



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**Επίδραση της Αντιρετροϊκής Αγωγής στο Μεταβολισμό
του Παράγοντα Ενεργοποίησης των Αιμοπεταλίων**

**ΒΑΣΙΛΙΚΗ Δ. ΠΑΠΑΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΥ
ΧΗΜΙΚΟΣ**

**ΑΘΗΝΑ
ΙΟΥΛΙΟΣ 2014**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**Επίδραση της Αντιρετροϊκής Αγωγής στο Μεταβολισμό του Παράγοντα
Ενεργοποίησης των Αιμοπεταλίων**

ΒΑΣΙΛΙΚΗ Δ. ΠΑΠΑΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΥ

A.M.: 001013

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ:

Κωνσταντίνος Α. Δημόπουλος, Καθηγητής Τμήματος Χημείας ΕΚΠΑ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ ΠΑΡΑΚΟΛΟΥΘΗΣΗΣ:

Κωνσταντίνος Α. Δημόπουλος, Καθηγητής Τμήματος Χημείας ΕΚΠΑ
Σμαραγδή Αντωνοπούλου, Καθηγήτρια Τμήματος Διαιτολογίας και Διατροφής
Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο
Ελισάβετ Φραγκοπούλου, Επίκουρη καθηγήτρια Τμήματος Διαιτολογίας και
Διατροφής Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο

ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Κωνσταντίνος Α. Δημόπουλος, Καθηγητής Τμήματος Χημείας Εθνικό και
Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών
Σμαραγδή Αντωνοπούλου, Καθηγήτρια Τμήματος Διαιτολογίας και Διατροφής
Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο
Ελισάβετ Φραγκοπούλου, Επίκουρη Καθηγήτρια Τμήματος Διαιτολογίας και
Διατροφής Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο
Κωνσταντίνα Γαλανοπούλου, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Τμήματος Χημείας
Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών
Ηλίας Λιανός, Καθηγητής Ιατρικής Σχολής Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο
Αθηνών
Σταμάτης Θεοχάρης, Αναπληρωτής καθηγητής Ιατρικής Σχολής Εθνικό και
Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών
Τζώρτζης Νομικός, Επίκουρος Καθηγητής Τμήματος Διαιτολογίας και Διατροφής
Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΕΞΕΤΑΣΗΣ

16/7/2014

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η HIV λοίμωξη αποτελεί πλέον μια χρόνια νόσο παρά μια θανατική καταδίκη χάρη στην αντιρετροϊκή αγωγή. Παρόλα αυτά, πληθώρα παραγόντων, είτε σχετικών με τον ιό είτε με την εκάστοτε αντιρετροϊκή αγωγή, μεσολαβούν ώστε οι οροθετικοί ασθενείς να εμφανίζουν μικρότερο προσδόκιμο ζωής καθώς και υψηλότερα επίπεδα φλεγμονωδών δεικτών από το μέσο πληθυσμό. Αυτή η κατάσταση είναι χαρακτηριστική της HIV λοίμωξης και αποδίδεται με τον όρο “ανοσολογική διέγερση”. Ως αποτέλεσμα εμφανίζονται οι διάφορες, μη συσχετιζόμενες με το AIDS, εκδηλώσεις όπως ο καρκίνος, η καρδιαγγειακή και η νεφρική νόσος. Το φλεγμονώδες υπόβαθρο των εκδηλώσεων αυτών εγείρει ερωτήματα για την *in vivo* επίδραση της αντιρετροϊκής αγωγής στο μεταβολισμό του Παράγοντα Ενεργοποίησης των Αιμοπεταλίων (PAF), τον ισχυρότερο φλεγμονώδη παράγοντα και μεσολαβητή. Με σκοπό να διαλευκανθεί η επίδραση αυτή, 50 οροθετικοί ασυμπτωματικοί και μη προθεραπευμένοι άρρενες ασθενείς διαχωρίστηκαν σε 5 ομάδες. Η ομάδα Α έλαβε tenofovir-DF/emtricitabine/ efavirenz, η ομάδα Β έλαβε abacavir/lamivudine/ efavirenz, η ομάδα Γ έλαβε tenofovir-DF/emtricitabine/ atazanavir-r, η ομάδα Δ έλαβε abacavir/lamivudine/ atazanavir-r και η ομάδα Ν δεν έλαβε θεραπεία, αποτελώντας την ομάδα αναφοράς. Ακολούθησαν 6 αιμοληψίες μέσα στο χρονικό διάστημα 12 μηνών και προσδιορίστηκαν τα επίπεδα και τα ρυθμιστικά ένζυμα του PAF. Τα αποτελέσματα δείχνουν την άμεση επίδραση της αντιρετροϊκής αγωγής στο μεταβολισμό του PAF, άλλες φορές με ανασταλτική και άλλες με ενεργοποιητική δράση, καθώς και την εμπλοκή του στη χρόνια ανοσολογική διέγερση και στις μη συσχετιζόμενες με το AIDS εκδηλώσεις της λοίμωξης. Τα δεδομένα αυτά μπορούν να δώσουν έναυσμα για έρευνα και ανάπτυξη αντιρετροϊκών αγωγών με αντι-φλεγμονώδη και συγκεκριμένα αντι-PAF δράση με σκοπό το τέλος της χρόνιας φλεγμονής και των εκδηλώσεων της στην HIV λοίμωξη.

ΘΕΜΑΤΙΚΗ ΠΕΡΙΟΧΗ: Η Βιοχημεία των Αντιρετροϊκών Φαρμάκων

ΛΕΞΕΙΣ ΚΛΕΙΔΙΑ: Παράγοντας Ενεργοποίησης των Αιμοπεταλίων, Φλεγμονή, HIV-λοίμωξη, Αντιρετροϊκή Θεραπεία, Μη συσχετιζόμενες με το AIDS εκδηλώσεις

ABSTRACT

The Effect of Antiretroviral Therapy on the Metabolism Of Platelet Activating Factor

The progress of antiretroviral therapy has converted HIV infection from a death sentence into a chronic disease. Eventhought, numerous factors, related either to the virus itself or the antiretroviral therapy, are responsible for the lower life expectancy and the higher inflammatory markers of HIV patients compared to the average population. This condition has been defined as immune activation and is responsible for many pathological conditions namely “non-AIDS morbidities” such as malignancies, cardiovascular and renal disease. The inflammatory background of the above pathological conditions has raised questions about the *in vivo* effect of the antiretroviral therapy on the metabolism of Platelet Activating Factor (PAF), the most potent inflammatory mediator. In order to elucidate this effect, 50 male, asymptomatic and naïve HIV-infected patients have been recruited and divided into 5 groups according to their antiretroviral therapy; Group A received tenofovir-DF/emtricitabine/ efavirenz, Group B received abacavir/lamivudine/ efavirenz, Group C received tenofovir-DF/emtricitabine/ atazanavir-r, Group D received abacavir/lamivudine/ atazanavir-r and Group N was the positive control group consisted of the naïve patients. After 6 blood donations within 12 months, PAF levels and the specific activity of PAF metabolic enzymes were defined in patients’ blood. The results display the effect of antiretroviral therapy on PAF metabolism, having either an inhibitory or an activating action. In addition, PAF seems to be implicated in the immune activation as well in the non-AIDS morbidities. The present data could trigger the research and development of antiretrovirals with anti-inflammatory and especially anti-PAF actions in order to diminish chronic activation and its harmful consequences during HIV infection.

SUBJECT AREA: The biochemistry of Antiretroviral Therapy

KEYWORDS: Platelet Activating Factor, Inflammation, HIV-infection, Antiretroviral Therapy, non-AIDS morbidities

Αφιερωμένο σε ότι μου δίνει έμπνευση,

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε την περίοδο 2010-2014 στο Εργαστήριο Βιοχημείας του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Αθηνών σε συνεργασία με τις Μονάδες Λοιμώξεων των Γενικών Νοσοκομείων «Κοργιαλένιο-Μπενάκιο Ε.Ε.Σ.» και Γενικό Κρατικό «Γ. Γεννηματάς». Την επίβλεψη και καθοδήγηση της εργασίας είχε ο Καθηγητής Κωνσταντίνος Α. Δημόπουλος, τον οποίο θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά για την ανάθεση του θέματος, τις συμβουλές του και την υποστήριξη του όλα αυτά τα χρόνια.

Στη συνέχεια θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στα υπόλοιπα μέλη της τριμελούς επιτροπής, την Καθηγήτρια Σ. Αντωνοπούλου και την Επίκουρη Καθηγήτρια Ε. Φραγκοπούλου για τις συμβουλές τους και την άμεση βοήθειά τους σε όποιο στάδιο χρειάστηκα.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω το Συντονιστή-Διευθυντή Μ-Κ Λαζανά και την Επιστημονική Υπεύθυνη Μ. Χίνη της Μονάδας Λοιμώξεων του Γενικού Νοσοκομείου «Κοργιαλένιο-Μπενάκιο Ε.Ε.Σ.», για την εμπιστοσύνη και την οικονομική συμβολή τους στη μελέτη. Ένα μεγάλο ευχαριστώ στο Συντονιστή-Διευθυντή της Μονάδας Λοιμώξεων του Γενικού νοσοκομείου «Γ. Γεννηματάς», Π. Γαργαλιάνο-Κακολύρη για την παραχώρηση ειδικού χώρου επεξεργασίας των δειγμάτων αίματος όπως και όλο το προσωπικό των δύο μονάδων για την αгаσθή μας συνεργασία αυτά τα χρόνια. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω την Διευθύντρια του τμήματος Ανοσολογίας και Ιστοσυμβατότητας του Γενικού νοσοκομείου «Ο Ευαγγελισμός» Χ. Παπαστεριάδη και τη Δρ. Κ. Ψαρρά για την συμβολή τους στην ανάλυση των κυτταροκινών.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες θα ήθελα να εκφράσω στο Δρ. Γ. Σταματάκη όχι μόνο για την εξαιρετική μας συνεργασία στη διεξαγωγή των πειραμάτων αλλά και για τη φιλική ατμόσφαιρα στην καθημερινότητά μας. Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω όλο το διδακτικό προσωπικό και τους φοιτητές του Εργαστηρίου Βιοχημείας, Χημείας Τροφίμων του Τμήματος Χημείας και του Χαροκοπείου Πανεπιστημίου για την ευχάριστη ατμόσφαιρα και συνεργασία κατά το διάστημα αυτών των ετών. Τέλος, ένα μεγάλο ευχαριστώ στους δικούς μου ανθρώπους, οικογένεια και φίλους, για την αγάπη και τη στήριξη τους.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	5
ABSTRACT.....	6
ΠΡΟΛΟΓΟΣ	19
Θεωρητικό Μέρος	21
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1^ο: Το Σύνδρομο Επίκτητης Ανοσολογικής Ανεπάρκειας - Ο Ανθρώπινος Ιός Ανοσοανεπάρκειας και η Αντιρετροϊκή Αγωγή	23
1.1 Χαρακτηριστικά, δομή και ιικός κύκλος του HIV.....	23
1.2 Αντιρετροϊκή θεραπεία.....	27
1.2.1 Κατηγορίες Αντιρετροϊκών Φαρμάκων	28
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2^ο: Η Ανοσολογική Ενεργοποίηση και οι Χρόνιες, μη Συσχετιζόμενες με το AIDS, Εκδηλώσεις στην HIV λοίμωξη	33
2.1 Ανοσολογική Ενεργοποίηση στην HIV λοίμωξη.....	33
2.1.1 Ρυθμιστικοί Παράγοντες Ιντερφερονών (IRF)	35
2.1.2 Το μονοπάτι του NF-κΒ.....	35
2.2 Μη συσχετιζόμενες με το AIDS εκδηλώσεις (non-AIDS morbidities)	36
2.2.1 Καρδιαγγειακή νόσος (CVD)	38
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3^ο: Μεσολαβητές της Φλεγμονής - Ο Παράγοντας Ενεργοποίησης των Αιμοπεταλίων και οι Κυτταροκίνες	42
3.1 Ο Παράγοντας Ενεργοποίησης των Αιμοπεταλίων (PAF)	42
3.1.1 Κυτταρικές πηγές, δράσεις και PAF υποδοχέας.....	43
3.1.2 Αναστολείς του PAF.....	44
3.1.3 Μεταβολισμός PAF	45
3.1.3.1 Η εξ' υπαρχής πορεία βιοσύνθεσης (<i>De Novo</i> πορεία)	46
3.1.3.2 Η πορεία αναδιαμόρφωσης (remodeling πορεία)	46
3.1.3.3 Αποικοδόμηση PAF.....	46
3.1.4 Ο PAF στην HIV λοίμωξη	47

3.1.5 Η σχέση του PAF με την ανοσολογική διέγερση και τις εκδηλώσεις της HIV λοίμωξης.....	48
3.2 Οι κυτταροκίνες	49
3.2.1 Ο ρόλος κυτταροκινών στην HIV λοίμωξη	50
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4^ο: Ερυθροκύτταρα	52
4.1 Η δομή και ο κύκλος ζωής των ερυθροκυττάρων.....	52
4.2 Ερυθρά αιμοσφαίρια, PAF και HIV λοίμωξη	55
Σκοπός	57
Πειραματικό Μέρος	58
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5^ο: Μέθοδοι.....	59
5.1 Σχεδιασμός μελέτης	59
5.1.1 Επιλογή εθελοντών	59
5.1.2 Κλινικό πρωτόκολλο	60
5.2 Εκχύλιση λιποειδών κατά τη μέθοδο Bligh-Dyer	62
5.3 Προσδιορισμός πρωτεΐνης με τη μέθοδο Bradford.....	63
5.4 Χρωματογραφία στήλης λιποειδών	65
5.5 Χρωματογραφία Λεπτής Στιβάδας (TLC) πολικών λιποειδών	66
5.6 Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (HPLC) λιποειδών	68
5.7 Βιολογική Δοκιμασία <i>in vitro</i>	70
5.7.1 Απομόνωση πλυμένων αιμοπεταλίων από αίμα κουνελιού	72
5.7.2 Συσσώρευση πλυμένων αιμοπεταλίων κουνελιού	73
5.7.3 Αναστολή της συσσώρευσης των πλυμένων αιμοπεταλίων κουνελιού	74
5.8 Παραλαβή αίματος	75
5.8.1 Αιμοληψία εθελοντή για προσδιορισμό επιπέδων PAF	75
5.8.2 Αιμοληψία εθελοντή για προσδιορισμό ενζύμων PAF	76
5.8.3 Αιμοληψία κουνελιού	76

5.9 Διαχωρισμός πλάσματος και έμμορφων συστατικών από ολικό αίμα.....	76
5.9.1 Απομόνωση πλάσματος.....	77
5.9.2 Απομόνωση αιμοπεταλίων.....	77
5.9.3 Απομόνωση λευκοκυττάρων.....	77
5.9.4 Απομόνωση ερυθροκυττάρων.....	78
5.10 Προσδιορισμός δραστικότητας της ανεξάρτητης διθειοθρεϊτόλης PAF- φωσφοχολινοτρανσφεράσης (PAF-CPT).....	80
5.11 Προσδιορισμός δραστικότητας της λυσο-PAF-ακετυλοτρανσφεράσης (lyso- PAF-AT).....	82
5.12 Ενζυμική δοκιμασία PAF-ακετυλοϋδρολάσης (PAF-AH) και της ισομορφής της λιποπρωτεϊνικής φωσφολιπάσης A2 (Lp-PLA2).....	83
5.13 Μέτρηση ραδιενέργειας με μετρητή σπινθηρισμού υγρών.....	85
5.14 Μέτρηση κυτταροκινών IL-1β, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70 και TNFα.....	86
5.15 Μέτρηση του Αγγειακού Ενδοθηλιακού Αυξητικού Παράγοντα (VEGF)....	88
5.16 Κυτταρομετρία ροής.....	90
5.17 Στατιστική επεξεργασία.....	92
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6^ο: Αποτελέσματα	93
6.1 <i>In vitro</i> επίδραση αντιρετροϊκών φαρμάκων στη συσσωρευτική δράση του PAF.....	93
6.2 <i>In vivo</i> επίδραση αντιρετροϊκής αγωγής στα επίπεδα PAF	95
6.2.1 Δεσμευμένος (Bound) PAF	96
6.2.2 Ελεύθερος (Free) PAF	98
6.2.3 Συνολικός (Total) PAF.....	99
6.3 <i>In vivo</i> επίδραση αντιρετροϊκής αγωγής στη βιοσύνθεση του PAF	101
6.3.1 PAF φωσφοχολινοτρανσφεράση (PAF-CPT) στα λευκοκύτταρα	102
6.3.2 lyso-PAF-ακετυλοτρανσφεράση (lyso-PAF-AT) στα λευκοκύτταρα .	104
6.3.3 PAF φωσφοχολινοτρανσφεράση (PAF-CPT) στα αιμοπετάλια	106

6.3.4	lyso-PAF-ακετυλοτρανσφεράση (lyso-PAF-AT) στα αιμοπετάλια	107
6.4	<i>In vivo</i> επίδραση αντιρετροϊκής αγωγής στην αποικοδόμηση PAF	109
6.4.1	PAF-ακετυλουδρολάση (PAF-AH) στα λευκοκύτταρα.....	110
6.4.2	PAF-ακετυλουδρολάση (PAF-AH) στα αιμοπετάλια	112
6.4.3	PAF-ακετυλουδρολάση (PAF-AH) στα ερυθροκύτταρα	113
6.4.4	Λιποπρωτεϊνική φωσφολιπάση A2 (Lp-PLA2)	115
6.5	Συγκρίσεις μεταξύ των ομάδων.....	117
6.5.1	Συγκρίσεις αντιρετροϊκών ομάδων με την ομάδα αναφοράς.....	117
6.5.2	Συγκρίσεις αντιρετροϊκών ομάδων	123
6.5.2.1	Συγκρίσεις αντιρετροϊκών ομάδων με efavirenz.....	129
6.5.2.2	Συγκρίσεις αντιρετροϊκών ομάδων με atazanavir-r.....	129
6.5.2.3	Συγκρίσεις αντιρετροϊκών ομάδων με tenofovir-DF/emtricitabine ..	130
6.5.2.4	Συγκρίσεις αντιρετροϊκών ομάδων με abacavir/lamivudine	131
6.6	Ανάλυση συσχετίσεων των μεταβολών μεταξύ έναρξης και λήξης της μελέτης.....	133
6.7	<i>In vivo</i> επίδραση αντιρετροϊκής αγωγής στις κυτταροκίνες IL-1β, IL-6, IL-8, IL-10, IL12p70, TNFα και στον παράγοντα VEGF.....	139
6.8	Δραστικότητα των βιοσυνθετικών ενζύμων του PAF, PAF-CPT και lyso-PAF-AT, στα ερυθροκύτταρα HIV ασθενών	141
6.9	Πιστοποίηση της ύπαρξης και μελέτη των βιοσυνθετικών ενζύμων του PAF (PAF-CPT και lyso-PAF-AT) σε ανθρώπινα ερυθροκύτταρα.....	142
6.9.1	Παραλαβή και ομογενοποίηση ερυθροκυττάρων.....	142
6.9.2	Πιστοποίηση ενζυμικής δραστικότητας.....	142
6.9.3	Προσδιορισμός ειδικής δραστικότητας PAF-CPT και lyso-PAF-AT στα υποκυτταρικά κλάσματα	143
6.9.4	Βιοχημικός Χαρακτηρισμός των βιοσυνθετικών ενζύμων PAF-CPT και lyso-PAF-AT σε ανθρώπινα ερυθροκύτταρα	145
6.9.4.1	Επίδραση της ποσότητας πρωτεΐνης και του χρόνου επώασης στη δραστικότητα των PAF-CPT και lyso-PAF-AT.....	145

6.9.4.2 Επίδραση της θερμοκρασίας επώασης στη δραστικότητα των PAF-CPT και lyso-PAF-AT	147
6.9.4.3 Επίδραση του pH στη δραστικότητα των PAF-CPT και lyso-PAF-AT	147
6.10 Πιστοποίηση της δραστικότητας των βιοσυνθετικών ενζύμων του PAF (PAF-CPT και lyso-PAF-AT) σε ανθρώπινα ερυθροκύτταρα μέσω φασματοσκοπίας μάζας του παραγόμενου PAF	149
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7^ο: Συζήτηση	150
ΠΙΝΑΚΑΣ ΟΡΟΛΟΓΙΑΣ	163
Συντμήσεις – Αρκτικόλεξα – Ακρωνύμια	167
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ I	171
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ II	172
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ III	174
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ IV	177
ΑΝΑΦΟΡΕΣ	179

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

Σχήμα 1: Σχεδιαγραμματική απεικόνιση της πορείας διαχωρισμού πλάσματος και έμμορφων στοιχείων από ολικό αίμα	79
Σχήμα 2: <i>In vitro</i> επίδραση αντιρετροϊκών συνδυασμών έναντι στη συσσωρευτική δράση του PAF σε πλυμένα αιμοπετάλια κουνελιού.	94
Σχήμα 3: <i>In vitro</i> επίδραση των επιμέρους δραστικών ουσιών του κάθε αντιρετροϊκού συνδυασμού έναντι στη συσσωρευτική δράση του PAF σε πλυμένα αιμοπετάλια κουνελιού.	95
Σχήμα 4: Επίδραση αντιρετροϊκής αγωγής στα επίπεδα του δεσμευμένου (Bound) PAF.	97
Σχήμα 5: Επίδραση αντιρετροϊκής αγωγής στα επίπεδα του ελεύθερου (Free) PAF.	99
Σχήμα 6: Επίδραση αντιρετροϊκής αγωγής στα επίπεδα του συνολικού (Total) PAF.	101
Σχήμα 7: Επίδραση αντιρετροϊκής αγωγής στην ειδική δραστικότητα της PAF-CPT στα λευκοκύτταρα.....	103
Σχήμα 8: Επίδραση αντιρετροϊκής αγωγής στην ειδική δραστικότητα της lyso-PAF-AT στα λευκοκύτταρα.	105
Σχήμα 9: Επίδραση αντιρετροϊκής αγωγής στην ειδική δραστικότητα της PAF-CPT στα αιμοπετάλια.	107
Σχήμα 10: Επίδραση αντιρετροϊκής αγωγής στην ειδική δραστικότητα της lyso-PAF-AT στα αιμοπετάλια.....	109
Σχήμα 11: Επίδραση αντιρετροϊκής αγωγής στην ειδική δραστικότητα της PAF-AH στα λευκοκύτταρα.....	111
Σχήμα 12: Επίδραση αντιρετροϊκής αγωγής στην ειδική δραστικότητα της PAF-AH στα αιμοπετάλια.	113

Σχήμα 13: Επίδραση αντιρετροϊκής αγωγής στην ειδική δραστικότητα της PAF-AH στα ερυθροκύτταρα.....	115
Σχήμα 14: Επίδραση αντιρετροϊκής αγωγής στην ειδική δραστικότητα της Lp-PLA2 στο πλάσμα.....	117
Σχήμα 15: Σύγκριση αντιρετροϊκών αγωγών (Α-Δ) στα επίπεδα PAF	124
Σχήμα 16: Σύγκριση αντιρετροϊκών αγωγών (Α-Δ) στα βιοσυνθετικά ένζυμα του PAF.....	126
Σχήμα 17: Σύγκριση αντιρετροϊκών αγωγών (Α-Δ) στα αποικοδομητικά ένζυμα του PAF.....	128
Σχήμα 18: Δραστικότητα βιοσυνθετικών ενζύμων του PAF i) PAF-CPT και ii) lyso-PAF-AT στην ομάδα N. Το p_{time} συμβολίζει τη συνολική μεταβολή στη διάρκεια της μελέτης.....	141
Σχήμα 19: Επίδραση βρασμού στην ειδική δραστικότητα της PAF-CPT και της lyso-PAF-AT στο Υπερκείμενο και στο Ίζημα του ομογενοποιημένου ερυθροκυττάρων.	143
Σχήμα 20: Σχεδιάγραμμα της πορείας υποκυτταρικής κατανομής ανθρώπινων ερυθροκυττάρων.	144
Σχήμα 21: Επίδραση της ποσότητας πρωτεΐνης και του χρόνου επώασης στη δραστικότητα των PAF-CPT και lyso-PAF-AT.	146
Σχήμα 22: Επίδραση της θερμοκρασίας επώασης στη δραστικότητα των PAF-CPT και lyso-PAF-AT.....	147
Σχήμα 23: Επίδραση του pH στη δραστικότητα των PAF-CPT και lyso-PAF-AT. .	148

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1: Η δομή του HIV.	25
Εικόνα 2: Ο ιικός κύκλος του HIV.	26
Εικόνα 3: Ο μηχανισμός δράσης των NRTIs.	29
Εικόνα 4: Οι δομές των αντιρετροϊκών φάρμακων lamivudine, abacavir, tenofovir και emtricitabine της κατηγορίας των NRTIs και NtRTIs.	30
Εικόνα 5: Η δομή του αντιρετροϊκού φαρμάκου efavirenz της κατηγορίας των NNRTIs.	30
Εικόνα 6: Ο μηχανισμός των PIs.	31
Εικόνα 7: Οι δομές των αντιρετροϊκών φάρμακων atazanavir και ritonavir της κατηγορίας των PIs.	32
Εικόνα 8: Η ανοσολογική ενεργοποίηση μέσω των Toll-like υποδοχέων.	34
Εικόνα 9: Οι αιτίες της χρόνιας ανοσολογικής διέγερσης και της φλεγμονής στην HIV λοίμωξη.	38
Εικόνα 10: Η δομή του Παράγοντα Ενεργοποίησης των Αιμοπεταλίων (PAF).	42
Εικόνα 11: Ο μεταβολισμός του Παράγοντα Ενεργοποίησης των Αιμοπεταλίων (PAF) [244].	45
Εικόνα 12: Τα έμμορφα στοιχεία του αίματος.	52
Εικόνα 13: Η διαδικασία της ερυθροποίησης.	53
Εικόνα 14: Ο συνολικός μηχανισμός της ερυθρόπτωσης με την εμπλοκή του PAF.	56
Εικόνα 15: Η σειρά εμφάνισης πρότυπων φωσφολιποειδών σε πλάκα TLC.	68
Εικόνα 16: Η σειρά εμφάνισης φωσφολιποειδών σε χρωματογράφημα HPLC.	70
Εικόνα 17: Η αρχή βιολογικής δοκιμασίας <i>in vitro</i>	75
Εικόνα 18: Η αρχή μεθόδου CBA.	91
Εικόνα 19: Φάσμα LC-MS παραγόμενου PAF που προέκυψε από τα βιοσυνθετικά ενζυμα του PAF στα ερυθροκύτταρα.	149

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1: Οι πρωτεΐνες που μεταφράζονται από το γονιδίωμα του HIV.	25
Πίνακας 2: Οι έξι κατηγορίες αντιρετροϊκών και γνωστά παραδείγματα φαρμάκων.	28
Πίνακας 3: Μη συσχετιζόμενες με το AIDS εκδηλώσεις της HIV λοίμωξης	37
Πίνακας 4: Ο διαχωρισμός των ασθενών της μελέτης στις ομάδες A-N.....	61
Πίνακας 5: Περιγραφή αντιρετροϊκών ομάδων και αγωγών.	93
Πίνακας 6: Επιμέρους συγκρίσεις αντιρετροϊκών ομάδων A-Δ με την ομάδα N στα επίπεδα PAF.	118
Πίνακας 7: Επιμέρους συγκρίσεις αντιρετροϊκών ομάδων A-Δ με την ομάδα N στη βιοσύνθεση του PAF.	120
Πίνακας 8: Επιμέρους συγκρίσεις αντιρετροϊκών ομάδων A-Δ με την ομάδα N στην αποικοδόμηση του PAF.	122
Πίνακας 9: Σύγκριση αντιρετροϊκών ομάδων με efavirenz (A vs B).	129
Πίνακας 10: Σύγκριση αντιρετροϊκών ομάδων με atazanavir-r. (Γ vs Δ).	130
Πίνακας 11: Σύγκριση αντιρετροϊκών ομάδων με tenofovir-DF/ emtricitabine (A vs Γ).....	131
Πίνακας 12: Σύγκριση αντιρετροϊκών ομάδων με abacavir/lamivudine (B vs Δ). ..	132
Πίνακας 13: Συσχετίσεις μεταξύ CD4 ⁺ T κυττάρων και του ιικού φορτίου στην ομάδα ART.....	133
Πίνακας 14: Συσχετίσεις μεταξύ CD4 ⁺ T κυττάρων και του ιικού φορτίου με τα επίπεδα και τα μεταβολικά ένζυμα του PAF στην ομάδα ART.	133
Πίνακας 15: Συσχετίσεις μεταξύ ανθρωπομετρικών χαρακτηριστικών (BMI, ηλικία και κάπνισμα) με τα επίπεδα και τα μεταβολικά ένζυμα του PAF στην ομάδα ART.....	134
Πίνακας 16: Συσχετίσεις μεταξύ ανθρωπομετρικών χαρακτηριστικών (ΔΜΣ, ηλικία και κάπνισμα) με τα επίπεδα και τα μεταβολικά ένζυμα του PAF στην ομάδα N....	134

Πίνακας 17: Συσχετίσεις μεταξύ των επιπέδων και των ενζύμων του PAF στην ομάδα ART.....	135
Πίνακας 18: Συσχετίσεις μεταξύ των επιπέδων και των ενζύμων του PAF στην ομάδα N.	135
Πίνακας 19: Συσχετίσεις μεταξύ των ενζύμων του PAF στην ομάδα ART.....	136
Πίνακας 20: Συσχετίσεις μεταξύ των ενζύμων του PAF στην ομάδα N.	136
Πίνακας 21: Συσχετίσεις μεταξύ βιοχημικών και αιματολογικών χαρακτηριστικών με τα επίπεδα και τα ένζυμα του PAF στην ομάδα ART.....	138
Πίνακας 22: Συσχετίσεις μεταξύ βιοχημικών και αιματολογικών χαρακτηριστικών με τα επίπεδα και τα ένζυμα του PAF στην ομάδα N.	138
Πίνακας 23: Επίπεδα κυτταροκινών και VEGF στους HIV ασθενείς των ομάδων Α και Β.	140
Πίνακας 24: Αποτελέσματα ειδικής δραστηριότητας PAF-CPT και lyso-PAF-AT στα υποκυτταρικά κλάσματα.	145
Πίνακας 25: CD4 ⁺ Τ κύτταρα και ιικό φορτίο των ασθενών κατά τη διάρκεια της μελέτης.....	171
Πίνακας 26: Δείκτης Μάζας Σώματος και λιπιδαιμικό προφίλ των ασθενών κατά τη διάρκεια της μελέτης.....	172
Πίνακας 27: Βιοχημικοί δείκτες των ασθενών κατά τη διάρκεια της μελέτης.....	174
Πίνακας 28: Αιματολογικοί δείκτες των ασθενών κατά τη διάρκεια της μελέτης.	177

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διδακτορική διατριβή είναι το αποτέλεσμα μια ευρύτερης μελέτης σχετικά με την εμπλοκή της φλεγμονής και του οξειδωτικού στρες στην αντιρετροϊκή θεραπεία και την HIV λοίμωξη. Από τα δεδομένα της εν λόγω έρευνας έχουν προκύψει μέχρι τώρα τέσσερις δημοσιεύσεις σε διεθνή επιστημονικά περιοδικά και μία σε ελληνικό περιοδικό ενώ κατά καιρούς έχουν παρουσιαστεί τα αποτελέσματά της με προφορικές ή αναρτημένες ανακοινώσεις σε Παγκόσμια, Ευρωπαϊκά και Πανελλήνια συνέδρια.

Δημοσιεύσεις

- ***In vivo* effect of two first-line ART regimens on inflammatory mediators in male HIV patients.** Papakonstantinou VD, Chini M, Mangafas N, Stamatakis GM, Tsogas N, Tsoupras AB, Psarra K, Fragopoulou E, Antonopoulou S, Gargalianos P, Demopoulos CA, Lazanas MC. *Lipids Health Dis.* 2014;13(1):90.
- **HIV λοίμωξη και καρδιαγγειακός κίνδυνος. Ο ρόλος του Παράγοντα Ενεργοποίησης Αιμοπεταλίων.** Χίνη Μ, Παπακωνσταντίνου ΒΔ, Δημόπουλος ΚΑ. *Καρδιολογική Γνώμη*, 2012;7(2):110-118.
- **Effects of HAART on platelet-activating factor metabolism in naive HIV-infected patients I: study of the tenofovir-DF/emtricitabine/efavirenz HAART regimen.** Chini M, Tsoupras AB, Mangafas N, Tsogas N, Papakonstantinou VD, Fragopoulou E, Antonopoulou S, Gargalianos P, Demopoulos CA, Lazanas MC. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 2012;28(8):766-75.
- **Effects of highly active antiretroviral therapy on platelet activating factor metabolism in naive HIV-infected patients: ii) study of the abacavir/lamivudine/efavirenz HAART regimen.** Chini M, Tsoupras AB, Mangafas N, Tsogas N, Papakonstantinou VD, Fragopoulou E, Antonopoulou S, Gargalianos P, Demopoulos CA, Lazanas MC. *Int J Immunopathol Pharmacol.* 2012;25(1):247-58.
- **Platelet-activating factor and its basic metabolic enzymes in blood of naive HIV-infected patients.** Tsoupras AB, Chini M, Mangafas N, Tsogas N, Stamatakis G, Tsantila N, Fragopoulou E, Antonopoulou S, Gargalianos P, Demopoulos CA, Lazanas MC. *Angiology.* 2012;63(5):343-52.

Συνέδρια

- ***In vivo* effects of HAART on PAF metabolism in HIV+ Patients.** 49th ICAAC Meeting, September 2009, San Francisco, USA.
- **Επίδραση της αντιρετροϊκής θεραπείας (HAART) στον Παράγοντα Ενεργοποίησης Αιμοπεταλίων (PAF).** 21^ο Πανελλήνιο Συνέδριο AIDS, Νοέμβριος 2009, Θεσσαλονίκη
- **Συγκριτική μελέτη του μεταβολισμού του Παράγοντα ενεργοποίησης αιμοπεταλίων (PAF) σε μη προθεραπευμένους (naïve) ασθενείς με HIV λοίμωξη και υγιείς μάρτυρες.** 10^ο Συνέδριο της Ελληνικής Εταιρείας Λοιμώξεων, Φεβρουάριος 2010, Αθήνα.
- **Abacavir και αύξηση του καρδιαγγειακού κινδύνου σε ασθενείς με HIV λοίμωξη: ο ρόλος του Παράγοντα Ενεργοποίησης Αιμοπεταλίων.** 4^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Αθηροσκλήρωσης, Οκτώβριος 2010, Ιωάννινα.
- **Επίδραση της HIV λοίμωξης και της αντιρετροϊκής θεραπείας στον παράγοντα ενεργοποίησης αιμοπεταλίων και συσχέτιση της με τον κίνδυνο καρδιαγγειακών επιπλοκών.** 4^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Αθηροσκλήρωσης, Οκτώβριος 2010, Ιωάννινα.
- **Επίδραση της αντιρετροϊκής θεραπείας (HAART) στο μεταβολισμό και τα επίπεδα του παράγοντα ενεργοποίησης αιμοπεταλίων (PAF) και συσχέτιση τους με τον καρδιαγγειακό κίνδυνο.** 22^ο Πανελλήνιο Συνέδριο AIDS, Νοέμβριος 2010, Αθήνα.
- **HIV λοίμωξη και καρδιαγγειακός κίνδυνος: ο ρόλος του PAF.** 34^ο Εκπαιδευτικό σεμινάριο με θέμα: Λιπίδια στην κλινική πράξη, Ιούνιος 2011, Ωνάσειο Καρδιοχειρουργικό κέντρο.
- ***In vivo* effects of HAART on platelet activating factor (PAF) metabolism and levels in HIV-infected patients: a potential mechanism of abacavir-related cardiovascular risk.** 6th IAS Conference on HIV Pathogenesis Treatment and Prevention, July 2011, Rome – Italy
- **Επίδραση διαφορετικών σχημάτων HAART στα επίπεδα δεικτών φλεγμονής σε ασθενείς με HIV λοίμωξη.** 23^ο Πανελλήνιο Συνέδριο AIDS, 25-27 Νοεμβρίου 2011, Αθήνα.
- **Abacavir και αύξηση καρδιαγγειακού κινδύνου σε ασθενείς με HIV λοίμωξη: ο ρόλος του Παράγοντα Ενεργοποίησης Αιμοπεταλίων (PAF).** 4^ο Επιστημονικό Συμπόσιο της Ελληνικής Εταιρείας Αθηροσκλήρωσης, Δεκέμβριος 2011, Αθήνα
- **Effect of Two First Line ART Regimens on Various Inflammatory Markers in HIV-patients: A New Criterion in Selecting Antiretrovirals?** 14th European AIDS Conference and 15th International Workshop on Co-morbidities and adverse drug reaction in HIV, October 2013, Brussels-Belgium
- ***In vivo* επίδραση δύο σχημάτων HAART στο μεταβολισμό του Παράγοντα Ενεργοποίησης Αιμοπεταλίων (PAF) σε μη προθεραπευμένους ασθενείς με HIV λοίμωξη.** 25^ο Πανελλήνιο Συνέδριο AIDS, Νοέμβριος 2013, Αθήνα.

Θεωρητικό Μέρος

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1^ο: Το Σύνδρομο Επίκτητης Ανοσολογικής Ανεπάρκειας - Ο Ανθρώπινος Ιός Ανοσοανεπάρκειας και η Αντιρετροϊκή Αγωγή

Ο Ανθρώπινος Ιός Ανοσοανεπάρκειας (Human Immunodeficiency Virus, HIV), προκαλεί το Σύνδρομο Επίκτητης Ανοσολογικής Ανεπάρκειας (Acquired Immunodeficiency Syndrome, AIDS) και είναι υπεύθυνος για περισσότερους από 20.000.000 θανάτους ανά την υφήλιο [1]. Η HIV λοίμωξη και το AIDS παραμένουν ένα παγκόσμιο πρόβλημα υγείας καθώς, σύμφωνα με τα διεθνή στατιστικά δεδομένα για το 2012, οι οροθετικοί ξεπερνούν τα 35.000.000 ενώ καθημερινά προκύπτουν 6.300 νέα περιστατικά λοίμωξης [2]. Στην Ελλάδα, ο συνολικός αριθμός των HIV οροθετικών ατόμων που έχουν δηλωθεί μέχρι την 31^η Δεκεμβρίου 2013 ανέρχεται στους 13.622, σημειώνοντας αυξητικές τάσεις τα τελευταία χρόνια [3].

Οι πρώτες αναφορές εμφανίστηκαν το 1981 στο Los Angeles, με πέντε περιστατικά πνευμονίας *Pneumocystis carinii* [4] και σύντομα προέκυψαν ανάλογες αναφορές από τη Νέα Υόρκη και το San Francisco [5] σηματοδοτώντας έτσι την έναρξη της έρευνας γύρω από αυτή την άγνωστη, έως τότε, θανατηφόρο πανδημία. Με κύριες ερευνητικές ομάδες την Αμερικάνικη στο National Institut of Health και τη Γαλλική στο ινστιτούτο Pasteur, οι επικεφαλής R. Gallo και L. Montagnier αντίστοιχα, κατάφεραν να απομονώσουν τον ιό και να τον συνδέσουν ως αιτιολογικό παράγοντα του AIDS δίνοντας του εν τέλει την ονομασία HIV [6-11].

1.1 Χαρακτηριστικά, δομή και ιικός κύκλος του HIV

Ο HIV προήλθε από την κεντροδυτική Αφρική στις αρχές του 20^{ου} αιώνα [12] και είναι τυπικό μέλος του γένους των βραδέων ιών ή Φακοϊών (*lente virus*) [13], της οικογένειας των Ρετροϊών [14]. Χαρακτηριστικό των ρετροϊών είναι το RNA γονιδίωμα τους το οποίο μετατρέπουν σε DNA με τη βοήθεια του ενζύμου αντίστροφη μεταγραφάση. Ένα από τα χαρακτηριστικά των βραδέων ιών είναι η μακρά περίοδος εκκόλαψής τους στο κύτταρο ξενιστή προτού να εμφανιστούν τα

κλινικά συμπτώματα της ασθένειας. Ο κύριος υποδοχέας για τον ιό HIV είναι το μόριο CD4 και συνεπώς οποιοδήποτε κύτταρο που το εκφράζει αποτελεί στόχο του ιού. Έτσι, τα Τ λεμφοκύτταρα είναι ο κύριος στόχος, χωρίς να αποκλείονται τα μονοκύτταρα, μακροφάγα και πολλά άλλα κύτταρα με τελικό στόχο τη σταδιακή κατάρρευση του ανοιμικού συστήματος του ξενιστή [15].

Κάθε ώριμος ιός αποτελείται από τις δομές που εμφανίζονται στην εικόνα 1 και περιγράφονται παρακάτω περιληπτικά [16-18].

- *Εξωτερικό διλιποειδικό μεμβρανικό περίβλημα / ιικός φάκελος*

Έχει σχήμα εικοσάεδρης σφαίρας με διάμετρο 100 nm. Αποτελείται από μια διπλοστοιβάδα λιποειδών με 72 μυτερές προεξοχές που συναρμολογούνται ως τριμερή από τις επιφανειακές πρωτεΐνες gp120 και τις διαμεμβρανικές πρωτεΐνες gp41.

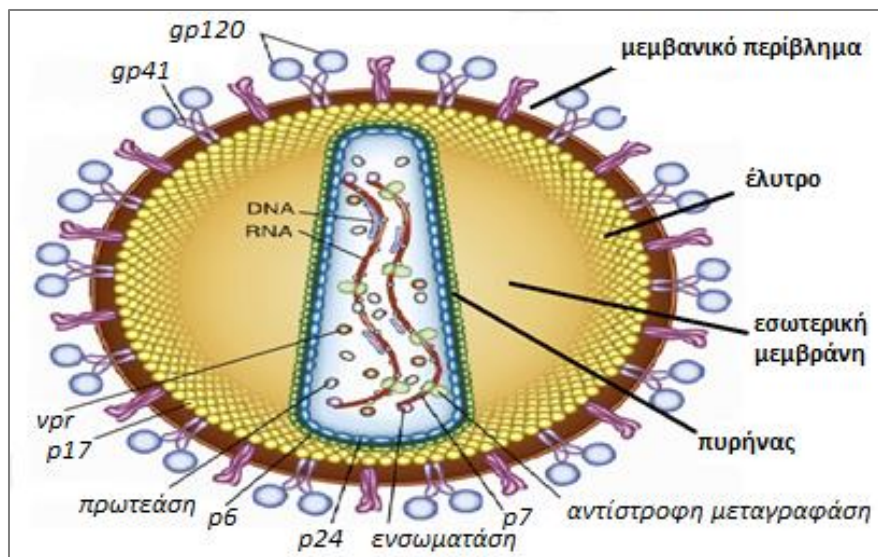
- *Έλυτρο και εσωτερική μεμβράνη*

Το έλυτρο βρίσκεται κάτω από το λιποειδικό περίβλημα και κάτω από το έλυτρο βρίσκεται η εσωτερική μεμβράνη. Ο χώρος αυτός προστατεύει τον πυρήνα και αποτελείται κυρίως από την πρωτεΐνη p17.

- *Πυρήνας*

Ο πυρήνας έχει μορφή κώνου και αποτελείται από τις πρωτεΐνες p24 και p6. Περιέχει τα δύο μόρια μονόκλωνου RNA και πρωτεΐνες απαραίτητες για την επιβίωση του ιού, όπως την πρωτεάση, την ενσωμάτωση, την αντίστροφη μεταγραφάση, τη νουκλεοπρωτεΐνη p7 και τις p1 και p2.

Όσον αφορά στο γονιδίωμά του, ο HIV διαθέτει μια πολύπλοκη δομή 9 γονιδίων τα οποία μεταφράζονται σε 15 πρωτεΐνες [19, 20] (πίνακας 1).

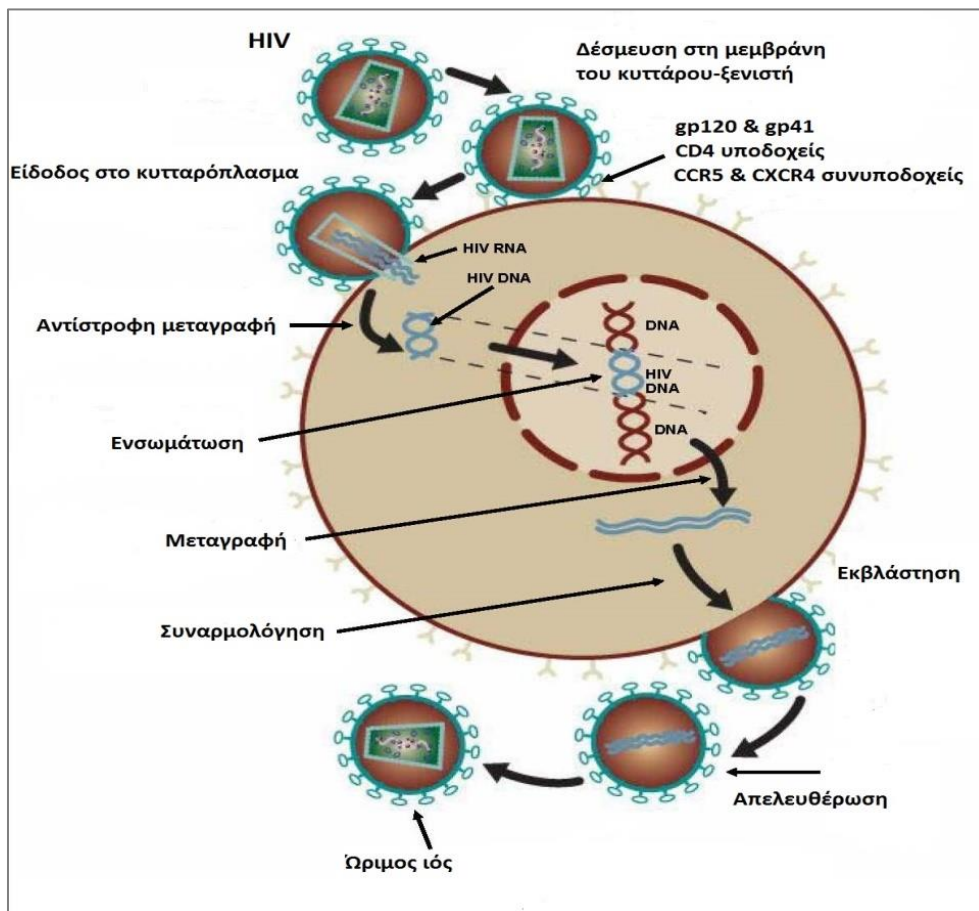


Εικόνα 1: Η δομή του HIV.

Πίνακας 1: Οι πρωτεΐνες που μεταφράζονται από το γονιδίωμα του HIV.

Κατηγορία πρωτεϊνών	Γονίδιο	Πρόδρομη πρωτεΐνη	Τελική λειτουργική πρωτεΐνη
Δομικές	Gag	Gag πολυπρωτεΐνη	MA, CA, SP1, NC, SP2, P6
	Pol	Pol πολυπρωτεΐνη	RT, RNάση H, IN, PR
	Env	gp160	gp120, gp41
Κύριες λειτουργικές	Tat	Tat	
	Rev	Rev	
Δευτερεύουσες λειτουργικές	Nef	Nef	
	Vpr	Vpr	
	Vif	Vif	
	Vpru	Vpru	

Μετά την είσοδο του HIV στον οργανισμό, ακολουθεί μια σειρά διεργασιών μεταξύ του ιού και του ξενιστή που θα μπορούσε να περιγραφεί σε δύο φάσεις. Ουσιαστικά η πρώτη φάση περιλαμβάνει την πρόσδεση του ιού στη μεμβράνη του κύτταρου ξενιστή, την είσοδο του στο κυτταρόπλασμα, την αντίστροφη μεταγραφή του γονιδιώματός του από RNA σε DNA και την ενσωμάτωση του με το δίκλωνο DNA του ξενιστή. Η δεύτερη φάση περιγράφει τη ζωή των προσβεβλημένων κυττάρων ως ιικά, με επίκεντρο τις κυτταρικές πρωτεΐνες να ρυθμίζουν τη βιοσύνθεση των ιικών πρωτεϊνών και των νέων μολυσματικών ιών, τα λεγόμενα βίρια, επεκτείνοντας με τον τρόπο αυτό τη λοίμωξη [15, 21-23].



Εικόνα 2: Ο ιικός κύκλος του HIV.

1.2 Αντιρετροϊκή θεραπεία

Οι πρώτες αγωγές που εμφανίστηκαν είχαν στόχο να περιορίσουν τα συμπτώματα, όπως τις ευκαιριακές λοιμώξεις, και όχι να καταπολεμήσουν τον ίδιο τον ιό [24]. Δίχως κάποια ειδική θεραπευτική αγωγή, η HIV λοίμωξη οδηγούσε σε AIDS και ο ασθενής κατέληγε 8-10 χρόνια μετά τη λοίμωξη [25]. Η εισαγωγή της αντιρετροϊκής θεραπείας (Antiretroviral Therapy, ART) στα μέσα της δεκαετίας '90 έφερε ως αποτέλεσμα τη δραστική μείωση των θανάτων στους οροθετικούς ασθενείς [26-28]. Οι πρώτες αγωγές, με πιο αντιπροσωπευτικό παράδειγμα το zidovudine (AZT), είχαν δυνατές παρενέργειες που επηρέαζαν και μείωναν τη δράση των φαρμάκων [29]. Με τον καιρό οι παρενέργειες περιορίστηκαν, τα φάρμακα έγιναν πιο εύκολα και απλά στη χορήγησή τους, μειώνοντας ακόμα περισσότερο τη θνησιμότητα [30-32]. Η μονοθεραπευτική αγωγή αντικαταστάθηκε γρήγορα από το συνδυασμό αντιρετροϊκών φαρμάκων, συνήθως τριών, παίρνοντας την ονομασία συνδυαστική Αντιρετροϊκή Αγωγή (combinational AntiRetroviral Therapy, cART) ή Αντιρετροϊκή Αγωγή Υψηλής Δραστηριότητας (High Active AntiRetroviral Therapy, HAART) περιορίζοντας ακόμα περισσότερο τη θνησιμότητα και τη νοσηρότητα [33-36]. Ο αρχικός στόχος των διάφορων θεραπειών ήταν η δραστική μείωση του ιικού φορτίου στο μη ανιχνεύσιμο ώστε να περιοριστεί η αντίσταση στα φάρμακα, που προκαλεί το υψηλό φορτίο λόγω των συνεχών μεταλλάξεων του ιού, αλλά και για να μειωθούν οι πιθανότητες μετάδοσης του ιού από τον ασθενή. Όταν αυτό έγινε πραγματικότητα οι απαιτήσεις αυξήθηκαν, οι αγωγές εξελίχθηκαν και κατάφεραν, παράλληλα με την καταστολή του ιικού φορτίου, να επαναφέρουν τη λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος, όπως φαίνεται από τη σημαντική αύξηση των CD4⁺ T λεμφοκυττάρων [37-39].

Τριάντα χρόνια μετά την εμφάνιση του, το σύνδρομο του AIDS μπορεί να θεωρηθεί παρελθόν [40, 41], τουλάχιστον σε περιοχές με πρόσβαση σε αντιρετροϊκή αγωγή, ενώ παράλληλα η HIV λοίμωξη έχει μετατραπεί από θανατική καταδίκη μια χρόνια νόσος [42, 43]. Με έγκαιρη αντιρετροϊκή θεραπεία οι ασθενείς παρουσιάζουν προσδόκιμο ζωής παρόμοιο, αν και πάλι χαμηλότερο, με αυτό του μέσου πληθυσμού [44]. Τα τελευταία χρόνια δε, αντιρετροϊκά φάρμακα χορηγούνται

προληπτικά σε ομάδες υψηλού κινδύνου και σημειώνουν επιτυχία δίνοντας ελπίδα για μια μελλοντική και πλήρως αποτελεσματική θεραπευτική αγωγή [45]. Παρόλα αυτά η αντιρετροϊκή αγωγή δεν αποκαθιστά την υγεία καθώς οι ασθενείς παρουσιάζουν ένα φάσμα παθολογικών καταστάσεων που αποδίδονται με τον όρο “μη συσχετιζόμενες με το AIDS εκδηλώσεις” (non-AIDS morbidities) [41, 46, 47] οι οποίες θα αναπτυχθούν στα επόμενα κεφάλαια.

1.2.1 Κατηγορίες Αντιρετροϊκών Φαρμάκων

Υπάρχουν πάνω από 36 φάρμακα που έχουν εγκριθεί από το FDA (Food and Drug Administration) και πολλά ακόμα βρίσκονται υπό ένταξη ή μελέτη. Τα αντιρετροϊκά φάρμακα μπορούν να ταξινομηθούν σε έξι κατηγορίες ανάλογα το μηχανισμό δράσης τους [24, 48], (πίνακας 2).

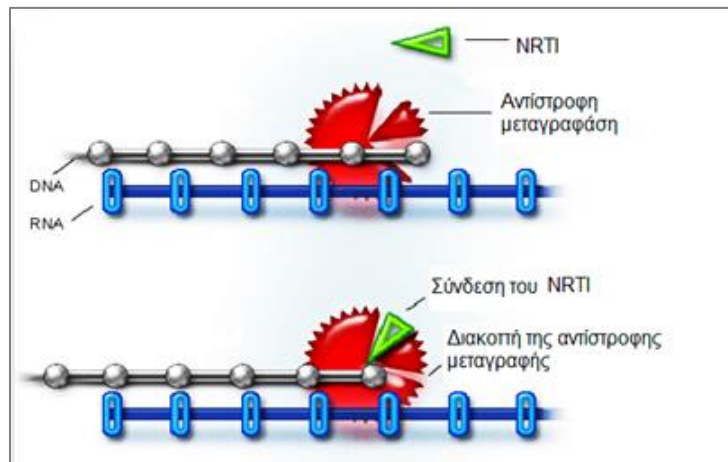
Πίνακας 2: Οι έξι κατηγορίες αντιρετροϊκών και γνωστά παραδείγματα φαρμάκων.

Μηχανισμός Δράσης αντιρετροϊκών φαρμάκων	Αντιπροσωπευτικά Παραδείγματα
Νουκλεοσιδικά και νουκλεοτιδικά ανάλογα αναστολείς αντίστροφης μεταγραφάσης (Nucleoside and Nucleotide Reverse Transcriptase Inhibitors, NRTIs και NtRTIs)	tenofovir, emtricitabine, abacavir, lamivudine, zidovudine
Μη νουκλεοσιδικά ανάλογα αναστολείς αντίστροφης μεταγραφάσης (Non-Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitors, NNRTIs)	efavirenz, nevirapine, etravirine, rilpivirine
Αναστολείς πρωτεασών (Protease Inhibitors, PIs)	atazanavir, ritonavir, darunavir
Αναστολείς ενσωματάσης	raltegravir
Αναστολείς εισόδου	maraviroc, (vicriviroc, cenicriviroc)
Αναστολείς σύντηξης	enfuvirtine, (ibalizumab)

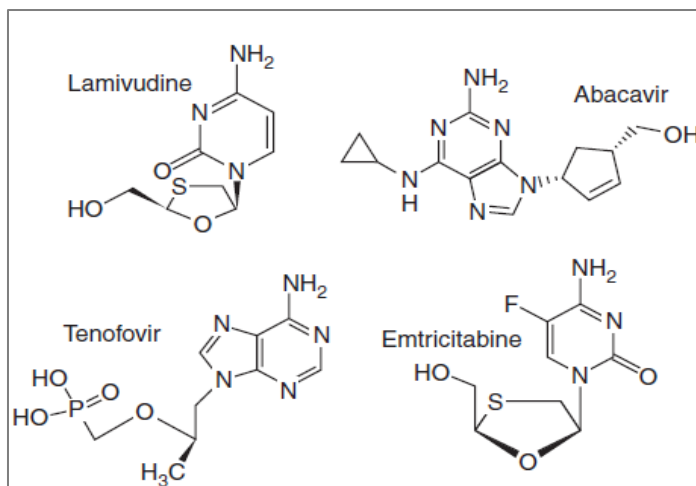
Εντός παρενθέσεως βρίσκονται τα φάρμακα υπό ένταξη.

Ι. Νουκλεοσιδικά και νουκλεοτιδικά ανάλογα - αναστολείς αντίστροφης μεταγραφάσης (NRTIs και NtRTIs)

Τα φάρμακα αυτής της κατηγορίας είναι τα πρώτα που εγκρίθηκαν από τον FDA και χρησιμοποιήθηκαν σε ασθενείς [49]. Αποτελούν τροποποιημένα ανάλογα φυσικού νουκλεοζίτη και λειτουργούν ως προ-φάρμακα αφού πριν πραγματοποιήσουν την αντιρετροϊκή τους δράση πρέπει πρώτα φωσφορυλιωθούν από κυτταρικές κινάσες [50]. Η δράση τους περιλαμβάνει την αναστολή της αντιγραφής του ιού τερματίζοντας την αυξανόμενη αλυσίδα του ιικού DNA. Ο μηχανισμός έγκειται στην αναστολή του ενζύμου αντίστροφη μεταγραφάση, καθώς η δραστική ομάδα του φαρμάκου προσδένεται στο ενεργό κέντρο του ενζύμου και παρεμποδίζει τη σύνδεση με τα φυσικά νουκλεοτίδια διακόπτοντας έτσι την επιμήκυνση 5'→3' της ιικής αλυσίδας DNA [48] (εικόνα 3). Οι δομές κάποιων από τα φάρμακα που μελετήθηκαν στην εργασία αυτή φαίνονται στην εικόνα 4.



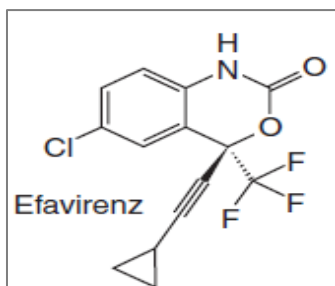
Εικόνα 3: Ο μηχανισμός δράσης των NRTIs.



Εικόνα 4: Οι δομές των αντιρετροϊκών φαρμάκων lamivudine, abacavir, tenofovir και emtricitabine της κατηγορίας των NRTIs και NtRTIs.

