

ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ



026000200276



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

459

ΙΩΑΝΝΗ Β. ΜΗΤΣΙΟΥ
ΧΗΜΙΚΟΥ

**ΒΙΟΔΡΑΣΤΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΤΩΝ
ΑΙΜΟΠΕΤΑΛΙΩΝ. ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΕΚΚΡΙΣΗΣ ΚΑΙ
ΡΟΛΟΣ ΣΤΗΝ ΑΘΗΡΟΓΕΝΕΣΗ.**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2006



ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΟ

1932

... ..

... ..

...

...

...

...

...

...

...

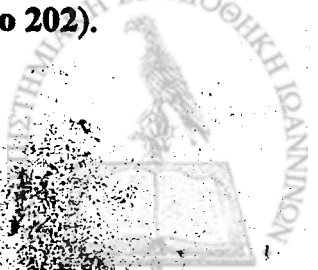
...

...

...

...

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





ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ
ΤΟΜΕΑΣ ΟΡΓΑΝΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ
Εργαστήριο Βιοχημείας
Αλέξανδρος Τσελέπης
Αναπληρωτής Καθηγητής Βιοχημείας

Ιωάννινα, 11-7-2006

Η επταμελής Εξεταστική Επιτροπή που ορίστηκε για την κρίση της Διδακτορικής Διατριβής του κ Ιωάννη Μήτσιου Χημικού, συνήλθε σε συνεδρίαση στο Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων την Τρίτη 11 Ιουλίου 2006, όπου παρακολούθησε την υποστήριξη της διατριβής με τίτλο: "Βιοδραστικοί παράγοντες των αιμοπεταλίων. Μηχανισμός έκκρισης και ρόλος στην αθηρογένεση".

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

Με τιμή

Τα μέλη της εξεταστικής Επιτροπής

1. Αλέξανδρος Τσελέπης, Αναπληρωτής Καθηγητής Βιοχημείας Παν/μίου Ιωαννίνων

2. Κων/νος Δημόπουλος, Καθηγητής Βιοχημείας Παν/μίου Αθηνών

3. Ιωάννης Γουδέβας, Καθηγητής Παθολογίας/Καρδιολογίας Παν/μίου Ιωαννίνων

4. Μαυρός Ελισάφ, Καθηγητής Παθολογίας Παν/μίου Ιωαννίνων

5. Μαρία Σακαρέλλου, Καθηγήτρια Βιοχημείας Παν/μίου Ιωαννίνων

6. Σμαραγδή Αντωνοπούλου, Αν Καθηγήτρια Βιοχημείας Χαροκόπειου Παν/μίου Αθηνών

7. Δημόκριτος Τσουκάτος, Αναπληρωτής Καθηγητής Βιοχημείας Παν/μίου Ιωαννίνων



Στους γονείς μου



Πρόλογος

Η παρούσα διατριβή εκπονήθηκε στον Τομέα Οργανικής Χημείας και Βιοχημείας (Ερευνητικό Εργαστήριο Λιπιδίων και Λιποπρωτεϊνών) του Τμήματος Χημείας Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, από το 2001-2006, στα πλαίσια ερευνητικού προγράμματος «ΗΡΑΚΛΕΙΤΟΣ» με τίτλο «Βιοδραστικοί παράγοντες των αιμοπεταλίων. Μηχανισμός έκκρισης και ρόλος στην αθηρογένεση.» της Γενικής Γραμματείας Έρευνας και Τεχνολογίας.

Την επίβλεψη και άμεση καθοδήγηση της διατριβής είχε ο Καθηγητής του Τμήματος Χημείας κ. Αλέξανδρος Τσελέπης. Παρά το φόρτο εργασίας του, αφιέρωσε χρόνο προσπαθώντας να με διδάξει με τον καλύτερο δυνατό τρόπο τη λειτουργία του ερευνητικού χώρου της βιοχημείας αλλά και για την καθοριστικής σημασίας συμβολή του στα χρόνια αυτά πράγμα για το οποίο τον ευχαριστώ.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τα μέλη της τριμελούς επιτροπής μου κ. Δημόπουλο Κωνσταντίνο, Καθηγητή του τμήματος Χημείας Πανεπιστημίου Αθηνών καθώς και τον Ιωάννη Γουδέβενο, Καθηγητή της Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων για την άψογη συνεργασία τους.

Ευχαριστώ πολύ τον Καθηγητή της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων κ. Μωυσή Ελισάφ για την άψογη συνεργασία και την συλλογή των κλινικών δειγμάτων. Επίσης οφείλω ένα μεγάλο ευχαριστώ στην Ελένη Νάκου, Άννα Κακαφήκα, Ειρήνη Γάζη, Αθανασία Σπύρου, Σοφία Τσούλη, Βασίλη Σαούγκο, Μιχάλη Κωσταπάνο, Θεοδόση Φιλιππάτο, και στην κα Ντότη Ρέα του εξωτερικού ιατρείου λιπιδίων του Πανεπιστημιακού Περιφερειακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων για την εξαιρετική συνεργασία μας στη συλλογή των κλινικών δειγμάτων. Επίσης ευχαριστώ πολύ τους ειδικευόμενους της Β΄ Παθολογικής Κλινικής του Πανεπιστημιακού Περιφερειακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω και τον Λέκτορα της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων κ. Σάββα Χρηστοφορίδη καθώς και τους μεταπτυχιακούς φοιτητές Αγαθή Παπανικολάου και την Μαρία Μπαλατσού για την παρασκευή των ενδοθηλιακών κυττάρων. Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω και τον κ. Δημόκριτο Τσουκάτο, Αναπληρωτή Καθηγητή του τμήματος Χημείας Πανεπιστημίου Ιωαννίνων για το ειλικρινές ενδιαφέρον του και τις χρήσιμες και επικοδομητικές παρατηρήσεις του. Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω και τον κ.

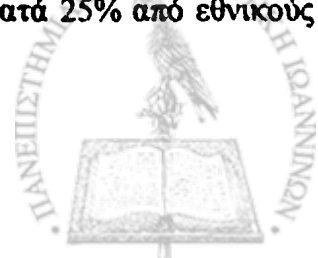


Μιχάλη Κοντομηνά, Καθηγητή του τμήματος Χημείας Πανεπιστημίου Ιωαννίνων για της εύστοχες παρατηρήσεις κατά την συγγραφή της διατριβής.

Ευχαριστώ θερμά τον Δρ. Λουκά Τσιρώνη για την φιλία και την πολύτιμη βοήθεια του και τους φίλους και συνεργάτες Δρ. Ευαγγέλια Λουρίδα, Ελένη Παπαβασιλείου, Μαρία Πετράκη, Μάχη Δημητρίου, Παντελή Αρωνή, Δρ. Αθανάσιο Παπαθανασίου άλλα και τον Δρ. Πασχάλη Θωμά Δούλια για την άψογη συνεργασία που είχαμε. Σας ευχαριστώ για την στήριξη και την βοήθεια που μου προσφέρατε κατά την διάρκεια της διατριβής. Ευχαριστώ επίσης τους συνάδελφους Δρ. Σόνια-Αθηνά Καραμπίνα, Δρ. Αφροδίτη Ταμπάκη και την Δρ. Μαρία Βίνη που παρουσία τους έκανα τα πρώτα μου βήματα στο ερευνητικό εργαστήριο.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω στους γονείς μου, για τις θυσίες τους, την κατανόηση και την συμπαράστασή τους στην πραγματοποίηση των ονείρων μου.

Η εργασία αυτή συγχρηματοδοτήθηκε από την Ευρωπαϊκή Ένωση, στα πλαίσια του προγράμματος με τίτλο «ΗΡΑΚΛΕΙΤΟΣ», του προγράμματος ΕΠΕΑΕΚ Β II του 3^{ου} Κοινοτικού Πλαισίου Στήριξης του ΥΠ.Ε.Π.Θ., με χρηματοδότηση κατά 25% από εθνικούς πόρους και κατά 75% από το Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο (ΕΚΤ).



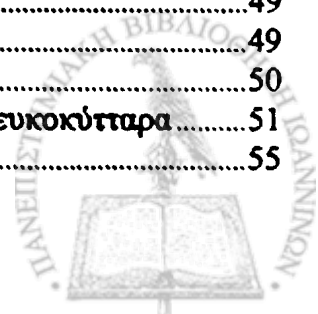
Σκοπός της Διατριβής

Σκοπός της διατριβής ήταν η διερεύνηση της πιθανής διαφοροποίησης της περιεκτικότητας των PMPs σε χαρακτηριστικές πρωτεΐνες οι οποίες αποτελούν δείκτες της παραγωγής αυτών. Επίσης μελετήθηκε και η συσχέτιση της ενζυμικής ενεργότητας της PAF-AH με τα PMPs και το κατά πόσον η έκκριση του ενζύμου συσχετίζεται με την παραγωγή αυτών. Ειδικότερα στην εργασία αυτή διερευνήθηκε ο ρόλος των παραπάνω παραγόντων στην αλληλεπίδραση των PMPs με ενδοθηλιακά κύτταρα και μονοκύτταρα από περιφερικό φλεβικό αίμα. Τέλος μελετήθηκε η επίδραση των PMPs στις λιποπρωτεΐνες του πλάσματος και η επίδραση τους στην οξειδωτική τροποποίηση των λιποπρωτεϊνών.



Περιεχόμενα

ΠΡΟΛΟΓΟΣ.....	I
ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ.....	III
ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ.....	IV
ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ.....	VII
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1^ο	1
Αιμοπετάλια.....	1
Γενικά.....	1
Δομή των αιμοπεταλίων.....	2
Η φυσιολογία των αιμοπεταλίων.....	5
Αγωνιστές των αιμοπεταλίων και οι υποδοχείς τους.....	8
Συσσώρευση των αιμοπεταλίων.....	14
Προσκόλληση των αιμοπεταλίων.....	17
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2^ο	20
Μικροσωματίδια των αιμοπεταλίων (PMPs).....	20
Γενικά.....	20
Τι είναι τα μικροσωματίδια?.....	21
Μικροσωματίδια των αιμοπεταλίων.....	23
Μηχανισμοί που συμμετέχουν στην αναδιοργάνωση της κυτταρικής μεμβράνης.....	24
Κάθαρση των PMPs από την κυκλοφορία.....	33
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3^ο	34
Χαμηλής Πυκνότητας Λιποπρωτεΐνη (LDL).....	34
Γενικά.....	34
Φαινότυπος της LDL.....	38
Η οξειδωμένη μορφή της LDL.....	39
Μηχανισμοί οξείδωσης της LDL.....	41
Ο Ρόλος των λιποπρωτεϊνών (LDL και οξειδωμένη LDL) στην φλεγμονή και την εξέλιξη της αθηρωμάτωσης.....	46
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4^ο	49
Αθηρωμάτωση - Ο ρόλος των αιμοπεταλίων.....	49
Γενικά.....	49
Ο ρόλος των αιμοπεταλίων στην αθηροθρόμβωση.....	50
Η αλληλεπίδραση των αιμοπεταλίων με το ενδοθήλιο και τα λευκοκύτταρα.....	51
Ο ρόλος των PMPs στην εξέλιξη της αθηρωμάτωσης.....	55



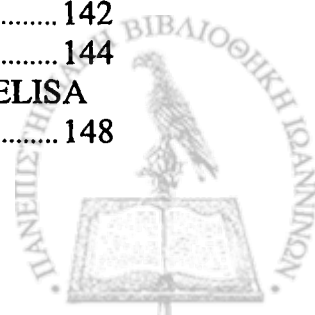
Ο ρόλος των αιμοπεταλίων και των PMPs στην εξέλιξη της αθηρωμάτωσης.....	57
Η εξέλιξη της αθηρωματικής πλάκας.....	64

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5^ο..... 67

Η Ακέτυλοϋδρολάση του Παράγοντα Ενεργοποίησης των Αιμοπεταλίων (PAF-AH)67	
Γενικά.....	67
Δομή της εκκρινόμενης μορφής της PAF-AH (PAF-AH του πλάσματος).....	68
Γονίδιο της PAF-AH και μεταλλάξεις.....	70
Σύνδεση με τις λιποπρωτεΐνες του πλάσματος.....	71
Κυτταρική πηγή προέλευσης και ρύθμιση των επιπέδων της PAF-AH του πλάσματος.....	72
PAF-AH και αθηρωμάτωση.....	75

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6^ο..... 79

Μεθοδολογία.....	79
Μελέτη της συσσώρευσης των πλυμένων αιμοπεταλίων.....	79
Απομόνωση των PMPs.....	84
Ανάλυση των PMPs με χρήση κυτταρόμετρίας ροής (Flow Cytometry).....	86
Ποσοτικός προσδιορισμός του PAF με συσσώρευση πλυμένων αιμοπεταλίων κουνελιού.....	88
Προσδιορισμός των πρωτεϊνών με τη μέθοδο BCA.....	94
Προσδιορισμός των πρωτεϊνών με τη μέθοδο LOWRY.....	96
Απομόνωση των λιποπρωτεϊνών με διαδοχικές υπερφυγοκεντρήσεις.....	98
Οξείδωση της LDL και της HDL παρουσία των PMPs.....	102
Ηλεκτροφόρηση λιποπρωτεϊνών σε πήκτωμα αγαρόζης.....	104
Μελέτη της πρόσδεσης (Binding) του επισημασμένου με FITC LDL στα PMPs με χρήση κυτταρομετρίας ροής.....	108
Προσδιορισμός ενεργότητας της PAF-AH.....	109
Απενεργοποίηση της PAF-AH στον ορό εμβρύου μόσχου (FCS).....	113
Απομόνωση μονοκυττάρων με FICOLL.....	114
Ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE 5-19%.....	118
Μεταφορά και ανοσοαποτύπωση πρωτεϊνών.....	124
Ανοσοκαταβύθιση PAF-AH των αιμοπεταλίων.....	126
Απομόνωση αγγελιοφόρου RNA (mRNA) από ανθρώπινα αιμοπετάλια.....	128
Κατεργασία του mRNA με DNAση.....	131
Αντίστροφη μεταγραφή του RNA (RT).....	133
Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR).....	134
Ηλεκτροφόρηση αγαρόζης 1% για cDNA.....	137
Ανίχνευση των PMPs και προσδιορισμός ενεργότητας της PAF-AH στο πλάσμα με μέθοδο ELISA.....	138
Μικροσκόπιο συνεστιασμού (Confocal Microscope).....	142
Καλλιέργεια ενδοθηλιακών κυττάρων.....	144
Προσδιορισμός επιπέδων MCP-1 σε υπερκείμενο κυττάρων με τη μέθοδο ELISA τύπου σάντουιτς.....	148



Στατιστική ανάλυση.....	150
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7^ο	151
Αποτελέσματα	151
Παραγωγή και χαρακτηρισμός των PMPs.....	151
Ποσοτικοποίηση του PAF των PMPs.....	157
Η έκκριση της PAF-AH από τα ανθρώπινα αιμοπετάλια	161
Χαρακτηρισμός της PAF-AH των αιμοπεταλίων.....	162
Η έκκριση της PAF-AH από τα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια συσχετίζεται με τα PMPs.....	168
Χαρακτηρισμός της PAF-AH των PMPs.....	176
Τα PMPs του πλάσματος είναι φορείς της PAF-AH.....	178
Η επίδραση των PMPs στα μονοκύτταρα.....	182
Η επίδραση των PMPs στα ενδοθηλιακά κύτταρα.....	185
Η αλληλεπίδραση των PMPs με τις λιποπρωτεΐνες του πλάσματος.....	190
Η Αλληλεπίδραση των PMPs με την LDL.....	190
Ενεργότητα της PAF-AH πριν και μετά την οξείδωση της LDL παρουσία των PMPs.....	192
Η επίδραση των PMPs με την HDL.....	193
Οξειδωτική τροποποίηση των PMPs	195
Σύνδεση των PMPs με την LDL.....	200
 ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8^ο	 202
Συζήτηση.....	202
Παραγωγή και χαρακτηρισμός των PMPs.....	202
Ποσοτικοποίηση του PAF των PMPs.....	203
Η έκκριση της PAF-AH από τα ανθρώπινα αιμοπετάλια	204
Η επίδραση των PMPs στα μονοκύτταρα.....	207
Η επίδραση των PMPs στα ενδοθηλιακά κύτταρα.....	208
Η επίδραση των PMPs με τις λιποπρωτεΐνες του πλάσματος.....	209
 ΠΕΡΙΛΗΨΗ	 212
 ABSTRACT	 215
 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	 218
 ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ	 271



Συντμήσεις

[Ca ²⁺] _i	Συγκέντρωση του ενδοκυττάρου ασβεστίου
4-HNE	4-υδροξυνοενάλη
5-HT	Σεροτονίνη
A	Αδενίνη
AC	Αδενυλοκυκλάση
AcLDL	Ακετυλιωμένη LDL
ADP	Διφωσφορική αδενοσίνη
APC	Ενεργοποιημένη πρωτεΐνη C
apo	Απολιποπρωτεΐνες
apo B-100	Απολιποπρωτεΐνη B-100
apo E	Απολιποπρωτεΐνη E
ApoER2	Υποδοχέων των απολιποπρωτεϊνών E-2
APP	β-αμυλοειδής πρωτεΐνη
Arg, R	Αργινίνη
Asn, N	Ασπαραγίνη
Asp, D	Ασπαραγινικό οξύ
ATP	Τριφωσφορική αδενοσίνη
BSA	Αλβουμίνη από ορό βοδιού
cAMP	Κυκλικό 3'5'-αδενοσινό-μονοφωσφορικό οξύ
CD62p	P-σελεκτίνη
cDNA	Συμπληρωματικό δειοξυριβονουκλεϊκό οξύ
Cer	Κηραμίδιο
CETP	Πρωτεΐνη μεταφοράς εστέρων χοληστερόλης
CM	Χυλομικρά
Cox-1	Κυκλοξυγονάση-1
Cox-2	Κυκλοξυγονάσης-2
CRP	C-αντιδράσεως πρωτεΐνη
CT	Κυκλικό όριο (cycle threshold)
Cu ²⁺	Χαλκός
DAG	Διακυλογλυκερόλη
DFP	Δισοπροπυλοφθοροφωσφορικό οξύ
DMSO	Διμεθυλοσουλφοξείδιο
DTNB	5,5-διθεο-δις-2-νιτροβενζοϊκό οξύ
EC ₅₀	Η συγκέντρωση που προκαλεί το 50% της ενεργοποίησης
EDG-1	Γονίδιο διαφοροποίησης-1 των ενδοθηλιακών κυττάρων
EDTA	Αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ
EGF	Ο επιδερμικός αυξητικός παράγοντας
EMPs	Μικροσωματίδια των ενδοθηλιακών κυττάρων
FCS	Ορό από εμβρύου μόσχου
Fg	Ινωδογόνο
FITC	Fluorescein Isothiocyanate
G	Γουανίνη
GDP	Διφωσφορική γουανοσίνη



Gln, Q	Γλουταμίνη
Gly, G	Γλυκίνη
GP	Γλυκοπρωτεΐνες
GTP	Τριφωσφορική γουανοσίνη
HDL	Υψηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνη
His, H	Ιστιδίνη
HP	Ηπατική λιπάση
HUVECs	Ανθρώπινα ενδοθηλιακά κύτταρα
ICAM-1	Μόριο της διακυτταρικής προσκόλλησης-1
IDL	Ενδιάμεση πυκνότητας λιποπρωτεΐνη
IFN-γ	Ιντερφερόνη-γ
IL-1	Ιντερλευκίνη-1
IL-10	Ιντερλευκίνη-10
IL-1β	Ιντερλευκίνη-1β
IL-6	Ιντερλευκίνη-6
IL-8	Ιντερλευκίνη-8
Ile, I	Ιντερλευκίνη
IMT	Έσω-μέσου χιτώνα
IP ₃	Τριφωσφορική ινοσιτόλη
LDL	Χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνη
LDL-FITC	LDL επισημασμένο με FITC
LDL-R	Υποδοχέας της LDL
Leu, L	Λευκίνη
Lp(a)	Λιποπρωτεΐνη a
LPA	Λυσοφωσφατιδυλοχολικό οξύ
LPL	Λιποπρωτεϊνική λιπάση
Lp-PLA ₂	Συσχετιζόμενη με της λιποπρωτεΐνες φωσφολιπάση A ₂
Lyso-PC	Λυσο-φωσφατιδυλοχολίνη
MCP-1	Χημειοτακτική πρωτεΐνη-1 των μονοκυττάρων
MDA	Μηλονική διαλδεϋδη
MFI	Μέση ένταση φθορισμού
MLCK	Κινάση της ελαφριάς αλυσίδας της μυοσίνης
MPs	Κυτταρικά μικροσωματίδια
mRNA	Αγγελιοφόρο ριβονουκλεϊκό οξύ
NF-κB	Πυρηνικός παράγοντας-κB
nLDL	Φυσική LDL
NO	Νιτρικό οξύ
O ₂	Ρίζες οξυγόνου
PAF	Ο παράγοντας ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων
PAF-AH	Ακετυλοϋδρολάση του παράγοντα ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων
PAGE	Πολυακρυλαμίδιο
PAI-1	Αναστολέας του ενεργοποιητή του πλασμινογόνου
PC	Φωσφατιδυλοχολίνη
PDGF	Ο αυξητικός παράγοντας των αιμοπεταλίων
PE	Φωσφατιδυλαιθανολαμίνη
PECAM-1 ή CD31	Προσκολλητικό μόριο των αιμοπεταλίων και των ενδοθηλιακών κύτταρων



Pefabloc	Φαινυλο-μεθυλο-σουλφονυλο-φθορίδιο
PF4, CXCL4	Αιμοπεταλιακός παράγοντας 4
PGI ₂	Προσταγλαδίνη I ₂
Phe, F	Φαινυλαλανίνη
PI	Φωσφατιδυλοϊνοσιτόλη
PIP ₂	4,5-δισφωφορική-φωσφατιδυλοϊνοσιτόλη
PKC	Πρωτεϊνοκινάση C
PLA ₁	Φωσφολιπάση A ₁
PLA ₂	Φωσφολιπάση A ₂
PLC	Φωσφολιπάση C
PLSCR	Αναδιοργάνωση των φωσφολιπιδίων
PMPs	Μικροσωματίδια των αιμοπεταλίων
PS	Φωσφατιδυλοσερίνη
PSGL-1	Ο γλυκοπρωτεϊνικός προσδέτης της P-σελεκτίνης
PTK	Πρωτεϊνοκινάση της τυροσίνης
PUFAs	Πολυακόρεστα λιπαρά οξέα
REM	Σχετικής ηλεκτροφορητική κινητικότητα
-S'	Ρίζες θείου
Ser, S	Σερίνη
SM	Σφιγγομυελίνη
SMC	Λεία μυϊκά κύτταρα
-sn-	Στερεοειδική αρίθμηση
SOCE	Σύστημα μεταφοράς Ca ²⁺
SPP	Φωσφορική σφιγγοσίνη-1
T	Θυμίνη
TCA	Τριγλωροξικό οξύ
TF	Ιστικός παράγοντας
TGF-β	Ο μετασχηματίζων αυξητικός παράγοντας-β
TNF-α	Παράγοντας νέκρωσης των όγκων-α
tPA	Ιστικός ενεργοποιητής του πλασμινογόνου
Trp, W	Θρυπτοφάνη
TRPC	Transient Receptor Potential channel
TS	Συνθάση του θρομβοξανίου
TxA ₂	Θρομβοξάνιο A ₂
Val, V	Βαλίνη
VCAM-1	Προσκολλητικό μόριο του αγγειακού τοιχώματος-1
VEGF	Αυξητικός παράγοντας των ενδοθηλιακών κυττάρων του αγγείου
VHDL	Πολύ υψηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνες
VLDL	Πολύ χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνες
VLDL-R	Υποδοχέας της VLDL
vWF	Παράγοντας von Willebrand
AA	Αραχιδονικό οξύ
β-TG	β-θρομβογλοβουλίνη
βιταμίνη E ή α-T	α-τοκοφερόλη
E.E.	Ειδική Ενεργότητα
ε-NH ₂	ε-αμινοομάδες
HOCl	Υποχλωριώδες οξύ



NO ₂	Διοξείδιο του αζώτου
NOO ⁻	Υπεροξυνιτρικό ανιόν
O ₂	Οξυγόνο
oxLDL	Οξειδωμένη LDL
OEM	Οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου
OH ⁻	Ρίζα υδροξυλίου



ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1^ο

Αιμοπετάλια

Γενικά

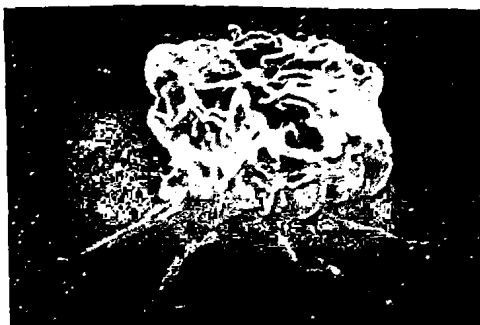
Τα αιμοπετάλια είναι κύτταρα του αίματος και αποτελούν το 0.5% του όγκου αυτού. Παράγονται στο μυελό των οστών από το θρυμματισμό του κυτταροπλάσματος των μεγακαρυοκυττάρων και γι' αυτό το λόγο είναι απύρρηνα κύτταρα. Τα αιμοπετάλια έχουν διάμετρο περίπου 2-5 μm , χρόνο ζωής 7-10 ημέρες και ο αριθμός τους κυμαίνεται από 150,000/ mm^3 - 450,000/ mm^3 [1]. Παρόλο που είναι απύρρηνα κύτταρα περιέχουν αρκετά υποκυτταρικά οργανίδια όπως είναι τα μιτοχόνδρια, τα ριβοσώματα, το mRNA διαφόρων πρωτεϊνών, ο κυτταροσκελετός καθώς επίσης και πολλά κοκκία που χρησιμεύουν στη λειτουργία του αιμοπεταλίου. Επιπρόσθετα, τα αιμοπετάλια στο εσωτερικό τους περιέχουν ένα πολύπλοκο μεμβρανικό σωληνοειδές σύστημα το οποίο συνδέεται με την κυτταρική μεμβράνη [2]. Σε κατάσταση ηρεμίας τα αιμοπετάλια έχουν δισκοειδές σχήμα, το οποίο υποστηρίζεται από τα μικρονημάτια που βρίσκονται στην επιφάνειά τους (Εικόνα 1Α). Κατά την κυκλοφορία τους, τα αιμοπετάλια τείνουν να συγκεντρώνονται στην περιφέρεια της αιματικής ροής και έτσι μπορούν να αναγνωρίσουν και να ανταποκριθούν γρήγορα σε οποιαδήποτε βλάβη του ενδοθηλίου. Η κύρια λειτουργία των αιμοπεταλίων είναι η συσσώρευση, η οποία πραγματοποιείται διάμεσου γεφυρών ινωδογόνου (Fg) παρουσία ιόντων Ca^{2+} [3-5]. Με αυτό τον τρόπο σχηματίζονται συσσωρεύματα μεταξύ των αιμοπεταλίων που εμπλέκονται στη διαδικασία της αιμόστασης. Τα ανθρώπινα αιμοπετάλια ενεργοποιούνται από διάφορους αγωνιστές όπως η διφωσφορική αδενοσίνη (ADP), η θρομβίνη και το κολλαγόνο [6-8].



A)



B)



Εικόνα 1: A) Χαρακτηριστικό σχήμα των αιμοπεταλίων σε ηρεμία [9]. B) Ενεργοποιημένα αιμοπετάλια όπου διακρίνεται η εκβολή ψευδοποδιών [10].

Δομή των αιμοπεταλίων

Ο White [11] θέλοντας να συσχετίσει τη δομή με τη λειτουργία του κυττάρου χώρισε την ανατομία του αιμοπεταλίου σε τρεις ζώνες, την περιφερειακή ζώνη, τη ζώνη του κυτοσολίου και τη ζώνη των οργανιδίων.

Η περιφερειακή ζώνη περιέχει την κυτταρική μεμβράνη με όλα τα δομικά της στοιχεία, όπως η λιπιδιακή διπλοστοιβάδα, οι διαμεμβρανικές πρωτεΐνες και οι πρωτεΐνες του κυτταροσκελετού. Επιπρόσθετα, η ζώνη αυτή περιλαμβάνει περιοχές πλούσιες σε γλυκοπρωτεΐνες και διαμεμβρανικούς υποδοχείς για διάφορους αγωνιστές των αιμοπεταλίων όπως είναι η επινεφρίνη, η θρομβίνη, το ADP, το θρομβοξάνιο A_2 (TXA_2) και ο παράγοντας ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων (platelet activating factor, PAF). Ο γλυκοκάλυκας που περιβάλλει τη μεμβράνη των αιμοπεταλίων, έχει πάχος 10-20 nm και αποτελείται από υδατάνθρακες. Η ακριβής σύσταση του περιβλήματος αυτού δεν είναι γνωστή, αλλά θεωρείται σημαντική γιατί προσδίδει αρνητικό φορτίο στη μεμβράνη. Ο γλυκοκάλυκας διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη συσσώρευση και προσκόλληση των αιμοπεταλίων. Η κυτταρική μεμβράνη των αιμοπεταλίων αποτελείται από διάφορα φωσφολιπίδια κυρίως την σφιγγομυελίνη (SM) που καλύπτει το 90% της επιφάνειας των αιμοπεταλίων αλλά και την φωσφατιδυλοχολίνη (PC) που καλύπτει το 60% αντίστοιχα [12-14] (Πίνακας 1). Ενώ η φωσφατιδυλοσερίνη (PS) και η φωσφατιδυλοαιθανολαμίνη (PE) βρίσκονται κυρίως ενδοκυττάρια.



Πίνακας 1: Κατανομή των φωσφολιπιδίων στα αιμοπετάλια.

Φωσφολιπίδια	% του συνόλου των φωσφολιπιδίων	% έκφραση στην επιφάνεια των αιμοπεταλίων
Φωσφατιδυλοχολίνη (PC)	38%	60%
Φωσφατιδυλοαιθανολαμίνη (PE)	27%	20%
Σφιγγομυελίνη (SM)	17%	90%
Φωσφατιδυλοσερίνη (PS)	10%	Ίχνη
Φωσφατιδυλοϊνοσιτόλη (PI)	5%	Ίχνη

Είναι γνωστό ότι οι κύριοι παράγοντες πήξης, όπως οι παράγοντες V και XI, βρίσκονται συνδεδεμένοι στο γλυκοκάλυκα [15]. Πολλές από τις γλυκοπρωτεΐνες των αιμοπεταλίων έχουν διαμόρφωση υποδοχέα και συμμετέχουν στους μηχανισμούς συσσώρευσης ή προσκόλλησης στο αρτηριακό τοίχωμα. Οι κυριότερες από αυτές είναι οι γλυκοπρωτεΐνες της οικογένειας των ιντεγκρινών καθώς και οι πλούσιες σε λευκίνη γλυκοπρωτεΐνες.

Οι ιντεγκρίνες αποτελούνται από δυο υπομονάδες, την α και τη β υπομονάδα. Η σύνδεση μεταξύ τους γίνεται με μη ομοιοπολικούς δεσμούς σε διάφορες αναλογίες. Οι κυριότερες ιντεγκρίνες που απαντούν στα αιμοπετάλια είναι η $\alpha_{IIb}\beta_3$ (GPIIb/IIIa), η $\alpha_2\beta_1$ (GP Ia/IIa), η $\alpha_5\beta_1$ (GP Ic/IIa) και η $\alpha_v\beta_3$ [16,17] (Πίνακας 2). Από την οικογένεια των πλούσιων σε λευκίνη γλυκοπρωτεϊνών (GP), στη μεμβράνη των μη ενεργοποιημένων αιμοπεταλίων βρίσκονται η GPIb, η GPIX, και η GPV.



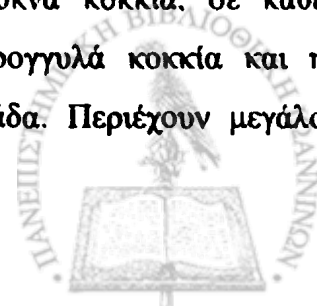
Πίνακας 2: Οι ιντεγκρίνες των αιμοπεταλίων και οι προσδέτες τους.

Ιντεγκρίνες	Προσδέτης
GPIa/IIa (VLA-2, $\alpha_2\beta_1$)	Κολλαγόνο
GPIc/IIIa (VLA-5, $\alpha_5\beta_1$)	Φιβρονεκτίνη
GPIIb/IIIa ($\alpha_{IIb}\beta_3$)	Ινωδογόνο, φιβρονεκτίνη, βιτρονεκτίνη, vWF
Υποδοχέας βιτρονεκτίνη ($\alpha_v\beta_3$)	Ινωδογόνο, φιβρονεκτίνη, βιτρονεκτίνη, vWF, θρομβοσπονδίνη
Περιοχή GPIc/IIa ($\alpha_6\beta_1$)	Λαμινίνη

Εκτός από την κυτταρική μεμβράνη και το γλυκοκάλυκα, η περιφερειακή ζώνη του αιμοπεταλίου περιλαμβάνει και τις πρωτεΐνες του κυτταροσκελετού. Παράλληλα, η παρουσία ενός συστατικού συστήματος βοηθάει στην αλλαγή του σχήματος του αιμοπεταλίου, στη δημιουργία ψευδοποδιών, στη σύσπαση του κυτταροσκελετού και στην έκκριση των πυκνών και α-κοκκίων (Εικόνα 1B). Το σύστημα αυτό αποτελείται κυρίως από την ακτίνη, ενώ άλλες σημαντικές πρωτεΐνες που απαντούν σ' αυτό είναι η μυοσίνη, η τροπομυοσίνη, η πρωτεΐνη που δεσμεύει την ακτίνη, η α-ακτινίνη και η σπεκτρίνη. Τα μορφολογικά χαρακτηριστικά που περιγράφονται παραπάνω στηρίζουν τη δισκοειδή μορφή του αιμοπεταλίου.

Η ζώνη του κυτοσολίου περιέχει ίνες, νημάτια και διάφορες πρωτεΐνες που βρίσκονται σε κατάσταση πολυμερισμού. Επίσης στη ζώνη του κυτοσολίου βρίσκεται το ανοιχτό διαυλικό σύστημα (open canalicular system, OCS) που συνδέεται με την επιφάνεια του αιμοπεταλίου. Με αυτό τον τρόπο δημιουργείται μια οδός για τη μετακίνηση των βιοδραστικών ουσιών του ενεργοποιημένου αιμοπεταλίου προς την εξωτερική επιφάνεια [9].

Τέλος, η ζώνη των οργανιδίων περιέχει τα πυκνά και α-κοκκία, τα λυσοσώματα, τα μιτοχόνδρια και το γλυκογόνο. Αυτή η ζώνη χρησιμεύει για την αποθήκευση ορισμένων ενζύμων, νουκλεοτιδίων, σεροτονίνης, πρωτεϊνών, ιόντων Ca^{2+} , αντιοξειδωτικών, ταυρίνης και γλουταθειόνης. Ο αριθμός των πυκνών κοκκίων κυμαίνεται από 2-10 σε κάθε αιμοπετάλιο. Τα πυκνά κοκκία περιέχουν νουκλεοτίδια (ADP, τριφωσφορική αδενοσίνη (ATP)), σεροτονίνη και ιόντα Ca^{2+} [18]. Παράλληλα με τα πυκνά κοκκία, σε κάθε αιμοπετάλιο υπάρχουν 20-200 α-κοκκία. Τα α-κοκκία είναι στρογγυλά κοκκία και η μεμβράνη τους αποτελείται από μια φωσφολιπιδιακή διπλοστοιβάδα. Περιέχουν μεγάλο



αριθμό από παράγοντες χρήσιμους για την αιμοπεταλιακή λειτουργία. Επίσης περιέχουν Fg, τον αιμοπεταλιακό παράγοντα 4 (platelet activating factor, PF4), τον παράγοντα von Willebrand (vWF), τη φιβρονεκτίνη και τον αναστολέα του ενεργοποιητή του πλασμινογόνου (PAI-1) [19]. Στο εσωτερικό της μεμβράνης των α-κοκκίων υπάρχει η P-σελεκτίνη (CD62p ή GMP-140), μια γλυκοπρωτεΐνη η οποία διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην προσκόλληση των αιμοπεταλίων με τα λευκοκύτταρα και το ενδοθήλιο [20]. Η P-σελεκτίνη αναγνωρίζει ως προσδέτες μεμβρανικούς ολιγοσακχαρίτες, οι οποίοι περιέχουν στο μόριο τους σιαλυλομάδες και μοιάζουν δομικά με τον sialyl-Lewis X (sLe^X) [21]. Επιπρόσθετα, το πυκνό σωληνοειδές σύστημα (dense tubular system, DTS) περιέχει ένζυμα για το μεταβολισμό του αραχιδονικού οξέος (AA) και τη σύνθεση των διαφόρων προσταγλανδινών που χρησιμεύουν στην αιμοπεταλιακή λειτουργία.

Η φυσιολογία των αιμοπεταλίων

Τα αιμοπετάλια εμπλέκονται σε διάφορες παθοφυσιολογικές καταστάσεις όπως είναι η φλεγμονή, η θρόμβωση και η επαναστένωση. Οι φυσιολογικοί αγωνιστές των αιμοπεταλίων, δεν μπορούν να διαπεράσουν την κυτταρική μεμβράνη. Κατά συνέπεια απαιτούνται ειδικοί υποδοχείς στην επιφάνεια των αιμοπεταλίων για τη δέσμευσή τους. Η ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων, έχει ως αποτέλεσμα τη διέγερση διαφόρων μεταβολικών οδών, την αλλαγή του σχήματος των αιμοπεταλίων, τη μεταβολή της συγκέντρωσης του ενδοκυττάριου ασβεστίου ($[Ca^{2+}]_i$), την αποκοκκίωση των αιμοπεταλίων καθώς επίσης και την ενεργοποίηση του υποδοχέα $\alpha_{IIb}\beta_3$ [22-30].

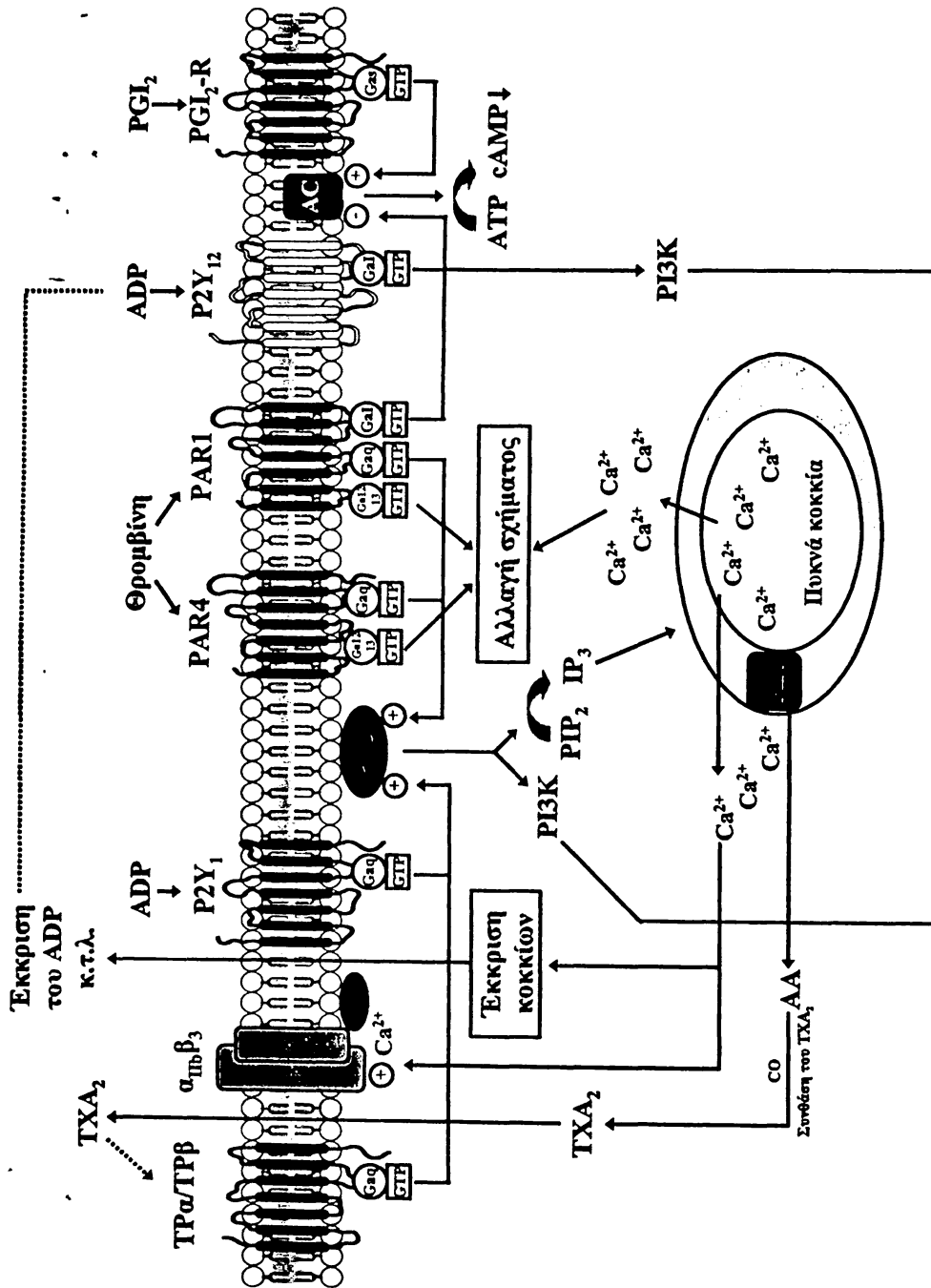
Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, οι κύριοι αγωνιστές των αιμοπεταλίων είναι το ADP, η επινεφρίνη, το TxA_2 , η θρομβίνη και ο PAF. Η ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων οδηγεί στο σχηματισμό των ψευδοποδίων, την αλλαγή του σχήματος, την προσκόλληση, τη συσσώρευση και την έκκριση του περιεχομένου των πυκνών και α-κοκκίων τους.

Οι υποδοχείς του ADP, της επινεφρίνης, του TxA_2 , της θρομβίνης και του PAF έχουν ήδη περιγραφεί [28,31]. Οι υποδοχείς των αγωνιστών αυτών συνδέονται με πρωτεΐνες που δεσμεύουν τη φωσφατάση της τρισφωφορικής γουανοσίνης (GTP). Τα αιμοπετάλια περιέχουν μονομερείς, χαμηλού μοριακού βάρους G-πρωτεΐνες αλλά και ετεροτριμερείς G-



πρωτεΐνες. Το GTP δεσμεύεται στην α-υπομονάδα της G-πρωτεΐνης, με αποτέλεσμα την υδρολύση του προς διφωσφορική γουανοσίνη (GDP) [30]. Πολλοί αγωνιστές των αιμοπεταλίων συνδέονται στους συζευγμένους με G-πρωτεΐνες υποδοχείς και ενεργοποιούν μονοπάτια σηματοδότησης. Οι G-πρωτεΐνες μεταβιβάζουν στη συνέχεια αυτού του είδους τα σήματα με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση του κύκλου της φωσφατιδυλοϊνοσιτόλης (PI). Η PI είναι ένα ελάσσον φωσφολιπίδιο της κυτταρικής μεμβράνης το οποίο βρίσκεται στην εσωτερική επιφάνειά της. Η φωσφορυλίωση της PI από το ATP έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό της 4,5-δισφωφορικής-φωσφατιδυλοϊνοσιτόλης (PIP₂) η οποία στη συνέχεια με τη δράση του μεμβρανικού ενζύμου φωσφολιπάση C (PLC), υδρολύεται προς δύο ενδοκυττάριους αγγελιοφόρους, τη διακυλογλυκερόλη (DAG) και την τριφωσφορική ινοσιτόλη (IP₃). Η PLC, συνδέεται με το μεμβρανικό υποδοχέα διαμέσου των G-πρωτεϊνών οι οποίες στην περίπτωση αυτή είναι μόνο διεγερτικές G-πρωτεΐνες. Έτσι, η σύνδεση του αγωνιστή στον υποδοχέα προκαλεί την ενεργοποίηση της διεγερτικής G-πρωτεΐνης και στη συνέχεια, διαμέσου αυτής, την ενεργοποίηση της PLC. Η IP₃ απελευθερώνει το Ca²⁺ από τις ενδοκυττάριες αποθήκες, κυρίως τα πυκνά κοκκία, αυξάνοντας την [Ca²⁺]_i στο κυτοσόλιο. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την πλήρη ενεργοποίηση του κύκλου της PI και την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων (Εικόνα 2).





Εικόνα 2: Ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων και του κύκλου της φωσφατιδυλινοσιτόλης (τροποποιημένο από Jurk et al.) [32].



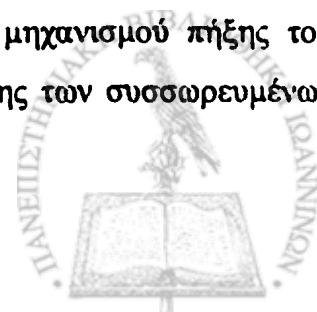
Το κυκλικό 3'5'-αδενοσινο-μονοφωσφορικό οξύ ή κυκλικό AMP (cAMP) είναι αναστολέας των αιμοπεταλίων. Το cAMP παράγεται από το ATP με τη δράση του ενζύμου αδενυλοκυκλάση (AC) που βρίσκεται στην εσωτερική επιφάνεια της κυτταρικής μεμβράνης. Το cAMP απενεργοποιείται γρήγορα προς 5'-AMP με τη δράση του ενζύμου φωσφοδιεστεράση. Η AC είναι συζευγμένη με μεμβρανικούς υποδοχείς διαμέσου G-πρωτεϊνών. Υπάρχουν δύο τύποι G-πρωτεϊνών, ο ένας ενεργοποιεί την AC και είναι γνωστός ως G_s -πρωτεΐνη και ο άλλος αναστέλλει την AC και είναι γνωστός ως G_i -πρωτεΐνη. Παράλληλα, και μεμβρανικοί υποδοχείς συζεύγνυνται με την AC διαμέσου των G_s -πρωτεϊνών, οπότε η πρόσδεση του αγωνιστή σε αυτούς ενεργοποιεί την AC και αυξάνει το cAMP. Μετά το σχηματισμό του, το cAMP ενεργοποιεί κινάσες οι οποίες καταλύουν τη φωσφορυλίωση ειδικών πρωτεϊνών δημιουργώντας έτσι μόρια που δεσμεύονται χημικά με τα ιόντα Ca^{2+} . Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση την $[Ca^{2+}]_i$ στον ενδοκυττάριο χώρο [33]. Η πρόσδεση του αγωνιστή διαμέσου των G_i -πρωτεϊνών αναστέλλει την AC και μειώνει το cAMP (Εικόνα 2).

Η προσταγλανδίνη I_2 (προστακυκλίνη, PGI_2) παράγεται στο ενδοθήλιο και χρησιμεύει ως φυσικός αναστολέας των αιμοπεταλίων. Επίσης τα ενδοθηλιακά κύτταρα εκτός από την έκκριση της PGI_2 εκκρίνουν και αντιθρομβωτικές ουσίες όπως είναι το νιτρικό οξύ (NO) και ο ιστικός ενεργοποιητής του πλασμινογόνου (tPA). Η έκκριση μορίων NO από το ενδοθήλιο, προκαλεί τη μείωση του $[Ca^{2+}]_i$ και κατά συνέπεια αναστολή της προσκόλλησης των αιμοπεταλίων στο ενδοθήλιο και την περαιτέρω ενεργοποίηση ή συσσώρευσή τους [34].

Αγωνιστές των αιμοπεταλίων και οι υποδοχείς τους

Θρομβίνη

Η θρομβίνη είναι ο πιο ισχυρός αγωνιστής των αιμοπεταλίων, *in vivo*. Η θρομβίνη, *in vivo*, υπάρχει κυρίως στην ανενεργή της μορφή γνωστή με τον όρο προθρομβίνη. Η προθρομβίνη είναι μια σφαιρίνη του πλάσματος η οποία βιοσυντίθεται στο ήπαρ. Η μετατροπή της σε θρομβίνη γίνεται κατά την ενεργοποίηση του μηχανισμού πήξης του αίματος. Η προθρομβίνη συνδέεται στα φωσφολιπίδια της μεμβράνης των συσσωρευμένων



αιμοπεταλίων μαζί με το μετατρεπτικό παράγοντα της προθρομβίνης, ο οποίος την υδρολύει προς α-θρομβίνη αποσπώντας ένα ανενεργό πεπτίδιο από το μόριο της. Μετά το σχηματισμό της, η θρομβίνη υδρολύει το Fg οδηγώντας στο σχηματισμό του ινώδους.

Η θρομβίνη, προκαλεί την ενεργοποίηση του κύκλου της PI, ενεργοποιεί το μηχανισμό του AA και το σχηματισμό TxA_2 και αυξάνει το $[Ca^{2+}]_i$ *in vitro*. Επιπρόσθετα, προκαλεί την αλλαγή του σχήματος, την έκκριση των κοκκίων και τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων. Η θρομβίνη δεσμεύεται σε δυο διαφορετικούς υποδοχείς. Αυτοί είναι: οι PARs (Protease Activated Receptors) και το σύμπλοκο GPIb-IX-V. Στα ανθρώπινα αιμοπετάλια η θρομβίνη πρωτεολύει δυο PAR υποδοχείς, τον PAR1 [35,36] και τον PAR4 [35,37]. Έχουν βρεθεί τέσσερις υποδοχείς που ανήκουν στην οικογένεια των PARs, και χωρίζονται σε δυο κατηγορίες: υποδοχείς ευαίσθητοι στην θρομβίνη PAR1, PAR3 και PAR4, και υποδοχείς ευαίσθητοι στον ενεργοποιημένο με θρυψίνη υποδοχέα PAR2 (γνωστό και ως F2R, F2R11, F2RL2 και F2RL3, αντίστοιχα). Οι υποδοχείς των PARs δρουν διάμεσου G_q -πρωτεϊνών και ενεργοποιούν μια φωσφολιπάση C β (PLC β) οδηγώντας στη φωσφορυλίωση της PI από το ATP με αποτέλεσμα το σχηματισμό της PIP $_2$. Η PIP $_2$ στη συνέχεια με την επίδραση ενός μεμβρανικού ενζύμου της PLC, υδρολύεται προς δύο ενδοκυττάριους αγγελιοφόρους, τη DAG και την IP $_3$. Το IP $_3$ απελευθερώνει το Ca^{2+} από τις ενδοκυττάριες αποθήκες, αυξάνοντας την $[Ca^{2+}]_i$ και την περαιτέρω ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων. Ο PAR1 συνδέεται με τις G_q , $G_{12/13}$, και $G_{z/i}$ πρωτεΐνες ενώ ο δεύτερος μόνο με τις G_q πρωτεΐνες [35,37-39].

Η πρωτεόλυση του PAR1 από τη θρομβίνη συνοδεύεται από την ενεργοποίηση πολλών πρωτεϊνών, όπως η PLC β , η κινάση του φωσφοϊνσιτιδίου-3 (PI3K) και οι RhoA/Rho κινάσες. Ο υποδοχέας PAR1 έχει μετρίου βαθμού συγγένεια με τη θρομβίνη και ενεργοποιεί το αιμοπετάλιο διαμέσου του κύκλου της PI. Ο υποδοχέας PAR1 ενεργοποιείται με την υδρόλυση του πεπτιδικού δεσμού μεταξύ Arg41 και Ser42, η οποία καταλύεται από τη θρομβίνη οδηγώντας στο σχηματισμό ενός νέου αμινοτελικού-άκρου (the "tethered ligand"), το οποίο αλληλεπιδρά με υπολείμματα αμινοξέων που βρίσκονται στην εξωκυττάρια περιοχή του υποδοχέα καθώς επίσης και με το αμινοτελικό άκρο της θρομβίνης [36,40-42]. Το νέο αμινοτελικό άκρο αποτελείται από το πεπτίδιο με την αλληλουχία Ser-Phe-Leu-Leu-Arg-Asn (SFLLRN). Το SFLLRN μπορεί να ενεργοποιήσει τα αιμοπετάλια απουσία της α-θρομβίνης.

Η μετρίου βαθμού συγγένεια του PAR1 με τη θρομβίνη οδηγεί στην ενεργοποίηση της

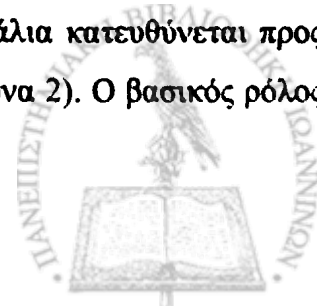


φωσφολιπάσης A_2 (PLA_2) καθώς και στην απενεργοποίηση της AC διάμεσου G-πρωτεϊνών [43-45]. Οι Covic L et al. [46] παρατήρησαν ότι ο PAR1 συμμετέχει στη βραχεία (short-lived) αλλά και πρόωμη (early) μεταφορά του Ca^{2+} στον ενδοκυττάριο χώρο, ενώ ο PAR4 ασκεί τη δράση της παρατεταμένης μεταφοράς Ca^{2+} (Εικόνα 2). Μελέτες έχουν δείξει ότι ο PAR1 ενεργοποιείται σε χαμηλές συγκεντρώσεις θρομβίνης με τιμή EC_{50} 50pM (EC_{50} , η συγκέντρωση που προκαλεί το 50% της ενεργοποίησης) [35,47,48]. Απουσία όμως του PAR1 η ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων μπορεί να γίνει και διάμεσου του PAR4 αλλά βασική προϋπόθεση είναι ότι απαιτεί 50 φορές μεγαλύτερη δόση θρομβίνης για να προκαλέσει την ίδια ενεργοποίηση στα αιμοπετάλια (EC_{50} 5nM) [35].

Ο δεύτερος υποδοχέας της θρομβίνης, το σύμπλοκο GPIb-IX-V, αποτελείται από την α -(130kDa) και β -(25kDa) υπομονάδα που συνδέονται μεταξύ τους με δισουλφιδικούς δεσμούς. Η GPIb συνδέεται με την GPIX (22kDa) με μη ομοιοπολικούς δεσμούς καθώς επίσης και χαλαρά με το GPV (82kDa) σε αναλογία 2:2:2:1 [49]. Το σύμπλοκο GPIb-IX-V έχει μεγάλη συγγένεια για την α -θρομβίνη [50]. Η ενεργοποίηση με α -θρομβίνη προκαλεί την ενεργοποίηση της ζ ισομορφής της PLA_2 που οδηγεί στο σχηματισμό του AA καθώς και στην ενεργοποίηση της πρωτεϊνοκινάσης της τυροσίνης (PTK). Οι παραπάνω δράσεις οδηγούν στην αύξηση του $[Ca^{2+}]_i$, στην έκκριση των κοκκίων και στη συσσώρευση των αιμοπεταλίων.

Θρομβοξάνιο A_2 (TxA_2)

Το θρομβοξάνιο A_2 (TxA_2) είναι προϊόν του μεταβολισμού του AA. Κατά την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων ενεργοποιείται η PLA_2 και καταλύει την απελευθέρωση του AA το οποίο βρίσκεται εστεροποιημένο στην *sn*-2 θέση των μεμβρανικών φωσφολιπιδίων. Με τη δράση του ενζύμου κυκλοξυγονάση-1 (Cox-1) το AA μετατρέπεται στα ασταθή ενδοϋπεροξειδία (PGG_2 και PGH_2) και στη συνέχεια σε TxA_2 παρουσία του ενζύμου συνθάση του θρομβοξανίου (TS) [51]. Οι υποδοχείς των αιμοπεταλίων που δεσμεύουν το TxA_2 αναγνωρίζουν επίσης το ενδοϋπεροξειδίο PGH_2 και γι' αυτό το λόγο ονομάζονται υποδοχείς TxA_2/PGH_2 [52]. Ο υποδοχέας TxA_2/PGH_2 μετονομάστηκε σε υποδοχέα TP από την International Union of Pharmacology Classification of Prostanoid Receptors [53]. Η βιοσύνθεση και έκκριση του TxA_2 από τα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια κατευθύνεται προς τους ειδικούς υποδοχείς τους ενεργοποιώντας τον κύκλο της PI (Εικόνα 2). Ο βασικός ρόλος



του TxA_2 είναι η ενίσχυση της αρχικής ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων με αποτέλεσμα την στρατολόγηση των αιμοπεταλίων στην περιοχή της βλάβης [54]. Η δράση του TxA_2 περιορίζεται μόνο στην περιοχή της βλάβης διότι παρουσιάζει μικρό χρόνο ημιζωής (half-life) στο πλάσμα και η δράση που ασκεί στα γειτονικά αιμοπετάλια γίνεται στα πρώτα 30sec μετά από την έκκριση του.

Διφωσφορική αδενοσίνη (ADP)

Το ADP είναι αποθηκευμένη στα πυκνά κοκκία και εκκρίνεται κατά την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων. Το ADP συνδέεται με πουρινεργικούς υποδοχείς, όπως οι $P2Y_1$ και $P2Y_{12}$. Ο $P2Y_1$ υποδοχέας συνδέεται με μια G_q πρωτεΐνη. Η πρόσδεση του ADP προκαλεί αύξηση του $[Ca^{2+}]_i$ και την παράλληλη ενεργοποίηση της PLCβ με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση του υποδοχέα $\alpha_{IIb}\beta_3$ [55-58]. Πιστεύεται ότι ο υποδοχέας $P2Y_1$ χρησιμοποιείται κυρίως για τη μεταφορά του Ca^{2+} στο κυτοσόλιο του αιμοπεταλίου [59], στην ενεργοποίηση της PLCβ, στην απελευθέρωση του Ca^{2+} από τα πυκνά κοκκία και πιθανώς στην εισροή Ca^{2+} στο κύτταρο (Εικόνα 2). Ο υποδοχέας $P2Y_{12}$ φαίνεται να διαδραματίζει ρόλο κλειδί στις βιοχημικές αντιδράσεις που προκαλούν την πλήρη ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων [60].

Πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι ο υποδοχέας $P2Y_{12}$ συμμετέχει στην αποκοκκίωση των πυκνών κοκκίων [61], στην ενεργοποίηση του υποδοχέα $\alpha_{IIb}\beta_3$ [62-66] και στο σχηματισμό του θρόμβου [67,68]. Ο υποδοχέας αυτός παίζει σημαντικό ρόλο στην μη-αντιστρεπτή συσσώρευση των αιμοπεταλίων προκαλούμενη από το ADP, το TxA_2 και το γνωστό πεπτίδιο SFLLRN [69,70]. Επίσης, αναστέλλει την AC [60,71] αλλά δεν συμμετέχει στην κινητοποίηση του Ca^{2+} και στην αλλαγή σχήματος των αιμοπεταλίων μετά από ενεργοποίηση με ADP [69,70]. Επιπρόσθετα, ο υποδοχέας $P2X_1$ αναγνωρίζει το ATP ή το ADP και προκαλεί μια μικρή σύστασης αλλά γρήγορη μεταφορά του Ca^{2+} προς τον ενδοκυττάριο χώρο του αιμοπεταλίου [72]. Οι Daneil et al. [73] με σχετικά πρόσφατη μελέτη τους προτείνουν και ένα τρίτο υποδοχέα (τον $P2T_{AC}$) ο οποίος φαίνεται να είναι υπεύθυνος για την αναστολή της AC και τη μείωση του cAMP, υπόθεση η οποία βρίσκεται ακόμα υπό διερεύνηση.

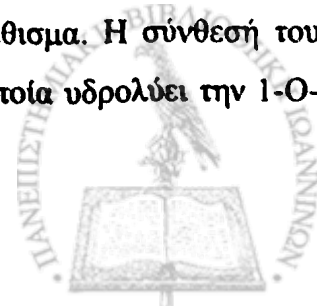


Ο Παράγοντας Ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων (PAF)

Ο Παράγοντας Ενεργοποίησης των Αιμοπεταλίων (1-O-alkyl-2-acetyl-sn-glycero-3-phosphocholine, PAF) είναι ένα βιολογικά δραστικό φωσφολιπίδιο που προκαλεί την ενεργοποίηση, τη συσσώρευση και την έκκριση των κοκκίων των αιμοπεταλίων τόσο *in vivo* όσο και *in vitro* [74,75]. Ο PAF είναι ένας χημικός διαβιβαστής ο οποίος διαδραματίζει ρόλο στην κυτταρική επικοινωνία, έχοντας έτσι παρόμοια λειτουργική συμπεριφορά με τις ορμόνες, τις κυτταροκίνες και τις ιντερλευκίνες [76,77]. Στα κύτταρα, σε συνθήκες ηρεμίας, ο PAF δεν ανιχνεύεται. Όταν αυτά όμως διεγερθούν, παράγεται και κατόπιν εκκρίνεται ή εκφράζεται στη μεμβράνη τους. Στη συνέχεια ο PAF ενεργοποιεί, διάμεσου των ειδικών υποδοχέων του, τα κύτταρα στόχους [78].

Το 1991 οι Honda et al. κλωνοποίησαν το cDNA του υποδοχέα του PAF από πνεύμονα χοίρου guinea [79]. Η ανάλυση του cDNA έδειξε ότι ο υποδοχέας του PAF αποτελείται από 342 αμινοξέα και έχει μοριακή μάζα 39 kDa. Η δομή του υποδοχέα του PAF είναι όμοια με αυτή της υπεροικογένειας των συζευγμένων με G-πρωτεΐνες υποδοχέων. Πρόκειται για μια μονή πολυπεπτιδική αλυσίδα η οποία σχηματίζει 7 διαμεμβρανικά τμήματα. Το καρβοξυτελικό κυτταροπλασματικό άκρο περιέχει 4 κατάλοιπα σερίνης και 5 κατάλοιπα θρεονίνης ως πιθανά σημεία φωσφορυλίωσης από τις κινάσες των συζευγμένων με G-πρωτεΐνες υποδοχέων.

Η δράση του PAF δεν περιορίζεται μόνο στο κύτταρο από το οποίο εκκρίνεται, αλλά και σε παρακείμενα κύτταρα, εμφανίζοντας ενδοκρινή, παρακρινή και συνδετοκρινή δράση. Ο PAF εμπλέκεται σε διάφορες φυσιολογικές λειτουργίες, αποτελεί όμως και το διαμεσολαβητή διαφόρων παθοφυσιολογικών αντιδράσεων όπως είναι η φλεγμονή, ο σχηματισμός θρόμβου και οι αλλεργικές αντιδράσεις [80]. Υπάρχουν δυο κύριες ενζυμικές πορείες για τη βιοσύνθεση του PAF, η πορεία ανασύνθεσης (remodelling pathway) και η πορεία βιοσύνθεσης «εκ νέου» (*de novo* pathway). Τα αιμοπετάλια βιοσυνθέτουν PAF όταν ενεργοποιηθούν με τους κατάλληλους αγωνιστές όπως το ιονοφόρο του Ca^{2+} (A23187) [81-83]), η θρομβίνη [81,84] και το κολλαγόνο (η ποσότητα του PAF που παράγεται κυμαίνεται από: $0,25-3 \text{ pmoles}/10^8$ αιμοπετάλια). 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 PLA_2 , η οποία υδρολύει την 1-O-



αλκυλο-2-αραχιδονούλο-*sn*-γλυκερο-3-φωσφοχολίνη σε 1-Ο-αλκυλο-*sn*-γλυκερο-3-φωσφοχολίνη (lyso-PAF). Το δεύτερο βήμα στη σύνθεση του PAF πραγματοποιείται με τη δράση της ακετυλο-συνένζυμο Α:lyso-PAF ακετυλοτρανσφεράσης. Η *de novo* πορεία βιοσύνθεσης του PAF καταλύεται από μία CDP-φωσφοχολινοτρανσφεράση. Το αρχικό υπόστρωμα 1-Ο-αλκυλο-2-λυσο-*sn*-γλυκερο-3-φωσφορικό οξύ ακετυλιώνεται στην *sn*-2 θέση με τη δράση της ακετυλοCoA- ακετυλοτρανσφεράσης παρουσία ακετυλοCoA. Στη συνέχεια με τη δράση της φωσφοϋδρολάσης του 1-Ο-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-Ο-αλκυλο-2-ακετυλο-*sn*-γλυκερόλη [85,86].

Αντίθετα, η βιοσύνθεση του PAF δεν πραγματοποιείται παρουσία των αγωνιστών ADP και AA [87]. Επιπρόσθετα, ο PAF εκκρίνεται από τα αιμοπετάλια, μετά από την ενεργοποίησή τους, συνδεδεμένος στα μικροσωματίδια των αιμοπεταλίων (PMPs) [88,89].

Η δράση του PAF στα αιμοπετάλια έχει ως αποτέλεσμα την έκκριση των πυκνών και α-κοκκίων, τη συσώρευση, την αλλαγή του σχήματος, το μεταβολισμό του AA και σύνθεση του TXA₂, τη φωσφορυλίωση πρωτεϊνών και την αύξηση του [Ca²⁺]_i. Ο PAF αποκωδομεύεται με τη δράση της ακετυλοϋδρολάσης του παράγοντα ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων (PAF-AH), ένα ένζυμο που υδρολύει τον εστερικό δεσμό στην *sn*-2 θέση απομακρύνοντας την οξική ομάδα και παράγοντας το βιολογικό ανενεργό μεταβολίτη lyso-PAF [90]. Με αυτό τον τρόπο ελέγχονται τα επίπεδα του PAF στα αιμοπετάλια. Έχει αποδειχτεί ότι η PAF-AH βρίσκεται σε αιμοπετάλια ποντικού [9] καθώς και στα ανθρώπινα αιμοπετάλια [91].

Σεροτονίνη ή 5-υδροξυτρυταμίνη (5-HT)

Ο υποδοχέας της σεροτονίνης (5-HT) ενεργοποιεί την PLC μέσω μιας G-πρωτεΐνης, οδηγώντας στην αύξηση του [Ca²⁺]_i και τη φωσφορυλίωση των πρωτεϊνών. Η αλληλουχία του ανθρώπινου υποδοχέα του 5-HT έχει κλωνοποιηθεί και έχει βρεθεί ότι πρόκειται για ένα σερπεντινικό διαμεμβρανικό υποδοχέα [92]. Εκτός από αγωνιστής των αιμοπεταλίων, η 5-HT βρίσκεται αποθηκευμένη στα πυκνά κοκκία [93] και εκκρίνεται κατά την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων.



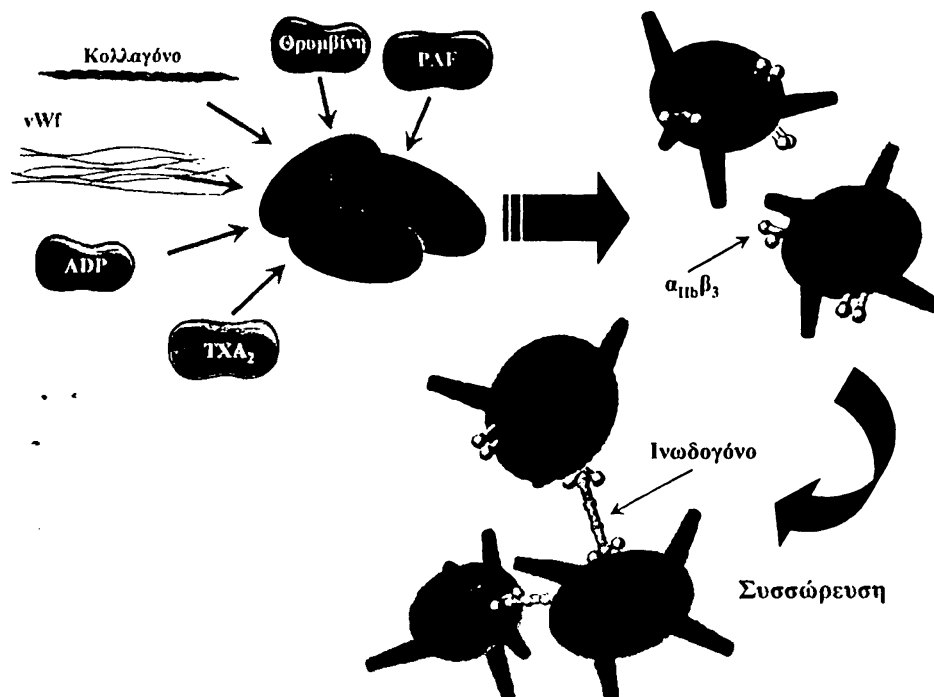
Επινεφρίνη

Η επινεφρίνη ανήκει στην οικογένεια των αγωνιστών των αιμοπεταλίων. Προκαλεί την έκκριση και συσσώρευση αλλά όχι την αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού η οποία έχει ως αποτέλεσμα την αλλαγή σχήματος των αιμοπεταλίων. Ο αδρενεργικός υποδοχέας α_2 (α_2 -adrenergic) είναι ο κυρίως υποδοχέας της επινεφρίνης [94-96].

Συσσώρευση των αιμοπεταλίων

Τα αιμοπετάλια συσσωρεύονται στο εσωτερικό των αιμοφόρων αγγείων που έχουν υποστεί βλάβη με αποτέλεσμα το σχηματισμό αιμοπεταλιακού θρόμβου και την παρεμπόδιση της ροής του αίματος. Για να αρχίσει όμως η συσσώρευση των αιμοπεταλίων θα πρέπει να έχει προηγηθεί η ενεργοποίησή τους και κατά συνέπεια η μετατροπή του υποδοχέα $\alpha_{IIb}\beta_3$ από την ανενεργό στην ενεργό μορφή του. Αυτό, όπως αναφέρεται και παραπάνω, συμβαίνει με την αλλαγή διαμόρφωσης του ετεροδιμερούς και την εμφάνιση των περιοχών σύνδεσης του προσδέτη. Στην συνέχεια, η πρόσδεση του Fg στον υποδοχέα έχει ως αποτέλεσμα τη σύνδεση των αιμοπεταλίων μεταξύ τους με γέφυρες Fg και τη συσσώρευσή τους. Ακολουθεί η ενεργοποίηση του μηχανισμού πήξης και ο σχηματισμός του ινώδους και του θρόμβου στο εσωτερικό των αγγείων. Η σύνδεση του vWF στον υποδοχέα $\alpha_{IIb}\beta_3$ σταθεροποιεί περισσότερο τον αιμοπεταλιακό θρόμβο και αυτό έχει μεγάλη σημασία κυρίως υπό συνθήκες ισχυρών διατμητικών τάσεων όπως σε περιοχές στένωσης των αγγείων. Η σύνδεση του $\alpha_{IIb}\beta_3$ με το Fg και τον vWF γίνεται σε λίγα δευτερόλεπτα μετά την αλλαγή διαμόρφωσης του υποδοχέα των αιμοπεταλίων και φαίνεται να σταθεροποιείται μέσα σε λίγα λεπτά (Εικόνα 3).





Εικόνα 3: Σχηματική απεικόνιση της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων.

Τα γεγονότα μεταγωγής σήματος τα οποία αρχίζουν μετά τη διέγερση των αιμοπεταλίων και προκαλούν την αλλαγή διαμόρφωσης του υποδοχέα, έχουν ως αποτέλεσμα τη μετατροπή αυτού από υποδοχέα χαμηλής σε υποδοχέα υψηλής συγγένειας. Αυτό το φαινόμενο είναι γνωστό με το τον όρο μέσα-έξω σηματοδότηση. Ο υποδοχέας $\alpha_{IIb}\beta_3$ σε κατάσταση ηρεμίας βρίσκεται σε μια μορφή χαμηλής συγγένειας σε σχέση με το Fg, όπου η β_3 υπομονάδα δεν μπορεί να δεσμευτεί με τον προσδέτη. Παράλληλα, η β_3 υπομονάδα παρεμποδίζει την περιοχή δέσμευσης της υπομονάδας α_{IIb} [97]. Κατά την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων, η β_3 υπομονάδα υφίσταται αλλαγή διαμόρφωσης, με αποτέλεσμα την έκφραση της περιοχής δέσμευσης για την RGD (Arg-Gly-Asp) ακολουθία των διαφόρων προσκολλητικών μορίων. Η αλλαγή διαμόρφωσης της β_3 υπομονάδας και η κυτταροσκελετική αναδιοργάνωση του αιμοπεταλίου προκαλεί την έκθεση, στην επιφάνεια, της περιοχής δέσμευσης της υπομονάδας α_{IIb} , με αποτέλεσμα την πρόσδεση του Fg στον υποδοχέα $\alpha_{IIb}\beta_3$. Οι Hers et al. [98] έδειξαν ότι η ενεργοποίηση της κινάσης του Src συμμετέχει στη μέσα-έξω σηματοδότηση του $\alpha_{IIb}\beta_3$, για οποιοδήποτε αγωνιστή των αιμοπεταλίων. Επιπρόσθετα, η PKC συμμετέχει στη μέσα-έξω σηματοδότηση όταν τα αιμοπετάλια ενεργοποιούνται από την α-θρομβίνη. Φαίνεται ότι τα υπολείμματα 749-762 του καρβοξυτελικού άκρου της β_3 υπομονάδας πιθανώς να αποτελούν υπόστρωμα για τη δράση των διαφορετικών κινάσων κατά την ενεργοποίηση των

αιμοπεταλίων. Αποτέλεσμα αυτής της σηματοδότησης είναι η αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού, ο οποίος διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη δυνατότητα δέσμευσης του υποδοχέα με τα διάφορα προσκολλητικά μόρια [99].

Η σύνδεση του προσδέτη στον υποδοχέα οδηγεί όχι μόνο στη συσσώρευση των αιμοπεταλίων αλλά και στην παραγωγή μιας έξω-μέσα σηματοδότησης, η οποία προκαλεί αντιδράσεις φωσφορυλίωσης και ανασυγκρότησης του κυτταροσκελετού [100-102]. Αποτέλεσμα της δέσμευσης του προσδέτη στον υποδοχέα $\alpha_{IIb}\beta_3$ είναι η ρύθμιση και η σταθεροποίηση των αιμοπεταλίων, η εξάπλωσή τους, η αποκοκκίωση τους, η συρρίκνωση του θρόμβου και πιθανώς η αύξηση της θρομβογόνου ικανότητας του αιμοπεταλίου [103].

Από την άλλη πλευρά, η σύνδεση του Fg και/ή vWF στον υποδοχέα προκαλεί συγκεκριμένες ενδοκυττάρειες αντιδράσεις, όπως είναι ο σχηματισμός συμπλεγμάτων υποδοχέων $\alpha_{IIb}\beta_3$, η φωσφορυλίωση ποικίλου μοριακού βάρους τυροσινών και η ενεργοποίηση της κινάσης Syk [104-107]. Μετά από λίγα δευτερόλεπτα, τα αιμοπετάλια αρχίζουν να «ισοπεδώνονται» σχηματίζοντας μικροσκοπικά συσσωρεύματα. Σε αυτό το ενδιάμεσο στάδιο παρατηρείται η ενεργοποίηση του $pp60^{src}$ και συμπλεγμάτων του $\alpha_{IIb}\beta_3$ που διακρίνονται στο μικροσκόπιο ανοσοφθορισμού. Η εξάπλωση των αιμοπεταλίων στο ακινητοποιημένο Fg και/ή vWF γίνεται μέσα σε λίγα λεπτά. Μέσα σε αυτό το χρονικό διάστημα εμφανίζονται μικροσκοπικά συμπλέγματα της βινικουλίνης που συνδέονται με νημάτια της F-ακτίνης [107-109]. Η πλήρης συσσώρευση και εξάπλωση των αιμοπεταλίων συσχετίζεται με την κινάση της τυροσίνης καθώς και με την ενεργοποίηση άλλων κινασών όπως η $pp125^{FAK}$ [107,110-112].

Συνοψίζοντας, η παρουσία αγωνιστών όπως το ADP, η θρομβίνη, και το κολλαγόνο προκαλεί τη μέσα-έξω σηματοδότηση που δημιουργείται κατά την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων. Τελικά, η ενεργοποίηση οδηγεί σε κυτταροσκελετική αναδιοργάνωση των αιμοπεταλίων, αύξηση του $[Ca^{2+}]_i$, την αποκοκκίωση των πυκνών- και α-κοκκίων, τη μείωση των επιπέδων του cAMP και τη μη-αντιστρεπτή συσσώρευση των αιμοπεταλίων. Συνεπώς, η συσσώρευση των αιμοπεταλίων περιλαμβάνει πολλές οδούς σηματοδότησης, αλλαγής σχήματος του κυτταροσκελετού, σχηματισμού γεφυρών Fg μεταξύ τους με αποτέλεσμα το σχηματισμό του αιμοπεταλιακού θρόμβου.

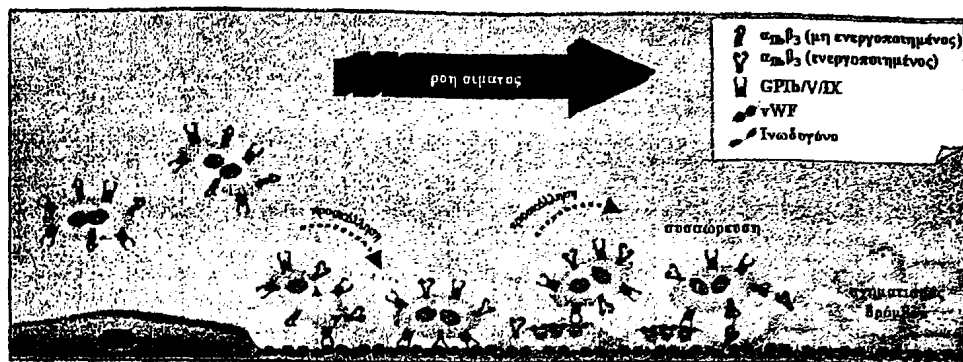


Προσκόλληση των αιμοπεταλίων

Η ταχύτητα της ροής του αίματος στο εσωτερικό των αγγείων είναι τέτοια ώστε τα αιμοπετάλια, εξαιτίας του μικρού μεγέθους τους, τείνουν να βρίσκονται στην περιφέρεια της ροής του αίματος, κοντά στο αγγειακό τοίχωμα. Υπό φυσιολογικές συνθήκες τα αιμοπετάλια κυκλοφορούν ελεύθερα χωρίς να αλληλεπιδρούν μεταξύ τους ή με αλλά κύτταρα του αίματος.

Στην περίπτωση τραυματισμού του αρτηριακού τοιχώματος προκαλείται λύση της συνέχειας του ενδοθηλίου που καλύπτει το εσωτερικό του αγγειακού τοιχώματος. Έτσι, συστατικά του υπενδοθηλιακού χώρου, τα κυριότερα από τα οποία είναι ο vWF, το κολλαγόνο, η βιτρονεκτίνη και η φιβρονεκτίνη, έρχονται σε επαφή με τα κύτταρα του αίματος. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την αρχική πρόσδεση του vWF του αρτηριακού τοιχώματος με τον αιμοπεταλιακό υποδοχέα GPIb. Ο vWF αλληλεπιδρά με τους υποδοχείς της βιτρονεκτίνης του $\alpha_{1\text{Ib}}\beta_3$ και κυρίως με το GPIb-IX. Το συμπλόκο vWF-GPIb σταθεροποιεί τα αιμοπετάλια που βρίσκονται σε υψηλές διατμητικές τάσεις κοντά στο αρτηριακό τοίχωμα, με αποτέλεσμα, να αλληλεπιδράσουν με τα αλλά συστατικά του υπενδοθηλιακού χώρου. Η σημασία του συμπλόκου vWF-GPIb περιγράφεται κυρίως στο σύνδρομο του Bernard-Soulier, στο οποίο η έλλειψη του GPIb έχει ως αποτέλεσμα την αιμορραγική διάθεση [113]. Η πρόσδεση του vWF στον υποδοχέα είναι αρχικά ασθενής, σταθεροποιείται όμως στη συνέχεια με την απευθείας πρόσδεση των αιμοπεταλίων με το κολλαγόνο του υπενδοθηλιακού χώρου με το οποίο δεσμεύονται διαμέσου του υποδοχέα GPIa/IIa ($\alpha_2\beta_1$). Η πρόσδεση αυτή σταθεροποιείται ακόμα περισσότερο με την πρόσδεση της βιτρονεκτίνης στους υποδοχείς $\alpha_v\beta_3$ και τον ενεργοποιημένο $\alpha_{1\text{Ib}}\beta_3$ [114,115] (Εικόνα 4). Η ιδανική πρόσδεση της βιτρονεκτίνης στον υποδοχέα GPIIb γίνεται διάμεσου του vWF [116]. Στην έναρξη της διαδικασίας της θρόμβωσης φαίνεται ότι διαδραματίζει ρόλο και η συνεργική αλληλεπίδραση των προσκολλητικών μορίων. Η πρόσδεση της φιβρονεκτίνης στον υποδοχέα GPIc/IIIa οδηγεί στην περαιτέρω σταθεροποίηση του αιμοπεταλιακού θρόμβου [117].





Εικόνα 4: Σχηματική απεικόνιση της προσκόλλησης των αιμοπεταλίων στο ενεργοποιημένο ενδοθήλιο.

Η πρόσδεση των αιμοπεταλίων στο κολλαγόνο έχει ως αποτέλεσμα την ενεργοποίησή τους. Η $\alpha_2\beta_1$ (GPIa–IIa) και η GPVI αποτελούν τον υποδοχέα του κολλαγόνου I, III και IV, μόρια που βρίσκονται κυρίως στο αρτηριακό τοίχωμα. Έχει προταθεί ένα μοντέλο το οποίο εξηγεί την απόκριση των αιμοπεταλίων στην αλληλεπίδραση τους με το κολλαγόνο. Η ιντεγκρίνη $\alpha_2\beta_1$ είναι κύρια υπεύθυνη για την προσκόλληση και η GPVI είναι υπεύθυνη για την ενεργοποίηση των προσκολλημένων αιμοπεταλίων. Επιπρόσθετα, η ιντεγκρίνη $\alpha_2\beta_1$ παρουσιάζει υψηλή συγγένεια για το κολλαγόνο ακόμα και μετά την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων. Η αυξημένη αυτή συγγένεια υποδηλώνει ότι το σύμπλοκο αυτό παίζει ρόλο και στην περαιτέρω ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων. Πειραματικά δεδομένα δείχνουν ότι και οι δυο υποδοχείς είναι απαραίτητοι για την προσκόλληση των αιμοπεταλίων στην περιοχή της βλάβης [118]. Η ενεργοποίηση με το κολλαγόνο οδηγεί στη φωσφορυλίωση πολλών πρωτεϊνών. Αποτέλεσμα της φωσφορυλίωσης είναι η ενεργοποίηση μιας φωσφολίτασης $Cy2$ η οποία υδρολύει το PIP_2 προς DAG και IP_3 . Τα ενδοκυττάρια αγγελιοφόρα μόρια (DAG και IP_3) ενεργοποιούν την PKC και προκαλούν την εισροή Ca^{2+} στα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια. Η αύξηση του $[Ca^{2+}]_i$ είναι απαραίτητη για την αποκοκκίωση, την ενεργοποίηση του υποδοχέα $\alpha_{IIb}\beta_3$, τον πολυμερισμό της ακτίνης και τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων [119].

Σε υψηλές διατμητικές τάσεις, οι υποδοχείς του κολλαγόνου δεν μπορούν να συμμετέχουν στην δημιουργία ή την εξέλιξη του αιμοπεταλιακού θρόμβου. Απαραίτητη προϋπόθεση είναι η αρχική πρόσδεση των αιμοπεταλίων διάμεσου του υποδοχέα GPIb και του vWF [120,121]. Όταν οι διατμητικές τάσεις στο ανθρώπινο αίμα ξεπερνούν τα $1,000 s^{-1}$,

η αλληλεπίδραση vWF-GPIIb αποτελεί βασική προϋπόθεση για την προσκόλληση των αιμοπεταλίων στο αρτηριακό τοίχωμα (Εικόνα 4).

Στην ενεργοποίηση αυτή, εκτός του κολλαγόνου συμμετέχουν και άλλοι αγωνιστές. Αυτοί είναι η θρομβίνη, καθώς επίσης το TXA₂, το ADP και ο PAF οι οποίοι εκκρίνονται από τα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια [122]. Η ενεργοποίηση αυτή οδηγεί στην αλλαγή της διαμόρφωσης του υποδοχέα α_{IIb}β₃, στον οποίο προσδένεται το Fg, στη συσσώρευση των αιμοπεταλίων και στο σχηματισμό αιμοπεταλιακού θρόμβου (Εικόνα 3) [123]. Επιπρόσθετα, η Ρ-σελεκτίνη των α-κοκκίων εκφράζεται στην επιφάνεια των ενεργοποιημένων αιμοπεταλίων και διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην προσκόλληση των αιμοπεταλίων με τα ουδετερόφιλα, τα μονοκύτταρα και τα ενδοθηλιακά κύτταρα [124]. Στον Πίνακα 3 αναφέρονται οι υποδοχείς καθώς και οι προσδέτες που συμμετέχουν στην προσκόλληση των αιμοπεταλίων.

Πίνακας 3. Οι υποδοχείς και οι προσδέτες που συμμετέχουν στην προσκόλληση των αιμοπεταλίων, στον υπενδοθηλιακό χώρο.

Προσδέτης	Υποδοχείς
Κολλαγόνο	GPIa-IIa, GPIIb-IIIa, GPIV και GPVI
Ινωδογόνο	α _{IIb} β ₃
Φιβρονεκτίνη	GPIc-IIa και α _{IIb} β ₃
Θρομβοσπονδίνη	Υποδοχέας βιτρονεκτίνης, GPIV και πρωτεΐνη συσχετιζόμενη με ιντεγκρίνες
Βιτρονεκτίνη	Υποδοχέας βιτρονεκτίνης, GPIV και πρωτεΐνη συσχετιζόμενη με ιντεγκρίνες
vWF	Υποδοχέας βιτρονεκτίνης, α _{IIb} β ₃ και GPIIb-IX
Λαμινίνη	Περιοχή GPIc-IIa



ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2^ο

Μικροσωματίδια των αιμοπεταλίων (PMPs)

Γενικά

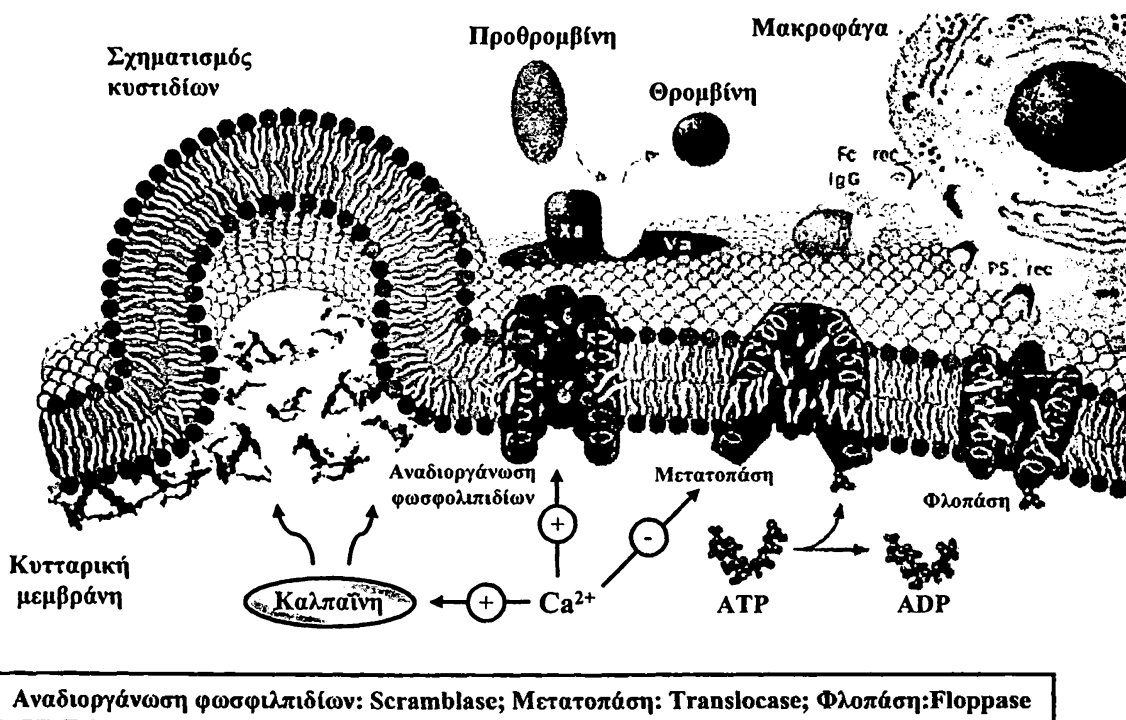
Στην δεκαετία του '40, παρατηρήθηκε μια μείωση στο χρόνο πήξης του αίματος όταν χορηγήθηκε ορός ή πλάσμα φτωχό σε αιμοπετάλια. Επιπρόσθετα, ο Wolf [125] το 1967 χαρακτήρισε την δράση αυτή με μια απλή φράση ως «αιμοπεταλιακή σκόνη» (“platelet dust”), δηλώνοντας έτσι τα θραύσματα της κυτταρικής μεμβράνης των αιμοπεταλίων μετά από την ενεργοποίησή τους ή την αποθήκευσή τους για μεγάλο χρονικό διάστημα. Η ενεργότητα αυτή αρχικά χαρακτηρίστηκε ως αιμοπεταλιακός παράγοντας 3 (platelet factor 3) της οδού πήξης. Κυτταρικά μικροσωματίδια (MPs), αποτελούν θραύσματα της κυτταρικής μεμβράνης και παράγονται από όλα τα είδη κύτταρων. Η παραγωγή των MPs πραγματοποιείται στην κυκλοφορία όταν διάφορα κύτταρα του αίματος υποβάλλονται σε διαφορές συνθήκες στρες (απόπτωση ή ενεργοποίηση των κύτταρων διαμέσου αγωνιστών). Η ενεργότητα αυτή παρατηρήθηκε επίσης στα MPs αλλά και στην αρνητικά φορτισμένη επιφάνεια των αιμοπεταλίων. Επιπρόσθετα, ανιχνεύτηκαν αυξημένα επίπεδα MPs σε διάφορες παθολογικές καταστάσεις που συσχετίζονται κυρίως με τη θρόμβωση αλλά και την πήξη [126]. Βασικό ρόλο στην απελευθέρωση των MPs διαδραματίζει η διεργασία μεμβρανικού ανασχηματισμού (membrane-remodeling process) που οδηγεί στην αναδιοργάνωση των φωσφολιπιδίων της κυτταρικής μεμβράνης.

Πρόσφατα δείχθηκε ότι τα MPs αποτελούν ένδειξη ενεργοποίησης κύτταρων *in vitro* και/ή του ιστικού εκφυλισμού σε διάφορες παθολογικές καταστάσεις. Επιπρόσθετα, βρέθηκε ότι τα MPs διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο ως φορείς στην ανταλλαγή ενδοκυττάρων βιολογικών πληροφοριών.



Τι είναι τα μικροσωματίδια?

Ο σχηματισμός MPs σχετίζεται άμεσα με την καταστροφή της λιπιδιακής ασυμμετρίας, σε αρκετές καταστάσεις είτε αυτές είναι φυσιολογικές είτε παθολογικές. Υπάρχουν διάφορα κύτταρα τα οποία παράγουν MPs, όπως είναι τα κύτταρα με προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο [127], τα αποπτωτικά κύτταρα, τα καρκινικά κύτταρα [128], τα ενεργοποιημένα ενδοθηλιακά κύτταρα [129,130], τα δρεπανοκύτταρα [131] αλλά και τα μονοκύτταρα [132]. Στην Εικόνα 5 περιγράφεται σχηματικά ο μηχανισμός παράγωγης των MPs.

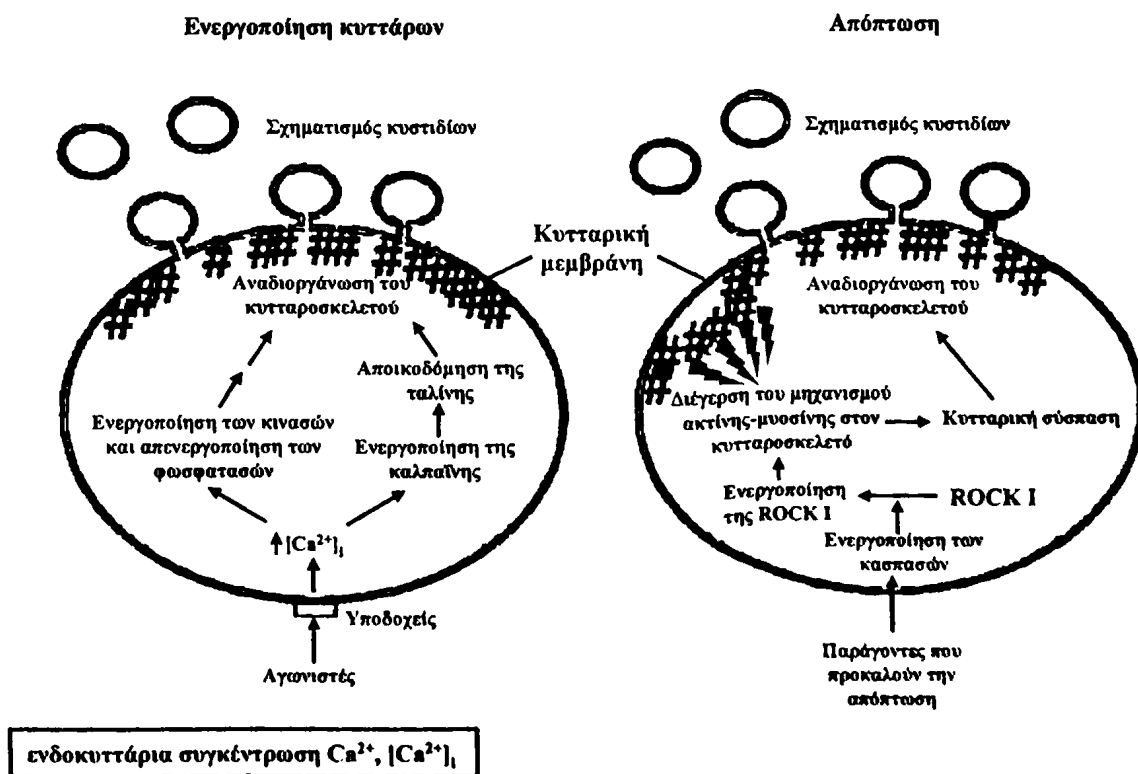


Εικόνα 5: Ο μηχανισμός παραγωγής των MPs (τροποποιημένο από Zwaal et al.) [133].

Αρχικά, υπάρχουν βασικές διαφορές μεταξύ της απόπτωσης των κύτταρων και της παραγωγής των MPs από ενεργοποιημένα κύτταρα. Η απόπτωση των κύτταρων χαρακτηρίζεται από τη σύσπαση των κύτταρων, τον κατακερματισμό του DNA, και το σχηματισμό κυστιδίων [134,135]. Κυστίδια που παράγονται με απόπτωση σε σχέση με MPs που παράγονται κατά τη διέγερση των κύτταρων διαφέρουν ως προς το μέγεθος, τη λιπιδιακή τους σύσταση, τη σύστασή τους σε πρωτεΐνες αλλά και στον παθοφυσιολογικό ρόλο που διαδραματίζουν.



Στην απόπτωση, η συσπαστική δύναμη (contractile forces) μεταξύ της ακτίνης και μυοσίνης του κυτταροσκελετού, πιστεύεται ότι παίζει ρόλο στην παραγωγή των κυστιδίων αυτών [136,137]. Η απόπτωση βασίζεται στην ενεργοποίηση μιας Rho κινάσης που ονομάζεται ROCK I [134]. Η ROCK I διεγείρει το μηχανισμό της ακτίνης και μυοσίνης στον κυτταροσκελετό με αποτέλεσμα την κυτταρική σύσπαση αλλά και την αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού [138]. Αποτέλεσμα της απόπτωσης είναι η μεταφορά θραύσματος του DNA από την πυρηνική περιοχή των κύτταρων προς τη μεμβράνη και στη συνέχεια στα αποπτωτικά κυστίδια (Εικόνα 6). Αντίθετα, η παραγωγή των MPs, βασίζεται στην ενεργοποίηση των κυττάρων υπό την δράση διαφόρων αγωνιστών, στην αύξηση του $[Ca^{2+}]_i$, την ενεργοποίηση διαφόρων κινασών, την ενεργοποίηση της καλπαϊνης (calpain) και την αποικοδόμηση της ταλίνης. Αποτέλεσμα αυτής της ενεργοποίησης είναι η αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού και η παράγωγή των MPs (Εικόνα 6).



Εικόνα 6: Οι βασικές διαφορές μεταξύ της απόπτωσης και της παραγωγής των MPs [139].



Μικροσωματίδια των αιμοπεταλίων

Τα μικροσωματίδια των αιμοπεταλίων (PMPs) είναι ένας ετερογενής πληθυσμός κυστιδίων με αρνητικά φορτισμένα φωσφολιπίδια στην επιφάνειά τους, που παράγονται μετά από την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων. Τα PMPs αποτελούν το 70%-90% των MPs που βρίσκονται στην κυκλοφορία του αίματος. Επίσης, ποικίλουν ως προς το μέγεθος (0.05–1 μm) και την πρωτεϊνική και λιπιδιακή σύσταση. Στην επιφάνεια των PMPs βρίσκονται μόρια που προέρχονται από τα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια όπως για παράδειγμα ο υποδοχέας $\alpha_{IIb}\beta_3$, ο GPIb/V/IX, η P-σελεκτίνη, η πρωτεΐνη S72, και περιοχές δέσμησης των παραγόντων V και VIII [140-143]. Τα PMPs διαφέρουν από τα εξωσώματα (0.03–0.1 μm) που παράγονται διάμεσου της εξωκύττωσης του ενδοκυττάριου πολυκυστιδιακού σώματος που διαδραματίζει ρόλο στην αντιγόνοπαρουσίαση. Τα εξωσώματα είναι εμπλουτισμένα με MFG-E8, διάφορες πρωτεΐνες (tetraspanins, CD9, CD63, CD81, CD82) και αντιγόνα του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας τύπου II (MHC class II molecules) [144].

Η παραγωγή των PMPs των αιμοπεταλίων

Τα PMPs είναι μικρά μεμβρανικά κυστίδια που είναι πλούσια σε κυτταροπλασματικό περιεχόμενο. Παρά το γεγονός ότι τα PMPs έχουν μια ανεστραμμένη διαμόρφωση (εκφράζουν αρνητικά φωσφολιπίδια), εμφανίζουν μια θρομβωτική δράση άσχετα με το ότι δεσμεύονται με την αννεξίνη-V [145,146], μια πρωτεΐνη που προέρχεται από τον πλακούντα και η οποία εμφανίζει αντιθρομβωτική δράση δεσμεύοντας στα αρνητικά φωσφολιπίδια. Επιπρόσθετα, η P-σελεκτίνη, η οποία στα μη ενεργοποιημένα αιμοπετάλια βρίσκεται αποθηκευμένη στα α-κοκκία των αιμοπεταλίων, εκφράζεται στην επιφάνεια των PMPs [145,147]. Το παραπάνω φαινόμενο εξηγείται με την υπόθεση ότι η μετατόπιση των φωσφολιπιδίων αλλά και η έκκριση του περιεχομένου των α-κοκκίων γίνεται πριν την παραγωγή των PMPs. Σε συμφωνία με την παραπάνω παρατήρηση είναι και το γεγονός ότι η παρουσία της αννεξίνης-V στην εξωτερική επιφάνεια των αιμοπεταλίων μετά από την ενεργοποίησή τους αναστέλλει την παραγωγή των PMPs, αλλά δεν παρεμποδίζει την αποικοδόμηση των αιμοπεταλιακών πρωτεϊνών παρουσία της καλπαΐνης [145]. Αυτό οδηγεί στην ερώτηση αν υπάρχει άμεση ή χαλαρή συσχέτιση μεταξύ της μεταφοράς φωσφολιπιδίων και της παραγωγής των PMPs. Προτείνεται ότι η επιφανειακή έκφραση των



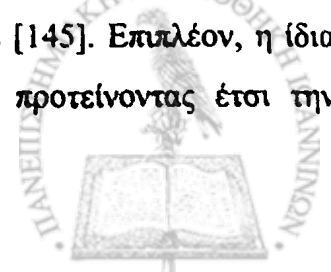
αμινοφωσφολιπιδίων από μόνη της δεν μπορεί να οδηγήσει το κύτταρο στην παραγωγή των PMPs. Επιπλέον, η πρωτεϊνική φωσφατάση των τυροσινών (protein tyrosine phosphatase) παίζει ρόλο στην παραγωγή των PMPs [148], αλλά ο ακριβής μηχανισμός δεν είναι ακόμα γνωστός. Υπό φυσιολογικές συνθήκες, η επιφανειακή έκφραση της PS είναι το κύριο χαρακτηριστικό των PMPs. Η έκφραση της PS στην επιφάνεια των PMPs έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία του κατάλληλου περιβάλλοντος για τη θρομβωτική δράση των PMPs.

