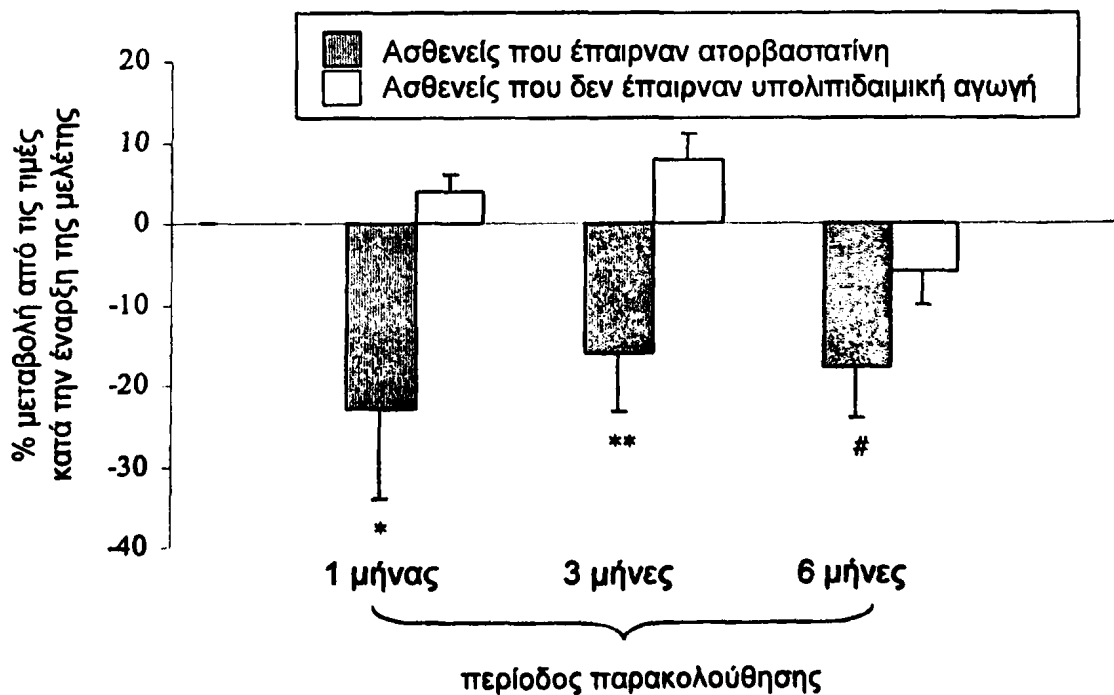
p=0,004, *p=0,005, [#]p=0,02 σε σύγκριση με τις αντίστοιχες τιμές ενεργότητας κατά την έναρξη της μελέτης

Συνολικά στον πληθυσμό της μελέτης η ποσοστιαία μεταβολή της ενεργότητας της PAF-AH τον πρώτο μήνα παρακολούθησης συσχετίζονταν θετικά με την ποσοστιαία μεταβολή του τίτλου των αυτοαντισωμάτων κατά της oxLDL_L (r=0,514, p=0,001, *Εικόνα 39*) και της oxLDL_D (r=0,383, p=0,021, *Εικόνα 40*) την ίδια χρονική στιγμή. Τέλος παρόμοια συσχέτιση βρέθηκε και μεταξύ της ποσοστιαίας μεταβολής της ενεργότητας του ενζύμου τον 3^ο μήνα και της ποσοστιαίας μεταβολής των επιπέδων των αντι-oxLDL_L την ίδια χρονική στιγμή (r=0,365, p=0,044, *Εικόνα 41*).

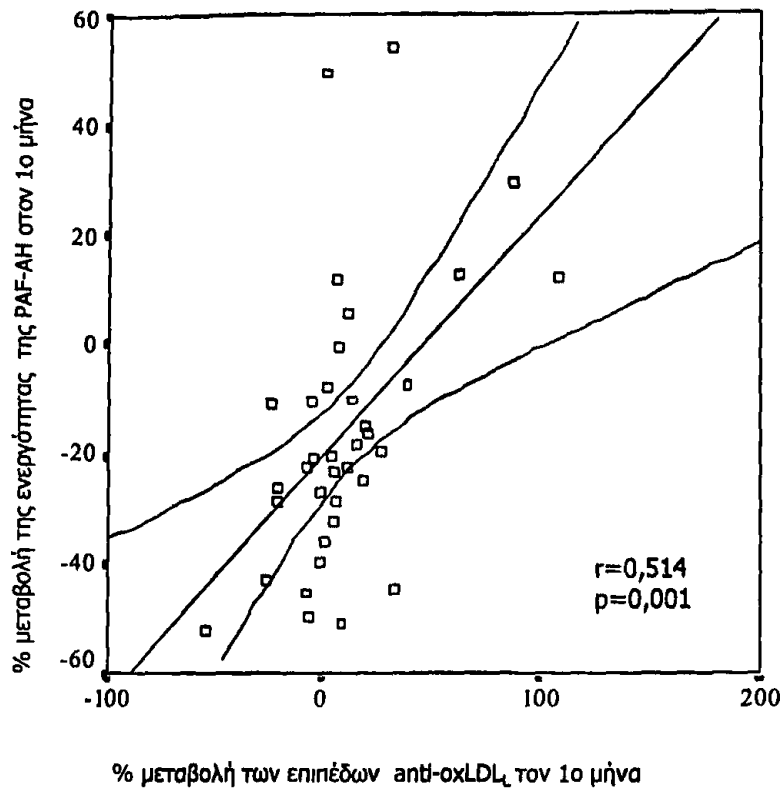




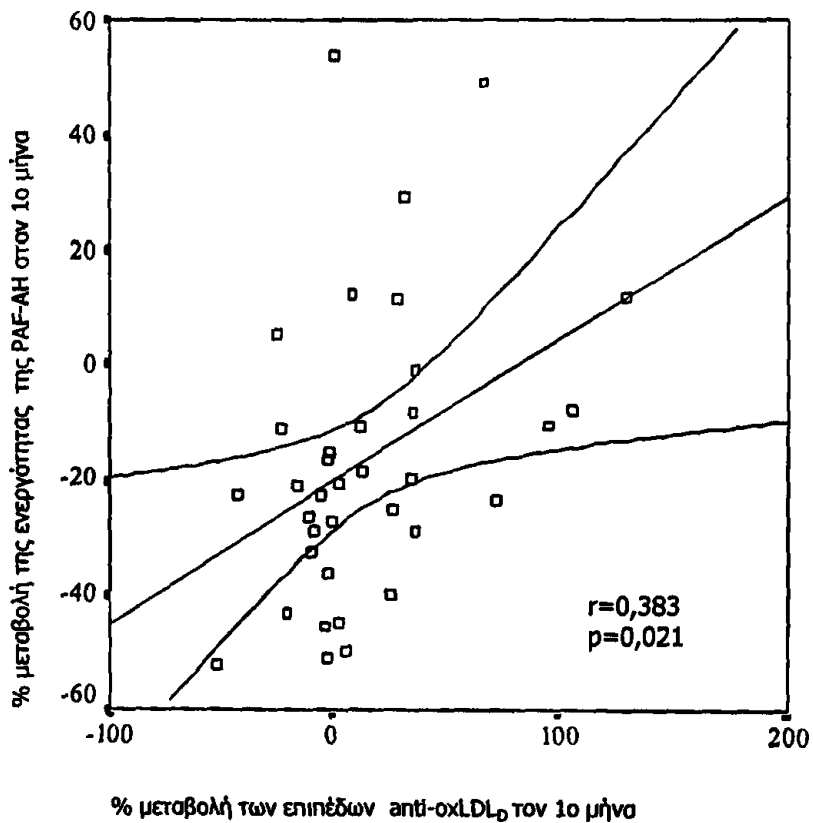
Εικόνα 37. Ενεργότητα της PAF-AH της LDL στις δύο ομάδες της μελέτης. ($p=0,004$, $^{**}p=0,005$, $^{\#}p=0,02$ σε σύγκριση με τις αντίστοιχες τιμές ενεργότητας κατά την έναρξη της μελέτης, $^{\$}p=0,005$, $^{\&}p=0,01$, $^{\eta}p=0,05$ σε σύγκριση με τις αντίστοιχες τιμές ενεργότητας των ασθενών που δεν έπαιρναν υπολιπιδαιμική αγωγή τη δεδομένη χρονική στιγμή)



Εικόνα 38. Ποσοστιαίες μεταβολές της ενεργότητας της PAF-AH στις δύο ομάδες της μελέτης κατά τη διάρκεια της παρακολούθησης ($p=0,002$, $^{\#}p=0,03$, $^{\eta}p=0,04$ σε σύγκριση με την αντίστοιχη τιμή των ασθενών που δεν έπαιρναν υπολιπιδαιμική αγωγή την κάθε δεδομένη στιγμή)

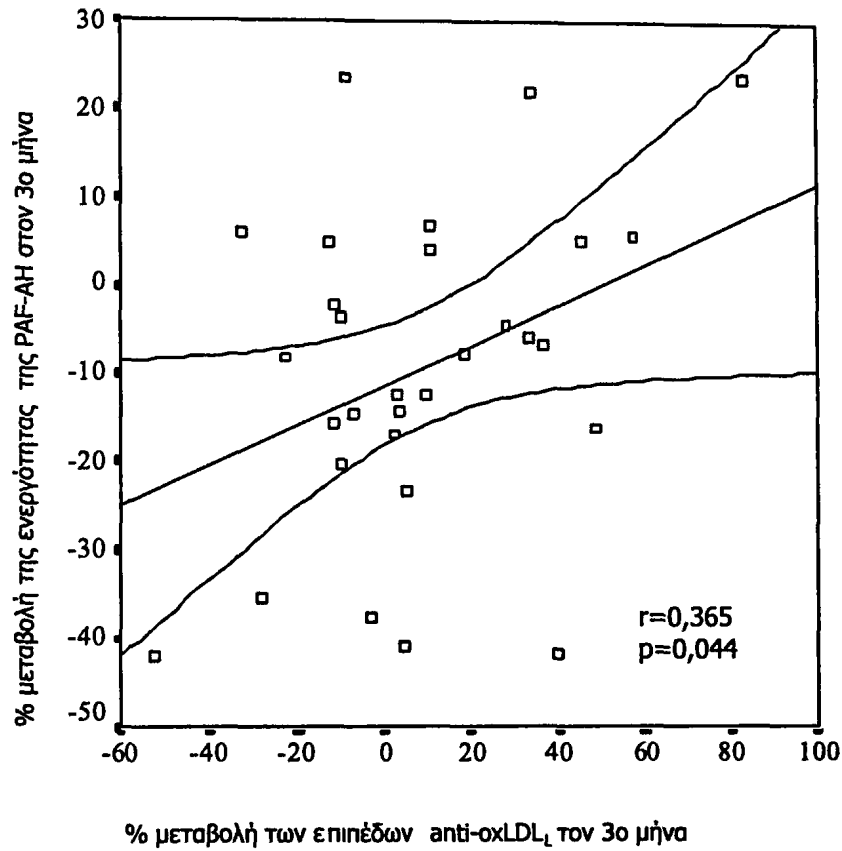


Εικόνα 39. Συσχέτιση μεταξύ της ποσοστιαίας μεταβολής της ενεργότητας της PAF-AH της LDL τον 1^ο μήνα παρακολούθησης και της ποσοστιαίας μεταβολής των επιπέδων των αντι-oxLDL_L στον 1^ο μήνα



Εικόνα 40. Συσχέτιση μεταξύ της ποσοστιαίας μεταβολής της ενεργότητας της PAF-AH της LDL τον 1^ο μήνα παρακολούθησης και της ποσοστιαίας μεταβολής των επιπέδων των αντι-oxLDL_D στον 1^ο μήνα





Εικόνα 41. Συσχέτιση μεταξύ της ποσοστιαίας μεταβολής της ενεργότητας της PAF-AH της LDL τον 3^ο μήνα παρακολούθησης και της ποσοστιαίας μεταβολής των επιπέδων των αντι-oxLDL_L στον 3^ο μήνα

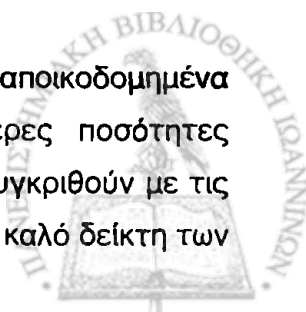
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 10^ο

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης δείχνουν για πρώτη φορά ότι η ενεργότητα της PAF-AH της LDL συμβάλλει σημαντικά στη μείωση της αντιγονικότητας της oxLDL. Το ένζυμο αυτό μετατρέπει κατά τη διάρκεια της οξειδωσης της LDL τα οξειδωμένα φωσφολιπίδια (oxPL) σε λυσοφωσφατιδυλοχολίνη (lyso-PC) ^[79]. Με αυτό τον τρόπο η PAF-AH επηρεάζει τα επίπεδα των παραπάνω φωσφολιπιδίων στο σωματίδιο της oxLDL. Αρχικά στην παρούσα μελέτη μελετήθηκαν οι τίτλοι των αυτοαντισωμάτων κατά διαφόρων μορφών oxLDL σε ασθενείς με σταθερή στηθάγχη και υγιείς εθελοντές. Στον πληθυσμό αυτό, όταν ως αντιγόνα χρησιμοποιήθηκαν οι τρεις μορφές της oxLDL(-), δηλαδή μορφές που προέκυψαν όταν οι LDL οξειδώθηκαν αφού πρώτα είχε απενεργοποιηθεί η ενδογενής PAF-AH, οι τίτλοι αυτοαντισωμάτων ήταν υψηλότεροι τόσο στους υγιείς εθελοντές όσο και στους ασθενείς με σταθερή στηθάγχη, σε σύγκριση με τους τίτλους που παρατηρήθηκαν όταν ως αντιγόνα χρησιμοποιήθηκαν οι αντίστοιχοι τύποι της oxLDL, δηλαδή οι μορφές που προέκυψαν όταν οι LDL οξειδώθηκαν χωρίς να απενεργοποιηθεί η ενδογενής PAF-AH.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της μελέτης μας, οι μορφές της oxLDL ήταν πλούσιες σε lyso-PC. Περιείχαν όμως λιγότερα ποσοστά φωσφατιδυλοχολίνης (PC), όταν συγκρίθηκαν με τις αντίστοιχες μορφές της oxLDL(-). Αυτό το εύρημα υποδηλώνει ότι στις μορφές oxLDL(-) δεν υδρολύθηκε ο εστερικός δεσμός στην *sn-2* θέση των οξειδωμένων φωσφολιπιδίων από την PAF-AH ^[95], προφανώς λόγω της πρότερης απενεργοποίησης του ενζύμου πριν από την οξειδωση της LDL. Με αυτό τον τρόπο, στις μορφές της oxLDL(-) τα τμήματα των λιπαρών οξέων στην *sn-2* θέση, τα οποία προκύπτουν από την αποικοδόμηση των υπεροξειδίων των λιπαρών οξέων, παραμένουν δεσμευμένα με εστερικό δεσμό στα μόρια της φωσφατιδυλοχολίνης. Τέτοια τμήματα, προσκολλημένα στα οξειδωμένα φωσφολιπίδια μπορεί να περιέχουν τελικές δραστικές αλδεΐδες, οι οποίες μπορούν να δημιουργήσουν σταθερές βάσεις Schiff με τα υπολείμματα λυσίνης της ApoB-100 αλλά και άλλων πρωτεϊνών, όπως και με τα φωσφολιπίδια που περιέχουν αμίνη, όπως η φωσφατιδυλεθανολαμίνη και η φωσφατιδυλσερίνη ^[11,47,446]. Τα παραπάνω φωσφολιπίδια μπορούν επίσης διαμέσου αυτοδιάσπασης να σχηματίσουν αλδόλες, οι οποίες αποτελούν αντιγονικούς επίτοπους στο σωματίδιο της oxLDL ^[267].

Σε αντίθεση με την αυξημένη περιεκτικότητα σε άθικτα μη αποικοδομημένα οξειδωμένα φωσφολιπίδια, οι μορφές της oxLDL(-) περιέχουν μικρότερες ποσότητες δραστικών ουσιών που αντιδρούν με θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBARS) όταν συγκριθούν με τις αντίστοιχες μορφές της oxLDL. Τα επίπεδα των TBARS αποτελούν ένα πολύ καλό δείκτη των



αλδεϋδών οι οποίες απελευθερώνονται από την *sn-2* θέση των υπεροξειδίων των λιπαρών οξέων όταν αυτά αποικοδομούνται^[447]. Τέτοιες δραστικές αλδεϋδες (κυρίως η MDA και η 4-υδροξυνοενάλη, 4-HNE) μπορούν επίσης να σχηματίσουν βάσεις Schiff και προϊόντα προσθήκης τύπου Michael με τα υπολείμματα λυσίνης της αρσΒ της oxLDL και να δημιουργήσουν επιπρόσθετους αντιγονικούς επιτόπους^[446].

Συνολικά, οι μορφές της oxLDL(-) είναι εμπλουτισμένες σε οξειδωμένα φωσφολιπίδια. Αυτά τα φωσφολιπίδια περιέχουν στην *sn-2* θέση τα υπολείμματα των λιπαρών οξέων που παραμένουν συνδεδεμένα στη φωσφατιδυλοχολίνη, αλλά είναι πτωχές σε lyso-PC και ελεύθερες αλδεϋδες^[65]. Συνεπώς, οι υψηλότεροι τίτλοι αυτοαντισωμάτων, οι οποίοι ανιχνεύθηκαν τόσο στους υγιείς εθελοντές όσο και στους ασθενείς με σταθερή στηθάγχη κατά των διαφόρων μορφών oxLDL(-), σε σύγκριση με τους τίτλους κατά των αντίστοιχων μορφών της oxLDL, υποδηλώνουν ότι τα τμήματα των *sn-2* λιπαρών οξέων, τα οποία παραμένουν συνδεδεμένα μέσω εστερικών δεσμών στη φωσφατιδυλοχολίνη, μπορούν να σχηματίσουν περισσότερο ενεργούς αντιγονικούς επιτόπους στο σωματίδιο της oxLDL σε σύγκριση με τους αντιγονικούς επιτόπους που σχηματίζονται παρουσία της lyso-PC και των αλδεϋδών. Ένα τέτοιο συμπέρασμα υποδηλώνει ότι η PAF-AH της LDL αποτρέπει το σχηματισμό τέτοιων έντονα ενεργών αντιγονικών επιτόπων, αφού απελευθερώνει τα *sn-2* τμήματα των λιπαρών οξέων από τα οξειδωμένα φωσφολιπίδια.

Στη παρούσα μελέτη, οι τίτλοι αυτοαντισωμάτων κατά όλων των μορφών τόσο της oxLDL όσο και της oxLDL(-) αυξάνονταν παράλληλα με την αύξηση του ρυθμού οξειδωσης των LDL (από τη λανθάνουσα φάση στη φάση αποικοδόμησης) στην ομάδα ελέγχου. Φαίνεται λοιπόν ότι ο βαθμός της οξειδωσης των LDL είναι ένας ακόμα σημαντικός παράγοντας για τον καθορισμό του τίτλου των αυτοαντισωμάτων που ανιχνεύονται σε υγιή άτομα.

Αντίθετα, στην ομάδα των ασθενών με σταθερή στηθάγχη οι τίτλοι των αυτοαντισωμάτων κατά oxLDL_D και oxLDL(-)_D δεν διέφεραν σε σύγκριση με τους τίτλους κατά των oxLDL_P και oxLDL(-)_P, αντίστοιχα. Καθώς το κοινό σημείο των oxLDL_D και oxLDL(-)_D είναι ο εμπλουτισμός τους σε TBARS, μπορούμε να υποθέσουμε ότι η ανοσολογική απάντηση των ασθενών με σταθερή στηθάγχη στους επιτόπους που σχηματίζονται στην oxLDL παρουσία ελευθέρων αλδεϋδών είναι μικρότερη όταν συγκριθεί με την αντίστοιχη των υγιών εθελοντών. Μια τέτοια προσέγγιση μπορεί να εξηγήσει και τα ευρήματα της παρούσας μελέτης. Σύμφωνα με αυτά, οι ασθενείς με στεφανιαία νόσο εμφάνισαν υψηλότερους τίτλους αυτοαντισωμάτων κατά όλων των μορφών oxLDL και oxLDL(-) αλλά όχι κατά της MDA-LDL, σε σύγκριση με τους υγιείς εθελοντές.