II. Μη νουκλεοσιδικά ανάλογα - αναστολείς αντίστροφης μεταγραφάσης (NNRTIs)

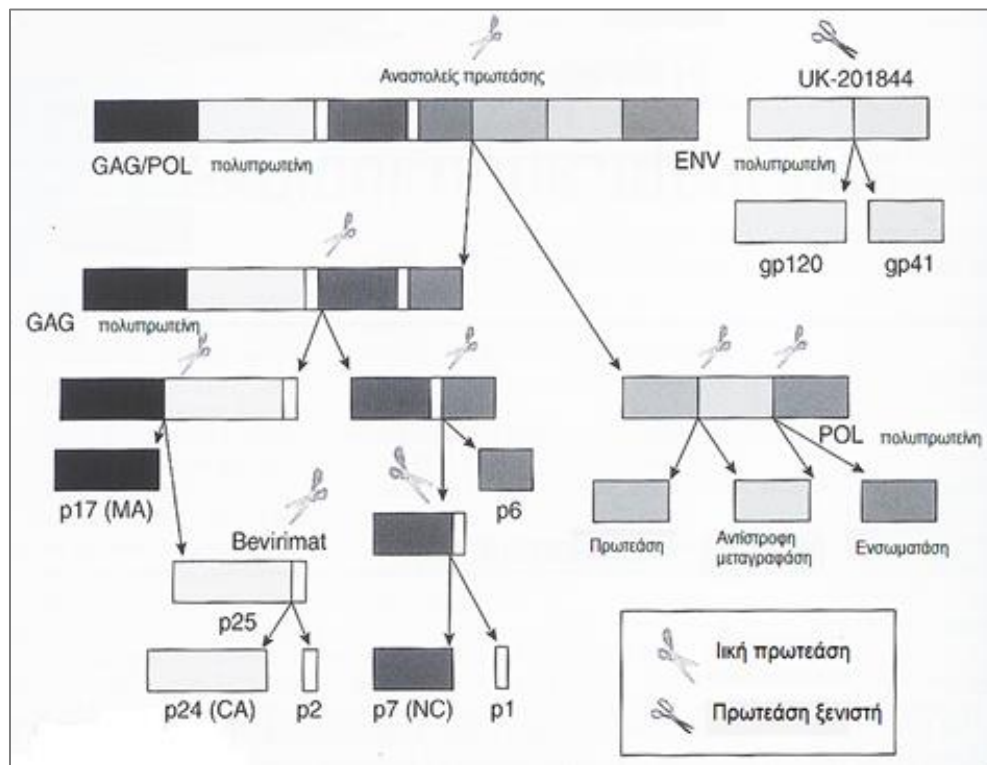
Τα φάρμακα αυτής της κατηγορίας προκαλούν επίσης αναστολή της αντίστροφης μεταγραφάσης, όταν προσδεθούν κοντά και όχι μέσα, στο ενεργό κέντρο του ενζύμου αποτελώντας έτσι αλλοστερικούς αναστολείς [48, 51, 52]. Σε αντίθεση με τους N(t)RTIs που περιγράφηκαν παραπάνω, οι αναστολείς αυτοί δεν λειτουργούν σε άλλους ιούς του γένους των Φακοίων όπως τον HIV-2 και τον SIV [51, 53]. Η δομή του efavirenz, το οποίο μελετήθηκε στην εργασία αυτή, φαίνεται στην εικόνα 5.



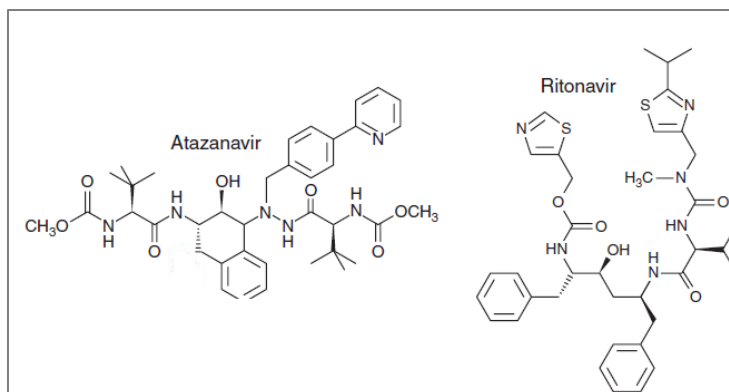
Εικόνα 5: Η δομή του αντιρετροϊκού φαρμάκου efavirenz της κατηγορίας των NNRTIs.

III. Αναστολείς πρωτεασών (PIs)

Οι ιικές πρωτεάσες κόβουν τις πρόδρομες πολυπρωτεΐνες Gag και Gag-Pol κατά τις μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις σε λειτουργικά προϊόντα, ένζυμα και δομικές πρωτεΐνες [48, 54]. Τα φάρμακα της κατηγορίας αυτής είναι μικρά μόρια που μιμούνται το ανάλογο πεπτιδικό υπόστρωμα του ενζύμου, αποτρέποντάς το έτσι από το να τροποποιήσει τις πολυπρωτεΐνες. Αναστέλλοντας λοιπόν τη δράση της πρωτεάσης προκύπτουν μη λειτουργικά μεγαλομοριακά κομμάτια πρωτεϊνών (εικόνα 6). Στην κατηγορία αυτοί ανήκουν επίσης οι αναστολείς ωρίμανσης, δηλαδή αναστέλλουν τη διαδικασία επεξεργασίας της Gag πολυπρωτεΐνης, παρεμποδίζοντας το κόψιμο p24-p2 και καταλήγοντας σε ελλειμματικό ιό. Οι δομές κάποιων από τα φάρμακα που μελετήθηκαν στην εργασία αυτή φαίνονται στην εικόνα 7.



Εικόνα 6: Ο μηχανισμός των PIs.



Εικόνα 7: Οι δομές των αντιρετροϊκών φάρμακων atazanavir και ritonavir της κατηγορίας των PIs.

IV. Αναστολείς ενσωματάσης (integrase)

Το ένζυμο ενσωματάση (integrase) ενσωματώνει το DNA του ιού με αυτό του ξενιστή. Οι αναστολείς ενσωματάσης ανήκουν στην ευρύτερη οικογένεια των πολυνουκλεϊτιδικών τρανσφερασών (ρεκομπινάσες) και αποτρέπουν την ενσωμάτωση αυτή παρεμποδίζοντας έτσι την αντιγραφή του ιού και την προσβολή νέων κυττάρων του ξενιστή [55, 56]. Αποτελεσματική αναστολή προκύπτει όχι μόνο όταν δεν υπάρχει επιτυχημένη ενσωμάτωση του ιικού γονιδιώματος με αυτό του ξενιστή αλλά όταν παρεμποδίζεται η διατήρηση μιας λανθάνουσας κατάστασης του ιού μέσα στο ξενιστή [48].

V. Αναστολείς σύντηξης

Οι αναστολείς αυτοί επιδρούν στη σύντηξη των μεμβρανών ιού και ξενιστή. Χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι το φάρμακο enfuvirtine, το οποίο μιμείται την HR2 περιοχή της gp41 ανταγωνιζόμενο το ιικό HR2 για την πρόσδεση με το HR1 και οδηγεί σε αποτυχημένη σύντηξη [48].

VI. Αναστολείς εισόδου

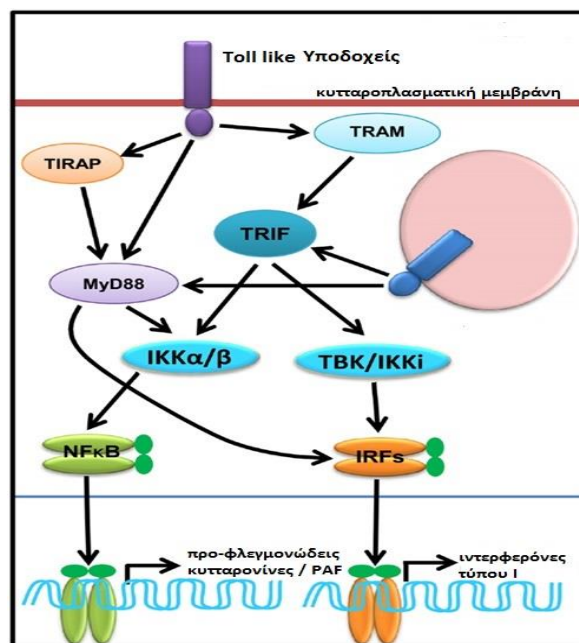
Οι αναστολείς αυτοί, ανάλογα τη δομή τους, παρεμβαίνουν στην πρόσδεση της ιικής gp-120 είτε με τους υποδοχείς των CD4⁺ T κυττάρων, είτε με τους συνυποδοχείς CCR5 ή CXCR4 παρεμποδίζοντας την είσοδο του ιού στο κύτταρο ξενιστή [48].

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2^ο: Η Ανοσολογική Ενεργοποίηση και οι Χρόνιες, μη Συσχετιζόμενες με το AIDS, Εκδηλώσεις στην HIV λοίμωξη

2.1 Ανοσολογική Ενεργοποίηση στην HIV λοίμωξη

Η ικανότητα κάθε ξενιστή να αντιλαμβάνεται την εισβολή ενός παθογόνου παράγοντα και να ενεργοποιεί τους μηχανισμούς άμυνάς του είναι πρωταρχικής σημασίας για την επιβίωσή του [57]. Η αναγνώριση αυτή έγκειται στη δέσμευση του παθογόνου στους Toll-like υποδοχείς (Toll-like Receptors, TLRs) [58] οι οποίοι ανήκουν στο έμφυτο ανοσοποιητικό σύστημα (innate immune system). Πρόκειται για διαμεμβρανικές γλυκοπρωτεΐνες τύπου I και εκφράζονται σε πολλά κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος και των διάφορων ιστών. Υπάρχουν τουλάχιστον 13 τύποι TLRs για να αναγνωρίζουν τα διαφορετικά είδη PAMPs (pathogen associated molecular patterns) των διάφορων παθογόνων [59]. Ο κάθε τύπος ενεργοποιείται από συγκεκριμένες δομές όπως τους λιποπολυσακχαρίτες (LPS), τις τροποποιημένες LDL (modified LDL, mLDL) σαν την οξειδωμένη LDL (ox-LDL) ή τη γλυκοζυλιωμένη LDL (G-LDL) καθώς και την ευρύτερη οικογένεια του Παράγοντα Ενεργοποίησης των Αιμοπεταλίων, PAFs [60, 61]. Για την άμυνα ενάντια των ιών σαν σύνολο συμμετέχουν οι TLR3, 7, 8 και 9 [62] ενώ για τον HIV συγκεκριμένα οι TLR7 και 8 στους οποίους προσδένεται το μονόκλωνο ιικό RNA (single-stranded, ssRNA) [63, 64]. Κατά την HIV λοίμωξη όμως υπάρχουν, εκτός από το μονόκλωνο RNA, και άλλες δομές που προσδένονται και ενεργοποιούν τους TLRs όπως το υβριδικό ιικό DNA (double-stranded DNA, dsDNA) [63] και οι λιποπολυσακχαρίτες (LPS) προερχόμενοι από τη μικροβιακή μετατόπιση (microbial translocation) που αποτελεί ένα από τα τυπικά χαρακτηριστικά της HIV λοίμωξης [65, 66]. Με τον όρο μικροβιακή μετατόπιση εννοείται η μη φυσιολογική διέλευση της μικροχλωρίδας του γαστρεντερικού σωλήνα στην κυκλοφορία του αίματος [67, 68]. Υπό φυσιολογικές συνθήκες τα μικρόβια αυτά και τα παραπροϊόντα τους φαγοκυτταρώνονται από τον οργανισμό. Όμως σε περιπτώσεις αδύναμου ανοσολογικού συστήματος, όπως στην HIV λοίμωξη, η καταστροφή τους καθίσταται αδύνατη [65, 69]. Ενδιαφέρον αποτελεί η συμμετοχή των TLRs στο παράδοξο φαινόμενο των οροαρνητικών που ενώ

εκτίθενται στον ιό μέσω σεξουαλικής επαφής εμφανίζουν αντίσταση σε αυτόν και η διαλεύκανση του οποίου θα μπορούσε να αποτελέσει τον προστατευτικό μηχανισμό ενάντια στη λοίμωξη [67]. Το αποτέλεσμα της ενεργοποίησης των TLRs είναι η στρατολόγηση πρωτεϊνικών παραγόντων, γνωστές ως πρωτεΐνες προσαρμογής (adaptor proteins), μέσω αλληλεπίδρασης με τη δομική περιοχή TIR (Toll/interleukin-1 receptor). Στις πρωτεΐνες αυτές ανήκουν η myD88 (Myeloid differentiation protein 88), η TRIF (Toll-interleukin-1-receptor domain-containing adaptor inducing interferon- β), η TRAM (TRIF related adaptor molecule) και η TIRAP (TIR domain containing adaptor protein). Η πορεία αυτή έχει ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση MAP κινασών (JNK, ERK, p38a) και προ-φλεγμονωδών μεταγραφικών παραγόντων (NF- κ B, IRF, AP1, Elk1) [70]. Από όλα αυτά τα μεταβολικά μονοπάτια περισσότερο μελετημένα και εμπλεκόμενα στην HIV λοίμωξη είναι αυτό των ρυθμιστικών παραγόντων Ιντερφερονών (Interferon Regulatory Factors, IRF) και του πυρηνικού παράγοντα κ B (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells, NF- κ B) το οποίο και θα μας απασχολήσει περισσότερο λόγω του σημαντικού του ρόλου στη φλεγμονή, (εικόνα 8) [63].



Εικόνα 8: Η ανοσολογική ενεργοποίηση μέσω των Toll-like υποδοχέων

2.1.1 Ρυθμιστικοί Παράγοντες Ιντερφερονών (IRF)

Οι ιντερφερόνες (IFN) ανήκουν στην ευρύτερη οικογένεια των κυτταροκινών με κυρίαρχο ρόλο την ικανότητά τους να παρεμβαίνουν (interfere) στη λειτουργία των ιών μέσα στο κύτταρο του ξενιστή [71]. Οι Ρυθμιστικοί Παράγοντες Ιντερφερονών (Interferon Regulatory Factors, IRF) είναι ένα σύστημα εννέα μεταγραφικών παραγόντων (IRF1-9) που παίζει σημαντικό ρόλο στη σύνθεση των ιντερφερονών, πολλών χημειοκινών όπως και πρωτεϊνών που μεσολαβούν στην αντι-ιική, αντι-βακτηριακή και αντι-φλεγμονώδη απόκριση [72, 73]. Καθένας από τους εννιά παράγοντες έχει συγκεκριμένες ιδιότητες ως προς τα γονίδια που εκφράζει αλλά και στο τρόπο που ενεργοποιείται. Στην HIV λοίμωξη οι τύποι IRF-3 και IRF-7 είναι αυτοί που εκφράζουν τα γονίδια *Ifn* αλλά και ενισχύουν το ρόλο των ιντερφερονών που συνθέτουν. Συγκεκριμένα ο ιός ενεργοποιεί τον IRF-3 με συνέπεια τη σύνθεση της $INF\beta$ η οποία με τη σειρά της ενεργοποιεί τον IRF-7 και έτσι συντίθενται η $IFN\alpha$ που ενισχύει τη σύνθεση της $IFN\beta$ [74]. Φαίνεται δηλαδή ότι οι ιντερφερόνες τύπου I ($IFN\alpha$, $IFN\beta$, $IFN\epsilon$ και $IFN\omega$) μονοπωλούν το ενδιαφέρον στην HIV λοίμωξη και ο λόγος είναι οι ποικίλες ιδιότητες τους στην αντιρετροϊκή απόκριση. Όχι μόνο για τις αντιρετροϊκές τους δράσεις αλλά και επειδή σηματοδοτούν τη συσσώρευση των κυττάρων του αμυντικού συστήματος στο σημείο της λοίμωξης και ενισχύουν τη λειτουργία των μακροφάγων, των NK κυττάρων και των B/T λεμφοκυττάρων [71, 73]. Το συνολικό μονοπάτι των IRFs βοηθά άμεσα στην πρώιμη φάση της HIV λοίμωξης με την αντιρετροϊκή δράση των IFNs αλλά και έμμεσα επάγοντας τη βιοσύνθεση προφλεγμονωδών κυτταροκινών.

2.1.2 Το μονοπάτι του NF-κB

Ο NF-κB είναι ένας διμερής μεταγραφικός παράγοντας, υπεύθυνος για την έκφραση πληθώρας γονιδίων. Όσο βρίσκεται στην ανενεργό του κατάσταση είναι δεσμευμένος με την ανασταλτική πρωτεΐνη I-κB και εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα. Μετά την ενεργοποίηση των TLRs, ενεργοποιείται ένα σύμπλεγμα κινασών IKK που φωσφορυλιώνει την ομάδα I-κB η οποία στη συνέχεια ουβικιτυλιώνεται και τελικά αποικοδομείται μέσω ενός μηχανισμού πολλών βημάτων, απελευθερώνοντας τελικά το δραστικό μέρος του NF-κB το οποίο κατευθύνεται προς τον πυρήνα [75-77]. Η

ενεργοποίηση του NF-κΒ, παίζει κεντρικό ρόλο στη φλεγμονή αφού ρυθμίζει την έκφραση γονιδίων που κωδικοποιούν προ-φλεγμονώδεις κυτταροκίνες (TNF-α, IL-6, IL-8), χημειοκίνες, ιντερφερόνες, μόρια προσκόλλησης (adhesion molecules), αυξητικούς παράγοντες, inducible ένζυμα (COX-2), τη συνθάση του νιτρικού οξέος καθώς και τον Παράγοντα Ενεργοποίησης των Αιμοπεταλίων [78] δηλαδή ένα σύνολο παραγόντων που μαζί ορίζουν την οξεία φλεγμονή και έχουν ευεργετική επίδραση στην πρώιμη φάση της HIV λοίμωξης.

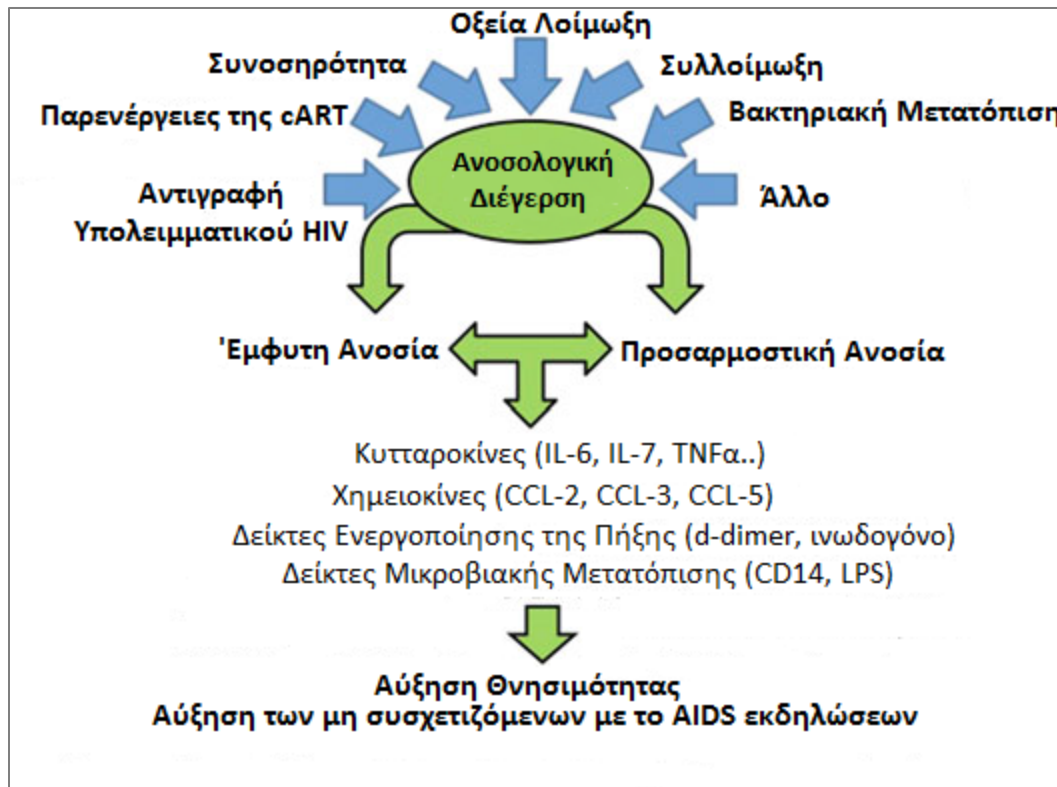
Η έναρξη αντιρετροϊκής αγωγής στο σημείο αυτό επεμβαίνει στην πρώιμη φάση της HIV λοίμωξης, μειώνει δραστικά το ιικό φορτίο, αυξάνει τα CD4⁺ T κύτταρα και ως συνέπεια τα επίπεδα των διάφορων δεικτών φλεγμονής μειώνονται χωρίς όμως να φτάνουν εκείνα του μέσου πληθυσμού. Φαίνεται λοιπόν ότι η ανοσολογική ενεργοποίηση συνεχίζεται σηματοδοτώντας την κατάσταση εμμένουσας φλεγμονής της HIV λοίμωξης με σοβαρές επιπτώσεις [79-81].

2.2 Μη συσχετιζόμενες με το AIDS εκδηλώσεις (non-AIDS morbidities)

Παρόλο που η αντιρετροϊκή αγωγή έχει καταφέρει να καταστείλει το ιικό φορτίο στο μη ανιχνεύσιμο και να επαναφέρει τα περιφερειακά CD4⁺ T κύτταρα, οι HIV ασθενείς συνεχίζουν να έχουν υψηλότερα επίπεδα δεικτών φλεγμονής που χαρακτηρίζουν μια κατάσταση ανοσολογικής διέγερσης και πρόωρης ή αφύσικης ανοσολογικής γήρανσης (immunosenescence) [79, 80, 82]. Ως αποτέλεσμα, εμφανίζονται σε μεγαλύτερη συχνότητα από το μέσο πληθυσμό, θνησιμότητα και μη συσχετιζόμενες με το AIDS, εκδηλώσεις (non-AIDS morbidities) [83-85]. Οι λόγοι της αυξημένης ανοσολογικής διέγερσης είναι η ελλιπής αποκατάσταση του ανοσολογικού συστήματος, η βλάβη κάποιων οργάνων ή ιστών, η αντιγραφή του υπολειμματικού HIV, οι διάφορες συλλοιμώσεις, η μικροβιακή μετατόπιση καθώς και οι παρενέργειες αλλά και οι αλληλεπιδράσεις όλων των παραπάνω με την αντιρετροϊκή αγωγή [80]. Κάποιες από τις εκδηλώσεις της HIV λοίμωξης εμφανίζονται στον πίνακα 3.

Πίνακας 3: Μη συσχετιζόμενες με το AIDS εκδηλώσεις της HIV λοίμωξης

Μη συσχετιζόμενες με το AIDS εκδηλώσεις της HIV λοίμωξης	
Κακοήθειες [86, 87]	Καρκίνος του πνεύμονα [88], του προστάτη [89], του πρωκτού [90], του μαστού [91], Hodgkin λέμφωμα, ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα [92]
Καρδιαγγειακή Νόσος	Αθηροσκλήρωση [93-95], Στεφανιαία Νόσος [96-98], Καρδιακή Δυσλειτουργία [99]
Ασθένειες Νευρολογικής Φύσης	Άνοια [100], Ψυχομετρική Δυσλειτουργία [101]
Αιματολογικές Διαταραχές	Αναιμία [102], Θρομβωτική Θρομβοπενική Πορφύρα [103]
Διαταραχές στα Οστά	Οστεονέκρωση [104], Οστεοπενία [105], Οστεοπόρωση[105]
Μεταβολικές Διαταραχές	Λιποδυστροφία [106], Δυσλιπιδαιμία [107], Διαβήτης τύπου 2 [108], Ανορεξία [109]
Νεφρική Νόσος	Νεφρική Ανεπάρκεια [110], Νεφροπάθεια [111]
Ψυχική Νόσος	Κατάθλιψη [112]



Εικόνα 9: Οι αιτίες της χρόνιας ανοσολογικής διέγερσης και της φλεγμονής στην HIV λοίμωξη

2.2.1 Καρδιαγγειακή νόσος (CVD)

Ανάμεσα σε όλες τις μη συσχετιζόμενες με τον HIV εκδηλώσεις, η καρδιαγγειακή νόσος (cardiovascular disease, CVD) είναι η πιο συχνή. Το λιπιδαιμικό προφίλ των οροθετικών ασθενών πριν από την έναρξη της αγωγής δείχνει ότι η HIV λοίμωξη προκαλεί μείωση της ολικής χοληστερόλης, της HDL, της LDL, και αύξηση των τριγλυκεριδίων [113, 114]. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της μακροχρόνιας έρευνας MACS (Multicenter AIDS Cohort Study), αμέσως μετά την έναρξη της αντιρετροϊκής αγωγής οι τιμές αυτές σταδιακά αυξάνονται και κορυφώνονται στα 2-3 χρόνια εκτός από την HDL η οποία παραμένει σε χαμηλά επίπεδα. Η μακροχρόνια επίδραση των λιπιδίων στον καρδιαγγειακό κίνδυνο και η πιθανή αλληλεπίδραση των αγωγών μείωσης των επιπέδων των λιπιδίων με τις διάφορες αντιρετροϊκές αγωγές είναι ακόμα άγνωστες [115]. Ο μηχανισμός του καρδιαγγειακού κινδύνου παραμένει ακόμα ανεξακρίβωτος [116] φαίνεται όμως να είναι φλεγμονώδους αιτιολογίας [117-

124]. Η μελέτη SMART δείχνει ότι οι ασθενείς σε αντιρετροϊκή αγωγή εμφανίζουν συχνότερα καρδιαγγειακή νόσο [125] ενώ από τη μελέτη FRAM φαίνεται ότι εμφανίζουν πιο συχνά αθηροσκλήρωση [126]. Όσον αφορά στις αντιρετροϊκές αγωγές, οι αναστολείς πρωτεασών αυξάνουν τους κλασικούς παράγοντες κινδύνου (λιπίδια ορού, περίμετρο μέσης) [127-129], προκαλούν βλάβες της ενδοθηλιακής λειτουργίας και εμφανίζουν αθηρογόνες πλάκες [130-132]. Η μελέτη D.A.D. δείχνει εκτός από τους PIs υπεύθυνοι είναι και οι NNRTIs και συγκεκριμένα το efavirenz [133]. Το μεγαλύτερο όμως ενδιαφέρον από τα διάφορα αντιρετροϊκά φάρμακα επικεντρώνεται στο NRTI abacavir διότι η μελέτη D.A.D. το ενοχοποιεί για έμφραγμα μυοκαρδίου σε ασθενείς με υψηλό καρδιαγγειακό κίνδυνο όπως φάνηκε από το Framingham Risk Score [134-136] και επιβεβαιώθηκε από τη μελέτη SMART [137] ενώ επακόλουθες μελέτες δεν βρίσκουν καμία συσχέτιση του abacavir με έμφραγμα μυοκαρδίου [116, 138-142]. Η μελέτη SMART συσχέτισε τον κίνδυνο με τους δείκτες φλεγμονής [143] ενώ η HEAT έδειξε μείωση των δεικτών σε αγωγές με και χωρίς abacavir [144, 145]. Τέλος, μια έρευνα συνέδεσε τον εν λόγω κίνδυνο με αυξημένη ενεργοποίηση αιμοπεταλίων που προκαλείται από τους μεταβολίτες του abacavir [146]. Μπορεί οι έρευνες να μην έχουν ακόμα αποσαφηνίσει τη σχέση του καρδιαγγειακού κινδύνου και της HIV λοίμωξης αλλά η πρόληψη μέσω παρακολούθησης των λιπιδίων του ορού και του δείκτη κινδύνου Framingham Risk Score βρίσκεται πλέον στις οδηγίες. Τα τελευταία χρόνια το ενδιαφέρον έχει στραφεί στη συγχορήγηση φαρμάκων για τη μείωση των λιπιδίων του ορού με κυρίαρχες τις στατίνες [147], τα κατεξοχήν σκευάσματα αντιμετώπισης του καρδιαγγειακού κινδύνου στις οποίες έχουν αποδοθεί και αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες [148]. Τα αποτελέσματα ως προς τη βελτίωση της ενεργοποίησης των T κυττάρων είναι μεν θετικά [149, 150] αλλά ασαφή ως προς το ρόλο τους στη φλεγμονή. Σε κάποιες μελέτες φαίνεται να μειώνουν τους δείκτες CRP, IL-6, και TNFα [151, 152], ενώ σε κάποιες άλλες δεν παρατηρείται κάποια διαφορά στους δείκτες plasminogen-activator inhibitor type 1 (PAI-1, P-selectin και CRP αν και στο λιπιδαιμικό προφίλ είχαν θετική επίδραση [153]. Σίγουρα το είδος κάθε στατίνης που θα χρησιμοποιηθεί παίζει σημαντικό ρόλο [154] και τα υποσχόμενα αυτά δεδομένα θα διευκρινιστούν στο τέλος των μελετών που διεξάγονται ακόμα.

2.2.2 Νεφρική νόσος

Η νεφρική νόσος είναι πιο συχνή στους οροθετικούς ασθενείς σε σχέση με το μέσο πληθυσμό, αποτελεί μία από τις γνωστές εκδηλώσεις της HIV λοίμωξης [155-158] και πολλές ερευνητικές μελέτες την έχουν συσχετίσει με την εξέλιξη σε νόσο του AIDS και με τη θνησιμότητα [159-162]. Η είσοδος του ιού στα νεφρικά επιθηλιακά κύτταρα παραμένει μυστήριο καθώς τα κύτταρα αυτά δεν εκφράζουν ούτε το μόριο CD4 στη μεμβράνη τους, ούτε τους συνυποδοχείς CXCR4 ή CCR5 [163, 164]. Η φλεγμονή που χαρακτηρίζει την HIV λοίμωξη και οι φλεγμονώδεις παράγοντες που επάγονται από το μονοπάτι του NF-κΒ φαίνεται να μεσολαβούν στη νεφρική νόσο που παρατηρείται στους οροθετικούς ασθενείς [165]. Παράγοντες κινδύνου είναι ο διαβήτης, η υπέρταση, η ηλικία, το ιστορικό, η συλλοίμωξη με ηπατίτιδα C όπως και το υψηλό ιικό φορτίο σε συνδυασμό με τα χαμηλά CD4⁺ T κύτταρα [159]. Γενικά η έναρξη αντιρετροϊκής αγωγής βελτιώνει τη νεφρική λειτουργία [166, 167] αλλά κάποιες μεμονωμένες περιπτώσεις φαρμάκων έχουν συσχετιστεί με τον κίνδυνο νεφρικής νόσου [168]. Το tenofovir-DF είναι αυτό που έχει ενοχοποιηθεί περισσότερο ανάμεσα στα άλλα φάρμακα [169] και συγκεκριμένα της κατηγορίας NRTIs [170]. Οι έρευνες δείχνουν ότι όταν το tenofovir-DF συνδυαστεί με αναστολείς πρωτεασών Ritonavir-boosted (PIs-r) αυξάνεται η τοξικότητά του και μάλιστα περισσότερο σε συνδυασμό με τη χρήση του atazanavir [171, 172]. Η συχνή παρακολούθηση της νεφρικής λειτουργίας των ασθενών μέσω των βιοχημικών δεικτών της κρεατίνης και της ουρικής πρωτεΐνης σε συνδυασμό με την έγκαιρη και μη νεφρο-τοξική αντιρετροϊκή αγωγή θα μειώσει κατά πολύ την εμφάνιση της νεφρικής νόσου ως μιας από τις μη συσχετιζόμενες με το AIDS εκδηλώσεις.

2.2.3 Κακοήθειες

Στα μέσα της δεκαετίας του '90 που εμφανίστηκε η αντιρετροϊκή αγωγή τα είδη των κακοηθειών που εμφανίζονται στους HIV ασθενείς μετατράπηκαν από συσχετιζόμενες με το AIDS (AIDS-defining cancers) σε μη συσχετιζόμενες με το AIDS (non-AIDS-defining cancers). Έτσι το σάρκωμα Kaposi και το non-Hodgkin λέμφωμα έδωσαν τη θέση τους σε καρκίνο του πνεύμονα, προστάτη, ήπατος και στο Hodgkin λέμφωμα [173-177]. Ένας από τους βασικούς λόγους είναι η αύξηση του

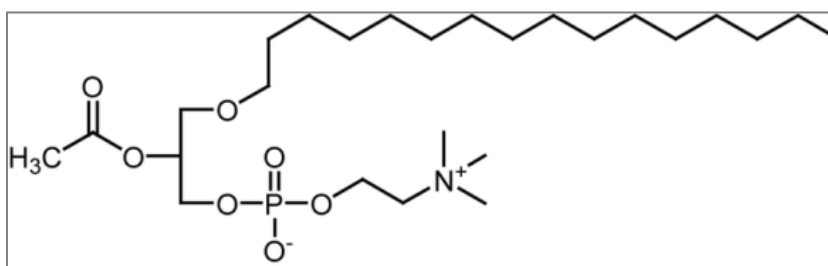
προσδόκιμου ζωής των ασθενών, που όπως και στο μέσο πληθυσμό, η αύξηση της ηλικίας συσχετίζεται με την εμφάνιση διάφορων μορφών καρκίνου [178]. Παράγοντες κινδύνου σε αυτούς τους ασθενείς μπορούν να θεωρηθούν οι διάφοροι ιοί όπως ο Ιός των Ανθρωπίνων Θηλωμάτων (Human Papillomavirus, HPV) [179], ο Ιός της Ηπατίτιδας C (Hepatitis C Virus, HCV) [180], ο Ιός της Ηπατίτιδας B (Hepatitis B Virus, HBV) [180] και ο σχετικός με το σάρκωμα Kaposi Ερπητοϊός (Kaposi sarcoma-associated herpes virus) [181], όπως επίσης το κάπνισμα [182] και το αλκοόλ [183]. Υπό κανονικές συνθήκες το ανοσολογικό σύστημα προστατεύει τον οργανισμό μέσω των διάφορων αντικαρκινικών μηχανισμών που διαθέτει [184]. Στην περίπτωση HIV λοίμωξης η χρόνια ανοσολογική διέγερση, η φλεγμονή και το οξειδωτικό στρες όχι μόνο δεν επιτρέπουν στο ανοσοποιητικό σύστημα να προλάβει μια καρκινογένεση αλλά αντιθέτως δημιουργεί και το υπόβαθρο για την εξέλιξή της [185, 186]. *In vitro* και *in vivo* μελέτες δείχνουν ότι πολλές κατηγορίες αντιρετροϊκών φαρμάκων έχουν αντικαρκινικές ιδιότητες (PIs, NRTIs, NNRTIs) [187-190], αλλά έχουν σημειωθεί και περιπτώσεις αντιρετροϊκών με καρκινογόνο δράση (NNRTIs, CCR5 ανταγωνιστές, AZT) [191-193], ενώ κάποιες άλλες έρευνες δεν βρίσκουν καμία επίδραση των αντιρετροϊκών στο κίνδυνο καρκινογένεσης [194, 195]. Τα ερευνητικά ευρήματα συγκλίνουν στην άποψη ότι η έγκαιρη έναρξη αντιρετροϊκής αγωγής με αντικαρκινικές και αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες θα μπορέσουν να μειώσουν τις εκδηλώσεις κακοηθειών κατά την HIV λοίμωξη.

Συμπερασματικά, η HIV λοίμωξη έχει πλέον χαρακτηριστεί με τη χρόνια ανοσολογική διέγερση και τη φλεγμονή. Παρόλα αυτά η διεθνής βιβλιογραφία δεν αναφέρει τη σχέση της με τον κατεξοχήν μεσολαβητή της φλεγμονής, τον Παράγοντα Ενεργοποίησης των Αιμοπεταλίων, ο οποίος έχει συσχετιστεί με την παθογένεια όλων των προαναφερθέντων μη συσχετιζόμενων με το AIDS εκδηλώσεων.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3^ο: Μεσολαβητές της Φλεγμονής - Ο Παράγοντας Ενεργοποίησης των Αιμοπεταλίων και οι Κυτταροκίνες

3.1 Ο Παράγοντας Ενεργοποίησης των Αιμοπεταλίων (PAF)

Ο Παράγοντας Ενεργοποίησης των Αιμοπεταλίων (Platelet Activating Factor – PAF) αποτελεί τον ισχυρότερο φλεγμονώδη παράγοντα και έχει χαρακτηριστεί ως μια μοναδική και δραστική τάξη λιποειδικών χημικών μεσολαβητών ενώ θεωρείται ένας πρωτόγονος και παγκόσμιος κυτταρικός βιορυθμιστής [196-198]. Πήρε το όνομά του από τη συσσωρευτική δράση που προκαλεί στα αιμοπετάλια αν και τώρα η περιγραφική αυτή ονομασία δεν είναι ακριβής λόγω του ευρέος φάσματος δράσης που έδειξε στην πορεία ότι έχει [199, 200]. Ο PAF είναι ο κύριος εκπρόσωπος των γλυκεναιθερικών φωσφολιποειδικών μορίων με δομή 1-Ο-ακετυλο-*sn*-γλυκερο-3-φωσφατιδυλο χολίνη [196], (εικόνα 10).



Εικόνα 10: Η δομή του Παράγοντα Ενεργοποίησης των Αιμοπεταλίων (PAF).

Η δομή του μορίου έχει δύο ιδιαίτερα χαρακτηριστικά τα οποία έχουν σαφώς άμεση σχέση με τη δραστηριότητά του [196, 201, 202]. Συγκεκριμένα, στην πρώτη θέση του σκελετού της γλυκερόλης είναι δεσμευμένο με αιθερικό δεσμό ένα λιπαρό οξύ, συνήθως 16-18 ατόμων άνθρακα, με αιθερικό δεσμό. Αν και τα περισσότερα αιθερικά λιπίδια αντικαταστάθηκαν από τα εστερικά ανάλογά τους κατά την εξέλιξη, στον PAF ο αιθερικός δεσμός παρέμεινε λόγω της υψηλής βιολογικής του αξίας δίνοντας στο μόριο μεγάλη σταθερότητα και αποδεικνύοντας την αρχέγονη καταγωγή του [203]. Το δεύτερο χαρακτηριστικό είναι το εστεροποιημένο οξικό οξύ

στη δεύτερη θέση, κάτι επίσης σπάνιο, καθώς τα φωσφολιποειδή συνήθως είναι κυρίως εστεροποιημένα με λιπαρά οξέα μακριάς αλυσίδας. Αν και στην αρχή οι ερευνητές πίστευαν ότι πρόκειται για μια μοναδική δομή, στη συνέχεια κατέληξαν στην ύπαρξη μιας οικογένειας μορίων PAF με κύριο εκπρόσωπο το παραπάνω μόριο. Στην οικογένεια αυτή ανήκουν διάφορα μοριακά ανάλογα του PAF (PAF-like lipids) με παρόμοια ή μικρότερη, αλλά ποτέ μεγαλύτερη, βιολογική δραστικότητα. Τα μόρια αυτά μπορεί να διαφέρουν στο δεσμό και στο είδος της λιπαρής αλυσίδας στην *sn*-1 θέση του γλυκερινικού σκελετού είτε στο λιπαρό οξύ που είναι εστεροποιημένο στην *sn*-2 θέση είτε στο είδος της βάσης στην *sn*-3 θέση [204-209]. Σε πολλές περιπτώσεις υπάρχουν μόρια στη φύση με PAF δράση η οποία δεν μπορεί να αποδοθεί ούτε στο ίδιο το μόριο αλλά ούτε σε κάποιο μοριακό του ανάλογο. Η έρευνα γύρω από το θέμα αυτό κατέληξε στο συμπέρασμα ότι υπάρχουν μόρια διαφορετικής δομής αλλά παρόμοιας δραστικότητας με τον PAF (PAF-like activity) [210].

3.1.1 Κυτταρικές πηγές, δράσεις και PAF υποδοχέας

Ο PAF συντίθεται σε ζωικούς οργανισμούς, σε φυτικά κύτταρα, σε κατώτερους ζωικούς οργανισμούς, σε μονοκύτταρους ευκαρυωτικούς όπως και σε προκαρυωτικούς οργανισμούς επιβεβαιώνοντας έτσι τη δράση του ως αρχέγονος βιολογικός ρυθμιστής [211]. Στον άνθρωπο συντίθεται κυρίως σε ευκαρυωτικά κύτταρα τα οποία σχετίζονται με φλεγμονώδεις και αλλεργικές καταστάσεις, όπως τα ουδετερόφιλα, τα βασεόφιλα, τα ηωσινόφιλα, τα μονοκύτταρα και μακροφάγα, τα αιμοπετάλια, τα ενδοθηλιακά όπως και στα κύτταρα των περισσότερων ιστών κυρίως του νεφρού [212, 213].

Διαθέτει ευρύ φάσμα δράσεων με φυσιολογικό και παθολογικό ρόλο εμφανίζοντας τις παθοφυσιολογικές του δράσεις συνήθως σε συγκεντρώσεις της τάξης των 10^{-9} M ενώ μπορεί να φτάσει ακόμα και στο 10^{-12} M. Ο παραγόμενος PAF μπορεί να δράσει με διάφορους τρόπους όπως: αυτοκρινώς, πάνω στα κύτταρα που παράχθηκε ή παρακρινώς, στα γειτονικά ίδιου ή διαφορετικού είδους. Σε άλλη περίπτωση ενσωματώνεται στην πλασματική μεμβράνη του κυττάρου από το οποίο παράχθηκε και δρα ως διακυτταρικός μεσολαβητής ενεργοποιώντας γειτονικά κύτταρα, είτε

παραμένει στα κύτταρα και δρα ως ενδοκυτταρικός μεσολαβητής. Σύμφωνα με τα παραπάνω λοιπόν πρόκειται για ένα μόριο-σήμα, όχι μόνο τοπικής δράσης αλλά και μακριά από το σημείο βιοσύνθεσής του, δρώντας κατά κάποιο τρόπο ως ορμόνη [211, 214].

Ο PAF, σε αντίθεση με τα άλλα φωσφολιποειδή, ασκεί τη δράση του μέσω δέσμευσης στον ειδικό υποδοχέα του (PAF-R) που βρίσκεται στην πλασματική μεμβράνη πολλών κυττάρων. Ο υποδοχέας έχει κλωνοποιηθεί και η δομή του περιλαμβάνει 7 διαμεμβρανικές περιοχές με δομή α-έλικας, χαρακτηριστικό των υποδοχέων που συνδέονται με G πρωτεΐνες (GPCR) [215-218]. Κατά τη σύνδεση του PAF στον υποδοχέα του σηματοδοτείται ένας καταρράκτης αντιδράσεων που μετατρέπει το μήνυμα του PAF σε κυτταρική απόκριση [197, 219].

3.1.2 Αναστολείς του PAF

Υπάρχουν πολλά μόρια που δρουν ως αναστολείς του PAF με υποσχόμενα αποτελέσματα στην κλινική πράξη οι οποίοι μπορούν να διακριθούν στους ειδικούς και στους μη ειδικούς [220-224].

Οι ειδικοί αναστολείς δρουν ανταγωνιζόμενοι τη σύνδεση του PAF με τον υποδοχέα του και χωρίζονται στους φυσικούς και στους συνθετικούς [221, 225-227]. Στους φυσικούς αναστολείς ανήκει η κυριότερη και πιο μελετημένη ομάδα αναστολέων, τα γκινγκολίδια προερχόμενα από το Κινέζικο δέντρο *Ginkgo biloba* με κύριο εκπρόσωπό τους, και ισχυρότερο αναστολέα του PAF, το BN-52021. Εκχύλισμα του αναστολέα αυτού χρησιμοποιείται ευρέως για ενδυνάμωση της μνήμης σε περιπτώσεις άνοιας ή Alzheimer [228, 229]. Φυσικοί PAF αναστολείς υπάρχουν επίσης σε πολλά τρόφιμα της Μεσογειακής Δίαιτας [230], όπως το ελαιόλαδο και τα παράγωγά του [231-234], το κρασί [235-238], το γιαούρτι [239], το γάλα [239], το ψάρι [240, 241], κα. Οι συνθετικοί αναστολείς του PAF έχουν κυρίως παραχθεί για φαρμακευτική χρήση [222, 224] με περισσότερο διαδεδομένη τη ρουπαταδίνη για την καταπολέμηση της ρινίτιδας που αποτελεί το πρώτο φάρμακο-αναστολέα του PAF [242].

3.1.3.1 Η εξ' υπαρχής πορεία βιοσύνθεσης (*De Novo* πορεία)

Η *de novo* πορεία είναι υπεύθυνη για τη διατήρηση των φυσιολογικών επιπέδων PAF στον οργανισμό αλλά φαίνεται να εμπλέκεται και στις χρόνιες φλεγμονές. Η πορεία περιλαμβάνει μια σειρά αντιδράσεων με τελικό στάδιο τη μεταφορά μιας ομάδας φωσφοχολίνης από τη CDP-χολίνη, στην *sn*-3 θέση της αλκυλοακετυλογλυκερόλης. Το βήμα αυτό καταλύεται από την ανεξάρτητης σε διθειοθρεϊτόλη (DTT) φωσφοχολινοτρανσφεράση του PAF (Dithiothreitol (DTT) insensitive CDP-choline: alkylacetyl glycerol cholinephosphotransferase, PAF-CPT, EC 2.7.8.16) που θεωρείται και το ρυθμιστικό ένζυμο-κλειδί της πορείας [245-247].

3.1.3.2 Η πορεία αναδιαμόρφωσης (*remodeling* πορεία)

Η πορεία αναδιαμόρφωσης ενεργοποιείται κυρίως ως άμεση απόκριση σε καταστάσεις οξείας φλεγμονής. Στην ταχεία αυτή πορεία ουσιαστικά αναδιαμορφώνονται τα γλυκεριναιθερικά φωσφολιποειδή που προϋπάρχουν στις μεμβράνες των κυττάρων και μετατρέπονται σε PAF. Το ένζυμο-κλειδί της πορείας είναι η lyso-PAF ακετυλοτρανσφεράση (lyso-PAF acetyltransferase, lyso-PAF-AT, EC 2.3.1.67) που καταλύει το τελικό στάδιο της πορείας αναδιαμόρφωσης δηλαδή τη μεταφορά της ακετυλο-ομάδας από το ακετυλο-συνένζυμο Α στην *sn*-2 θέση του lyso-PAF [248, 249].

3.1.3.3 Αποικοδόμηση PAF

Η αποικοδόμηση του PAF ουσιαστικά έγκειται στην απομάκρυνση της ακετυλομάδας από την *sn*-2 θέση του σκελετού της γλυκερόλης προς παραγωγή του lyso-PAF. Η υδρόλυση αυτή πραγματοποιείται μέσω μιας PAF-ειδικής ακετυλοϋδρολάσης (PAF acetylhydrolase, PAF-AH, EC 3.1.1.47). Υπάρχουν πολλές ισομορφές του ενζύμου στα διάφορα κύτταρα και ιστούς όπως και στο πλάσμα γνωστή ως λιποπρωτεϊνική φωσφολιπάση A2 (lipoprotein-associated Phospholipase A2, Lp-PLA2) η οποία κυκλοφορεί δεσμευμένη με τις λιποπρωτεΐνες χαμηλής και υψηλής πυκνότητας, LDL και HDL [250-257].

3.1.4 Ο PAF στην HIV λοίμωξη

Η πρώτη θεωρία για την εμπλοκή του PAF στην HIV λοίμωξη τον καθιστούσε κυτταρικό μεσολαβητή στην έκφραση του ιικού γονιδιώματος [258]. Στην πορεία φάνηκε ότι η ιική λειτουργική πρωτεΐνη Tat επάγει τη σύνθεση του PAF [259-263] και ενεργοποιεί τα αιμοπετάλια [264]. Οι Arese et al. περιέγραψαν την ενεργοποίηση της σύνθεσης του PAF από την Tat μέσω της ενεργοποίησης του υποδοχέα-1 του VEGF (VEGFR-1) [265] καθώς η δομική ομοιότητά της Tat με τον VEGF της επιτρέπει να προσδένεται στον υποδοχέα του και μέσω αυτού να εκφράζει τις δράσεις της στα κύτταρα του ξενιστή [266]. Η Tat έχει πλειοτροπικές δράσεις ανάμεσα στις οποίες είναι η trans ενεργοποίηση των HIV γονιδίων [23] με σκοπό την επέκταση της HIV λοίμωξης. Έκπληξη προκάλεσε η ανακάλυψη της εξωκυτταρικά [23, 267], γεγονός που συνδέθηκε με τις χημειοτακτικές δράσεις της επί των λευκοκυττάρων, την αγγειακή διαπερατότητα, την αγγειογένεση, τη μετανάστευση μονοκυττάρων και μακροφάγων, την απόπτωση καθώς και τον κυρίαρχο ρόλο της στην επαγωγή πληθώρας προ-φλεγμονωδών παραγόντων [259, 260, 262, 265]. Ο PAF λοιπόν, πέραν της μεσολάβησης του στις δράσεις της Tat, συνδέθηκε με διάφορες βλάβες του κεντρικού νευρικού συστήματος που παρουσιάζονται στην HIV λοίμωξη, με κύριο εκπρόσωπο την άνοια του AIDS, ενώ χαρακτηρίστηκε και ως νευροτοξίνη [268-276]. Σε μία από αυτές τις περιπτώσεις, *in vitro* πειράματα σε κυτταρικές σειρές HIV ασθενών δείχνουν ότι τα αυξημένα επίπεδα PAF και TNFα, μειώθηκαν όταν προ-επωάστηκαν με PAF-AH ή αναστολείς του PAF και συνετέλεσαν ευεργετικά στην άνοια του AIDS [277]. Αναστολείς του PAF που έχουν χρησιμοποιηθεί σε αυτές τις περιπτώσεις, με πρώτο το lexipafant [278], δίνουν υποσχόμενα αποτελέσματα στην αντιμετώπιση των μη συσχετιζόμενων με το AIDS εκδηλώσεων και τονίζουν τη σημασία ανάπτυξης αντιρετροϊκών φαρμάκων με αντιφλεγμονώδεις δράσεις [279-289]. Πέραν του PAF, η πρωτεΐνη Tat επάγει την έκκριση κυτταροκινών όπως την IL-6 [290, 291] και τον TNF [292, 293] που με τη σειρά του επάγει την ενεργοποίηση του NF-κΒ [293]. Η διαταραχή αυτή στην έκκριση φλεγμονωδών παραγόντων προκαλεί τη δυσλειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος, οδηγεί σε χρόνια φλεγμονή η οποία σχετίζεται με το κυτταρικό θάνατο και την εξέλιξη της νόσου.

3.1.5 Η σχέση του PAF με την ανοσολογική διέγερση και τις εκδηλώσεις της HIV λοίμωξης

Κατά την HIV λοίμωξη τα μονοκύτταρα και τα μακροφάγα αποτελούν τους κύριους στόχους του ιού κατά την HIV λοίμωξη και εκκρίνουν στο πλαίσιο της φλεγμονώδους απόκρισης διάφορες κυτταροκίνες και αυτακοειδή, όπως και PAF [294-296]. Η σχέση TNF α , PAF και VEGF είναι δυναμική καθώς το κάθε μόριο επάγει και την έκκριση του άλλου και *vice versa* [297-301]. Όπως αναφέρθηκε και στο προηγούμενο κεφάλαιο, κατά την HIV λοίμωξη ο ιός ή οι λιποπολυσακχαρίτες που προήλθαν από τη μικροβιακή μετατόπιση είναι σε θέση να προσδεθούν στους TLRs και να ξεκινήσει ένας φλεγμονώδης καταρράκτης με συνέπεια τη βιοσύνθεση πληθώρας φλεγμονωδών παραγόντων ανάμεσα στους οποίους συγκαταλέγεται και ο PAF. Ο PAF δρα μέσω του υποδοχέα του που είναι συνδεδεμένος με G πρωτεΐνες και ενεργοποιεί ένα μονοπάτι μεταγωγής σήματος το οποίο έχει σε πολλές περιπτώσεις προστατευτικό ρόλο για το έμφυτο ανοσοποιητικό σύστημα [302]. Υπό φυσιολογικές συνθήκες τα επίπεδα του PAF βρίσκονται κάτω από αυστηρό ενζυμικό έλεγχο κάτι το οποίο δεν συμβαίνει σε περιπτώσεις χρόνιας ανοσολογικής διέγερσης όπως στην HIV λοίμωξη. Ενδιαφέρον αποτελεί η σχέση του υποδοχέα της ευρύτερης οικογένειας των μορίων PAF και των TLRs, οι οποίοι φαίνεται να μοιράζονται κοινές σηματοδοτικές πορείες και να δρουν συμπληρωματικά τρόπον τινά. Πράγματι, ο PAF μπορεί να προσδεθεί στους TLRs και να επάγει έτσι εκ νέου παράγοντες φλεγμονής, αλλά και ο υποδοχέας του PAF μπορεί να ενεργοποιηθεί και να προκαλέσει σηματοδότηση της φλεγμονής μέσω άλλων μορίων εκτός του PAF όπως το λιποτειχοϊκό οξύ (LTA) και οι διάφοροι λιποπολυσακχαρίτες. Ο PAF λοιπόν φαίνεται να έχει ένα διπλό ρόλο. Στην οξεία φλεγμονή, προκαλούμενη από τον ιό, δρα ως αντι-φλεγμονώδης παράγοντας καθώς δεσμεύεται στους TLRs και αναστέλλει, το επαγόμενο από τον ιό, μονοπάτι του NF- κ B παρεμποδίζοντας τη δέσμευση των ιικών παραγόντων στους TLRs [303]. Από την άλλη όμως, αν δεν διευθετηθεί η παραγωγή του λόγω της ανεπάρκειας κατάλληλων μηχανισμών ρύθμισης της φλεγμονής, δρα ως φλεγμονώδης παράγοντας μέσω του μονοπατιού NF- κ B, παράγει συνεχώς φλεγμονώδεις παράγοντες και οδηγεί σε χρόνια φλεγμονή [304].

3.2 Οι κυτταροκίνες

Οι κυτταροκίνες είναι πρωτεΐνες μικρού μοριακού βάρους, συχνά γλυκοζυλιωμένες, με κυρίαρχο διαβιβαστικό ρόλο στην κυτταρική επικοινωνία του ανοσοποιητικού συστήματος. Διαθέτουν ένα ευρύ φάσμα δράσεων σε ιστούς και βιολογικά συστήματα καθώς και σημαντικό ρόλο στη φλεγμονή [305, 306]. Στην ευρύτερη οικογένεια των κυτταροκινών ανήκουν οι «ιντερλευκίνες» οι οποίες παράγονται από τα λευκοκύτταρα και δρουν κυρίως σε αυτά. Ο όρος κυτταροκίνες περιλαμβάνει επίσης τις ιντερφερόνες (Interferons, IFNs), τον παράγοντα νέκρωσης των όγκων (Tumor Necrosis Factor, TNF), τον τροποποιητικό αυξητικό παράγοντα (Transforming Growth Factor, TGF) και τους παράγοντες πολλαπλασιασμού των αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων (Colony Stimulation Factors, CSFs) [70]. Αν και δομικά μοιάζουν μεταξύ τους, μπορούν να διαιρεθούν σε διάφορες τάξεις ανάλογα τη λειτουργία τους, έτσι ανάλογα την απόκριση τους στη φλεγμονή, μπορούν να είναι αντι-φλεγμονώδεις ή προ-φλεγμονώδεις [307] ενώ ανάλογα το είδος Τ-βοηθητικού κυττάρου που τις παράγει μπορεί να είναι τύπου Th-1 (INF-g, TNF-a, TNF-b, IL-2, IL-6, IL-12) ή τύπου Th-2 (IL-1, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13) [308]. Ο ρόλος τους είναι παθοφυσιολογικός καθώς συμμετέχουν τόσο στην κυτταρική ανοσία όσο και στις φυσιολογικές μεταβολικές διεργασίες [309, 310]. Λειτουργούν μέσω πρόσδεσης σε ένα συγγενή υποδοχέα που οδηγεί σε ένα καταρράκτη αντιδράσεων με τελικό βήμα τις διάφορες κυτταρικές αλλαγές [311]. Η δράση των κυτταροκινών μπορεί να είναι αυτοκρινής, ενδοκρινής ή παρακρινής ενώ μεταξύ τους δρουν ανταγωνιστικά, προσθετικά ή συνεργικά. Πολλά είδη κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος (μονοκύτταρα, μακροφάγα, Τ-λεμφοκύτταρα) συνθέτουν κυτταροκίνες ανάλογα με τη ζήτηση του οργανισμού και έτσι μπορεί να παρατηρηθεί συχνά μια έκρηξη έκκρισης [309]. Στον όρο κυτταροκίνη υπάγεται και ο Αγγειακός Ενδοθηλιακός Αυξητικός Παράγοντας (VEGF). Στην πραγματικότητα ο όρος VEGF περιλαμβάνει μια ευρεία οικογένεια μορίων (VEGF-A, PlGF, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E και sVEGF) που λειτουργούν έχοντας παθολογικές και φυσιολογικές δράσεις [218]. Ο φυσιολογικός του ρόλος έγκειται σε περιπτώσεις αγγειογένεσης, όπως τη δημιουργία νέων ιστών και τη μεταφορά του αίματος [219]. Σε παθολογικές συνθήκες δρα ως προ-φλεγμονώδης παράγοντας και ενεργοποιείται από πληθώρα ερεθισμάτων

όπως τις διάφορες κυτταροκίνες και το οξειδωτικό στρες επάγοντας αγγειογένεση [220]. Στις περιπτώσεις αυτές εμφανίζει χημειοτακτικές ιδιότητες επί των λευκοκύτταρων [220] και επάγει μια ποικιλία μεσολαβητών της φλεγμονής, όπως κυτταροκίνες, μόρια προσκόλλησης αλλά και PAF [221]. Στην οξεία φάση της φλεγμονής ο VEGF προκαλεί υπέρμετρη αγγειογένεση και συνδέεται με την καρδιαγγειακή νόσο, τον καρκίνο και πολλές παθολογικές καταστάσεις φλεγμονώδους αιτιολογίας [222, 223]. Τα τελευταία χρόνια απασχολούν ιδιαίτερα την επιστημονική και ιδιαίτερα την ιατρική κοινότητα καθώς έχουν ρόλο διαγνωστικό, προγνωστικό αλλά και θεραπευτικό σε πολλές ασθένειες.

3.2.1 Ο ρόλος κυτταροκινών στην HIV λοίμωξη

Τα μονοκύτταρα και τα μακροφάγα αποτελούν τους κύριους στόχους του ιού και ως απόκριση εκκρίνουν τις διάφορες κυτταροκίνες όπως αναφέρθηκε στο εδάφιο 2.1 μέσω της ενεργοποίησης των Toll-like υποδοχέων. Στη συνέχεια παρατίθενται κάποιες από τις κυτταροκίνες που εμπλέκονται στην HIV λοίμωξη και μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία.

- **TNF α**

Κατά την HIV λοίμωξη τα διάφορα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος, κυρίως μακροφάγα, αυξάνουν την παραγωγή της προ-φλεγμονώδους κυτταροκίνης TNF α στην αρχή της οξείας φάσης της φλεγμονής [312]. Έπειτα η κυτταροκίνη αυτή με τη σειρά της επάγει τη σύνθεση των IL-6 και IL-8 [313] για να ασκήσουν βοηθητικό ρόλο αλλά και της αντι-φλεγμονώδους IL-10 ώστε να εμποδίσει την περαιτέρω φλεγμονή αναστέλλοντας τη δράση του TNF α [314, 315]. Παράλληλα ασκεί και παθολογική δράση αφού ενεργοποιεί τον παράγοντα NF- κ B διεγείροντας την απόπτωση των T λεμφοκυττάρων [316]. Συνήθως ο TNF α έχει θετική συσχέτιση με το ιικό φορτίο και συνδέεται με διάφορα συμπτώματα της HIV λοίμωξης. Ενώ λοιπόν έχει ωφέλιμη δράση κατά την έναρξη της φλεγμονής τα επίπεδά του πρέπει να βρίσκονται υπό έλεγχο, κάτι που έχει καταφέρει η αντιρετροϊκή αγωγή.