Η δυνατότητα διάφορων αιμοπεταλιακών αγωνιστών να προκαλέσουν την παραγωγή των PMPs έχει διερευνηθεί εκτενώς. Οι διαφορές που παρατηρούνται ως προς την αποτελεσματικότητα των αγωνιστών αυτών, οφείλονται κυρίως στον τρόπο ανάλυσης των δειγμάτων. Με βάση μελέτες *in vitro*, η ισχύς των αγωνιστών, όσον αφορά την ικανότητά τους να επάγουν το σχηματισμό PMPs, ακολουθεί την εξής σειρά: ιονοφόρο Ca^{2+} -A23187 > C5b9-του συστήματος συμπληρώματος (C5b9-membrane attack complex of the complement system) > συνδυασμός θρομβίνης και κολλαγόνου > θρομβίνη ή κολλαγόνο > επινεφρίνη ή ADP [126]. Επιπρόσθετα, μηχανική διέγερση η οποία παρατηρείται κατά την επαφή των αιμοπεταλίων σε μια τεχνητή επιφάνεια [149], ή υψηλές διατμητικές τάσεις οδηγούν στην παραγωγή των PMPs σε πειραματικό μοντέλο [150-152]. Υπό φυσιολογικές συνθήκες τα PMPs παράγονται με πολλούς τρόπους. Οι πιο συνήθεις από αυτούς είναι ο συνδυασμός θρομβίνης και κολλαγόνου, η ενεργοποίηση διάμεσου του συστήματος συμπληρώματος και οι υψηλές διατμητικές τάσεις που παρατηρούνται σε διάφορες παθολογικές καταστάσεις.

Μηχανισμοί που συμμετέχουν στην αναδιοργάνωση της κυτταρικής μεμβράνης

Ο ρόλος του ενδοκυττάριου Ca^{2+} ($[Ca^{2+}]_i$)

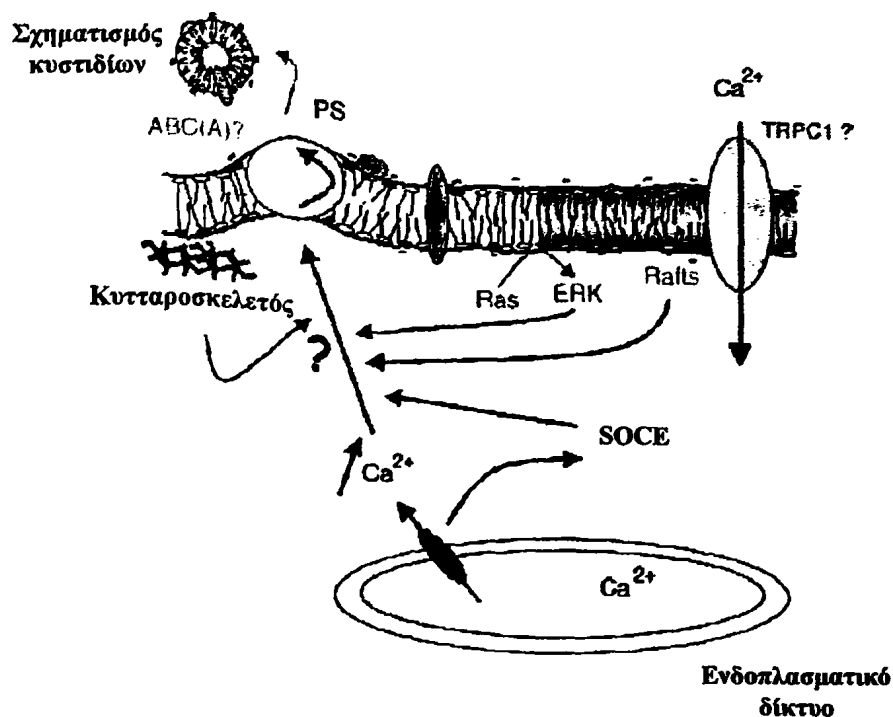
Έχει αποδειχθεί ότι η υψηλή $[Ca^{2+}]_i$ αποτελεί σήμα για την παραγωγή των PMPs [147,153]. Η υπόθεση αυτή επιβεβαιώθηκε με βάση το γεγονός ότι σε αιμοπετάλια με υψηλή συγκέντρωση Ca^{2+} παρατηρείται παραγωγή PMPs [154]. Διαφορετικές συγκεντρώσεις Ca^{2+} , λόγω της παρουσίας αναστολέων της Ca^{2+} -ΑΤΡασης, προκαλούν μείωση της καταλυτικής θρομβωτικής επιφάνειας ανεξάρτητα από την παραγωγή των PMPs [145]. Επιπλέον, η ίδια $[Ca^{2+}]_i$ οδηγεί στο σχηματισμό διαφορετικών ποσοτήτων PMPs, προτείνοντας έτσι την



εμπλοκή και άλλων σημάτων στην παραγωγή των PMPs [155]. Απαραίτητη για την παραγωγή των PMPs είναι η εισροή Ca^{2+} στο κύτταρο. Αυτό στηρίζεται περαιτέρω και από το γεγονός ότι το ιονοφόρο του Ca^{2+} δεν μπορεί από μόνο του να προκαλέσει την αναδιοργάνωση της κυτταρικής μεμβράνης και την παράλληλη παραγωγή των PMPs, αν και μπορεί να απελευθερώσει Ca^{2+} από τα ενδοκυττάρια διαμερίσματα [156]. Η αύξηση του $[Ca^{2+}]_i$ είναι απαραίτητη για τη διαμεμβρανική ανακατανομή της PS στα κύτταρα θηλαστικών [133]. Έχει βρεθεί σε Β-λεμφοκύτταρα που έχουν προσβληθεί από τον ιό Epstein-Barr [157], παρουσιάζουν δυσλειτουργία στο σύστημα μεταφοράς Ca^{2+} (store-operated Ca^{2+} entry, SOCE ή capacitative Ca^{2+} entry) (Εικόνα 7) [158]. Επιπρόσθετα, μερική αναστολή των διαύλων, οι οποίοι είναι υπεύθυνοι για τη μεταφορά Ca^{2+} σε μεγακαρυοκύτταρα (megakaryocytic HEL cells), έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση της ικανότητας μεταφοράς της PS στην εξωτερική επιφάνεια των κύτταρων. Η ακεραιότητα του κυτταροσκελετού είναι επίσης σημαντική για την παραγωγή των MPs, τουλάχιστον μέχρι την αναδιοργάνωση της κυτταρικής μεμβράνης [159]. Με βάση τα παραπάνω δεδομένα η δυσλειτουργία του SOCE μπορεί να αποτελεί ένα μέρος του φαινοτύπου του συνδρόμου Scott. Το σύνδρομο του Scott, είναι μια ασθένεια η οποία χαρακτηρίζεται από την έλλειψη της δράσης της Ca^{2+} -εξαρτώμενης αναδιοργάνωσης των φωσφολιπιδίων και του σχηματισμού συμπλόκου της προθρομβινάσης στα αιμοπετάλια αλλά και σε άλλα κύτταρα του αίματος [141,146,160,161].

Επιπλέον, ο έλεγχος του SOCE, όσον αφορά τη μεταφορά του Ca^{2+} μέσα στο κύτταρο, φαίνεται να είναι υπό τον έλεγχο του TRPC (transient receptor potential channel) [158]. Οι Kunzelmann-Marche et al. [162] έδειξαν ότι χρησιμοποιώντας ένα πολυκλωνικό αντίσωμα κατά του TRPC1 μειώθηκε η λειτουργία του SOCE αλλά και η έκφραση της PS σε κύτταρα HEL.





Εικόνα 7: Ο ρόλος του $[Ca^{2+}]_i$ στην παραγωγή των PMPs (τροποποιημένο από Freyssinet) [163].

Επώαση των αιμοπεταλίων με 10 mM Ca^{2+} για 2h είχε ως αποτέλεσμα την παραγωγή των PMPs [164]. Συνέπεια της αύξησης του $[Ca^{2+}]_i$ είναι η ενεργοποίηση μιας Ca^{2+} -εξαρτώμενης πρωτεάσης, γνωστή και ως καλπαΐνη, η οποία συσχετίζεται με την παράγωγη των MPs. Στην Εικόνα 5 απεικονίζεται η δράση της καλπαΐνης στην κυτταρική μεμβράνη των αιμοπεταλίων. Υπάρχουν δυο μορφές της καλπαΐνης, η μ- και η m-καλπαΐνη, η κάθε μια από τις οποίες έχει και διαφορετικές απαιτήσεις σε ιόντα Ca^{2+} [165]. Η ενεργοποίηση της καλπαΐνης μετά την προσθήκη του ιονοφόρου Ca^{2+} πραγματοποιείται όταν η ενδοκυττάρια συγκέντρωση του Ca^{2+} φτάσει τα 3-8 μM . Η συγκέντρωση αυτή είναι η μικρότερη που χρειάζεται το κύτταρο ώστε να ενεργοποιηθεί η καλπαΐνη [156].

Η φύση των μεταφορικών μορίων που εμπλέκονται στην ανακατανομή της PS δεν έχει ακόμη διευκρινιστεί. Σύμφωνα με πρόσφατη μελέτη της ομάδας του Sims et al. [166], έχει προταθεί ότι η μη ειδική, διπλής κατεύθυνσης, αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού, οφείλεται σε μια αναδιοργάνωση των φωσφολιπιδίων (PL-scramblase, PLSCR), η οποία συμμετέχει και στην Ca^{2+} -εξαρτώμενη ή μη εξαρτώμενη δράση της ATP. Η ομάδα του Zhou et al. [167] χαρακτήρισε για πρώτη φορά τον PLSCR1. Στη συνέχεια άλλες ομάδες χαρακτήρισαν 3 μορφές πρωτεϊνών που ανήκουν στην οικογένεια PLSCR [168]. Ποντικοί με έλλειψη της PLSCR1 δεν παρουσίασαν δυσλειτουργία στην αιμοστατική τους λειτουργία.

αντίθετα παρουσίασαν πρόβλημα στην ανταπόκριση τους σε αυξητικούς παράγοντες του αιμοποιητικού συστήματος [169].

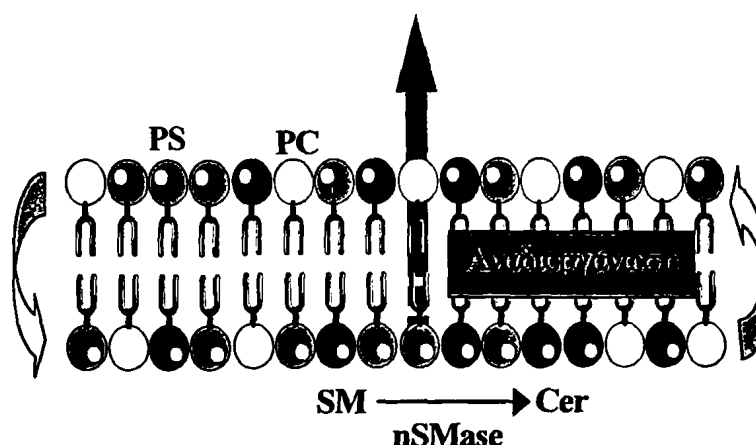
Φαίνεται ότι η κυτταρική μεμβράνη, και συγκεκριμένα μικροπεριοχές λιπιδίων (Lipid Rafts), εμπλέκονται στην ενδοκυττάρια σηματοδότηση [170]. Οι μικροπεριοχές λιπιδίων είναι λιγότερο ρευστές σε σχέση με την υπόλοιπη κυτταρική μεμβράνη διότι είναι πλούσιες σε σφιγγολιπίδια αλλά και χοληστερόλη [170,171]. Η ακεραιότητα των μικροπεριοχών αυτών είναι απαραίτητη για τη φυσιολογική λειτουργία του SOCE αλλά και την αναδιοργάνωση και μεταφορά της PS σε ενεργοποιημένα μεγακαρυοκύτταρα. Επιπρόσθετα, η παραπάνω δράση συσχετίζεται και με τη σηματοδοτική οδό ERK [162], όπως απεικονίζεται σχηματικά στην Εικόνα 7.

Αντίθετα, διάφορες ερευνητικές ομάδες πρότειναν ότι η αύξηση του $[Ca^{2+}]_i$ δεν είναι ο μόνος λόγος για την αναδιοργάνωση της κυτταρικής μεμβράνης. Έχειδειχθεί ότι η PIP_2 οδηγεί στην έκφραση της PS σε ερυθροκύτταρα [172] αλλά και σε αιμοπετάλια [173]. Μια πρόσφατη μελέτη της ομάδας O'Connell et al. [174] έδειξε μια δόσοεξαρτώμενη αναστολή της παραγωγής των PMPs όταν τα αιμοπετάλια επώαστηκαν με PIP_2 . Αντίθετα η επώαση των αιμοπεταλίων με την PC ή την PE δεν επηρέασε την παραγωγή των PMPs. Τα αποτελέσματα αυτά υποδηλώνουν ότι υψηλά επίπεδα PIP_2 αναστέλλουν το σχηματισμό των PMPs. Κατά συνέπεια η μείωση των επιπέδων PIP_2 αυξάνει την παραγωγή PMPs [175].

Επιπρόσθετα, υπό διάφορες συνθήκες, η SM που έχει μεταφερθεί από το εξωτερικό της κυτταρικής μεμβράνης στο εσωτερικό, μετατρέπεται με τη δράση της σφιγγομυελινάσης (nSMase), σε κηραμίδιο (Cer). Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη μεταφορά της PS στην εξωτερική επιφάνεια της κυτταρικής μεμβράνης. Τα κηραμίδια κατά συνέπεια μπορούν να διαδραματίζουν και ένα φυσιολογικό ρόλο στο σχηματισμό αποπτωτικών σωματιδίων εκτός από το να δρουν ως δευτεροί αγγελιοφόροι (Εικόνα 8) [176].



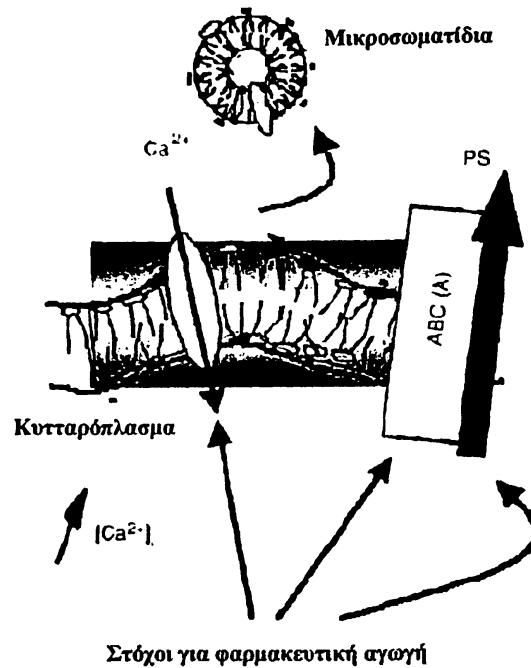
Σχηματισμός μικροσωματιδίων ή απόπτωση



Εικόνα 8: Σχηματική απεικόνιση της δράσης της σφιγγομυελινάσης στην κυτταρική μεμβράνη (τροποποιημένο από van Blitterswijk et al.) [176].

Μια οικογένεια πρωτεϊνών που φαίνεται να διαδραματίζει ρόλο στην παραγωγή MPs είναι η μεμβρανική πρωτεΐνη μεταφορέας γνωστή και ως ABC (ATP-binding cassette). Οι ABC πρωτεΐνες αποτελούνται από δύο διαμεμβρανικές περιοχές έξι ελίκων, οι οποίες δημιουργούν ένα μονοπάτι για τη μετατόπιση των υποστρωμάτων κατά μήκος των κυτταρικών μεμβρανών καθώς και από δύο περιοχές που δεσμεύουν το ATP [177-180]. Σχετικά πρόσφατα δεδομένα έδειξαν ότι οι ABC διαδραματίζουν ρόλο, στην μεταφορά φωσφολιπιδίων εξαιρουμένου της PS κατά μήκος της κυτταρικής μεμβράνης [181]. Μέλος της οικογένειας ABC είναι η ABCA1 μια πρωτεΐνη 2261 αμινοξέων με μοριακό βάρος 240 kDa. Οι Young et al. [182] έδειξαν ότι η έλλειψη του γονιδίου που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη ABCA1 έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση κατά 70% της έκφρασης της PS. Βασικός ρόλος του ABCA1, που βρίσκεται στην επιφάνεια των κυττάρων, είναι η μετακίνηση της χοληστερόλης από τα κύτταρα στις αρχέγονες μορφές της υψηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνης (HDL) [182]. Επιπρόσθετα, σε πειραματικό μοντέλο που χρησιμοποίησαν ινοβλάστες από ποντίκια με έλλειψη του ABCA1 ($ABCA1^{-/-}$) δείχθηκε μειωμένη έκφραση της PS σε αντίθεση με τον άγριο τύπο ($ABCA1^{+/+}$), όταν τα κύτταρα αυτά ενεργοποιήθηκαν με ιονοφόρο Ca^{2+} [183]. Κατά συνέπεια η ABCA1 μπορεί να συνδέει τα καρδιαγγειακά συμβάματα όπως η δυσλειτουργία στο μεταβολισμό της χοληστερόλης με τη θρόμβωση. Συνεπώς θα μπορούσε επίσης να αποτελέσει μια καινούρια φαρμακευτική προσέγγιση για την καταπολέμηση

θρομβωτικών επεισοδίων, μειώνοντας την έκφραση της PS με αποτέλεσμα τη μείωση της παραγωγής των MPs (Εικόνα 9).



Εικόνα 9: Ο ρόλος του ABCA1 στην παραγωγή των PMPs [163].

Ενεργοποίηση των πρωτεασών

Κατά το σχηματισμό PMPs από τα αιμοπετάλια παρατηρείται ένα πλήθος μεταβολών του κυτταροσκελετού. Η παρουσία της κυτοχλασίνης D, η οποία αναστέλλει τον πολυμερισμό της ακτίνης, προκαλεί σχεδόν ολοκληρωτική αναστολή του σχηματισμού των PMPs [184,185]. Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, η ενεργοποίηση της καλπαΐνης εξαρτάται από την εισροή Ca^{2+} . Κατά συνέπεια, η συνεπακόλουθη υδρόλυση των συνδέσεων του κυτταροσκελετού θεωρείται απαραίτητη για το σχηματισμό κυστιδίων μετά από τη μεταφορά των αμινοφωσολιπιδίων στην εξωτερική επιφάνεια του αιμοπεταλίου [148,184].

Μελέτη των βιοχημικών και μορφολογικών χαρακτηριστικών των ενεργοποιημένων αιμοπεταλίων και των αποπτωτικών κύτταρων οδήγησε στην ανακάλυψη των κασπασών, συγκεκριμένα της κασπάσης 3 και 9 [186-188]. Η κασπάση 3 είναι μια πρωτεάση υπεύθυνη για την αποικοδόμηση των πρωτεϊνών του κυτταροσκελετού όπως είναι η ακτίνη και η φοδρίνη [189]. Διάφορες μελέτες έχουν δείξει ότι οι κασπάσες διαδραματίζουν ρόλο στο

σχηματισμό MPs. Συγκεκριμένα, η κασπάση 3 φαίνεται ότι ευθύνεται για την έκθεση της PS στην επιφάνεια των αιμοπεταλίων [186,188].

Φωσφορυλίωση πρωτεϊνών

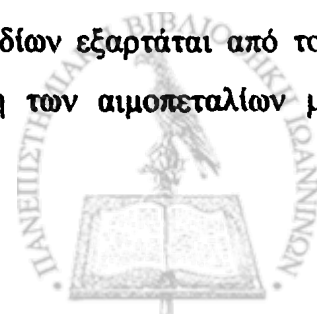
Η φωσφορυλίωση των πρωτεϊνών είναι μια διαδικασία με βάση την οποία ρυθμίζεται η ενδοκυττάρια ενεργοποίηση και απενεργοποίηση πρωτεϊνών και λιπιδίων. Πρόκειται για μια δυναμική και αντιστρεπτή διαδικασία η οποία εξαρτάται τόσο από τη δράση των κινασών όσο και από τη δράση των φωσφατασών [190]. Φαίνεται ότι τόσο οι κινάσες σερίνης και θρεονίνης, όπως η πρωτεϊνοκινάσης C (PKC), όσο και οι κινάσες τυροσίνης ρυθμίζουν την παραγωγή των PMPs.

Αναστολείς της PKC προκαλούν μείωση της, επαγόμενης από θρομβίνη και κολλαγόνο αλλά όχι από το ιονοφόρο Ca^{2+} -A23187, πρόσδεσης της ανεξίνης V στα αιμοπετάλια [191]. Αντίθετα, αναστολείς της κινάσης της ελαφριάς αλυσίδας της μυοσίνης (mysosin light chain kinase, MLCK) καθώς και των καλμοδουλινο-εξαρτώμενων κινασών εμποδίζουν την επαγόμενη από το ιονοφόρο Ca^{2+} παραγωγή των MPs.

Μελέτη έδειξε ότι όταν τα αιμοπετάλια των ασθενών με το σύνδρομο του Scott ενεργοποιήθηκαν με συνδυασμό θρομβίνης και κολλαγόνου, παρουσιάστηκε μειωμένη φωσφορυλίωση πρωτεϊνών με μοριακό βάρος 40, 97 και 116 kDa [146]. Αναστολείς της κινάσης των τυροσινών δεν επηρέασαν την παραγωγή των PMPs [154], ενώ αναστολείς της φωσφατάσης των τυροσινών μείωσαν την έκθεση της PS στην κυτταρική μεμβράνη των αιμοπεταλίων [148]. Από τα παραπάνω αποτελέσματα προτάθηκε ότι η φωσφορυλίωση των τυροσινών είναι απαραίτητη για την έκθεση της PS στην επιφάνεια των αιμοπεταλίων ενώ η αποφωσφορυλίωση για το σχηματισμό των PMPs. Αυτό επιβεβαιώνεται από την παρουσία μιας φωσφορυλιωμένης πρωτεΐνης με μοριακό βάρος 190 kDa και την παράλληλη ενεργοποίηση της μ-καλπαΐνης [156].

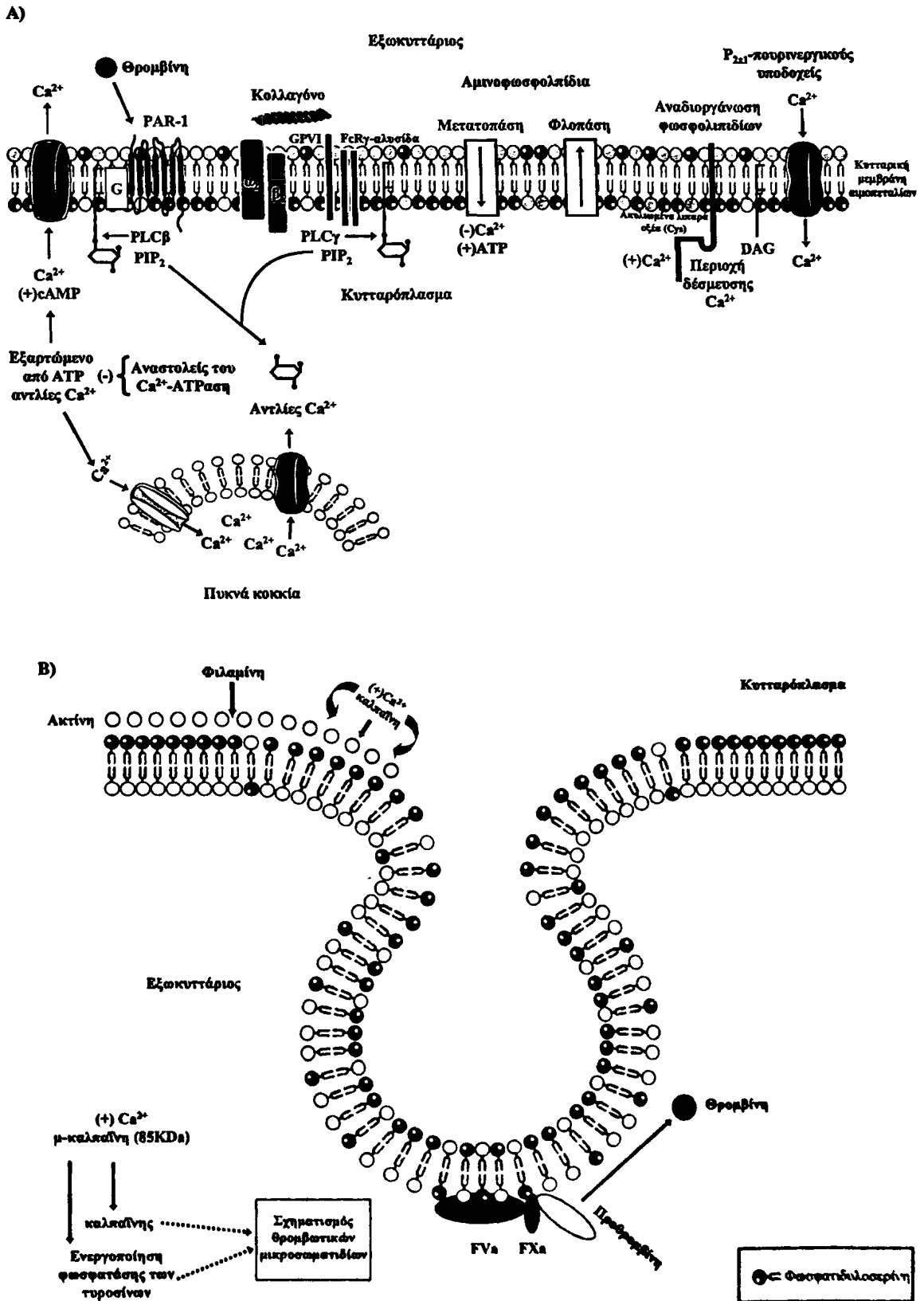
Ο ρόλος του $\alpha_{IIb}\beta_3$

Ο ρόλος που διαδραματίζει ο $\alpha_{IIb}\beta_3$ στο σχηματισμό κυστιδίων εξαρτάται από τον αγωνιστή. Έτσι, η αναστολή του $\alpha_{IIb}\beta_3$ κατά την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων με



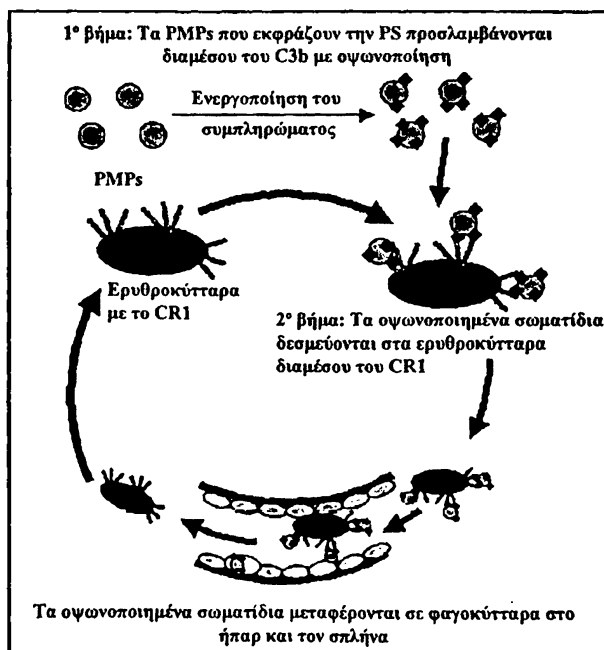
θρομβίνη ή κολλαγόνο ή το συνδυασμό αυτών, έχει ως αποτέλεσμα την αναστολή σχηματισμού των PMPs [142,192,193]. Αντίθετα, η αναστολή του $\alpha_{IIb}\beta_3$ δεν επηρεάζει το επαγόμενο από τον ιονοφόρο Ca^{2+} , σχηματισμό των κυστιδίων [194]. Επιπρόσθετα, μελέτες έχουν δείξει ότι ο υποδοχέας $\alpha_{IIb}\beta_3$ μπορεί να λειτουργεί ως διάυλος Ca^{2+} [195,196]. Πειραματικά δεδομένα έδειξαν ότι η τικλοπιδίνη, ανταγωνιστής του υποδοχέα του ADP, ανέστειλε την εισροή Ca^{2+} διαμέσου του $\alpha_{IIb}\beta_3$ και την παράλληλη αναστολή της επαγομένης από anti-CD9 παραγωγή PMPs [197]. Το ADP συμμετέχει στην εισροή Ca^{2+} το οποίο είναι απαραίτητο για την θρομβωτική του δραστηριότητα [198]. Έτσι, είναι πιθανό ο $\alpha_{IIb}\beta_3$ να επηρεάζει την παραγωγή των PMPs αυξάνοντας τη $[Ca^{2+}]$. Επιπλέον, έχει δειχθεί ότι η δέσμευση του προσδέτη στον υποδοχέα $\alpha_{IIb}\beta_3$ ενεργοποιεί την καλπαΐνη [199]. Παρόλα αυτά, οι κυτοσολικές περιοχές του $\alpha_{IIb}\beta_3$ συσχετίζονται με πολλά σηματοδοτικά μόρια τα οποία μπορούν επίσης να επάγουν τη μεταγωγή του σήματος για το σχηματισμό κυστιδίων [99]. Συνοψίζοντας τα παραπάνω, φαίνεται ότι ο ρόλος που διαδραματίζουν οι διάφορες σηματοδοτικές πορείες στην παραγωγή των PMPs δεν έχει διευκρινιστεί ακόμα (Εικόνα 10).





Κάθαρση των PMPs από την κυκλοφορία

Μελέτες έχουν δείξει ότι τα PMPs προσλαμβάνονται από τα συστατικά του συμπληρώματος C3b διαμέσου οψωνοποίησης [201-203]. Το C3b παράγεται από την πρωτεΐνη συμπληρώματος C3, της οποίας η συγκέντρωση στο πλάσμα είναι 1.2 mg/mL. Η C3 διασπάται με τη δράση της C3 μετατροπάσης προς C3b [204]. Η πρωτεόλυση έχει ως αποτέλεσμα την έκθεση ενός δεσμού θειοεστέρα, ο οποίος με τη σειρά του μπορεί να συμμετέχει σε αντιδράσεις τρανσακετυλίωσης με τις πυρηνόφιλες ομάδες που βρίσκονται στα αμινοφωσfolιπίδια, στους υδατάνθρακες και στις πρωτεΐνες [205-207]. Η κάθαρση των PMPs γίνεται διαμέσου της αλληλεπίδρασης της PS των PMPs με το C3 του συστήματος συμπληρώματος, σχηματίζοντας ένα οψωνοποιημένο σωματίδιο. Στην συνέχεια το σωματίδιο αυτό δεσμεύεται στα ερυθροκύτταρα διαμέσου του υποδοχέα 1 του συμπληρώματος (complement receptor 1, CR1 (CD35)) [203]. Τα οψωνοποιημένα σωματίδια μεταφέρονται με την κυκλοφορία του αίματος προς τα φαγοκύτταρα του ήπατος και τον σπλήνα, όπου καταβολίζονται περαιτέρω (Εικόνα 11).



Εικόνα 11: Σχηματική απεικόνιση του πιθανού μηχανισμού κάθαρσης των PMPs (τροποποιημένο από Flaumenshaft) [175].

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3^ο

Χαμηλής Πυκνότητας Λιποπρωτεΐνη (LDL)

Γενικά

Όλα τα λιπίδια του πλάσματος εκτός από τα ελεύθερα λιπαρά οξέα και ποσοστό της λυσο-φωσφατιδυλοχολίνης (Lyso-PC) μεταφέρονται με τη μορφή λιποπρωτεϊνών. Οι λιποπρωτεΐνες είναι μακρομοριακά συμπλέγματα λιπιδίων που περιέχουν εξειδικευμένες πρωτεΐνες γνωστές ως απολιποπρωτεΐνες (apo). Οι απολιποπρωτεΐνες αλληλεπιδρούν με τα φωσφολιπίδια και την ελεύθερη χοληστερόλη και σχηματίζουν το πολικό εξωτερικό τμήμα των λιποπρωτεϊνικών σωματιδίων που περιβάλλει ένα μη πολικό πυρήνα, ο οποίος αποτελείται από τριγλυκερίδια και εστέρες χοληστερόλης. Οι apo δεν έχουν μόνο δομικό ρόλο αλλά δρουν και ως συνένζυμα σε αντιδράσεις μεταβολισμού των λιποπρωτεϊνών. 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.

Οι λιποπρωτεΐνες ταξινομούνται με βάση τη διαφορά τους στην πυκνότητα και κατατάσσονται σε 6 κύριες τάξεις: τα χυλομικρά (CM, $d < 0.096 \text{ g/mL}$), τις πολύ χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνες (VLDL, $0.096 < d < 1.006 \text{ g/mL}$), τις ενδιάμεσης πυκνότητας λιποπρωτεΐνες (IDL, $1.006 < d < 1.019 \text{ g/mL}$), τις χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνες (LDL, $1.019 < d < 1.063 \text{ g/mL}$) και τις υψηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνες (HDL, $1.063 < d < 1.210 \text{ g/mL}$). Στο βασικό αυτό διαχωρισμό έχει προστεθεί και η λιποπρωτεΐνη a (Lp(a), $1.060 < d < 1.100 \text{ g/mL}$).

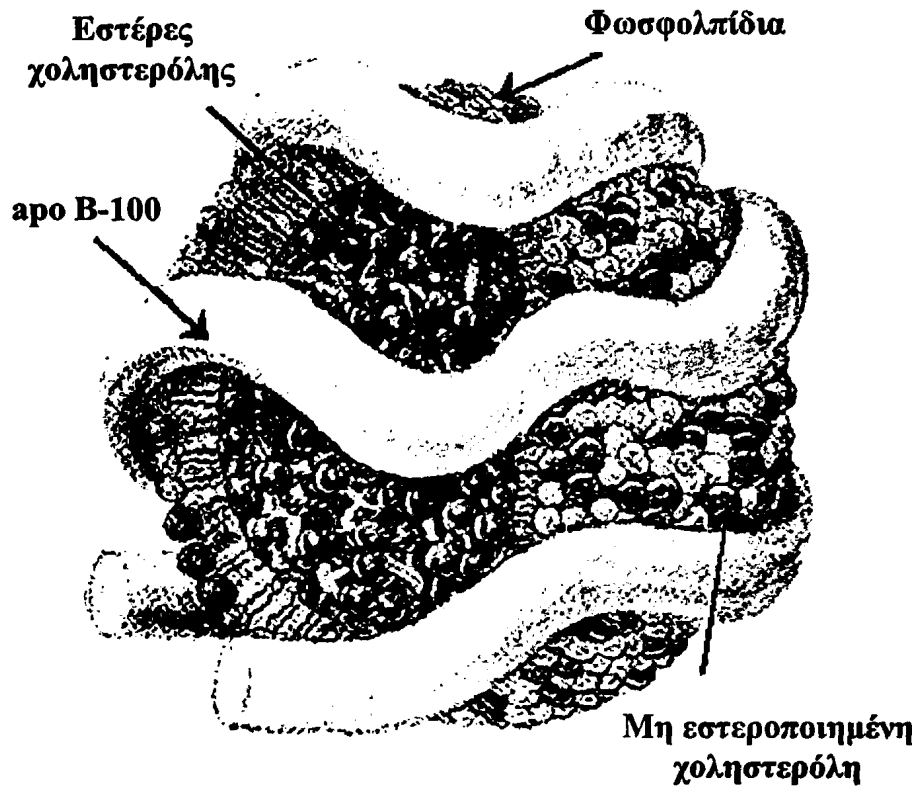
Ο κύριος ρόλος των λιποπρωτεϊνών είναι η μεταφορά λιπιδίων. Έτσι η VLDL αποτελεί την κύρια μορφή μεταφοράς, στο πλάσμα, των τριγλυκεριδίων που βιοσυντίθενται ενδογενώς. Η LDL είναι ο κύριος τροφοδότης των ιστών με χοληστερόλη ενώ τα σωματίδια της HDL είναι υπεύθυνα για την αντίστροφη μεταφορά χοληστερόλης από τους ιστούς στο ήπαρ. Τα CM μεταφέρουν τα τριγλυκερίδια που προσλαμβάνονται με τις τροφές για λίγες ώρες μετά από ένα γεύμα. Κατά τη διάρκεια της μεταφοράς τους με τις λιποπρωτεΐνες, τα



λιπίδια υφίστανται ποιοτικές και ποσοτικές μεταβολές, οι οποίες οφείλονται στη δράση των συνδεδεμένων, στα λιποπρωτεϊνικά σωματίδια, ενζύμων και πρωτεϊνών μεταφοράς.

Η LDL του ανθρώπινου πλάσματος είναι ένας ετερογενής πληθυσμός σωματιδίων των οποίων ο φυσιολογικός ρόλος είναι η μεταφορά της χοληστερόλης από το ήπαρ στους διάφορους ιστούς του σώματος. Τα σωματίδια αυτά εμφανίζουν διαφορές όσον αφορά το μέγεθος, την πυκνότητα, τη σύσταση, το ισοηλεκτρικό σημείο, το καθαρό ηλεκτρικό φορτίο, τις φυσικοχημικές ιδιότητες καθώς και την ανοσοδραστικότητα [208-210]. Η πυκνότητα της LDL κυμαίνεται από 1.019-1.063 g/mL, η διάμετρος από 19-25 nm και το μοριακό της βάρος από 1800-2800 kDa. Τα σωματίδια της LDL είναι σφαιρικά πολυμοριακά συμπλέγματα τα οποία απαρτίζονται από ένα υδρόφοβο πυρήνα που περιέχει περίπου 1600 μόρια εστέρων χοληστερόλης και 170 μόρια τριγλυκεριδίων και περιβάλλεται από μία μονοστιβάδα που αποτελείται από 700 μόρια φωσφολιπιδίων (Εικόνα 12). Τα κύρια φωσφολιπίδια που απαντούν στην LDL περιγράφονται στον Πίνακα 4. Οι πολικές κεφαλές των φωσφολιπιδίων προσανατολίζονται στην επιφάνεια του λιποπρωτεϊνικού σωματιδίου συμβάλλοντας στη διαλυτότητα της LDL στο υδρόφιλο περιβάλλον του πλάσματος. Στην πραγματικότητα οι όροι «πυρήνας» και «εξωτερική επιφάνεια» δεν αντανακλούν την ακριβή δομή του λιποπρωτεϊνικού σωματιδίου. Έτσι προτάθηκε ένα νέο μοντέλο «τριών στιβάδων» που περιγράφει τη δομή της LDL. Σύμφωνα με το μοντέλο αυτό, η εξωτερική επιφάνεια διαιρείται σε μια εξωτερική στιβάδα αποτελούμενη κυρίως από τις κεφαλές των φωσφολιπιδίων και σε μια ενδιάμεση στιβάδα αποτελούμενη τόσο από λιπίδια του πυρήνα όσο και από λιπίδια της εξωτερικής επιφάνειας [211]. Η εξωτερική επιφάνεια της LDL περιβάλλεται από την απολιποπρωτεΐνη B-100 (apo B-100) (Εικόνα 12) [209]. Ο κύριος ρόλος που διαδραματίζει η apo B-100 είναι η διατήρηση της δομικής ακεραιότητας της LDL καθώς και ο έλεγχος των αλληλεπιδράσεων των LDL με διάφορα συστατικά των ιστών. Η apo B-100 συντίθεται στο ήπαρ και αποτελείται από 4536 αμινοξέα. Επίσης, είναι γλυκοζυλιωμένη (το συνολικό ποσοστό σε υδατάνθρακες αποτελεί το 8-10% του βάρους της) [212]. Οι κυριότεροι υδατάνθρακες που περιέχει είναι η μανόζη, η γαλακτόζη, η γλυκοζαμίνη και το σιαλικό οξύ. Το μοριακό βάρος της γλυκοζυλιωμένης apo B-100 είναι 550,000 Da. Είναι η μοναδική apo της LDL και είναι υπεύθυνη για την αναγνώριση και πρόσληψη της LDL από τον LDL-υποδοχέα (B/E υποδοχέα) [209].



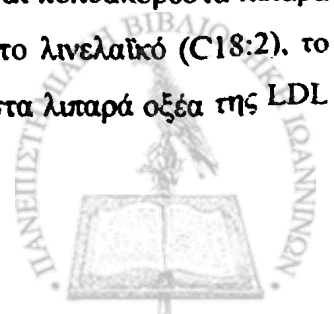


Εικόνα 12: Η δομή της LDL.

Πίνακας 4: Τα κύρια φωσφολιπίδια στο μόριο της LDL.

Φωσφολιπίδια	μόρια ανά σωματίδιο LDL
Φωσφατιδυλοχολίνη (PC)	450 (~63%)
Σφιγγομυελίνη (SM)	185 (~26%)
Λυσο-φωσφατιδυλοχολίνη (Lyso-PC)	80
Φωσφατιδυλοαιθανολαμίνη (PE)	10
Διακυλογλυκερόλη (DAG)	7
Κηραμίδια (Cer)	2
Φωσφατιδυλοϊνσιτόλη (PI)	Μικρό ποσοστό

Ο συνολικός αριθμός των λιπαρών οξέων που είναι εστεροποιημένα στα διάφορα λιπίδια των σωματιδίων της LDL είναι 2700, από τα οποία τα μισά περίπου είναι πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (Polyunsaturated Fatty Acids, PUFAs) με κύριους εκπρόσωπους το λινελαϊκό (C18:2), το αραχιδονικό (C20:4) οξύ και εικοσαεξανοϊκό οξύ [213]. Τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα της LDL



προστατεύονται από τη δράση των ελευθέρων ριζών και την οξείδωση από έναν αριθμό λιπόφιλων συστατικών που υπάρχουν στο λιποπρωτεϊνικό σωματίδιο και δρουν ως αντιοξειδωτικά. Το κυριότερο αντιοξειδωτικό συστατικό που απαντά στην LDL (6 μόρια ανά μόριο LDL) είναι η α-τοκοφερόλη (βιταμίνη E) [214]. Η αντιοξειδωτική δράση της βιταμίνης E οφείλεται στην ικανότητά της να μετατρέπει τις αλυσίδες των σχηματιζόμενων ριζών υπεροξειδίου προς υδροϋπεροξειδία και ρίζα της βιταμίνης E, η οποία μπορεί να ανακυκλωθεί προς α-τοκοφερόλη διαμέσου αντίδρασής της με κάποιο άλλο αντιοξειδωτικό, 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 [208,209].

Τα σωματίδια της LDL προέρχονται από μεγαλύτερα σωματίδια που περιέχουν apo B-100, όπως είναι οι VLDL, οι οποίες εκκρίνονται από το ήπαρ. Ο μεταβολισμός των VLDL στην κυκλοφορία αρχίζει με τη συνεχή δράση της λιποπρωτεϊνικής λιπάσης (lipoprotein lipase, LPL), η οποία υδρολύει τα τριγλυκερίδια σε μονογλυκερίδια και λιπαρά οξέα, ενώ ταυτόχρονα οι VLDL αποδίδουν τριγλυκερίδια και προσλαμβάνουν εστέρες χοληστερόλης από την HDL, με τη δράση της CETP (πρωτεΐνη μεταφοράς εστέρων χοληστερόλης, cholesterol ester transfer protein) [215]. Με αυτό τον τρόπο σχηματίζονται τα σωματίδια της IDL. Το 50% των σωματιδίων της IDL προσλαμβάνεται από ηπατικούς υποδοχείς, ενδοκυτταρώνεται και με αυτό τον τρόπο αποδίδονται τα τριγλυκερίδια και οι εστέρες χοληστερόλης. Το υπόλοιπο 50% της IDL μεταβολίζεται στην κυκλοφορία. Στο ήπαρ η ηπατική λιπάση (Hepatic lipase, HP) διασπά τα τριγλυκερίδια που η IDL περιέχουν. Ταυτόχρονα, η IDL στην κυκλοφορία προσλαμβάνει εστέρες χοληστερόλης από την HDL, ενώ ταυτόχρονα αποδίδει στην HDL τριγλυκερίδια (με τη δράση της CETP) και τις apo C. Τα σωματίδια που προκύπτουν από τον ενδαγγειακό μεταβολισμό της IDL είναι η LDL [216], η οποία είναι πλούσια σε εστέρες χοληστερόλης.

Με τη δράση της CETP, οι εστέρες της χοληστερόλης μεταφέρονται από τη LDL στην πολύ υψηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνη (VHDL) με αντάλλαγμα τη μεταφορά τριγλυκεριδίων από την VHDL στην LDL. Έτσι σχηματίζονται σωματίδια LDL τα οποία είναι πλούσια σε τριγλυκερίδια [217]. Ο κύριος ρόλος της 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 [218].

Φαινότυπος της LDL

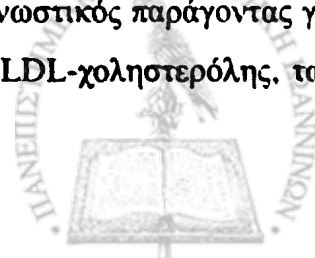
Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, ο πληθυσμός των σωματιδίων της LDL είναι ετερογενής. Χρησιμοποιώντας διάφορες τεχνικές η LDL μπορεί να χωριστεί σε διάφορα υποκλάσματα, ο αριθμός των οποίων κυμαίνεται από 2 έως 12 ανάλογα με την αναλυτική μέθοδο [219]. Συνήθως διαχωρίζονται τρία (LDL_1 - LDL_3), ή πέντε (LDL_1 - LDL_5) υποκλάσματα με λίγο διαφορετική πυκνότητα το καθένα [220]. Ο διαχωρισμός των ατόμων του γενικού πληθυσμού με βάση την πυκνότητα των LDL αποκαλύπτει δύο φαινότυπους [221]:

Το φαινότυπο **A**, στον οποίο το μεγαλύτερο ποσοστό των μορίων LDL είναι μεγάλα και ελαφρά, αφού περιέχουν πολλούς εστέρες χοληστερόλης με μέγεθος $>25,5\text{nm}$ και πυκνότητα $1,019$ - $1,03\text{ g/mL}$, και

Το φαινότυπο **B**, στον οποίο το μεγαλύτερο ποσοστό των μορίων LDL είναι μικρά και πυκνά με λίγους εστέρες χοληστερόλης με μέγεθος $<25,5\text{nm}$ και πυκνότητα $1,04$ - $1,063\text{ g/mL}$.

Μελέτες έχουν δείξει ότι η μέση διάμετρος των σωματιδίων της LDL μειώνεται όσο αυξάνει η πυκνότητά τους [222]. Επίσης η δομή και η σύσταση των σωματιδίων της LDL μεταβάλλεται ανάλογα με το μέγεθός τους. Τα μικρά και πυκνά σωματίδια της LDL είναι πλούσια σε τριγλυκερίδια σε σύγκριση με τα μεγαλύτερα σωματίδια, ενώ η περιεκτικότητά τους σε αντιοξειδωτικά είναι μικρότερη, γεγονός που τα καθιστά περισσότερο ευαίσθητα στην οξείδωση απ' ό,τι τα μεγαλύτερα και χαμηλότερης πυκνότητας σωματίδια. Επίσης, τα μικρά πυκνά σωματίδια έχουν ελαττωμένη συγγένεια με τον υποδοχέα της LDL.

Σύγχρονες μελέτες έδειξαν διαφορές στο μέγεθος, την πυκνότητα και τη σύσταση των σωματιδίων των LDL μεταξύ ασθενών με στεφανιαία νόσο και υγιών εθελοντών [223]. Στη μελέτη «Quebec Cardiovascular Study» [224], άνδρες με μέγεθος LDL σωματιδίων $<25,6\text{nm}$ είχαν 2,2 φορές μεγαλύτερο κίνδυνο για την εμφάνιση στεφανιαίας νόσου, σε σύγκριση με τους άνδρες με μέγεθος LDL σωματιδίων $>25,6\text{nm}$. Στη μελέτη αυτή, η πολυπαραγοντική ανάλυση έδειξε ότι το μέγεθος των σωματιδίων της LDL ήταν προγνωστικός παράγοντας για την εμφάνιση στεφανιαίας νόσου, ανεξάρτητα από τα επίπεδα της LDL-χοληστερόλης, των



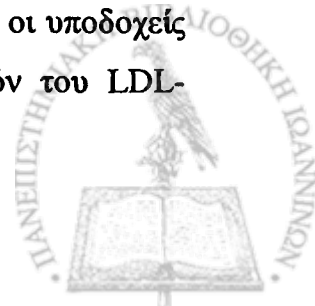
τριγλυκεριδίων, της HDL-χοληστερόλης και της apo B-100 του πλάσματος. Αντίθετα, στη μελέτη «Physicians Health Study» [225], τα μικρά πυκνά σωματίδια LDL δεν αποτέλεσαν ανεξάρτητο προγνωστικό δείκτη για την εμφάνιση εμφράγματος του μυοκαρδίου. Παρόλα αυτά και σε αυτή τη μελέτη, οι ασθενείς με έμφραγμα του μυοκαρδίου εμφάνισαν μικρότερα LDL σωματίδια σε σύγκριση με τα υγιή άτομα.

Η οξειδωμένη μορφή της LDL

Γενικά

Η εμφάνιση αφρωδών κυττάρων πλούσιων σε λιπίδια αποτελεί χαρακτηριστικό των πρώτων σταδίων στην ανάπτυξη της αθηροσκλήρωσης. Τέτοια αφρώδη κύτταρα σχηματίζονται *in vitro* όταν μακροφάγα επωάζονται με τροποποιημένες μορφές LDL, υποδηλώνοντας ότι συγκεκριμένες τροποποιήσεις στο λιποπρωτεϊνικό σωματίδιο επάγουν το σχηματισμό αφρωδών κυττάρων *in vivo*. Η πρόσληψη της τροποποιημένης LDL γίνεται διαμέσου των υποδοχέων εκκαθαριστών οι οποίοι είναι διαφορετικοί από τους κλασικούς LDL υποδοχείς.

Οι χημικά τροποποιημένες λιποπρωτεΐνες αποτέλεσαν αντικείμενο μελέτης από το 1979. Οι Brown και Goldstein παρατήρησαν ότι επώαση καλλιέργειας μακροφάγων με ακετυλιωμένη LDL (AcLDL) είχε ως αποτέλεσμα τη συσσώρευση εστέρων χοληστερόλης στο εσωτερικό των κυττάρων και το σχηματισμό αφρωδών κυττάρων με χαρακτηριστικά όμοια με αυτά που απαντούν σε αθηρωματικές βλάβες [226]. Η μελέτη αυτή ενέπλεκε την παρουσία ενός υποδοχέα, για την ακετυλιωμένη ή χημικά τροποποιημένη LDL, στα μακροφάγα, ο οποίος μπορεί να διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στο σχηματισμό αφρωδών κυττάρων κατά την αθηρωματική διαδικασία δίνοντας το έναυσμα για την προσέγγιση, σε μοριακό επίπεδο, της «λειτουργίας των μακροφάγων ή των προερχόμενων από τα μακροφάγα κυττάρων». Η ενδοκυτταρική πρόσληψη των τροποποιημένων λιποπρωτεϊνών γίνεται διάμεσου των υποδοχέων εκκαθαριστών [226,227]. Αντίθετα, με τους LDL-υποδοχείς, οι οποίοι υπόκεινται σε αυστηρή ρύθμιση από την LDL που προσλαμβάνεται και των οποίων ο αριθμός μειώνεται καθώς αυξάνεται η συγκέντρωση των σωματιδίων της LDL, οι υποδοχείς των μακροφάγων εμφανίζουν ένα μηχανισμό δράσης διαφορετικό από αυτόν του LDL-υποδοχέα.

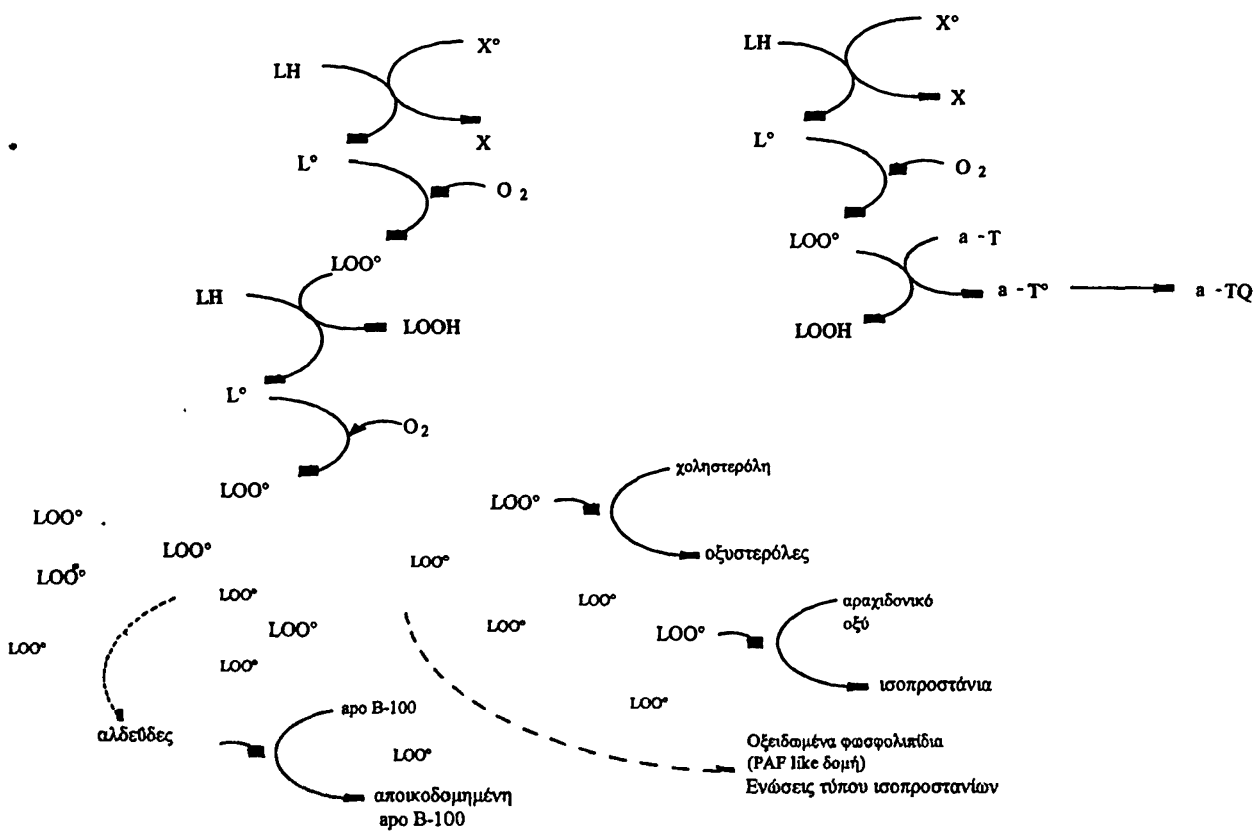


Οι Steinberg et al. [228] έδειξαν ότι τα μακροφάγα μετασχηματίζονται σε αφρώδη κύτταρα με την πρόσληψη LDL όταν αυτή είχε προεπωαστεί με καλλιέργεια ενδοθηλιακών κυττάρων. Αποδείχτηκε επίσης ότι LDL η οποία είχε προεπωαστεί με ενδοθηλιακά κύτταρα ήταν οξειδωτικά τροποποιημένη. Η πρόσληψη της oxLDL από τα μακροφάγα ολοκληρώθηκε ακόμη και παρουσία περίσσειας AcLDL, δηλώνοντας ότι η oxLDL μπορεί να είναι ένας φυσικά απαντώμενος προσδέτης των υποδοχέων εκκαθαριστών των μακροφάγων [229]. Μέχρι σήμερα έχει ταυτοποιηθεί ένας μεγάλος αριθμός από υποδοχείς εκκαθαριστές οι οποίοι αναγνωρίζουν τροποποιημένες μορφές LDL (SR-A, SR-B, CD36, LOX-1) όχι μόνο στα μακροφάγα αλλά και σε άλλους τύπους κυττάρων [227].

Η οξείδωση της LDL (oxLDL) περιλαμβάνει μία διαδικασία υπεροξείδωσης των λιπιδίων η οποία πυροδοτείται από ελεύθερες ρίζες. Κατά τη διάρκεια της οξείδωσης της LDL τόσο το λιπιδιακό, όσο και το πρωτεϊνικό περιεχόμενό της υπόκεινται σε μια ποικιλία από χημικές μεταβολές διαμέσου αντιδράσεων ελευθέρων ριζών καθώς επίσης και τροποποιήσεων από χημικώς δραστικά προϊόντα που σχηματίζονται στην oxLDL [219,228]. Η οξείδωση αρχίζει με την απομάκρυνση ενός ατόμου υδρογόνου από ένα πολυακόρεστο λιπαρό οξύ της LDL από μία ελεύθερη ρίζα X^{\bullet} . Η ρίζα του λιπαρού οξέος (L^{\bullet}) που προκύπτει αντιδρά ταχύτατα με οξυγόνο (O_2) προς το σχηματισμό ρίζας λιποϋπεροξειδίου, LOO^{\bullet} . Κατόπιν η ρίζα λιποϋπεροξειδίου αποσπά ένα άτομο υδρογόνου από παρακείμενο λιπαρό οξύ, LH, προς το σχηματισμό υδρολιποϋπεροξειδίου, $LOOH$, και μιας νέας ελεύθερης ρίζας λιπαρού οξέος L^{\bullet} . Τα υδρολιποϋπεροξειδία των λιπιδίων διασπώνται παρουσία μεταλλικών ιόντων προς αλδεύδες (μηλονική διαλδεύδη, MDA, 4-υδροξυνοενάλη, 4-HNE) και υδρογονάνθρακες. Τα τελικά προϊόντα οξείδωσης των λιπιδίων της LDL αντιδρούν με την apo B-100. Η καρβονυλική ομάδα της MDA αντιδρά με τις ε-αμινοομάδες ($\epsilon-NH_2$) μορίων λυσίνης που περιέχονται στην apo B-100 προς το σχηματισμό σταθερών ενώσεων που είναι γνωστές ως βάσεις Schiff. Παρουσία φαινολικών αντιοξειδωτικών, όπως η βιταμίνη E ($\alpha-T$), η υπεροξείδωση των λιπαρών οξέων αναστέλλεται με την αντίδραση της ελεύθερης ρίζας του υπεροξειδίου με το αντιοξειδωτικό (Εικόνα 13). Η φαινοξυ-ρίζα $\alpha-T^{\bullet}$ έχει πολύ μικρή δραστηριότητα και κατά συνέπεια δεν μπορεί να επιμηκύνει την υπεροξείδωση των λιπαρών οξέων [230].



Χαρακτηριστικό της oxLDL είναι ότι το επιφανειακό φορτίο της είναι περισσότερο αρνητικό απ' ότι της φυσικής LDL. Η oxLDL έχει μεγαλύτερη διάμετρο από τη φυσική LDL και παρουσιάζει αυξημένη ηλεκτροφορητική κινητικότητα. Περιέχει επίσης ισχυρώς 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. Έχει προταθεί επίσης ότι η oxLDL μπορεί να προκαλέσει την ενεργοποίηση των T-λεμφοκυττάρων σε αθηρωματικές πλάκες και να διεγείρει τον πολλαπλασιασμό των λείων μυϊκών κυττάρων (smooth muscle cells, SMC).



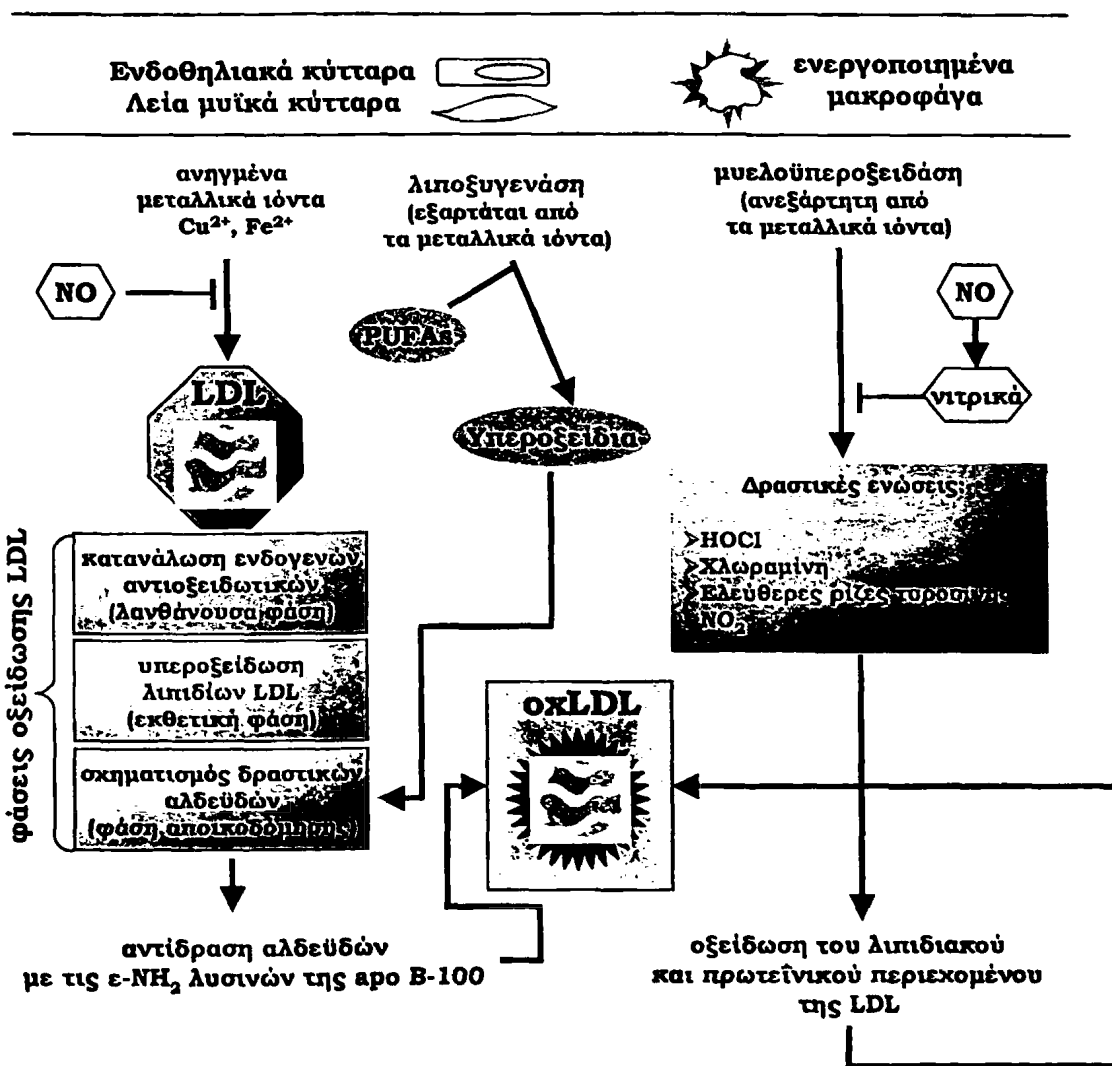
Εικόνα 13: Σχηματική απεικόνιση της υπεροξειδωσης των λιπιδίων.

Μηχανισμοί οξείδωσης της LDL

Διάφοροι μηχανισμοί, ενζυμικοί και μη ενζυμικοί, έχουν προταθεί για την οξείδωση της LDL στηριζόμενοι σε μελέτες *in vitro*. Στους μηχανισμούς αυτούς εμπλέκονται δραστικά μόρια, όπως μεταλλικά ιόντα, θειόλες, η γλυκόζη, η ρίζα του μονοξειδίου του αζώτου, η



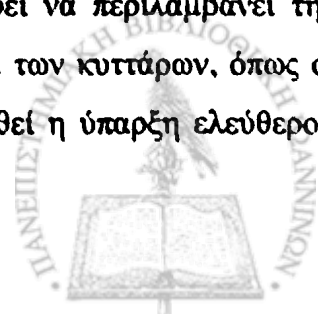
λιποξυγονάση και η μυελοϋπεροξειδάση (Εικόνα 14). Η μη ενζυμική οξείδωση η οποία καταλύεται από διάφορα δραστικά μόρια εξαρτάται από την παρουσία υδροϋπεροξειδίων των λιπιδίων.



Εικόνα 14: Μηχανισμοί οξείδωσης της LDL.

Μεταλλικά ιόντα

Πολλές μελέτες έχουν δείξει ότι ο χαλκός (Cu^{2+}) και άλλα δισθενή ιόντα είναι ιδιαίτερα επικίνδυνα για την LDL. Ακόμη και ελάχιστη ποσότητα χαλκού ή σιδήρου είναι ικανή να οξειδώσει ταχύτατα την LDL. Μία πιθανή πορεία μπορεί να περιλαμβάνει την αρχική αναγωγή των μεταλλικών ιόντων από αναγωγικά συστατικά των κυττάρων, όπως οι θειόλες και το ανιόν του υπεροξειδίου O_2^- . Παρόλο που έχει δείχθει η ύπαρξη ελεύθερου



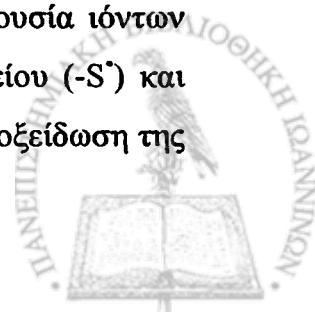
σιδήρου και χαλκού σε περιοχές προχωρημένης αθηρωμάτωσης [231], δεν υπάρχουν στοιχεία σχετικά με τα αρχικά στάδια ανάπτυξης της αθηρωμάτωσης. Έχει όμως βρεθεί ότι η ρίζα του O_2^- είναι ικανή να ελευθερώσει σίδηρο από την φερριτίνη [216]. Κατά συνέπεια θα μπορούσε να παίζει σημαντικό ρόλο τόσο στην έναρξη της οξειδωτικής τροποποίησης όσο και στην παραγωγή μετάλλων μετάπτωσης μέσα στο αρτηριακό τοίχωμα.

Η οξείδωση της LDL από μεταλλικά ιόντα (Cu^{2+}) *in vitro* συμβαίνει σε τρεις φάσεις: στην αρχική **λανθάνουσα φάση** παρατηρείται κατανάλωση των ενδογενών αντιοξειδωτικών της 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 της LDL αρχίζει η υπεροξείδωση των λιπαρών οξέων και η οξείδωση της LDL οδηγείται στην **εκθετική (παραγωγική) φάση**. Οι ρίζες που έχουν σχηματιστεί από τη λανθάνουσα φάση, διαμέσου σειράς αλυσιδωτών αντιδράσεων, σχηματίζουν νέες ελεύθερες ρίζες λιποϋπεροξειδίων. Το σημείο στο οποίο η παραγωγή των συζυγών διενίων είναι μέγιστη, σημαίνει το τέλος της παραγωγικής φάσης και την αρχή της **φάσης αποικοδόμησης** στην οποία τα λιποϋπεροξειδία μετατρέπονται σε δραστικές αλδεϋδες, οι οποίες με τη σειρά τους θα αντιδράσουν με τις θετικά φορτισμένες ε- NH_2 μορίων λυσίνης της apo B-100.

Τα μεταλλικά ιόντα μπορούν επίσης να καταλύουν την αποσύνθεση των λιπιδιακών υδροϋπεροξειδίων προς οξειδωμένα συστατικά. Η LDL έχει την ικανότητα να δεσμεύει τα ιόντα και η δέσμευση αυτή μπορεί να συσχετιστεί με την αναγωγή των μετάλλων και την προαγωγή της λιποϋπεροξείδωσης. Πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι η πρόσδεση του ιόντος Cu^{2+} σε ιστιδίνη της apo B-100 προάγει την υπεροξείδωση, απαραίτητες όμως για την αναγωγή των μεταλλικών ιόντων είναι και άλλες προσδένουσες περιοχές [213,232-234].

Θειόλες

Οι θειόλες είναι ενώσεις που περιέχουν θείο και οι οποίες ανακυκλώνονται συνεχώς ανάμεσα στην ανηγμένη και την οξειδωμένη μορφή τους (δισουλφίδιο). Παρουσία ιόντων μετάλλων αυτοξειδώνονται και παράγουν ανηγμένα μεταλλικά ιόντα, ρίζες θείου ($-S^{\cdot}$) και O_2^- , που προάγουν την υπεροξείδωση των λιπιδίων. Έχει προταθεί ότι κατά την οξείδωση της



LDL από τα αρτηριακά SMC, αυτά ανάγουν την εξωκυττάρια L-κυστίνη προς μία θειώλη, πιθανότατα L-κυστεΐνη, η οποία στην συνέχεια είναι υπεύθυνη για την αναγωγή του O_2 προς O_2^- . Η συνύπαρξη O_2^- μαζί με οξειδοαναγωγικά μέταλλα έχει ως αποτέλεσμα την οξείδωση της LDL [213].

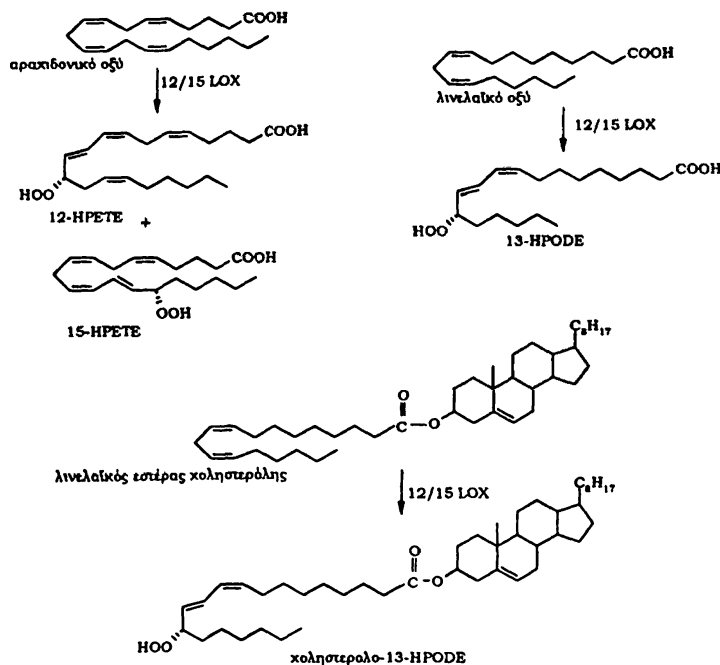
Γλυκόζη

Έχει προταθεί ότι οι αντιδράσεις γλυκοξειδωσης διαδραματίζουν ρόλο σε ασθενείς με σακχαρώδη διαβήτη που εμφανίζουν εκτεταμένη αγγειακή νόσο. Η γλυκοζυλίωση των πρωτεϊνών καθώς επίσης και η γλυκόζη διεγείρουν την οξείδωση της LDL από μεταλλικά ιόντα. Τέτοιου τύπου LDL οξειδώνεται ευκολότερα από χαλκό απ' ότι η φυσική LDL, υποδηλώνοντας ένα υψηλότερο περιεχόμενο σε προϊόντα οξείδωσης λιπιδίων [235-237].

Λιποξυγονάση

Οι λιποξυγονάσες είναι ενδοκυττάρια ένζυμα τα οποία είναι παρόντα στα μακροφάγα, σε επιδερμικά και επιθηλιακά κύτταρα, σε ενδοθηλιακά κύτταρα καθώς και λεία μυϊκά κύτταρα. Τα κύρια χαρακτηριστικά αυτών των ενζύμων για την καταλυτική τους δράση είναι η ύπαρξη ενός ατόμου σιδήρου, το οποίο δεν προέρχεται από το σίδηρο που περιέχει η αίμη, καθώς και η ικανότητά τους να εισάγουν μοριακό οξυγόνο σε ένα cis-cis-1,4-πενταδιενο-πολυακόρεστο λιπαρό οξύ. Τα ένζυμα αυτά καταλύουν την υπεροξειδωση των ελεύθερων πολυακόρεστων λιπαρών οξέων, όπως είναι το αραχιδονικό και το λινελαϊκό οξύ, προς οξειδωμένα λιπίδια τα οποία εμφανίζουν βιολογική δράση [237]. Εκτός από τα ελεύθερα λιπαρά οξέα οι λιποξυγονάσες καταλύουν και την υπεροξειδωση πολυακόρεστων λιπαρών οξέων που βρίσκονται εστεροποιημένα στα φωσfolιπίδια και τη χοληστερόλη (Εικόνα 15). Η δράση της 12/15 λιποξυγονάσης στα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό διαμορφωτικών και στερεοειδικών προϊόντων (η S διαμόρφωση υπερτερεί της R στερεοειδικής διαμόρφωσης). Αντίθετα, η διαμεσολαβούμενη από ελεύθερες ρίζες οξείδωση των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων οδηγεί στο σχηματισμό ρακεμικού μίγματος προϊόντων (S προϊόντα=R προϊόντα) [238].





Εικόνα 15: Υπεροξειδωση ελεύθερων λιπαρών οξέων και εστέρας χοληστερόλης προς μεταβολίτες υδροϋπεροξειδίου με τη δράση της 12/15 λιποξυγονάσης.

Ρίζα μονοξειδίου του αζώτου (NO[•])

Το NO[•] παράγεται από διάφορα κύτταρα με τη δράση της επαγωγίμης NO[•] συνθετάσης (iNOS). Αποτελεί παράγοντα αγγειοδιαστολής των SMC. Το NO[•] είναι μία σταθερή ρίζα η οποία δεν μπορεί να οξειδώσει την LDL σε φυσιολογικό pH. Σε LDL επωασμένη με Cu²⁺, η προσθήκη ουσιών οι οποίες είναι δότες NO[•] αναστέλλει την οξείδωση. Εντούτοις μια μελέτη έδειξε ότι επώαση της LDL με ουσίες οι οποίες είναι δότες NO[•] είχε ως αποτέλεσμα την πρόσληψή της από τα μακροφάγα διαμέσου των υποδοχέων εκκαθαριστών. Παρόλα αυτά, μπορεί να συνεισφέρει στην οξείδωση των λιποπρωτεϊνών με διάφορους μηχανισμούς. Αντιδρά ταχύτατα με το ανιόν του υπεροξειδίου, O₂^{•-}, προς το σχηματισμό υπεροξυνιτρικού ανιόντος (NOO⁻) το οποίο είναι ικανό να πυροδοτήσει την υπεροξειδωση των λιπιδίων. Το NOO⁻ μόλις πρωτονιωθεί διασπάται σχηματίζοντας ρίζα υδροξυλίου (OH[•]) [239]. Οι Leeuwenburgh et al. [240] έδειξαν την παρουσία της 3-νιτροτυροσίνης (η οποία σχηματίζεται όταν η LDL οξειδωθεί παρουσία NOO⁻) στην LDL που απομονώθηκε από αθηρωματικές πλάκες, υποδηλώνοντας έτσι ότι η οξειδωτική τροποποίηση της LDL από NOO⁻ ίσως συμβαίνει *in vivo*.



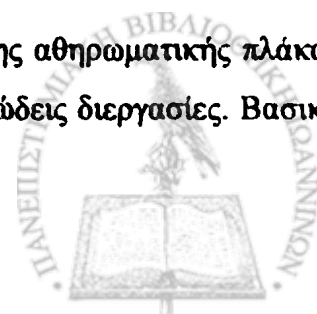
Μυελοϋπεροξειδάση

Η μυελοϋπεροξειδάση είναι ένα ένζυμο το οποίο απελευθερώνεται από τα μακροφάγα και τα ουδετερόφιλα ύστερα από φλεγμονώδη διέγερση, καταλύει το σχηματισμό ενός ισχυρού οξειδωτικού, του υποχλωριώδους οξέος (HOCl) χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα H_2O_2 και ιόντα Cl^- αλλά και άλλων δραστικών μορίων όπως χλωραμίνες, τυροσυλο-ελεύθερες ρίζες και διοξείδιο του αζώτου (NO_2). Το HOCl τροποποιεί την LDL αυξάνοντας το αρνητικό της φορτίο και μετατρέποντάς τη σε μια μορφή η οποία επάγει τη συσσώρευση εστέρων της χοληστερόλης στα μακροφάγα. Τα κύρια υποστρώματα για οξείδωση από το HOCl είναι δραστικές αμινομάδες της apo B-100. Συγκεκριμένα, η δράση της μυελοϋπεροξειδάσης στις πρωτεΐνες αρχίζει με τη μετατροπή της L-τυροσίνης, ενός φαινολικού αμινοξέος (το οποίο απαντά στο πλάσμα) σε τυροσυλο-ελεύθερη ρίζα. *In vitro* οι τυροσυλο-ρίζες αντιδρούν διασταυρωτά με τυροσίνες πρωτεϊνών σχηματίζοντας *o,o'*-διτυροσίνη. Η *o,o'*-διτυροσίνη σχηματίζεται στην LDL όταν αυτή επωαστεί με μυελοϋπεροξειδάση παρουσία H_2O_2 και Cl^- , όχι όμως όταν η LDL επωαστεί μόνο με περίσσεια ιόντων Cu^{2+} [213,233,241].

Ο Ρόλος των λιποπρωτεϊνών (LDL και οξειδωμένη LDL) στην φλεγμονή και την εξέλιξη της αθηρωμάτωσης

Η πρόοδος τα τελευταία πενήντα χρόνια στη αθηρωμάτωση βασίζεται κυρίως στη βασική θεώρηση του κεντρικού ρόλου που διαδραματίζει η LDL. Είναι γνωστό ότι η LDL παίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη της αθηρωματικής πλάκας. Παρόλα αυτά είναι γνωστό ότι ασθενείς με αγγειογραφικά τεκμηριωμένη στεφανιαία νόσο μπορεί να εμφανίζουν μετρίως ή και καθόλου αυξημένα επίπεδα LDL-χοληστερόλης ορού. [242]. Επιπρόσθετα, η μείωση της LDL-χοληστερόλης, σε ασθενείς στους οποίους χορηγήθηκαν στατίνες είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση του συνολικού καρδιαγγειακού κινδύνου κατά το 1/3 μετά από 5 χρόνια χορήγησης των φάρμακων [242].

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 oxLDL. Ταυτόχρονα η φλεγμονή έχει συσχετισθεί και με παράγοντες κινδύνου για αθηρωμάτωση, όπως η υπέρταση, η δυσλιπιδαιμία, ο σακχαρώδης διαβήτης και η παχυσαρκία [243]. Η oxLDL προκαλεί μείωση της έκφρασης του mRNA της προϊνσουλίνης στα παγκρεατικά κύτταρα, με αποτέλεσμα τη μείωση της έκκρισης της ινσουλίνης από τα συγκεκριμένα κύτταρα [244]. Ταυτόχρονα σε ασθενείς με μεταβολικό σύνδρομο τα αυξημένα επίπεδα oxLDL συσχετίστηκαν με διπλασιασμό του κινδύνου για καρδιαγγειακό θάνατο και μείζονα μη θανατηφόρα καρδιαγγειακά συμβάματα [245]. Επιπλέον υψηλά επίπεδα oxLDL έχουν ανιχνευθεί σε ασθενείς με καταστάσεις που θεωρούνται κλασικοί παράγοντες κινδύνου για στεφανιαία νόσο, όπως η υπέρταση [246-249], η δυσλιπιδαιμία [250-253], ο σακχαρώδης διαβήτης [254-257] και το κάπνισμα [258-260]. Υγιείς μέσης ηλικίας άνδρες με αυξημένα επίπεδα οξειδωμένης LDL ορού εμφανίζουν μειωμένη στεφανιαία εφεδρεία [261] και αυξημένο κίνδυνο να εκδηλώσουν ένα οξύ στεφανιαίο επεισόδιο τα επόμενα χρόνια [262].

Αυξημένα επίπεδα oxLDL σε σύγκριση με υγιείς εθελοντές έχουν παρατηρηθεί σε άτομα με αυξημένο 10-ετή κίνδυνο για οξύ στεφανιαίο σύνδρομο [245], σε ασθενείς με αγγειογραφικά τεκμηριωμένη στεφανιαία νόσο [263-267], καθώς επίσης και σε ασθενείς με σταθερή στηθάγχη [268] ή ιστορικό οξέος στεφανιαίου επεισοδίου [269,270]. Επιπρόσθετα, αυξημένα επίπεδα oxLDL στο ορό μπορούν να διαχωρίσουν τους ασθενείς με οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου (OEM) τόσο από αυτούς με σταθερή [271] όσο και από αυτούς με ασταθή στηθάγχη [264, 272]. Σε μια άλλη μελέτη τα αυξημένα επίπεδα της oxLDL 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 [273]. Αυξημένα επίπεδα oxLDL 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 [274, 275], όσο και σε ασθενείς με δυσλιπιδαιμία [276]. Παρότι η oxLDL ανιχνεύεται στο αίμα, είναι απίθανο να σχηματίζεται εκεί, καθώς στην κυκλοφορία υπάρχει αφθονία αντιοξειδωτικών ουσιών. Έτσι πιστεύεται ότι η θέση σχηματισμού της oxLDL είναι η αθηρωματική πλάκα και μόνο ένα πολύ μικρό ποσοστό της κυκλοφορεί στον ορό, όπου και ανιχνεύεται.



Είναι πιθανό ότι τα αυξημένα επίπεδα οxLDL 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 et al. [277] έδειξαν ότι αυξημένα επίπεδα οxLDL τόσο στην κυκλοφορία όσο και στο εσωτερικό των αθηρωματικών πλακών σχετίζονται με αυξημένο κίνδυνο για ρήξη των αθηρωματικών αυτών πλακών.



ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4^ο

Αθηρωμάτωση - Ο ρόλος των αιμοπεταλίων

Γενικά

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. Παρά το γεγονός ότι η νόσος του καρδιαγγειακού συστήματος θεωρείται νόσος των ανδρών, στοιχεία από την ιστοσελίδα του ΑΗΑ (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' ότι αθροιστικά οι επόμενες 17 αιτίες θανάτου συνολικά. 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 [278]. 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 [279]. Η πλειονότητα των νοσημάτων του καρδιαγγειακού συστήματος οφείλεται στην αθηρωμάτωση.

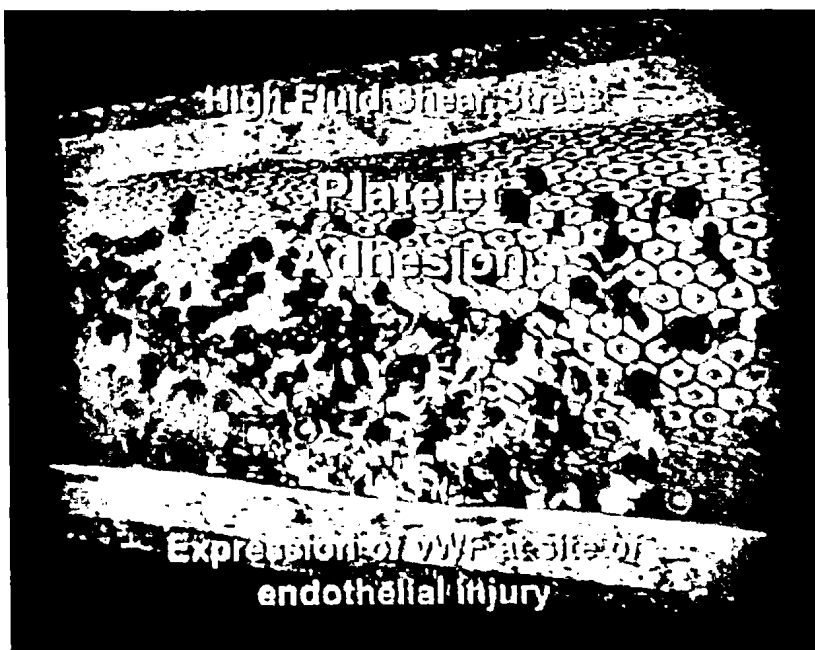
Η αθηρωμάτωση είναι ασθένεια του έσω χιτώνα των αρτηριών και θεωρείται μια ανοσολογική και φλεγμονώδης απάντηση του έσω χιτώνα σε βλάβη μιας περιοχής του αγγειακού τοιχώματος. Πρόκειται για μια τοπικά εντοπισμένη βλάβη σε όλο το πάχος του έσω χιτώνα κατά μήκος της αρτηρίας. Αφορά αρτηρίες που κυμαίνονται 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.

Ρόλος των αιμοπεταλίων στην αθηροθρόμβωση

Απαραίτητη προϋπόθεση για την προσκόλληση των αιμοπεταλίων στο αρτηριακό τοίχωμα είναι η λύση της συνέχειας του ενδοθηλίου. Η καταστροφή των ενδοθηλιακών κυττάρων οδηγεί στην έκθεση στον ενδαγγειακό χώρο στοιχείων του συνδετικού ιστού του ενδοθηλιακού χώρου όπως το κολλαγόνο, ο ακινητοποιημένος σ' αυτό παράγοντας vonWillebrand (vWF), η φιβρονεκτίνη και η βιτρονεκτίνη [280,281]. Η απάντηση των αιμοπεταλίων στη συγκεκριμένη βλάβη βασίζεται στην προσκόλληση, την ενεργοποίηση και τη συσσώρευση των κυττάρων αυτών (Εικόνα 16).

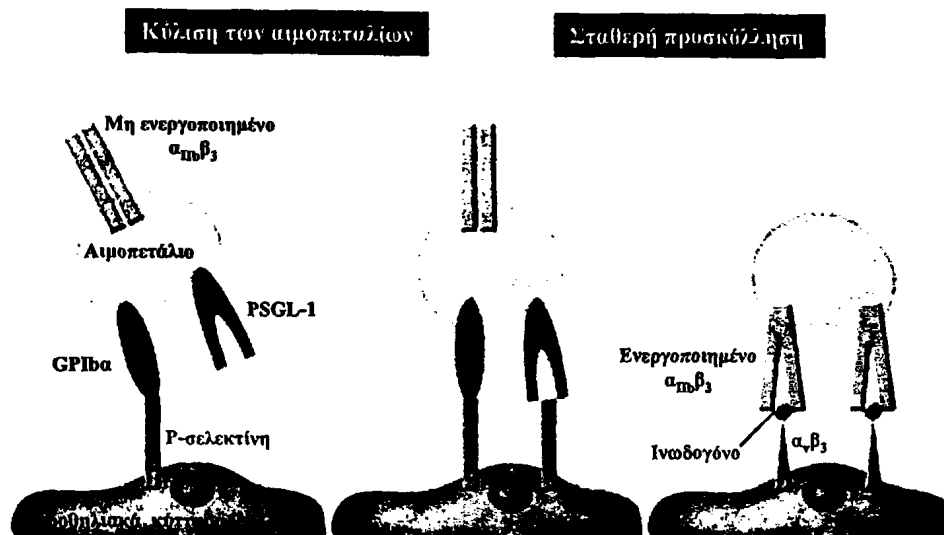


Εικόνα 16: Σχηματική απεικόνιση της ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων μετά από τη ρήξη της αθηρωματικής πλάκας.

Η αλληλεπίδραση των αιμοπεταλίων με το ενδοθήλιο και τα λευκοκύτταρα

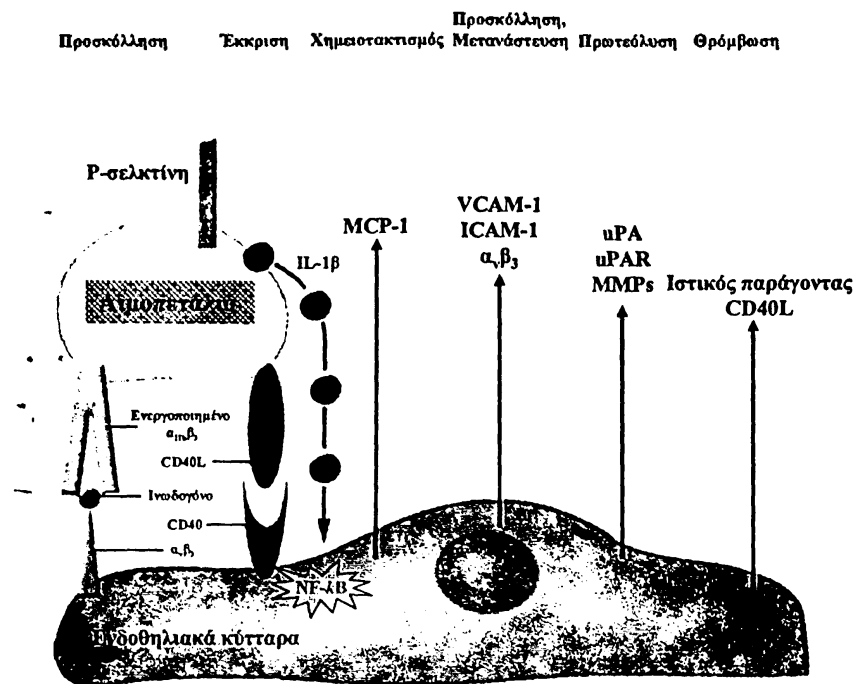
Εκτός από την προσκόλλησή τους στον υπενδοθηλιακό χώρο του αρτηριακού τοιχώματος, σε περίπτωση καταστροφής του ενδοθηλίου, τα αιμοπετάλια μπορούν να προσκολληθούν και στα ίδια τα ενδοθηλιακά κύτταρα, διαμέσου των ουδετερόφιλων και των λευκοκυττάρων. Η προσκόλληση του αιμοπεταλίου στο ενδοθήλιο έχει ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση των ενδοθηλιακών κυττάρων και την έκφραση της P-σελεκτίνης στην επιφάνεια της κυτταρικής μεμβράνης τους. Η P-σελεκτίνη, η οποία βρίσκεται αποθηκευμένη στα ενδοκυττάρια κοκκία των ενδοθηλιακών κυττάρων, γνωστά και ως σωματίδια Weibel-Palade, μεταφέρεται πολύ γρήγορα στην κυτταρική τους μεμβράνη, όταν τα ενδοθηλιακά κύτταρα ενεργοποιηθούν από διάφορους αγωνιστές όπως είναι η θρομβίνη, η ισταμίνη και οι ελεύθερες ρίζες O_2 [124,282]. Η προσκόλληση των ενεργοποιημένων αιμοπεταλίων στο ενδοθηλιακό κύτταρο γίνεται διάμεσου της P-σελεκτίνης και του vWF. Οι επιφανειακοί υποδοχείς των αιμοπεταλίων GPIIb και ο γλυκοπρωτεϊνικός προσδέτης της P-σελεκτίνης (P-selectin glycoprotein ligand-1, PSGL-1) αλληλεπιδρούν με την ενδοθηλιακή P-σελεκτίνη, με αποτέλεσμα τη χαλαρή προσκόλληση των ενεργοποιημένων αιμοπεταλίων στα ενδοθηλιακά κύτταρα (Εικόνα 17) [283,284]. Αυτή η αρχική προσκόλληση είναι χαλαρή και επιτρέπει στα αιμοπετάλια να κυλούν (rolling) πάνω στο ενδοθήλιο, δίνοντας έτσι τη δυνατότητα σε αυτά να αναγνωρίσουν και να συνδεθούν χαλαρά και με αλλά μόρια, όπως με την E-σελεκτίνη [285]. Η E-σελεκτίνη εκφράζεται στην κυτταρική μεμβράνη των ενδοθηλιακών κυττάρων. Επιπρόσθετα, τα λευκοκύτταρα μπορούν να προκαλέσουν την προσκόλληση των ενεργοποιημένων αιμοπεταλίων διαμέσου της αλληλεπίδρασης της P-σελεκτίνης με τον PSGL-1 [286]. Τα λευκοκύτταρα πιθανώς να συσσωρεύονται στους αιμοπεταλιακούς θρόμβους που ήδη βρίσκονται στον υπενδοθηλιακό χώρο [287]. Επιπλέον, η P-σελεκτίνη των α-κοκκίων εκφράζεται στη μεμβράνη των ενεργοποιημένων αιμοπεταλίων και παίζει σημαντικό ρόλο στην προσκόλληση των αιμοπεταλίων με τα ουδετερόφιλα και τα μονοκύτταρα [124,288]. Τελικά η προσκόλληση των αιμοπεταλίων με το ενδοθήλιο σταθεροποιείται διάμεσου των β_3 ιντεγκρινών (Εικόνα 17).





Εικόνα 17: Σχηματική απεικόνιση της προσκόλλησης των αιμοπεταλίων στα ενεργοποιημένα ενδοθηλιακά κύτταρα (τροποποιημένο από Gawaz et al.) [289].

Η σταθερή προσκόλληση των αιμοπεταλίων διάμεσου του ενεργοποιημένου $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ οδηγεί στην έκφραση της P-σελεκτίνης αλλά και στην απελευθέρωση του CD40L και της ιντερλευκίνης-1 β (IL-1 β). Η IL-1 β διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην ενεργοποίηση των ενδοθηλιακών κυττάρων, [290,291] αφού επάγει την έκφραση διαφόρων φλεγμονωδών μορίων, όπως το μόριο της διακυτταρικής προσκόλλησης-1 (Intercellular Adhesion Molecule-1, ICAM-1), το προσκολλητικό μόριο του αγγειακού τοιχώματος-1 (Vascular Cell Adhesion Molecule-1, VCAM-1) και η χημειοτακτική πρωτεΐνη-1 των μονοκυττάρων (monocyte chemoattractant protein-1, MCP-1) [292]. Επιπρόσθετα η IL-1 β επάγει την ενεργοποίηση του NF- κ B (πυρηνικός παράγοντας- κ B, nuclear factor- κ B) [293] διάμεσου της κινάσης του p38 (p38 MAP κινάση) [294]. Η έκκριση των μορίων αυτών διεγείρει τα ενδοθηλιακά κύτταρα, με αποτέλεσμα τη δημιουργία συνθηκών φλεγμονής τοπικά, γεγονός που προάγει τις αλλαγές που παρατηρούνται στα κύτταρα αυτά κατά την εξέλιξη της αθηρωμάτωσης (Εικόνα 18).



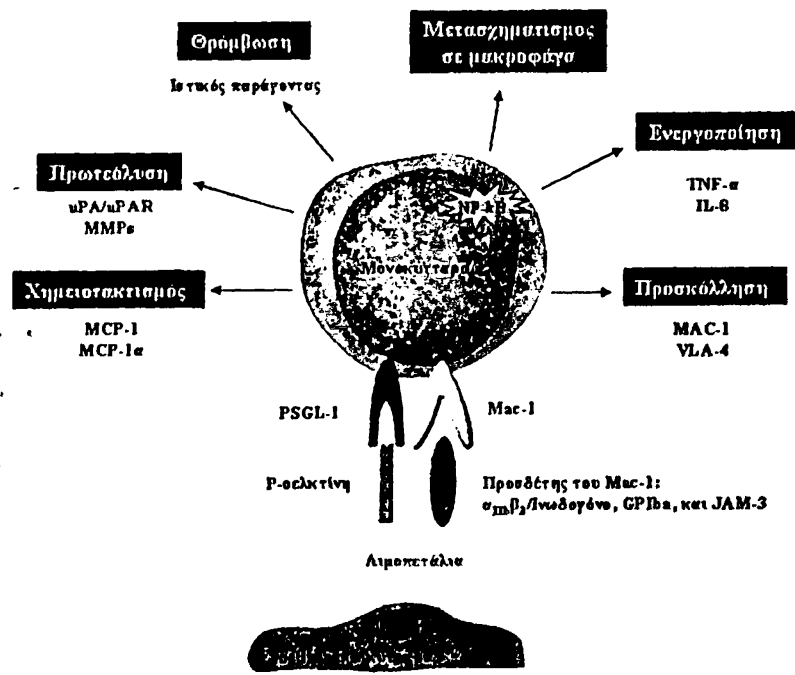
Εικόνα 18: Σχηματική απεικόνιση της σταθερής προσκόλλησης των αιμοπεταλίων στο ενεργοποιημένο ενδοθήλιο (τροποποιημένο από Gawaz et al.) [289].

Η προσκόλληση των αιμοπεταλίων στα ενδοθηλιακά κύτταρα μπορεί να γίνει διαμέσου των ουδετερόφιλων. Αρχικά προσκολλούνται ασθενώς στο ενεργοποιημένο ενδοθήλιο διάμεσου της P-σελεκτίνης που εκφράζεται στην μεμβράνη των ενδοθηλιακών κυττάρων. Αυτή η αρχική προσκόλληση είναι χαλαρή και επιτρέπει στα ουδετερόφιλα να κυλούν πάνω στο ενδοθήλιο [295]. Σ' αυτή την προσκόλληση συμβάλλουν επίσης η L-σελεκτίνη που εκφράζεται στην κυτταρική μεμβράνη των ουδετερόφιλων και η E-σελεκτίνη των ενδοθηλιακών κυττάρων, όταν αυτά ενεργοποιηθούν από κυτταροκίνες, όπως είναι ο παράγοντας νέκρωσης των όγκων-α (TNF-α, Tumor Necrosis Factor-α). Η προσκόλληση των ουδετερόφιλων στο ενεργοποιημένο ενδοθήλιο έχει ως αποτέλεσμα την έκθεση αυτών σε ισχυρούς ενεργοποιητές τους, όπως είναι ο PAF και οι χημειοκίνες της οικογένειας C-X-C (ιντερλευκίνη-8, IL-8), οι οποίοι παράγονται από τα ενδοθηλιακά κύτταρα [296,297]. Ιδιαίτερα ο PAF μετά την παραγωγή του δεν εκκρίνεται, αλλά παραμένει συνδεδεμένος στην κυτταρική μεμβράνη των ενδοθηλιακών κυττάρων. Με αυτό τον τρόπο ασκεί συνδετοκρινή δράση στα προσκολλημένα ουδετερόφιλα [298]. Η ενεργοποίηση αυτή οδηγεί, στην έκφραση, της β₂ ιντεγκρίνης (CD11b/CD18, Mac-1 και α_Mβ₂) στην κυτταρική μεμβράνη των ουδετερόφιλων. Στη συνέχεια η CD11b/CD18 συνδέεται με τον ενδοθηλιακό υποδοχέα του

ICAM-1, με αποτέλεσμα τη σταθεροποίηση της προσκόλλησης των ουδετερόφιλων στο ενδοθήλιο. Πάνω σ' αυτά, μπορούν κατόπιν να προσκολληθούν τα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια διάμεσου της P-σελεκτίνης, σχηματίζοντας έτσι συσσωρεύματα αιμοπεταλίων-ουδετερόφιλων πάνω στο ενδοθήλιο. Η προσκόλληση των αιμοπεταλίων-ουδετερόφιλων διάμεσου της P-σελεκτίνης και ο σχηματισμός ασταθών συσσωματωμάτων μπορεί να συμβεί και ανεξάρτητα από την προσκόλληση των ουδετερόφιλων στο ενδοθήλιο. Τα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια μπορούν να συνδεθούν με τα ουδετερόφιλα διάμεσου γεφυρών Fg. Το Fg αναγνωρίζεται τόσο από το υποδοχέα CD11b/CD18 των ουδετερόφιλων όσο και από τον υποδοχέα $\alpha_{IIb}\beta_3$ των αιμοπεταλίων [299]. Έτσι τα αιμοπετάλια, τα ουδετερόφιλα και τα ενδοθηλιακά κύτταρα, αλληλεπιδρούν μεταξύ τους προσκολλούμενα και ενεργοποιώντας το ένα το άλλο διαμέσου της παραγωγής και έκκρισης των διαφόρων αγωνιστών.