Προηγούμενες μελέτες έδειξαν ότι η MDA-LDL αποτελεί ένα πιθανό δείκτη για την εμφάνιση οξέων στεφανιαίων συνδρόμων^[369], ενώ οι τίτλοι των αυτοαντισωμάτων κατά MDA-LDL είναι αυξημένοι σε ασθενείς με ασταθή στηθάγχη, αλλά όχι σε ασθενείς με σταθερή στηθάγχη^[448]. Λόγω του ότι οι ασθενείς που συμμετείχαν στο πρώτο μέρος της παρούσας μελέτης ήταν ασθενείς με στηθάγχη προσπάθειας και σταθερή κλινική συμπτωματολογία για

τουλάχιστον έξι μήνες, τα αποτελέσματα της μελέτης μας συμφωνούν με τις παραπάνω παρατηρήσεις. Επιπλέον, τα δεδομένα αυτά υποδηλώνουν ότι η ανοσολογική απόκριση του οργανισμού κατά της MDA-LDL μπορεί να διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην άρση της σταθερότητας και τη ρήξη της αθηρωματικής πλάκας. Φαίνεται όμως ότι διαδραματίζει σαφώς λιγότερο σημαντικό ρόλο στην χρόνια εξέλιξη της αθηρωματικής νόσου. Επιπλέον, σύμφωνα με τα αποτελέσματα της μελέτης, η PAF-AH της LDL, παρά το γεγονός ότι αναστέλλει τον σχηματισμό των έντονα ενεργών αντιγονικών επιτόπων στους οποίους συμμετέχουν τα τμήματα των *sn-2* λιπαρών οξέων των οξειδωμένων φωσφολιπιδίων, ευοδώνει την παραγωγή TBARS (στις μορφές της oxLDL σε σύγκριση με τις μορφές της oxLDL(-)), αφού απελευθερώνει τα τμήματα των *sn-2* λιπαρών οξέων από τα οξειδωμένα φωσφολιπίδια, πολλά από τα οποία τμήματα περιέχουν τελικές ενεργές αλδεϋδες. Έτσι, με αυτό το μηχανισμό, η ενεργότητα της PAF-AH της LDL μπορεί να διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην αστάθεια της αθηρωματικής πλάκας και στην παθογένεια των οξέων στεφανιαίων επεισοδίων.

Μελέτες έδειξαν ότι οι τίτλοι των αυτοαντισωμάτων κατά της oxLDL είναι αυξημένοι σε ασθενείς με οξύ στεφανιαίο σύνδρομο [77,436]. Σε όλες αυτές τις μελέτες, για τον προσδιορισμό του τίτλου των αυτοαντισωμάτων, χρησιμοποιήθηκαν ως αντιγόνα πλήρως oxLDL, δηλαδή LDL οι οποίες υποβλήθηκαν σε οξείδωση για τουλάχιστον 12 ώρες. Τα σωματίδια των πλήρως oxLDL περιέχουν αυξημένα ποσά TBARS. Είναι επίσης εμπλουτισμένα σε οξειδωμένα φωσφολιπίδια, τα οποία δημιουργούνται από την πρώιμη απενεργοποίηση της ενδογενούς PAF-AH λόγω της οξείδωσης [449]. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα των παραπάνω μελετών, η αύξηση του επιπέδου των οξειδωμένων φωσφολιπιδίων του ορού και η συνακόλουθη αύξηση του τίτλου των αυτοαντισωμάτων κατά της πλήρως oxLDL ή της MDA-LDL σχετίζεται σημαντικά με την εμφάνιση οξέων στεφανιαίων συνδρόμων [50,77,362]. Αντίθετα, σε ασθενείς με σταθερή στηθάγχη, τόσο τα επίπεδα στον ορό της MDA-LDL, όσο και οι τίτλοι των αυτοαντισωμάτων κατά της oxLDL είναι οριακά ή και καθόλου αυξημένοι σε σύγκριση με τους υγιείς εθελοντές [287,368,369].

Στην παρούσα μελέτη η διαφορά στους τίτλους των αυτοαντισωμάτων κατά της oxLDL_D μεταξύ των ασθενών με σταθερή στηθάγχη και των υγιών εθελοντών είναι λιγότερο σημαντική όταν συγκριθεί με την αντίστοιχη, όταν ως αντιγόνο χρησιμοποιήθηκε η oxLDL_P. Αυτή η παρατήρηση υποδηλώνει ότι όσο πιο μεγάλη είναι η έκταση της οξείδωσης των LDL, τόσο πιο μικρή είναι η διαφορά στον τίτλο των αυτοαντισωμάτων μεταξύ των υγιών εθελοντών και των ασθενών με σταθερή στηθάγχη. Το συμπέρασμα αυτό ενισχύεται επιπρόσθετα και από το γεγονός ότι στην πολυπαραγοντική λογιστική ανάλυση παλινδρόμησης μεταξύ των τίτλων αυτοαντισωμάτων κατά όλων των μορφών οξειδωμένης LDL, μόνο αυτοί κατά της oxLDL_P αποδείχθηκαν ανεξάρτητοι παράγοντες κινδύνου για την εμφάνιση στεφανιαίας νόσου. Η μορφή αυτή διαφέρει σε σύγκριση με την oxLDL(-)_P, στο ότι είναι εμπλουτισμένη σε lyso-PC και από την oxLDL_D στο ότι περιέχει σε μικρότερο βαθμό

TBARS. Πράγματι, στην oxLDL_P, ο λόγος TBARS / lyso-PC είναι μικρότερος σε σύγκριση με τον αντίστοιχο λόγο στην oxLDL_D.

Έτσι με βάση αυτά τα αποτελέσματα μπορούμε να υποθέσουμε ότι σε αντίθεση με τους ασθενείς με οξύ στεφανιαίο σύνδρομο, οι αντιγονικοί επίτοποι στους οποίους συμμετέχει η lyso-PC μπορεί να είναι οι κύριοι υπεύθυνοι για την αυξημένη ανοσολογική απάντηση η οποία παρατηρείται στους ασθενείς με σταθερή στηθάγχη σε σύγκριση με τους υγιείς εθελοντές. Η μείωση του τίτλου των αυτοαντισωμάτων κατά όλων των μορφών της oxLDL, όταν οι οροί προεπεβάστηκαν με lyso-PC (στα πειράματα αναστολής), η οποία ήταν περισσότερο έντονη στην oxLDL_P, ενισχύει επιπρόσθετα αυτή την άποψη.

Οι παθοφυσιολογικοί μηχανισμοί που συμμετέχουν στα οξεία στεφανιαία σύνδρομα (ΟΣΣ) διαφέρουν σημαντικά συγκριτικά με τη σταθερή στηθάγχη. Είναι γνωστό ότι τα ΟΣΣ σχετίζονται με έντονη φλεγμονώδη διεργασία, η οποία χαρακτηρίζεται από αυξημένους φλεγμονώδεις δείκτες, όπως η hsCRP ^[422,258,186,450]. Τέτοιοι δείκτες αυξάνονται άμεσα μετά από οξύ στεφανιαίο επεισόδιο ^[451,452]. Στην μελέτη μας τα αρχικά επίπεδα της hsCRP μειώθηκαν σημαντικά κατά τη διάρκεια της παρακολούθησης σε όλους τους ασθενείς της μελέτης, παρότι στους ασθενείς που έπαιρναν ατορβαστατίνη η μείωση ήταν μεγαλύτερη, καθώς είναι γνωστό ότι η χορήγηση στατινών σχετίζεται με τη μείωση των επιπέδων της hsCRP ^[168,422, 423, 427].

Όπως ήδη αναφέρθηκε, σε ασθενείς μετά από ΟΣΣ παρατηρείται βραχυπρόθεσμη αύξηση των επιπέδων των αυτοαντισωμάτων κατά πλήρως οξειδωμένης (οξειδωση τουλάχιστον για 12 ώρες) LDL ^[77]. Στην παρούσα μελέτη διερευνήθηκαν για πρώτη φορά τα επίπεδα των αυτοαντισωμάτων κατά των διαφόρων μορφών oxLDL στο ορό ασθενών μετά από ΟΣΣ, καθώς και η επίδραση της χορήγησης ατορβαστατίνης στα επίπεδα αυτά στη διάρκεια του χρόνου.

Πράγματι, οι ασθενείς που δεν έπαιρναν υπολιπιδαιμική αγωγή μετά από ΟΣΣ εμφάνισαν μια σημαντική αύξηση των τίτλων των αυτοαντισωμάτων κατά όλων των μορφών, τόσο της oxLDL, όσο και της oxLDL(-), στον πρώτο μήνα παρακολούθησης. Είναι γνωστό ότι τα οξεία στεφανιαία επεισόδια οφείλονται σε ρήξη μιας αθηρωματικής πλάκας, με αποτέλεσμα την απελευθέρωση στην κυκλοφορία διαφόρων στοιχείων της, όπως σωματιδίων oxLDL με έντονη αντιγονικότητα ^[77,221,453], τα οποία φυσιολογικά βρίσκονται στη κυκλοφορία σε πολύ μικρές ποσότητες ^[454]. Παρόμοια αύξηση παρατηρήθηκε επίσης και σε ασθενείς μετά από διαδερμική αγγειοπλαστική των στεφανιαίων αγγείων, μια διαδικασία που είναι γνωστό ότι σχετίζεται με σύνθλιψη της αθηρωματικής πλάκας ^[362]. Η έντονη αντιγονικότητα των oxLDL, όπως ήδη αναφέρθηκε, οφείλεται τόσο στα οξειδωμένα φωσφολιπίδια ^[82] όσο και στη lyso-PC που αυτά τα σωματίδια περιέχουν ^[48].

Η αρχική αύξηση των τίτλων των αυτοαντισωμάτων κατά των παραπάνω αντιγόνων, η οποία παρατηρείται τόσο στην δική μας μελέτη όσο και σε άλλες μελέτες ^[77,362,438], φαίνεται ότι σχετίζεται με την ανοσολογική αντίδραση του οργανισμού κατά των έντονα αντιγονικών

συστατικών των oxLDL, τα οποία εισέρχονται στην κυκλοφορία από το αρτηριακό τοίχωμα. Δεν είναι γνωστό όμως μέχρι στιγμής αν αυτή η ανοσολογική αντίδραση του οργανισμού δρα ευνοϊκά, απομακρύνοντας από την κυκλοφορία τις oxLDL, ή απλά αποτελεί ένα ακόμα αποτέλεσμα της φλεγμονώδους διεργασίας και του έντονου οξειδωτικού στρες που παρατηρείται μετά από ένα ΟΣΣ. Στη μελέτη μας η έντονη φλεγμονώδης διεργασία υποδηλώνεται από τα αυξημένα επίπεδα hsCRP που εμφανίζουν όλοι οι ασθενείς κατά την έναρξη της μελέτης και τα οποία μειώνονται στη διάρκεια της περιόδου παρακολούθησης και στις δύο ομάδες της μελέτης.

Πρέπει να σημειωθεί όμως ότι τα αυτοαντισώματα κατά των διαφόρων μορφών της oxLDL συμπεριφέρονται διαφορετικά σε σύγκριση με τα αυτοαντισώματα κατά των διαφόρων μορφών oxLDL(-) στους ασθενείς που δεν έπαιρναν υπολιπιδαιμική αγωγή. Πράγματι, τα επίπεδα των αυτοαντισωμάτων κατά των διαφόρων μορφών oxLDL εμφανίζουν μετά την αρχική αύξηση (στον 1^ο μήνα), σημαντική μείωση στους 3 και 6 μήνες παρακολούθησης και επιστρέφουν στις αρχικές τους τιμές. Αντίθετα, οι τίτλοι των αυτοαντισωμάτων κατά των διαφόρων μορφών oxLDL(-) παραμένουν αυξημένοι σε όλη τη διάρκεια της παρακολούθησης, χωρίς να εμφανίζουν τάση να επιστρέψουν στα αρχικά επίπεδα. Καθώς οι μορφές της oxLDL είναι πλούσιες σε lyso-PC (αφού η PAF-AH δεν έχει απενεργοποιηθεί), ενώ οι μορφές της oxLDL(-) είναι πλούσιες σε oxPL, φαίνεται ότι υπάρχει διαφορετική ανοσολογική απόκριση του οργανισμού στα διαφορετικά αυτά αντιγόνα στη διάρκεια του χρόνου μετά από ένα ΟΣΣ. Έτσι, η αντίδραση του οργανισμού στην lyso-PC φαίνεται ότι είναι οξεία και ότι η έντασή της μειώνεται με τον χρόνο. Η διατήρηση όμως αυξημένων επιπέδων αυτοαντισωμάτων κατά των oxPL σε όλη τη διάρκεια της παρακολούθησης, υποδηλώνει μια χρόνια ανοσολογική απόκριση του οργανισμού στα συγκεκριμένα αντιγόνα μετά από ένα ΟΣΣ.

Η χορήγηση ατορβαστατίνης φαίνεται ότι τροποποιεί σημαντικά την παραπάνω ανοσολογική απόκριση του οργανισμού μετά από ένα ΟΣΣ. Πράγματι στους ασθενείς που έπαιρναν ατορβαστατίνη δεν παρατηρήθηκε καμιά μεταβολή των τίτλων των αυτοαντισωμάτων κατά όλων των μορφών τόσο της oxLDL, όσο και της oxLDL(-). Αντίθετα τα επίπεδα των αυτοαντισωμάτων παρέμειναν σταθερά σε σύγκριση με τα αρχικά επίπεδα.

Οι μηχανισμοί με τους οποίους οι στατίνες μπορούν να εμποδίσουν μια τέτοια αύξηση ποικίλουν^[244]. Η μείωση των επιπέδων της LDL χοληστερόλης ορού που τα φάρμακα αυτά επιτυγχάνουν οδηγεί σε μείωση της διαθέσιμης ποσότητας των LDL για οξείδωση και κατά συνέπεια σε μείωση των oxLDL. Σε υποομάδα ασθενών της μελέτης MIRACL, η χορήγηση ατορβαστατίνης μετά από οξύ στεφανιαίο επεισόδιο, είχε ως αποτέλεσμα μείωση των επιπέδων των oxPL του ορού^[436]. Είναι επίσης γνωστό ότι οι στατίνες εμφανίζουν αντιφλεγμονώδεις και ανοσοτροποποιητικές δράσεις^[244,410,435,455]. Πράγματι, η χορήγηση των φαρμάκων αυτών οδηγεί σε τροποποίηση της ενεργοποίησης των κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος, δράση που αφορά τόσο τα Β όσο και τα Τ λεμφοκύτταρα^[244]. Η χορήγηση στατινών στην παρούσα μελέτη συνδυάστηκε με μια σημαντική μείωση των

επιπέδων της oxLDL ορού και της hsCRP. Παρόμοια μείωση έχει παρατηρηθεί και σε άλλες μελέτες ^[435] και σχετίζεται με τη μείωση του οξειδωτικού στρες και της φλεγμονής μετά από ένα ΟΣΣ, μια δράση που έχει αποδοθεί στις στατίνες ^[450]. Επιπρόσθετα, η μη αύξηση των επιπέδων των αυτοαντισωμάτων κατά των διαφόρων μορφών oxLDL, δηλαδή μορφών πλούσιων σε lyso-PC, μπορεί να οφείλεται και στη μείωση της ενεργότητας της PAF-AH, η οποία παρατηρήθηκε σε αυτούς τους ασθενείς και η οποία είναι γνωστό ότι προκαλείται από τις στατίνες ^[456-459]. Πράγματι, μεταβολές της ενεργότητας της PAF-AH στη διάρκεια της παρακολούθησης δεν παρατηρήθηκαν στα άτομα που δεν έπαιρναν υπολιπιδαιμική αγωγή. Ταυτόχρονα, οι παρατηρούμενες μεταβολές μετά από ένα ΟΣΣ σχετίστηκαν θετικά με τις μεταβολές των επιπέδων των παραπάνω αυτοαντισωμάτων. Αποτελέσματα υποομάδων ασθενών πολλών τυχαιοποιημένων μελετών έδειξαν ότι τα επίπεδα της PAF-AH αποτελούν ανεξάρτητο προγνωστικό παράγοντα κινδύνου για την εμφάνιση στεφανιαίας νόσου ^[170-180]. Όμως η μείωση των επιπέδων αυτών με τη χορήγηση στατινών δεν έχει ακόμη συνδεθεί με ευνοϊκά κλινικά ή παθοφυσιολογικά αποτελέσματα ^[458]. Η παρούσα μελέτη υποδεικνύει για πρώτη φορά ότι η μείωση της ενεργότητας της PAF-AH από την ατορβαστατίνη μπορεί να σχετίζεται με τη μείωση της αντιγονικότητας της oxLDL, η οποία οφείλεται στην lyso-PC.

Συμπερασματικά, τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης υποδεικνύουν ότι η ενεργότητα της PAF-AH της LDL, καθώς και ο βαθμός οξείδωσης των LDL διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην τροποποίηση των αντιγονικών επιτόπων που δημιουργούνται κατά τη διάρκεια της οξείδωσης της LDL και συνακόλουθα στην ανοσολογική δραστικότητα της oxLDL. Επιπρόσθετα, η lyso-PC, η οποία παράγεται κυρίως από τη δράση της PAF-AH της LDL, είναι πιθανά η κύρια υπεύθυνη για τον αυξημένο τίτλο αυτοαντισωμάτων κατά oxLDL σε ασθενείς με σταθερή στηθάγχη και αγγειογραφικά σημαντική στεφανιαία νόσο.

Επιπρόσθετα, στους ασθενείς μετά από οξύ στεφανιαίο σύνδρομο, παρατηρείται αύξηση των επιπέδων των αυτοαντισωμάτων κατά όλων των μορφών της oxLDL, πιθανά ως απάντηση του οργανισμού στη ρήξη της αθηρωματικής πλάκας και στην απελευθέρωση στην κυκλοφορία βιοδραστικών και έντονα αντιγονικών συστατικών της oxLDL. Η αύξηση αυτή διατηρείται στο χρόνο για τα αυτοαντισώματα κατά των οξειδωμένων φωσφολιπιδίων, αλλά φαίνεται ότι είναι παροδική για τα αντίστοιχα κατά της lyso-PC. Η χορήγηση ατορβαστατίνης, αναστέλλει αυτή την αύξηση, αφού τροποποιεί την ανοσολογική απάντηση του οργανισμού στην βλάβη του αγγειακού τοιχώματος, πιθανώς διαμέσου της σταθεροποίησης της αθηρωματικής πλάκας και των άλλων πλειοτροπικών δράσεων της. Αυτή η δράση της ατορβαστατίνης είναι πιθανό να προσθέτει έναν επιπρόσθετο μηχανισμό, ο οποίος εξηγεί τα βραχυπρόθεσμα οφέλη από τη χορήγηση της σε ασθενείς μετά από ένα ΟΣΣ.



ΚΕΦΑΛΑΙΟ 11^ο

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Επιγραμματικά, η παρούσα μελέτη έδειξε ότι :

- ↓ Αυτοαντισώματα κατά διαφόρων μορφών oxLDL ανιχνεύονται τόσο σε ασθενείς με στεφανιαία νόσο όσο και υγιείς εθελοντές.
- ↓ Τα αυτοαντισώματα αυτά στους ασθενείς με στεφανιαία νόσο καθορίζονται κυρίως από την ενεργότητα της PAF-AH των LDL, καθώς επίσης και από τον βαθμό της οξειδωσης των LDL, αφού αυτές οι δύο παράμετροι διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην τροποποίηση των αντιγονικών επιτόπων, οι οποίοι δημιουργούνται στο σωματίδιο των LDL κατά την οξειδωσή τους και συνακόλουθα στις ανοσολογικές δράσεις των oxLDL.
- ↓ Οι τίτλοι αυτοαντισωμάτων τα οποία ανιχνεύθηκαν τόσο στους υγιείς εθελοντές όσο και στους ασθενείς με σταθερή στηθάγχη κατά των διαφόρων μορφών oxLDL(-) ήταν υψηλότερα, όταν συγκρίθηκαν με τους αντίστοιχους τίτλους κατά των αντίστοιχων μορφών της oxLDL. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει ότι τα τμήματα των *sn-2* λιπαρών οξέων τα οποία παραμένουν συνδεδεμένα μέσω εστερικών δεσμών στην φωσφατιδυλοχολίνη μπορούν να σχηματίσουν περισσότερο ενεργούς αντιγονικούς επιτόπους στο σωματίδιο της oxLDL σε σύγκριση με τους αντιγονικούς επιτόπους που σχηματίζονται παρουσία της lyso-PC και των αλδευδών. Ένα τέτοιο συμπέρασμα υποδηλώνει ότι η PAF-AH της LDL αποτρέπει το σχηματισμό τέτοιων έντονα δραστικών αντιγονικών επιτόπων, απελευθερώνοντας τα *sn-2* τμήματα των λιπαρών οξέων από τα οξειδωμένα φωσφολιπίδια.
- ↓ Επιπρόσθετα η lyso-PC η οποία παράγεται κυρίως από τη δράση της PAF-AH της LDL, μπορεί να είναι ο κύριος αντιγονικός επίτοπος για τους αυξημένους τίτλους αυτοαντισωμάτων κατά της oxLDL στους ασθενείς με σταθερή στηθάγχη.
- ↓ Από το σύνολο των αυτοαντισωμάτων κατά διαφόρων μορφών της oxLDL, μόνο αυτοί κατά της oxLDL_p αποτελούν ανεξάρτητους παράγοντες κινδύνου για την εμφάνιση στεφανιαίας νόσου.
- ↓ Οι ασθενείς μετά από οξύ στεφανιαίο σύνδρομο εμφανίζουν αύξηση των τίτλων των αυτοαντισωμάτων κατά όλων των μορφών oxLDL, η οποία πιθανά σχετίζεται με την ρήξη της αθηρωματικής πλάκας και την απελευθέρωση στην κυκλοφορία έντονα αντιγονικών οξειδωμένων φωσφολιπιδίων και lyso-pC τα οποία βρίσκονται στο εσωτερικό των αθηρωματικών πλακών.