- **Ιντερλευκίνες (IL-1β, IL-6, IL-8, IL-12p70 και IL-10)**

Οι IL-1β, IL-6, IL-8 και IL-12p70 είναι προ-φλεγμονώδεις κυτταροκίνες και κατά την HIV λοίμωξη βρίσκονται αυξημένες στην έναρξη της φλεγμονώδους διαδικασίας. Συγκεκριμένα, η IL-1β θεωρείται ένας μεσολαβητής τόσο της οξείας όσο και της χρόνιας φλεγμονής που η αύξησή της και επάγει την παραγωγή άλλων κυτταροκινών (IL-6, IL-8 TNFα) [317]. Η IL-6 και η IL-12p70 συμμετέχουν στις διεργασίες της οξείας φάσης ενώ η IL-8 φαίνεται να έχει περισσότερο βοηθητικό, παρά κυρίαρχο, ρόλο στην όλη διαδικασία [318]. Αντίθετα, η IL-10 είναι μια αντι-φλεγμονώδης κυτταροκίνη η οποία παράγεται σε μια δεύτερη φάση της λοίμωξης μετριάζοντας τα επίπεδα των προ-φλεγμονωδών κυτταροκινών [319].

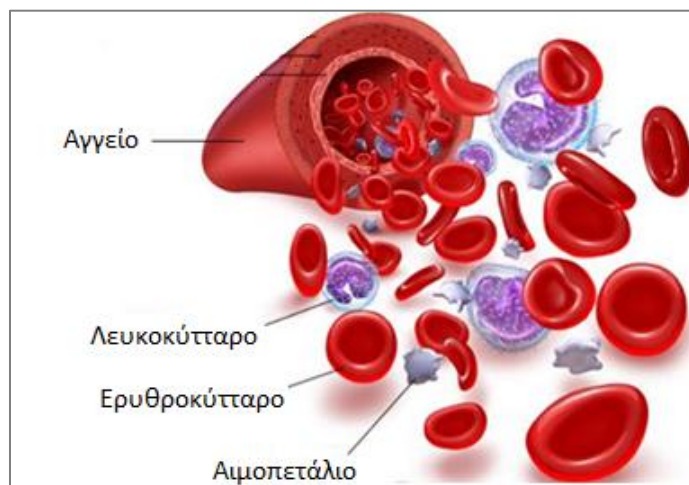
- **Αγγειακός Ενδοθηλιακός Αυξητικός Παράγοντας (VEGF)**

Τα αυξημένα επίπεδα προφλεγμονωδών κυτταροκινών επάγουν τη βιοσύνθεση του VEGF στην HIV λοίμωξη. Συγκεκριμένα έχει βρεθεί να αυξάνονται επίπεδα του στο πλάσμα ασθενών με σάρκωμα Kaposi [320, 321] αλλά και σε ασθενείς με HIV εγκεφαλοπάθεια (HIVE) [322].

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4^ο: Ερυθροκύτταρα

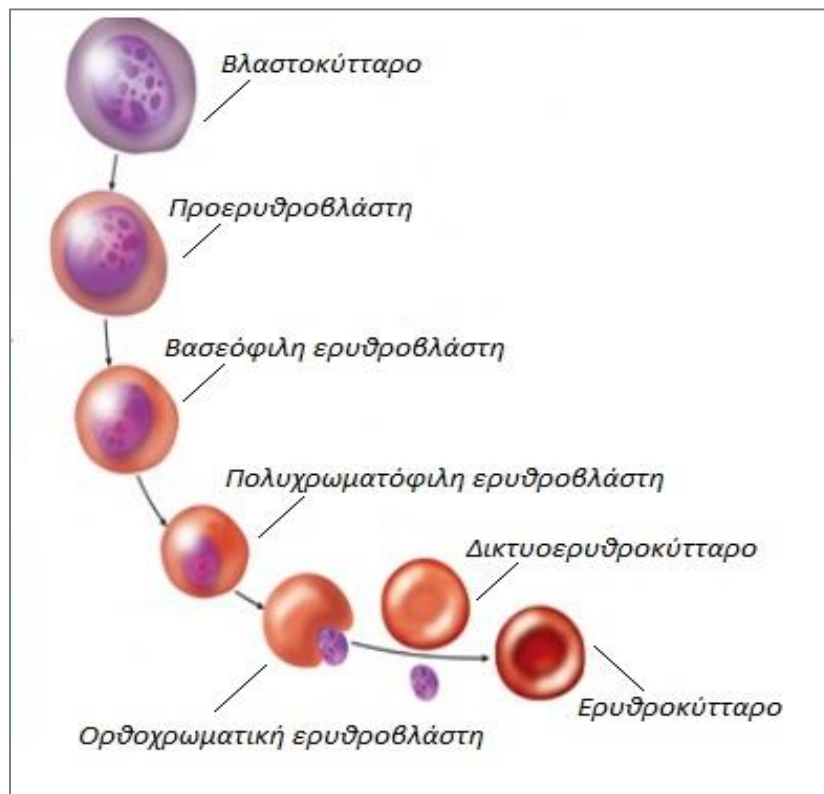
4.1 Η δομή και ο κύκλος ζωής των ερυθροκυττάρων

Το αίμα αποτελεί έναν από τους ιστούς του οργανισμού, κυκλοφορεί διαμέσου της καρδιάς, των αρτηριών, των φλεβών και των τριχοειδών αγγείων, μεταφέροντας θρεπτικά υλικά, ηλεκτρολύτες, ορμόνες, βιταμίνες, αντισώματα, θερμότητα και οξυγόνο στους ιστούς και απομακρύνοντας άχρηστα υλικά και διοξείδιο του άνθρακα. Το ανθρώπινο αίμα αποτελείται περίπου κατά 52%-62% από πλάσμα και κατά 38%-48% από κύτταρα. Το πλάσμα αποτελείται κυρίως από νερό, ιόντα, πρωτεΐνες, ορμόνες και λιπίδια. Τα έμμορφα στοιχεία αποτελούνται από τα ερυθροκύτταρα, τα λευκοκύτταρα και τα αιμοπετάλια και παράγονται στο μυελό των οστών. Συγκεκριμένα, στο μυελό των οστών παράγονται τα πολυδύναμα αιμοποιητικά βλαστικά κύτταρα (PHSC) από τα οποία προέρχονται όλα τα κύτταρα του αίματος. Από τα κύτταρα αυτά κάποια μένουν πανομοιότυπα με τα αρχικά, αποτελώντας το απόθεμα βλαστοκυττάρων του οργανισμού, ενώ το μεγαλύτερο μέρος από τα παραγόμενα βλαστικά κύτταρα διαφοροποιείται για παραχθούν τα κύτταρα του αίματος. Στη συνέχεια πληθώρα παραγόντων αύξησης και διαφοροποίησης αναλαμβάνουν τη μετατροπή των πρώιμων αυτών κυττάρων στη τελική τους μορφή [57, 323].



Εικόνα 12: Τα έμμορφα στοιχεία του αίματος

Έτσι λοιπόν τα ερυθροκύτταρα όταν αναπτύσσονται στο μυελό των οστών προέρχονται από εμπύρνηνα πρόδρομα κύτταρα, αλλά πριν εισέλθουν στην κυκλοφορία, αποβάλλεται ο πυρήνας και τα κυτταρικά τους οργανίδια (συσσκευή Golgi, ενδοπλασματικό δίκτυο, μεγάλος αριθμός μιτοχονδρίων, λυσοσωμάτων) με αποτέλεσμα τα ερυθροκύτταρα να μετατρέπονται σε σωματίδια περιβαλλόμενα από χαρακτηριστική διπλοστοιβάδα κυτταρικής μεμβράνης. Η διαδικασία αυτή ονομάζεται ερυθροποίηση και μπορεί να περιγραφεί περιληπτικά σε δύο στάδια. Το πρώτο στάδιο περιλαμβάνει τη φάση του πολλαπλασιασμού, όπου τα βλαστοκύτταρα ενεργοποιούνται είτε από παράγοντες εξωτερικούς (αυξητικούς), είτε από εσωτερικούς (μεταγραφικούς) ώστε να αυξηθούν και να ενεργοποιήσουν τα συστήματα διαφοροποίησης. Η δεύτερη φάση, εκείνη της ωριμοποίησης, όπου το πρώτο ερυθροειδές κύτταρο υπόκεινται τις διάφορες τροποποιήσεις σχετικά με τον πυρήνα και τα υπόλοιπα οργανίδια. Στην εικόνα 13 φαίνεται η συνολική πορεία της ερυθροποίησης [324].



Εικόνα 13: Η διαδικασία της ερυθροποίησης

Τα ώριμα απύρηντα ερυθροκύτταρα έχουν σχήμα αμφίκοιλου δίσκου, είναι τα μικρότερα κύτταρα του οργανισμού με διάμετρο 6 nm και διάρκεια ζωής 100 έως 120 ημέρες. Αποτελούν την πολυπληθέστερη ομάδα κυττάρων του αίματος, αποτελώντας το ένα τέταρτο του αριθμού των συνολικών κυττάρων του οργανισμού, με 4,5 έως 6 εκατομμύρια κύτταρα ανά μL αίματος. Η αποβολή του πυρήνα στα ώριμα ερυθροκύτταρα τους έδωσε τη δυνατότητα για την κύρια λειτουργία τους, τη μεταφορά των αερίων, O_2 από τους πνεύμονες και CO_2 από τα κύτταρα με τη βοήθεια της αιμοσφαιρίνης [324]. Η οργάνωση της μεμβράνης της επιτρέπει να υπόκεινται πολλές διαφοροποιήσεις κατά τη διάρκεια της ζωής των ερυθροκυττάρων στην κυκλοφορία του αίματος. Πρόκειται για μια μοναδική μεμβράνη όσον αφορά την ελαστικότητα και την ανθεκτικότητά της, ιδιότητες που απορρέουν από τα λιπίδια της [325]. Η διπλοστοιβάδα αποτελείται από ίσο αριθμό χοληστερόλης και φωσφολιποειδών [326] και ενώ η χοληστερόλη είναι συμμετρικά κατανεμημένη και από τις δύο πλευρές της μεμβράνης, δεν συμβαίνει το ίδιο με τα φωσφολιποειδή. Η φωσφατιδυλοχολίνη και η σφιγγομυελίνη βρίσκονται κατά κύριο λόγο από την εξωτερική πλευρά, ενώ από την εσωτερική πλευρά βρίσκονται η φωσφατιδυλοαιθανολαμίνη και η φωσφατιδυλοσερίνη [327, 328]. Στη διατήρηση της δομής αυτής εμπλέκονται και πολλές μεταφορικές πρωτεΐνες, όπως τις φλιπάσες (flippases), τις φλοπάσες (floppases), τις σκραμπλάσες (scramblases) και τις λιπιδικές σχεδίες (lipid rafts) που αποτελούνται από χοληστερόλη, σφιγγολιπίδια, και πρωτεΐνες όπως φλοτιλίνες (flotillin), στοματίνη (stomatin) και G-πρωτεΐνες [329-331].

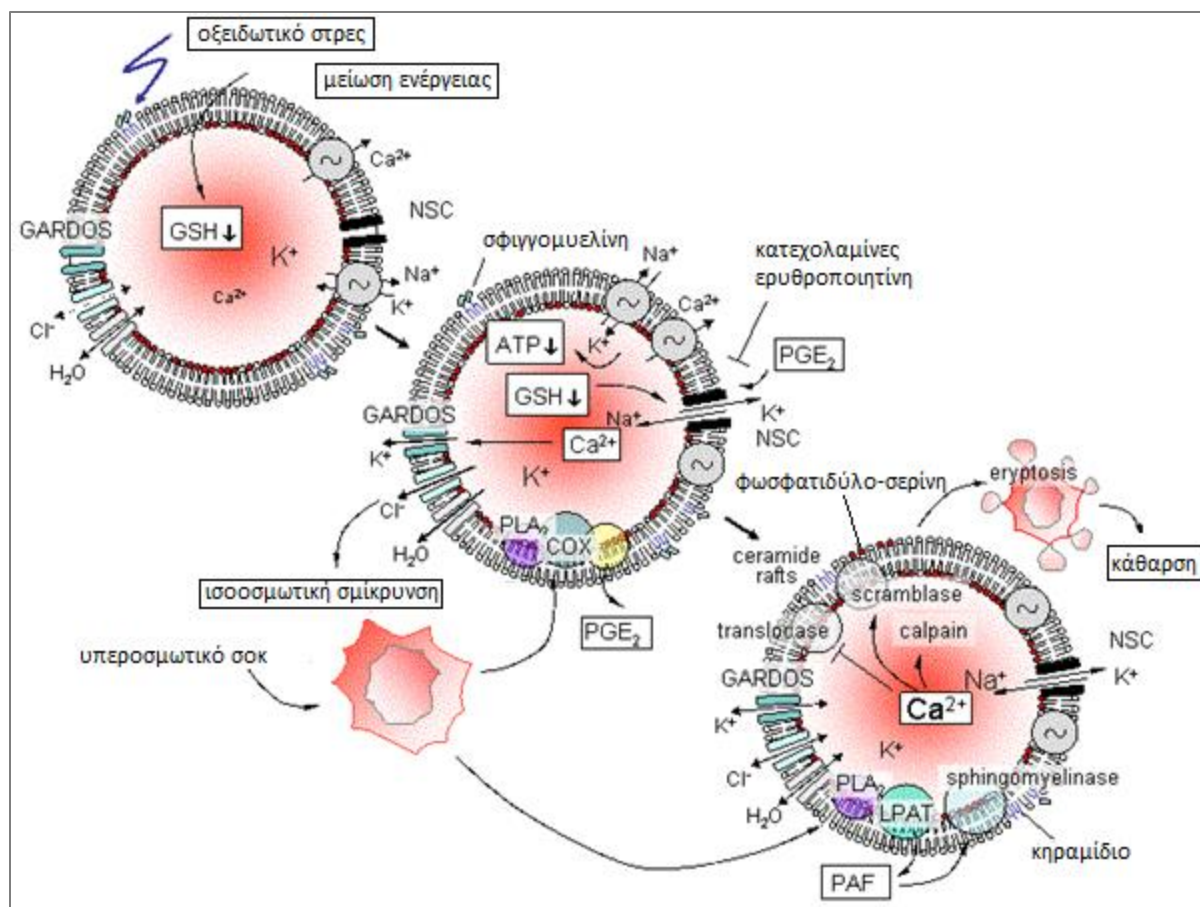
Ο περιορισμός της ζωής των ερυθροκυττάρων στις 120 περίπου ημέρες έγκειται στη γήρανση (senescence) που υπόκεινται το κύτταρο. Η μεμβράνη διαφοροποιείται με τέτοιο τρόπο ώστε να αναγνωρίζεται από τα φαγοκύτταρα και σε τελικό στάδιο επέρχεται η εκκαθάριση όλων των γερασμένων ερυθροκυττάρων από τον οργανισμό [332, 333]. Κατά τη διάρκεια της ζωής τους τα ερυθροκύτταρα μπορεί να εκτεθούν σε διάφορες στρεσογόνες καταστάσεις με αποτέλεσμα να επέλθει κυτταρικός αυτοκτονικός θάνατος, γνωστός ως ερυθρόπτωση (eryptosis) [334-336]. Χωρίς μιτοχόνδρια και πυρήνα η ερυθρόπτωση διαχωρίζεται από την απόπτωση αν και έχουν κοινά χαρακτηριστικά όπως τη συρρίκνωση του κυττάρου, τις ακανόνιστες

προεκβολές (blebbing) της πλασματικής μεμβράνης και την έκθεση της φωσφατιδυλοσερίνης [337-339]. Η ερυθρόπτωση αν δεν ρυθμιστεί από τον οργανισμό μπορεί να επιφέρει αναιμία [340] και έχει συσχετιστεί με πολλές διαφορετικές ασθένειες όπως σήψη, ελονοσία, νόσος του Wilson κά.. [336]. Η ερυθρόπτωση μπορεί να ενεργοποιηθεί με πολλούς διαφορετικούς μηχανισμούς:

- αύξηση κυτταροπλασματικού ασβεστίου Ca^{2+} [340]
- αύξηση του κηραμιδίου [341]
- απώλεια ενέργειας [342]
- οξειδωτικό στρες [343, 344]
- αδυναμία λειτουργίας αντιοξειδωτικών μηχανισμών [345, 346]

4.2 Ερυθρά αιμοσφαίρια, PAF και HIV λοίμωξη

Από όλους τους παραπάνω μηχανισμούς, η αύξηση του κηραμιδίου σχετίζεται με την εμπλοκή του PAF [347]. Συγκεκριμένα, η συρρίκνωση του κυτάρου οδηγεί στην απελευθέρωση PAF ο οποίος διεγείρει τη σφιγγομυελινάση και έτσι σχηματίζεται κηραμίδιο. Με τη σειρά του το κηραμίδιο ενεργοποιεί τη σκραμπλάση (scramblase) και οδηγεί στην ασύμμετρη κατανομή/έκθεση της φωσφατιδυλοσερίνης στη μεμβράνη με επακόλουθο τον κυτταρικό θάνατο. Επιπλέον, ο PAF έδειξε να ενεργοποιεί τους, ευαίσθητους σε Ca^{+2} , διαύλους K^{+} (διαύλοι Gardos) στη μεμβράνη των ερυθροκυττάρων και άρα συμμετέχει και στο μηχανισμό ερυθρόπτωσης με αύξηση κυτταροπλασματικού ασβεστίου Ca^{2+} . Από την κατεργασία των κυττάρων με ανταγωνιστή του PAF (ABT491) φάνηκε ότι τα ερυθροκύτταρα εκφράζουν τον υποδοχέα του PAF στη μεμβράνη τους. Από την ίδια μελέτη προέκυψε η βιοσύνθεση του PAF από τα ερυθροκύτταρα με άγνωστο μηχανισμό μιας και στη βιβλιογραφία δεν υπάρχει αναφορά για την ύπαρξη των βιοσυνθετικών του ενζύμων σε αυτά τα κύτταρα.



Εικόνα 14: Ο συνολικός μηχανισμός της ερυθρόπτωσης με την εμπλοκή του PAF

Όσον αφορά στην HIV λοίμωξη, η αναιμία αποτελεί μία από τις πιο συχνές αιματολογικές διαταραχές σε συχνότητα 63% με 95% [348]. Οι αιτίες έχουν να κάνουν με τις ευκαιριακές λοιμώξεις, τις διατροφικές ελλείψεις αλλά και τα αντιρετροϊκά φάρμακα (AZT) [349] με συνέπειες την κόπωση και γενικά τη μείωση της ποιότητας ζωής των οροθετικών [350].

Παρόλη τη σύνδεση του PAF και της αναιμίας που επάγεται από την ερυθρόπτωση δεν έχει μελετηθεί καθόλου μέχρι τώρα στη βιβλιογραφία η εμπλοκή του στις αιματολογικές διαταραχές κατά την HIV λοίμωξη.

Σκοπός

Το φλεγμονώδες υπόβαθρο των εκδηλώσεων της HIV λοίμωξης δημιούργησε ερωτήματα για την *in vivo* επίδραση της αντιρετροϊκής αγωγής στο μεταβολισμό του Παράγοντα Ενεργοποίησης των Αιμοπεταλίων (PAF). Ο σκοπός της παρούσας διδακτορικής διατριβής είναι η διαλεύκανση της επίδρασης της αντιρετροϊκής αγωγής στο μεταβολισμό του PAF και η γενικότερη εμπλοκή του τόσο στην HIV λοίμωξη όσο και στις μη σχετικές με το AIDS εκδηλώσεις της. Για το σκοπό αυτό θα επιλεγθούν να μελετηθούν 50 οροθετικοί ασυμπτωματικοί και μη προθεραπευμένοι άρρενες ασθενείς που θα διαχωριστούν σε ομάδες ανάλογα την αντιρετροϊκή θεραπεία ενώ μία ομάδα δεν θα λάβει θεραπεία, αποτελώντας την ομάδα αναφοράς. Θα ακολουθήσουν 6 αιμοληψίες μέσα στο χρονικό διάστημα 12 μηνών με σκοπό να προσδιοριστούν τα επίπεδα του PAF στο αίμα, τα βιοσυνθετικά ένζυμα του PAF, PAF-φωσφοχολινοτρανσφεράση (PAF-CPT) και lyso-PAF-ακετυλοτρανσφεράση (lyso-PAF-AT) στα λευκοκύτταρα και τα αιμοπετάλια και το αποικοδομητικό ένζυμο του PAF, PAF-ακετυλουδρολάση (PAF-AH), στα λευκοκύτταρα, τα αιμοπετάλια, τα ερυθροκύτταρα και το πλάσμα. Παράλληλα, θα γίνει διερεύνηση σχετικά με την ύπαρξη βιοσυνθετικών ενζύμων του PAF στα ερυθροκύτταρα με σκοπό να μελετηθεί ο τυχόν ρόλος τους στη φλεγμονή και την HIV λοίμωξη.

Πειραματικό Μέρος

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5^ο: Μέθοδοι

5.1 Σχεδιασμός μελέτης

Η παρούσα μελέτη αφορά στη σχέση της HIV λοίμωξης και της αντιρετροϊκής αγωγής με τη φλεγμονή. Για το σκοπό αυτό μελετήθηκαν η *in vitro* και η *in vivo* επίδραση τεσσάρων αντιρετροϊκών αγωγών και μιας ομάδας αναφοράς, στο μεταβολισμό του Παράγοντα Ενεργοποίησης των Αιμοπεταλίων σε HIV ασθενείς. Παράλληλα μελετήθηκαν κάποιοι ήδη γνωστοί δείκτες φλεγμονής της HIV λοίμωξης όπως οι κυτταροκίνες IL-1β, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70 και TNFα και ο Αγγειακός Ενδοθηλιακός Αυξητικός Παράγοντας (VEGF).

5.1.1 Επιλογή εθελοντών

Στη μελέτη συμμετείχαν 50 HIV-1 ασυμπτωματικοί και μη προθεραπευμένοι, *naïve*, ασθενείς από τις Μονάδες Λοιμώξεων των Γενικών Νοσοκομείων του Ερυθρού Σταυρού «Κοργιαλένειο-Μπενάκιο Ε.Ε.Σ.» και του Γενικού Κρατικού «Γ. Γεννηματάς». Όλοι οι εθελοντές ήταν άρρενες ενήλικες με τεκμηριωμένη HIV-1 λοίμωξη πιστοποιημένη με τη μέθοδο ELISA και επιβεβαιωμένη από τη δοκιμασία WESTERN-BLOT. Η κλινική κατηγορία των ασθενών κατά CDC είναι A1 ή A2 σύμφωνα με τα κριτήρια σταδιοποίησης της HIV λοίμωξης. Ως κριτήρια αποκλεισμού (n=8) από το πρωτόκολλο θεωρήθηκε η μη τεκμηριωμένη HIV-1 λοίμωξη, η συλλοίμωξη με χρόνια ηπατίτιδα Β ή/και C, φλεγμονώδεις ασθένειες/καταστάσεις (περιοδοντίτιδα, αυτοάνοσα νοσήματα, αλλεργία), άλλες ασθένειες όπως ο διαβήτης και η υπέρταση, η ύπαρξη ενεργούς καιροσκοπικής λοίμωξης και η χορήγηση επιπλέον φαρμακευτικής αγωγής, πλην της αντιρετροϊκής, η οποία θα μπορούσε να επηρεάσει το μεταβολισμό του PAF.

5.1.2 Κλινικό πρωτόκολλο

Η ένταξη του κάθε ασθενούς στο πρωτόκολλο περιλαμβάνει αρχικά την ενημέρωση από τους θεράποντες ιατρούς και ακολουθεί η γραπτή συγκατάθεση του για συμμετοχή στη μελέτη σύμφωνα με τη Διακήρυξη του Ελσίνκι. Στη συνέχεια ακολουθεί ο προκαταρκτικός έλεγχος που περιλαμβάνει την ανεύρεση βέλτιστου αντιρετροϊκού σχήματος βάσει γονοτυπικού ελέγχου και ελέγχου για HLA B57-01 σύμφωνα με τις Ευρωπαϊκές [351] και Διεθνείς [352] κατευθυντήριες οδηγίες και προσαρμοσμένο στις ανάγκες και τις ιδιαιτερότητες του κάθε ασθενή. Ακολουθεί η αρχική επίσκεψη/baseline ($t=0$). Την ημέρα αυτή συλλέγονται τα δημογραφικά δεδομένα (ημερομηνία και χώρα γέννησης, φυλετική ομάδα, βάρος, ύψος, τρόπος μόλυνσης από τον ιό, έτος διάγνωσης και στάδιο νόσου κατά CDC) και διεξάγονται οι αιματολογικές εξετάσεις (λευκά αιμοσφαίρια, αιμοσφαιρίνη, αιματοκρίτης, αιμοπετάλια), βιοχημικές εξετάσεις (γλυκόζη, ουρία, κρεατίνη, ουρικό οξύ, K, Na, Ca, P, ALT, AST, LDH, CK, γ -GT, ALP, Bill ολική, HDL, LDL και τριγλυκερίδια), καθώς και η μέτρηση του ιικού φορτίου και του υποπληθυσμού T4 λεμφοκυττάρων. Επιπλέον, λαμβάνεται δείγμα αίματος για τον προσδιορισμό φλεγμονωδών μεσολαβητών και ακολουθεί η χορήγηση αντιρετροϊκής αγωγής. Ο κάθε ασθενής ακολουθεί ένα προγραμματισμένο χρονοδιάγραμμα άλλων πέντε επισκέψεων τον 1^ο, 3^ο, 6^ο, 9^ο και 12^ο μήνα μετά το baseline όπου πραγματοποιείται κλινικός και εργαστηριακός έλεγχος παρόμοιος με αυτόν της αρχικής επίσκεψης. Παράλληλα με τις ομάδες ART στο πρωτόκολλο εντάχθηκε μια ομάδα αναφοράς, αποτελώντας θετικό control, οι *naïve* ασθενείς, οι οποίοι δεν λάμβαναν αντιρετροϊκή αγωγή και συμμετείχαν στη μελέτη για εξίσου 12 μήνες μέσω 6 αιμοληψιών τις αντίστοιχες χρονικές στιγμές με τους υπόλοιπους εθελοντές.

Πίνακας 4: Ο διαχωρισμός των ασθενών της μελέτης στις ομάδες Α-Ν.

50 HIV ασθενείς					
Ομάδες	Α	Β	Γ	Δ	Ν
Αγωγή	tenofovir-DF/ emtricitabine/ efavirenz	abacavir/ lamivudine/ efavirenz	tenofovir-DF/ emtricitabine/ atazanavir-r	abacavir/ lamivudine/ atazanavir-r	-
n	8 (2 αποκλεισμοί)	10	8 (2 αποκλεισμοί)	10	8 (2 αποκλεισμοί)
Ηλικία (έτη)	46 ± 10	35 ± 11	34 ± 8	35 ± 10	33 ± 12
Κάπνισμα	50%	70%	75%	40%	40%
Δείκτης Μάζας Σώματος (ΔΜΣ) (Kg/m ²)	27.4 (24.4 - 32.6)	24.2 (23.4 - 27.6)	24.7 (22.5 – 26.8)	23.8 (22.3 – 26.3)	24.6 (23.5 - 27.5)

5.2 Εκχύλιση λιποειδών κατά τη μέθοδο Bligh-Dyer

Αντιδραστήρια – Όργανα

- Οργανικοί διαλύτες (χλωροφόρμιο, μεθανόλη) αναλυτικής καθαρότητας
- Απεσταγμένο νερό
- Αέριο άζωτο
- Περιστρεφόμενη συσκευή εξάτμισης υπό κενό Buchi B-169 Vacuum System (flash evaporator)
- Κυκλοαναδευτήρας (vortex)
- Γυάλινοι δοκιμαστικοί σωλήνες των 14 mL
- Σφαιρικές γυάλινες φιάλες των 100 mL
- Γυάλινα σιφώνια των 10 mL
- Γυάλινες ράβδοι
- Φυγοκεντρικοί γυάλινοι σωλήνες των 50 mL
- Γυάλινα ποτήρια των 250 mL

Αρχή μεθόδου

Η μέθοδος Bligh-Dyer χρησιμοποιείται με σκοπό την παραλαβή των ολικών λιποειδών από το δείγμα. Αρχικά, με κατάλληλο μονοφασικό σύστημα διαλυτών εκχυλίζονται τα ολικά λιποειδή και μια μικρή ποσότητα υδατοδιαλυτών ουσιών όπως αλάτων, πρωτεϊνών, σακχάρων κλπ. Με τη μετατροπή του μονοφασικού συστήματος σε διφασικό κατανέμονται στη μεν υδατική φάση τα υδατοδιαλυτά συστατικά του δείγματος και στη δε χλωροφορμική τα διάφορα λιποειδή συμπεριλαμβανομένου και του PAF [353].

Αναλυτική πορεία

Το προς ανάλυση δείγμα εκχυλίζεται με κατάλληλο μονοφασικό σύστημα διαλυτών χλωροφόρμιο: μεθανόλη: νερό 1:2:0,8 (v/v/v) και ακολουθεί έντονη ανάδευση, με κυκλοαναδευτήρα ή ράβδο ανάλογα τον όγκο και το σκεύος στο οποίο βρίσκεται. Ανάλογα τη φύση του δείγματος υπάρχει η περίπτωση μεγάλου όγκου αδιάλυτων συστατικών, όπως στο ολικό αίμα, τα οποία απομακρύνονται με φυγοκέντρηση (300 xg για 10 min στους 4°C). Μετά την παραμονή 10 min, προστίθενται οι κατάλληλες ποσότητες χλωροφορμίου και νερού ώστε να προκύψει διφασικό σύστημα με αναλογία 1:1:0,9 (v/v/v). Αφού σχηματιστεί το διφασικό συλλέγεται η χλωροφορμική (κάτω) φάση που περιέχει τα ολικά λιποειδή και μεταφέρεται ποσοτικά σε σφαιρική φιάλη ή δοκιμαστικό σωλήνα. Ο διαλύτης απομακρύνεται έως ξηρού με τη χρήση περιστρεφόμενης συσκευής εξάτμισης υπό κενό ή ρεύματος αζώτου, αντίστοιχα, σε θερμοκρασία 30-35°C. Στην περίπτωση της σφαιρικής φιάλης, τα λιποειδή παραλαμβάνονται ποσοτικά και μεταφέρονται με διάλυμα χλωροφορμίου:μεθανόλης (1:1) σε δοκιμαστικό γυάλινο σωλήνα και ο διαλύτης εξατμίζεται εκ νέου σε ρεύμα αζώτου έως ξηρού. Τα ολικά λιποειδή αναδιαλύονται σε μικρή ποσότητα διαλύματος χλωροφορμίου:μεθανόλης (1:1) και φυλάσσονται στους -20°C για περαιτέρω επεξεργασία.

5.3 Προσδιορισμός πρωτεΐνης με τη μέθοδο Bradford

Αντιδραστήρια – Όργανα

- Πυκνό διάλυμα αλβουμίνης ορού βώος (BSA-stock): Ζυγίζεται 1 g BSA ελεύθερης λιπαρών οξέων (Sigma) και διαλύεται σε 10 mL νερού
- Διάλυμα εργασίας αλβουμίνης ορού βώος (BSA-working) 2 mg/mL. Αναδιάλυση 0,2 mL BSA stock σε 10 mL νερό
- Προκατασκευασμένο αντιδραστήριο Bradford (Sigma). Περιέχει διάλυμα Coomassie Brilliant Blue G και φωσφορικό οξύ σε μεθανόλη

- Φωτόμετρο Boeco S-20
- Απεσταγμένο νερό
- Πλαστικοί δοκιμαστικοί σωλήνες των 14 mL μιας χρήσης
- Κυψελίδες φασματοφωτομέτρου του 1 mL μιας χρήσης
- Κυκλοαναδευτήρας (vortex)

Αρχή μεθόδου

Η μέθοδος Bradford περιλαμβάνει την τοποθέτηση της όξινης χρωστικής Coomassie Brilliant Blue G στο διάλυμα των πρωτεϊνών. Η χρωστική συμπλέκεται με τα βασικά και αρωματικά αμινοξέα των πρωτεϊνών προκαλώντας μια μετατόπιση της μέγιστης απορρόφησης της χρωστικής από 465 nm (καφέ χρώμα) σε 595 nm (μπλε χρώμα). Το σύμπλοκο της πρωτεΐνης-χρωστικής σταθεροποιείται σε 5 λεπτά και είναι σταθερό για 45 λεπτά. Η απορρόφηση είναι ανάλογη της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης. Η γραμμικότητα της ανάλυσης κυμαίνεται από 1 μ g σε 10 g πρωτεΐνης, εκφρασμένης ως προς BSA [354].

Αναλυτική πορεία

Παρασκευάζονται πρότυπα διαλύματα BSA με συγκεντρώσεις από 1 ως 10 μ g/mL όπως και το διάλυμα του άγνωστου δείγματος με τελική συγκέντρωση εντός γραμμικής περιοχής (1-10 μ g/mL). Τα διαλύματα των προτύπων και των αγνώστων δειγμάτων βρίσκονται σε τελικό όγκο 1 mL ρυθμισμένου με απεσταγμένο νερό. Στη συνέχεια προστίθεται 1 mL αντιδραστηρίου Bradford και μετά από έντονη ανάδευση στο κυκλοαναδευτήρα και παραμονή 10 min, μετράται η απορρόφηση των προτύπων και των δειγμάτων σε 595 nm. Ο υπολογισμός της περιεκτικότητας του δείγματος σε πρωτεΐνη γίνεται με βάση την πρότυπη καμπύλη αναφοράς.

5.4 Χρωματογραφία στήλης λιποειδών

Αντιδραστήρια - Όργανα

- Υλικό πλήρωσης στήλης: Πυριτικό οξύ (Silica gel 60, Merck, particle size 0,2-0,5 mm). Το υλικό πλήρωσης ξεπλένεται διαδοχικά τρεις φορές με ίσο όγκο νερού και μια φορά με ίσο όγκο μεθανόλης ώστε να παραμείνουν μόνο οι κόκκοι επιθυμητού μεγέθους. Ακολουθεί εξάτμιση στον απαγωγό για μια νύχτα και ενεργοποίηση στους 100°C επίσης για μια νύχτα.
- Πυριαντήριο (Memmert-854, Schwabach)
- Οργανικοί διαλύτες αναλυτικής καθαρότητας (χλωροφόρμιο, μεθανόλη)
- Απεσταγμένο νερό
- Γυάλινη στήλη με ηθμό πορσελάνης
- Γυάλινες πιπέτες των 10 mL
- Γυάλινα ποτήρια των 250 mL
- Γυάλινοι ράβδοι
- Κυκλοαναδευτήρας (vortex)

Αρχή μεθόδου

Στη χρωματογραφία στήλης σκοπός είναι ο διαχωρισμός του δείγματος λιποειδών σε διαφορετικής πολικότητας κλάσματα. Αυτό επιτυγχάνεται μέσω πρόσδεσης του δείγματος σε μια στατική φάση και διαδοχικής έκλουσής του με διαλύματα κατάλληλης πολικότητας διαχωρίζοντας το έτσι σε διάφορα κλάσματα ανάλογα τη φύση τους [355].

Αναλυτική πορεία

Το ενεργοποιημένο πυριτικό οξύ διασπείρεται σε διάλυμα μεθανόλης:νερού 1:1,5 (v/v) (1^ο σύστημα έκλουσης) και αποχύνεται προσεχτικά και ομοιογενώς, χωρίς κενά ή φυσαλίδες αέρα, σε γυάλινη στήλη διαμέτρου 1 cm, μέχρι το κατάλληλο ύψος αυτής (20 cm). Εν συνεχεία η στήλη εκλούεται τρεις φορές με ίσο όγκο του 1^{ου}

συστήματος έκλουσης, ώστε να πακεταριστεί. Έπειτα τοποθετείται το δείγμα διαλυμένο σε μικρό όγκο κατάλληλου διαλύτη (χλωροφόρμιο:μεθανόλη 1:1) και ακολουθούν οι εκλούσεις της στήλης. Αρχικά τοποθετούνται 40 mL του 1^{ου} συστήματος και έτσι επιτυγχάνεται η έκλυση των πολικών συστατικών τα οποία και απορρίπτονται. Ακολουθούν 50 mL του 2^{ου} συστήματος έκλουσης (μεθανόλη:νερό, 2:1 (v/v)), το οποίο, ως λιγότερο πολικό, συλλέγει από το δείγμα τα μεσαίας πολικότητας λιποειδή, ανάμεσά τους και τον PAF. Καθ' όλη τη διαδικασία οι χειρισμοί πρέπει να γίνονται προσεκτικά και το υλικό πλήρωσης πρέπει να περιβάλλεται από διαλύτη ώστε να μην δημιουργηθούν κενά και διαταραχθεί το ομοιόμορφο πακετάρισμα της στήλης. Μετά τη συλλογή του, το επιθυμητό έκλουσμα εκχυλίζεται με τη μέθοδο Bligh-Dyer και φυλάσσεται σε μικρό όγκο διαλύτη χλωροφόρμιο:μεθανόλη (1:1) στους -20°C.

5.5 Χρωματογραφία Λεπτής Στιβάδας (TLC) πολικών λιποειδών

Αντιδραστήρια - Όργανα

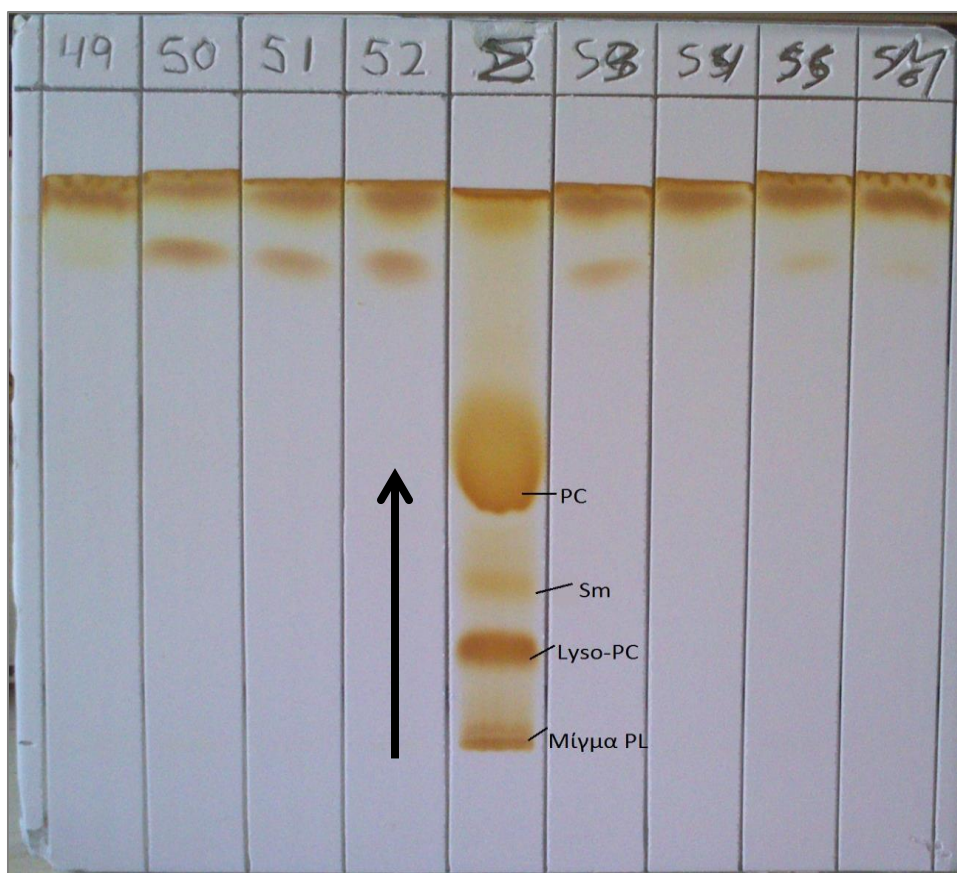
- Οργανικοί διαλύτες (οξικό οξύ, μεθανόλη, χλωροφόρμιο)
- Πρότυπα φωσfolιποειδή (Merck)
- Προσροφητικό υλικό: πηκτή SiO₂ (Silica Gel G 60, Merck)
- Σύστημα επίστρωσης πλακών TLC: Desaga (Germany)
- Γυάλινες πλάκες διαστάσεων 20x20 cm και 20x10 cm
- Ψυχόμενη φυγόκεντρος Heraeus Labofuge 400R και Sorvall RC-5B.
- Γυάλινοι θάλαμοι ανάπτυξης διαστάσεων 25x25x10 cm και 11x2,5 cm
- Απεσταγμένο νερό
- Διηθητικό χαρτί
- Πυριαντήριο (Memmert-854, Schwabach)
- Κυκλοαναδευτήρας (vortex)

Αρχή μεθόδου

Η μέθοδος αυτή ανήκει στις τεχνικές της χρωματογραφίας κατανομής και σκοπός της είναι να διαχωριστεί το δείγμα σε διάφορες ζώνες ανάλογα την πολικότητα του κάθε λιποειδούς. Ο επιτυχημένος διαχωρισμός γίνεται χάρη στο συνδυασμό της διαφορετικής προσρόφησης των λιποειδών του δείγματος από τη στατική φάση και τη χρήση κατάλληλου μίγματος διαλυτών προς ανάπτυξη. Η απόσταση που διατρέχει κάθε ουσία από την αρχή προς το μέτωπο της πλάκας ορίζεται ως R_f και αποτελεί χαρακτηριστικό της εν λόγω ουσίας [356].

Αναλυτική πορεία

Το προσροφητικό υλικό αναμιγνύεται με απεσταγμένο νερό σε αναλογία 1/2 (w/v). Ανακινείται έντονα για 2 min και στη συνέχεια γίνεται η επίστρωση των γυάλινων πλακών χρησιμοποιώντας τη συσκευή Desaga. Οι πλάκες αφήνονται σε θερμοκρασία δωματίου για 24 ώρες και ακολουθεί η ενεργοποίησή τους σε πυριαντήριο σε 100°C για 60 min. Το δείγμα διαλυμένο σε μικρό όγκο (2 φορές από 50 μ L) κατάλληλου διαλύτη (χλωροφόρμιο:μεθανόλη 1:1) τοποθετείται στις πλάκες σε ύψος περίπου 2,5 cm. Η πλάκα εισάγεται σε προκεκορεσμένο θάλαμο με κατάλληλο σύστημα ανάπτυξης (χλωροφόρμιο : μεθανόλη : οξικό οξύ : απεσταγμένο νερό 100:57:16:8 v/v/v/v) και αφήνεται να αναπτυχθεί, μέσω τριχοειδών φαινομένων, μέχρι την άνω χαραγή (περίπου 18 cm). Όταν ολοκληρωθεί η ανάπτυξη αφήνεται για λίγα λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και τοποθετείται σε γυάλινο κλειστό θάλαμο που περιέχει κρυστάλλους ιωδίου. Τα διαχωρισμένα φωσφολιποειδή απορροφούν το ιώδιο και εμφανίζουν χαρακτηριστικές πορτοκαλί κηλίδες οι οποίες αποξηáινονται, μεταφέρονται σε γυάλινους σωλήνες και το δείγμα εκχυλίζεται με τη μέθοδο Bligh-Dyer και φυλάσσεται σε μικρό όγκο διαλύτη χλωροφόρμιο : μεθανόλη (1:1) στους -20°C. Στην εικόνα 15 φαίνεται η σειρά εμφάνισης πρότυπων φωσφολιποειδών σε πλάκα TLC: Lyso-PC, SM, PC και PE σε σύστημα ανάπτυξης χλωροφόρμιο : μεθανόλη : οξικό οξύ : απεσταγμένο νερό (100:57:16:8 v/v/v/v). Ο PAF βρίσκεται στην περιοχή της SM ανάμεσα από τις κηλίδες της Lyso-PC και της PC, χωρίς να εμφανίζει κηλίδα ο ίδιος.



Εικόνα 15: Η σειρά εμφάνισης πρότυπων φωσfolιποειδών σε πλάκα TLC.

5.6 Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (HPLC) λιποειδών

Αντιδραστήρια – Όργανα

- Οργανικοί διαλύτες χρωματογραφικής καθαρότητας (ακετονιτρίλιο, μεθανόλη)
- Νερό χρωματογραφικής καθαρότητας
- Πρότυπα φωσfolιποειδή (Merck)
- Υγρός χρωματογράφος: Hewlett-Packard, Hp Series 1100.
- Ανιχνευτής: Hewlett-Packard, Hp Series 1100.
- Καταγραφέας-Ολοκληρωτής: Hewlett-Packard, Hp-3395.
- Μικροσύριγγες ακρίβειας 50 και 250 μL .

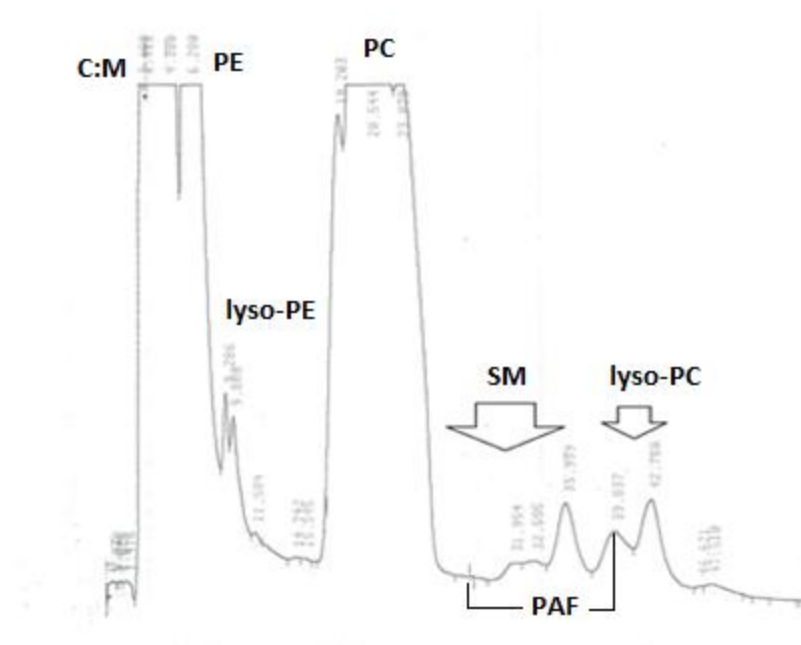
- Στήλες κατιοανταλλαγής: particil 10 SCX, WCS Analytical column, 4.6 mm x 250 mm Whatman

Αρχή μεθόδου

Η μέθοδος αυτή ανήκει στις μεθόδους υγρής χρωματογραφίας κατά την οποία η κινητή φάση, υπό την επίδραση ελεγχόμενης πίεσης, περνάει μέσα από τη στήλη που περιέχει τη στατική φάση. Κάθε λιποειδές που εξέρχεται από τη στήλη, έχει και έναν χαρακτηριστικό χρόνο έκλουσης και κορυφή που εξαρτάται από την πολικότητα του λιποειδούς σε σχέση με τη στήλη που χρησιμοποιείται κάθε φορά [357].

Αναλυτική πορεία

Αρχικά η στήλη καθαρίζεται με κατάλληλους διαλύτες (ακετονιτρίλιο, μεθανόλη, νερό), ανάλογα το υλικό πλήρωσης της και σταθεροποιείται με το εκάστοτε σύστημα έκλουσης που χρησιμοποιείται για την ανάλυση. Ακολουθώς, ένα μίγμα πρότυπων φωσφολιποειδών περνά από τη στήλη ώστε να διαπιστωθούν οι χρόνοι έκλουσής και οι χαρακτηριστικές κορυφές τους. Το δείγμα τοποθετείται διαλυμένο σε μικρό όγκο (100 μ L) διαλύτη χλωροφόρμιο:μεθανόλη (1:1). Η έκλουση των διαφόρων κλασμάτων του δείγματος γίνεται με σταθερή σύσταση διαλυτών ελεγχόμενη από τη μεταβολή της οπτικής απορρόφησης στα 208 nm και ροή 1 mL/min. Έτσι παραλαμβάνονται τα κλάσματα τα οποία, αφού εξατμιστούν και μεταφερθούν σε γυάλινο δοκιμαστικό σωλήνα με μικρό όγκο χλωροφόρμιο:μεθανόλη (1:1), φυλάσσονται στους -20°C . Για την παραλαβή του κλάσματος του PAF χρησιμοποιήθηκαν τα συστήματα έκλουσης διαλυτών ακετονιτρίλιο : μεθανόλη : νερό αναλογίας 66:36:8 ή 77:15:8 αναλόγως την έκλουση των πρότυπων διαλυμάτων. Στην εικόνα 16 απεικονίζεται ένα χρωματογράφημα HPLC με στήλη κατιοανταλλαγής SCX και σειρά εμφάνισης: PE, Lyso-PE, PC, SM και Lyso-PC. Ο PAF εκλύεται λίγο μετά τη SM και πριν τη Lyso-PC χωρίς να εμφανίζει κορυφή. Το κλάσμα του PAF λαμβάνεται μαζί με τη SM, στο τέλος της PC ως την 1^η κορυφή της Lyso-PC.



Εικόνα 16: Η σειρά εμφάνισης φωσφολιποειδών σε χρωματογράφημα HPLC.

5.7 Βιολογική Δοκιμασία *in vitro*

Αντιδραστήρια-Όργανα

- Διάλυμα Tyrodes stock: Σε 100 mL απεσταγμένου νερού περιέχονται 8 g NaCl, 0,195 g KCl, 0,213 g $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ και 1 g γλυκόζη
- Διάλυμα $CaCl_2$ stock: Σε 100 mL απεσταγμένου νερού περιέχονται 1,911 g $CaCl_2$
- Διάλυμα 0,2 M EGTA stock: Ποσότητα 0,76 g EGTA διαλύεται σε 10 mL απεσταγμένου νερού. Το pH Ρυθμίζεται του διαλύματος στα 7,5 με 5 M NaOH.
- Διάλυμα ζελατίνης 10% (w/v) σε απεσταγμένο νερό
- Πυκνό διάλυμα αλβουμίνης βοδινού ορού (BSA stock): Ζυγίζεται 1 g BSA ελεύθερης λιπαρών οξέων (Sigma) και διαλύεται σε 10 mL νερού
- Διάλυμα εργασίας αλβουμίνης βοδινού ορού (BSA working) 2,5 mg/mL φυσιολογικού ορού: Σε 39 mL φυσιολογικού ορού προστίθεται 1 mL BSA stock.

- Διαλύματα εργασίας PAF συγκεντρώσεων $1,846 \times 10^{-9}$ M, σε διάλυμα εργασίας BSA. Σε γυάλινο δοκιμαστικό σωλήνα παραλαμβάνονται 500 μ L από το διάλυμα φύλαξης του PAF συγκέντρωσης $1,846 \times 10^{-9}$ M τα οποία εξατμίζονται έως ξηρού σε ρεύμα αζώτου και αναδιαλύονται σε 500 μ L διαλύματος εργασίας BSA. Μετά από παραμονή 10 min ο PAF έχει εκχυλιστεί από τη BSA και το διάλυμα δοκιμάζεται στο εναιώρημα πλυμένων αιμοπεταλίων κουνελιού σε διάφορες συγκεντρώσεις ώστε να δημιουργηθεί πρότυπη καμπύλη αναφοράς
 - Ficoll-Paque (Pharmacia)
 - Φυσιολογικός ορός (NaCl 9‰)
 - Πλαστικά σιφώνια των 10 mL.
 - Αυτόματες πιπέτες μιας χρήσεως
 - Aggregometer (CHRONO-LOG Corporation).
 - pH-μετρο (Orion model 410A).
 - Φωτόμετρο Helios B Unicam.
 - Υδρόλουτρο Julabo
 - Φυγόκεντρος επιτραπέζια Heraeus Labofuge 400R
 - Διάλυμα NaHCO_3 : διαλύονται 0,2030 g NaHCO_3 σε 10 mL απεσταγμένου νερού αμέσως πριν τη χρήση
 - Ρυθμιστικά διαλύματα για ρύθμιση του pH-μέτρου.
- I. Διαλύματα Tyrodes-Gelatin pH 6,5 (Tg pH 6,5) και Tyrodes-Gelatin-EGTA pH 6,5 (Tg-EGTA pH 6,5): Σε 80 mL νερό προστίθενται 10 mL Tyrodes 10x stock. Χρησιμοποιώντας μαγνητικό αναδευτήρα προστίθενται 2,5 mL ζελατίνης 10% (υπό τήξη στο σημείο βρασμού). Κατόπιν προστίθενται 5 mL διαλύματος NaHCO_3 . Συμπληρώνεται ο όγκος στα 100 mL με απεσταγμένο νερό και χωρίζεται σε δύο τμήματα των 50 mL. Στο ένα από τα δύο προστίθενται 25 μ L 0,2 M EGTA. Ρυθμίζεται το pH και των δύο κλασμάτων στο 6,46 με 1 N HCl. Αμέσως

γεμίζονται σωλήνες των 16 mL μέχρι επάνω (χωρίς φυσαλίδες αέρα) και σκεπάζονται με parafilm.

- II. Διάλυμα Tyrodes ασβεστίου pH 7,2 (Tg-Ca pH 7,2): Σε 5 mL Tyrodes 10x stock προστίθενται 40 mL νερό. Χρησιμοποιώντας μαγνητικό αναδευτήρα προστίθενται 1,25 mL 10% ζελατίνη. Στη συνέχεια προστίθεται 0,5 mL 100x CaCl_2 stock. Κατόπιν προστίθενται 2,5 mL διαλύματος NaHCO_3 . Συμπληρώνεται ο όγκος μέχρι τα 50 mL με νερό και ρυθμίζεται το pH στο 7,16 με 1N HCl. Αμέσως γεμίζονται σωλήνες των 16 mL μέχρι επάνω (χωρίς φυσαλίδες αέρα) και σκεπάζονται με parafilm.

Αρχή μεθόδου

Κατά τη μέθοδο αυτή απομονώνονται αιμοπετάλια από το αίμα κουνελιού και με τη βοήθεια ειδικού φωτόμετρου, το συσσωρευματομέτρο, μετράται ποσοτικά η συσώρευση που προκαλείται στα αιμοπετάλια από το προς ανάλυση δείγμα είτε η αναστολή που προκαλεί ένα δείγμα σε γνωστή ποσότητα πρότυπου PAF [196].

Αναλυτική πορεία

5.7.1 Απομόνωση πλυμένων αιμοπεταλίων από αίμα κουνελιού

Το αίμα που παρελήφθη κατά την αιμοληψία (6.8.3) φυγοκεντρείται στα 630 $\times g$ για 13 min στους 25 °C. Μετά το πέρας της φυγοκέντρωσης αναρροφώνται τα 2/3 του υπερκείμενου πλάσματος το λεγόμενο πλάσμα πλούσιο σε αιμοπετάλια (PRP, Platelet Rich Plasma) με σιφώνιο των 10 mL και μεταφέρονται σε άλλο σωλήνα των 50 mL. Στη συνέχεια το PRP τοποθετείται προσεκτικά σε σωλήνες των 14 mL που περιέχουν 2 mL Ficoll, ένα πολυσακχαρίτη που δρα ως μοριακό φίλτρο και διαχωρίζει τα αιμοπετάλια από τα λευκοκύτταρα και τα ερυθροκύτταρα τα οποία το διαπερνούν. Ο όγκος του PRP ρυθμίζεται έτσι ώστε πάντοτε να υπάρχουν 6-9 mL PRP πάνω από το στρώμα του Ficoll και χρησιμοποιώντας πολύ αργή ροή με το σιφόνι, ώστε να μην αναμιχθούν καθόλου τα δύο διαλύματα. Αφού οι σωλήνες φυγοκεντρηθούν στα 1525 $\times g$ για 21 min στους 25°C, τα αιμοπετάλια εμφανίζονται ως μεσοστοιβάδα μεταξύ της στοιβάδας του υπερκείμενου πλάσματος, γνωστό ως πλάσμα φτωχό σε αιμοπετάλια (PPP, Platelet Poor Plasma) και του στρώματος του

Ficoll. Το PPP και το Ficoll μαζί με τα άλλα έμμορφα συστατικά που έχουν διαπεράσει το στρώμα του απορρίπτονται. Τα αιμοπετάλια ξεπλένονται ήπια με 4-5 mL από το διάλυμα Tg EGTA ώστε να δεσμευτεί το Ca^{2+} και το εναιώρημα των αιμοπεταλίων που προκύπτει μεταφέρεται εκ νέου σε πλαστικούς σωλήνες που περιέχουν από 2 mL Ficoll. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στα $1525 \times g$ για 15 min στους 25°C όπου προκύπτει η ίδια μεσοστοιβάδα αιμοπεταλίων. Το υπερκείμενο ρυθμιστικό διάλυμα και το Ficoll αναρροφώνται και απορρίπτονται όπως στο προηγούμενο στάδιο. Στη συνέχεια προστίθενται 8 mL διαλύματος Tg σε κάθε σωλήνα και μετά από ήπια ανάδευση μεταφέρεται το εναιώρημα σε καθαρό σωλήνα των 14 mL. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στα $1636 \times g$ για 15 min στους 25°C μετά το πέρας της οποίας το υπερκείμενο ρυθμιστικό διάλυμα απορρίπτεται με αναστροφή και το σωληνάκι αφήνεται για πλήρη αποστράγγιση πάνω σε διηθητικό χαρτί. Ακολούθως προστίθενται 0,8 mL Tg σε κάθε σωλήνα αναδιασπείροντας τα κύτταρα με ήπιο τρόπο. Το περιεχόμενο των σωλήνων ενώνεται σε καθαρό σωλήνα μετρώντας παράλληλα τον όγκο του. Από το διάλυμα αυτό λαμβάνονται 10 μL τα οποία αραιώνονται με 990 μL Tg και φωτομετρώνται στα 530 nm. Ο αριθμός των κυττάρων στα 10 μL δίνεται από τον τύπο: $\text{κύτταρα}/10\mu\text{L} = A \times 1,25 \times 10^8$ όπου A είναι η απορρόφηση. Με βάση πρότυπη καμπύλη της οπτικής απορρόφησης συναρτήσει του αριθμού αιμοπεταλίων υπολογίζεται ο αριθμός κυττάρων και ετοιμάζεται το επιθυμητό εναιώρημα αιμοπεταλίων, το οποίο περιέχει τελική συγκέντρωση αιμοπεταλίων $1,25 \times 10^8$ κύτταρα/mL.