Η προσκόλληση των μονοκυττάρων στα αιμοπετάλια αρχικά επιτυγχάνεται διάμεσου της αλληλεπίδρασης της P-σελεκτίνης και του PSGL-1 [300,301]. Στην συνέχεια η προσκόλληση αυτή σταθεροποιείται με την σύνδεση του με το CD11b/CD18 ή το GPIIb [302] ή/και με υποδοχείς της κυτταρικής μεμβράνης των αιμοπεταλίων (JAM-3 [303], ICAM-2 [304]) και με το Fg δεσμευμένο στον $\alpha_{IIb}\beta_3$ [305,306]. Με αυτό τον τρόπο, τα αιμοπετάλια διεγείρουν την έκκριση χημειοκινών, κυτταροκινών και του ιστικού παράγοντα (tissue factor, TF) από τα μονοκύτταρα, ενεργοποιούν υποδοχείς προσκόλλησης και πρωτεασών, ενώ επάγουν τη διαφοροποίηση των μονοκυττάρων σε μακροφάγα (Εικόνα 19). Η αλληλεπίδραση αιμοπεταλίων και μονοκυττάρων δημιουργεί το κατάλληλο περιβάλλον στο αρτηριακό τοίχωμα για την ανάπτυξη της αθηρωματικής πλάκας [289].





Εικόνα 19: Σχηματική απεικόνιση της αλληλεπίδρασης αιμοπεταλίων με μονοκύτταρων (τροποποιημένο από Gawaz et al.) [289].

Ο ρόλος των PMPs στην εξέλιξη της αθηρωμάτωσης

Τα PMPs που παράγονται από τα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια εκφράζουν την P-σελεκτίνη. Η έκφραση της P-σελεκτίνης σ' αυτά οδηγεί στη δημιουργία γεφυρών μεταξύ των PMPs και των λευκοκυττάρων, με αποτέλεσμα να κατευθύνονται προς την επιφάνεια του ενδοθηλίου και να εμπλέκονται σε φλεγμονώδεις καταστάσεις [307]. Η πρόσδεση των λευκοκυττάρων στα αιμοπετάλια προκαλεί την ενεργοποίησή τους και την παραγωγή των PMPs. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την πιθανή προσκόλληση των λευκοκυττάρων στα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια και τα ενδοθηλιακά κύτταρα διαμέσου της P-σελεκτίνης και του PSGL-1 αντίστοιχα [308].

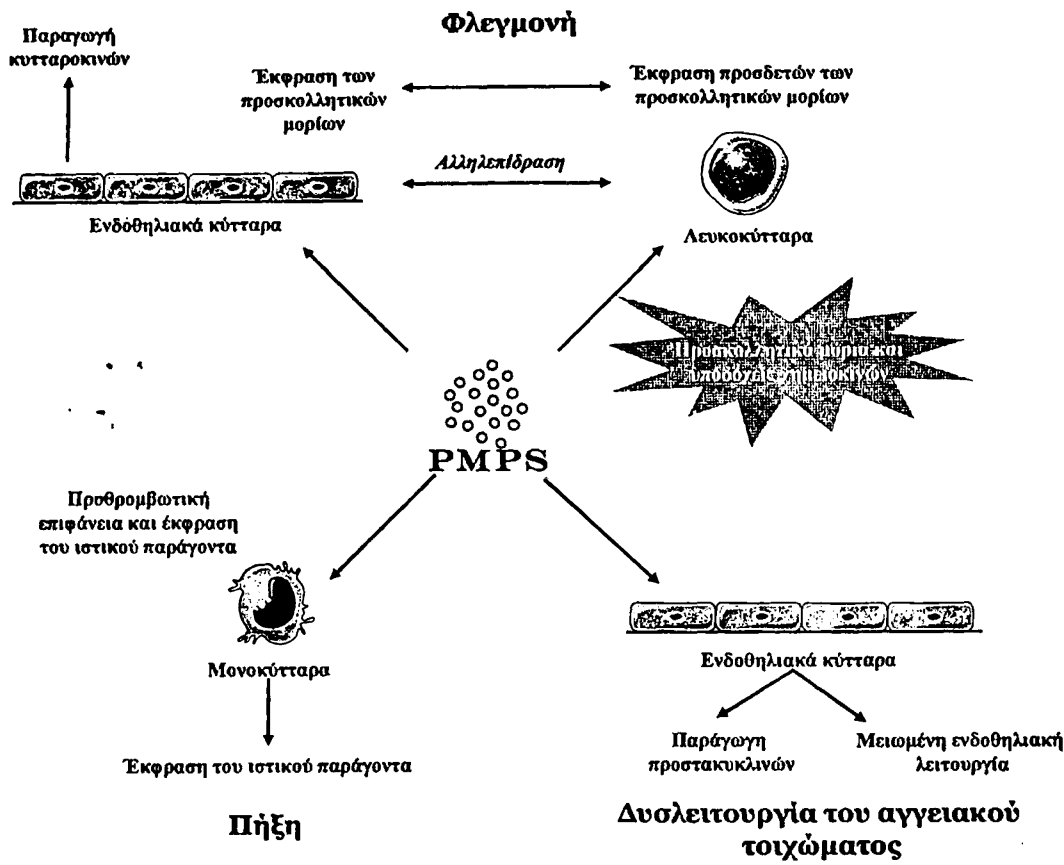
Η προσκόλληση των PMPs στον υπενδοθηλιακό χώρο αλλά και στα ενεργοποιημένα ενδοθηλιακά κύτταρα, γίνεται διάμεσου του α_{IIb}β₃ των PMPs [309, 310]. Η προσκόλληση των PMPs στο αρτηριακό τοίχωμα έχει ως αποτέλεσμα τη μετανάστευση ενεργοποιημένων αιμοπεταλίων στην περιοχή της ενδοθηλιακής βλάβης, διάμεσου ενός μηχανισμού ο οποίος εξαρτάται από το Fg και τον α_{IIb}β₃ [311].



Οι Barry et al. [312] έδειξαν ότι τα PMPs ισχυροποιούν την προσκόλληση των λευκοκύτταρων στα ενδοθηλιακά κύτταρα. Τα PMPs αυξάνουν την έκφραση του ICAM-1, με αποτέλεσμα την προσκόλληση των λευκοκυττάρων στο ενεργοποιημένο ενδοθήλιο. Ακολουθεί η μετανάστευση των κύτταρων αυτών στον υπενδοθηλιακό χώρο, με αποτέλεσμα την παραγωγή διαφόρων φλεγμονωδών κυτταροκινών όπως η ιντερλευκίνη-1 (IL-1), IL-8 και ιντερλευκίνη-6 (IL-6) [312-314]. Ορισμένες από τις δράσεις αυτές των PMPs οφείλονται στο AA και πραγματοποιούνται διαμέσου μιας PKC [312]. Επιπρόσθετα, τα PMPs πιθανώς να παίζουν ρόλο στην αθηρωμάτωση, καθώς προκαλούν τη μετανάστευση των SMC [315]. Πρόσφατη μελέτη των Baj-Kryworzeka et al. [316] έδειξε ότι τα PMPs εκφράζουν το CD40L στην επιφάνειά τους όταν απομονώνονται από αιμοπετάλια ενεργοποιημένα με συνδυασμό θρομβίνης και κολλαγόνου, δίνοντας έτσι μια νέα διάσταση στο ρόλο του CD40L αλλά και των PMPs στην ανάπτυξη της αθηρωματικής πλάκας.

Επιπρόσθετα, τα αιμοπετάλια εμφανίζουν ένα μηχανισμό αρνητικής παλίνδρομης ρύθμισης, ο οποίος ελέγχει την ανταπόκρισή τους στο κολλαγόνο. Ο μηχανισμός αυτός σχετίζεται με το προσκολλητικό μόριο των αιμοπεταλίων και των ενδοθηλιακών κύτταρων (platelet-endothelial cell adhesion molecule-1, PECAM-1 ή CD31). Με αυτό τον τρόπο περιορίζεται η ανεξέλεγκτη δημιουργία αιμοπεταλιακού θρόμβου [317]. Οι Naganuma et al. [318], έδειξαν ότι σε υψηλές διατμητικές τάσεις η αλληλεπίδραση GPIb-vWF έχει ως αποτέλεσμα τησχάση του PECAM-1 από την κυτταρική μεμβράνη των αιμοπεταλίων, την ενεργοποίηση της καλπαΐνης και την παραγωγή των PMPs. Με αυτό τον τρόπο τα PMPs φέρουν τον PECAM-1 στην επιφάνειά τους. Βέβαια ο ακριβής ρόλος του PECAM-1 στην αθηροθρόμβωση δεν έχει ακόμα διευκρινιστεί. Επιπρόσθετα, είναι γνωστό ότι MPs που φέρουν τον PECAM-1 παράγονται και από τα ενδοθηλιακά κύτταρα (EMPs). Παρόλα αυτά, η πλειοψηφία των μικροσωματιδίων του πλάσματος είναι τα PMPs [319]. Ο διαχωρισμός των PMPs από τα EMPs γίνεται με τη βοήθεια της κυτταρομετρίας ροής παρουσία αντισωμάτων κατά των αιμοπεταλίων ή των ενδοθηλιακών κύτταρων. Επιπρόσθετα, ο διαχωρισμός των PMPs βασίζεται στο γεγονός ότι σε αντίθεση με τα PMPs ο μεγαλύτερος αριθμός των EMPs δεν εκφράζει θετικότητα για την αννεξίνη-V [320]. Συνοπτικά, η δράση των PMPs στους παράγοντες που εμπλέκονται στην αθηρωματική διαδικασία φαίνεται στην Εικόνα 20.





Εικόνα 20: Σχηματική απεικόνιση της δράσης των PMPS (τροποποιημένο από VanWijk et al.) [139].

Ο ρόλος των αιμοπεταλίων και των PMPS στην εξέλιξη της αθηρωμάτωσης

Πρόσφατα έχει έρθει ξανά στο φως της δημοσιότητας η υπόθεση ότι τα προσκολλούμενα στο αρτηριακό τοίχωμα αιμοπετάλια δεν συμβάλλουν μόνο στην ενεργοποίηση και τη συσσώρευση αλλά και στην ανάπτυξη της αθηρωματικής πλάκας. Η αναστολή της κυκλοξυγονάσης-2 (Cox-2), του αγγειακού τοιχώματος, η οποία συμμετέχει στην παραγωγή της PGI₂, δεν επηρέασε την ανάπτυξη της αθηρωματικής πλάκας σε πειραματικό μοντέλο ποντικών [321]. Όμως, η αναστολή της Cox-1, η οποία συμβάλλει στη σύνθεση του TxA₂ των αιμοπεταλίων και μειώνει έτσι την ενεργοποίησή τους, είχε ως αποτέλεσμα σημαντική μείωση της ανάπτυξης της αθηρωματικής πλάκας στο ίδιο πειραματικό μοντέλο [321].

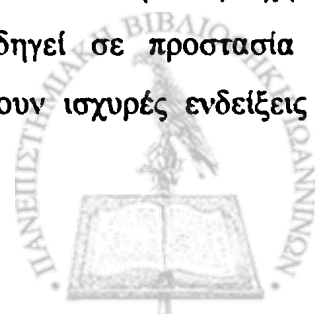
Παρά τα νέα αυτά δεδομένα, ο ρόλος των αιμοπεταλίων στην αθηρωμάτωση παραμένει αδιευκρίνιστος. Τα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια προσκολλούνται στις περιοχές



στις οποίες το ενδοθήλιο έχει υποστεί βλάβη και προάγουν την ανάπτυξη της αθηρωμάτωσης με διαφορετικούς τρόπους. Τέτοιες αλληλεπιδράσεις συμβάλλουν στην προσκόλληση των λευκοκυττάρων στο αρτηριακό τοίχωμα σε καταστάσεις που εμφανίζουν υψηλές διατμητικές τάσεις. Τα αιμοπετάλια εκκρίνουν διάφορους αυξητικούς παράγοντες, όπως ο αυξητικός παράγοντας των αιμοπεταλίων (platelet derived growth factor, PDGF) [322] καθώς και άλλους παράγοντες με μιτογόνες δράσεις, όπως ο μετασχηματίζων αυξητικός παράγοντας-β (transforming growth factor-β, TGF-β) και ο επιδερμικός αυξητικός παράγοντας (epidermal growth factor, EGF). Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη μετανάστευση και τον πολλαπλασιασμό των SMC και των ινοβλαστών του αρτηριακού τοιχώματος, συμβάλλοντας έτσι στην ανάπτυξη της αθηρωματικής πλάκας ή στη δημιουργία της επαναστένωσης μετά από αγγειοπλαστική [323-326].

Είναι γνωστό από παλαιότερες μελέτες ότι τα αιμοπετάλια αλληλεπιδρούν με τις λιποπρωτεΐνες του πλάσματος. Η αλληλεπίδραση μεταξύ λιποπρωτεϊνών και αιμοπεταλίων παίζει σημαντικό ρόλο στην παθοφυσιολογία της αθηρωμάτωσης και της θρόμβωσης. Παλαιότερες μελέτες *in vivo* έχουν δείξει ότι ασθενείς με υπερχοληστερολαιμία εμφανίζουν ενεργοποιημένα αιμοπετάλια. Στο πλάσμα των ασθενών αυτών ανιχνεύονται αυξημένα επίπεδα συστατικών των αποθηκευτικών κοκκίων των αιμοπεταλίων όπως η β-θρομβογλοβουλίνη (β-thromboglobulin, β-TG), ο PF4 [327] καθώς και κυκλοφορούντα αιμοπεταλιακά συσσωρεύματα [328]. *In vitro*, τα αιμοπετάλια αυτών των ασθενών είναι περισσότερο ευαίσθητα στη δράση διάφορων συσσωρευτικών παραγόντων, όπως το ADP και η θρομβίνη, σε σχέση με αυτά των νορμολιπιδαιμικών ατόμων [329-331]. Επιπλέον, η αυξημένη έκκριση ADP και 5-HT από τα πυκνά κοκκία καθώς και της TxA₂ από τα α-κοκκία αποτελούν δείκτες πρόωμης ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων.

Τα ευρήματα αυτά επιβεβαιώνουν το γεγονός ότι τα αιμοπετάλια τα οποία προσκολλούνται στο αρτηριακό τοίχωμα συμβάλλουν τόσο στην ανάπτυξη της αθηρωματικής πλάκας, όσο και στην έναρξη της οξείας αρτηριακής θρόμβωσης. Οι Theilmeyer et al. [332] παρατήρησαν αυξημένη έκκριση του vWF σε ασθενείς με υπερχοληστερολαιμία σαν απάντηση του αρτηριακού τοιχώματος στη φλεγμονή. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη στρατολόγηση (recruitment) των αιμοπεταλίων στην περιοχή της φλεγμονής. Η έλλειψη του vWF σε διάφορες ασθένειες οδηγεί σε προστασία και επιβράδυνση της ανάπτυξης της αθηρωματικής πλάκας. Υπάρχουν ισχυρές ενδείξεις ότι



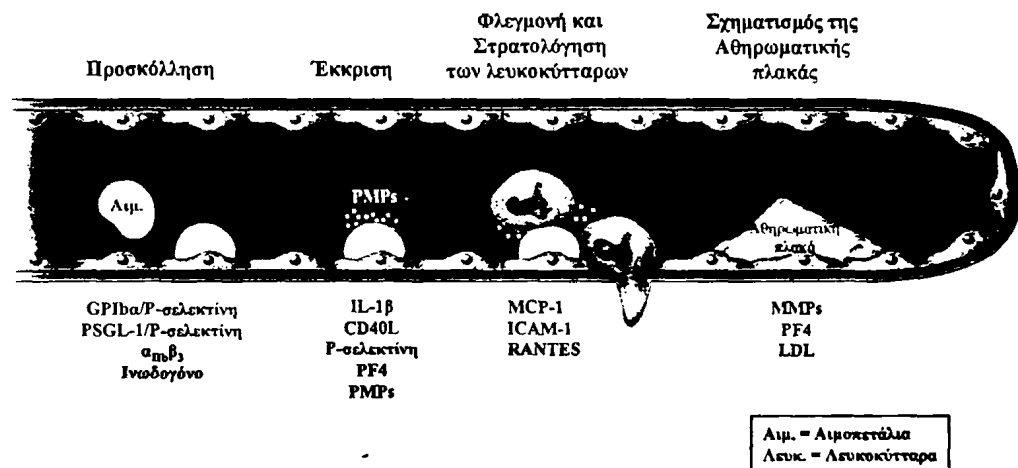
διάφορες βακτηριακές ή ιογενείς λοιμώξεις μπορούν πιθανά να προκαλέσουν και γενικότερα να συμμετέχουν στην έναρξη της αθηρωμάτωσης [333]. Τα αιμοπετάλια μπορούν να ενεργοποιηθούν από βακτήρια ή από προϊόντα βακτηριδίων αλλά και από αντισώματα των μικροοργανισμών διαμέσου του υποδοχέα των ανοσοσφαιρινών G, FCγRIIA [334]. Έτσι η επακόλουθη μόλυνση ή λοίμωξη, η οποία πιστεύεται ότι αυξάνει τον κίνδυνο για οξεία στεφανιαία επεισόδια, μπορεί να είναι ένα από τα φλεγμονώδη ερεθίσματα τα οποία ξεκινούν ή επιταχύνουν την ανάπτυξη της αθηρωματικής πλάκας προσελκύοντας ενεργοποιημένα αιμοπετάλια στην περιοχή της βλάβης. Οι Shpilberg et al. [335] έδειξαν ότι η έλλειψη της ιντεγκρίνης $\alpha_{IIb}\beta_3$ δε συσχετίζεται με την προστασία από την αθηρωμάτωση, γεγονός που υποδηλώνει ότι μόνο ορισμένοι από τους υποδοχείς που συμμετέχουν στην προσκόλληση, συμμετέχουν και στο σχηματισμό ενός αιμοπεταλιακού θρόμβου.

• Επιπρόσθετα, τα PMPs πιθανώς να προάγουν την αγγειογένεση [336,337], μια παθοφυσιολογική κατάσταση που συσχετίζεται άμεσα με την αθηρωμάτωση. Είναι γνωστό ότι διάφορα βιοδραστικά λιπίδια βρίσκονται στην επιφάνεια των αιμοπεταλίων όπως η φωσφορική σφινγγοσίνη-1 (sphingosine-1-phosphate, SPP) [336]. Πράγματι, το SPP είναι προσδέτης για το συζευγμένο με G_i -πρωτεΐνη γονίδιο διαφοροποίησης-1 των ενδοθηλιακών κυττάρων (Endothelial Differentiation Gene-1, EDG-1), γνωστό επίσης και ως SPP_1 . Η επαφή του SPP με τα ενδοθηλιακά κύτταρα, διάμεσου του SPP_1 , οδηγεί στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, τη μετανάστευση και τελικά το σχηματισμό ενός αυλού που επενδύεται από αυτά, γεγονός απαραίτητο για την αγγειογένεση. Επιπρόσθετα, το EDG-1 οδηγεί στην ωρίμανση του αγγειακού τοιχώματος, η οποία επιτυγχάνεται διάμεσου της αλληλεπίδρασης των SMC και των ενδοθηλιακών κυττάρων. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την ισχυροποίηση του αγγειακού τοιχώματος και τη μείωση της αγγειακής διαπερατότητας. Οι Kim et al. [337] έδειξαν ότι η απομάκρυνση των βιοδραστικών λιπιδίων με ενεργό άνθρακα, μειώνει σημαντικά την δυνατότητα των PMPs να προκαλέσουν αγγειογένεση. Έτσι φαίνεται ότι τα PMPs μπορούν να συμμετέχουν στην ανάπτυξη της αθηρωματικής πλάκας διάμεσου της συμμετοχής τους στη διαδικασία της αγγειογένεσης (Εικόνα 21).

Στην Εικόνα 21 φαίνεται συνοπτικά ο ρόλος των αιμοπεταλίων στην αθηρογένεση. Η ανάπτυξη της αθηρωματικής πλάκας χωρίζεται σε τέσσερις διαφορετικές φάσεις. Στην πρώτη φάση, τη φάση προσκόλλησης, τα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια κυλούν κατά μήκος του ενδοθηλίου μέσω της GPIIb/IIIa/P-σελεκτίνης ή του συμπλέγματος PSGL-1/P-σελεκτίνης. Στη



συνέχεια τα αιμοπετάλια παραμένουν σταθερά προσκολλημένα στο αγγειακό ενδοθήλιο, απελευθερώνουν παράγοντες που επάγουν τη φλεγμονή (IL-1 β , CD40L, PF4 και PMPs) και την έκφραση διάφορων πρωτεϊνών που προάγουν την αθηρωματική διαδικασία (MCP-1, ICAM-1 και RANTES). Η έκκριση αυτή οδηγεί στην στρατολόγηση των λευκοκυττάρων της κυκλοφορίας τα οποία προσκολλούνται στα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια ή PMPs και διεγείρονται διάμεσου αλληλεπιδράσεων με υποδοχείς. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη μετανάστευση των λευκοκυττάρων στον υπενδοθηλιακό χώρο και τη δημιουργία των αφρωδών κυττάρων. Κατά συνέπεια, τα αιμοπετάλια παρέχουν το φλεγμονώδες περιβάλλον για το σχηματισμό των αθηρωματικών πλακών, πριν την απόφραξη του αγγείου από θρόμβωση κατά τη ρήξη της πλάκας (Εικόνα 21) [289].



Εικόνα 21: Σχηματική απεικόνιση της ανάπτυξης της αθηρωματικής πλάκας από τα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια ή PMPs (τροποποιημένο από Gawaz et al.) [289].

Η δημιουργία του αιμοπεταλιακού θρόμβου αποτελεί το πρώτο απαραίτητο βήμα για την ενεργοποίηση του μηχανισμού πήξης που οδηγεί στο σχηματισμό του ινώδους. Με αυτό τον τρόπο δημιουργείται ένας μεγαλύτερος θρόμβος στον οποίο εγκλωβίζονται λευκοκύτταρα και κυρίως ερυθροκύτταρα. Η ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων, εκτός από το ότι συμβάλλει με την έκκριση παραγόντων πήξης, στο μηχανισμό αιμόστασης, παρεμποδίζει και την θρομβόλυση, διότι εκκρίνεται ο αναστολέας του PAI-1.

Είναι γνωστό ότι ο PAI-1 βρίσκεται στα α -κοκκία των μη ενεργοποιημένων αιμοπεταλίων [338]. Ένα ποσοστό του PAI-1 βρίσκεται συνδεδεμένο με τη βιτρονεκτίνη. Η αλληλεπίδραση βιτρονεκτίνης και PAI-1 έχει ως αποτέλεσμα τη διατήρηση του PAI-1 σε

ενεργοποιημένη κατάσταση [311]. Η ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων οδηγεί στην αποκοκκίωση των α-κοκκίων και του περιεχομένου τους, ενώ επιπρόσθετα εκφράζεται και η βιμεντίνη που αποτελεί συστατικό του κυτταροσκελετού. Κατά την εξέλιξη αυτής της διεργασίας ακολουθεί η δέσμευση του PAI-1 με τη βιμεντίνη διαμέσου της βιτρονεκτίνης. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα, την παρουσία του PAI-1 στα PMPs. Με αυτό τον τρόπο τα PMPs ενισχύουν τη θρομβωτική δράση τους.

Η ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων οδηγεί στην έκφραση αρνητικών φωσφολιπιδίων στην επιφάνεια τους αλλά και στα PMPs, όπως η PS. Η έκφραση της PS δημιουργεί το κατάλληλο περιβάλλον για την πρόσδεση διάφορων παραγόντων. Οι παράγοντες αυτοί προσδένονται διαμέσου των αρνητικών φορτισμένων φωσφολιπιδίων και της περιοχής-GIa, παρουσία ιόντων Ca^{2+} σχηματίζοντας σύμπλοκα θρομβοπλαστίνης και τενάσης. Τα PMPs εκφράζουν περισσότερες περιοχές για τη δέσμευση με τους παράγοντες Va, VIIIa, and IXa σε σχέση με την ενεργοποιημένη επιφάνεια των αιμοπεταλίων [339]. Κατά συνέπεια, η θρομβωτική δράση των ενεργοποιημένων αιμοπεταλίων και/ή των PMPs οδηγεί στην παραγωγή της θρομβίνης διάμεσου της θρομβοπλαστίνης και στο σχηματισμό ινώδους, σταθεροποιώντας με αυτό τον τρόπο τον αιμοπεταλιακό θρόμβο.

Η μετατόπιση των αρνητικών φωσφολιπιδίων στην επιφάνεια των αιμοπεταλίων διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη διατήρηση της θρομβογόνο δράσης των PMPs. Αυτό φαίνεται από το γεγονός ότι η δυσλειτουργία μιας μετατοπάσης, η οποία είναι υπεύθυνη για τη μεταφορά αυτή, οδηγεί σε αιμορραγική διαταραχή, η οποία είναι γνωστή ως σύνδρομο του Scott [340]. Η νόσος αυτή χαρακτηρίζεται από την έλλειψη PMPs στο αίμα. Η υπόθεση ότι τα PMPs παίζουν σημαντικό ρόλο σε διάφορες παθολογικές καταστάσεις, ενισχύεται και από τις μελέτες των Castaman et al. [341,342], οι οποίοι παρουσίασαν ένα περιστατικό που χαρακτηριζόταν τόσο από μειωμένα επίπεδα PMPs όσο και από μειωμένη θρομβογόνο δράση χωρίς όμως να παρατηρείται μεταβολή στην ενεργότητα της θρομβοπλαστίνης. Οι Tans et al. [343] σε μια παλιότερη μελέτη έδειξαν ότι τα PMPs εμφανίζουν αντιπηκτική δράση, εξαιτίας της ικανότητάς τους να δεσμεύουν την ενεργοποιημένη πρωτεΐνη C (activated protein C, APC) και να αναστέλλουν τον παράγοντα Va *in vitro*. Πιθανολογείται ότι αυτή η αντιπηκτική δράση η οποία οφειλόταν κατά 25% στην παρουσία των PMPs, αναστέλλει την ανάπτυξη του θρόμβου στο αγγειακό τοίχωμα. Παρόλα αυτά, δεν έχει ακόμη διευκρινισθεί ο θρομβωτικός ρόλος των PMPs *in vivo*. Είναι πιθανόν τα PMPs να δεσμεύονται στο πλασμινογόνο με τρόπο

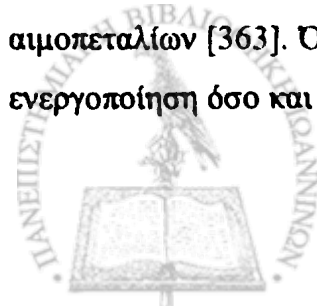


ανάλογο της δέσμευσής τους στη επιφάνεια των ενεργοποιημένων αιμοπεταλίων, υπόθεση η οποία δεν έχει μέχρι σήμερα επιβεβαιωθεί με πειραματικά ευρήματα [344].

Επιπρόσθετα, η έκθεση της oxLDL των αθηρωματικών πλακών μετά τη ρήξη της συνέχειας του ενδοθηλίου ενεργοποιεί την ενδογενή οδό της πήξης [345] και τα αιμοπετάλια [346,347]. Κύρια υπεύθυνα για την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων φαίνεται να είναι τα οξειδωμένα φωσφολιπίδια της oxLDL και η lyso-PC [348]. Οι υπεύθυνοι μηχανισμοί για την δράση αυτή δεν είναι ακριβώς γνωστοί.

Φαίνεται όμως ότι τα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια αναγνωρίζονται διαμέσου του LOX-1 [349], ειδικού υποδοχέα εκκαθαριστή της oxLDL, ο οποίος έχει βρεθεί στην επιφάνεια των ενδοθηλιακών κυττάρων [350]. Είναι γνωστό ότι στην επιφάνεια των ενεργοποιημένων αιμοπεταλίων εκφράζεται η PS, όμως παρουσία της αννεξίνης-V αναστέλλεται η πρόσδεση των αιμοπεταλίων στο LOX-1. Επομένως, η έκθεση της PS μπορεί να αποτελεί επίτοπο για το LOX-1 [349]. Επιπρόσθετα, οι Chen et al. [351] βρήκαν το mRNA του LOX-1 στα αιμοπετάλια και έδειξαν ότι η συγκεκριμένη πρωτεΐνη εκφράζεται στα αιμοπετάλια μετά από την ενεργοποίησή τους. Επιπλέον, το CD36 των αιμοπεταλίων, γνωστό και ως γλυκοπρωτεΐνη IV (GPIV) [352-355], είναι υποδοχέας για ερυθροκύτταρα μολυσμένα με *Plasmodium falciparum*, αποπτωτικά κύτταρα και για διάφορα μόρια όπως την θρομβοσποδίνη και το κολλαγόνο [352, 356]. Παλιότερες μελέτες έδειξαν ότι το CD36 είναι υποδοχέας και για την oxLDL [352,353]. Πειραματικά δεδομένα έδειξαν ότι παρουσία ειδικών αντισωμάτων κατά του CD36 μειώνεται η πρόσληψη της oxLDL από τα αιμοπετάλια. Επομένως φαίνεται ότι το CD36 διαδραματίζει ρόλο κλειδί για την πρόσληψη της oxLDL από τα αιμοπετάλια [352,354,355]. Το CD36 εκφράζεται στην κυτταρική μεμβράνη των αιμοπεταλίων, ενώ ο LOX-1 εκφράζεται μόνο στην επιφάνεια των ενεργοποιημένων αιμοπεταλίων [351], δίνοντας έτσι μια νέα διάσταση στην αλληλεπίδραση των ενεργοποιημένων αιμοπεταλίων και των ενδοθηλιακών κυττάρων παρουσία της oxLDL.

Οι μηχανισμοί αυτοί συσχετίζονται επίσης με τη μειωμένη ενεργότητα της ενδοθηλιακής συνθετάσης του NO (eNOS) [357,358] και με άλλους μηχανισμούς, οι οποίοι αφορούν τα ενδοκυττάρια μικροϊνίδια [359,360] και την ενεργότητα της εξαρτώμενης από το Ca^{2+} ATP-άσης των αιμοπεταλίων [361,362]. Η lyso-PC συστατικό της oxLDL, που βρίσκεται στην αθηρωματική πλάκα επάγει την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων [363]. Όταν η LDL οξειδωθεί παρουσία υποχλωριώδους οξέος επάγει τόσο την ενεργοποίηση όσο και την



προσκόλληση των αιμοπεταλίων [364]. Οι Rother et al. [365] έδειξαν ότι ειδικοί ανταγωνιστές του λυσοφωσφατυδυλοχολικού οξέος (lysophosphatidic acid, LPA) αναστέλλουν την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων και τη δημιουργία θρόμβων *in vitro*.

Τα αιμοπετάλια εκφράζουν στην επιφάνεια τους θέσεις με υψηλή συγγένεια πρόσδεσης (υποδοχείς) τόσο για τις αθηρογόνες λιποπρωτεΐνες VLDL και LDL, όσο και για την HDL. Οι θέσεις πρόσδεσης για τις VLDL και LDL είναι διαφορετικές από τον κλασικού LDL-υποδοχέα. Η πρόσδεση των λιποπρωτεϊνών στη μεμβράνη των αιμοπεταλίων μεταβάλλει την ανταπόκριση τους στη δράση διάφορων αγωνιστών διαμέσου ενεργοποίησης ενδοκυττάρων μηχανισμών επαγωγής σήματος (Signal Transduction Pathways). Το μόριο στο σωματίδιο της LDL το οποίο είναι υπεύθυνο για τη σύνδεση του σωματιδίου με τα αιμοπετάλια είναι η apo B-100, γεγονός που έχει ως αποτέλεσμα τη μεταφορά των λιπιδίων στη μεμβράνη των αιμοπεταλίων [366]. Πρόσφατη μελέτη έδειξε ότι η αλληλεπίδραση των αιμοπεταλίων με την LDL πραγματοποιείται διάμεσου των υποδοχέων των απολιποπρωτεϊνών E-2 (apolipoprotein E receptor-2, ApoER2). Η ApoER2, γνωστή και ως σχετιζόμενη με τον LDL-υποδοχέα πρωτεΐνη-8, ανήκει στην οικογένεια των υποδοχέων της LDL, όπου η δομή της συσχετίζεται άμεσα με τον υποδοχέα της LDL (LDL-R) και του υποδοχέα της VLDL (VLDL-R) [367]. Τα αιμοπετάλια εκφράζουν στην επιφάνεια τους θέσεις με υψηλή συγγένεια πρόσδεσης για τις αθηρογόνες λιποπρωτεΐνες οι οποίες διαφέρουν ανοσολογικά από τους κλασικούς LDL-υποδοχείς [368]. Έχει προταθεί ότι η πρόσδεση των λιποπρωτεϊνών του πλάσματος στην μεμβράνη των αιμοπεταλίων γίνεται διάμεσου των γλυκοπρωτεϊνών. Ειδικότερα, κύρια υπεύθυνες για την πρόσδεση αυτή είναι οι υπομονάδες του υποδοχέα $\alpha_{IIb}\beta_3$ [369,370]. Οι Pedreno et al. [371] έδειξαν ότι αιμοπετάλια σε κατάσταση ηρεμίας δε δεσμεύονται στην LDL διάμεσου του υποδοχέα $\alpha_{IIb}\beta_3$ ή των υπομονάδων α_{IIb} και β_3 .

Έτσι, ενώ η πρόσδεση των LDL και VLDL έχειδειχθεί ότι επαυξάνει τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων, τα πλούσια σε απολιποπρωτεΐνη E (apo E) HDL σωματίδια τη μειώνουν. Επιπρόσθετα, η παρουσία της LDL έχει σαν αποτέλεσμα την αύξηση της σύνδεσης του Fg με τα αιμοπετάλια όταν αυτά ενεργοποιηθούν με ADP, φαινόμενο το οποίο είναι δόσοεξαρτώμενο [372]. Πρόσφατη μελέτη των Sachais et al. [373] έδειξε ότι τα αιμοπετάλια πιθανώς να επηρεάζουν το μεταβολισμό της LDL, με αποτέλεσμα την άμεση συμμετοχή στα αρχικά στάδια ανάπτυξης της αθηρωματικής πλάκας. Τα αιμοπετάλια μπορούν να



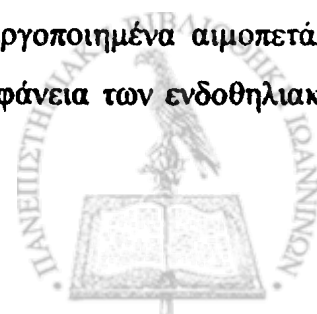
προσλάβουν σταγονίδια λίπους και να φαγοκυτταρωθούν από τα μακροφάγα, τα οποία μετατρέπονται έτσι σε αφρώδη κύτταρα [374-377]. Η ανίχνευση της πρόδρομης μορφής του β-αμυλοειδούς (β-amyloid precursor protein, APP), μιας μεμβρανικής πρωτεΐνης που βρίσκεται στα α-κοκκία των αιμοπεταλίων [378] στην αθηρωματική πλάκα, οδηγεί στο συμπέρασμα ότι τα αιμοπετάλια συμβάλλουν στην ενεργοποίηση των μακροφάγων και την ανάπτυξη της αθηρωματικής πλάκας [379].

Η εξέλιξη της αθηρωματικής πλάκας

Οι αθηρωματικές βλάβες ξεκινούν με το σχηματισμό λιπωδών γραμμώσεων (fatty streaks). Η στρατολόγηση των μακροφάγων και η επακόλουθη πρόσληψη της LDL-χοληστερόλης από αυτά είναι τα κύρια γεγονότα που συμβάλλουν στο σχηματισμό της λιπόδους γράμμωσης. Πολλά είναι τα στοιχεία που υποστηρίζουν ότι η οξειδωτική τροποποίηση τόσο των λιπιδίων όσο και της apo B-100 της LDL καθοδηγούν τον αρχικό σχηματισμό των λιπωδών γραμμώσεων.

Η αρχική μετανάστευση των μονοκυττάρων στο αρτηριακό τοίχωμα και η διαφοροποίησή τους σε μακροφάγα μπορεί να διαδραματίζει προστατευτικό ρόλο απομακρύνοντας τα κυτταροτοξικά και φλεγμονώδη σωματίδια όπως η oxLDL ή τα αποπτωτικά κύτταρα. Όμως, η προοδευτική συσσώρευση των μακροφάγων και η πρόσληψη της oxLDL τελικά οδηγεί στην ανάπτυξη αθηρωματικών βλαβών σχηματίζοντας τα αφρώδη κύτταρα.

Διάφορες μελέτες έδειξαν ότι μετά την προσκόλλησή τους στα ενδοθηλιακά κύτταρα τα λευκοκύτταρα μεταναστεύουν στον έσω χιτώνα του αρτηριακού τοιχώματος, αφού διαπεράσουν τις συνδέσεις μεταξύ των ενδοθηλιακών κυττάρων. Υπεύθυνοι για αυτό το φαινόμενο είναι χημειοτακτικοί παράγοντες που παράγονται ή συγκεντρώνονται τοπικά, όπως η oxLDL, η Lp(a) [380] και η MCP-1 [381-384]. Επίσης τα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια προκαλούν την έκκριση της MCP-1 από τα ενδοθηλιακά κύτταρα ή τα SMC, διάμεσου του CD40L ή της IL-1β, οδηγώντας στη μετανάστευση των μονοκυττάρων στο υπενδοθηλιακό χώρο [385]. Η έκκριση χημειοκινών από τα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια (όπως RANTES [CCL5] και PF4 και η εναπόθεσή τους στην επιφάνεια των ενδοθηλιακών



κυττάρων ή μονοκύτταρων μπορεί να οδηγήσει στην προσκόλληση των μονοκύτταρων στην περιοχή της βλάβης [385].

Μελέτες σε γενετικά τροποποιημένα ποντίκια τα οποία δεν εκφράζουν MCP-1 ή τον υποδοχέα της MCP-1, CCR2, και είναι επιρρεπή σε αθηρωμάτωση εξαιτίας της έλλειψης του γονιδίου για την apo E ή για τον υποδοχέα της LDL, έδειξαν σημαντική μείωση στη χημειοταξία των μακροφάγων αλλά και στην συσσώρευση των LDL σωματιδίων στο αγγειακό τοίχωμα [382,386]. Κύριο ρόλο στη χημειοταξία των μακροφάγων, διαδραματίζει η oxLDL και ειδικότερα ένα από τα κύρια συστατικά της, η lyso-PC [387]. Επιπρόσθετα, η oxLDL φαίνεται ότι μειώνει την κινητικότητα των μακροφάγων στον έσω χιτώνα με μηχανισμό ο οποίος δεν είναι απόλυτα γνωστός [387]. Πράγματι η lyso-PC και τα μη εστεροποιημένα λιπαρά οξέα της oxLDL είναι κυρίως υπεύθυνα για την έκκριση της MCP-1 [388]. Ταυτόχρονα από τα μακροφάγα που υπάρχουν στις αθηρωματικές βλάβες παράγονται κυτταροκίνες, όπως ο TNF-α και η IL-1 [389]. Οι κυτταροκίνες αυτές προάγουν την παραγωγή προσκολλητικών μορίων από τα ενδοθηλιακά κύτταρα (VCAM-1, ICAM-1 και σελεκτινών) καθώς επίσης και την παραγωγή των ενδιάμεσων κυτταροκινών, όπως οι IL-6, IL-8, IL-10 [390]. Η oxLDL πιθανά επάγει την ενεργοποίηση του NF-κΒ, ο οποίος είναι υπεύθυνος για την έκφραση των γονιδίων των προσκολλητικών μορίων [391,392]. Επίσης, στο εσωτερικό της αθηρωματικής πλάκας παράγονται χημειοτακτικοί παράγοντες για τα T-λεμφοκύτταρα και τα μαστοκύτταρα (IFN-γ και εοταξίνη αντίστοιχα) [242].

Η IL-6 προάγει την έκφραση γονιδίων στα ηπατοκύτταρα για την παραγωγή πρωτεϊνών οξείας φάσης, όπως η C-αντιδράσεως πρωτεΐνη (CRP) και το αμυλοειδές A [389]. Τόσο τα επίπεδα της IL-6 όσο και τα επίπεδα του αμυλοειδούς A αυξάνονται όταν συμβαίνει ρήξη της αθηρωματικής πλάκας, γεγονός το οποίο υποδεικνύει το σημαντικό ρόλο της φλεγμονής σε ασθενείς με οξύ στεφανιαίο επεισόδιο [393]. Αντίθετα, η ιντερλευκίνη-10 (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 τη σταθεροποίηση της αθηρωματικής πλάκας, τουλάχιστον σε ασθενείς μετά από οξύ στεφανιαίο σύνδρομο [394].

Η μετάβαση από τη σχετικά απλή λιπώδη γράμμωση σε πιο πολύπλοκη βλάβη χαρακτηρίζεται από τη μετανάστευση των SMC από τη μεσαία στιβάδα του αρτηριακού τοιχώματος στον έσω χιτώνα ή στον υπενδοθηλιακό χώρο. Τα SMC του έσω χιτώνα μπορούν



με τη σειρά τους να πολλαπλασιαστούν και να προσλάβουν τροποποιημένες λιποπρωτεΐνες συμβάλλοντας στο σχηματισμό αφρωδών κυττάρων. Έχουν επίσης την ικανότητα να συνθέτουν πρωτεΐνες της εξωκυττάριας ουσίας συμβάλλοντας στην ανάπτυξη της ινώδους κάψας. Αυτή η φάση ανάπτυξης της βλάβης επηρεάζεται από αλληλεπιδράσεις μεταξύ μονοκυττάρων/μακροφάγων και T-κυττάρων οι οποίες οδηγούν σε πλήθος χημικών και κυτταρικών αντιδράσεων και στην δημιουργία χαρακτηριστικών χρόνιας φλεγμονώδους κατάστασης.

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 της πλάκας παραμένει σταθερό [395]. 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: α) επιφανειακή ρήξη (η οποία χαρακτηρίζεται από τοπική λύση της συνέχειας του ενδοθηλίου που καλύπτει την ινώδη κάψα και επακόλουθη δημιουργία μικροθρόμβου τοπικά), β) ο δεύτερος μηχανισμός απότομης αύξησης της αθηρωματικής πλάκας αφορά τη ρήξη των μικροαγγείων που σχηματίζονται στο εσωτερικό αθηρωματικών πλακών, ως αποτέλεσμα της νεοαγγειογένεσης, γ) και 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. Φαίνεται λοιπόν ότι, τα αιμοπετάλια και τα PMPs παίζουν σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη και εξέλιξη της αθηρωμάτωσης.



ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5^ο

Η Ακέτυλοϋδρολάση του Παράγοντα Ενεργοποίησης των Αιμοπεταλίων (PAF-AH)

Γενικά

Ο όρος PAF-ακετυλοϋδρολάση (PAF-AH) περιγράφει μια οικογένεια ενζύμων τα οποία έχουν την ικανότητα να αποικοδομούν τόσο τον PAF, όσο και διάφορα οξειδωμένα φωσφολιπίδια (Εικόνα 22), υδρολύοντας ακετυλομάδες βραχείας αλυσίδα ($C_n < 6$) στη θέση *sn*-2 του υποστρώματος ανεξάρτητα από την παρουσία ασβεστίου (Ca^{+2}) [90,396-402]. Το ένζυμο αυτό υδρολύει επίσης τα φωσφολιπίδια τα οποία περιέχουν οξειδωτικά κατακερματισμένα λιπαρά οξέα στην *sn*-2 θέση [403-406] (Εικόνα 22). 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 [397,399,407, 408]. Αυτή η μεγάλη εξειδίκευση υποστρώματος είναι απαραίτητη ώστε να αποφεύγεται η συνεχής υδρόλυση των φωσφολιπιδίων των λιποπρωτεϊνών και των κυτταρικών μεμβρανών [401]. Η οικογένεια αυτή περιλαμβάνει διάφορα ενδοκυττάρια ισοένζυμα [409], όπως η ενδοκυττάρια ισομορφή II (PAF-AH II) [410] και η ετεροτριμερής ισομορφή της PAF-AH του εγκεφάλου [411], καθώς και την PAF-ακετυλοϋδρολάση του πλάσματος (pPAF-AH) [412,413]. Εκτός από τη δράση της ως PLA_2 , η PAF-AH έχει ακόμη δράσεις εστεράσης, φωσφολιπάσης A_1 (PLA_1) και τρανσακετυλάσης [414].

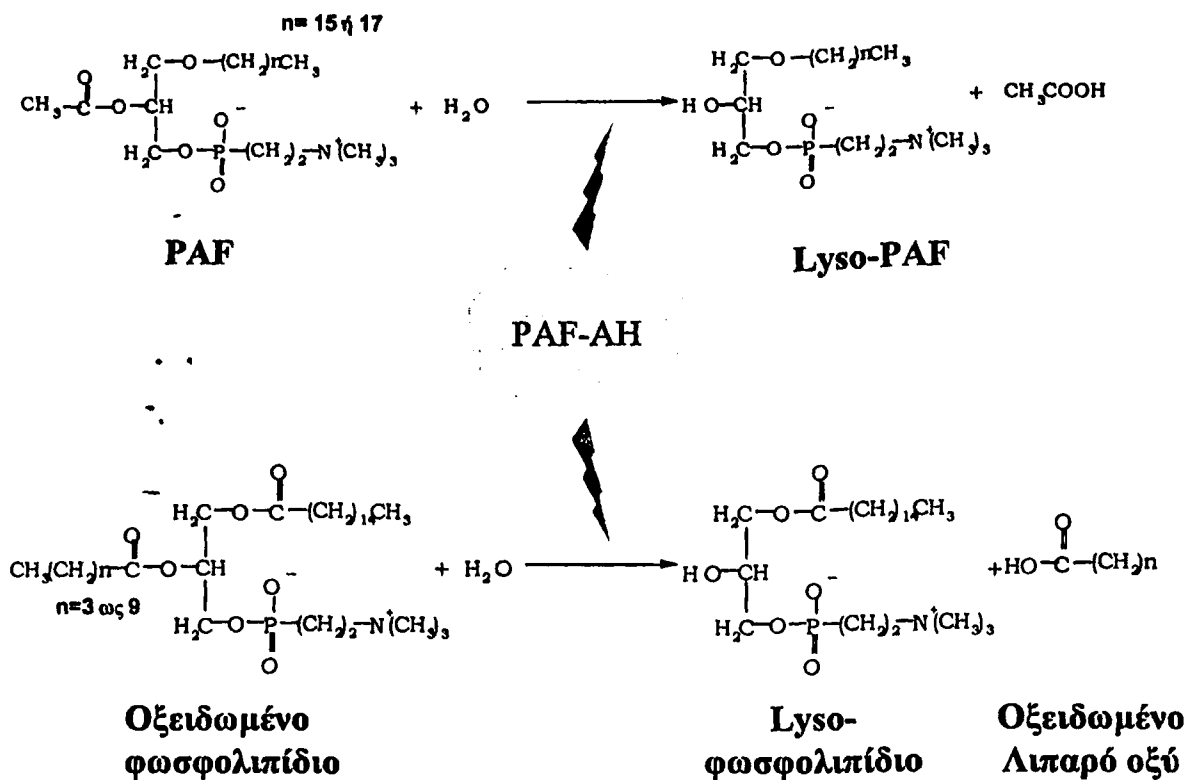


Δομή της εκκρινόμενης μορφής της PAF-AH (PAF-AH του Πλάσματος)

Η PAF-ακετυλοϋδρολάση του πλάσματος (pPAF-AH, EC 3.1.1.47) περιγράφηκε για πρώτη φορά το 1980 [415], αλλά η δομή του ενζύμου (Εικόνα 23) προσδιορίστηκε για πρώτη φορά το 1995, οπότε και έγινε δυνατή η κλωνοποίησή του [416].

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 [417]. 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 [417]. 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 [418]. 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 [417]. Το αμινοτελικό άκρο ποικίλλει λόγω περιορισμένης πρωτεόλυσης. Η δομή του μακρομορίου της PAF-AH συμπληρώνεται με την παρουσία N-γλυκοζυλιώσεων [419,420], δηλαδή υδατανθρακικών αλυσίδων που συνδέονται με τις ασπαραγίνες της πολυπεπτιδικής αλυσίδας [421]. Η παρουσία των υδατανθρακικών αλυσίδων δεν είναι απαραίτητη για την έκκριση του ενζύμου από τα μακροφάγα, δεν επηρεάζει την ευαισθησία του στις πρωτεάσες και δε 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 apo B [413,422].





Εικόνα 22: Υδρόλυση του PAF και οξειδωμένων φωσφολιπιδίων από την PAF-AH.

Οι Min et al. [423] 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 [423]. Η δράση του ενζύμου αναστέλλεται από την παρουσία αναστολέων των σερινοεραστερασών, όπως είναι το δισοπροπυλοφθοροφωσφορικό οξύ (DFP) και το φαινυλο-μεθυλο-σουλφονυλο-φθορίδιο (Pefabloc).

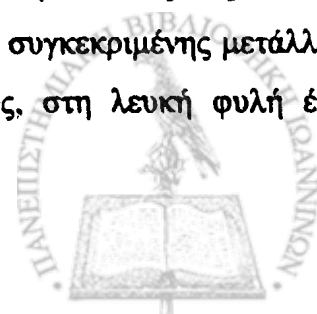




Εικόνα 23: Υποθετικό μοντέλο της τριτοταγούς δομής της PAF-AH του πλάσματος.

Γονίδιο της PAF-AH και μεταλλάξεις

Το γονίδιο της PAF-AH βρίσκεται στο χρωμόσωμα 6p12-21.1 και είναι οργανωμένο σε 12 εξόνια [417,424,425]. 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 μορφή, σε πλήρη εξάλειψη της ενζυμικής ενεργότητας του πλάσματος [426]. 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) [424]. 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 [427]. Ένας άλλος πολυμορφισμός του γονιδίου της PAF-AH που έχει παρατηρηθεί στους Ιάπωνες και προκαλεί πλήρη εξάλειψη της ενζυμικής ενεργότητας του πλάσματος (Gln²⁸¹→Arg) συνίσταται σε αντικατάσταση μιας αδενίνης από γουανίνη (A→G) στη θέση 1001 [428]. Μεγάλη επιδημιολογική μελέτη σε 4152 Ιάπωνες δεν έδειξε συσχέτιση της συγκεκριμένης μετάλλαξης και της πιθανότητας εμφάνισης στεφανιαίας νόσου [429]. Τέλος, στη λευκή φυλή έχουν



περιγραφεί δύο άλλοι πολυμορφισμοί του γονιδίου της PAF-AH (Pε¹⁹⁸→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 [430-432].

Σύνδεση με τις λιποπρωτεΐνες του πλάσματος

Η PAF-AH του πλάσματος είναι ένα υδρόφοβο μόριο το οποίο κυκλοφορεί συνδεδεμένο με τα λιποπρωτεϊνικά σωματίδια [399] 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 apo B-100 (VLDL, IDL και LDL), καθώς και στις την HDL [433]. Η PAF-AH συνδέεται στο πλάσμα κυρίως με την LDL (και μάλιστα περισσότερο με τις μικρές πυκνές αθηρογόνες LDL) και λιγότερο (<20%) με την HDL (και μάλιστα με το υποκλάσμα εκείνο των HDL που ανήκει στις VHDL-1 και επίσης περιέχει apo E) [434]. 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 apo B-100 [435]. Ειδικότερα, μια περιοχή 160 αμινοξέων που εκτείνεται μεταξύ των αμινοξέων 4119 και 4279 διαδραματίζει ρόλο κλειδί στη σύνδεση του ενζύμου με την LDL [436]. Πρόσφατα περιγράφηκε ότι η PAF-AH της LDL συνδέεται κυρίως με α ηλεκτροαρνητικά φορτισμένα σωματίδια LDL, τα οποία ευοδώνουν τη φλεγμονή στα ενδοθηλιακά κύτταρα [437]. Μια άλλη λιποπρωτεΐνη η οποία επίσης έχει υψηλά επίπεδα ενεργότητας της PAF-AH είναι η λιποπρωτεΐνη (a) (Lp(a)) [438]. 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 [439].



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

Το ένζυμο του πλάσματος προέρχεται κυρίως από τα κύτταρα του αιμοποιητικού συστήματος (κύτταρα της μυελοειδούς σειράς) και μάλιστα από το σύστημα των μονοκυττάρων/μακροφάγων (Εικόνα 24) [440]. Μελέτες έδειξαν ότι μακροφάγα προερχόμενα από περιφερικά μονοκύτταρα, καθώς επίσης και κύτταρα HL-60 [441,442] 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 [443-445]. 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* [446,447] 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 [448].

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 [401]. Μελέτες σε ασθενείς με συγγενείς διαταραχές του μεταβολισμού των λιπιδίων έδειξαν ότι η παρουσία των λιποπρωτεϊνών δεν είναι απαραίτητη προϋπόθεση για την παραγωγή του ενζύμου. Έτσι, τόσο οι ασθενείς με αβηταλιποπρωτεΐναιμία, όσο και οι ασθενείς με νόσο Tangier (οι οποίοι παρουσιάζουν σχεδόν πλήρη έλλειψη των λιποπρωτεϊνών που περιέχουν apo B και της HDL αντίστοιχα) έχουν φυσιολογική ενεργότητα της PAF-AH στο πλάσμα [449,450]. Παρόλα αυτά, η παραγωγή και η έκκριση του ενζύμου από τα μακροφάγα αυξάνεται όταν αυτά επωασθούν παρουσία ανθρώπινου ορού [451]. Αν και το ακριβές στοιχείο του ορού που διεγείρει την παραγωγή του ενζύμου δεν είναι γνωστό, πιθανολογείται ότι πρόκειται για τα λιποπρωτεϊνικά σωματίδια [452]. 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 [453].

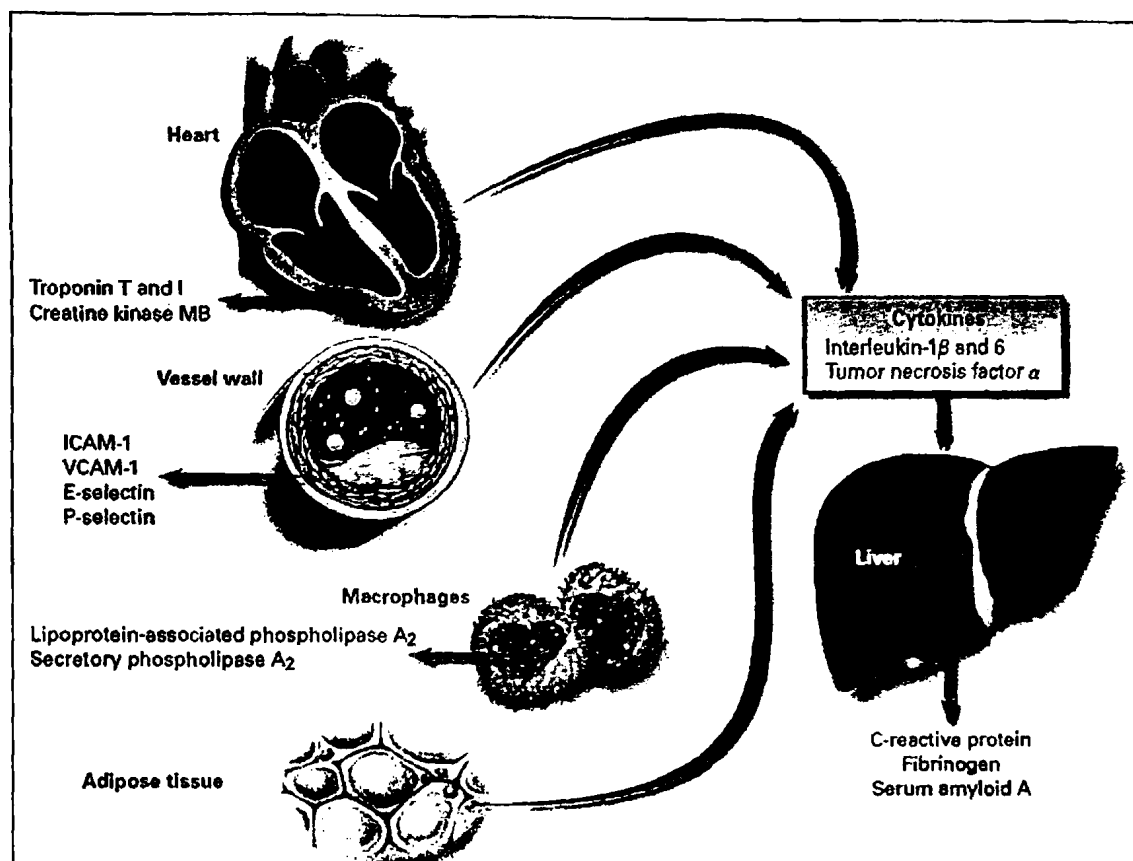
Αν και η επίδραση των λιπιδίων στην παραγωγή της PAF-AH του πλάσματος δεν έχει καθορισθεί με σαφήνεια φαίνεται ότι ο μεταβολισμός των λιποπρωτεϊνών συμβάλλει



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 apo B είναι ο σημαντικότερος ρυθμιστικός παράγοντας της ενεργότητας της PAF-AH του πλάσματος [454]. Έτσι, οι ασθενείς με διαταραχές του μεταβολισμού των λιπιδίων που χαρακτηρίζονται από μείωση της κάθαρσης της LDL (οικογενής υπερχοληστερολαιμία) εμφανίζουν σημαντικά υψηλότερη ενεργότητα της PAF-AH στο πλάσμα σε σύγκριση με υγιείς μάρτυρες [455]. 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 apo B [456].

Άλλοι παράγοντες που επηρεάζουν τα επίπεδα της PAF-AH του πλάσματος είναι: α) ο βαθμός διαφοροποίησης των κυττάρων του συστήματος μονοκυρήνων/μακροφάγων [457], β) ορμονικοί παράγοντες [458,459] (η προγεστερόνη και η δεξαμεθαζόνη προκαλούν σημαντική αύξηση της παραγωγής του ενζύμου από τα μακροφάγα του φθαρού, 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 [460], γ) οι κυτταροκίνες που ευοδώνουν τη φλεγμονή [444,461-464], δ) η ηλικία και το φύλο και ε) η κληρονομικότητα [454].





Εικόνα 24: Πηγές παραγωγής κυτταροκινών, δεικτών φλεγμονής και της PAF-AH (lipoprotein-associated phospholipase A_2).

Οι περισσότερες κυτταροκίνες $IFN-\gamma$, παράγοντας νέκρωσης των όγκων ($TNF-\alpha$) 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 [444]. Ο μόνος διαβιβαστής της φλεγμονής που προκαλεί αύξηση της σύνθεσης του ενζύμου σε κυτταροκαλλιέργειες μακροφάγων και ηπατοκυττάρων είναι ο ίδιος ο PAF [446]. Έτσι, ασθενείς με υψηλά επίπεδα κυτταροκινών, όπως ασθενείς με ρευματοειδή αρθρίτιδα [465], 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 [466].

PAF-AH και αθηρωμάτωση

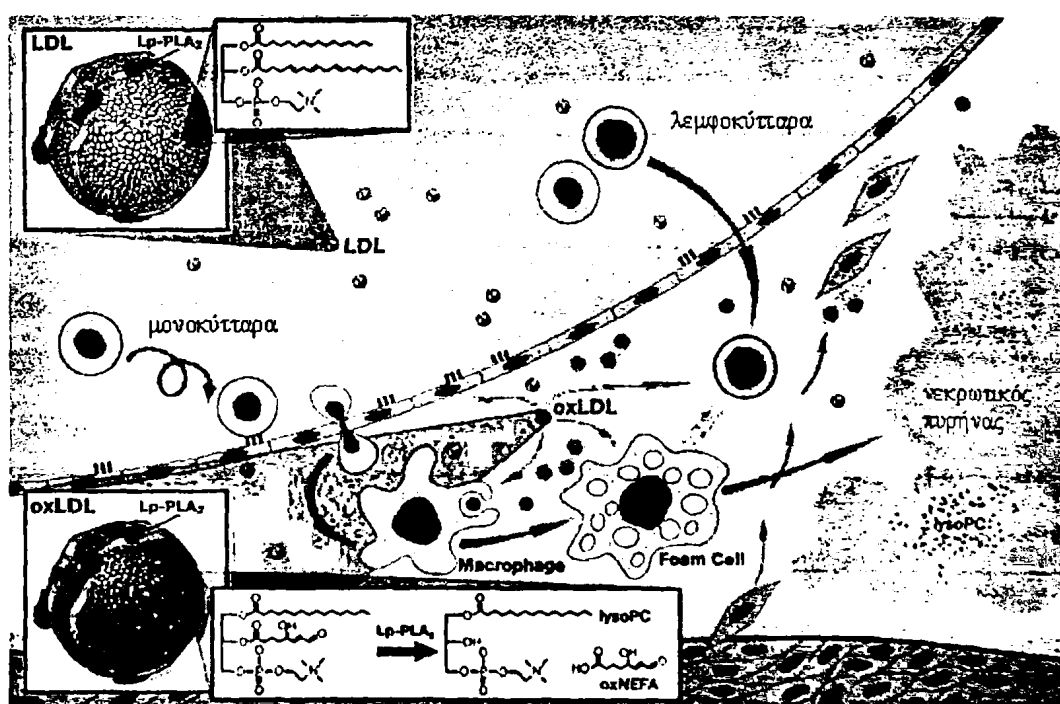
Η PAF-AH διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην αθηρογένεση και στην εμφάνιση καρδιαγγειακής νόσου λόγω της δράσης της στο μεταβολισμό βιοδραστικών φωσφολιπιδίων, όπως είναι ο PAF και τα οξειδωμένα φωσφολιπίδια [452]. Οι Tew DG και οι συν. [421] πρότειναν ότι η PAF-AH εμφανίζει δύο αντίθετες δράσεις. Από 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 βραδυκινίνη, η ισταμίνη και τα λευκοτριένια C_4 και D_4 , ενεργοποιεί την παραγωγή ανιόντων υπεροξειδίου από τα μακροφάγα [77,467]. Αυτή η ενεργοποίηση των ανιόντων υπεροξειδίου, έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της οξειδωτικής τροποποίησης της 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 της LDL, η οποία με τη σειρά της διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη της αθηρωμάτωσης [403,468]. 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 της 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 την LDL το ένζυμο βρίσκεται συνδεδεμένο και στην HDL. Όταν κατά την οξείδωση της LDL είναι παρούσες και η HDL, τα οξειδωμένα φωσφολιπίδια μεταφέρονται από την LDL στην HDL και υδρολύονται από την PAF-AH των τελευταίων. Επιπρόσθετα, η 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 [406,469,470]. 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 [424]. 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 [421]. Η υποψία αυτή υποστηρίζεται από την παρατήρηση ότι κατά τη διάρκεια της υδρόλυσης της oxPC, η PAF-AH παράγει τη lyso-PC [403], ένα φωσφολιπίδιο το οποίο συμμετέχει σε πολλές φάσεις σχηματισμού της αθηρωματικής πλάκας [219]. Παράλληλα με τη lyso-PC, οξειδωμένα λιπαρά οξέα που εμφανίζουν αθηρογόνες ιδιότητες, απελευθερώνονται κατά την υδρόλυση των οξειδωμένων φωσφολιπιδίων από αυτό το ένζυμο [471] (Εικόνα 25).



Εικόνα 25: Ο πιθανός προαθηρογόνος ρόλος της PAF-AH (Lp-PLA₂) (τροποποιημένο από Zalewski et al.) [424].

Πρώτοι οι Ostermann et al. [472] 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 [424], καθώς επίσης και σε ασθενείς με πρωτοπαθή υπέρταση και σακχαρώδη διαβήτη [473,474]. 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 [77,472]. 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 [475,476].

Στα πλαίσια διαφόρων τυχαιοποιημένων ελεγχόμενων μελετών εξετάστηκε η συσχέτιση της PAF-AH του πλάσματος με την εμφάνιση καρδιαγγειακών νοσημάτων (στεφανιαία νόσος, έμφραγμα του μυοκαρδίου, ισχαιμικά αγγειακά εγκεφαλικά επεισόδια, Πίνακας 5).

Πίνακας 5. Κλινικές μελέτες και PAF-AH.

Μελέτη	Καταληκτικά σημεία	Βιβλιογραφία
WOSCOPS	ΣΝ	[477]
ARIC	ΣΝ	[478]
WHS	ΣΝ/AEE	[479]
MONICA	ΣΝ	[480]
ROTTERDAM	ΣΝ/AEE	[481]
CARDIA	Ασβεστώσεις στην αξονική τομογραφία	[482]
EPIC-Norfolk	ΣΝ	[483]
Ludwigshafen	ΣΝ	[484]
Brilakis et al.	ΣΝ	[485]
ARIC-stroke	AEE	[486]
Khuseynova et al.	ΣΝ	[487]

ΣΝ: Στεφανιαία Νόσος, AEE: Αγγειακό Εγκεφαλικό Επεισόδιο

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 PAF-AH δεν συσχετίζονται με τα επίπεδα της CRP του ορού.



ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6^ο

Μεθοδολογία

Μελέτη της συσσώρευσης των πλυμένων αιμοπεταλίων

Αντιδραστήρια-Όργανα

- Φυγόκεντρος πάγκου (HermLe, Z 320)
- Αιματοκυτόμετρο (Newbauer)
- Μικροσκόπιο (Olympus)
- Μετρητής συσσώρευσης αιμοπεταλίων ή συσσωρευόμετρο (CHRONO-LOG)
- Καταγραφικό (CHRONO-LOG)
- Γυάλινες κυψελίδες συσσώρευσης
- Ειδικά μαγνητάκια συσσώρευσης
- Ινωδόγονο (Calbiochem)
- Διφωσφορική αδενοσίνη (ADP, CHRONO-LOG)
- Καλπεπτίνη (M.B. 362.5 g/mol, Calbiochem)
- Απυράση (EC 3.6.1.5, Sigma)
- PGE₁ (Προσταγλανδίνη E₁, Sigma)
- HEPES (C₁₈H₁₈N₂O₄S, M.B. 238.31 g/mol, Sigma)
- NaCl (M.B. 58.44 g/mol, Sigma)
- KCl (M.B. 74.56 g/mol, Sigma)
- NaHCO₃ (M.B. 84.01 g/mol, Fluka-Garanite)
- MgCl₂•6H₂O (M.B. 203.31 g/mol, Sigma)
- NaH₂PO₄•H₂O (M.B. 137.99 g/mol, Merck)
- Δεξτρόζη [HOCH₂CH(CHOH)₄O, M.B.180.16 g/mol, Fluka]
- Κιτρικό οξύ (C₆H₈O₇, M.B.192.13 g/mol, Merck)
- Κιτρικό νάτριο (C₆H₅Na₃O₇•H₂O, M.B.294.10 g/mol, Merck)
- Αλβουμίνη (Sigma)
- CaCl₂ (M.B. 110.99 g/mol, Merck)
- NH₄Cl (M.B. 53.49 g/mol, Fluka-Garanite)
- K₂EDTA (C₁₀H₁₄N₂O₈K₂, M.B. 368.4 g/mol, Sigma)
- KHCO₃ (Merck)
- Θρομβίνη (CHRONO-LOG)
- Διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO)



Διαλύματα Εργασίας

- **Αντιπηκτικό διάλυμα κιτρικών (ACD).** Το υδατικό αντιπηκτικό διάλυμα ACD περιέχει 42 mM κιτρικού οξέος, 75 mM κιτρικού νατρίου και 139 mM D(+) γλυκόζη. Το διάλυμα διατηρείται στους 4°C.
- **Διάλυμα απυράσης.** Το εμπορικό αντιδραστήριο περιέχει 500 U απυράσης σε λυοφιλοποιημένη μορφή τα οποία διαλυτοποιούνται σε 5 mL φυσιολογικό ορό δίνοντας διάλυμα τελικής συγκέντρωσης 100 U/mL. Το διάλυμα διατηρείται στους -80 °C σε κλάσματα των 500 μL.
- **Διάλυμα προσταγλανδίνης E₁ (PGE₁).** Το εμπορικό αντιδραστήριο περιέχει 50 mg PGE₁ σε λυοφιλοποιημένη μορφή τα οποία διαλυτοποιούνται σε 5 mL αιθανόλης δίνοντας διάλυμα συγκέντρωσης 1 mg/mL. Το διάλυμα διατηρείται στους -80 °C σε κλάσματα των 20 μL.
- **Ρυθμιστικό διάλυμα Tyrode's (pH 7.0).** Το ρυθμιστικό αυτό διάλυμα περιέχει 5.0 mM HEPES, 137 mM NaCl, 2.68 mM KCl, 11.8 mM NaHCO₃, 10 mM MgCl₂•6H₂O, 0.41 mM NaH₂PO₄•H₂O, 0.5 mM δεξτρόζη, 70 mM κιτρικό οξύ, 110 mM κιτρικό νάτριο και 0.25% αλβουμίνη. Το pH αρχικά είναι όξινο. Με διαλύματα 10 N και 0.5 N NaOH ρυθμίζεται το pH στο 7.0. Το διάλυμα διατηρείται στους -20 °C σε πλαστικά φιαλίδια.
- **Ρυθμιστικό διάλυμα Tyrode's (pH 7.4).** Το ρυθμιστικό αυτό διάλυμα έχει ακριβώς την ίδια σύσταση με το Tyrode's pH 7.0 με την εξαίρεση ότι δεν περιέχει κιτρικό οξύ, κιτρικό νάτριο καθώς και αλβουμίνη. Επιπλέον το pH ρυθμίζεται στο 7.4. Διατηρείται στους 4 °C σε πλαστικά φιαλίδια.
- **Διάλυμα 130 mM CaCl₂ - 1 M MgCl₂•6H₂O.** 2.88 g CaCl₂ και 40.6 g MgCl₂•6H₂O διαλυτοποιούνται σε 200 mL d H₂O. Το διάλυμα διατηρείται στους 4°C.
- **Διάλυμα λύσης των κοττάρων.** Το διάλυμα αυτό περιέχει 156 mM NH₄Cl, 97 μM K₂EDTA και 10 mM KHCO₃. Το οποίο τοποθετείται ογκομετρική φιάλη μέχρι τα 50 mL ή οποία συμπληρώνεται μέχρι τα 50 mL, στην συνέχεια ρυθμίζεται το pH του διαλύματος στο 7.4. Κατά τη διάρκεια του πειράματος φυλάσσεται σε πάγο. Το διάλυμα αυτό παρασκευάζεται λίγο πριν την χρήση του.



- **Διάλυμα 20 mg/mL ινωδογόνου (Fg).** Το λυοφιλοποιημένο Fg παραλαμβάνεται από το εμπόριο απαλλαγμένο από τον vWF και την φιβρονεκτίνη κλεισμένο σε αεροστεγή φιαλίδια που περιέχουν 250 mg και φυλάσσεται στους 4°C. Το περιεχόμενο ενός φιαλιδίου διαλύεται σε 12.5 mL PBS (τελική συγκέντρωση 20 mg Fg/mL) και φυλάσσεται στους -80 °C.
- **Διάλυμα 1.9 mM ιονοφόρο Ca^{2+} -A23187.** Το εμπορικό αντιδραστήριο περιέχει 1 mg ιονοφόρο Ca^{2+} -A23187 σε λυοφιλοποιημένη μορφή τα οποία διαλυτοποιούνται σε 1 mL DMSO δίνοντας διάλυμα συγκέντρωσης 1.9 mM. Στην συνέχεια το διάλυμα αραιώνεται 1:1 με DMSO δίνοντας ένα διάλυμα με συγκέντρωση 0,9 mM. Τα διαλύματα διατηρούνται στους -80 °C σε κλάσματα των 100 μL.
- **Διάλυμα 20 U/mL θρομβίνη.** Η εμπορική συσκευασία περιέχει λυοφιλοποιημένη θρομβίνη από ανθρώπινο πλάσμα το οποίο διαλυτοποιείται σε 2 mL φυσιολογικό ορό. Το διάλυμα αυτό διατηρείται στους -80 °C σε κλάσματα των 25 μL.
- **Διάλυμα 1 mM διφωσφορικής αδενοσίνης (ADP).** Το διάλυμα της διφωσφορικής αδενοσίνης προέρχεται από 2.5 mg λυοφιλοποιημένου ADP διαλυτοποιημένο σε 5 mL φυσιολογικό ορό. Το διάλυμα αυτό διατηρείται στους -80 °C σε κλάσματα των 50 μL.
- **Διάλυμα 30 mM καλπετίνης.** Η εμπορική συσκευασία περιέχει λυοφιλοποιημένη καλπετίνη η οποία διαλυτοποιείται σε 460 μL DMSO. Το διάλυμα αυτό διατηρείται στους -80°C σε κλάσματα των 50 μL.

Αρχή της μεθόδου

Η συσσώρευση των αιμοπεταλίων παρουσία ενός εξωγενώς προστιθέμενου αγωνιστή έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της διαπερατότητας του εναιωρήματος των αιμοπεταλίων, η οποία μετρείται με ειδικό νεφελόμετρο. Τα αιμοπετάλια προεπωάζονται υπό διάφορες συνθήκες για 1 min στους 37°C, μετά προστίθεται ο αγωνιστής και παρακολουθείται η συσσώρευση για 3 min στους 37°C.



Πειραματική διαδικασία

Σε σωληνάκια πολυπροπυλενίου τα οποία περιέχουν αντιπηκτικό διάλυμα ACD σε αναλογία 1:9 (v:v), συλλέγονται 10.8 mL περιφερικού φλεβικού αίματος. Το αίμα φυγοκεντρείται στα 120xg για 15 min, σε θερμοκρασία δωματίου παρασκευάζοντας με αυτό το τρόπο πλάσμα πλούσιο σε αιμοπετάλια (PRP). Τα 2/3 από την επάνω στοιβάδα του PRP απομονώνονται πολύ προσεκτικά, για να αποφευχθεί η πρόσληψη ποσότητας ερυθροκυττάρων και λευκοκυττάρων. Το PRP στο οποίο προστίθενται 10 $\mu\text{L}/\text{mL}$ απυράσης και 1 μL PGE₁ σε τελικές συγκεντρώσεις 1 U/mL και 0.1 mg/mL αντίστοιχα, φυγοκεντρείται στα 650xg με φρένο στην ένδειξη 10 για 10 min σε θερμοκρασία δωματίου. Το υπερκείμενο αποχύνεται και το ίζημα των αιμοπεταλίων αναδιασπείρεται σε μικρό όγκο (1 mL) ρυθμιστικό διαλύματος Tyrode's pH 7.0, που περιέχει 10 $\mu\text{L}/\text{mL}$ απυράσης και 1 μL PGE₁ με τη βοήθεια της πιπέτας, στην συνέχεια συμπληρώνεται ο όγκος μέχρι τα 10 mL με το παραπάνω ρυθμιστικό διάλυμα. Κατόπιν φυγοκεντρείται στα 650xg με φρένο στην ένδειξη 10 για 10 min σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά το τέλος της φυγοκέντρωσης το υπερκείμενο αποχύνεται και το ίζημα των αιμοπεταλίων αναδιασπείρεται σε 1 mL από το διάλυμα λύσης των κυττάρων. Αφήνεται για 15 min στους 4°C για να πραγματοποιηθεί η λύση των ερυθροκυττάρων. Συμπληρώνεται ο όγκος μέχρι τα 10 mL με το ρυθμιστικό διάλυμα Tyrode's pH 7.0 που περιέχει 10 $\mu\text{L}/\text{mL}$ απυράσης και 1 μL PGE₁. Έπειτα ακολουθεί φυγοκέντρωση στα 650xg με φρένο στην ένδειξη 10 για 10 min σε θερμοκρασία δωματίου. Διατηρείται μια ποσότητα του εναιωρήματος των αιμοπεταλίων και πραγματοποιείται η μέτρηση με χρήση το αιματοκυτόμετρο Newbauer, μετά από αραιώση 1:20 (v/v) σε διάλυμα Tyrode's 7.0. Συγκεκριμένα 10 μL εναιωρήματος αναδιασπείρονται σε 190 μL διαλύματος Tyrode's pH 7.0 (αραιώση 1:20). Το μίγμα ομογενοποιείται ήπια και 10 μL από το εναιώρημα τοποθετούνται σε μία από τις δύο υποδοχές που υπάρχουν στο αιματοκυτόμετρο, πάνω στο οποίο έχει τοποθετηθεί καλυπτρίδα. Το αιματοκυτόμετρο τοποθετείται για 15 min σε τρυβλίο Petri, το οποίο περιέχει ένα κομμάτι βρεγμένου βαμβακιού για να διατηρηθεί υγρή η ατμόσφαιρα στο εσωτερικό του τρυβλίου. Μετά από 15 min γίνεται η μέτρηση των αιμοπεταλίων στο μικροσκόπιο. Μετρούνται 5 μέτρου μεγέθους τετράγωνα του κεντρικού μεγάλου τετραγώνου του αιματοκυτομέτρου. Γνωρίζοντας ότι καθένα από τα 5 τετράγωνα



καταλαμβάνει όγκο 0.004 mm^3 μπορεί με τον παρακάτω τύπο να υπολογιστεί ο συνολικός αριθμός αιμοπεταλίων του εναιωρήματος ανά mm^3 ή ανά μL :

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

Στη συνέχεια με βάση τον αριθμό που προκύπτει υπολογίζεται η ποσότητα του Tyrode's pH 7.4 με την οποία ρυθμίζεται η τελική συγκέντρωση των αιμοπεταλίων (από 250,000 αιμοπετάλια/ μL μέχρι 1×10^6 αιμοπετάλια/ μL).

Στο εναιώρημα (αιμοπετάλια) που προκύπτει προστίθεται CaCl_2 και $\text{MgCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ σε τελικές συγκεντρώσεις 2 mM και 15.4 mM αντίστοιχα. Το όργανο ανοίγεται 30 min ωρίτερα, ώστε να φτάσει η θερμοκρασία στους 37°C . Γίνεται η ρύθμιση της κλίμακας του οργάνου χρησιμοποιώντας το διάλυμα Tyrode's pH 7.4 ως αναφορά για το 100% οπτικής διαπερατότητας ή 100% συσσώρευσης. Μετά από αυτή την κατεργασία η συσσώρευση των αιμοπεταλίων προσδιορίζεται παρουσία διαφόρων αγωνιστών: ιονοφόρο Ca^{2+} -A23187, θρομβίνη, η ADP σε τελική συγκέντρωση 10 μM , 0-0.5 U/mL, και 2.5-10 μM , αντίστοιχα. Στην περίπτωση της ενεργοποίησης με ADP, προστίθεται εξωγενώς Fg σε τελική συγκέντρωση 0.2 mg/mL 1 min πριν την προσθήκη του αγωνιστή με σκοπό την υποβοήθηση της συσσώρευσης [488]. Επιπρόσθετα, στην περίπτωση που θέλουμε να μετρήσουμε ενεργότητα της PAF-AH στο εναιώρημα των αιμοπεταλίων πριν η μετά την ενεργοποίηση, ακολουθεί φυγοκέντρηση ($1,500 \times g$) για 5 min ώστε να απομακρυνθούν τα υπολείμματα των αιμοπεταλίων. Επίσης, για την μελέτη της δράσης της καλπεπτίνης στην συσσώρευση των αιμοπεταλίων, τα αιμοπετάλια επιάζονται με αυτή για 30 min πριν την προσθήκη του αγωνιστή. Ο τελικός όγκος μέσα στην κυψελίδα είναι 500 μL . Στην συνέχεια η κυψελίδα τοποθετείται στο όργανο και μετά από αναμονή 1 min υπό συνεχή ανάδευση προστίθεται σε αυτή η κατάλληλη ποσότητα του αγωνιστή. Έτσι προσδιορίζεται η μέγιστη συσσώρευση που επιτυγχάνεται μέσα σε 3 min μετά την προσθήκη του αγωνιστή. Όλα τα πειράματα συσσωρευομετρίας ολοκληρώνονται μέσα σε 3 ώρες από την αιμοληψία.



Απομόνωση των PMPs

Αντιδραστήρια-Όργανα

- Φυγόκεντρος πάγκου (HermLe, Z 320)
- Αιματοκυτόμετρο (Newbauer)
- Μικροσκόπιο (Olympus)
- Μετρητής συσσώρευσης αιμοπεταλίων ή συσσωρευόμετρο (CHRONO-LOG)
- Καταγραφικό (CHRONO-LOG)
- Γυάλινες κυψελίδες συσσώρευσης
- Ειδικά μαγνητάκια συσσώρευσης
- Auto densi-flow
- Υπερφυγόκεντρος (L7, Beckman)
- Κεφαλή υπερφυγοκέντρου (NVT-65, Beckman)
- Σωλήνες υπερφυγοκέντρου (Quickseal, Beckman)

Διαλύματα Εργασίας

- *Αντιπηκτικό διάλυμα κιτρικών (ACD)*. Όπως περιγράφεται στη σελίδα 80.
- *Διάλυμα απυράσης*. Όπως περιγράφεται στη σελίδα 80.
- *Διάλυμα προσταγλανδίνης E₁ (PGE₁)*. Όπως περιγράφεται στη σελίδα 80.
- *Ρυθμιστικό διάλυμα Tyrode's (pH 7.0)*. Όπως περιγράφεται στη σελίδα 80.
- *Ρυθμιστικό διάλυμα Tyrode's (pH 7.4)*. Όπως περιγράφεται στη σελίδα 80.
- *Διάλυμα 130 mM CaCl₂ – 1 M MgCl₂•6H₂O*. Όπως περιγράφεται στη σελίδα 80.
- *Διάλυμα λύσης των κυττάρων*. Όπως περιγράφεται στη σελίδα 80.
- *Διάλυμα 20 mg/mL ινωδογόνου (Fg)*. Όπως περιγράφεται στη σελίδα 81.
- *Διάλυμα 1.9 mM ιονοφόρο Ca²⁺-A23187*. Όπως περιγράφεται στη σελίδα 81.
- *Διάλυμα 20 U/mL θρομβίνης*. Όπως περιγράφεται στη σελίδα 81.
- *Ρυθμιστικό διάλυμα 10 mM PBS, pH 7.4*. 8.1816 g NaCl, 1.3800 g NaH₂PO₄•H₂O και 1.7795 g Na₂HPO₄•2H₂O διαλυτοποιούνται σε 800 mL dH₂O και αφού ρυθμιστεί το pH στο 7.4, συμπληρώνεται ο όγκος στο 1 L με dH₂O. Το διάλυμα διατηρείται στους σε θερμοκρασία δωματίου.



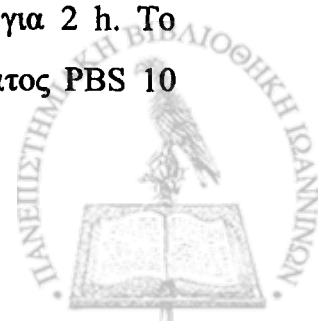
- **Διάλυμα 10% EDTA, pH 7.0.** 12.8247 g EDTANa₂•2H₂O (Titrplex III) διαλυτοποιούνται σε 90 mL dH₂O. Το pH ρυθμίζεται στο 7.0 και ο όγκος συμπληρώνεται στα 100 mL με dH₂O. Το διάλυμα διατηρείται στους 4°C.
- **Διάλυμα 20% σουκρόζη.** 2.0 g σουκρόζης διαλυτοποιούνται σε 10 mL Tyrode's pH 7.4. Παρασκευάζεται λίγο πριν την χρήση του.

Αρχή της μεθόδου

Η ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων, υπό την επίδραση διαφόρων αγωνιστών, έχει σαν αποτέλεσμα την διέγερση των κυττάρων με συνέπεια την αναδιοργάνωση της κυτταρικής μεμβράνης και την παραγωγή των PMPs.

Πειραματική διαδικασία

Τα πλυμένα αιμοπετάλια παρασκευάστηκαν όπως περιγράφεται στην παράγραφο **Μελέτη της συσσώρευσης των πλυμένων αιμοπεταλίων**. Τα PMPs παρασκευάστηκαν όπως έχει είδη περιγραφεί με μερικές τροποποιήσεις [489,490]. Η ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων πραγματοποιείται παρουσία θρομβίνης σε συγκέντρωση 0.2 U/mL υπό συνεχή ανάδευση ή από το ιονοφόρο Ca²⁺-A23187 σε συγκέντρωση 10 μM χωρίς ανάδευση για 30 min στους 37°C. Η ποσότητα του DMSO δεν ξεπερνά το 1% (v/v) στο διάλυμα των αιμοπεταλίων. Η ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων τερματίζεται με τη προσθήκη 0.01% EDTA (w/v) και άμεση τοποθέτηση στους 4°C. Το εναιώρημα των ενεργοποιημένων αιμοπεταλίων φυγοκεντρείται στους 1,000×g για 15 min σε θερμοκρασία δωματίου για την καθίζηση των υπολειμμάτων των αιμοπεταλίων. Το πλούσιο σε PMPs υπερκείμενο απομακρύνεται από το ίζημα. Στη συνέχεια το υπερκείμενο αυτό επιστοιβάζεται σε διάλυμα 20% σουκρόζη και φυγοκεντρείται στους 2,000×g για 10 min σε θερμοκρασία δωματίου [491]. Η επιστοίβαση και η φυγοκέντρωση διαχωρίζει τα PMPs από το υπολείμματα των αιμοπεταλίων. Με την βοήθεια αυτόματης πιπέτας συλλέγεται η πάνω στοιβάδα, (πλούσια σε PMPs), και υποβάλλεται σε υπερφυγοκέντρωση στους 100,000×g στους 4°C για 2 h. Το υπερκείμενο αποχύνεται και το ίζημα αναδιασπείρεται σε μικρό όγκο διαλύματος PBS 10



mM, pH 7.4 (600 μ L). Στην συνέχεια γίνεται η ταυτοποίηση των PMPs με χρήση κυτταρομετρίας ροής και προσδιορισμός πρωτεΐνης με την μέθοδο BCA.

Ανάλυση των PMPs με χρήση κυτταρομετρίας ροής (Flow Cytometry)

Αντιδραστήρια-Όργανα

- CD61-PerCP (Becton Dickinson)
- CD41a-FITC (Becton Dickinson)
- CD31-PE (Becton Dickinson)
- CD-62p-PE (Becton Dickinson)
- CD154-FITC (CD40L) (Pharmingen, Becton Dickinson)
- Annexin-V-FITC (Pharmingen, Becton Dickinson)
- Σωληνάκια πολυστηρενίου των 5 mL (12×75 mm, Becton Dickinson)
- Cell Quest πρόγραμμα (Becton Dickinson)
- Κυτταρόμετρο ροής FACScalibur (Becton Dickinson)

Διαλύματα Εργασίας

- **Ροθμιστικό διάλυμα 10 mM PBS (pH 7.4).** Όπως περιγράφεται στην σελίδα 84.
- **Διάλυμα 130 mM CaCl_2 –1 M $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$.** Όπως περιγράφεται στη σελίδα 80.
- **Διάλυμα 20 mM HEPES.** 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 1 mM $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 20 mM HEPES, 3.3 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 5.6 mM D(+)-γλυκόζης, και 0.1% αλβουμίνης διαλυτοποιούνται σε 90 mL dH_2O . Το pH ρυθμίζεται στο 7.4 και ο όγκος συμπληρώνεται στα 100 mL. Το διάλυμα φυλάσσεται στους 4°C.
- **Διάλυμα 20 mM HEPES + 2 mM CaCl_2 (Binding Buffer).** Το διάλυμα παρασκευάζεται όπως περιγράφεται παραπάνω. Επιπλέον περιέχει μια ποσότητα από το διάλυμα 130 mM CaCl_2 –1 M $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ τέτοια ώστε η τελική συγκέντρωση του CaCl_2 να είναι 2 mM.



Αρχή της μεθόδου

Το κυτταρόμετρο ροής έχει ως πηγή φωτός μια ακτίνα laser Αργού, η οποία παράγει φως ισχύος 15 mW και μήκους κύματος 488 nm. Η ακτίνα του laser προμηθεύει μια περιοχή φωτός αρκετά μεγάλη για τα περισσότερα είδη κυττάρων ώστε να υπάρχει πλήρης φωτισμός εντός της ακτίνας και να δίνει μια ομοιόμορφη διέγερση όλων των κύτταρων τα οποία περιέχονται στο δείγμα. Η εστιασμένη ακτίνα laser αλληλεπιδρά με τα φθορίζοντα αντισώματα με τα οποία έχει επισημανθεί ένα κύτταρο, με αποτέλεσμα να δημιουργούνται ταυτόχρονα σκεδασμένο φως καθώς και σήματα φθορισμού. Με τα κατάλληλα φθορίζοντα αντισώματα έχουμε την δυνατότητα να μελετήσουμε διάφορα κύτταρα και την αλληλεπίδρασή τους με τα αντισώματα αυτά. Στο κυτταρόμετρο τα κύτταρα διαχωρίζονται με βάση το μέγεθος και την κοκκίωση τους. Επίσης, το καθένα από τα αντισώματα έχουν επισημανθεί με μια φθορίζουσα ουσία η οποία εκπέμπει σε ένα χαρακτηριστικό μήκος κύματος (FITC= 530nm/30, PE= 585nm/42, και PerCP= 650 nm). Όμως, όλες η φθορίζουσες ουσίες με τις οποίες είναι επισημασμένα τα αντισώματα που χρησιμοποιούνται στη κυτταρομετρία διεγείρονται στο ίδιο μήκος κύματος (488 nm). Το σήμα της πρόσθιας σκέδασης (FSC, Forward Scatter), που αναγνωρίζει το μέγεθος των κυττάρων, συλλέγεται με την δίοδο της πρόσθιας σκέδασης. Η πλάγια σκέδαση (SSC, Side Scatter) που αναγνωρίζει την κοκκίωση των κυττάρων αλλά και οι παράμετροι του φθορισμού συλλέγονται από καθρέπτες που βρίσκονται σε γωνία 90° από την ακτίνα του λέιζερ.

Χρησιμοποιούμε αντισώματα όπως το CD41a-FITC (που αναγνωρίζει την α_{IIb} υπομονάδα του υποδοχέα α_{IIb}β₃), το CD62p-PE (που αναγνωρίζει την έκφραση της P-σελεκτίνης), το CD154-FITC, το CD31-PE (αναγνωρίζει την έκφραση του PECAM-1) αλλά και το CD61-PerCP (που αναγνωρίζει την β₃ υπομονάδα του υποδοχέα α_{IIb}β₃) μόρια που εκφράζονται στην επιφάνεια των PMPs μετά από την παραγωγή τους, για των χαρακτηρισμό αυτών. Επιπρόσθετα, χρησιμοποιείται η αννεξίνη-V η οποία αναγνωρίζει τα αρνητικά φορτισμένα φωσφολιπίδια, δηλαδή η PS που εκφράζονται στην επιφάνεια των PMPs. Με αυτό τον τρόπο επιβεβαιώνεται ότι τα μικροσωματίδια που παρασκευάστηκαν προέρχονται από τα αιμοπετάλια, διότι εκφράζουν τόσο αντιγόνα των αιμοπεταλίων όσο και τον χαρακτηριστικό δείκτη των μικροσωματιδίων αννεξίνη-V.



Πειραματική διαδικασία

Η πειραματική πορεία έχει ως εξής: προετοιμάζουμε ειδικά σωληνάκια της Becton Dickinson με 5 μL από τα κατάλληλα αντισώματα (anti-CD61, anti-CD41a αννεξίνη-V κτλ.). Στην συνέχεια προσθέτουμε 5 μL από τα PMPs και συμπληρώνουμε με ρυθμιστικό διάλυμα 20 mM HEPES μέχρι τα 50 μL . Τα δείγματα επωάζονται για 30 min σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά ακολουθεί αρραίωση αυτών 1:10 με ρυθμιστικό διάλυμα 20 mM HEPES, pH 7.4. Στην περίπτωση της αννεξίνης-V, το ρυθμιστικό διάλυμα 20 mM HEPES περιέχει και 2 mM Ca^{2+} (binding buffer). Η πρόσδεση της αννεξίνης-V με τα αρνητικά φωσφολιπίδια, όπως η PS των PMPs, απαιτεί ιόντα Ca^{2+} διότι και η αννεξίνη-V είναι αρνητικά φορτισμένη, οπότε με αυτό τον τρόπο δημιουργούνται γέφυρες μεταξύ της αννεξίνης-V και της PS διαμέσου ιόντων Ca^{2+} . Ακολουθεί η ανάλυση των δειγμάτων με κυτταρομετρία ροής, η απορρόφηση του δείγματος γίνεται με χαμηλή ροή ($12 \mu\text{L} \pm 3 \mu\text{L}/\text{min}$) χωρίς καμία άλλη επεξεργασία στο δείγμα και μετά ακολουθεί ανάλυση με τη βοήθεια υπολογιστή. Η καλύτερη ανάλυση των PMPs γίνεται την επόμενη μέρα μετά από την παραγωγή τους.

Ποσοτικός προσδιορισμός του PAF με συσσώρευση πλυμένων αιμοπεταλίων κουνελιού

Αντιδραστήρια-Όργανα

- EGTA (Ethylene glycol bis-(2-aminoethylether)-N,N'-tetraacetic acid, M.B. 380,4 g/mol, Serva)
- Ζελατίνη (Merck)
- KCl (M.B. 74,56 g/mol, Ferak Berlin)
- $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (M.B. 203,31 g/mol, Fluka)
- NaHCO_3 (M.B. 84,01 g/mol, Merck)
- Γλυκόζη (M.B. 180,16 g/mol, Fluka)
- Ασπρίνη (Ακετυλοσαλικυλική λυσίνη, Egicalm)
- CV-3988 ((\pm)-[3-(N-octadecylcarbamoxyloxy)-2-methoxy]propyl 2-thiazolioethyl phosphate, $\text{C}_{26}\text{H}_{54}\text{NO}_7\text{P}$, M.B. 523.7 g/mol, Sigma)
- Οξαλίκo αμμώνιο ($(\text{NH}_4)_2\text{C}_2\text{O}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, M.B. 142,11 g/mol, Mallinckrodt)
- $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (M.B. 147,00 g/mol, Sigma)
- Φωσφοκρεατίνη (CP, M.B. 255,1 g/mol, Sigma)



- Κινάση της φωσφοκρεατίνης (CPK, 17500 U/mL, Sigma)
- PAF (1-O-hexadecyl-2-acetyl-sn-glycero-3-phosphocholine, M.B.:523,7 g/mol, Sigma)
- Πλαστικοί φυγοκεντρικοί σωλήνες των 50 mL
- Αιματοκυτόμετρο (Neubauer)
- Μικροσκόπιο (Olympus)
- Μετρητής συσσώρευσης αιμοπεταλίων ή συσσώρευόμετρο (CHRONO-LOG)
- Γυάλινες κυψελίδες συσσώρευσης
- Ειδικά μαγνητάκια συσσώρευσης

Διαλύματα Εργασίας

- **Διάλυμα EDTA 0,2M.** 7,4440 g EDTA Na₂•2H₂O και 0,9 g NaCl διαλυτοποιούνται σε 100 mL dH₂O. Το διάλυμα διατηρείται στους 4°C.
- **Διάλυμα EGTA 0,2M.** 7,6080 g EGTA διαλυτοποιούνται σε 100 mL dH₂O. Το διάλυμα διατηρείται στους 4°C.
- **Διάλυμα ζελατίνης 10%.** 5 g ζελατίνης διαλυτοποιούνται σε περίπου 40 mL dH₂O με θέρμανση και συνεχή ήπια ανάδευση. Μετά τη διαλυτοποίηση το διάλυμα αφήνεται να κρυώσει και ο όγκος συμπληρώνεται στα 50 mL με dH₂O. Το διάλυμα παρασκευάζεται λίγο πριν τη χρήση του.
- **Ρυθμιστικό διάλυμα έκλυσης των αιμοπεταλίων, pH 6.5.** 0,1950 g KCl, 0,2125 g MgCl₂•6H₂O, 8 g NaCl, 1,0150 g NaHCO₃, 1 mL διαλύματος EGTA 0,2 M, 1 g άνυδρης γλυκόζης και 25 mL διαλύματος ζελατίνης 10% διαλυτοποιούνται σε 1 L dH₂O. Ρυθμίζεται το pH στο 6.5. Το διάλυμα χωρίζεται σε όγκους των 100 mL και τοποθετείται σε πλαστικά μπουκαλάκια (πολυπροπυλενίου). Το διάλυμα διατηρείται στους -20°C.
- **Διάλυμα ασπιρίνης 0.1 M.** 0,0162 g ασπιρίνης διαλυτοποιούνται σε 500 μL φυσιολογικό ορό. Το διάλυμα παρασκευάζεται λίγο πριν τη χρήση του.
- **Διάλυμα οξαλικού αμμωνίου 1%.** 1 g οξαλικού αμμωνίου διαλυτοποιούνται σε 100 mL dH₂O. Το διάλυμα διατηρείται στους 4°C.
- **Διάλυμα CP 0.2 M.** 0,1020 g CP διαλυτοποιούνται σε 2 mL φυσιολογικό ορό. Το διάλυμα χωρίζεται σε όγκους των 200 μL και τοποθετείται σε erpendorf. Το διάλυμα διατηρείται στους -20°C.



- **Διάλυμα CPK 2000 U/mL.** 0,0129 g CPK διαλυτοποιούνται σε 2 mL φυσιολογικό ορό. Το διάλυμα χωρίζεται σε όγκους των 200 μ L και τοποθετείται σε erpendorf. Το διάλυμα διατηρείται στους -20°C .
- **Διάλυμα 51 mM CV-3988.** Το εμπορικό αντιδραστήριο περιέχει 5 mg CV-3988 σε λυοφιλοποιημένη μορφή τα οποία διαλυτοποιούνται σε 165 μ L αιθανόλης δίνοντας διάλυμα συγκέντρωσης 51 mM. Το διαλύματα διατηρείται στους -20°C .
- **Ρυθμιστικό διάλυμα Tyrode's με ζελατίνη και ασβεστίου, pH 7.4.** 0,1950 g KCl, 0,2125 g $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 8 g NaCl, 1,2100 g Tris-HCL, 0,1910 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 1 g άνυδρης γλυκόζης και 25 mL διαλύματος ζελατίνης 10% διαλυτοποιούνται σε 1 L dH_2O . Ρυθμίζεται το pH στο 7.4. Το διάλυμα χωρίζεται σε όγκους των 40 mL και τοποθετείται σε πλαστικά φιαλίδια. Το διάλυμα διατηρείται στους -20°C .
- **Ρυθμιστικό διάλυμα συσσώρευσης των αιμοπεταλίων, pH 7.4.** Σε 40 mL ρυθμιστικό διαλύματος Tyrode's με ζελατίνη και ασβεστίου, pH 7.4, προσθέτονται 200 μ L διαλύματος CP 0.2 M (τελική συγκέντρωση 1 mM) και 200 μ L διαλύματος CPK 2000 U/mL (τελική συγκέντρωση 10 U/mL) ρυθμίζεται το pH στο 7.4. Το διάλυμα παρασκευάζεται λίγο πριν τη χρήση του.
- **Διάλυμα BSA 2,5 mg/mL.** 0,2500 g BSA διαλυτοποιούνται σε 1 mL φυσιολογικού ορού. Το διάλυμα διατηρείται στους -20°C .
- **Διάλυμα 20 mM PAF.** Τα 25 mg σκόνης διαλυτοποιούνται σε 2,387 mL αιθανόλης (80%) δίνοντας διάλυμα 20 mM. Το διάλυμα διατηρείται στους -20°C .
- **Πρότυπα διαλύματα C16:0 PAF 5 και 10 pg/ μ L.** 2 μ L διαλύματος PAF 20 mM αραιώνονται στα 2 mL με την προσθήκη αιθανόλης (80%), δίνοντας διάλυμα 20 μ M. 2.4 μ L διαλύματος PAF 20 μ M μεταφέρονται σε πλαστικό σωληνάκι πολυπροπυλενίου. Οι διαλύτες εξατμίζονται σε ρευμα N_2 . Προσθέτονται 5 mL BSA 2.5 mg/mL. Το μίγμα αναδεύεται ισχυρά σε Vortex και επώάζεται για 30 min στους 37°C . Με τον τρόπο αυτό παρασκευάζεται διάλυμα 5 pg/ μ L (9.6 nM) σε BSA 2.5 mg/mL. Το διάλυμα διατηρείται στους -20°C . Με τη χρήση 4.8 μ L διαλύματος PAF 20 μ M παρασκευάζεται με το ίδιο ακριβώς τρόπο διάλυμα PAF 10 pg/ μ L (19.2 nM) σε BSA 2.5 mg/mL.