- ✦ Οι αυξήσεις αυτές διατηρούνται στο χρόνο όσον αφορά τα αυτοαντισώματα κατά των μορφών oxLDL(-), τα οποία είναι πλούσια σε oxPL, αλλά εξαλείφονται μετά τον πρώτο μήνα από το οξύ στεφανιαίο επεισόδιο, όσον αφορά τα αυτοαντισώματα κατά των μορφών oxLDL, τα οποία είναι πλούσια σε lyso-PC.
- ✦ Η χορήγηση ατορβαστατίνης μετά από ένα οξύ στεφανιαίο επεισόδιο τροποποιεί σημαντικά την προαναφερόμενη ανοσολογική αντίδραση του οργανισμού, καθώς στους ασθενείς στους οποίους χορηγήθηκε ατορβαστατίνη μετά από οξύ στεφανιαίο επεισόδιο δεν παρατηρήθηκε καμιά μεταβολή στους τίτλους των αυτοαντισωμάτων κατά όλων των μορφών oxLDL στη διάρκεια της περιόδου παρακολούθησης.
- ✦ Η παραπάνω δράση της ατορβαστατίνης πιθανά οφείλεται στις διάφορες πλειοτροπικές δράσεις της και συγκεκριμένα στις αντιφλεγμονώδεις και ανοσοτροποποιητικές της, καθώς επίσης και σε δράσεις που σχετίζονται με τη σταθεροποίηση της αθηρωματικής πλάκας.
- ✦ Τέλος, η μείωση των τίτλων των αυτοαντισωμάτων κατά των μορφών oxLDL (πλούσιων σε lyso-PC) πιθανά οφείλεται επιπρόσθετα στη μείωση της ενεργότητας της PAF-AH που παρατηρείται μετά τη χορήγηση της ατορβαστατίνης.



ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η ΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΣΤΑΤΙΝΩΝ ΣΤΗΝ ΑΘΗΡΩΜΑΤΩΣΗ

Α.Ι.ΠΑΠΑΘΑΝΑΣΙΟΥ

Η οξειδωμένη LDL χοληστερόλη (oxLDL) διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην παθογένεια της αθηροσκλήρωσης, αφού επηρεάζει τη λειτουργία των κυττάρων του αρτηριακού τοιχώματος. Κατά τη διάρκεια της οξείδωσης της LDL, τόσο το λιπιδικό περιεχόμενο, όσο και η απολιποπρωτεΐνη Β-100 (apoB-100), υποβάλλονται σε πλήθος αλλαγών διαμέσου αντιδράσεων για τις οποίες είναι απαραίτητη η παρουσία ελευθέρων ριζών, καθώς και τροποποιήσεις, που οφείλονται στα νεοσχηματιθέντα ενεργά παράγωγα που σχηματίζονται στο σωματίδιο της oxLDL.

Κατά τη διάρκεια των παραπάνω αλλαγών, τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα, τα οποία συνδέονται με φωσφατιδυλοχολίνη (PC) στην *sn-2* θέση με εστερικό δεσμό, μετατρέπονται στα αντίστοιχα υπεροξειδία, τα οποία στη συνέχεια διασπώνται, παρουσία μεταλλικών ιόντων. Αποτέλεσμα αυτών είναι ο σχηματισμός βιολογικά ενεργών οξειδωμένων φωσφολιπιδίων (oxPL) και αλδεϋδών, όπως η μηλονική διαλδεϋδη (MDA) και η 4-υδροξυνοενάλη (4-HNE). Τα προϊόντα αυτά είναι υπεύθυνα για πολλές από τις βιολογικές δράσεις της oxLDL, συμπεριλαμβανομένης και της αντιγονικότητάς της. Μια από τις σημαντικότερες διεργασίες που λαμβάνει χώρα κατά τη διάρκεια της οξείδωσης της LDL, είναι η υδρόλυση της περιεχόμενης PC και η παραγωγή λυσοφωσφατιδυλοχολίνης (lyso-PC). Η αντίδραση αυτή καταλύεται από το ένζυμο ακετυλοϋδρολάση του παράγοντα ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων (PAF-AH), που είναι συνδεδεμένο με την LDL. Η PAF-AH εμφανίζει ειδικότητα στα φωσφολιπίδια που περιέχουν μικρή αλυσίδα στην *sn-2* θέση, όπως ο PAF και ορισμένα oxPL. Όμως καθώς η οξείδωση των LDL προχωρά, η ενεργότητα του ενζύμου μειώνεται, έτσι ώστε ο βαθμός της οξείδωσης της LDL να επηρεάζει σημαντικά την ενεργότητα του ενζύμου και επομένως το ποσοστό σχηματισμού των oxPL σε lyso-PC.

Προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει ότι η oxLDL προάγει την παραγωγή αυτοαντισωμάτων, τα οποία έχουν ανιχνευθεί στον ορό τόσο ασθενών, όσο και υγιών εθελοντών. Παράλληλα, αυτοαντισώματα κατά της oxLDL έχουν ανιχνευθεί στα σημεία αθηρωματικών βλαβών και διάφορες μελέτες έχουν δείξει θετική συσχέτιση μεταξύ του βαθμού εξέλιξης της αθηρωμάτωσης και των τίτλων αυτών των αυτοαντισωμάτων. Ειδικότερα, αυτοαντισώματα κατά οξειδωμένης LDL ή/και MDA-LDL έχουν ανιχνευθεί σε ασθενείς με στεφανιαία νόσο. Τέτοιοι ασθενείς εμφανίζουν υψηλότερους τίτλους αυτοαντισωμάτων σε σύγκριση με υγιείς εθελοντές. Μελέτες υποδεικνύουν ότι αυτοί οι τίτλοι μπορεί να έχουν τόσο διαγνωστικό όσο και προγνωστικό ρόλο σε αυτούς τους ασθενείς.

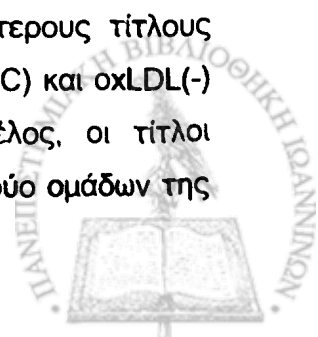
Στην αντιγονικότητα της oxLDL σημαντικό ρόλο διαδραματίζουν τόσο τα oxPL, αφού συμμετέχουν στο σχηματισμό διαφόρων αντιγονικών επιτόπων στο σωματίδιο της oxLDL, όσο και η lyso-PC, η οποία φαίνεται ότι αλληλεπιδρά με το πρωτεϊνικό περιεχόμενο της oxLDL. Αντισώματα κατά lyso-PC έχουν ανιχνευθεί τόσο σε υγιείς εθελοντές όσο και σε ασθενείς με οριακή υπέρταση.

Καθώς η ενεργότητα της PAF-AH είναι ο κύριος παράγοντας που καθορίζει τα επίπεδα των oxPL και της lyso-PC κατά τη διάρκεια της οξειδωσης των LDL, το ένζυμο αυτό μπορεί να επηρεάζει το είδος των αντιγονικών επιτόπων, καθώς και τους τίτλους των αυτοαντισωμάτων κατά της oxLDL.

Έτσι, σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν να εκτιμηθούν οι τίτλοι των αυτοαντισωμάτων κατά της oxLDL σε σύγκριση με το βαθμό της οξειδωσης και με την ενεργότητα της PAF-AH, σε ασθενείς με σταθερή στηθάγχη και σε υγιείς εθελοντές, σε μια προσπάθεια να διερευνηθεί ο άγνωστος μέχρι σήμερα ρόλος της PAF-AH στην αντιγονικότητα της oxLDL. Στην συνέχεια μελετήθηκαν οι τίτλοι αυτοαντισωμάτων κατά των συγκεκριμένων μορφών oxLDL, δηλαδή μορφών πλούσιων σε oxPL ή/και lyso-PC σε ασθενείς με οξύ στεφανιαίο επεισόδιο και η συμπεριφορά τους στη διάρκεια του χρόνου μετά το στεφανιαίο επεισόδιο, καθώς και η επίδραση της χορήγησης ατορβαστατίνης στις παραπάνω μεταβολές.

Αρχικά εκτιμήθηκαν οι τίτλοι των αυτοαντισωμάτων κατά της oxLDL σε 65 ασθενείς με σταθερή στηθάγχη και σταθερή κλινική συμπτωματολογία για τουλάχιστον 6 μήνες, οι οποίοι είχαν δοκιμασία κόπωσης θετική για μυοκαρδιακή ισχαιμία και 47 υγιείς εθελοντές, της ίδιας ηλικίας και φύλου. Παρασκευάστηκαν διάφορες μορφές οξειδωμένης LDL παρουσία ιόντων χαλκού. Οι μορφές αυτές απομονώθηκαν στο τέλος της λανθάνουσας, της εκθετικής φάσης και της φάσης αποικοδόμησης της οξειδωσης (η oxLDL_L, oxLDL_P και oxLDL_D αντίστοιχα). Ομοίως αντίστοιχες μορφές οξειδωμένης LDL παρασκευάστηκαν, αφού πρώτα απενεργοποιήθηκε η ενδογενής PAF-AH (oxLDL(-)). Τέλος, ως αντιγόνο χρησιμοποιήθηκε και LDL τροποποιημένη με MDA (MDA-LDL).

Και οι δύο ομάδες της μελέτης εμφάνισαν αυξημένους τίτλους αυτοαντισωμάτων κατά όλων των μορφών oxLDL(-) σε σύγκριση με τους αντίστοιχους κατά oxLDL. Ταυτόχρονα και στις δύο ομάδες της μελέτης οι τίτλοι των αυτοαντισωμάτων ήταν υψηλότεροι όταν ως αντιγόνα χρησιμοποιήθηκαν οι oxLDL_P και οι oxLDL_D ή οι αντίστοιχες μορφές oxLDL(-) σε σύγκριση με τους αντίστοιχους τίτλους όταν ως αντιγόνα χρησιμοποιήθηκαν οι oxLDL_L και oxLDL(-)_L αντίστοιχα. Οι ασθενείς με στεφανιαία νόσο εμφάνιζαν υψηλότερους τίτλους αυτοαντισωμάτων κατά όλων των μορφών oxLDL (εμπλουτισμένων σε lyso-PC) και oxLDL(-) (εμπλουτισμένων σε oxPL) σε σύγκριση με τους υγιείς εθελοντές. Τέλος, οι τίτλοι αυτοαντισωμάτων κατά της MDA-LDL δεν διέφεραν σημαντικά μεταξύ των δύο ομάδων της μελέτης.



Η πολυπαραγοντική λογιστική ανάλυση παλινδρόμησης ανέδειξε ότι μεταξύ των διαφόρων τίτλων αυτοαντισωμάτων, μόνο αυτοί κατά της oxLDL_p συσχετίζονταν με αυξημένο κίνδυνο για την εμφάνιση στεφανιαίας νόσου.

Στη συνέχεια, μελετήθηκαν οι μεταβολές του τίτλου των αυτοαντισωμάτων κατά των διαφόρων μορφών oxLDL ασθενείς μετά από οξύ στεφανιαίο σύνδρομο (ΟΣΣ), καθώς και η επίδραση της χορήγησης ατορβαστατίνης στα παραπάνω επίπεδα. Για τον σκοπό αυτό μελετήθηκαν 55 ασθενείς με επιβεβαιωμένο ΟΣΣ και οι οποίοι χωρίστηκαν σε δύο ομάδες ανάλογα με το αν έπαιρναν ατορβαστατίνη ή δεν έπαιρναν καθόλου υπολιπιδαιμική αγωγή κατά τη διάρκεια παρακολούθησης. Στους ασθενείς που δεν έπαιρναν υπολιπιδαιμική αγωγή, παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση των επιπέδων των αυτοαντισωμάτων κατά όλων των μορφών oxLDL τον πρώτο μήνα παρακολούθησης. Τα επίπεδα των αυτοαντισωμάτων κατά των μορφών oxLDL εμφανίζουν, μετά την αρχική (στον 1^ο μήνα) αύξηση, σημαντική μείωση στους 3 και 6 μήνες, επιστρέφοντας στα επίπεδα κατά την έναρξη της μελέτης. Αντίθετα, οι τίτλοι των αυτοαντισωμάτων κατά των διαφόρων μορφών oxLDL(-) παραμένουν σε αυξημένα επίπεδα σε όλη τη διάρκεια της παρακολούθησης. Καθώς οι μορφές της oxLDL είναι πλούσιες σε lyso-PC (αφού η PAF-AH δεν έχει απενεργοποιηθεί), ενώ αντίθετα οι μορφές της oxLDL(-) είναι πλούσιες σε oxPL, φαίνεται ότι υπάρχει διαφορετική ανοσολογική απόκριση του οργανισμού στα διαφορετικά αυτά αντιγόνα στη διάρκεια του χρόνου μετά από ΟΣΣ. Έτσι, η αντίδραση του οργανισμού στην lyso-PC φαίνεται να είναι οξεία και η έντασή της να μειώνεται με το χρόνο, ενώ η διατήρηση αυξημένων επιπέδων αυτοαντισωμάτων κατά των oxPL σε όλη τη διάρκεια της παρακολούθησης, υποδηλώνει μια χρόνια ανοσολογική απόκριση του οργανισμού στα συγκεκριμένα αντιγόνα μετά από ΟΣΣ.

Η χορήγηση ατορβαστατίνης φαίνεται ότι τροποποιεί σημαντικά την παραπάνω ανοσολογική απόκριση του οργανισμού. Πράγματι, στους ασθενείς οι οποίοι έπαιρναν ατορβαστατίνη δεν παρατηρήθηκε καμιά μεταβολή των τίτλων των αυτοαντισωμάτων κατά όλων των μορφών τόσο της oxLDL, όσο και της oxLDL(-). Αντίθετα, τα επίπεδα των αυτοαντισωμάτων παρέμειναν σταθερά σε όλη τη διάρκεια της παρακολούθησης. Η δράση αυτή της ατορβαστατίνης πιθανά οφείλεται στις αντιφλεγμονώδεις και ανοσοτροποποιητικές δράσεις της. Επιπλέον, η δράση αυτή μπορεί να οφείλεται και στη μείωση της ενεργότητας της PAF-AH που είναι γνωστό ότι προκαλεί η ατορβαστατίνη.

Συμπερασματικά, τόσο η ενεργότητα της PAF-AH της LDL, όσο και ο βαθμός οξειδωσης της LDL διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην αντιγονικότητα της oxLDL. Η lyso-PC, ένα από τα κύρια συστατικά της oxLDL, μπορεί να είναι η κύρια υπεύθυνη για τους αυξημένους τίτλους αυτοαντισωμάτων σε ασθενείς με στεφανιαία νόσο και ειδικότερα σε ασθενείς με σταθερή στηθάγχη σε σύγκριση με τους υγιείς εθελοντές. Επιπρόσθετα, ασθενείς μετά από οξύ στεφανιαίο επεισόδιο εμφανίζουν αύξηση του τίτλου των αυτοαντισωμάτων κατά των διαφόρων μορφών oxLDL. Η αύξηση αυτή είναι παροδική για τα αυτοαντισώματα κατά των διαφόρων μορφών oxLDL, ενώ διατηρείται στη διάρκεια του

χρόνου για τα αντίστοιχα κατά των μορφών oxLDL(-). Η χορήγηση ατορβαστατίνης αναστέλλει την αύξηση αυτών των επιπέδων, ένα φαινόμενο που μπορεί να χαρακτηριστεί ως μια ακόμα πλειοτροπική δράση της συγκεκριμένης στατίνης.



ABSTRACT

Statins effect in atheromatosis

A.I.Papathanasiou

Oxidized low-density lipoprotein (oxLDL) plays an important role in arteriosclerosis, influencing the function of the cells in the arterial wall. During LDL oxidation both the lipids and apolipoprotein B-100 (apoB) undergo a variety of chemical changes via radical-mediated reactions as well as modifications by chemically active products formed on oxLDL particles. Such alterations include the transformation of polyunsaturated fatty acyl-groups esterified at the sn-2 position of phosphatidylcholine (PC), into their hydro peroxides, which are then cleaved in the presence of metal ions to form bioactive oxidized phospholipids (oxPL) as well as aldehydes, such as malondialdehyde (MDA) and 4-hydroxynonenal. These products are responsible for many of the biological properties of oxLDL including immunogenicity. One of the important biochemical changes that take place during LDL oxidation is the hydrolysis of its PC content and the production of lysophosphatidylcholine (lyso-PC), a reaction catalyzed by the enzyme LDL-associated platelet-activating factor acetylhydrolase (PAF-acetylhydrolase, PAF-AH). PAF-AH preferentially hydrolyses phospholipids containing a short acyl group at the sn-2 position, such as platelet-activating factor and oxPL. During LDL oxidation the PAF-AH activity is progressively decreased, thus the extent of LDL oxidation significantly influences the enzyme activity and consequently the rate of oxPL transformation into lyso-PC.

Many studies have shown that oxLDL is immunogenic, since autoantibodies against oxLDL have been detected in human plasma under various disease conditions, as well as in healthy individuals. Furthermore, autoantibodies against oxLDL are present in atherosclerotic lesions and several studies have demonstrated a positive association between the degree of atherosclerosis and antibody levels to oxLDL. More specifically, autoantibodies to oxLDL and/or LDL modified with malondialdehyde (MDA-LDL) are present in the sera of patients with coronary artery disease (CAD). CAD patients exhibit higher autoantibody titers to oxLDL or MDA-LDL as compared to normal subjects, and several studies suggest that these titers may have a diagnostic and/or prognostic value for CAD.

OxPL formed during LDL oxidation play important roles in the antigenicity of oxLDL participating in the formation of various epitopes. Indeed there are a variety of autoantibodies to oxidation-specific epitopes of oxLDL in animals and humans. Except for oxPL, lyso-PC is also involved in the antigenicity of oxLDL, possibly by forming immunogenic complexes with the oxLDL protein moiety. Antibodies against lyso-PC are present in serum of healthy individuals as well as in patients with borderline hypertension.

Since the LDL-associated PAF-AH activity is the main factor that significantly influences the levels of oxPL and lyso-PC during LDL oxidation, this enzyme could influence the types of epitopes formed on LDL during oxidation as well as the levels of autoantibody titers against oxLDL.

Therefore, the aim of the present study was to evaluate the autoantibody titers against oxLDL in relation to the extent of LDL oxidation and to the activity of the LDL-associated PAF-AH, in CAD patients and in healthy volunteers in an effort to investigate a possible role of this enzyme in the immunogenicity of oxLDL.

Sixty-five patients with stable angina and 47 age- and sex- matched healthy volunteers, participated in the study. Various types of copper-oxidized LDL, prepared at the end of the lag, propagation or decomposition phase (oxLDL_L, oxLDL_P and oxLDL_D, respectively) and malondialdehyde-modified LDL (MDA-LDL) were also used as antigens. Similar types of oxidized LDL were prepared after previous inactivation of endogenous PAF-AH [oxLDL(-)]. Both groups exhibited higher autoantibody titers against each type of oxLDL(-) compared to the respective type of oxLDL. In both groups autoantibody titers were higher when the oxLDL_P and oxLDL_D or the respective types oxLDL(-) were used as antigens compared to oxLDL_L or to oxLDL(-)_L, respectively. Patients had significantly higher titers against all types of oxLDL (enriched in lyso-PC) and oxLDL(-) (enriched in intact oxPL) compared to controls. Autoantibody titers against MDA-LDL did not differ between CAD patients and controls. Multivariate logistic regression analysis showed that among the autoantibody titers measured only those towards oxLDL_P are associated with a significantly higher risk for coronary artery disease.

Then, we studied the behaviour of autoantibody titers against various forms of oxLDL in patients with an acute coronary syndrome (ACS). Moreover, we studied the effect of early atorvastatin admission after the ACS. Fifty-five patients with certain ACS participated in the study. Patients were divided into two groups; patients who received atorvastatin (34 patients) and patients who did not receive any hypolipidemic therapy (21 patients) throughout the entire 6-month follow up period.

In patients who did not receive any hypolipidemic therapy, autoantibody titers against all forms of either oxLDL or oxLDL(-) were elevated at 1 month follow up compared to baseline. In these patients autoantibody titers against oxLDL were significantly reduced in the third and sixth month, whereas the respective titers against oxLDL(-) remained elevated throughout the entire follow up period. As mentioned above, oxLDL forms are enriched in lyso-PC, while oxLDL(-) (forms of oxLDL prepared after previous inactivation of endogenous PAF-AH) are enriched in intact oxPL. According to our results there is an elevation of circulating oxLDL markers that reflects the presence of ACS, implying immune awareness to newly exposed oxidation-specific epitopes and possible release of oxLDL in the circulation. Moreover, it is

possible that, after an ACS, this immune response to lyso-PC is short term. On the other hand, there seems to be a chronic immune response against oxPL.

Atorvastatin administration seems to play an important role in this immune response to ACS. Interestingly, there were no differences in patients receiving atorvastatin for autoantibody titers against all forms of oxLDL during the follow-up period, compared to the baseline values. This effect of atorvastatin on autoantibody titers against various forms of oxLDL is presented for the first time and it is possible through mechanisms involving plaque stabilization and other antiinflammatory actions. These results may explain in part the benefits of early admission of atorvastatin in patients with ACS.

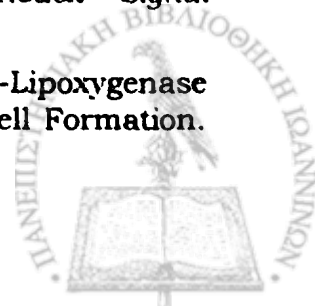
Conclusions: The LDL-associated PAF-AH activity as well as the extent of LDL oxidation may play important roles in the immunogenicity of oxidized LDL. Lysophosphatidylcholine, a major component of oxLDLP, could be mainly responsible for the elevated autoantibody titers against oxLDL in patients with stable angina. In patients after an ACS there is an increase in the autoantibody titers against various forms of oxLDL. These increases are suppressed by atorvastatin admission early after the onset of the ACS.