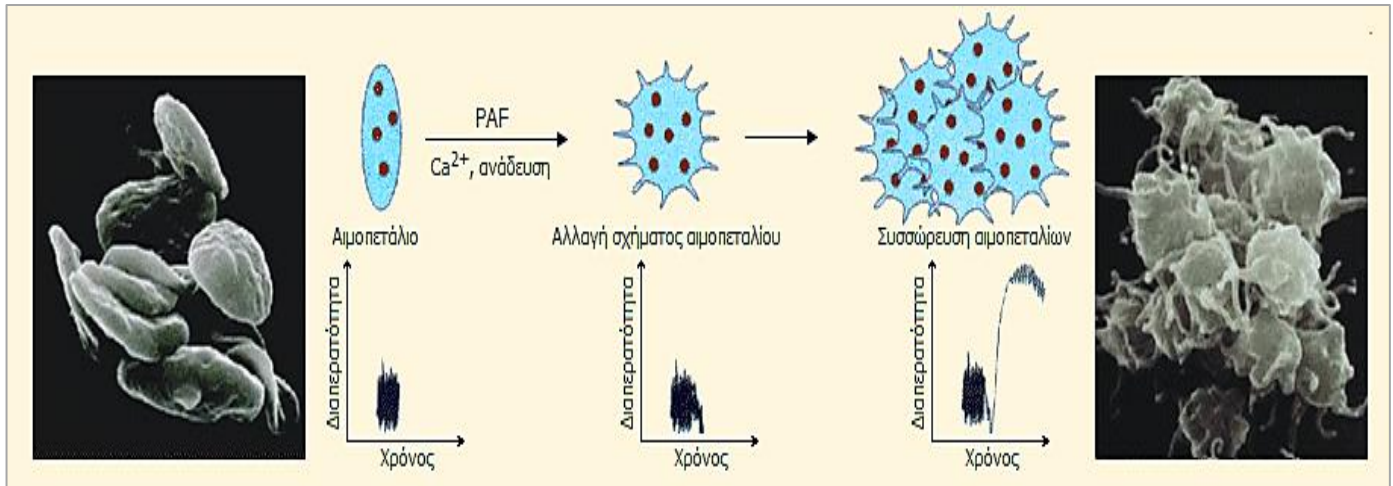
5.7.2 Συσσώρευση πλυμένων αιμοπεταλίων κουνελιού

Σε γυάλινες κυψελίδες συσσωρευματομέτρου των 0,5 mL προστίθενται 50 μL από το εναιώρημα αιμοπεταλίων συγκεντρώσεως $1,25 \times 10^8$ κύτταρα/mL και 200 μL διαλύματος Tg-Ca. Ακολουθεί επώαση για 30 min σε θερμοστατούμενο υδρόλουτρο θερμοκρασίας 37°C . Στη συνέχεια η κυψελίδα με το εναιώρημα των αιμοπεταλίων τοποθετείται στην ειδική θερμοστατούμενη υποδοχή του συσσωρευματομέτρου και προστίθενται ένας μικρός μαγνητικός αναδευτήρας ώστε να περιστρέφεται με 1.200 στροφές το λεπτό (rpm, rounds per min) κατά τη διάρκεια της μέτρησης. Αρχικά κατασκευάζεται η καμπύλη αναφοράς του ύψους της προκαλούμενης συσσώρευσης

των αιμοπεταλίων ως προς συγκέντρωσης PAF χρησιμοποιώντας διάφορες ποσότητες πρότυπου PAF με μέγιστη τιμή (100%) τη μέγιστη αντιστρεπτή συσσώρευση. Η συσσώρευση των αιμοπεταλίων είναι ανάλογη της διαπερατότητας του φωτός, καθώς τα αιμοπετάλια συσσωρεύονται και επιτρέπουν τη διέλευση της δέσμης της ακτινοβολίας. Τα προς μέτρηση δείγματα δοκιμάζονται σε κατάλληλες ποσότητες και αραιώσεις ώστε τα ύψη συσσώρευσης που προκύπτουν να βρίσκονται εντός καμπύλης για να γίνει έπειτα μέσω αυτής ο υπολογισμός της συγκέντρωσης του δείγματος.

5.7.3 Αναστολή της συσσώρευσης των πλυμένων αιμοπεταλίων κουνελλιού

Το προς εξέταση δείγμα προστίθεται στην κυψελίδα των αιμοπεταλίων εντός του συσσωρευματομέτρου και ακολουθεί 1 min επώαση. Στη συνέχεια προστίθεται ο PAF (1.846 nM) που προκαλεί γνωστού ύψους συσσώρευση και η ανασταλτική ικανότητα του δείγματος υπολογίζεται από το ποσοστό αναστολής επί του PAF. Σχεδιάζεται η καμπύλη της επί της εκατό αναστολής, συναρτήσει της συγκέντρωσης του αναστολέα που είναι ευθύγραμμη για το διάστημα 20% μέχρι 80% αναστολή και τα αποτελέσματα εκφράζονται ως ποσότητα δείγματος ικανή να προκαλέσει 50% αναστολή της συσσώρευσης των πλυμένων αιμοπεταλίων που καλείται IC₅₀ (Inhibitory Concentration for 50% Inhibition). Στην εικόνα 17 φαίνεται η αρχή βιολογικής δοκιμασίας *in vitro*. Στην αριστερή εικόνα απεικονίζεται η αρχική μορφή των αιμοπεταλίων ενώ στη δεξιά η τελική μορφή τους μετά από την επίδραση του PAF.



Εικόνα 17: Η αρχή βιολογικής δοκιμασίας *in vitro*.

5.8 Παραλαβή αίματος

Αντιδραστήρια-Όργανα

- Αιθανόλη αναλυτικής καθαρότητας
- Αντιπηκτικό διάλυμα κιτρικών. Ζυγίζονται 0,6825 g κιτρικού οξέος, 1,25 g κιτρικού νατρίου και διαλύονται σε 50 mL απεσταγμένου νερού
- Αντιπηκτικό διάλυμα κιτρικών με γλυκόζη (ACD): Σε 100 mL νερού διαλύονται 1,365 g κιτρικού οξέος, 2,5 g κιτρικού νατρίου και 2 g γλυκόζης

Αναλυτική πορεία

5.8.1 Αιμοληψία εθελοντή για προσδιορισμό επιπέδων PAF

Κάθε αιμοληψία γίνεται πρωινές ώρες μετά από 10ωρη κατάσταση νηστείας. Λαμβάνονται 10 mL αίματος και φέρονται από 5 mL σε δύο σε πλαστικούς σωλήνες των 50 mL (falcon) που περιέχουν 20 mL απόλυτης αιθανόλης. Ακολουθεί ανακίνηση των σωλήνων με ήπια αναστροφή.

5.8.2 Αιμοληψία εθελοντή για προσδιορισμό ενζύμων PAF

Κάθε αιμοληψία γίνεται πρωινές ώρες μετά από 10ωρη κατάσταση νηστείας. Λαμβάνονται 9 mL αίματος και φέρονται σε πλαστικό σωλήνα των 14 mL που περιέχει 1 mL αντιπηκτικού διαλύματος κιτρικών. Ακολουθεί ανακίνηση του σωλήνα με ήπια αναστροφή.

5.8.3 Αιμοληψία κουνελιού

Το αίμα συλλέγεται από την κεντρική αρτηρία του αυτιού του κουνελιού. Λαμβάνονται συνολικά 71 mL και φέρονται από 35,5 mL σε δύο πλαστικούς σωλήνες των 50 mL που περιέχουν 7 mL αντιπηκτικού ACD. Ακολουθεί ανακίνηση των σωλήνων με ήπια αναστροφή.

5.9 Διαχωρισμός πλάσματος και έμμορφων συστατικών από ολικό αίμα

Αντιδραστήρια-Όργανα

- Φυγόκεντροι: Heraeus Multifuge 3 L-R, Jouan C 312 και micro 22R Hettich zentrifugen
- Συσκευή υπερήχων: Sonicator supersonic Bandelin Sonoplus HD 2070 (Heinrichstraze 3-4, D-12207 Berlin, Germany)
- Διάλυμα Tris-HCl 50 mM (pH 7.4): διαλύονται 6,05 g σε 1 L νερό με ρυθμισμένο pH στο 7,4 με HCl 1N
- Φυσιολογικός ορός (NaCl 9 %): Διαλύονται 9g NaCl σε 1L νερό
- Διάλυμα δεξτράνης 3% σε NaCl 0,15 M: Διαλύονται 3g Dextrane σε 100mL ορού
- Lysis Buffer (155 mM NH_4Cl , 10 mM KHCO_3 , και 0.1 mM EDTA): Διαλύονται 8,29 g NH_4Cl , 1,0012 g KHCO_3 και 38 mg EDTA σε 1 L νερού
- Κυκλοαναδευτήρας (vortex)
- Πλαστικοί σωλήνες των 14 mL

- Αυτόματες πιπέτες

Αναλυτική πορεία

5.9.1 Απομόνωση πλάσματος

Το δείγμα ολικού αίματος που λαμβάνεται κατά την αιμοληψία (6.8.2) φυγοκεντρείται σε 194 xg για 10 min σε 25°C. Από το υπερκείμενο (πλάσμα πλούσιο σε αιμοπετάλια PRP), λαμβάνονται 2 mL τα οποία φυγοκεντρούνται σε 1.400 xg για 20 min σε 25°C. Από το υπερκείμενο που προκύπτει (πλάσμα φτωχό σε αιμοπετάλια PPP) λαμβάνονται 1,4 mL και φυγοκεντρούνται σε 20.000 xg για 60 min στους 4°C με σκοπό να απομακρυνθούν τυχόν ιικά σωματίδια από το πλάσμα. Μετά τη φυγοκέντρωση λαμβάνεται 1 mL από το υπερκείμενο και αραιώνεται σε 3 mL φυσιολογικού ορού. Ακολουθεί έντονη ανάδευση με κυκλοαναδευτήρα, το διάλυμα χωρίζεται σε erpendorfs και αποθηκεύεται στους -80°C.

5.9.2 Απομόνωση αιμοπεταλίων

Το ίζημα των 1.400 xg για 20 min σε 25°C (6.9.1) στο οποίο βρίσκονται τα αιμοπετάλια, αναδιαλύεται σε 1 mL tris (pH=7,4), αναδεύεται ήπια και ακολουθεί ομογενοποίηση με υπερήχους υπό πάγο για 1 min (30% ένταση, 4 φορές για 15 s). Το ομογενοποίημα φυγοκεντρείται σε 500 xg για 10 min στους 4 °C ώστε να απαλλαχτεί το δείγμα από άσπαστα κύτταρα, κομμάτια πυρήνα και όποιο άλλο μη επιθυμητό σωματίδιο μπορεί να εμπεριέχεται. Το υπερκείμενο είναι πλέον καθαρό ομογενοποίημα αιμοπεταλίων και αφού γίνει ισχυρή ανάδευση και προσδιορισμός πρωτεΐνης με τη μέθοδο Bradford (6.3), χωρίζεται σε erpendorfs και φυλάσσεται στους -80°C.

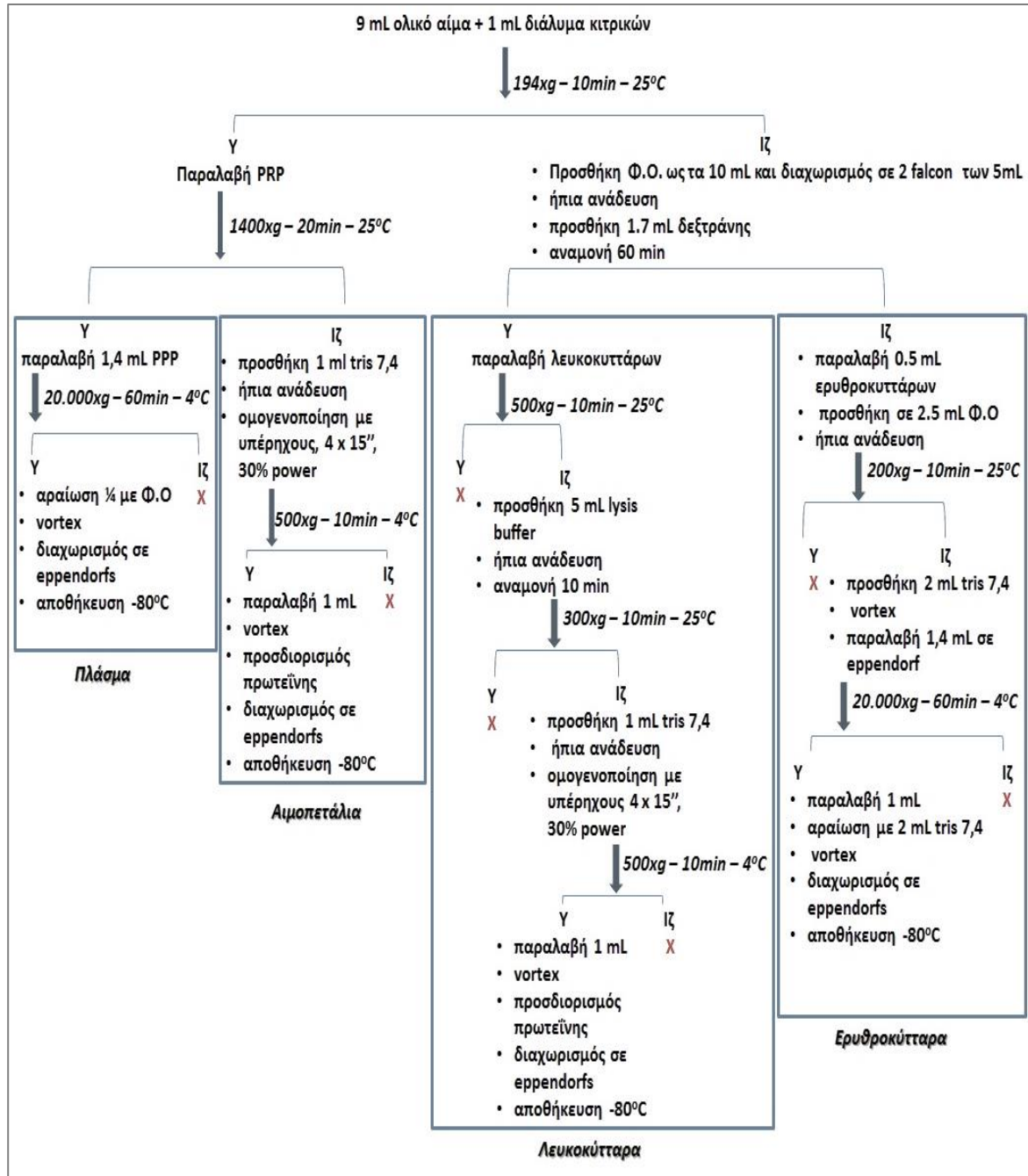
5.9.3 Απομόνωση λευκοκυττάρων

Το ίζημα των 194 xg για 10 min σε 25°C (6.9.1) περιέχει τα λευκά και τα ερυθρά αιμοσφαίρια. Αραιώνεται στα 10 mL με φυσιολογικό ορό, αναδεύεται ήπια και χωρίζεται σε δύο ίσα μέρη. Σε κάθε ένα από αυτά τα μέρη προστίθενται 1,4 mL δεξτράνης. Μετά τη παρέλευση 60 min λαμβάνεται το υπερκείμενο και φυγοκεντρείται στα 300 xg για 10 min στους 25°C. Στο ίζημα προστίθενται 5 mL lysis

buffer και αναδεύεται ήπια ώστε να λυθούν τα ερυθροκύτταρα που έχουν απομείνει και μετά από αναμονή 10 min φυγοκεντρείται στα 500 xg για 10 min στους 25°C. Το ίζημα αναδιαλύεται σε 1mL tris (pH=7,4), αναδεύεται ήπια και ακολουθεί ομογενοποίηση με υπερήχους υπό πάγο για 1 min (30% ένταση, 4 φορές για 15 s). Το ομογενοποίημα φυγοκεντρείται σε 500 xg για 10 min στους 4°C ώστε να απαλλαχτεί το δείγμα από άσπαστα κύτταρα, κομμάτια πυρήνα και όποιο άλλο μη επιθυμητό σωματίδιο μπορεί να εμπεριέχεται. Το υπερκείμενο είναι πλέον καθαρό ομογενοποίημα λευκοκυττάρων και αφού γίνει ισχυρή ανάδευση και προσδιορισμός πρωτεΐνης με τη μέθοδο Bradford (6.3), χωρίζεται σε eppendorfs και φυλάσσεται στους -80°C.

5.9.4 Απομόνωση ερυθροκυττάρων

Μετά τη πάροδο των 60 min του μίγματος λευκοκυττάρων και ερυθροκυττάρων με δεξτράνη λαμβάνεται όγκος 0,5 mL από το ίζημα και προστίθενται σε 2,5 mL φυσιολογικού ορού. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στα 200 xg για 10 min στους 25°C. Στο ίζημα προστίθενται 2 mL Tris (pH=7,4), ακολουθεί έντονη ανάδευση και παραλαμβάνεται ποσότητα 1,4 mL για φυγοκέντρηση στα 2.000 xg για 60 min στους 25°C για απομάκρυνση ιικών σωματιδίων. Λαμβάνεται 1 mL από το υπερκείμενο, αραιώνεται με 2 mL Tris (pH=7,4), αναδεύεται έντονα και αφού γίνει προσδιορισμός πρωτεΐνης με τη μέθοδο Bradford (6.3), χωρίζεται σε eppendorfs και φυλάσσεται στους -80°C.



Σχήμα 1: Σχεδιαγραμματική απεικόνιση της πορείας διαχωρισμού πλάσματος και έμμορφων στοιχείων από ολικό αίμα

5.10 Προσδιορισμός δραστηρότητας της ανεξάρτητης διθειοθρεϊτόλης PAF-φωσφοχολινοτρανσφεράσης (PAF-CPT)

Αρχή μεθόδου

Σκοπός είναι να προσδιοριστεί η δραστηρότητα του ρυθμιστικού ενζύμου της *de novo* βιοσυνθετικής πορείας του PAF μέσω της μέτρησης των παραγόμενων επιπέδων PAF που προκύπτει από τη μεταφορά της φωσφοχολίνης από τη CDP-χολίνη στο AAG [358].

Αντιδραστήρια-Όργανα

- Ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl 100 mM σε pH=8,0. Ζυγίζονται 12,114 g tris και διαλύονται σε 1 L απεσταγμένου νερού. Το pH ρυθμίζεται στο 8 με HCl 1N.
- Διάλυμα φύλαξης (stock) $MgCl_2$ 2,1 M. Ζυγίζονται 100 g $MgCl_2$ και διαλύονται σε 500 mL απεσταγμένου νερού.
- Διάλυμα εργασίας (working) $MgCl_2$ 0,4 M. Αναμειγνύονται 3,8 mL διαλύματος φύλαξης 2,1 M $MgCl_2$ και 16,2 mL ρυθμιστικού διαλύματος Tris.
- Διάλυμα DTT 0,2 M. Ζυγίζονται 0,617g DTT και διαλύονται σε 20 mL απεσταγμένου νερού
- Διάλυμα φύλαξης (stock) CDP-Chol 100 mM. Διαλύονται 0,25 g σε 4,6 mL απεσταγμένου νερού
- Διάλυμα εργασίας (working) CDP-Chol 4mM. Αναμειγνύονται 40 μ L stock CDP-Chol και 960 μ L απεσταγμένου νερού.
- Αιθανολικό διάλυμα AAG 10 mM. Διαλύονται 5 mg AAG (95% καθαρότητας) σε 1.325 μ L αιθανόλης
- Διάλυμα εργασίας αλβουμίνης ορού βοός (BSA) 40 mg/mL. Διαλύονται 0,4 g BSA σε 10 mL απεσταγμένου νερού
- Διάλυμα EDTA 20 mM σε Tris-HCl 100 mM με pH 8,0. Διαλύονται 0,3723g EDTA σε 50 mL ρυθμιστικού διαλύματος Tris-HCl 100 mM pH 8,0.

- Κυκλοαναδευτήρας
- Χρονόμετρο
- Θερμοστατούμενο υδρόλουτρο
- Σωλήνες πολυπροπυλενίου
- Αυτόματες πιπέτες

Αναλυτική πορεία

Σε σωλήνα πολυπροπυλενίου φέρονται τα εξής διαλύματα: 10 μL MgCl_2 0,4 M, 15 μL διαλύματος DTT 0,2 M, 5 μL διαλύματος EDTA 20 mM, 5 μL διαλύματος BSA 40 mg/mL και κατάλληλη ποσότητα ρυθμιστικού διαλύματος ώστε ο τελικός όγκος μέσα στο σωλήνα να είναι 200 μL . Ακολουθεί έντονη ανάδευση και το μίγμα επωάζεται στους 37°C για 5 min. Στο μίγμα αυτό προστίθενται πρώτα το ενζυμικό παρασκεύασμα, ακολουθεί κυκλοανάδευση, μετά από 30 s προστίθενται 2 μL αιθανολικού διαλύματος AAG με κυκλοανάδευση, ενώ μετά από άλλα 30 s προστίθεται 5 μL διαλύματος εργασίας CDP-χολίνης με κυκλοανάδευση, οπότε και ξεκινά η αντίδραση. Μετά την πάροδο 20 min στους 37°C, η αντίδραση σταματά με την προσθήκη 0,5 mL διαλύματος μεθανόλης που προκαλεί απενεργοποίηση του ενζυμικού παρασκευάσματος. Για την εκχύλιση του παραγομένου PAF προστίθενται 0,25 mL χλωροφορμίου για να προκύψει διάλυμα μίας φάσης χλωροφορμίου : μεθανόλης : νερού με αναλογία 1:2:0,8 (v/v/v) και μετά από έντονη ανάδευση σε vortex προστίθενται 0,25 mL χλωροφορμίου και 0,25 mL νερού για να προκύψει διφασικό διάλυμα χλωροφορμίου : μεθανόλης : νερού με αναλογία 1:1:0,9 (v/v/v) σύμφωνα με τη μέθοδο εκχύλισης Bligh-Dyer (6.2). Μετά την παραμονή 24 h σε 4°C, συλλέγεται η χλωροφορμική φάση, εξατμίζεται σε ρεύμα N_2 , αναδιαλύεται σε μικρό όγκο χλωροφορμίου:μεθανόλης με αναλογία 1:1 και φυλάσσεται στους -20°C.

5.11 Προσδιορισμός δραστηριότητας της λυσο-PAF-ακετυλοτρανσφεράσης (lyso-PAF-AT)

Αρχή μεθόδου

Σκοπός είναι να προσδιοριστεί η δραστηριότητα του ρυθμιστικού ενζύμου της βιοσυνθετικής πορείας αναδιαμόρφωσης του PAF μέσω της μέτρησης των επιπέδων του παραγόμενου PAF που προκύπτει από τη μεταφορά της ακετυλοομάδας από το ακετυλο-CoA στο λυσο-PAF [359].

Αντιδραστήρια-Όργανα

- Ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl 50 mM pH=7,4. Διαλύονται 0,605 g Tris σε 100 mL απεσταγμένου νερού και το pH ρυθμίζεται στο 7,4 με HCl 1 N.
- Διάλυμα εργασίας αλβουμίνης ορού βοός (BSA) 12,5 mg/mL. Διαλύονται 125 mg BSA ελεύθερης λιπαρών οξέων (sigma) σε 10 mL απεσταγμένου νερού
- Διάλυμα εργασίας Lyso-PAF (working) Φέρονται σε βιδωτό σωλήνα 146 μ L stock Lyso-PAF, εξατμίζονται σε ρεύμα αζώτου και αναδιαλύονται με 600 μ L BSA 12,5 mg/mL.
- Διάλυμα εργασίας Ac-CoA (working). Διαλύονται 25 mg Ac-CoA (94%) σε 1.302 μ L ρυθμιστικού διαλύματος Tris 50 mM σε pH=7,4.
- Θερμοστατούμενο υδρόλουτρο
- Σωλήνες πολυπροπυλενίου
- Χρονόμετρο

Αναλυτική πορεία

Σε σωλήνα πολυπροπυλενίου φέρονται 4 μ L Lyso-PAF 12,5 mg/mL, 2 μ L Ac-CoA 20 mM και κατάλληλη ποσότητα ρυθμιστικού διαλύματος Tris (pH=7,4) με σκοπό ο τελικός όγκος να ανέρχεται στα 200 μ L. Το μίγμα αναδεύεται και επωάζεται σε θερμοστατούμενο υδρόλουτρο στους 37°C για 5 min. Αφού προστεθεί το ενζυμικό παρασκεύασμα ακολουθεί επώαση της αντίδρασης σε θερμοστατούμενο

υδρόλουτρο στους 37°C για 30 min. Η αντίδραση σταματά με την προσθήκη 0,5 mL διαλύματος μεθανόλης 2% που προκαλεί απενεργοποίηση του ενζυμικού παρασκευάσματος. Για την εκχύλιση του παραγομένου PAF προστίθενται 0,25 mL χλωροφορμίου για να προκύψει διάλυμα μίας φάσης χλωροφορμίου : μεθανόλης : νερού με αναλογία 1:2:0,8 και μετά από έντονη ανάδευση προστίθενται 0,25 mL χλωροφορμίου και 0,25 mL νερού για να προκύψει διφασικό διάλυμα χλωροφορμίου : μεθανόλης : νερού με αναλογία 1:1:0,9 σύμφωνα με τη μέθοδο εκχύλισης Bligh-Dyer (6.2). Μετά από 24 h παραμονή στους 4°C συλλέγεται η χλωροφορμική φάση, εξατμίζεται σε ρεύμα αζώτου, αναδιαλύεται σε διάλυμα χλωροφορμίου:μεθανόλης με αναλογία 1:1 και φυλάσσεται στους -20°C.

5.12 Ενζυμική δοκιμασία PAF-ακετυλοϋδρολάσης (PAF-AH) και της ισομορφής της λιποπρωτεϊνικής φωσφολιπάσης A2 (Lp-PLA2)

Αρχή μεθόδου

Σκοπός είναι να προσδιοριστεί η δραστικότητα του ενζύμου PAF ακετυλοϋδρολάση και της ισομορφής της λιποπρωτεϊνικής φωσφολιπάσης A2 (Lp-PLA2) της αποικοδομητικής πορείας του PAF μέσω της εκπεμπόμενης ραδιενέργειας του προϊόντος ($[^3\text{H}]\text{-CH}_3\text{COOH}$). Το επισημασμένο οξύ οξύ βρίσκεται στο υπερκείμενο διάλυμα μετά την επώαση του ενζυμικού παρασκευάσματος με $[^3\text{H}]\text{-PAF}$ παρουσία BSA. Ακολουθεί η καταβύθιση των πρωτεϊνών χρησιμοποιώντας TCA όπου και διαχωρίζεται το $[^3\text{H}]\text{-CH}_3\text{COOH}$ από τον μη αντιδρών $[^3\text{H}]\text{-PAF}$ ο οποίος καταβυθίζεται ως πρωτεϊνικό σύμπλοκο της BSA [360].

Αντιδραστήρια-Όργανα

- Ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl 50 mM pH=7,4. Διαλύονται 0,605 g Tris σε 100 mL απεσταγμένου νερού και η ρύθμιση του pH γίνεται με HCl 1 N.
- Βόεια αλβουμίνη ορού (BSA) ελεύθερης λιπαρών οξέων (sigma)
- Διάλυμα αλβουμίνης ορού βοός (BSA) 10 mg/mL. Διαλύονται 100 mg BSA και 10 mL απεσταγμένου νερού.

- Διάλυμα αλβουμίνης ορού βοός (BSA) 100 mg/mL Διαλύονται 1 g BSA και 10 mL απεσταγμένου νερού.
- Πρότυπος PAF (I6:0) (Sigma)
- Διάλυμα φύλαξης (stock) PAF σε μεθανόλη συγκέντρωσης $2,308 \cdot 10^{-4}$ M.
- Διάλυμα εργασίας (working) PAF σε BSA 10 mg/mL συγκέντρωσης 800 μ M και ειδικής δραστηριότητας 1000 cpm/nmol.

Φέρεται κατάλληλη ποσότητα διαλύματος ψυχρού stock PAF και ραδιενεργού PAF σε βιδωτό σωλήνα και αφού εξατμιστεί ο διαλύτης σε ρεύμα αζώτου αναδιαλύεται σε κατάλληλη ποσότητα διαλύματος BSA 10 mg/mL έτσι ώστε να προκύψει συγκέντρωση PAF 800 μ M και κάθε 5 μ L να αντιστοιχούν σε 10.000 cpm.

- Διάλυμα τριχλωροξικού οξέος (CCl_3COOH , TCA) 40% (w/v). Διαλύονται 40g TCA σε 100 mL νερού.
- Αυτόματες πιπέτες
- Φυγόκεντρος Hereaus Labofuge 400R.
- Θερμοστατούμενο υδρόλουτρο
- Ειδικοί πλαστικοί σωλήνες φυγόκεντρου των 0,5 mL (erppendorf)

Αναλυτική πορεία

Σε σωλήνα erppendorf φέρονται 5 μ L μίγματος ραδιενεργού/ψυχρού PAF και κατάλληλη ποσότητα ρυθμιστικού διαλύματος Tris (pH=7,4) ώστε ο τελικός όγκος να ανέρχεται στα 200 μ L. Ακολουθεί ανάδευση και επώαση σε θερμοστατούμενο υδρόλουτρο στους 37°C για 30 min. Αφού προστεθεί το ενζυμικό παρασκεύασμα ακολουθεί επώαση της αντίδρασης σε θερμοστατούμενο υδρόλουτρο στους 37°C για 30 min. Μετά το πέρας της αντίδρασης προσθέτονται 2 μ L διαλύματος BSA 100 mg/mL για να εξασφαλιστεί η ποσοτική δέσμευση των προϊόντων από τη BSA και μετά από 30 s προσθέτονται 64 μ L διαλύματος TCA 40%. Το μίγμα αφήνεται σε πάγο για 30 min ώστε να καταβυθιστούν οι πρωτεΐνες και στη συνέχεια

φυγοκεντρείται σε μικροφυγόκεντρο για 5 λεπτά σε 16.060 xg στους 4°C. Παραλαμβάνονται 100 μ L από το υπερκείμενο και μετρώνται μέσω ραδιενέργειας (6.13).

5.13 Μέτρηση ραδιενέργειας με μετρητή σπινθηρισμού υγρών

Αντιδραστήρια – Όργανα

- Ναφθαλίνιο (Sigma)
- Διοξάνη (Riedel de Haen)
- 2,5-Διφαινυλοξαζόλιο (PPO), BDH Chemicals
- 1,4-Δι-2-(5-φαινυλοξαζόλιο) βενζόλιο (POPOP), BDH Chemicals
- Υγρό σπινθηρισμού με βάση διοξάνη (dioxane base). Το διάλυμα παρασκευάζεται διαλύοντας 7 g PPO, 0,3 g POPOP και 100 g ναφθαλινίου σε 1 L διοξάνης και 200 mL απεσταγμένου νερού.
- Κυκλοαναδευτήρας (vortex)
- Πλαστικά φιαλίδια μιας χρήσης (vials) όγκου 20 mL.
- Ειδικές υποδοχές (racks) του μετρητή σπινθηρισμού υγρών
- Μετρητής σπινθηρισμού υγρών Wallac 1209 Rackbeta, Pharmacia, συνδεδεμένος με καταγραφέα Facit B3100

Αρχή μεθόδου

Το προς μέτρηση δείγμα αναμιγνύεται με το διάλυμα σπινθηρισμού που περιέχει ένα διαλύτη και μία ή περισσότερες ουσίες που φθορίζουν. Τα εκπεμπόμενα από το ραδιενεργό δείγμα β σωματίδια διεγείρουν το διαλύτη και αυτός με τη σειρά του διεγείρει τις φθορίζουσες ουσίες που εκπέμπουν φωτόνια, τα οποία καταγράφονται από ένα φωτοπολλαπλασιαστή. Το σύνολο των φωτονίων, που εκπέμπονται μετά από κάθε εκπομπή β σωματιδίων, ανιχνεύονται σαν ένας παλμός, ο οποίος

μεταβιβάζεται σε ένα σύστημα μέτρησης το οποίο καταγράφει τους παλμούς σαν ξεχωριστές κρούσεις .

Αναλυτική πορεία

Τα δείγματα όγκου 100 μ L φέρονται σε πλαστικά φιαλίδια που περιέχουν 5 mL υγρού σπινθηρισμού. Ακολουθεί ισχυρή ανάδευση και τοποθετούνται με ειδικές υποδοχές (racks) στο μετρητή σπινθηρισμού υγρών. Μετρώνται οι κρούσεις του ραδιενεργού δείγματος για 5min και τα αποτελέσματα εκφράζονται σε κρούσεις ανά λεπτό (cpm). Εκτός από τα δείγματα γίνεται και τυφλού προσδιορισμός που περιέχει μόνο το υγρό σπινθηρισμού.

5.14 Μέτρηση κυτταροκινών IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70 και TNF α

Αντιδραστήρια – Όργανα

- Προπαρασκευασμένο kit Cytometric Bead Array (CBA) για IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70 και TNF α (BD) το οποίο περιλαμβάνει:
 - Πρότυπα διαλύματα κυτταροκινών με λυοφιλοποιημένα ανασυνδιασμένα ανθρώπινα αντισώματα IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70 και TNF α
 - Σφαιρίδια πρόσδεσης ανθρώπινων IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70 και TNF α
 - Διάλυμα στρεπταβιδίνης-φυκοερυθρίνης (PE Detection Reagent)
 - Ρυθμιστικό διάλυμα της μεθόδου (Assay Diluent)
 - Ρυθμιστικό διάλυμα πλάσματος (Serum Enhancement Buffer)
 - Διάλυμα έκπλυσης (Wash Buffer)
- Ειδικοί σωλήνες κυτταρομέτρου από πολυστυρένιο των 5mL και διαστάσεων 12x75 mm (BD)
- Αυτόματες πιπέτες

- Ψυχόμενη μικροφυγόκεντρος micro 22R Hettich zentrifugen

Αρχή μεθόδου

Η μέθοδος βασίζεται στην πρόσδεση διαλυτών πρωτεϊνών σε σφαιρίδια γνωστού μεγέθους και φθορισμού έτσι ώστε να είναι εφικτή η μέτρηση των υπό ανάλυση πρωτεϊνών με κυτταρομετρία ροής. Με τη μέθοδο των μικροσφαιριδίων επιτυγχάνεται ο ταυτόχρονος προσδιορισμός πολλαπλών παραγόντων σε βιολογικά δείγματα όπου οι συγκεντρώσεις είναι ιδιαίτερα μικρές. Για τη μέτρηση χρησιμοποιούνται σφαιρίδια πρόσδεσης που είναι συζευγμένα με ειδικά αντισώματα. Κατά τη επώαση των σφαιριδίων με το αντίσωμα και το δείγμα δημιουργείται ένα σύμπλοκο τύπου σάντουιτς το οποίο φθορίζει και μετράται με κυτταρομετρία ροής ανάλογα το μέγεθος του σφαιριδίου και τα χαρακτηριστικά της φθορίζουσας χρωστικής.

Αναλυτική πορεία

I. Προετοιμασία πρότυπων διαλυμάτων για την κατασκευή της καμπύλης αναφοράς

Τα λυοφιλοποιημένα αντισώματα αναδιαλύονται σε 2 mL από το ρυθμιστικό διάλυμα της μεθόδου και μετά από παραμονή 15 min σε θερμοκρασία δωματίου παρασκευάζονται διαδοχικά από το πυκνό διάλυμα οι αραιώσεις 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128, 1:256, 1:512, 1:1024 καθώς και το τυφλό δείγμα αναφοράς.

II. Προετοιμασία διαλυμάτων μικροσφαιριδίων

Στο σημείο αυτό τα μικροσφαιρίδια αναδιαλύονται σε ρυθμιστικό διάλυμα ορού ώστε να μειωθεί το θετικό σφάλμα από τη μη ειδική σύνδεση λόγω των πρωτεϊνών του ορού. Συγκεκριμένα κάθε φιαλίδιο μικροσφαιριδίων αναδεύεται ισχυρά με κυκλοαναδευτήρα και στη συνέχεια προστίθενται 10 μ L/δείγμα από το κάθε φιαλίδιο. Το διάλυμα φυγοκεντρείται στα 200 xg για 5 min σε θερμοκρασία δωματίου. Αφού απορριφθεί το υπερκείμενο αναδιαλύονται με το ρυθμιστικό διάλυμα ορού ίσου όγκου και το διάλυμα αναδεύεται ισχυρά. Ακολουθεί επώαση για 30 min σε θερμοκρασία δωματίου απουσία φωτός.

III. Διαδικασία δοκιμασίας κυτταροκινών πλάσματος

Σε σωλήνα πολυστυρενίου προστίθενται 50 μ L από το διάλυμα μικροσφαιριδίων και 50 μ L από το δείγμα HIV πλάσματος. Παράλληλα με τα δείγματα προετοιμάζονται και τα πρότυπα διαλύματα. Συγκεκριμένα επωάζονται για 1,5 h σε θερμοκρασία δωματίου απουσία φωτός. Στη συνέχεια προστίθεται 1 mL από το διάλυμα έκπλυσης και ακολουθεί φυγοκέντρηση 200 xg για 5 min σε θερμοκρασία δωματίου. Αφού απορριφθεί το υπερκείμενο προστίθενται 50 μ L διαλύματος στρεπταβιδίνης-φυκοερυθρίνης και αναδεύονται ήπια οι σωλήνες για να επιτευχθεί η επαναιώρηση των σφαιριδίων. Αφού επωαστούν για 1,5 h σε θερμοκρασία δωματίου και απουσία φωτός προστίθεται εκ νέου 1 mL από το διάλυμα έκπλυσης και ακολουθεί φυγοκέντρηση στις ίδιες συνθήκες. Μετά την απόρριψη του υπερκειμένου προστίθενται 300 μ L από το διάλυμα έκπλυσης και ακολουθεί η μέτρηση των επιπέδων των κυτταροκινών σε κυτταρομετρητή ροής.

5.15 Μέτρηση του Αγγειακού Ενδοθηλιακού Αυξητικού Παράγοντα (VEGF)

Αντιδραστήρια – Όργανα

- Προπαρασκευασμένο kit Cytometric Bead Array (CBA) Human VEGF Flex Set (BD) το οποίο περιλαμβάνει:
 - Πρότυπο διάλυμα λυοφιλοποιημένου ανασυνδυασμένου ανθρώπινου αντισώματος VEGF
 - Σφαιρίδια πρόσδεσης ανθρώπινου VEGF
 - Διάλυμα στρεπταβιδίνης-φυκοερυθρίνης (PE Detection Reagent)
- Προπαρασκευασμένο kit: Cytometric Bead Array (CBA) Human Soluble Protein Master Buffer Kit (BD) το οποίο περιλαμβάνει:
 - Ρυθμιστικό διάλυμα της μεθόδου (Assay Diluent)
 - Ρυθμιστικό διάλυμα των σφαιριδίων (Capture Bead Diluent)

- Αντιδραστήριο ανίχνευσης (Detection Reagent Diluent)
- Διάλυμα έκπλυσης (Wash Buffer)
- Ρυθμιστικό διάλυμα πλάσματος (Capture Bead Diluent for Serum)
- Ειδικοί σωλήνες κυτταρομέτρου από πολυστυρένιο των 5mL και διαστάσεων 12x75 mm (BD)
- Αυτόματες πιπέτες
- Ψυχόμενη μικροφυγόκεντρος micro 22R Hettich zentrifugen

Αρχή μεθόδου

Η μέθοδος βασίζεται στην πρόσδεση διαλυτών πρωτεϊνών σε σφαιρίδια γνωστού μεγέθους και φθορισμού έτσι ώστε να είναι εφικτή η μέτρηση των υπό ανάλυση πρωτεϊνών με κυτταρομετρία ροής. Με τη μέθοδο των μικροσφαιριδίων επιτυγχάνεται ο προσδιορισμός παραγόντων ιδιαίτερα μικρών συγκεντρώσεων σε βιολογικά δείγματα. Για τη μέτρηση χρησιμοποιούνται σφαιρίδια πρόσδεσης που είναι συζευγμένα με ειδικά αντισώματα. Κατά τη επώαση των σφαιριδίων με το αντίσωμα και το δείγμα δημιουργείται ένα σύμπλοκο τύπου σάντουιτς το οποίο φθορίζει και μετράται με κυτταρομετρία ροής ανάλογα το μέγεθος του σφαιριδίου και τα χαρακτηριστικά της φθορίζουσας χρωστικής.

Αναλυτική πορεία

I. Προετοιμασία πρότυπων διαλυμάτων για την κατασκευή της καμπύλης αναφοράς

Τα λυοφιλοποιημένα αντισώματα αναδιαλύονται σε 4 mL από το ρυθμιστικό διάλυμα της μεθόδου και μετά από παραμονή 15 min σε θερμοκρασία δωματίου και ήπια ανάδευση παρασκευάζονται διαδοχικά από το πυκνό διάλυμα οι αραιώσεις 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128, 1:256, 1:512, 1:1024 καθώς και το τυφλό δείγμα αναφοράς.

II. Προετοιμασία διαλυμάτων μικροσφαιριδίων

Στο σημείο αυτό τα μικροσφαιρίδια αναδιαλύονται σε ρυθμιστικό διάλυμα ορού ώστε να μειωθεί το θετικό σφάλμα από τη μη ειδική σύνδεση λόγω των πρωτεϊνών του ορού. Συγκεκριμένα το φιαλίδιο μικροσφαιριδίων αναδεύεται ισχυρά με κυκλοαναδευτήρα και στη συνέχεια υπολογίζεται ο όγκος που θα χρειαστεί ώστε κάθε δείγμα να περιέχει 1 μL . Προστίθενται 0,5 mL διαλύματος έκπλυσης και ακολουθεί φυγοκέντρηση στα 200 xg για 5 min σε θερμοκρασία δωματίου. Αφού απορριφθεί το υπερκείμενο αναδιαλύονται με το ρυθμιστικό διάλυμα ορού με τελικό όγκο 50 μL ανά δείγμα. Ακολουθεί ισχυρή ανάδευση και επώαση για 15 min σε θερμοκρασία δωματίου.

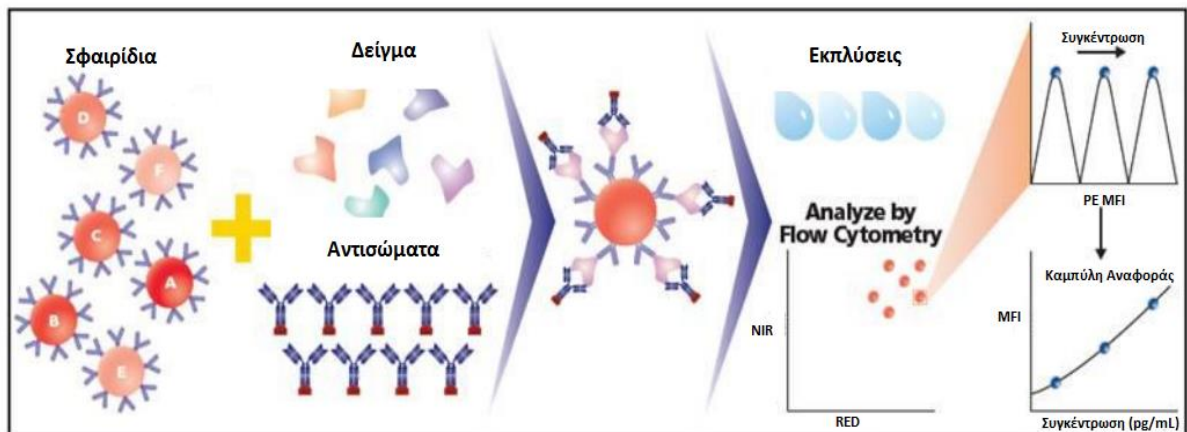
III. Διαδικασία δοκιμασίας δειγμάτων

Σε σωλήνα πολυστυρενίου προστίθενται 50 μL από τα πρότυπα διαλύματα και τα δείγματα πλάσματος. Στη συνέχεια προστίθενται 50 μL από το διάλυμα μικροσφαιριδίων και επωάζονται για 1 h σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολουθεί προσθήκη 50 μL από το διάλυμα ανίχνευσης και αφού αναδευτούν ήπια επωάζονται για 2 h σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια προστίθεται 1 mL από το διάλυμα έκπλυσης και ακολουθεί φυγοκέντρηση 200 xg για 5 min σε θερμοκρασία δωματίου. Αφού απορριφθεί το υπερκείμενο προστίθενται 300 μL από το διάλυμα έκπλυσης και ακολουθεί η μέτρηση των επιπέδων του VEGF σε κυτταρομετρητή ροής.

5.16 Κυτταρομετρία ροής

Η κυτταρομετρία ροής (Flow Cytometry, FC) είναι μια τεχνική αυτοματοποιημένης κυτταρικής ανάλυσης που επιτρέπει τη μέτρηση μεμονωμένων μικροσκοπικών σωματιδίων καθώς διέρχονται σε νηματική ροή από ένα σταθερό σημείο όπου προσπίπτει ακτίνα laser. Στην κυτταρομετρία ροής το υπό εξέταση δείγμα είναι υπό μορφή εναιωρήματος και υπόκειται σε επεξεργασία με ειδικά κατά περίπτωση μονοκλωνικά αντισώματα συζευγμένα με φθορίζουσες ουσίες ή με φθορίζουσες χρωστικές ανάλογες προς τη χημική παράμετρο που αναζητείται.

- Η μέθοδος CBA είναι μια εφαρμογή της κυτταρομετρίας ροής, η οποία επιτρέπει τον προσδιορισμό πολλών κυτταροκινών, προφλεγμονωδών, αυξητικών και άλλων παραγόντων την ίδια χρονική στιγμή, σε πολύ μικρή ποσότητα δείγματος. Το σύστημα περιέχει ομοιόμορφου τύπου μαγνητικά σφαιρίδια (beads), με διακριτή ένταση φθορισμού μιας εκπεμπόμενης κόκκινης χρωστικής (PE). Κάθε σφαιρίδιο είναι ομοιοπολικά συνδεδεμένο με αντισώματα που αναγνωρίζουν και δεσμεύουν μια συγκεκριμένη πρωτεΐνη-αντιγόνο. Οι προς εξέταση παράγοντες δεσμεύονται στα αντισώματα και περνώντας το δείγμα από τον κυτταρομετρητή ροής λαμβάνονται μετρήσεις διαφορετικής έντασης φθορισμού, οι οποίες είναι ανάλογες με τη συγκέντρωση του εκάστοτε παράγοντα στο δείγμα. Στην εικόνα 18 απεικονίζεται η αρχή μεθόδου CBA. Τα σφαιρίδια, το δείγμα και τα αντισώματα δημιουργούν ένα σύμπλοκο τύπου σάντουιτς με χαρακτηριστική ένταση φθορισμού ανάλογη της συγκέντρωσης του μετρούμενου παράγοντα.



Εικόνα 18: Η αρχή μεθόδου CBA.

5.17 Στατιστική επεξεργασία

Ο έλεγχος κανονικής κατανομής έγινε μέσω γραφημάτων P-P και χρησιμοποιώντας το κριτήριο Shapiro-Wilk. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως διάμεσο και ενδοτεταρτημοριακό εύρος (25° - 75°). Για την κάθε ομάδα χρησιμοποιήθηκε η μη παραμετρική Friedman ανάλυση (p_{time}) για τις συνολικές διαφοροποιήσεις κατά τη διάρκεια της 12μηνιας μελέτης ενώ για τη διαφοροποίηση καθεμιάς από τις χρονικές τιμές με το χρόνο έναρξης (baseline) χρησιμοποιήθηκε το κριτήριο Wilcoxon (p_{1-12}). Για τη σύγκριση των ομάδων χρησιμοποιήθηκε repeated measures ANOVA μετά από Rank των τιμών απ' όπου προέκυψαν οι συνολικές διαφοροποιήσεις ($P_{\text{intervention}} / P_{\text{int}}$) και οι επιμέρους (P_{1-12}) για κάθε χρονική στιγμή. Για την ανάλυση των συσχετίσεων χρησιμοποιήθηκε το κριτήριο Spearman και μελετήθηκαν οι μεταβολές των μεγεθών μεταξύ των χρονικών στιγμών έναρξης και λήξης της μελέτης (Δt_{12-0}). Ως στατιστική σημαντικότητα ορίστηκε το $p < 0,05$ και η ανάλυση των δεδομένων έγινε με τη χρήση του στατιστικού λογισμικού IBM SPSS Statistics.20.0.0 (IBM Inc., Chicago, IL, USA).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6^ο: Αποτελέσματα

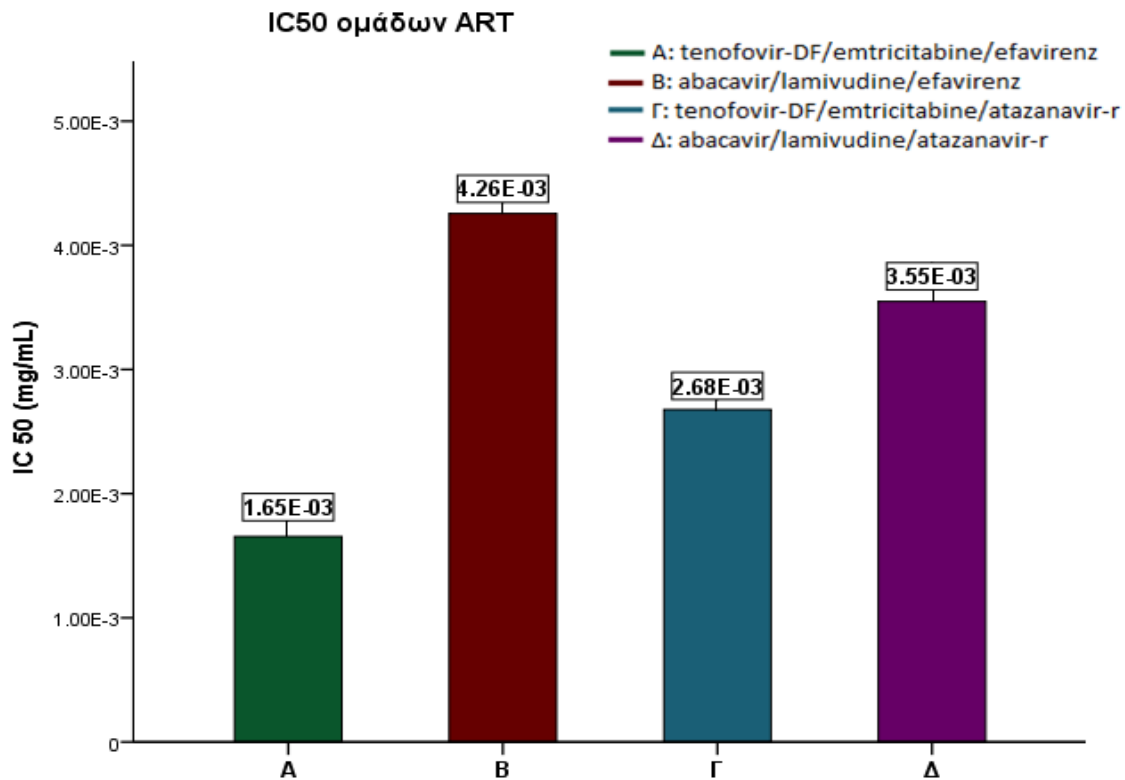
6.1 *In vitro* επίδραση αντιρετροϊκών φαρμάκων στη συσσωρευτική δράση του PAF

Για τον προσδιορισμό του IC₅₀ χρησιμοποιήθηκαν οι συνδυασμοί των χαπιών του πίνακα 5.

Πίνακας 5: Περιγραφή αντιρετροϊκών ομάδων και αγωγών.

Ομάδα	Συνδυασμός ART (mg δραστικής ουσίας)	Χάπι(α)	Αναλογία
A	tenofovir-DF (300)/emtricitabine (200)/efavirenz (600)	Atripla®	1
B	Abacavir (600)/ lamivudine (300)/efavirenz (600)	Kivexa®:Stocrin®	1:1
Γ	tenofovir-DF (300)/emtricitabine (200)/atazanavir (300) - ritonavir (100)	Truvada®:Reyataz®:Norvir®	1:1:1
Δ	Abacavir (600)/ lamivudine (300)/ atazanavir (300) - ritonavir (100)	Kivexa®:Reyataz®:Norvir®	1:1:1

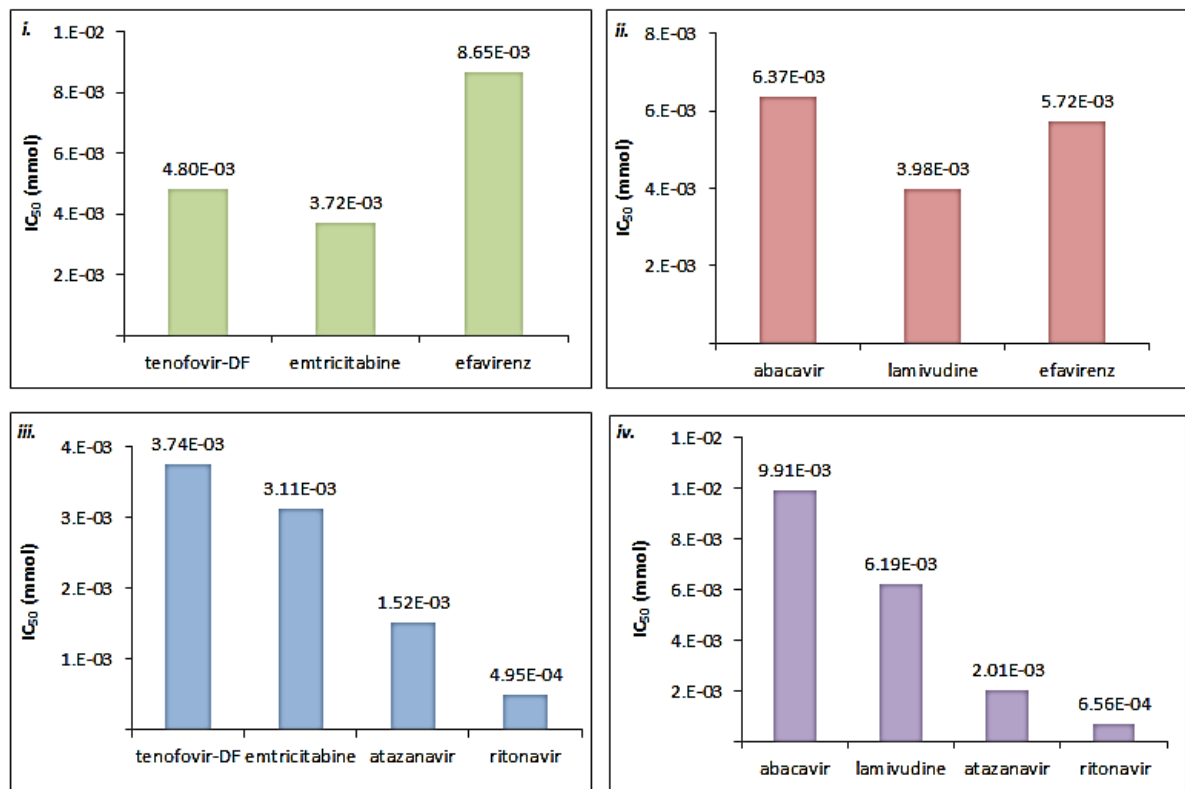
Κάθε χάπι κονιοποιήθηκε σε γουδί και αφού ζυγίστηκαν οι κατάλληλες ποσότητες για τη δημιουργία των αντιρετροϊκών συνδυασμών, διαλύθηκαν σε BSA (2mg/mL). Στη συνέχεια προσδιορίστηκε το IC₅₀ έναντι στον PAF με τη μέθοδο της συσσώρευσης των πλυμένων αιμοπεταλίων κουνελιού (5.7.3). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στο σχήμα 2. Από τα δεδομένα προκύπτει ότι ο αντιρετροϊκός συνδυασμός με τη μεγαλύτερη *in vitro* ανασταλτική δράση έναντι στη συσσώρευση των αιμοπεταλίων, προκαλούμενη από τον PAF (1,85 nM), είναι ο tenofovir-DF/emtricitabine/ efavirenz και ακολουθεί ο tenofovir-DF/emtricitabine/ atazanavir-r, ο abacavir/lamivudine/ atazanavir-r ενώ τη μικρότερη αναστολή έδειξε ο συνδυασμός abacavir/lamivudine/ efavirenz.



Σχήμα 2: *In vitro* επίδραση αντιρετροϊκών συνδυασμών έναντι στη συσσωρευτική δράση του PAF σε πλυμένα αιμοπετάλια κουνελιού.

A: tenofovir-DF/emtricitabine /efavirenz, B: abacavir/lamivudine /efavirenz, Γ: tenofovir-DF/emtricitabine /atazanavir-r και Δ: abacavir/lamivudine/atazanavir-r. Τα αποτελέσματα είναι εκφρασμένα σε IC₅₀ (mg/mL).

Επιπλέον, υπολογίστηκε η επιμέρους επίδραση που έχει η κάθε δραστική ουσία στο IC_{50} του εκάστοτε αντιρετροϊκού συνδυασμού και παρουσιάζεται στο σχήμα 3.



Σχήμα 3: *In vitro* επίδραση των επιμέρους δραστικών ουσιών του κάθε αντιρετροϊκού συνδυασμού έναντι στη συσσωρευτική δράση του PAF σε πλυμένα αιμοπετάλια κουνελιού.

i. tenofovir-DF/emtricitabine /efavirenz, ii: abacavir/lamivudine /efavirenz, iii: tenofovir-DF/emtricitabine /atazanavir-r και iv: abacavir/lamivudine/atazanavir-r. Τα αποτελέσματα είναι εκφρασμένα σε IC_{50} (nmol δραστικής ουσίας).