Αρχή της μεθόδου

Ο ποσοτικός προσδιορισμός του PAF των δειγμάτων βασίζεται στη σύγκριση της συσσώρευσης που προκαλούν διάφορες ποσότητες δείγματος σε εναιώρημα αιμοπεταλίων σε σχέση με τις συσσωρεύσεις που προκαλούν γνωστές ποσότητες εμπορικά διαθέσιμου C16:0 PAF. Η συσσώρευση έχει σαν αποτέλεσμα της αύξηση της διαπερατότητας του εναιωρήματος των αιμοπεταλίων, η οποία μετριέται σε ειδικό νεφελόμετρο. Τα αιμοπετάλια κατεργάζονται με ασπιρίνη, ώστε να αναστέλλεται η παραγωγή και έκκριση του TxA_2 , καθώς και με σύστημα CP/CPK, ώστε να απενεργοποιείται το εκκρινόμενο κατά την ενεργοποίηση ADP [492].

Πειραματική διαδικασία

Συλλογή του αίματος

Συλλέγονται 40 mL αίματος, από την κεντρική αρτηρία του αυτιού των κουνελιών, σε πλαστικό φυγοκεντρικό σωλήνα των 50 mL, ο οποίος περιέχει 1 mL Na_2EDTA 0.2M. Το αίμα αναμιγνύεται ήπια.

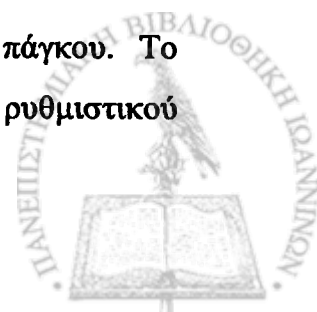
Απομόνωση, αρίθμηση και έκπλυση των αιμοπεταλίων από αίμα κουνελιού

Πρώτη φυγοκέντρωση

Ο σωλήνας με το αίμα φυγοκεντρείται σε $375 \times g$ για 20 min σε φυγόκεντρο πάγκου χωρίς φρένο. Το PRP συλλέγεται με πιπέτα και τοποθετείται σε άλλο πλαστικό φυγοκεντρικό σωλήνα των 50 mL.

Δεύτερη φυγοκέντρωση

Το PRP φυγοκεντρείται σε $1,400 \times g$ για 15 min σε φυγόκεντρο πάγκου. Το υπερκείμενο αποχύνεται και τα αιμοπετάλια αναδιαπείρονται σε μικρό όγκο ρυθμιστικού



διαλύματος έκπλυσης, pH 6.5. Στη συνέχεια ο όγκος συμπληρώνεται στα 40 mL με ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης, pH 6.5. Το εναιώρημα των αιμοπεταλίων ομογενοποιείται με ήπια ανάδευση.

Τρίτη φυγοκέντρηση

Τα αιμοπετάλια φυγοκεντρούνται σε 1,400xg για 15 min σε φυγόκεντρο πάγκου. Το υπερκείμενο αποχύνεται και τα αιμοπετάλια αναδιαπείρονται σε μικρό όγκο ρυθμιστικού διαλύματος έκπλυσης, pH 6.5. Στη συνέχεια ο όγκος συμπληρώνεται στα 40 mL με ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης, pH 6.5. Προσθέτονται 40 µL διαλύματος ασπιρίνης 0.1 M. Το εναιώρημα των αιμοπεταλίων ομογενοποιείται με ήπια ανάδευση και αφήνεται για 15 min σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.

Αρίθμηση των αιμοπεταλίων

Κατά την διάρκεια της επώασης του εναιωρήματος με την ασπιρίνη γίνεται η μέτρηση των αιμοπεταλίων. Συγκεκριμένα 10 µL αιμοπεταλίων προσθέτονται σε 190 µL διαλύματος οξαλικού αμμωνίου 1% (αραίωση 1:20). Το μίγμα ομογενοποιείται ήπια και 10 µL από το εναιώρημα τοποθετούνται σε μία από τις δύο υποδοχές που υπάρχουν στο αιματοκυτόμετρο, πάνω στο οποίο έχει τοποθετηθεί καλυπτρίδα. Το αιματοκυτόμετρο τοποθετείται για 20 min σε τρυβλίο Petri, το οποίο περιέχει ένα κομμάτι βρεγμένου βαμβακιού για να διατηρηθεί υγρή η ατμόσφαιρα στο εσωτερικό του τρυβλίου. Μετά από 20 min γίνεται η μέτρηση των αιμοπεταλίων στο μικροσκόπιο. Μετρούνται 5 μέτριου μεγέθους τετράγωνα του κεντρικού μεγάλου τετραγώνου του αιματοκυτομέτρου.

$$\frac{(\Sigma \text{ αιμοπεταλίων των 5 τετράγωνων}) \times 0,04}{2.5}$$

2.5



Το αποτέλεσμα της παραπάνω εξίσωσης αντιστοιχεί στον όγκο (σε mL) που πρέπει να επαναιωρηθούν τα αιμοπετάλια έτσι ώστε η τελική συγκέντρωση να είναι 2.5×10^9 αιμοπετάλια/mL.

Τέταρτη φυγοκέντρωση

Τα αιμοπετάλια φυγοκεντρώνονται σε $1,400 \times g$ για 15 min σε φυγόκεντρο πάγκου. Το υπερκείμενο αποχύνεται και τα αιμοπετάλια αναδιασπείρονται σε μικρό όγκο ρυθμιστικού διαλύματος έκπλυσης, pH 6.5. Στη συνέχεια ο όγκος συμπληρώνεται με ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης, pH 6.5, έτσι ώστε η τελική συγκέντρωση των αιμοπεταλίων να είναι 2.5×10^9 αιμοπετάλια/mL.

Συσσωρευση των αιμοπεταλίων

Ρύθμιση του συσσωρευομέτρου

Το όργανο ανοίγεται τουλάχιστον 30 min νωρίτερα, ώστε να φτάσει σε θερμοκρασία 37°C . Γίνεται η ρύθμιση της κλίμακας του οργάνου χρησιμοποιώντας 500 μL ρυθμιστικού διαλύματος συσσωρευσης, pH 7.4 ως αναφορά για το 100% οπτικής διαπερατότητας ή 100% συσσωρευσης, και το PRP για το 0% της οπτικής διαπερατότητας ή 0% συσσωρευσης.

Πρότυπη καμπύλη

Σε γυάλινη κυβελίδα συσσωρευσης, που περιέχει ειδικό μαγνητάκι, προσθέτονται 400 μL ρυθμιστικού διαλύματος συσσωρευσης, pH 7.4, 100 μL του εναιωρήματος των αιμοπεταλίων και προσθέτονται αυξανόμενοι όγκοι των προτύπων διαλυμάτων C16:0 PAF. Η κυβελίδα τοποθετείται στο συσσωρευόμετρο και αφήνεται για 3 min. Στο χρονικό διάστημα αυτό καταγράφονται οι συσσωρεύσεις.



Μέτρηση των δειγμάτων

Σε γυάλινη κυψελίδα συσσώρευσης, που περιέχει ειδικό μαγνητάκι, προσθέτονται μια ποσότητα (350 μL) ρυθμιστικού διαλύματος συσσώρευσης, pH 7.4, 100 μL του εναιωρήματος των αιμοπεταλίων και διάφορες συγκέντρωσεις του εναιωρήματος ενεργοποιημένων αιμοπεταλίων (0-30 μg πρωτεΐνης/mL), τα PMPs (0-30 μg πρωτεΐνης/mL) και τα οξειδωμένα PMPs (0-30 μg πρωτεΐνης/mL). Επίσης, ο ειδικός αναστολέας του PAF το CV-3988 (30 μM) χρησιμοποιήθηκε στα δείγματα αυτά. Η κυψελίδα τοποθετείται στο συσσωρευόμετρο και αφήνεται για 3 min. Στο χρονικό διάστημα αυτό καταγράφονται οι συσσωρεύσεις.

Επεξεργασία των αποτελεσμάτων

Με χρήση ηλεκτρονικού υπολογιστή σχεδιάζεται γράφημα το οποίο περιέχει στον άξονα των X τα συνολικά pM PAF που περιέχονται στους διάφορους όγκους των προτύπων διαλυμάτων που χρησιμοποιήθηκαν και στον άξονα των Y τις αντίστοιχες συσσωρεύσεις των αιμοπεταλίων. Με τον τρόπο αυτό σχηματίζεται η πρότυπη καμπύλη, η οποία έχει σιγμοειδή μορφή. Με βάση την πρότυπη καμπύλη και τις συσσωρεύσεις των αιμοπεταλίων παρουσία διαφόρων όγκων των δειγμάτων υπολογίζεται η περιεκτικότητα των δειγμάτων σε PAF. Αξιόπιστοι υπολογισμοί γίνονται μόνο όταν οι συσσωρεύσεις που προκαλούν τα δείγματα αντιστοιχούν στη γραμμική περιοχή της πρότυπης καμπύλης.

Προσδιορισμός των πρωτεϊνών με τη μέθοδο BCA

Αντιδραστήρια – Όργανα

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

- **Αντιδραστήριο Α.** Το αντιδραστήριο Α είναι μείγμα ανθρακικού νατρίου, διττανθρακικού νατρίου, δισιχρονικού οξέος και ταρταρικού νατρίου σε 0.2N NaOH.
- **Αντιδραστήριο Β.** Διάλυμα 4% CuSO_4 .
- Πρότυπο διάλυμα 2 mg/mL BSA σε 0.9% NaCl και 0.05% NaN_3 .



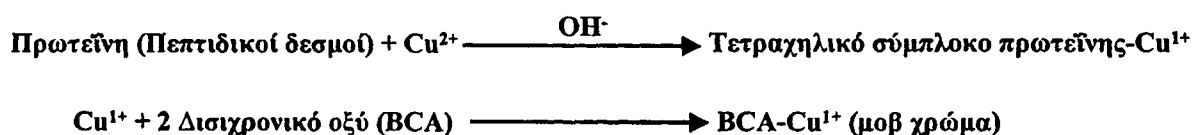
- Πλακίδιο microELISA 96 θέσεων (Starsstedt).
- Πολυπιπέτα σταθερού όγκου 200 μL (Costar)
- Μετρητής microELISA (Spectra Max 190, Molecular Devices)

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 αραιώση του διαλύματος BSA 2 mg/mL, έτσι ώστε να προκύψουν διαλύματα 0.25-1.5 mg/mL BSA. Τα πρότυπα διαλύματα BSA διατηρούνται στους 4°C.

Αρχή της μεθόδου

Τα ιόντα Cu^{2+} ανάγονται αρχικά από τις πρωτεΐνες, σε αλκαλικό περιβάλλον, προς ιόντα Cu^+ , κάθε ένα από τα οποία σχηματίζει στη συνέχεια έγχρωμο, υδατοδιαλυτό σύμπλοκο με 2 μόρια δισιχρονικού οξέος, που απορροφά στα 560 nm [493,494].



Πειραματική διαδικασία

Σε πλακίδιο microELISA 96 θέσεων τοποθετούνται 20 μL προτύπων 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 την βοήθεια ηλεκτρονικού υπολογιστή, η βέλτιστη ευθεία:

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

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

Προσδιορισμός των πρωτεϊνών με τη μέθοδο LOWRY

Αντιδραστήρια- Όργανα

- NaOH (M.B. 40 g/mol, Merck)
- Na₂CO₃ (M.B. 108 g/mol, Merck)
- Κιτρικό νάτριο (C₆H₅Na₃O₇·2H₂O, M.B. 294.10 g/mol, Merck)
- CuSO₄ (M.B. 159.61 g/mol, Riedel-deHaen)
- Αντιδραστήριο φαινόλης 2N (Folin & Ciocalteu's phenol reagent, Sigma)
- Πλακίδιο ELISA 96 θέσεων (Sarstedt)
- Μετρητής microELISA (Spectra MAX 190, Molecular Devices)
- Οκτακάναλη πολυπιπέτα μεταβαλλόμενου όγκου (Costar)

Διαλύματα εργασίας

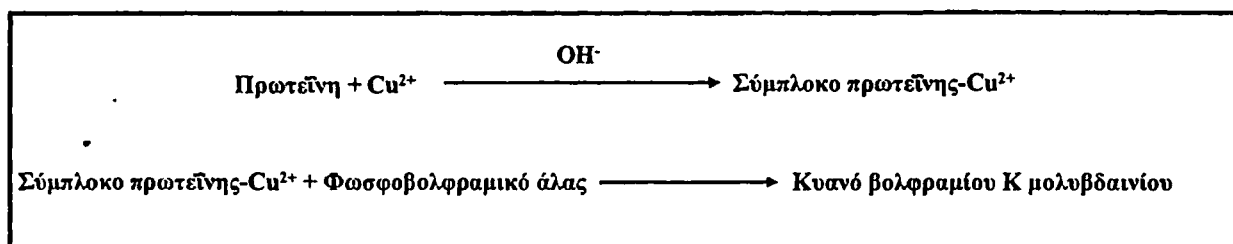
- **Διάλυμα 1 N NaOH.** 4g NaOH διαλύονται σε 80 mL dH₂O. Το διάλυμα αφήνεται να κρυσώσει, μεταφέρεται σε ογκομετρική φιάλη των 100 mL όπου συμπληρώνεται ο όγκος με dH₂O. Το διάλυμα διατηρείται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.
- **Διάλυμα 0.5 N NaOH.** Γίνεται αραίωση 1:1 (v/v) του διαλύματος 1N NaOH με dH₂O. Το διάλυμα διατηρείται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.
- **Διάλυμα 2% Na₂CO₃.** 2 g Na₂CO₃ διαλυτοποιούνται σε 100 mL dH₂O. Το διάλυμα διατηρείται στους 4°C.
- **Διάλυμα 1% κιτρικού νατρίου.** 1.139 g κιτρικού νατρίου διαλυτοποιούνται σε 100 mL dH₂O. Το διάλυμα διατηρείται στους 4°C.



- **Διάλυμα 0.5% CuSO₄ σε 1% κιτρικό νάτριο.** 0.5 g CuSO₄ διαλυτοποιούνται σε 100 mL 1% κιτρικού νατρίου. Το διάλυμα διατηρείται στους 4°C.
- **Διάλυμα εργασίας A.** 2% Na₂CO₃ και 0.5% CuSO₄ σε αναλογία 50:1 (v/v). Σε 50 mL διαλύματος 2% Na₂CO₃ προστίθεται 1 mL διαλύματος 0.5% CuSO₄. Το διάλυμα εργασίας παρασκευάζεται λίγο πριν τη χρήση του.
- **Πρότυπο διάλυμα 100 μg/mL BSA σε 0.5 N NaOH.** 10 mg BSA διαλυτοποιούνται σε 100 mL 0.5-N NaOH. Το διάλυμα διατηρείται στους -20°C.
- **Αντιδραστήριο φαινόλης.** Ορισμένος όγκος Folin & Ciocalteu's αναμιγνύεται με ίσο όγκο dH₂O. Το αντιδραστήριο παρασκευάζεται λίγο πριν τη χρήση του.

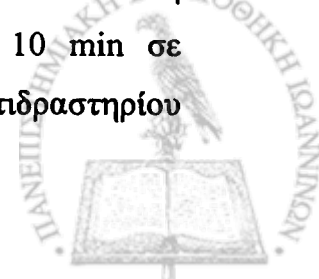
Αρχή της μεθόδου

Οι πρωτεΐνες αρχικά αντιδρούν με τα ιόντα Cu²⁺, σε αλκαλικό περιβάλλον, και στη συνέχεια ανάγουν το φωσφομολυβδαινικό-φωσφοβολφραμικό αντιδραστήριο με αποτέλεσμα το σχηματισμό μπλε χρώματος που απορροφά στα 720nm [495].



Πειραματική διαδικασία

Σε πλακίδιο ELISA 96 θέσεων τοποθετούνται 0, 5, 12.5, 25, 37.5 και 50 μL πρότυπου διαλύματος 100 μg/mL BSA (0, 10, 25, 50, 75 και 100 μg BSA αντίστοιχα) και ο όγκος συμπληρώνεται μέχρι τα 50 μL με 0.5N NaOH. Αντίστοιχα αναμιγνύονται 5 μL δείγματος με ίσο όγκο 1N NaOH και ο όγκος συμπληρώνεται μέχρι τα 50 μL με 0.5N NaOH. Το μίγμα αναμιγνύεται ισχυρά και αφήνεται για 60 min σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά την επώαση της μιας ώρας προστίθενται με πολυπιπέτα 250 μL του διαλύματος εργασίας σε κάθε θέση της πλάκας. Ακολουθεί ισχυρή ανάδευση και το πλακίδιο αφήνεται για 10 min σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια προστίθενται με πολυπιπέτα 25 μL αντιδραστηρίου



φαινόλης σε κάθε θέση της πλάκας. Ακολουθεί ισχυρή ανάδευση και επώαση για 30 min σε θερμοκρασία δωματίου. Έπειτα το πλακίδιο εισάγεται στον μετρητή microELISA όπου φωτομετρείται στα 720 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.

Απομόνωση των λιποπρωτεϊνών με διαδοχικές υπερφυγοκεντρήσεις

Αντιδραστήρια-Όργανα

- Φυγόκεντρος πάγκου (HermLe, Z 320)
- Υπερφυγόκεντρος (L7, Beckman)
- Κεφαλή υπερφυγοκέντρου (NVT-65, Beckman)
- Σωλήνες υπερφυγοκέντρου (Quickseal, Beckman)
- Σωλήνες υπερφυγοκέντρου (Optiseal, Beckman)
- Αντιβιοτικό Garamycin, (Gentamicin sulfate, Schering-Plough)
- Titriplex III (Merck)
- KBr (Merck)
- Μembrάνη διαπίδυσης (Sigma)
- Φίλτρα διήθησης 0.20 μ (Corning)

Διαλύματα εργασίας

- **Διάλυμα 10% EDTA, pH 7.0.** Όπως περιγράφεται στην σελίδα 85.
- **Διάλυμα KBr πυκνότητας 1.019 g/mL.** 14.92 g KBr διαλυτοποιούνται σε dH₂O 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.



- **Διάλυμα KBr πυκνότητας 1.210 g/mL.** 159.03 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.** 8.1816 g NaCl, 1.3800 g NaH₂PO₄H₂O και 1.7795 g 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.
- **Μεμβράνη διαπίδυσης.** Η μεμβράνη ενεργοποιείται σε PBS για 3 h και κατακρατά οποιοδήποτε συστατικό έχει μοριακό βάρος μεγαλύτερο από 12 kDa.
- **Το KBr.** Το KBr ξηραίνεται σε κλίβανο στους 100°C για 24 h και διατηρείται σε ξηραντήρα.
- **Αντιβιοτικό Garamycin.** Το διάλυμα περιέχει 40 mg θεικής γενταμυκίνης/mL και υπάρχει σε φιαλίδια των 2 mL.

Αρχή της μεθόδου

Ο διαχωρισμός των λιποπρωτεϊνών του πλάσματος με υπερφυγοκέντρωση βασίζεται στην παρατήρηση ότι διαφορές στο λιπιδιακό περιεχόμενο των λιποπρωτεϊνών έχουν ως αποτέλεσμα την επιπλευσή τους σε διαφορετικές πυκνότητες [496]. Απομονώνονται οι εξής λιποπρωτεΐνες στις αντίστοιχες πυκνότητες.

Λιποπρωτεΐνες	Πυκνότητα (d=density)
VLDL + IDL	0.096-1,019 g/mL
LDL	1.019-1.063 g/mL
HDL	1.063-1.210 g/mL
Lp(a)	1.060-1.107 g/mL



Πειραματική διαδικασία

Απομόνωση του πλάσματος

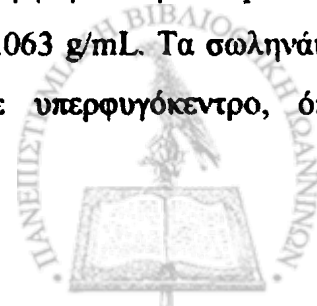
Η συλλογή του αίματος γίνεται σε πλαστικό σωληνάκι το οποίο περιέχει 10% EDTA σε αναλογία 100 μL για κάθε 10 mL αίματος. Το σωληνάκι φυγοκεντρείται στις 1500xg για 20 min, σε θερμοκρασία δωματίου, σε φυγόκεντρο πάγκου για να καταβυθιστούν τα κύτταρα του αίματος. Το πλάσμα συλλέγεται με πιπέτα. Σ' αυτό προσθέτονται 5 μL 10% EDTA και 1.25 μL Garamycin ανά mL πλάσματος.

Απομόνωση της VLDL και IDL

Μετρίεται ο όγκος του πλάσματος σε mL και πολλαπλασιάζεται με το συντελεστή 0.0212. Ο αριθμός που προκύπτει ισούται με τα g στερεού KBr που προσθέτονται 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 ζυγοσταθμιστούν, σφραγίζονται και τοποθετούνται σε υπερφυγόκεντρο, όπου φυγοκεντρούνται στις 40,000 rpm (152,000xg), για 10 h, στους 14°C. Μετά το τέλος της υπερφυγοκέντρωσης η VLDL έχει συγκεντρωθεί στην κορυφή του σωλήνα διαχωρισμένη από τα υπόλοιπα συστατικά του πλάσματος. Η VLDL συλλέγεται προσεκτικά με σύριγγα από την κορυφή του σωλήνα (2-2.5 mL). Στη συνέχεια συλλέγεται και το υπόλειμμα το οποίο περιέχει την LDL, HDL και άλλες πρωτεΐνες.

Απομόνωση της LDL

Μετρίεται 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 προσθέτονται 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 ζυγοσταθμιστούν, σφραγίζονται και τοποθετούνται σε υπερφυγόκεντρο, όπου



φυγοκεντρούνται στις 40,000 rpm (152,000×g), για 10 h, στους 14°C. Μετά το τέλος της υπερφυγοκέντρωσης η LDL έχει μαζευτεί στην κορυφή του σωλήνα διαχωρισμένη από τα υπόλοιπα συστατικά του πλάσματος. Η LDL συλλέγεται προσεκτικά με σύριγγα από την κορυφή του σωλήνα (2-2.5 mL).

Έκπλυση της LDL

Η απομονωμένη LDL υπερφυγοκεντρείται ακόμα μία φορά ώστε να καθαριστεί όσο το δυνατό περισσότερο από την αλβουμίνη του πλάσματος. Η LDL μοιράζεται σε σωληνάκια υπερφυγοκέντρου Optiseal, ο όγκος των οποίων συμπληρώνεται με διάλυμα KBr πυκνότητας 1.063 g/mL. Τα σωληνάκια, αφού ζυγοσταθμιστούν, σφραγίζονται και τοποθετούνται σε υπερφυγόκεντρο, όπου φυγοκεντρούνται στις 40,000 rpm (152,000×g), για 10 h, στους 14°C. Μετά το τέλος της υπερφυγοκέντρωσης η LDL έχει μαζευτεί στην κορυφή του σωλήνα απ' όπου συλλέγεται με σύριγγα (2-2.5 mL). Ακολουθεί διαπίδυση της LDL για 24 h στους 4°C στο σκοτάδι έναντι ρυθμιστικού διαλύματος PBS 10 mM, pH 7.4 και μέτρηση της πρωτεΐνης με τη μέθοδο BCA.

Απομόνωση της HDL

Μετριέται ο όγκος του υπολείμματος της δεύτερης υπερφυγοκέντρωσης σε mL και πολλαπλασιάζεται με το συντελεστή 0.2199. Ο αριθμός που προκύπτει ισούται με τα g στερεού KBr που προσθέτονται στο υπόλειμμα ώστε η πυκνότητά του να μεταβληθεί από 1.063 σε 1.210 g/mL. Το υπόλειμμα μοιράζεται σε σωληνάκια υπερφυγοκέντρου Optiseal, ο όγκος των οποίων συμπληρώνεται με διάλυμα KBr πυκνότητας 1.210 g/mL. Τα σωληνάκια, αφού ζυγοσταθμιστούν, σφραγίζονται και τοποθετούνται σε υπερφυγόκεντρο, όπου φυγοκεντρούνται στις 40,000 rpm (152,000×g), για 10h, στους 14°C. Μετά το τέλος της υπερφυγοκέντρωσης η HDL έχει μαζευτεί στην κορυφή του σωλήνα διαχωρισμένη από τα υπόλοιπα συστατικά του πλάσματος. Η HDL συλλέγεται προσεκτικά με σύριγγα από την κορυφή του σωλήνα (2-2.5 mL).



Έκπλυση της HDL

Η απομονωμένη HDL υπερφυγοκεντρείται ακόμα μία φορά ώστε να καθαριστεί όσο το δυνατό περισσότερο από την αλβουμίνη του πλάσματος. Η HDL μοιράζεται σε σωληνάκια υπερφυγοκέντρου Optiseal, ο όγκος των οποίων συμπληρώνεται με διάλυμα ΚΒγ πυκνότητας 1.210 g/mL. Τα σωληνάκια, αφού ζυγοσταθμιστούν, σφραγίζονται και τοποθετούνται σε υπερφυγόκεντρο, όπου φυγοκεντρούνται στις 40,000 rpm (152,000×g), για 10 h, στους 14°C. Μετά το τέλος της υπερφυγοκέντρωσης η HDL έχει μαζευτεί στην κορυφή του σωλήνα απ' όπου συλλέγεται με σύριγγα (2-2.5 mL). Ακολουθεί διαπίδυση της HDL για 24 h στους 4°C στο σκοτάδι έναντι ρυθμιστικού διαλύματος PBS 10 mM, pH 7.4 και μέτρηση της πρωτεΐνης με τη μέθοδο BCA.

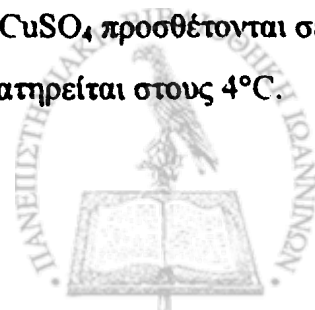
Οξείδωση της LDL και της HDL παρουσία των PMPs

Αντιδραστήρια- Όργανα

- Απομονωμένη LDL
- Απομονωμένη HDL
- CuSO_4 (M.B. 159.61 g/mol, Riedel-deHaën)
- Μembrάνη διαπίδυσης (Sigma)
- Φίλτρα διήθησης 0.20 μ (Corning)
- Πλακίδιο microELISA 96 θέσεων (Costar, Maxisorp)
- Μετρητής microELISA (Spectra Max 190, Molecular Devices)

Διαλύματα Εργασίας

- *Διάλυμα 10% EDTA, pH 7.0.* Όπως περιγράφεται στην σελίδα 85.
- *Ρυθμιστικό διάλυμα 10 mM PBS, pH 7.4.* Όπως περιγράφεται στην σελίδα 84.
- *Διάλυμα 20 mM CuSO_4 .* 0.0319 g CuSO_4 διαλυτοποιούνται σε 100 mL dH_2O δίνοντας διάλυμα 20 mM CuSO_4 . Το διάλυμα διατηρείται στους 4°C.
- *Διάλυμα 0.5 mM CuSO_4 .* 0.25 mL του διαλύματος 20 mM CuSO_4 προσθέτονται σε 10 mL dH_2O δίνοντας διάλυμα 0.5 mM CuSO_4 . Το διάλυμα διατηρείται στους 4°C.



- **Απομονωμένη LDL.** Η LDL απομονώνεται υπερφυγοκεντρικά, όπως έχει περιγραφεί και διατηρείται στο ψυγείο, στους 4°C, παρουσία EDTA 0.05%.
- **Απομονωμένη HDL.** Η HDL απομονώνεται υπερφυγοκεντρικά, όπως έχει περιγραφεί και διατηρείται στο ψυγείο, στους 4°C, παρουσία EDTA 0.05%.
- **Μεμβράνη διαπίδυσης.** Η μεμβράνη ενεργοποιείται σε PBS για 3 h και κατακρατά οποιοδήποτε συστατικό έχει μοριακό βάρος μεγαλύτερο από 12 kDa.

Αρχή της μεθόδου

Η οξειδωτική τροποποίηση των λιποπρωτεϊνών (LDL και HDL) επιτυγχάνεται με την επώασή τους, σε κατάλληλες συνθήκες, με ιόντα Cu^{2+} στους 37°C. Η παρακολούθηση της οξείδωσης γίνεται στα 234 nm, περιοχή όπου απορροφούν τα συζυγή διένια που σχηματίζονται από τις λιποπρωτεΐνες κατά την υπεροξείδωση των ενδογενών πολυακόρεστων λιπαρών οξέων.

Πειραματική διαδικασία

Προετοιμασία της LDL για οξείδωση

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



Οξείδωση της LDL και της HDL

Οι LDL και HDL αραιώνονται στα 100 µg πρωτεΐνης/mL με την προσθήκη κατάλληλου όγκου PBS 10 mM, pH 7.4. Η οξείδωση αρχίζει με την προσθήκη διαλύματος 0.5 mM CuSO₄, δίνοντας τελική συγκέντρωση ιόντων 5 µM Cu²⁺, παρουσία διάφορες συγκεντρώσεις PMPs ή oxPMPs (0-100 µg πρωτεΐνης/mL). Η οξείδωση των PMPs (100 µg πρωτεΐνης/mL, oxPMPs) πραγματοποιείται με την προσθήκη διαλύματος 0.5 mM CuSO₄, δίνοντας τελική συγκέντρωση ιόντων 5 µM Cu²⁺, για 3 h στους 37°C. Ο έλεγχος της οξείδωσης των PMPs έγινε με την έκφραση της αννεξίνης-V με χρήση κυτταρομετρία ροής. Στην συνέχεια, οι απομονωμένες λιποπρωτεΐνης τοποθετούνται σε πλακίδιο microELISA 96 θέσεων στους 37°C για 3 h παρουσία των PMPs ή των oxPMPs σε διάφορες συγκεντρώσεις. Η οξείδωση παρακολουθείται στα 234 nm με καταγραφή της σιγμοειδούς καμπύλης παραγωγής των συζυγών διενίων κάθε 10 min.

Τερματισμός της οξείδωσης

Η οξείδωση της LDL αλλά και της HDL σταματά με την προσθήκη 5 µL/mL διαλύματος 10% EDTA, pH 7.0, δίνοντας τελική συγκέντρωση EDTA 0.05%. Η οξειδωμένη LDL (oxLDL) ή η οξειδωμένη μορφή της HDL παρουσία και απουσία των PMPs είτε κατεργάζονται αμέσως ή διατηρούνται στους 4°C.

Ηλεκτροφόρηση λιποπρωτεϊνών σε πήκτωμα αγαρόζης

Αντιδραστήρια-Όργανα

- Συσκευή ηλεκτροφόρησης Sebia -K20
- Τροφοδοτικό
- Εμπορική συσκευασία Kit ηλεκτροφόρησης Hydrigel Lipo + Lp(a) (Sebia) που περιλαμβάνει:
 1. 10 πλάκες με πήκτωμα αγαρόζης, έτοιμες για χρήση
 2. Φιαλίδια συμπυκνωμένου ρυθμιστικού διαλύματος Tris-βαρβιτουρικού
 3. Φιαλίδια συμπυκνωμένης χρωστικής 3% Sudan black
 4. Διάλυμα χρώσης



5. Ειδική μεμβράνη με θέσεις τοποθέτησης των δειγμάτων
 6. Διηθητικά χαρτιά
- Διάλυμα αιθανόλης (45%) σε dH₂O (v/v)

Διαλύματα Εργασίας

- *Φιαλίδια συμπυκνωμένου ρυθμιστικού διαλύματος Tris-βαρβιτουρικού.* Το περιεχόμενο κάθε φιαλιδίου αραιώνεται στα 1,000 mL με dH₂O.
- *Διάλυμα χρώσης.* Η παρασκευή του διαλύματος χρώσης γίνεται ως εξής: Σε κωνική φιάλη αναμιγνύονται 160 mL απόλυτης αιθανόλης με 2 mL 3% Sudan black. Υπό συνεχή ισχυρή ανάδευση ακολουθεί προσθήκη 140 mL dH₂O.

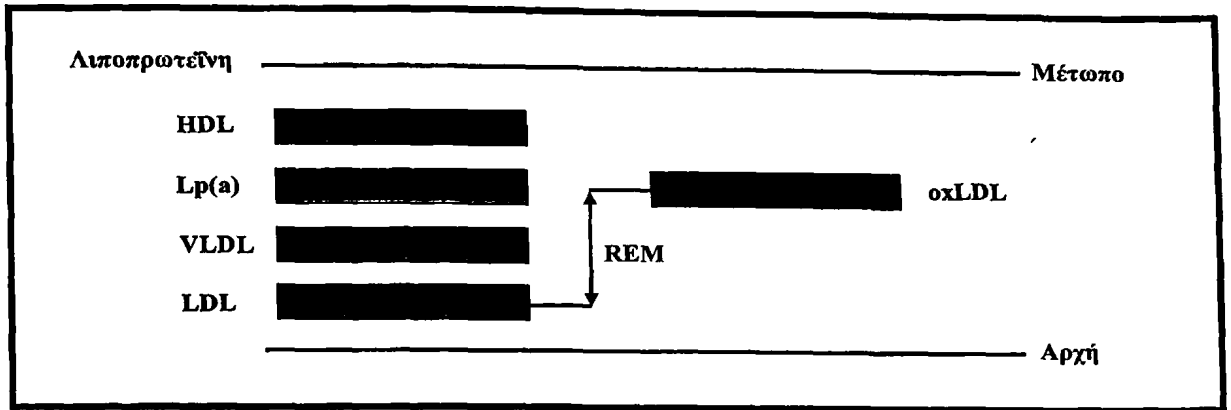
Αρχή της μεθόδου

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

Δείγμα *

Χρησιμοποιείται ορός ή πλάσμα με EDTA καθώς και απομονωμένες λιποπρωτεΐνες Lp(a), HDL, για το έλεγχο της καθαροτητάς τους, αλλά και για την οξειδωτική τροποποίηση των λιποπρωτεϊνών. Η συντήρηση των δειγμάτων γίνεται στους 4⁰C το πολύ για 3 μέρες. Η ηλεκτροφόρηση ενός νορμολιπιδαιμικού ατόμου με Lp(a) θα είναι ως εξής (σε αυτό το πήκτωμα φαίνονται όλες οι λιποπρωτεΐνης αλλά και η oxLDL)





Εκτέλεση της ηλεκτροφόρησης

Η πλάκα με το πήκτωμα αγαρόζης τοποθετείται σε επιφάνεια καθαρισμένη εκ των προτέρων με αιθανόλη (45%). Το πήκτωμα έχει χαραγμένα δύο βέλη τα οποία καθορίζουν την θέση τοποθέτησης της μεμβράνης των δειγμάτων. Η υγρασία που υπάρχει στην επιφάνεια του πηκτώματος απορροφάται γρήγορα με την εφαρμογή διηθητικού χαρτιού στην θέση που ορίζεται από τα βέλη. Στην συνέχεια εφαρμόζεται η μεμβράνη τοποθέτησης των δειγμάτων πάνω στο πήκτωμα της αγαρόζης ώστε τα βέλη της μεμβράνης να συμπίπτουν με τα βέλη της επιφάνειας της πηκτής. Κατά την εφαρμογή της μεμβράνης στην αγαρόζη πρέπει να αποφεύγεται η δημιουργία φυσαλίδων αέρα γιατί παρεμποδίζουν την μετανάστευση των δειγμάτων. Έπειτα προστίθενται τα δείγματα στις κατάλληλες θέσεις με αυτόματη πιπέτα χωρίς να τραυματιστεί η αγαρόζη. Ο όγκος των δειγμάτων για ορό ή πλάσμα είναι 2 μL ενώ για άλλο υλικό δεν πρέπει να ξεπερνά τα 10 μL . Χρησιμοποίηση μεγάλων ποσοτήτων δείγματος έχει ως αποτέλεσμα την εμφάνιση ουρών που καθιστούν δύσκολη την ταυτοποίηση των λιποπρωτεϊνών. Τα δείγματα αφήνονται για 7 min ώστε να προσροφηθούν πλήρως στην αγαρόζη. Στη συνέχεια αφαιρείται η ειδική μεμβράνη και το πήκτωμα είναι έτοιμο για την ηλεκτροφόρηση. Σε κάθε διαμέρισμα της συσκευής ηλεκτροφόρησης προστίθενται 150 mL ρυθμιστικού διαλύματος Tris-βαρβιτουρικού και το πήκτωμα 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 (50 V), ενώ η ένταση του ρεύματος ανέρχεται σε 3 mA για κάθε δείγμα.

Χρώση των λιποπρωτεϊνών

Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης το πήκτωμα στεγνώνεται σε ρεύμα θερμού αέρα ($\leq 80^{\circ}\text{C}$). Η πλάκα υπο μορφή πλέον ζελατίνης τοποθετείται στο ειδικό δοχείο χρώσης που περιέχει το διάλυμα της χρωστικής, όπου αφήνεται για 15 min. Η περίσσεια της χρωστικής ξεπλένεται με νερό βρύσης. Στη συνέχεια η ζελατίνη τοποθετείται σε λεκάνη που περιέχει αιθανόλη (45%) για 5 min. Η περίσσεια της αιθανόλης στεγνώνεται σε ρεύμα θερμού αέρα.

Έλεγχος της καθαρότητας των απομονωμένων λιποπρωτεϊνών

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

Έλεγχος της οξειδωτικής τροποποίησης των λιποπρωτεϊνών (LDL)

Η μετανάστευση της LDL και της oxLDL μελετήθηκε με πήκτωμα αγαρόζης και προσδιορίστηκε η σχετική ηλεκτοφορητική κινητικότητα (REM), παρουσία ή απουσία των PMPs.



Μελέτη της πρόσδεσης (binding) του επισημασμένου με FITC LDL στα PMPs με χρήση κυτταρομετρίας ροής

Αντιδραστήρια -Όργανα

- CD61-PerCP (Becton Dickinson)
- Απομονωμένη LDL
- FITC, isomer on celite 10% (Calbiochem)
- Σωληνάκια πολυστυρενίου των 5 mL (12×75 mm, Becton Dickinson)
- Cell Quest πρόγραμμα (Becton Dickinson)
- Μικροφυγόκεντρος erpendorf
- Κυτταρόμετρο ροής FACScalibur (Becton Dickinson)

Διαλύματα εργασίας

- *Ρυθμιστικό διάλυμα 10 mM PBS (pH 7.4)*. Όπως περιγράφεται στην σελίδα 84.
- *Διάλυμα 5% Na₂CO₃*. 5 g Na₂CO₃ διαλυτοποιείται σε 100 mL H₂O. Το διάλυμα διατηρείται στους 4°C.

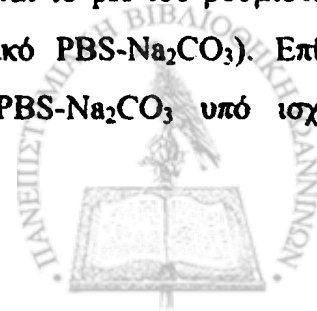
Αρχή της μεθόδου

Η επισήμανση της LDL με τη φθορίζουσα ουσία (FITC) μας δίνει τη δυνατότητα να μελετήσουμε την πρόσδεση της LDL τόσο στα αιμοπετάλια όσο και στα PMPs.

Επισήμανση LDL με FITC

Η επισήμανση της LDL με FITC έγινε σύμφωνα με την μέθοδο που περιγράφουν οι Smythe et al. [497]. Η απομονωμένη LDL (με πρωτεΐνη περίπου 2.3 mg/mL) υποβλήθηκε σε διαπίδυση για 24 h στους 4°C στο σκοτάδι έναντι ρυθμιστικού διαλύματος PBS 10 mM, pH 8.6 (το pH ρυθμίστηκε με 5% Na₂CO₃), με δυο αλλαγές.

Η επισήμανση της LDL γίνεται ως εξής: αρχικά ρυθμίζεται το pH του ρυθμιστικού διαλύματος PBS με διάλυμα 5% Na₂CO₃ στο 8.6 (Ρυθμιστικό PBS-Na₂CO₃). Επίσης προστίθεται ορισμένη ποσότητα celite-FITC στο διάλυμα PBS-Na₂CO₃ υπό ισχυρή



ανάδευση. Η συγκέντρωση του celite-FITC δεν πρέπει να ξεπερνά τα 2mg/mL. Σε erpendorf που περιέχει LDL (τελική συγκέντρωση 1.4 mg/mL) προσθέτουμε στάγδην, τέτοια ποσότητα celite-FITC ώστε η τελική συγκέντρωση του να είναι 0.2 mg/mL. Τα erpendorf επωάζονται σε θερμοκρασία δωματίου για 60 min υπό περιοδική ανάδευση στο σκοτάδι. Ακολουθεί μια φυγοκέντρηση στα 10,000×g (σε μικροφυγόκεντρο erpendorf) για 5min, και στη συνέχεια το υπερκείμενο υποβάλλεται σε διαπίδυση. Η διαπίδυση γίνεται έναντι 2 L PBS 10 mM, pH 8,6 με δυο αλλαγές για 24 h στους 4°C στο σκοτάδι. Μετά από την διαπίδυση γίνεται μια φυγοκέντρηση στα 10,000×g (σε μικροφυγόκεντρο erpendorf) για 1 min και φυλάσσεται στους 4°C. Η LDL-FITC χρησιμοποιείται μέσα σε δυο ημέρες μετά από την επισήμανση.

Πειραματική διαδικασία

Τα PMPs (100 µg πρωτεΐνης/mL) επωάζονται με LDL-FITC σε διαφορές συγκεντρώσεις (50-400 µg πρωτεΐνης/mL) σε erpendorf για 1 h στους 37°C. Μεταφέρονται 50 µL σε σωληνάκια της Becton Dickinson, που περιέχει 5 µL του anti-CD61 και επωάζονται για 15 min σε θερμοκρασία δωματίου. Στην συνέχεια ακολουθεί αραίωση 1:10 με PBS 10 mM, pH 7.4 και ανάλυση στο κυτταρόμετρο. Ως θετικό control χρησιμοποιήθηκαν τα πλυμένα αιμοπετάλια, ενώ η πρόσδεση μελετήθηκε με τον ίδιο τρόπο που περιγράφεται παραπάνω. Ως αρνητικό δείγμα έλεγχου χρησιμοποιήθηκε το IgG του οποίου η πρόσδεση ήταν αμελητέα.

Προσδιορισμός ενεργότητας της PAF-AH

Αντιδραστήρια- Όργανα

- Μετρητής υγρού σπινθηρισμού, Packard (TriCarb 2100 TR)
- Μικροφυγόκεντρος για erpendorf
- Υδατόλουτρο 37°C
- Φιαλίδια σπινθηρισμού των 4 mL
- PAF (1-O-δεκαεξάκυκλο-2-ακετυλο-sn-γλυκερο-3-φωσφοχολίνη, M.B. 523.7 g/mol, Sigma)



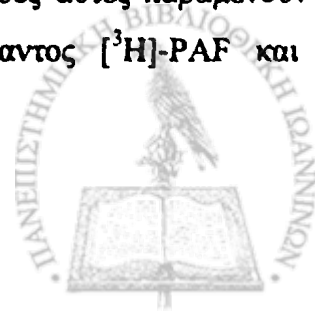
- Πρότυπο διάλυμα [^3H]-PAF (1-O-δεκαεξέκυλο-2-[[^3H ακετυλο]-sn-γλυκερο-3-φωσφοχολίνη, 0.25 mCi/0.5 mL, 10 Ci/mmol, DuPont New England Nuclear Boston MA)
- Υγρό σπινθηρισμού, Scintillation liquid Optiphase Hisafe 3
- Τριχλωροξεϊκό οξύ (TCA, Merck)
- Αλβουμίνη βοδινού ορού ελεύθερη λιπαρών οξέων (FFA BSA, Sigma)
- HEPES ($\text{C}_{18}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_4\text{S}$, M.B. 238.31 g/mol, Sigma)

Διαλύματα εργασίας

- *Διάλυμα 20 mM PAF.* Όπως περιγράφεται στην σελίδα 90.
- *Διάλυμα 20% TCA.* 20 g TCA διαλυτοποιούνται σε 100 mL H_2O . Το διάλυμα διατηρείται στους 4°C .
- *Διάλυμα 2.5 mg/mL BSA.* Όπως περιγράφεται στην σελίδα 90.
- *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 L dH_2O . 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 N_2 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 .

Αρχή της μεθόδου

Η ενεργότητα της PAF-AH προσδιορίζεται με την μέθοδο ιζηματοποίησης με τριχλωροξεϊκό οξύ (TCA). Η μέτρηση της ενεργότητας της PAF-AH πραγματοποιείται έμμεσα με την μέτρηση των ραδιοσημασμένων οξικών ομάδων που ελευθερώνονται κατά την υδρόλυση του υποστρώματος [^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 [498].

Πειραματική διαδικασία

Προετοιμασία δειγμάτων

Ως πηγή του ενζύμου χρησιμοποιούνται:

1. 8 µg πρωτεΐνης LDL, 8 µg πρωτεΐνης HDL, 8 µg πρωτεΐνης PMPs και 8 µg πρωτεΐνης oxPMPs τα οποία αναμιγνύονται με ρυθμιστικό διάλυμα HEPES pH 7.4 μέχρι τελικού όγκου 90 µL ή
2. 85 µL εναιωρήματος αιμοπεταλίων (ενεργοποιημένα η μη) ή και το κυτταρικό λύμα των αιμοπεταλίων στα όποια προστίθενται 5 µL 10% EDTA ή
3. 85 µL υπερκείμενου ή λυμμένων κυττάρων, στα οποία προσθέτονται 5 µL 10% EDTA.

Παράλληλα ετοιμάζεται και δείγμα ελέγχου (τυφλό) όπου περιέχει 90 µL HEPES pH 7.4. Τα εppendorf 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 με την LDL και για 1 h ακριβώς για τα δείγματα με την HDL, τα PMPs και κυττάρων. Μόλις συμπληρωθεί ο απαραίτητος χρόνος επώασης, η ενζυμική αντίδραση σταματά με την προσθήκη 20 µL διαλύματος 100 mg/mL BSA. Στη συνέχεια τα εppendorf αναδεύονται ισχυρά σε Vortex και τοποθετούνται σε θερμοκρασία 4°C (παγόλουτρο) για 15 min τουλάχιστον. Έπειτα προστίθενται 80 µL διαλύματος 20% TCA, τα εppendorf αναδεύονται ισχυρά σε Vortex και τοποθετούνται σε θερμοκρασία 4°C για άλλα 30 min τουλάχιστον. Ακολουθεί φυγοκέντρηση, σε μικροφυγόκεντρο εppendorf, σε 10,000 rpm (7,200xg) 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 (counts/min, cpm).



Υπολογισμός ειδικής ενεργότητας (E.E.)

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:

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

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 την μέτρηση υπήρχε συνολικά όγκος 200 μL , ο οποίος δίνει 2 x cpm_{δ} κρούσεις από τις οποίες αφαιρούνται οι κρούσεις που οφείλονται στο δείγμα ελέγχου (τυφλό) 2 x cpm_{τ} . Άρα, οι καθαρές κρούσεις που οφείλονται στο δείγμα είναι 2 x ($cpm_{\delta} - cpm_{\tau}$). Έτσι η ενεργότητα της PAF-AH υπολογίζεται από τον παρακάτω τύπο:

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

οπου 1000, είναι ο συντελεστής για την μετατροπή των μg πρωτεΐνης σε mg , ή των μL ελαιωρήματος σε mL

α , είναι τα μg πρωτεΐνης ή τα μL ελαιωρήματος

β , είναι ο χρόνος επώασης του δείγματος σε min



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

Απενεργοποίηση της PAF-AH στον ορό εμβρύου μόσχου (FCS)

Αντιδραστήρια-Όργανα

- Ορός εμβρύου μόσχου (FCS, Gibco-BRL)
- Pefabloc (4-(2-aminoethyl) benzenesulfonyl fluoride, M.B. 279 g/mol, Merck)
- Μembrάνη διαπίδυσης (Sigma). Η μεμβράνη ενεργοποιείται σε PBS για 3h και κατακρατά οποιονδήποτε συστατικό έχει μοριακό βάρος μεγαλύτερο από 12kDa
- Φίλτρα διήθησης 0.20 μ (Corning)

Διαλύματα εργασίας

- *Ρυθμιστικό διάλυμα PBS 10 mM, pH 7.4.* Όπως περιγράφεται στην σελίδα 84.
- *Διάλυμα 100 mM Pefabloc.* 0.0187 g Pefabloc διαλύονται σε 670.25 μL dH₂O. Το διάλυμα διατηρείται στους 4°C.

Πειραματική διαδικασία

Η απενεργοποίηση της PAF-AH του FCS επιτυγχάνεται με την προσθήκη διαλύματος 100 mM Pefabloc, 10 μL/mL, δίνοντας τελική συγκέντρωση 1 mM Pefabloc. Το μίγμα επωάζεται στους 37°C για 1 h. Μετά το τέλος της απενεργοποίησης της ενδογενούς PAF-AH, το FCS υποβάλλεται σε εκτενή διαπίδυση για την απομάκρυνση της περίσσειας του Pefabloc. Το FCS μεταφέρεται σε μεμβράνη διαπίδυσης και τοποθετείται σε ποτήρι που περιέχει 200πλάσιο όγκο, σε σχέση με τον όγκο της, 10 mM PBS, 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 το FCS συλλέγεται προσεκτικά με σύριγγα και διηθείται από φίλτρο 0.20 μ υπό στείρες συνθήκες.



Απομόνωση μονοκυττάρων με FICOLL

Αντιδραστήρια-Όργανα

- Αποστειρωμένο ρυθμιστικό διάλυμα 10X PBS (GIBCO BRL)
- Αποστειρωμένο διάλυμα FICOLL (BIOCHROM)
- Θρεπτικό υλικό RPMI 1640 με L- γλουταμίνη (GIBCO BRL)
- Αποστειρωμένο dH₂O (Fresenius Kabi)
- Giemsa (Ferak Berlin)
- Titriplex III (Merck)
- Αντιβιοτικό Garamycin, (Gentamicin sulfate, Schering-Plough).
- Αποστειρωμένα σωληνάκια με αντιπηκτικό EDTA (Becton Dickinson)
- Αποστειρωμένοι κωνικοί βαθμονομημένοι σωλήνες των 15 mL και 50 mL (Corning)
- Πλακίδια καλλιέργειας κυττάρων 24 θέσεων (18×10 mm, Primaria Falcon)
- Αποστειρωμένα σιφώνια των 5, 10, 25 mL
- Θάλαμος νηματικής ροής (Class II, Type A/B3, NUAIRE)
- Κλίβανος επώασης με ατμόσφαιρα 5% σε CO₂ (NUAIRE)
- Ανάστροφο μικροσκόπιο (A.Krüss Optrometics)
- Κλίβανος υγρής αποστείρωσης
- Ορός εμβρύου μόσχου, θερμικά απενεργοποιημένος (FCS, Gibco-BRL)
- CCR2-PE (R&D Systems)
- CD14-FITC (Pharmingen, Becton Dickinson)
- Φυγόκεντρος πάγκου (HermLe, Z 320)
- PAF (1-O-δεκαεξάκυλο-2-ακετυλο-sn-γλυκερο-3-φωσφοχολίνη, M.B. 523.7 g/mol, Sigma)

Διαλύματα εργασίας

- **Ρυθμιστικό διάλυμα PBS.** Προκύπτει με αραιώση 1/10 (v/v), έτοιμου αποστειρωμένου 10X PBS, με αποστειρωμένο dH₂O. Η αραιώση γίνεται υπό στείρες συνθήκες. Το διάλυμα φυλάσσεται σε θερμοκρασία δωματίου.
- **Αποστειρωμένο διάλυμα 100X EDTA.** 2 g EDTA διαλύονται σε 80 mL dH₂O. Ρυθμίζεται το pH στο 7.4 και ο όγκος συμπληρώνεται μέχρι τα 100 mL. Το διάλυμα αποστειρώνεται στον κλίβανο υγρής αποστείρωσης και φυλάσσεται σε θερμοκρασία δωματίου.
- **Ρυθμιστικό διάλυμα PBS-10% EDTA.** 100 mL 10X PBS και 10 mL 100X EDTA αναμιγνύονται με αποστειρωμένο dH₂O, μέχρι τελικού όγκου 1000 mL. Η ανάμειξη γίνεται υπό στείρες συνθήκες. Το διάλυμα φυλάσσεται σε θερμοκρασία δωματίου.

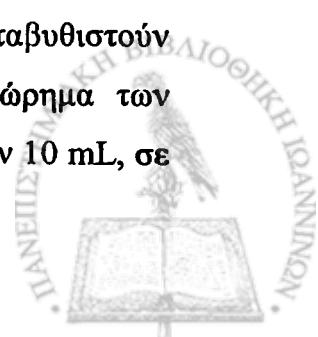


- *Αντιβιοτικό Garamycin*. Όπως περιγράφεται στην σελίδα 99.
- *Θρεπτικό υλικό RPMI εργασίας*. Σε 500 mL RPMI με L- γλουταμίνη προστίθενται 250 μ L garamycin. Η ανάμιξη γίνεται υπό στείρες συνθήκες. Το θρεπτικό υλικό RPMI εργασίας φυλάσσεται στους 4°C.
- *RPMI εργασίας- 10% FCS*. Σε 45 mL RPMI εργασίας προστίθεται 5 mL FCS. Το διάλυμα παρασκευάζεται λίγο πριν τη χρήση του.
- *Διάλυμα Giemsa*. 10 μ L Giemsa αναμιγνύονται με 490 μ L αποστειρωμένου διαλύματος 10 mM PBS. Το διάλυμα παρασκευάζεται λίγο πριν τη χρήση του.
- *Διάλυμα-λύσης των κυττάρων*. 10 μ L Triton X-100 και 1 mL 10% EDTA αναμιγνύονται με 9 mL dH₂O. Το διάλυμα φυλάσσεται στους 4°C.
- *Ρυθμιστικό διάλυμα PBS 10 mM, pH 7.4*. Όπως περιγράφεται στην σελίδα 84.
- *Διάλυμα 2.5 mg/mL BSA*. Όπως περιγράφεται στην σελίδα 90.
- *Διάλυμα 40 μ M και 20 μ M PAF*. 100 μ L από τον PAF (40 μ M και 20 μ M σε αιθανόλη) εξατμίζονται σε ρεύμα N₂. Στην συνέχεια αναδιασπείρεται ο PAF σε 100 μ L 2.5 mg/mL BSA δίνοντας μια συγκέντρωση όμοια με την αρχική. Τα δείγματα αυτά τοποθετούνται σε υδατόλουτρο με θερμοκρασία 37°C για 30 min. Ακολουθεί ισχυρό vortex και το διάλυμα φυλάσσεται στους -4°C.

Πειραματική διαδικασία

Απομόνωση μονοκυττάρων

Χρησιμοποιείται φρέσκο αίμα το οποίο συλλέγεται σε αποστειρωμένα σωληνάκια των 8 mL που περιέχουν αντιπηκτικό EDTA. Συνολικά για κάθε παρασκευή μονοκυττάρων χρησιμοποιούνται 6-8 σωληνάκια αίμα. Όλη η διαδικασία απομόνωσης μονοκυττάρων γίνεται υπό στείρες συνθήκες, στο χώρο ιστοκαλλιέργειών, στο θάλαμο νηματοειδούς ροής. Ο χώρος καθαρίζεται με αιθανόλη (70%) πριν από τη χρήση του. Το αίμα συλλέγεται σε αποστειρωμένα σωληνάκια που περιέχουν αντιπηκτικό. Ακολουθεί φυγοκέντρηση αυτού στις 1500xg για 20 min, σε θερμοκρασία δωματίου, σε φυγόκεντρο πάγκου για να καταβυθιστούν τα κύτταρα του αίματος. Μετά την απομάκρυνση του πλάσματος το εναιώρημα των κυττάρων του αίματος προστίθεται, με τη βοήθεια αποστειρωμένου σιφωνιού των 10 mL, σε



κωνικό βαθμονομημένο αποστειρωμένο σωλήνα των 50 mL όπου αναμιγνύεται με το ρυθμιστικό διάλυμα PBS-EDTA μέχρι τελικού όγκου 25 mL. Τα 25 mL επιστοιβάζονται στη συνέχεια με μεγάλη προσοχή σε 19 mL Ficoll που βρίσκονται σε κωνικό σωλήνα των 50 mL. Η επιστοιβασία γίνεται με πλαστικό αποστειρωμένο σιφώνι των 25 mL. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στα 1,000xg για 25 min σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά το πέρας της φυγοκέντρησης στον πυθμένα του σωλήνα βρίσκονται τα ερυθροκύτταρα και τα πολυμορφοπύρηνα λευκοκύτταρα. Πάνω από αυτά βρίσκονται επιστοιβασμένα τα αιμοπετάλια και περίπου στη μέση του σωλήνα υπάρχει ο δακτύλιος των μονοκυττάρων μαζί με τα λεμφοκύτταρα. Πάνω από αυτή υπάρχει διαυγές διάλυμα PBS το οποίο αφαιρείται με πιπέτα Pasteur υπό κενό. Στη συνέχεια συλλέγεται κατά το δυνατό ποσοτικά και χωρίς πολλές προσμίξεις με ερυθροκύτταρα η στιβάδα των μονοκυττάρων και λεμφοκυττάρων, η οποία μεταφέρεται σε νέο κωνικό σωλήνα. Ο όγκος συμπληρώνεται στα 50 mL με διάλυμα PBS-EDTA και ακολουθεί φυγοκέντρηση στα 340xg για 10 min σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά την έκλυση απομακρύνεται το υπερκείμενο με άντληση υπό κενό και τα κύτταρα αναδιασπείρονται στα 50 mL με το ρυθμιστικό διάλυμα PBS-EDTA με τη βοήθεια πλαστικού αποστειρωμένου σιφωνιού. Ακολουθεί νέα φυγοκέντρηση στα 290xg για 10 min σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά την έκλυση απομακρύνεται το υπερκείμενο με άντληση υπό κενό και γίνεται αναδιασπορά των κυττάρων σε ρυθμιστικό διάλυμα PBS-EDTA μέχρι τα 50 mL και ακολουθεί νέα φυγοκέντρηση στα 160xg για 10 min σε θερμοκρασία δωματίου. Με τη μέθοδο αυτή των διαδοχικών φυγοκεντρήσεων απομακρύνονται κατά το δυνατόν ποσοτικά τα διάφορα σε μεγέθη λεμφοκύτταρα, τα αιμοπετάλια που έχουν απομείνει μετά τη φυγοκέντρηση παρουσία Ficoll καθώς και τα μεμβρανικά υπολείμματα κατεστραμμένων κυττάρων. Σε όλες τις εκκλύσεις η παρουσία του EDTA είναι απαραίτητη για την αποφυγή της ενεργοποίησης και συγκόλλησης των κυττάρων, τόσο μεταξύ τους όσο και στον πλαστικό σωλήνα. Στη συνέχεια απομακρύνεται το υπερκείμενο με άντληση υπό κενό και γίνεται αναδιασπορά των κυττάρων σε ρυθμιστικό διάλυμα PBS χωρίς EDTA. Συμπληρώνεται ο όγκος του σωλήνα στα 50 mL και ακολουθεί νέα φυγοκέντρηση στα 160xg για 10 min σε θερμοκρασία δωματίου. Τα κύτταρα αναδιασπείρονται σε 3 mL θρεπτικού υλικού RPMI εργασίας μετά την απομάκρυνση του PBS με άντληση υπό κενό. Ακολουθεί η μέτρηση των κυττάρων.



Μέτρηση κυττάρων

10 μL από το εναιώρημα των κυττάρων τοποθετούνται σε σωληνάκι erpendorf που περιέχει 90 μL Giemsa αραιωμένη 1/50 (v/v) με 10 mM PBS και αναδεύονται. 10 μL από το εναιώρημα που προκύπτει τοποθετείται και στις δύο πλευρές του αιματοκυττομέτρου Newbauer. Μετρούνται τα μεγάλα μόνο κύτταρα που είναι στην πλειονότητα τους μονοκύτταρα τα οποία βρίσκονται στα εννέα τετράγωνα της μιας πλευράς του αιματοκυττομέτρου Newbauer. Ο αριθμός των κυττάρων στο εναιώρημα RPMI υπολογίζεται ως εξής:

$$\text{αριθμός κυττάρων/ mL εναιωρήματος} = \frac{\text{Συνολικός αριθμός κυττάρων}}{9} \times 10^5$$

Καλλιέργεια μονοκυττάρων

Σε κάθε θέση του πλακιδίου καλλιέργειας των 24 θέσεων, τοποθετείται 1 mL κυττάρων συγκέντρωσης 2×10^6 κύτταρα/mL. Τα κύτταρα αφήνονται να κολλήσουν στον πυθμένα για 60 min στους 37°C σε κλίβανο επώασης με ατμόσφαιρα 5% σε CO_2 . Στη συνέχεια το υπερκείμενο απομακρύνεται με αναρρόφηση υπό κενό με τη χρήση αποστειρωμένης πιπέτας Pasteur. Ακολουθούν δύο εκπλύσεις των κυττάρων με PBS 10mM, pH 7.4 για την απομάκρυνση των κυττάρων που δεν έχουν κολλήσει στον πυθμένα και στη συνέχεια τα μονοκύτταρα καλλιεργούνται για 3 ημέρες παρουσία 1 mL RPMI με 10% FCS. Λαμβάνεται δείγμα 200 μL για τον προσδιορισμό της ενεργότητας PAF-AH τις χρονικές στιγμές 0, 24 και 48 h. Μετά το πέρας των 3 ημερών συλλέγεται το υπερκείμενο της καλλιέργειας των κυττάρων όπου φυγοκεντρείται στα 10,000 rpm για 2 min για την απομάκρυνση κυττάρων ή κυτταρικών υπολειμμάτων. Τα κύτταρα εκπλύνονται με ρυθμιστικό διάλυμα PBS. Στη συνέχεια προστίθενται σε αυτά 0.2 mL διαλύματος λύσης των κυττάρων και αφήνονται για 10 min στους 37°C στον κλίβανο επώασης. Τα εναιωρήματα των κυττάρων που λαμβάνονται μετά την προσθήκη του διαλύματος λύσης φυγοκεντρούνται στα 10,000 rpm για 2 min για την απομάκρυνση κυττάρων και κυτταρικών υπολειμμάτων



(κυτταρικές μεμβράνες και ίνες). Τα υπερκείμενα της καλλιέργειας των κυττάρων καθώς και τα εναιωρήματα των κυττάρων που λαμβάνονται μετά την προσθήκη του διαλύματος λύσης φυλάσσονται στους 4°C, για χρονικό διάστημα 48 h, για τη μέτρηση της ενεργότητας PAF-AH και της πρωτεΐνης με τη μέθοδο Lowry και στη συνέχεια καταψύχονται στους -80°C.

Στην περίπτωση που θέλουμε να επιδράσουμε στα PMPs με τα μονοκύτταρα για να δούμε την έκφραση του CCR2, τα μονοκύτταρα (2×10^6 κύτταρα/mL) επωάζονται με τα PMPs (30 µg πρωτεΐνης/mL) ή με το PAF (100 nM) για 1 h σε κλίβανο επώασης με ατμόσφαιρα 5% σε CO₂ σε πλαστικά βιδωτά σωληνάκια των 15 mL. Κατά την διάρκεια παραμονής στο κλίβανο τα καπάκια ξεβιδώνονται ώστε τα κύτταρα να μπορούν να «αναπνέουν». Μετά από την 1 h επώαση τα κύτταρα μεταφέρονται με παγόλουτρο και φυγοκεντρούνται για 5 min στους 2,000 rpm (HermLe, Z 320). Το υπερκείμενο απομακρύνεται με απλή απόχυση και αναδιασπείρονται τα κύτταρα σε μικρό όγκο PBS, 10mM (500 µL), pH 7.4 και ακολουθεί φυγοκέντρηση στους 2,000 rpm (HermLe, Z 320) για 5 min. Στην συνέχεια, το υπερκείμενο απομακρύνεται με απλή απόχυση και αναδιασπείρονται τα κύτταρα σε 100 µL PBS, 10mM, pH 7.4. Προετοιμάζουμε ειδικά σωληνάκια της Becton Dickinson με 5 µL από τα κατάλληλα αντισώματα (anti-CD14, anti-CCR2). Στην συνέχεια προσθέτουμε 5 µL από τα μονοκύτταρα και PMPs ή PAF και συμπληρώνουμε με ρυθμιστικό διάλυμα PBS, 10 mM μέχρι τα 50 µL, επωάζουμε στο σκοτάδι για 20 min. Μετά ακολουθεί αραιώση αυτών 1:10 με ρυθμιστικό διάλυμα PBS, 10 mM, pH 7.4, και ανάλυση των δειγμάτων με κυτταρομετρίας ροής. Η απορρόφηση του δείγματος γίνεται με χαμηλή ροή (12 µL ± 3 µL/min) χωρίς καμία άλλη επεξεργασία στο δείγμα και μετά ακολουθεί ανάλυση από τον υπολογιστή.

Ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE 5-19%

Αντιδραστήρια-Όργανα

- Κάθετη συσκευή ηλεκτροφόρησης (Mini Protean II, Bio-Rad)
- Συσκευή βαθμίδωσης πυκνοτήτων
- Περισταλτική αντλία (Gilson, Minipuls 3)
- Τροφοδοτικό
- Διάλυμα εμπορίου N,N-τετραμεθυλοαιθυλενοδιαμίνη (TEMED)
- Διάλυμα ανασυνδυασμένης PAF-ακετυλοϋδρολάσης (4 mg/dL, Cayman)
- Διθειοθρεϊτόλη (Sigma)



Διαλύματα εργασίας

- **Διάλυμα Α.** 29.2% Ακρυλαμίδιο, 0.8% δις ακρυλαμίδιο. 58.4 g ακρυλαμιδίου και 1.6 g δις ακρυλαμιδίου διαλύονται σε dH₂O μέχρι τελικού όγκου 200 mL. Το διάλυμα διατηρείται σε σκοτεινόχρωμο δοχείο στους 4⁰C για ένα μήνα.
- **Διάλυμα Β.** Ρυθμιστικό διάλυμα διαδρομής (running) pH 8.8. 36.34 g Tris base και 0.8 g SDS διαλύονται σε 100 mL dH₂O. Ρυθμίζεται το pH στο 8.8 και συμπληρώνεται ο όγκος στα 200 mL. Το διάλυμα είναι σταθερό για ένα μήνα σε θερμοκρασία δωματίου.
- **Διάλυμα Γ.** Ρυθμιστικό διάλυμα επιστοίβασης, (stacking), pH 6.8. 6.6 g Tris base διαλύονται σε 50 mL dH₂O, ρυθμίζεται το pH στο 6.8 και συμπληρώνεται ο όγκος στα 100 mL με dH₂O. Το διάλυμα είναι σταθερό για ένα μήνα σε θερμοκρασία δωματίου.
- **Διάλυμα Δ.** Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης. 72.5 g γλυκίνης 7.5 g SDS και 15 g Tris base διαλύονται σε 5 L dH₂O. Το pH επιβεβαιώνεται ότι είναι 8.2 χωρίς όμως να ρυθμίζεται. Το διάλυμα παρασκευάζεται λίγο πριν τη χρήση του.
- **Διάλυμα Ε (Διάλυμα δειγμάτων).** 6.61 g SDS και 0.32 g Tris base διαλύονται σε 120 mL dH₂O. Το pH ρυθμίζεται στο 6.8 και ο όγκος συμπληρώνεται στα 200 mL με dH₂O. Το διάλυμα είναι σταθερό για ένα μήνα σε θερμοκρασία δωματίου.
- **Διάλυμα 1 M DTT (διθειοθρεϊτόλη).** 0.3086 g DTT διαλύονται σε 2 mL dH₂O. Διατηρείται στους -20⁰C σε δείγματα των 20 μL.
- **Διάλυμα κατεργασίας δειγμάτων.** Σε 2 mL διαλύματος δειγμάτων προστίθενται 20 μL από το διάλυμα 1 M DTT, έτσι ώστε η τελική συγκέντρωση της DTT στο διάλυμα να είναι 10 mM. Το διάλυμα παρασκευάζεται λίγο πριν τη χρήση του.
- **Διάλυμα 10% υπερθειικού αμμωνίου (Ammonium Persulfate, APS).** 0.1 g υπερθειικού αμμωνίου διαλύεται σε 1 mL dH₂O. Το διάλυμα παρασκευάζεται λίγο πριν τη χρήση του.
- Πρότυπα μοριακά βάρη



Μυοσίνη	210 kDa
β-γαλακτοζαμίνη	127 kDa
Φωσφορυλάση D	116 kDa
Αλβουμίνη βοδιού	84 kDa
Αλβουμίνη αυγού	49 kDa
Καρβονική ανυδράση	49.5 kDa
Αναστολέας της τρυψίνης	35.3 kDa
Λυσοζύμη	20.5 kDa
Αποπροτονίνη	7 kDa

- *Διάλυμα φόρτωσης:* το διάλυμα περιέχει 50% γλυκόζη σε dH₂O και μία μικρή ποσότητα μπλέ βρωμοφαινόλης.
- *Διάλυμα 10% SDS.* 10 g SDS διαλύονται σε 100 mL dH₂O. Το διάλυμα διατηρείται σε θερμοκρασία δωματίου.

Αρχή της μεθόδου

Η ηλεκτροφόρηση βαθμίδωσης πυκνοτήτων πολυακρυλαμιδίου, (PAGE), κάτω από συνθήκες αποδιάταξης (SDS), συνδυάζει την ηλεκτροφόρηση με βάση το μοριακό βάρος με την υψηλή διαχωριστική ικανότητα. Η παρουσία του ιοντικού απορρυπαντικού SDS έχει σαν αποτέλεσμα την πλήρη αποδιάταξη των πρωτεϊνών και των υπομονάδων τους ώστε να προκύψουν πολύ ανιονικές αλυσίδες πεπτιδίων λόγω της συμπλοκοποίησης με SDS. Το SDS που ενώνεται με τις πρωτεΐνες δίνει ένα σταθερό λόγο ανιονικού φορτίου προς μάζα για όλες τις πρωτεΐνες και τις αλυσίδες τους οι οποίες μεταναστεύουν προς την άνοδο με βάση το μοριακό τους βάρος. Η συγκέντρωση του PAGE δρα ως μοριακό κόσκινο και είναι τέτοια ώστε τα μόρια να εισέρχονται πρώτα σε μια περιοχή χαμηλής συγκέντρωσης PAGE και μεγάλων πόρων και στη συνέχεια καθώς προχωρούν στην πηκτή η συγκέντρωση του PAGE αυξάνει και μειώνεται το μέγεθος των πόρων. Τα μόρια ανάλογα με το μέγεθός τους παγιδεύονται όταν φτάνουν σε περιοχές πηκτής όπου το μέγεθος των πόρων είναι τέτοιο ώστε δεν μπορούν να εισέλθουν [499].



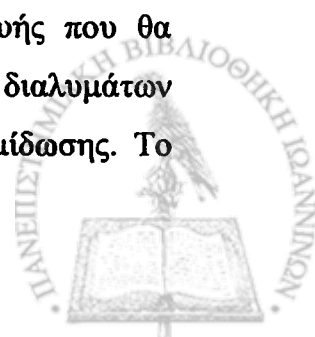
Πειραματική διαδικασία**Προετοιμασία του πηκτώματος διαδρομής (running gel)****Προετοιμασία συσκευής**

Χρησιμοποιούνται γυάλινες πλάκες διαστάσεων 7×10 cm οι οποίες καθαρίζονται προσεκτικά με dH₂O και στη συνέχεια με απόλυτη αιθανόλη. Οι πλάκες τοποθετούνται η μια πάνω στην άλλη και στις 2 πλάγιες άκρες τους τοποθετούνται διαχωριστές πάχους 1.5 mm. Στη βάση στήριξης των πλακών της κάθετης συσκευής ηλεκτροφόρησης τοποθετούνται ελάσματα καουτσούκ που εξασφαλίζουν στεγανότητα. Οι γυάλινες πλάκες τοποθετούνται στη βάση στήριξης και σταθεροποιούνται με σφιγκτήρες. Με τη χρήση αλφαδιού εξασφαλίζεται η ευθύγραμμη τοποθέτησή τους.

Προετοιμασία διαλυμάτων πηκτώματος 5% και 19%**Πυκνότητα**

	5%	19%
Διάλυμα Α	0.63 mL	2.38 mL
Διάλυμα Β	0.93 mL	0.94 mL
H ₂ O	2.19 mL	0.43 mL
APS	16 μL	16 μL
TEMED	2 μL	2 μL

Το APS και το TEMED προστίθενται λίγο πριν την επιστοίβαση των πυκνοτήτων, αφού και τα δύο δρουν καταλυτικά στον πολυμερισμό του πολυακρυλαμιδίου. Μόλις παρασκευαστούν τα διαλύματα τοποθετούνται στα διαμερίσματα της συσκευής που θα δημιουργηθεί η βαθμίδωση πυκνοτήτων. Στο διαμέρισμα ανάμειξης των διαλυμάτων τοποθετείται το διάλυμα 19% που είναι και η τελευταία πυκνότητα της βαθμίδωσης. Το



διάλυμα 5% διατηρείται στο άλλο διαμέρισμα, από όπου σε μικρές ποσότητες διοχετεύεται αυτόματα στο διαμέρισμα ανάμειξης, ώστε να δημιουργηθούν όλες οι πυκνότητες της βαθμίδωσης. Αρχικά τα δύο διαμερίσματα δεν επικοινωνούν μεταξύ τους και αυτό διασφαλίζεται με την προσθήκη ίχνους χρωστικής, βρωμοφαινόλης μπλέ, στο διάλυμα 19%. Αν δεν υπάρχει στεγανότητα η χρωστική βάφει και το διάλυμα 5%. Η συσκευή που δημιουργεί τη βαθμίδωση πυκνοτήτων συνδέεται με περισταλτική αντλία η οποία μεταφέρει και επιστοιβάσει τα διαλύματα στο χώρο σχηματισμού της πηκτής. Κατά την επιστοίβαση πρέπει να αποφεύγεται η δημιουργία φυσαλίδων αέρα οι οποίες καθιστούν ασυνεχή την πηκτή και παρεμποδίζουν τον πολυμερισμό. Μόλις ολοκληρωθεί η επιστοίβαση των διαλυμάτων, η επιφάνεια της πηκτής καλύπτεται με νερό, το οποίο τοποθετείται προσεκτικά ώστε να μη διαταραχθεί η επιφάνεια του πολυακρυλαμιδίου. Έτσι η πηκτή δεν έρχεται σε επαφή με τον αέρα και ο πολυμερισμός γίνεται πιο γρήγορα. Ο πολυμερισμός ολοκληρώνεται σε μια περίπου ώρα και το νερό αφαιρείται ποσοτικά με διηθητικό χαρτί. Στον χρόνο αυτό γίνεται η προετοιμασία του 3% διαλύματος επιστοίβασης των δειγμάτων (stacking gel).

3% stacking gel	
Διάλυμα Α	0.75 mL
Διάλυμα Γ	1.87 mL
H ₂ O	4.87 mL
Ακολουθεί απαέρωση	
10% SDS	75 μL
10%APS	50 μL
TEMED	7.5 μL

Το προκύπτον διάλυμα αναδεύεται και επιστοιβάζεται με τη χρήση σύριγγας πάνω από την πηκτή 5-19%. Μεταξύ των γυάλινων πλακών έχει ήδη τοποθετηθεί χτένι πάχους 1.5 mm ώστε μόλις πήξει το stacking gel να έχουν δημιουργηθεί οι θέσεις στις οποίες θα τοποθετηθούν τα δείγματα. Ο πολυμερισμός του stacking gel ολοκληρώνεται σε διάστημα 30-60 min. Σε αυτό το χρονικό διάστημα ετοιμάζονται τα δείγματα.



Προετοιμασία δειγμάτων

Ποσότητα δείγματος που περιέχει 10 μg πρωτεΐνης τοποθετείται σε κωνικό σωλήνα erpendorf και λυοφιλοποιείται μέχρι ξηρού. Σε κάθε δείγμα προστίθενται 20 μL από το διάλυμα κατεργασίας των δειγμάτων, και ακολουθεί βρασμός για 5 λεπτά, αφού τρυπηθούν τα καπάκια των erpendorf. Στη συνέχεια προστίθενται 20 μL από το διάλυμα φόρτωσης. Τα δείγματα αναδεύονται και είναι έτοιμα για ηλεκτροφόρηση. Το ίδιο γίνεται και με την ανασυνδυασμένη PAF-AH, χωρίς όμως να λυοφιλοποιείται πιο πριν, από την οποία χρησιμοποιείται τόση ποσότητα όση υπολογίζεται για να είναι ανιχνεύσιμη η ενεργότητα (2 μL από το διάλυμα ανασυνδιασμένης PAF-AH). Τα πρότυπα μοριακών βαρών, από τα οποία χρησιμοποιούνται 10 μL , δεν υποβάλλονται σε καμία κατεργασία.

Τοποθέτηση δειγμάτων

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

Συνθήκες ηλεκτροφόρησης

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



Χρώση του πηκτώματος

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

Μεταφορά και ανοσοαποτύπωση πρωτεϊνών

Αντιδραστήρια-Όργανα

- Κάθετη συσκευή ηλεκτροφόρησης για μεταφορά πρωτεϊνών και κασέτα (Mini Protean II, Bio-Rad)
- Τροφοδοτικό
- Υπερφίλμ ECL (Enhanced Chemiluminescence Detection film, Amersham)
- Διηθητικό χαρτί Whatman 3MM
- Μembrάνη μεταφοράς πρωτεϊνών Polyscreen PVDF (Polyvinylidene difluoride Du Pont)
- Πρωτογενές πολυκλωνικό αντίσωμα κουνελιού για την PAF-AH της LDL (Cayman): Χρησιμοποιείται σε αραιώση 1:1000 (v/v)
- Δευτερογενές αντίσωμα sheep anti-rabbit IgG HRP-conjugated (Serotec): Χρησιμοποιείται σε αραιώση 1:3000 (v/v)
- Διάλυμα εμφάνισης του υπερφίλμ (Kodak)

Διαλύματα Εργασίας

- **Ρυθμιστικό διάλυμα μεταφοράς 10X.** Tris-Base 30.3 g/L, γλυκίνη 144 g/L, SDS 5 g/L.
- **Ρυθμιστικό διάλυμα μεταφοράς 1X.** Αναμιγνύονται 100 mL του 10X με 200 mL μεθανόλης. Ο όγκος συμπληρώνεται στα 1000 mL με dH₂O.
- **Ρυθμιστικό διάλυμα TBS (Tris-Base φυσιολογικός ορός).** Το διάλυμα περιέχει 20 mM Tris-base, 100 mM NaCl. Το pH ρυθμίζεται στο 7.5.
- **Ρυθμιστικό διάλυμα TBS-BSA 5%.** Το διάλυμα περιέχει 20 mM Tris-base, 100 mM και 5% BSA. Το pH ρυθμίζεται στο 7.5.



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

Πειραματική διαδικασία

Προετοιμασία της μεμβράνης

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

Μεταφορά πρωτεϊνών

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

Ανοσοαποτύπωση

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



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

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

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

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

Η μεμβράνη περιβάλλεται με διαφανή λεπτή μεμβράνη και μεταφέρεται μέσα σε κασέτα σε σκοτεινό θάλαμο για ανάπτυξη της χημειοφωταύγειας. Μέσα στην κασέτα και πάνω στην μεμβράνη τοποθετείται το υπερφίλμ, χωρίς να έχει αγγίξει πουθενά πριν και γίνεται επώαση για 5 min. Το φιλμ τοποθετείται αρχικά στο υγρό εμφάνισης έως ότου εμφανιστούν οι ζώνες, στην συνέχεια στο υγρό σταθεροποίησης για 5 min και τέλος εκπλένεται με dH_2O .

Ανοσοκαταβύθιση PAF-AH των αιμοπεταλίων

Αντιδραστήρια-Όργανα

- Μικροφυγόκεντρος erpendorf
- Κάθετος κυκλοαναδευτήρας
- Sepharose-πρωτεΐνη A
- Πολυκλωνικό αντίσωμα κουνελιού κατά της ανασυνδυασμένης PAF-AH του πλάσματος (Cayman)



Διαλύματα Εργασίας

- *Διάλυμα εκπλύσεων φωσφορικών.* Διαλύονται 0.41 g $\text{Na}_3\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 0.255 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 3 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ και 0.3725 g Titriplex III σε 500 mL dH_2O . Το pH ρυθμίζεται στο 6.85 με την προσθήκη διαλύματος 10 N NaOH. Διατηρείται στους 4°C.

Αρχή της μεθόδου

Η μέθοδος στηρίζεται στην δέσμευση της PAF-AH των αιμοπεταλίων ανθρώπου από το αντίσωμα κατά της PAF-AH του πλάσματος το οποίο είναι ακινητοποιημένο στην Sepharose-πρωτεΐνη A.

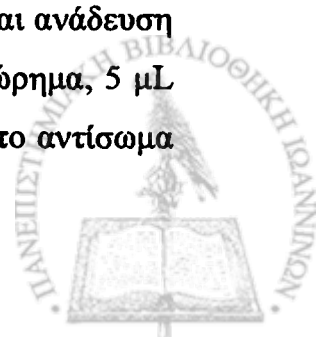
Πειραματική διαδικασία

Προετοιμασία της Sepharose-πρωτεΐνης A

Σε ένα erpendorf τοποθετείται λίγο από το υλικό της Sepharose-πρωτεΐνης A και προστίθεται 1 mL διαλύματος φωσφορικών. Αφήνεται στους 4°C για όλη την διάρκεια της νύχτας για να διογκωθεί. Στην συνέχεια, αφαιρείται προσεκτικά το υπερκείμενο μετά από φυγοκέντρηση στα 12,000xg για 1 min και το διογκωμένο υλικό εκπλένεται δύο φορές με 1 mL διαλύματος φωσφορικών. Η τελική αναδιασπορά του διογκωμένου υλικού γίνεται σε 0.5 mL διαλύματος φωσφορικών. Η Sepharose-πρωτεΐνη A διατηρείται στους 4°C.

Στάδια επώασης

Από τον πυθμένα του erpendorf, που περιέχει το εναιώρημα της Sepharose-πρωτεΐνης A, λαμβάνονται προσεκτικά 5 μL χρησιμοποιώντας πλαστικό tip με κομμένο ρύγχος και μεταφέρονται σε erpendorf που περιέχει 400 μL διαλύματος φωσφορικών. Γίνεται ανάδευση για 15 min σε κάθετο κυκλοαναδευτήρα. Στην συνέχεια προσθέτονται στο εναιώρημα, 5 μL του αντισώματος και ακολουθεί ανάδευση για 3 h στους 4°C, για να δεσμευτεί το αντίσωμα



στην Sepharose-πρωτεΐνη A. Από το erpendorf απομακρύνεται προσεκτικά το υπερκείμενο, μετά από φυγοκέντρηση στα 12,000×g για 1 min. Ακολουθούν δύο εκπλύσεις, με 1 mL από το διάλυμα των φωσφορικών, για να απομακρυνθεί ποσοτικά το αντίσωμα που δεν δεσμεύτηκε στην Sepharose-πρωτεΐνη A. Κατόπιν προσθέτονται 150 µL PAF-AH των αιμοπεταλίων σε διάλυμα φωσφορικών. Ο όγκος συμπληρώνεται στα 500 µL με διάλυμα φωσφορικών και ακολουθεί ανάδευση στο κυκλοαναδευτήρα για 12 h στους 4°C.

Μετά από φυγοκέντρηση στα 12,000×g για 3 min, το υπερκείμενο και το ίζημα διατηρούνται στους 4°C. Η ίδια πειραματική διαδικασία πραγματοποιείται συγχρόνως σε δύο erpendorf. Στο ένα η επώαση του ενζύμου γίνεται παρουσία αντισώματος (+Ab) ενώ το άλλο απουσία του (-Ab).

Στα ιζήματα και τα υπερκείμενα παρουσία και απουσία Ab προσδιορίστηκε η ενεργότητα PAF-AH και έγινε ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE 5-19%.

Απομόνωση αγγελιοφόρου RNA (mRNA) από ανθρώπινα αιμοπετάλια

Αντιδραστήρια-Όργανα

- Φυγόκεντρος πάγκου
- Μικροφυγόκεντρος ψυχόμενη (Erpendorf)
- Φασματοφωτόμετρο UV
- Θάλαμος νηματικής ροής
- Διάλυμα εκχύλισης του mRNA (Bioprobes)
- Χλωροφόρμιο (CHCl₃, Merck)
- Ισοπροπανόλη (C₃H₇OH, Merck)
- Αιθανόλη (C₂H₅OH, Merck)
- Tips αποστειρωμένα και ελεύθερα από RNAσες
- Erpendorfs αποστειρωμένα και ελεύθερα από RNAσες

Διαλύματα εργασίας

- **Διάλυμα ACD.** Όπως περιγράφεται στην σελίδα 80.
- **Διάλυμα χρωστικής Giemsa 1:50 (ν/ν).** Όπως περιγράφεται στην σελίδα 115.



- *Χλωροφόρμιο και Ισοπροπανόλη (από μπουκάλια που δεν έχουν ανοιχτεί).* Μεταφέρεται ποσότητα σε αποστειρωμένες φιάλες των 100 mL και διατηρούνται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.
- *80% αιθανόλη (v/v).* Από φιάλη με απόλυτη αιθανόλη, που δεν έχει ανοιχτεί, μεταφέρονται 80 mL σε αποστειρωμένη φιάλη των 100 mL και προσθέτονται 20 mL αποστειρωμένου dH₂O. Διατηρείται στους -20°C.

Πειραματική διαδικασία

Ολόκληρη η διαδικασία πραγματοποιείται υπό στείρες συνθήκες σε θάλαμο νηματικής ροής, φορώντας γάντια τα οποία είναι επίσης αποστειρωμένα, γιατί το mRNA είναι πολύ λίγο (1-2% του συνολικού RNA) και διασπάται ταχύτητα από τις RNAσες που υπάρχουν στο νερό, στα χέρια μας κτλ. Οι πάγκοι είναι καθαρισμένοι με αποστειρωμένο dH₂O και αιθανόλη (70%).

Συλλέγονται 40-50 mL αίμα (αναλογία 1:9 v/v με ACD) σε αποστειρωμένα κωνικά σωληνάρια των 15 mL. Φυγοκεντρούνται στα 100×g για 15 min στους 15°C, χωρίς φρένο. Το PRP, το οποίο περιέχει επίσης λίγα λευκοκύτταρα και ερυθροκύτταρα του αίματος, μεταφέρεται υπό στείρες συνθήκες, σε αποστειρωμένα κωνικά σωληνάρια των 15 mL. Φυγοκεντρείται, για να καθιζάνουν τα άλλα κύτταρα του αίματος, έκτος των αιμοπεταλίων, στα 1,500×g για 30 ακριβώς sec στους 15°C, με φρένο. Μετά την φυγοκέντρηση γίνεται η μέτρηση των αιμοπεταλίων στο PRP καθώς και των άλλων κυττάρων που πιθανώς να υπάρχουν. Η μέτρηση γίνεται σε 10 μL PRP, αραιωμένο 1:20 (v/v) με το διάλυμα χρωστικής Giemsa. Το διάλυμα αυτό βάφει τα αιμοπετάλια κόκκινα.

Στην συνέχεια το PRP φυγοκεντρείται στα 1,500×g για 15 min στους 15°C, με φρένο. Το υπερκείμενο απομακρύνεται ποσοτικά και το ίζημα (αιμοπετάλια) τοποθετείται αμέσως στους 4°C. Προσθέτονται 200 μL RNAlplus ανά 5×10⁸ αιμοπετάλια και γίνεται πολύ ισχυρή ανάδευση, έως ότου οι φαινόλες που περιέχει το αντιδραστήριο να διαρρήξουν τις μεμβράνες των κυττάρων. Κατόπιν τοποθετούνται στους 4°C για 5 min. Προσθέτονται 200 μL χλωροφόρμιο και αναδεύεται για 20 sec. Αφήνεται στους 4°C για 15 min ώστε να διαχωριστεί το RNA από το DNA και τις πρωτεΐνες. Το εναίωρημα μεταφέρεται σε eppendorf των 2 mL και φυγοκεντρείται στις 14,000 rpm για 15 min στους 4°C. Η χλωροφορμική φάση (πάνω



φάση) μεταφέρεται σε άλλο erpendorf και προστίθεται ισοπροπανόλη σε αναλογία 1:1 (v/v). Το μίγμα αφήνεται στους -20°C για όλο το βράδυ, για να καθιζάνει το RNA.

Φορώντας πάντα γάντια, το μίγμα φυγοκεντρείται στην μικροφυγόκεντρο στις $14,000\times\text{g}$ για 60 min στους -9°C . Το υπερκείμενο απορρίπτεται και στο ίζημα προστίθεται 1 mL αιθανόλης (80%), για έκπλυση από τα άλατα. Το ίζημα δεν αναδιασπείρεται. Φυγοκεντρείται σε θερμοκρασία δωματίου στις 14,000 rpm για 20 min, από την ίδια γωνία που φυγοκεντρήθηκε και πριν έτσι ώστε το ίζημα να μην ξεκολλήσει.

Η αιθανόλη αποχύνεται και το erpendorf τοποθετείται ανοιχτό κάτω και κοντά σε μια λάμπα για 1 h, για να στεγνώσει το ίζημα. Προσθέτονται κατόπιν 50 μL αποστειρωμένο dH_2O και γίνεται ισχυρή ανάδευση. Το εναιώρημα RNA διατηρείται στους -80°C [500].

Μέτρηση του RNA

Γίνεται αραιώση 1 μL του παραπάνω διαλύματος RNA σε 200 μL αποστειρωμένου dH_2O . Η μέτρηση στο δείγμα αυτό καθώς και στο τυφλό (dH_2O) πραγματοποιείται στα 260 nm και στα 280 nm σε φασματοφωτόμετρο UV. Υπολογίζεται η καθαρή απορρόφηση ($A_{\text{δείγματος}} - A_{\text{τυφλού}}$) για κάθε μήκος κύματος και προσδιορίζεται ο λόγος A_{260}/A_{280} . Όσο πιο κοντά στο 2 βρίσκεται ο λόγος, τόσο πιο καθαρό RNA έχει απομονωθεί. Τέλος υπολογίζεται η συγκέντρωση του RNA σε $\mu\text{g}/\text{mL}$ με βάση τον τύπο:

$$C=40\times A_{280}\times d$$

όπου C: η συγκέντρωση του mRNA σε $\mu\text{g}/\text{mL}$

A_{260} : η απορρόφηση του δείγματος στα 260 nm και

d: η αραιώση του δείγματος ίση με 125

Τα συνολικά μg RNA υπολογίζονται με βάση τον τύπο:

$$\mu\text{g RNA} = C(\mu\text{g}/\text{mL})\times 0.100$$



Κατεργασία του mRNA με DNAση

Αντιδραστήρια-Όργανα

- Υδατόλουτρο 37°C
- Μικροφυγόκεντροs erpendorf
- DNAση (DNase, RNase free, Promega, 1000 U/mL)
- Θάλαμος νηματικής ροής
- Tris-base.(Merck)

Διαλύματα εργασίας

- **Διάλυμα 5 M NaCl (αποστειρωμένο).** Διαλύονται 58.44 g σε 200 mL αποστειρωμένο dH₂O.
- **Διάλυμα 0.5 M EDTA (pH 8).** Διαλύονται 18.6 g EDTA σε 80 mL αποστειρωμένο dH₂O. Ρυθμίζεται το pH στο 8 και ο όγκος συμπληρώνεται στα 100 mL.
- **Διάλυμα 1 M Tris Base (pH 8).** Διαλύονται 24.23 g Tris Base σε 180 mL αποστειρωμένο dH₂O. Ρυθμίζεται το pH στο 8 και ο όγκος συμπληρώνεται στα 200 mL.
- **Διάλυμα TAE 50X.** Διαλύονται 242 g Tris base, 57.1 g οξικού οξέος και 100 mL 0.5 M EDTA pH 8, σε τελικό όγκο 1 L αποστειρωμένο dH₂O. Φυλάσσεται σε θερμοκρασία δωματίου.
- **CH₃COONa (3 M και pH 5.5).** Αποστειρωμένο.
- **Διάλυμα TE 1X.** Αναμιγνύονται με αναλογία 5/1 (v/v) τα διαλύματα 1 M Tris Base, pH 8 και 0.5 M EDTA, pH 8, σε τελικό όγκο 100 mL (για να έχουν τελικές συγκεντρώσεις στο διάλυμα 10 mM το Tris Base και 1 mM το EDTA, αναλογία 10/1 (v/v)).
- **Μίγμα Φαινόλης: Χλωροφορμίου: Ισοαμυλικής Αλκοόλης 25:24:1 (v/v/v) (Sigma).** Το διάλυμα είναι έτοιμο. Διατηρείται στους 4°C.
- **Μίγμα Χλωροφορμίου: Ισοαμυλικής Αλκοόλης 24:1 (v/v).** Αναμιγνύονται υπό στείρες συνθήκες σε αναλογία 24:1 (v/v). Διατηρείται στους 4°C.
- **80% αιθανόλης (v/v).** Όπως περιγράφεται στην σελίδα 129.



Αρχή της μεθόδου

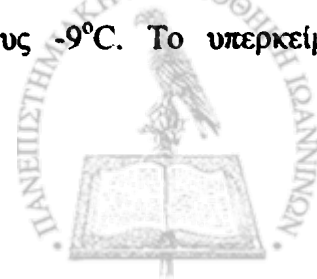
Η προσθήκη DNAσης στο mRNA, καταστρέφει τις διπλές αλυσίδες του χρωμοσωμικού DNA, που ίσως να συνυπάρχουν στο παρασκεύασμα. Η DNAση δεν καταστρέφει μονές αλυσίδες. Το αντιδραστήριο φαινόλης: χλωροφορμίου: ισοαμυλικής αλκοόλης 25:24:1 σταμάτα την δράση της DNAσης, όταν όμως απομακρυνθεί το μίγμα των διαλυτών η δράση της DNAσης επανέρχεται.

Πειραματική διαδικασία

Η διαδικασία απομόνωσης του mRNA επαναλαμβάνεται, με διπλή ποσότητα αιμοπεταλίων, έως το στάδιο της προσθήκης 50 μL αποστειρωμένου dH_2O (λίγο πριν την μέτρηση του RNA). Στο δείγμα προστίθενται επιπλέον 50 μL αποστειρωμένου dH_2O και χωρίζεται σε δύο erpendorf. Το ένα (50 μL) φυλάσσεται για μέτρηση και αντίστροφη μεταγραφή (-20°C) ενώ στο άλλο (υπόλοιπα 50 μL) προστίθενται 2 μL (2U) DNAσης και επωάζεται στους 37°C για 30 min. Προστίθενται ίσος όγκος TE 1X (50 μL) και διπλάσιος όγκος από το αντιδραστήριο φαινόλη: χλωροφόρμιο: ισοαμυλική αλκοόλη 25:24:1 (100 μL). Γίνεται ισχυρή ανάδευση και ακολουθεί φυγοκέντρηση σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 5 min στις 12,000 rpm.

Από την πάνω φάση της φυγοκέντρησης φυλάσσεται περίπου 95 μL . Προστίθενται σε αυτό ίσος όγκος χλωροφόρμιο: ισοαμυλική αλκοόλη 24:1, v/v (100 μL), για να απομακρυνθεί ποσοτικά η φαινόλη. Γίνεται πάλι ισχυρή ανάδευση και φυγοκέντρηση σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 5 min στις 12,000 rpm. Η πάνω φάση μεταφέρεται σε άλλο erpendorf και στην κάτω φάση προστίθενται εκ νέου 100 μL χλωροφόρμιο: ισοαμυλική αλκοόλη 24:1 (v/v). Ακολουθεί ισχυρή ανάδευση και φυγοκέντρηση στις 12,000 rpm για 5 min.

Οι πάνω φάσεις ενώνονται και προστίθενται σε αυτές 100 μL χλωροφόρμιο: ισοαμυλική αλκοόλη 24:1 (v/v). Ακολουθεί ανάδευση και φυγοκέντρηση στις 12,000 rpm για 5 min. Η πάνω φάση περίπου 100 μL υπερκειμένου μεταφέρεται σε άλλο erpendorf και προστίθενται 10 μL CH_3COONa (αναλογία 1/10 (v/v)) και 250 μL απόλυτης αιθανόλης (αναλογία 25/10 (v/v)). Γίνεται ισχυρή ανάδευση και τοποθετείται στους -20°C για 12 h. Στην συνέχεια φυγοκεντρείται στις 14,000 rpm για 60 min στους -9°C . Το υπερκείμενο



απορρίπτεται και το ίζημα προστίθενται σε 1 mL 80% αιθανόλης. Το ίζημα δεν αναδιασπείρεται. Φυγοκεντρείται ξανά σε θερμοκρασία δωματίου στις 14,000 rpm για 20 min, από την ίδια γωνία που φυγοκεντρήθηκε και πριν. Η αιθανόλη αποχύνεται και εξατμίζεται μέχρι ξηρού. Προστίθενται κατόπιν 50 μ L αποστειρωμένο dH₂O και γίνεται ισχυρή ανάδευση.

Τόσο το δείγμα μετά την κατεργασία με την DNAση, όσο και το δείγμα χωρίς την κατεργασία φωτομετρούνται στα 260 nm και στα 280 nm με φασματοφωτόμετρο UV (μέτρηση RNA):

Αντίστροφη μεταγραφή του RNA (RT)

Αντιδραστήρια-Όργανα

- Υδατόλουτρο 37°C
- Thermoblock 70°C
- Μικροφυγόκεντρος
- Απόλυτη αιθανόλη (συντήρηση -20°C)
- Θάλαμος νηματικής ροής

Διαλύματα εργασίας

- 80% αιθανόλη (v/v). Όπως περιγράφεται στην σελίδα 129.
- *RT αντιδραστήρια*. Αντίστροφη μεταγραφή (Superscript RNase H reverse transcriptase, RT), 40 U/mL RNAsine, Oligo-mix, 10 mM dNTP και 0.1 M DTT. Διάλυμα first strand 5X και αποστειρωμένο H₂O_{RT} (διατηρούνται στους -20°C, GIBCO).

Πειραματική διαδικασία

Ολόκληρη η διαδικασία πραγματοποιείται υπό στείρες συνθήκες. Ως υλικό χρησιμοποιήθηκε το mRNA μακροφάγων, το mRNA αιμοπεταλίων και το mRNA αιμοπεταλίων μετά από κατεργασία με DNAση.



Για την αντίστροφη αντιγραφή χρειάζονται 5 μg RNA που αντιστοιχούν σε συγκεκριμένη ποσότητα εναιωρήματος RNA (μL). Η ποσότητα αυτή μεταφέρεται σε αποστειρωμένο eppendorf και προσθέτονται 10 μL από το oligo-mix, 1 μL από την RNAsine (η οποία καταστρέφει τις RNAσες) και ο όγκος συμπληρώνεται στα 30 μL με το $\text{H}_2\text{O}_{\text{RT}}$. Η ανάμιξη γίνεται ήπια με την βοήθεια της αυτόματης πιπέτας. Το μίγμα του RNA, για να μετουσιωθεί, τοποθετείται στους -70°C για 5-10 min. Αμέσως μετά υποβάλλεται σε μια γρήγορη φυγοκέντρηση και αφήνεται να αποκτήσει την θερμοκρασία περιβάλλοντος.

Κατόπιν προσθέτονται 10 μL του διαλύματος 5X, 5 μL του 0.1 M DTT και 3 μL του dNTP. Η RT απομακρύνεται από τους -20°C και πολύ γρήγορα τοποθετείται χωρίς καμία ανάμιξη, στο παγόλουτρο. Προσθέτονται στο μίγμα του RNA 2.5 μL της RT και αναμιγνύεται με ήπια αναδιασπορά. Τοποθετείται στους 37°C για 2 h 30 min. Το τελικό προϊόν της επώασης είναι το cDNA. Η συντήρηση του γίνεται στους -20°C .

Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Αντιδραστήρια-Όργανα

- Θερμοκυκλοποιητής (PCR)

Διαλύματα εργασίας

- *Αντιδραστήρια PCR.* Διάλυμα DyNasyme 10X, 2 U/ μL DyNasyme II (Taq-Πολυμεράση), 10 mM dNTP, $\text{H}_2\text{O}_{\text{PCR}}$ (όλα σε ένα κουτί στους -20°C , GIBCO).
- *Μίγμα 10 mM dNTP.* Αποτελείται από 20 μL dATP, 20 μL dCTP, 20 μL dGTP και 20 μL dTTP σε 120 μL $\text{H}_2\text{O}_{\text{PCR}}$ (GIBCO).
- *Μίγμα-Taq (Taq-mix).* Αποτελείται από 1 μL 10 mM dNTP, 5 μL διαλύματος DyNasyme 10X, 0.5 μL DyNasyme II και 3.5 μL $\text{H}_2\text{O}_{\text{PCR}}$. Οι ποσότητες αυτές χρησιμοποιούνται για ένα δείγμα, για αυτό πολλαπλασιάζεται ανάλογα με τα δείγματα του PCR. Πάντα παρασκευάζεται για περισσότερα δείγματα.



- **Ολιγονουκλεοτίδια Πριμοδότες (Oligo Primers sense/antisense) για PAF-AH.** Οι αρχικές συγκεντρώσεις όλων των πριμοδοτών είναι 10 µg/µL. Χρησιμοποιούνται σε συγκέντρωση 0.2 µg/µL, μετά από αραίωση 1:50 (v/v) σε H₂O_{PCR}.

Η αλληλουχία τους είναι η εξής:

AH1/6R	5' ATACAAGTACTGATGGCTGCTGCAAG 3' sense 5' GGACTGAACCCCTGATTGTAA 3' antisense
AH2/6R	5' TCTTTGGAACACACTGGCTTATGGGC 3' 5' GGACTGAACCCCTGATTGTAA 3'
AH4/6R	5' GACCTGGCATCTCATGG 3' 5' GGACTGAACCCCTGATTGTAA 3'
AH1/7R	5' ATACAAGTACTGATGGCTGCTGCAAG 3' 5' GTGAAGTCAGCAAAATTCTGGTGG 3'
AH4/7R	5' GACCTGGCATCTCATGG 3' 5' GTGAAGTCAGCAAAATTCTGGTGG 3'

Πειραματική διαδικασία

Χρησιμοποιήθηκε το cDNA μακροφάγων, το cDNA αιμοπεταλίων και το cDNA αιμοπεταλίων μετά από κατεργασία του RNA με DNAση.

Χρησιμοποιήθηκαν πριμοδότες που αναγνωρίζουν το mRNA ολόκληρης της περιοχής του ενεργού κέντρου της PAF-AH των μακροφάγων (AH) καθώς και κάποιοι που αναγνωρίζουν στο mRNA, την ύπαρξη της αλληλουχίας του υποδοχέα του PAF, του υποδοχέα εκκαθαριστή, της Ca²⁺-ΑΤΡάσης και της ακτίνης.

Στα ειδικά eppendorf του PCR τοποθετούνται 35 µL H₂O_{PCR}, 10 µL μίγμα-Taq, 2 µL από κάθε πριμοδότη και 3 µL του cDNA. Στην περίπτωση που η ποσότητα των 3 µL είναι περισσότερη από ό,τι χρειάζεται για την ηλεκτροφόρηση (αυτό διαπιστώνεται μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης με αгарόζη), προστίθεται λιγότερη ποσότητα (1 µL) του cDNA και η διαφορά έως 50 µL συμπληρώνεται με 2 µL H₂O_{PCR}. Κατόπιν τοποθετούνται στο PCR και αρχίζει το πρόγραμμα, ανάλογα με τους πριμοδότες που χρησιμοποιήθηκαν (κάποιοι πριμοδότες δρουν βέλτιστα στους 59°C και κάποιοι άλλοι στους 55°C).



Τα προγράμματα αυτά είναι τα εξής:

A) Για τους πριμοδότες της PAF-AH: AH1/6R, AH2/6R, AH4/6R, AH1/7R, AH4/7R καθώς και για της ακτίνης και του υποδοχέα του PAF:

- 5 min στους 95°C (μετουσίωση του cDNA, διαχωρισμός των αλυσίδων) (1)
- 30 sec στους 94°C (μετουσίωση του cDNA, διαχωρισμός των αλυσίδων) (2)
- 45 sec στους 59°C (σύνδεση, βέλτιστη δράση του πριμοδότη) (3)
- 2 min στους 72°C (δράση της Taq πολυμεράσης, δημιουργία συμπληρωματικής αλυσίδας) (4)
- 7 min στους 72°C (5)

Το στάδιο (1) πραγματοποιείται για έναν κύκλο. Τα στάδια (2)-(4) για 35 κύκλους. Μετά η διαδικασία τελειώνει με το στάδιο (5) και το δείγμα, το πολυμερισμένο cDNA, διατηρείται στους 4°C. Με την χρήση του συγκεκριμένου προγράμματος έγινε ο πολυμερισμός στο cDNA που παρασκευάστηκε από το mRNA των αιμοπεταλίων και το mRNA των μακροφάγων (μάρτυρας).

B) Για τους πριμοδότες της Ca²⁺-ATPάσης και τον υποδοχέα του εκκαθαριστή:

- 10 min στους 95°C (μετουσίωση του cDNA, διαχωρισμός των αλυσίδων) (1)
- 1 min στους 95°C (μετουσίωση του cDNA, διαχωρισμός των αλυσίδων) (2)
- 1 min στους 55°C (σύνδεση, βέλτιστη δράση του πριμοδότη) (3)
- 1 min στους 72°C (δράση της Taq πολυμεράσης, δημιουργία συμπληρωματικής αλυσίδας) (4)
- 7 min στους 72°C (5)

Το στάδιο (1) πραγματοποιείται για έναν κύκλο. Τα στάδια (2)-(4) για 30 κύκλους. Μετά η διαδικασία τελειώνει με το στάδιο (5) και το δείγμα, το πολυμερισμένο cDNA, διατηρείται στους 4°C. Με την χρήση του συγκεκριμένου προγράμματος έγινε ο πολυμερισμός στο cDNA που παρασκευάστηκε από το mRNA των αιμοπεταλίων και το mRNA των μακροφάγων (μάρτυρας).



Ηλεκτροφόρηση αγαρόζης 1% για cDNA

Αντιδραστήρια- όργανα

- Οριζόντια συσκευή ηλεκτροφόρησης (Fotodyne Incorporated)
- Τροφοδοτικό (BIO-RAD, Power Pac 200)
- Φούρνος μικροκυμάτων
- Φωτογραφική κάμερα (UV ακτινοβολία)
- Αγαρόζη (GIBCO BRL)
- Βρωμιούχο αιθίδιο, 10 mg/mL (EtBr, Sigma). Το διάλυμα αυτό είναι εξαιρετικά επικίνδυνο γι' αυτό το λόγο η χρήση του γίνεται πολύ προσεκτικά. Φυλάσσεται στους 4°C, πολύ καλά προστατευμένο.
- Πρότυπα ζευγών DNA (100bp, BioRad)

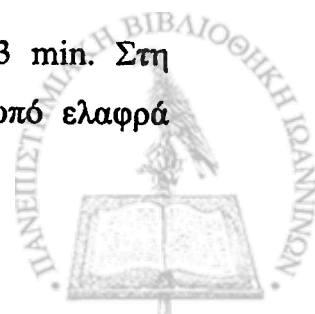
Διαλύματα εργασίας

- **Διάλυμα 0.5 M EDTA (pH 8.0).** 18.6g EDTA διαλύονται σε 80 mL δις-απεσταγμένου H₂O (ddH₂O). Το pH ρυθμίζεται στο 8.0 και ο όγκος συμπληρώνεται στα 100 mL.
- **Διάλυμα TAE 50X.** 242 g Tris Base, 57.1 g οξεικού οξέος και 100 mL 0.5 M EDTA (pH 8.0) διαλύονται σε τελικό όγκο 1 L ddH₂O. Το διάλυμα φυλάσσεται σε θερμοκρασία δωματίου.
- **Διάλυμα TAE 1X.** Σε 980 mL ddH₂O προστίθενται 20 mL διαλύματος TAE 50X. Το διάλυμα φυλάσσεται σε θερμοκρασία δωματίου.
- **Πήκτωμα αγαρόζης 1%.** Σε κωνική φιάλη των 500 mL διαλύονται 2 g αγαρόζης σε 200 mL TAE 1X.
- **Χρωστική DNA.** Σε διάλυμα TAE 1X διαλύονται σε τελική συγκέντρωση 0.1% (v/v) γλυκερόλη και 0.1% (v/v) μπλε βρωμοφαινόλη. Διατηρείται στους 4°C.

Πειραματική διαδικασία

Προετοιμασία πηκτώματος

Το πήκτωμα αγαρόζης τοποθετείται στο φούρνο μικροκυμάτων για 3 min. Στη συνέχεια απομακρύνεται η φιάλη από το φούρνο και το διάλυμα ψύχεται υπό ελαφρά



ανάδευση κάτω από συνεχή ροή κρύου νερού. Πολύ προσεκτικά προστίθενται στο διάλυμα αγαρόζης 10 μL EtBr. Αναδεύεται ελαφρώς και αποχύνεται στη θέση τοποθέτησης του πηκτώματος. Αμέσως τοποθετείται χτένι των 20 θέσεων ή δύο χτένια των 40 θέσεων συνολικά. Πριν αρχίσει να πήζει η αγαρόζη, απομακρύνονται τυχόν φυσαλίδες που δημιουργήθηκαν. Το πήκτωμα αγαρόζης είναι έτοιμο όταν ασπρίσει.

Προετοιμασία δειγμάτων

Η προετοιμασία των δειγμάτων μετά από PCR γίνεται ως εξής: σε eppendorf τοποθετούνται 3 μL χρωστικής και 15 μL cDNA. Η ανάδευση γίνεται με την πιπέτα.

Τοποθέτηση δειγμάτων

Μετά την πήξη το πήκτωμα αγαρόζης τοποθετείται στη θέση εκκίνησης. Προστίθεται διάλυμα TAE 1X ώστε να καλυφθεί όλη η επιφάνειά του, περίπου μισό εκατοστό. Απομακρύνονται τα χτένια πολύ προσεκτικά. Σε κάθε θέση (πηγαδάκι) που έχει σχηματιστεί, τοποθετείται το μίγμα δείγματος/χρωστικής. Σε μια από τις θέσεις τοποθετείται και 15 μL από το πρότυπο των ζευγών DNA.

Η διάρκεια της ηλεκτροφόρησης είναι τουλάχιστον 1 h με σταθερή τάση 100 V. Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης (μετακίνηση της χρωστικής περίπου στη μέση του πηκτώματος), το πήκτωμα φωτογραφίζεται σε σκοτεινό θάλαμο κάτω από ακτινοβολία UV.

Ανίχνευση των PMPs και προσδιορισμός ενεργότητας της PAF-AH στο πλάσμα με μέθοδο ELISA

Αντιδραστήρια –Όργανα

- Μετρητής υγρού σπινθηρισμού, Packard (TriCarb 2100 TR)
- Μικροφυγόκεντρος για eppendorf
- Υδατόλουτρο 37°C
- Φιαλίδια σπινθηρισμού των 4 mL



- PAF (1-O-δεκαεξάκυλο-2-ακετυλο-sn-γλυκερο-3-φωσφοχολίνη, M.B. 523.7 g/mol, Sigma)
- Πρότυπο διάλυμα [³H]-PAF (1-O-δεκαεξέκυλο-2-[³Hακετυλο]-sn-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
- Τριγλωροξεικό οξύ (TCA, Merck)
- Αλβουμίνη βοδινού ορού ελεύθερη λιπαρών οξέων (FFA BSA, Sigma)
- CD61-PerCP (Becton Dickinson)
- CD61 (Becton Dickinson)
- CD41a-FITC (Becton Dickinson)
- CD31-PE (Becton Dickinson)
- CD14-FITC (Becton Dickinson)
- CD45-PE (Becton Dickinson)
- Αννεξίνη-V-FITC (Pharmingen, Becton Dickinson)
- Σωληνάκια πολυστυρενίου των 5 mL (12×75 mm, Becton Dickinson)
- Cell Quest πρόγραμμα (Becton Dickinson)
- Κυτταρόμετρο ροής FACScalibur (Becton Dickinson)
- Μετρητής microELISA (SpectraMAX 190, Molecular Devices)
- Πλακίδια ELISA 96 θέσεων (Corning Costar)
- Tris-Base (C₄H₁₁NO₃, M.B. 121.14 g/mol, Riedel-deHaën)
- NaCl (M.B. 58.44 g/mol, Merck)
- Φυσιολογικός ορός
- Οκτακάναλη πολυπιπέτα μεταβαλλόμενου όγκου 20-200 μL (Costar)

Διαλύματα εργασίας

- *Διάλυμα 20 mM PAF.* Όπως περιγράφεται στην σελίδα 90.
- *Διάλυμα 20% TCA.* Όπως περιγράφεται στην σελίδα 110.
- *Διάλυμα 2.5 mg/mL BSA.* Όπως περιγράφεται στην σελίδα 90.
- *Διάλυμα 100 mg/mL BSA.* Όπως περιγράφεται στην σελίδα 110.
- *Ρυθμιστικό διάλυμα Hepes pH 7.4.* Όπως περιγράφεται στην σελίδα 110.
- *Διάλυμα 1000 μM [³H]-PAF.* Όπως περιγράφεται στην σελίδα 110.
- *Διάλυμα 10% EDTA, pH 7.0.* Όπως περιγράφεται στην σελίδα 85.
- *Διάλυμα PBS 10 Mm, pH 7.4.* Όπως περιγράφεται στην σελίδα 84.
- *Διάλυμα 0.1% EDTA.* Αναμιγνύονται 1 mL του διαλύματος 10% EDTA με 99 mL φυσιολογικού ορού σε τελικό όγκο 100 mL. Το διάλυμα διατηρείται στους 4°C.



- **Διάλυμα 1% EDTA.** Αναμιγνύονται 10 mL του διαλύματος 10% EDTA με 90 mL φυσιολογικού ορού σε τελικό όγκο 100 mL. Το διάλυμα διατηρείται στους 4°C.
- **Διάλυμα 50 mM TBS.** Διαλύονται 0.15 g Tris-Base και 0.225 g NaCl σε 25 mL dH₂O. Το pH ρυθμίζεται στο 7.6 και διατηρείται στους 4°C.
- **Διάλυμα 1% FFA BSA/PBS.** Διαλύεται 1 g FFA BSA σε 100 mL PBS 10 mM, pH 7.4. Το διάλυμα διατηρείται στους 4°C.

Αρχή της μεθόδου

Έγινε η απομόνωση των μικροσωματιδίων από πλάσμα και χαρακτηρισμός της προέλευσής τους και προσδιορισμός της ενεργότητας της PAF-AH συσχετιζόμενης με τα PMPs. Η μέθοδος η οποία περιγράφεται πιο κάτω βασίζεται σε αυτή των Osumi et al. [501] με κάποιες τροποποιήσεις.

Πειραματική διαδικασία

Σε σωληνάκια τα οποία περιέχουν αντιπηκτικό διάλυμα ACD συλλέγονται 8.5 mL περιφερικού φλεβικού αίματος. Το αίμα φυγοκεντρείται στα 150xg για 10 min, σε θερμοκρασία δωματίου παρασκευάζοντας με αυτό το τρόπο πλάσμα πλούσιο σε αιμοπετάλια (PRP). Τα 2/3 από την επάνω επιφάνεια του PRP απομονώνεται πολύ προσεκτικά, για να αποφευχθεί η πρόσληψη ποσότητας ερυθροκυττάρων και λευκοκυττάρων. Στην συνέχεια το PRP αραιώνεται με 0.1% EDTA/φυσιολογικό ορό, σε αναλογία 3:2 (v/v) και ακολουθεί φυγοκέντρηση στα 1,500xg για 20 min. Το υπερκείμενο (πλούσιο σε PMPs) απομακρύνεται και αραιώνεται σε αναλογία 1:1 (v/v) με 1% EDTA και φυλάσσεται για ανάλυση με κυτταρομετρία ροής ή προσδιορισμός PAF-AH.

Η ταυτοποίηση της προέλευσης των μικροσωματιδίων έγινε με κυτταρομετρία ροής. Αρχικά προσδιορίστηκε η έκφραση της αννεξίνης-V στα δείγματα, όπως έχει ήδη περιγραφεί στην μεθοδολογία. Στην συνέχεια χρησιμοποιώντας ειδικά μονοκλωνικά αντισώματα κατά των αιμοπεταλίων (anti-CD41a-FITC), των μονοκυττάρων (anti-CD14-FITC), των αιμοπεταλίων και ενδοθηλιακών κυττάρων (anti-CD31-PE) και των λευκοκυττάρων (CD45-PE), χαρακτηρίστηκαν τα μικροσωματίδια του πλάσματος.



Χρησιμοποιούνται δείγματα PRP τα οποία αμέσως μετά την παρασκευή τους (εντός τριών ωρών από την αιμοληψία) διατηρούνται στους 4°C για τουλάχιστον τρεις ώρες.

1. Η ακινητοποίηση του αντισώματος anti-CD61 (που αναγνωρίζει την β_3 ιντεγκρίνη του υποδοχέα $\alpha_{IIb}\beta_3$) στο πλακίδιο ELISA γίνεται με την προσθήκη αυτού σε συγκέντρωση 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ σε PBS (50 $\mu\text{L}/\text{θέση}$) σε κάθε θέση του πλακιδίου ή 50 μL από το anti-CD45 (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ σε PBS) ή το ισοτυπικό αρνητικό δείγμα ελέγχου IgG (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ σε PBS). Στη συνέχεια ακολουθεί επώαση του πλακιδίου ELISA στους 4°C για 24h.

2. Το πλακίδιο ELISA εκπλύνεται τρεις φορές με το διάλυμα 50 mM TBS με τη βοήθεια χειροκίνητου πλυστικού μηχανήματος και το υγρό έκλυσης αποχύνεται με αναστροφή του πλακιδίου. Η έκπλυση γίνεται ώστε να απομακρυνθεί η περίσσεια του αντισώματος που δεν έχει δεσμευτεί σε κάθε θέση του πλακιδίου ELISA.

3. Σε κάθε θέση του πλακιδίου ELISA προστίθενται 300 μL 1% FFA-BSA σε PBS (pH 7.4) για τη δέσμευση της επιφάνειας κάθε θέσης του πλακιδίου η οποία δεν έχει καταληφθεί από το αντίσωμα. Ακολουθεί επώαση για 2.5 h στους 37°C.

4. Ακολουθούν τρεις εκπλύσεις με PBS 10 mM, pH 7.4, και απόχυση του υπερκειμένου όπως αναφέρεται παραπάνω, ώστε να απομακρυνθεί η περίσσεια του 1% FFA-BSA.

5. Προστίθενται 100 μL από το πλάσμα πλούσιο σε μικροσωματίδια ή PMPs (150 μg πρωτεΐνης/ mL) που απομονώθηκαν από ενεργοποιημένα αιμοπετάλια από ιονοφόρο Ca^{2+} -A23187 όπως περιγράφεται στην παράγραφο Απομόνωση των PMPs σε κάθε θέση που έχει επικαλυφθεί με τα διάφορα αντισώματα. Γίνεται επώαση για 2 h στους 37°C.

6. Ακολουθούν τρεις εκπλύσεις με PBS 10 mM, pH 7.4 και απόχυση του υπερκειμένου με τέτοιο τρόπο ώστε να απομακρυνθεί η περίσσεια ποσότητα δείγματος.

7. Προστίθενται 90 μL του ρυθμιστικού διαλύματος HEPES (το διάλυμα αυτό έχει θερμανθεί στους 37°C) και στην συνέχεια 10 μL από το διάλυμα 1000 μM [^3H -ακέτυλο]PAF (100 μM τελική συγκέντρωση/θέση). Γίνεται επώαση για 1 h στους 37°C.

8. Σταματάμε την αντίδραση με την προσθήκη 20 $\mu\text{L}/\text{θέση}$ ψυχρής FFA-BSA (100 mg/mL). Στην συνέχεια προσθέτουμε το πλακίδιο στους 4°C για 15 min.

9. Μετά από τα 15 min το μίγμα κάθε θέσης απομακρύνεται και τοποθετείται σε ξεχωριστά erpendorfs που περιέχουν 80 μL ψυχρού TCA (20%). Ακολουθεί η υπόλοιπη πειραματική πορεία όπως περιγράφεται στην παράγραφο Προσδιορισμός ενεργότητας της

PAF-AH.



Μικροσκόπιο συνεστιασμού (Confocal Microscope)

Αντιδραστήρια –Όργανα

- Αντισώματα κατά της PAF-AH του πλάσματος και της ενδοκυττάριας τύπου II μορφής της PAF-AH ήταν δωρεά από των Δρ. C. Macphree (SmithKline Beecham)
- Δευτερογενές IgG αντίσωμα (anti-mouse) επισημασμένο με FITC (Dianova Company, Hamburg, Germany)
- Πλακίδια καλλιέργειας κυττάρων 6 θέσεων (35×10 mm, Primaria Falcon)
- CD41a-FITC (Becton Dickinson)
- MOWIOL (Calbiochem)
- DAPCO (1,4-Diazabicyclo[2.2.2] octane, C₆H₁₂N₂, M.B. 112.2 g/mol, Sigma)
- Tris-HCl (C₄H₁₁NO₃ *ClH, M.B. 157.60 g/mol, Merck)
- Γλυκερόλη 87% (Carlo-Erba)
- Leica TCS-SP Μικροσκόπιο συνεστιασμού (Leica Microsystems AG, Wetzlar, Germany)
- Leica TCS λογισμικό
- Ψηφιακή κάμερα Leica TCS NT (Leica Microsystems AG)
- Αποστειρωμένοι κωνικοί βαθμονομημένοι σωλήνες των 50 mL (Corning)

Διαλύματα εργασίας

- **Διάλυμα PBS 10 mM, pH 7.4.** Όπως περιγράφεται στην σελίδα 84.
- **Διάλυμα 1% FFA BSA/PBS.** Όπως περιγράφεται στην σελίδα 140.
- **Διάλυμα 0.2 M Tris-HCl.** Διαλύονται 1.6 g Tris-HCl σε 50 mL dH₂O. Το pH ρυθμίζεται στο 8.5.
- **Διάλυμα MOWIOL.** Ζυγίζονται 2.49 g MOWIOL και τοποθετούνται σε κωνικό βαθμονομημένο σωλήνα των 50 mL στην συνέχεια προσθέτονται 5.5 mL γλυκερόλης (87%) και 6 mL ddH₂O αφήνεται υπό ανάδευση για 2 h σε θερμοκρασία δωματίου. Στην συνέχεια προσθέτονται 12 mL από το διάλυμα 0.2 M Tris-HCl, pH 8.5 και αφήνεται σε υδατόλουτρο με θερμοκρασία 53°C, μέχρι να γίνει διάλυμα το MOWIOL (περίπου 30 min). Ακολουθεί φυγοκέντρηση στους 4,000 rpm για 20 min. Το υπερκείμενο χωρίζεται σε aliquots του 1 mL και φυλάσσεται στους -80°C.
- **MOWIOL+ DAPCO.** Προστίθεται τετοια ποσότητα του DAPCO ώστε στο 1 mL του MOWIOL να έχουμε τελική συγκέντρωση του DAPCO 100 mg/mL.



Αρχή της μεθόδου

Στην μικροσκοπία συνεστιασμού, οι φακοί του μικροσκοπίου εστιάζουν το λέιζερ στο δείγμα σημείο προς σημείο γνωστό και ως εστιακό σημείο (focal point). Το λέιζερ σαρώνει το δείγμα και έτσι συλλέγονται πληροφορίες για αυτό. Οι πληροφορίες αυτές αποτελούνται τόσο από φώς της φθορίζουσας χρωστικής που χρησιμοποιείται όσο και από φώς που αντανακλάται από το ίδιο το δείγμα. Στην συνέχεια το φώς που εκπέμπει το εστιακό σημείο εστιάζεται σε ένα δεύτερο σημείο γνωστό ως σημείο συνεστιασμού (Confocal point). Στο σημείο αυτό υπάρχει ένα μικρό άνοιγμα (pinhole aperture) που επιτρέπει στο φως να περνά προς τον ανιχνευτή. Αντίθετα, πληροφορίες εκτός του εστιακού σημείου δεν καταγράφονται από τον ανιχνευτή.

Πειραματική διαδικασία

Η πειραματική διαδικασία που χρησιμοποιήθηκε προέρχεται από αυτή που προτάθηκε από τον Leng et al. [108] με ορισμένες τροποποιήσεις.

1. Γυάλινες καλυπτρίδες (coverslips) τοποθετούνται σε πλακίδια καλλιέργειας κυττάρων 6 θέσεων και επικαλύπτονται με ιωδογόνο (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) για 2 h σε θερμοκρασία δωματίου.
2. Το πλακίδιο εκπλένεται τρεις φορές με PBS 10 mM, pH 7.4 ώστε να απομακρυνθεί η περίσσεια του ιωδογόνου που δεν έχει δεσμευτεί στο πλακίδιο.
3. Στην συνέχεια προστίθενται 500 μL 1% FFA-BSA σε PBS (10 mM, pH 7.4) ώστε να δεσμευτεί η επιφάνεια που δεν έχει καταληφθεί από το ιωδογόνο. Ακολουθεί επώαση για 1.5 h σε θερμοκρασία δωματίου. Τα πλυμένα αιμοπετάλια παρασκευάστηκαν όπως περιγράφεται στην παράγραφο **Μελέτη της συσσώρευσης των πλυμένων αιμοπεταλίων**. Αιμοπετάλια σε συγκέντρωση $2.0 \times 10^7/\text{mL}$ τοποθετήθηκαν σε κάθε φρεάτιο του πλακιδίου και αφέθηκαν να προσκολληθούν στις καλυπτρίδες για 1.5 h σε θερμοκρασία δωματίου.
4. Τα αιμοπετάλια που δεν έχουν προσκολληθεί απομακρύνθηκαν με τρεις εκπλύσεις με PBS 10 mM, pH 7.4.
5. Η μονιμοποίηση των αιμοπεταλίων έγινε με την προθήκη ψυχρής μεθανόλης (70%) για 7 min, και ακολούθησαν τρεις εκπλύσεις με PBS 10 mM, pH 7.4.



6. Οι μη ειδικές θέσεις ελαχιστοποιήθηκαν με την προσθήκη 500 μL 1% FFA-BSA σε PBS (10 mM, pH 7.4) για 20 min σε θερμοκρασία δωματίου.
7. Ακλούθησαν τρεις εκπλύσεις με PBS 10 mM, pH 7.4.
8. Τα κύτταρα επώαστηκαν για 60 min σε θερμοκρασία δωματίου με τα πρωτογενή αντισώματα με (1:5 (v/v)) αραίωση για τα μονοκλωνικά αντισώματα anti-CD41a-FITC και για το αρνητικό IgG-FITC και 1:50 (v/v) αραίωση για τα αντισώματα κατά της PAF-AH του πλάσματος και της ενδοκυττάριας τύπου II PAF-AH) και στην συνέχεια οι καλυπτρίδες ξεπλύθηκαν τρεις φορές.
9. Ακλουθεί η προσθήκη του δευτερογενούς αντισώματος επισημασμένου με FITC (1:50 αραίωση (v/v)) για 30 min σε θερμοκρασία δωματίου.
10. Μετά το πέρας της επώασης ξεπλένουμε τρεις φορές με PBS 10 mM, pH 7.4.
11. Στην συνέχεια η γυάλινες καλυπτρήδες αντιστρέφονται σε αντικειμενοφόρα πλάκα παρουσία MOWIOL+DAPCO (5 μL) και επώάζεται στους 37°C για 30 min; μετά πραγματοποιείται οπτική παρατήρηση.

Καλλιέργεια ενδοθηλιακών κυττάρων

Αντιδραστήρια –Όργανα

- Πλακίδια καλλιέργειας κυττάρων 24 θέσεων (18x10 mm, Primaria Falcon)
- Αποστειρωμένα σιφώνια των 5, 10, 25 mL
- Θάλαμος νηματικής ροής
- Κλίβανος επώασης με ατμόσφαιρα 5% σε CO₂ (NUAIRE)
- Κλίβανος υγρής αποστείρωσης
- Αποστειρωμένοι καθετήρες τριών δρόμων (3 way stopcock)
- Αποστειρωμένο νυστέρι #11
- Αποστειρωμένα γάντια
- Σύριγγες
- Γυάλινα ποτήρια των 250 και 600 mL
- Αποστειρωμένες Γάζες
- Dulbecco's PBS (Biowhittaker, Walkersville, MD)
- Medium 199 (Biowhittaker, Walkersville, MD)
- Hank's balanced salt solution (HBSS, Biowhittaker, Walkersville, MD)
- L-γλυταμίνη (Biowhittaker, Walkersville, MD)



- Πενικιλίνη/Στρεπτομυκίνη (25,000 U/mL και 25,000 mg/mL, αντίστοιχα; Biowhittaker, Walkersville, MD)
- Τύπου I Κολλαγενάση (5 g/btl, Worthington Biochemical Corp. Freehold, NJ)
- Ορός από έμβρυο βοδιού (FCS, Gibco-BRL)
- Trypsin+EDTA (Gibco-BRL)
- $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ (M.B. 203.31 g/mol, Sigma)
- $CaCl_2$ (M.B. 110.99 g/mol, Merck)
- Ανθρώπινος όρος (Biowhittaker, Walkersville, MD)
- VEGF (Immunotools)
- Ζελατίνη (Sigma)
- PAF (1-Ο-δεκαεξάκυλο-2-ακετυλο-sn-γλυκερο-3-φωσφοχολίνη, M.B. 523.7 g/mol, Sigma)
- Αλβουμίνη βοδινού ορού ελεύθερη λιπαρών οξέων (FFA BSA, Sigma)
- Πλακίδια καλλιέργειας κυττάρων 24 θέσεων (18x10 mm, Primaria Falcon)
- Φίλτρα διήθησης 0.20 μ (Corning)
- Αποστειρωμένοι κωνικοί βαθμονομημένοι σωλήνες των 15 mL και 50 mL (Corning)

Διαλύματα εργασίας

- **Διάλυμα 250 U/mg κολλαγενάσης σε PBS.** Διαλύεται 1 g κολλαγενάσης σε 10 mL PBS που έχει θερμανθεί στους 37°C δίνοντας το stock διάλυμα. Το διάλυμα αποστειρώνεται με φίλτρο διήθησης 0.20 μ κάτω από στείρες συνθήκες. Το διάλυμα εργασίας προέρχεται από αραιώση 1:100 σε PBS του αρχικού stock. Όμως πριν χρησιμοποιηθεί η κολλαγενάση θερμαίνεται στους 37°C για 1 h. Το διάλυμα διατηρείται στους -80°C.
- **Θρεπτικό Medium 199.** Προστίθενται στο εμπορικό διαθέσιμο διάλυμα 20% FCS, θερμικά απενεργοποιημένη (v/v), 1:100 L-γλυταμίνη (200 nM) και 1:250 Πενικιλίνη/Στρεπτομυκίνη (25,000 U/mL και 25,000 mg/mL).
- **Διάλυμα 10 mM HEPES.** 10 mM HEPES, 1 mM $CaCl_2$, 1 mM $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ και 0.5% ανθρώπινο όρο. Το pH ρυθμίζεται στο 7.4.
- **Διάλυμα 2.5 mg/mL BSA.** Όπως περιγράφεται στην σελίδα 90.
- **Διάλυμα 40 μM και 20 μM PAF.** Όπως περιγράφεται στην σελίδα 115.
- **Διάλυμα 0.2% gelatin.** 0.2 g ζελατίνη διαλύονται σε 100 mL PBS. Το διάλυμα αυτό αποστειρώνεται σε κλίβανο υγρής αποστείρωσης.
- **Διάλυμα VEGF (10 μg/mL).** Το εμπορικό αντιδραστήριο περιέχει 2 μg VEGF σε λυοφιλοποιημένη μορφή τα οποία διαλυτοποιούνται σε 0.2 mL 0.2% ζελατίνη



δίνοντας διάλυμα συγκέντρωσης 10 µg/mL. Τα διαλύματα διατηρούνται στους -80°C σε κλάσματα των 10 µL.

Πειραματική διαδικασία

Από τη στιγμή που λαμβάνεται ο ομφάλιος λώρος μπορεί να διατηρηθεί μέσα σε PBS έως και 6 h σε θερμοκρασία δωματίου.

1. Όλη η διαδικασία απομόνωσης των ενδοθηλιακών κυττάρων γίνεται υπό στείρες συνθήκες, στο χώρο ιστοκαλλιέργειών, στο θάλαμο νηματικής ροής. Ο χώρος καθαρίζεται με αιθανόλη (70%) πριν από τη χρήση του. Λαμβάνεται ο λώρος με καθαρά αποστειρωμένα γάντια.
2. Στο λώρο υπάρχουν δυο αρτηρίες και μια μεγαλύτερη φλέβα η οποία πρέπει να εντοπιστεί. Εντοπίζονται στο λώρο τα σημάδια από τους αιμοστάτες; στην περιοχή αυτή κόβονται 1-2 cm από κάθε πλευρά με αποστειρωμένο νυστέρι #11.
3. Ξεπλένεται η φλέβα με το PBS, προσθέτοντας το στόμιο της σύριγγας στην μια άκρη της φλέβας. Η διαδικασία αυτή συνεχίζεται μέχρι το διάλυμα βγει καθαρό από τον λώρο.
4. Εφαρμόζονται και στις δύο πλευρές των καθετήρων τριών δρόμων (3 way stop cocks) και στην συνέχεια με την χρήση χειρουργικού νήματος τα σταθεροποιούμε στο λώρο, δένοντας τους στις άκρες. Με την βοήθεια σύριγγας των 20 mL διοχετεύεται το διάλυμα κολλαγενάσης έως ότου γεμίσει. Κλείνουμε τις στρόφιγγες των καθετήρων τριών δρόμων και βάζουμε το λώρο σε προθερμασμένο στους 37°C PBS για 12 min ακριβώς.
5. Μετά την παρέλευση 12 min ανοίγεται η μια στρόφιγγα και αδειάζουμε το διάλυμα κολλαγενάσης που βρίσκεται μέσα στο λώρο σε αποστειρωμένο κωνικό βαθμονομημένο σωλήνα των 50 mL. Από την άλλη πλευρά του καθετήρα εφαρμόζουμε μια σύριγγα των 20 mL με θρεπτικό Medium 199 έτσι ώστε να ανασταλεί η δράση της κολλαγενάσης. Στη συνέχεια, ξεπλένουμε με PBS για να πάρουμε τυχόν υπολείμματα κυττάρων που έχουν απομείνει στο τοίχωμα της φλέβας.
6. Φυγοκεντρούνται τα κύτταρα στους 1000 rpm για 10 min σε 4°C . Μετά από την φυγοκέντρηση το υπερκείμενο αποχύνεται και το ίζημα επαναιωρείται σε θρεπτικό υλικό (θρεπτικό Medium 199), ο όγκος του θρεπτικού υλικού καθορίζεται από το μήκος του ομφάλιου λώρου, όπως περιγράφεται στον παρακάτω πίνακα:



Μήκος του ομφάλιου λώρου	Όγκος του θρεπτικού υλικού	Φιάσκα
20 cm	5 cc	T-25 (1) ή Πλακίδια καλλιέργειας κυττάρων 24 θέσεων (20 θέσης)
80 cm	10 cc	T-75 (1) ή T-25 (3) ή Πλακίδια καλλιέργειας κυττάρων 24 θέσεων (80 θέσης)

7. Τα κύτταρα επωάζονται σε κλίβανο επώασης με ατμόσφαιρα 5% σε CO₂ και θερμοκρασία 37°C. Αλλάζουμε θρεπτικό υλικό την πρώτη φορά στις 12-24 h και μετά κάθε 48-72 h.

Γίνεται διαίρεση των κυττάρων (split (1:4)) και καλλιεργούνται σε καινούργια πλακίδια καλλιέργειας κυττάρων, για να αποκτήσουμε καινούργια γενιά κυττάρων (ανακαλλιέργειας, P).

Στην περίπτωση που θέλουμε να επιδράσουμε τα PMPs στα ενδοθηλιακά κύτταρα για να δούμε την έκφραση του ICAM-1 και VCAM-1, τα ενδοθηλιακά κύτταρα επωάζονται με τα PMPs (30 µg πρωτεΐνης/mL), το PAF (100 nM), και με VEGF (50 ng/mL) για 1, 5 και 24 h σε κλίβανο επώασης με ατμόσφαιρα 5% σε CO₂ σε πλακίδια καλλιέργειας κυττάρων 24 θέσεων. Μετά από την επώαση με τα κύτταρα, απομακρύνουμε και φυλάμε το υπερκείμενο και προσθέτουμε 200 µL από το εμπορικό διαθέσιμο διάλυμα trypsin+EDTA. Τα κύτταρα τοποθετούνται στο κλίβανο επώασης με ατμόσφαιρα 5% σε CO₂ για 2-3 min και στην συνέχεια απομακρύνονται τα 200 µL και τοποθετούνται σε erpendorf που περιέχει 1.2 mL HEPES 10 mM, pH 7.4 (αραίωση 1:10 της trypsin+EDTA). Τα δείγματα φυγοκεντρούνται σε μικροφυγόκεντρο erpendorf για 2 min στους 2,000 rpm. Το υπερκείμενο απομακρύνεται με απλή απόχυση και αναδιασπείρονται τα κύτταρα σε μικρό όγκο HEPES 10 mM, pH 7.4 (500 µL) και ακλουθεί φυγοκέντρηση στους 2,000 rpm 2 min. Στην συνέχεια, το υπερκείμενο απομακρύνεται με απλή απόχυση και αναδιασπείρονται τα κύτταρα σε 20 µL HEPES 10 mM, pH 7.4. Προετοιμάζουμε ειδικά σωληνάκια της Becton Dickinson με 5 µL από τα κατάλληλα αντισώματα (anti-CD54, anti-CD106). Στην συνέχεια προσθέτουμε 20 µL από τα κύτταρα στα σωληνάκια αυτά και επωάζουμε στο σκοτάδι για 20 min. Μετά ακλουθεί αραίωση αυτών 1:10 με ρυθμιστικό διάλυμα HEPES 10 mM, pH 7.4, και ανάλυση των



δειγμάτων με κυτταρομετρία ροής. Η απορρόφηση του δείγματος γίνεται με χαμηλή ροή (12 $\mu\text{L} \pm 3 \mu\text{L}/\text{min}$) χωρίς καμία άλλη επεξεργασία στο δείγμα και μετά ακολουθεί ανάλυση από τον υπολογιστή.

Προσδιορισμός επιπέδων MCP-1 σε υπερκείμενο κυττάρων με τη μέθοδο ELISA τύπου σάντουιτς

Αντιδραστήρια-Όργανα

Εμπορική συσκευασία kit προσδιορισμού του MCP-1 που περιέχει:

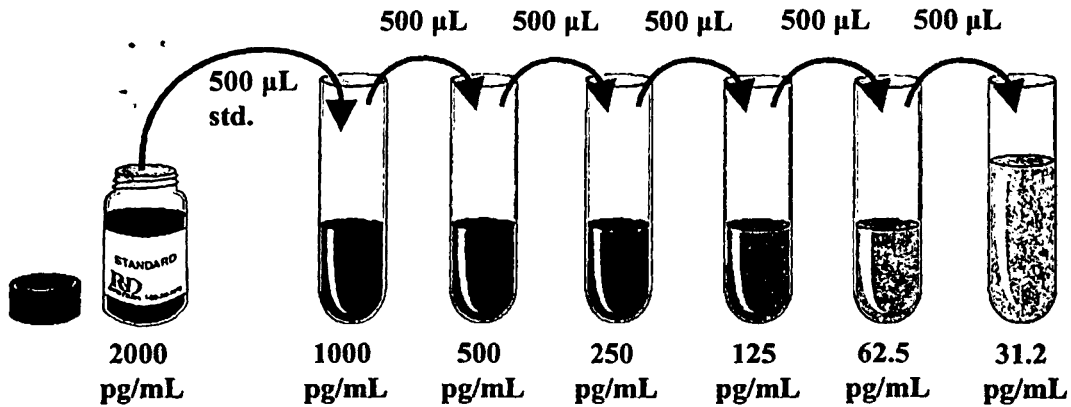
- Πλακίδιο ELISA
- Πρότυπο διάλυμα TNF- α (2000pg/mL)
- Πολυκλωνικό αντίσωμα κατά MCP-1 επισημασμένο με ένζυμο
- Διάλυμα RD1-83
- Διάλυμα RD5L (5X)
- Διάλυμα RD6Q
- Αρχικό διάλυμα αραίωσης προτύπων διαλυμάτων
- Αρχικό διάλυμα έκπλυσης
- Χρωμοφόρο A
- Χρωμοφόρο B
- Διάλυμα τερματισμού της αντίδρασης (2N H_2SO_4)
- MicroELISA φασματοφωτόμετρο (SpectraMax 190, Molecular Devices)
- Οκτακάναλη πολυπιπέτα μεταβαλλόμενου όγκου 20-200 μL (Costar)

Διαλύματα εργασίας

- **Διάλυμα έκπλυσης.** 20 mL του αρχικού διαλύματος έκπλυσης αναμιγνύονται με 480 mL dH_2O .
- **Διάλυμα αραίωσης πρότυπων διαλυμάτων MCP-1 ((RD5L (5X)).** 20 mL διαλύματος του αρχικού διαλύματος αραίωσης πρότυπων διαλυμάτων MCP-1 αναμιγνύονται με 80 mL dH_2O .
- **Υπόστρωμα.** Παρασκευάζεται με ανάμιξη ίσων όγκων χρωμοφόρου A και χρωμοφόρου B.



- **Πρότυπο διάλυμα MCP-1.** Η ανασύσταση του πρότυπου διαλύματος γίνεται σε 1 mL dH₂O.
- **Πρότυπα διαλύματα MCP-1.** Τα πρότυπα διαλύματα MCP-1 παρασκευάζονται ως εξής:



Αρχή της μεθόδου

Το υπερκείμενο των κυττάρων καθώς και τα πρότυπα διαλύματα επωάζονται σε πλακίδια ELISA που περιέχουν ακινητοποιημένο μονοκλωνικό αντίσωμα εξειδικευμένο προς τον MCP-1. Οποιαδήποτε ποσότητα MCP-1 υπάρχει δεσμεύεται στο αντίσωμα. Με διαδοχικές εκπλύσεις το MCP-1 που δεν έχει δεσμευθεί απομακρύνεται και ακολουθεί μια επώαση με πολυκλωνικό έναντι του MCP-1 αντίσωμα. Η περίσσεια του αντισώματος απομακρύνεται και ακολουθεί η προσθήκη κατάλληλου υποστρώματος για την ανάπτυξη χρώματος. Η ένταση του χρώματος που παρατηρείται είναι ανάλογη της ποσότητας της MCP-1 που έχει δεσμευθεί. Η αντίδραση διακόπτεται με την προσθήκη οξέος και μετρείται η απορρόφηση στα 450 nm.

Πειραματική διαδικασία

Όλα τα δείγματα και αντιδραστήρια που χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό αφήνονται να αποκτήσουν θερμοκρασία δωματίου.



1. Σε κάθε θέση του πλακιδίου ELISA προστίθενται 200 μL των προτύπων διαλυμάτων ή υπερκείμενου κυττάρων σε κάθε θέση και ακολουθεί επώαση για 2 h σε θερμοκρασία δωματίου.
2. Ακολουθούν τρεις εκπλύσεις με το αντιδραστήριο έκπλυσης με τη χρήση χειροκίνητου πλυστικού μηχανήματος για να απομακρυνθεί η περίσσεια του MCP-1 που δεν έχει δεσμευθεί.
3. Προστίθενται 200 μL του πολυκλωνικού αντισώματος έναντι MCP-1 και ακολουθεί επώαση για 1 h σε θερμοκρασία δωματίου.
4. Ακολουθούν τρεις εκπλύσεις με το αντιδραστήριο έκπλυσης με τη χρήση χειροκίνητου πλυστικού μηχανήματος για να απομακρυνθεί η περίσσεια του πολυκλωνικού αντισώματος που δεν έχει δεσμευθεί.
5. Στη συνέχεια προστίθενται 200 μL υποστρώματος και ακολουθεί επώαση για 20 min απουσία φωτός.
6. Τέλος, προστίθενται 50 μL του διαλύματος τερματισμού της αντίδρασης. Το χρώμα παραμένει σταθερό για 30 min.
7. Μετράται η απορρόφηση στα 450 nm.

Επεξεργασία των αποτελεσμάτων

Με τη βοήθεια των πρότυπων διαλυμάτων κατασκευάζεται η πρότυπη καμπύλη. Από την εξίσωση της ευθείας που προκύπτει υπολογίζεται η ποσότητα του MCP-1 που περιέχουν τα δείγματα. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε pg/mL .

Στατιστική ανάλυση

Η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων έγινε με τη βοήθεια του στατιστικού λογισμικού Statistica. Οι τιμές εκφράστηκαν ως η μέση τιμή \pm τυπική απόκλιση (SD). Η σύγκριση των τιμών έγινε χρησιμοποιώντας το student's t-test, έκτος από την μελέτη της έκκρισης της PAF-AH από τα μονοκύτταρα, που οι διαφορές συγκρίθηκαν μεταξύ τους με τη βοήθεια Mann-Whitney. Σε κάθε περίπτωση το επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας θεωρήθηκε

ως

$P < 0.05$.



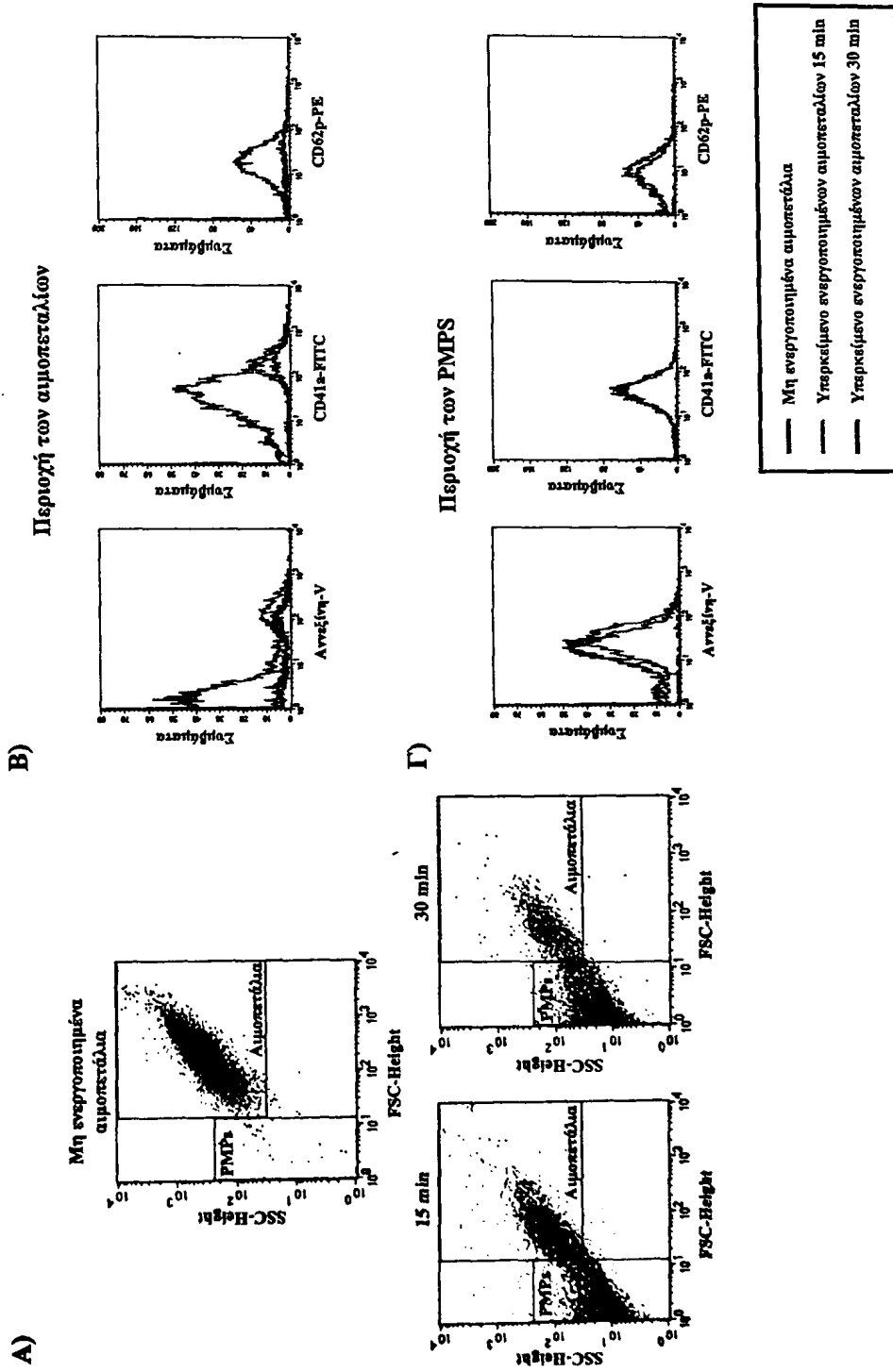
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7^ο

Αποτελέσματα

Παραγωγή και χαρακτηρισμός των PMPs

Αρχικά παρασκευάστηκαν πλυμένα αιμοπετάλια όπως περιγράφεται στη μεθοδολογία και στη συνέχεια έγινε η ενεργοποίησή τους με θρομβίνη (0.5 U/mL) και ανάλυση με κυτταρομετρία ροής των ενεργοποιημένων αιμοπεταλίων σε διάφορα χρονικά διαστήματα. Παρατηρήθηκε με βάση το ιστόγραμμα FSC vs SSC ότι σε σχέση με τα μη ενεργοποιημένα αιμοπετάλια υπήρχε χρονο-εξαρτώμενη αύξηση των συμβαμάτων (events) στην περιοχή των PMPs όπως φαίνεται στην Εικόνα 26Α. Η περιοχή των PMPs χαρακτηρίζεται από μικρά σε μέγεθος σωματίδια και θετική έκφραση ως προς την αννεξίνη-V. Η πρόσδεση της αννεξίνης-V, που αναγνωρίζει την μετάθεση στην εξωτερική επιφάνεια της με έκθεση των αρνητικών φωσφολιπιδίων (όπως είναι η PS) των PMPs [145,146], επιβεβαιώνει ότι ο πληθυσμός που βρίσκεται στην περιοχή των PMPs είναι μικροσωματίδια. Επίσης τα PMPs χαρακτηρίστηκαν, ως προς την έκφραση της αννεξίνης-V αλλά και ως προς την έκφραση διαφόρων πρωτεϊνών που χαρακτηρίζουν τα αιμοπετάλια. Είναι γνωστό ότι τα PMPs είναι εμπλουτισμένα με διάφορες πρωτεΐνες που βρίσκονται στα αιμοπετάλια, όπως για παράδειγμα η ιντεγκρίνη $\alpha_{IIb}\beta_3$ [126]. Επιπρόσθετα, τα PMPs εκφράζουν P-σελεκτίνη, η οποία στα μη ενεργοποιημένα αιμοπετάλια βρίσκεται αποθηκευμένη στα α-κοκκία των αιμοπεταλίων [145,147]. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 26B και Γ η μέση ένταση φθορισμού (MFI) ως προς την έκφραση της αννεξίνης-V, του CD41a (ειδικό αντίσωμα έναντι της ιντεγκρίνης $\alpha_{IIb}\beta_3$) και του CD62p (αντίσωμα που αναγνωρίζει την P-σελεκτίνη) είναι αυξημένη στην περιοχή των PMPs υποδηλώνοντας την παραγωγή αυτών.

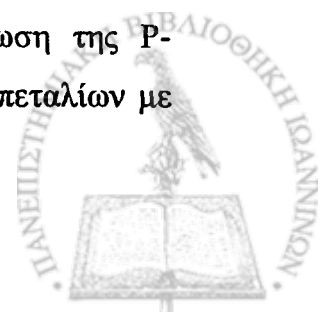




Εικόνα 26: A) Αντιπροσωπευτική εικόνα κυτταρομετρίας ροής όπου φαίνεται η χρονο-εξαρτώμενη παραγωγή των PMPs μετά από ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων με θρομβίνη (0.5 U/ mL). B) Χαρακτηρισμός της περιοχής των αιμοπεταλίων παρουσία διαφόρων φθορισμένων αντισωμάτων. Γ) Χαρακτηρισμός της περιοχής των PMPs παρουσία διαφόρων φθορισμένων αντισωμάτων.

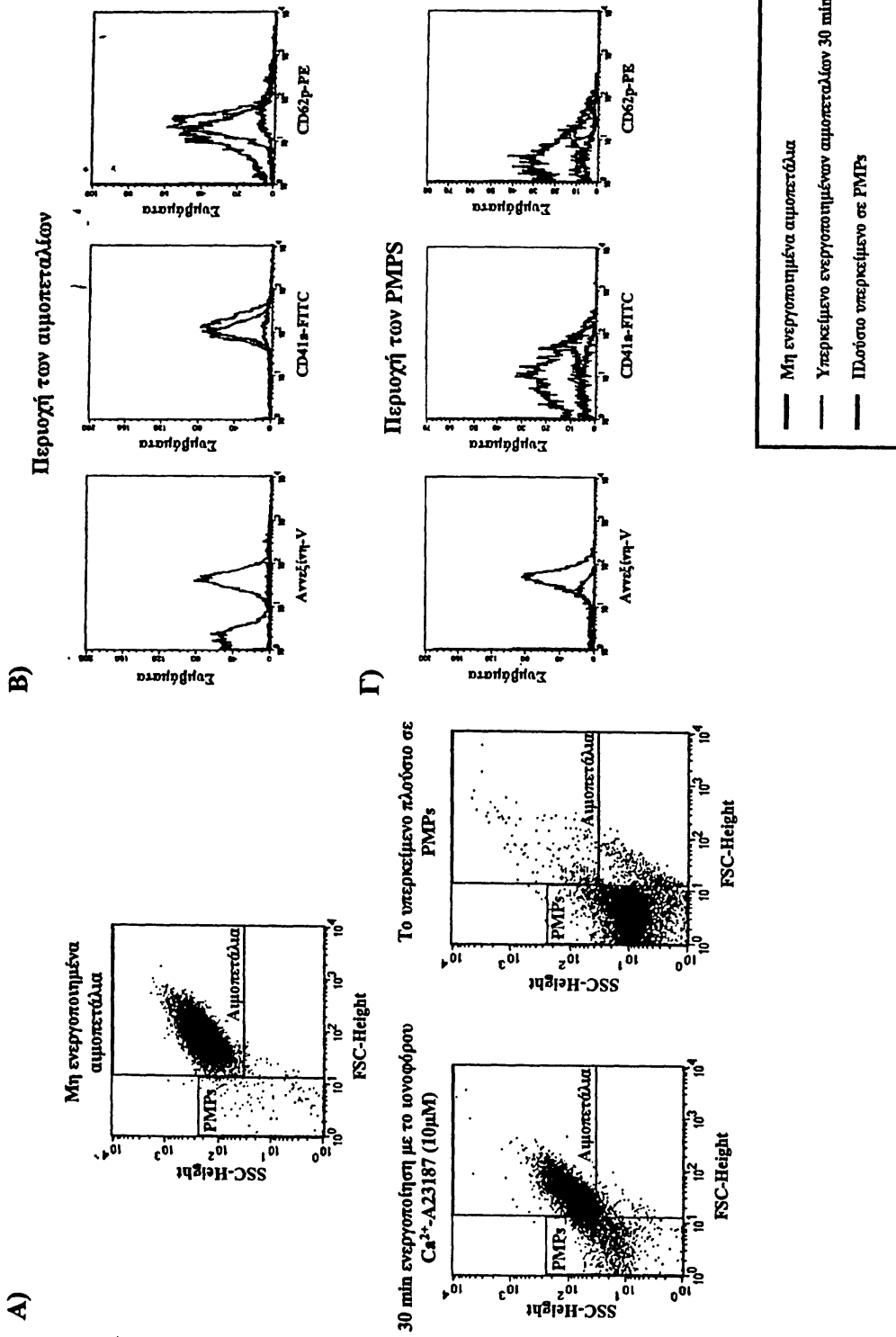


Η προσθήκη της θρομβίνης στα αιμοπετάλια έχει ως αποτέλεσμα τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων αλλά και την παραγωγή των PMPs σύμφωνα με τα παραπάνω αποτελέσματα (Εικόνα 26). Όμως σύμφωνα με την διεθνή βιβλιογραφία ο καλύτερος αγωνιστής για την παραγωγή των PMPs είναι αυτός που προκαλεί αναδιοργάνωση της κυτταρικής μεμβράνης με αποτέλεσμα την παραγωγή των PMPs. Με βάση μελέτες *in vitro*, η ισχύς των αγωνιστών, όσον αφορά την ικανότητά τους να επάγουν το σχηματισμό PMPs, ακολουθεί την εξής σειρά: ιονοφόρο Ca^{2+} -A23187 > C5b9-του συστήματος του συμπληρώματος > συνδυασμός θρομβίνης και κολλαγόνου > θρομβίνη ή κολλαγόνο > επινεφρίνη ή ADP [126]. Για αυτό στη συνέχεια επιλέχθηκε ως αγωνιστής το ιονοφόρο Ca^{2+} -A23187 και μελετήθηκε η παραγωγή των PMPs μετά από ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων για 30 min. Επιλέχθηκαν τα 30 min ενεργοποίησης αφού αυτός ήταν αρκετός χρόνος για την μέγιστη παραγωγή των PMPs σύμφωνα με τα παραπάνω αποτελέσματα (Εικόνα 26). Η βασική διαφορά της ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων, προς παραγωγή των PMPs, με το ιονοφόρο Ca^{2+} -A23187 σε σύγκριση με την αντίστοιχη με θρομβίνη είναι ότι η ενεργοποίηση παρουσία του πρώτου δεν απαιτεί ανάδευση διότι η παραγωγή των PMPs βασίζεται στην αναδιοργάνωση της κυτταρικής μεμβράνης και όχι στη συσσώρευση. Η λειτουργικότητα των αιμοπεταλίων δεν επηρεάστηκε από τον οργανικό διαλύτη διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO), στον οποίο είναι διαλυμένο το ιονοφόρο Ca^{2+} -A23187. Στο πειραματικό μοντέλο που χρησιμοποιήσαμε η συγκέντρωση του DMSO δεν ξεπέρασε το 1% (v/v) στο διάλυμα των αιμοπεταλίων. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 27A, μετά από την ενεργοποίηση παρατηρήθηκε μια μετατόπιση των συμβαμάτων σε σχέση με τα μη ενεργοποιημένα αιμοπετάλια προς την περιοχή των PMPs, έχουμε δηλαδή την παραγωγή σωματιδίων με μικρότερο μέγεθος. Επιπρόσθετα, απομακρύνοντας τα υπολείμματα των αιμοπεταλίων με φυγοκέντρηση, παραλαμβάνεται ένα υπερκείμενο πλούσιο σε PMPs, όμως αυτό επιβεβαιώνεται από τις εικόνες της κυτταρομετρίας ροής. Επίσης όπως φαίνεται στην Εικόνα 27B και Γ η MFI ως προς την έκφραση της αννεξίνης-V, CD41a και του CD62p αυξάνεται στην περιοχή των PMPs, υποδηλώνοντας την παραγωγή αυτών. Σε σύγκριση με τα PMPs που παράγονται παρουσία θρομβίνης η έκφραση του CD62p είναι μεγαλύτερη με αυτά που παράγονται παρουσία του ιονοφόρου Ca^{2+} -A23187. Αυτό εξηγείται από το γεγονός ότι η ενεργοποίηση παρουσία θρομβίνης οδηγεί στην έκκριση του περιεχόμενου των α - και πυκνών-κοκκίων, με αποτέλεσμα την απελευθέρωση της P-σελεκτίνης από τις ενδοκυττάρειες αποθήκες. Αντίθετα η ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων με

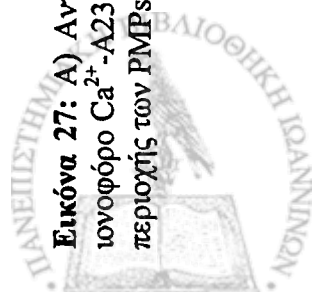


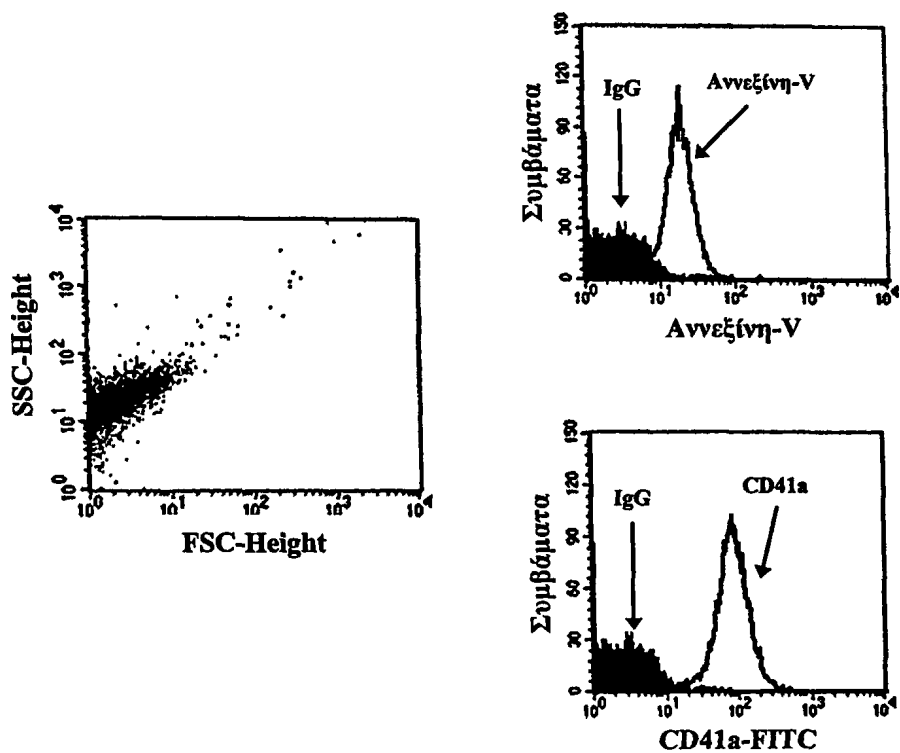
το ιονοφόρο Ca^{2+} -A23187 οδηγεί στην αναδιοργάνωση των φωσφολιπιδίων της κυτταρικής μεμβράνης και στην παραγωγή PMPs και όχι στην απελευθέρωση του περιεχόμενου των α- και πυκνών-κοκκίων. Συνεπώς, η έκφραση της P-σελεκτίνης είναι μικρότερη στα PMPs που παράχθηκαν με το ιονοφόρο Ca^{2+} -A23187. Μετά την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων παρουσία του ιονοφόρου Ca^{2+} -A23187 το πλούσιο σε PMPs υπερκείμενο επιστοιβάστηκε σε διάλυμα 20% σουκρόζης, όπως περιγράφεται στην μεθοδολογία, και στη συνέχεια υποβλήθηκε σε φυγοκέντρηση. Μετά από την φυγοκέντρηση απομακρύνεται το υπερκείμενο που είναι πλούσιο σε PMPs και υποβάλλεται σε υπερφυγοκέντρηση. Το ίζημα που προκύπτει μετά από την υπερφυγοκέντρηση αναδιασπείρεται σε μικρό όγκο ρυθμιστικού διαλύματος PBS. Ακολουθεί ανάλυση με χρήση κυτταρομετρίας ροής και φύλαξη στους 4°C για τουλάχιστον μια εβδομάδα. Στην Εικόνα 28 φαίνεται το κυτταρομετρικό προφίλ των απομονωμένων PMPs. Τα PMPs εκφράζουν θετικότητα για την αννεξίνη-V αλλά και το CD41a.





Εικόνα 27: Α) Αντιπροσωπευτική εικόνα κυταρομετρίας ροής όπου φαίνεται η παραγωγή των PMPs μετά από ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων με το ιονοφόρο Ca^{2+} -A23187 (10 µM). Β) Χαρακτηρισμός της περιοχής των αιμοπεταλίων παρουσία διαφόρων φθορισμένων αντισωμάτων. Γ) Χαρακτηρισμός της περιοχής των PMPs παρουσία διαφόρων φθορισμένων αντισωμάτων.

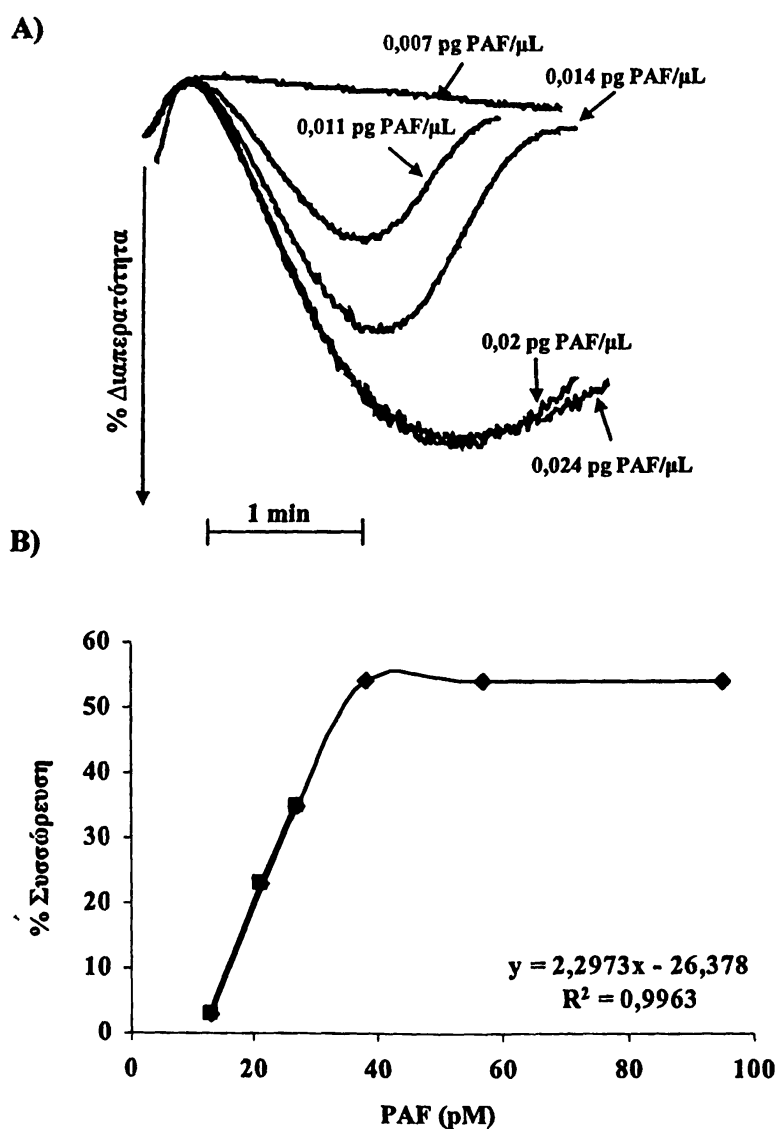




Εικόνα 28: Απομόνωση των PMPs μετά από υπερφυγοκέντρωση και χαρακτηρισμός τους με την έκφραση της αννεξίνης-V και του CD41a σε σύγκριση με το αρνητικό δείγμα έλεγχου (IgG).

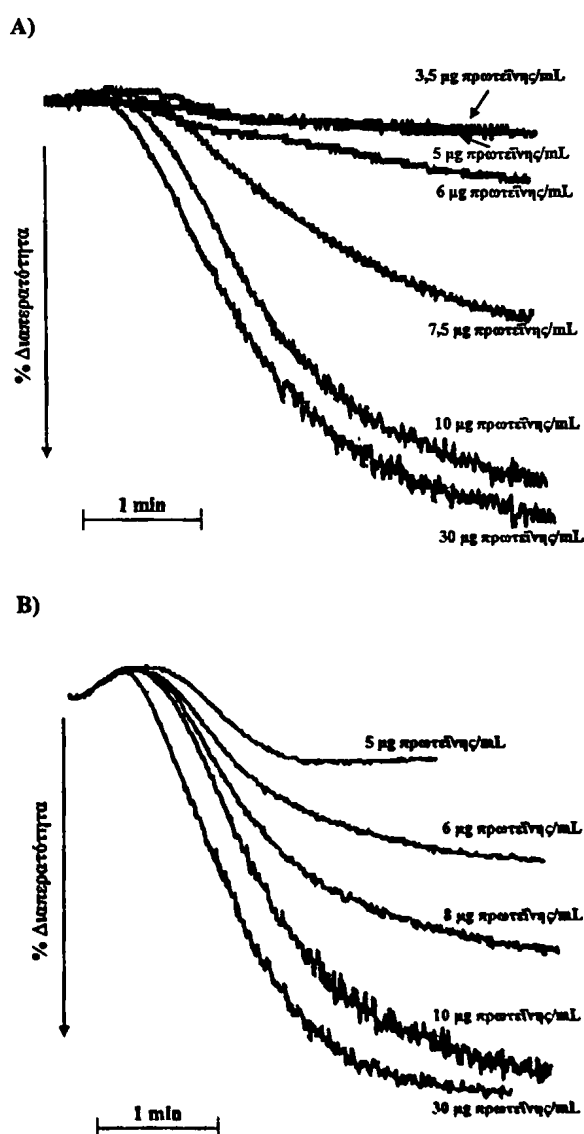
Ποσοτικοποίηση του PAF των PMPs

Ο ποσοτικός προσδιορισμός του PAF των δειγμάτων βασίζεται στη σύγκριση συσσώρευσης που προκαλούν διάφορες ποσότητες δείγματος σε εναιώρημα πλυμένων αιμοπεταλίων κουνελιού σε σχέση με τις συσσωρεύσεις που προκαλούν γνωστές ποσότητες εμπορικά διαθέσιμου C16:0 PAF. Με βάση τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων υπολογίζεται η βέλτιστη ευθεία από την εξίσωση της οποίας υπολογίζεται η συγκέντρωση του PAF των άγνωστων δειγμάτων (Εικόνα 29).



Εικόνα 29: Ποσοτικοποίηση του PAF. A) Αντιπροσωπευτικές καμπύλες συσσώρευσης πλυμένων αιμοπεταλίων κουνελιού με πρότυπα διαλύματα του PAF. B) Η καμπύλη με βάση την οποία γίνεται η ποσοτικοποίηση του PAF.

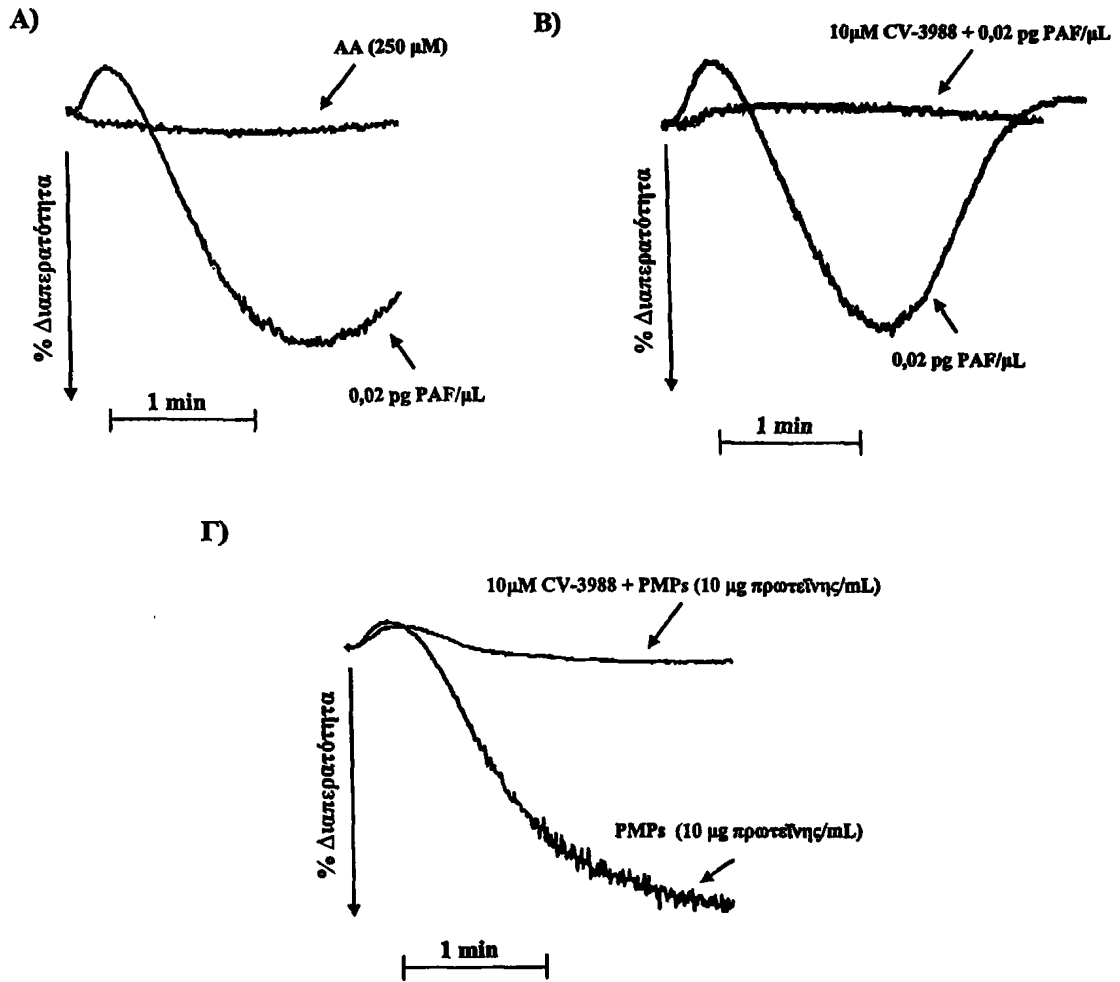
Με βάση τα παραπάνω, έγινε ανίχνευση και ποσοτικός προσδιορισμός του PAF στα PMPs που παράγονται από τα αιμοπετάλια με τη δράση του ιονοφόρου Ca^{2+} -A23187. Η ποσότητα του PAF που εκκρίνεται από τα αιμοπετάλια μετά από ενεργοποίηση με το ιονοφόρο Ca^{2+} -A23187 είναι 31.0 ± 14.1 pM ή 2.5 ± 0.7 pg PAF/μg πρωτεΐνης υπερκειμένου (Εικόνα 30A). Στην συνέχεια ποσοτικοποίησαμε την περιεκτικότητα των PMPs σε PAF και βρέθηκε να είναι 18.0 ± 8.5 pM ή 2.7 ± 2.0 pg PAF/μg PMPs πρωτεΐνης (Εικόνα 30B).



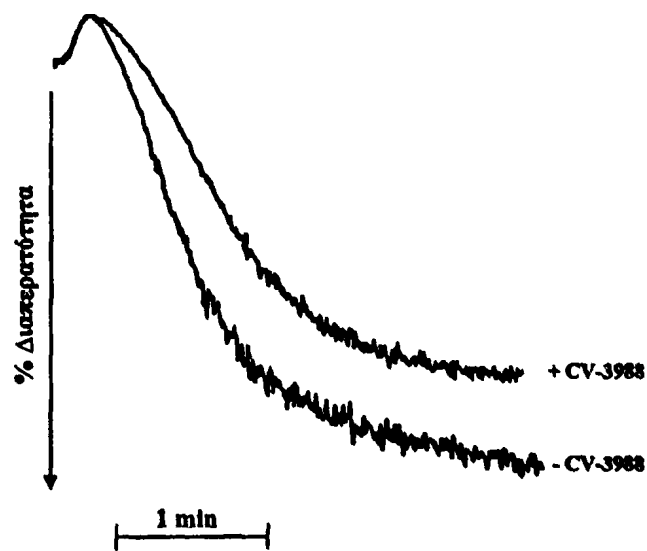
Εικόνα 30: A) Η επίδραση του υπερκειμένου των ενεργοποιημένων αιμοπεταλίων από το ιονοφόρο Ca^{2+} -A23187 στην συσώρευση των πλυμένων αιμοπεταλίων κουνελιού B) Η επίδραση των απομονωμένων PMPs στην συσώρευση των πλυμένων αιμοπεταλίων κουνελιού. Τα πειράματα έγιναν εις τριπλούν.

Για να επιβεβαιωθούμε ότι η συσσωρευτική δράση που παρατηρήσαμε στα PMPs ως προς τα πλυμένα αιμοπετάλια κουνελιού οφείλεται στον PAF και όχι σε άλλους βιοδραστικούς παράγοντες που εκκρίνονται κατά την διάρκεια της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων και πιθανώς να υπάρχουν στα PMPs, έγινε παρασκευή εναιωρήματος αιμοπεταλίων κουνελιού στα οποία προσθέσαμε το σύστημα CP/CPK το οποίο δρα σαν εκκαθαριστής του ενδογενούς παραγόμενου ADP καθώς και ασπιρίνη η οποία αναστέλλει μη αντιστρεπτά την δράση του ενζύμου COX-1 και παρεμποδίζει την σύνθεση του TxA_2 (προϊόν μεταβολισμού του AA). Σύμφωνα με τα αποτελέσματά μας, παρουσία της ασπιρίνης παρατηρήθηκε πλήρης αναστολή της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων κουνελιού όταν χρησιμοποιήθηκε το AA ως αγωνιστής (Εικόνα 31A). Επιπλέον, στην ίδια παρασκευή των αιμοπεταλίων χρησιμοποιήθηκε ο ειδικός αναστολέας του PAF, CV-3988. Παρουσία του τελευταίου παρατηρήθηκε πλήρης αναστολή της βιολογικής δράσης του εμπορικά διαθέσιμου (πρότυπο διάλυμα) PAF όσο και αυτής των PMPs (Εικόνα 31B και Γ). Η δράση του συγκεκριμένου αναστολέα είναι ειδική έναντι του PAF αφού αυτός δεν παρουσίασε ανάλογη ανασταλτική δράση έναντι άλλου αγωνιστή όπως η θρομβίνη (Εικόνα 32).





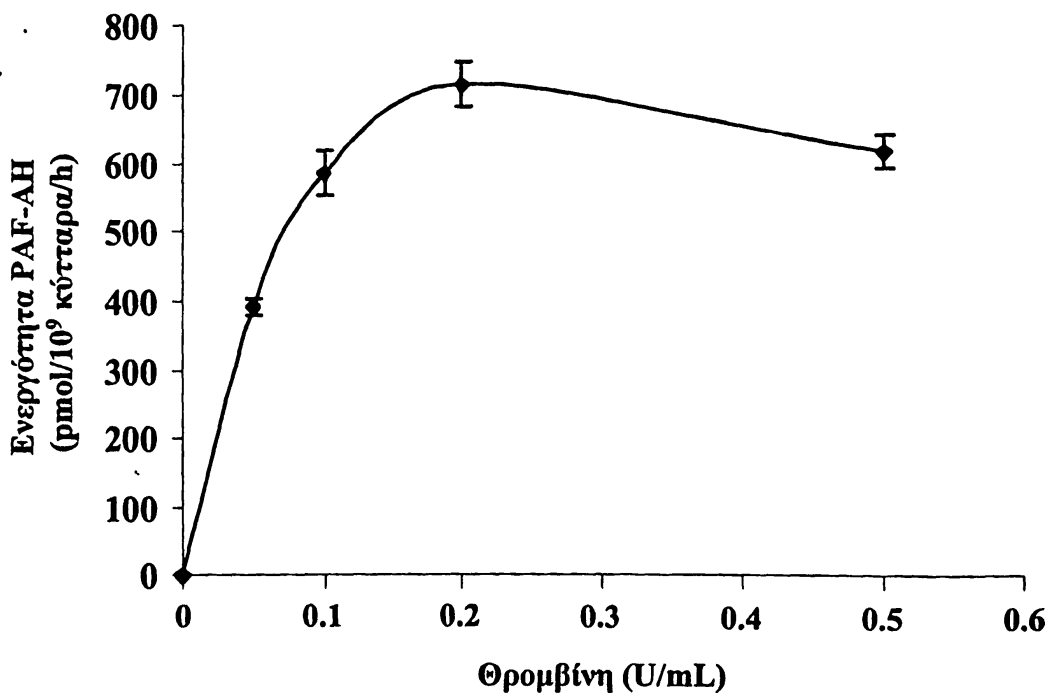
Εικόνα 31: Αντιπροσωπευτικές καμπύλες συσσώρευσης αιμοπεταλίων κουνελιού παρουσία του AA (Α), παρουσία του PAF και 10 μ M CV-3988 (Β) και παρουσία των PMPs και 10 μ M CV-3988 (Γ).



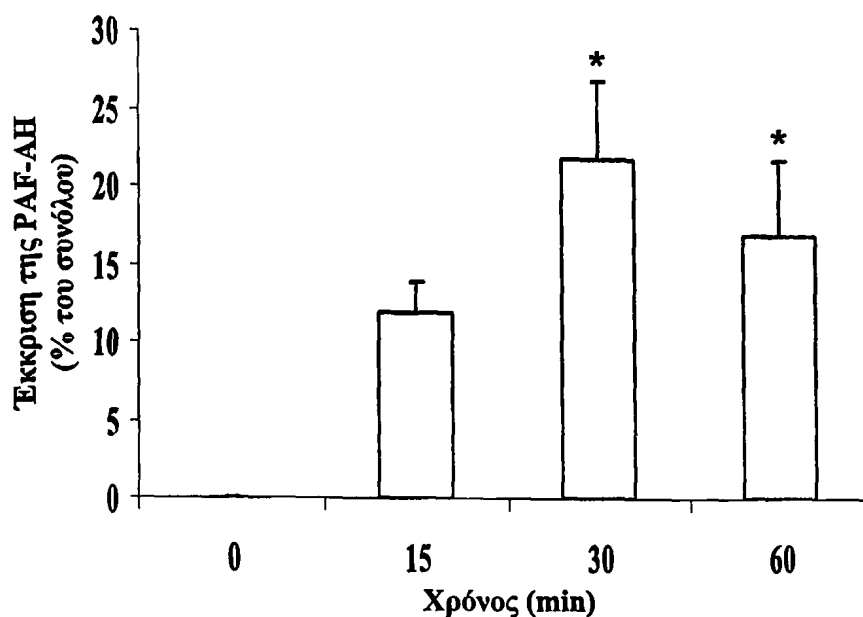
Εικόνα 32: Η επαγόμενη από θρομβίνη (0.5 U/mL) συσσώρευση των αιμοπεταλίων κουνελιού παρουσία και απουσία του CV-3988 (10 μ M).

Η έκκριση της PAF-AH από τα ανθρώπινα αιμοπετάλια

Στη συνέχεια, μελετήθηκε η έκκριση της PAF-AH από πλυμένα αιμοπετάλια ανθρώπου μετά από την επίδραση της θρομβίνης και του ADP. Η επαγόμενη από την θρομβίνη ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων έδειξε μια δόσο- (Εικόνα 33) αλλά και χρονο-εξαρτώμενη έκκριση της PAF-AH (Εικόνα 34). Η μέγιστη έκκριση του ένζυμου (716 ± 144 pmol/ 10^9 κύτταρα/h) πραγματοποιήθηκε με την χρησιμοποίηση 0.2 U/mL θρομβίνης ως αγωνιστή. Αποκλείσαμε την πιθανότητα η επαγόμενη από την θρομβίνη έκκριση της PAF-AH να οφείλεται στην λύση των κυττάρων διότι δεν παρατηρήθηκε απελευθέρωση της γαλακτικής αφυδρογονάσης κατά την διάρκεια της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων. Επιπρόσθετα, πρέπει να τονιστεί ότι απομακρύνθηκε πλήρως η ενεργότητα της PAF-AH του πλάσματος κατά την διάρκεια της παρασκευής των πλυμένων αιμοπεταλίων, διότι δεν προσδιορίστηκε ενεργότητα του ενζύμου στο υπερκείμενο των αιμοπεταλίων πριν την ενεργοποίηση με θρομβίνη.



Εικόνα 33: Δόσο-εξαρτώμενη έκκριση της PAF-AH μετά από ενεργοποίηση των ανθρώπινων αιμοπεταλίων με θρομβίνη.



Εικόνα 34: Χρονο-εξαρτώμενη έκκριση της PAF-AH μετά από ενεργοποίηση με θρομβίνη. Τα αποτελέσματα αντιπροσωπεύουν το έπι τοις % ποσοστό ως προς την συνολική ενεργότητα που υπάρχει στα αιμοπετάλια (κυτταρόλυμα, platelet lysate). Η ενεργότητα προσδιορίστηκε με την μέθοδο ιζηματοποίησης με TCA. Ως πηγή του ενζύμου χρησιμοποιήθηκαν 85 μL από το δείγμα αιμοπεταλίων. Οι τιμές εκπροσωπούν την μέση τιμή \pm SD από 10 πειράματα. * $P < 0.03$ συγκρινόμενο με την έκκριση της PAF-AH στα 15 min.

Σε αντίθεση με την θρομβίνη το ADP δεν προκάλεσε έκκριση της PAF-AH σε οποιαδήποτε συγκέντρωση μέχρι τα 10 μM παρά το γεγονός ότι παρατηρήθηκε μια δόσο-εξαρτώμενη συσσώρευση των αιμοπεταλίων, με μέγιστο στο $41 \pm 8\%$ ($n=5$) σε συγκέντρωση των 5 μM . Επιπρόσθετα, παρατηρήθηκε έκκριση των α -κοκκίων των αιμοπεταλίων μετά από την ενεργοποίηση με ADP, την έκφραση P-σελεκτίνης (CD62p) όπως προσδιορίστηκε με χρήση κυτταρομετρίας ροής. Το $34.8 \pm 17.0\%$ των ενεργοποιημένων κυττάρων εκφράζουν θετικότητα για CD62p σε σχέση μετά τα μη-ενεργοποιημένα αιμοπετάλια ($1.7 \pm 0.3\%$, $n=5$).

Χαρακτηρισμός της PAF-AH των αιμοπεταλίων

Η επαγόμενη από θρομβίνη ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων προκάλεσε την έκκριση του $22 \pm 5\%$ της συνολικής ενεργότητας της PAF-AH που βρίσκεται στο κυτταρόλυμα (platelet lysate) των μη-ενεργοποιημένων αιμοπεταλίων ($3,254 \pm 654 \text{ pmol}/10^9 \text{ κύτταρα/h}$).

Στην συνέχεια το συνολικό κυτταρόλυμα υποβλήθηκε σε υπερφυγοκέντρωση. Η ενεργότητα του ενζύμου κατανεμήθηκε ως εξής: $75.1 \pm 14.3\%$ στο υπερκείμενο (κυτοσολικό κλάσμα, $2,444 \pm 306$ pmol/ 10^9 κύτταρα/h) ενώ το υπόλοιπο $24.9 \pm 7.3\%$ στο ίζημα (μεμβρανικό κλάσμα). Τόσο η ενεργότητα του κυτοσολικού, όσο και του μεμβρανικού αλλά και η εκκρινόμενη χαρακτηρίστηκαν ως PAF-AH, διότι παρουσίασαν μια δράση ανεξάρτητη των ιόντων Ca^{2+} . Ακόμα και παρουσία πολύ υψηλών συγκεντρώσεων ιόντων Ca^{2+} δεν επάγεται η ενεργότητά τους. Επίσης δεν παρατηρήθηκε μεταβολή της ενεργότητας παρουσία EDTA, ένδειξη η όποια ενισχύει την υπόθεση ότι το ένζυμο δεν παρουσιάζει ενεργότητα κλασσικής PLA₂ (Πίνακας 6). Επιπρόσθετα, η παρουσία 1 mM του ειδικού αναστολέα των σερινοεστερασών (Pefabloc) [502] ανέστειλλε την ενεργότητα των τριών κλασμάτων αυτών σε υψηλό ποσοστό (Πίνακας 6). Όταν σαν υπόστρωμα χρησιμοποιήθηκε η PC ακόμα και σε πενταπλάσια ποσότητα σε σχέση με το PAF, η ενεργότητα του ενζύμου παράμεινε ανεπηρέαστη. Το εύρημα αυτό υποδηλώνει ότι το ένζυμο αυτό παρουσιάζει εξειδίκευση έναντι υποστρωμάτων με μικρές ακυλο-ομάδες στην sn-2 θέση. Σημαντικό, είναι και το γεγονός ότι η παρουσία 1 mM DTNB ανέστειλλε την ενεργότητα του κυτοσολικού κλάσματος αντίθετα όμως δεν επηρέασε την ενεργότητα του μεμβρανικού κλάσματος αλλά και την εκκρινόμενη PAF-AH (Πίνακας 6).



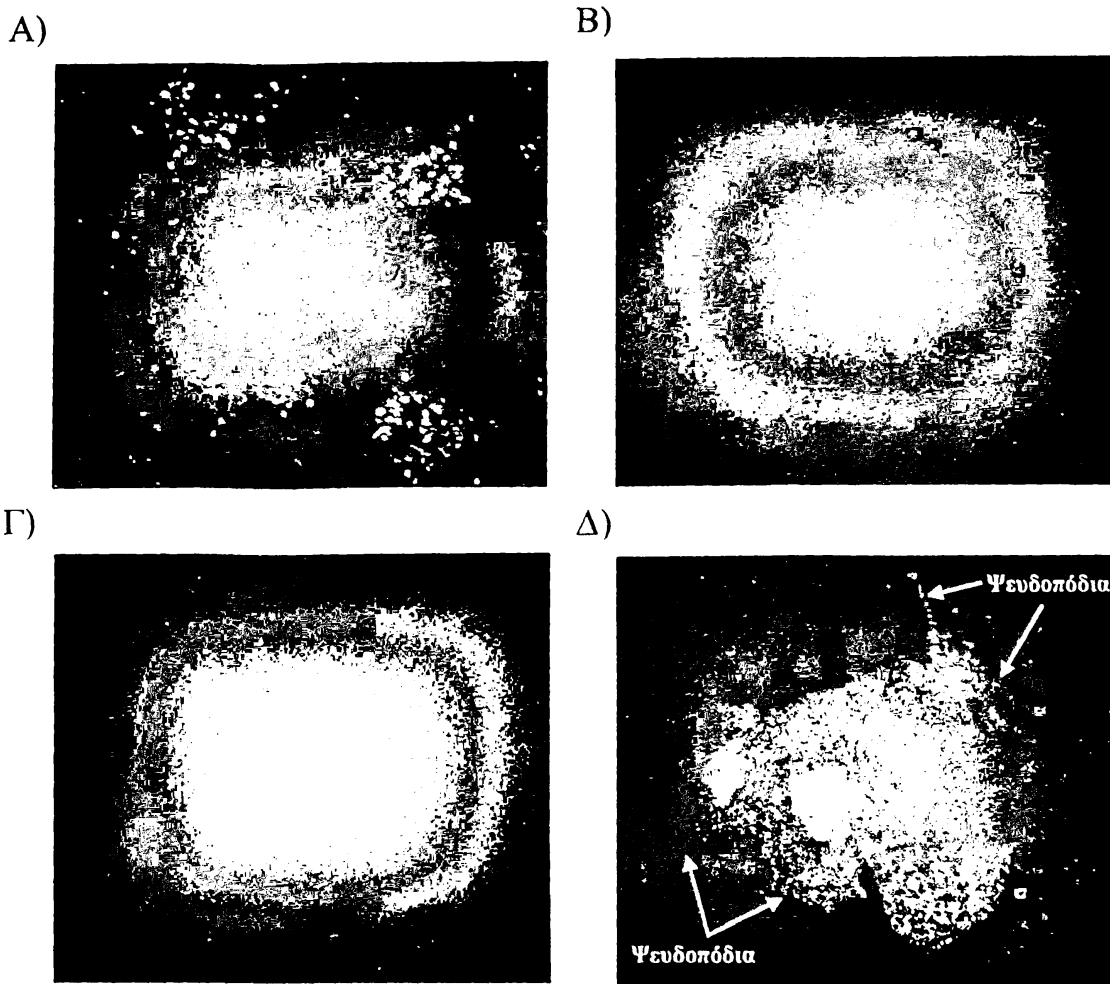
Πίνακας 6: Κατεργασίες για την ταυτοποίηση της PAF-AH των αιμοπεταλίων.

Αντιδραστήριο	Ενεργότητα PAF-AH, % του συνόλου		
	Κυτοσολικό κλάσμα	Μεμβρανικό κλάσμα	Εκκρινόμενη
Τυφλό	100	100	100
Ca ²⁺ , 1 mM	97	100	103
Ca ²⁺ , 10 mM	93	95	91
EDTA, 1 mM	110	108	96
EDTA, 5 mM	107	93	96
Pefabloc, 1 mM 30min, 37°C	15	10	12
DTNB, 1 mM, 30min, 37°C	10	78	80
PC, 0.1 mM	98	106	103
PC, 0.5 mM	94	104	96

Οι τιμές εκπροσωπούν την μέση τιμή±SD από 3 πειράματα. Η ενεργότητα προσδιορίστηκε με την μέθοδο ζηματοποίησης με TCA. Το DTNB διαλύθηκε σε DMSO ενώ η PC διαλύθηκε σε αιθανόλη. Η συγκέντρωση του DMSO δεν ξεπέρασε το 1% στο διάλυμα (v/v) και η συγκέντρωση της αιθανόλης δεν ξεπέρασε το 0.5% στο διάλυμα (v/v). EDTA; αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ, DTNB; 5,5-διθεο-δισ-2-νιτροβενζοϊκό οξύ, και PC; Φωσφατιδυλοχολίνη.

Στην συνέχεια μελετήθηκε η ύπαρξη της PAF-AH στα αιμοπετάλια με ανοσοφθορισμό και χρήση του μικροσκοπίου συνεστιασμού. Χρησιμοποιήθηκαν αντισώματα κατά της PAF-AH του πλάσματος αλλά και της ενδοκυττάριας τύπου II PAF-AH. Τα αιμοπετάλια εκφράζουν θετικότητα και για τις δύο μορφές της PAF-AH, με την ένταση φθορισμού της PAF-AH του πλάσματος να είναι χαμηλότερη σε σχέση με αυτής της ενδοκυττάριας μορφής τύπου II (Εικόνα 35). Στην Εικόνα 35Δ φαίνεται η χρώση του θετικού δείγματος ελέγχου των αιμοπεταλίων με την χρήση ειδικού αντισώματος έναντι της ιντεγκρίνης α_{IIb}β₃.



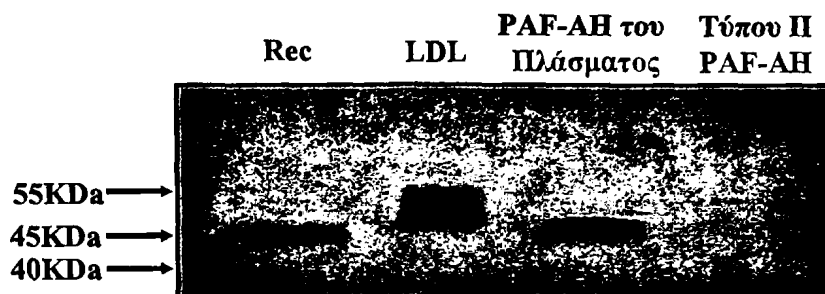


Εικόνα 35: Αντιπροσωπευτικές εικόνες ανοσοφθορισμού σε πλυμένα αιμοπετάλια παρουσία και απουσία αντισωμάτων έναντι της PAF-AH. Τα αιμοπετάλια προσκολλήθηκαν σε καλυπτρίδα επικαλυμμένα με Fg. A) Αντίσωμα έναντι της ενδοκυττάριας Τύπου II PAF-AH, B) Αντίσωμα έναντι της PAF-AH του πλάσματος, Γ) το αρνητικό control IgG, D) anti-CD41a. Τα πειράματα έγιναν εις τριπλούν.

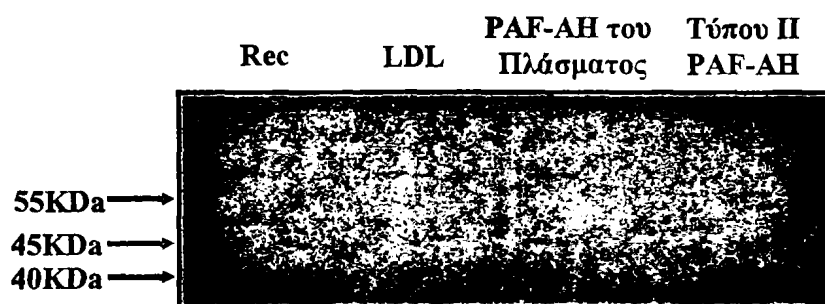
Για την επιβεβαίωση του παραπάνω ευρήματος σύμφωνα με το οποίο τα αιμοπετάλια του ανθρώπου περιέχουν δύο τύπους PAF-AH, την ενδοκυττάρια τύπου II και την PAF-AH του πλάσματος, έγινε μερικώς καθαρισμός του ενζύμου από συνολικό κυτταρόλυμα των αιμοπεταλίων όπως περιγράφεται στη μεθοδολογία. Το ένζυμο συμπυκνώθηκε κατά 117 φορές και η ανάκτηση ήταν 9%. Το μερικώς καθαρισμένο ένζυμο υποβλήθηκε σε ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE 5-19% και στην συνέχεια σε ανοσοαποτύπωση παρουσία των μονοκλωνικών αντισωμάτων έναντι της PAF-AH του πλάσματος και της ενδοκυττάριας τύπου II PAF-AH. Πράγματι βρέθηκε ότι τα αιμοπετάλια περιέχουν και τους δύο τύπους της PAF-AH (Εικόνα 36A και B). Επιπρόσθετα, η PAF-AH του πλάσματος των αιμοπεταλίων

δεν είναι γλυκοζυλιωμένη διότι δεν εμφανίζει τα ίδια χαρακτηριστικά με την N-γλυκοζυλιωμένη μορφή της PAF-AH της LDL (Εικόνα 36A) [422].

A)



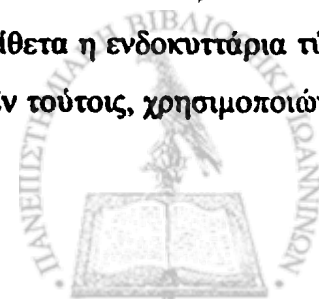
B)



Εικόνα 36: Ανοσοαποτύπωση της μερικώς καθαρισμένης PAF-AH των αιμοπεταλίων. A) Ανοσοαποτύπωση παρουσία του μονοκλωνικού αντισώματος έναντι της PAF-AH του πλάσματος. B) Ανοσοαποτύπωση παρουσία του μονοκλωνικού αντισώματος έναντι της ενδοκυττάριας τύπου II PAF-AH. Ανασυνδιασμένη PAF-AH του πλάσματος (Rec).

Σύμφωνα με τα παραπάνω αποτελέσματα, η PAF-AH των αιμοπεταλίων μοιάζει ανοσοενζυμικά με την PAF-AH του πλάσματος. Η τεχνική του RT-PCR χρησιμοποιήθηκε για την διερεύνηση της προέλευσης της PAF-AH των αιμοπεταλίων. Θελήσαμε δηλαδή να διερευνήσουμε το κατά πόσο τα αιμοπετάλια προσλαμβάνουν την PAF-AH από το πλάσμα ή κληρονομούν το mRNA από τα μεγακαρυοκύτταρα οπότε και την παράγουν σε επόμενο στάδιο. Η μελέτη έγινε σε σύγκριση με το mRNA της PAF-AH των μακροφάγων που θεωρείται ως η κυρία πηγή της PAF-AH του πλάσματος.