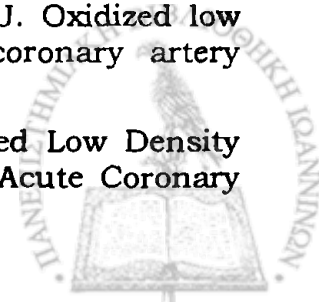
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Kane J. Structure and function of the plasma lipoproteins and their receptors. In: Atherosclerosis and coronary artery disease. Philadelphia: Lippincott - Raven Publishers; 1996.
2. Packard C. Plasma lipid and lipoprotein metabolism in the 1990's - what we know and what we need to know.
3. Stryer L. Biosynthesis of membrane lipids and steroid hormones. In: Biochemistry. San Francisco: Freeman and Company, 3rd Eds; 1988:560-68.
4. Eckel R. lipoprotein lipase: a multifunctional enzyme relevant to common metabolic diseases. *N Engl J Med* 1989;**320**:1060-8.
5. Itabe H. Oxidized phospholipids as a new landmark in atherosclerosis. *Prog Lipid Res* 1998;**37**(2/3):181-207.
6. Mertens A, Holvoet P. Oxidized LDL and HDL: antagonists in atherosclerosis. *FASEB J* 2001;**15**:2073-84.
7. Ramos P, Giese S, Schuster P, Esterbauer H. Effect of temperature and phase transition on oxidation resistance of low density lipoprotein. *J Lipid Res* 1995;**36**:2113-28.
8. Esterbauer H, Gebicki J, Puhl H, Jurgens G. The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL. *Free Radical Biology & Medicine* 1992;**13**:341-90.
9. Choy P, Siow Y, Mymin D, Karmin O. Lipids and atherosclerosis. *Biochem Cell Biol* 2004;**82**:212-24.
10. Havel R, Hamilton R. Hepatic catabolism of remnant lipoproteins: where the action is. *Atheroscler Thromb Vasc Biol* 2004;**24**:213-5.
11. Steinberg D. Oxidative modification of LDL and atherogenesis. *Circulation* 1997;**95**(4):1062-71.
12. Soccio R, Breslow J. Intracellular cholesterol transport. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004;**24**:1150-60.
13. Dejager S, Bruckert E, Chapman MJ. Dense low density lipoprotein subspecies with diminished oxidative resistance predominate in combined hyperlipidemia. *J Lipid Res* 1993;**34**:295-308.
14. Austin AM, King MC, Vranizan KM, Krauss RM. Atherogenic lipoprotein phenotype. A proposed genetic marker for coronary heart disease. *Circulation* 1990;**82**:495-506.
15. Carmena R, Duriez P, Fruchart J. Atherogenic Lipoprotein particles in atherosclerosis. *Circulation* 2004;**109**[suppl III]:III2-III-7.
16. Hamilton C. Low-density lipoprotein and oxidised low-density lipoprotein: their role in the development of atherosclerosis. *Pharmacol Ther* 1997;**74**(1):55-72.
17. Lamarche B, Pierre AC, Ruel IL, Cantin B, Dagenais GR, Despres JP. A prospective, population-based study of low density lipoprotein particle size as a risk factor for ischemic heart disease in men. *Can J Cardiol* 2001;**17**:859-65.
18. Stampfer MJ, Krauss RM, Ma J, et al. A prospective study of triglyceride level, low density lipoprotein particle diameter and risk of myocardial infarction. *JAMA* 1996;**276**:882-8.

19. Tall AR. Plasma high density lipoproteins. Metabolism and relation to atherogenesis. *J Clin Inv* 1990;**86**:379-84.
20. Mertens A HP. Oxidized LDL and HDL: antagonists in atherothrombosis. *FASEB J* 2001;**15**:2073-84.
21. Williams K, Tabas I. Lipoprotein retention - and clues for atheroma regression. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005;**25**:1536-40.
22. Herttuala Y. Is oxidized low density lipoprotein present in vivo? *Current Opinion in Lipidology* 1998;**9**:337-44.
23. Berliner JA, Heinecke JW. The role of oxidized lipoproteins in atherogenesis. *Free Rad Biol & Med* 1996;**20**(5):707-27.
24. VanLenten BJ, Prieve J, Navad M, Hama S, Lusis AJ, Forelman AM. Lipid-induced changes in intracellular iron homeostasis in vitro and in vivo. *J Clin Invest* 1995;**95**:2104-10.
25. Yoshida H, Sasaki K, Hirowatari Y, et al. Increased serum iron may contribute to enhanced oxidation of low-density lipoprotein in smokers in part through changes in lipoxygenase and catalase. *Clin Chim Acta* 2004;**345**(1-2):161-70.
26. Brouwers A, Langlois M, Delanghe J, et al. Oxidized low-density lipoprotein, iron stores, and haptoglobin polymorphism. *Atherosclerosis* 2004;**176**(1):189-95.
27. diGiuseppe D, Frosali S, Priora R, et al. The effects of age and hyperhomocysteinemia on the redox forms of plasma thiols. *J Lab Clin Med* 2004;**144**:235-45.
28. Lynch S, Campione C, Moore K. Plasma thiols inhibit hemin-dependent oxidation of human low-density lipoprotein. *Biochimica et Biophysica Acta* 2000;**1485**:11-22.
29. Andersson A, Hultberg B, Lindgren A. Redox status of plasma homocysteine and other plasma thiols in stroke patients. *Atherosclerosis* 2000;**151**:535-9.
30. Nakano E, Williamson M, Williams N, Powers H. Copper-mediated LDL oxidation by homocysteine and related compounds depends largely on copper ligation. *Biochimica et Biophysica Acta* 2004;**1688**:33-41.
31. Harats D, Shaish A, George J, et al. Overexpression of 15-lipoxygenase in vascular endothelium accelerates early atherosclerosis in LDL receptor-deficient mice. *Atheroscler Thromb Vasc Biol* 2000;**20**:2100-5.
32. Li S, Dwarakanath RS, Cai Q, Lanting L, Natarajan R. Effects of silencing leukocyte-type 12/15-lipoxygenase using short interfering RNAs. *Lipid Res* 2005;**46**(2):220-9.
33. Knutsen-Rydberg E, Krettek A, Ullstrom C, et al. Hypoxia Increases LDL Oxidation and Expression of 15-Lipoxygenase-2 in Human Macrophages. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004;**25**:2040-5.
34. Takahashi Y, Zhu H, Yoshimoto T. Essential Roles of Lipoxygenases in LDL Oxidation and Development of Atherosclerosis. *Antioxid Redox Signal* 2005;**7**:425-31.
35. Belkner J, Chaitidis P, Stender H, et al. Expression of 12/15-Lipoxygenase Attenuates Intracellular Lipid Deposition During In Vitro Foam Cell Formation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005;**25**:1-6.



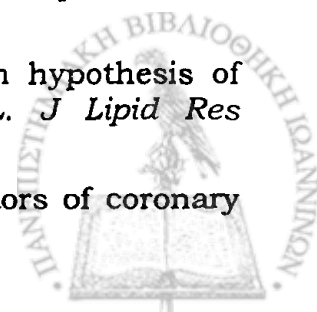
36. Carr A, McCall M, Frei B. Oxidation of LDL by myeloperoxidase-generated reactive nitrogen species: reaction pathways and antioxidant protection. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;**20**:1716-23.
37. Sugiyama S, Okada Y, Sukhova GK, Virmani R, Heinecke JW, Libby P. Macrophage myeloperoxidase regulation by granulocyte macrophage colony stimulating factor in human atherosclerosis and implications in acute coronary syndromes. *Am J Pathol* 2001;**158**:879-91.
38. Podrez E, Schmitt D, Hoff H, Hazen S. Myeloperoxidase - generated reactive nitrogen species convert LDL into an atherogenic form in vitro. *J Clin Inv* 1999;**103**:1547-60.
39. Heller J, Crowley J, Hazen S, et al. p-Hydroxyphenylacetaldehyde, an aldehyde generated by myeloperoxidase, modifies phospholipid amino groups of low density lipoprotein in human atherosclerotic intima. *J Biol Chem* 2000;**275**:9957-62.
40. Zouaoui Boudjeltia K, Moguilevsky N, Legssyer I, et al. Oxidation of low density lipoproteins by myeloperoxidase at the surface of endothelial cells: an additional mechanism to subendothelium oxidation. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;**325**(2):434-8.
41. Malle E, Waeg G, Schreiber R, Grone E, Sattler W, Grone H. Immunohistochemical evidence for the myeloperoxidase/H₂O₂/haline system in human atherosclerotic lesions: colocalization of myeloperoxidase and hypochlorite - modified proteins. *Eur J Biochem* 2000;**267**:4495-503.
42. Stocker R, Huang A, Jeranian E, et al. Hypochlorous Acid Impairs Endothelium-Derived Nitric Oxide Bioactivity Through a Superoxide-Dependent Mechanism. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004;**24**:2028-33.
43. Rikitake Y, Hirata K, Kawashima S, Akita H, Yokoyama M. Inhibitory effect of inducible type nitric oxide synthase on oxidative modification of low density lipoprotein by vascular smooth muscle cells. *Atherosclerosis* 1998;**136**:51-7.
44. Patel R, Levonen A, Crawford J, Darley-Usmar V. Mechanisms of the pro- and anti-oxidant actions of nitric oxide in atherosclerosis. *Cardiovasc Res* 2000;**47**:465-74.
45. Bloodworth A, O'Donnell V, Freeman B. Nitric oxide regulation of free rad. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;**20**:1707-15.
46. Fleming I, Mohamed A, Galle J, et al. Oxidized low-density lipoprotein increases superoxide production by endothelial nitric oxide synthase by inhibiting PKC α . *Cardiovasc Res* 2005;**65**(4):897-906.
47. Schnitzer E, Fainaru M, Lichtenberg D. Oxidation of low density lipoprotein upon sequential exposure to copper ions. *Free Radic Res* 1995;**23**:137-49.
48. Holvoet P, Vanhaecke J, Janssens S, Van-de-Werf F, Collen D. Oxidized LDL and malondialdehyde-modified LDL in patients with acute coronary syndromes and stable angina. *Circulation* 1998;**98**:1487-94.
49. Holvoet P, Stassen J, VanCleemput M, Collen D, Vanhaecke J. Oxidized low density lipoprotein in patients with transplant-associated coronary artery disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998;**18**:100-7.
50. Ehara S, Ueda M, Naruko T, et al. Elevated Levels of Oxidized Low Density Lipoprotein Show a Positive Relationship With the Severity of Acute Coronary Syndromes. *Circulation* 2001;**103**:1955-60.



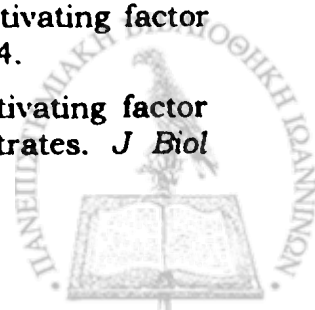
51. Chatterjee S, Berliner JA, Subbanagounder G, Bhunia A. Identification of a biologically active component in minimally oxidized low density lipoprotein (MM-LDL) responsible for aortic smooth muscle cell proliferation. *Glycoconjugate J* 2004;**20**:331-8.
52. Holvoet P. Oxidized LDL and coronary heart disease. *Acta Cardiol* 2004;**59**(5):479-84.
53. Dominguez-Rodriguez A, Abreu-Gonzalez P, Garcia-Gonzalez M, Ferrer-Hita J, Vargas M, Reiter RJ. Elevated levels of oxidized low-density lipoprotein and impaired nocturnal synthesis of melatonin in patients with myocardial infarction. *Atherosclerosis* 2005;**180**(1):101-5.
54. Anselmi M, Garbin U, Agostoni P, et al. Plasma levels of oxidized-low-density lipoproteins are higher in patients with unstable angina and correlated with angiographic coronary complex plaques. *Atherosclerosis* 2005.
55. Prescott SM ZG, Sattforini DM, McIntyre TM. Platelet-activating factor and related lipid mediators. *Annu Rev Biochem* 2000;**69**:419-45.
56. McManus LM PR. PAF, a putative mediator of oral inflammation. *Crit Rev Oral Biol Med* 2000;**11**(2):240-58.
57. Renooij W SR. Biosynthesis of 1-O-alkyl-2-acetyl-sn-glycero-3-phosphocholine (platelet activating factor and a hypotensive lipid) by cholinephosphotransferase in various rat tissues. *Biochim Biophys Acta* 1981;**663**:545-56.
58. Shukla D. Platelet-activating factor receptor and signal transduction mechanisms. *FASEB J* 1992;**6**:2296-301.
59. Imaizumi T SD, Yamada Y, McIntyre TM, Prescott SM. Platelet-activating factor: a mediator for clinicians. *J Intern Med* 1995;**238**:5-20.
60. Beer JH WB, von Felten A. Allergen exposure in acute asthma causes the release of platelet-activating factor (PAF) as demonstrated by the desensitization of platelets to PAF. *Int Arch Allergy Immunol* 1995;**106**:291-6.
61. Bennett SA LL, Birnboim HC. Platelet activating factor, an endogenous mediator of inflammation, induces phenotypic transformation of rat embryo cells. *Carcinogenesis* 1993;**14**:1289-96.
62. Azzuzi B JP, Beneviste P, Thomas Y. Immunoregulatory functions of PAF-acether. IX. Modulation of apoptosis in an immature T-cell line. *Biochem Biophys Res Commun* 1993;**190**:320-4.
63. Tjoelker LW SD. Platelet-activating factor acetylhydrolase in health and disease. *Biochim Biophys Acta* 2000;**1488**:102-23.
64. Marathe GK DS, Harrison KA, Silva AR, Murphy RC, Castro-Faria-Neto H, Prescott SM, Zimmerman GA, McIntyre TM. Inflammatory platelet-activating factor-like phospholipids in oxidized low density lipoproteins are fragmented alkyl phosphatidylcholines. *J Biol Chem* 1999;**274**(40):28395-404.
65. Leitinger N. Oxidized phospholipids as modulators of inflammation in atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol* 2003;**14**:421-30.
66. Horkko S, Bird DA, Miller E, et al. Monoclonal autoantibodies specific for oxidized phospholipids or oxidized phospholipid-protein adducts inhibit macrophage uptake of oxidized low-density lipoproteins. *J Clin Invest* 1999;**103**(1):117-28.



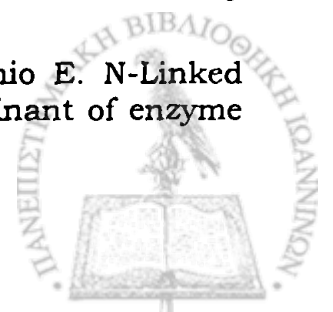
67. Kamido H, Eguchi H, Ikeda H, Sack M. Core aldehydes of alkyl glycerophospholipids in atheroma induce platelet aggregation and inhibit endothelium-dependent arterial relaxation. *J Lipid Res* 2002;**43**:158-66.
68. Subbanagounder G, Wang J, Lee H, Sack M. Epoxyisoprostane and epoxycyclopentenone phospholipids regulate monocyte chemotactic protein-1 and interleukin-8 synthesis: formation of these oxidized phospholipids in response to interleukin-1 β . *J Biol Chem* 2002;**277**:7271-81.
69. Navab M HS, Ready ST, Ng CJ, van Lenten BJ, Laks H, Fogelman AM. Oxidized lipids as mediators of coronary heart disease. *Curr Opin Lipidol* 2002;**13**:363-72.
70. Lee H SW, Tontonoz P, Wang S, Subbanagounder G, Hedrick CC, Hama S, Borromeo C, Evans RM, Berliner JA, Nagy L. Role for Peroxisome Proliferator-Activated Receptor α in Oxidized Phospholipid-Induced Synthesis of Monocyte Chemotactic Protein-1 and Interleukin-8 by Endothelial Cells. *Circ Res* 2000;**87**:516 - 21.
71. Watson AD SG, Welsbie DS, Faull KF, Navab M, Jung ME, Fogelman AM, Berliner JA. Structural identification of a novel pro-inflammatory epoxyisoprostane phospholipid in mildly oxidized low density lipoprotein. *J Biol Chem* 1999;**274**:24787-98.
72. Parhami F, Fang Z, Yang B, Sack M. Stimulation of Gs and inhibition of Gi protein functions by minimally oxidized LDL. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995;**15**:2019-24.
73. Subbanagounder G WA, Berliner JA. Bioactive products of phospholipid oxidation: isolation, identification, measurement and activities. *Free Radical Biology & Medicine* 2000;**28**(12):1751-61.
74. McIntyre TM ZG, Prescott SM. Biologically active oxidized phospholipids. *J Biol Chem* 1999;**274**(36):25189-92.
75. Berliner J LN, Watson A, Huber J, Fogelman A, Navab M. Oxidized lipids in atherogenesis. *Thrombosis and Haemostasis* 1997;**78**(1):195-9.
76. Heery JM KM, Stafforini DM, Jones DA, Zimmerman GA, McIntyre TM, Prescott SM. Oxidatively modified LDL contains phospholipids with platelet-activating factor-like activity and stimulates the growth of smooth muscle cells. *J Clin Invest* 1995;**96**: 2322-30.
77. Tsimikas S, Bergmark C, Beyer R, et al. Temporal increases in plasma markers of oxidized low-density lipoprotein strongly reflect the presence of acute coronary syndromes. *J Am Coll Cardiol* 2003;**41**(3):360-70.
78. Frey B, Haupt R, Alms S, Sack M. Increase in fragmented phosphatidylcholine in blood plasma by oxidative stress. *J Lipid Res* 2000;**41**:1145-53.
79. Tselepis AD, John Chapman M. Inflammation, bioactive lipids and atherosclerosis: potential roles of a lipoprotein-associated phospholipase A2, platelet activating factor-acetylhydrolase. *Atheroscler Suppl* 2002;**3**(4):57-68.
80. Zalewski A, Macphee C. Role of lipoprotein-associated phospholipase A2 in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005;**25**:923-31.
81. Navab M, Ananthramaiah GM, Reddy ST, et al. The oxidation hypothesis of atherogenesis: the role of oxidized phospholipids and HDL. *J Lipid Res* 2004;**45**(6):993-1007.
82. Navab M, Hama SY, Reddy ST, et al. Oxidized lipids as mediators of coronary heart disease. *Curr Opin Lipidol* 2002;**13**(4):363-72.



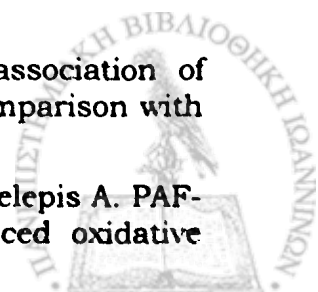
83. Itabe H. Oxidized phospholipids as a new landmark in atherosclerosis. *Prog Lipid Res* 1998;**37**(2/3):181-207.
84. Quinn MT PS, Steinberg D. Lysophosphatidylcholine: A chemotactic factor for human monocytes and its potential role in atherogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988;**85**:2805-9.
85. Kume N CM, Gimbrone MA Jr. Lysophosphatidylcholine, a component of atherogenic lipoproteins, induces mononuclear leukocyte adhesion molecules in cultured human and rabbit arterial endothelial cells. *J Clin Invest* 1992;**90**:1138-44.
86. Silva A, Assis E, Caiado L, Sack M. Monocyte chemoattractant protein-1 and 5-lipoxygenase products recruit leukocytes in response to platelet-activating factor-like lipids in oxidized low-density lipoprotein. *J Immunol* 2002;**168**:4112-20.
87. Shih DM, Xia YR, Wang XP, et al. Combined serum paraoxonase knockout/apolipoprotein E knockout mice exhibit increased lipoprotein oxidation and atherosclerosis. *J Biol Chem* 2000;**275**(23):17527-35.
88. Blank ML LT-C, Fitzgerald V, Snyder F. A specific acetylhydrolase for 1-alkyl-2-acetyl-sn-glycero-3-phosphocholine (a hypotensive and platelet-activating lipid). *J Biol Chem* 1981;**256**:175-8.
89. Blank ML HM, Cress EA, Snyder F. Inactivation of 1-alkyl-2-acetyl-sn-glycero-3-phosphocholine by plasma acetylhydrolase: higher activities in hypertensive rats. *Biochem Biophys Res Commun* 1983;**113**:666-71.
90. Wardlow ML CC, Meng KE, Greene DE, Farr RS. Substrate specificity and partial characterization of the PAF-acetylhydrolase in human serum that rapidly inactivates platelet-activating factor. *J Immunol* 1986;**136**:3441-6.
91. Prichard P. The degradation of platelet-activating factor by high density lipoprotein in rat plasma. *Biochem J* 1987;**246**:791-4.
92. Stafforini DM PS, McIntyre TM. Human platelet-activating factor acetylhydrolase: purification and properties. *J Biol Chem* 1987;**262**:4223-30.
93. Stafforini DM MT, Carter ME, Prescott SM. Human plasma platelet-activating factor acetylhydrolase: association with lipoprotein particles and role in the degradation of platelet-activating factor. *J Biol Chem* 1987;**262**:4215-22.
94. Imaizumi T SD, Yamada Y, Zimmerman GA, McIntyre TM, Prescott SM. The fate of platelet-activating factor: PAF acetylhydrolase from plasma and tissues. In Gross R, editor *Advances in lipobiology Connecticut: JAI Press* 1996;**1**:141-62.
95. Stafforini DM PS, Zimmerman GA, McIntyre TM. Mammalian platelet-activating factor acetylhydrolases. *Biochim Biophys Acta* 1996;**1301**:161-73.
96. Steinbrecher UP PP. Hydrolysis of phosphatidylcholine during LDL oxidation is mediated by platelet-activating acetylhydrolase. *J Lipid Res* 1989;**30**:305-15.
97. Stremmler KE SD, Prescott SM, Zimmerman GA, McIntyre TM. An oxidized derivative of phosphatidylcholine is a substrate for the platelet-activating factor acetylhydrolase from human plasma. *J Biol Chem* 1989;**264**:5331-4.
98. Stremmler KE SD, Prescott SM, McIntyre TM. Human platelet-activating factor acetylhydrolase: oxidatively fragmented phospholipids as substrates. *J Biol Chem* 1991;**266**:11095-103.