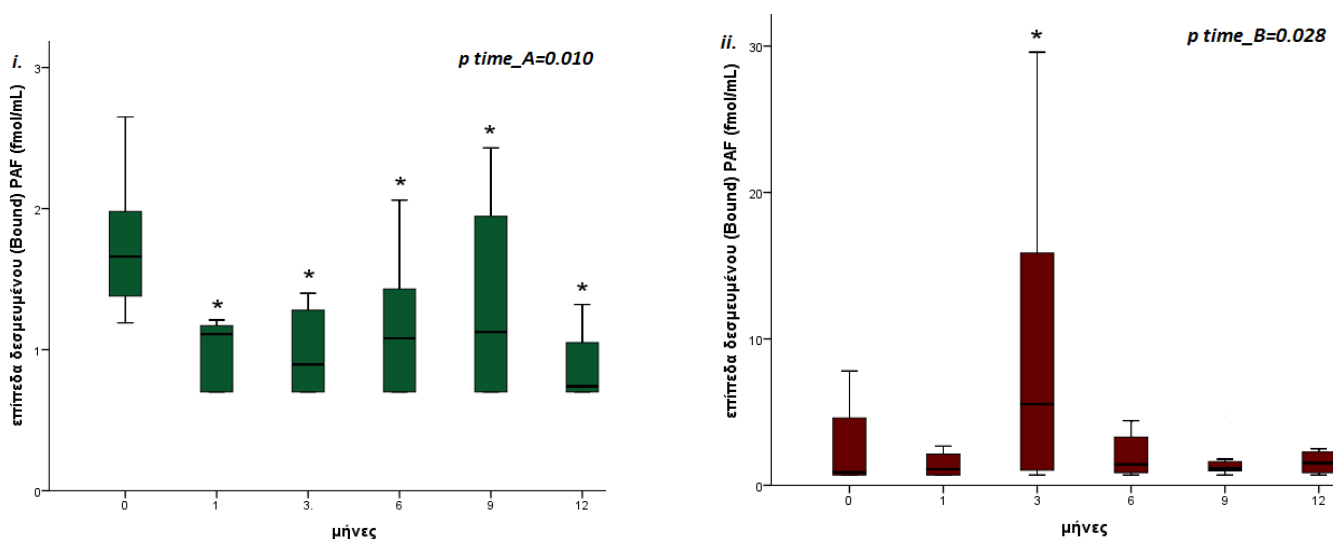
6.2 In vivo επίδραση αντιρετροϊκής αγωγής στα επίπεδα PAF

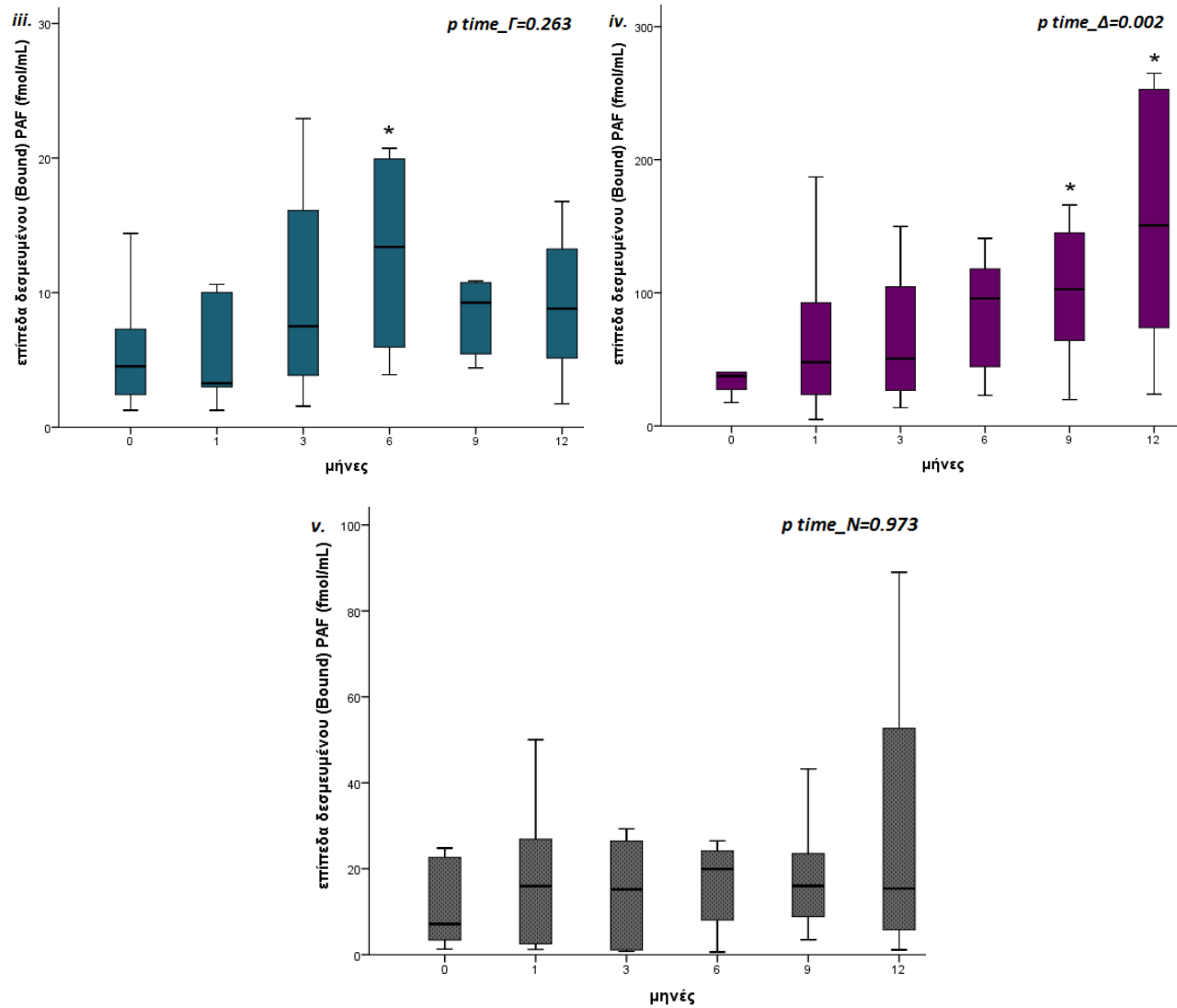
Ολικό αίμα παραλαμβάνεται από τους ασθενείς (5.8.1) και ακολουθεί εκχύλιση λιποειδών με τη μέθοδο Bligh-Dyer (5.2) και διαχωρισμός του δεσμευμένου (Bound) και του ελεύθερου (Free) PAF. Με τον όρο δεσμευμένος περιγράφεται ο PAF που περιέχεται στα έμμορφα συστατικά του αίματος, ενώ με τον όρο ελεύθερος, ο PAF που βρίσκεται εκτός κυττάρων και κυκλοφορεί στο αίμα ασθενώς συνδεδεμένος στις

πρωτεΐνες του πλάσματος. Από τα ολικά λιποειδή που συλλέχθηκαν, το κλάσμα του PAF μαζί με πολλά άλλα λιποειδή παρόμοιας πολικότητας, διαχωρίζεται μέσω χρωματογραφία στήλης (5.4). Ο PAF παραλαμβάνεται σε καθαρότερη μορφή με HPLC (5.6) και τελικά προσδιορίζεται ποσοτικά μέσω βιολογικής δοκιμασίας σε πλυμένα αιμοπετάλια κουνελιού (5.7.2). Τα επίπεδα συνολικού (Total) PAF προκύπτουν από το άθροισμα δεσμευμένου και ελεύθερου PAF. Πριν τη διεξαγωγή των πειραμάτων αυτών η παραπάνω διαπιστευμένη μέθοδος ελέγχθηκε για την αποτελεσματικότητά της σε μια σειρά δειγμάτων των απορριφθέντων ασθενών.

6.2.1 Δεσμευμένος (Bound) PAF

Τα επίπεδα δεσμευμένου PAF (σχήμα 4) μεταβάλλονται στην ομάδα Α κατά τη 12-μηνη μελέτη ($p_{\text{time}_A}=0.010$) και συγκεκριμένα μειώνονται τον 1^ο, 3^ο, 6^ο και 12^ο μήνα ($p_1=0.008$, $p_3=0.016$, $p_6=0.039$ και $p_{12}=0.008$). Στην ομάδα Β επίσης μεταβάλλονται ($p_{\text{time}_B}=0.028$) με μια παροδική αύξηση στο 3^ο μήνα ($p_3=0.016$). Στην ομάδα Γ τα επίπεδα παραμένουν μεν σταθερά στη διάρκεια της μελέτης ($p_{\text{time}_G}=0.263$), εμφανίζοντας δε μια παροδική αύξηση στον 6^ο μήνα ($p_6=0.039$). Στην ομάδα Δ ο δεσμευμένος PAF μεταβάλλεται στο 12-μηνο ($p_{\text{time}_D}=0.002$), εμφανίζοντας μία τάση αύξησης από τον 9^ο μήνα η οποία γίνεται στατιστικώς σημαντική φτάνοντας στο 12^ο ($p_9=0.084$ και $p_{12}=0.027$). Στην ομάδα Ν τα επίπεδα παραμένουν σταθερά στη διάρκεια του 12-μηνου ($p_{\text{time}_N}=0.973$), χωρίς καμία επιμέρους μεταβολή.



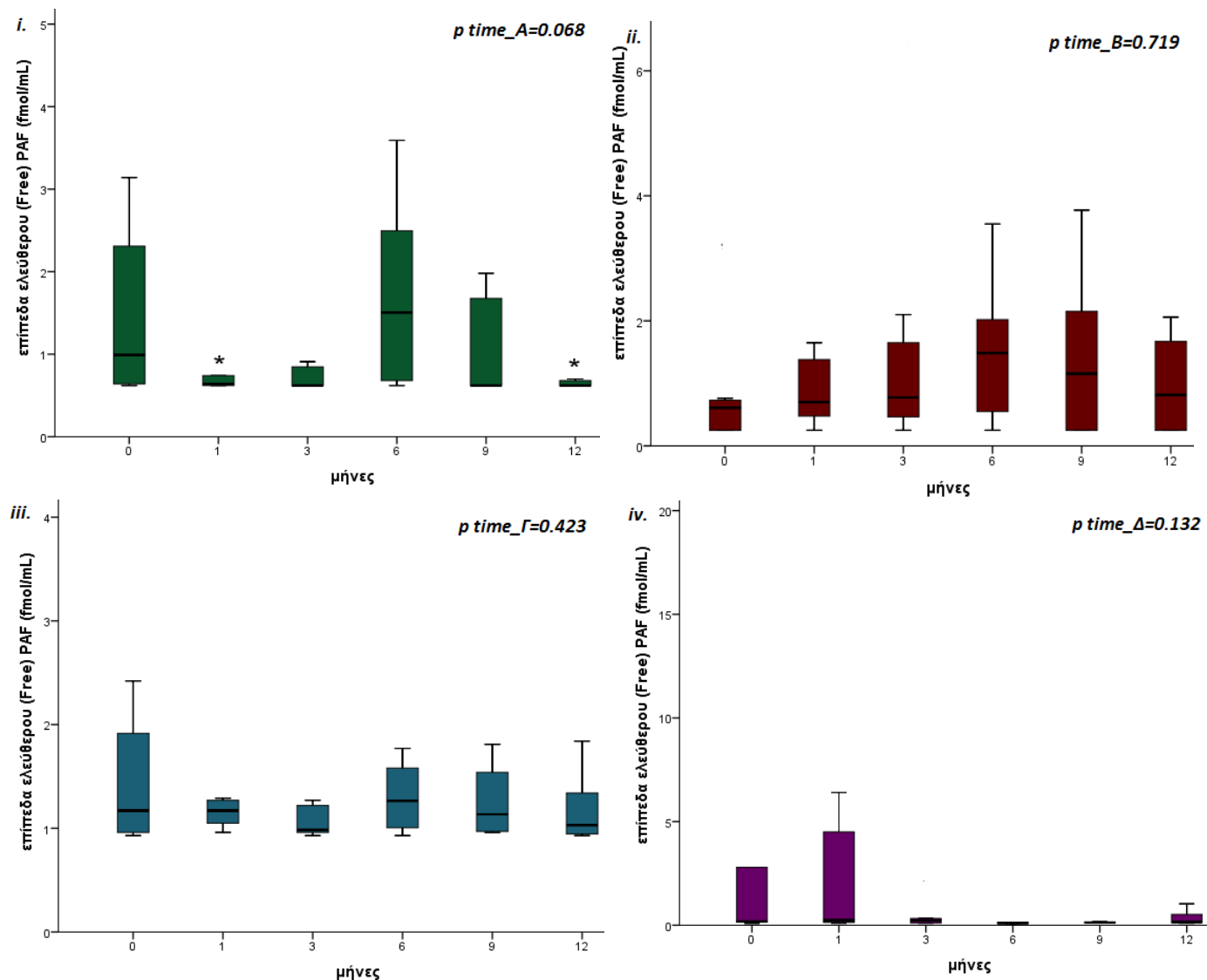


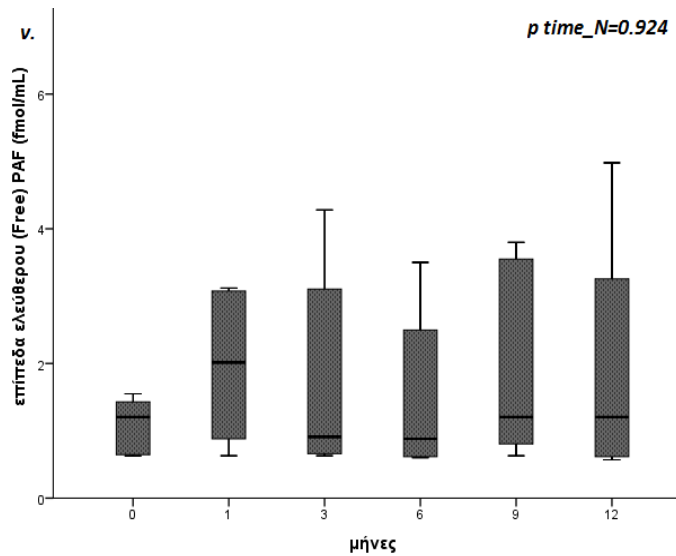
Σχήμα 4: Επίδραση αντιρετροϊκής αγωγής στα επίπεδα του δεσμευμένου (Bound) PAF.

i) ομάδα *tenofovir/emtricitabine/efv*, ii) ομάδα *abacavir/lamivudine/efv*, iii) ομάδα *tenofovir/emtricitabine/atv-r*, iv) ομάδα *abacavir/lamivudine/atv-r*, και v) ομάδα *naïve*. Το p_{time} εκφράζει τη συνολική μεταβολή στη διάρκεια της μελέτης ενώ ο δείκτης * τη στατιστικώς σημαντική διαφοροποίηση ($p<0.05$) σε σχέση με την έναρξη της αγωγής ($t=0$, *baseline*). Τα μεγέθη είναι εκφρασμένα σε fmol/mL.

6.2.2 Ελεύθερος (Free) PAF

Στην ομάδα Α τα επίπεδα ελεύθερου PAF (σχήμα 5) μεταβάλλονται οριακά στη διάρκεια της 12-μηνιας μελέτης ($p_{\text{time}_A}=0.068$) και συγκεκριμένα σημειώνουν μείωση τον 1^ο και 12^ο μήνα ($p_1=0.063$ και $p_{12}=0.078$). Στις ομάδες Β, Γ, Δ και Ν τα επίπεδα ελεύθερου PAF παραμένουν σταθερά στη διάρκεια της μελέτης ($p_{\text{time}_B}=0.719$, $p_{\text{time}_\Gamma}=0.423$, $p_{\text{time}_\Delta}=0.132$ και $p_{\text{time}_N}=0.924$) χωρίς επιμέρους μεταβολές.



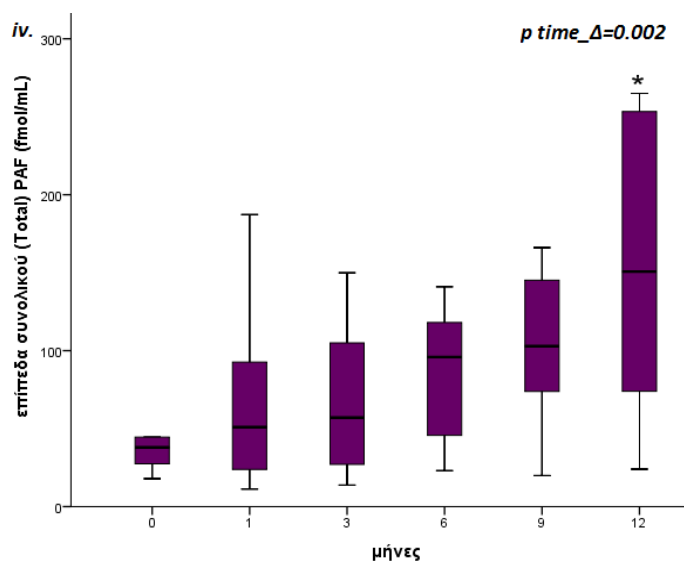
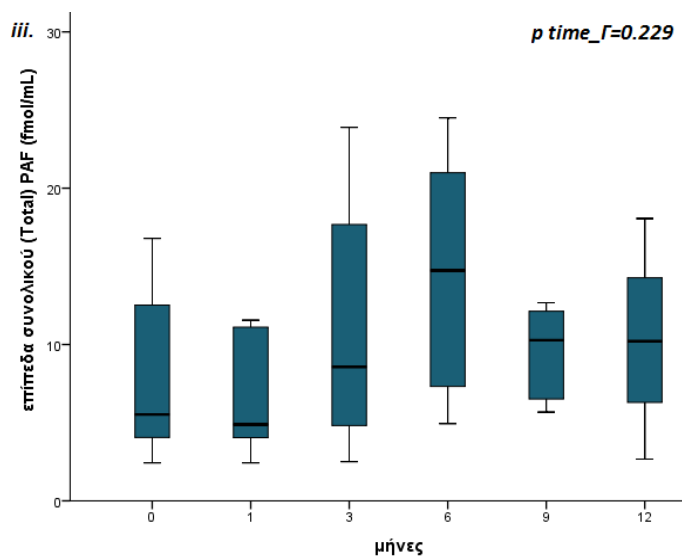
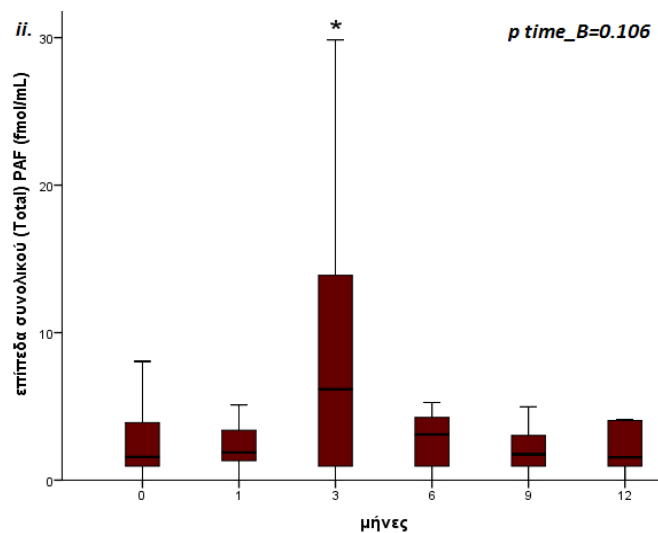
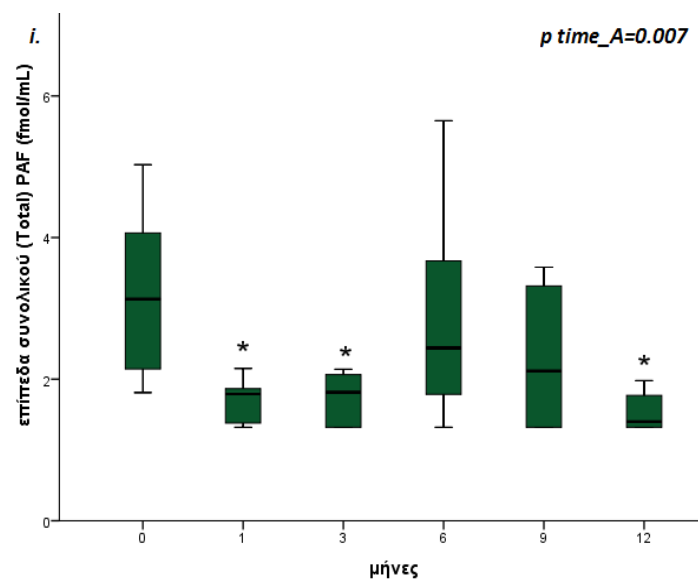


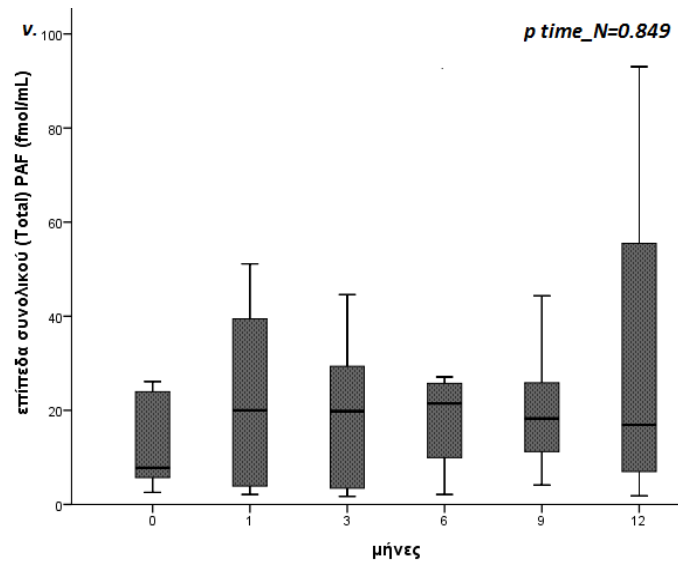
Σχήμα 5: Επίδραση αντιρετροϊκής αγωγής στα επίπεδα του ελεύθερου (Free) PAF.

i) ομάδα *tenofovir/emtricitabine/efv*, ii) ομάδα *abacavir/lamivudine/efv*, iii) ομάδα *tenofovir/emtricitabine/atv-r*, iv) ομάδα *abacavir/lamivudine/atv-r*, και v) ομάδα *naïve*. Το p_{time} εκφράζει τη συνολική μεταβολή στη διάρκεια της μελέτης ενώ ο δείκτης * τη στατιστικώς σημαντική διαφοροποίηση ($p < 0.05$) σε σχέση με την έναρξη της αγωγής ($t=0$, baseline). Τα μεγέθη είναι εκφρασμένα σε fmol/mL.

6.2.3 Συνολικός (Total) PAF

Στην ομάδα Α τα επίπεδα συνολικού PAF (σχήμα 6) μεταβάλλονται στη διάρκεια της 12-μηνιαίας μελέτης ($p_{time_A}=0.007$) και συγκεκριμένα εμφανίζουν μείωση τον 1^ο, 3^ο και 12^ο μήνα ($p_1=0.008$, $p_3=0.016$ και $p_{12}=0.008$). Στην ομάδα Β τα επίπεδα δεν μεταβάλλονται στο 12-μήνο ($p_{time_B}=0.106$), εμφανίζοντας πάρα ταύτα μια παροδική αύξηση τον 3^ο μήνα ($p_3=0.031$). Στην ομάδα Γ τα επίπεδα συνολικού PAF παραμένουν σταθερά στη διάρκεια της μελέτης ($p_{time_Γ}=0.299$) χωρίς επιμέρους μεταβολές. Στην ομάδα Δ ο συνολικός PAF μεταβάλλεται στη διάρκεια της μελέτης ($p_{time_Δ}=0.002$) και εμφανίζοντας αύξηση τον 12^ο μήνα ($p_{12}=0.027$). Στην ομάδα Ν τα επίπεδα συνολικού PAF παραμένουν σταθερά ($p_{time_N}=0.849$) χωρίς επιμέρους μεταβολές.





Σχήμα 6: Επίδραση αντιρετροϊκής αγωγής στα επίπεδα του συνολικού (Total) PAF.

i) ομάδα *tenofovir/emtricitabine/efv*, ii) ομάδα *abacavir/lamivudine/efv*, iii) ομάδα *tenofovir/emtricitabine/atv-r*, iv) ομάδα *abacavir/lamivudine/atv-r*, και v) ομάδα *naïve*. Το *p*time εκφράζει τη συνολική μεταβολή στη διάρκεια της μελέτης ενώ ο δείκτης * τη στατιστικώς σημαντική διαφοροποίηση ($p < 0.05$) σε σχέση με την έναρξη της αγωγής ($t=0$, *baseline*). Τα μεγέθη είναι εκφρασμένα σε *pmol/mL*.

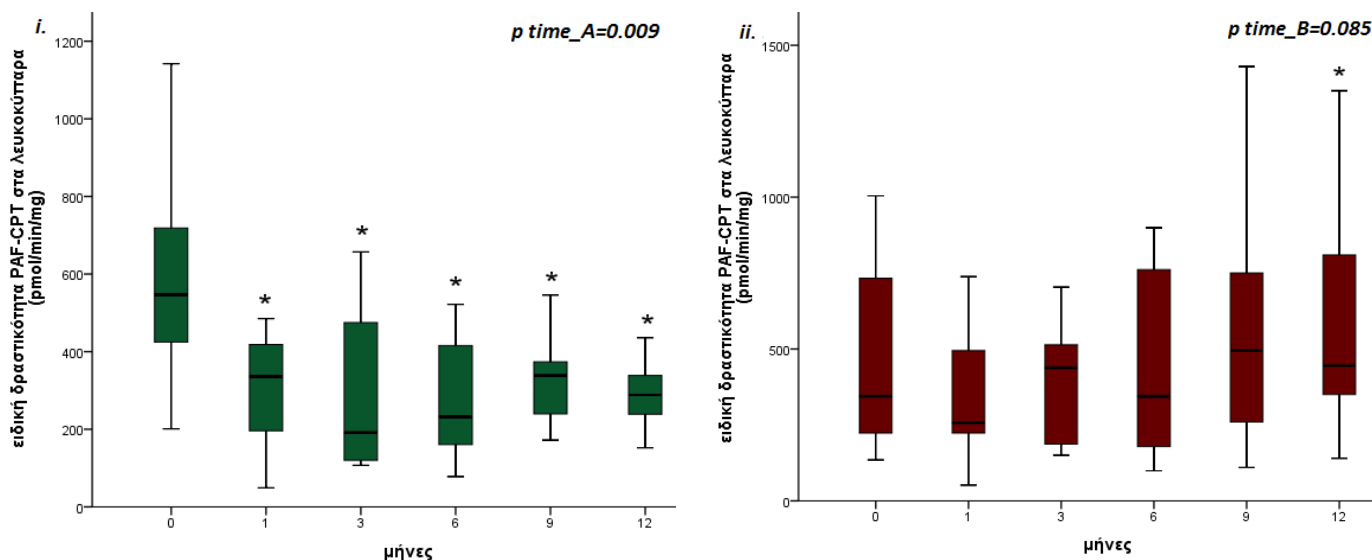
6.3 *In vivo* επίδραση αντιρετροϊκής αγωγής στη βιοσύνθεση του PAF

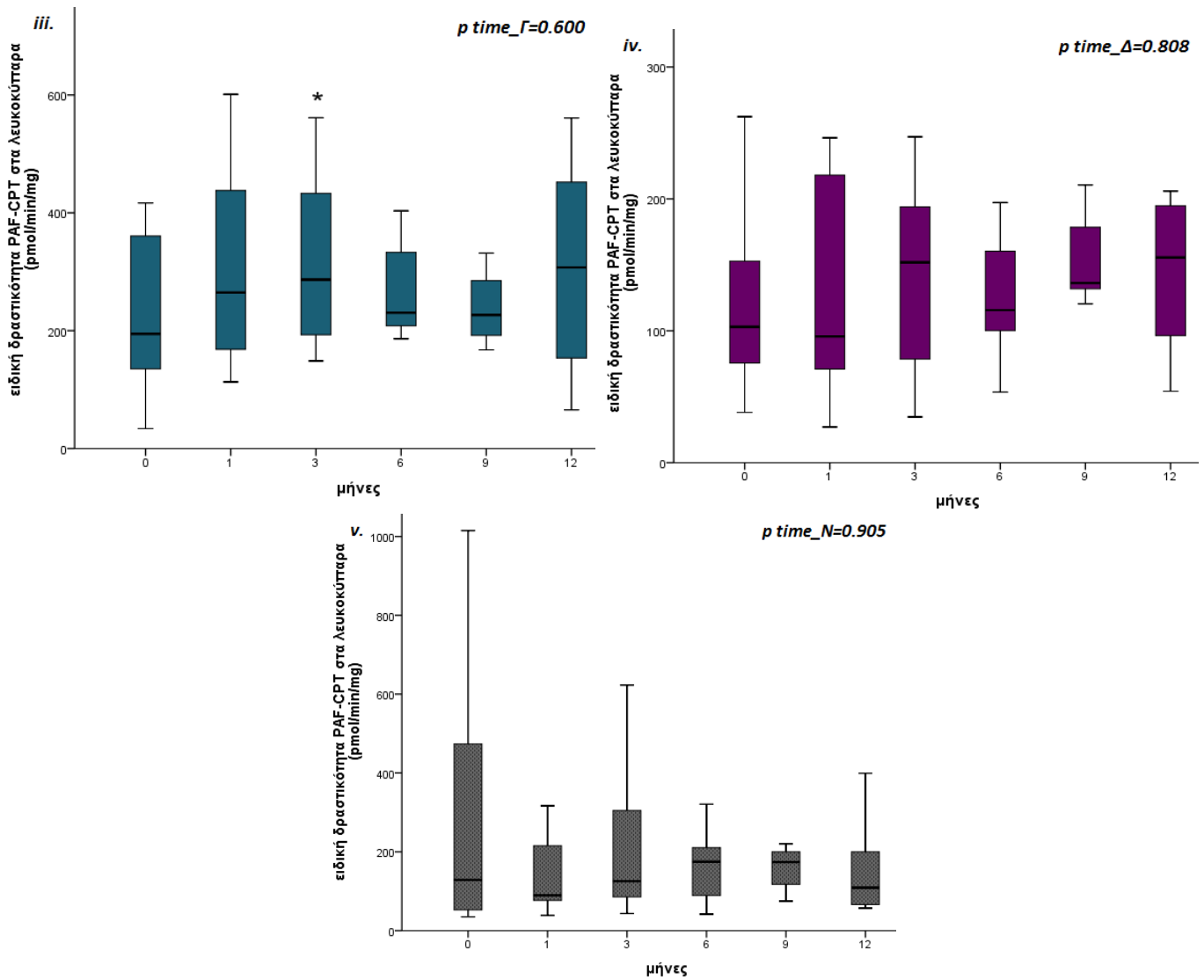
Από το ολικό αίμα των εθελοντών (5.8.2) απομονώθηκαν τα λευκοκύτταρα και τα αιμοπετάλια (5.9). Στη συνέχεια έγινε ο προσδιορισμός δραστηριότητας της PAF-CPT και της lyso-PAF-AT. Για την PAF-CPT χρησιμοποιούνται 10 μ g πρωτεΐνης για τα λευκοκύτταρα και τα αιμοπετάλια και η αντίδραση διαρκεί 20 min. Για τη lyso-PAF-AT χρησιμοποιούνται 25 μ g πρωτεΐνης για τα λευκοκύτταρα και τα αιμοπετάλια και η αντίδραση διαρκεί 30 min. Η ποσότητα της πρωτεΐνης και ο χρόνος επώασης για τους εν λόγω ενζυμικούς προσδιορισμούς έχουν μελετηθεί από την ερευνητική μας ομάδα στο παρελθόν και έτσι στην παρούσα μελέτη έγινε μια επιβεβαίωση των συνθηκών αυτών με τα δείγματα των απορριφθέντων ασθενών. Ο παραγόμενος PAF εκχυλίζεται με Bligh-Dyer (5.2) και διαχωρίζεται με TLC (5.5). Ο PAF

προσδιορίζεται ποσοτικά μέσω βιολογικής δοκιμασίας σε πλυμένα αιμοπετάλια κουνελιού (5.7) και υπολογίζεται η ειδική δραστικότητα των ενζύμων.

6.3.1 PAF φωσφοχολινοτρανσφεράση (PAF-CPT) στα λευκοκύτταρα

Στην ομάδα Α η ειδική δραστικότητα της PAF-CPT στα λευκοκύτταρα (σχήμα 7) μεταβάλλεται τόσο στη διάρκεια της 12-μηνιας μελέτης ($p_{\text{time_A}}=0.009$), όσο και επιμέρους σε κάθε χρονική στιγμή από τον 1^ο ως το 12^ο μήνα ($p_1=0.016$, $p_3=0.008$, $p_6=0.047$, $p_9=0.008$ και $p_{12}=0.008$). Στην ομάδα Β η ειδική δραστικότητα της PAF-CPT δεν μεταβάλλεται στη διάρκεια της μελέτης ($p_{\text{time_B}}=0.085$), εμφανίζοντας πάρα ταύτα μια αύξηση στο 12^ο μήνα ($p_{12}=0.006$). Στην ομάδα Γ δεν υπάρχει μεταβολή στην ειδική δραστικότητα της PAF-CPT στο 12-μηνο ($p_{\text{time_Γ}}=0.808$), εμφανίζοντας πάρα ταύτα μια παροδική αύξηση στον 3^ο μήνα ($p_3=0.050$). Στις ομάδες Δ και Ν, η ειδική δραστικότητα της PAF-CPT παραμένει σταθερή στη διάρκεια της μελέτης ($p_{\text{time_Δ}}=0.600$, $p_{\text{time_N}}=0.905$), χωρίς επιμέρους μεταβολές.



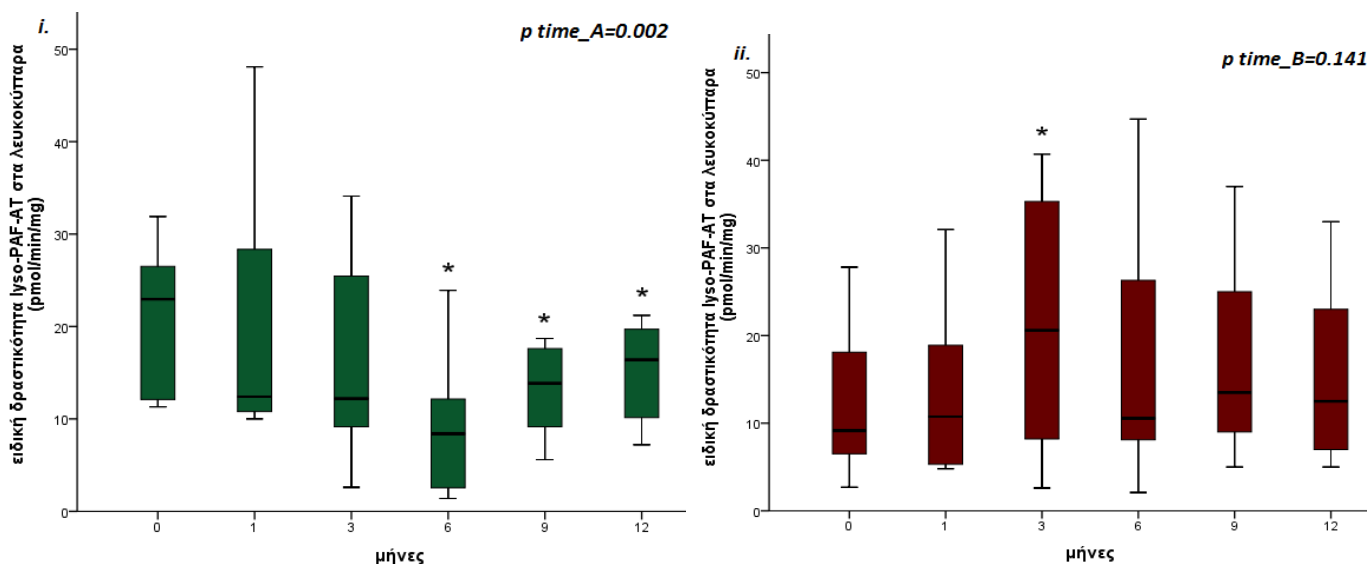


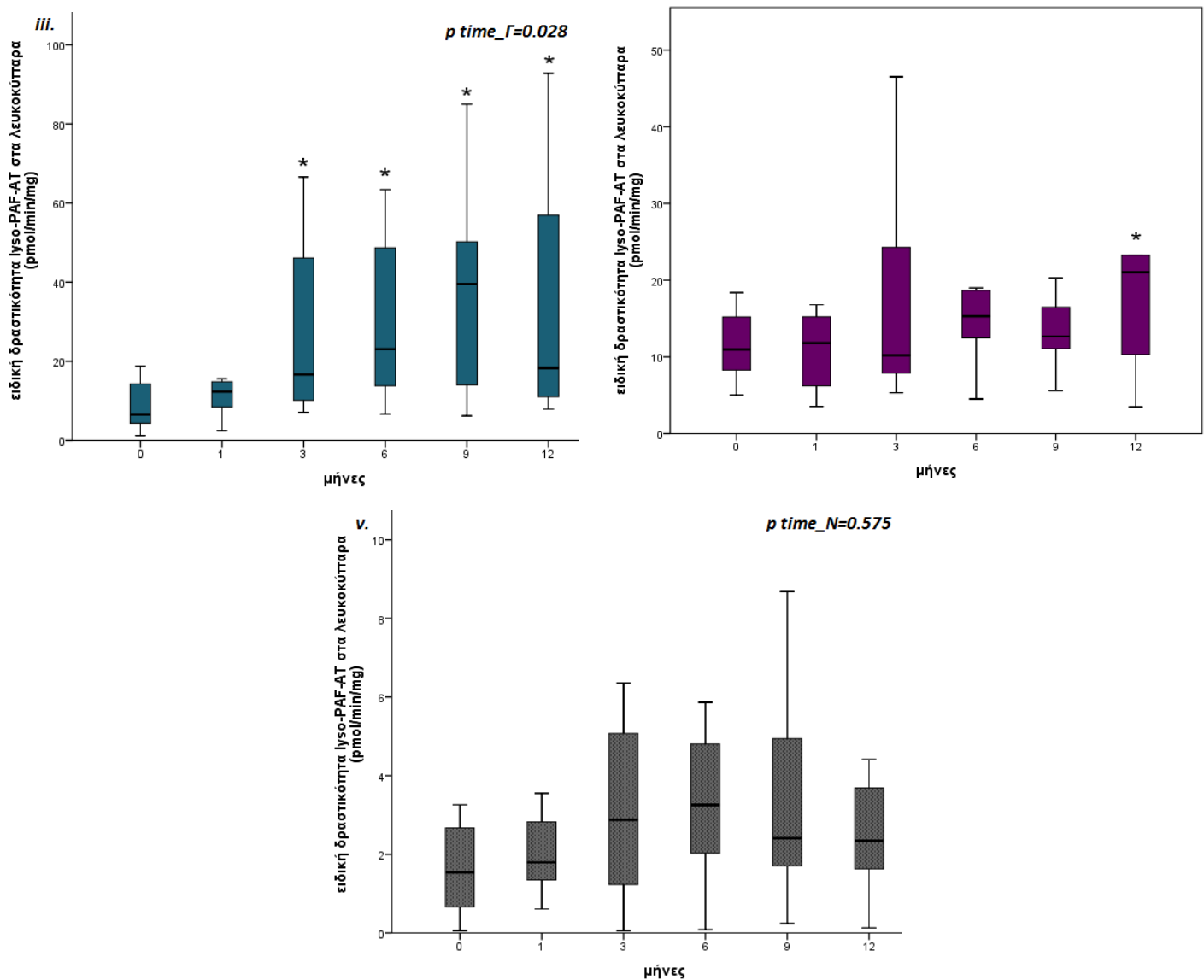
Σχήμα 7: Επίδραση αντιρετροϊκής αγωγής στην ειδική δραστηριότητα της PAF-CPT στα λευκοκύτταρα.

i) ομάδα *tenofovir/emtricitabine/efv*, ii) ομάδα *abacavir/lamivudine/efv*, iii) ομάδα *tenofovir/emtricitabine/atv-r*, iv) ομάδα *abacavir/lamivudine/atv-r*, και v) ομάδα *naïve*. Το $p \text{ time}$ εκφράζει τη συνολική μεταβολή στη διάρκεια της μελέτης ενώ ο δείκτης * τη στατιστικώς σημαντική διαφοροποίηση ($p < 0.05$) σε σχέση με την έναρξη της αγωγής ($t=0$, *baseline*). Τα μεγέθη είναι εκφρασμένα σε pmol/min/mg .

6.3.2 lyso-PAF-ακετυλοτρανσφεράση (lyso-PAF-AT) στα λευκοκύτταρα

Στην ομάδα Α η ειδική δραστηριότητα της lyso-PAF-AT (σχήμα 7) στα λευκοκύτταρα μεταβάλλεται τόσο στη διάρκεια της 12-μηνιας μελέτης ($p_{\text{time}_A}=0.002$), όσο και επιμέρους σε κάθε χρονική στιγμή από τον 6^ο ως το 12^ο μήνα ($p_6=0.008$, $p_9=0.008$ και $p_{12}=0.008$). Στην ομάδα Β η ειδική δραστηριότητα της lyso-PAF-AT δεν μεταβάλλεται στη διάρκεια της μελέτης ($p_{\text{time}_B}=0.141$), εμφανίζοντας πάρα ταύτα μια αύξηση στον 3^ο μήνα ($p_3=0.037$). Στην ομάδα Γ η lyso-PAF-AT μεταβάλλεται στη διάρκεια της αγωγής ($p_{\text{time}_\Gamma}=0.028$), εμφανίζοντας αύξηση από τον 3^ο ως τον 12^ο μήνα ($p_3=0.078$, $p_6=0.008$, $p_9=0.016$ και $p_{12}=0.039$). Στην ομάδα Δ η ειδική δραστηριότητα της lyso-PAF-AT διαφοροποιείται στη διάρκεια της 12-μηνιας μελέτης ($p_{\text{time}_\Delta}=0.038$), εμφανίζοντας μια αύξηση στο 12^ο μήνα αγωγής ($p_{12}=0.049$) ενώ στην ομάδα Ν η ειδική δραστηριότητα της lyso-PAF-AT παραμένει σταθερή στη διάρκεια του 12-μηνου ($p_{\text{time}_N}=0.575$), χωρίς επιμέρους μεταβολές.



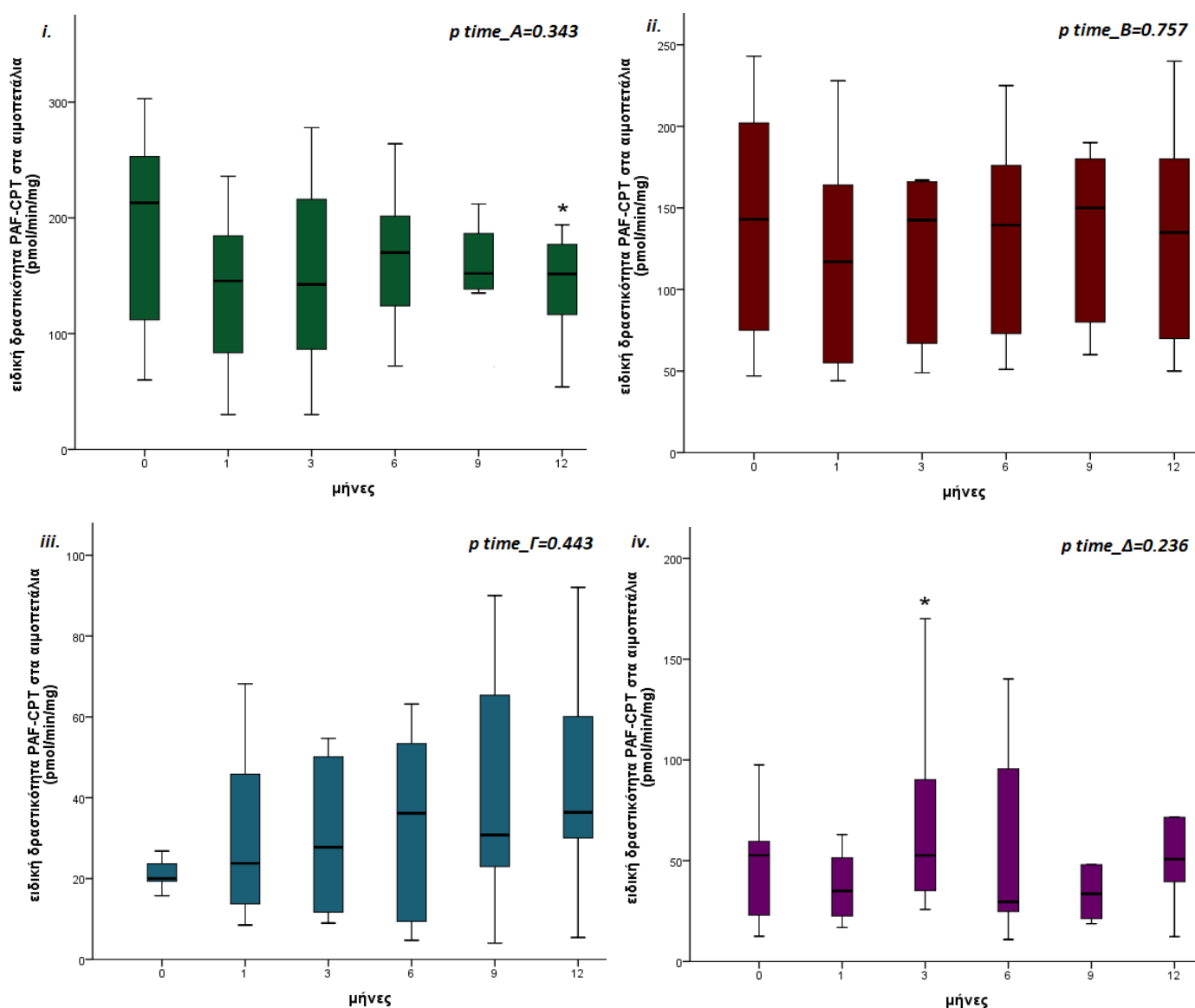


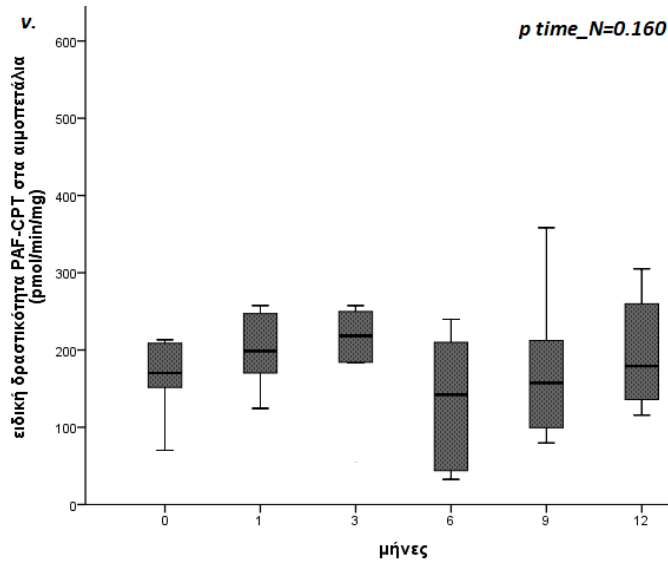
Σχήμα 8: Επίδραση αντιρετροϊκής αγωγής στην ειδική δραστηριότητα της lyso-PAF-AT στα λευκοκύτταρα.

i) ομάδα *tenofovir/emtricitabine/efv*, ii) ομάδα *abacavir/lamivudine/efv*, iii) ομάδα *tenofovir/emtricitabine/atv-r*, iv) ομάδα *abacavir/lamivudine/atv-r*, και v) ομάδα *naïve*. Το p_{time} εκφράζει τη συνολική μεταβολή στη διάρκεια της μελέτης ενώ ο δείκτης * τη στατιστικώς σημαντική διαφοροποίηση ($p < 0.05$) σε σχέση με την έναρξη της αγωγής ($t=0$, *baseline*). Τα μεγέθη είναι εκφρασμένα σε $pmol/min/mg$.

6.3.3 PAF φωσφοχολινوترανσφεράση (PAF-CPT) στα αιμοπετάλια

Στην ομάδα Α η ειδική δραστηριότητα της PAF-CPT στα αιμοπετάλια (σχήμα 9) δεν μεταβάλλεται στη διάρκεια του 12-μηνου ($p_{\text{time}_A}=0.343$), εμφανίζοντας όμως μια μείωση στο 12^ο μήνα ($p_{12}=0.047$). Στις ομάδες Β, Γ και Ν δεν υπάρχει κάποια μεταβολή ούτε καθ' όλη τη μελέτη ($p_{\text{time}_B}=0.757$, $p_{\text{time}_\Gamma}=0.443$, $p_{\text{time}_N}=0.160$), ούτε στις επιμέρους χρονικές στιγμές. Στην ομάδα Δ η ειδική δραστηριότητα του ενζύμου παραμένει μεν σταθερή στη διάρκεια της 12-μηνιας μελέτης ($p_{\text{time}_\Delta}=0.236$), με μια τάση αύξησης όμως στο 3^ο μήνα αγωγής ($p_{12}=0.084$).





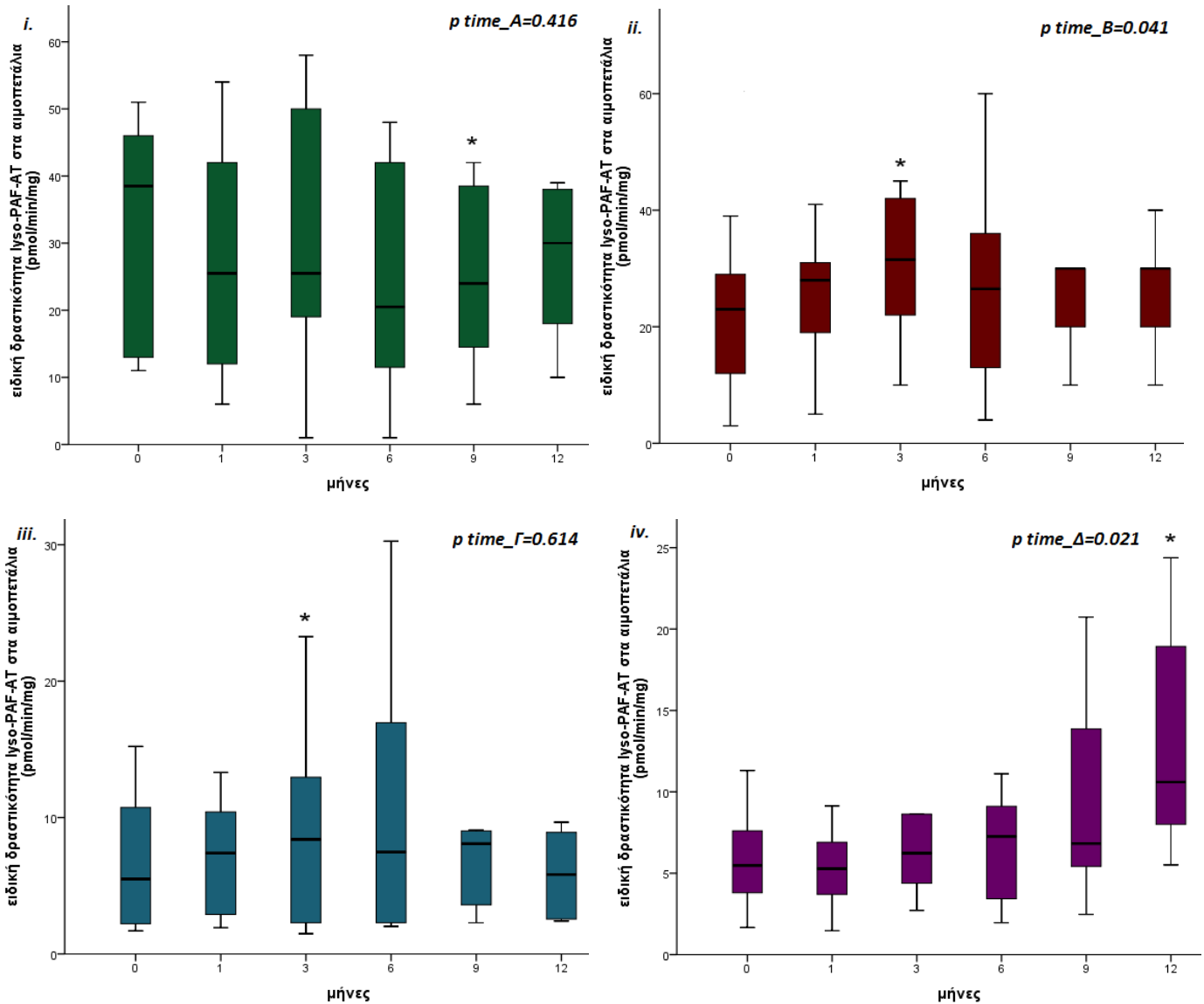
Σχήμα 9: Επίδραση αντιρετροϊκής αγωγής στην ειδική δραστηριότητα της PAF-CPT στα αιμοπετάλια.

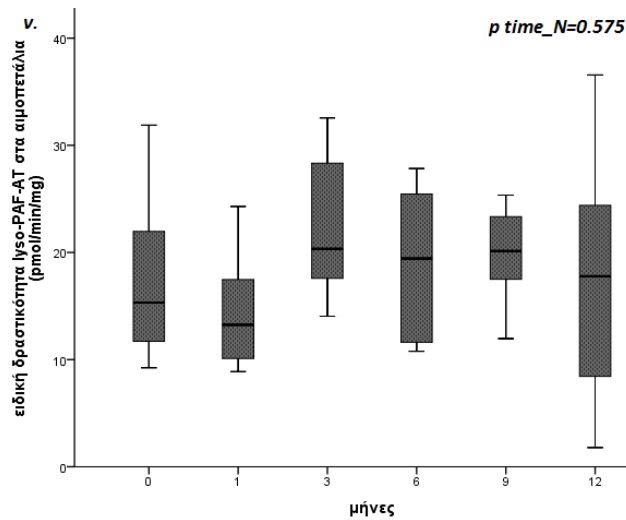
i) ομάδα *tenofovir/emtricitabine/efv*, ii) ομάδα *abacavir/lamivudine/efv*, iii) ομάδα *tenofovir/emtricitabine/atv-r*, iv) ομάδα *abacavir/lamivudine/atv-r*, και v) ομάδα *naïve*. Το *p_{time}* εκφράζει τη συνολική μεταβολή στη διάρκεια της μελέτης ενώ ο δείκτης * τη στατιστικώς σημαντική διαφοροποίηση ($p < 0.05$) σε σχέση με την έναρξη της αγωγής ($t=0$, *baseline*). Τα μεγέθη είναι εκφρασμένα σε *pmol/min/mg*.

6.3.4 lyso-PAF-ακετυλοτρανσφεράση (lyso-PAF-AT) στα αιμοπετάλια

Στην ομάδα Α η ειδική δραστηριότητα της lyso-PAF-AT στα αιμοπετάλια (σχήμα 10) δεν μεταβάλλεται στη διάρκεια της 12-μηνιαίας μελέτης ($p_{\text{time}_A}=0.416$), εμφανίζοντας όμως μια παροδική μείωση στον 9^ο μήνα ($p_9=0.039$). Στην ομάδα Β η ειδική δραστηριότητα του ενζύμου μεταβάλλεται στη διάρκεια μελέτης ($p_{\text{time}_B}=0.041$), εμφανίζοντας μια αύξηση στον 3^ο μήνα ($p_3=0.010$). Στην ομάδα Γ η ειδική δραστηριότητα της lyso-PAF-AT δεν μεταβάλλεται στη διάρκεια της αγωγής ($p_{\text{time}_\Gamma}=0.614$), εμφανίζοντας ωστόσο μία παροδική αύξηση τον 3^ο μήνα ($p_3=0.039$). Στην ομάδα Δ η ειδική δραστηριότητα της lyso-PAF-AT διαφοροποιείται στη διάρκεια του 12-μηνιαίου ($p_{\text{time}_\Delta}=0.021$), εμφανίζοντας μια αύξηση στο 12^ο μήνα αγωγής

($p_{12}=0.049$). Στην ομάδα N η ειδική δραστηριότητα της lyso-PAF-AT παραμένει σταθερή στη διάρκεια της μελέτης ($p_{\text{time}_N}=0.575$), χωρίς επιμέρους μεταβολές.





Σχήμα 10: Επίδραση αντιρετροϊκής αγωγής στην ειδική δραστικότητα της lyso-PAF-AT στα αιμοπετάλια.

i) ομάδα *tenofovir/emtricitabine/efv*, ii) ομάδα *abacavir/lamivudine/efv*, iii) ομάδα *tenofovir/emtricitabine/atv-r*, iv) ομάδα *abacavir/lamivudine/atv-r*, και v) ομάδα *naïve*. Το *p*time εκφράζει τη συνολική μεταβολή στη διάρκεια της μελέτης ενώ ο δείκτης * τη στατιστικώς σημαντική διαφοροποίηση ($p < 0.05$) σε σχέση με την έναρξη της αγωγής ($t=0$, baseline). Τα μεγέθη είναι εκφρασμένα σε *pmol/min/mg*.

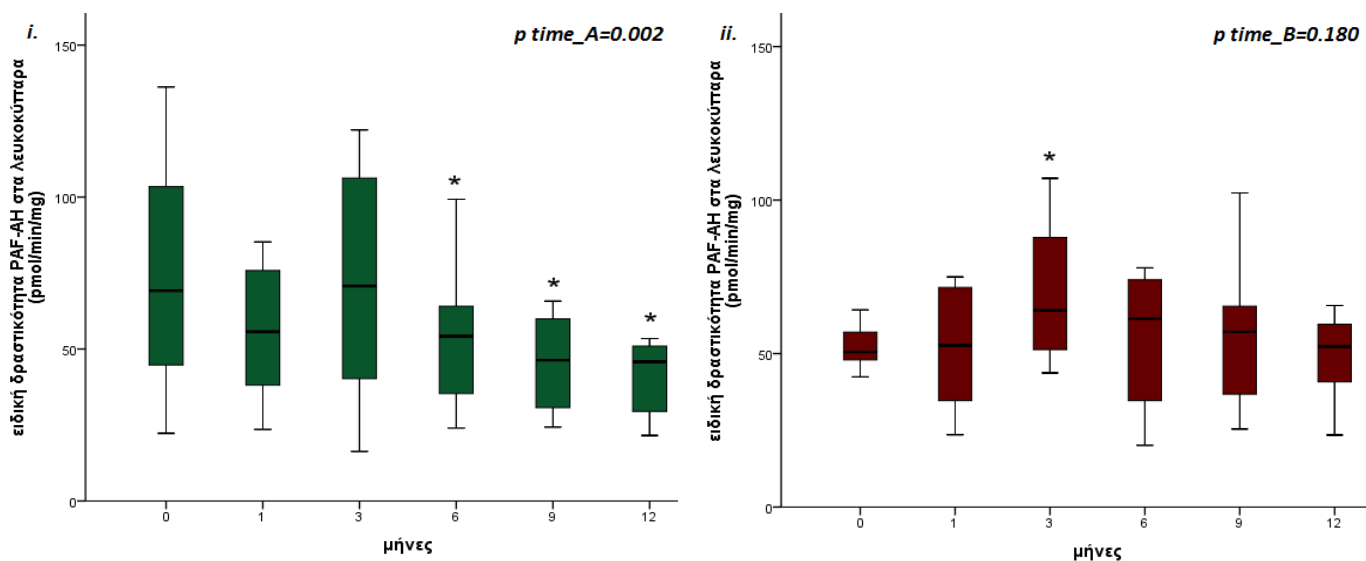
6.4 *In vivo* επίδραση αντιρετροϊκής αγωγής στην αποικοδόμηση PAF

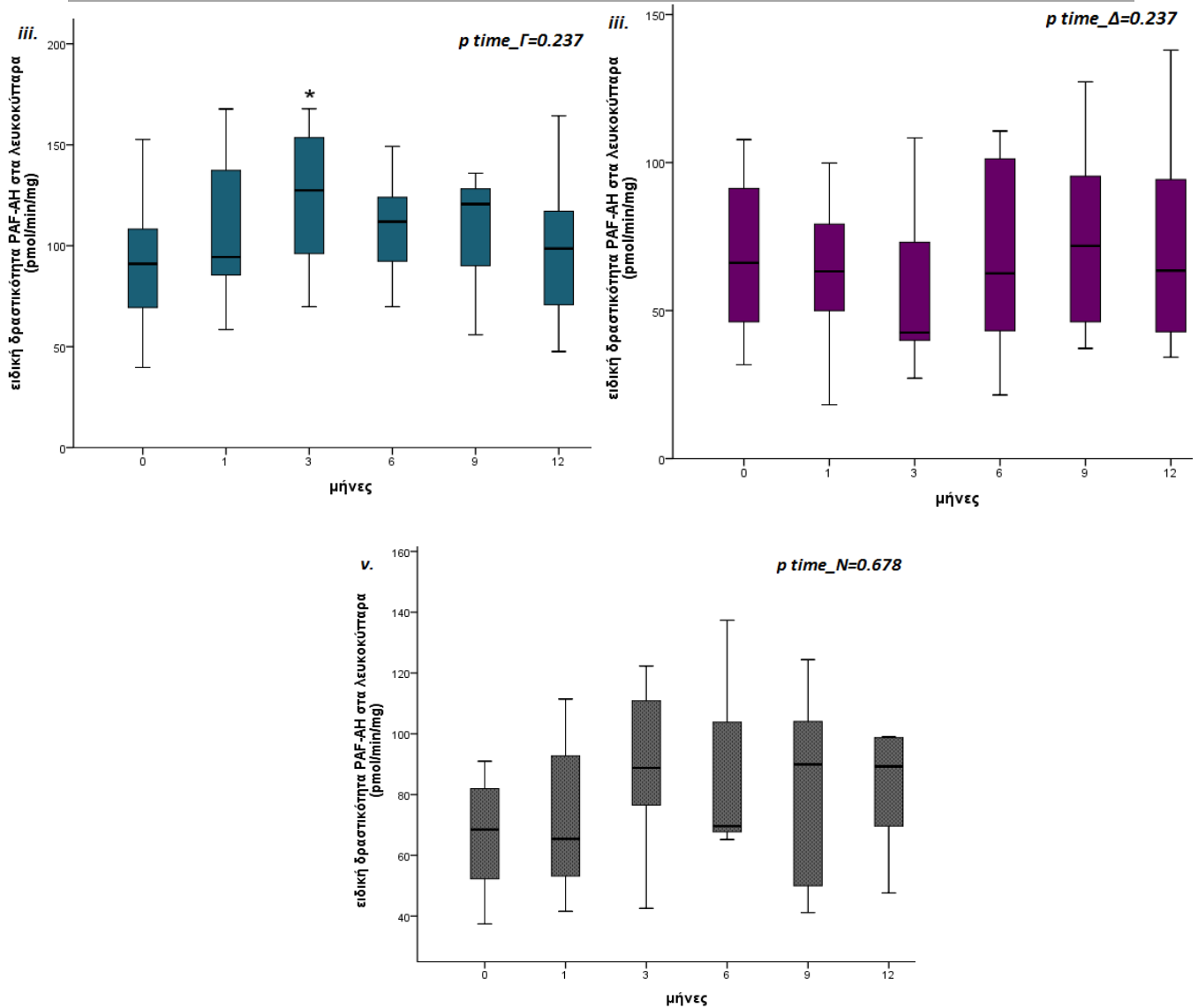
Από το ολικό αίμα των εθελοντών (5.8.2) απομονώθηκαν τα λευκοκύτταρα, τα αιμοπετάλια, τα ερυθροκύτταρα και το πλάσμα (5.9). Στη συνέχεια έγινε ο προσδιορισμός δραστικότητας της PAF-AH στα έμμορφα συστατικά και της Lp-PLA2 στο πλάσμα (5.12). Η αντίδραση διαρκεί 30 min και χρησιμοποιούνται 50 μg πρωτεΐνης για τα λευκοκύτταρα, 100 μg πρωτεΐνης για τα αιμοπετάλια, 250 μg πρωτεΐνης για τα ερυθροκύτταρα και 2 μL πλάσματος για τη Lp-PLA2. Η ποσότητα της πρωτεΐνης και ο χρόνος επώασης για τους εν λόγω ενζυμικούς προσδιορισμούς έχουν μελετηθεί από την ερευνητική μας ομάδα στο παρελθόν και έτσι στην παρούσα μελέτη έγινε μια επιβεβαίωση των συνθηκών αυτών με δείγματα των

απορριφθέντων ασθενών. Η αποικοδόμηση του PAF μετράται μέσω ραδιενέργειας (5.13) και υπολογίζεται η ειδική δραστικότητα των ενζύμων.