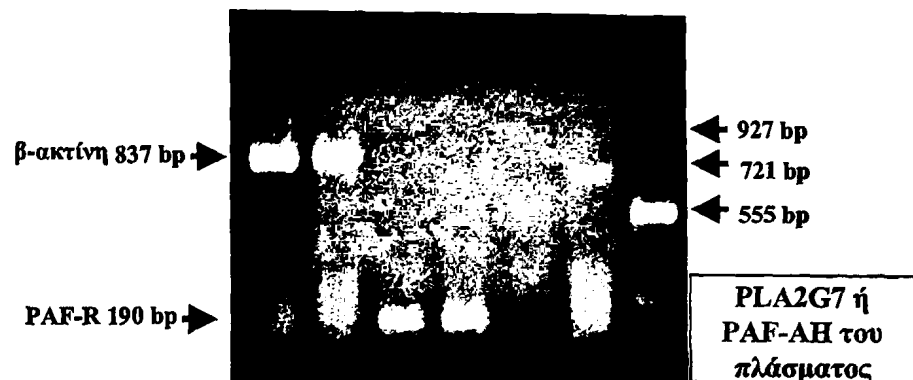
Όπως φαίνεται στην Εικόνα 37A και B, τα αιμοπετάλια περιέχουν το mRNA της PAF-AH του πλάσματος με τιμή κυκλικού ορίου (cycle threshold, CT) 24.3 όταν χρησιμοποιήθηκαν 20 ng cDNA για την ανάλυση με QPCR. Αντίθετα η ενδοκυττάρια τύπου II PAF-AH δεν εντοπίστηκε με την κλασική μέθοδο του PCR. Εν τούτοις, χρησιμοποιώντας



την μέθοδο QPCR η οποία παρουσιάζει μεγαλύτερη ευαισθησία για την ανίχνευση του mRNA, εντοπίστηκε μια μικρή ποσότητα της ενδοκυττάριας τύπου II PAF-AH με τιμή CT 30.4 (Εικόνα 37B). Στην συνέχεια μελετήθηκε και η ύπαρξη των διάφορων υπομονάδων της PAF-AH IB. Βρέθηκε σε πολύ μικρό ποσοστό το mRNA της γ υπομονάδας ενώ οι υπομονάδες α και β δεν βρέθηκαν διότι οι τιμές CT ήταν πάνω από το 31 (Εικόνα 37B). Δεν υπήρχε μόλυνση από αλλά κύτταρα του αίματος γιατί δεν βρέθηκε στα δείγματα των αιμοπεταλίων το mRNA της β_2 ιντεγκρίνης/CD11c και του CD14. Τα οποία είναι ειδικοί δείκτες των λευκοκυττάρων (Εικόνα 37B). Ως θετικός μάρτυρας για το PCR χρησιμοποιήθηκε το mRNA των μονοκυττάρων/μακροφάγων (τιμές CT 24 με 26, Εικόνα 37B).



A)



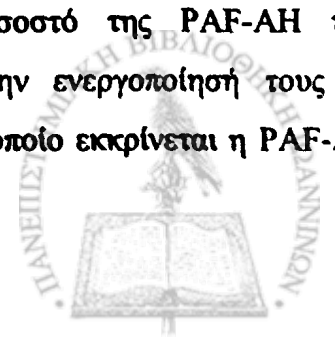
B)

Γονίδιο	CT
β ακτίνη	27.2
PAF-AH	24.3
PAF-AH II	30.4
PAF-AH 1α	31.9
PAF-AH 1β	32.1
PAF-AH 1γ	29.3
CD11c/β ₂ Ιντεγρίνη	34.2
CD14	34.0

Εικόνα 37: A) Η ανίχνευση της PAF-AH του πλάσματος με RT-PCR στα ανθρώπινα αιμοπετάλια, θετικός μάρτυρας η έκφραση της β-ακτίνης αλλά και του PAF-R (ο υποδοχέας του PAF). B) Ανίχνευση του mRNA της PAF-AH στα αιμοπετάλια ανθρώπου με QPCR (χρησιμοποιήθηκε 20 ng από το cDNA).

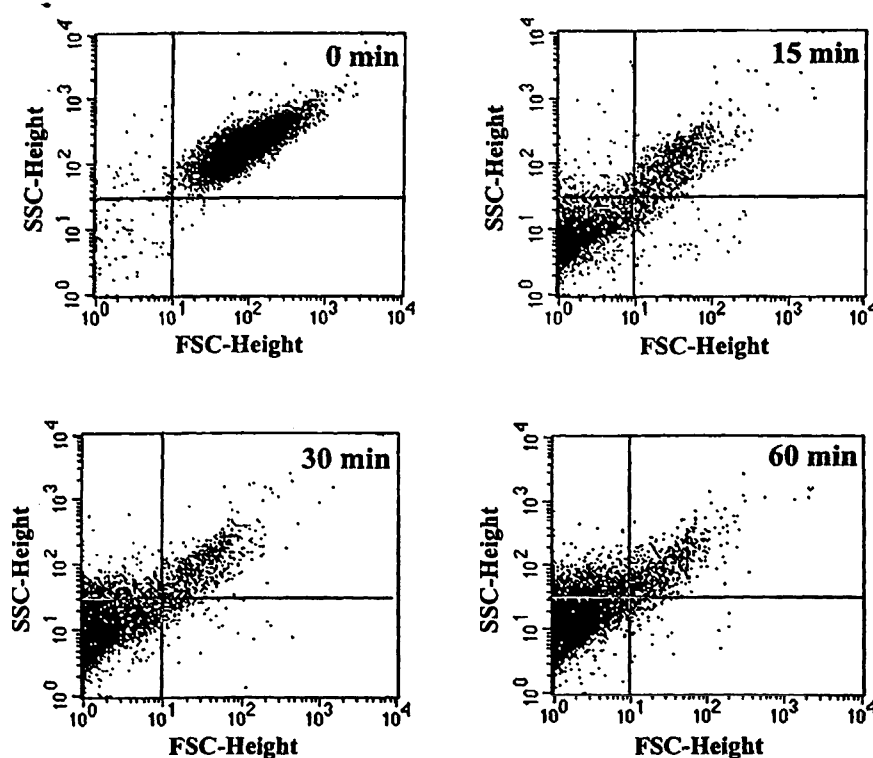
Η έκκριση της PAF-AH από τα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια συσχετίζεται με τα PMPs

Σύμφωνα με τα παραπάνω αποτελέσματα ένα ποσοστό της PAF-AH των αιμοπεταλίων εκκρίνεται στο υδρόφιλο περιβάλλον κατά την ενεργοποίησή τους με θρομβίνη. Θελήσαμε να διευκρινίσουμε τον μηχανισμό με τον οποίο εκκρίνεται η PAF-AH



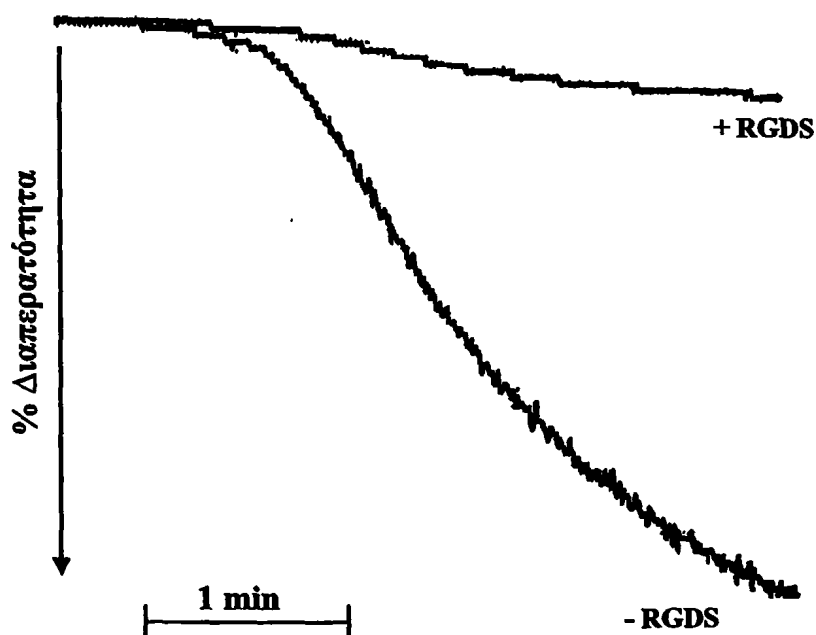
και το αν η έκκριση αυτή συσχετίζεται με την παραγωγή των PMPs μετά από ενεργοποίηση με θρομβίνη.

Πραγματοποιήθηκε ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων με θρομβίνη (0.2 U/mL) που οδήγησε στην χρονο-εξαρτώμενη παράγωγή των PMPs (Εικόνα 38, αύξηση του πληθυσμού στην κάτω αριστερή περιοχή του ιστογράμματος FSC vs SSC) και στην παράλληλη έκκριση της PAF-AH όπως αυτή που παρουσιάζεται στην Εικόνα 34.



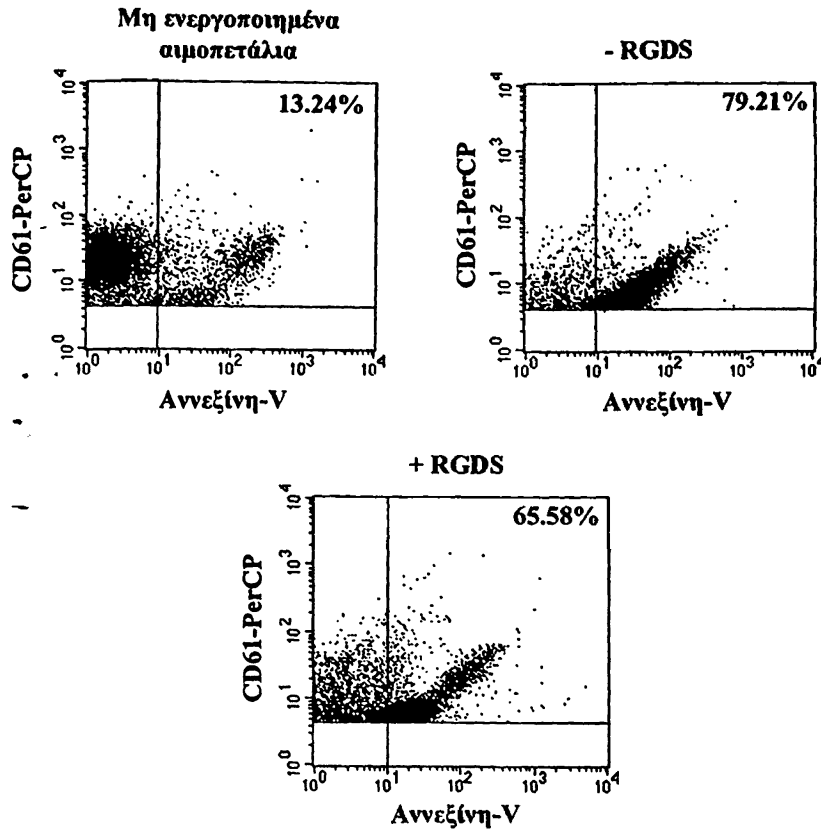
Εικόνα 38: Αντιπροσωπευτικές εικόνες κυτταρομετρίας ροής όπου φαίνεται η χρονο-εξαρτώμενη παραγωγή των PMPs μετά από ενεργοποίηση με θρομβίνη (0.2 U/mL).

Στην συνέχεια διερευνήσαμε ποιος είναι ο ρόλος της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων και αν αυτή είναι απαραίτητη για την έκκριση της PAF-AH. Ενεργοποιήσαμε τα αιμοπετάλια παρουσία του πεπτιδίου RGDS (230 μ M), το οποίο αναστέλλει τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων δεσμευόμενο στην ιντεγκρίνη $\alpha_{IIb}\beta_3$ [503]. Το RGDS στην παραπάνω συγκέντρωση ανέστειλε την επαγόμενη από θρομβίνη συσσώρευση των αιμοπεταλίων όπως φαίνεται στην Εικόνα 39.

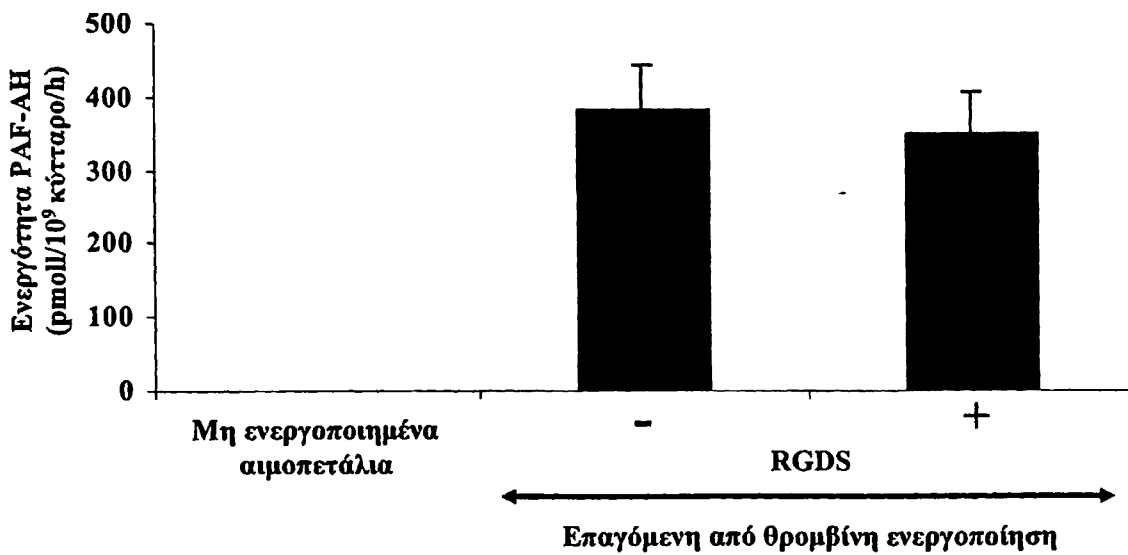


Εικόνα 39: Αντιπροσωπευτική καμπύλη συσσώρευσης των ανθρώπινων πλυμένων αιμοπεταλίων από τη θρομβίνη (0.2 U/mL) παρουσία και απουσία του RGDS (230 μ M).

Η δράση του RGDS δεν επηρέασε την παραγωγή των PMPs (Εικόνα 40). Όπως φαίνεται στην εικόνα αυτή το 79.2% των κυττάρων εκφράζει αννεξίνη-V και CD61 απουσία του RGDS ενώ το 65.6% των κυττάρων εκφράζει αννεξίνη-V και CD61 παρουσία του RGDS. Επίσης όπως φαίνεται στην Εικόνα 41, το RGDS δεν ανέστειλε την έκκριση της PAF-AH. Με βάση τα παραπάνω αποτελέσματα η διαδικασία της συσσώρευσης δεν φαίνεται να διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη έκκριση την PAF-AH αλλά και στην παραγωγή των PMPs.



Εικόνα 40: Αντιπροσωπευτικό κυτταρομετρικό προφίλ της παραγωγής των PMPs μετά από ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων με θρομβίνη (0.2 U/mL) παρουσία και απουσία του RGDS (230 μM). Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως % των αιμοπεταλίων που εκφράζουν τα δύο αντισώματα στην πάνω δεξιά γωνία.



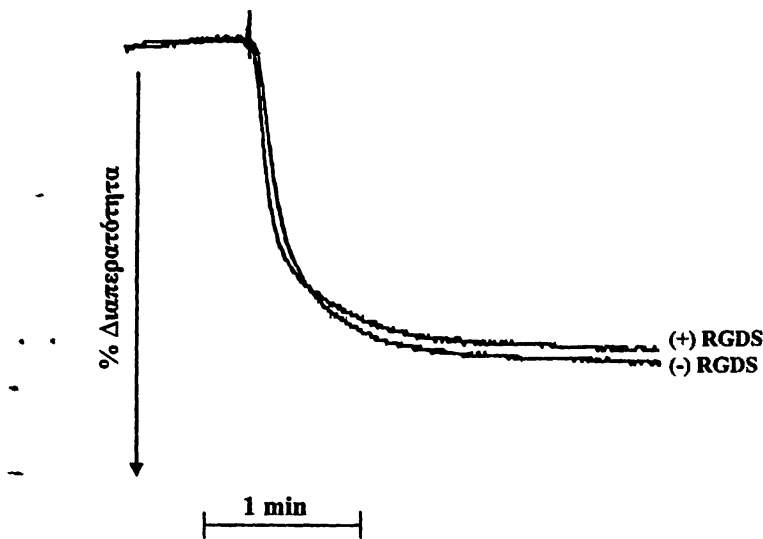
Εικόνα 41: Επίδραση του RGDS (230 μM) στην επαγόμενη από θρομβίνη (0.2 U/mL) έκκριση της PAF-AH από πλυμένα αιμοπετάλια ανθρώπου. Τα αποτελέσματα εκφράζουν την μέση τιμή±SD. Τα πειράματα έγιναν εις τριπλούν.



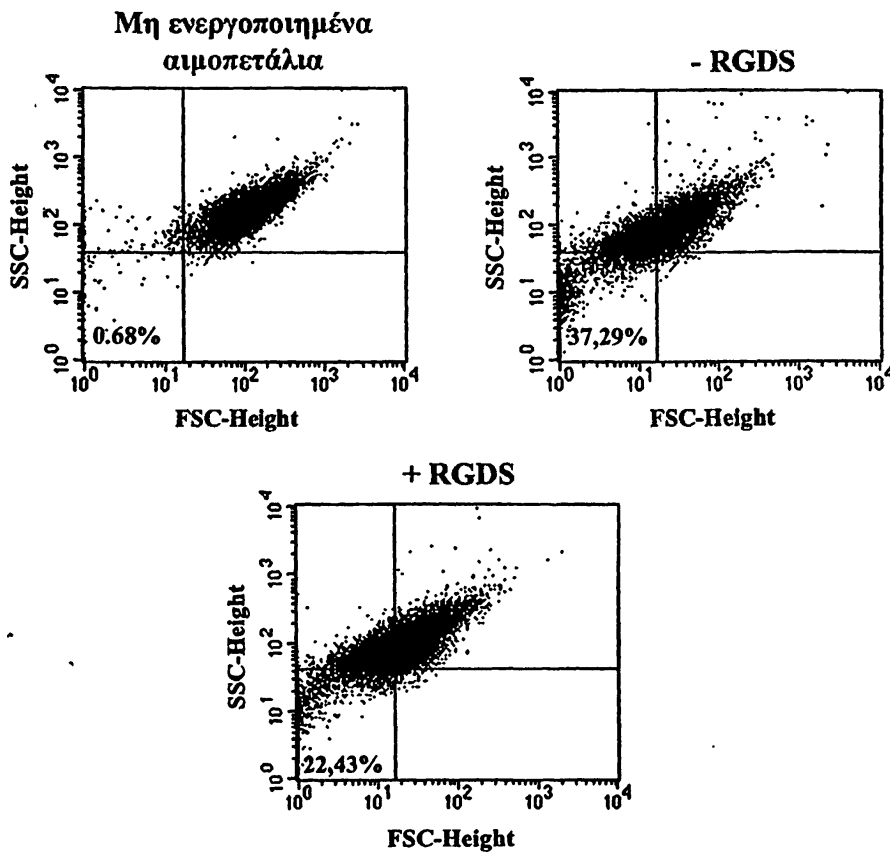
Σύμφωνα με τα παραπάνω αποτελέσματα η επαγόμενη από θρομβίνη ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων, προκαλεί την έκκριση αλλά και παραγωγή των PMPs η οποία δεν επηρεάζεται από την παρουσία του RGDS. Φαίνεται λοιπόν ότι η συσσώρευση των αιμοπεταλίων δεν είναι απαραίτητη για την έκκριση της PAF-AH αλλά και για την παραγωγή των PMPs. Σε επόμενα πειράματα δοκιμάσαμε έναν άλλο αγωνιστή των αιμοπεταλίων, το ιονοφόρο Ca^{2+} -A23187 ως προς την δράση του στην παραγωγή και έκκριση της PAF-AH. Το ιονοφόρο Ca^{2+} -A23187 θεωρείται ένας από τους καλύτερους αγωνιστές για την παραγωγή των PMPs επειδή προκαλεί αναδιοργάνωση της κυτταρικής μεμβράνης και όχι συσσώρευση των αιμοπεταλίων [126, 141].

Η επίδραση του ιονοφόρου Ca^{2+} -A23187 (10 μM) στα αιμοπετάλια προκάλεσε μια χρονο-εξαρτώμενη έκκριση της PAF-AH παρόμοια με την έκκριση της PAF-AH που προκαλεί η θρομβίνη. Παράλληλα η επίδραση του ιονοφόρου Ca^{2+} -A23187 παρουσίασε μια αύξηση της διαπερατότητας στο συσσωρευόμετρο η οποία καταγράφεται ως συσσώρευση ενώ στην πραγματικότητα είναι η μείωση του πληθυσμού των αιμοπεταλίων και η παραγωγή των PMPs (Εικόνα 42). Κάτω από αυτές της πειραματικές συνθήκες το RGDS (230 μM) δεν επηρέασε την επαγόμενη από το ιονοφόρο Ca^{2+} -A23187 αύξηση της διαπερατότητας στο συσσωρευόμετρο (Εικόνα 42). Παράλληλα η παρουσία του RGDS δεν επηρέασε την παραγωγή των PMPs. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 43 το 37.3% των κυττάρων βρίσκεται στην περιοχή των PMPs στο ιστόγραμμα FSC vs SSC απουσία του RGDS έναντι του 22.4% των κυττάρων παρουσία του RGDS. Τέλος το RGDS δεν επηρέασε την έκκριση της PAF-AH (Εικόνα 44). Με βάση τα αποτελέσματα αυτά συνάγεται το συμπέρασμα ότι η συσσώρευση των αιμοπεταλίων δεν διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην παραγωγή και έκκριση της PAF-AH, αλλά η αναδιοργάνωση της κυτταρικής μεμβράνης και η παραγωγή των PMPs φαίνεται να παίζει καθοριστικό ρόλο στην διαδικασία αυτή.



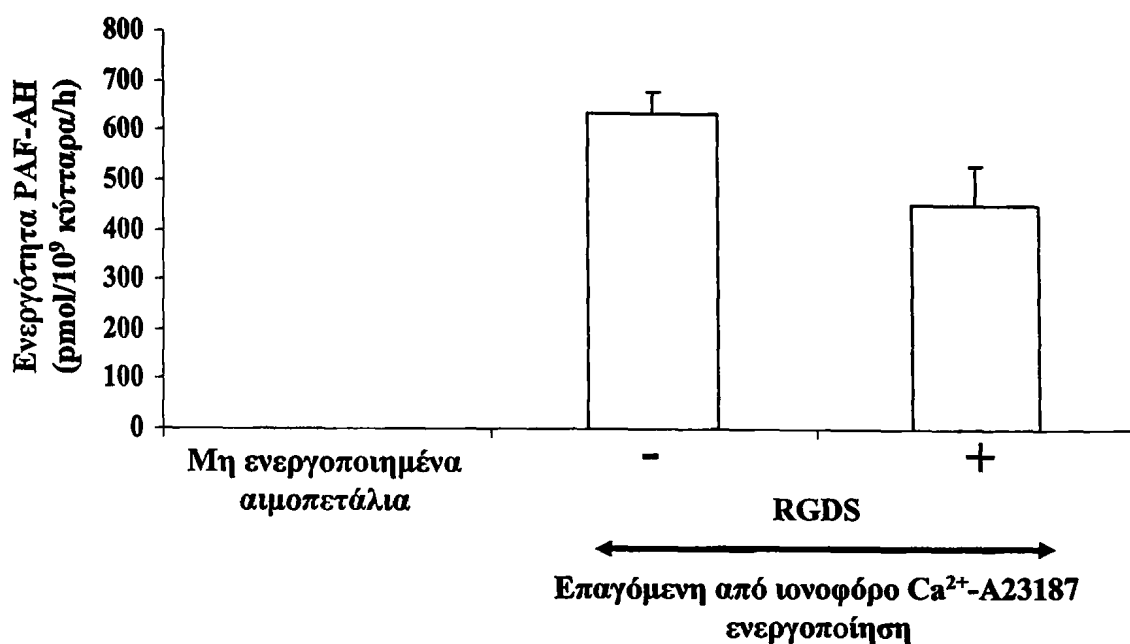


Εικόνα 42: Αύξηση της διαπερατότητας στο συσσωρευόμετρο μετά από ενεργοποίηση των πλυμένων αιμοπεταλίων με το ιονοφόρο Ca^{2+} -A23187 (10 μ M), παρουσία και απουσία του RGDS (230 μ M). Τα πειράματα έγιναν εις τριπλούν.



Εικόνα 43: Τυπικές κυτταρομετρικές εικόνες στις οποίες απεικονίζεται η επίδραση του RGDS (230 μ M) στην επαγόμενη από το ιονοφόρο Ca^{2+} -A23187 (10 μ M) παραγωγή των PMPs από πλυμένα αιμοπετάλια ανθρώπου. Τα πειράματα έγιναν εις τριπλούν.

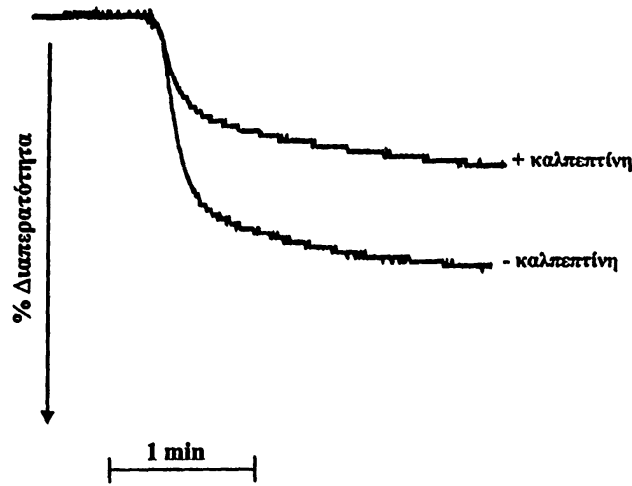




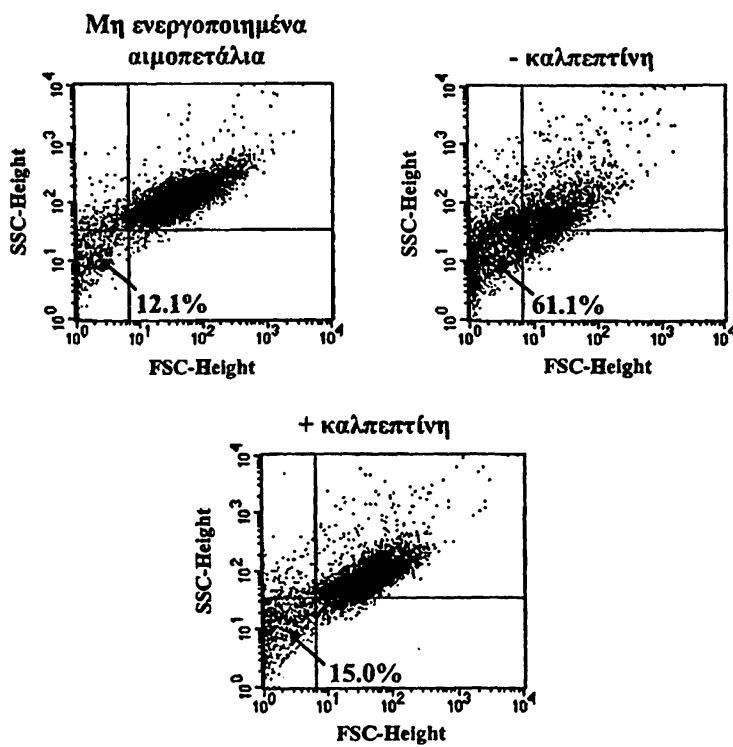
Εικόνα 44: Επίδραση του RGDS (230 μM) στην επαγόμενη από το ιονοφόρο Ca^{2+} -A23187 (10 μM) έκκριση της PAF-AH από πλυμένα αιμοπετάλια ανθρώπου. Τα αποτελέσματα εκφράζουν την μέση τιμή \pm SD. Τα πειράματα έγιναν εις τριπλούν.

Ο επόμενος προβληματισμός που τέθηκε ήταν σχετικά με το ποια είναι η σχέση της παραγωγής των PMPs με την έκκριση της PAF-AH. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήσαμε την καλπεπτίνη, έναν ειδικό αναστολέα της καλπαΐνης η όποια διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην παραγωγή των PMPs [141,504]. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 45, η καλπεπτίνη (300 μM), μετά από 30 min επώασης με τα αιμοπετάλια, παρουσίασε μια ανασταλτική δράση στην επαγόμενη από ιονοφόρο Ca^{2+} -A23187 αύξηση της διαπερατότητας στο συσσωρευόμετρο. Η δράση της καλπεπτίνης στην παραγωγή των PMPs φαίνεται από το κυτταρομετρικό προφίλ των αιμοπεταλίων (Εικόνα 46) όπου απουσία αυτής, το 61.1% των κυττάρων εκφράζουν το CD61 και βρέθηκαν στην κάτω αριστερή περιοχή του ιστογράμματος FSC vs SSC έναντι του 15.0% των κυττάρων παρουσία της καλπεπτίνης. Επιπρόσθετα, στην Εικόνα 47 απεικονίζεται η δράση της καλπεπτίνης στην έκκριση της PAF-AH. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα παρατηρήθηκε σημαντική μείωση της έκκρισης της PAF-AH παρουσία της καλπεπτίνης σε σύγκριση με το αντίστοιχο δείγμα απουσία αυτής (640 ± 60 pmol/10⁹ κύτταρα/h απουσία και 20 ± 7 pmol/10⁹ κύτταρα/h παρουσία της καλπεπτίνης, αντίστοιχα $P < 0.01$).



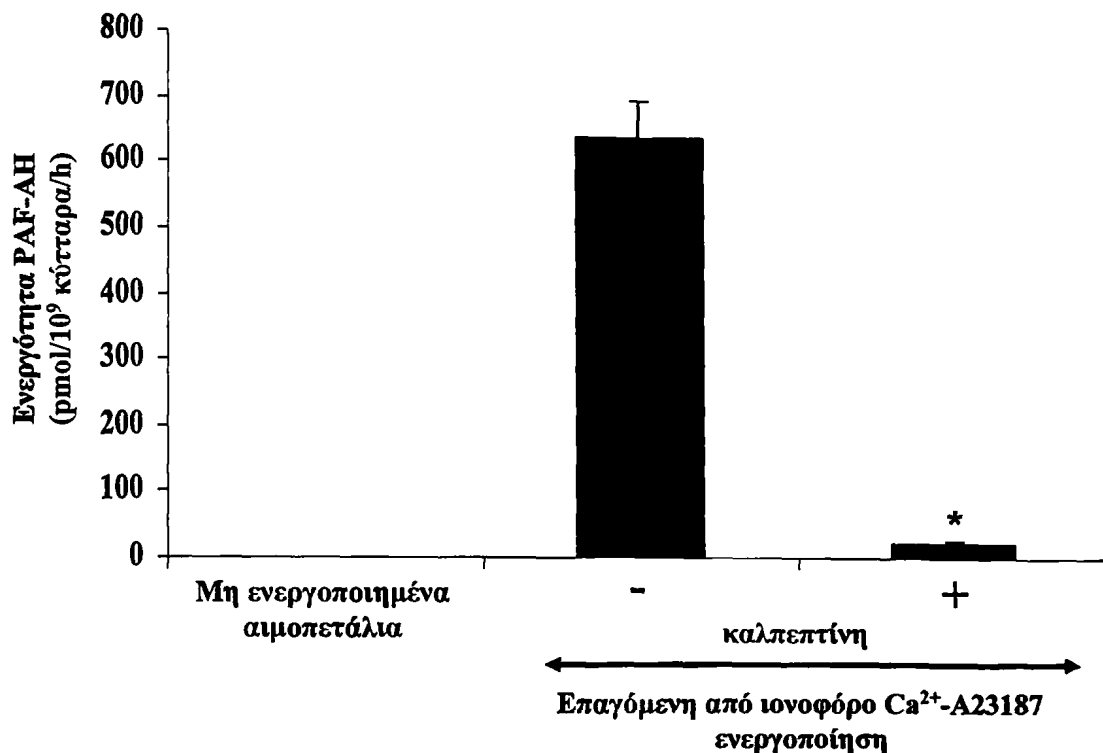


Εικόνα 45: Αύξηση της διαπερατότητας στο συσσωρευόμετρο μετά από ενεργοποίηση των πλυμένων αιμοπεταλίων με το ιονοφόρο Ca^{2+} -A23187 (10 μM), παρουσία και απουσία την καλπεπτίνη (300 μM). Τα πειράματα έγιναν εις τριπλούν.



Εικόνα 46: Επίδραση της καλπεπτίνης (300 μM) στην επαγόμενη από το ιονοφόρο Ca^{2+} -A23187 (10 μM) παραγωγή των PMPs από πλυμένα αιμοπετάλια ανθρώπου. Τα πειράματα έγιναν εις τριπλούν.



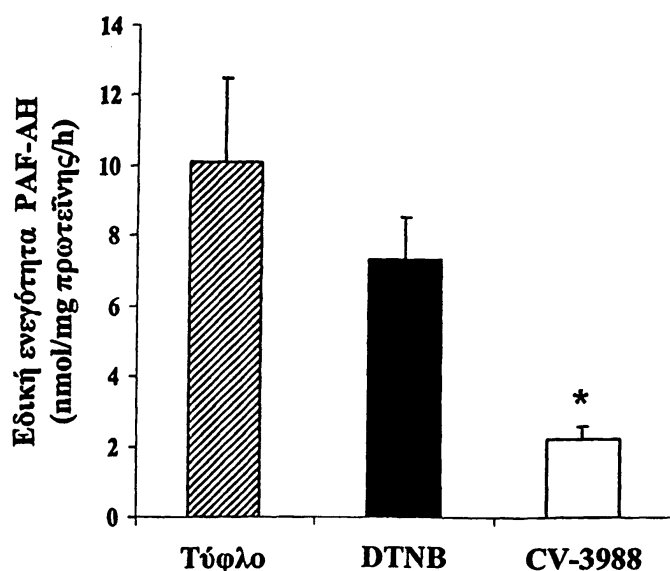


Εικόνα 47: Επίδραση της καλπεπτίνης (300 μM) στην επαγόμενη από το ιονοφόρο Ca^{2+} -A23187 (10 μM) έκκριση της PAF-AH από πλυμένα αιμοπετάλια ανθρώπου. Τα αποτελέσματα εκφράζουν την μέση τιμή \pm SD. * $P < 0.01$ συγκρινόμενο με απουσία της καλπεπτίνης. Τα πειράματα έγιναν εις τριπλούν.

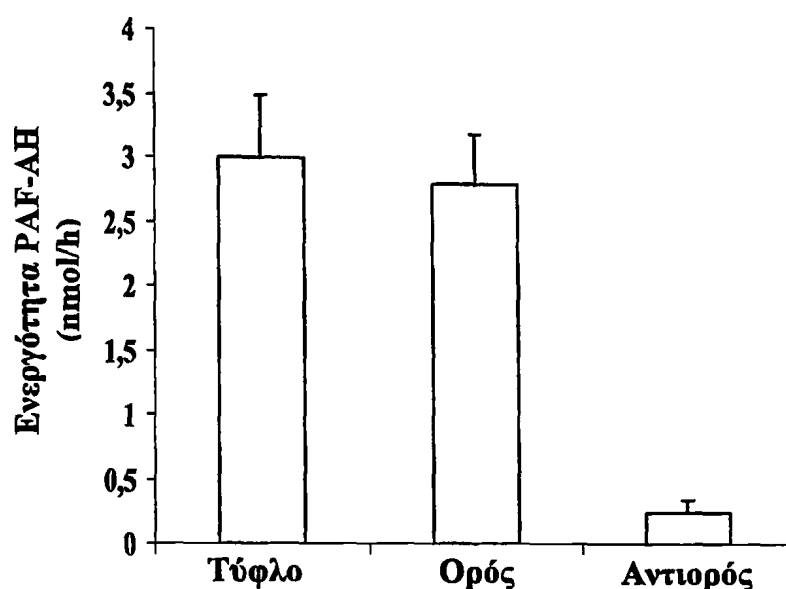
Χαρακτηρισμός της PAF-AH των PMPs

Στην συνέχεια θελήσαμε να διαπιστώσουμε αν τα PMPs τα όποια απομονώθηκαν μετά από ενεργοποίηση με ιονοφόρο Ca^{2+} -A23187 εκφράζουν ενεργότητα PAF-AH. Απομονώσαμε PMPs μετά από υπερφυγοκέντρηση του υπερκείμενου των ενεργοποιημένων αιμοπεταλίων και προσδιορίσαμε την ενεργότητα της PAF-AH τόσο στο κυτταρόλυμα όσο και στα PMPs. Τα PMPs εμφανίζουν μεγαλύτερη ειδική ενεργότητα σε σχέση με το κυτταρόλυμα (10.1 ± 2.4 nmol/mg πρωτεΐνης/h vs 4.9 ± 0.3 nmol/mg πρωτεΐνης/h, αντίστοιχα, $p < 0.01$, $n = 7$). Το CV-3988 σε συγκέντρωση 30 μM ανέστειλε την συσχετιζόμενη με τα PMPs ενεργότητα PAF-AH, αντίθετα το DTNB σε συγκέντρωση 1 mM δεν επηρέασε την ενεργότητα των PMPs (Εικόνα 48).

Τα αποτελέσματα αυτά υποδηλώνουν ότι τα PMPs παρουσιάζουν ενεργότητα PAF-AH όμοια με εκείνη του πλάσματος. Στην συνέχεια χαρακτηρίσαμε την PAF-AH των PMPs με πειράματα ανοσοκαταβύθισης χρησιμοποιώντας πολυκλωνικό αντιγόνο από κουνέλια που αναγνωρίζει την ανασυνδυασμένη PAF-AH του πλάσματος. Η ενεργότητα καταβυθίστηκε παρουσία του αντιγόνου, ένδειξη ότι η PAF-AH των PMPs έχει χαρακτηριστικά παρόμοια με την PAF-AH του πλάσματος (Εικόνα 49).



Εικόνα 48: Η επίδραση των CV-3988 (30 μ M) ή των DTNB (1 mM) στην ενεργότητα της PAF-AH που εκφράζουν τα PMPs. Οι τιμές εκπροσωπούν την μέση τιμή \pm SD από 7 πειράματα. * $P < 0.02$ συγκρινόμενο με το τυφλό.



Εικόνα 49: Ανοσοκαταβύθιση της PAF-AH του πλάσματος χρησιμοποιώντας πολυκλωνικό αντιορρό από κουνέλια που αναγνωρίζει την ανασυνδυασμένη PAF-AH του πλάσματος. Οι τιμές εκπροσωπούν την μέση τιμή±SD από 3 πειράματα.

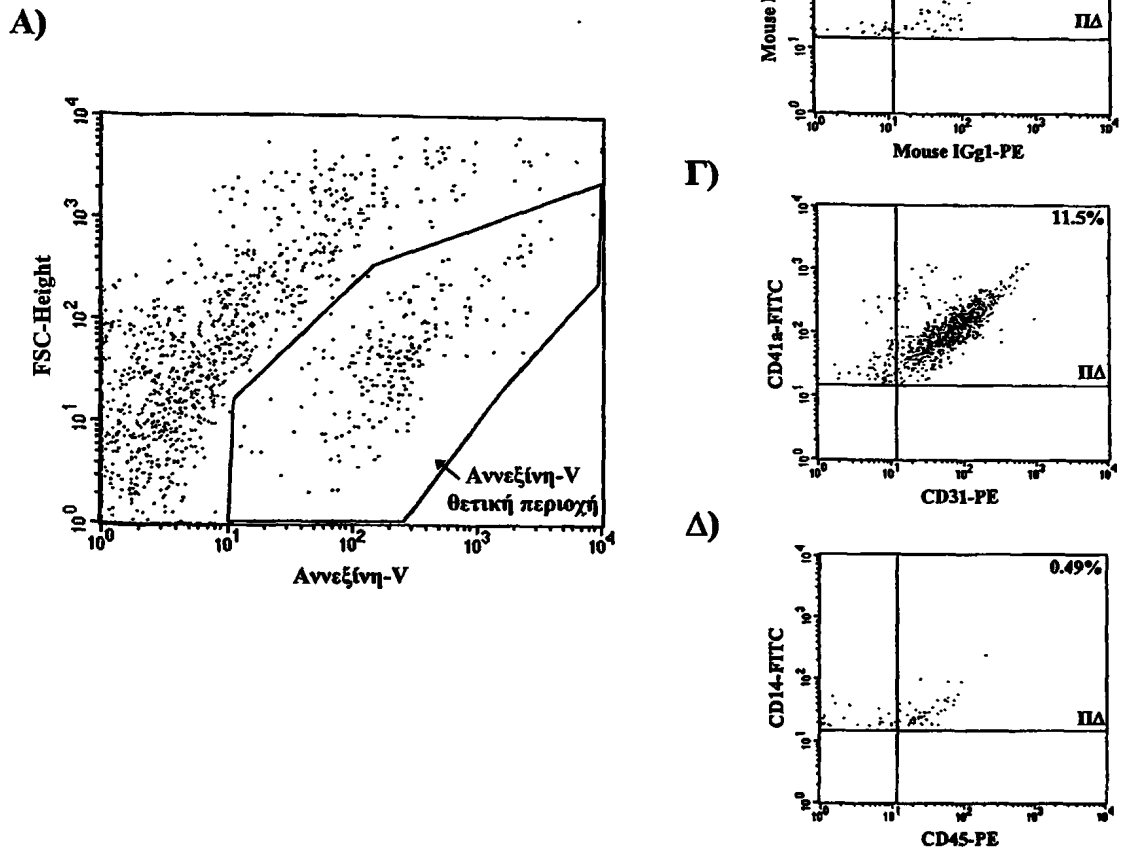
Τα PMPs του πλάσματος είναι φορείς της PAF-AH

Τα παραπάνω αποτελέσματα δείχνουν ότι τα PMPs που παράγονται από τα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια *in vitro* είναι εμπλουτισμένα με PAF-AH του πλάσματος. Όμως είναι αδιευκρίνιστο αν τα PMPs της κυκλοφορίας παρουσιάζουν ενεργότητα PAF-AH *in vivo*. Για να διερευνήσουμε αν υπάρχει συσχέτιση μεταξύ της PAF-AH και των PMPs *in vivo*, παρασκευάσαμε πλάσμα από νορμολιπιδαιμικούς ασθενείς. Αρχικά τόσο ο πληθυσμός όσο και την προέλευση των μικροσωματιδίων χαρακτηρίστηκε με κυτταρομετρία ροής. Το μικροσωματίδια του πλάσματος έδειξαν μια τυπική εικόνα κυτταρομετρίας ροής με βάση το προφίλ τους FSC vs SSC. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, το 11±3% του πληθυσμού ήταν θετικό για την αννεξίνη-V. Ο πληθυσμός των μικροσωματιδίων χαρακτηρίστηκε επιπλέον με χρήση διαφόρων φθορισμένων αντισωμάτων που αναγνωρίζουν αντιγόνα χαρακτηριστικά των διαφόρων κυττάρων που παράγουν μικροσωματίδια. Μεταξύ των θετικών σε αννεξίνη-V μικροσωματιδίων, το 89±3% εκφράζουν το CD41a και το CD31 ενώ το 11±2% εκφράζουν μόνο το CD41a. Δεν βρέθηκε θετικότητα για το CD45 (ειδικό αντιγόνο για τα λευκοκύτταρα) ή για το CD14 (ειδικό αντιγόνο για τα μονοκύτταρα) μεταξύ των μικροσωματιδίων που



εκφράζουν αννεξίνη-V. Είναι γνωστό ότι το CD41a είναι δείκτης για τα PMPs διότι αναγνωρίζει την $\alpha_{IIb}\beta_3$ υπομονάδα της ιντεγκρίνης $\alpha_{IIb}\beta_3$ που βρίσκεται στην επιφάνεια των PMPs ενώ το CD31 (PECAM-1) χαρακτηρίζει τόσο τα PMPs όσο και τα μικροσωματίδια που προέρχονται από τα ενδοθηλιακά κύτταρα. Σύμφωνα με τα αποτελέσματά μας τα μικροσωματίδια τα οποία βρίσκονται στο πλάσμα είναι κυρίως PMPs ένα εύρημα που είναι σε συμφωνία με προηγούμενες μελέτες από άλλους ερευνητές [319]. Επιπρόσθετα, αυτό τον πληθυσμό των μικροσωματιδίων που ήταν αρνητικός προς την αννεξίνη-V το $5\pm 1\%$ βρέθηκε να είναι θετικός για το CD31, ενώ δεν υπήρχε θετικότητα ως προς τα CD41a, CD45 και CD14. Τα αποτελέσματα μας είναι σε συμφωνία με αυτά άλλων ερευνητών [320] οι οποίοι έχουν δείξει ότι τα μικροσωματίδια των ενδοθηλιακών κυττάρων δεν εκφράζουν θετικότητα προς την αννεξίνη-V. Η μη-ειδική πρόσδεση των αντισωμάτων μελετήθηκε χρησιμοποιώντας τα μονοκλωνικά IgG αντισώματα επισημασμένα με FITC και με PE και βρέθηκε ότι η μη-ειδική πρόσδεση ήταν αμελητέα.

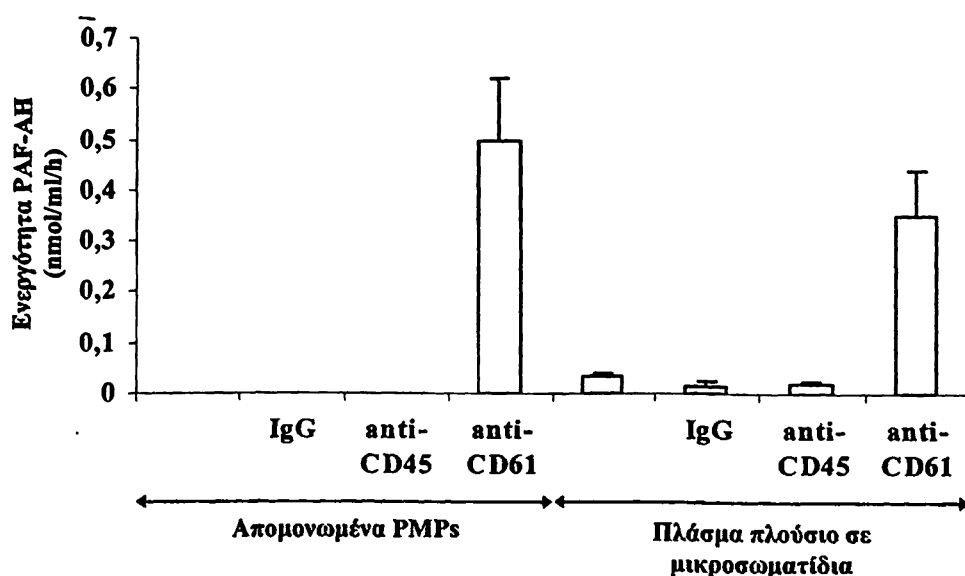




Εικόνα 50: Αντιπροσωπευτικό κυτταρομετρικό προφίλ των μικροσωματιδίων του πλάσματος όπου φαίνονται τα θετικά προς αννεξίνη-V μικροσωματίδια (A). Η περιοχή που βρίσκεται πάνω και δεξιά (PIA) είναι η περιοχή που είναι θετικά προς και τα δύο αντισώματα που μελετάμε. Η μη-ειδική πρόσδεση των IgG αντισωμάτων (B). Τα PMPs (Γ) και τα μικροσωματίδια που προέρχονται από τα λευκοκύτταρα (Δ). Οι τιμές εκπροσωπούν το επί τοις % της συνολικής έκφρασης για όλο τον πληθυσμό.

Σύμφωνα με τα παραπάνω αποτελέσματά μας τα μικροσωματίδια που βρίσκονται στο πλάσμα αποτελούνται κυρίως από PMPs αλλά το ερώτημα που παραμένει είναι αν τα PMPs εκφράζουν ενεργότητα PAF-AH *in vivo*. Για το σκοπό αυτό αναπτύχθηκε μια νέο μέθοδος ELISA για την ανίχνευση της PAF-AH στον πληθυσμό των μικροσωματιδίων του πλάσματος. Χρησιμοποιώντας την μέθοδο αυτή ανιχνεύσαμε ενεργότητα PAF-AH στις θέσεις της πλάκας που περιείχαν το anti-CD61 αντίσωμα (Εικόνα 51). Είναι γνωστό ότι το CD61 είναι ένα ειδικό αντιγόνο που αντιστοιχεί στην β_3 υπομονάδα της ιντερκρίνης $\alpha_{IIb}\beta_3$, οπότε μικροσωματίδια που εκφράζουν τον υποδοχέα αυτό θα κατακρατηθούν στις θέσεις που

στο πλακίδιο ELISA περιέχουν ακινητοποιημένο το anti-CD61. Αντίθετα στις θέσεις που περιείχαν αντισώματα χαρακτηριστικά για άλλα κύτταρα (CD45 και CD14) δεν ανιχνεύτηκε ενεργότητα της PAF-AH. Το ίδιο φαινόμενο παρατηρήθηκε και στα απομονωμένα PMPs από το υπερκείμενο ενεργοποιημένων αιμοπεταλίων τα οποία εκφράζουν ενεργότητα PAF-AH μόνο στις θέσεις οι οποίες είχαν επικαλυφθεί με το anti-CD61. Τα παραπάνω αποτελέσματα δείχνουν για πρώτη φορά ότι τα PMPs που κυκλοφορούν στο αίμα εκφράζουν ενεργότητα PAF-AH και αποτελούν το μεγαλύτερο ποσοστό μικροσωματιδίων στην κυκλοφορία.



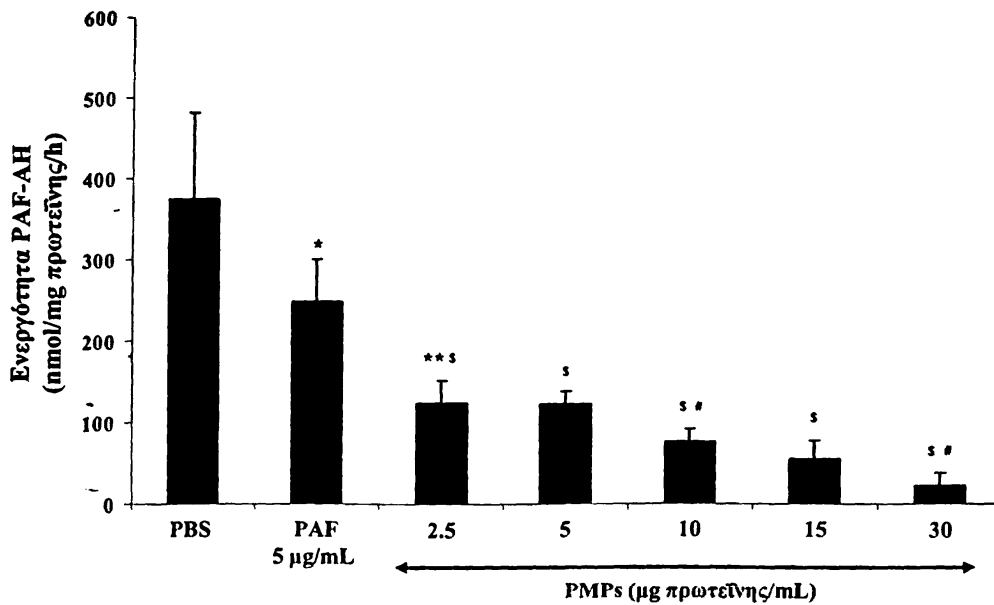
Εικόνα 51: Η ανίχνευση της ενεργότητας της PAF-AH σε PMPs *in vivo* πραγματοποιήθηκε με ELISA. Ειδικά πλακίδια ELISA επικαλυφτήκαν με διάφορα μονοκλωνικά αντισώματα (anti-CD61, anti-CD45 ή το ισotypικό IgG). Η επικάλυψη έγινε στους 4°C για 12 h. 100μL από το πλάσμα πλούσιο σε μικροσωματίδια ή PMPs (150 μg πρωτεΐνης/mL) που παρασκευάστηκαν από ενεργοποιημένα αιμοπετάλια, επώαστηκαν στα πηγαδάκια για 2h στους 37°C. Το πλακίδιο ξεπλύθηκε 3 φορές με διάλυμα HEPES που περιέχει 0.01% EDTA (το διάλυμα της PAF-AH) και η ενεργότητα προσδιορίστηκε σε κάθε πηγαδάκι με την μέθοδο ιζηματοποίησης με TCA. Οι τιμές εκπροσωπούν την μέση τιμή±SD από 10 διαφορετικά πλάσματα.

Η επίδραση των PMPs στα μονοκύτταρα

Τα PMPs περιέχουν διάφορα βιολογικά δραστικά συστατικά. Στην εργασία αυτή δείξαμε ότι τα PMPs που παράγονται από τα ανθρώπινα αιμοπετάλια μετά από την ενεργοποίηση με το ιονοφόρο Ca^{2+} -A23187 περιέχουν τόσο PAF όσο και PAF-AH όμοια με αυτή του πλάσματος. Ο PAF είναι ένας ισχυρός διαμεσολαβητής της φλεγμονής. Δρα σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις (10^{-10} - 10^{-12} M). Ο PAF ενεργοποιεί τα λευκοκύτταρα και τα αιμοπετάλια και προκαλεί την προσκόλληση των λευκοκυττάρων στο αρτηριακό τοίχωμα. Επιπρόσθετα, ο PAF είναι ένας αγγειοδραστικός διαμεσολαβητής ο οποίος μπορεί να συντίθεται τοπικά σε σημεία βλάβης του ενδοθηλίου. Επιπλέον, ο PAF παράγεται κατά τη διάρκεια της οξείδωσης της LDL και πιστεύεται ότι διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στο σχηματισμό των αθηρωματικών πλακών. Η PAF-AH επομένως υδρολύοντας τον PAF μπορεί να δρα ως αντιαθηρογόνο ένζυμο. Επίσης είναι γνωστό ότι η κυρία πηγή της PAF-AH του πλάσματος είναι τα μονοκύτταρα.

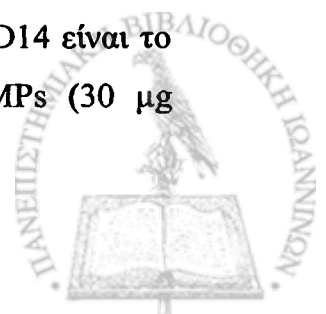
Διερευνήθηκε λοιπόν η επίδραση των PMPs στην έκκριση της PAF-AH από καλλιέργειες μονοκυττάρων περιφερικού αίματος. Τα PMPs χρησιμοποιήθηκαν σε συγκεντρώσεις από 2.5 έως 30 μg πρωτεΐνης/mL. Παρατηρήθηκε ότι τα PMPs ανέστειλαν την έκκριση του ενζύμου σε σύγκριση με το τυφλό με δόσο-εξαρτώμενο τρόπο (Εικόνα 52). Αυξανόμενης της συγκέντρωσης του PMPs παρατηρήθηκε μείωση της ενεργότητας PAF-AH που εκκρίθηκε στο υπερκείμενο των κυττάρων μετά από επώαση 24 h. Επιπρόσθετα, ο PAF στην συγκέντρωση που χρησιμοποιήθηκε έδειξε μια σημαντική μείωση στην έκκριση της PAF-AH από τα μονοκύτταρα, ένα εύρημα που είναι σε συμφωνία με προηγούμενες μελέτες από άλλους ερευνητές [505].



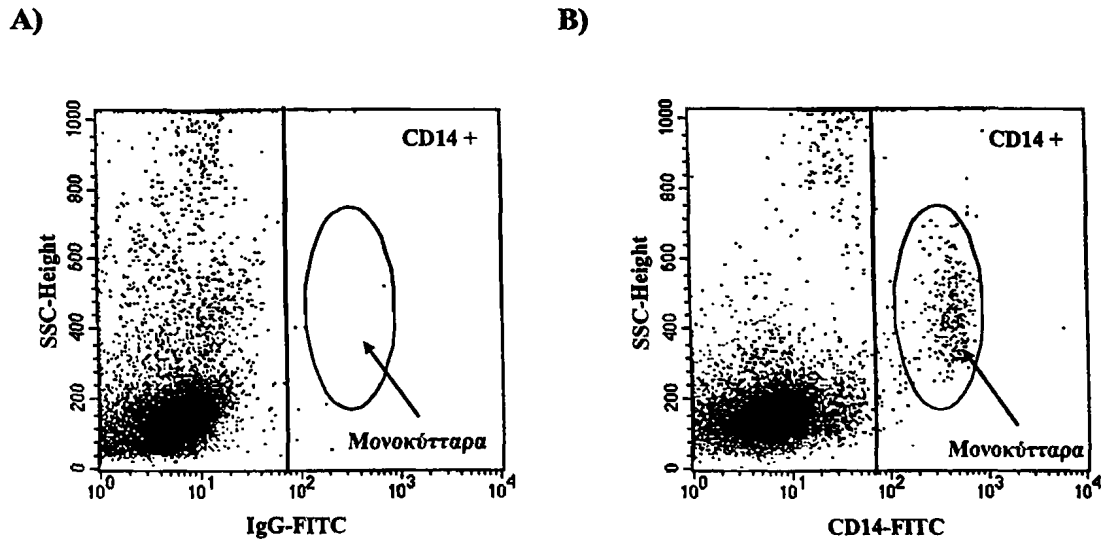


Εικόνα 52: Η επίδραση των PMPs στην έκκριση της PAF-AH από τα μονοκύτταρα. * $P < 0.05$ σε σύγκριση με το PBS; ** $P < 0.02$ σε σύγκριση με του PAF (5 µg/mL); [§] $P < 0.001$ σε σύγκριση με το PBS, με του PAF (5 µg/mL), με τα PMPs (2.5 µg πρωτεΐνης/mL), με τα PMPs (5 µg πρωτεΐνης/mL), με τα PMPs (10 µg πρωτεΐνης/mL), και με τα PMPs (15 µg πρωτεΐνης/mL); # $P < 0.006$ σε σύγκριση με τα PMPs (2.5 µg πρωτεΐνης/mL) και με τα PMPs (10 µg πρωτεΐνης/mL).

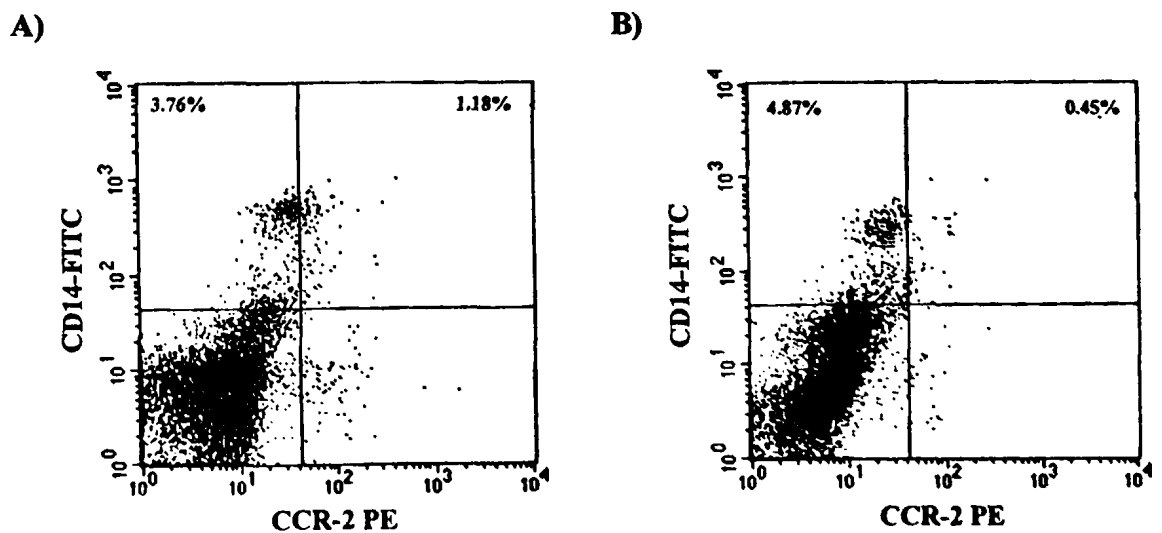
Στην συνέχεια θέλαμε να δούμε αν τα PMPs επηρεάζουν την έκφραση του CCR2 στα μονοκύτταρα. Υπενθυμίζοντας ότι ο CCR2 είναι ο υποδοχέας της MCP-1 και διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην διαδικασία του χημειοτακτισμού των μονοκυττάρων. Απομονώσαμε ένα πληθυσμό λευκοκυττάρων, πλούσιο σε μονοκύτταρα και λεμφοκύτταρα από περιφερικό φλεβικό αίμα όπως περιγράφεται στην μεθοδολογία και επιδράσαμε στα κύτταρα αυτά PMPs (30 µg πρωτεΐνης/mL) για 1 h στους 37°C. Αρχικά ταυτοποιήσαμε τα μονοκύτταρα με κυτταρομετρία ροής με βάση την έκφραση του CD14 (γενικός δείκτης μονοκυττάρων). Όπως φαίνεται στην Εικόνα 53A και B ο πληθυσμός των μονοκυττάρων εκφράζει θετικότητα για το CD14 ενώ στην αντίστοιχη περιοχή του αρνητικού δείγματος έλεγχου δεν υπάρχουν κύτταρα αφού δεν εμφανίζονται παρουσία του μη ειδικού IgG αντισώματος. Στην συνέχεια, αναλύσαμε τα δείγματα αυτά με βάση την έκφρασή τους στο CD14 και του CCR2. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 54A μετά από την επίδραση με PAF (100 nM) υπήρχε ένας πληθυσμός που ήταν θετικός τόσο για το CD14 όσο και για το CCR2 (η περιοχή που είναι πάνω δεξιά στο ιστόγραμμα). Επιπλέον, το ποσοστό των μονοκυττάρων που εκφράζουν μονό CD14 είναι το 3.76% των απομονωθέντων λευκοκυττάρων. Αντίθετα, η επίδραση των PMPs (30 µg



πρωτεΐνης/mL) στα μονοκύτταρα μείωσε το ποσοστό που εκφράζει τόσο το CD14 αλλά όσο και το CCR2 στην πάνω δεξιά περιοχή του ιστογράμματος. Ενώ αυξήθηκε ο πληθυσμός που εκφράζει μόνο το CD14. Επιπρόσθετα, δεν υπήρχε έκφραση του CCR2 απουσία αγωνιστή. Συνεπώς, τα PMPs ανέστειλαν την έκκριση της PAF-AH από τα μονοκύτταρα με δόσο-εξαρτώμενο τρόπο άλλα προκάλεσαν και μείωση στην έκφραση του CCR2 στα μονοκύτταρα.



Εικόνα 53: Η ταυτοποίηση των μονοκυττάρων σε ολικό πληθυσμό λευκοκυττάρων. Α) αρνητικού δείγμα έλεγχου IgG-FITC και Β) το CD14-FITC.



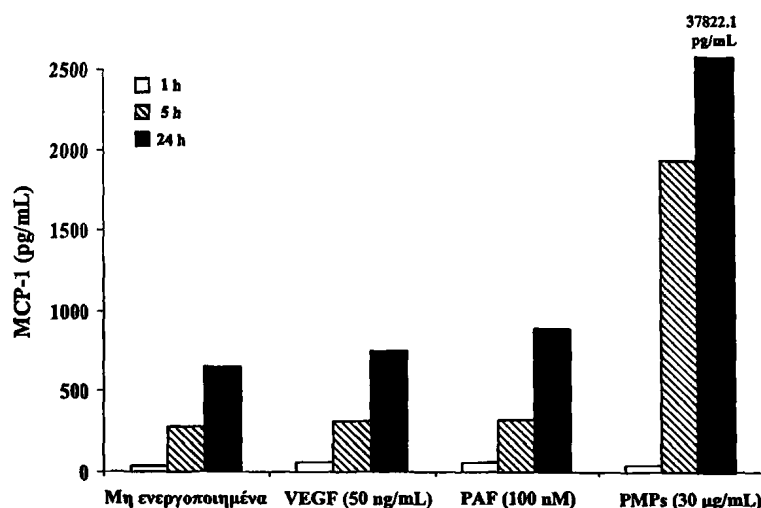
Εικόνα 54: Η επίδραση του PAF (Α) και των PMPs (Β) στην έκφραση των CCR2 των μονοκυττάρων.

Η επίδραση των PMPs στα ενδοθηλιακά κύτταρα

Είναι γνωστό ότι η αλληλεπίδραση των αιμοπεταλίων με το ενδοθήλιο οδηγεί στην ενεργοποίηση αυτών [290,291], αφού επάγει την έκφραση διαφόρων φλεγμονωδών μορίων, όπως το ICAM-1 (CD54), το VCAM-1 (CD106) καθώς και την έκκριση της MCP-1 [292]. Η αλληλεπίδραση των ενεργοποιημένων αιμοπεταλίων με τα ενδοθηλιακά κύτταρα έχει ως αποτέλεσμα την έκφραση του ICAM-1 αλλά και την έκκριση του MCP-1 [294]. Επιπρόσθετα, μια πρόσφατη μελέτη έδειξε ότι τα PMPs επάγουν την έκφραση του ICAM-1 στα ενδοθηλιακά κύτταρα, με αποτέλεσμα την προσκόλληση των λευκοκυττάρων στο ενεργοποιημένο ενδοθήλιο [312]. Επίσης μελέτες έχουν δείξει ότι διάφοροι αγωνιστές επάγουν την έκφραση των μορίων αυτών όπως η θρομβίνη [506,507] και ο αυξητικός παράγοντας των ενδοθηλιακών κυττάρων του αγγείου (Vascular Endothelial Growth Factor, VEGF) [508]. Τα ενδοθηλιακά κύτταρα εκφράζουν σε μόνιμη βάση ένα ποσοστό του ICAM-1 στην επιφάνεια τους ενώ ο VCAM-1 εκφράζεται μόνο κατά την ενεργοποίηση των κυττάρων αυτών.

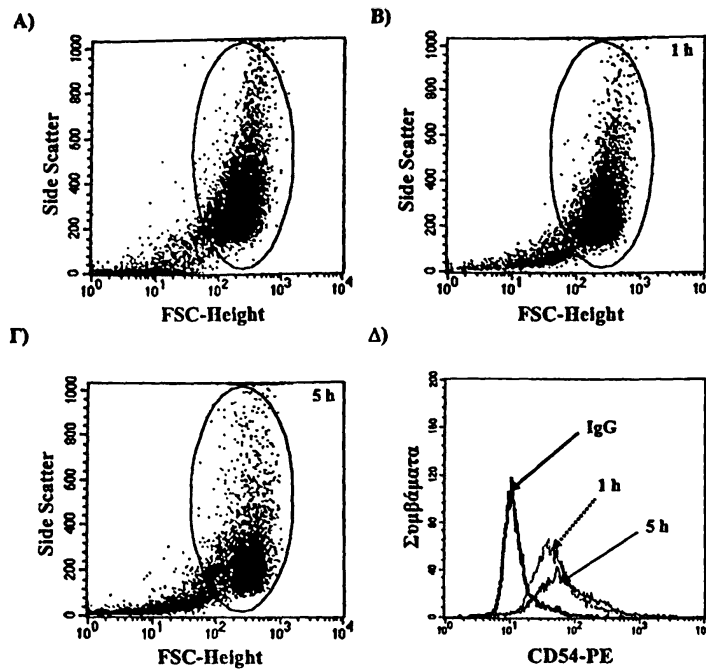
Στη συνέχεια της μελέτης θέλαμε να δούμε την επίδραση των PMPs απομονωμένα μετά από ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων με το ιονοφόρο Ca^{2+} -A23187 στην ενεργοποίηση των ενδοθηλιακών κυττάρων. Απομονώσαμε ενδοθηλιακά κύτταρα από ομφάλιο λώρο, όπως περιγράφεται στην μεθοδολογία, και στην συνέχεια επδράσαμε στα κύτταρα αυτά PAF (100 nM), VEGF (50 ng/mL) και PMPs (30 μg πρωτεΐνης/mL) για 1, 5 και 24 h. Τα ενδοθηλιακά κύτταρα που χρησιμοποιήθηκαν στην μελέτη αυτή ήταν 1^{ης} ως 3^{ης} ανακαλλιέργειας. Στην συνέχεια προσδιορίσαμε την έκκριση της MCP-1 με ELISA. Σύμφωνα με τα αποτελέσματά μας, τα ενδοθηλιακά κύτταρα εκκρίνουν αυθόρμητα μια ποσότητα MCP-1 ανεξάρτητα από την παρουσία αγωνιστών (Εικόνα 55). Επίσης παρουσία τόσο του PAF (100 nM) όσο και του VEGF (50 ng/mL) δεν παρατηρήθηκε μεταβολή της αυθόρμητης έκκρισης της MCP-1 σε σχέση με τα μη ενεργοποιημένα ενδοθηλιακά κύτταρα. Επιπρόσθετα, τα PMPs (30 μg πρωτεΐνης/mL) επάγουν την έκκριση του MCP-1 σε σύγκριση με αυτή που παρατηρείται είτε απουσία αγωνιστή ή παρουσία τόσο του PAF (100 nM) όσο και του VEGF (50 ng/mL) (Εικόνα 55). Με βάση τα παραπάνω αποτελέσματα η ενεργοποίηση για 5 h είναι αρκετός χρόνος για να δούμε την δράση των PMPs στην έκφραση και έκκριση των ενδοθηλιακών κυττάρων.



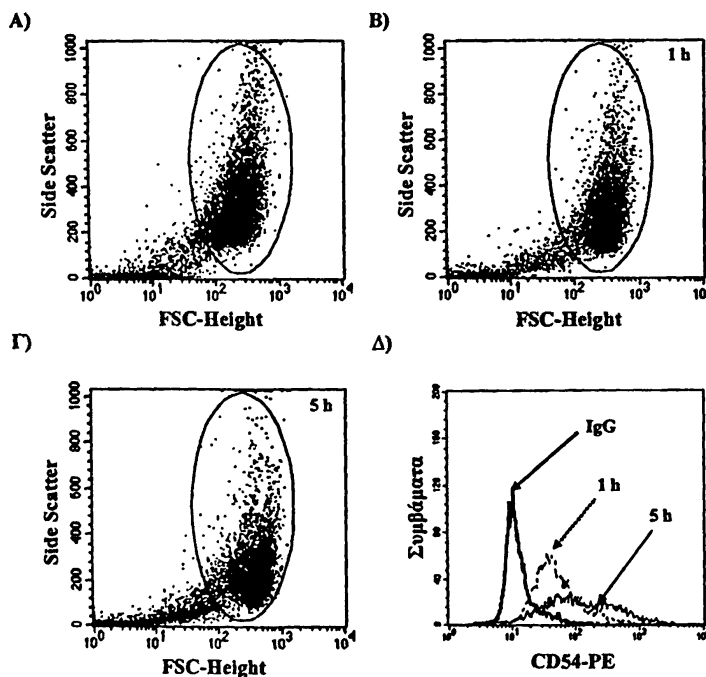


Εικόνα 55: Η επίδραση διαφόρων αγωνιστών και PMPs στην έκκριση της MCP-1 στα ενδοθηλιακά κύτταρα.

Υπό τις παραπάνω πειραματικές συνθήκες, μελετήσαμε στη συνέχεια τη δράση των PMPs στη μεμβρανική έκφραση του προσκολλητικού μορίου CD54 (ICAM-1) στα ενδοθηλιακά κύτταρα. Αρχικά επιδράσαμε PAF (100 nM) στα ενδοθηλιακά κύτταρα και προσδιορίσαμε την έκφραση του ICAM-1 με χρήση κυτταρομετρίας ροής. Ο PAF προκάλεσε μια σημαντική αύξηση στην έκφραση του ICAM-1 μετά από 5 h ενεργοποίησης με MFI 105.62 (Εικόνα 56). Παράλληλα τα PMPs στην συγκέντρωση των 30 µg πρωτεΐνης/mL προκάλεσαν μια σημαντική αύξηση της έκφρασης του ICAM-1 μετά από 5 h ενεργοποίησης με MFI 202.27 (Εικόνα 57). Επιπλέον, η έκφραση του ICAM-1 παρουσία των PMPs ήταν διπλάσια σε σχέση με αυτή που παρατηρείται παρουσία του PAF. Αντίθετα, στην 1 h δεν υπήρχαν σημαντικές διαφορές ως προς την έκφραση του ICAM-1 τόσο στα ενεργοποιημένα με PAF όσο και στα ενεργοποιημένα με PMPs ενδοθηλιακά κύτταρα. Η επιφανειακή έκφραση του ICAM-1 στα ενδοθηλιακά κύτταρα βασίζεται στην μεταγραφή και μετάφραση του mRNA μετά από την επίδραση του αγωνιστή. Η έκφραση του ICAM-1 είναι ανιχνεύσιμη μετά από 4 h ενεργοποίησης ενώ η μέγιστη έκφραση του ICAM-1 γίνεται μετά από 16-24 h [509]. Τα αποτελέσματα αυτά είναι συμβατά με τα ευρήματα αυτής της μελέτης.

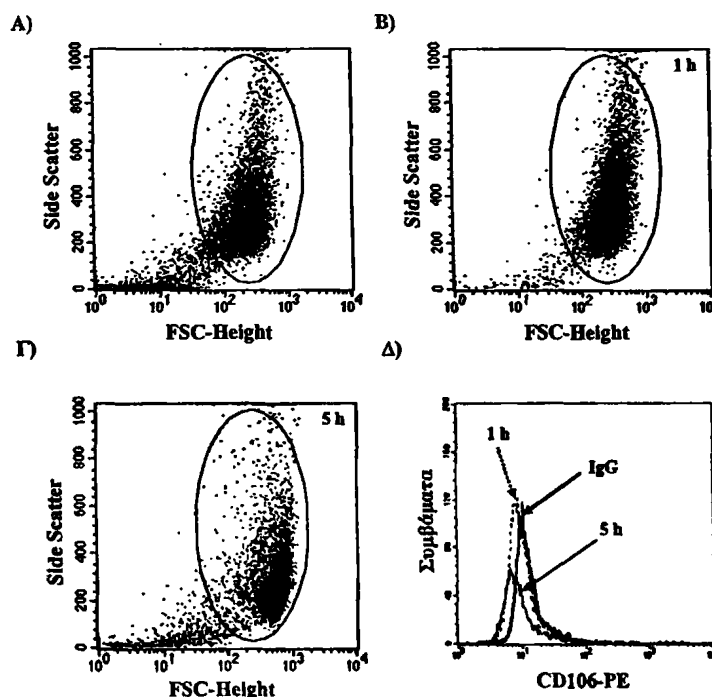


Εικόνα 56: Αντιπροσωπευτική εικόνα κυτταρομετρίας ροής που δείχνει την ενεργοποίηση των ενδοθηλιακών κυττάρων παρουσία του PAF (100 nM). Α) παρουσία του IgG Β) μετά από 1 h ενεργοποίηση με PAF Γ) μετά από 5 h ενεργοποίηση με PAF Δ) αντιπροσωπευτικό ιστόγραμμα που δείχνει την έκφραση του CD54 (ICAM-1), παρουσία PAF.

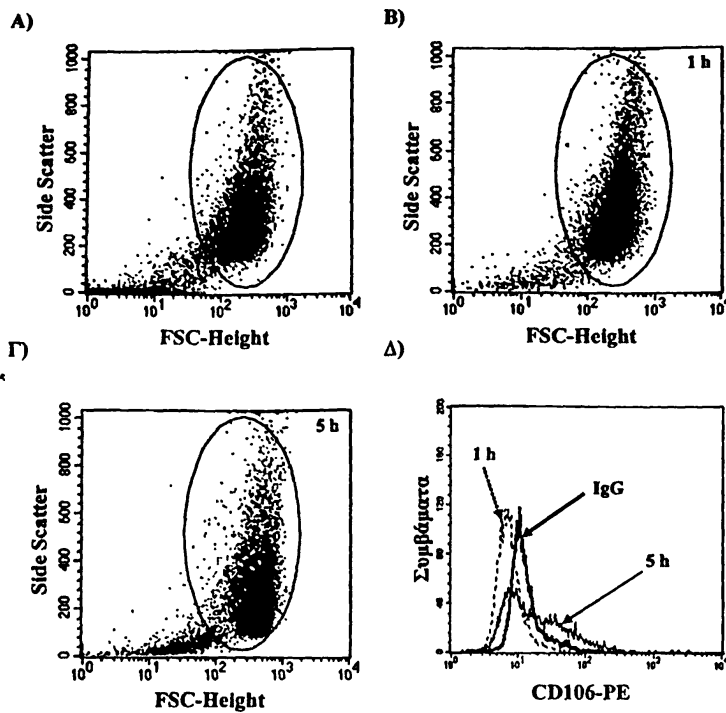


Εικόνα 57: Αντιπροσωπευτική εικόνα κυτταρομετρίας ροής που δείχνει την ενεργοποίηση των ενδοθηλιακών κυττάρων παρουσία των PMPs (30 μg πρωτεΐνης/mL). Α) παρουσία του IgG Β) μετά από 1 h ενεργοποίηση με PMPs Γ) μετά από 5 h ενεργοποίηση με PMPs Δ) αντιπροσωπευτικό ιστόγραμμα που δείχνει την έκφραση του CD54 (ICAM-1), παρουσία των PMPs.

Επίσης, προσδιορίσαμε και την έκφραση του CD106 (VCAM-1) στα ενδοθηλιακά κύτταρα παρουσία των PMPs. Παρουσία του PAF (100 nM) δεν επάγεται η έκφραση του CD106 μετά από 5 h ενεργοποίησης με MFI 12.42 (Εικόνα 58). Αντίθετα παρουσία των PMPs (30 µg πρωτεΐνης/mL) υπήρχε μια σημαντική αύξηση της έκφρασης του CD106 μετά από 5 h ενεργοποίησης με MFI 26.28 (Εικόνα 59). Συνεπώς τα PMPs επάγουν τόσο την έκφραση του ICAM-1 όσο και την έκφραση του VCAM-1 στα ενδοθηλιακά κύτταρα.



Εικόνα 58: Αντιπροσωπευτική εικόνα κυτταρομετρίας ροής που δείχνει την ενεργοποίηση των ενδοθηλιακών κυττάρων παρουσία του PAF (100 nM) Α) παρουσία του IgG Β) μετά από 1 h ενεργοποίηση με PAF Γ) μετά από 5 h ενεργοποίηση με PAF Δ) αντιπροσωπευτικό ιστόγραμμα που δείχνει την έκφραση του CD106 (VCAM-1), παρουσία PAF.



Εικόνα 59: Αντιπροσωπευτική εικόνα κυτταρομετρίας ροής που δείχνει την ενεργοποίηση των ενδοθηλιακών κυττάρων παρουσία των PMPs (30 μ g πρωτεΐνης/mL) Α) παρουσία του IgG Β) μετά από 1 h ενεργοποίηση με PMPs Γ) μετά από 5 h ενεργοποίηση με PMPs Δ) αντιπροσωπευτικό ιστόγραμμα που δείχνει την έκφραση του CD106 (VCAM-1), παρουσία PMPs.

Στην συνέχεια, μελετήθηκε η επίδραση των PMPs στην προσκόλληση των μονοκυττάρων σε μονοστοιβάδα καλλιέργειας ενδοθηλιακών κυττάρων. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, τα PMPs δεν επηρεάζουν σημαντικά την προσκόλληση των μονοκυττάρων στα ενδοθηλιακά κύτταρα λόγω κυρίως της μείωσης της έκφρασης του CCR2 που προκαλούν στα μονοκύτταρα. Παράλληλα, μελετήθηκε η έκφραση και η έκκριση προσκολλητικών μορίων και της PAF-AH από τα παραπάνω κύτταρα. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, τα PMPs προκαλούν σημαντική αύξηση της έκφρασης των προσκολλητικών μορίων ICAM-1 και VCAM-1 στα ενδοθηλιακά κύτταρα, ενώ αντίθετα προκαλούν μείωση της έκκρισης της PAF-AH από τα μονοκύτταρα. Τέλος δεν επηρεάζουν την έκφραση της PSGL-1 και CD11a/CD18.

Η αλληλεπίδραση των PMPs με τις λιποπρωτεΐνες του πλάσματος

Η Αλληλεπίδραση των PMPs με την LDL

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

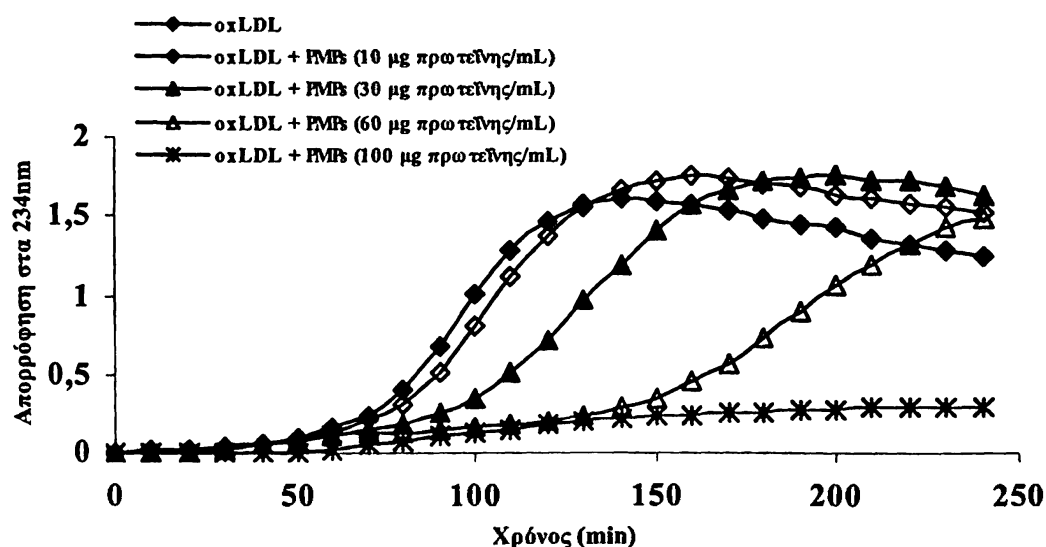
Όπως φαίνεται στον Πίνακα 7 τα PMPs με δόσο-εξαρτώμενο τρόπο προστατεύουν την LDL από την επαγόμενη με Cu^{2+} οξείδωση. Το αποτέλεσμα αυτό συνάγεται από την α) παράταση του λανθάνοντα χρόνου β) τη μείωση του ρυθμού παραγωγής συζυγών διενίων και γ) τη μείωση του συνολικού αριθμού διενίων. Τα PMPs σε συγκέντρωση 100 μg πρωτεΐνης/mL παρουσίασαν πλήρη αναστολή της επαγόμενης από Cu^{2+} οξείδωση της LDL. Στατιστικά σημαντικές διαφορές υπήρχαν στο λανθάνοντα χρόνο οξείδωσης της LDL παρουσία 60 μg πρωτεΐνης/mL PMPs (126.7 ± 20.8 min) και 30 μg πρωτεΐνης/mL (110.0 ± 34.6 min) σε σύγκριση με την οξειδωμένη LDL (oxLDL, 72.5 ± 12.6 min, $P < 0.008$ και $P < 0.05$, αντίστοιχα). Επίσης στατιστικά σημαντικές είναι και οι διαφορές στην μείωση του ρυθμού παραγωγής συζυγών διενίων παρουσία PMPs 60 μg πρωτεΐνης/mL (3.8 ± 0.6 nmol/mg πρωτεΐνης/min) και 30 μg πρωτεΐνης/mL (5.1 ± 1.8 nmol/mg πρωτεΐνης/min) σε σύγκριση με την oxLDL (6.0 ± 0.5 nmol/mg πρωτεΐνης/min, $P < 0.002$ και $P < 0.05$, αντίστοιχα). Στην Εικόνα 60 απεικονίζεται αντιπροσωπευτική δόσο-εξαρτώμενη αναστολή της επαγόμενης από Cu^{2+} οξείδωσης της LDL.



Πίνακας 7: Επίδραση των PMPs στην οξείδωση της LDL.

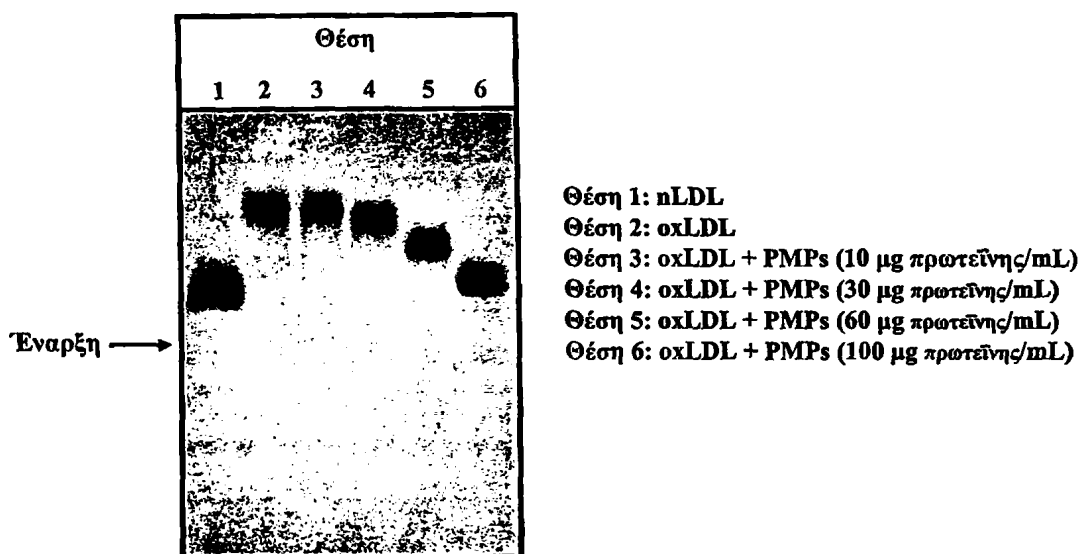
	PMPs (μg/mL)				
	oxLDL	10	30	60	100
Λανθάνων χρόνος (min)	72.5±12.6	77.5±5.0	110.0±34.6*	126.7±20.8**	Πλήρης αναστολή
Ρυθμός παραγωγής συζυγών διενίων (nmol/mg πρωτεΐνης/min)	6.0±0.5	6.1±1.0	5.1±1.8*	3.8±0.6†	Πλήρης αναστολή
Συνολικός αριθμός διενίων (nmol διενίων/mg πρωτεΐνης)	570.4±30.1	649.0±113.5	568.4±179.8	363.2±135.0*	Πλήρης αναστολή
REM	2.09	2.09	1.91	1.64	1.27

Η οξείδωση πραγματοποιήθηκε στους 37°C με επώαση 100 μg/mL LDL σε PBS με 5 μM CuSO₄ παρουσία και απουσία των PMPs σε διαφορετικές συγκεντρώσεις. Η κινητική μελέτη της οξείδωσης έγινε με καταγραφή της απορρόφησης των συζυγών διενίων στα 234 nm κάθε 10 min για 3 h. Η σχετική ηλεκτροφορητική κινητικότητα (REM) μελετήθηκε σε πήκτωμα αγαρόζης. Οι τιμές εκπροσωπούν την μέση τιμή±SD από 4 πειράματα. * $P < 0.05$, ** $P < 0.008$, † $P < 0.002$, συγκρινόμενο με την oxLDL.



Εικόνα 60: Αντιπροσωπευτική δόσο-εξαρτώμενη αναστολή από τα PMPs της επαγόμενης από Cu²⁺ οξείδωσης της LDL. Η κινητική μελέτη της οξείδωσης έγινε με καταγραφή της απορρόφησης των συζυγών διπλών δεσμών στα 234 nm κάθε 10 min για 3 h.

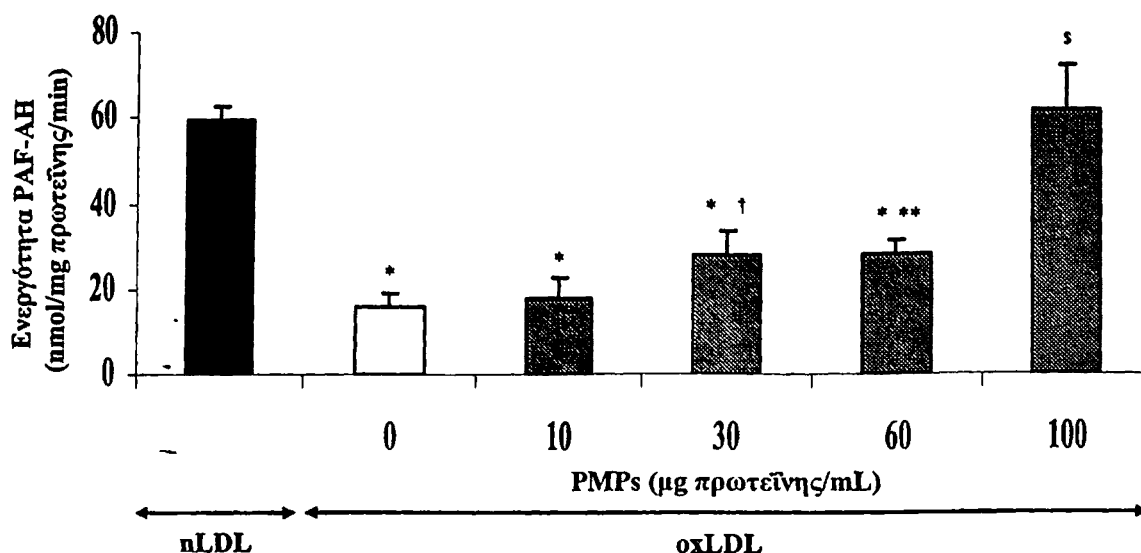
Στην Εικόνα 61 φαίνεται η δόσο-εξαρτώμενη μείωση της σχετικής ηλεκτροφορητικής κινητικότητας (REM) της oxLDL παρουσία των PMPs σε σχέση με τη φυσική LDL (nLDL).



Εικόνα 61: Αντιπροσωπευτική δόσο-εξαρτώμενη αναστολή της REM της oxLDL από τα PMPs.

Ενεργότητα της PAF-AH πριν και μετά την οξείδωση της LDL παρουσία των PMPs

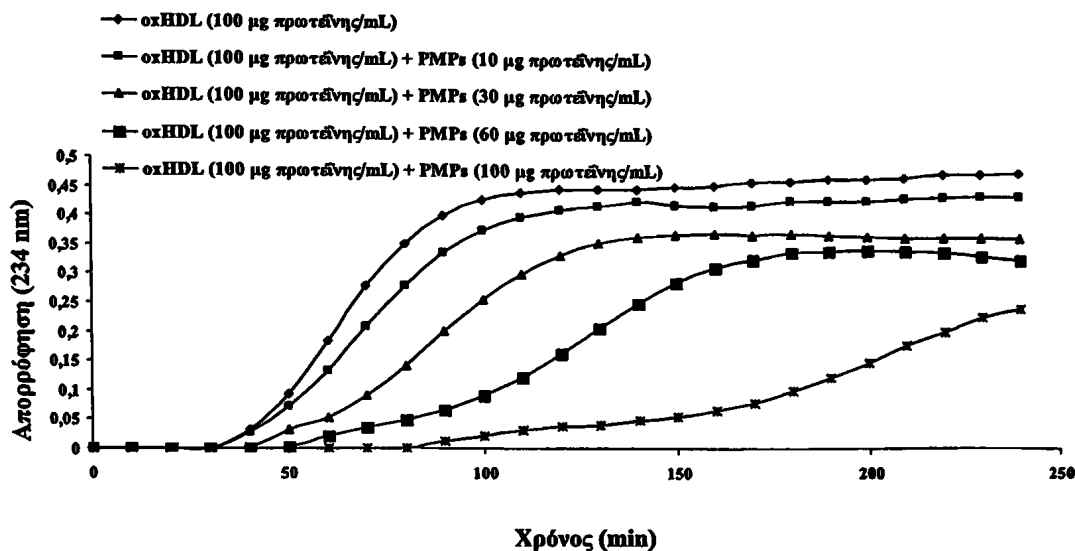
Η ενεργότητα της PAF-AH μετρήθηκε στην LDL πριν και μετά την οξείδωσή της με ιόντα Cu^{2+} παρουσία των PMPs, *in vitro*. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 62 τα PMPs ανέστειλλαν την μείωση της ενεργότητας της PAF-AH που παρατηρείται κατά την οξείδωση της LDL. Σύμφωνα με τα αποτελέσματά μας, η ενεργότητα της PAF-AH στην oxLDL μειώθηκε κατά 74% (από 59.5 ± 3.0 nmol/mg πρωτεΐνης/min σε 15.5 ± 3.5 nmol/mg πρωτεΐνης/min, $P < 0.0000$) μετά από 3 h οξείδωσης παρουσία ιόντων Cu^{2+} σε σχέση με την nLDL. Επίσης παρουσία PMPs σε συγκέντρωση 60 µg πρωτεΐνης/mL παρατηρήθηκε μια μείωση της ενεργότητας της PAF-AH κατά 53% (από 59.5 ± 3.0 nmol/mg πρωτεΐνης/min σε 28.1 ± 3.1 nmol/mg πρωτεΐνης/min, $P < 0.0000$) ενώ δεν παρατηρήθηκε μεταβολή της ενεργότητας της PAF-AH παρουσία των 100 µg πρωτεΐνης/mL PMPs (από 59.5 ± 3.0 nmol/mg πρωτεΐνης/min σε 61.2 ± 9.7 nmol/mg πρωτεΐνης/min).



Εικόνα 62: Η ενεργότητα της PAF-AH κατά την οξείδωση της LDL παρουσία και απουσία των PMPs. Η ενεργότητα προσδιορίστηκε με την μέθοδο ζηματοποίησης με TCA. Η συγκέντρωση του υποστρώματος είναι 100 μM ^3H -PAF και η πηγή του ενζύμου είναι η πρωτεΐνη της LDL (8 μg πρωτεΐνης/mL). Οι τιμές εκπροσωπούν την μέση τιμή \pm SD από 4 πειράματα. * P <0.0000 συγκρινόμενο με την nLDL. † P <0.04 και ** P <0.003 και *** P <0.0001 συγκρινόμενο με οξειδωμένη LDL (oxLDL) απουσία των PMPs.

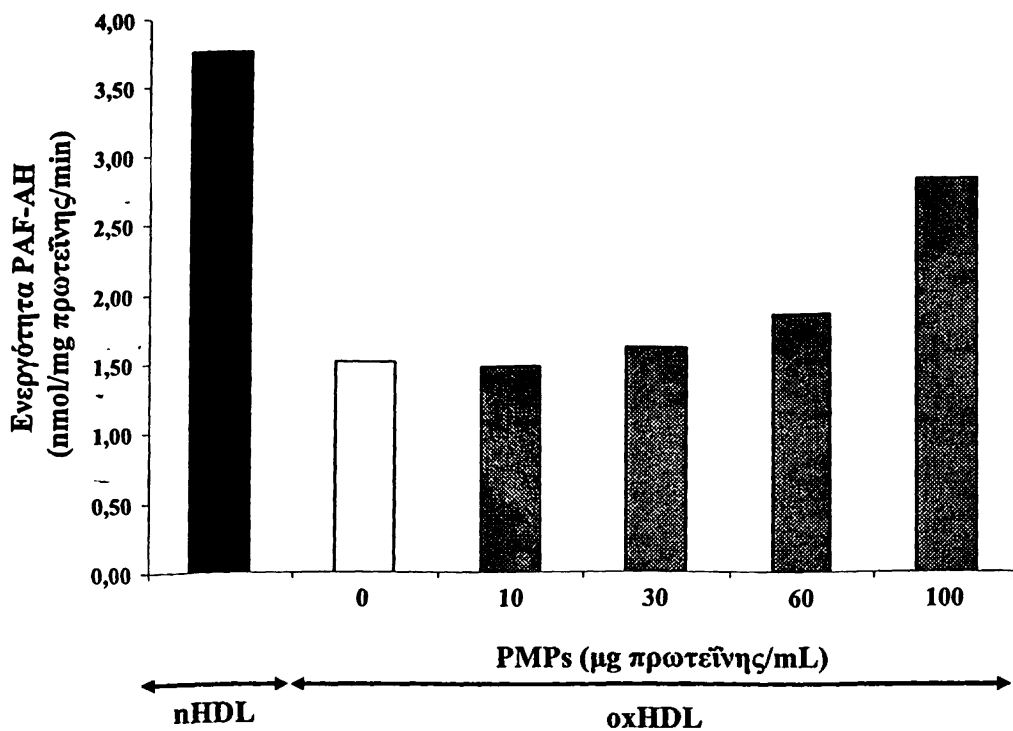
Η επίδραση των PMPs με την HDL

Στην συνέχεια μελετήθηκε η δράση των PMPs στην επαγόμενη από Cu^{2+} οξείδωση της HDL. Τα PMPs με δοσο-εξαρτώμενο τρόπο προστατεύουν την HDL από την επαγόμενη με Cu^{2+} οξείδωση. Στην Εικόνα 63 απεικονίζεται αντιπροσωπευτική δοσο-εξαρτώμενη αναστολή της επαγόμενης από Cu^{2+} οξείδωση της HDL. Τα 100 μg πρωτεΐνης/mL PMPs παρουσίασαν την μέγιστη καθυστέρηση της οξείδωσης της HDL (λανθάνοντα χρόνο 80 min) σε σχέση με την οξειδωμένη HDL (λανθάνοντα χρόνο 50 min).



Εικόνα 63: Αντιπροσωπευτική δοδο-εξαρτώμενη αναστολή από PMPs της επαγόμενης από Cu^{2+} οξείδωση της HDL. Η κινητική μελέτη της οξείδωσης έγινε με καταγραφή της απορρόφησης των συζυγών διπλών δεσμών στα 234 nm κάθε 10 min για 3 h.

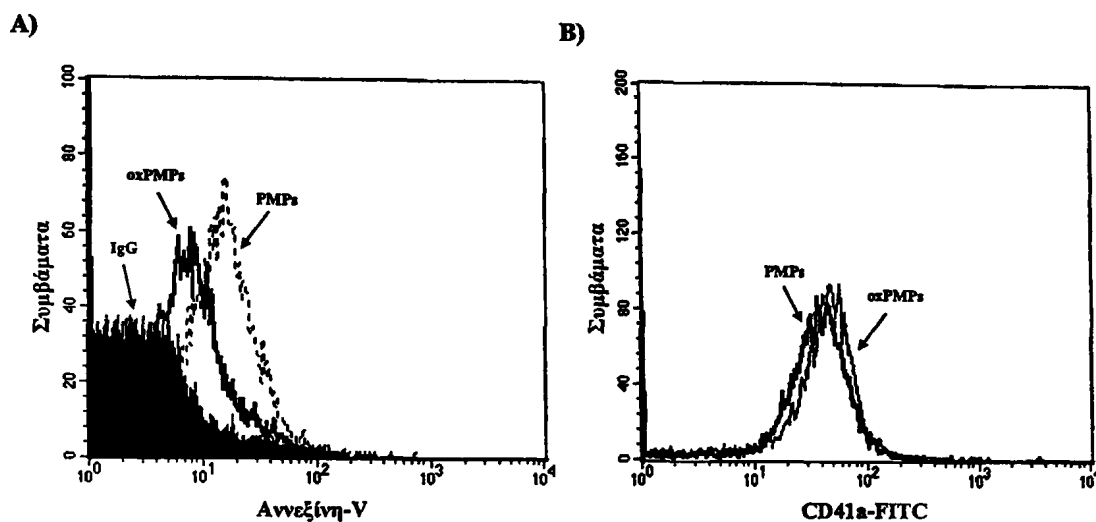
Στην Εικόνα 64 φαίνεται η κατανομή της ενεργότητας της PAF-AH παρουσία των PMPs. Η ενεργότητα της PAF-AH στην HDL μειώθηκε κατά 60% μετά από 3 h οξείδωσης παρουσία Cu^{2+} σε σχέση με την φυσική HDL, ενώ παρουσία των PMPs (100 μg πρωτεΐνης/mL) μειώθηκε κατά 19% υποδηλώνοντας ότι τα PMPs αναστέλλουν την μείωση της ενεργότητας του ενζύμου.



Εικόνα 64: Η ενεργότητα της PAF-AH παρουσία και απουσία των PMPs. Η ενεργότητα προσδιορίστηκε με την μέθοδο ιζηματοποίησης με TCA. Η συγκέντρωση του υποστρώματος είναι $100 \mu\text{M } ^3\text{H-PAF}$ και η πηγή του ενζύμου είναι η πρωτεΐνη της HDL ($8 \mu\text{g πρωτεΐνης/mL}$).