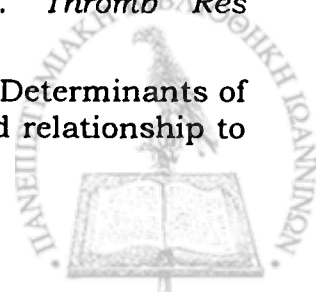
99. Stafforini DM ZG, McIntyre TM, Prescott S. The platelet-activating factor acetylhydrolase from human plasma prevents oxidative modification of low-density lipoprotein. *Trans Assoc Am Physicians* 1992;**105**:44-63.
100. Stafforini DM PS, Zimmerman GA, McIntyre TM. Platelet-activating factor acetylhydrolase activity in human tissues and blood cells. *Lipids* 1991;**26**:979-85.
101. Stafforini DM RE, Prescott SM, McIntyre TM. The platelet-activating factor acetylhydrolase from human erythrocytes: purification and properties. *J Biol Chem* 1993;**268**:3857-65.
102. Arai H, Koizumi H, Aoki J, Inoue K. Platelet activating factor-acetylhydrolase (PAF-AH). *J Biochem* 2002;**131**:635-40.
103. Hattori K AH, Matsuzawa A, Yamamoto K, Tsujimoto M, Aoki J, Hattori M, Arai H, Inoue K. cDNA cloning and expression of intracellular platelet-activating factor (PAF) acetylhydrolase II. *J Biol Chem* 1996;**271**:33032-8.
104. Hattori M AH, Inoue K. Purification and characterization of bovine brain platelet-activating factor acetylhydrolase. *J Biol Chem* 1993;**268**:18748-53.
105. Stafforini DM TL. Human plasma platelet-activating factor acetylhydrolase. *Methods Mol Biol* 1999;**109**:49-58.
106. Karasawa K hA, Satoh N, Inoue K, Setaka M. Plasma platelet activating factor-acetylhydrolase. *Progress in Lipid Research* 2003;**42**:93-114.
107. Tsoukatos D, Liapikos T, Tselepis A, Chapman M, Ninio E. Platelet-activating factor acetylhydrolase and transacetylase activities in human plasma low-density lipoprotein. *Biochem J* 2001;**357**:457-64.
108. Farr R, Cox C, Wardlow M, Jorgensen R. Preliminary studies of an acid-labile factor (ALF) in human sera that inactivates platelet-activating factor (PAF). *Clin Immunol Immunopathol* 1980;**15**:318-30.
109. Tjoelker L, Wilder C, Eberhardt C, et al. Anti-inflammatory properties of a platelet-activating factor acetylhydrolase. *Nature* 1995;**374**:549-53.
110. Tjoelker LW EC, Unger J, Trong HL, Zimmerman GA, McIntyre TM, et al. Plasma platelet -activating factor acetylhydrolase is a secreted phospholipase A2 with a catalytic triad. *J Biol Chem* 1995;**270**:25481-7.
111. Stafforini DM MT, Zimmerman GA, Prescott SM. Platelet-activating-factor acetylhydrolases. *J Biol Chem* 1997;**272**:17895-8.
112. Derewenda ZS DU. The structure and function of platelet-activating factor acetylhydrolases. *Cell Mol Life Sci* 1998;**54**:446-55.
113. Derewenda ZS HY. PAF-acetylhydrolases. *Biochim Biophys Acta* 1999;**1441**:229-36.
114. Tew DG SC, Rice SQJ, Lawrence GMP, Li H, boyd HF, et al. Purification, properties, sequencing, and cloning of a lipoprotein-associated, serine-dependent phospholipase involved in the oxidative modification of low-density lipoprotein. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1996;**16**:591-9.
115. Tselepis AD KS-A, Stengel D, Piedagnel R, Chapman MJ, Ninio E. N-Linked glycosylation of macrophage-derived PAF-AH is a major determinant of enzyme association with plasma HDL. *J Lipid Res* 2001;**42**:1645-54.



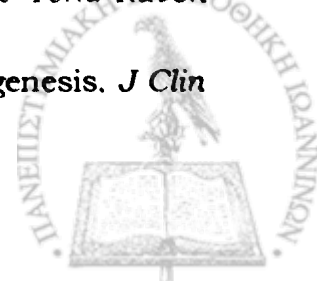
116. Min JII JM, Wilder C, Paul L, Apitz-Castro R, Aspleaf DC, et al. Membrane-bound plasma platelet activating factor acetylhydrolase acts on substrate in the aqueous phase. *Biochem* 1999;**38**:12935-42.
117. Stafforini DM SK, Atkinson DL, Tjoelker LW, Eberhardt C, Yoshida H, Imaizumi T, Takamatsu S, Zimmerman GA, McIntyre TM, Gray PW, Prescott SM. Platelet-activating factor acetylhydrolase deficiency: A missense mutation near the active site of an anti-inflammatory phospholipase. *J Clin Invest* 1996;**97**:2784-91.
118. Miwa M, Miyake T, Yamanaka T, et al. Characterization of serum platelet-activating factor (PAF) acetylhydrolase. Correlation between deficiency of serum PAF acetylhydrolase and respiratory symptoms in asthmatic children. *J Clin Invest* 1988;**82**:1983-91.
119. Balta G, Gurgey A, Kudayarov D, Tunc B, Altay C. Evidence for the existence of the PAF acetylhydrolase mutation (Val279Phe) in non-Japanese populations: a preliminary study in Turkey, Azerbaijan, and Kyrgyzstan. *Thromb Res* 2001;**101**:231-4.
120. Yamada Y, Yokota M. Loss of activity of plasma platelet-activating factor acetylhydrolase due to a novel Gln281-->Arg mutation. *Biochem Biophys Res Commun* 1997;**236**:772-5.
121. Yamada Y, Izawa H, Ichihara S, et al. Prediction of the risk of myocardial infarction from polymorphisms in candidate genes. *N Engl J Med* 2002;**347**:1916-23.
122. Bell R, Collier D, Rice S, et al. Systematic screening of the LDL-A2 gene for polymorphic variants and case-control analysis in schizophrenia. *Biochem Biophys Res Commun* 1997;**241**:630-5.
123. Kruse S, Mao X, Heinzmann A, et al. The Ile198Thr and Ala379Val variants of plasmatic PAF-acetylhydrolase impair catalytical activities and are associated with atopy and asthma. *Am J Hum Genet* 2000;**66**:1522-30.
124. Rubin A, Smith L, Patterson R. The bronchoconstrictor properties of platelet-activating factor in humans. *Am Rev Respir Dis* 1987;**136**:1145-51.
125. Lee C, Sigari F, Segrado T, et al. All ApoB-containing lipoproteins induce monocyte chemotaxis and adhesion when minimally modified. Modulation of lipoprotein bioactivity by platelet-activating factor acetylhydrolase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999;**19**:1437-46.
126. Tselepis A, Dentan C, Karabina S, Chapman M, Ninio E. PAF-degrading acetylhydrolase is preferentially associated with dense LDL and VLDL-1 in human plasma. Catalytic characteristics and relation to the monocyte-derived enzyme. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995;**15**:1764-73.
127. Tjoelker LW SD. Platelet-activating factor acetylhydrolase in health and disease. *Biochim Biophys Acta* 2000;**1488**(102-123).
128. Benitez S, Sanchez-Quesada J, Ribas V, et al. Platelet-activating factor acetylhydrolase is mainly associated with electronegative low-density lipoprotein subfraction. *Circulation* 2003;**108**(92-6).
129. Blencowe C, Hermetter A, Kostner G, Deigner H. Enhanced association of platelet-activating factor acetylhydrolase with lipoprotein (a) in comparison with low density lipoprotein. *J Biol Chem* 1995;**270**:31151-7.
130. Karabina S, Elisaf M, Goudevenos J, Siamopoulos K, Sideris D, Tselepis A. PAF-acetylhydrolase activity of Lp(a) before and during Cu(2+)-induced oxidative modification in vitro. *Atherosclerosis* 1996;**125**:121-34.



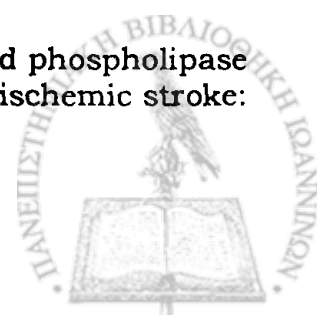
131. Asano K, Okamoto S, Fukunaga K, et al. Cellular source(s) of platelet-activating factor acetylhydrolase activity in plasma. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;**261**:511-4.
132. Narahara H FR, Johnston JM. Secretion of platelet-activating factor acetylhydrolase following phorbol-ester-stimulated differentiation of HL-60 cells. *Arch Biochem Biophys* 1993;**301**:275-81.
133. Lee T-C FV, Chatterjee R, Malone B, Snyder F. Differentiation induced increase of platelet-activating factor acetylhydrolase in HL-60 cells. *J Lipid Mediat Cell Signal* 1994;**9**:267-83.
134. Stafforini DM MT, Prescott SM. Platelet-activating factor acetylhydrolase from human plasma. *Methods Enzymol* 1990;**187**:344-57.
135. Narahara H JJ. Effects of endotoxins and cytokines on the secretion of platelet-activating factor acetylhydrolase by human decidual macrophages. *Am j Obstetr Gynecol* 1993;**169**:531-7.
136. Elstad MR SD, McIntyre TM, Prescott SM, Zimmerman GA. Platelet-activating factor acetylhydrolase increases during macrophage differentiation. *J Biol Chem* 1989;**264**:467-8470.
137. Satoh K IT, Kawamura Y, Yoshida H, Hiramoto M, Takamatsu S, et al. Platelet-activating factor (PAF) stimulates the production of PAF-acetylhydrolase by human hepatoma cell line, Hep G2. *J Clin Invest* 1991;**87**:476-81.
138. Tarbet EB SD, Elstad MR, Zimmerman GA, McIntyre TM, Prescott SM. Liver cells secrete the plasma form of platelet-activating factor acetylhydrolase. *J Biol Chem* 1991;**266**:16667-73.
139. Svetlov S, Sturm E, Olson M, Crawford J. Hepatic regulation of platelet-activating factor acetylhydrolase and lecithin:cholesterol acyltransferase biliary and plasma output in rats exposed to bacterial lipopolysaccharide. *Hepatology* 1999;**30**:128-36.
140. Pritchard P, Chonn A, Yeung C. The degradation of platelet-activating factor in the plasma of a patient with familial high density lipoprotein deficiency (Tangier disease). *Blood* 1985;**66**:1476-8.
141. Stafforini D, Carter M, Zimmerman G, McIntyre T, Prescott S. Lipoproteins alter the catalytic behavior of the platelet-activating factor acetylhydrolase in human plasma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989;**86**:2393-7.
142. Stafforini D, Elstad M, McIntyre T, Zimmerman G, Prescott S. Human macrophages secrete platelet-activating factor acetylhydrolase. *J Biol Chem* 1990;**265**:9682-7.
143. Tselepis A, Chapman M. Inflammation, bioactive lipids and atherosclerosis: potential roles of a lipoprotein-associated phospholipase A2, platelet activating factor-acetylhydrolase. *Atherosclerosis Supplements* 2002;**3**:57-68.
144. Russwurm S, Krause S, Finkelberg L, Ruhling K, Schauer U, Losche W. Generation of reactive oxygen species and activity of platelet-activating factor acetylhydrolase in human monocyte-derived macrophages. *Thromb Res* 1994;**74**:505-14.
145. 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**:2281-8.



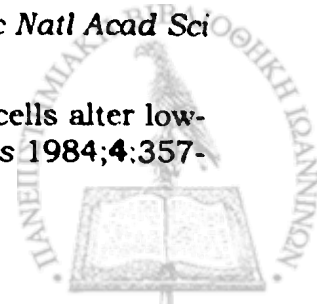
146. Tsimihodimos V, Karabina S, Tambaki A, et al. Altered distribution of PAF-acetylhydrolase activity between LDL and HDL as a function of the severity of hypercholesterolemia. *J Lipid Res* 2002;**43**:256-63.
147. Caslake M, Packard C, Suckling K, Holmes S, Chamberlain P, Macphee C. Lipoprotein-associated phospholipase A(2), platelet-activating factor acetylhydrolase: a potential new risk factor for coronary artery disease. *Atherosclerosis* 2000;**150**:413-9.
148. Wu X, McIntyre T, Zimmerman G, Prescott S, Stafforini D. Molecular characterization of the constitutive expression of the plasma PAF-acetylhydrolase gene in macrophages. *Biochem J* 2003;**375**:351-63.
149. Miyaura S, Maki N, Byrd W, Johnston J. The hormonal regulation of platelet-activating factor acetylhydrolase activity in plasma. *Lipids* 1991;**26**:1015-20.
150. Yasuda K, Johnston J. The hormonal regulation of platelet-activating factor-acetylhydrolase in the rat. *Endocrinology* 1992;**130**:708-16.
151. Maki N, Hoffman D, Johnston J. Platelet-activating factor acetylhydrolase activity in maternal, fetal, and newborn rabbit plasma during pregnancy and lactation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988;**85**:728-32.
152. Howard KM MJ, Miwa M, Olson MS. Cell-specific regulation of expression of plasma-type platelet-activating factor acetylhydrolase in the liver. *Bio Chem* 1997;**272**:27543-8.
153. Narahara H NY, Johnston Jm. Secretion of platelet-activating factor acetylhydrolase by human decidual macrophages. *J Clin Endocrinol Metab* 1993;**77**:1258-62.
154. Cao Y SD, 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**:4012-20.
155. Kawano Y NH, 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**:328-32.
156. Tselepis A, Elisaf M, Basis S, Karabina S, Chapman M, 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**:37.-83.
157. Kosaka T, Yamaguchi M, Miyanaga K, Mizuno K. Serum platelet-activating factor acetylhydrolase (PAF-AH) activity in more than 3000 healthy Japanese. *Clin Chim Acta* 2001; **312**:179-83.
158. Tselepis AD CM. Inflammation, bioactive lipids and atherosclerosis: potential roles of a lipoprotein-associated phospholipase A2, platelet activating factor-acetylhydrolase. *Atherosclerosis Supplements* 2002;**3**:57-68.
159. Zimmerman GA PS, McIntyre TM. Platelet-activating factor and cell-associated mediator of inflammation. In Gallin JI, Goldstein IM, Snyderman R editors, *Inflammation: basic principles and clinical correlates*, 2nd edn New York: Raven Press 1992:149-76.
160. Witztum JL SD. Role of oxidized low density lipoprotein in atherogenesis. *J Clin Invest* 1991;**88**:1785-92.



161. Parthasarathy S BJ, Fong LG. High density lipoprotein inhibits the oxidative modification of low-density lipoprotein. *Biochim Biophys Acta* 1990;**1044**:275-83.
162. Sakai M MA, Hakamata H, Sasaki T, Yui S, Yamazaki M, Shichiri M, Horiuchi S. Lysophosphatidylcholine plays an essential role in the mitogenic effect of oxidized low density lipoprotein on murine macrophages. *J Biol Chem* 1994;**269**:31430-5.
163. Itabé H. Oxidized phospholipids as a new landmark in atherosclerosis. *Prog Lipid Res* 1998;**37**:181-207.
164. Macphee CH MK, Boyd H, et al. The lipoprotein-associated phospholipase A₂ generates two bioactive products during the oxidation of low density lipoprotein: studies using a novel inhibitor. *Biochem J* 1999;**338**:479-87.
165. Ostermann G RK, Zabel-Langhenning R, Winkler L, Schlag B, Till U. Plasma from atherosclerotic patients exerts an increased degradation of platelet-activating factor. *Thromb Res* 1987;**47**:279-85.
166. Satoh K IT, Kawamura Y, Yoshida H, Takamatsu S, Takamatsu M. Increased activity of platelet-activating factor acetylhydrolase in plasma low density lipoprotein from patients with essential hypertension. *Prostaglandins* 1989; **37**: 673-82.
167. Hofmann B RK, Spangeberg P, Ostermann G. Enhanced degradation of platelet-activating factor in serum from diabetic patients. *Haemostasis* 1989;**19**:180-84.
168. Albert MA, Danielson E, Rifai N. Effect of statin therapy on C-reactive protein levels-The Pravastatin Inflammation/CRP Evaluation (PRINCE): a randomized trial and cohort study. *JAMA* 2001;**286**:64-70.
169. Albert MA, Glynn RJ, Wolfert RL, Ridker PM. The effect of statin therapy on lipoprotein associated phospholipase A₂ levels. *Atherosclerosis* 2005;**182**(1):193-8.
170. Blake G, Dada N, Fox JC, Manson JE, Ridker PM. A prospective evaluation of lipoprotein-associated phospholipase A₂ levels and the risk of future cardiovascular events in women. *J Am Coll Cardiol* 2001;**38**(5):1302-6.
171. Packard CJ, O'Reilly DS, Caslake MJ, et al. Lipoprotein-associated phospholipase A₂ as an independent predictor of coronary heart disease. West of Scotland Coronary Prevention Study Group. *N Engl J Med* 2000;**343**(16):1148-55.
172. Ballantyne CM, Hoogeveen RC, Bang H, et al. Lipoprotein-associated phospholipase A₂, high-sensitivity C-reactive protein, and risk for incident coronary heart disease in middle-aged men and women in the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) study. *Circulation* 2004;**109**(7):837-42.
173. Koenig W, Khuseyinova N, Lowel H, Trischler G, Meisinger C. Lipoprotein-associated phospholipase A₂ adds to risk prediction of incident coronary events by C-reactive protein in apparently healthy middle-aged men from the general population: results from the 14-year follow-up of a large cohort from southern Germany. *Circulation* 2004;**110**(14):1903-8.
174. Oei HH, van der Meer IM, Hofman A, et al. Lipoprotein-associated phospholipase A₂ activity is associated with risk of coronary heart disease and ischemic stroke: the Rotterdam Study. *Circulation* 2005;**111**(5):570-5.



175. Iribarren C, Grossm M, Darbinianm J, Jacobs D, Sidney S, Loria C. Association of lipoprotein-associated phospholipase A2 mass and activity with calcified coronary plaque in young adults. The Cardia study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005;**25**:216-21.
176. Boekholdt S, Keller T, Wareham N, et al. Serum levels of type II secretory phospholipase A2 and the risk of future coronary artery disease in apparently healthy men and women. The EPIC-Norfolk prospective population study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005;**25**:839-46.
177. Winkler K, Winkelmann B, Scharnagl H, et al. Platelet-activating factor acetylhydrolase activity indicates angiographic coronary artery disease independently of systemic inflammation and other risk factors. The Ludwigshafen risk and cardiovascular health study. *Circulation* 2005;**111**:980-7.
178. Brilakis E, McConnell J, Lennon R, Elesber A, Meyer J, Berger P. Association of lipoprotein-associated phospholipase A2 levels with coronary artery disease risk factors, angiographic coronary artery disease, and major adverse events at follow-up. *Eur Heart J* 2005;**26**:137-44.
179. Ballantyne C, Hoogeveen R, Bang H, et al. The relation of lipoprotein-associated phospholipase A2 and C-reactive protein to incident stroke in middle-aged men and women: the Atherosclerosis Risk in Communities study. In: Proc 5th Annual Conference on Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology; 2004; San Francisco, CA; 2004.
180. Khuseyinova N, Imhof A, Rothenbacher D, et al. Association between Lp-PLA2 and coronary artery disease: focus on its relationship with lipoproteins and markers of inflammation and hemostasis. *Atherosclerosis*:in press.
181. Mishra V, Mehta K. History and Biochemistry of Statins. In: Mahta J, ed. Statins: understanding clinical use. Philadelphia: Saunders editions; 2004:1-12.
182. ESC2004. European Society of Cardiology. Cardiovascular Diseases in Europe. EuroHeart Survey and National Registries of cardiovascular diseases and patients management.; 2004.
183. Strong P. Natural history and risk factors for early human atherogenesis. *J Clin Chem* 1995;**41**:134-8.
184. Kadar A, Glasz T. Development of atherosclerosis and plaque biology. *Cardiovasc Surg* 2001;**9**(2):109-21.
185. Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature* 1993;**362**:801-9.
186. Ross R. Atherosclerosis-an inflammatory disease. *N Engl J Med* 1999;**340**:115-26.
187. Steinberg D. Modified forms of low-density lipoprotein and atherosclerosis. *J Inter Med* 1993;**233**:227-32.
188. Henricksen T, Mahoney M, D. S. Enhanced macrophage degradation of low density lipoprotein previously incubated with cultured endothelial cells: recognition by receptor for acetylated low density lipoproteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981;**78**:6499-503.
189. Morel D, DiCorleto P, Chisolm G. Endothelial and smooth muscle cells alter low-density lipoprotein in vitro by free radical oxidation. *Atherosclerosis* 1984;**4**:357-64.