6.4.1 PAF-ακετυλουδρολάση (PAF-AH) στα λευκοκύτταρα

Στην ομάδα Α η ειδική δραστικότητα της PAF-AH στα λευκοκύτταρα (σχήμα 11) μεταβάλλεται στη διάρκεια της 12-μηνιας μελέτης ($p_{\text{time_A}}=0.002$), εμφανίζοντας μείωση από τον 6^ο ως το 12^ο μήνα ($p_6=0.031$, $p_9=0.016$, $p_{12}=0.008$). Στην ομάδα Β η ειδική δραστικότητα της PAF-AH δεν μεταβάλλεται στη διάρκεια της αγωγής ($p_{\text{time_B}}=0.180$), εμφανίζοντας ωστόσο μια παροδική αύξηση τον 3^ο μήνα ($p_3=0.049$). Στην ομάδα Γ η ειδική δραστικότητα του ενζύμου δεν μεταβάλλεται στη διάρκεια της 12-μηνιας μελέτης ($p_{\text{time_Γ}}=0.237$), εμφανίζοντας ωστόσο μια παροδική αύξηση τον 3^ο μήνα ($p_3=0.055$). Στην ομάδες Δ και Ν η ειδική δραστικότητα της PAF-AH παραμένει σταθερή στη διάρκεια της 12-μηνιας μελέτης ($p_{\text{time_Δ}}=0.618$ και $p_{\text{time_N}}=0.678$), δίχως επιμέρους μεταβολές.



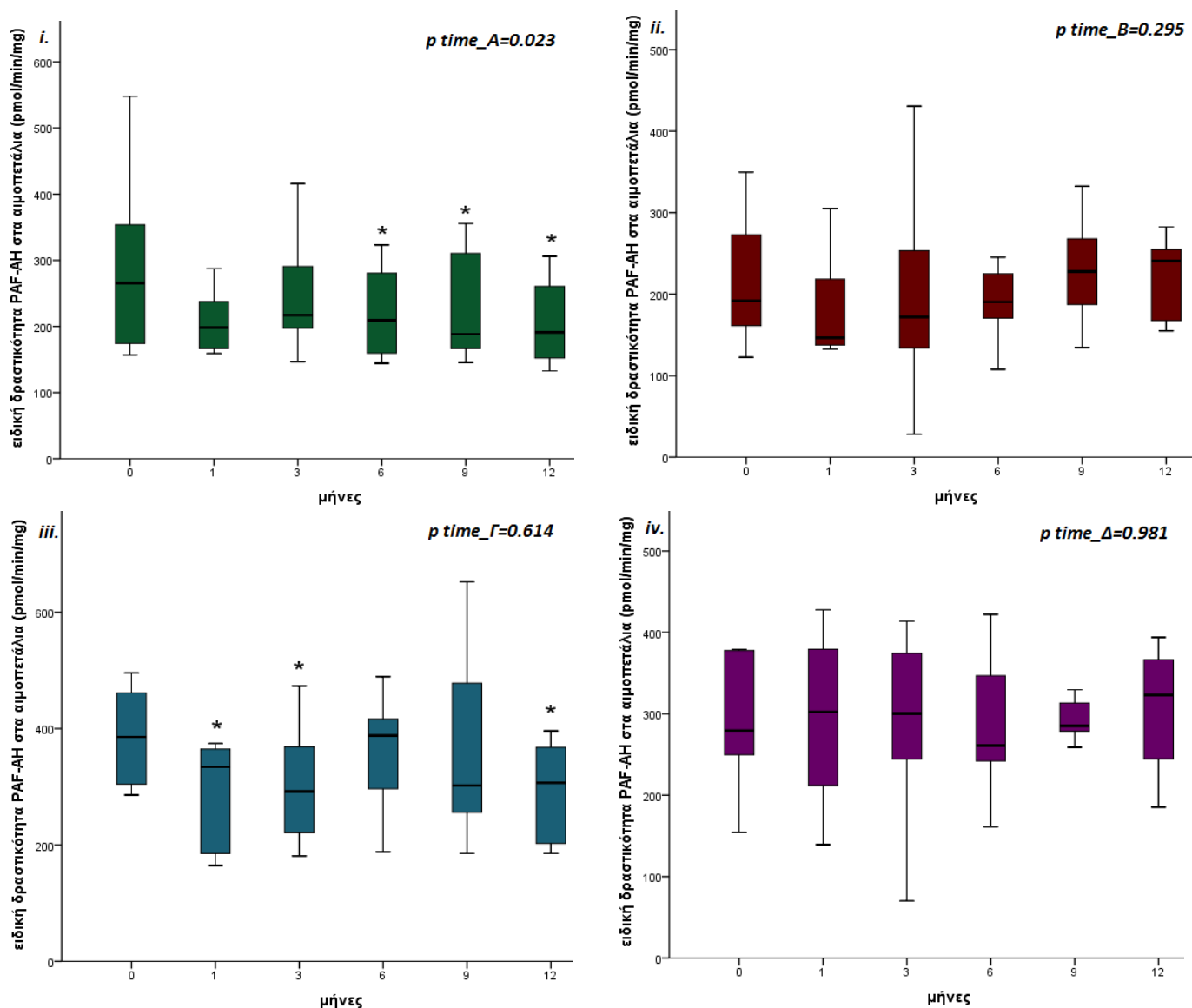


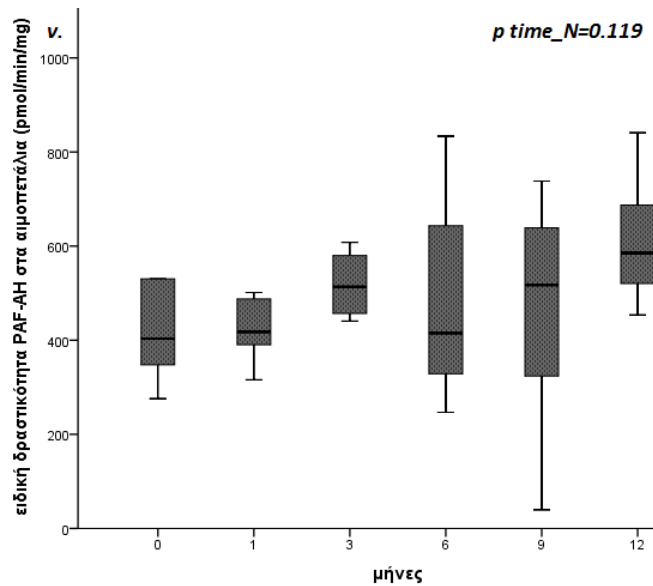
Σχήμα 11: Επίδραση αντιρετροϊκής αγωγής στην ειδική δραστηριότητα της PAF-AH στα λευκοκύτταρα.

i) ομάδα *tenofovir/emtricitabine/efv*, ii) ομάδα *abacavir/lamivudine/efv*, iii) ομάδα *tenofovir/emtricitabine/atv-r*, iv) ομάδα *abacavir/lamivudine/atv-r*, και v) ομάδα *naïve*. Το *p*time εκφράζει τη συνολική μεταβολή στη διάρκεια της μελέτης ενώ ο δείκτης * τη στατιστικώς σημαντική διαφοροποίηση ($p < 0.05$) σε σχέση με την έναρξη της αγωγής ($t=0$, *baseline*). Τα μεγέθη είναι εκφρασμένα σε *pmol/min/mg*.

6.4.2 PAF-ακετυλουδρολάση (PAF-AH) στα αιμοπετάλια

Στην ομάδα Α η ειδική δραστικότητα της PAF-AH στα αιμοπετάλια (σχήμα 12) μεταβάλλεται στη διάρκεια της 12-μηνιας αγωγής ($p_{\text{time}_A}=0.023$), εμφανίζοντας μείωση από τον 6^ο ως το 12^ο μήνα ($p_6=0.016$, $p_9=0.008$, $p_{12}=0.008$). Στην ομάδα Β η ειδική δραστικότητα της PAF-AH μένει σταθερή στο 12-μηνιο ($p_{\text{time}_B}=0.295$), χωρίς επιμέρους μεταβολές. Στην ομάδα Γ η ειδική δραστικότητα του ενζύμου δεν μεταβάλλεται στη διάρκεια της μελέτης ($p_{\text{time}_\Gamma}=0.614$), εμφανίζοντας ωστόσο μειώσεις τον 1^ο, 3^ο και 12^ο μήνα ($p_1=0.055$, $p_3=0.055$ και $p_{12}=0.039$). Στις ομάδες Δ και Ν η ειδική δραστικότητα της PAF-AH παραμένει σταθερή στη διάρκεια της 12-μηνιας μελέτης ($p_{\text{time}_\Delta}=0.981$, $p_{\text{time}_N}=0.119$), δίχως επιμέρους μεταβολές.



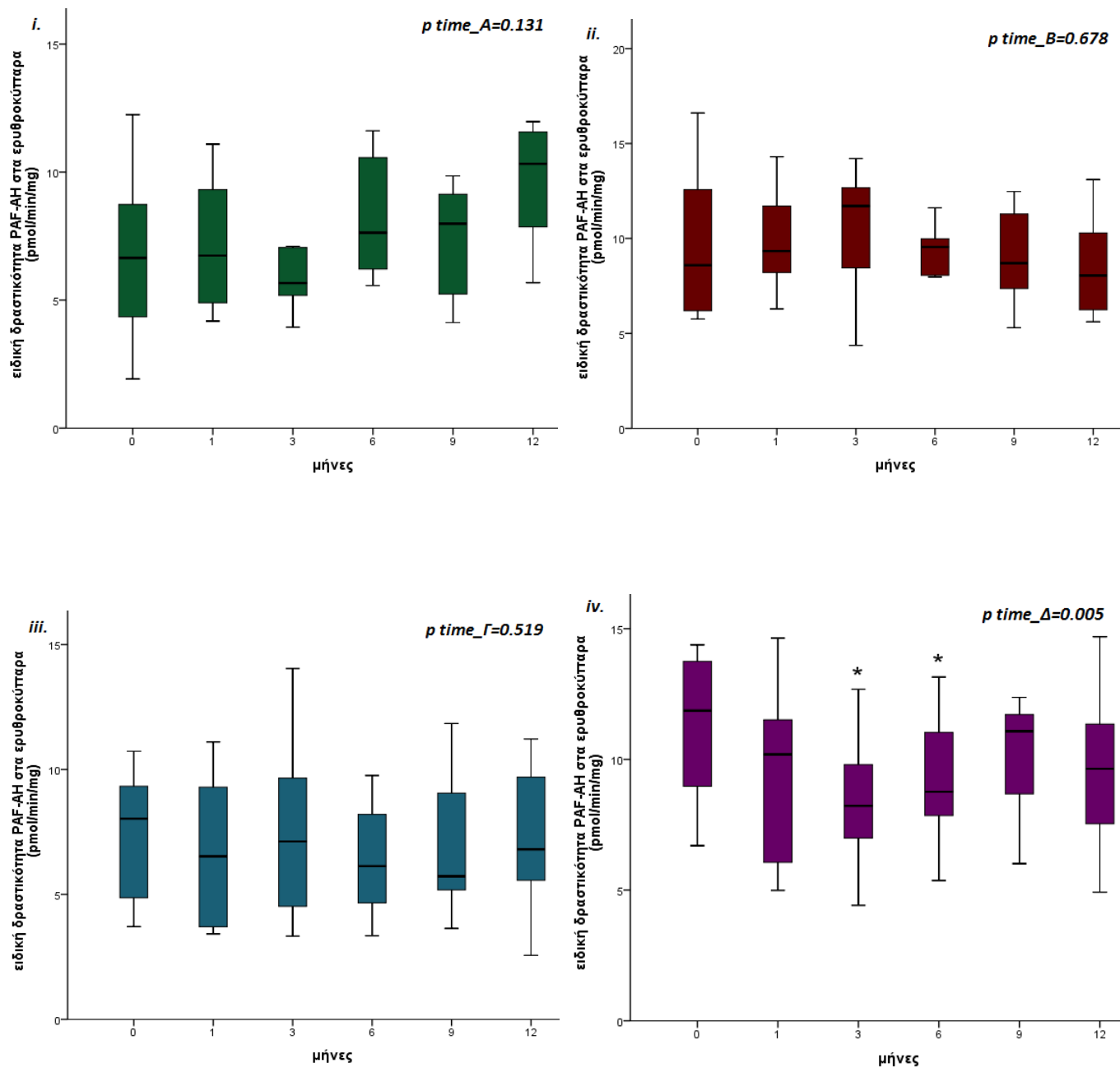


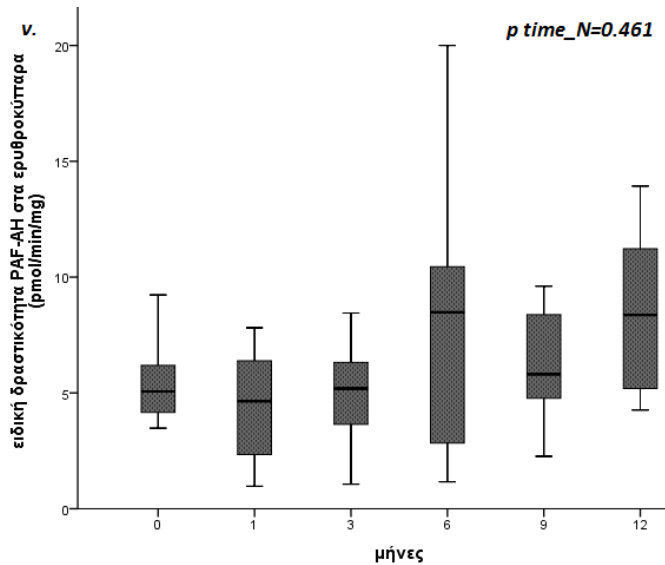
Σχήμα 12: Επίδραση αντιρετροϊκής αγωγής στην ειδική δραστηριότητα της PAF-AH στα αιμοπετάλια.

i) ομάδα *tenofovir/emtricitabine/efv*, ii) ομάδα *abacavir/lamivudine/efv*, iii) ομάδα *tenofovir/emtricitabine/atv-r*, iv) ομάδα *abacavir/lamivudine/atv-r*, και v) ομάδα *naïve*. Το *p_{time}* εκφράζει τη συνολική μεταβολή στη διάρκεια της μελέτης ενώ ο δείκτης * τη στατιστικώς σημαντική διαφοροποίηση ($p < 0.05$) σε σχέση με την έναρξη της αγωγής ($t=0$, *baseline*). Τα μεγέθη είναι εκφρασμένα σε *pmol/min/mg*.

6.4.3 PAF-ακετυλουδρολάση (PAF-AH) στα ερυθροκύτταρα

Στην ομάδα A η ειδική δραστηριότητα της PAF-AH στα ερυθροκύτταρα (σχήμα 13) μένει σταθερή στη διάρκεια της 12-μηνιαίας μελέτης ($p_{\text{time}_A}=0.131$), χωρίς επιμέρους μεταβολές. Στις ομάδες B, Γ και N η ειδική δραστηριότητα της PAF-AH μένει σταθερή στη διάρκεια του 12-μηνιαίου ($p_{\text{time}_B}=0.678$, $p_{\text{time}_\Gamma}=0.519$ και $p_{\text{time}_N}=0.461$), χωρίς επιμέρους μεταβολές. Στην ομάδα Δ η ειδική δραστηριότητα του ενζύμου μεταβάλλεται στη διάρκεια της αγωγής ($p_{\text{time}_\Delta}=0.005$), με μειώσεις τον 3^ο και τον 6^ο μήνα ($p_3=0.006$ και $p_6=0.025$).



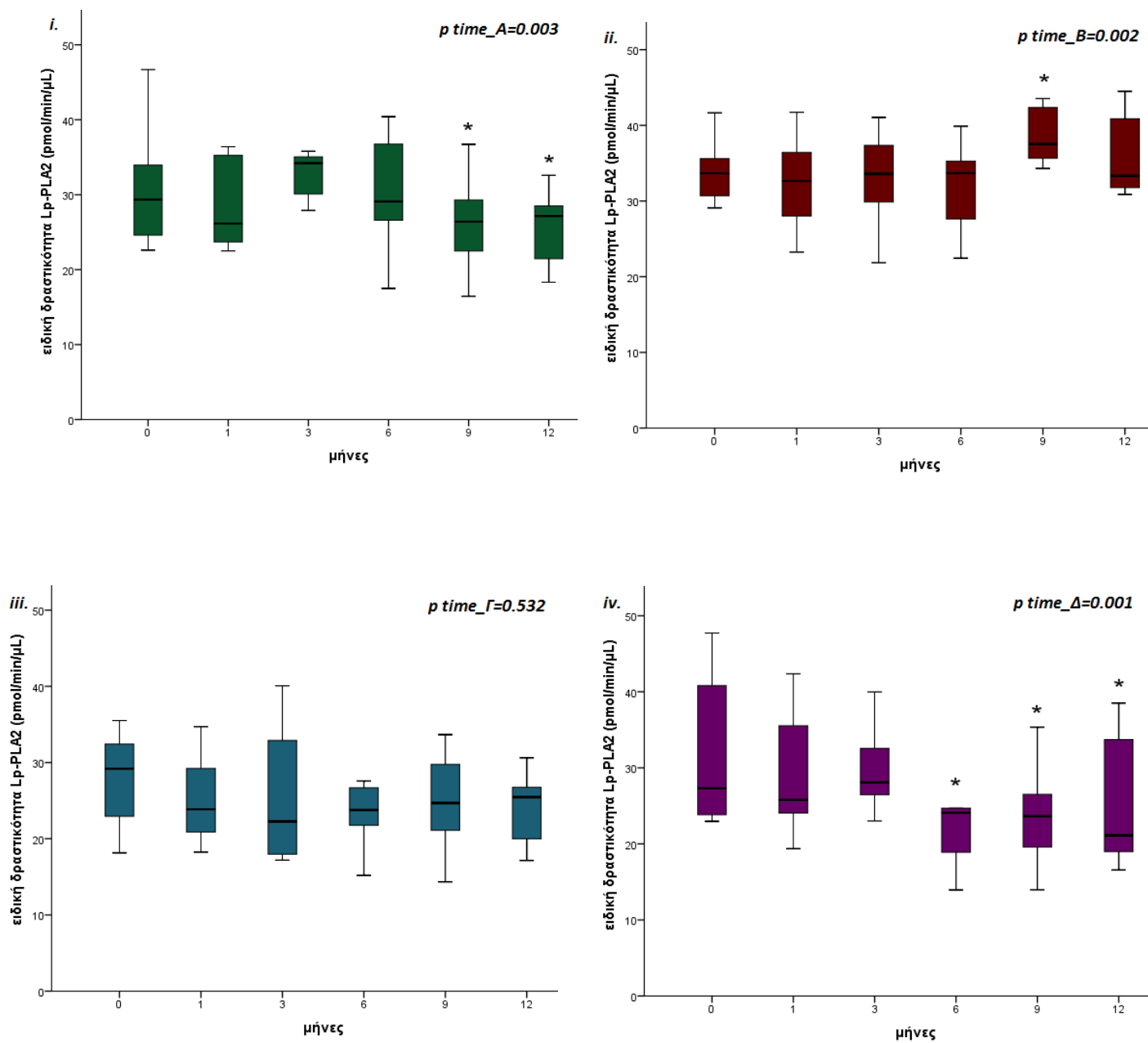


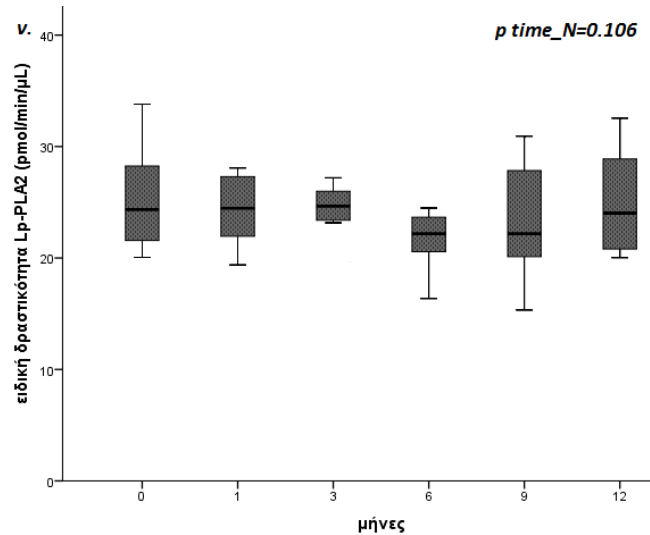
Σχήμα 13: Επίδραση αντιρετροϊκής αγωγής στην ειδική δραστηριότητα της PAF-AH στα ερυθροκύτταρα.

i) ομάδα *tenofovir/emtricitabine/efv*, ii) ομάδα *abacavir/lamivudine/efv*, iii) ομάδα *tenofovir/emtricitabine/atv-r*, iv) ομάδα *abacavir/lamivudine/atv-r*, και v) ομάδα *naïve*. Το *p_{time}* εκφράζει τη συνολική μεταβολή στη διάρκεια της μελέτης ενώ ο δείκτης * τη στατιστικώς σημαντική διαφοροποίηση ($p < 0.05$) σε σχέση με την έναρξη της αγωγής ($t=0$, *baseline*). Τα μεγέθη είναι εκφρασμένα σε *pmol/min/mg*.

6.4.4 Λιποπρωτεϊνική φωσφολιπάση A2 (Lp-PLA2)

Στην ομάδα A η ειδική δραστηριότητα της Lp-PLA2 στο πλάσμα (σχήμα 14) διαφοροποιείται στη διάρκεια της 12-μηνιαίας μελέτης ($p_{\text{time}_A}=0.003$), εμφανίζοντας μειώσεις τον 9^ο και τον 12^ο μήνα ($p_9=0.008$ και $p_{12}=0.008$). Στην ομάδα B η ειδική δραστηριότητα της Lp-PLA2 διαφοροποιείται στη διάρκεια της αγωγής ($p_{\text{time}_B}=0.002$), εμφανίζοντας μια στιγμιαία αύξηση τον 9^ο μήνα αγωγής ($p_9=0.002$). Στις ομάδες Γ και Ν η ειδική δραστηριότητα του ενζύμου μένει σταθερή στη διάρκεια του 12-μηνιαίου ($p_{\text{time}_\Gamma}=0.532$ και $p_{\text{time}_N}=0.106$), δίχως επιμέρους μεταβολές. Στην ομάδα Δ η ειδική δραστηριότητα της Lp-PLA2 στο πλάσμα διαφοροποιείται στη διάρκεια της 12-μηνιαίας μελέτης ($p_{\text{time}_\Delta}=0.001$), εμφανίζοντας μειώσεις από τον 6^ο ως τον 12^ο μήνα ($p_6=0.006$, $p_9=0.006$ και $p_{12}=0.049$).





Σχήμα 14: Επίδραση αντιρετροϊκής αγωγής στην ειδική δραστηριότητα της Lp-PLA2 στο πλάσμα.

i) ομάδα *tenofovir/emtricitabine/efv*, ii) ομάδα *abacavir/lamivudine/efv*, iii) ομάδα *tenofovir/emtricitabine/atv-r*, iv) ομάδα *abacavir/lamivudine/atv-r*, και v) ομάδα *naïve*. Το *p*time εκφράζει τη συνολική μεταβολή στη διάρκεια της μελέτης ενώ το * τη στατιστικώς σημαντική διαφοροποίηση ($p < 0.05$) σε σχέση με την έναρξη της αγωγής ($t=0$, baseline). Τα μεγέθη είναι εκφρασμένα σε pmol/min/mL .

6.5 Συγκρίσεις μεταξύ των ομάδων

Για τις συγκρίσεις των ομάδων χρησιμοποιήθηκαν τα αποτελέσματα που παρουσιάστηκαν παραπάνω χρησιμοποιώντας κάθε φορά το κατάλληλο στατιστικό μοντέλο. Αρχικά έγινε η σύγκριση κάθε αντιρετροϊκής ομάδας (Α-Δ) με την ομάδα αναφοράς (Ν) και στη συνέχεια έγιναν συγκρίσεις των ομάδων ανά ζεύξη, ανάλογα τα κοινά αντιρετροϊκά φάρμακα που περιέχουν.

6.5.1 Συγκρίσεις αντιρετροϊκών ομάδων με την ομάδα αναφοράς

Η κάθε αντιρετροϊκή ομάδα (Α, Β, Γ και Δ) συγκρίθηκε με την ομάδα αναφοράς (Ν) στις χρονικές στιγμές της έναρξης και της λήξης της μελέτης ($t=0$ και $t=12$) και τα αποτελέσματα εμφανίζονται στους πίνακες 6–8.

ο Επίπεδα PAF

Τα αποτελέσματα (πίνακας 6) δείχνουν ότι τα επίπεδα του δεσμευμένου και του συνολικού PAF των ομάδων Α και Β εμφανίζουν χαμηλότερες τιμές ενώ της ομάδας Δ υψηλότερες σε σχέση με την ομάδα Ν τόσο στην έναρξη όσο και στη λήξη της μελέτης.

Αναφορικά με τα επίπεδα του ελεύθερου PAF μόνο η ομάδα Δ εμφανίζει χαμηλότερες τιμές από την ομάδα Ν και στις δύο χρονικές στιγμές. Τέλος, η ομάδα Γ δεν έδειξε στατικές σημαντικές διαφοροποιήσεις σε σχέση την ομάδα Ν στα επίπεδα PAF.

Πίνακας 6: Επιμέρους συγκρίσεις αντιρετροϊκών ομάδων Α-Δ με την ομάδα Ν στα επίπεδα PAF.

Επίπεδα PAF	Ομάδες vs Naïve	$p_{baseline}$	p_{12}	P_{int}
Δεσμευμένος PAF	A ↓	0.008	0.000	0.000
	B ↓	0.001	0.000	
	Γ	-	-	
	Δ ↑	0.001	0.000	
Ελεύθερος PAF	A	-	-	0.000
	B	-	-	
	Γ	-	-	
	Δ ↓	0.045	0.005	
Συνολικός PAF	A ↓	0.000	0.000	0.000
	B ↓	0.000	0.000	
	Γ	-	-	
	Δ ↑	0.001	0.000	

Το P_{int} εκφράζει τη συνολική διαφοροποίηση ενώ τα $p_{baseline}$ και p_{12} τις διαφοροποιήσεις κάθε ομάδας στις αντίστοιχες χρονικές στιγμές, $p < 0.05$. Οι δείκτες ↑ και ↓ εκφράζουν αν η αντιρετροϊκή ομάδα έχει μεγαλύτερες ή μικρότερες τιμές από την ομάδα αναφοράς αντίστοιχα.

ο Βιοσύνθεση PAF

Τα αποτελέσματα (πίνακας 7) δείχνουν ότι η ειδική δραστικότητα της PAF-CPT στα λευκοκύτταρα των ομάδων Α και Β εμφανίζει υψηλότερες τιμές σε σχέση με την ομάδα Ν και στις δύο χρονικές στιγμές. Η ομάδα Γ εμφανίζει επίσης υψηλότερη ειδική δραστικότητα, αλλά μόνο στο 12^ο μήνα, ενώ στην ομάδα Δ οι τιμές σε σχέση με την ομάδα Ν δεν διαφοροποιούνται σε καμία χρονική στιγμή.

Η ειδική δραστικότητα της lyso-PAF-AT στα λευκοκύτταρα είναι αυξημένη σε όλες τις αντιρετροϊκές ομάδες σε σχέση την ομάδα Ν τόσο στην έναρξη όσο και στη λήξη της μελέτης.

Η ειδική δραστικότητα της PAF-CPT στα αιμοπετάλια παρουσιάζει χαμηλότερες τιμές για τις ομάδες Γ και Δ και στις δύο χρονικές στιγμές ενώ δεν διαφοροποιείται στις ομάδες Α και Β, σε σχέση με την ομάδα Ν.

Αναφορικά με τη lyso-PAF-AT στα αιμοπετάλια φαίνεται ότι στις δύο χρονικές τιμές της ομάδας Γ και στο baseline της ομάδας Δ η ειδική δραστικότητα είναι μικρότερη από τη ομάδα Ν. Αντιθέτως, η ομάδα Β στο 12^ο μήνα εμφανίζει υψηλότερες τιμές ενώ η ομάδα Α δεν διαφοροποιείται σε σχέση με την ομάδα Ν.

Πίνακας 7: Επιμέρους συγκρίσεις αντιρετροϊκών ομάδων Α-Δ με την ομάδα Ν στη βιοσύνθεση του PAF.

Βιοσύνθεση PAF	Ομάδες vs Naïve	p_{baseline}	p_{12}	P_{int}
PAF-CPT στα λευκοκύτταρα	A↑	0.002	0.015	0.000
	B↑	0.021	0.000	
	Γ↑	-	0.021	
	Δ	-	-	
lyso-PAF-AT στα λευκοκύτταρα	A↑	0.000	0.003	0.000
	B↑	0.000	0.002	
	Γ↑	0.002	0.000	
	Δ↑	0.000	0.000	
PAF-CPT στα αιμοπετάλια	A	-	-	0.000
	B	-	-	
	Γ↓	0.000	0.000	
	Δ↓	0.000	0.000	
lyso-PAF-AT στα αιμοπετάλια	A	-	-	0.000
	B↑	-	0.037	
	Γ↓	0.005	0.016	
	Δ↓	0.003	-	

Το P_{int} εκφράζει τη συνολική διαφοροποίηση ενώ τα p_{baseline} και p_{12} τις διαφοροποιήσεις κάθε ομάδας στις αντίστοιχες χρονικές στιγμές, $p < 0.05$. Οι δείκτες ↑ και ↓ εκφράζουν αν η αντιρετροϊκή ομάδα έχει μεγαλύτερες ή μικρότερες τιμές από την ομάδα αναφοράς αντίστοιχα.

ο Αποικοδόμηση PAF

Τα αποτελέσματα (πίνακας 8) δείχνουν ότι η ειδική δραστικότητα της PAF-AH στα λευκοκύτταρα εμφανίζει για τις ομάδες Α και Β χαμηλότερες τιμές σε σχέση με την ομάδα Ν στο 12^ο μήνα της μελέτης. Οι ομάδες Γ και Δ δεν διαφοροποιούνται σε σχέση με την ομάδα Ν σε καμία χρονική στιγμή.

Στα αιμοπετάλια οι τιμές της ομάδας Ν είναι υψηλότερες από τις αντίστοιχες των αντιρετροϊκών ομάδων τόσο στην αρχή όσο και στο τέλος της μελέτης εκτός από το baseline της ομάδας Γ όπου σημειώνεται διαφοροποίηση στη δραστικότητα.

Στα ερυθροκύτταρα οι τιμές ειδικής δραστικότητας της PAF-AH είναι υψηλότερες μόνο στο baseline των ομάδων Β και Δ, ενώ οι ομάδες Α και Γ δεν διαφοροποιούνται σε σχέση με την ομάδα Ν.

Στο πλάσμα η ειδική δραστικότητα της Lp-PLA2 είναι υψηλότερη από την ομάδα Ν μόνο στην ομάδα Β και μάλιστα και στις δύο χρονικές στιγμές. Οι υπόλοιπες ομάδες Α, Γ και Δ δεν παρουσιάζουν στατιστικώς σημαντικές διαφορές σε σχέση με την ομάδα αναφοράς.

Πίνακας 8: Επιμέρους συγκρίσεις αντιρετροϊκών ομάδων Α-Δ με την ομάδα Ν στην αποικοδόμηση του PAF.

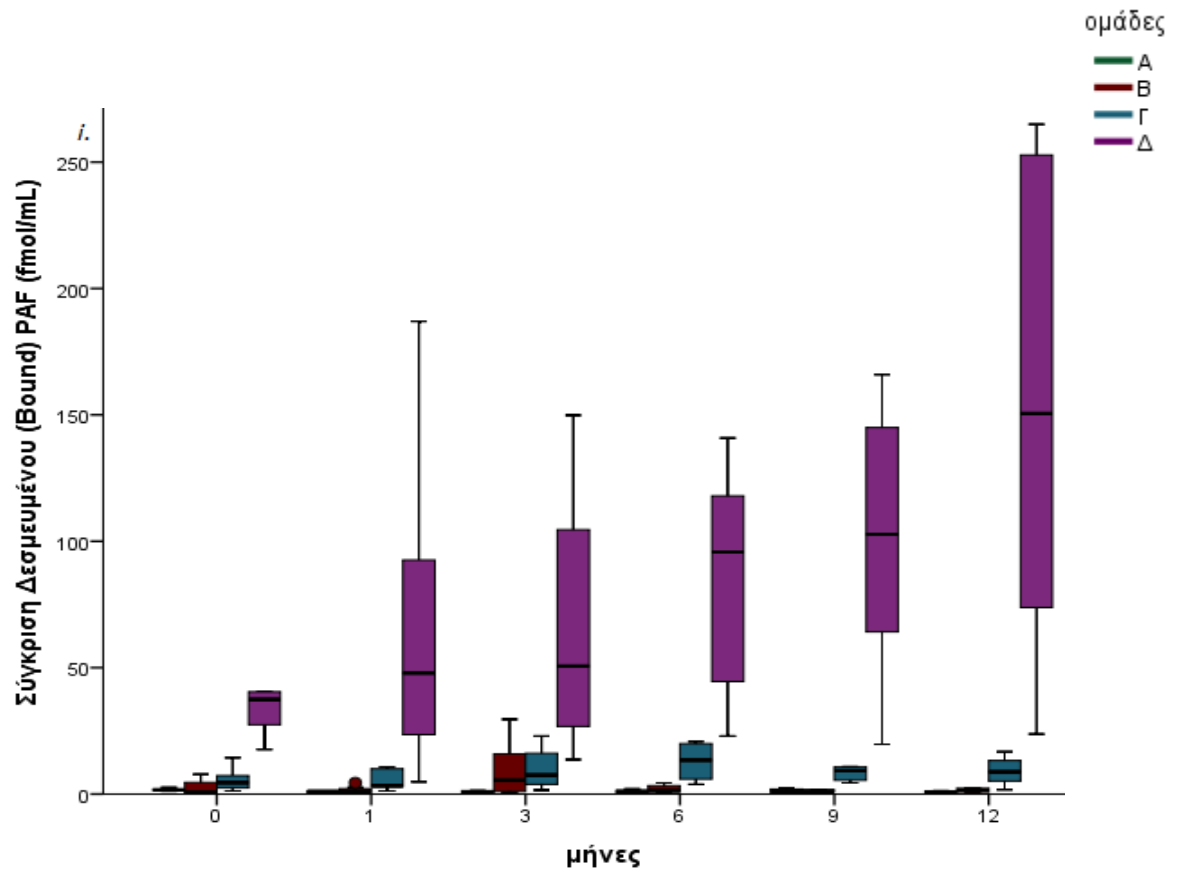
Αποικοδόμηση PAF	Ομάδες vs Naïve	p_{baseline}	p_{12}	P_{int}
PAF-AH στα λευκοκύτταρα	A↓	-	0.000	0.000
	B↓	-	0.008	
	Γ	-	-	
	Δ	-	-	
PAF-AH στα αιμοπετάλια	A↓	0.010	0.000	0.000
	B↓	0.000	0.000	
	Γ↓	-	0.000	
	Δ↓	0.018	0.000	
PAF-AH στα ερυθροκύτταρα	A	-	-	0.001
	B↑	0.003	-	
	Γ	-	-	
	Δ↑	0.000	-	
Lp-PLA2 στο πλάσμα	A	-	-	0.002
	B↑	0.007	0.001	
	Γ	-	-	
	Δ	-	-	

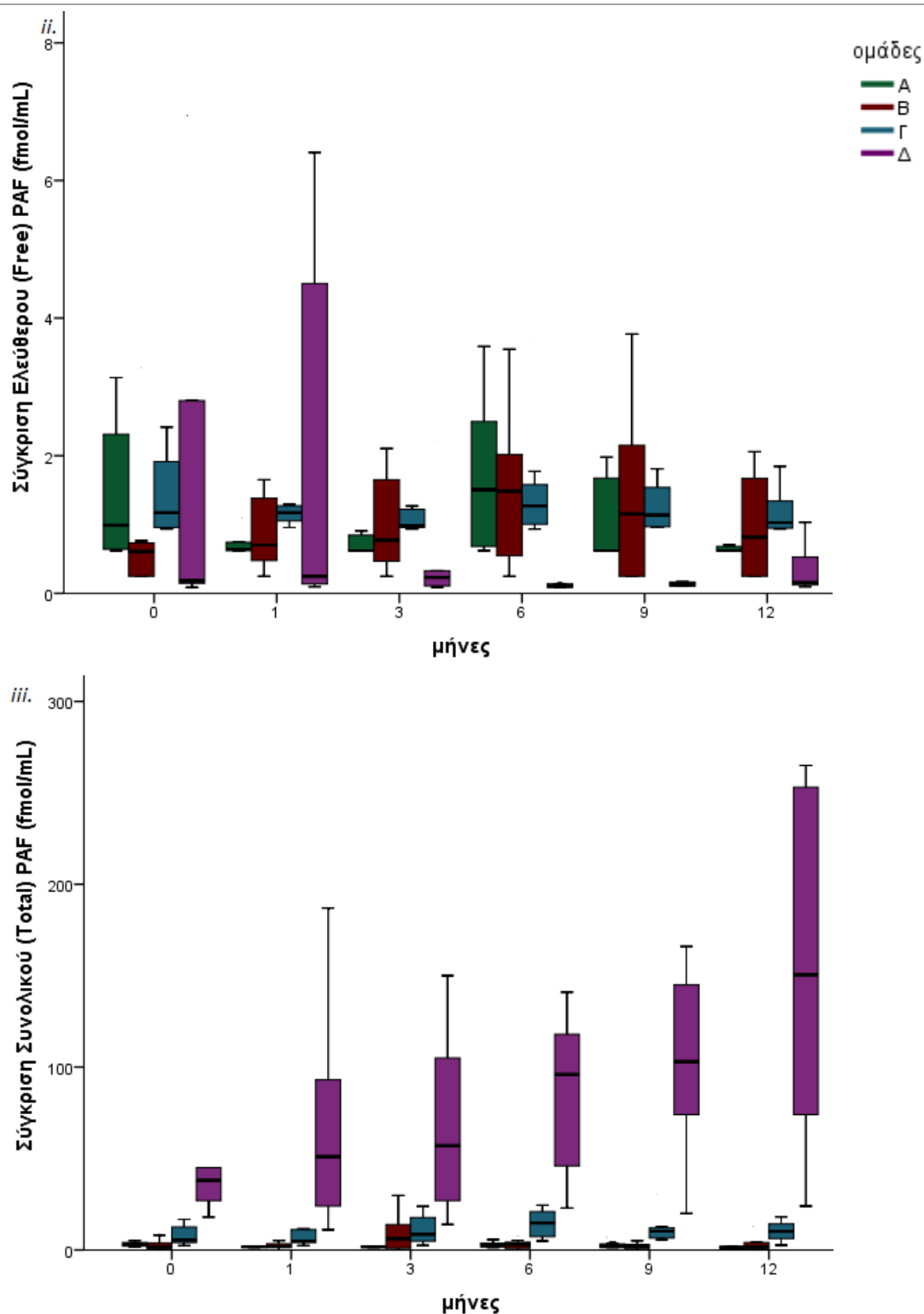
Το P_{int} εκφράζει τη συνολική διαφοροποίηση ενώ τα p_{baseline} και p_{12} τις διαφοροποιήσεις κάθε ομάδας στις αντίστοιχες χρονικές στιγμές, $p < 0.05$. Οι δείκτες ↑ και ↓ εκφράζουν αν η αντιρετροϊκή ομάδα έχει μεγαλύτερες ή μικρότερες τιμές από την ομάδα αναφοράς αντίστοιχα.

6.5.2 Συγκρίσεις αντιρετροϊκών ομάδων

Οι τέσσερις αντιρετροϊκές ομάδες (Α, Β, Γ και Δ) παρουσιάζονται στα σχήματα 15 ως 17 ως απόλυτες τιμές ενώ στους πίνακες που ακολουθούν συγκρίθηκαν μεταξύ τους ανά ζεύγη σε όλες τις χρονικές στιγμές της μελέτης.

- Επίπεδα PAF

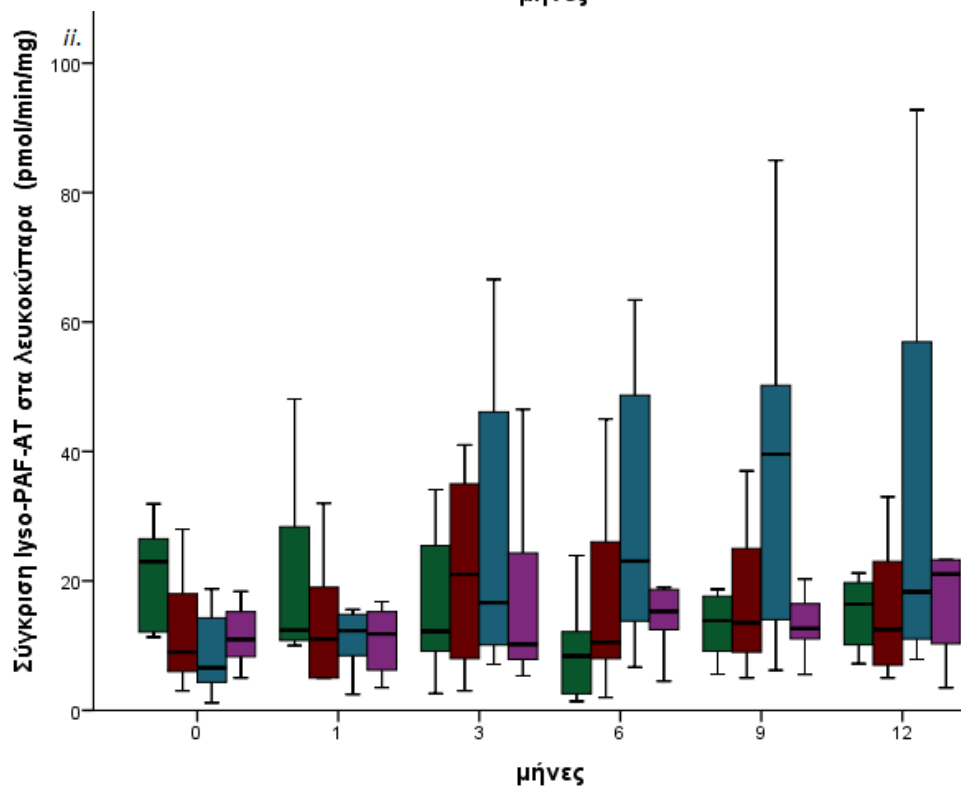
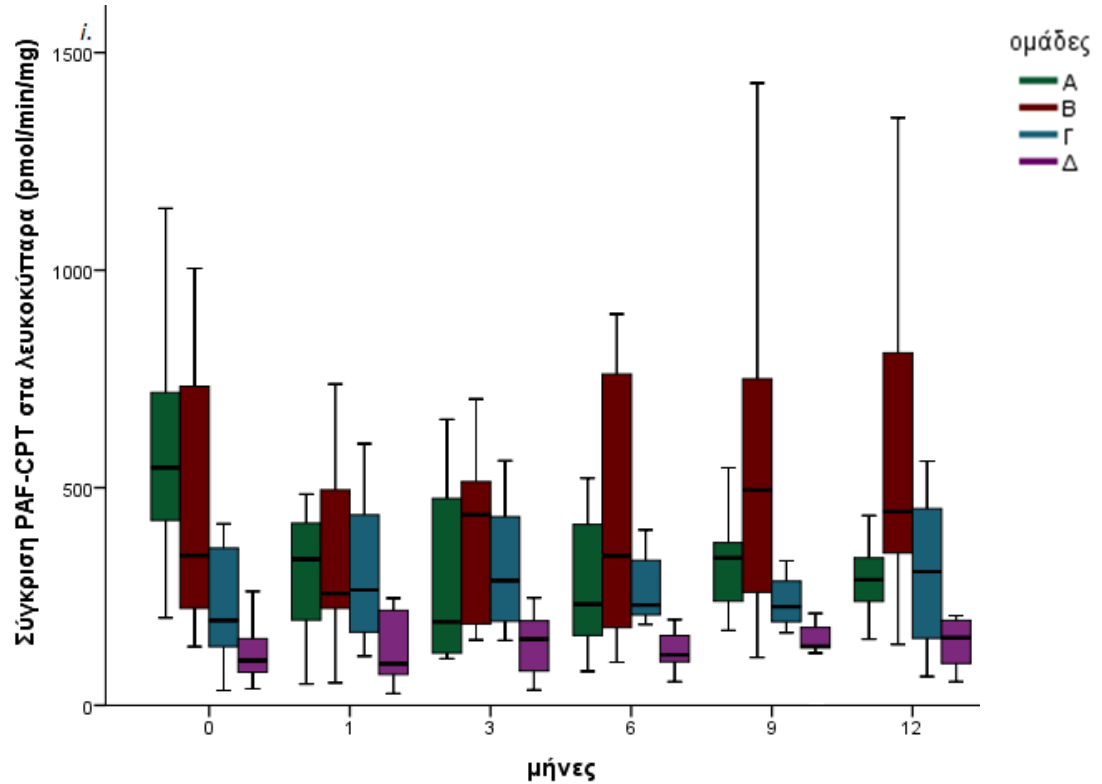


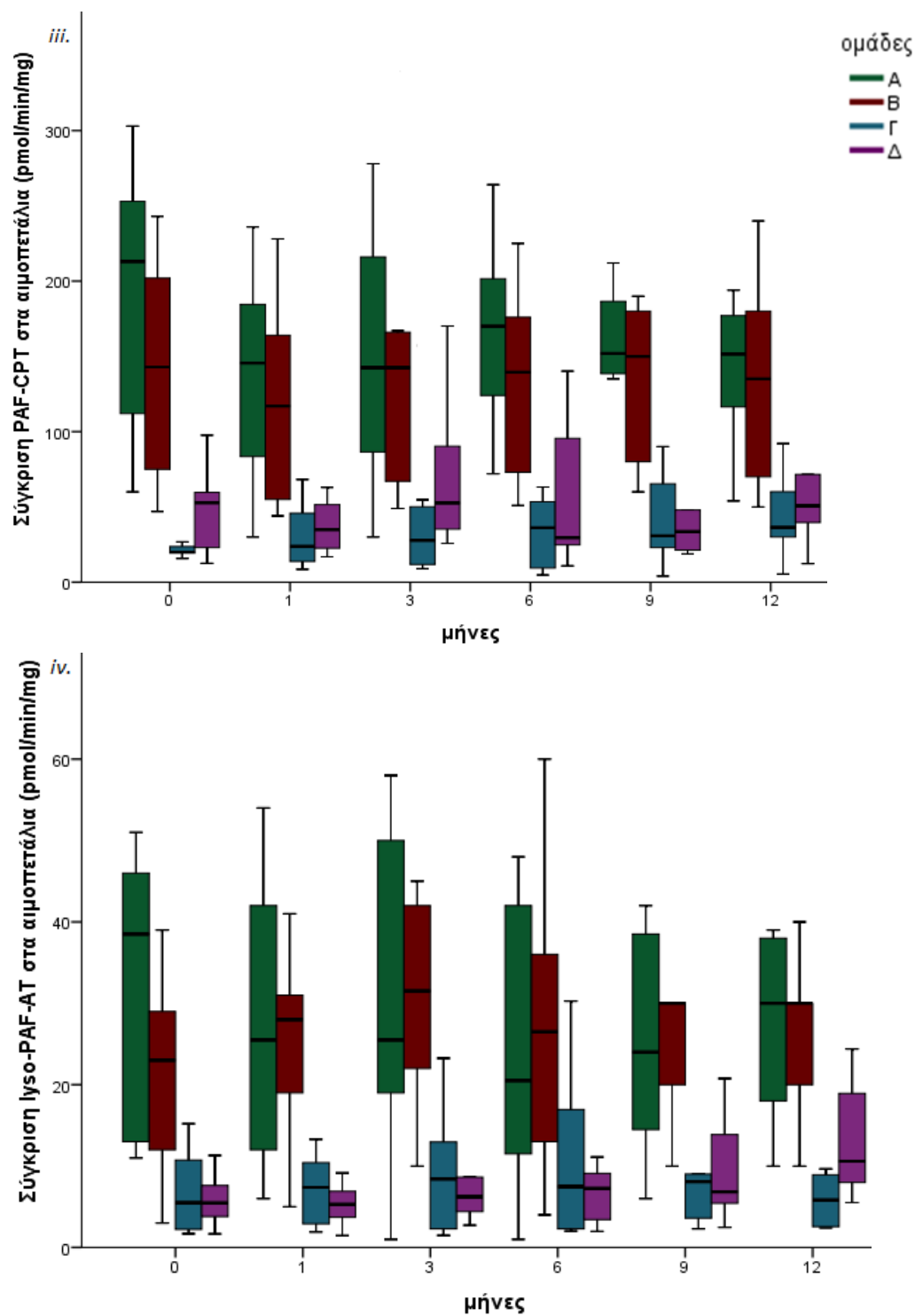


Σχήμα 15: Σύγκριση αντιρετροϊκών αγωγών (Α-Δ) στα επίπεδα PAF

i) δεσμευμένος (Bound) PAF, ii) ελεύθερος (Free) PAF, iii) συνολικός (Total) PAF. Τα μεγέθη είναι παρουσιασμένα σε fmol/mL

ο Βιοσύνθεση PAF

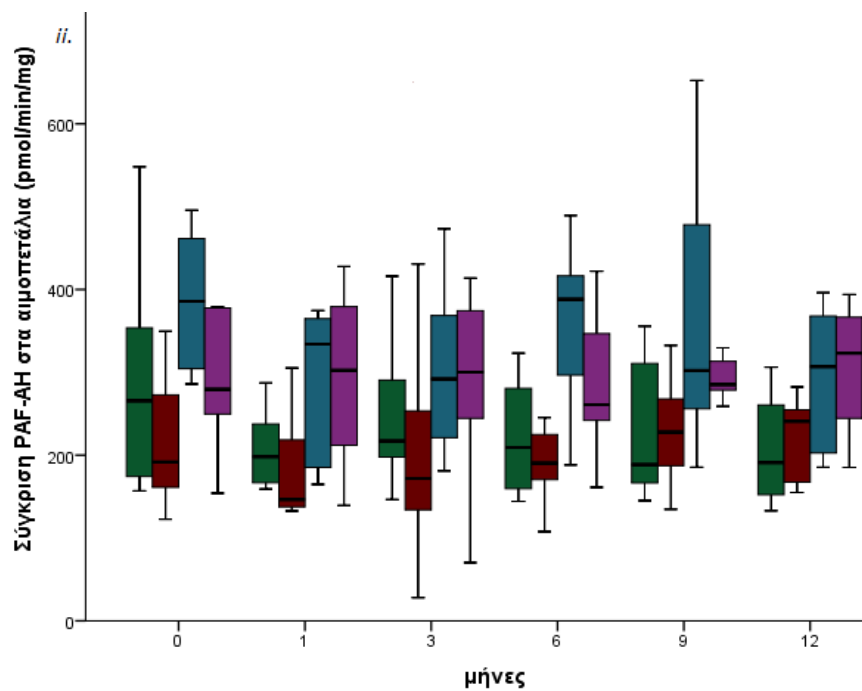
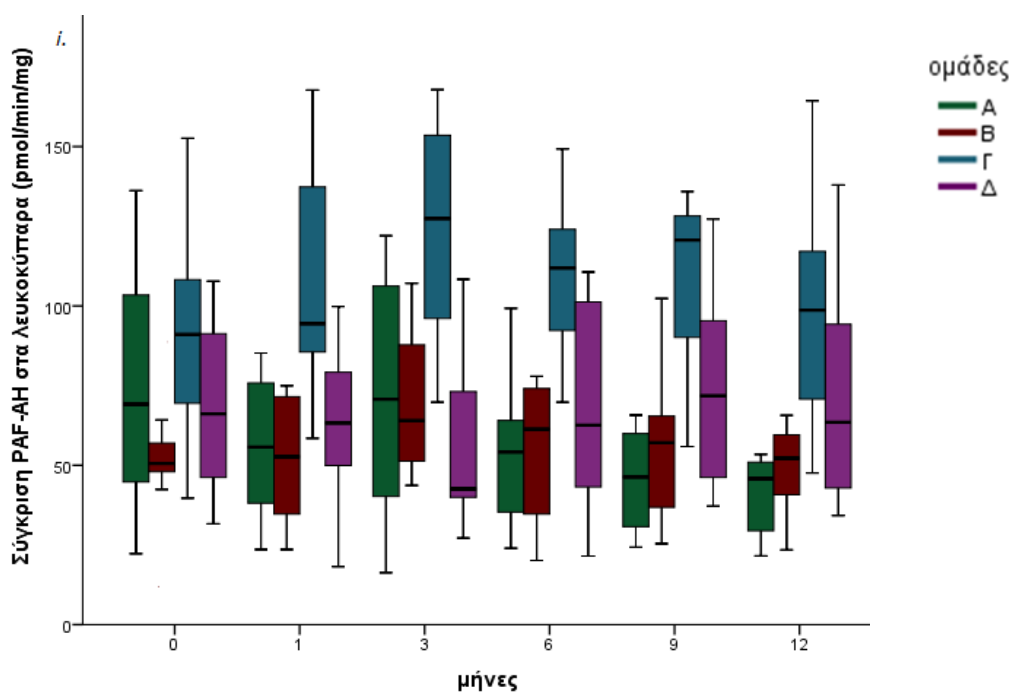


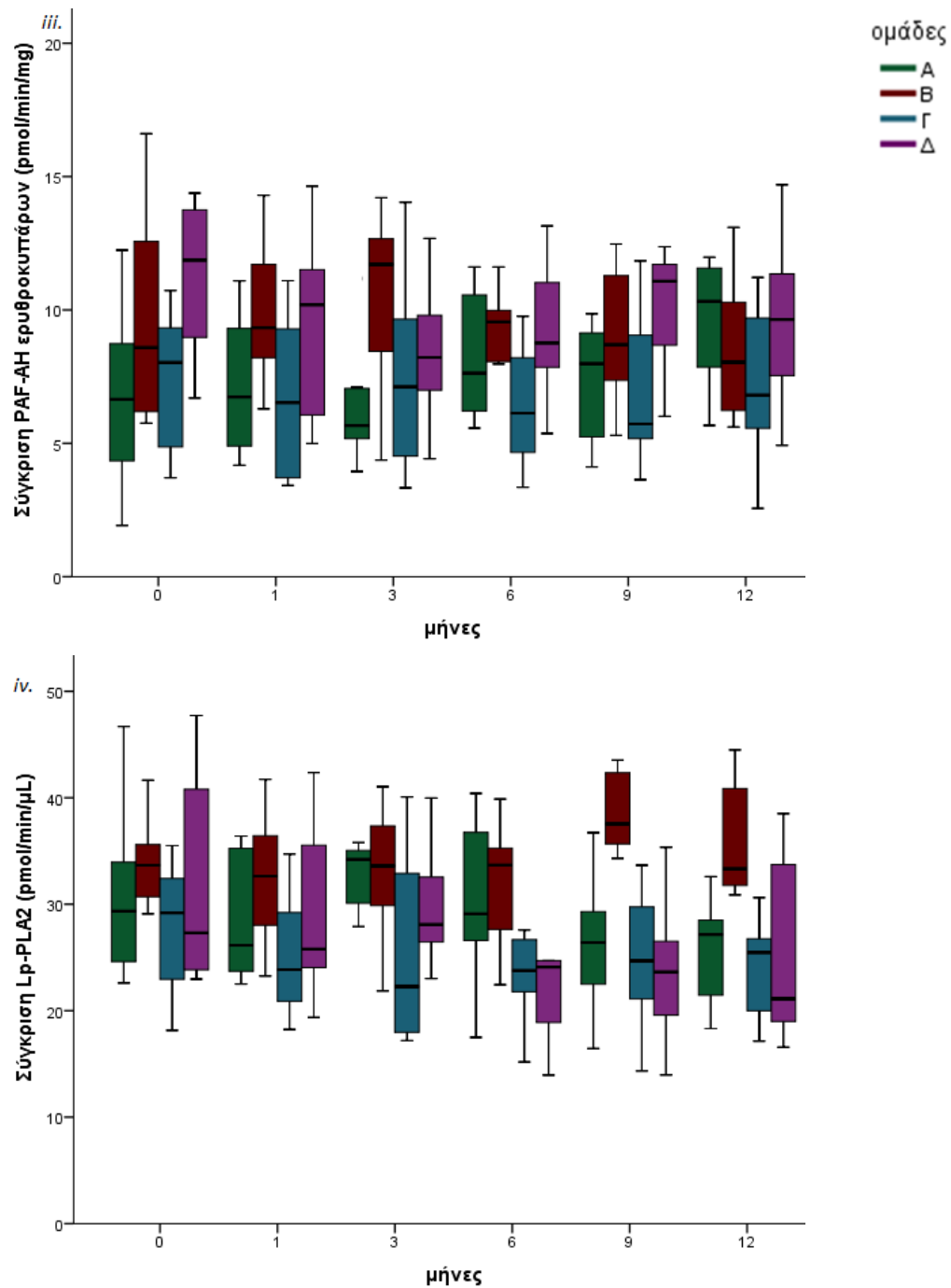


Σχήμα 16: Σύγκριση αντιρετροϊκών αγωγών (Α-Δ) στα βιοσυνθετικά ένζυμα του PAF.

i) PAF-CPT στα λευκοκύτταρα, ii) lyso-PAF-AT στα λευκοκύτταρα, iii) PAF-CPT στα αιμοπετάλια και iv) lyso-PAF-AT στα αιμοπετάλια. Τα μεγέθη είναι εκφρασμένα σε pmol/min/mg.