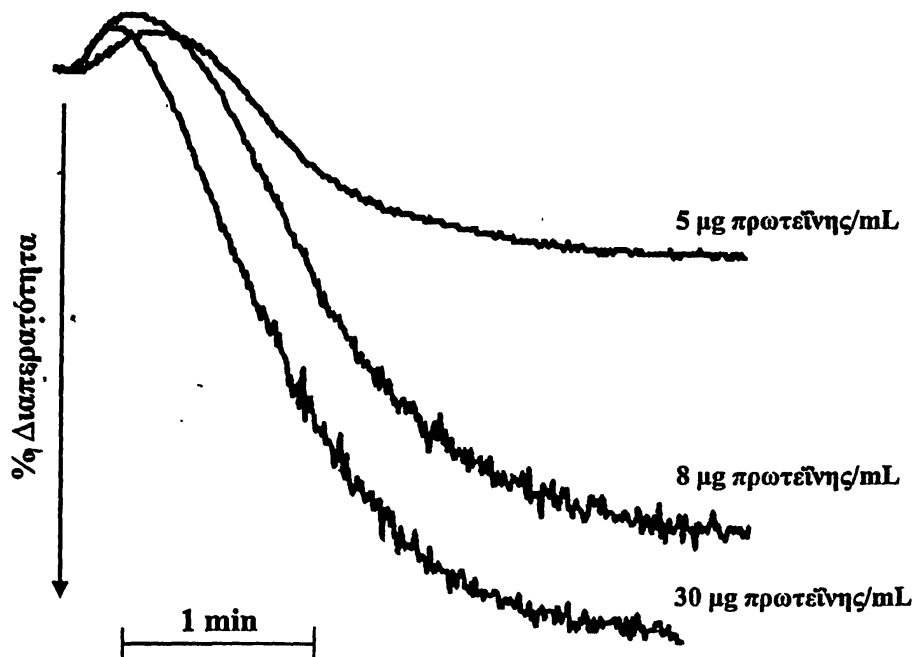
Οξειδωτική τροποποίηση των PMPs

Η οξειδωτική τροποποίηση των PMPs πραγματοποιήθηκε στους 37°C με επώαση $100 \mu\text{g πρωτεΐνης/mL PMPs}$ με $5 \mu\text{M CuSO}_4$. Στην συνέχεια μελετήθηκε με χρήση κυτταρομετρίας ροής η έκφραση τόσο της αννεξίνης-V όσο και του CD41a. Παρατηρήθηκε μια μείωση της έκφρασης της αννεξίνης-V κατά 50% στα οξειδωμένα PMPs (Εικόνα 65A). Πιθανώς αυτή η μείωση να αποτελεί ένα δείκτη οξείδωσης των PMPs. Επίσης, η οξειδωτική τροποποίηση των PMPs δεν επηρέασε την έκφραση του CD41a στην επιφάνεια των PMPs (Εικόνα 65B).



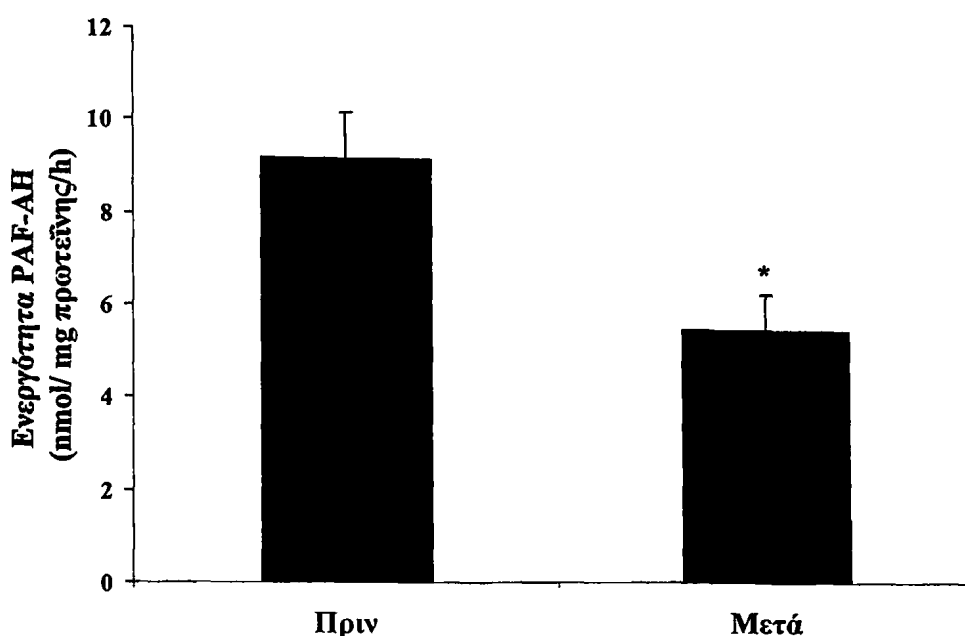
Εικόνα 65: Α) Αντιπροσωπευτικό ιστόγραμμα της έκφρασης της αννεξίνης-V πριν και μετά την οξείδωση των PMPs (oxPMPs) σε σύγκριση με το τυφλό (το IgG) Β) Αντιπροσωπευτικό ιστόγραμμα της έκφρασης του CD41a-FITC πριν και μετά την οξείδωση των PMPs.

Στην συνέχεια έγινε ποσοτικός προσδιορισμός του PAF στα oxPMPs με την μέθοδο της συσσώρευσης των πλυμένων αιμοπεταλίων κουνελιού. Τα oxPMPs περιέχουν 23.0 ± 1.4 pM PAF (ή 2.4 ± 0.1 pg PAF/ μ g oxPMPs πρωτεΐνης) εναντί 18.0 ± 8.5 pM PAF στα μη οξειδωμένα PMPs. Αντιπροσωπευτική καμπύλη συσσώρευσης παρουσία διαφόρων συγκεντρώσεων oxPMPs φαίνεται στην Εικόνα 66. Φαίνεται ότι η οξείδωση των PMPs δεν επηρεάζει την σύσταση των σωματιδίων αυτών ως προς την περιεκτικότητά τους σε PAF.



Εικόνα 66: Αντιπροσωπευτική καμπύλη συσσώρευσης αιμοπεταλίων κουνελιού παρουσία διαφόρων συγκεντρώσεων oxPMPs.

Προσδιορίστηκε η ενεργότητα της PAF-AH στα PMPs μετά την οξείδωση και βρέθηκε ότι η ενεργότητα των PMPs μειώνεται σημαντικά μετά από την οξείδωση (9.2 ± 1 nmol/mg πρωτεΐνης/h και 5.5 ± 0.8 nmol/mg πρωτεΐνης/h, αντίστοιχα $P < 0.02$, Εικόνα 67).



Εικόνα 67: Η ενεργότητα της PAF-AH πριν και μετά την οξείδωση των PMPs. Η ενεργότητα προσδιορίστηκε με την μέθοδο ιζηματοποίησης με TCA. Η συγκέντρωση του υποστρώματος είναι 100 μM ^3H -PAF και η πηγή του ενζύμου είναι η πρωτεΐνη των PMPs (8 μg πρωτεΐνης/mL). * $P < 0.02$ σε σύγκριση με πριν την οξείδωση.

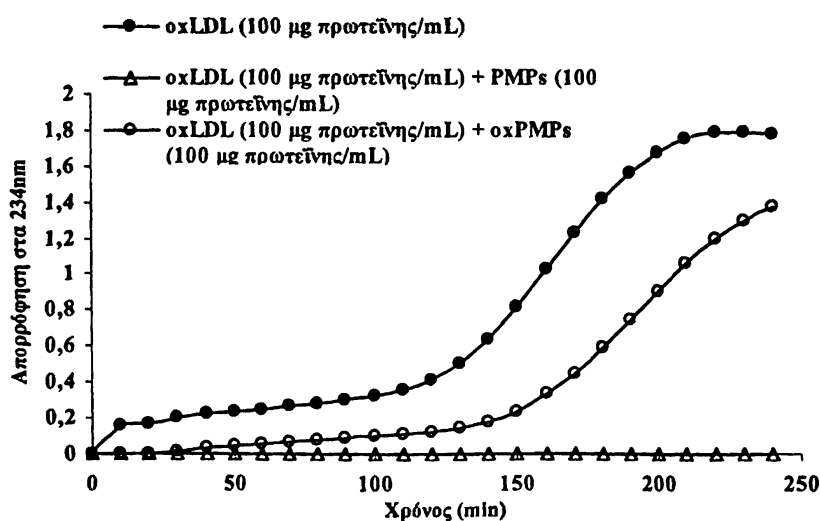
Τέλος μελετήθηκε η ικανότητα των oxPMPs να προστατεύουν την LDL από την οξειδωτική τροποποίηση. Όπως φαίνεται από τον Πίνακα 8 τα PMPs και τα oxPMPs ασκούν διαφορετικές δράσεις στην οξειδωτική τροποποίηση της LDL. Τα oxPMPs στην ίδια συγκέντρωση που τα PMPs προκαλούν πλήρη αναστολή της οξείδωσης δεν παρατηρείται το ίδιο φαινόμενο. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, ο λανθάνων χρόνο οξείδωσης παρουσία των oxPMPs (100 μg πρωτεΐνης/mL) ήταν 118.0 ± 20.2 min σε σχέση με την oxLDL που ήταν 88.8 ± 12.6 min ($P = \text{NS}$). Επίσης δεν υπήρχαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στην μείωση του ρυθμού παραγωγής συζυγών διενίων παρουσία 100 μg πρωτεΐνης/mL oxPMPs (4.20 ± 0.4 nmol/mg πρωτεΐνης/min) σε σύγκριση με την oxLDL (5.8 ± 1.1 nmol/mg πρωτεΐνης/min, $P = \text{NS}$). Επιπρόσθετα, δεν υπήρχαν διαφορές στο συνολικό αριθμό διενίων στα oxPMPs (482.0 ± 126.1 nmol διενίων/mg πρωτεΐνης) σε σχέση με την oxLDL (583.3 ± 105.9 nmol διενίων/mg πρωτεΐνης, $P = \text{NS}$).

Πίνακας 8: Επίδραση των PMPs και oxPMPs στην οξείδωση της LDL.

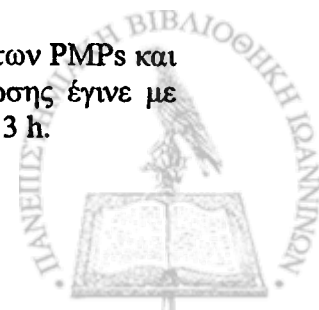
	oxLDL	oxLDL + PMPs	oxLDL + oxPMPs
Λανθάνων χρόνος (min)	88.8 ±12.6	Πλήρης αναστολή	118.0 ±20.2
Ρυθμός παραγωγής συζυγών διενίων (nmol/mg πρωτεΐνης /min)	5.8 ±1.1	Πλήρης αναστολή	4.2 ±0.4
Συνολικός αριθμός διενίων (nmol διενίων/mg πρωτεΐνης)	583.3 ±105.9	Πλήρης αναστολή	482.2 ±126.1

Η οξείδωση πραγματοποιήθηκε στους 37°C με επώαση 100 µg πρωτεΐνης/mL LDL με 5µM CuSO₄ παρουσία των PMPs (100 µg πρωτεΐνης/mL) ή παρουσία των oxPMPs (100 µg πρωτεΐνης/mL). Η κινητική μελέτη της οξείδωσης έγινε με καταγραφή της απορρόφησης των συζυγών διπλών δεσμών στα 234 nm κάθε 10 min για 3 h. Οι τιμές εκπροσωπούν την μέση τιμή±SD από 3 πειράματα.

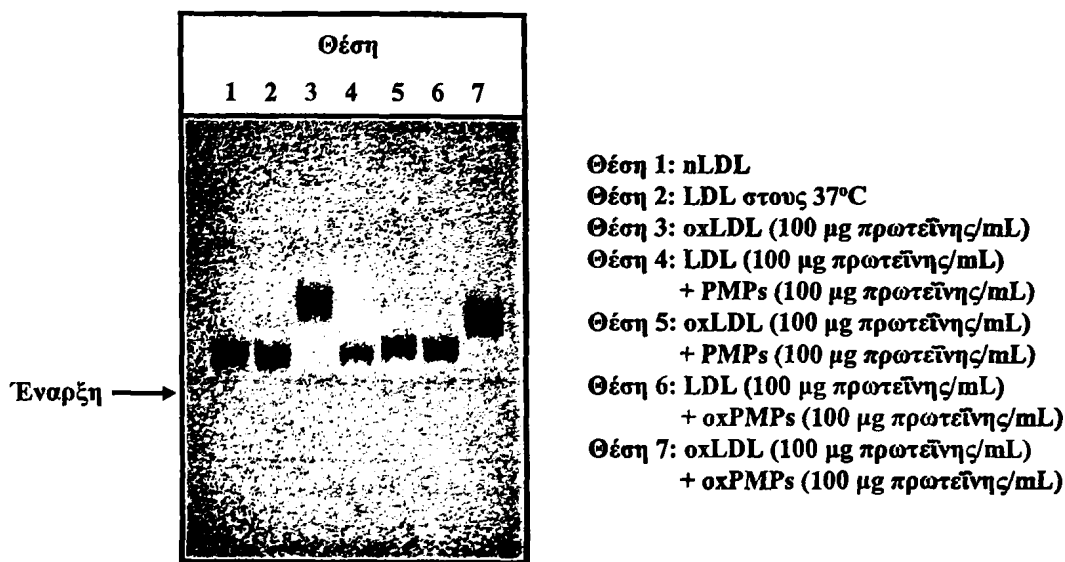
Στην Εικόνα 68 απεικονίζεται αντιπροσωπευτική καμπύλη οξείδωσης της LDL από Cu²⁺ παρουσία των PMPs και των oxPMPs. Τα PMPs (100 µg πρωτεΐνης/mL) παρουσίασαν πλήρη αναστολή της οξείδωσης της LDL. Αντίθετα, τα oxPMPs στην ίδια συγκέντρωση χάνουν την ικανότητα τους να προστατεύουν την LDL από την οξειδωτική τροποποίηση.



Εικόνα 68: Αντιπροσωπευτική καμπύλη οξείδωσης της LDL από ιόντα Cu²⁺ παρουσία των PMPs και των oxPMPs σε συγκέντρωση 100 µg πρωτεΐνης/mL. Η κινητική μελέτη της οξείδωσης έγινε με καταγραφή της απορρόφησης των συζυγών διπλών δεσμών στα 234 nm κάθε 10 min για 3 h.



Στην Εικόνα 69 φαίνεται η REM της oxLDL παρουσία των PMPs και των oxPMPs σε σχέση με την nLDL. Παρουσία των oxPMPs (100 μg πρωτεΐνης/mL) δεν παρατηρείται σημαντική μεταβολή της REM σε σχέση με την oxLDL. Αντίθετα, η παρουσία των PMPs (100 μg πρωτεΐνης/mL) ανέστειλε σημαντικά τη REM της oxLDL.

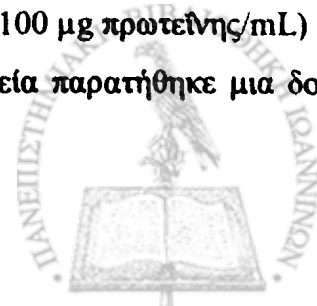


Εικόνα 69: Αντιπροσωπευτική αναστολή του REM παρουσία των PMPs και των oxPMPs σε σύγκριση με την nLDL με χρήση πηκτώματος αγαρόζης.

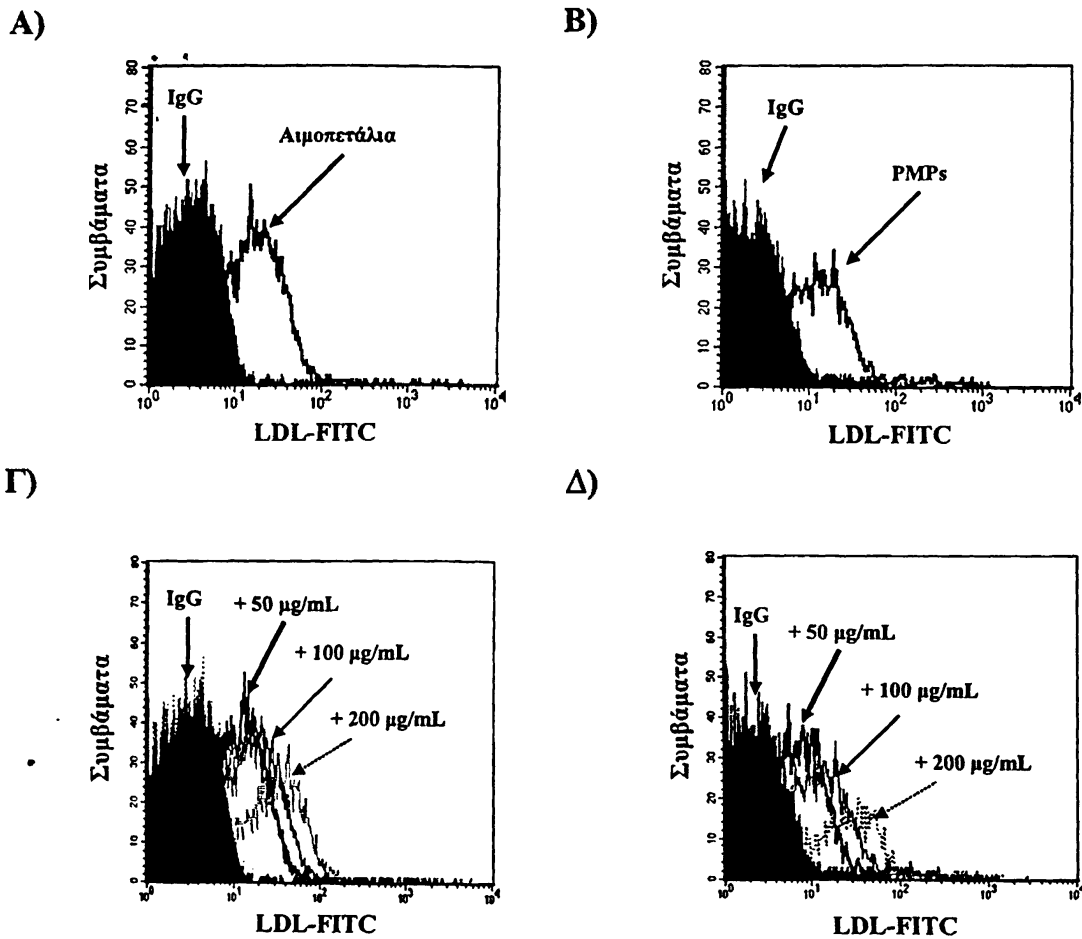
Συμπερασματικά, η οξειδωτική τροποποίηση των PMPs οδηγεί στην μείωση της ικανότητάς τους να προστατεύουν την LDL από την οξείδωση και μειώνει σημαντικά την ενεργότητα της PAF-AH, αλλά δεν επηρεάζεται η σύστασή τους ως προς τον PAF.

Σύνδεση των PMPs με την LDL

Αρχικά μελετήθηκε με κυτταρομετρία ροής η πρόσδεση της LDL σε αιμοπετάλια χρησιμοποιώντας LDL-FITC. Τα αιμοπετάλια επώαστηκαν με την LDL-FITC (100 μg πρωτεΐνης/mL) για 30 min στους 37°C και μετά έγινε ανάλυση με κυτταρομετρία ροής. Παρατηρήθηκε η αύξηση της MFI προς τα δεξιά όπως απεικονίζεται στην Εικόνα 70Α, όπου φαίνεται η πρόσδεση της LDL στα αιμοπετάλια. Το ίδιο φαινόμενο παρατηρήθηκε όταν και τα PMPs (100 μg πρωτεΐνης/mL) επώαστηκαν με την LDL-FITC (100 μg πρωτεΐνης/mL) υπό τις παραπάνω πειραματικές συνθήκες (Εικόνα 70Β). Στην συνέχεια παρατήθηκε μια δοσο-



εξαρτώμενη πρόσδεση της LDL-FITC τόσο στα αιμοπετάλια (Εικόνα 70Γ) όσο και στα PMPs (Εικόνα 70Δ). Σε συγκεντρώσεις άνω των 200 μg πρωτεΐνης/mL της LDL-FITC παρατηρήθηκε υψηλό background με αποτέλεσμα να υπάρχει πρόβλημα στην ανάλυση αυτών των δειγμάτων με την κυτταρομετρία ροής.



Εικόνα 70: Αντιπροσωπευτικά ιστογράμματα κυτταρομετρίας ροής που δείχνουν την πρόσδεση της LDL-FITC (100 μg πρωτεΐνης/mL) Α) στα αιμοπετάλια Β) στα PMPs (100 μg πρωτεΐνης/mL) Γ) Δοσο-εξαρτώμενη πρόσδεση της LDL-FITC στα αιμοπετάλια Δ) Δοσο-εξαρτώμενη πρόσδεση της LDL-FITC στα PMPs (100 μg πρωτεΐνης/mL).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8^ο

Συζήτηση

Παραγωγή και χαρακτηρισμός των PMPs

Στην διεθνή επιστημονική κοινότητα δεν υπάρχει ακόμα κάποιο πρωτόκολλο για την ταυτοποίηση των PMPs. Έχει όμως προταθεί ότι αν ένας μικρού μεγέθους πληθυσμός σωματιδίων (0.05-1 μm) εκφράζει θετικότητα για την αννεξίνη-V τότε τα σωματίδια αυτά μπορούν να χαρακτηριστούν ως μικροσωματίδια. Είναι γνωστό ότι η αννεξίνη-V είναι μια πρωτεΐνη που προέρχεται από τον πλακούντα και η οποία εμφανίζει αντιθρομβωτική δράση δεσμευόμενη με αρνητικά φωσφολιπίδια, (κυρίως την PS) διαμέσου γεφυρών Ca^{2+} . Τα PMPs που παράγονται από τα αιμοπετάλια μετά την ενεργοποίηση με θρομβίνη ή από ιονοφόρο Ca^{2+} -A23187 παράγουν PMPs τα οποία περιέχουν μεγάλη ποσότητα PS στην εξωτερική επιφάνεια της κυτταρικής μεμβράνης. Υπό φυσιολογικές συνθήκες, η επιφανειακή έκφραση της PS είναι το κύριο χαρακτηριστικό των PMPs. Η θετικότητα προς την αννεξίνη-V όμως δεν είναι επαρκές στοιχείο ώστε να χαρακτηριστούν τα σωματίδια αυτά ως PMPs. Πρέπει τα σωματίδια αυτά να εκφράζουν και άλλες πρωτεΐνες χαρακτηριστικό των κυττάρων προέλευσής τους. Για παράδειγμα PMPs θα πρέπει να εκφράζουν πρωτεΐνες που προέρχονται από τα αιμοπετάλια όπως είναι το CD41a το οποίο αναγνωρίζει την α_{IIb} υπομονάδα της ιντεγκρίνης $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$. Χρησιμοποιώντας λοιπόν την αννεξίνη-V και το μονοκλωνικό αντίσωμα anti-CD41a ταυτοποιήσαμε τα PMPs της εκάστοτε παρασκευής μας.

Η πρώτη παρασκευή έγινε με την επίδραση της θρομβίνης υπό συνθήκες ανάδευσης, ενώ η δεύτερη στην επίδραση του ιονοφόρου Ca^{2+} -A23187 χωρίς ανάδευση. Παρατηρήθηκε και στις δύο περιπτώσεις παρόμοια θετικότητα ως προς την έκφραση αντισωμάτων που αναγνωρίζουν πρωτεΐνες των αιμοπεταλίων καθώς και έκφραση αννεξίνης-V στην χαρακτηριστική περιοχή των PMPs, ενώ το μόνο γεγονός που διαφοροποίησε τους δύο αγωνιστές ήταν η έκφραση της P-σελεκτίνης, η οποία ήταν μεγαλύτερη στην περίπτωση της



ενεργοποίησης με θρομβίνη. Αυτό οφείλεται στις διαφορετικές πειραματικές συνθήκες αφού η ενεργοποίηση με ιονοφόρο Ca^{2+} -A23187 έχει ως αποτέλεσμα την αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού και την παραγωγή μικροσωματιδίων ενώ η ενεργοποίηση με θρομβίνη οδηγεί στην συσσώρευση και έκκριση του περιεχομένου των πυκνών- και α-κοκκίων.

Ο τρόπος παραγωγής των PMPs ο οποίος τελικά επιλέχθηκε τόσο για την μελέτη της επίδρασης αυτών σε μονοκύτταρα και ενδοθηλιακά κύτταρα όσο και στην μελέτη της αλληλεπίδρασής-τους με τις λιποπρωτεΐνες του πλάσματος κατά την διάρκεια της οξειδωτικής τροποποίησης τους, ήταν διαμέσου της ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων με ιονοφόρο Ca^{2+} -A23187 χωρίς ανάδευση. Επιπρόσθετα, το ιονοφόρο Ca^{2+} -A23187 επιλέχθηκε ως ενεργοποιητής γιατί βρίσκεται στην κορυφή της λίστας των αγωνιστών ως προς την ικανότητα τους να επάγουν τον σχηματισμό των PMPs [126].

Ποσοτικοποίηση του PAF των PMPs

Ο PAF είναι ένας χημικός διαβιβαστής ο οποίος μεταξύ των άλλων διαδραματίζει ρόλο στην διακυτταρική επικοινωνία, έχοντας έτσι παρόμοια λειτουργική συμπεριφορά με τις ορμόνες, τις κυτταροκίνες και τις ιντερλευκίνες [76, 77]. Επιπρόσθετα, ο PAF εκκρίνεται από τα αιμοπετάλια, μετά από την ενεργοποίησή τους [88,89].

Ποσοτικοποιήσαμε τον PAF στα PMPs χρησιμοποιώντας τα πλυμένα αιμοπετάλια κουνελιού ως πειραματικό μοντέλο. Είναι γνωστό ότι τα αιμοπετάλια αυτά είναι ευαίσθητα στον PAF [492]. Επιβεβαιώσαμε στην μελέτη αυτή ότι τα PMPs που παράγονται από το ιονοφόρο Ca^{2+} -A23187 είναι εμπλουτισμένα με PAF. Για να βεβαιωθούμε ότι η βιολογική δράση των PMPs οφείλεται στον PAF και όχι σε άλλους βιοδραστικούς παράγοντες που εκκρίνονται κατά την διάρκεια της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων επώασαμε το εναιώρημα των αιμοπεταλίων κουνελιού με το σύστημα CP/CPK καθώς και με την ασπιρίνη. Το σύστημα CP/CPK δρα ως εκκαθαριστής του ενδογενώς παραγόμενου ADP ενώ η ασπιρίνη αναστέλλει μη αντιστρεπτά την δράση του ενζύμου COX-1 και παρεμποδίζει την σύνθεση του TxA_2 (προϊόν μεταβολισμού του AA). Σύμφωνα με τα αποτελέσματά μας, η βιολογική δράση των PMPs οφειλόταν στην περιεκτικότητά τους σε PAF και όχι σε άλλους βιοδραστικούς παράγοντες που εκκρίνονται από τα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια, αφού η



συσσωρευτική ικανότητα των PMPs αναστάλθηκε παρουσία του ειδικού αναστολέα του PAF, CV-3988 [510].

Η έκκριση της PAF-AH από τα ανθρώπινα αιμοπετάλια

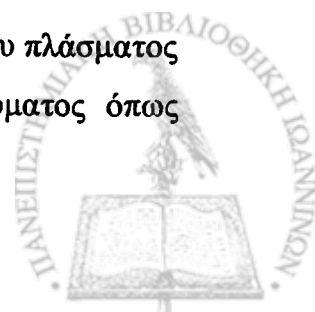
Για πρώτη φορά η μελέτη αυτή έδειξε ότι τα αιμοπετάλια περιέχουν δύο μορφές της PAF-AH, την PAF-AH του πλάσματος και την ενδοκυττάρια Τύπου II PAF-AH. Σε συμφωνία με προηγούμενες μελέτες [511] βρέθηκε ότι το 75% της συνολικής ενεργότητας βρίσκεται στο κυτοσολικό κλάσμα και μοιάζει με την ενδοκυττάρια Τύπου II PAF-AH, ενώ το υπόλοιπο 25% συσχετίζεται με της κυτταρικές μεμβράνες και μοιάζει με την PAF-AH του πλάσματος. Είναι γνωστό ότι τα αιμοπετάλια έχουν την ικανότητα να απορροφούν πρωτεΐνες του πλάσματος όπως το Fg και την αλβουμίνη διαμέσου της ενδοκύτωσης με αποτέλεσμα την αποθήκευσή τους στα ενδοκυττάρια κοκκία. Μια πρόσφατη μελέτη του Del Conde et al. [512] έδειξε ότι μικροσωματίδια που προέρχονται από τα μονοκύτταρα προσκολλούνται στα αιμοπετάλια και μεταφέρουν το περιεχόμενό τους σε πρωτεΐνες άλλα και σε λιπίδια στη μεμβράνη των αιμοπεταλίων. Όποτε μπορούμε να υποθέσουμε ότι τα αιμοπετάλια απορροφούν την PAF-AH από το πλάσμα είτε από τις λιποπρωτεΐνες ή από μικροσωματίδια των μονοκυττάρων/μακροφάγων, την κύρια πηγή της PAF-AH του πλάσματος. Εν τούτοις, η παραπάνω υπόθεση δεν είναι πιθανή διότι η PAF-AH του πλάσματος άλλα και αυτή που εκκρίνεται από τα μονοκύτταρα/μακροφάγα είναι N-γλυκοζυλιωμένη [422], ενώ σύμφωνα με τα αποτελέσματα της μελέτης μας η PAF-AH των αιμοπεταλίων δεν είναι γλυκοζυλιωμένη. Επιπρόσθετα, η μελέτη αυτή έδειξε ότι τα αιμοπετάλια περιέχουν υψηλά επίπεδα του mRNA της PAF-AH του πλάσματος υποδηλώνοντας ότι τα κύτταρα αυτά πιθανώς να συνθέτουν την PAF-AH του πλάσματος *de novo*. Μελέτες έχουν δείξει ότι τα αιμοπετάλια μπορούν να συνθέσουν πρωτεΐνες όπως την ιντερλευκίνη 1β όταν τα κύτταρα αυτά ενεργοποιούνται [513]. Στην μελέτη μας, η συνολική ενεργότητα που προσδιορίστηκε στο κυτταρόλυμα πριν την ενεργοποίηση ήταν ίδια με αυτή μετά από την ενεργοποίηση, υποδηλώνοντας ότι η μετάφραση του mRNA που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη της PAF-AH του πλάσματος δεν εξαρτάται από την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων.



Κατά την ενεργοποίηση με θρομβίνη παρατηρήσαμε έκκριση της PAF-AH σε ποσοστό $22 \pm 5\%$ της συνολικής ενεργότητας που βρίσκεται στο κυτταρόλυμα και το εύρημα αυτό είναι σε συμφωνία με προηγούμενη μελέτη μας [514]. Επιπρόσθετα, κατά την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων, η έκκριση της PAF-AH έγινε παράλληλα με την παραγωγή των PMPs. Όμως η διαδικασία της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων δεν είναι βασική προϋπόθεση για την έκκριση του ενζύμου άλλα και για την παραγωγή των PMPs, όπως φαίνεται από τα πειράματα παρουσία του πεπτιδίου RGDS. Το πεπτίδιο RGDS αναστέλλει την συσσώρευση των αιμοπεταλίων δεσμευόμενο στην ιντεγκρίνη $\alpha_{IIb}\beta_3$ παρεμποδίζοντας με αυτό τον τρόπο την δέσμευση του Fg στον υποδοχέα αυτό [503]. Το πεπτίδιο αυτό ανέστειλε την συσσώρευση των αιμοπεταλίων άλλα δεν επηρέασε την έκκριση της PAF-AH ή την παραγωγή των PMPs. Επιπλέον, η υπόθεση αυτή ενισχύεται από το γεγονός ότι το ADP πρόκάλεσε συσσώρευση και έκκριση των α -κοκκίων, με βάση την έκφραση της P-σελεκτίνης, άλλα δεν παράχθηκαν PMPs. Άλλες μελέτες έχουν δείξει ότι ο αγωνιστής ADP δεν προκαλεί την παραγωγή των PMPs [141,194].

Η μελέτη αυτή δείχνει για πρώτη φορά ότι η έκκριση της PAF-AH από τα αιμοπετάλια βασίζεται στην παραγωγή των PMPs και ίσως αυτό αποτελεί το μηχανισμό έκκρισης της PAF-AH κατά την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων. Με βάση τα αποτελέσματα με το ιονοφόρο Ca^{2+} -A23187 ενισχύεται η υπόθεση ότι η έκκριση συσχετίζεται με την παραγωγή των PMPs, διότι, I) το ιονοφόρο Ca^{2+} -A23187 προκαλεί αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού και όχι συσσώρευση των αιμοπεταλίων [141], II) παρά την έλλειψη συσσώρευσης παρατηρήθηκε τόσο έκκριση της PAF-AH όσο και παραγωγή των PMPs, III) η παρουσία της καλπεπτίνης, ενός ειδικού αναστολέα της καλπαΐνης, οδήγησε στην σημαντική μείωση τόσο της παραγωγής των PMPs όσο και της έκκρισης της PAF-AH. Είναι γνωστό ότι η πρωτεάσες, καλπαΐνη I και II, παίζουν σημαντικό ρόλο στο σχηματισμό των PMPs. Η ενεργοποίηση των καλπαϊνών I και II οδηγεί στην κατάρρευση της δομικής ακεραιότητας της κυτταρικής μεμβράνης των αιμοπεταλίων οδηγώντας στην αναδιοργάνωση αυτής με αποτέλεσμα την παραγωγή των PMPs [141]. Συνοψίζοντας η αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού και ο σχηματισμός των PMPs είναι απαραίτητη προϋπόθεση για την έκκριση της PAF-AH.

Η PAF-AH των PMPs έχει παρόμοια χαρακτηριστικά με την PAF-AH του πλάσματος και έχει μεγαλύτερη ειδική ενεργότητα σε σχέση με αυτή του κυτταρολύματος όπως



παρατηρείται και για άλλους βιοδραστικούς παράγοντες των αιμοπεταλίων [126], όπως ο PAF [88,89]. Ένα σημαντικό εύρημα της μελέτης μας ήταν ότι με χρήση ELISA προσδιορίστηκε ενεργότητα της PAF-AH τόσο σε απομονωμένα PMPs όσο και σε PMPs του πλάσματος από νορμολιπιδαιμικούς εθελοντές. Για πρώτη φορά υπάρχει ένδειξη ότι πέρα από της λιποπρωτεΐνες, τα PMPs της κυκλοφορίας είναι φορείς της PAF-AH του πλάσματος.

Η ύπαρξη της PAF-AH στα PMPs μπορεί να έχει παθοφυσιολογική σημασία σε συνδυασμό με τους υποδοχείς και τα άλλα βιοδραστικά μόρια που εκφράζονται στην επιφάνεια των σωματιδίων αυτών άλλα και ως προς το περιεχόμενό τους σε βιοδραστικά λιπίδια όπως ο PAF, ο οποίος διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη φλεγμονή και στην αθηρογένεση [139,316]. Επιπρόσθετα, ο PAF φαίνεται να διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην διακυτταρική επικοινωνία όπως έχει παρατηρηθεί σε μοντέλα με οξεία ή χρόνια φλεγμονή [436,515]. Δηλαδή η δράση του δεν περιορίζεται μόνο στο κύτταρο από το οποίο εκκρίθηκε, ή σε παρακείμενα κύτταρα, αλλά εμφανίζει και συνδετοκρινή δράση. Συνεπώς, η PAF-AH που συνδέεται στα PMPs μπορεί να ελέγχει την δράση του PAF στην σηματοδότηση που προκαλεί στα κύτταρα στόχους. Πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι υπάρχουν αυξημένα επίπεδα των PMPs στην κυκλοφορία των ασθενών με οξύ στεφανιαίο σύνδρομο [516, 517]. Μελέτη του εργαστηρίου μας έδειξε ότι υπάρχει ισοζύγιο μεταξύ της παραγωγής του PAF και της έκκρισης της PAF-AH από τα αιμοπετάλια σε ασθενείς που υποβλήθηκαν σε αγγειοπλαστική [91]. Η αλλαγή στο ισοζύγιο μεταξύ του PAF και της PAF-AH μπορεί να διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη της αθηροθρόμβωσης κατά την διάρκεια της επέμβασης της αγγειοπλαστικής [91].

Πρόσφατες κλινικές μελέτες έδειξαν ότι υπάρχει θετική συσχέτιση μεταξύ του κινδύνου για καρδιαγγειακά συμβάματα με την μάζα ή την ενεργότητα της PAF-AH της LDL (Lp-PLA₂) [481,485]. Σε αντίθεση όμως με την συσχετιζόμενη με την HDL ενεργότητα της PAF-AH που εμφανίζει αντιαθηρογόνες ιδιότητες [452], ο ρόλος της PAF-AH της συσχετιζόμενης με τα PMPs βρίσκεται ακόμα υπό διερεύνηση. Επιπρόσθετα, η ποσοτικοποίηση της PAF-AH των PMPs στο πλάσμα μπορεί να αποτελέσει προγνωστικό ή και διαγνωστικό εργαλείο για την αθηρωμάτωση. Όμως είναι απαραίτητο να γίνουν κλινικές μελέτες για να διευρυνθεί ο ρόλος της PAF-AH των PMPs στην αθηρωμάτωση.

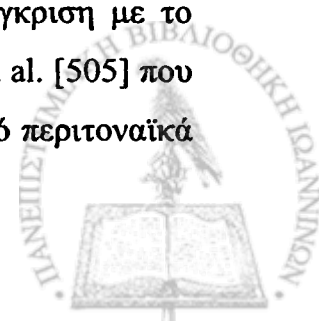


Η επίδραση των PMPs στα μονοκύτταρα

Όπως αναφέρθηκε στην εισαγωγή, η PAF-AH είναι ένα ένζυμο το οποίο διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην αθηρογένεση και την καρδιαγγειακή νόσο λόγω της ικανότητάς του να υδρολύει βιοδραστικά λιπίδια, όπως είναι ο PAF και τα οξειδωμένα φωσφολιπίδια [433].

Μελέτες έχουν δείξει ότι τα μακροφάγα που προέρχονται από μονοκύτταρα του περιφερικού αίματος αποτελούν την κύρια πηγή της PAF-AH του πλάσματος. Η κυτταρική έκφραση της PAF-AH του πλάσματος υπόκειται σε ρύθμιση από διάφορους παράγοντες. Σε αυτούς τους παράγοντες συμπεριλαμβάνεται ο βαθμός διαφοροποίησης των κυττάρων καθώς επίσης και ο βαθμός ενεργοποίησής τους από προφλεγμονώδεις παράγοντες. Μονοκύτταρα από περιφερικό αίμα δεν εκφράζουν την PAF-AH. Παρόλα αυτά, καθώς διαφοροποιούνται σε μακροφάγα *in vitro* ανιχνεύεται το mRNA της PAF-AH και το ένζυμο εκκρίνεται στο μέσο καλλιέργειας.

Έτσι λοιπόν θελήσαμε να διερευνήσουμε την επίδραση των PMPs στην παραγωγή και έκκριση της PAF-AH από καλλιέργειες μονοκυττάρων περιφερικού αίματος. Παρατηρήθηκε μια δόσο-εξαρτώμενη μείωση στην έκκριση της PAF-AH παρουσία των PMPs. Οι συγκεντρώσεις των PMPs που χρησιμοποιήσαμε δεν ήταν κυτταροτοξικές για τα μονοκύτταρα. Επίσης η ενεργότητα της PAF-AH των PMPs ήταν αμελητέα σε σχέση με την ενεργότητα της PAF-AH που εκκρίνεται από τα μονοκύτταρα. Ο Pennewitz et al. [518] έδειξε ότι τα αιμοπετάλια αναστέλλουν την έκκριση της PAF-AH άλλα και την διαφοροποίησή τους προς μακροφάγα. Ο ακριβής μηχανισμός με τον οποίο τα PMPs ασκούν την ανασταλτική τους δράση στα μονοκύτταρα δεν είναι γνωστός. Τα αιμοπετάλια εκκρίνουν διάφορες βιοδραστικές ουσίες που οδηγούν στην αύξηση της πρόσληψης της LDL από τα μονοκύτταρα [519]. Αντίθετα τα αιμοπετάλια επάγουν την έκφραση του ιστικού παράγοντα και το σχηματισμό ελευθέρων ριζών και αυξάνουν την ενεργότητα της λιποξογενάσης στα μονοκύτταρα [520,521]. Ο μηχανισμός με τον οποίο τα PMPs αναστέλλουν την έκκριση της PAF-AH μπορεί να οφείλεται στην περιεκτικότητά τους σε PAF. Παρατηρήθηκε ότι ο PAF στην δόση που χρησιμοποιήθηκε ανέστειλε την έκκριση του ενζύμου σε σύγκριση με το τυφλό. Το εύρημα αυτό είναι σε συμφωνία με τα αποτελέσματα του Narahara et al. [505] που έδειξε επίσης ότι η παρουσία του PAF ανέστειλε την έκκριση της PAF-AH από περιτοναϊκά

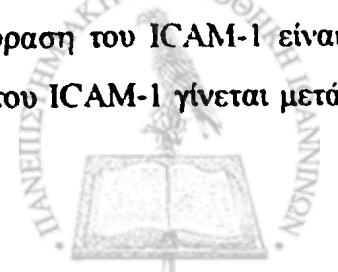


μακροφάγα. Ο μηχανισμός που πρότειναν για να εξηγήσουν τη δράση του PAF περιλαμβάνει την αύξηση του $[Ca^{2+}]_i$ και την ενεργοποίηση της πρωτεϊνικής κινάσης C. Ο μηχανισμός με τον οποίο τα PMPs ασκούν την δράση τους στα μονοκύτταρα/μακροφάγα βρίσκεται υπό διερεύνηση από το εργαστήριο μας.

Στην συνέχεια διερευνήσαμε την επίδραση των PMPs στη έκφραση του CCR2 στα μονοκύτταρα. Στο πληθυσμό των μονοκυττάρων που απομονώσαμε παρατηρήσαμε μια μείωση στην έκφραση του CCR2 παρουσία των PMPs. Υπό φυσιολογικές συνθήκες στα THP-1 μονοκύτταρα εκφράζονται περίπου 5,000 μόρια CCR2 στην κυτταρική τους μεμβράνη [522]. Μελέτες έχουν δείξει ότι η oxLDL, που είναι εμπλουτισμένη σε οξειδωμένα φωσφολιπίδια, προκαλεί μείωση στην έκφραση του CCR2 στα μονοκύτταρα, με αποτέλεσμα την αναστολή της πρόσδεσης της MCP-1 στον υποδοχέα αυτό [522]. Όποτε μπορούμε να υποθέσουμε ότι η επώαση των PMPs με τα μονοκύτταρα οδηγεί στην οξείδωση των PMPs, αυτό έχει ως αποτέλεσμα την απελευθέρωση οξειδωμένων φωσφολιπιδίων από αυτά. Όποτε τα PMPs ασκούν μια παρόμοια ανασταλτική δράση όπως αυτή της oxLDL στην μείωση της έκφρασης του CCR2 πιθανώς διαμέσου των οξειδωμένων φωσφολιπιδίων. Αντίθετα η CRP προκαλεί αύξηση κατά 70% στην επιφανειακή έκφραση του CCR2 στα μονοκύτταρα [523].

Η επίδραση των PMPs στα ενδοθηλιακά κύτταρα

Η αλληλεπίδραση των αιμοπεταλίων με τα ενδοθηλιακά κύτταρα οδηγεί στην ενεργοποίηση αυτών με αποτέλεσμα την έκκριση και έκφραση διάφορων φλεγμονωδών μορίων που οδηγούν στην πρόωμη ανάπτυξη της αθηρωματικής πλάκας [290-292]. Είναι γνωστό ότι όταν αιμοπετάλια ενεργοποιημένα, με το ADP [524] ή με τη θρομβίνη [292], επωαστούν με ενδοθηλιακά κύτταρα προκαλούν στα τελευταία την έκκριση της MCP-1. Επιπρόσθετα, η p38MAP κινάση πιθανώς να οφείλεται για την έκκριση της MCP-1 από τα ενδοθηλιακά κύτταρα όταν αυτά ενεργοποιούνται από τα αιμοπετάλια [294]. Η ενεργοποίηση των ενδοθηλιακών κυττάρων μεταξύ των άλλων οδηγεί στην επιφανειακή έκφραση των προσκολλητικών μορίων ICAM-1 ή VCAM-1. Η επιφανειακή έκφραση του ICAM-1 βασίζεται στην ενεργοποίηση της μεταγραφής και μετάφρασης του mRNA που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη αυτή μετά από την επίδραση ενός αγωνιστή. Η έκφραση του ICAM-1 είναι ανιχνεύσιμη μετά από 4 h ενεργοποίησης ενώ η μεγίστη έκφραση του ICAM-1 γίνεται μετά

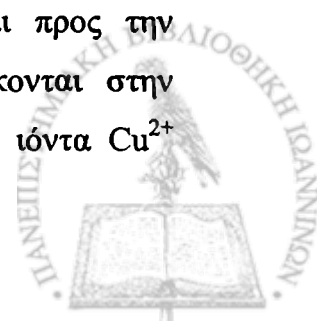


από 16-24 h [509]. Μελέτες έχουν δείξει ότι τα αιμοπετάλια επάγουν την έκφραση του ICAM-1 στα ενδοθηλιακά κύτταρα [292,293,524]. Επιπρόσθετα, μελέτες έδειξαν ότι η επίδραση PMPs με ενδοθηλιακά κύτταρα επάγει την έκφραση του ICAM-1 με αποτέλεσμα να ισχυροποιείται η προσκόλληση των λευκοκυττάρων σε αυτά [312]. Πιθανολογείται ότι η δράση των PMPs οφείλεται στην περιεκτικότητά τους σε AA και ότι πραγματοποιείται διαμέσου μιας PKC κινάσης [312].

Σε συμφωνία με τα παραπάνω βιβλιογραφικά δεδομένα τα PMPs τα οποία απομονώθηκαν μετά από την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων με ιονοφόρο Ca^{2+} -A23187 βρέθηκαν να επάγουν τόσο την έκκριση της MCP-1 όσο και την έκφραση του ICAM-1 άλλα και του VCAM-1 στην επιφάνεια των ενδοθηλιακών κυττάρων. Ως θετικό μάρτυρα χρησιμοποιήθηκε το VEGF που ενεργοποιεί τα ενδοθηλιακά κύτταρα τόσο ως προς την έκφραση των ICAM-1, VCAM-1 [508]. Έχοντας ως δεδομένο ότι τα PMPs είναι εμπλουτισμένα σε PAF θελήσαμε να διερευνήσουμε κατά πόσο ο PAF αυτών συμμετέχει στην παραπάνω βιολογική δράση των PMPs. Αρχικά τα ενδοθηλιακά κύτταρα ενεργοποιήθηκαν με PAF. Βρέθηκε ότι ο PAF επάγει σε μικρό ποσοστό την έκκριση της MCP-1, την έκφραση του ICAM-1 αλλά όχι του VCAM-1. Σε σύγκριση με τα PMPs η ενεργοποίηση των ενδοθηλιακών κυττάρων με PAF ήταν λιγότερο ισχυρή γεγονός που υποδηλώνει την πιθανή συμμετοχή και άλλων βιοδραστικών παραγόντων των PMPs στην ενεργοποίηση των ενδοθηλιακών κυττάρων.

Η επίδραση των PMPs με τις λιποπρωτεΐνες του πλάσματος

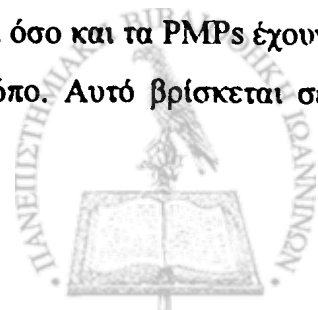
Σε επόμενο στάδιο της μελέτης μας θελήσαμε να διερευνήσουμε την πιθανή συμμετοχή της αλληλεπίδρασης PMPs με τις λιποπρωτεΐνες του πλάσματος στην οξειδωτική τροποποίηση των τελευταίων. Με βάση τα αποτελέσματα μας τα PMPs παρουσίασαν μια δοσο-εξαρτώμενη αναστολή τόσο της οξείδωσης της LDL όσο και της οξείδωσης της HDL παρουσία ιόντων Cu^{2+} . Είναι πιθανόν η ανασταλτική δράση των PMPs να οφείλεται στην περιεκτικότητά τους σε PS αφού είναι γνωστό ότι κατά την διάρκεια την ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων τα αρνητικά φωσφολιπίδια (όπως είναι η PS) μεταφέρονται προς την εξωκυττάρια πλευρά της κυτταρικής μεμβράνης με αποτέλεσμα να βρίσκονται στην επιφάνεια των PMPs. Έχει προταθεί ότι η PS ανέστειλε την επαγόμενη από ιόντα Cu^{2+}



οξειδωση της LDL [525]. Αυτό επιβεβαιώνεται και στην παρούσα μελέτη, όπου η οξειδωτική τροποποίηση των PMPs μειώνει την ικανότητα τους να προστατεύουν την LDL από την οξειδωση. Επίσης παρατηρήθηκε ότι η οξειδωτική τροποποίηση των PMPs με ιόντα Cu^{2+} οδήγησε στη μείωση της πρόσδεσης της αννεξίνης-V συνεπώς την μείωση της έκφρασης της PS στην επιφάνεια των PMPs. Με βάση τα παραπάνω αποτελέσματα φαίνεται ότι η PS πιθανώς να παίζει σημαντικό ρόλο στην αντιοξειδωτική ικανότητα των PMPs.

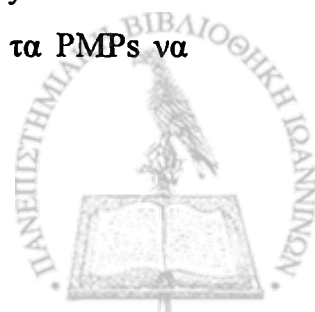
Μια δεύτερη υπόθεση είναι ότι τα πλασμαλογόνα των αιμοπεταλίων [526, 527] πιθανώς να παίζουν ρόλο στην αναστολή της οξειδωσης των λιποπρωτεϊνών του πλάσματος από τα PMPs. Τα πλασμαλογόνα είναι γλυκεροφωσφολιπίδια που περιέχουν έναν α,β -ακόρεστο αιθέρα στην *sn-1* θέση και βρίσκονται σε διάφορα κύτταρα αλλά και ιστούς [528]. Μελέτες έχουν δείξει ότι τα πλασμαλογόνα προστατεύουν τα κύτταρα από το οξειδωτικό στρες δρώντας σαν αντιοξειδωτικό διάμεσου του α,β -ακόρεστου αιθέρα συνδεδεμένου στην *sn-1* θέση [529-531]. Ειδικότερα, στις μελέτες των Hahnel et al. η παρουσία των πλασμαλογόνων οδήγησε στην μείωση της επαγόμενης από ιόντα Cu^{2+} οξειδωση της LDL [532,533]. Η ανασταλτική αυτή δράση των πλασμαλογόνων αποδόθηκε σε πιθανή «χηλική» δέσμευση των ιόντων Cu^{2+} άλλα και στην ικανότητα τους να παρεμποδίζουν την υπεροξειδωση των λιπιδίων. Επιπρόσθετα, τα πλασμαλογόνα βρέθηκαν στις μικροπεριοχές λιπιδίων (Lipid Rafts) κυτταρικής σειράς ανθρώπινων επιδερμικών καρκινικών κυττάρων [534]. Είναι γνωστό ότι μικροπεριοχές λιπιδίων, εμπλέκονται στην ενδοκυττάρια σηματοδότηση [170]. Οι μικροπεριοχές λιπιδίων αυτές είναι λιγότερο ρευστές σε σχέση με την υπόλοιπη κυτταρική μεμβράνη διότι είναι πλούσιες σε σφιγγολιπίδια αλλά και σε χοληστερόλη [170,171]. Μελέτες έχουν δείξει ότι η ακεραιότητα των μικροπεριοχών αυτών είναι απαραίτητη για τη φυσιολογική λειτουργία του SOCE αλλά και για την αναδιοργάνωση και μεταφορά της PS σε ενεργοποιημένα μεγακαρυοκύτταρα [162]. Είναι γνωστό ότι η βασική λειτουργία του SOCE είναι η αύξηση του $[\text{Ca}^{2+}]_i$ μέσα στο κύτταρο με αποτέλεσμα την παραγωγή των PMPs. Οπότε μια πιθανή εξήγηση της βιολογικής δράσης των PMPs κατά την διάρκεια της οξειδωτικής τροποποίησης της LDL θα μπορούσε να είναι η παρουσία στην επιφάνεια των PMPs πλασμαλογόνων τα όποια αποδεδειγμένα ασκούν ανασταλτική δράση ως προς την οξειδωση της LDL.

Στην παρούσα μελέτη δείξαμε επίσης ότι τόσο τα αιμοπετάλια όσο και τα PMPs έχουν την δυνατότητα να δεσμεύσουν την LDL με δοσο-εξαρτώμενο τρόπο. Αυτό βρίσκεται σε



συμφωνία με την βιβλιογραφία άλλα ο ακριβής μηχανισμός με τον οποίο επιτυγχάνεται αυτό βρίσκεται ακόμα υπό διερεύνηση. Τα σημερινά πειραματικά αποτελέσματα παραμένουν αντικρουόμενα για το ποιο είναι το σημείο πρόσδεσης της LDL στα αιμοπετάλια αλλά και στην άμεση συνέπεια της πρόσδεσης αυτής. Φαίνεται ότι η apo B-100 της LDL είναι υπεύθυνη για τη σύνδεση του σωματιδίου με τα αιμοπετάλια με αποτέλεσμα τη μεταφορά των λιπιδίων στη μεμβράνη των αιμοπεταλίων [366]. Άλλη μια πρόσφατη μελέτη του Hussain et al. [367] έδειξε ότι η LDL αλληλεπιδρά με τα αιμοπετάλια διάμεσου του ApoER2 που ανήκει στην οικογένεια των υποδοχέων της LDL. Άλλες μελέτες έχουν δείξει ότι τα αιμοπετάλια εκφράζουν στην επιφάνεια τους περιοχές που παρουσιάζουν υψηλή συγγένεια για την LDL οι οποίες διαφέρουν ανοσολογικά από τους κλασσικούς LDL-υποδοχείς [368]. Επιπρόσθετα, έχει προταθεί ότι η αλληλεπίδραση της LDL με τα αιμοπετάλια γίνεται διάμεσου των γλυκοπρωτεϊνικών υπομονάδων του υποδοχέα $\alpha_{IIb}\beta_3$ [369,370]. Τα παραπάνω έρχονται σε αντίθεση με το Pedreno et al. [371] που υποστηρίζει ότι τα αιμοπετάλια δε δεσμεύονται στην LDL διάμεσου του υποδοχέα $\alpha_{IIb}\beta_3$ ή των υπομονάδων α_{IIb} και β_3 . Τα αιμοπετάλια και τα PMPs δεσμεύονται στην LDL, άλλα ο ακριβής μηχανισμός και περιοχή δέσμευσης δεν έχει διευκρινιστεί ακόμη. Πρόσφατη μελέτη έδειξε ότι τα PMPs εσωτερικεύονται από τα αιμοποιητικά κύτταρα, με αποτέλεσμα την μεταφορά των διαφόρων πρωτεϊνών τους στα κύτταρα αυτά [316]. Οπότε η σημασία της πρόσδεσης της LDL στα PMPs, μπορεί να είναι η μεταφορά δραστικών ουσιών των PMPs σε κύτταρα που αναγνωρίζουν και δεσμεύουν την LDL ή η LDL να μεταφέρεται σε κύτταρα που αναγνωρίζουν και δεσμεύουν τα PMPs. Συνεπώς τα PMPs μπορεί να εμπλέκονται σε διάφορες παθοφυσιολογικές καταστάσεις.

Συνοψίζοντας, τα PMPs περιέχουν δύο μορφές της PAF-AH, και εκκρίνουν την PAF-AH του πλάσματος σε μορφή PMPs. Επιπρόσθετα η PAF-AH των PMPs διαφέρει από την PAF-AH της LDL, διότι δεν είναι γλυκοζυλιωμένη. Τα PMPs αποτελούν παράλληλα και φορέα του ενζύμου στην κυκλοφορία σε συνδυασμό με τις λιποπρωτεΐνες του πλάσματος. Στην συνέχεια τα PMPs ασκούν διάφορες βιολογικές δράσεις τόσο στα μονοκύτταρα όσο και στα ενδοθηλιακά κύτταρα. Επίσης τα PMPs αναστέλλουν την οξείδωση τόσο της LDL όσο και της HDL, δράση η οποία μπορεί να οφείλεται στην περιεκτικότητά τους σε PS. Τα παραπάνω ευρήματα υποδεικνύουν έναν νέο μηχανισμό με το οποίο πιθανώς τα PMPs να συμμετέχουν στην παθοφυσιολογία της αθηροθρόμβωσης.



ΠΕΡΙΛΗΨΗ

ΒΙΟΔΡΑΣΤΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΤΩΝ ΑΙΜΟΠΕΤΑΛΙΩΝ. ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΕΚΚΡΙΣΗΣ ΚΑΙ ΡΟΛΟΣ ΣΤΗΝ ΑΘΗΡΟΓΕΝΕΣΗ.

Ιωάννης Β. Μήτσιος

Διδακτορική Διατριβή
Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

Τα αιμοπετάλια είναι κύτταρα του αίματος, των οποίων ο βασικός τους ρόλος είναι να συμμετέχουν στην πήξη του αίματος μετά από τραυματισμό. Επίσης τα κύτταρα αυτά συμβάλλουν στην ανάπτυξη και εξέλιξη την αθηρωμάτωσης. Είναι γνωστό ότι κατά την διάρκεια την ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων εκκρίνονται διάφοροι βιοδραστικοί παράγοντες που διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην λειτουργία αυτών. Τα μικροσωματίδια των αιμοπεταλίων (PMPs) παράγονται κατά την διάρκεια της ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων. Τα PMPs συμμετέχουν σε διάφορες παθοφυσιολογικές καταστάσεις όπως είναι η φλεγμονή, η πήξη του αίματος άλλα και η λειτουργία του ενδοθηλίου. Στην παρούσα διατριβή θελήσαμε να μελετήσουμε την αλληλεπίδραση των PMPs με τα κύτταρα του αίματος όπως είναι τα ενδοθηλιακά κύτταρα και τα μονοκύτταρα, αλλά και την επίδραση των PMPs στην οξείδωση των λιποπρωτεϊνών του πλάσματος όπως και την συσχέτιση τους με το ένζυμο της PAF-ακετυλοϋδρολάσης (PAF-AH).

Αρχικά παράχθηκαν PMPs με την χρησιμοποίηση των αγωνιστών των αιμοπεταλίων θρομβίνη και ιονοφόρο Ca^{2+} -A23187. Παρατηρήθηκε ότι τα PMPs εκφράζουν χαρακτηριστικές πρωτεΐνες των αιμοπεταλίων όπως και την αννεξίνη-V. Με αυτό τον τρόπο χαρακτηρίσαμε τα μικροσωματίδια μας ως PMPs διότι εκφράζουν θετικότητα ως προς την αννεξίνη-V άλλα και ως προς πρωτεΐνες που προέρχονται από τα κύτταρα προέλευσης που είναι τα αιμοπετάλια. Επιπρόσθετα, ποσοτικοποιήσαμε και το περιεχόμενο των PMPs σε PAF χρησιμοποιώντας πλυμένα αιμοπετάλια κουνελιού. Παρατηρήθηκε, ότι τα PMPs που παράγονται κατά την διάρκεια της ενεργοποίησης των ανθρωπινών αιμοπεταλίων παρουσία του ιονοφόρου Ca^{2+} -A21387 είναι εμπλουτισμένα στον ισχυρό διαμεσολαβητή της φλεγμονής PAF. Η παρουσία του PAF στα απομονωμένα PMPs ταυτοποιήθηκε τόσο με την



χρήση του ειδικού αναστολέα αυτού το CV-3988 όσο και με την χρήση του συστήματος CP/CPK και ασπρίνη.

Στην συνέχεια διερευνήσαμε την ύπαρξη της PAF-AH στα αιμοπετάλια και τον πιθανό τρόπο έκκρισής της από αυτά. Παρατηρήθηκε ότι παρουσία θρομβίνης το ένζυμο εκκρίνεται με δόσο- και χρονο-εξαρτώμενο τρόπο. Χρησιμοποιώντας ανοσοφθορισμό και μικροσκοπία συνεστιάσμου παρατηρήθηκε η ύπαρξη τόσο της ενδοκυττάριας τύπου II μορφής της PAF-AH όσο και της μορφής του πλάσματος. Ειδικότερα, έγινε μερικώς καθαρισμός του ενζύμου και ταυτοποίηση με ανοσοαποτύπωση, παρουσία των μονοκλωνικών αντισωμάτων έναντι της PAF-AH του πλάσματος και της ενδοκυττάριας τύπου II μορφής. Βρέθηκε ότι τα αιμοπετάλια περιέχουν και τις δύο μορφές του ενζύμου αυτού, με την PAF-AH των αιμοπεταλίων να εμφανίζεται στην μη γλυκοζυλιωμένη της μορφή. Επιπρόσθετα, ταυτοποιήθηκε η παρουσία του mRNA της PAF-AH του πλάσματος στα αιμοπετάλια. Στην συνέχεια θελήσαμε να δούμε με ποιο τρόπο εκκρίνεται η PAF-AH από τα αιμοπετάλια. Παρατηρήσαμε ότι η παραγωγή των PMPs γινόταν παράλληλα με την έκκριση του ενζύμου. Παρουσία της θρομβίνης και του πεπτιδίου RGDS δεν παρατηρήθηκε μείωση ούτε της έκκρισης του ενζύμου αλλά ούτε και της παραγωγής των PMPs. Το ίδιο φαινόμενο παρατηρήθηκε όταν σαν αγωνιστής των αιμοπεταλίων χρησιμοποιήθηκε το ιονοφόρο Ca^{2+} -A23187. Αντίθετα, παρουσία της καλπεπτίνης μειώθηκε σημαντικά τόσο η έκκριση της PAF-AH όσο και η παραγωγή των PMPs. Αυτό αποτελεί μια ένδειξη ότι η παραγωγή των PMPs συσχετίζεται άμεσα με την έκκριση της PAF-AH. Επιπλέον, η PAF-AH των απομονωμένων PMPs μοιάζει ενζυμικά με την PAF-AH του πλάσματος. Επιπρόσθετα για πρώτη φορά προσδιορίστηκε η PAF-AH του πλάσματος σε PMPs της κυκλοφορίας, χρησιμοποιώντας μια μέθοδο ELISA, μια ένδειξη που πέρα από τις λιποπρωτεΐνες του πλάσματος και τα PMPs μπορούν να αποτελέσουν φορείς του ιδίου ενζύμου.

Επίσης τα PMPs προκαλούν μια δόσο-εξαρτώμενη μείωση της έκκρισης της PAF-AH από καλλιέργεια μονοκυττάρων, τα οποία αποτελούν την κύρια πηγή της PAF-AH του πλάσματος. Πιθανώς η δράση των PMPs να οφείλεται στην περιεκτικότητά τους σε PAF, αφού ο PAF προκαλεί μείωση της έκκρισης της PAF-AH από τα μονοκύτταρα. Παράλληλα τα PMPs προκάλεσαν μείωση της έκφρασης του CCR2 στα μονοκύτταρα. Επίσης τα PMPs επάγουν τόσο την έκφραση του ICAM-1, VCAM-1 άλλα και την έκκριση της MCP-1 από τα HUVECs. Φαίνεται λοιπόν ότι τα PMPs συμβάλλουν στην ανάπτυξη και εξέλιξη της



αθηρωμάτωσης. Τα PMPs ανέστειλαν την επαγόμενη από ιόντα Cu^{2+} οξείδωση των LDL, HDL. Η ανασταλτική δράση αυτή μπορεί να οφείλεται είτε στην περιεκτικότητα των PMPs σε φωσφατιδυλοσερίνη ή στην παρουσία των πλάσμαλογόνων. Τα παραπάνω ευρήματα υποδεικνύουν ένα νέο μηχανισμό με τον οποίο τα PMPs πιθανά να συμβάλουν στην παθοφυσιολογία της αθηροθρόμβωσης.



ABSTRACT

PLATELET DERIVED BIOACTIVE FACTORS. MECHANISM OF SECRETION AND THEIR ROLE IN ATHEROGENESIS.

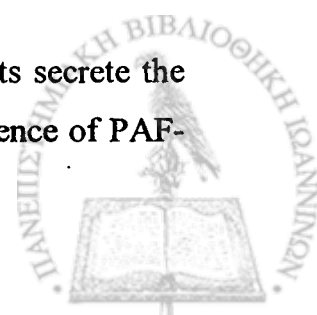
John V. Mitsios

Doctoral Dissertation
Department of Chemistry, University of Ioannina

Blood platelets play a central role in the physiology of primary hemostasis and in the pathophysiological processes of arterial thrombosis. It has been well documented that the blood platelet plays a central role in the development of the atherosclerosis. Upon platelet activation a variety of bioactive compounds are secreted which mediate this process. Platelet derived microparticles (PMPs) are also produced upon platelet activation and exhibit a variety of actions ranging from their effect on inflammation, the coagulation cascade as well as on vascular function. In the present study we focused on the interaction of PMPs with that of endothelial cells and monocytes, the interaction of PMPs with lipoproteins during their oxidative modification as well as the relationship between platelet-activating factor acetylhydrolase (PAF-AH) and PMPs.

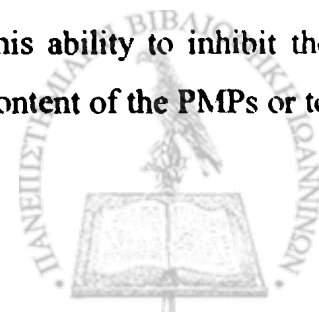
Initially PMPs were produced using two agonists under different experimental conditions; these were thrombin and Ca^{2+} ionophore A23187. As was determined by flow cytometry PMPs express a variety of proteins that are present on platelets including annexin-V. Therefore, when microparticles express both annexin-V as well as proteins that are found on the cell of origin, in this case platelets, one then can characterize these microparticles as PMPs. In addition, PAF was also determined on PMPs using the washed rabbit platelet assay. Isolated PMPs derived from Ca^{2+} ionophore A23187 stimulated washed human platelets are enriched in the potent mediator of inflammation PAF. The aggregatory effect of PMPs was further attributed to PAF since it was inhibited by the PAF specific inhibitor CV-3988. In addition, other bioactive compounds were excluded that might affect the aggregatory effect of PMPs since CP/CPK and aspirin were present in the washed rabbit platelet assay.

Previous studies conducted in our lab have shown that activated platelets secrete the plasma type of PAF-AH, *in vitro*. Therefore, we next studied the possible existence of PAF-



AH in platelets and the mechanism through which this enzyme is secreted from activated platelets. A time- and concentration-dependent secretion of the enzyme was observed when washed human platelets were activated with thrombin. In addition, using immunofluorescence and confocal microscopy we were able to detect the intracellular type II as well as the plasma type of PAF-AH in the platelet. Thus it might be envisioned that platelets absorb the plasma type of PAF-AH either from circulating lipoproteins or from microvesicles derived from monocytes/macrophages, the main cellular source of the plasma type of PAF-AH. However, the above possibilities are unlikely, since both the plasma and the monocytes/macrophage-secreted PAF-AH are N-glycosylated, whereas we show here that platelet PAF-AH lacks glycosylation. Furthermore, we showed that platelets contain high levels of mRNA corresponding to the plasma type of PAF-AH, suggesting that these cells may synthesize *de novo* plasma PAF-AH. Importantly, PAF-AH secretion occurred in parallel to the shedding of PMPs observed during platelet aggregation, although the latter is not required either for PAF-AH secretion or for PMPs production, as documented in the experiments with the peptide RGDS, which inhibited platelet aggregation but did not affect PAF-AH secretion or PMPs production independent of platelet agonist used. In addition, we showed that the shedding of PMPs is required for the secretion of PAF-AH since calpeptin, a specific inhibitor of calpain, significantly inhibited the generation of PMPs as well as the secretion of PAF-AH. Most importantly, by using an immunocaptured ELISA method we demonstrated that not only PMPs generated upon platelet activation *in vitro* but also PMPs existing in plasma of normolipidemic volunteers contain the plasma type of PAF-AH. This is the first indication that in addition to lipoproteins, circulating PMPs are carriers of PAF-AH in human plasma.

We next studied the interaction of PMPs with monocytes, a dose-dependent decrease in the secretion of PAF-AH was observed from monocytes in the presence of PMPs. This inhibitory response may be attributed to the PAF present on PMPs since PAF alone inhibits PAF-AH secretion from monocytes. In addition, PMPs also decreased the expression of CCR2 on monocytes. Therefore, we next studied the interaction of PMPs with endothelial cells and found that PMPs induce the expression of various adhesion molecules such as ICAM-1, VCAM-1 as well as the secretion of MCP-1. In addition, PMPs exhibited an antioxidant effect on Cu^{2+} -induced oxidation of LDL and HDL. This ability to inhibit the oxidation of lipoproteins may be attributed to the phosphatidylserine content of the PMPs or to

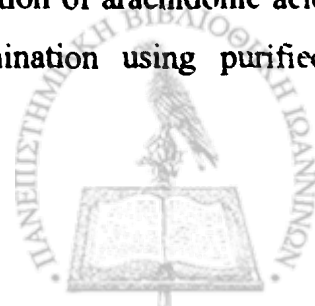


that of plasmalogens. The above findings suggest that PMPs exhibit a variety of functions and may promote atherothrombosis, however, further studies are needed to fully understand the role of PMPs in the development of atherosclerosis.



ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

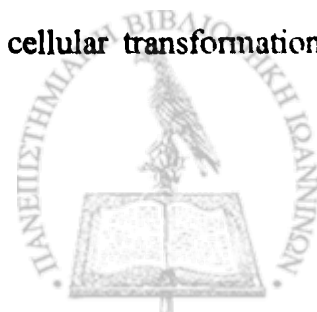
- 1 Hoffman R, Benz EJ, Shattil SJ, Furie B, Cohen HJ, Silberstein LE and McGlove P. Hematology: Basic principles and practice. Churchill and Livingstone 2000.
- 2 Bauer KD, DuQua RE and Shankey TV. Clinical Flow Cytometry: Principles and Application. Williams and Wilkins 1993.
- 3 Frojmovic MM, Milton JG and Duchastel A. Microscopic measurements of platelet aggregation reveal a low ADP-dependent process distinct from turbidometrically measured aggregation. *J. Lab. Clin. Med.* 1983;101:964-976.
- 4 Mustard JF, Packham MA, Kinlough-Rathbone RL, Perry DW and Regoeczi T. Fibrinogen and ADP-induced platelet aggregation. *Blood.* 1978;52:453-466.
- 5 Peerschke EI. The platelet fibrinogen receptor. *Semin. Hematol.* 1985;22:241-259.
- 6 Frojmovic MM and Milton JG. Human platelet size, shape and related functions in health and disease. *Physiol. Rev.* 1982;62:185-261.
- 7 Gear AR. Rapid platelet morphological changes visualized by scanning electron microscopy: kinetics derived from a quenched flow approach. *Br. J. Haematol.* 1984;56:387-398.
- 8 Pedvis LG, Wong T and Frojmovic MM. Differential inhibition of platelet activation sequence: shape change micro- and macro-aggregation by a stable prostacyclin analogue (Iloprost). *Thromb. Haemost.* 1988;59:323-328.
- 9 Rao GHR. Handbook of Platelet Physiology and Pharmacology. Kluwer Academic Publishers 1998.
- 10 Ruggeri ZM. Platelets in atherothrombosis. *Nat. Med.* 2002;8:1227-1234.
- 11 White JG. Platelet Structural Physiology: The ultrastructure of adhesion, secretion and aggregation in arterial thrombosis. *Cardiovasc. Clin.* 1987;18:13-23.
- 12 Schick PK, Kurica KB and Chacko GK. Location of phosphatidylethanolamine and phosphatidylserine in the human platelet plasma membrane. *J Clin. Invest.* 1976;57:1221-1226.
- 13 Perret B, Chap HJ and Douste-Blazy L. Asymmetric distribution of arachidonic acid in the plasma membrane of human platelets. A determination using purified



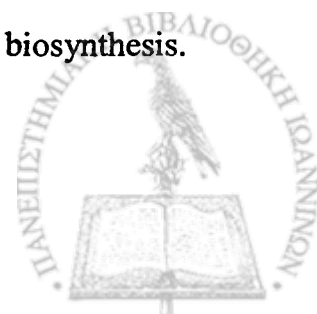
- phospholipases and a rapid method for membrane isolation. *Biochim. Biophys. Acta.* 1979;556:434-446.
- 14 Bevers EM, Comfurius P and Zwaal RF. Changes in membrane phospholipid distribution during platelet activation. *Biochim. Biophys. Acta.* 1983;736:57-66.
- 15 Holmsen H. The Platelet: Its membrane physiology and biochemistry in platelet disorders. In *Clinics in Haematology*, WB Saunders, London 1972;235.
- 16 Saelman EU, Nieuwenhuis HK, Hese KM, de Groot PG, Heijnen HF, Sage EH, Williams S, McKeown L, Gralnick HR. and Sixma JJ. Platelet adhesion to collagen types I through VIII under conditions of stasis and flow is mediated by GPIa/IIa (alpha 2 beta 1-integrin). *Blood.* 1994;83:1244-1250.
- 17 Ginsberg MH, Xiaoping D, O'Toole TE, Loftus JC and Plow FF. Platelet integrins. *Thromb. Haemost.* 1993;70:87-93.
- 18 Skaer RJ, Peters PD and Emmines JP. The localization of calcium and phosphorus in human platelets. *J. Cell Sci.* 1974;15:679-682.
- 19 Bevilacqua M, Butcher E, Furie B, Furie B, Gallatin M, Gimbrone M, Harlan J, Kishimoto K, Lasky L, McEver R, et. al. Selectins. A family of adhesion receptors. *Cell.* 1991;67:233.
- 20 Holmsen H. Significance of testing platelet function in vitro. *Eur. J. Clin. Invest.* 1994;24:3-8.
- 21 Bevilacqua MP and Nelson RM. Selectins. *J. Clin. Invest.* 1993;91:379-387.
- 22 Hallam TJ, Sanchez A and Rink TJ. Stimulus response coupling in human platelets. Changes evoked by platelet-activating factor in cytoplasmic free calcium monitored with the fluorescent calcium indicator quin2. *Biochem. J.* 1984;218:819-827.
- 23 Zucker MB and Nachmias VT. Platelet activation. *Arteriosclerosis.* 1985;5:2-18.
- 24 Berridge MJ. The molecular basis of communication within the cell. *Sci. Am.* 1985;253:142-152.
- 25 Holmsen H. Platelet metabolism and activation. *Semin. Haematol.* 1985;22:219-240.
- 26 Nishizuka Y. Studies and perspectives of protein kinase C. *Science.* 1986;253:305-312.
- 27 Knight DE. Calcium and diacylglycerol control secretion. *Biosci. Rep.* 1987;7:355-367.



- 28 Siess W. Molecular mechanisms of platelet activation. *Physiol. Rev.* 1989;69:159-178.
- 29 Rana RS and Hokin LE. Role of phosphoinositides in transmembrane signaling. *Physiol. Rev.* 1990;70:115-164.
- 30 Kaziro Y, Itoh H, Kozasa T, Nafafuku M and Satoh T. Structure and functions of signal transducing GTP-binding proteins. *Ann. Rev. Biochem.* 1991;60:349-400.
- 31 Rao GH. Physiology of blood platelets activation. *Indian J. Physiol. Pharmacol.* 1993;37:263-275.
- 32 Jurk K and Kehrel BE. Platelets: Physiology and Biochemistry. *Semin. Thromb. Hemost.* 2005;31:381-392.
- 33 Salzman EW. Cyclic AMP and platelet function. *N. Engl. J. Med.* 1972;286:358-363.
- 34 Smith WL. Prostanoid biosynthesis and mechanisms of action. *Am. J. Physiol.* 1992;263:F181-F191.
- 35 Kahn ML, Nakanishi-Matsui M, Shapiro MJ, Ishihara H and Coughlin SR. Protease-activated receptors 1 and 4 mediate activation of human platelets by thrombin. *J. Clin. Invest.* 1999;103:879-887.
- 36 Vu TK, Hung DT, Wheaton VI and Coughlin SR. Molecular cloning of a functional thrombin receptor reveals a novel proteolytic mechanism of receptor activation. *Cell.* 1991;64:1057-1068.
- 37 Xu WF, Andersen H, Whitmore TE, Presnell SR, Yee DP, Ching A, Gilbert T, Davie EW and Foster DC. Cloning and characterization of human protease-activated receptor 4. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. A.* 1998;95:6642-6646.
- 38 Kahn ML, Zheng YW, Huang W, Bigornia V, Zeng D, Moff S, Farese RV Jr, Tam C and Coughlin SR. A dual thrombin receptor system for platelet activation. *Nature.* 1998;394:690-694.
- 39 Faruqi TR, Weiss EJ, Shapiro MJ, Huang W and Coughlin SR. Structure-function analysis of protease-activated receptor 4 tethered ligand peptides. Determinants of specificity and utility in assays of receptor function. *J. Biol. Chem.* 2000;275:19728-19734.
- 40 Burnham MR, Harte MT, Richardson A, Parsons JT and Bouton AH. The identification of P130cas-binding proteins and their role in cellular transformation. *Oncogene.* 1996;12:2467-2472.



- 41 Coughlin SR. Thrombin signalling and protease-activated receptors. *Nature*. 2000;407:258-264.
- 42 Sambrano GR, Weiss EJ, Zheng YW, Huang W and Coughlin SR. Role of thrombin signalling in platelets in haemostasis and thrombosis. *Nature*. 2001;413:74-78.
- 43 Seiler SM, Michel IM and Fenton JW. Involvement of the "tethered ligand" receptor in thrombin inhibition of platelet adenylate cyclase. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 1992;182:1296-1302.
- 44 Huang RS, Sorisky A, Church WR, Simons ER and Rittenhouse SE. "Thrombin" receptor-directed ligand accounts for activation by thrombin of platelet phospholipase C and accumulation of 3-phosphorylated phosphoinositides. *J. Biol. Chem.* 1991;266:18435-18438.
- 45 Baffy G, Yang L, Raj S, Manning DR and Williamson JR. G protein coupling to the thrombin receptor in Chinese hamster lung fibroblasts. *J. Biol. Chem.* 1994;269:8483-8487.
- 46 Covic L, Gresser AL and Kuliopulos A. Biphasic kinetics of activation and signaling for PAR1 and PAR4 thrombin receptors in platelets. *Biochemistry*. 2000;39:5458-5467.
- 47 Hung DT, Vu TK, Wheaton VI, Ishii K and Coughlin SR. Cloned platelet thrombin receptor is necessary for thrombin-induced platelet activation. *J Clin Invest*. 1992;89:1350-1353.
- 48 Brass LF, Vassallo RR Jr, Belmonte E, Ahuja M, Cichowski K and Hoxie JA. Structure and function of the human platelet thrombin receptor. Studies using monoclonal antibodies directed against a defined domain within the receptor N terminus. *J Biol Chem*. 1992;267:13795-13798.
- 49 Lopez JA. The platelet glycoprotein Ib-IX complex. *Blood. Coagul. Fibrinolysis*. 1994;5:97-119.
- 50 Mazzucato M, Marco LD, Masotti A, Pradella P, Bahou WF and Ruggeri ZM. Characterization of the initial alpha-thrombin interaction with glycoprotein Ib alpha in relation to platelet activation. *J. Biol. Chem.* 1998;273:1880-1887.
- 51 Smith WL, Marnett LJ and DeWitt DL. Prostaglandin and thromboxane biosynthesis. *Pharmacol. Ther.* 1991;4:153-179.



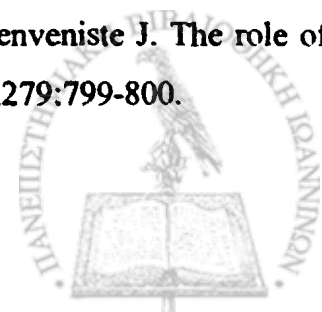
- 52 Halushka PV, Allan CJ and Davis-Bruno KL. Thromboxane A2 receptors. *J. Lipid Mediat. Cell Signal.* 1995;12:361-378.
- 53 Coleman RA, Smith WL and Narumiya S. International Union of Pharmacology Classification of Prostanoid Receptors: Properties, Distribution and Structure of the Receptors and their Subtypes. *Pharmacol. Rev.* 1994;46:205-229.
- 54 Brass L, Shaller CC and Belmonte EJ. Inositol 1,4,5-triphosphate-induced granule secretion in platelets. Evidence that the activation of phospholipase C mediated by platelet thromboxane receptors involves a guanine nucleotide binding protein-dependent mechanism distinct from that of thrombin. *J. Clin. Invest.* 1987;79:1269-1275.
- 55 Kunapuli SP and Daniel JL. P2 receptor subtypes in the cardiovascular system. *Biochem. J.* 1998;336:513-523.
- 56 Offermanns S, Laugwitz KL, Spicher K and Schultz G. G proteins of the G12 family are activated via thromboxane A2 and thrombin receptors in human platelets. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1994;91:504-508.
- 57 Yang X, Sun L, Ghosh S and Rao AK. Human platelet signaling defect characterized by impaired production of inositol-1,4,5-triphosphate and phosphatidic acid and diminished Pleckstrin phosphorylation: evidence for defective phospholipase C activation. *Blood.* 1996;88:1676-1683.
- 58 Gabbeta J, Yang X, Kowalska MA, Sun L, Dhanasekaran N and Rao AK. Platelet signal transduction defect with G α subunit dysfunction and diminished G α q in a patient with abnormal platelet responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1997;94:8750-8755.
- 59 Fabre JE, Nguyen M, Latour A, Keifer JA, Audoly LP, Coffman TM and Koller BH. Decreased platelet aggregation, increased bleeding time and resistance to thromboembolism in P2Y1-deficient mice. *Nat. Med.* 1999;5:1199-1202.
- 60 Hollopeter G, Jantzen HM, Vincent D, Li G, England L, Ramakrishnan V, Yang RB, Nurden P, Nurden A, Julius D and Conley PB. Identification of the platelet ADP receptor targeted by antithrombotic drugs. *Nature.* 2001;409:202-207.



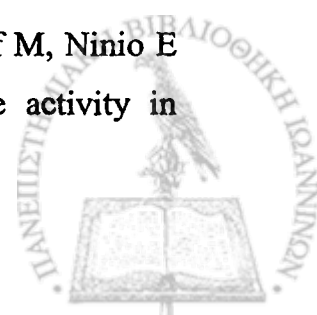
- 61 Dangelmaier C, Jin J, Smith JB and Kunapuli SP. Potentiation of thromboxane A₂-induced platelet secretion by G_i signaling through the phosphoinositide-3 kinase pathway. *Thromb. Haemost.* 2001;85:341-348.
- 62 Jin J and Kunapuli SP. Coactivation of two different G protein-coupled receptors is essential for ADP-induced platelet aggregation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1998;95:8070-8074.
- 63 Dorsam RT, Kim S, Jin J and Kunapuli SP. Coordinated signaling through both G_{12/13} and G_(i) pathways is sufficient to activate GPIIb/IIIa in human platelets. *J. Biol. Chem.* 2002;277:47588-47595.
- 64 Quinton TM, Kim S, Dangelmaier C, Dorsam RT, Jin J, Daniel JL and Kunapuli SP. Protein kinase C- and calcium-regulated pathways independently synergize with G_i pathways in agonist-induced fibrinogen receptor activation. *Biochem. J.* 2002;368:535-543.
- 65 Kauffenstein G, Bergmeier W, Eckly A, Ohlmann P, Leon C, Cazenave JP, Nieswandt B and Gachet C. The P₂Y₍₁₂₎ receptor induces platelet aggregation through weak activation of the alpha(IIb)beta(3) integrin--a phosphoinositide 3-kinase-dependent mechanism. *FEBS Lett.* 2001;505:281-290.
- 66 Nieswandt B, Schulte V, Zywiets A, Gratacap MP and Offermanns S. Costimulation of G_i- and G₁₂/G₁₃-mediated signaling pathways induces integrin alpha IIb beta 3 activation in platelets. *J. Biol. Chem.* 2002;277:39493-39498.
- 67 van Gestel MA, Heemskerk JW, Slaaf DW, Heijnen VV, Reneman RS and oude Egbrink, MG. In vivo blockade of platelet ADP receptor P₂Y₁₂ reduces embolus and thrombus formation but not thrombus stability. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2003;23:518-523.
- 68 Andre P, Delaney SM, LaRocca T, Vincent D, DeGuzman F, Jurek M, Koller B, Phillips DR and Conley PB. P₂Y₁₂ regulates platelet adhesion/activation, thrombus growth, and thrombus stability in injured arteries. *J. Clin. Invest.* 2003;112:398-406.
- 69 Kunapuli SP, Dorsam RT, Kim S and Quinton TM. Platelet purinergic receptors. *Curr. Opin. Pharmacol.* 2003;3:175-180.
- 70 Gachet C. ADP receptors of platelets and their inhibition. *Thromb. Haemost.* 2001;86:222-232.



- 71 Zhang FL, Luo L, Gustafson E, Lachowicz J, Smith M, Qiao X, Liu YH, Chen G, Pramanik B, Laz TM, Palmer K, Bayne M and Monsma FJ Jr. ADP is the cognate ligand for the orphan G protein-coupled receptor SP1999. *J. Biol. Chem.* 2001;276:8608-8615.
- 72 MacKenzie AB, Mahaut-Smith MP and Sage SO. Activation of receptor-operated cation channels via P2X1 not P2T purinoceptors in human platelets. *J. Biol. Chem.* 1996;271:2879-2881.
- 73 Daniel JL, Dangelmaier C, Jin J, Ashby B, Smith JB and Kunapuli SP. Molecular basis for ADP-induced platelet activation I. Evidence for three distinct ADP receptors on human platelets. *J. Biol. Chem.* 1998;273:2024-2029.
- 74 Henson PM. Release of vasoactive amines from rabbit platelets induced by antiplatelet antibody in the presence and absence of complement. *J. Immunol.* 1970;104:924-934.
- 75 Siraganian RP and Osler AG. Destruction of rabbit platelets in the allergic response of sensitized leukocytes. I. Demonstration of a fluid phase intermediate. *J. Immunol.* 1971;106:1244-1251.
- 76 Demopoulos CA, Pinckard RN and Hanahan DJ. Platelet-Activating Factor. Evidence for 1-O-alkyl-2-acetyl-sn-glycerol-3-phosphorylcholine as the active component (a new class of lipid chemical mediators). *J. Biol. Chem.* 1979;254:9355-9358.
- 77 Imaizumi T, Stafforini DM, Yamada Y, McIntyre TM and Prescott SM. Platelet-activating factor: a mediator for clinicians. *J. Intern. Med.* 1995;238:5-20.
- 78 Kroegel C, Yukawa T, Westwick J and Barnes PJ. Evidence for two platelet activating factor receptors on eosinophils: dissociation between PAF-induced intracellular calcium mobilization degranulation and superoxides anion generation in eosinophils. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1989;162:511-521.
- 79 Honda Z, Nakamura M, Miki I, Minami M, Watanabe T, Seyama Y, Okado H, Toh H, Ito K, Miyamoto T and Shimizu T. Cloning by functional expression of platelet-activating factor receptor from guinea-pig lung. *Nature.* 1991;349:342-346.
- 80 Koltai M and Braquet PG. Involvement of PAF in atherogenesis. Brief review. *Agents Actions Suppl.* 1992;37:333-339.
- 81 Chignard M, Le Couedic JP, Tence M, Vargaftig BB and Benveniste J. The role of platelet-activating factor in platelet aggregation. *Nature.* 1979;279:799-800.



- 82 Chap H, Mauco G, Simon MF, Benveniste J and Douste-Blazy L. Biosynthetic labelling of platelet activating factor from radioactive acetate by stimulated platelets. *Nature*. 1981;289:312-314.
- 83 Marcus AJ, Safier LB, Ullman HL, Wong KT, Broekman MJ, Weksler BB and Kaplan KL. Effects of acetyl glyceryl ether phosphorylcholine on human platelet function in vitro. *Blood*. 1981;58:1027-1031.
- 84 Benveniste J, Chignard M, Le Couedic JP and Vargaftig BB. Biosynthesis of platelet-activating factor (PAF-ACETHER). II. Involvement of phospholipase A2 in the formation of PAF-ACETHER and lyso-PAF-ACETHER from rabbit platelets. *Thromb. Res*. 1982;25:375-385.
- 85 McManus LM and Pinckard RN. PAF, a putative mediator of oral inflammation. *Crit. Rev. Oral. Biol. Med*. 2000;11:240-258.
- 86 Renooij W and Snyder R. Biosynthesis of 1-O-alkyl-2-acetyl-sn-glycero-3-phosphocholine (platelet activating factor and a hypotensive lipid) by cholinephosphotransferase in various rat tissues. *Biochim. Biophys. Acta*. 1981;663:545-556.
- 87 Chignard M, Le Couedic JP, Vargaftig BB and Benveniste J. Platelet-activating factor (PAF-acether) secretion from platelets: effect of aggregating agents. *Br. J. Haematol*. 1980;46:455-464.
- 88 Iwamoto S, Kawasaki T, Kambayashi J, Ariyoshi H and Monden M. Platelet microparticles: A carrier of Platelet-activating factor? *Biochem. Biophys. Res. Comm*. 1996;218:940-944.
- 89 Iwamoto S, Kawasaki T, Kambayashi J, Ariyoshi H, Shinoki N, Sakon M, Ikeda Y and Monden M. The release mechanism of platelet-activating factor during shear-stress induced platelet aggregation. *Biochem. Biophys. Res. Comm*. 1997;239:101-105.
- 90 Blank ML, Lee T, Fitzgerald V and Snyder F. A specific acetylhydrolase for 1-alkyl-2-acetyl-sn-glycero-3-phosphocholine (a hypotensive and platelet-activating lipid). *J. Biol. Chem*. 1981;256:175-178.
- 91 Goudevenos J, Tselepis AD, Vini MP, Michalis L, Tsoukatos DC, Elisaf M, Ninio E and Sideris DA. Platelet-associated and secreted PAF-acetylhydrolase activity in



- patients with stable angina: sequential changes of the enzyme activity after angioplasty. *Eur. J. Clin. Invest.* 2001;31:15-23.
- 92 Saltzman AG, Morse B, Whitman MM, Ivanshchenko Y, Jaye M and Felder S. Cloning of the human serotonin 5-HT₂ and 5-HT_{1C} receptor subtypes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1991;181:1469-1478.
- 93 Pletscher A. The 5-hydroxytryptamine system of blood platelets: physiology and pathophysiology. *Int. J. Cardiol.* 1987;14:177-188.
- 94 Newman KD, Williams LT, Bishopric NH and Lefkowitz RJ. Identification of alpha-adrenergic receptors in human platelets by [3H]dihydroergocryptine binding. *J. Clin. Invest.* 1978;61:395-402.
- 95 Kaywin P, McDonough M, Insel PA and Shattil SJ. Platelet function in essential thrombocythemia. Decreased epinephrine responsiveness associated with a deficiency of platelet alpha-adrenergic receptors. *N. Engl. J. Med.* 1978;299:505-509.
- 96 Motulsky HJ and Insel PA. [3H]Dihydroergocryptine binding to alpha-adrenergic receptors of human platelets. A reassessment using the selective radioligands [3H]prazosin, [3H]yohimbine, and [3H]rauwolscine. *Biochem. Pharmacol.* 1982;31:2591-2597.
- 97 Loftus JC and Liddington RC. Cell adhesion in vascular biology. New insights into integrin-ligand interaction. *J. Clin. Invest.* 1997;99:2302-2306.
- 98 Hers I, Donath J, Litjens PE, van Willigen G and Akkerman JW. Inhibition of platelet integrin alpha(IIb)beta(3) by peptides that interfere with protein kinases and the beta(3) tail. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2000;20:1651-1660.
- 99 Shattil SJ, Kashiwagi H and Pampori N. Integrin signaling: the platelet paradigm. *Blood.* 1998;91:2645-2657.
- 100 Sastry SK and Horwitz AF. Adhesion-growth factor interactions during differentiation: an integrated biological response. *Dev. Biol.* 1996;80:55-467.
- 101 Miyamoto S, Teramoto H, Gutkind JS and Yamada KM. Integrins can collaborate with growth factors for phosphorylation of receptor tyrosine kinases and MAP kinase activation: roles of integrin aggregation and occupancy of receptors. *J. Cell Biol.* 1996;35:1633-1642.



- 102 Juliano R. Cooperation between soluble factors and integrin-mediated cell anchorage in the control of cell growth and differentiation. *Bioessays*. 1996;18:911-917.
- 103 Peerschke EI. Regulation of platelet aggregation by post-fibrinogen binding events. Insights provided by dithiothreitol-treated platelets. *Thromb. Haemost.* 1995;73:862-867.
- 104 Hartwig JH, Kung S, Kovacsovics T, Janmey PA, Cantley LC, Stossel TP and Toker A. D3 phosphoinositides and outside-in integrin signaling by glycoprotein IIb-IIIa mediate platelet actin assembly and filopodial extension induced by phorbol 12-myristate 13-acetate. *J. Biol. Chem.* 1996;271:32986-32993.
- 105 Hartwig JH. Mechanisms of actin rearrangements mediating platelet activation. *J. Cell Biol.* 1992;118:1421-1442.
- 106 Shattil SJ, Ginsberg MH and Brugge JS. Adhesive signaling in platelets. *Curr. Opin. Cell Biol.* 1994;6:695-704.
- 107 Yuan Y, Dopheide SM, Ivanidis C, Salem HH and Jackson SP. Calpain regulation of cytoskeletal signaling complexes in von Willebrand factor-stimulated platelets. Distinct roles for glycoprotein Ib-V-IX and glycoprotein IIb-IIIa (integrin α IIb β 3) in von Willebrand factor-induced signal transduction. *J. Biol. Chem.* 1997;272:21847-21854.
- 108 Leng L, Kashiwagi H, Ren XD and Shattil SJ. RhoA and the function of platelet integrin α IIb β 3. *Blood*. 1998;91:4206-4215.
- 109 Nachmias VT and Golla R. Vinculin in relation to stress fibers in spread platelets. *Cell. Motil. Cytoskeleton*. 1991;20:190-202.
- 110 Clark EA and Brugge JS. Integrins and signal transduction pathways: the road taken. *Science*. 1995;268:233-239.
- 111 Laffargue M, Monnereau L, Tuech J, Ragab A, Ragab-Thomas J, Payrastre B, Raynal P and Chap H. Integrin-dependent tyrosine phosphorylation and cytoskeletal translocation of Tec in thrombin-activated platelets. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1997;238:247-251.
- 112 Giuriato S, Payrastre B, Drayer AL, Plantavid M, Woscholski R, Parker P, Erneux C and Chap H. Tyrosine phosphorylation and relocation of SHIP are integrin-mediated in thrombin-stimulated human blood platelets. *J. Biol. Chem.* 1997;272:26857-26863.



- 113 Clemetson KJ, McGregor JL, James E, Dechavanne M and Luscher EF. Characterization of the platelet membrane glycoprotein abnormalities in Bernard-Soulier syndrome and comparison with normal by surface-labeling techniques and high-resolution two-dimensional gel electrophoresis. *J. Clin. Invest.* 1982;70:304-311.
- 114 Hynes RO. *Fibronectins*. Springer-Verlag, New York 1989.
- 115 Beumer S, IJsseldijk MJ, de Groot PG and Sixma JJ. Platelet adhesion to fibronectin in flow: dependence on surface concentration and shear rate, role of platelet membrane glycoproteins GP IIb/IIIa and VLA-5, and inhibition by heparin. *Blood.* 1994;84:3724-3733.
- 116 Beumer S, Heijnen HF, IJsseldijk MJ, Orlando E, de Groot PG and Sixma JJ. Platelet adhesion to fibronectin in flow: the importance of von Willebrand factor and glycoprotein Ib. *Blood.* 1995;86:3452-3460.
- 117 Kroll MH, Harris TS, Moake JL, Handin RI and Schafer AI. von Willebrand factor binding to platelet GpIb initiates signals for platelet activation. *J. Clin. Invest.* 1991;88:1568-1573.
- 118 Watson S, Berlanga O, Best D and Frampton J. Update on collagen receptor interactions in platelets: is the two-state model still valid? *Platelets.* 2000;11:252-258.
- 119 Smith JB, Selak MA, Dangelmaier C and Daniel JL. Cytosolic calcium as a second messenger for collagen-induced platelet responses. *Biochem. J.* 1992;288:925-929.
- 120 Savage B, Saldivar E and Ruggeri ZM. Initiation of platelet adhesion by arrest onto fibrinogen or translocation on von Willebrand factor. *Cell.* 1996;84:289-297.
- 121 Savage B, Almus-Jacobs F and Ruggeri ZM. Specific synergy of multiple substrate-receptor interactions in platelet thrombus formation under flow. *Cell.* 1998;94:657-666.
- 122 Fuster V and Jang IK. Role of platelet-inhibitor agents in coronary artery disease.:In *Textbook of Interventional Cardiology* (Topol, E. J., ed.), WB Saunders, Philadelphia 1994;3-22.
- 123 Lefkovits J, Plow EF and Topol EJ. Platelet glycoprotein IIb/IIIa receptors in cardiovascular medicine. *N. Engl. J. Med.* 1995;332:1553-1559.
- 124 Rosen P, Schwippert B and Tschöpe D. Adhesive proteins in platelet-endothelial interactions. *Eur. J. Clin. Invest.* 1994;24:21-24.



- 125 Wolf P. The nature and significance of platelet products in human plasma. *Br. J. Haematol.* 1967;13:269-288.
- 126 Horstman LL and Ahn YS. Platelet microparticles: a wide-angle perspective. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 1999;30:111-142.
- 127 Casciola-Rosen L, Rosen A, Petri M and Schliessel M. Surface blebs on apoptotic cells are sites of enhanced procoagulant activity: implications for coagulation events and antigenic spread in systemic lupus erythematosus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1996;93:1624-1629.
- 128 Dvorak HF, Van DeWater L, Bitzer AM, Dvorak AM, Anderson D, Harvey VS, Bach R, Davis GL, DeWolf W and Carvalho AC. Procoagulant activity associated with plasma membrane vesicles shed by cultured tumor cells. *Cancer Res.* 1983;43:4434-4442.
- 129 Combes V, Simon AC, Grau GE, Arnoux D, Camoin L, Sabatier F, Mutin M, Sanmarco M, Sampol J and Dignat-George F. In vitro generation of endothelial microparticles and possible prothrombotic activity in patients with lupus anticoagulant. *J. Clin. Invest.* 1999;104:93-102.
- 130 Hamilton KK, Hattori R, Esmon CT and Sims PJ. Complement proteins C5b-9 induce vesiculation of the endothelial plasma membrane and expose catalytic surface for assembly of the prothrombinase enzyme complex. *J. Biol. Chem.* 1990;265:3809-3814.
- 131 Franck PF, Bevers EM, Lubin BH, Comfurius P, Chiu DT, Op den Kamp JA, Zwaal RF, van Deenen LL and Roelofsen B. Uncoupling of the membrane skeleton from the lipid bilayer. The cause of accelerated phospholipid flip-flop leading to an enhanced procoagulant activity of sickled cells. *J. Clin. Invest.* 1985;75:183-190.
- 132 Satta N, Toti F, Feugeas O, Bohbot A, Dachary-Prigent J, Eschwege V, Hedman H and Freyssinet JM. Monocyte vesiculation is a possible mechanism for dissemination of membrane-associated procoagulant activities and adhesion molecules after stimulation by lipopolysaccharide. *J. Immunol.* 1994;153:3245-3255.
- 133 Zwaal RF and Schroit AJ. Pathophysiologic implications of membrane phospholipid asymmetry in blood cells. *Blood.* 1997;89:1121-1132.