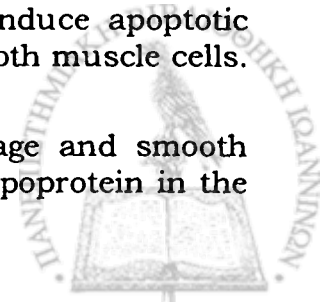
190. Steinbrecher D, Parthasarathy S, Leake D, Witztum J, D. S. Modification of low density lipoprotein by endothelial cells involves lipid peroxidation and degradation of low density lipoprotein phospholipids. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984;**83**:3883-7.
191. Heinecke JW, Rosen H, Chait A. Iron and copper promote modification of LDL by human arterial smooth muscle cells. *J Clin Inv* 1984;**74**:1890-4.
192. Haberland M, Fong E, Cheng L. Malondialdehyde altered protein occurs in atheroma of WHHL rabbits. *Science* 1988;**241**:215-8.
193. Palinski W, Rosenfeld M, Hertzuala Y, et al. LDL undergoes oxidative modification in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;**86**:1372-6.
194. Hertzuala Y, Palinski W, Rosenfeld M, et al. Evidence for the presence of oxidatively modified low density lipoprotein in atherosclerotic lesions of rabbit and man. *J Clin Inv* 1989;**84**:1086-95.
195. Stary H, Blankenhorn D, Chandler A, Sack M. A definition of advanced arteriosclerotic lesions and a classification of arteriosclerosis. *Circulation* 1995;**92**(5):1355-74.
196. Bhakdi S, Lackner KJ, Han S, Torzewski M, Husmann G. Beyond cholesterol: the enigma of atherosclerosis revised. *Throm Haemost* 2004;**91**:639-45.
197. Τερτίπη Α, Καδρυμίδης Φ. Στάδια εξέλιξης της αθηρωμάτωσης. In: Δυσλιπιδαιμίες. Αθήνα; 2001:256-64.
198. Libby P, Ridker P, Maseri A. Inflammation and atherosclerosis. *Circulation* 2002;**105**:1135-43.
199. Okajima F, Kurihara M, Ono C, et al. Oxidized but not acetylated low-density lipoprotein reduces preproinsulin mRNA expression and secretion of insulin from HIT-T15 cells. *Biochim Biophys Acta* 2005;**1687**(1-3):173-80.
200. Holvoet P, Kritchevsky SB, Tracy RP, et al. The metabolic syndrome, circulating oxidized LDL, and risk of myocardial infarction in well-functioning elderly people in the health, aging, and body composition cohort. *Diabetes* 2004;**53**(4):1068-73.
201. Frostegard J, Wu R, Lemne C. Circulating oxidized low-density lipoprotein is increased in hypertension. *Clin Sci (Lond)* 2003;**105**:615-20.
202. Toikka JO, Laine H, Ahotupa M, et al. Increased arterial intima-media thickness and in vivo LDL oxidation in young men with borderline hypertension. *Hypertension* 2000;**36**(6):929-33.
203. Toikka JO, Niemi P, Ahotupa M, et al. Decreased large artery distensibility in borderline hypertension is related to increased in vivo low-density lipoprotein oxidation. *Scand J Clin Lab Invest* 2002;**62**(4):301-6.
204. Singh BM, Mehta JL. Interactions between the renin-angiotensin system and dyslipidemia: relevance in the therapy of hypertension and coronary heart disease. *Arch Intern Med* 2003;**163**(11):1296-304.
205. Liu BW, Jiang Y, Fu MD, Liu Y, Fan P. Oxidative modification of lipoproteins in hypertriglyceridemic patients and hypercholesterolemic rabbits in vivo. *Mol Cell Biochem* 2000;**207**(1-2):131-5.
206. Napoli C, Postiglione A, Triggiani M, et al. Oxidative structural modifications of low density lipoprotein in homozygous familial hypercholesterolemia. *Atherosclerosis* 1995;**118**(2):259-73.

207. Inoue T, Inoue K, Maeda H, Takayanagi K, Morooka S. Immunological response to oxidized LDL occurs in association with oxidative DNA damage independently of serum LDL concentrations in dyslipidemic patients. *Clin Chim Acta* 2001;**305**(1-2):115-21.
208. Yamazaki K, Bujo H, Taira K, et al. Increased circulating malondialdehyde-modified LDL in the patients with familial combined hyperlipidemia and its relation with the hepatic lipase activity. *Atherosclerosis* 2004;**172**(1):181-7.
209. Yano M, Inoue M, Maehata E, et al. Increased electronegative charge of serum low-density lipoprotein in patients with diabetes mellitus. *Clin Chim Acta* 2004;**340**(1-2):93-8.
210. Sonoki K, Iwase M, Iino K, et al. Atherogenic role of lysophosphatidylcholine in low-density lipoprotein modified by phospholipase A2 and in diabetic patients: protection by nitric oxide donor. *Metabolism* 2003;**52**(3):308-14.
211. Tsuzura S, Ikeda Y, Suehiro T, et al. Correlation of plasma oxidized low-density lipoprotein levels to vascular complications and human serum paraoxonase in patients with type 2 diabetes. *Metabolism* 2004;**53**(3):297-302.
212. Shimada K, Mokuno H, Matsunaga E, et al. Predictive value of circulating oxidized LDL for cardiac events in type 2 diabetic patients with coronary artery disease. *Diabetes Care* 2004;**27**(3):843-4.
213. Van Himbergen T, Roest M, De Waart F, et al. Paraonase genotype, LDL-oxidation and carotid atherosclerosis in male life-long smokers. *Free Radic Res* 2004;**38**(6):553-60.
214. Suzuki K, Ito Y, Ochiai J, et al. The relationship between smoking habits and serum levels of 8-OHdG, oxidized LDL antibodies, Mn-SOD and carotenoids in rural Japanese residents. *J Epidemiol* 2003;**13**(1):29-37.
215. Lindholt JS, Heegaard NH, Vammen S, Fasting H, Henneberg EW, Heickendorff L. Smoking, but not lipids, lipoprotein(a) and antibodies against oxidised LDL, is correlated to the expansion of abdominal aortic aneurysms. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2001;**21**(1):51-6.
216. Laaksonen R, Janatuinen T, Vesalainen R, et al. High oxidized LDL and elevated plasma homocysteine contribute to the early reduction of myocardial flow reserve in healthy adults. *Eur J Clin Invest* 2002;**32**(11):795-802.
217. Meisinger C, Baumert J, Khuseyinova N, Loewel H, Koenig W. Plasma oxidized low-density lipoprotein, a strong predictor for acute coronary heart disease events in apparently healthy, middle-aged men from the general population. *Circulation* 2005;**112**:651-7.
218. Miyazaki T, Shimada K, Sato O, et al. Circulating malondialdehyde-modified LDL and atherogenic lipoprotein profiles measured by nuclear magnetic resonance spectroscopy in patients with coronary artery disease. *Atherosclerosis* 2005;**179**(1):139-45.
219. Bilgen D, Sonmez H, Ekmekci H, et al. The relationship of TFPI, Lp(a), and oxidized LDL antibody levels in patients with coronary artery disease. *Clin Biochem* 2005;**38**(1):92-6.
220. Shimada K, Mokuno H, Matsunaga E, et al. Circulating oxidized low-density lipoprotein is an independent predictor for cardiac event in patients with coronary artery disease. *Atherosclerosis* 2004;**174**(2):343-7.
221. Tsimikas S, Witztum JL. Measuring circulating oxidized low-density lipoprotein to evaluate coronary risk. *Circulation* 2001;**103**(15):1930-2.

222. Matsumoto N, Nomura S, Kamihata H, Kimura Y, Iwasaka T. Increased level of oxidized LDL-dependent monocyte-derived microparticles in acute coronary syndrome. *Thromb Haemost* 2004;**91**(1):146-54.
223. Holvoet P, Mertens A, Verhamme P, et al. Circulating oxidized LDL is a useful marker for identifying patients with coronary artery disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001;**21**(5):844-8.
224. Wallenfeldt K, Fagerberg B, Wikstrand J, Hulthe J. Oxidized low-density lipoprotein in plasma is a prognostic marker of subclinical atherosclerosis development in clinically healthy men. *J Intern Med* 2004;**256**(5):413-20.
225. Metso S, Loimaala A, Mercuri MF, et al. Circulating oxidized low-density lipoprotein and common carotid artery intima-media thickness in a random sample of middle-aged men. *J Biomed Sci* 2004;**11**(3):356-61.
226. Liu ML, Ylitalo K, Salonen R, Salonen JT, Taskinen MR. Circulating oxidized low-density lipoprotein and its association with carotid intima-media thickness in asymptomatic members of familial combined hyperlipidemia families. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004;**24**(8):1492-7.
227. Nishi K, Itabe H, Uno M, et al. Oxidized LDL in carotid plaques and plasma associates with plaque instability. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002;**22**(10):1649-54.
228. Ananyeva NM, Kouivaskaia DV, Shima M, Saenko EL. Intrinsic pathway of blood coagulation contributes to thrombogenicity of atherosclerotic plaque. *Blood* 2002;**99**(12):4475-85.
229. Korporaal SJ, Gorter G, van Rijn HJ, Akkerman JW. Effect of oxidation on the platelet-activating properties of low-density lipoprotein. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005;**25**(4):867-72.
230. Korporaal SJ, Relou IA, van Rijn HJ, Akkerman JW. Lysophosphatidic acid-independent platelet activation by low-density lipoprotein. *FEBS Lett* 2001;**494**(1-2):121-4.
231. Gopfert MS, Siedler F, Siess W, Sellmayer A. Structural identification of oxidized acyl-phosphatidylcholines that induce platelet activation. *J Vasc Res* 2005;**42**(2):120-32.
232. Landmesser U, Hornih B, Drexler H. Endothelial Function. A critical Determinant in Atherosclerosis? *Circulation* 2004;**109** [suppl II]:II-27-II-33.
233. Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature* 2002;**420**:868-74.
234. Shaul PW. Endothelial nitric oxide synthase, caveolae and the development of atherosclerosis. *J Physiol* 2003;**547**(Pt 1):21-33.
235. Chrysohoou C, Panagiotakos DB, Pitsavos C, et al. Evidence for association between endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism (G894T) and inflammatory markers: the ATTICA study. *Am Heart J* 2004;**148**(4):733-8.
236. Millanvoye-Van Brussel E, Topal G, Brunet A, et al. Lysophosphatidylcholine and 7-oxocholesterol modulate Ca²⁺ signals and inhibit the phosphorylation of endothelial NO synthase and cytosolic phospholipase A2. *Biochem J* 2004;**380**(Pt 2):533-9.
237. Yoshida H, Sasaki K, Namiki Y, Sato N, Tada N. Edaravone, a novel radical scavenger, inhibits oxidative modification of low-density lipoprotein (LDL) and reverses oxidized LDL-mediated reduction in the expression of endothelial nitric oxide synthase. *Atherosclerosis* 2005;**179**(1):97-102.

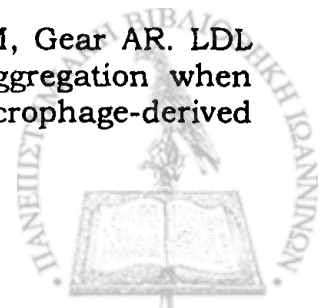
238. Chen LY, Mehta P, Mehta JL. Oxidized LDL decreases L-arginine uptake and nitric oxide synthase protein expression in human platelets: relevance of the effect of oxidized LDL on platelet function. *Circulation* 1996;**93**(9):1740-6.
239. Langheinrich A, Bohle R. Atherosclerosis: humoral and celllural factors of inflammation. *Virchows Arch* 2005;**446**:101-11.
240. Lusis A. Atherosclerosis. *Nature* 2000;**407**:233-41.
241. Li H, Cybulsky MI, Gimbrone MA, Libby P. An atherogenic diet rapidly induces VCAM-1, a cytokine regulatable mononuclear leukocyte adhesion molecule, in rabbit endothelium. *Arterioscler Thromb* 1993;**13**:197-204.
242. Cybulsky MI, Iiyama K, Li H, et al. A major role for VCAM-1, but not ICAM-1, in early atherosclerosis. *J Clin Invest* 2001;**107**:1255-62.
243. Takabe W, Kanai Y, Chairoungdua A, et al. Lysophosphatidylcholine enhances cytokine production of endothelial cells via induction of L-type amino acid transporter 1 and cell surface antigen 4F2. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004;**24**(9):1640-5.
244. Palinski W, Tsimikas S. Immunomodulatory effects of statins: Mechanisms and potential impact on arteriosclerosis. *J Am Soc Nephrol* 2002;**13**:1673-81.
245. Collins T, Cybulsky MI. NF-kB:pivotal mediator or innocent bystander in atherosclerosis? *J Clin Invest* 2001;**107**:255-64.
246. Fan J, Watanabe S. Inflammatory reactions in the pathogenesis of atherosclerosis. *J Atheroscler Thromb* 2003;**10**:63-71.
247. Collins R, Velji R, Guevara N, Hicks M, Chan L, Beaudet A. P-Selectin or intracellular adhesion molecule (ICAM-1) deficiency substantially protects against atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *J Exp Med* 2000;**191**:189-94.
248. Dersch K, Ichijo H, Bhakdi S, Husmann M. Fatty acids liberated from low-density lipoprotein trigger endothelial apoptosis via mitogen-activated protein kinases. *Cell Death Differ* 2005.
249. Napoli C, Quehenberger O, deNigris F, Abete P, Glass C, Palinski W. Apoptosis induced by mildly oxidized LDL involves multiple apoptotic signaling pathways in human coronary cells. *FASEB J* 2000;**14**:1996-2007.
250. Nihei S, Yamashita K, Tasaki H, Ozumi K, Nakashima Y. Oxidized low-density lipoprotein-induced apoptosis is attenuated by insulin-activated phosphatidylinositol 3-kinase/Akt through p38 mitogen-activated protein kinase. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2005;**32**(3):224-9.
251. Sata M, Walsh K. oxidized LDL activates Fas-mediated endothelial cell apoptosis. *J Clin Invest* 1998;**102**:1682-9.
252. Hansson G. Immune mechanisms in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001;**21**:1876-90.
253. Gu L, Okada Y, Clinton SK, et al. Absence of monocyte chemoattractant protein-1 reduces atherosclerosis in low-density lipoprotein-deficient mice. *Mol Cell* 1998;**2**:275-81.
254. Linton M, Fazio S. macrophages, inflammation and atherosclerosis. *Intern J of Obesity* 2003;**27**:S35-S40.
255. Rosenson RS. Statins in atherosclerosis: lipid-lowering agents with antioxidant capabilities. *Atherosclerosis* 2004;**173**(1):1-12.

256. Boring L, Gosling J, Cleary M, Charo I. Decreased lesion formation in CCR2^{-/-} mice reveals a role of chemokines in the initiation of atherosclerosis. *1998*;394:894-7.
257. Benitez S, Camacho M, Arcelus R, et al. Increased lysophosphatidylcholine and non-esterified fatty acid content in LDL induces chemokine release in endothelial cells. Relationship with electronegative LDL. *Atherosclerosis* 2004;177(2):299-305.
258. Tsousoulis D, Davies G, Stefanadis C, Toutouzas P, Ambrose JA. Inflammatory and thrombotic mechanisms in coronary atherosclerosis. *Heart* 2003;89:993-7.
259. Boisvert WA, Santiago R, Curtiss LK, Terkeltaub RA. A leukocyte homologue of the IL-8 receptor CXCR-2 mediates the accumulation of macrophages in atherosclerotic lesions of LDL receptor deficient mice. *J Clin Invest* 1998;101:353-63.
260. Barnes P, Karin M. Nuclear factor- κ B-A pivotal transcription factor in chronic inflammatory disease. *N Engl J Med* 1997;336:1066-71.
261. Dong Z, Wagner D. Leukocyte-endothelium adhesion molecules in atherosclerosis. *J Lab Clin Med* 1998;132:369-75.
262. Maier W, Altwegg L, Corti R, et al. Inflammatory markers at the site of ruptured plaque in acute myocardial infarction. locally increased interleukin-6 and serum amyloid A but decreased C-reactive-protein. *Circulation* 2005;111:1355-61.
263. Halvorsen B, Waehre T, Scholz H, et al. Interleukin-10 enhances the oxidized LDL-induced foam cell formation of macrophages by antiapoptotic mechanisms. *J Lipid Res* 2005;46(2):211-9.
264. Scott J. Pathophysiology and biochemistry of cardiovascular disease. *Current Opinion in Genetics & Development* 2004;14:271-9.
265. Itabe H, Takano T. Oxidized low density lipoprotein: the occurrence and metabolism in circulation and in foam cells. *J Atheroscler Thromb* 2000;7:123-31.
266. Witztum JL, Steinberg D. Role of oxidized low density lipoprotein in atherogenesis. *J Clin Invest* 1991;88:1785-92.
267. Gillotte KL, Horkko S, Witztum JL, Steinberg D. Oxidized phospholipids, linked to apolipoprotein B of oxidized LDL, are ligands for macrophage scavenger receptors. *J Lipid Res* 2000;41(5):824-33.
268. Miyazaki A, Biwa T, Hakamata H, et al. Granulocyte macrophage colony-stimulating factor plays a priming role in murine macrophage growth induced by oxidized low density lipoprotein. *Ann N Y Acad Sci* 2000;902:342-6.
269. Glass C, Witztum J. Atherosclerosis: the road ahead. *Cell* 2001;104:503-16.
270. Hulten LM, Ullstrom C, Krettek A, et al. Human macrophages limit oxidation products in low density lipoprotein. *Lipids Health Dis* 2005;4(1):6.
271. Loidl A, Sevcsik E, Riesenhuber G, Deigner HP, Hermetter A. Oxidized phospholipids in minimally modified low density lipoprotein induce apoptotic signaling via activation of acid sphingomyelinase in arterial smooth muscle cells. *J Biol Chem* 2003;278(35):32921-8.
272. Akishima Y, Akasaka Y, Ishikawa Y, et al. Role of macrophage and smooth muscle cell apoptosis in association with oxidized low-density lipoprotein in the atherosclerotic development. *Mod Pathol* 2005;18(3):365-73.

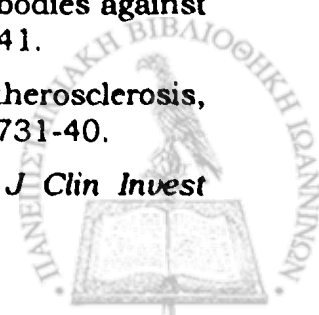


273. Alcouffe J, Caspar-Bauguil S, Garcia V, Salvayre R, Thomsen M, Benoist H. Oxidized low density lipoproteins induce apoptosis in PHA-activated peripheral blood mononuclear cells and in the Jurkat T-cell line. *J Lipid Res* 1999;**40**(7):1200-10.
274. Benoist H, Salvayre R, Negre-Salvayre A. Oxidized LDL-induced apoptosis. *Subcell Biochem* 2002;**36**:123-50.
275. Tabas I. Apoptosis and plaque destabilization in atherosclerosis: the role of macrophage apoptosis induced by cholesterol. *Cell Death Differ* 2004;**11** Suppl 1:S12-6.
276. Freeman NE, Rusinol AE, Linton M, et al. Acyl-CoA: Cholesterol acyltransferase promotes oxidized LDL/oxysterol-induced apoptosis in macrophages. *J Lipid Res* 2005.
277. Berthier A, Lemaire-Ewing S, Prunet C, et al. Involvement of a calcium-dependent dephosphorylation of BAD associated with the localization of Trpc-1 within lipid rafts in 7-ketocholesterol-induced THP-1 cell apoptosis. *Cell Death Differ* 2004;**11**(8):897-905.
278. Auge N, Garcia V, Maupas-Schwalm F, Levade T, Salvayre R, Negre-Salvayre A. Oxidized LDL-induced smooth muscle cell proliferation involves the EGF receptor/PI-3 kinase/Akt and the sphingolipid signaling pathways. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002;**22**(12):1990-5.
279. Li D, Liu L, Chen H, Sawamura T, Ranganathan S, Mehta JL. LOX-1 mediates oxidized low-density lipoprotein-induced expression of matrix metalloproteinases in human coronary artery endothelial cells. *Circulation* 2003;**107**(4):612-7.
280. Li D, Williams V, Liu L, et al. LOX-1 inhibition in myocardial ischemia-reperfusion injury: modulation of MMP-1 and inflammation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002;**283**(5):H1795-801.
281. Li D, Liu L, Chen H, Sawamura T, Mehta JL. LOX-1, an oxidized LDL endothelial receptor, induces CD40/CD40L signaling in human coronary artery endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003;**23**(5):816-21.
282. Mach F, Schonbeck U, Sukhova GK, et al. Functional CD40 ligand is expressed on human vascular endothelial cells, smooth muscle cells, and macrophages: implications for CD40-CD40 ligand signaling in atherosclerosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;**94**:1931-6.
283. Schonbeck U, Libby P. CD40 signaling and plaque instability. *Circ Res* 2001;**89**:1092-103.
284. Caligiuri G, Nicoletti A, Zhou X, Tornberg I, Hansson GK. Effects of sex and age on atherosclerosis and autoimmunity in apoE-deficient mice. *Atherosclerosis* 1999;**145**(2):301-8.
285. Nicoletti A, Paulsson G, Caligiuri G, Zhou X, Hansson GK. Induction of neonatal tolerance to oxidized lipoprotein reduces atherosclerosis in ApoE knockout mice. *Mol Med* 2000;**6**(4):283-90.
286. Cicha I, Yilmaz A, Klein M, et al. Connective Tissue Growth Factor Is Overexpressed in Complicated Atherosclerotic Plaques and Induces Mononuclear Cell Chemotaxis In Vitro. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005;**25**:1-6.
287. Holvoet P, Collen D. Oxidation of low density lipoproteins in the pathogenesis of atherosclerosis. *Atherosclerosis* 1998;**137**Suppl:S33-S8.