ο Αποικοδόμηση PAF





Σχήμα 17: Σύγκριση αντιρετροϊκών αγωγών (Α-Δ) στα αποικοδομητικά ένζυμα του PAF.

i) PAF-AH στα λευκοκύτταρα, ii) PAF-AH στα αιμοπετάλια, iii) PAF-AH στα ερυθροκύτταρα και iv) Lp-PLA2 στο πλάσμα. Τα μεγέθη είναι εκφρασμένα σε pmol/min/mg ή μL .

6.5.2.1 Συγκρίσεις αντιρετροϊκών ομάδων με efavirenz

Από τη συνολική σύγκριση των ομάδων με efavirenz προκύπτει διαφοροποίηση στη Lp-PLA2 και στην PAF-AH στα ερυθροκύτταρα ($P_{int} < 0.05$) με μεγαλύτερες τιμές για την ομάδα Β. Επιπλέον προκύπτουν κάποιες επιμέρους διαφοροποιήσεις και συγκεκριμένα, τον 3^ο μήνα στα επίπεδα δεσμευμένου και συνολικού PAF, τον 12^ο στην ειδική δραστηριότητα της PAF-CPT στα λευκοκύτταρα, τον 3^ο μήνα στην ειδική δραστηριότητα της PAF-AH στα ερυθροκύτταρα και τον 9^ο και 12^ο για τη Lp-PLA2. Σε όλες τις περιπτώσεις οι τιμές της ομάδας Β εμφανίζουν τις υψηλότερες τιμές.

Πίνακας 9: Σύγκριση αντιρετροϊκών ομάδων με efavirenz (A vs B).

Ζεύγος με efavirenz (ομάδες Α και Β)						
	P_1	P_3	P_6	P_9	P_{12}	P_{int}
Δεσμευμένος PAF	-	0.038	-	-	-	0.357
Ελεύθερος PAF	-	-	-	-	-	0.917
Συνολικός PAF	-	0.040	-	-	-	0.212
PAF-CPT στα λευκοκύτταρα	-	-	-	-	0.016	0.304
lyso-PAF-AT στα λευκοκύτταρα	-	-	-	-	-	0.055
PAF-CPT στα αιμοπετάλια	-	-	-	-	-	0.438
lyso-PAF-AT στα αιμοπετάλια	-	-	-	-	-	0.828
PAF-AH στα αιμοπετάλια	-	-	-	-	-	0.396
PAF-AH στα ερυθροκύτταρα	-	0.006	-	-	-	0.038
Lp-PLA2	-	-	-	<0.001	<0.001	0.017

Το P_{int} εκφράζει τη συνολική διαφοροποίηση ενώ τα p_{1-12} τις διαφοροποιήσεις των δύο ομάδων στις αντίστοιχες χρονικές στιγμές, $p < 0.05$.

6.5.2.2 Συγκρίσεις αντιρετροϊκών ομάδων με atazanavir-r

Από τη σύγκριση των ομάδων με atazanavir-r προκύπτει συνολική διαφοροποίηση στα επίπεδα PAF, στην PAF-CPT στα λευκοκύτταρα και στην PAF-AH στα λευκοκύτταρα και τα ερυθροκύτταρα. Συγκεκριμένα για τα επίπεδα, εμφανίζονται υψηλότερες τιμές για την ομάδα Δ για το δεσμευμένο και το συνολικό PAF και υψηλότερες τιμές για την ομάδα Γ από τον 3^ο ως τον 9^ο μήνα για τον ελεύθερο PAF.

Η ειδική δραστικότητα της PAF-CPT στα λευκοκύτταρα είναι υψηλότερη στην ομάδα Γ από τον 1^ο ως τον 9^ο μήνα και της lyso-PAF-AT στα αιμοπετάλια είναι υψηλότερη στην ομάδα Δ τον 12^ο μήνα. Η ειδική δραστικότητα της PAF-AH στα λευκοκύτταρα είναι υψηλότερη στην ομάδα Γ από τον 1^ο ως τον 9^ο μήνα και στα ερυθροκύτταρα είναι υψηλότερη στην ομάδα Δ τον 9^ο μήνα.

Πίνακας 10: Σύγκριση αντιρετροϊκών ομάδων με atazanavir-r. (Γ vs Δ).

Ζεύγος με atazanavir-r (ομάδες Γ και Δ)						
	p_1	p_3	p_6	p_9	p_{12}	P_{int}
Δεσμευμένος PAF	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
Ελεύθερος PAF	-	0.027	0.001	0.001	-	0.008
Συνολικός PAF	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
PAF-CPT στα λευκοκύτταρα	0.016	0.006	0.000	0.001	-	<0.001
lyso-PAF-AT στα λευκοκύτταρα	-	-	-	-	-	0.503
PAF-CPT στα αιμοπετάλια	-	-	-	-	-	0.082
lyso-PAF-AT στα αιμοπετάλια	-	-	-	-	0.047	0.847
PAF-AH στα λευκοκύτταρα	0.006	0.001	0.011	0.021	-	0.001
PAF-AH στα αιμοπετάλια	-	-	-	-	-	0.432
PAF-AH στα ερυθροκύτταρα	-	-	-	0.011	-	0.016
Lp-PLA2	-	-	-	-	-	0.668

Το P_{int} εκφράζει τη συνολική διαφοροποίηση ενώ τα p_{1-12} τις διαφοροποιήσεις των δύο ομάδων στις αντίστοιχες χρονικές στιγμές, $p < 0.05$.

6.5.2.3 Συγκρίσεις αντιρετροϊκών ομάδων με tenofovir-DF/emtricitabine

Από τη σύγκριση των ομάδων με tenofovir-DF/emtricitabine προκύπτει συνολική διαφοροποίηση στα επίπεδα PAF, στα βιοσυνθετικά ένζυμα στα αιμοπετάλια και στην PAF-AH στα λευκοκύτταρα και στα αιμοπετάλια. Συγκεκριμένα για τα επίπεδα, εμφανίζονται υψηλότερες τιμές για την ομάδα Γ από τον 1^ο ως τον 12^ο μήνα για το δεσμευμένο και το συνολικό PAF και από τον 1^ο ως τον 3^ο μήνα για τον ελεύθερο PAF. Η ειδική δραστικότητα της lyso-PAF-AT στα λευκοκύτταρα είναι υψηλότερη στην ομάδα Γ τον 6^ο και τον 9^ο μήνα. Η ειδική δραστικότητα της PAF-CPT από τον

1^ο ως το 12^ο μήνα και της lyso-PAF-AT τους 1^ο, 3^ο, 9^ο και 12^ο μήνες στα αιμοπετάλια είναι υψηλότερη στην ομάδα Α. Σχετικά με την αποικοδόμηση η PAF-AH στα λευκοκύτταρα από τον 1^ο ως το 12^ο μήνα και στα αιμοπετάλια από τον 6^ο ως το 12^ο μήνα είναι υψηλότερες στην ομάδα Γ. Τέλος η διαφοροποίηση στη Lp-PLA2 είναι υψηλότερη στην ομάδα Α τον 6^ο μήνα.

Πίνακας 11: Σύγκριση αντιρετροϊκών ομάδων με tenofovir-DF/ emtricitabine (Α vs Γ).

Ζεύγος με tenofovir-DF/emtricitabine (ομάδες Α και Γ)						
	p ₁	p ₃	p ₆	p ₉	p ₁₂	P _{int}
Δεσμευμένος PAF	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
Ελεύθερος PAF	<0.001	0.002	-	-	-	0.001
Συνολικός PAF	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
PAF-CPT στα λευκοκύτταρα	-	-	-	-	-	0.402
lyso-PAF-AT στα λευκοκύτταρα	-	-	0.010	0.055	-	0.491
PAF-CPT στα αιμοπετάλια	0.001	0.006	0.002	0.010	<0.001	<0.001
lyso-PAF-AT στα αιμοπετάλια	0.004	0.015	-	0.006	<0.001	0.002
PAF-AH στα λευκοκύτταρα	0.010	0.041	<0.001	<0.001	0.001	0.001
PAF-AH στα αιμοπετάλια	-	-	0.004	0.055	0.041	0.020
PAF-AH στα ερυθροκύτταρα	-	-	-	-	-	0.483
Lp-PLA2	-	-	0.021	-	-	0.157

Το P_{int} εκφράζει τη συνολική διαφοροποίηση ενώ τα p₁₋₁₂ τις διαφοροποιήσεις των δύο ομάδων στις αντίστοιχες χρονικές στιγμές, p<0.05.

6.5.2.4 Συγκρίσεις αντιρετροϊκών ομάδων με abacavir/lamivudine

Από τη σύγκριση των ομάδων με abacavir/lamivudine προκύπτει συνολική διαφοροποίηση στα επίπεδα PAF, στη PAF-CPT στα λευκοκύτταρα, σε όλα τα ένζυμα των αιμοπεταλίων και στην Lp-PLA2. Συγκεκριμένα για τα επίπεδα, εμφανίζονται υψηλότερες τιμές για την ομάδα Δ από τον 1^ο ως τον 12^ο μήνα για το δεσμευμένο και το συνολικό PAF και από τον 6^ο ως τον 12^ο μήνα για τον ελεύθερο PAF. Η ειδική δραστηριότητα της PAF-CPT στα λευκοκύτταρα όπως και στα δύο βιοσυνθετικά ένζυμα στα αιμοπετάλια είναι υψηλότερη στην ομάδα Β από τον 1^ο ως

τον 12^ο μήνα. Σχετικά με την αποικοδόμηση η PAF-AH στα αιμοπετάλια είναι υψηλότερη στην ομάδα Δ τον 1^ο, 6^ο, 9^ο και 12^ο μήνα ενώ στη Lp-PLA2 είναι υψηλότερη στην ομάδα Β τον 9^ο και το 12^ο μήνα.

Πίνακας 12: Σύγκριση αντιρετροϊκών ομάδων με abacavir/lamivudine (B vs Δ).

Ζεύγος με abacavir/lamivudine (ομάδες Β και Δ)						
	p ₁	p ₃	p ₆	p ₉	p ₁₂	P _{int}
Δεσμευμένος PAF	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
Ελεύθερος PAF	-	-	0.001	0.001	0.027	0.008
Συνολικός PAF	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
PAF-CPT στα λευκοκύτταρα	0.002	0.002	0.002	<0.001	<0.001	<0.001
lyso-PAF-AT στα λευκοκύτταρα	-	-	-	-	-	0.811
PAF-CPT στα αιμοπετάλια	<0.001	0.024	0.002	<0.001	0.024	<0.001
lyso-PAF-AT στα αιμοπετάλια	<0.001	<0.001	0.002	<0.001	0.003	<0.001
PAF-AH στα λευκοκύτταρα	-	-	-	-	-	0.395
PAF-AH στα αιμοπετάλια	0.005	-	0.006	0.003	0.014	<0.001
PAF-AH στα ερυθροκύτταρα	-	-	-	-	-	0.734
Lp-PLA2	-	-	-	<0.001	0.024	0.022

Το P_{int} εκφράζει τη συνολική διαφοροποίηση ενώ τα p₁₋₁₂ τις διαφοροποιήσεις των δύο ομάδων στις αντίστοιχες χρονικές στιγμές, p<0.05.

6.6 Ανάλυση συσχετίσεων των μεταβολών μεταξύ έναρξης και λήξης της μελέτης

Τα επίπεδα και τα μεταβολικά ένζυμα του PAF συσχετίστηκαν τόσο μεταξύ τους όσο και με πληθώρα ανθρωπομετρικών, ανοσολογικών, αιματολογικών και βιοχημικών δεικτών. Για την ανάλυση χρησιμοποιήθηκαν οι μεταβολές μεταξύ έναρξης και λήξης (Δt_{12-0}) των χαρακτηριστικών των ασθενών υπό αντιρετροϊκή αγωγή, ομάδα ART ($n=36$, ομάδες Α-Δ) και των παϊνε ασθενών ($n=8$, ομάδα Ν). Από τα αποτελέσματα προκύπτουν πληθώρα στατιστικώς σημαντικών συσχετίσεων που παρουσιάζονται στους παρακάτω πίνακες με το συντελεστή Spearman και εντός παρενθέσεως το p . Εμφανίζονται μόνο όσα μεγέθη έδειξαν συσχέτιση με $p > 0.05$ ανεξαρτήτως του συντελεστή Spearman.

○ $CD4^+$ Τ κύτταρα και ιικό φορτίο

Όσον αφορά τα $CD4^+$ Τ κύτταρα και το ιικό φορτίο, εμφανίζουν μεταξύ τους αρνητική συσχέτιση ($r=-0.359$, $p=0.031$) μόνο στους ασθενείς υπό αντιρετροϊκή αγωγή (πίνακας 13).

Πίνακας 13: Συσχετίσεις μεταξύ $CD4^+$ Τ κυττάρων και του ιικού φορτίου στην ομάδα ART.

$n=36$	VL
$CD4^+$ Τ	-0.359 (0.031)

○ $CD4^+$ Τ κύτταρα και ιικό φορτίο σε σχέση με τα επίπεδα και τα ένζυμα του PAF

Από τη συσχέτιση των $CD4^+$ Τ κυττάρων και του ιικού φορτίου με τα επίπεδα και τα ένζυμα του PAF προκύπτει θετική συσχέτιση μεταξύ του ιικού φορτίου και της PAF-AH των αιμοπεταλίων στην ομάδα ART (πίνακας 14).

Πίνακας 14: Συσχετίσεις μεταξύ $CD4^+$ Τ κυττάρων και του ιικού φορτίου με τα επίπεδα και τα μεταβολικά ένζυμα του PAF στην ομάδα ART.

$n=36$	PAF-AH(P)
VL	+0.475 (0.003)

- ο ΔΜΣ, ηλικία και κάπνισμα σε σχέση με τα επίπεδα και τα ένζυμα του PAF.

Από τη συσχέτιση των ανθρωπομετρικών χαρακτηριστικών με τα επίπεδα και τα ένζυμα του PAF στην ομάδα ART προκύπτει αρνητική συσχέτιση μεταξύ της ηλικίας και της lyso-PAF-AT των λευκοκυττάρων (πίνακας 15).

Στην ομάδα N (πίνακας 16), τα αποτελέσματα φανερώουν θετική συσχέτιση μεταξύ ηλικίας και Lp-PLA2.

Πίνακας 15: Συσχετίσεις μεταξύ ανθρωπομετρικών χαρακτηριστικών (BMI, ηλικία και κάπνισμα) με τα επίπεδα και τα μεταβολικά ένζυμα του PAF στην ομάδα ART.

n=36	Ηλικία
lyso-PAF-AT(L)	-0.369 (0.029)

Πίνακας 16: Συσχετίσεις μεταξύ ανθρωπομετρικών χαρακτηριστικών (ΔΜΣ, ηλικία και κάπνισμα) με τα επίπεδα και τα μεταβολικά ένζυμα του PAF στην ομάδα N.

n=8	Ηλικία
Lp-PLA2	+0.462 (0.028)

- ο Επίπεδα PAF σε σχέση με τα ένζυμα του PAF

Από τη συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων και των ενζύμων του PAF στην ομάδα ART προκύπτει θετική συσχέτιση μεταξύ του δεσμευμένου PAF και του βιοσυνθετικού ενζύμου PAF-CPT στα λευκοκύτταρα και στα αιμοπετάλια (πίνακας 17).

Οι αντίστοιχες συσχετίσεις για την ομάδα N φανερώουν θετική συσχέτιση για τον ελεύθερο PAF με την PAF-CPT στα αιμοπετάλια και την Lp-PLA2 (πίνακας 18).

Πίνακας 17: Συσχετίσεις μεταξύ των επιπέδων και των ενζύμων του PAF στην ομάδα ART.

n=36	Δεσμευμένος PAF	Συνολικός PAF
PAF-CPT(L)	+0.349 (0.037)	
PAF-CPT(P)	+0.373 (0.025)	+0.350 (0.036)

Πίνακας 18: Συσχετίσεις μεταξύ των επιπέδων και των ενζύμων του PAF στην ομάδα N.

n=8	Ελεύθερος PAF
PAF-CPT (P)	+0.905 (0.002)
Lp-PLA2	+0.762 (0.028)

○ Ένζυμα του PAF

Από τη συσχέτιση των ενζύμων του PAF στην ομάδα ART προκύπτουν τα αποτελέσματα του πίνακα 19. Συγκεκριμένα, η PAF-CPT των λευκοκυττάρων εμφανίζει θετική συσχέτιση με τα βιοσυνθετικά ένζυμα lyso-PAF-AT των λευκοκυττάρων και PAF-CPT των αιμοπεταλίων όπως επίσης με το αποικοδομητικό ένζυμο PAF-AH των λευκοκυττάρων και των αιμοπεταλίων. Η lyso-PAF-AT των λευκοκυττάρων συσχετίζεται θετικά με την PAF-CPT και των δύο κυττάρων και αρνητικά με την PAF-AH των ερυθροκυττάρων. Η PAF-CPT των αιμοπεταλίων εμφανίζει θετική συσχέτιση με όλα τα ένζυμα των λευκοκυττάρων καθώς και με την PAF-AH των αιμοπεταλίων. Η PAF-AH των αιμοπεταλίων εμφανίζει θετική συσχέτιση με την PAF-CPT και των δύο κυττάρων και με την PAF-AH των λευκοκυττάρων. Η PAF-AH των ερυθροκυττάρων παρουσιάζει αρνητική συσχέτιση με την lyso-PAF-AT των λευκοκυττάρων.

Αντίστοιχα για την ομάδα N, η PAF-CPT των αιμοπεταλίων εμφανίζει θετική συσχέτιση με την Lp-PLA2 ενώ η lyso-PAF-AT των αιμοπεταλίων εμφανίζει αρνητική συσχέτιση με την PAF-AH των αιμοπεταλίων (πίνακας 20).

Πίνακας 19: Συσχετίσεις μεταξύ των ενζύμων του PAF στην ομάδα ART.

n=36	PAF-CPT(L)	lyso-PAF-AT(L)	PAF-CPT(P)	PAF-AH(L)	PAF-AH(P)	PAF-AH(R)
PAF-CPT(L)		+0.452 (0.006)	+0.446 (0.006)	+0.327 (0.050)	+0.362 (0.030)	
lyso-PAF-AT(L)	+0.452 (0.006)		+0.491 (0.002)			-0.377 (0.023)
PAF-CPT(P)	+0.446 (0.006)	+0.491 (0.002)		+0.370 (0.026)	+0.434 (0.008)	
lyso-PAF-AT(P)						
PAF-AH(L)	+0.327 (0.050)		+0.370 (0.026)		+0.451 (0.006)	
PAF-AH(P)	+0.362 (0.030)		+0.434 (0.008)	+0.451 (0.006)		
PAF-AH(R)		-0.377 (0.023)				

Πίνακας 20: Συσχετίσεις μεταξύ των ενζύμων του PAF στην ομάδα N.

n=8	PAF-CPT(P)	lyso-PAF-AT(P)	PAF-AH(P)	Lp-PLA2
PAF-CPT(P)				+0.810 (0.015)
lyso-PAF-AT(P)			-0.762 (0.028)	
PAF-AH(P)		-0.762 (0.028)		
Lp-PLA2	+0.810 (0.015)			

- ο *Βιοχημικά και αιματολογικά χαρακτηριστικά σε σχέση με τα επίπεδα και τα ένζυμα του PAF*

Από τη συσχέτιση των βιοχημικών και αιματολογικών χαρακτηριστικών με τα επίπεδα και τα ένζυμα του PAF στην ομάδα ART προκύπτουν τα αποτελέσματα του πίνακα 21. Ο δεσμευμένος PAF εμφανίζει αρνητική συσχέτιση τον αριθμό ερυθροκυττάρων και την αιμοσφαιρίνη ενώ ο ελεύθερος PAF εμφανίζει θετική συσχέτιση με τη γλυκόζη. Στα λευκοκύτταρα, η PAF-CPT εμφανίζει αρνητική συσχέτιση με τον αιματοκρίτη και η lyso-PAF-AT με τη γ-GT ενώ στα αιμοπετάλια η lyso-PAF-AT εμφανίζει αρνητική συσχέτιση με την CK. Σχετικά με την αποικοδόμηση, η PAF-AH των λευκοκυττάρων εμφανίζει θετική συσχέτιση με την κινάση της κρεατίνης και αρνητική με τον αριθμό ερυθροκυττάρων και τον αιματοκρίτη. Η PAF-AH των αιμοπεταλίων εμφανίζει αρνητική συσχέτιση με την ALP, τις αλβουμίνες και τον αριθμό αιμοπεταλίων. Τέλος, η Lp-PLA2 εμφανίζει αρνητική συσχέτιση με τον αριθμό λευκοκυττάρων.

Οι αντίστοιχες συσχετίσεις για την ομάδα N παρουσιάζονται στον πίνακα 22. Συγκεκριμένα, ο δεσμευμένος και ο συνολικός PAF εμφανίζουν αρνητική συσχέτιση με το άζωτο ουρίας. Η PAF-CPT των λευκοκυττάρων εμφανίζει θετική συσχέτιση με την ALP και lyso-PAF-AT των αιμοπεταλίων εμφανίζει αρνητική συσχέτιση με SGOT, την LDH, την CK και θετική με την HDL, τον αριθμό ερυθροκυττάρων και τον αιματοκρίτη. Η PAF-AH των αιμοπεταλίων έχει θετική συσχέτιση με την SGOT και τη CK ενώ η PAF-AH των ερυθροκυττάρων αρνητική συσχέτιση με την αιμοσφαιρίνη.

Πίνακας 21: Συσχετίσεις μεταξύ βιοχημικών και αιματολογικών χαρακτηριστικών με τα επίπεδα και τα ένζυμα του PAF στην ομάδα ART.

n=36	GLUC	CREA	CK	γ-GT	ALP	ALB	WBC	RBC	HGB	HCT	PLT
Δεσ/νος PAF								-0.332 (0.048)	-0.330 (0.050)		
Ελ/ρος PAF	+0.338 (0.043)										
PAF-CPT(L)										-0.370 (0.026)	
lyso-PAF-AT(L)				-0.341 (0.042)							
lyso-PAF-AT(P)			-0.367 (0.028)								
PAF-AH(L)		+0.382 (0.022)						-0.374 (0.025)		-0.428 (0.009)	
PAF-AH(P)				-0.421 (0.011)	-0.387 (0.020)						-0.350 (0.036)
Lp-PLA2							-0.357 (0.032)				

Πίνακας 22: Συσχετίσεις μεταξύ βιοχημικών και αιματολογικών χαρακτηριστικών με τα επίπεδα και τα ένζυμα του PAF στην ομάδα N.

n=8	BUN	SGOT,AST	LDH	CK	ALP	HDL	RBC	HGB	HCT
Δεσ/νος PAF	-0.810 (0.015)								
Συν/κός PAF	-0.810 (0.015)								
PAF-CPT(L)					+0.762 (0.028)				
lyso-PAF-AT(P)		-0.707 (0.050)	-0.707 (0.050)	-0.810 (0.015)		+0.833 (0.010)	+0.762 (0.028)		+0.771 (0.025)
PAF-AH(P)		+0.755 (0.031)		+0.857 (0.007)					
PAF-AH(R)								-0.781 (0.022)	

6.7 *In vivo* επίδραση αντιρετροϊκής αγωγής στις κυτταροκίνες IL-1β, IL-6, IL-8, IL-10, IL12p70, TNFα και στον παράγοντα VEGF

Από το ολικό αίμα των εθελοντών (5.8.2) απομονώθηκε το πλάσμα όπως περιγράφεται στο εδάφιο (5.9). Στη συνέχεια προσδιορίστηκαν οι κυτταροκίνες (5.14) και ο παράγοντας VEGF (5.15) και μετρήθηκαν μέσω κυτταρομετρία ροής (5.16). Οι μελέτη των εν λόγω παραγόντων φλεγμονής πραγματοποιήθηκε στις ομάδες Α και Β. Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι τα επίπεδα κυτταροκινών και VEGF παραμένουν σταθερά στη διάρκεια του 12-μηνου ($p_{\text{times}} > 0.05$). Εξετάζοντας τη διαφοροποίηση κάθε δείκτη ως προς το baseline παρατηρείται μια παροδική αύξηση του TNFα στον 1^ο μήνα, στην ομάδα Β. Από τη σύγκριση των δύο ομάδων στο σύνολο της παρέμβασης ($P_{\text{int.}} > 0.05$) αλλά και σε κάθε μήνα χωριστά ($P_{0-12} > 0.05$) δεν προέκυψε κάποια στατιστικώς σημαντική διαφοροποίηση (Πίνακας 23). Τα επίπεδα της IL-8 δεν ανιχνεύθηκαν με τη μέθοδο αυτή στους ασθενείς των ομάδων Α και Β. Η ανάλυση των κυτταροκινών πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Ανοσολογίας και Ιστοσυμβατότητας του Γ.Ν. <<Ευαγγελισμός>> .

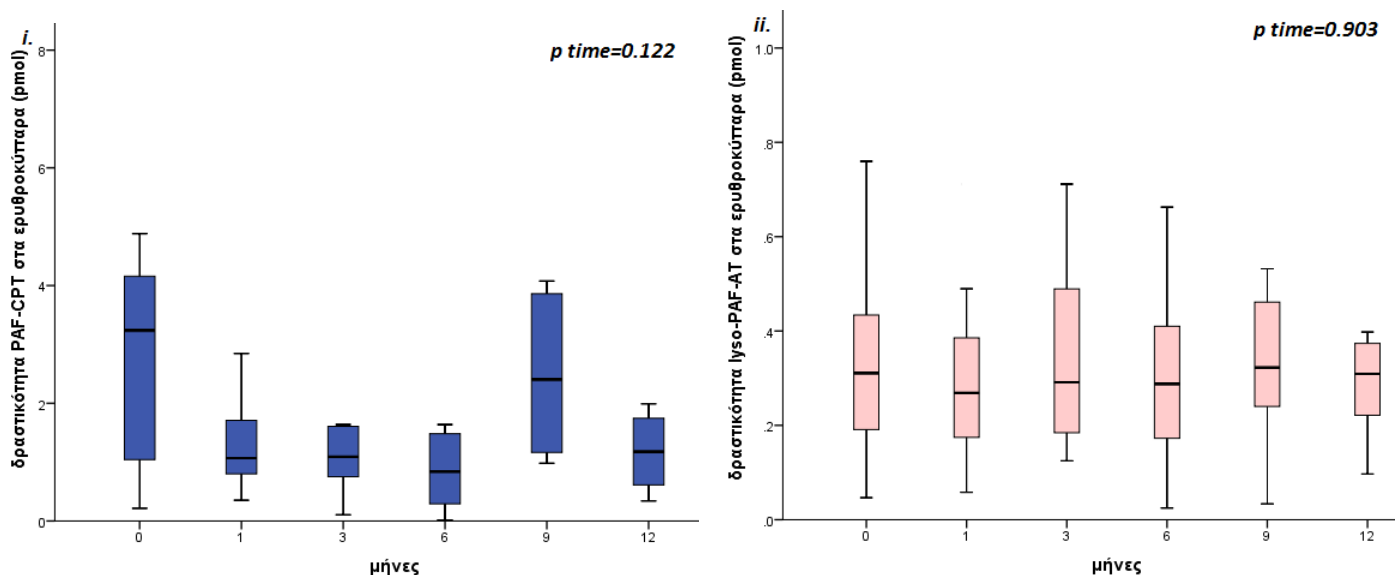
Πίνακας 23: Επίπεδα κυτταροκινών και VEGF στους HIV ασθενείς των ομάδων Α και Β.

Παράγοντας (pg/mL)	Ομάδα	Baseline	1 ^{ος} μήνας	3 ^{ος} μήνας	6 ^{ος} μήνας	9 ^{ος} μήνας	12 ^{ος} μήνας	p _{time}	P _{int}
IL-1β	A	59.6 (42.4 - 75.8)	42.3 (26.5 - 72.8)	68.7 (48.5 - 87.1)	48.4 (40.0 - 69.2)	43.7 (32.1 - 54.8)	59.0 (38.1 - 78.6)	0.323	0.060
	B	71.7 (19.5 - 97.4)	64.1 (41.6 - 106.8)	88.4 (44.1 - 127.0)	40.6 (36.3 - 134.4)	39.6 (25.9 - 69.0)	53.3 (30.2 - 103.2)	0.276	
IL-6	A	44.5 (16.0 - 66.4)	76.6 (25.9 - 339.1)	33.6 (12.6 - 202.1)	34.1 (16.4 - 109.0)	44.5 (19.4 - 167.7)	86.9 (49.9 - 186.7)	0.505	0.173
	B	49.9 (23.5 - 153.3)	63.2 (10.4 - 170.8)	89.4 (14.6 - 260.0)	49.9 (20.2 - 91.1)	52.9 (12.4 - 115.6)	65.2 (43.0 - 165.5)	0.909	
IL-10	A	40.6 (14.9 - 135.5)	53.2 (20.8 - 89.4)	30.9 (16.0 - 101.9)	61.4 (25.1 - 140.4)	33.7 (13.2 - 76.3)	30.9 (18.9 - 105.9)	0.905	0.137
	B	22.0 (15.7 - 71.7)	92.1 (24.6 - 133.22)	52.7 (21.6 - 137.8)	31.1 (25.8 - 64.6)	33.7 (17.3 - 81.0)	38.5 (10.3 - 57.2)	0.478	
TNFα	A	206.1 (116.3 - 310.2)	154.41 (57.74 - 210.9)	221.7 (72.4 - 463.3)	121.1 (81.6 - 420.5)	90.3 (61.3 - 248.8)	77.6 (52.3 - 216.4)	0.539	0.136
	B	130.3 (71.2 - 281.7)	205.4* (158.5 - 462.1)	202.6 (80.8 - 366.7)	128.5 (90.1 - 298.2)	91.4 (61.3 - 230.4)	95.3 (70.5 - 145.0)	0.183	
IL-12p70	A	53.1 (34.5 - 193.1)	111.0 (35.9 - 208.9)	62.8 (18.8 - 159.9)	87.7 (36.2 - 289.2)	38.0 (26.5 - 158.3)	67.1 (34.5 - 94.3)	0.778	0.104
	B	21.3 (5.0 - 217.0)	122.8 (42.1 - 243.2)	137.0 (38.2 - 217.3)	149.0 (26.7 - 259.5)	65.9 (41.1 - 150.0)	52.0 (18.77 - 150.58)	0.483	
VEGF	A	5.9 (0.2 - 22.3)	13.5 (1.7 - 27.1)	5.3 (3.6 - 24.0)	8.9 (1.6 - 14.3)	11.7 (1.2 - 18.4)	9.7 (0.7 - 18.5)	0.991	0.200
	B	14.3 (2.3 - 28.0)	9.5 (3.1 - 12.0)	8.3 (0.2 - 17.7)	11.1 (6.3 - 15.6)	16.8 (5.1 - 27.8)	6.7 (1.0 - 12.0)	0.314	

Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται σε pg/mL ως διάμεσο και ενδοτεταρτημοριακό εύρος (25^ο-75^ο). Το p_{time} συμβολίζει τη συνολική μεταβολή στη διάρκεια της μελέτης, ο δείκτης * τη στατιστικώς σημαντική διαφοροποίηση (p<0.05) σε σχέση με την έναρξη της αγωγής (t=0, baseline). Το P_{int} εκφράζει τη συνολική διαφοροποίηση που προκύπτει ύστερα από τη σύγκριση των δύο ομάδων μεταξύ τους.

6.8 Δραστικότητα των βιοσυνθετικών ενζύμων του PAF, PAF-CPT και lyso-PAF-AT, στα ερυθροκύτταρα HIV ασθενών

Από το ολικό αίμα των υγιών εθελοντών (5.8.2) απομονώθηκαν τα ερυθροκύτταρα όπως περιγράφεται στο εδάφιο (6.9). Στη συνέχεια έγινε ο προσδιορισμός δραστικότητας της PAF-CPT και της lyso-PAF-AT. Ο παραγόμενος PAF εκχυλίζεται με Bligh-Dyer (5.2) και διαχωρίζεται με TLC (5.5). Ο PAF προσδιορίζεται ποσοτικά μέσω βιολογικής δοκιμασίας σε πλυμένα αιμοπετάλια κουνελιού (5.7) και υπολογίζεται η δραστικότητα των ενζύμων. Οι ποσότητες πρωτεΐνης και ο χρόνος της αντίδρασης επιλέχθηκαν προσεγγιστικά στο σημείο αυτό ώστε τα αποτελέσματα να αποτελέσουν ένα πρώτο βήμα στην ευρύτερη μελέτη των βιοσυνθετικών ενζύμων του PAF στα ερυθροκύτταρα και την πιθανή εμπλοκή τους στην HIV λοίμωξη. Από όλες τις ομάδες επιλέχθηκε να μελετηθεί αρχικά η ομάδα αναφοράς (ομάδα N). Τα αποτελέσματα (Σχήμα 18) δείχνουν την ύπαρξη δραστικότητας και για τα δύο ένζυμα. Επιπλέον, δεν σημειώνεται κάποια διαφοροποίηση στην ομάδα ούτε καθ' όλη τη διάρκεια της μελέτης ($p_{\text{time_CPT}}=0.122$, $p_{\text{time_AT}}=0.903$) αλλά ούτε σε κάθε μήνα χωριστά ως προς την έναρξη (baseline) της μελέτης ($p_{1-12}>0.05$).



Σχήμα 18: Δραστικότητα βιοσυνθετικών ενζύμων του PAF i) PAF-CPT και ii) lyso-PAF-AT στην ομάδα N. Το p_{time} συμβολίζει τη συνολική μεταβολή στη διάρκεια της μελέτης

6.9 Πιστοποίηση της ύπαρξης και μελέτη των βιοσυνθετικών ενζύμων του PAF (PAF-CPT και lyso-PAF-AT) σε ανθρώπινα ερυθροκύτταρα

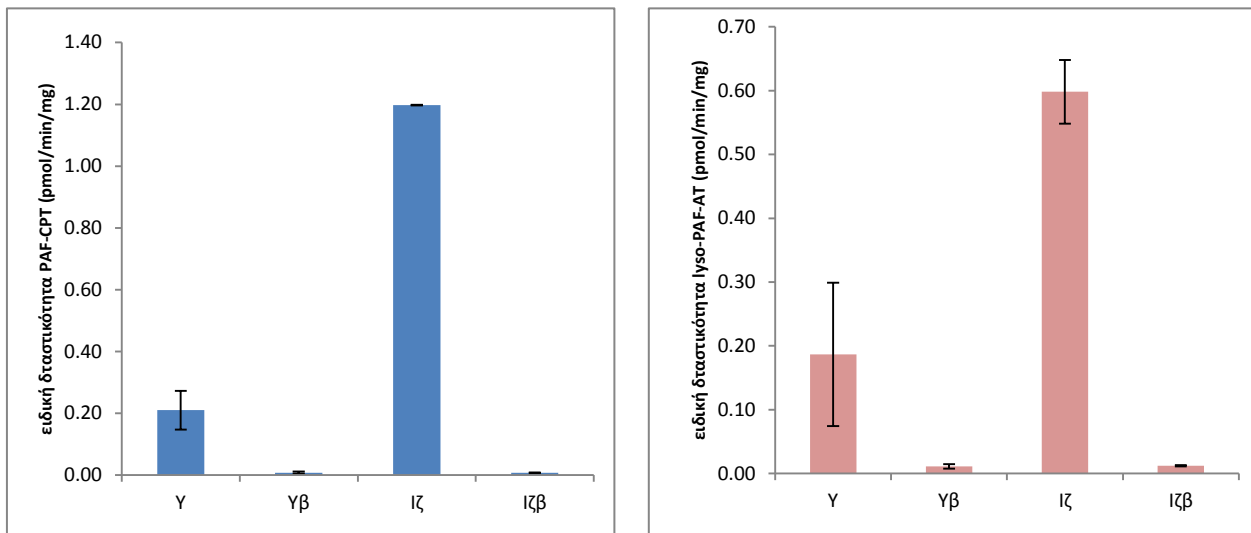
6.9.1 Παραλαβή και ομογενοποίηση ερυθροκυττάρων

Η παραλαβή ομογενοποιήματος ερυθροκυττάρων από το ολικό αίμα υγιών εθελοντών έγινε όπως περιγράφεται στο εδάφιο 5.9.4 με μια μικρή παραλλαγή. Συγκεκριμένα αφού ληφθεί το ίζημα μετά την πάροδο των 60 min του μίγματος λευκοκυττάρων/ερυθροκυττάρων με δεξτράνη και εκπλυθεί με φυσιολογικό ορό, η συνολική ποσότητα ερυθροκυττάρων αναδιαλύεται σε ίσο όγκο Tris 7.4 και ακολουθεί ομογενοποίηση με υπερήχους υπό πάγο για 1 min (30% ένταση, 4 φορές για 15 s).

6.9.2 Πιστοποίηση ενζυμικής δραστηριότητας

Για να πιστοποιηθεί η ενζυμική δραστηριότητα και κατά συνέπεια η περιεκτικότητα του ομογενοποιήματος στα βιοσυνθετικά ένζυμα του PAF, το ομογενοποίημα φυγοκεντρείται στα 20.000 xg για 60 min στους 4°C. Το υπερκείμενο (Υ) φυλάσσεται στους -80° C ενώ το ίζημα αναδιαλύεται σε Tris-HCl (pH 7,4) και φυγοκεντρείται εκ νέου στις ίδιες συνθήκες για ακόμα 4 φορές. Το τελικό ίζημα (Ιζ) αναδιαλύεται σε περίπου 1 mL Tris-HCl (pH 7,4) και φυλάσσεται στους -80° C. Αφού έγινε η μέτρηση πρωτεΐνης με τη μέθοδο Bradford (5.3) ακολούθησαν οι ενζυμικές δοκιμασίες των PAF-CPT (5.10) (0,5 mg πρωτεΐνης για 20 min) και lyso-PAF-AT (5.11) (0,25 mg πρωτεΐνης για 30 min). Οι ποσότητες πρωτεϊνών και ο χρόνος της αντίδρασης επιλέχθηκαν βάση προκαταρκτικών δοκιμών καθώς η μελέτη των ενζύμων ως προς το χρόνο και τη πρωτεΐνη ακολούθησε αργότερα. Τα δείγματα ομογενοποιημένων ερυθροκυττάρων χωρίστηκαν σε δύο μέρη, το πρώτο χρησιμοποιήθηκε ως έχει (Υ, Ιζ) ενώ το δεύτερο υπέστη βρασμό για 2-3 min (Υ_β, Ιζ_β). Ο παραγόμενος PAF της κάθε αντίδρασης εκχυλίστηκε μέσω Bligh-Dyer (5.2) και διαχωρίστηκε μέσω TLC (5.5) ενώ η μέτρηση του έγινε μέσω της βιολογικής δοκιμασίας σε πλυμένα αιμοπετάλια κουνελιού (5.7) υπολογίζοντας τελικά τη δραστηριότητα των δύο ενζύμων. Τα αποτελέσματα του σχήματος 19 δείχνουν ότι η ενζυμική δραστηριότητα μειώνεται δραστικά με το βρασμό συμπεραίνοντας ότι πρόκειται για ένζυμο και όχι

κάποιου άλλου είδους καταλύτη. Επίσης και στα δύο ένζυμα περισσότερη δραστικότητα ανιχνεύτηκε στο ίζημα υποδεικνύοντας ότι πρόκειται για μεμβρανικά ένζυμα, κάτι το οποίο πιστοποιήθηκε με τα πειράματα υποκυτταρικής κατανομής που ακολούθησαν. Τα αποτελέσματα της ειδικής δραστικότητας για τα δύο ένζυμα προέρχονται από το μέσο όρο τριπλών δειγμάτων.

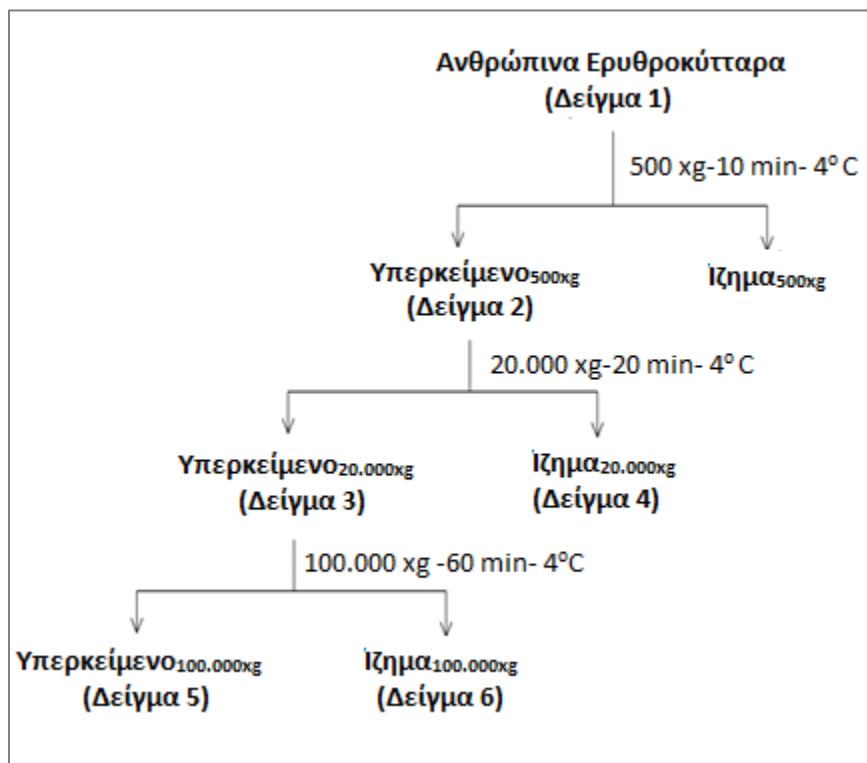


Σχήμα 19: Επίδραση βρασμού στην ειδική δραστικότητα της PAF-CPT και της lyso-PAF-AT στο Υπερκείμενο και στο Ίζημα του ομογενοποιημάτος ερυθροκυττάρων.

6.9.3 Προσδιορισμός ειδικής δραστικότητας PAF-CPT και lyso-PAF-AT στα υποκυτταρικά κλάσματα

Αφού διαχωριστούν και ομογενοποιηθούν τα ερυθροκύτταρα (5.9.4), λαμβάνεται το ομογενοποίημα τους (Δείγμα 1) και φυγοκεντρείται στα 500 xg για 10 min στους 4°C. Το υπερκείμενο φυλάσσεται (Δείγμα 2) και το ίζημα αφού αναδιαλυθεί φυγοκεντρείται στα 20.000 xg για 20 min στους 4°C. Φυλάσσονται μικρή ποσότητα από το υπερκείμενο (Δείγμα 3) και το αναδιαλυμένο ίζημα (Δείγμα 4). Η υπόλοιπη ποσότητα υπερκειμένου φυγοκεντρείται στα 100.000 xg για 60 min στους 4°C και φυλάσσεται το υπερκείμενο (Δείγμα 5) και το αναδιαλυμένο ίζημα (Δείγμα 6). Όλα τα δείγματα διατηρούνται έως την επόμενη επεξεργασία στους -80°C και όπου χρειάστηκε αναδιάλυση χρησιμοποιήθηκε μικρή ποσότητα Tris-HCl 7,4 (Σχήμα 20). Στα κλάσματα που συλλέχθηκαν γίνεται ενζυμικός προσδιορισμός της ειδικής

δραστικότητας των δύο βιοσυνθετικών ενζύμων PAF-CPT και lyso-PAF-AT όπως περιγράφεται στο εδάφιο (5.7.2). Τα αποτελέσματα της ειδικής δραστηριότητας για τα δύο ένζυμα προέρχονται από το μέσο όσο διπλών δειγμάτων τριών διαφορετικών ομογενοποιημάτων και παρουσιάζονται στον πίνακα 24.



Σχήμα 20: Σχεδιάγραμμα της πορείας υποκυτταρικής κατανομής ανθρώπινων ερυθροκυττάρων.

Η ποσότητα ιζήματος των 100.000 xg ήταν μικρή και έτσι η ενζυμική δοκιμασία έγινε σε λιγότερη ποσότητα πρωτεΐνης σε σχέση με τα άλλα κλάσματα. Αν είχαν χρησιμοποιηθεί οι ίδιες ποσότητες πιθανόν να έδειχναν ακόμα μεγαλύτερη ενζυμική δραστηριότητα. Βάση αποτελεσμάτων αλλά και χάριν πρακτικής ευκολίας επιλέχθηκε το ίζημα των 20.000 xg.

Πίνακας 24: Αποτελέσματα ειδικής δραστηριότητας PAF-CPT και lyso-PAF-AT στα υποκυτταρικά κλάσματα.

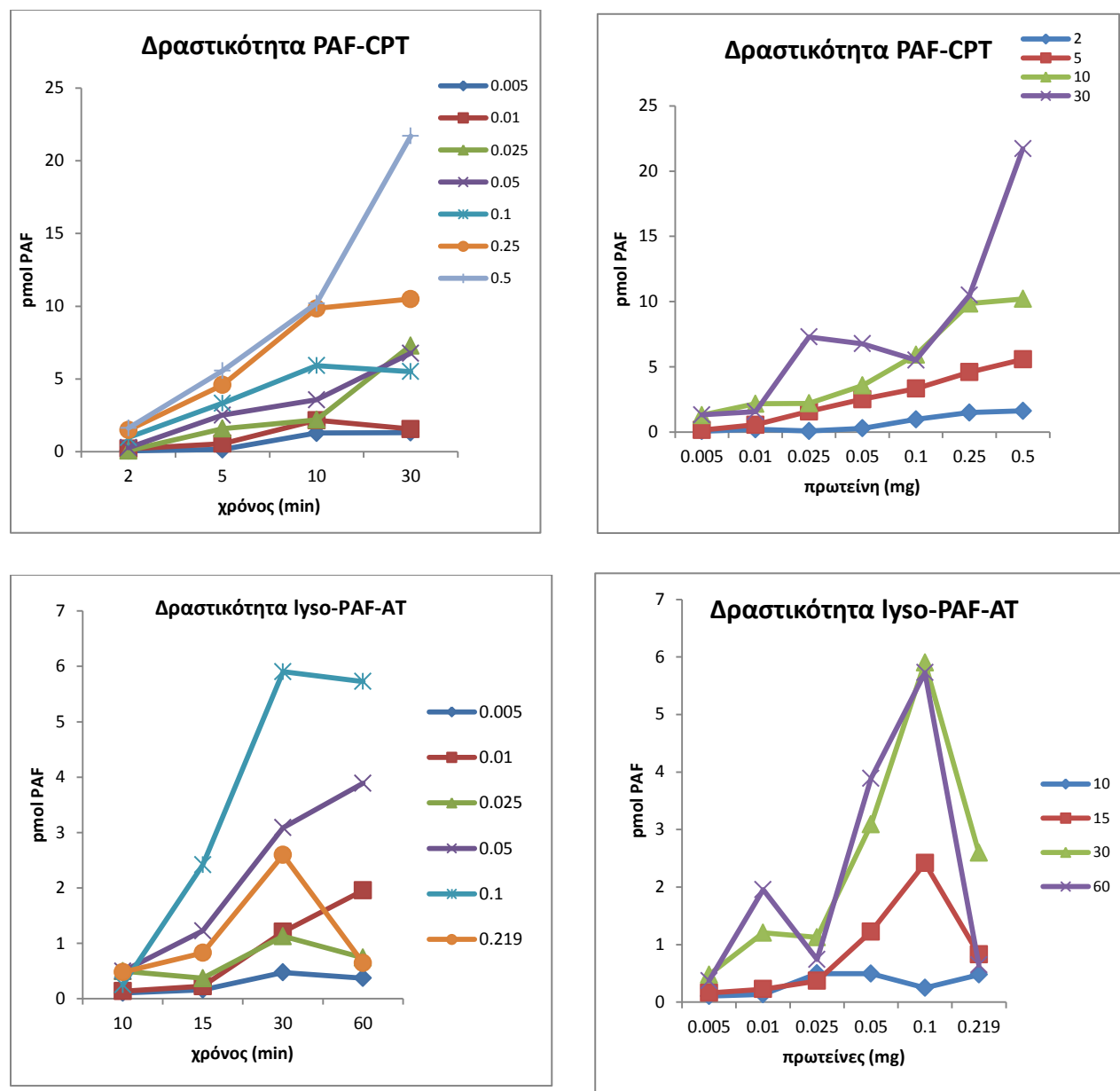
Δείγματα	pmol/min/mg	
	PAF-CPT	lyso-PAF-AT
1:Ομογενοποίησημα	0.626	0.089
2: Y_500xg	0.410	0.533
3: Y_20.000xg	0.229	0.580
4: Ιζ_20.000xg	2.372	15.722
5: Y_100.000xg	0.016	0.021
6: Ιζ_100.000xg	2.535	0.452

6.9.4 Βιοχημικός Χαρακτηρισμός των βιοσυνθετικών ενζύμων PAF-CPT και lyso-PAF-AT σε ανθρώπινα ερυθροκύτταρα

Για το βιοχημικό χαρακτηρισμό των δύο ενζύμων απομονώθηκε εκ νέου ποσότητα από το ίζημα των 20.000 xg και μελετήθηκε η επίδραση των ενζύμων από παράγοντες όπως η ποσότητα της πρωτεΐνης, ο χρόνος επώασης, η θερμοκρασία και το pH.

6.9.4.1 Επίδραση της ποσότητας πρωτεΐνης και του χρόνου επώασης στη δραστηριότητα των PAF-CPT και lyso-PAF-AT

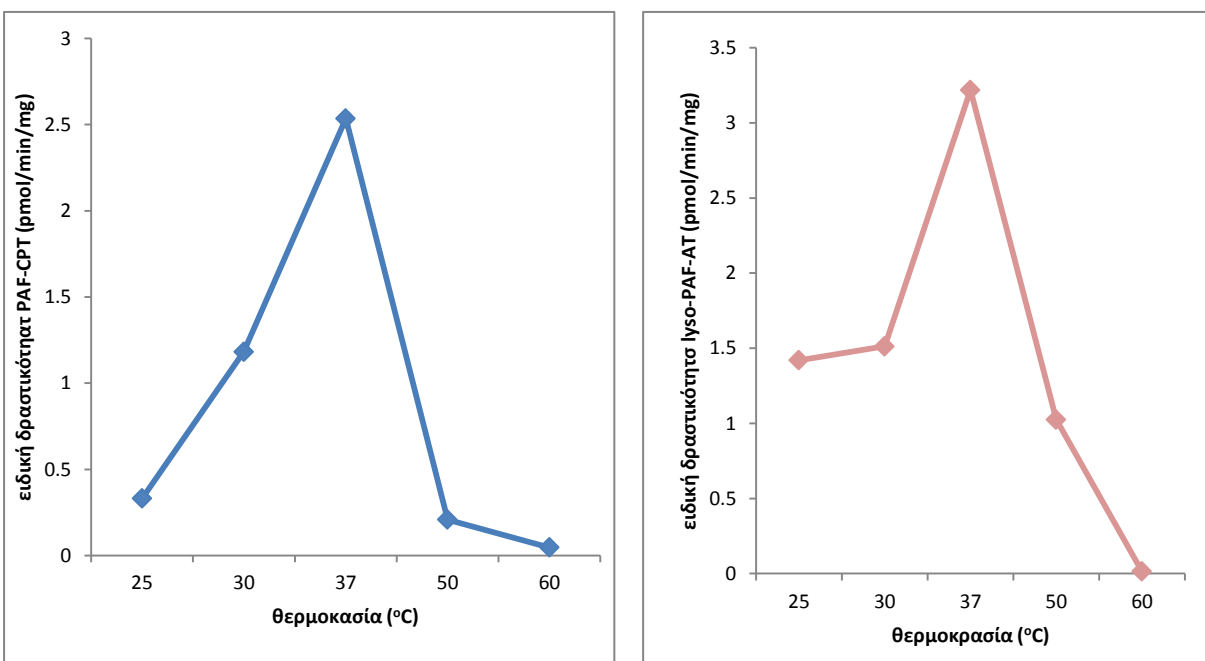
Για την υπόλοιπη μελέτη χρησιμοποιήθηκε το ίζημα των 20.000 xg. Για τις ενζυμικές δοκιμασίες των ενζύμων χρησιμοποιήθηκαν πληθώρα χρόνων και ποσοτήτων πρωτεϊνών με σκοπό να βρεθεί η γραμμική περιοχή και να επιλεγθούν οι βέλτιστες συνθήκες. Τα αποτελέσματα της ειδικής δραστηριότητας για τα δύο ένζυμα προέρχονται από το μέσο όσο διπλών δειγμάτων από τρία πειράματα και εμφανίζονται στο σχήμα 21. Από τα αποτελέσματα φαίνεται ότι η γραμμικότητα της αντίδρασης εκτείνεται μέχρι τα 0,1 mg πρωτεΐνης και 10 min χρόνου επώασης για τη PAF-CPT ενώ αντίστοιχα μέχρι τα 0,1 mg πρωτεΐνης και 30 min χρόνου επώασης για τη lyso-PAF-AT. Βάση τα παραπάνω επιλέχτηκαν για τη PAF-CPT τα 0,05 mg πρωτεΐνης και τα 5 min ενώ για τη lyso-PAF-AT τα 0,05 mg πρωτεΐνης και τα 15 min.



Σχήμα 21: Επίδραση της ποσότητας πρωτεΐνης και του χρόνου επώασης στη δραστικότητα των PAF-CPT και lyso-PAF-AT.

6.9.4.2 Επίδραση της θερμοκρασίας επώασης στη δραστικότητα των PAF-CPT και lyso-PAF-AT

Η ενζυμική δοκιμασία πραγματοποιήθηκε στο ίζημα των 20.00 xg σε ένα εύρος θερμοκρασιών επώασης από 25 έως 60°C. Τα αποτελέσματα της ειδικής δραστικότητας για τα δύο ένζυμα προέκυψαν από το μέσο όσο διπλών δειγμάτων από δύο πειράματα και εμφανίζονται στο σχήμα 22. Από τα αποτελέσματα προκύπτει ως βέλτιστη θερμοκρασία οι 37°C και για τα δύο ένζυμα.

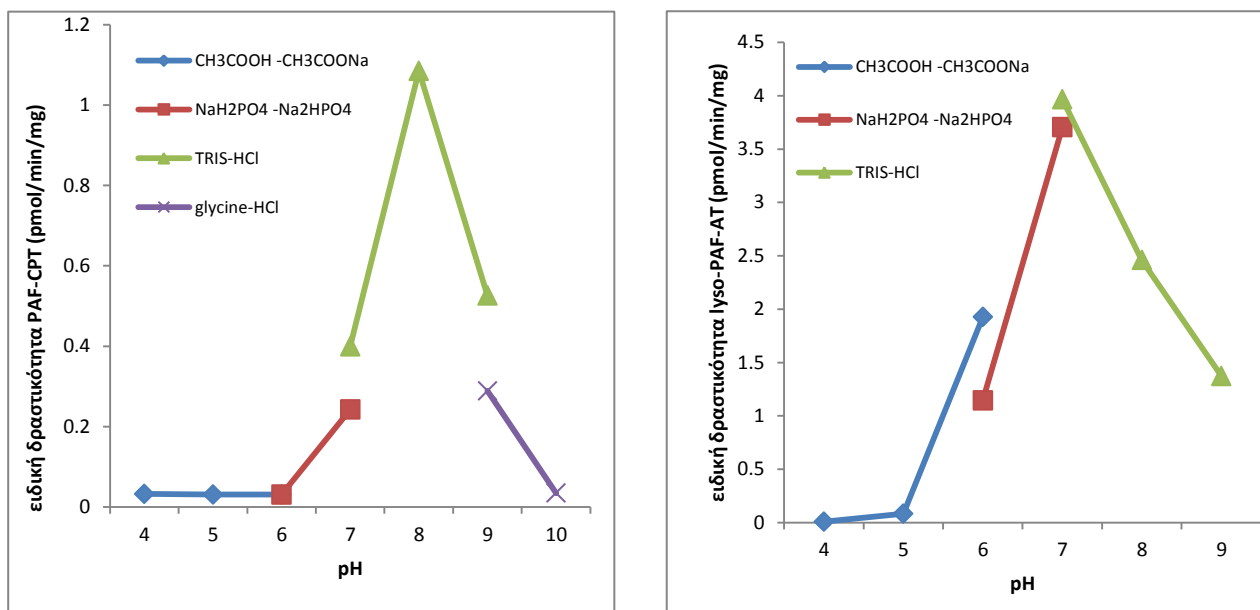


Σχήμα 22: Επίδραση της θερμοκρασίας επώασης στη δραστικότητα των PAF-CPT και lyso-PAF-AT.