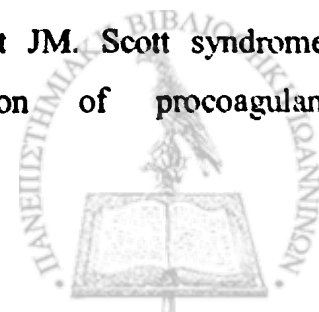
- 134 Coleman ML, Sahai EA, Yeo M, Bosch M, Dewar A and Olson MF. Membrane blebbing during apoptosis results from caspase-mediated activation of ROCK I. *Nat. Cell Biol.* 2001;3:339-345.
- 135 Mallat Z and Tedgui A. Current perspective on the role of apoptosis in atherothrombotic disease. *Circ. Res.* 2001;88:998-1003.
- 136 Cotter TG, Lennon SV, Glynn JM and Green DR. Microfilament-disrupting agents prevent the formation of apoptotic bodies in tumor cells undergoing apoptosis. *Cancer Res.* 1992;52:997-1005.
- 137 Mills JC, Stone NL, Erhardt J and Pittman RN. Apoptotic membrane blebbing is regulated by myosin light chain phosphorylation. *J. Cell Biol.* 1998;140:627-636.
- 138 Maekawa M, Ishizaki T, Boku S, Watanabe N, Fujita A, Iwamatsu A, Obinata T, Ohashi K, Mizuno K and Narumiya S. Signaling from Rho to the actin cytoskeleton through protein kinases ROCK and LIM-kinase. *Science.* 1999;285:895-898.
- 139 VanWijk MJ, VanBavel E, Sturk A and Nieuwland R. Microparticles in cardiovascular diseases. *Cardiovasc. Res.* 2003;59:277-287.
- 140 Gilbert GE, Sims PJ, Wiedmer T, Furie B, Furie BC and Shattil SJ. Platelet-derived microparticles express high affinity receptors for factor VIII. *J. Biol. Chem.* 1991;266:17261-17268.
- 141 Sims PJ, Wiedmer T, Esmon CT, Weiss HJ and Shattil SJ. Assembly of the platelet prothrombinase complex is linked to vesiculation of the platelet plasma membrane. Studies in Scott syndrome: an isolated defect in platelet procoagulant activity. *J. Biol. Chem.* 1989;264:17049-1757.
- 142 Nomura S, Komiyama Y, Matsuura E, Xie GL, Katsura K, Miyake T, Miyazaki Y, Kagawa H, Koike T and Fukuhara S. Participation of alpha IIb beta 3 in platelet microparticle generation by collagen plus thrombin. *Haemostasis.* 1996;26:31-37.
- 143 Bode AP, Orton SM, Frye MJ and Udis B. Vesiculation of platelets during in vitro aging. *Blood.* 1991;77:887-895.
- 144 Thery C, Zitvogel L and Amigorena S. Exosomes: composition, biogenesis and function. *Nat. Rev. Immunol.* 2002;2:569-579.



- 145 Dachary-Prigent J, Pasquet JM, Freyssinet JM and Nurden AT. Calcium involvement in aminophospholipid exposure and microparticle formation during platelet activation: a study using Ca^{2+} -ATPase inhibitors. *Biochemistry*. 1995;34:11625-11634.
- 146 Dachary-Prigent J, Pasquet JM, Fressinaud E, Toti F, Freyssinet JM and Nurden AT. Aminophospholipid exposure, microvesiculation and abnormal protein tyrosine phosphorylation in the platelets of a patient with Scott syndrome: a study using physiologic agonists and local anaesthetics. *Br. J. Haematol*. 1997;99:959-967.
- 147 Sims PJ, Faioni EM, Wiedmer T and Shattil SJ. Complement proteins C5b-9 cause release of membrane vesicles from the platelet surface that are enriched in the membrane receptor for coagulation factor Va and express prothrombinase activity. *J. Biol. Chem*. 1988;263:18205-18212.
- 148 Pasquet JM, Dachary-Prigent J and Nurden AT. Microvesicle release is associated with extensive protein tyrosine dephosphorylation in platelets stimulated by A23187 or a mixture of thrombin and collagen. *Biochem. J*. 1998;333:591-599.
- 149 Gemmell CH, Ramirez SM, Yeo EL and Sefton MV. Platelet activation in whole blood by artificial surfaces: identification of platelet-derived microparticles and activated platelet binding to leukocytes as material-induced activation events. *J. Lab. Clin. Med*. 1995;125:276-287.
- 150 Holme PA, Orvim U, Hamers MJ, Solum NO, Brosstad FR, Barstad RM and Sakariassen KS. Shear-induced platelet activation and platelet microparticle formation at blood flow conditions as in arteries with a severe stenosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol*. 1997;17:646-653.
- 151 Miyazaki Y, Nomura S, Miyake T, Kagawa H, Kitada C, Taniguchi H, Komiyama Y, Fujimura Y, Ikeda Y and Fukuhara S. High shear stress can initiate both platelet aggregation and shedding of procoagulant containing microparticles. *Blood*. 1996;88:3456-3464.
- 152 Sakariassen KS, Holme PA, Orvim U, Barstad RM, Solum NO and Brosstad FR. Shear-induced platelet activation and platelet microparticle formation in native human blood. *Thromb. Res*. 1998;92:S33-S41.



- 153 Wiedmer T, Shattil SJ, Cunningham M and Sims PJ. Role of calcium and calpain in complement-induced vesiculation of the platelet plasma membrane and in the exposure of the platelet factor Va receptor. *Biochemistry*. 1990;29:623-632.
- 154 Heemskerk JW, Vuist WM, Feijge MA, Reutelingsperger CP and Lindhout T. Collagen but not fibrinogen surfaces induce bleb formation, exposure of phosphatidylserine, and procoagulant activity of adherent platelets: evidence for regulation by protein tyrosine kinase-dependent Ca^{2+} responses. *Blood*. 1997;90:2615-2625.
- 155 Smeets EF, Heemskerk JW, Comfurius P, Bevers EM and Zwaal RF. Thapsigargin amplifies the platelet procoagulant response caused by thrombin. *Thromb. Haemost.* 1993;70:1024-1029.
- 156 Pasquet JM, Dachary-Prigent J and Nurden AT. Calcium influx is a determining factor of calpain activation and microparticle formation in platelets. *Eur. J. Biochem.* 1996;239:647-654.
- 157 Martinez MC, Martin S, Toti F, Fressinaud E, Dachary-Prigent J, Meyer D and Freyssinet JM. Significance of capacitative Ca^{2+} entry in the regulation of phosphatidylserine expression at the surface of stimulated cells. *Biochemistry*. 1999;38:10092-10098.
- 158 Venkatachalam K, van Rossum DB, Patterson RL, Ma HT and Gill DL. The cellular and molecular basis of store-operated calcium entry. *Nat. Cell Biol.* 2002;4:E263-E272.
- 159 Kunzelmann-Marche C, Freyssinet JM and Martinez MC. Regulation of phosphatidylserine transbilayer redistribution by store-operated Ca^{2+} entry: role of actin cytoskeleton. *J. Biol. Chem.* 2001;276:5134-5139.
- 160 Bevers EM, Wiedmer T, Comfurius P, Zhao J, Smeets EF, Schlegel RA, Schroit AJ, Weiss HJ, Williamson P, Zwaal RF and Sims PJ. The complex of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate and calcium ions is not responsible for Ca^{2+} -induced loss of phospholipid asymmetry in the human erythrocyte: a study in Scott syndrome, a disorder of calcium-induced phospholipid scrambling. *Blood*. 1995;86:1983-1991.
- 161 Toti F, Satta N, Fressinaud E, Meyer D and Freyssinet JM. Scott syndrome, characterized by impaired transmembrane migration of procoagulant



- phosphatidylserine and hemorrhagic complications, is an inherited disorder. *Blood*. 1996;87:1409-1415.
- 162 Kunzelmann-Marche C, Freyssinet JM and Martinez MC. Loss of plasma membrane phospholipid asymmetry requires raft integrity. Role of transient receptor potential channels and ERK pathway. *J. Biol. Chem.* 2002;277:19876-19881.
- 163 Freyssinet JM. Cellular microparticles: what are they bad or good for? *J. Thromb. Haemost.* 2003;1:1655-1662.
- 164 Tsai WJ, Chen JC and Wang CT. Changes in both calcium pool size and morphology of human platelets incubated in various concentrations of calcium ion. Calcium-specific bleb formation on platelet-membrane surface. *Biochim. Biophys. Acta.* 1988;940:105-120.
- 165 Tsujinaka T, Sakon M, Kambayashi J and Kosaki G. Cleavage of cytoskeletal proteins by two forms of Ca²⁺ activated neutral proteases in human platelets. *Thromb. Res.* 1982;28:149-156.
- 166 Sims PJ and Wiedmer T. Unraveling the mysteries of phospholipid scrambling. *Thromb. Haemost.* 2001;86:266-275.
- 167 Zhou Q, Zhao J, Stout JG, Luhm RA, Wiedmer T and Sims PJ. Molecular cloning of human plasma membrane phospholipid scramblase. A protein mediating transbilayer movement of plasma membrane phospholipids. *J. Biol. Chem.* 1997;272:18240-18244.
- 168 Wiedmer T, Zhou Q, Kwoh DY and Sims PJ. Identification of three new members of the phospholipid scramblase gene family. *Biochim. Biophys. Acta.* 2000;1467:244-253.
- 169 Zhou Q, Zhao J, Wiedmer T and Sims PJ. Normal hemostasis but defective hematopoietic response to growth factors in mice deficient in phospholipid scramblase 1. *Blood*. 2002;99:4030-4038.
- 170 van Meer G. Cell biology. The different hues of lipid rafts. *Science*. 2002;296:855-857.
- 171 Edidin M. Shrinking patches and slippery rafts: scales of domains in the plasma membrane. *Trends. Cell. Biol.* 2001;11:492-496.



- 172 Bucki R, Giraud F and Sulpice JC. Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate domain inducers promote phospholipid transverse redistribution in biological membranes. *Biochemistry*. 2000;39:5838-5844.
- 173 Bucki R, Janmey PA, Vegners R, Giraud F and Sulpice JC. Involvement of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate in phosphatidylserine exposure in platelets: use of a permeant phosphoinositide-binding peptide. *Biochemistry*. 2001;40:15752-15761.
- 174 O'Connell DJ, Rozenvayn N and Flaumenhaft R. Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate regulates activation-induced platelet microparticle formation. *Biochemistry*. 2005;44:6361-6370.
- 175 Flaumenhaft R. Formation and fate of platelet microparticles. *Blood Cells Mol. Dis.* 2006;36:182-187.
- 176 van Blitterswijk WJ, van der Luit AH, Veldman RJ, Verheij M and Borst J. Ceramide: second messenger or modulator of membrane structure and dynamics? *Biochem. J.* 2003;369:199-211.
- 177 Van Eck M, Pennings M, Hoekstra M, Out R and Van Berkel TJ. Scavenger receptor BI and ATP-binding cassette transporter A1 in reverse cholesterol transport and atherosclerosis. *Curr. Opin. Lipidol.* 2005;16:307-315.
- 178 Stefkova J, Poledne R and Hubacek JA. ATP-binding cassette (ABC) transporters in human metabolism and diseases. *Physiol. Res.* 2004;53:235-243.
- 179 Lee JY and Parks JS. ATP-binding cassette transporter AI and its role in HDL formation. *Curr. Opin. Lipidol.* 2005;16:19-25.
- 180 Knight BL. ATP-binding cassette transporter A1: regulation of cholesterol efflux. *Biochem. Soc. Trans.* 2004;32:124-127.
- 181 van Helvoort A, Smith AJ, Sprong H, Fritzsche I, Schinkel AH, Borst P and van Meer G. MDR1 P-glycoprotein is a lipid translocase of broad specificity, while MDR3 P-glycoprotein specifically translocates phosphatidylcholine. *Cell*. 1996;87:507-517.
- 182 Young SG and Fielding CJ. The ABCs of cholesterol efflux. *Nat. Genet.* 1999;22:316-318.
- 183 Hamon Y, Broccardo C, Chambenoit O, Luciani MF, Toti F, Chaslin S, Freyssinet JM, Devaux PF, McNeish J, Marguet D and Chimini G. ABC1 promotes engulfment



- of apoptotic cells and transbilayer redistribution of phosphatidylserine. *Nat. Cell Biol.* 2000;2:399-406.
- 184 Gaffet P, Bettache N and Bienvenue A. Phosphatidylserine exposure on the platelet plasma membrane during A23187-induced activation is independent of cytoskeleton reorganization. *Eur. J. Cell Biol.* 1995;67:336-345.
- 185 Yano Y, Kambayashi J, Shiba E, Sakon M, Oiki E, Fukuda K, Kawasaki T and Mori T. The role of protein phosphorylation and cytoskeletal reorganization in microparticle formation from the platelet plasma membrane. *Biochem. J.* 1994;299:303-308.
- 186 Shcherbina A and Remold-O'Donnell E. Role of caspase in a subset of human platelet activation responses. *Blood.* 1999;93:4222-4231.
- 187 Vanags DM, Orrenius S and Aguilar-Santelises M. Alterations in Bcl-2/Bax protein levels in platelets form part of an ionomycin-induced process that resembles apoptosis. *Br. J. Haematol.* 1997;99:824-831.
- 188 Wolf BB, Goldstein JC, Stennicke HR, Beere H, Amarante-Mendes GP, Salvesen GS and Green DR. Calpain functions in a caspase-independent manner to promote apoptosis-like events during platelet activation. *Blood.* 1999;94:1683-1692.
- 189 Thornberry NA. The caspase family of cysteine proteases. Royal Society of Medicine Press Ltd, London, 1997.
- 190 Levy-Toledano S, Gallet C, Nadal F, Bryckaert M, Maclouf J and Rosa JP. Phosphorylation and dephosphorylation mechanisms in platelet function: a tightly regulated balance. *Thromb. Haemost.* 1997;78:226-233.
- 191 Thiagarajan P and Tait JF. Collagen-induced exposure of anionic phospholipid in platelets and platelet-derived microparticles. *J. Biol. Chem.* 1991;266:24302-24307.
- 192 Gemmell CH, Sefton MV and Yeo EL. Platelet-derived microparticle formation involves glycoprotein IIb-IIIa. Inhibition by RGDS and a Glanzmann's thrombasthenia defect. *J. Biol. Chem.* 1993;268:14586-14589.
- 193 Reverter JC, Beguin S, Kessels H, Kumar R, Hemker HC and Coller BS. Inhibition of platelet-mediated, tissue factor-induced thrombin generation by the mouse/human chimeric 7E3 antibody. Potential implications for the effect of c7E3 Fab treatment on acute thrombosis and "clinical restenosis". *J. Clin. Invest.* 1996;98:863-874.



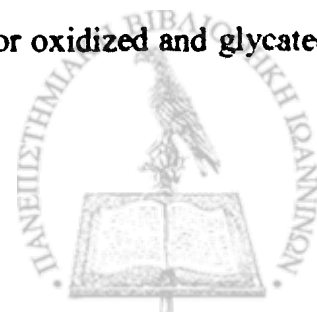
- 194 Holme PA, Solum NO, Brosstad F, Egberg N and Lindahl TL. Stimulated Glanzmann's thrombasthenia platelets produced microvesicles. Microvesiculation correlates better to exposure of procoagulant surface than to activation of GPIIb-IIIa. *Thromb. Haemost.* 1995;74:1533-1540.
- 195 Fujimoto T, Fujimura K and Kuramoto A. Electrophysiological evidence that glycoprotein IIb-IIIa complex is involved in calcium channel activation on human platelet plasma membrane. *J. Biol. Chem.* 1991;266:16370-16375.
- 196 Rybak ME, Renzulli LA, Bruns MJ and Cahaly DP. Platelet glycoproteins IIb and IIIa as a calcium channel in liposomes. *Blood.* 1988;72:714-720.
- 197 Nomura S, Nagata H, Suzuki M, Iwata K, Kawakatsu T, Kido H, Fukuroi T, Yamaguchi K, Yanabu M, Soga T, Kokawa T and Yasunaga K. Effects of ticlopidine on monoclonal anti-CD9 antibody-induced platelet aggregation and microparticle generation. *Thromb. Res.* 1992;65:95-104.
- 198 Weiss HJ and Lages B. Platelet prothrombinase activity and intracellular calcium responses in patients with storage pool deficiency, glycoprotein IIb-IIIa deficiency, or impaired platelet coagulant activity--a comparison with Scott syndrome. *Blood.* 1997;89:1599-1611.
- 199 Fox JE, Taylor RG, Taffarel M, Boyles JK and Goll DE. Evidence that activation of platelet calpain is induced as a consequence of binding of adhesive ligand to the integrin, glycoprotein IIb-IIIa. *J. Cell Biol.* 1993;120:1501-1507.
- 200 Solum NO. Procoagulant expression in platelets and defects leading to clinical disorders. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 1999;19:2841-2846.
- 201 Atkinson JP, Krych M, Nickells M, Birmingham D, Subramanian VB, Clemenza L, Alvarez J and Liszewski K. Complement receptors and regulatory proteins: immune adherence revisited and abuse by microorganisms. *Clin. Exp. Immunol.* 1994;97:1-3.
- 202 Birmingham DJ and Hebert LA. CR1 and CR1-like: the primate immune adherence receptors. *Immunol. Rev.* 2001;180:100-111.
- 203 Hess C and Schifferli JA. Immune adherence revisited: novel players in an old game. *News Physiol. Sci.* 2003;18:104-108.



- 204 Sahu A and Lambris JD. Structure and biology of complement protein C3, a connecting link between innate and acquired immunity. *Immunol. Rev.* 2001;180:35-48.
- 205 Law SK and Dodds AW. The internal thioester and the covalent binding properties of the complement proteins C3 and C4. *Protein Sci.* 1997;6:263-274.
- 206 Sahu A, Kozel TR and Pangburn MK. Specificity of the thioester-containing reactive site of human C3 and its significance to complement activation. *Biochem. J.* 1994;302:429-436.
- 207 Sahu A and Pangburn MK. Tyrosine is a potential site for covalent attachment of activated complement component C3. *Mol. Immunol.* 1995;32:711-716.
- 208 Esterbauer H, Gebicki J, Puhl H and Jurgens G. The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL. *Free Radic. Biol. Med.* 1992;13:341-390.
- 209 Esterbauer H, Dieber-Rotheneder M, Waeg G, Striegl G and Jurgens G. Biochemical, structural, and functional properties of oxidized low-density lipoprotein. *Chem. Res. Toxicol.* 1990;3:77-92.
- 210 Narvanen O, Erkkila A and Yla-Herttuala S. Evaluation and characterization of EIA measuring autoantibodies against oxidized LDL. *Free Radic. Biol. Med.* 2001;31:769-777.
- 211 Hevonoja T, Pentikainen MO, Hyvonen MT, Kovanen PT and Ala-Korpela M. Structure of low density (LDL) particles: Basis for understanding molecular changes in modified LDL. *Biochim. Biophys. Acta.* 2000;1488:189-210.
- 212 Choy PC, Siow YL, Mymin D and Karmin O. Lipids and atherosclerosis. *Biochem. Cell. Biol.* 2004;82:212-224.
- 213 Mertens A and Holvoet P. Oxidized LDL and HDL: antagonists in atherothrombosis. *FASEB J.* 2001;15:2073-2084.
- 214 Ramos P, Giese SP, Schuster B and Esterbauer H. Effect of temperature and phase transition on oxidation resistance of low density lipoprotein. *J. Lipid Res.* 1995;36:2113-2128.
- 215 Havel RJ and Hamilton RL. Hepatic catabolism of remnant lipoproteins: where the action is. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2004;24:213-215.



- 216 Steinberg D, Lewis A, Conner Memorial Lecture. Oxidative modification of LDL and atherogenesis. *Circulation*. 1997;95:1062-1071.
- 217 Kane J. Structure and function of the plasma lipoproteins and their receptors. In *Atherosclerosis and coronary artery disease*, Lippincott-Raven, Philadelphia 1996.
- 218 Soccio RE and Breslow JL. Intracellular cholesterol transport. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol*. 2004;24:1150-1160.
- 219 Itabe H. Oxidized phospholipids as a new landmark in atherosclerosis. *Prog. Lipid Res*. 1998;37:181-207.
- 220 Dejager S, Bruckert E and Chapman MJ. Dense low density lipoprotein subspecies with diminished oxidative resistance predominate in combined hyperlipidemia. *J. Lipid Res*. 1993;34:295-308.
- 221 Austin MA, King MC, Vranizan KM and Krauss RM. Atherogenic lipoprotein phenotype. A proposed genetic marker for coronary heart disease risk. *Circulation*. 1990;82:495-506.
- 222 Chapman MJ, Lund-Katz S, Phillips MC, Prassl R, Laggner P, Flament C, Goulinet S, Nigon F, Rouis M, Lapland PM, Geurin M, Bruckert E and Dolphin PJ. LDL subfractions: properties and functions. In *Atherosclerosis X* (Woodford, F. P., Davignon, J. and Sniderman, A., eds.), Elsevier Science 1995;977-979.
- 223 Carmena R, Duriez P and Fruchart JC. Atherogenic lipoprotein particles in atherosclerosis. *Circulation*. 2004;109:III2-III7.
- 224 Lamarche B, St-Pierre AC, Ruel IL, Cantin B, Dagenais GR and 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;17:859-865.
- 225 Stampfer MJ, Krauss RM, Ma J, Blanche PJ, Holl LG, Sacks FM and Hennekens CH. A prospective study of triglyceride level, low-density lipoprotein particle diameter, and risk of myocardial infarction. *JAMA*. 1996;276:882-888.
- 226 Goldstein JL, Ho YK, Basu SK and Brown MS. Binding site on macrophages that mediates uptake and degradation of acetylated low density lipoprotein, producing massive cholesterol deposition. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1979;76:333-337.
- 227 Horiuchi S, Sakamoto Y and Sakai M. Scavenger receptors for oxidized and glycated proteins. *Amino Acids*. 2003;25:283-292.



- 228 Steinberg D, Parthasarathy S, Carew TE, Khoo JC and Witztum JL. Beyond cholesterol. Modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity. *N. Engl. J. Med.* 1989;320:915-924.
- 229 Itabe H. Oxidized low-density lipoproteins: what is understood and what remains to be clarified. *Biol. Pharm. Bull.* 2003;26:1-9.
- 230 Rice-Evans C and Bruckdorfer KR. Free radicals, lipoproteins and cardiovascular dysfunction. *Mol. Aspects Med.* 1992;13:1-111.
- 231 Yla-Herttuala S. Is oxidized low-density lipoprotein present in vivo? *Curr. Opin. Lipidol.* 1998;9:337-344.
- 232 Heinecke JW. Oxidants and antioxidants in the pathogenesis of atherosclerosis: implications for the oxidized low density lipoprotein hypothesis. *Atherosclerosis.* 1998;141:1-15.
- 233 Berliner JA and Heinecke JW. The role of oxidized lipoproteins in atherogenesis. *Free Radic. Biol. Med.* 1996;20:707-727.
- 234 Holvoet P and Collen D. Oxidized lipoproteins in atherosclerosis and thrombosis. *FASEB J.* 1994;8:1279-1284.
- 235 Sakurai T, Kimura S, Nakano M and Kimura H. Oxidative modification of glycated low density lipoprotein in the presence of iron. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1991;177:433-439.
- 236 Hunt JV, Smith CC and Wolff SP. Autoxidative glycosylation and possible involvement of peroxides and free radicals in LDL modification by glucose. *Diabetes.* 1990;39:1420-1424.
- 237 Yamamoto S. Mammalian lipoxygenases: molecular structures and functions. *Biochim. Biophys. Acta.* 1992;1128:117-131.
- 238 Funk CD and Cyrus T. 12/15-lipoxygenase, oxidative modification of LDL and atherogenesis. *Trends Cardiovasc. Med.* 2001;11:116-124.
- 239 Darley-USmar VM, Hogg N, O'Leary VJ, Wilson MT and Moncada S. The simultaneous generation of superoxide and nitric oxide can initiate lipid peroxidation in human low density lipoprotein. *Free Radic. Res. Commun.* 1992;17:9-20.



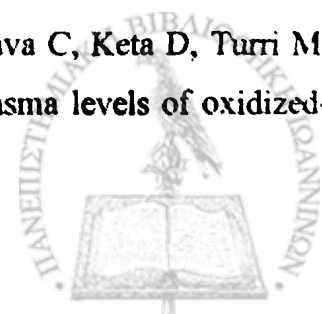
- 240 Leeuwenburgh C, Hardy MM, Hazen SL, Wagner P, Oh-ishi S, Steinbrecher UP and Heinecke JW. Reactive nitrogen intermediates promote low density lipoprotein oxidation in human atherosclerotic intima. *J. Biol. Chem.* 1997;272:1433-1436.
- 241 Hazell LJ and Stocker R. Oxidation of low-density lipoprotein with hypochlorite causes transformation of the lipoprotein into a high-uptake form for macrophages. *Biochem. J.* 1993;290:165-172.
- 242 Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature.* 2002;420:868-874.
- 243 Libby P, Ridker PM and Maseri A. Inflammation and atherosclerosis. *Circulation.* 2002;105:1135-1143.
- 244 Okajima F, Kurihara M, Ono C, Nakajima Y, Tanimura K, Sugihara H, Tatsuguchi A, Nakagawa K, Miyazawa T and Oikawa S. Oxidized but not acetylated low-density lipoprotein reduces preproinsulin mRNA expression and secretion of insulin from HIT-T15 cells. *Biochim. Biophys. Acta.* 2005;1687:173-180.
- 245 Holvoet P, Kritchevsky SB, Tracy RP, Mertens A, Rubin SM, Butler J, Goodpaster B and Harris TB. 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;53:1068-1073.
- 246 Frostegard J, Wu R, Lemne C, Thulin T, Witztum JL and de Faire U. Circulating oxidized low-density lipoprotein is increased in hypertension. *Clin. Sci. (Lond).* 2003;105:615-620.
- 247 Toikka JO, Laine H, Ahotupa M, Haapanen A, Viikari JS, Hartiala JJ and Raitakari OT. Increased arterial intima-media thickness and in vivo LDL oxidation in young men with borderline hypertension. *Hypertension.* 2000;36:929-933.
- 248 Toikka JO, Niemi P, Ahotupa M, Niinikoski H, Ronnema T, Viikari JS, Hartiala JJ and Raitakari OT. Decreased large artery distensibility in borderline hypertension is related to increased in vivo low-density lipoprotein oxidation. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 2002;62:301-306.
- 249 Singh BM and Mehta JL. Interactions between the renin-angiotensin system and dyslipidemia: relevance in the therapy of hypertension and coronary heart disease. *Arch. Intern. Med.* 2003;163:1296-1304.



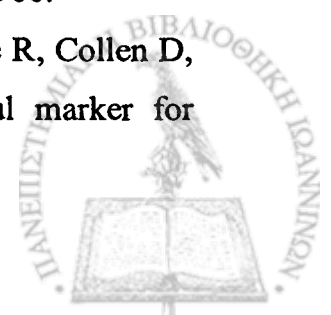
- 250 Liu BW, Jiang Y, Fu MD, Liu Y and Fan P. Oxidative modification of lipoproteins in hypertriglyceridemic patients and hypercholesterolemic rabbits in vivo. *Mol. Cell Biochem.* 2000;207:131-135.
- 251 Napoli C, Postiglione A, Triggiani M, Corso G, Palumbo G, Carbone V, Ruocco A, Ambrosio G, Montefusco S, Malorni A, Condorelli M and Chiariello M. Oxidative structural modifications of low density lipoprotein in homozygous familial hypercholesterolemia. *Atherosclerosis.* 1995;118:259-273.
- 252 Inoue T, Inoue K, Maeda H, Takayanagi K and 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;305:115-121.
- 253 Yamazaki K, Bujo H, Taira K, Ito N, Shibasaki M, Takahashi K and Saito Y. Increased circulating malondialdehyde-modified LDL in the patients with familial combined hyperlipidemia and its relation with the hepatic lipase activity. *Atherosclerosis.* 2004;172:181-187.
- 254 Yano M, Inoue M, Maehata E, Shiba T, Yamakado M, Hirabayashi Y, Taniyama M and Suzuki S. Increased electronegative charge of serum low-density lipoprotein in patients with diabetes mellitus. *Clin. Chim. Acta.* 2004;340:93-98.
- 255 Sonoki K, Iwase M, Iino K, Ichikawa K, Ohdo S, Higuchi S, Yoshinari M and Iida M. Atherogenic role of lysophosphatidylcholine in low-density lipoprotein modified by phospholipase A2 and in diabetic patients: protection by nitric oxide donor. *Metabolism.* 2003;52:308-314.
- 256 Tsuzura S, Ikeda Y, Suehiro T, Ota K, Osaki F, Arai K, Kumon Y and Hashimoto K. Correlation of plasma oxidized low-density lipoprotein levels to vascular complications and human serum paraoxonase in patients with type 2 diabetes. *Metabolism.* 2004;53:297-302.
- 257 Shimada K, Mokuno H, Matsunaga E, Miyazaki T, Sumiyoshi K, Kume A, Miyauchi K and Daida H. Predictive value of circulating oxidized LDL for cardiac events in type 2 diabetic patients with coronary artery disease. *Diabetes Care.* 2004;27:843-844.



- 258 Van Himbergen T, Roest M, De Waart F, De Graaf J, Voorbij H, Van Tits L and Stalenhoef A. Paraoxonase genotype, LDL-oxidation and carotid atherosclerosis in male life-long smokers. *Free Radic. Res.* 2004;38:553-560.
- 259 Suzuki K, Ito Y, Ochiai J, Aoki K, Wakai K, Tamakoshi A, Ando M, Watanabe Y, Ozasa K, Seki N, Nishino Y, Kondo T, Ohno Y, Tamakoshi A, Mori M, Motohashi Y, Tsuji I, Nakamura Y, Iso H, Mikami H, Hashimoto S, Inaba Y, Hoshiyama Y, Suzuki H, Shimizu H, Toyoshima H, Tokudome S, Ito Y, Kikuchi S, Koizumi A, Kawamura T, Watanabe Y, Miki T, Date C, Sakata K, Nose T, Hayakawa N, Yoshimura T, Fukuda K, Okamoto N, Shio H, Ohno Y, Kitagawa T, Kuroki T, Tajima K, Japan, Collaborative, Cohort, Study and Group. 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;13:29-37.
- 260 Lindholt JS, Heegaard NH, Vammen S, Fasting H, Henneberg EW and 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;21:51-56.
- 261 Laaksonen R, Janatuinen T, Vesalainen R, Lehtimaki T, Elovaara I, Jaakkola O, Jokela H, Laakso J, Nuutila P, Punnonen K, Raitakari O, Saikku P, Salminen K and Knuuti J. High oxidized LDL and elevated plasma homocysteine contribute to the early reduction of myocardial flow reserve in healthy adults. *Eur. J. Clin. Invest.* 2002;32:795-802.
- 262 Meisinger C, Baumert J, Khuseyinova N, Loewel H and 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;112:651-657.
- 263 Dominguez-Rodriguez A, Abreu-Gonzalez P, Garcia-Gonzalez M, Ferrer-Hita J, Vargas M and Reiter RJ. Elevated levels of oxidized low-density lipoprotein and impaired nocturnal synthesis of melatonin in patients with myocardial infarction. *Atherosclerosis.* 2005;180:101-105.
- 264 Anselmi M, Garbin U, Agostoni P, Fusaro M, Pasini AF, Nava C, Keta D, Turri M, Zardini P, Vassanelli C, Lo Cascio V and Cominacini L. Plasma levels of oxidized-



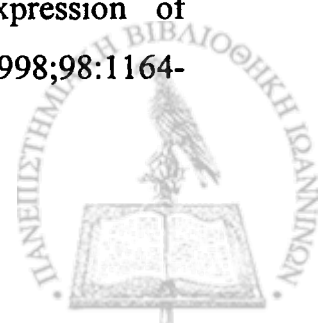
- low-density lipoproteins are higher in patients with unstable angina and correlated with angiographic coronary complex plaques. *Atherosclerosis*. 2006;185:114-120.
- 265 Miyazaki T, Shimada K, Sato O, Kotani K, Kume A, Sumiyoshi K, Sato Y, Ohmura H, Watanabe Y, Mokuno H and Daida H. Circulating malondialdehyde-modified LDL and atherogenic lipoprotein profiles measured by nuclear magnetic resonance spectroscopy in patients with coronary artery disease. *Atherosclerosis*. 2005;179:139-145.
- 266 Bilgen D, Sonmez H, Ekmekci H, Ulutin T, Ozturk Z, Kokoglu E, Bayram C, Soner A and Domanic N. The relationship of TFPI, Lp(a), and oxidized LDL antibody levels in patients with coronary artery disease. *Clin. Biochem*. 2005;38:92-96.
- 267 Shimada K, Mokuno H, Matsunaga E, Miyazaki T, Sumiyoshi K, Miyauchi K and Daida H. Circulating oxidized low-density lipoprotein is an independent predictor for cardiac event in patients with coronary artery disease. *Atherosclerosis*. 2004;174:343-347.
- 268 Tsimikas S and Witztum JL. Measuring circulating oxidized low-density lipoprotein to evaluate coronary risk. *Circulation*. 2001;103:1930-1932.
- 269 Holvoet P, Vanhaecke J, Janssens S, Van de Werf F and Collen D. Oxidized LDL and malondialdehyde-modified LDL in patients with acute coronary syndromes and stable coronary artery disease. *Circulation*. 1998;98:1487-1494.
- 270 Holvoet P, Stassen JM, Van Cleemput J, Collen D and Vanhaecke J. Oxidized low density lipoproteins in patients with transplant-associated coronary artery disease. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol*. 1998;18:100-107.
- 271 Matsumoto N, Nomura S, Kamihata H, Kimura Y and Iwasaka T. Increased level of oxidized LDL-dependent monocyte-derived microparticles in acute coronary syndrome. *Thromb. Haemost*. 2004;91:146-154.
- 272 Ehara S, Ueda M, Naruko T, Haze K, Itoh A, Otsuka M, Komatsu R, Matsuo T, Itabe H, Takano T, Tsukamoto Y, Yoshiyama M, Takeuchi K, Yoshikawa J and Becker AE. Elevated levels of oxidized low density lipoprotein show a positive relationship with the severity of acute coronary syndromes. *Circulation*. 2001;103:1955-1960.
- 273 Holvoet P, Mertens A, Verhamme P, Bogaerts K, Beyens G, Verhaeghe R, Collen D, Muls E and Van de Werf F. Circulating oxidized LDL is a useful marker for



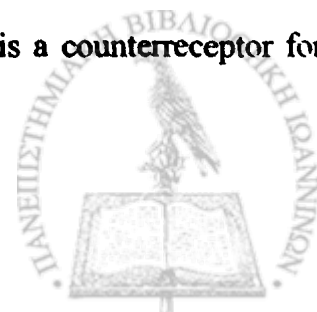
- identifying patients with coronary artery disease. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2001;21:844-848.
- 274 Wallenfeldt K, Fagerberg B, Wikstrand J and Hulthe J. Oxidized low-density lipoprotein in plasma is a prognostic marker of subclinical atherosclerosis development in clinically healthy men. *J. Intern. Med.* 2004;256:413-420.
- 275 Metso S, Loimaala A, Mercuri MF, Nenonen A, Vuori I, Oja P, Bond MG, Laine S, Rontu R and Lehtimäki T. Circulating oxidized low-density lipoprotein and common carotid artery intima-media thickness in a random sample of middle-aged men. *J. Biomed. Sci.* 2004;11:356-361.
- 276 Liu ML, Ylitalo K, Salonen R, Salonen JT and 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;24:1492-1497.
- 277 Nishi K, Itabe H, Uno M, Kitazato KT, Horiguchi H, Shinno K and Nagahiro S. Oxidized LDL in carotid plaques and plasma associates with plaque instability. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2002;22:1649-1654.
- 278 Misha V and Mehta K. History and Biochemistry of Statins. In Statins: Understanding clinical use (Mahta, J., ed.), Saunders, Philadelphia 2004;1-12.
- 279 European Society of Cardiology. Cardiovascular Diseases in Europe. EuroHeart Survey and National Registries of cardiovascular diseases and patients management. 2004;ESC2004.
- 280 Ware JA and Heistad DD. Platelet-endothelium interactions. *N. Engl. J. Med.* 1993;328:628-635.
- 281 Gross PL and Aird WC. The endothelium and thrombosis. *Semin. Thromb. Hemost.* 2000;26:463-478.
- 282 Patel KD, Zimmerman GA, Prescott SM, McEver RP and McIntyre TM. Oxygen radicals induce human endothelial cells to express GMP-140 and bind neutrophils. *J. Cell Biol.* 1991;112:749-759.
- 283 Frenette PS, Denis CV, Weiss L, Jurk K, Subbarao S, Kehrel B, Hartwig JH, Vestweber D and Wagner DD. P-Selectin glycoprotein ligand 1 (PSGL-1) is expressed



- on platelets and can mediate platelet-endothelial interactions in vivo. *J. Exp. Med.* 2000;191:1413-1422.
- 284 Laszik Z, Jansen PJ, Cummings RD, Tedder TF, McEver RP and Moore KL. P-selectin glycoprotein ligand-1 is broadly expressed in cells of myeloid, lymphoid, and dendritic lineage and in some nonhematopoietic cells. *Blood.* 1996;88:3010-3021.
- 285 Frenette PS, Moyna C, Hartwell DW, Lowe JB, Hynes RO and Wagner DD. Platelet-endothelial interactions in inflamed mesenteric venules. *Blood.* 1998;91:1318-1324.
- 286 Chan G, von Andrian VH and Dicovo TG. Leukocyte-mediated platelet deposition at sites of vascular inflammation. *Blood.* 1999;94:449a.
- 287 Merhi Y, Provost P, Chauvet P, Theoret JF, Phillips ML and Latour JG. Selectin blockade reduces neutrophil interaction with platelets at the site of deep arterial injury by angioplasty in pigs. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 1999;19:372-377.
- 288 Celi A, Lorenzet R, Furie B and Furie BC. Platelet-leukocyte-endothelial cell interaction on the blood vessel wall. *Semin. Hematol.* 1997;34:327-335.
- 289 Gawaz M, Langer H and May AE. Platelets in inflammation and atherogenesis. *J. Clin. Invest.* 2005;115:3378-3384.
- 290 Hawrylowicz CM, Howells GL and Feldmann M. Platelet-derived interleukin 1 induces human endothelial adhesion molecule expression and cytokine production. *J. Exp. Med.* 1991;174:785-790.
- 291 Kaplanski G, Farnarier C, Kaplanski S, Porat R, Shapiro L, Bongrand P and Dinarello CA. Interleukin-1 induces interleukin-8 secretion from endothelial cells by a juxtacrine mechanism. *Blood.* 1994;84:4242-4248.
- 292 Gawaz M, Brand K, Dickfeld T, Pogatsa-Murray G, Page S, Bogner C, Koch W, Schomig A and Neumann F. Platelets induce alterations of chemotactic and adhesive properties of endothelial cells mediated through an interleukin-1-dependent mechanism. Implications for atherogenesis. *Atherosclerosis.* 2000;148:75-85.
- 293 Gawaz M, Neumann FJ, Dickfeld T, Koch W, Laugwitz KL, Adelsberger H, Langenbrink K, Page S, Neumeier D, Schomig A and Brand K. Activated platelets induce monocyte chemotactic protein-1 secretion and surface expression of intercellular adhesion molecule-1 on endothelial cells. *Circulation.* 1998;98:1164-1171.



- 294 Dickfeld T, Lengyel E, May AE, Massberg S, Brand K, Page S, Thielen C, Langenbrink K and Gawaz M. Transient interaction of activated platelets with endothelial cells induces expression of monocyte-chemoattractant protein-1 via a p38 mitogen-activated protein kinase mediated pathway. Implications for atherogenesis. *Cardiovasc. Res.* 2001;49:189-199.
- 295 Hansen PR. Role of neutrophils in myocardial ischemia and reperfusion. *Circulation.* 1995;91:1872-1885.
- 296 Zimmerman GA, McIntyre TM and Prescott SM. Adhesion and signaling in vascular cell-cell interactions. *J. Clin. Invest.* 1996;98:1699-1702.
- 297 Siminiak T, Flores NA and Sheridan DJ. Neutrophil interactions with endothelium and platelets: possible role in the development of cardiovascular injury. *Eur. Heart J.* 1995;16:160-170.
- 298 Zimmerman GA, McIntyre TM and Prescott SM. Thrombin stimulates the adherence of neutrophils to human endothelial cells in vitro. *J. Clin. Invest.* 1985;76:2235-2246.
- 299 Entman ML and Ballantyne CM. Association of neutrophils with platelet aggregates in unstable angina. Should we alter therapy? *Circulation.* 1996;94:1206-1208.
- 300 Evangelista V, Manarini S, Sideri R, Rotondo S, Martelli N, Piccoli A, Totani L, Piccardoni P, Vestweber D, de Gaetano G and Cerletti C. Platelet/polymorphonuclear leukocyte interaction: P-selectin triggers protein-tyrosine phosphorylation-dependent CD11b/CD18 adhesion: role of PSGL-1 as a signaling molecule. *Blood.* 1999;93:876-885.
- 301 Yang J, Furie BC and Furie B. The biology of P-selectin glycoprotein ligand-1: its role as a selectin counterreceptor in leukocyte-endothelial and leukocyte-platelet interaction. *Thromb. Haemost.* 1999;81:1-7.
- 302 Simon DI, Chen Z, Xu H, Li CQ, Dong J, McIntire LV, Ballantyne CM, Zhang L, Furman MI, Berndt MC and Lopez JA. Platelet glycoprotein I α is a counterreceptor for the leukocyte integrin Mac-1 (CD11b/CD18). *J. Exp. Med.* 2000;192:193-204.
- 303 Santoso S, Sachs UJ, Kroll H, Linder M, Ruf A, Preissner KT and Chavakis T. The junctional adhesion molecule 3 (JAM-3) on human platelets is a counterreceptor for the leukocyte integrin Mac-1. *J. Exp. Med.* 2002;196:679-691.



- 304 Diacovo TG, deFougerolles AR, Bainton DF and Springer TA. A functional integrin ligand on the surface of platelets: intercellular adhesion molecule-2. *J. Clin. Invest.* 1994;94:1243-1251.
- 305 Wright SD, Weitz JI, Huang AJ, Levin SM, Silverstein SC and Loike JD. Complement receptor type three (CD11b/CD18) of human polymorphonuclear leukocytes recognizes fibrinogen. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1988;85:7734-7738.
- 306 Altieri DC, Bader R, Mannucci PM and Edgington TS. Oligospecificity of the cellular adhesion receptor Mac-1 encompasses an inducible recognition specificity for fibrinogen. *J. Cell. Biol.* 1988;107:1893-1900.
- 307 Forlow SB, McEver RP and Nollert MU. Leukocyte-leukocyte interactions mediated by platelet microparticles under flow. *Blood.* 2000;95:1317-1323.
- 308 Andre P, Hartwell D, Hrachovinova I, Saffaripour S and Wagner DD. Pro-coagulant state resulting from high levels of soluble P-selectin in blood. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2000;97:13835-13840.
- 309 Merten M, Pakala R, Thiagarajan P and Benedict CR. Platelet microparticles promote platelet interaction with subendothelial matrix in a glycoprotein IIb/IIIa-dependent mechanism. *Circulation.* 1999;99:2577-2582.
- 310 Gawaz M, Neumann FJ, Dickfeld T, Reininger A, Adelsberger H, Gebhardt A and Schomig A. Vitronectin receptor (alpha(v)beta3) mediates platelet adhesion to the luminal aspect of endothelial cells: implications for reperfusion in acute myocardial infarction. *Circulation.* 1997;96:1809-1818.
- 311 Salonen EM, Vaheri A, Pollanen J, Stephens R, Andreasen P, Mayer M, Dano K, Gailit J and Ruoslahti E. Interaction of plasminogen activator inhibitor (PAI-1) with vitronectin. *J. Biol. Chem.* 1989;264:6339-6343.
- 312 Barry OP, Pratico D, Savani RC and FitzGerald GA. Modulation of monocyte-endothelial cell interactions by platelet microparticles. *J. Clin. Invest.* 1998;102:136-144.
- 313 Ross R. Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N. Engl. J. Med.* 1999;40:15-126.
- 314 Nomura S, Tandon NN, Nakamura T, Cone J, Fukuhara S and Kambayashi J. High-shear-stress-induced activation of platelets and microparticles enhances expression of



- cell adhesion molecules in THP-1 and endothelial cells. *Atherosclerosis*. 2001;8:277-287.
- 315 Weber A, Koppen HO and Schror K. Platelet-derived microparticles stimulate coronary artery smooth muscle cell mitogenesis by a PDGF-independent mechanism. *Thromb. Res*. 2000;98:461-466.
- 316 Baj-Krzyworzeka M, Majka M, Pratico D, Ratajczak J, Vilaire G, Kijowski J, Reza R, Janowska-Wieczorek A and Ratajczak MZ. Platelet-derived microparticles stimulate proliferation, survival, adhesion, and chemotaxis of hematopoietic cells. *Exp. Hematol*. 2002;30:450-459.
- 317 Patil S, Newman DK and Newman PJ. Platelet endothelial cell adhesion molecule-1 serves as an inhibitory receptor that modulates platelet responses to collagen. *Blood*. 2001;97:1727-1732.
- 318 Naganuma Y, Satoh K, Yi Q, Asazuma N, Yatomi Y and Ozaki Y. Cleavage of platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1) in platelets exposed to high shear stress. *J. Thromb. Haemost*. 2004;2:1998-2008.
- 319 George JN, Thoi LL, McManus LM and Reimann TA. Isolation of human platelet membrane microparticles from plasma and serum. *Blood*. 1982;60:834-840.
- 320 Bernal-Mizrachi L, Jy W, Jimenez JJ, Pastor J, Mauro LM, Horstman LL, de Marchena E and Ahn YS. High levels of circulating endothelial microparticles in patients with acute coronary syndromes. *Am. Heart J*. 2003;145:962-970.
- 321 Pratico D, Tillmann C, Zhang ZB, Li H and FitzGerald GA. Acceleration of atherogenesis by COX-1-dependent prostanoid formation in low density lipoprotein receptor knockout mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A*. 2001;98:3358-3363.
- 322 Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature*. 1993;362:801-809.
- 323 Fuster V, Badimon L, Badimon JJ and Chesebro JH. The pathogenesis of coronary artery disease and the acute coronary syndromes. *N. Engl. J. Med*. 1992;326:242-250.
- 324 Scharf RE, Tomer A, Marzec UM, Teirstein PS, Ruggeri ZM and Harker LA. Activation of platelets in blood perfusing angioplasty-damaged coronary arteries. Flow cytometric detection. *Arterioscler. Thromb*. 1992;12:1475-1487.



- 325 Gasperetti CM, Gonias SL, Gimple LW and Powers ER. Platelet activation during coronary angioplasty in humans. *Circulation*. 1993;88:2728-2734.
- 326 Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis--an update. *N. Engl. J. Med.* 1986;314:488-500.
- 327 Zahavi J, Betteridge JD, Jones NA, Galton DJ and Kakkar VV. Enhanced in vivo platelet release reaction and malondialdehyde formation in patients with hyperlipidemia. *Am. J. Med.* 1981;70:59-64.
- 328 Lowe GD, Drummond MM, Third JL, Bremner WF, Forbes CD, Prentice CR and Lawrie TD. Increased plasma fibrinogen and platelet-aggregates in type II hyperlipoproteinaemia. *Thromb. Haemost.* 1980;42:1503-1507.
- 329 Carvalho AC, Colman RW and Lees RS. Platelet function in hyperlipoproteinemia. *N. Engl. J. Med.* 1974;290:434-438.
- 330 Corash L, Andersen J, Poindexter BJ and Schaefer EJ. Platelet function and survival in patients with severe hypercholesterolemia. *Arteriosclerosis*. 1981;1:443-448.
- 331 DiMinno G, Silver MJ, Cerbone AM, Rainone A, Postiglione A and Mancini M. Increased fibrinogen binding to platelets from patients with familial hypercholesterolemia. *Arteriosclerosis*. 1986;6:203-211.
- 332 Theilmeyer G, Michiels C, Spaepen E, Vreys I, Collen D, Vermeylen J and Hoylaerts MF. Endothelial von Willebrand factor recruits platelets to atherosclerosis-prone sites in response to hypercholesterolemia. *Blood*. 2002;99:4486-4493.
- 333 Willerson JT. Systemic and local inflammation in patients with unstable atherosclerotic plaques. *Prog. Cardiovasc. Dis.* 2002;44:469-478.
- 334 Sjobring U, Ringdahl U and Ruggeri ZM. Induction of platelet thrombi by bacteria and antibodies. *Blood*. 2002;100:4470-4477.
- 335 Shpilberg O, Rabi I, Schiller K, Walden R, Harats D, Tyrrell KS, Coller B and Seligsohn U. Patients with Glanzmann thrombasthenia lacking platelet glycoprotein alpha(IIb)beta(3) (GPIIb/IIIa) and alpha(v)beta(3) receptors are not protected from atherosclerosis. *Circulation*. 2002;105:1044-1048.
- 336 English D, Garcia JG and Brindley DN. Platelet-released phospholipids link haemostasis and angiogenesis. *Cardiovasc. Res.* 2001;49:588-599.



- 337 Kim HK, Song KS, Chung JH, Lee KR and Lee SN. Platelet microparticles induce angiogenesis in vitro. *Br. J. Haematol.* 2004;124:376-384.
- 338 Booth NA, Simpson AJ, Croll A, Bennett B and MacGregor IR. Plasminogen activator inhibitor (PAI-1) in plasma and platelets. *Br. J. Haematol.* 1988;70:327-333.
- 339 Diamant M, Tushuizen ME, Sturk A and Nieuwland R. Cellular microparticles: new players in the field of vascular disease? *Eur. J. Clin. Invest.* 2004;34:392-401.
- 340 Munnix IC, Harmsma M, Giddings JC, Collins PW, Feijge MA, Comfurius P, Heemskerk JW and Bevers EM. Store-mediated calcium entry in the regulation of phosphatidylserine exposure in blood cells from Scott patients. *Thromb. Haemost.* 2003;89:687-695.
- 341 Castaman G, Yu-Feng L and Rodeghiero F. A bleeding disorder characterised by isolated deficiency of platelet microvesicle generation. *Lancet.* 1996;347:700-701.
- 342 Castaman G, Yu-Feng L, Battistin E and Rodeghiero F. Characterization of a novel bleeding disorder with isolated prolonged bleeding time and deficiency of platelet microvesicle generation. *Br. J. Haematol.* 1997;96:458-463.
- 343 Tans G, Rosing J, Thomassen MC, Heeb MJ, Zwaal RF and Griffin JH. Comparison of anticoagulant and procoagulant activities of stimulated platelets and platelet-derived microparticles. *Blood.* 1991;77:2641-2648.
- 344 Miles LA, Ginsberg MH, White JG and Plow EF. Plasminogen interacts with human platelets through two distinct mechanisms. *J. Clin. Invest.* 1986;77:2001-2009.
- 345 Ananyeva NM, Kouivaskaia DV, Shima M and Saenko EL. Intrinsic pathway of blood coagulation contributes to thrombogenicity of atherosclerotic plaque. *Blood.* 2002;99:4475-4485.
- 346 Korporaal SJ, Gorter G, van Rijn HJ and Akkerman JW. Effect of oxidation on the platelet-activating properties of low-density lipoprotein. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2005;25:867-872.
- 347 Korporaal SJ, Relou IA, van Rijn HJ and Akkerman JW. Lysophosphatidic acid-independent platelet activation by low-density lipoprotein. *FEBS Lett.* 2001;494:121-124.



- 348 Gopfert MS, Siedler F, Siess W and Sellmayer A. Structural identification of oxidized acyl-phosphatidylcholines that induce platelet activation. *J. Vasc. Res.* 2005;42:120-132.
- 349 Kakutani M, Masaki T and Sawamura T. A platelet-endothelium interaction mediated by lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2000;97:360-364.
- 350 Sawamura T, Kume N, Aoyama T, Moriwaki H, Hoshikawa H, Aiba Y, Tanaka T, Miwa S, Katsura Y, Kita T and Masaki T. An endothelial receptor for oxidized low-density lipoprotein. *Nature.* 1997;386:73-77.
- 351 Chen M, Kakutani M, Naruko T, Ueda M, Narumiya S, Masaki T and Sawamura T. Activation-dependent surface expression of LOX-1 in human platelets. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2001;282:153-158.
- 352 Endemann G, Stanton LW, Madden KS, Bryant CM, White RT and Protter AA. CD36 is a receptor for oxidized low density lipoprotein. *J. Biol. Chem.* 1993;268:11811-11816.
- 353 Volf I, Moeslinger T, Cooper J, Schmid W and Koller E. Human platelets almost exclusively bind oxidized low density lipoprotein showing no specificity for acetylated low density lipoprotein. *FEBS Lett.* 1999;449:141-145.
- 354 Takahashi Y, Fuda H, Yanai H, Akita H, Shuping H, Chiba H and Matsuno K. Significance of membrane glycoproteins in platelet interaction with oxidized low-density lipoprotein. *Semin. Thromb. Hemostasis.* 1998;24:251-253.
- 355 Pearce SF, Roy P, Nicholson AC, Hajjar DP, Febbraio M and Silverstein RL. Recombinant glutathione S-transferase/CD36 function proteins define an oxidized low density lipoprotein binding domain. *J. Biol. Chem.* 1998;273:34875-34881.
- 356 Huh HY, Pearce SF, Yesner LM, Schindler JL and Silverstein RL. Regulated expression of CD36 during monocyte-to-monocyte differentiation: potential role of CD36 in foam cell formation. *Blood.* 1996;87:2020-2028.
- 357 Chen LY, Mehta P and 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;93:1740-1746.



- 358 Puccetti L, Pasqui AL, Pastorelli M, Bova G, Cercignani M, Palazzuoli A, Angori P, Auteri A and Bruni F. Time-dependent effect of statins on platelet function in hypercholesterolaemia. *Eur. J. Clin. Invest.* 2002;32:901-908.
- 359 Retzer M, Siess W and 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;466:70-74.
- 360 Hartwich J, Dembinska-Kiec A, Gruca A, Motyka M, Partyka L, Skrzeczynska J, Bzowska M, Pryjma J, Huber J, Leitinger N and Schmitz G. Regulation of platelet adhesion by oxidized lipoproteins and oxidized phospholipids. *Platelets.* 2002;13:141-151.
- 361 Zhao B, Dierichs R, Miller FN and Dean WL. Oxidized low density lipoprotein inhibits platelet plasma membrane Ca(2+)-ATPase. *Cell. Calcium.* 1996;19:453-458.
- 362 Weidtmann A, Scheithe R, Hrboticky N, Pietsch A, Lorenz R and Siess W. Mildly oxidized LDL induces platelet aggregation through activation of phospholipase A2. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 1995;15:1131-1138.
- 363 Haseruck N, Erl W, Pandey D, Tigyi G, Ohlmann P, Ravanat C, Gachet C and Siess W. The plaque lipid lysophosphatidic acid stimulates platelet activation and platelet-monocyte aggregate formation in whole blood: involvement of P2Y1 and P2Y12 receptors. *Blood.* 2004;103:2585-2592.
- 364 Coleman LGJ, Polanowska-Grabowska RK, Marcinkiewicz M and 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;104:380-389.
- 365 Rother E, Brandl R, Baker DL, Goyal P, Gebhard H, Tigyi G and Siess W. Subtype-selective antagonists of lysophosphatidic Acid receptors inhibit platelet activation triggered by the lipid core of atherosclerotic plaques. *Circulation.* 2003;108:741-747.
- 366 Relou IA, Hackeng CM, Akkerman JW and Malle E. Low-density lipoprotein and its effect on human blood platelets. *Cell. Mol. Life Sci.* 2003;60:961-971.
- 367 Hussain MM. Structural, biochemical and signaling properties of the low-density lipoprotein receptor gene family. *Front. Biosci.* 2001;6:D417-428.



- 368 Pedreno J, de Castellarnau C, Cullare C, Sanchez J, Gomez-Gerique J, Ordonez-Llanos J and Gonzalez-Sastre F. LDL binding sites on platelets differ from the "classical" receptor of nucleated cells. *Arterioscler. Thromb.* 1992;12:1353-1362.
- 369 Koller E, Koller F and Binder BR. Purification and identification of the lipoprotein-binding proteins from human blood platelet membrane. *J. Biol. Chem.* 1989;264:12412-12418.
- 370 Malle E, Ibovnik A, Stienmetz A, Kostner GM and Sattler W. Identification of glycoprotein IIb as the lipoprotein(a)-binding protein on platelets. Lipoprotein(a) binding is independent of an arginyl-glycyl-aspartate tripeptide located in apolipoprotein(a). *Arterioscler. Thromb.* 1994;14:345-352.
- 371 Pedreno J, Fernandez R, Cullare C, Barcelo A, Elorza MA and de Castellarnau C. Platelet integrin alpha IIb beta 3 (GPIIb-IIIa) is not implicated in the binding of LDL to intact resting platelets. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 1997;17:156-163.
- 372 Desai K, Bruckdorfer KR, Hutton RA and Owen JS. Binding of apoE-rich high density lipoprotein particles by saturable sites on human blood platelets inhibits agonist-induced platelet aggregation. *J. Lipid Res.* 1989;30:831-840.
- 373 Sachais BS, Kuo A, Nassar T, Morgan J, Kariko K, Williams KJ, Feldman M, Aviram M, Shah N, Jarett L, Poncz M, Cines DB and Higazi AA. Platelet factor 4 binds to low-density lipoprotein receptors and disrupts the endocytic machinery, resulting in retention of low-density lipoprotein on the cell surface. *Blood.* 2002;99:3613-3622.
- 374 Chandler AB and Hand RA. Phagocytized platelets: a source of lipids in human thrombi and atherosclerotic plaques. *Science.* 1961;134:946-947.
- 375 Poole JCF. Phagocytosis of platelets by monocytes in organizing arterial thrombi: an electron microscopical study. *Q. J. Exp. Physiol. Cogn. Med. Sci.* 1966;51:54-59.
- 376 Mendelsohn ME and Loscalzo J. Role of platelets in cholesteryl ester formation by U-937 cells. *J. Clin. Invest.* 1988;81:62-68.
- 377 Curtiss LK, Black AS, Takagi Y and Plow EF. New mechanism for foam cell generation in atherosclerotic lesions. *J. Clin. Invest.* 1987;80:367-373.
- 378 Van Nostrand WE, Scmaier AH, Farrow JS and Cunningham DD. Protese nexin II (amyloid beta-protein precursor): a platelet alpha granule protein. *Science.* 1990;248:745-748.



- 379 De Meyer GR, De Cleen DM, Cooper S, Knaapen MW, Jans DM, Martinet W, Herman AG, Bult H and Kockx MM. Platelet phagocytosis and processing of beta-amyloid precursor protein as a mechanism of macrophage activation in atherosclerosis. *Circ. Res.* 2002;90:1197-1204.
- 380 Langheinrich AC and Bohle RM. Atherosclerosis: humoral and cellular factors of inflammation. *Virchows Arch.* 2005;446:101-111.
- 381 Hansson GK. Immune mechanisms in atherosclerosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2001;21:1876-1890.
- 382 Gu L, Okada Y, Clinton SK, Gerard C, Sukhova GK, Libby P and Rollins BJ. Absence of monocyte chemoattractant protein-1 reduces atherosclerosis in low density lipoprotein receptor-deficient mice. *Mol. Cell.* 1998;2:275-281.
- 383 Linton MF and Fazio S. Macrophages, inflammation, and atherosclerosis. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* 2003;27:S35-S40.
- 384 Rosenson RS. Statins in atherosclerosis: lipid-lowering agents with antioxidant capabilities. *Atherosclerosis.* 2004;173:1-12.
- 385 Weber C. Platelets and chemokines in atherosclerosis: partners in crime. *Circ. Res.* 2005;96:612-616.
- 386 Boring L, Gosling J, Cleary M and Charo IF. Decreased lesion formation in CCR2^{-/-} mice reveals a role for chemokines in the initiation of atherosclerosis. *Nature.* 1998;394:894-897.
- 387 Fan J and Watanabe T. Inflammatory reactions in the pathogenesis of atherosclerosis. *J. Atheroscler. Thromb.* 2003;10:63-71.
- 388 Benitez S, Camacho M, Arcelus R, Vila L, Bancells C, Ordonez-Llanos J and Sanchez-Quesada JL. Increased lysophosphatidylcholine and non-esterified fatty acid content in LDL induces chemokine release in endothelial cells. Relationship with electronegative LDL. *Atherosclerosis.* 2004;177:299-305.
- 389 Tousoulis D, Davies G, Stefanadis C, Toutouzas P and Ambrose JA. Inflammatory and thrombotic mechanisms in coronary atherosclerosis. *Heart.* 2003;89:993-997.
- 390 Boisvert WA, Santiago R, Curtiss LK and Terkeltaub RA. A leukocyte homologue of the IL-8 receptor CXCR-2 mediates the accumulation of macrophages in



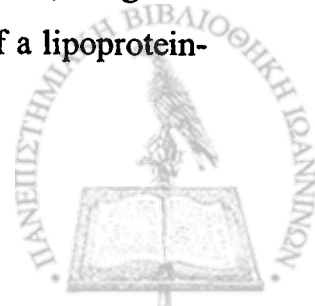
- atherosclerotic lesions of LDL receptor-deficient mice. *J. Clin. Invest.* 1998;101:353-363.
- 391 Barnes PJ and Karin M. Nuclear factor-kappaB: a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. *N. Engl. J. Med.* 1997;336:1066-1071.
- 392 Dong ZM and Wagner DD. Leukocyte-endothelium adhesion molecules in atherosclerosis. *J. Lab. Clin. Med.* 1998;132:369-375.
- 393 Maier W, Altwegg LA, Corti R, Gay S, Hersberger M, Maly FE, Sutsch G, Roffi M, Neidhart M, Eberli FR, Tanner FC, Gobbi S, von Eckardstein A and Luscher TF. 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;111:1355-1361.
- 394 Halvorsen B, Waehre T, Scholz H, Clausen OP, von der Thusen JH, Muller F, HeimLi H, Tonstad S, Hall C, Froland SS, Biessen EA, Damas JK and Aukrust P. Interleukin-10 enhances the oxidized LDL-induced foam cell formation of macrophages by antiapoptotic mechanisms. *J. Lipid Res.* 2005;46:211-219.
- 395 Yokoya K, Takatsu H, Suzuki T, Hosokawa H, Ojio S, Matsubara T, Tanaka T, Watanabe S, Morita N, Nishigaki K, Takemura G, Noda T, Minatoguchi S and Fujiwara H. 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;100:903-909.
- 396 Blank ML, Hall MN, Cress EA and 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;113:666-671.
- 397 Wardlow ML, Cox C, Meng KE, Greene DE and Farr RS. Substrate specificity and partial characterization of the PAF-acetylhydrolase in human serum that rapidly inactivates platelet-activating factor. *J. Immunol.* 1986;136:3441-3446.
- 398 Prichard P. The degradation of platelet-activating factor by high density lipoprotein in rat plasma. *Biochem. J.* 1987;246:791-794.
- 399 Stafforini DM, Prescott SM and McIntyre TM. Human platelet-activating factor acetylhydrolase: purification and properties. *J. Biol. Chem.* 1987;262:4223-4230.



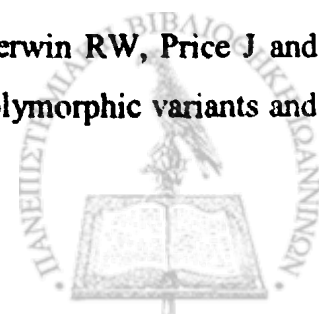
- 400 Stafforini D, McIntyre TM, Carter ME and Prescott SM. Human plasma platelet-activating factor acetylhydrolase: association with lipoprotein particles and role in the degradation of platelet-activating factor. *J. Biol. Chem.* 1987;262:4215-4222.
- 401 Imaizumi T, Stafforini DM, Yamada Y, Zimmerman GA, McIntyre TM and Prescott SM. The fate of platelet-activating factor: PAF acetylhydrolase from plasma and tissues. In *Advances in lipobiology* (Gross, R., ed.), JAI Press, Connecticut 1996;141-162.
- 402 Stafforini DM, Prescott SM, Zimmerman GA and McIntyre TM. Mammalian platelet-activating factor acetylhydrolases. *Biochim. Biophys. Acta.* 1996;1301:161-173.
- 403 Steinbrecher UP and Prichard PH. Hydrolysis of phosphatidylcholine during LDL oxidation is mediated by platelet-activating acetylhydrolase. *J. Lipid Res.* 1989;30:305-315.
- 404 StremLer KE, Stafforini DM, Prescott SM, Zimmerman GA and McIntyre TM. An oxidized derivative of phosphatidylcholine is a substrate for the platelet-activating factor acetylhydrolase from human plasma. *J. Biol. Chem.* 1989;264:5331-5334.
- 405 StremLer KE, Stafforini DM, Prescott SM and McIntyre TM. Human platelet-activating factor acetylhydrolase: oxidatively fragmented phospholipids as substrates. *J. Biol. Chem.* 1991;266:11095-11103.
- 406 Stafforini DM, Zimmerman GA, McIntyre TM and 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.
- 407 Stafforini DM, Prescott SM, Zimmerman GA and McIntyre TM. Platelet-activating factor acetylhydrolase activity in human tissues and blood cells. *Lipids.* 1991;26:979-985.
- 408 Stafforini DM, Rollins EN, Prescott SM and McIntyre TM. The platelet-activating factor acetylhydrolase from human erythrocytes: purification and properties. *J. Biol. Chem.* 1993;268:3857-3865.
- 409 Arai H, Koizumi H, Aoki J and Inoue K. Platelet activating factor-acetylhydrolase (PAF-AH). *J. Biochem.* 2002;131:635-640.



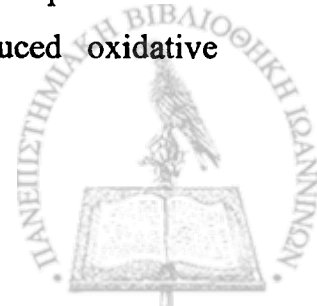
- 410 Hattori K, Adachi H, Matsuzawa A, Yamamoto K, Tsujimoto M, Aoki J, Hattori M, Arai H and Inoue K. cDNA cloning and expression of intracellular platelet-activating factor (PAF) acetylhydrolase II. *J. Biol. Chem.* 1996;271:33032-33038.
- 411 Hattori M, Arai H and Inoue K. Purification and characterization of bovine brain platelet-activating factor acetylhydrolase. *J. Biol. Chem.* 1993;268:18748-18753.
- 412 Stafforini DM and Tjoekler LW. Human plasma platelet-activating factor acetylhydrolase. *Methods. Mol. Biol.* 1999;109:49-58.
- 413 Karasawa K, Harada A, Satoh N, Inoue K and Setaka M. Plasma platelet activating factor-acetylhydrolase. *Prog. Lipid. Res.* 2003;42:93-114.
- 414 Tsoukatos D, Liapikos T, Tselepis A, Chapman M and Ninio E. Platelet-activating factor acetylhydrolase and transacetylase activities in human plasma low-density lipoprotein. *Biochem. J.* 2001;357:457-464.
- 415 Farr R, Cox C, Wardlow M and Jorgensen R. Preliminary studies of an acid-labile factor (ALF) in human sera that inactivates platelet-activating factor (PAF). *Clin. Immunol. Immunopathol.* 1980;15:318-330.
- 416 Tjoelker LW, Wilder C, Eberhardt C, Stafforini DM, Dietsch G, Schimpf B, Hooper S, Le Trong H, Cousens LS, Zimmerman GA. and et. al. Anti-inflammatory properties of a platelet-activating factor acetylhydrolase. *Nature.* 1995;374:549-553.
- 417 Tjoelker LW, Eberhardt C, Unger J, Trong HL, Zimmerman GA, McIntyre TM, Stafforini DM, Prescott SM and Gray PW. Plasma platelet -activating factor acetylhydrolase is a secreted phospholipase A2 with a catalytic triad. *J. Biol. Chem.* 1995;270:25481-25487.
- 418 Stafforini DM, McIntyre TM, Zimmerman GA and Prescott SM. Platelet-activating-factor acetylhydrolases. *J. Biol. Chem.* 1997;272:17895-17898.
- 419 Derewenda ZS and Derewenda U. The structure and function of platelet-activating factor acetylhydrolases. *Cell. Mol. Life. Sci.* 1998;54:446-455.
- 420 Derewenda ZS and Ho YS. PAF-acetylhydrolases. *Biochim. Biophys. Acta.* 1999;1441:229-236.
- 421 Tew DG, Southan C, Rice SQJ, Lawrence GMP, Li H, Boyd HF Moores K, Gloger IS and Macphee CH. Purification, properties, sequencing, and cloning of a lipoprotein-



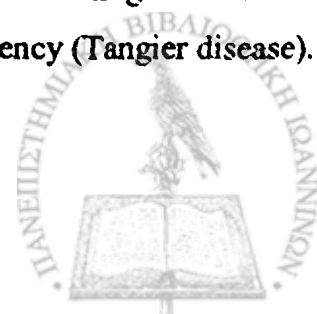
- associated, serine-dependent phospholipase involved in the oxidative modification of low-density lipoprotein. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 1996;16:591-599.
- 422 Tselepis AD, Karabina SA, Stengel D, Piedagnel R, Chapman MJ and Ninio E. N-Linked glycosylation of macrophage-derived PAF-AH is a major determinant of enzyme association with plasma HDL. *J. Lipid Res.* 2001;42:1645-1654.
- 423 Min JH, Jain MK, Wilder C, Paul L, Aritz-Castro R, Aspleaf DC and Gelb MH. Membrane-bound plasma platelet activating factor acetylhydrolase acts on substrate in the aqueous phase. *Biochemistry.* 1999;38:12935-12942.
- 424 Zalewski A and Macphee C. Role of lipoprotein-associated phospholipase A2 in atherosclerosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2005;25:923-931.
- 425 Stafforini DM, Satoh K, Atkinson DL, Tjoelker LW, Eberhardt C, Yoshida H, Imaizumi T, Takamatsu S, Zimmerman GA, McIntyre TM, Gray PW and Prescott SM. Platelet-activating factor acetylhydrolase deficiency: A missense mutation near the active site of an anti-inflammatory phospholipase. *J. Clin. Invest.* 1996;97:2784-2791.
- 426 Miwa M, Miyake T, Yamanaka T, Sugatani J, Suzuki Y, Sakata S, Araki Y and Matsumoto M. Characterization of serum platelet-activating factor (PAF) acetylhydrolase. Correlation between deficiency of serum PAF acetylhydrolase and respiratory symptoms in asthmatic children. *J. Clin. Invest.* 1988;82:1983-1991.
- 427 Balta G, Gurgey A, Kudayarov D, Tunc B and Altay C. Evidence for the existence of the PAF acetylhydrolase mutation (Val279Phe) in non-Japanese populations: a preliminary study in Turkey, Azerbaijan, and Kyrgyzstan. *Thromb. Res.* 2001;101:231-234.
- 428 Yamada Y and Yokota M. Loss of activity of plasma platelet-activating factor acetylhydrolase due to a novel Gln281-->Arg mutation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1997;236:772-775.
- 429 Yamada Y, Izawa H, Ichihara S, Takatsu F, Ishihara H, Hirayama H, Sone T, Tanaka M and Yokota M. Prediction of the risk of myocardial infarction from polymorphisms in candidate genes. *N. Engl. J. Med.* 2002;347:1916-1923.
- 430 Bell R, Collier DA, Rice SQ, Roberts GW, MacPhee CH, Kerwin RW, Price J and Gloger IS. Systematic screening of the LDL-PLA2 gene for polymorphic variants and



- case-control analysis in schizophrenia. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1997;241:630-635.
- 431 Kruse S, Mao XQ, Heinzmann A, Blattmann S, Roberts MH, Braun S, Gao PS, Forster J, Kuehr J, Hopkin JM, Shirakawa T and Deichmann KA. The Ile198Thr and Ala379Val variants of plasmatic PAF-acetylhydrolase impair catalytical activities and are associated with atopy and asthma. *Am. J. Hum. Genet.* 2000;66:1522-1530.
- 432 Rubin A, Smith L and Patterson R. The bronchoconstrictor properties of platelet-activating factor in humans. *Am. Rev. Respir. Dis.* 1987;136:1145-1151.
- 433 Lee C, Sigari F, Segrado T, Horkko S, Hama S, Subbaiah PV, Miwa M, Navab M, Witztum JL and Reaven PD. All ApoB-containing lipoproteins induce monocyte chemotaxis and adhesion when minimally modified. Modulation of lipoprotein bioactivity by platelet-activating factor acetylhydrolase. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 1999;19:1437-1446.
- 434 Tselepis AD, Dentan C, Karabina SA, Chapman MJ and 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;15:1764-1773.
- 435 Tjoelker LW and Stafforini DM. Platelet-activating factor acetylhydrolase in health and disease. *Biochim. Biophys. Acta.* 2000;1488:102-123.
- 436 Prescott SM, Zimmerman GA, Stafforini DM and McIntyre TM. Platelet-activating factor and related lipid mediators. *Annu. Rev. Biochem.* 2000;69:419-445.
- 437 Benitez S, Sanchez-Quesada JL, Ribas V, Jorba O, Blanco-Vaca F, Gonzalez-Sastre F and Ordonez-Llanos J. Platelet-activating factor acetylhydrolase is mainly associated with electronegative low-density lipoprotein subfraction. *Circulation.* 2003;108:92-96.
- 438 Blencowe C, Hermetter A, Kostner G and Deigner H. Enhanced association of platelet-activating factor acetylhydrolase with lipoprotein (a) in comparison with low density lipoprotein. *J. Biol. Chem.* 1995;270:31151-31157.
- 439 Karabina S, Elisaf M, Goudevenos J, Siamopoulos K, Sideris D and Tselepis A. PAF-acetylhydrolase activity of Lp(a) before and during Cu(2+)-induced oxidative modification in vitro. *Atherosclerosis.* 1996;125:121-134.



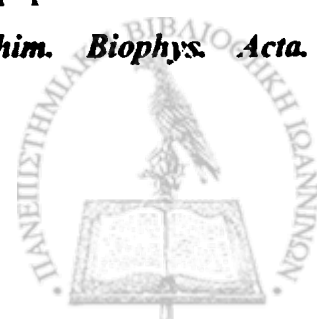
- 440 Asano K, Okamoto S, Fukunaga K, Shiomi T, Mori T, Iwata M, Ikeda Y and Yamaguchi K. Cellular source(s) of platelet-activating-factor acetylhydrolase activity in plasma. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1999;261:511-514.
- 441 Narahara H, Frenkel RA and Johnston JM. Secretion of platelet-activating factor acetylhydrolase following phorbol-ester-stimulated differentiation of HL-60 cells. *Arch. Biochem. Biophys.* 1993;301:275-281.
- 442 Lee TC, Fitzgerald V, Chatterjee R, Malone B and Snyder F. Differentiation induced increase of platelet-activating factor acetylhydrolase in HL-60 cells. *J. Lipid Mediat. Cell Signal.* 1994;9:267-283.
- 443 Stafforini DM, McIntyre TM and Prescott SM. Platelet-activating factor acetylhydrolase from human plasma. *Methods Enzymol.* 1990;187:344-357.
- 444 Narahara H and Johnston JM. Effects of endotoxins and cytokines on the secretion of platelet-activating factor acetylhydrolase by human decidual macrophages. *Am. J. Obstetr. Gynecol.* 1993;169:531-537.
- 445 Elstad MR, Stafforini DM, McIntyre TM, Prescott SM and Zimmerman GA. Platelet-activating factor acetylhydrolase increases during macrophage differentiation. A novel mechanism that regulates accumulation of platelet-activating factor. *J. Biol. Chem.* 1989;264:8467-8470.
- 446 Satoh K, Imaizumi T, Kawamura Y, Yoshida H, Hiramoto M, Takamatsu S and Takamatsu M. Platelet-activating factor (PAF) stimulates the production of PAF acetylhydrolase by the human hepatoma cell line, HepG2. *J. Clin. Invest.* 1991;87:476-481.
- 447 Tarbet EB, Stafforini DM, Elstad MR, Zimmerman GA, McIntyre TM and Prescott SM. Liver cells secrete the plasma form of platelet-activating factor acetylhydrolase. *J. Biol. Chem.* 1991;266:16667-16673.
- 448 Svetlov S, Sturm E, Olson M and 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;30:128-136.
- 449 Pritchard P, Chonn A and Yeung C. The degradation of platelet-activating factor in the plasma of a patient with familial high density lipoprotein deficiency (Tangier disease). *Blood.* 1985;66:1476-1478.



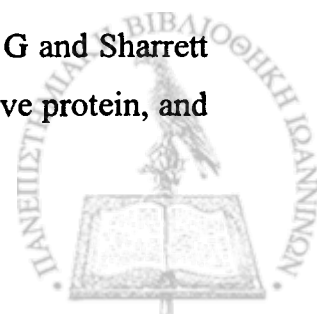
- 450 Stafforini D, Carter M, Zimmerman G, McIntyre T and Prescott S. Lipoproteins alter the catalytic behavior of the platelet-activating factor acetylhydrolase in human plasma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1989;86:2393-2397.
- 451 Stafforini D, Elstad M, McIntyre T, Zimmerman G and Prescott S. Human macrophages secrete platelet-activating factor acetylhydrolase. *J. Biol. Chem.* 1990;265:9682-9687.
- 452 Tselepis AD and Chapman MJ. Inflammation, bioactive lipids and atherosclerosis: potential roles of a lipoprotein-associated phospholipase A2, platelet activating factor-acetylhydrolase. *Atheroscler. Suppl.* 2002;3:57-68.
- 453 Russwurm S, Krause S, Finkelberg L, Ruhling K, Schauer U and Losche W. Generation of reactive oxygen species and activity of platelet-activating factor acetylhydrolase in human monocyte-derived macrophages. *Thromb. Res.* 1994;74:505-514.
- 454 Guerra R, Zhao B, Mooser V, Stafforini D, Johnston J and Cohen J. Determinants of plasma platelet-activating factor acetylhydrolase: heritability and relationship to plasma lipoproteins. *J. Lipid Res.* 1997;38:2281-2288.
- 455 Tsimihodimos V, Karabina SA, Tambaki AP, Bairaktari E, Miltiadous G, Goudevenos JA, Cariolou MA, Chapman MJ, Tselepis AD and Elisaf, M. Altered distribution of platelet-activating factor- acetylhydrolase activity between LDL and HDL as a function of the severity of hypercholesterolemia. *J. Lipid Res.* 2002;43:256-263.
- 456 Caslake M, Packard C, Suckling K, Holmes S, Chamberlain P and Macphee C. Lipoprotein-associated phospholipase A(2), platelet-activating factor acetylhydrolase: a potential new risk factor for coronary artery disease. *Atherosclerosis.* 2000;150:413-419.
- 457 Wu X, McIntyre T, Zimmerman G, Prescott S and Stafforini D. Molecular characterization of the constitutive expression of the plasma PAF-acetylhydrolase gene in macrophages. *Biochem. J.* 2003;375:351-363.
- 458 Miyaura S, Maki N, Byrd W and Johnston J. The hormonal regulation of platelet-activating factor acetylhydrolase activity in plasma. *Lipids.* 1991;26:1015-1020.
- 459 Yasuda K and Johnston J. The hormonal regulation of platelet-activating factor-acetylhydrolase in the rat. *Endocrinology.* 1992;130:708-716.



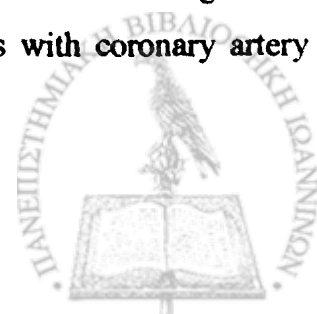
- 460 Maki N, Hoffman D and Johnston J. Platelet-activating factor acetylhydrolase activity in maternal, fetal, and newborn rabbit plasma during pregnancy and lactation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1988;85:728-732.
- 461 Howard KM, Miller JE, Miwa M and Olson MS. Cell-specific regulation of expression of plasma-type platelet-activating factor acetylhydrolase in the liver. *Bio. Chem.* 1997;272:27543-27548.
- 462 Cao Y, Stafforini DM, Zimmerman GA, McIntyre TM and Prescott SM. Expression of plasma platelet-activating factor acetylhydrolase is transcriptionally regulated by mediators of inflammation. *J. Biol. Chem.* 1998;273:4012-4020.
- 463 Narahara H, Nishioka Y and Johnston JM. Secretion of platelet-activating factor acetylhydrolase by human decidual macrophages. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1993;77:1258-1262.
- 464 Kawano Y, Narabara H and Johnston JM. Inhibitory effect of interleukin-8 on the secretion of platelet-activating factor acetylhydrolase by human decidual macrophages. *J. Soc. Gynecol. Invest.* 1999;6:328-332.
- 465 Tselepis A, Elisaf M, Basis S, Karabina S, Chapman M and Siamopoulou A. Association of the inflammatory state in active juvenile rheumatoid arthritis with hypo-high-density lipoproteinemia and reduced lipoprotein-associated platelet-activating factor acetylhydrolase activity. *Arthritis. Rheum.* 1999;42:373-383.
- 466 Kosaka T, Yamaguchi M, Miyana K and Mizuno K. Serum platelet-activating factor acetylhydrolase (PAF-AH) activity in more than 3000 healthy Japanese. *Clin. Chim. Acta.* 2001;312:179-183.
- 467 Zimmerman GA, Prescott SM and McIntyre TM. Platelet-activating factor and cell-associated mediator of inflammation. In *Inflammation: basic principles and clinical correlates*, (Gallin, J. I., Goldstein, I. M. and Snyderman, R., eds.), Raven Press, New York 1992;149-176.
- 468 Witztum JL and Steinberg D. Role of oxidized low density lipoprotein in atherogenesis. *J. Clin. Invest.* 1991;88:1785-1792.
- 469 Parthasarathy S, Barnett J and Fong LG. High density lipoprotein inhibits the oxidative modification of low-density lipoprotein. *Biochim. Biophys. Acta.* 1990;1044:275-283.



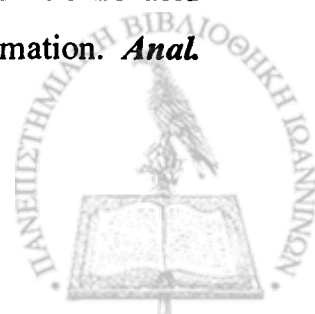
- 470 Sakai M, Miyazaki A, Hakamata H, Sasaki T, Yui S, Yamazaki M, Shichiri M and Horiuchi S. Lysophosphatidylcholine plays an essential role in the mitogenic effect of oxidized low density lipoprotein on murine macrophages. *J. Biol. Chem.* 1994;269:31430-31435.
- 471 MacPhee CH, Moores KE, Boyd HF, Dhanak D, Ife RJ, Leach CA, Leake DS, Milliner KJ, Patterson RA, Suckling KE., Tew DG and Hickey DM. Lipoprotein-associated phospholipase A2, platelet-activating factor acetylhydrolase, generates two bioactive products during the oxidation of low-density lipoprotein: use of a novel inhibitor. *Biochem. J.* 1999;338:479-487.
- 472 Ostermann G, Ruhling K, Zabel-Langhenning R, Winkler L, Schlag B and Till U. Plasma from atherosclerotic patients exerts an increased degradation of platelet-activating factor. *Thromb. Res.* 1987;47:279-285.
- 473 Satoh K, Imaizumi T, Kawamura Y, Yoshida H, Takamatsu S and Takamatsu M. Increased activity of platelet-activating factor acetylhydrolase in plasma low density lipoprotein from patients with essential hypertension. *Prostaglandins.* 1989;37:673-682.
- 474 Hofmann B, Ruhling K, Spangeberg P and Ostermann G. Enhanced degradation of platelet-activating factor in serum from diabetic patients. *Haemostasis.* 1989;19:180-184.
- 475 Albert MA, Danielson E and 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.
- 476 Albert MA, Glynn RJ, Wolfert RL and Ridker PM. The effect of statin therapy on lipoprotein associated phospholipase A2 levels. *Atherosclerosis.* 2005;182:193-198.
- 477 Packard CJ, O'Reilly DS, Caslake MJ, McMahon AD, Ford I, Cooney J, Macphee CH, Suckling KE, Krishna M, Wilkinson FE, RumLey A and Lowe GD. Lipoprotein-associated phospholipase A2 as an independent predictor of coronary heart disease. West of Scotland Coronary Prevention Study Group. *N. Engl. J. Med.* 2000;343:1148-1155.
- 478 Ballantyne CM, Hoogeveen RC, Bang H, Coresh J, Folsom AR, Heiss G and Sharrett AR. Lipoprotein-associated phospholipase A2, high-sensitivity C-reactive protein, and



- risk for incident coronary heart disease in middle-aged men and women in the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) study. *Circulation*. 2004;109:837-842.
- 479 Blake G, Dada N, Fox JC, Manson JE and Ridker PM. A prospective evaluation of lipoprotein-associated phospholipase A(2) levels and the risk of future cardiovascular events in women. *J. Am. Coll. Cardiol*. 2001;38:1302-1306.
- 480 Koenig W, Khuseyinova N, Lowel H, Trischler G and 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;110:1903-1908.
- 481 Oei HH, van der Meer IM, Hofman A, Koudstaal PJ, Stijnen T, Breteler MM and Witteman JC. Lipoprotein-associated phospholipase A2 activity is associated with risk of coronary heart disease and ischemic stroke: the Rotterdam Study. *Circulation*. 2005;111:570-575.
- 482 Iribarren C, Grossm M, Darbinianm J, Jacobs D, Sidney S and 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;25:216-221.
- 483 Boekholdt SM, Keller TT, Wareham NJ, Luben R, Bingham SA, Day NE, Sandhu MS, Jukema JW, Kastelein JJ, Hack CE and Khaw KT. 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;25:839-846.
- 484 Winkler K, Winkelmann BR, Scharnagl H, Hoffmann MM, Grawitz AB, Nauck M, Bohm BO and Marz W. 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;111:980-987.
- 485 Brilakis ES, McConnell JP, Lennon RJ, Elesber AA, Meyer JG and Berger PB. 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;26:137-144.
- 486 Ballantyne C, Hoogeveen R, Bang H and 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 5th Annual Conference on Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology 2004, San Francisco.
- 487 Khuseyinova N, Imhof A, Rothenbacher D, Trischler G, Kuelb S, Scharnagl H, Maerz W, Brenner H and Koenig W. Association between Lp-PLA2 and coronary artery disease: focus on its relationship with lipoproteins and markers of inflammation and hemostasis. *Atherosclerosis.* 2005;182:181-188.
- 488 Rand ML, Sanger W, Hancock MA, Taylor DM, Marcovina SM, Packman MA and Koschinsky ML. Apolipoprotein (a) enhances platelet responses to thrombin-receptor-activating peptide SFLLRN. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 1998;18:1393-1399.
- 489 Barry OP and Fitzgerald GA. Mechanisms of cellular activation by platelet microparticles. *Thromb. Haemost.* 1999;82:794-800.
- 490 Barry OP, Kazanietz MG, Pratico D and FitzGerald GA. Arachidonic acid in platelet microparticles up-regulates cyclooxygenase-2-dependent prostaglandin formation via a protein kinase C/mitogen-activated protein kinase-dependent pathway. *J. Biol. Chem.* 1999;274:7545-7556.
- 491 Pasquet JM, Toti F, Nurden AT and Dachery-Prigent J. Procoagulant activity and active calpain in platelet-derived microparticles. *Thromb. Res.* 1996;82:509-522.
- 492 Bossant MJ, Ninio E, Delautier D and Benveniste J. Bioassay of paf-acether by rabbit platelet aggregation. In *Methods in Enzymology* (Murphy, R. C. and Fitzpatrick, F. A., eds.), Academic Press, San Diego 1990;125-130.
- 493 Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ and Klenk DC. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* 1985;150:76-85.
- 494 Wiechelman K, Braun R and Fitzpatrick J. Investigation of the bicinchoninic acid protein assay: identification of the groups responsible for color formation. *Anal. Biochem.* 1988;175:231-237.



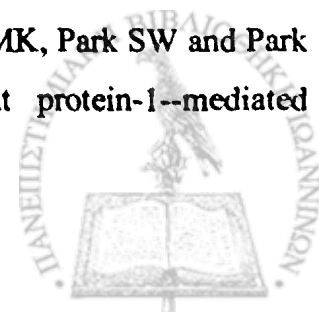
- 495 Folin O and Ciocalteu V. On tyrosine and tryptophane determinations in proteins. *J. Biol. Chem.* 1927;LXXIII(2):627-650.
- 496 Karabina SA, Liapikos TA, Grekas G, Goudevenos J and Tselepis AD. Distribution of PAF-acetylhydrolase activity in human plasma low-density lipoprotein subfractions. *Biochim. Biophys. Acta.* 1994;1213:34-38.
- 497 Smythe CD, Skinner VO, Bruckdorfer KR, Haskard DO and Landis RC. The state of macrophage differentiation determines the TNF alpha response to nitrated lipoprotein uptake. *Atherosclerosis.* 2003;170:213-221.
- 498 Tselepis AD, Lekka ME and Tsoukatos D. A PAF-acetylhydrolase activity in Tetrahymena pyriformis cells. *FEBS lett.* 1991;288:147-150.
- 499 Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970;227:680-685.
- 500 Stengel D, Antonucci M, Arborati M, Hourton D, Griglio S, Chapman MJ and Ninio E. Expression of the PAF receptor in human monocyte-derived macrophages is down-regulated by oxidized low-density lipoprotein: relevance to the inflammatory phase of atherogenesis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 1997;17:954-962.
- 501 Osumi K, Ozeki Y, Saito S, Nagamura Y, Ito H, Kimura Y, Ogura H and Nomura S. Development and assessment of enzyme immunoassay for platelet-derived microparticles. *Thromb. Haemost.* 2001;85:326-330.
- 502 Dentan C, Tselepis AD, Chapman MJ and Ninio E. Pefabloc, 4-[2-aminoethyl]benzenesulfonyl fluoride, is a new, potent nontoxic and irreversible inhibitor of PAF-degrading acetylhydrolase. *Biochim. Biophys. Acta.* 1996;1299:353-357.
- 503 Taub R, Gould RJ, Garsky VM, Ciccarone TM, Hoxie J, Friedman PA and Shattil SJ. A monoclonal antibody against the platelet fibrinogen receptor contains a sequence that mimics a receptor recognition domain in fibrinogen. *J. Biol. Chem.* 1989;264:259-265.
- 504 Tsujinaka T, Kajiwara Y, Kambayashi J, Sakon M, Higuchi N, Tanaka T and Mori T. Synthesis of a new cell penetrating calpain inhibitor (calpeptin). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1988;153:1201-1208.



- 505 Narahara H, Kawano Y, Nasu K, Yoshimatsu J, Johnston JM. and Miyakawa I. Platelet-activating factor inhibits the secretion of platelet-activating factor acetylhydrolase by human decidual macrophages. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2003;88:6029-6033.
- 506 Kaplanski G, Marin V, Fabrigoule M, Boulay V, Benoliel AM, Bongrand P, Kaplanski S and Farnarier C. Thrombin-activated human endothelial cells support monocyte adhesion in vitro following expression of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1; CD54) and vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1; CD106). *Blood.* 1998;92:1259-1267.
- 507 Rahman A, Anwar KN, Minhajuddin M, Bijli KM, Javaid K, True AL and Malik AB. cAMP targeting of p38 MAP kinase inhibits thrombin-induced NF-kappaB activation and ICAM-1 expression in endothelial cells. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 2004;287:L1017-1024.
- 508 Kim I, Moon SO, Kim SH, Kim HJ, Koh YS and Koh GY. Vascular endothelial growth factor expression of intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1), vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1), and E-selectin through nuclear factor-kappa B activation in endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 2001;276:7614-7620.
- 509 Tsakadze NL, Zhao Z and D'Souza SE. Interactions of intercellular adhesion molecule-1 with fibrinogen. *Trends. Cardiovasc. Med.* 2002;12:101-108.
- 510 Terashita Z, Imura Y and Nishikawa K. Inhibition by CV-3988 of the binding of [3H]-platelet activating factor (PAF) to the platelet. *Biochem. Pharmacol.* 1985;34:1491-1495.
- 511 Rice SQJ, Southan C, Boyd HF, Terrett JA, Macphee CH, Moores K, Gloger IS and Tew DG. Expression, purification and characterization of a human serine-dependent phospholipase A2 with high specificity for oxidized phospholipids and platelet activating factor. *Biochem. J.* 1998;330:1309-1315.
- 512 Del Conde I, Shrimpton CN, Thiagarajan P and Lopez JA. Tissue-factor-bearing microvesicles arise from lipid rafts and fuse with activated platelets to initiate coagulation. *Blood.* 2005;106:1604-1611.



- 513 Lindemann S, Tolley ND, Dixon DA, McIntyre TM, Prescott SM, Zimmerman GA and Weyrich AS. Activated platelets mediate inflammatory signaling by regulated interleukin 1beta synthesis. *J. Cell Biol.* 2001;154:485-490.
- 514 Korth R, Bidault J, Palmantier R, Benveniste J and Ninio E. Human platelets release a PAF-acether: acetylhydrolase similar to that in plasma. *Lipids.* 1993;28:193-199.
- 515 Prescott SM, McIntyre TM and Zimmerman G. Inflammation: Basic Principles and Clinical Correlates. Lippincott/Williams & Wilkins, Philadelphia 1999.
- 516 Tate DA, Bode AP, Nichols TC and Dehmer GJ. Platelet activation detected by platelet-derived microparticles in coronary sinus blood from patients with unstable coronary syndromes. *Circulation.* 1992;86:802.
- 517 Mallat Z, Benamer H, Hugel B, Benessiano J, Steg PG, Freyssinet JM and Tedgui A. Elevated levels of shed membrane microparticles with procoagulant potential in the peripheral circulating blood of patients with acute coronary syndromes. *Circulation.* 2000;101:841-843.
- 518 Pennewitz A, Finkelberg L, Krause S and Losche W. Platelets inhibit the activity of platelet activating factor acetylhydrolase in monocyte-derived macrophages. *Thromb. Res.* 1997;86:427-430.
- 519 Fuhrman B, Brook GJ and Aviram M. Proteins derived from platelet alpha granules modulate the uptake of oxidized low density lipoprotein by macrophages. *Biochim. Biophys. Acta.* 1992;1127:15-21.
- 520 Weide I and Simmet T. Contact-mediated stimulation of the monocyte 5-lipoxygenase pathway is enhanced by the presence of platelets. *Thromb. Res.* 1995;77:187-192.
- 521 Tsuji T, Nagata K, Koike J, Todoroki N and Irimura T. Induction of superoxide anion production from monocytes and neutrophils by activated platelets through the P-selectin-sialyl Lewis X interaction. *J. Leukoc. Biol.* 1994;56:583-587.
- 522 Han KH, Tangirala RK, Green SR and Quehenberger O. Chemokine receptor CCR2 expression and monocyte chemoattractant protein-1-mediated chemotaxis in human monocytes. A regulatory role for plasma LDL. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 1998;18:1983-1991.
- 523 Han KH, Hong KH, Park JH, Ko J, Kang DH, Choi KJ, Hong MK, Park SW and Park SJ. C-reactive protein promotes monocyte chemoattractant protein-1-mediated



- chemotaxis through upregulating CC chemokine receptor 2 expression in human monocytes. *Circulation*. 2004;109:2566-2571.
- 524 Cha JK, Jeong MH, Bae HR, Han JY, Jeong SJ, Jin HJ, Lim YJ, Kim SH and Kim JW. Activated platelets induce secretion of interleukin-1beta, monocyte chemotactic protein-1, and macrophage inflammatory protein-1alpha and surface expression of intercellular adhesion molecule-1 on cultured endothelial cells. *J. Korean Med. Sci*. 2000;15:273-278.
- 525 Lou P, Gutman RL, Mao FW and Greenspan P. Effects of phosphatidylserine on the oxidation of low density lipoprotein. *Int. J. Biochem*. 1994;26:539-545.
- 526 Broekman MJ, Handin RI, Derksen A and Cohen P. Distribution of phospholipids, fatty acids, and platelet factor 3 activity among subcellular fractions of human platelets. *Blood*. 1976;47:963-971.
- 527 Calzada C, Bruckdorfer KR and Rice-Evans CA. The influence of antioxidant nutrients on platelet function in healthy volunteers. *Atherosclerosis*. 1997;128:97-105.
- 528 Snyder F. Metabolism, regulation, and function of ether linked glycerolipids and their bioactive sprcies. In *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes*. (Vance, D. E. and Vance, J. E., eds.), Elsevier Science Publishers, Amsterdam 1991;241-267.
- 529 Zoeller RA, Morand OH and Raetz CRH. A possible role for plasmalogens in protectin animal cells against photosensitized killing. *J. Biol. Chem*. 1988;263:11590-11596.
- 530 Morand OH, Zoeller RA and Raetz CR. Disappearance of plasmalogens from membranes of animal cells subjected to photosensitized oxidation. *J. Biol. Chem*. 1988;263:11597-11606.
- 531 Zoeller RA, Lake AC, Nagan N, Gaposchkin DP, Legner MA and Lieberthal W. Plasmalogens as endogenous antioxidants: somatic cell mutants reveal the importance of the vinyl ether. *Biochem. J*. 1999;338:769-776.
- 532 Hahnel D, Thiery J, Brosche T and Engelmann B. Role of plasmalogens in the enhanced resitance of LDL to copper-induced oxidation after LDL apheresis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol*. 1999;19:2431-2438.



- 533 Hahnel D, Huber T, Kurze V, Beyer K and Engelmann B. Contribution of copper binding to the inhibition of lipid oxidation by plamalogen phospholipids. *Biochem. J.* 1999;340:377-383.
- 534 Pike LJ, Han X, Chung KN and Gross RW. Lipid rafts are enriched in arachidonic acid and plasmeneylethanolamine and their composition is independent of caveolin-1 expression: a quantitative electrospray ionization/mass spectrometric analysis. *Biochemistry.*2002;41:2075-2088.



ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ

Από τα αποτελέσματα της μελέτης και από την μεθοδολογία που αναπτύχθηκε κατά της εκπόνησης της παρούσας διατριβής προέκυψαν η παρακάτω δημοσιεύσεις.

1. Mitsios JV, Tselepis AD. Platelet microparticles bind to LDL and inhibit its oxidative modification in vitro. 10th Erfurt Platelet conference. Erfurt, Germany, 20-24 June, 2004.
2. Μήτσιος IB, Λουρίδα ΕΣ, Παπαβασιλείου ΕΧ, Τσελέπης ΑΔ. ΤΑ ΜΙΚΡΟΣΩΜΑΤΙΔΙΑ ΤΩΝ ΑΙΜΟΠΙΕΤΑΛΙΩΝ ΣΥΝΔΕΟΝΤΑΙ ΜΕ ΤΗΝ LDL ΚΑΙ ΑΝΑΣΤΕΛΛΟΥΝ ΤΗΝ ΟΞΕΙΔΩΣΗ ΤΗΣ LDL IN VITRO. 1^ο Πανελλήνιο Συνέδριο του Ελληνικού Φόρουμ Λιποειδών, Αθήνα, 8-9 Ιουνίου, 2005.
3. Mitsios JV, Tsironis LD, Tselepis AD. Platelet-Activating (PAF) and PAF-Acetylhydrolase Activity are Secreted from Human Platelets Mainly Associated with Platelet Derived Microparticles. 46th International Conference on the Bioscience of Lipids. Ajaccio, Corsica, September 20-24, 2005. *Chemistry and Physics of Lipids*. 136: 108-109.
4. J.V. Mitsios, M.P. Vini, D. Stengel, E. Ninio, A.D. Tselepis. CIRCULATING MICROPARTICLES OF PLATELET ORIGIN ARE CARRIERS OF PAF-ACETYLHYDROLASE. XIV international Symposium on Atherosclerosis. Rome Italy, June 18-22, 2006.
5. Mitsios JV, Vini MP, Stengel D, Ninio E, Tselepis AD. Human Platelets Secrete the Plasma Type of Platelet-Activating Factor Acetylhydrolase Primarily Associated With Microparticles. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2006;26:1907-1913.