288. Endemann G, Stanton LW, Madden KS, Bryant CM, White T, Protter AA. CD36 is a receptor for oxidized low density lipoprotein. *J Biol Chem* 1993;**268**:11811-16.
289. Nicholson AC, Hajjar DP. CD36, oxidized LDL and PPAR gamma: pathological interactions in macrophages and atherosclerosis. *Vascul Pharmacol* 2004;**41**(4-5):139-46.
290. Nicholson AC, Febbraio M, Han J, Silverstein RL, Hajjar DP. CD36 in atherosclerosis. The role of a class B macrophage scavenger receptor. *Ann N Y Acad Sci* 2000;**902**:128-31; discussion 31-3.
291. Boullier A, Friedman P, Harkewicz R, et al. Phosphocholine as a pattern recognition ligand for CD36. *J Lipid Res* 2005;**46**(5):969-76.
292. Wuttge DM, Zhou X, Sheikine Y, et al. CXCL16/SR-PSOX is an interferon-gamma-regulated chemokine and scavenger receptor expressed in atherosclerotic lesions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004;**24**(4):750-5.
293. Wagsater D, Olofsson PS, Norgren L, Stenberg B, Sirsjo A. The chemokine and scavenger receptor CXCL16/SR-PSOX is expressed in human vascular smooth muscle cells and is induced by interferon gamma. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;**325**(4):1187-93.
294. Sawamura T, Kume N, Aoyama T, et al. An endothelial receptor for oxidized low density lipoprotein. *Nature* 1997;**386**:73-7.
295. Mehta JL. The role of LOX-1, a novel lectin-like receptor for oxidized low density lipoprotein, in atherosclerosis. *Can J Cardiol* 2004;**20 Suppl B**:32B-6B.
296. Mehta JL, Li DY, Chen HJ, Joseph J, Romeo F. Inhibition of LOX-1 by statins may relate to upregulation of eNOS. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;**289**(4):857-61.
297. Yokoya K, Takatsu H, Suzuki T, et al. Process of progression of coronary artery lesions from mild or moderate stenosis to moderate or severe stenosis: a study based on four serial coronary arteriograms per year. *Circulation* 1999;**100**:903-9.
298. Libby P. Current Concepts of the Pathogenesis of the Acute coronary Syndromes. *Circulation* 2001;**104**:365-72.
299. Sukhova GK, Shi GP, Simon DI, Chapman H, Libby P. Expression of the elastolytic cathepsins S and K in human atheroma and regulation of their production in smooth muscle cells. *J Clin Invest* 1998;**102**:576-83.
300. Davies MJ, Richardson PD, Woolf N, Katz DR, Mann J. Risk of thrombosis in human atherosclerotic plaques: role of extracellular lipid, macrophage and smooth muscle cell content. *Br Heart J* 1993;**69**:377-81.
301. Haseruck N, Erl W, Pandey D, et al. The plaque lipid lysophosphatidic acid stimulates platelet activation and platelet-monocyte aggregate formation in whole blood: involvement of P2Y1 and P2Y12 receptors. *Blood* 2004;**103**(7):2585-92.
302. Coleman LG, Jr., Polanowska-Grabowska RK, Marcinkiewicz M, Gear AR. LDL oxidized by hypochlorous acid causes irreversible platelet aggregation when combined with low levels of ADP, thrombin, epinephrine, or macrophage-derived chemokine (CCL22). *Blood* 2004;**104**(2):380-9.



303. Rother E, Brandl R, Baker DL, et al. Subtype-selective antagonists of lysophosphatidic Acid receptors inhibit platelet activation triggered by the lipid core of atherosclerotic plaques. *Circulation* 2003;**108**(6):741-7.
304. Cominacini L, Fratta Pasini A, Garbin U, et al. The platelet-endothelium interaction mediated by lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1 reduces the intracellular concentration of nitric oxide in endothelial cells. *J Am Coll Cardiol* 2003;**41**(3):499-507.
305. Puccetti L, Pasqui AL, Pastorelli M, et al. Platelet hyperactivity after statin treatment discontinuation. *Thromb Haemost* 2003;**90**(3):476-82.
306. Puccetti L, Sawamura T, Pasqui AL, Pastorelli M, Auteri A, Bruni F. Atorvastatin reduces platelet-oxidized-LDL receptor expression in hypercholesterolaemic patients. *Eur J Clin Invest* 2005;**35**(1):47-51.
307. Puccetti L, Pasqui AL, Pastorelli M, et al. Time-dependent effect of statins on platelet function in hypercholesterolaemia. *Eur J Clin Invest* 2002;**32**(12):901-8.
308. Retzer M, Siess W, Essler M. Mildly oxidised low density lipoprotein induces platelet shape change via Rho-kinase-dependent phosphorylation of myosin light chain and moesin. *FEBS Lett* 2000;**466**(1):70-4.
309. Hartwich J, Dembinska-Kiec A, Gruca A, et al. Regulation of platelet adhesion by oxidized lipoproteins and oxidized phospholipids. *Platelets* 2002;**13**(3):141-51.
310. Zhao B, Dierichs R, Miller FN, Dean WL. Oxidized low density lipoprotein inhibits platelet plasma membrane Ca(2+)-ATPase. *Cell Calcium* 1996;**19**(5):453-8.
311. Weidtmann A, Scheithe R, Hrboticky N, Pietsch A, Lorenz R, Siess W. Mildly oxidized LDL induces platelet aggregation through activation of phospholipase A2. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995;**15**(8):1131-8.
312. Itabe H. Oxidized low-density lipoproteins: what is understood and what remains to be clarified. *Biol Pharm Bull* 2003;**26**(1):1-9.
313. Lee RT. Plaque stabilization: the role of lipid lowering. *Intern J of Cardiol* 2000;**74**:S11-S5.
314. Lee RT, Libby P. The unstable atheroma. *Atheroscler Thromb Vasc Biol* 1997;**17**(10):1859-67.
315. Corti R, Farkouh M, Badimon J. The vulnerable plaque and the acute coronary syndromes. *Am J Med* 2002;**113**:668-80.
316. Wu R, deFaire U, Lemne C, Witztum J, Frostegard J. Autoantibodies to OxLDL are decreased in individuals with borderline hypertension. *Hypertension* 1999;**33**(1):53-9.
317. Shoenfeld Y, Wu R, Dearing R, Matsuura E. Are Anti-Oxidized Low-Density Lipoprotein Antibodies Pathogenic or Protective? *Circulation* 2004;**110**:2552-8.
318. Steinerova A, Racek J, Stozicky F, Zima T, Fialova L, Lapin A. Antibodies against oxidized LDL--theory and clinical use. *Physiol Res* 2001;**50**(2):131-41.
319. Shaw P. Natural antibodies with the T15 idiotype may act in atherosclerosis, apoptotic clearance and protective immunity. *J Clin Invest* 2000;**105**:1731-40.
320. Kearney JF. Immune recognition of OxLDL in atherosclerosis. *J Clin Invest* 2000;**105**(12):1683-5.

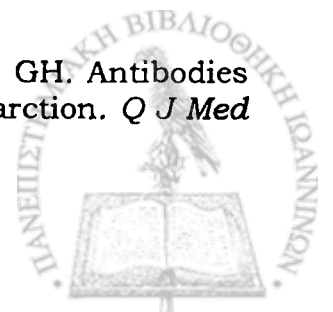


321. Palinski W, Witztum J. ApoE-deficient mice are a model of lipoprotein oxidation in atherogenesis - Demonstration of oxidation-specific epitopes in lesions and high titers of autoantibodies to malondialdehyde-lysine in serum. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1994;**14**:605-16.
322. Palinski W, Witztum JL. Immune responses to oxidative neoepitopes on LDL and phospholipids modulate the development of atherosclerosis. *J Intern Med* 2000;**247**(3):371-80.
323. Daugherty A RD, King VL. IL-5 links adaptive and natural immunity in reducing atherosclerotic disease. *J Clin Invest* 2004;**114**(3):317-9.
324. Binder P. Pneumococcal vaccination decreases atherosclerotic lesion formation: molecular mimicry between *Streptococcus pneumoniae* and oxidized LDL. *Nat Med* 2003;**9**:736-43.
325. Hulthe J. Antibodies to oxidized LDL in atherosclerosis development--clinical and animal studies. *Clin Chim Acta* 2004;**348**(1-2):1-8.
326. Shoji T, Nishizawa Y, Fukumoto M, et al. Inverse relationship between circulating oxidized low density lipoprotein (oxLDL) and anti-oxLDL antibody levels in healthy subjects. *Atherosclerosis* 2000;**148**(1):171-7.
327. Fukumoto M, Shoji T, Emoto M, Kawagishi T, Okuno Y, Nishizawa Y. Antibodies against oxidized LDL and carotid artery intima-media thickness in a healthy population. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;**20**(3):703-7.
328. Klapcinska B, Kempa K, Sobczak A, Sadowska-Krepa E, Jagsz S, Szoltysek I. Evaluation of autoantibodies against oxidized LDL (oLAB) and blood antioxidant status in professional soccer players. *Int J Sports Med* 2005;**26**(1):71-8.
329. Barros MR, Bertolami MC, Abdalla DS, Ferreira WP. Identification of mildly oxidized low-density lipoprotein (electronegative LDL) and its auto-antibodies IgG in children and adolescents hypercholesterolemic offsprings. *Atherosclerosis* 2005.
330. Iughetti L, Volta C, Maggi E, et al. Circulating antibodies recognizing oxidatively modified low-density lipoprotein in children. *Pediatr Res* 1999;**45**(1):94-9.
331. Τερτίγη Α, Καλδρυμίδης Φ. Πρωτοπαθείς δυσλιπιδαιμίες. In: Δυσλιπιδαιμίες. Αθήνα; 2001:143-229.
332. Τερτίγη Α, Καλδρυμίδης Φ. Δευτεροπαθείς δυσλιπιδαιμίες. In: Δυσλιπιδαιμίες. Αθήνα; 2001:230-50.
333. Goldstein L, Hazzard W, Schrott H, Bierman E, Motulsky A. Hyperlipidemia in coronary heart disease. I. Lipid levels in 500 survivors of myocardial infarction. *J Clin Inv* 1973;**52**:1533-43.
334. Gotto A, Pownall H. In: Manual of lipid disorders: Williams and Wilkins; 1999:290-350.
335. Turk Z, Mrzljak V, Metelko Z. Changes of autoantibodies against oxidatively modified low density lipoproteins during long-term LDL-apheresis. *Diab Nutr Metab* 1999;**12**:413-17.
336. Heitzer T, Herttuala Y, Luoma J, et al. Cigarette smoking potentiates endothelial dysfunction of forearm resistance vessels in patients with hypercholesterolemia. Role of oxidized LDL. *Circulation* 1996;**93**:1346-53.
337. Jansen H, Ghanem H, Kuypers J, Birkrnhager J. Autoantibodies against malondialdehyde-modified LDL are elevated in subjects with an LDL subclass pattern B. *Atherosclerosis* 1995;**115**:255-62.

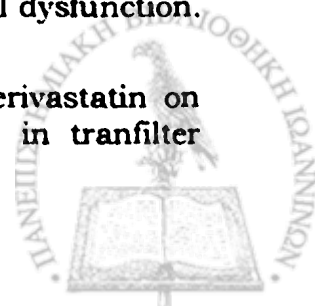
338. Hulthe J, Wikstrand J, Libell A, Wendelhag I, Hansson G, Wiklund O. Antibody titers against oxidized LDL are not elevated in patients with familial hypercholesterolemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998;**18**:1203-11.
339. Paiker J, Raal F, vonArB M. Auto-antibodies against oxidized LDL as a marker of coronary artery disease in patients with familial hypercholesterolemia. *Ann Clin Biochem* 2000;**37**:174-8.
340. Miller E, Erlinger T, Blumenthal R, Margolis S, Allen J. Antibodies to oxidized low-density lipoprotein in patients following coronary artery revascularization. *Coronary Artery Disease* 2003;**14**:163-9.
341. Haffner M, Lehto S, Ronnema T, Pyorala K, Laakso M. Mortality from coronary heart disease in subjects with type 2 diabetes and in nondiabetic subjects with or without prior myocardial infarction. *N Engl J Med* 1998;**339**(4):229-34.
342. Piarulli F, Lapolla A, Sartore G, et al. Autoantibodies against oxidized LDLs and atherosclerosis in type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2005;**28**(3):653-7.
343. Bellomo G, Maggi E, Poli M, Agosta F, Bollati P, Finardi G. Autoantibodies against oxidatively modified low-density lipoproteins in NIDDM. *Diabetes* 1995;**44**:60-6.
344. Mironova M, Virella G, Virella-Lowell I, Lopes-Virella M. Anti-modified LDL antibodies and LDL-containing immune complexes in IDDM patients and healthy controls. *Clinical Immunology and Immunopathology* 1997;**85**(1):73-82.
345. Makimattila S, Luoma J, Herttuala Y, et al. Autoantibodies against oxidized LDL and endothelium-dependent vasodilation in insulin-dependent diabetes mellitus. *Atherosclerosis* 1999;**147**:115-22.
346. Griffin ME, McInerney D, Fraser A, et al. Autoantibodies to oxidized low density lipoprotein: the relationship to low density lipoprotein fatty acid composition in diabetes. *Diabet Med* 1997;**14**:741-47.
347. Festa A, Kopp HP, Schernthaner G, Menzel EJ. autoantibodies to oxidised low density lipoproteins in IDDM are inversely related to metabolic control and microvascular complications. *Diabetologia* 1998;**41**:350-6.
348. Dotevall A, Hulthe J, Rosengren A, Wiklund O, Wilhelmsen L. Autoantibodies against oxidized low-density lipoprotein and C-reactive protein are associated with diabetes and myocardial infarction in women. *Clin Sci (Lond)* 2001;**101**(5):523-31.
349. Lopes-Virella M, Virella G, Orchard T, et al. Antibodies to oxidized LDL and LDL-containing immune complexes as risk factors for coronary artery disease in diabetes mellitus. *Clinical Immunology* 1999;**90**(2):165-72.
350. Orchard T, Virella G, Forrest Z, Evans R, Becker D, Lopes-Virella M. Antibodies to oxidized LDL predict coronary artery disease in type 1 diabetes. A Nested case-control study from the Pittsburgh Epidemiology of Diabetes Complications Study. *Diabetes* 1999;**48**:1454-58.
351. Maggi E, Marchesi E, Ravetta V, Martignoni A, Finardi G, Bellomo G. Presence of autoantibodies against oxidatively modified low-density lipoprotein in essential hypertension: a biochemical signature of an enhanced in vivo low-density lipoprotein oxidation. *Journal of Hypertension* 1995;**13**:129-38.



352. Shoji T, Fucumoto H, Kimoto E, et al. Antibody to oxidized low-density lipoprotein and cardiovascular mortality in end-stage renal disease. *Kidney International* 2002;**62**:2230-7.
353. Fialova L, Mikulnkova L, Malbohan I, et al. Antibodies Against Oxidized Low Density Lipoproteins in Pregnant Women. *Physiol Res* 2002;**51**:355-61.
354. Uotila J, Solakivi T, Jaakkola O, Tuimala R, Lehtimaki T. Antibodies against copper-oxidised and malondialdehyde-modified low density lipoproteins in pre-eclamptic pregnancies. *Br J Obst Gyn* 1998;**105**:1113-7.
355. Branch D, Mitchell M, Miller E, Palinski W, Witztum J. Pre-eclampsia and serum antibodies to oxidised low-density lipoprotein. *Lancet* 1994;**343**:645-6.
356. Craig W, Rawstron M, Rundell C, et al. Relationship between lipoprotein and oxidation related variables and atheroma lipid composition in subjects undergoing coronary artery bypass graft surgery. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999;**19**:1512-7.
357. Inoue T, Uchida T, Kamishirado H, Takayanagi K, Morroka S. Antibody against oxidized low density lipoprotein may predict progression or regression of atherosclerotic coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol* 2001;**37**(7):1871-6.
358. George J, Harats D, Bakshi E, et al. Anti-oxidized low density lipoprotein antibody determination as a predictor of restenosis following percutaneous transluminal coronary angioplasty. *Immunol Lett* 1999;**68**(2-3):263-6.
359. Toshima S, Hasegawa A, Kurabayashi M, et al. Circulating oxidized low density lipoprotein levels. A biochemical risk marker for coronary artery disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;**20**:2243-7.
360. Liang K, Huang J, Kao C, et al. Significantly higher levels of oxidized LDL autoantibody in coronary artery disease patients. *Chin Med J (Taipei)* 2000;**63**:101-6.
361. Yasunobu Y, Hayashi T, Shingu T, Yamagata T, Kajiyama G, Kambe M. Coronary atherosclerosis and oxidative stress as reflected by autoantibodies against oxidized low-density lipoprotein and oxysterols. *Atherosclerosis* 2001;**155**:445-53.
362. Tsimikas S, Lau H, Han S, et al. Percutaneous coronary intervention results in acute increases in oxidized phospholipids and lipoprotein(a). *Circulation* 2004;**109**:3164-70.
363. Puurunen M, Manttari M, Manninen V, et al. Antibody against oxidized low-density lipoprotein predicting myocardial infarction. *Arch Intern Med* 1994;**154**:2605-09.
364. Wang T, C. H, Chin Y, Lin Y. The autoantibody expression against different source of oxidized low density lipoprotein in patients with acute myocardial infarction. *Thromb Res* 2002;**107**:175-9.
365. Wu R, Nityanand S, Berglund L, Lithell H, Holm G, Lefvert A. Antibodies against cardiolipin and oxidatively modified LDL in 50-year-old men predict myocardial infarction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997;**17**:3159-63.
366. Ryan M, Owens D, Kilbride B, Collins PB, Johnson AH, Tomkin GH. Antibodies to oxidized lipoproteins and their relationship to myocardial infarction. *Q J Med* 1998;**91**:411-5.



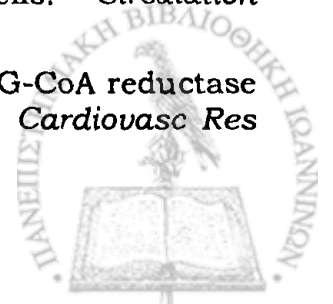
367. Erkkila A, Narvanen O, Lehto S, Uusitupa M, Hertzuala Y. Autoantibodies against oxidized low-density lipoprotein and cardioplin in patients with coronary heart disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;**20**:204-9.
368. Monaco C, Crea F, Niccoli G, et al. Autoantibodies against oxidized low density lipoproteins in patients with stable angina, unstable angina or peripheral vascular disease. *Eur Heart J* 2001;**22**:1572-77.
369. Holvoet P, Collen D, Van-de-Werf F. Malondialdehyde-modified LDL as a marker of acute coronary syndromes. *JAMA* 1999;**281**:1718-21.
370. Zhou X, Caligiuri G, Hamsten A, Lefvert A, Hansson G. LDL immunization induces T-cell-dependent antibody formation and protection against atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001;**21**(1):108-14.
371. Caligiuri G, Nicoletti A, Poirier B, Hansson G. Protective immunity against atherosclerosis carried by B cells of hypercholesterolemic mice. *J Clin Inv* 2002;**109**(6):745-53.
372. Wu R, Shoenfeld Y, Sherer Y, et al. Anti-idiotypes to oxidized LDL antibodies in intravenous immunoglobulin preparations--possible immunomodulation of atherosclerosis. *Autoimmunity* 2003;**36**(2):91-7.
373. Ginsberg HN. Effect of statins on triglyceride metabolism. *Am J Cardiol* 1998;**81**:32B-5B.
374. Davignon MD. Beneficial cardiovascular pleotropic effects of statins. *Circulation* 2004;**109**(SIII):III-39-III-43.
375. Schachinger V, Britten MB, Zeiher AM. Prognostic impact of coronary vasodilator dysfunction on adverse long-term outcome of coronary heart disease. *Circulation* 2000;**101**:1899-906.
376. Gokce N, Keaney JF, Hunter LM. Risk stratification for postoperative cardiovascular events via noninvasive assessment of endothelial function: a prospective study. *Circulation* 2002;**105**:1567-72.
377. Eichstadt HW, Eskotter H, Hoffman I. Improvement of myocardial perfusion by short-term fluvastatin therapy in coronary artery disease. *Am J Cardiol* 1995;**76**:122A-5A.
378. O'Driscoll G, Green D, Taylor RR. Simvastatin, an HMG-coenzyme A reductase inhibitor, improves endothelial function within 1 month. *Circulation* 1997;**95**:1126-31.
379. Marchesi S, Lupattelli G, Siepi D. Short-term atorvastatin treatment improves endothelial function in hypercholesterolemic women. *J Cardiovasc Pharmacol* 2000;**36**:617-21.
380. Laufs U, Wassmann S, Hilgers S. Rapid effects on vascular function after initiation and withdrawal of atorvastatin in healthy, noncholesterolemic men. *Am J Cardiol* 2001;**88**:1306-7.
381. Li D, Mehta JL. 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors protect against oxidized low-density lipoprotein-induced endothelial dysfunction. *Endothelium* 2003;**10**(1):17-21.
382. Axel D, Riesen R, Runge H, Viebahn R, Karsch K. Effects of cerivastatin on human arterial smooth muscle cell proliferation and migration in transfilter cocultures. *J Cardiovasc Pharmacol* 2000;**35**:619-29.



383. Schaefer C, Kuhlmann C, Gast C, et al. Statins prevent oxidized low-density lipoprotein- and lysophosphatidylcholine-induced proliferation of endothelial cells. *Vascular Pharmacology* 2004;**41**:67-73.
384. Yokoyama K, Ishibashi T, Ohkawara H, et al. HMG-CoA reductase inhibitors suppress intracellular calcium mobilization and membrane current induced by lysophosphatidylcholine in endothelial cells. *Circulation* 2002;**105**:962-7.
385. Nilius B, Droogmans G. Ion channels and their functional role in vascular endothelium. *Physiol Rev* 2001;**81**:1415-59.
386. Seljeflot I, Tonstad S, Hjerermann I, Arnesen H. Reduced expression of endothelial cell markers after 1 year treatment with simvastatin and atorvastatin in patients with coronary heart disease. *Atherosclerosis* 2002;**162**:179-85.
387. Aikawa M, Sugiyama S, Hill CC, et al. Lipid lowering reduces oxidative stress and endothelial cell activation in rabbit atheroma. *Circulation* 2002;**106**(11):1390-6.
388. Dobrucki L, Kalinowski L, Dobrucki I, Malinski T. Statin-stimulated nitric oxide release from endothelium. *Med Sci Monit* 2001;**7**:622-7.
389. Kaesemeyer W, Caldwell R, Huang J, R. C. Pravastatin sodium activates endothelial nitric oxide synthase independent of its cholesterol-lowering actions. *J Am Coll Cardiol* 1999;**33**:234-41.
390. Feron O, Dessy C, Desager JP. Hydroxy-methylglutaryl-coenzyme A reductase inhibition promotes endothelial nitric oxide synthase activation through a decrease in caveolin abundance. *Circulation* 2001;**103**:113-8.
391. Laufs U, Liao JK. Post-transcriptional regulation of endothelial nitric oxide synthase mRNA stability by Rho GTPase. *J Biol Chem* 1998;**273**:24266-71.
392. Wassmann S, Laufs U, Baumer AT. HMG-CoA reductase inhibitors improve endothelial dysfunction in normocholesterolemic hypertension via reduced production of reactive oxygen species. *Hypertension* 2001;**37**:1450-7.
393. Laufs U, La-Fata V, Plutzky J. Upregulation of endothelial nitric oxide synthase by HMG CoA reductase inhibitors. *Circulation* 1998;**97**:1129-35.
394. Kureishi Y, Luo ZY, Shiojima I. The HMG-CoA reductase inhibitor simvastatin activates the protein kinase Akt and promotes angiogenesis in normocholesterolemic animals. *Nature Med* 2000;**6**:1004-10.
395. Undas A, Brummel-Ziedins KE, Mann KG. Statins and blood coagulation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005;**25**(2):287-94.
396. Colli S, Eligini S, Lalli M, Camera M, Paoletti R, Tremoli E. Statins inhibit tissue factor in cultured human macrophages. A novel mechanism of protection against atherothrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997;**17**:265-72.
397. Eto M, Cosentino F, Joch H, Luscher T. Statins prevents tissue factor expression in human endothelial cells. Role of Rho/Rho kinase and Akt pathways. *Circulation* 2002;**105**:1756-9.
398. Bea F, Blessing E, Shelley M, Shultz J, Rosenfeld M. Simvastatin inhibits expression of tissue factor in advanced atherosclerotic lesions of apolipoprotein E deficient mice independently of lipid lowering. *Atherosclerosis* 2003;**167**:187-94.
399. Bourcier T, Libby P. HMGCoA reductase inhibitors reduce plasminogen activator inhibitor-1 expression by human vascular smooth muscle and endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;**20**:556-62.

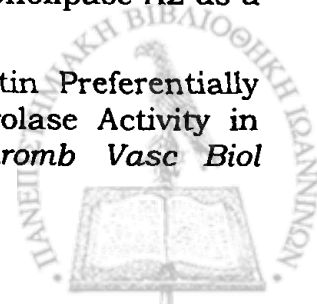
400. Ferro D, Basili S, Alessandri C, Cara D, Violi F. Inhibition of tissue-factor mediated thrombin generation by simvastatin. *Atherosclerosis* 2000;**149**:111-6.
401. Dujovne C, Harris W, Altman R, Overhiser R, Black D. Effect of atorvastatin on hemorheologic-hemostatic parameters and serum fibrinogen levels in hyperlipidemic patients. *Am J Cardiol* 2000;**85**:350-3.
402. Sbarouni E, Melissari E, Kyriakides Z, Kremastinos D. Effects of simvastatin or hormone replacement therapy, or both, on fibrinogen, factor VII and plasminogen activator inhibitor levels in postmenopausal women with proven coronary artery disease. *Am J Cardiol* 2000;**86**:80-3.
403. Morishita E, Minami S, Ishino C, et al. Atorvastatin reduces plasma levels of factor VII activity and factor VII antigen in patients with hyperlipidemia. *J Atheroscler Thromb* 2002;**9**:72-7.
404. Undas A, Brummel K, Musial J, Mann K, Szezeklik A. Simvastatin depresses blood clotting by inhibiting activation of prothrombin, factor V, and factor XIII and by enhancing factor Va inactivation. *Circulation* 2001;**103**:2248-53.
405. Liao J, Laufs U. Pleiotropic effects of statins. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2004;**45**:89-118.
406. Vaughan C, Gotto A, Basson C. The evolving role of statins in the management of atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol* 2000;**35**:1-10.
407. Aflon J, Royo T, Garcia-Moll X, Badimon L. Platelet deposition on eroded vessel walls at a stenotic shear rate is inhibited by lipid-lowering treatment with atorvastatin. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999;**19**:1812-7.
408. Aikawa M, Rabkin E, Sugiyama S, Voglic SJ, Fukumoto M. An HMG-CoA reductase inhibitor, cerivastatin, suppresses growth of macrophages expressing matrix metalloproteinases and tissue factor in vivo and in vitro. *Circulation* 2001;**103**:276-83.
409. Corsini A, Maggi F, Catapano AL. Pharmacology of competitive inhibitors of HMG-CoA reductase. *Pharmacol Res* 1995;**31**:9-27.
410. Bellostta S, Ferri N, Bernini F, Paoletti R, Corsini A. Non-lipid related effects of statins. *Ann Med* 2000;**32**(3):164-76.
411. Norata GD, Pirillo A, Catapano AL. Statins and oxidative stress during atherogenesis. *J Cardiovasc Risk* 2003;**10**(3):181-9.
412. Aviram M, Dankner G, Cogan U, Hochgraf E, Brook J. Lovastatin inhibits low-density lipoprotein oxidation and alters fluidity and uptake by macrophages: in vitro and in vivo studies. *Metabolism* 1992;**41**:229-35.
413. Girona J, LaVille A, Sola R, Plana N, Masana L. Simvastatin decreases adlehyde production derived from lipoprotein oxidation. *Am J Cardiol* 1999;**83**:846-51.
414. Rosenson RS, Tangney C, Levine D, Parker T, Gordon B. Association between reduced low density lipoprotein oxidation and inhibition of monocyte chemoattractant protein-1 production in statin-treated subjects. *J Lab Clin Med* 2005;**145**:83-7.
415. Aviram M, Rosenblat M, Bisgaier CL. Atorvastatin and gemfibrozil metabolites, but not the parent drugs, are potent antioxidants against lipoprotein oxidation. *Atherosclerosis* 1998;**138**:271-80.
416. De Caterina R, Cipollone F, Filardo FP, et al. Low-density lipoprotein level reduction by the 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme-A inhibitor simvastatin is accompanied by a related reduction of F2-isoprostane formation in

- hypercholesterolemic subjects: no further effect of vitamin E. *Circulation* 2002;**106**(20):2543-9.
417. Janatuinen T, Knuuti J, Toikka J, et al. Effect of pravastatin on low density lipoprotein oxidation and myocardial perfusion in young adults with type I diabetes. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004;**24**:1303-08.
418. Fuhrman B, Koren L, Volkova N. Atorvastatin therapy in hypercholesterolemic patients suppresses cellular uptake of oxidized-LDL by differentiating monocytes. *Atherosclerosis* 2002;**164**:179-85.
419. Li DY, Chen HJ, Mehta JL. Statins inhibit oxidized-LDL-mediated LOX-1 expression, uptake of oxidized-LDL and reduction in PKB phosphorylation. *Cardiovasc Res* 2001;**52**:130-5.
420. Sanchez-Quesada JL, Ojal-Entraigas C, Franco M. Effect of simvastatin treatment on the electronegative low-density lipoprotein present in patients with heterozygous familial hypercholesterolemia. *Am J Cardiol* 1999;**84**:655-59.
421. Kluft C. Is C-reactive protein an additional, surrogate end-point for statin treatment. *Eur Heart J* 2002;**23**:761-4.
422. Ridker PM, Rifai N, Pfeffer MA, (CARE), investigators. Inflammation, pravastatin, and the risk of coronary events after myocardial infarction in patients with average cholesterol levels. *Circulation* 1998;**98**:839-44.
423. Ridker PM, Rifai N, Pfeffer MA, (CARE), Investigators. Long-term effects of pravastatin on plasma concentration of C-reactive protein. *Circulation* 1999;**100**:230-5.
424. Plenge JK, Hernandez TL, Weil KM. Simvastatin lowers C-reactive protein within 14 days: an effect independent of low-density lipoprotein cholesterol reduction. *Circulation* 2002;**106**:1447-52.
425. Strandberg T, Vanhanen H, Tikkanen M. Effect of statins on C-reactive protein in patients with coronary artery disease. *Lancet* 1999;**353**:118-9.
426. Jialal I, Stein D, Balis D. Effect of hydroxymethyl glutaryl coenzyme A reductase inhibitor therapy on high sensitive C-reactive protein levels. *Circulation* 2001;**103**:1933-35.
427. Riesen W, Engler H, Risch M, Korte W, Nosedá G. Short-term effects of atorvastatin on C-reactive protein. *Eur Heart J* 2002;**23**:794-9.
428. Niwa S, Totsuka T, Hayashi T. Inhibitory effect of Fluvastatin, an HMG-CoA reductase inhibitor, on the expression of adhesion molecules on human monocyte cell line. *Int J Immunopharmacol* 1996;**18**:669-75.
429. Scalia R, Gooszen M, Jones S, Hoffmeyer M, Rimmer D. Simvastatin exerts both anti-inflammatory and cardioprotective effects in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation* 2001;**103**:2598-603.
430. Schonbeck U, Gerdes N, Varo N, et al. Oxidized low-density lipoprotein augments and 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors limit CD40 and CD40L expression in human vascular cells. *Circulation* 2002;**106**(23):2888-93.
431. Mulhaupt F, Matter C, Kwak B, Pelli G, Veillard N. Statins (HMG-CoA reductase inhibitors) reduce CD40 expression in human vascular cells. *Cardiovasc Res* 2003;**59**:755-66.



432. Liorente-Cortes V, Marty/nez-Gonza/lez J, Badimon L. Esterified cholesterol accumulation induced by aggregated LDL uptake in human vascular smooth muscle cells is reduced by HMG-CoA reductase inhibitors. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998;**18**:738-46.
433. Fukumoto M, Libby P, Rabkin E, Hill CC, M E. Statins alter smooth muscle cell accumulation and collagen content in established atheroma of watanabe heritable hyperlipidemic rabbits. *Circulation* 2001;**103**:993-9.
434. Bellosta S, Via D, Canavesi MA. HMG-CoA reductase inhibitors reduce MMP-9 secretion by macrophages. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998;**18**:1671-78.
435. Ndrepepa G, Braun S, vonBeckerath N, et al. Oxidized low density lipoproteins, statin therapy and severity of coronary artery disease. *Clinica Chimica Acta* 2005;**in press**.
436. Tsimikas S, Witztum JL, Miller ER, et al. High-dose atorvastatin reduces total plasma levels of oxidized phospholipids and immune complexes present on apolipoprotein B-100 in patients with acute coronary syndromes in the MIRACL trial. *Circulation* 2004;**110**(11):1406-12.
437. Edelstein C, Pfaffinger D, Hinman J, et al. Lysine-phosphatidylcholine adducts in kringle V impart unique immunological and potential pro-inflammatory properties to human apolipoprotein(a). *J Biol Chem* 2003;**278**(52):52841-7.
438. Tsimikas S, Brilakis ES, Miller ER, et al. Oxidized phospholipids, Lp(a) lipoprotein, and coronary artery disease. *N Engl J Med* 2005;**353**(1):46-57.
439. Kinlay S, Schwartz GG, Olsson AG, et al. High-dose atorvastatin enhances the decline in inflammatory markers in patients with acute coronary syndromes in the MIRACL study. *Circulation* 2003;**108**(13):1560-6.
440. Orem C, Orem A, Uydu HA, Celik S, Erdol C, Kural BV. The effects of lipid-lowering therapy on low-density lipoprotein auto-antibodies: relationship with low-density lipoprotein oxidation and plasma total antioxidant status. *Coron Artery Dis* 2002;**13**(1):65-71.
441. Karabina S, Bairaktari E, Tzallas C, Siamopoulos K, Tselepis A. Increased activity of platelet-activating factor acetylhydrolase in low-density lipoprotein subfractions induces enhanced lysophosphatidylcholine production during oxidation in patients with heterozygous familial hypercholesterolaemia. *European J Clin Invest* 1997;**27**:595-602.
442. Liapikos ThA aS, Karabina S-AP, Tsoukatos DC, Demopoulos CA, Tselepis AD. Platelet-activating factor formation during oxidative modification of low-density lipoprotein when PAF-acetylhydrolase has been inactivated. *Biochim Bioiophys Acta* 1994;**1212**:353-60.
443. Tsimihodimos V KS-A, Tambaki A, Bairaktari E, Miltiadous G, Goudevenos JA, Cariolou MA, Chapman MJ, Tselepis AD, Elisaf M. Altered distribution of PAF-acetylhydrolase activity between LDL and HDL as a function of the severity of hypercholesterolemia. *J Lipid Res* 2002;**43**:256-63.
444. Craig WY, Raytcheva SE, Poulin SE, Ritchie RF. Effect of low-density lipoprotein (LDL) antigen source on an enzyme-linked immunosorbent assay for autoantibodies against oxidized LDL. *Ann Clin Biochem* 1999;**36** (Pt 3):333-9.
445. Craig WY, Rawstron MW, Rundell CA, et al. Relationship between lipoprotein- and oxidation-related variables and atheroma lipid composition in subjects undergoing coronary artery bypass graft surgery. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999;**19**(6):1512-7.

446. Berliner JA, Subbanagounder G, Leitinger N, Watson A, Vora D. Evidence for a role of phospholipid oxidation products in atherogenesis. *Trends Cardiovasc Med* 2001;**11**:142-7.
447. Glantzounis G, Tselepis A, Tambaki A, et al. Laparoscopic surgery-induced changes in oxidative stress markers in human plasma. *Surg Endosc* 2001;**15**:1315-9.
448. Kwon KH, Kwon HM, Hong BK, et al. Autoantibody against, malondialdehyde-modified low density lipoprotein in patients with non-diabetic unstable angina: a potential role in immunologic reaction of plaque instability. *Yonsei Med J* 2002;**43**:203-10.
449. Liapikos T, Antonopoulou S, Karabina S, Tsoukatos DC, Demopoulos CA, Tselepis A. Platelet-activating factor formation during oxidative modification of low-density lipoprotein when PAF-acetylhydrolase has been inactivated. *Biochem Biophys Acta* 1994;**1212**:353-60.
450. Kausik R, Cannon C. Pathological changes in acute coronary syndromes: the role of statin therapy in the modulation of inflammation, endothelial function and coagulation. *J Thromb Thrombolysis* 2004;**18**(2):89-101.
451. Mazer SP, Rabbani LE. Evidence for C-reactive protein's role in (CRP) vascular disease: atherothrombosis, immuno-regulation and CRP. *J Thromb Thrombolysis* 2004;**17**(2):95-105.
452. Nilsson J. CRP--marker or maker of cardiovascular disease? *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005;**25**(8):1527-8.
453. Horkko S, Bird DA, Miller E, et al. Monoclonal autoantibodies specific for oxidized phospholipids or oxidized phospholipid-protein adducts inhibit macrophage uptake of oxidized low-density lipoproteins. *J Clin Invest* 1999;**103**(1):117-28.
454. Tsimikas S, Glass C, Steinberg D, Witztum J. Lipoproteins, lipoprotein oxidation and atherogenesis. In: Clien K, ed. *Molecular basis of cardiovascular disease: a companion to Braunwald's Heart Disease*. Philadelphia: WB Saunders; 2004:385-413.
455. Balk EM, Lau J, Goudas LC, et al. Effects of statins on nonlipid serum markers associated with cardiovascular disease: a systematic review. *Ann Intern Med* 2003;**139**(8):670-82.
456. Tambaki A, Rizos E, Tsimihodimos V, Tselepis A, Elisaf M. Effects of antihypertensive and hypolipidemic drugs on plasma and high-density lipoprotein-associated platelet activating factor-acetylhydrolase activity. *J Cardiovasc Pharmacol Ther* 2004;**9**(2):91-5.
457. Beltowski J, Wojcicka G, Jamroz A. Effect of 3-hydroxy-3-methylglutarylcoenzyme A Reductase Inhibitors (Statins) on Tissue Paraoxonase 1 and Plasma Platelet Activating Factor Acetylhydrolase Activities. *J Cardiovasc Pharmacol* 2004;**43**:121-7.
458. Macphee C, Nelson J, Zalewski A. Lipoprotein-associated phospholipase A2 as a target of therapy. *Curr Opin Lipidol* 2005;**16**:442-6.
459. Tsimihodimos V, Karabina S-A, Tambaki A, et al. Atorvastatin Preferentially Reduces LDL-Associated Platelet-Activating Factor Acetylhydrolase Activity in Dyslipidemias of Type IIA and Type IIB. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002;**22**:306-11.



ΒΡΑΒΕΥΣΕΙΣ

- [1] Έπαινος ερευνητικής εργασίας, για την εργασία με τίτλο «*Αυξημένος τίτλος αυτοαντισωμάτων κατά οξειδωμένων μορφών LDL σε ασθενείς με στεφανιαία νόσο*». Ευαγγελία Σ. Λουρίδα, Αθανάσιος Ι. Παπαθανασίου, Ιωάννης Γουδέβενος, Μωυσής Ελισάφ, Δημήτριος Σιδερός, Αλέξανδρος Δ. Τσελέπης Στο 22^ο Πανελλήνιο Καρδιολογικό Συνέδριο 22-24/11/2001
- [2] 2^ο Βραβείο Επάθλου «ΟΔ. ΚΑΛΛΙΓΙΑΝΝΗΣ» για την εργασία με τίτλο «Ασθενείς με στεφανιαία νόσο εμφανίζουν αυξημένο τίτλο αυτοαντισωμάτων έναντι διαφόρων μορφών οξειδωμένης LDL». Ευαγγελία Σ. Λουρίδα, Αθανάσιος Ι. Παπαθανασίου, Ιωάννης Γουδέβενος, Μωυσής Ελισάφ, Δημήτριος Σιδερός, Αλέξανδρος Δ. Τσελέπης. 11^ο Παγκρήτιο Ιατρικό Συνέδριο Χανιά Κρήτης, Νοέμβριος 1-3, 2002
- [3] Έπαινος «Σωτήρης Παπασταμάτης» για την εργασία με τίτλο «Η ενδογενής PAF-ακετυλοϋδρολάση επηρεάζει την αντιγονικότητα της οξειδωμένης LDL σε ασθενείς με στεφανιαία νόσο.». Ε. Λουρίδα, Α Παπαθανασίου, Ι Γουδέβενος, Α. Τσελέπης. Ιατρική Εταιρία Αθηνών 2005.



ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ

Από τον πληθυσμό, τα αποτελέσματα της μελέτης και από την μεθοδολογία που αναπτύχθηκε κατά την εκπόνηση της παρούσας διατριβής προέκυψαν οι παρακάτω δημοσιεύσεις:

- [1]. Λουρίδα ΕΣ, Παπαθανασίου Α], Γουδέβενος Ι, Ελισάφ ΜΣ, Μιχάλης ΛΚ, Σιδεράς Δ, Τσελέπης ΑΔ «*Αυξημένος τίτλος αυτοαντισωμάτων έναντι οξειδωμένων μορφών LDL σε ασθενείς με στεφανιαία νόσο*»
Ελληνική Καρδιολογική Επιθεώρηση. 2002;43:351-359.
- [2]. J Mitsios, A Papathanasiou, F Rodis, M Elisaf, J Goudevenos, A Tselepis «*Atorvastatin does not affect the antiplatelet potency of clopidogrel when it is administered concomitantly for 5 weeks in patients with acute coronary syndromes*».
Circulation 2004;109:1335-1338
- [3]. Lourida E, Papathanasiou A, Goudevenos J, Tselepis A. «*The LDL-associated PAF-acetylhydrolase activity and the extent of LDL oxidation are important determinants of the autoantibody titers against oxidized LDL in patients with coronary artery disease*»
Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids (submitted)