6.9.4.3 Επίδραση του pH στη δραστικότητα των PAF-CPT και lyso-PAF-AT

Η ενζυμική δοκιμασία πραγματοποιήθηκε σε ένα φάσμα ρυθμιστικών διαλυμάτων διαφόρων τιμών pH. Τα ρυθμιστικά διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν για τα δύο ένζυμα είναι ρυθμιστικό διάλυμα οξικών (pH: 4,0-6,0), ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (pH: 6,0-7,0) και ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl (pH: 7,0-9,0). Για τη PAF-CPT χρησιμοποιήθηκε επιπλέον ρυθμιστικό διάλυμα γλυκίνη-HCl (pH: 9,0-10,0). Τα αποτελέσματα της ειδικής δραστικότητας για τα δύο ένζυμα προέκυψαν

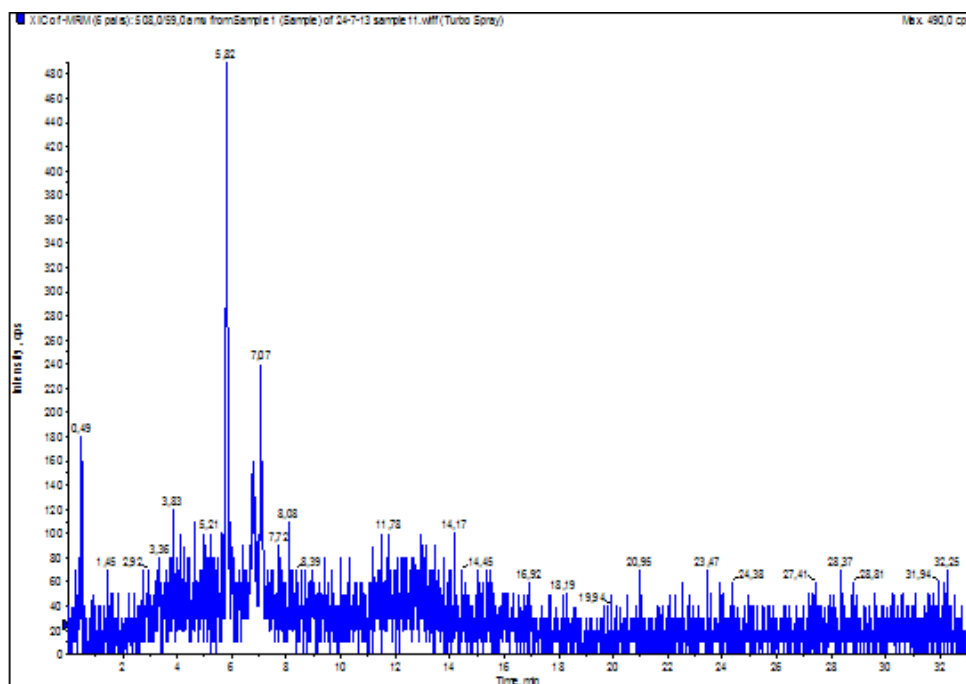
από το μέσο όσο διπλών δειγμάτων από δύο πειράματα και εμφανίζονται στο σχήμα 23. Από τα αποτελέσματα προκύπτει ως βέλτιστο pH η περιοχή κοντά στο 8 για την PAF-CPT και κοντά στο 7 για τη lyso-PAF-AT με τη βοήθεια ρυθμιστικού διαλύματος Tris-HCl.



Σχήμα 23: Επίδραση του pH στη δραστηριότητα των PAF-CPT και lyso-PAF-AT.

6.10 Πιστοποίηση της δραστηριότητας των βιοσυνθετικών ενζύμων του PAF (PAF-CPT και lyso-PAF-AT) σε ανθρώπινα ερυθροκύτταρα μέσω φασματοσκοπίας μάζας του παραγόμενου PAF

Για την επιβεβαίωση της δραστηριότητας των βιοσυνθετικών ενζύμων του PAF έγινε πιστοποίηση της ύπαρξης του PAF μέσω υγρής φασματομετρίας μάζας (LC-MS). Συγκεκριμένα, ένα από τα δείγματα ερυθροκυττάρων που παρουσίασε την πιο αυξημένη δραστηριότητα στα βιοσυνθετικά ένζυμα του PAF, εκχυλίστηκε με τη μέθοδο Bligh-Dyer (5.2) και η ύπαρξη του παραγόμενου PAF προσδιορίστηκε στη χλωροφορμική φάση με υγρή φασματοσκοπία μάζας. Στην εικόνα 19 παρουσιάζεται η Single reaction monitoring (SRM) ανάλυση σε LC-MS του δείγματος των ερυθροκυττάρων με μητρικό θραύσμα το $m/z=508$ - και προϊόν το $m/z=59$ - που αντιστοιχεί στον PAF ο οποίος πιστοποιήθηκε με πρότυπο ότι εκλούεται στο 5,82 min. Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε σε Electro-spray Mass spectrometer Fisions VG Quarto με σύστημα ιονισμού VG Biotech Electrospray με εξαπολικούς φακούς, σύστημα αντλιών Varian 9012 και βρόχο τοποθέτησης δείγματος Rheodyne 7125 του Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών.



Εικόνα 19: Φάσμα LC-MS παραγόμενου PAF που προέκυψε από τα βιοσυνθετικά ένζυμα του PAF στα ερυθροκύτταρα.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7^ο: Συζήτηση

Μετά από 30 χρόνια έρευνας στο AIDS, η επιστημονική κοινότητα έκανε άλματα ανακαλύπτοντας τον παράγοντα που την προκαλεί, τον HIV, αυξάνοντας το προσδόκιμο ζωής και μετατρέποντας την HIV λοίμωξη από μια θανατική καταδίκη σε μια χρόνια νόσο [80]. Οι αντιρετροϊκές αγωγές έχουν γίνει πιο δραστικές, με λιγότερες παρενέργειες χωρίς όμως να υπάρχει ακόμα μια εξολοκλήρου θεραπευτική μέθοδος [45]. Ακόμα και ασυμπτωματικοί ασθενείς υπό αγωγή, με μη ανιχνεύσιμο ιικό φορτίο και υψηλά CD4⁺ T κύτταρα, χαρακτηρίζονται από χρόνια ανοσολογική διέγερση και φλεγμονή που μαζί ονομάζονται “ανοσολογική γήρανση” καθώς οι ασθενείς εμφανίζουν παθολογικές καταστάσεις που στο μέσο πληθυσμό εμφανίζονται συνήθως σε μεγαλύτερες ηλικίες. Οι παθολογικές αυτές καταστάσεις καλύπτουν ένα ευρύ φάσμα και χαρακτηρίζονται όλες μαζί με τον όρο “μη συσχετιζόμενες με το AIDS εκδηλώσεις” [361]. Τα καρδιαγγειακά νοσήματα, η νεφρική νόσος και οι διάφορες κακοήθειες είναι κάποιες από τις συχνότερες εκδηλώσεις που εμφανίζονται στους οροθετικούς ασθενείς [362]. Παρόλη την ποικιλία τους οι εκδηλώσεις αυτές έχουν σαν κοινό γνώρισμα την εμμένουσα φλεγμονή η οποία χαρακτηρίζεται από τους αυξημένους δείκτες φλεγμονής όπως διάφορες προ-φλεγμονώδεις κυτταροκίνες, κυρίως τον TNFα και την IL-6 [79]. Ένας από τους κατεξοχήν μεσολαβητές της φλεγμονής που επάγει τη βιοσύνθεση των κυτταροκινών και *vice versa*, είναι ο Παράγοντας Ενεργοποίησης των Αιμοπεταλίων (PAF). Ο PAF, παρόλη τη γνωστή εμπλοκή του στην HIV λοίμωξη, δεν έχει μελετηθεί ενδελεχώς ως προς το ρόλο που πιθανώς να κατέχει στις διάφορες μη συσχετιζόμενες με το AIDS εκδηλώσεις. Η ερευνητική μας ομάδα, σε κάποια πρόδρομα *in vitro* πειράματα, μελέτησε μια σειρά από αντιρετροϊκά φάρμακα, είτε μεμονωμένα, είτε σε διάφορους συνδυασμούς. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τα περισσότερα από αυτά παρουσιάζουν αντι-PAF δράση [363] κάποια ισχυρή και κάποια ασθενή. Σε αυτό το δρόμο προχώρησε η έρευνα της παρούσας διδακτορικής διατριβής με σκοπό να μελετηθεί η *in vivo* επίδραση διάφορων αντιρετροϊκών αγωγών πρώτης γραμμής στο αίμα μη προθεραπευμένων ασυμπτωματικών HIV

ασθενών για τη διάρκεια 12 μηνών. Για το σκοπό αυτό οι ασθενείς χωρίστηκαν σε 5 ομάδες. Η ομάδα Α έλαβε tenofovir-DF/emtricitabine με efavirenz, η ομάδα Β έλαβε abacavir/lamivudine με efavirenz, η ομάδα Γ έλαβε tenofovir-DF/emtricitabine με atazanavir-r, ομάδα Δ έλαβε abacavir/lamivudine με atazanavir-r ενώ η ομάδα Ν αποτέλεσε την ομάδα αναφοράς και συγκεκριμένα θετικού control, μη λαμβάνοντας αγωγή.

In vitro αποτελέσματα

Στα *in vitro* πειράματα κάθε μία από τις προαναφερθείσες αγωγές δοκιμάστηκε ως προς την αναστολή που προκαλεί στη συσσωρευτική δράση του PAF σε πλυμένα αιμοπετάλια κουνελιού. Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι και οι τέσσερις αγωγές δρουν ως αναστολείς με IC_{50} της τάξης των 10^{-4} mg/mL, δηλαδή δεν είναι ιδιαίτερα ισχυροί αν αναλογιστεί κανείς ότι το BN-52021 σημειώνει αναστολή με IC_{50} της τάξης των 10^{-7} M το οποίο μετατρέπεται σε 10^{-9} mg/mL. Παρόλα αυτά πρέπει να επισημανθεί ότι τα αποτελέσματα προσδιορίστηκαν σε μάζα των σκευασμάτων ως προς τον όγκο που αναδιαλύθηκαν μιας και κάθε σχήμα περιέχει περισσότερες από μία δραστικές ουσίες. Σύμφωνα με αυτή τη παραδοχή, προκύπτει ότι η αγωγή της ομάδας Α έχει τη μεγαλύτερη αναστολή, ακολουθεί η αγωγή της ομάδας Γ, έπειτα η αγωγή της ομάδας Δ και τη μικρότερη αναστολή εμφανίζει η ομάδα Β. Όταν το κάθε IC_{50} προσδιορίστηκε σε M ως προς τη δραστική ουσία του κάθε αντιρετροϊκού συνδυασμού προέκυψαν ποικίλα συμπεράσματα. Έτσι λοιπόν, μελετώντας τα αποτελέσματα μεμονωμένα για κάθε δραστική ουσία, παρατηρείται ισχυρότερη αναστολή στα αντιρετροϊκά ritonavir και atazanavir, ακολουθούν τα emtricitabine, tenofovir, lamivudine και τέλος τα efavirenz και abacavir με την ασθενέστερη αναστολή. Από τα παραπάνω φαίνεται ότι υπάρχει συνεργιστική δράση ανάμεσα σε κάποιες από τις δραστικές ουσίες, όπως στην περίπτωση του σχήματος Α. Το σχήμα αυτό, παρόλο που αποτελείται από δραστικές ουσίες μετρίας αντι-PAF δράσης, αναδεικνύεται στο πιο ισχυρό σε *in vivo* αντι-PAF δράση. Στο σημείο αυτό αξίζει να αναφερθεί σαν παρατήρηση ότι το σχήμα Α είναι και το μόνο που χορηγείται μέσω ενός μόνο χαπιού. Στον αντίποδα βρίσκεται το σχήμα Β που

περιλαμβάνει τις δύο ασθενέστερες, ως προς την αναστολή του PAF, δραστικές ουσίες και σαν σύνολο εκδηλώνει και την ασθενέστερη αναστολή. Όσον αφορά στη φύση των δραστικών ουσιών σε σχέση με την ανασταλτική τους δράση, τα αποτελέσματα δείχνουν ότι οι αναστολείς πρωτεασών (atazanavir και ritonavir) εκδηλώνουν σαφώς ισχυρότερη αναστολή σε σχέση με τους αναστολείς αντίστροφης μεταγραφάσης (emtricitabine, tenofovir, lamivudine, efavirenz και abacavir).

In vivo αποτελέσματα

Όσον αφορά στην *in vivo* επίδραση της αντιρετροϊκής θεραπείας για κάθε ομάδα χωριστά προκύπτουν τα ακόλουθα συμπεράσματα.

Στην ομάδα Α τα επίπεδα του PAF μειώνονται σε όλη τη διάρκεια της 12μηνιας μελέτης. Το αποτέλεσμα αυτό φαίνεται να απορρέει από τη μείωση της δραστηριότητας της βιοσύνθεσης και των δύο πορειών ενώ η μείωση των επιπέδων του PAF προκαλεί μείωση στη δραστηριότητα της αποικοδόμησης. Επίσης, μειώνεται η δραστηριότητα της Lp-PLA2 προς το τέλος της μελέτης.

Στην ομάδα Β η αγωγή επιδρά με διαφορετικό τρόπο. Τα επίπεδα του PAF εμφανίζουν μια αύξηση στο 3^ο μήνα της αγωγής ενώ στη πορεία επιστρέφουν στα αρχικά τους επίπεδα. Αυτή η παροδική αύξηση προκύπτει από την πορεία αναδιαμόρφωσης καθώς, τόσο στα λευκοκύτταρα όσο και στα αιμοπετάλια, εμφανίζεται μια επίσης παροδική αύξηση σηματοδοτώντας την κατάσταση οξείας φλεγμονής. Η βιοσύνθεση μέσω της *de novo* πορείας εμφανίζει μια αύξηση τον 12^ο μήνα η οποία πιθανώς να σχετίζεται με την αργή και σταδιακή αύξηση της χρόνιας φλεγμονής στην ομάδα αυτή. Η αύξηση των επιπέδων πυροδοτεί τη δραστηριότητα της αποικοδόμησης με σκοπό να μειωθούν τα αυξημένα επίπεδα. Η Lp-PLA2 επηρεάζεται επίσης, καθώς παρατηρείται αύξηση στη δραστηριότητά της προς το τέλος της μελέτης. Σχετικά με τις κυτταροκίνες παρατηρείται μία στατιστικώς σημαντική και παροδική αύξηση στον TNFα τον 1^ο μήνα αγωγής. Αυτή η αύξηση

είναι πιθανώς το πρώτο βήμα για την αύξηση του PAF που γίνεται τον 3^ο μήνα αφού η βιοσύνθεση του TNFα επάγει τη βιοσύνθεση του PAF.

Στην ομάδα Γ παρατηρείται μια παροδική αύξηση του PAF στον 6^ο μήνα της αγωγής. Η αύξηση αυτή προκύπτει από την αύξηση της πορείας αναδιαμόρφωσης στα λευκοκύτταρα και στα αιμοπετάλια, δηλαδή της οξείας φλεγμονής. Στην ομάδα αυτή επηρεάζεται και η *de novo* πορεία με μια παροδική αύξηση ενώ η αποικοδόμηση αυξάνεται και στα δύο κύτταρα πιθανώς για να ρυθμιστούν τα επίπεδα PAF. Η Lp-PLA2 δεν φαίνεται να επηρεάζεται σε αυτή την ομάδα.

Στην ομάδα Δ παρατηρείται μια σταδιακή αύξηση από τον 6^ο ως τον 12^ο μήνα. Η αύξηση αυτή απορρέει από την πορεία αναδιαμόρφωσης σηματοδοτώντας μια κατάσταση οξείας φλεγμονής αλλά φαίνεται ότι επηρεάζεται και η *de novo* πορεία των αιμοπεταλίων. Στην ομάδα αυτή επηρεάζεται η αποικοδόμηση του PAF, μειώνοντας την PAF-AH των ερυθροκυττάρων ενώ και η δραστηριότητα της Lp-PLA2 επίσης μειώνεται στους τελευταίους μήνες αγωγής.

Η ομάδα αναφοράς δεν δείχνει καμία μεταβολή στις, σχετικές με τον PAF, παραμέτρους που μετρήθηκαν. Το αποτέλεσμα αυτό δείχνει τη διατήρηση της κατάστασης φλεγμονής σε σταθερά επίπεδα για τους συγκεκριμένους ασθενείς.

Συμπερασματικά, οι αντιρετροϊκές αγωγές επιδρούν στα επίπεδα, κυρίως του δεσμευμένου PAF, ενώ δεν φαίνεται να επηρεάζουν ιδιαίτερα τον ελεύθερο PAF. Τα επίπεδα δε του συνολικού PAF φαίνεται να καθορίζονται κυρίως από αυτά του δεσμευμένου. Οι προκαλούμενες διαφοροποιήσεις απορρέουν κυρίως από την ενζυμική δράση στα λευκοκύτταρα και των δύο βιοσυνθετικών ενζύμων, αλλά περισσότερο από την πορεία αναδιαμόρφωσης υποδεικνύοντας την εμπλοκή κυρίως της οξείας και δευτερευόντως της χρόνιας φλεγμονής. Η αποικοδόμηση ενδοκυτταρικά επηρεάζεται περισσότερο στα λευκοκύτταρα, λειτουργώντας με τέτοιο τρόπο ώστε να αντισταθμίζει τα επίπεδα PAF στο αίμα. Όσον αφορά στην αποικοδόμηση εξωκυτταρικά, η εκάστοτε αγωγή φαίνεται να ασκεί μια απευθείας επίδραση στη δραστηριότητα της Lp-PLA2.

Είναι γνωστό ότι τόσο η HIV λοίμωξη όσο και η αντιρετροϊκή θεραπεία προκαλούν πληθώρα μεταβολικών διαταραχών [364]. Από τις διάφορες βιοχημικές εξετάσεις των ασθενών (παραρτήματα I-IV), προκύπτουν τα ακόλουθα συμπεράσματα. Η αύξηση των $CD4^+$ T κυττάρων και η μείωση του ιικού φορτίου συμβαίνει στις ομάδες A-Δ και όχι στη N, ως απόρροια της χορήγησης αντιρετροϊκής αγωγής στις πρώτες. Ο ΔΜΣ στο σύνολο των ασθενών βρίσκεται στα όρια φυσιολογικού με υπέρβαρου παραμένοντας σταθερός σε όλες τις ομάδες, παρόλο τις διάφορες μεταβολικές αλλαγές που συνήθως παρατηρούνται στο βάρος των HIV ασθενών [365]. Συνήθως οι ασθενείς υπό θεραπευτική αγωγή εμφανίζουν δυσλιπιδαιμίες με κάποιες αγωγές να τις προκαλούν περισσότερο και με άλλες λιγότερο [366-368]. Στη παρούσα μελέτη τα επίπεδα χοληστερόλης αυξάνονται και μάλιστα υπερβαίνοντας οριακά τις ευνοϊκές τιμές (<200 mg/dL) στις ομάδες A, B και Γ, δηλαδή σε αυτές που περιέχουν ως κοινά φάρμακα το tenofovir-DF, το emtricitabine και το efavirenz. Η LDL αυξάνεται στις ομάδες A και B, δηλαδή αυτές που περιέχουν το γνωστό για δυσλιπιδαιμίες efavirenz [369], υπερβαίνοντας οριακά όμως τις ευνοϊκές τιμές (<130 mg/dL) μόνο στην ομάδα A. Τα τριγλυκερίδια αυξάνονται στις ομάδες B και Δ, δηλαδή αυτές που περιέχουν ως κοινά φάρμακα τα abacavir/lamivudine χωρίς όμως να υπερβούν ως μέση τιμή το ανώτερο επιτρεπτό όριο (160 mg/dL). Έκπληξη προκαλεί το γεγονός της αύξησης της HDL σε όλες τις αντιρετροϊκές ομάδες και ως πιθανή εξήγηση είναι η συσχέτιση που έχει βρεθεί μεταξύ της HDL και των αυξημένων $CD4^+$ T κύτταρων και του μειωμένου ιικού φορτίου σε ασθενείς υπό αντιρετροϊκή αγωγή [370]. Παρόλα αυτά πρέπει να σημειωθεί ότι παρά τη σημαντική αύξηση, οι τιμές παραμένουν πιο χαμηλές από το επιθυμητό όριο των 55 mg/dL. Συνεχίζοντας με τις υπόλοιπες βιοχημικές εξετάσεις, τα επίπεδα γλυκόζης και οι αλβουμίνες μειώνονται μόνο στην ομάδα N, παραμένοντας όμως εντός φυσιολογικών ορίων. Σύμφωνα με τα βιβλιογραφικά δεδομένα οι διαφοροποιήσεις στην ομοιόσταση των λιπιδίων και της γλυκόζης είναι διαδομένες στους παύει ασθενείς και επηρεάζονται από παράγοντες όπως την ηλικία, το ΔΜΣ, τα $CD4^+$ T κύτταρα, το ιικό φορτίο και την εξέλιξη της νόσου [370]. Στην παρούσα μελέτη οι παύει ασθενείς παρουσιάζουν μία πολύ καλή κατάσταση στις διάφορες προαναφερθείσες παραμέτρους και έτσι οι αλλαγές που παρατηρούνται στο

βιοχημικό τους προφίλ βρίσκονται εντός φυσιολογικών ορίων. Η CK αυξάνεται μόνο στην ομάδα Γ και το γεγονός αυτό, μαζί με τα αυξημένα επίπεδα PAF, συνηγορεί για νεφρική δυσλειτουργία που έχει παρατηρηθεί σε ασθενείς της ομάδας αυτής [172, 371]. Η γ-GT αυξάνεται στις ομάδες Α, Β και Γ, αλλά εκτός του ευνοϊκού ορίου των 32 U/L, φτάνουν μόνο οι Α και Β, δηλαδή αυτές που περιέχουν ως κοινό φάρμακο το efavirenz. Καθώς το efavirenz έχει κατηγορηθεί για ηπατοτοξική δράση [372], οι αυξήσεις όταν ομάδων Α και Β πιθανώς να υποδηλώνουν μια ηπατική δυσλειτουργία. Είναι γνωστό ότι η ALP αποτελεί επίσης δείκτη της ηπατικής λειτουργίας, μικρότερης όμως ευαισθησίας από τη γ-GT, και επηρεάζεται από αντιρετροϊκά φάρμακα [372]. Στην παρούσα μελέτη αυξάνεται μόνο στις ομάδες υπό αντιρετροϊκή αγωγή χωρίς να υπερβαίνεται το όριο των 104 U/L. Η HIV λοίμωξη κατά κανόνα έχει συσχετιστεί με την αδρή μείωση αιμοπεταλίων, οδηγώντας στη θρομβοπενία, γεγονός που αναστέλλει με επιτυχία η αντιρετροϊκή αγωγή [373]. Κατά συνέπεια των παραπάνω, στην παρούσα μελέτη ο αριθμός αιμοπεταλίων αυξάνεται στις ομάδες Α, Γ και Δ ενώ μειώνεται στην ομάδα Ν παραμένοντας εντός φυσιολογικών ορίων. Συνεχίζοντας, παρατηρείται μια σημαντική μείωση του αριθμού ερυθροκυττάρων μόνο στην ομάδα Δ η οποία είναι πιθανόν να συνδέεται με την αναιμία που προκαλεί μέσω πολύπλοκων μηχανισμών η HIV λοίμωξη [350]. Τέλος, αναφορικά με την αιμοσφαιρίνη και τον αιματοκρίτη, όλες οι ομάδες βρίσκονται μέσα στα φυσιολογικά όρια, σημειώνοντας αύξηση της πρώτης στην ομάδα Α και του δεύτερου στις ομάδες Α και Γ.

Συμπερασματικά για τις βιοχημικές εξετάσεις, όπως ήταν αναμενόμενο από την βιβλιογραφία [364], οι αντιρετροϊκές ομάδες αυξάνουν τα CD4⁺ Τ κύτταρα, καταστέλλουν το ιικό φορτίο και επηρεάζουν δείκτες που σχετίζονται κυρίως με δυσλιπιδαιμίες και ηπατική βλάβη.

Συγκρίσεις των αντιρετροϊκών ομάδων με την ομάδα αναφοράς

Όσον αφορά στις επιμέρους συγκρίσεις κάθε ομάδας με την ομάδα αναφοράς προκύπτουν τα εξής:

Η ομάδα Α εμφανίζει μειωμένα επίπεδα δεσμευμένου και συνολικού PAF σε σχέση με την Ομάδα Ν. Αυτό το αποτέλεσμα προκαλεί έκπληξη αφού η βιοσύνθεση της ομάδας Α είναι στατιστικώς αυξημένη σε σχέση με την ομάδα Ν και ακριβώς το αντίθετο συμβαίνει με την αποικοδόμηση. Χρησιμοποιώντας τα $CD4^+$ Τ κύτταρα ως συμπαράγοντα προέκυψε εξίσωση των επιπέδων PAF ανάμεσα στις δύο ομάδες.

Παρομοίως, η ομάδα Β εμφανίζει μειωμένα επίπεδα δεσμευμένου και συνολικού PAF σε σχέση με την Ομάδα Ν. Παρόλα αυτά η βιοσύνθεση της ομάδας Β είναι στατιστικώς αυξημένη σε σχέση με την ομάδα Ν και ακριβώς το αντίθετο συμβαίνει με την αποικοδόμηση. Όπως και πριν, τα επίπεδα PAF των δύο ομάδων εξισώνονται χρησιμοποιώντας ως συμπαράγοντα τα επίπεδα $CD4^+$ Τ. Ενδιαφέρον αποτελεί η δραστικότητα της Lp-PLA2 που είναι αυξημένη στην ομάδα Β σε σχέση με της ομάδας Ν.

Η ομάδα Γ και η ομάδα Ν εμφανίζουν παρόμοια επίπεδα PAF. Το αποτέλεσμα προκύπτει από τη βιοσυνθετική δραστικότητα καθώς στα λευκοκύτταρα είναι πιο ενεργοποιημένη στην ομάδα Γ και στα αιμοπετάλια είναι πιο αυξημένη στην ομάδα Ν. Η αποικοδομητική δραστικότητα είναι παρόμοια στις δύο ομάδες.

Η ομάδα Δ έχει πιο αυξημένα επίπεδα PAF από την ομάδα Ν. Από τη βιοσύνθεση φαίνεται ότι η πορεία αναδιαμόρφωσης στα λευκοκύτταρα είναι πιο αυξημένη στην ομάδα Δ αλλά στα αιμοπετάλια και οι δύο πορείες είναι πιο αυξημένες στη ομάδα Ν. Σε συνδυασμό με την αυξημένη αποικοδόμηση στα αιμοπετάλια φαίνεται ότι προκύπτουν αυξημένα επίπεδα στην ομάδα Δ.

Συμπερασματικά, μόνο τα επίπεδα PAF της ομάδας Δ είναι πιο αυξημένα σε σχέση με την ομάδα αναφοράς. Αναφορικά το μεταβολισμό, ως γενική εικόνα όλες οι ομάδες παρουσιάζουν αυξημένη τη βιοσύνθεση και μειωμένη την αποικοδόμηση σε σχέση με την ομάδα αναφοράς.

Από τα μεμονωμένα αποτελέσματα κάθε ομάδας και από την επιμέρους σύγκριση κάθε μιας από τις αντιρετροϊκές ομάδες, προκύπτουν ποικίλα συμπεράσματα για το φλεγμονώδες προφίλ των ασθενών. Αφενός, οι παύει ασθενείς της μελέτης βρίσκονται σε πρώιμο στάδιο της HIV λοίμωξης με υψηλές τιμές $CD4^+$ T κυττάρων (>400 κύτταρα/ μL) χωρίς να επηρεάζεται ιδιαίτερα το φλεγμονώδες προφίλ τους [96]. Αφετέρου οι ασθενείς των αντιρετροϊκών ομάδων παρουσιάζουν μεταβολές στο φλεγμονώδες προφίλ τους τόσο λόγω της αντιρετροϊκής αγωγής όσο και εξαιτίας της πιο προχωρημένης HIV λοίμωξης, όπως προκύπτει από τα $CD4^+$ T κυττάρων και το ιικό φορτίο στο baseline της μελέτης [96, 374].

Οι συγκρίσεις ανά ζεύγη ομάδων

Συγκρίνοντας τις ομάδες με efavirenz, η ομάδα Β έχει πιο αυξημένη τη Lp-PLA2 στο σύνολο αλλά και στους 9^ο και 12^ο μήνα. Επίσης έχει υψηλότερα επίπεδα PAF στον 3^ο μήνα αγωγής. Ο μεταβολισμός είναι πιο αυξημένος στην ομάδα Β μόνο στην PAF-CPT λευκοκυττάρων στο 12^ο μήνα και στην PAF-AH ερυθροκυττάρων στο 3^ο μήνα. Στους βιοχημικούς δείκτες παρατηρείται συνολική διαφοροποίηση στις ALB με πιο αυξημένη την ομάδα Β τον 9^ο μήνα.

Συγκρίνοντας τις ομάδες με atazanavir προκύπτουν πολλές διαφοροποιήσεις. Τα επίπεδα δεσμευμένου PAF είναι πιο αυξημένα στην ομάδα Δ αλλά ελεύθερου στην ομάδα Γ. Ο μεταβολισμός φαίνεται να ταιριάζει με τα αντιφατικά αυτά αποτελέσματα αφού σε κάποιες περιπτώσεις είναι πιο ενεργοποιημένος στην ομάδα Γ (PAF-CPT και PAF-AH λευκοκυττάρων) ενώ σε άλλες περιπτώσεις είναι στην ομάδα Δ (lyso-PAF-AT αιμοπεταλίων και PAF-AH ερυθροκυττάρων). Όσον αφορά στις βιοχημικές εξετάσεις των ασθενών χοληστερόλη, LDL και HDL είναι πιο αυξημένες στην ομάδα Δ.

Συγκρίνοντας τις ομάδες με tenofovir-DF τα επίπεδα όπως και ο μεταβολισμός τα λευκοκύτταρα είναι πιο αυξημένα στην ομάδα Γ. Παρόλα αυτά η βιοσύνθεση στα αιμοπετάλια είναι πιο ενεργοποιημένη στην ομάδα Α κάτι όμως που δεν φαίνεται να επηρέασε τα επίπεδα. Η Lp-PLA2 εμφανίζει διαφορά μόνο στον 6^ο μήνα και

μεγαλύτερες τιμές για την ομάδα Α. Όσον αφορά στις βιοχημικές εξετάσεις των ασθενών χοληστερόλη και γλυκόζη είναι πιο αυξημένες στην ομάδα Α.

Συγκρίνοντας τις ομάδες με abacavir τα αποτελέσματα είναι ιδιαίτερα αντιφατικά καθώς ενώ τα επίπεδα PAF είναι σαφώς πιο αυξημένα στην ομάδα Δ, ο μεταβολισμός είναι πιο ενεργοποιημένος στην ομάδα Β. Το αποτέλεσμα αυτό, σε συνδυασμό με τις ασυνήθιστα υψηλές τιμές PAF της ομάδας, οδηγεί στο συλλογισμό παραγωγής PAF μέσω κάποιου άλλου τρόπου. Παρόλα αυτά, οι βιοχημικές εξετάσεις δείχνουν μόνο τις αλβουμίνες να είναι πιο αυξημένες στην ομάδα Β. Δεν φαίνεται να μαρτυρούν τυχόν δυσλειτουργία σε κάποιο από τα όργανα που παράγουν PAF, όπως τα νεφρά. Παρατηρώντας όμως τις αιματολογικές εξετάσεις υπάρχει διαφοροποίηση των δύο ομάδων στον αριθμό των ερυθροκυττάρων με την ομάδα Δ να εμφανίζει μικρότερες τιμές.

Συμπερασματικά, οι ασθενείς που έλαβαν το abacavir/lamivudine (Β και Δ) φαίνεται να έχουν υψηλότερες τιμές στα επίπεδα και το μεταβολισμό του PAF σε σχέση με εκείνους που έλαβαν το tenofovir-DF/emtricitabine (Α και Γ), συνάδοντας και με τα *in vitro* αποτελέσματα. Αντίθετα με τα παραπάνω, δεν μπορεί να βγει ξεκάθαρο συμπέρασμα για τις ομάδες που έλαβαν atazanavir-r (Γ και Δ) ή efavirenz (Α και Β). Ο λόγος είναι ότι τα επίπεδα PAF είναι πιο αυξημένα στις ομάδες με atazanavir-r αλλά ο μεταβολισμός εμφανίζεται πιο ενεργοποιημένος στις ομάδες με efavirenz (Α και Β). Οι McComsey et al, σε μια πρόσφατη ερευνα που μελετούσε δείκτες φλεγμονής σε ασθενείς των ίδιων ομάδων, συσχέτισαν τη χρήση tenofovir-DF/emtricitabine και του efavirenz με μειωμένους φλεγμονώδεις δείκτες ενώ του abacavir/lamivudine και του atazanavir-r με αυξημένους [145].

Συσχετίσεις αντιρετροϊκών ομάδων

Η αρνητική συσχέτιση μεταξύ $CD4^+$ T κυττάρων και ιικού φορτίου είναι δικαιολογημένη καθώς όλοι οι ασθενείς της μελέτης αύξησαν τον αριθμό των $CD4^+$ T κυττάρων τους και ταυτόχρονα μείωσαν στο μη ανιχνεύσιμο το ιικό τους φορτίο σύντομα μετά την έναρξη της χορήγησης αντιρετροϊκής αγωγής. Η συσχέτιση αυτή δεν παρατηρείται την περίπτωση των naïve ασθενών καθότι η έλλειψη αγωγής δεν προκαλεί τις παραπάνω μεταβολές στα $CD4^+$ T κύτταρα και στο ιικό φορτίο.

Προχωρώντας στα ανθρωπομετρικά χαρακτηριστικά, στην περίπτωση των αντιρετροϊκών ομάδων η ηλικία συσχετίζεται αρνητικά με την lyso-PAF-AT λευκοκυττάρων, κάτι που συμφωνεί με τα αντίστοιχα ευρήματα μια πρόσφατης έρευνας που αφορά σε υγιή γυναικείο πληθυσμό [375]. Στους naïve ασθενείς, η ηλικία συσχετίζεται θετικά με την Lp-PLA2, γεγονός που έρχεται σε συμφωνία με πολλές μελέτες της διεθνούς βιβλιογραφίας [375-377].

Από τις συσχετίσεις της ομάδας ART μεταξύ των επιπέδων και των ενζύμων του PAF στα λευκοκύτταρα και στα αιμοπετάλια, προκύπτουν κοινά συμπεράσματα με εκείνα του υγιή πληθυσμού [375]. Συγκεκριμένα, παρατηρούνται θετικές συσχετίσεις μεταξύ i) των επιπέδων του PAF και της de novo βιοσυνθετικής πορείας, ii) των δύο βιοσυνθετικών πορειών, καθώς και iii) των βιοσυνθετικών πορειών με τις αποικοδομητικές ενδοκυτταρικές πορείες, καταλήγοντας στην ύπαρξη μιας δυναμικής σχέσης μεταξύ του συνολικού μεταβολισμού του PAF. Παρόλα αυτά, οι παραπάνω σχέσεις δεν παρατηρούνται στην ομάδα αναφοράς. Το γεγονός αυτό για να διευκρινιστεί χρήζει περεταίρω μελέτης καθώς είναι πιθανόν να οφείλεται είτε στο μικρό αριθμό δειγμάτων είτε σε κάποια επίδραση της HIV λοίμωξης που προκαλείται απουσία αντιρετροϊκής αγωγής.

Τα επίπεδα και τα μεταβολικά ένζυμα του PAF εμφανίζουν ποικίλες συσχετίσεις με τα διάφορα βιοχημικά χαρακτηριστικά που μετρήθηκαν. Δεν υπάρχουν προηγούμενες μελέτες που να εστιάζουν στα εν λόγω ευρήματα και είναι άγνωστη η πιθανή επίδραση της αντιρετροϊκής αγωγής και της HIV λοίμωξης. Συνεπώς για την αποσαφήνισή τους χρειάζεται περαιτέρω μελέτη.

Η βιοσύνθεση του PAF στα ερυθροκύτταρα

Στην εργασία αυτή πιστοποιήθηκε η ύπαρξη των βιοσυνθετικών ενζύμων του PAF, PAF-CPT και lyso-PAF-AT, στα ερυθροκύτταρα. Η μελέτη έδειξε ότι τα ένζυμα είναι μεμβρανικά, κάτι που οδηγεί στο συμπέρασμα ότι πιθανώς να σχηματίζονται κατά τη διάρκεια των πρώτων ημερών ζωής του ερυθροκυττάρου όσο υπάρχουν ακόμα τα διάφορα οργάνδια στο εσωτερικό του. Το εύρημα αυτό δημιουργεί περισσότερες ερωτήσεις από αυτές που ενδεχομένως να απαντά, ανοίγοντας έτσι το δρόμο για μια μεγάλη έρευνα γύρω από το θέμα αυτό που θα μπορούσε να δώσει εξηγήσεις σε πολλά ερωτήματα στις διάφορες παθολογικές καταστάσεις που σχετίζονται με φλεγμονή και αιματολογικές διαταραχές.

Όλες οι στατιστικώς σημαντικές παρατηρήσεις της παρούσας μελέτης για τα επίπεδα του PAF έχουν παραμείνει και μετά από διόρθωση των τιμών με πληθώρα παραμέτρων που θα μπορούσαν να επηρεάσουν όπως η ηλικία, ο ΔΜΣ, το κάπνισμα, ο αριθμό λευκοκυττάρων και τα CD4⁺ T κύτταρα.

Συμπεράσματα

- Οι διαφοροποιήσεις που προκάλεσαν οι αντιρετροϊκές αγωγές στα λιποειδή του ορού είναι προβλεπόμενες από τα βιβλιογραφικά δεδομένα καθώς η έναρξη της αγωγής έχει συσχετιστεί με την αύξησή τους [114, 115] δημιουργώντας ήδη ένα υπόβαθρο για καρδιαγγειακό κίνδυνο [378].
- Το tenofovir-DF/emtricitabine με efavirenz προκαλεί την ισχυρότερη *in vitro* αναστολή στη δράση του PAF και τα *in vivo* αποτελέσματα συνάδουν καθώς αναστέλλει το μεταβολισμό του PAF κατά τη διάρκεια της 12μηνιας μελέτης. Τα δεδομένα αυτά συμφωνούν με τα βιβλιογραφικά αφού η συγκεκριμένη αντιρετροϊκή αγωγή έχει συσχετιστεί με τη μείωση διαφόρων δεικτών φλεγμονής, όπως την CRP και τον TNFα [379].
- Το abacavir/lamivudine με efavirenz προκαλεί την πιο ασθενή αναστολή στη δράση του PAF, εμφανίζει *in vivo* παροδική αύξηση στο μεταβολισμό του PAF τον 3^ο μήνα αγωγής και αποτελεί την ομάδα με την πιο αυξημένη Lp-PLA2.

- Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν με τα ευρήματα της βιβλιογραφίας καθώς η αγωγή αυτή έχει συσχετιστεί με την αύξηση κάποιων δεικτών φλεγμονής (CRP, IL-6, CD40LG, IL-8, LTA και CCL5), γεγονός που αποδόθηκε στο abacavir που περιέχει [380, 381] και η χρήση του συνδέθηκε με την παροδική, σε κάποιες περιπτώσεις, αύξηση του καρδιαγγειακού κινδύνου [382]. Ο ακριβής μηχανισμός του είναι άγνωστος ακόμα αλλά τα δεδομένα μαρτυρούν υπέρ φλεγμονώδους αιτιολογίας. Επιπλέον, η Lp-PLA2 αποτελεί δείκτη της καρδιαγγειακής λειτουργίας, ευαίσθητο στα επίπεδα του PAF [383] αλλά έχει επίσης χαρακτηριστεί ως δείκτης της απόκρισης του ξενιστή στην HIV λοίμωξη, καθώς η έκκρισή της δρα προστατευτικά ενάντια στα αυξημένα επίπεδα PAF [384]. Τα παραπάνω δεδομένα σε συνδυασμό με τα αποτελέσματα της μελέτης θα μπορούσαν να προτείνουν τον PAF ως τον ενδιάμεσο παράγοντα στο καρδιαγγειακό κίνδυνο, καθώς έχει πιστοποιηθεί η συμμετοχή του σαν παράγοντας αλλά και σαν γενεσιουργό αίτιο της αθηροσκλήρωσης σύμφωνα με τη <<θεωρία της αθηροσκλήρωσης με εμπλοκή του PAF>> [385, 386].
- Το tenofovir-DF/emtricitabine με atazanavir-r, προκαλεί μια ενδιάμεση *in vitro* αναστολή στη δράση του PAF και εμφανίζει παροδική αύξηση στον *in vivo* μεταβολισμό του τον 6^ο μήνα αγωγής, χωρίς να επηρεάζει τη Lp-PLA2. Τα βιβλιογραφικά δεδομένα δείχνουν ότι το tenofovir-DF έχει κατηγορηθεί για νεφρική βλάβη και συγκεκριμένα όταν συνδυαστεί με αναστολείς πρωτεάσης, όπως το atazanavir-r [172] αλλά και η δράση του PAF εμπλέκεται στην HIV νεφροπάθεια [387]. Πιθανόν λοιπόν, στην παρούσα μελέτη, η οξεία φλεγμονή που χαρακτηρίζει την ομάδα αυτή να μαρτυρά μια νεφρολογική δυσλειτουργία, έστω παροδική, λόγω της νεφρο-τοξικής δράσης της αγωγής.
 - Το abacavir/lamivudine με atazanavir-r προκαλεί *in vitro* μια ενδιάμεση αναστολή στη δράση του PAF και εμφανίζει *in vivo* σταδιακή αύξηση στο μεταβολισμό του από τον 6^ο ως τον 12^ο μήνα αγωγής. Το παράδοξο των αποτελεσμάτων έγκειται στις πολύ υψηλές τιμές των PAF επιπέδων σε σύγκριση με τις άλλες ομάδες. Τα μεταβολικά του ένζυμα και οι βιοχημικές

τους εξετάσεις δεν συνηγορούν σε κάτι τέτοιο εκτός από τη στατιστικώς σημαντική μείωση του αριθμού των ερυθροκυττάρων, κάτι που δεν έχει συσχετιστεί με τη χρήση της αγωγής στη βιβλιογραφία αλλά ίσως να προμηνύει μια αναιμία, η οποία είναι συχνή στην HIV λοίμωξη αλλά και σχετίζεται με υψηλά επίπεδα PAF μέσω της ερυθρόπτωσης [102, 336, 340]. Επιπλέον, η αρνητική συσχέτιση που προέκυψε μεταξύ δεσμευμένου PAF με τον αριθμό ερυθροκυττάρων και την αιμοσφαιρίνη υποστηρίζει την παραπάνω υπόθεση.

- Τα επίπεδα των κυτταροκινών μετρήθηκαν με σκοπό να γίνει μια σύγκριση μεταξύ των γνωστών δεικτών της φλεγμονής με τον PAF. Τα δεδομένα δείχνουν ότι, τουλάχιστον με τη μέθοδο που χρησιμοποιήθηκε, ο PAF είναι πιο ευαίσθητος στις αλλαγές της φλεγμονώδους κατάστασης. Θα μπορούσε λοιπόν να αποτελέσει πολύ καλύτερο δείκτη φλεγμονής αν η μέτρηση του γινόταν πιο εύκολα και γρήγορα, με την ίδια όμως ευαισθησία, ώστε να μπορεί έτσι να χρησιμοποιείται σε εξετάσεις ρουτίνας. Παρόλα αυτά τα επίπεδα κυτταροκινών είναι πιο αυξημένα από το μέσο πληθυσμό φανερώνοντας μια κατάσταση φλεγμονής [388]. Επιπλέον, η αύξηση του TNFα στην ομάδα Β τον 1^ο μήνα αγωγής σχετίζεται άμεσα με την επακόλουθη αύξηση του PAF τον 3^ο μήνα αγωγής καθώς το ένα μόριο επάγει τη βιοσύνθεση του άλλου και *vice versa* [389, 390].

Από τη παρούσα διδακτορική διατριβή προέκυψε η άμεση εμπλοκή του Παράγοντα Ενεργοποίησης των Αιμοπεταλίων στην HIV λοίμωξη καθώς σχετίζεται με τη χρόνια ανοσολογική διέγερση και με τις μη συσχετιζόμενες με το AIDS εκδηλώσεις της λοίμωξης. Επιπλέον, ο μεταβολισμός του Παράγοντα Ενεργοποίησης των Αιμοπεταλίων επηρεάζεται από την εκάστοτε αντιρετροϊκή αγωγή και έτσι η έρευνα γύρω από το θέμα αυτό μπορεί να οδηγήσει στην ανάπτυξη αποτελεσματικότερων αγωγών και να ελέγξει τόσο τη φλεγμονή της HIV λοίμωξης όσο και τις συνέπειές της.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΟΡΟΛΟΓΙΑΣ

AIDS	Σύνδρομο Επίκτητης Ανοσολογικής Ανεπάρκειας
ALB	Αλβουμίνες
ALP	Αλκαλική Φωσφατάση
Baseline	Έναρξη Αγωγής
BSA	Αλβουμίνη Ορού Βwός
BUN	Άζωτο Ουρίας Ορού
cART	Συνδυαστική Αντιρετροϊκή Αγωγή
CHOL	Χοληστερόλη
CK	Κινάση Της Κρεατίνης
CREA	Κρεατινίνη Ορού
CSFs	Παράγοντες Πολλαπλασιασμού των Αρχέγονων Αιμοποιητικών Κυττάρων
De Novo	Εξ' Υπαρχής
DNA	Δεοξυριβονουκλεϊκό Οξύ
DTT	Διθειοθρεϊτόλη
Eryptosis	Ερυθρόπτωση
Flippases	Φλιπάσες
Floppases	Φλοπάσες
Flotillin	Φλοτιλίνες
G-LDL	Γλυκοζυλιωμένη LDL
GLUC	Γλυκόζη Ορού
GPCR	Υποδοχείς που συνδέονται με G Πρωτεΐνες
HAART	Αντιρετροϊκή Αγωγή Υψηλής Δραστηκότητας
HBV	Ιός της Ηπατίτιδας Β

HCT	Αιματοκρίτης
HCV	Ιός της Ηπατίτιδας C
HDL	Λιποπρωτεΐνη Υψηλής Πυκνότητας
HGb	Αιμοσφαιρίνη
HIVE	Εγκεφαλοπάθεια σχετική με τον HIV
HPLC	Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης
Hrv	Ιός των Ανθρωπίνων Θηλωμάτων
IFN	Ιντερφερόνες
Immune Activation	Ανοσολογική Ενεργοποίηση
Immunosenescence	Πρόωρη/Αφύσικη Ανοσολογική Γήρανση
Innate Immune System	Έμφυτο Ανοσοποιητικό Σύστημα
Integrase	Ενσωματάση
IRF	Ρυθμιστικοί Παράγοντες Ιντερφερονών
LDH	Γαλακτική Αφυδρογονάση
LDL	Λιποπρωτεΐνη Χαμηλής Πυκνότητας
Lipid rafts	Λιπιδικές σχεδίες
Lp-PLA2	Λιποπρωτεϊνική Φωσφολιπάση A2
LPS	Λιποπολυσακχαρίτες
LTA	Λιποτειχοϊκό οξύ
lyso-PAF-AT	lyso-PAF-ακετυλοτρανσφεράση
lyso-PC	lyso- φωσφατιδυλοχολίνη
mLDL	Τροποποιημένη LDL
NF-κB	Πυρηνικός Παράγοντας Κβ
non-AIDS morbidities	Μη Συσχετιζόμενες με το AIDS Εκδηλώσεις
NRTIs	Νουκλεοσιδικά Ανάλογα - Αναστολείς Αντίστροφης

	Μεταγραφάσης
NtRTIs	Νουκλεοτιδικά Ανάλογα - Αναστολείς Αντίστροφης Μεταγραφάσης
NNRTIs	Μη Νουκλεοσιδικά Ανάλογα - Αναστολείς Αντίστροφης Μεταγραφάσης
ox-LDL	Οξειδωμένη LDL
PAF	Παράγοντας Ενεργοποίησης των Αιμοπεταλίων
PAF-AH	PAF-Ακετυλοϋδρολάση
PAF-CPT	PAF-Φωσφοχολινοτρανσφεράση
PAF-like activity molecules	Μόρια Διαφορετικής Δομής αλλά Παρόμοιας Δραστικότητας με τον PAF
PAF-like molecules	Μοριακά Ανάλογα του PAF
PAF-R	PAF Υποδοχέας
PC	Φωσφατιδυλοχολίνη
PE	Φωσφατιδυλοαιθανολαμίνη
PHSC	Πολυδύναμα Αιμοποιητικά Βλαστικά Κύτταρα
PIs	Αναστολείς Πρωτεασών
PLT	Αριθμός Αιμοπεταλίων
RBC	Αριθμός Ερυθροκυττάρων
Remodeling	Αναδιαμόρφωση
RNA	Ριβονουκλεϊκό Οξύ
Scramplases	σκραμπλάσες
SGOT,AST	Οξαλοξεϊκή Τρανσαμινάση
SGPT,ALT	Πυροσταφυλική Τρανσαμινάση
SM	Σφιγγομυελίνη
Stomatin	Στοματίνη

TCA	Τριχλωροξικό Οξύ
TGF	Τροποποιητικός Αυξητικός Παράγοντας
TLC	Χρωματογραφία Λεπτής Στιβάδας
TLR	Toll-Like Υποδοχείς
TNF	Παράγοντας Νέκρωσης Όγκων
TRIG	Τριγλυκερίδια
VEGF	Αγγειακός Ενδοθηλιακός Αυξητικός Παράγοντας
WBC	Αριθμός Λευκοκυττάρων
BMI	Δείκτης Μάζας Σώματος
γ-GT	γ- Γλουταμινική Τρανσφεράση
Δ	Διαφορές
HIV	Ανθρώπινος Ιός Ανοσοανεπάρκειας
IL	Ιντερλευκίνη
Microbial Translocation	Μικροβιακή Μετατόπιση

Συντμήσεις – Αρκτικόλεξα – Ακρωνύμια

AAG	1-O-alkyl-2-acetyl-sn-glycerol
AIDS	Acquired Immunodeficiency Syndrome
ALB	Albumin
ALP	Alkaline Phosphatase
ATV	Atazanavir
BMI	Body Mass Index
BSA	Bovine Serum Albumin
BUN	Blood Urea Nitrogen
C	Chloroform
cART	Combinational Antiretroviral Therapy
CCR5	C-C Chemokine Receptor Type 5
CDC	Centers of Disease Control
CHOL	Cholesterol
CK	Creatine kinase
CREA	Creatinine
CRP	C-Reactive Protein
CSFs	Colony Stimulation Factors
CVD	Cardiovascular Disease
CXCR4	C-X-C Chemokine Receptor Type 4
D.A.D.	Data Collection on Adverse Events of Anti-HIV Drugs
DF	Disoproxil Fumarate
DNA	Deoxyribonucleic Acid
DTT	Dithiothreitol
Efv	Efavirenz
FDA	Food and Drug Administration
FRAM	Fat Redistribution and Metabolic Change in HIV Infection Study
G-LDL	Glycosylated LDL
GLUC	Glucose

GPCR	G protein-coupled receptor
HAART	High Active Antiretroviral Therapy
HBV	Hepatitis B virus
HCT	Hematocrit
HCV	Hepatitis C virus
HDL	High Density Lipoprotein
HEAT	HIV Study with Epzicom and Truvada
HGb	Hemoglobin
HIV	Human Immunodeficiency Virus
HIVE	HIV Associated Encephalopathy
HPLC	High Pressure Layer Chromatography
Hpv	Human Papillomavirus
IC₅₀	Inhibitory Concentration for 50% Inhibition
IFN	Interferon
IL	Interleukin
IRF	Interferon Regulatory Factor
L	Leukocytes
LDH	Lactate dehydrogenase
LDL	Low Density Lipoprotein
Lp-PLA2	Lipoprotein-associated Phospholipase A2
LPS	Lipopolysaccharides
LTA	Lipoteichoic acid
lyso-PAF-AT	lyso-PAF acetyltransferase
M	Methanol
MACS	Multicenter AIDS Cohort Study
mLDL	modified LDL
myD88	Myeloid differentiation protein 88
NF-κB	Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
NRTIs	Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitors

NtRTIs	Nucleotide Reverse Transcriptase Inhibitors
NNRTIs	Non-Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitors
ox-LDL	Oxidized LDL
P	Platelets
PAF	Platelet Activating Factor
PAF-AH	PAF acetylhydrolase
PAF-CPT	Platelet Activating Factor Cholinephosphotransferase
PAF-R	Platelet Activating Factor Receptor
PAI-1	Plasminogen-Activator Inhibitor Type 1
PAMP	Pathogen Associated Molecular Pattern
PC	Phosphatidylcholine
PE	Phosphatidylethanolamine
PHSC	Pluripotent Hematopoietic Stem Cell
PIs	Protease Inhibitors
PLT	Platelet Count
PPP	Platelet Poor Plasma
PRP	Platelet Rich Plasma
r	Ritonavir
RBC	Red Blood Cell Count
RNA	Ribonucleic Acid
SGOT,AST	Aspartate Aminotransferase
SGPT,ALT	Alanine Transaminase
SIV	Simian Immunodeficiency Virus
SM	Sphingomyelin
SMART	Strategies for Management of Antiretroviral Therapy
TCA	Trichlororic Acid
TGF	Transforming growth factor
TIR	Toll/interleukin-1 receptor
TLC	Thin Layer Chromatography

TLR	Toll-like receptor
TNF	Tumor Necrosis Factor
TRAM	TRIF related adaptor molecule
TRIF	Toll-interleukin-1-receptor domain-containing adaptor inducing interferon-β
TRIG	Triglycerides
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VEGFR	Vascular Endothelial Growth Factor Receptor
WBC	White Blood Cell Count
AZT	Zidovudine
γ-GT	Gamma-glutamyl transpeptidase
ΔΜΣ	Δείκτης Μάζας Σώματος
Φ.Ο.	Φυσιολογικός Ορός

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι

Πίνακας 25: CD4⁺ T κύτταρα και ιικό φορτίο των ασθενών κατά τη διάρκεια της μελέτης.

Ομάδες		Μήνες						p _{time}
		0	1	3	6	9	12	
CD4 ⁺ T (κύτταρα/μL)	A	273.0	348.0*	375.0*	411.5*	479.0*	439.0*	<0.001
		(232.0 - 362.0)	(319.0 – 412.0)	(315.0 – 422.0)	(279.5 – 470.2)	(390.5 – 534.2)	(329.0-478.7)	
	B	313.5	372.0*	473.5*	467.5*	526.5*	526.5*	<0.001
		(246.2 - 323.0)	(350.7 – 424.0)	(404.2 – 505.7)	(387.7 – 515.5)	(361.5 – 614.0)	(379.2-626.7)	
	Γ	305.5	387.5*	499.5*	598.0*	667.5*	678.0*	<0.001
		(254.8-381.0)	(335.3-599.0)	(346.0-783.5)	(403.0-685.0)	(382.5-871.3)	(439.5-983.5)	
	Δ	268.0	379.0*	409.0*	555.0*	466.0*	616.0*	<0.001
		(241.0-380.5)	(308.5-488.0)	(358.0-513.0)	(316.0-630.0)	(335.0-606.0)	(354.5-779.0)	
	N	486.5	550.5	495.5	650.5*	581.5	501.5	0.362
		(463.3-593.8)	(448.1-713.5)	(468.5-646.8)	(560.3-677.5)	(463.5-621.5)	(419.3-668.3)	
Ιικό φορτίο - VL (log ανηγ./mL)	A	4.3	2.4*	ND*	ND*	ND*	ND*	<0.001
		(4.0 – 4.7)	(2.2 – 2.7)					
	B	4.4	2.4*	2.0*	ND*	ND*	ND*	<0.001
		(3.8 – 5.1)	(1.9 – 2.6)					
	Γ	2.8	2.7*	ND*	ND*	ND*	ND*	<0.001
		(4.5-5.5)	(2.4-3.1)					
	Δ	4.3	2.5*	ND*	ND*	ND*	ND*	<0.001
		(3.8-5.0)	(2.1-2.9)					
	N	4.1	3.9	4.0	3.8	4.0	3.9	0.399
		(3.1-4.5)	(3.2-4.3)	(3.3-4.5)	(3.2-4.4)	(3.1-4.4)	(2.8-4.7)	

Το p_{time} εκφράζει τη συνολική μεταβολή στη διάρκεια της μελέτης ενώ το * τη στατιστικώς σημαντική διαφοροποίηση ($p < 0.05$) σε σχέση με την έναρξη της αγωγής ($t=0$, baseline). Τα μεγέθη είναι εκφρασμένα σε διάμεσο και ενδοτεταρτημοριακό εύρος (25° - 75°). (ND: Non Detected)

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ II

Πίνακας 26: Δείκτης Μάζας Σώματος και λιπιδαιμικό προφίλ των ασθενών κατά τη διάρκεια της μελέτης.

Ομάδες		Μήνες						P _{time}
		0	1	3	6	9	12	
Δείκτης Μάζας Σώματος - ΔΜΣ (Kg/cm ²)	A	27.4	27.5	27.7	28.1	28.1	28	0.754
		(24.4 - 32.6)	(24.5 - 31.4)	(24.4 - 30.9)	(24.8 - 30.1)	(24.7 - 29.9)	(24.1 - 30.6)	
	B	24.2	24.4	24.1	24.6	24.8	24.7	0.333
		(23.4 - 27.6)	(23.6 - 27.8)	(23.9 - 28.7)	(23.6 - 29.2)	(23.2 - 28.5)	(24.0 - 28.4)	
	Γ	24.7	25.2	26.1	25.9	25.9	25.8	0.761
		(22.5-26.9)	(23.2-26.9)	(23.7-27.0)	(24.1-27.6)	(24.0-27.5)	(25.3-27.4)	
	Δ	23.8	24.1	23.9	24.1	24.2*	24.7	0.215
		(22.3-26.3)	(22.8-26.3)	(23.0-25.7)	(23.2-26.8)	(23.6-26.7)	(23.4-27.3)	
	N	24.7	24.7	24.3	24.0	24.3	24.3	0.380
		(23.6-27.6)	(23.9-28.2)	(23.5-27.7)	(21.9-27.6)	(23.3-27.7)	(23.6-27.7)	
Ολική χοληστερόλη (mg/dL)	A	169.5	188.0*	209.0*	198.0*	199.5*	197.0 *	0.007
		(157.2 - 193.7)	(179.0 - 219.7)	(179.5 - 255.0)	(189.2 - 240.0)	(183.5 - 221.5)	(183.2 - 245.0)	
	B	156	185.5*	194.5*	197.0*	213.5*	202.5 *	0.001
		(136.8 - 179.5)	(169.7 - 263.7)	(170.0 - 241.2)	(171.0 - 243.7)	(176.0 - 244.2)	(184.5 - 240.2)	
	Γ	147.0	150.0	161.0	177.0	166.0	163.5	0.067
		(125.0-168.0)	(135.3-176.8)	(126.5-185.0)	(132.5 - 204.5)	(127.0-204.0)	(135.8-203.8)	
	Δ	182.0	197.0*	204.0*	204.0*	202.0*	196.0*	0.005
		(155.5-203.0)	(173.5-231.5)	(186.0-234.0)	(174.5-228.5)	(188.0-244.5)	(190.0-243.5)	
	N	169.5	161.3	171.0	168.0	155.5	149.5	0.595
		(142.5-193.8)	(146.0-188.5)	(138.5-185.5)	(119.0-192.8)	(118.3-194.5)	(130.0-194.8)	

Ομάδες		Μήνες						p _{time}
		0	1	3	6	9	12	
HDL (mg/dL)	A	34 (28.0 - 40.5)	42 (37.0 - 47.0)	46.0* (32.2 - 50.7)	46.5* (33.7 - 53.7)	44.5* (32.7 - 51.0)	40.5* (33.0 - 48.7)	0.008
	B	34.5 (29.0 - 38.8)	41.5* (32.7 - 48.5)	42.0* (33.5 - 50.0)	43.5* (40.7 - 48.7)	42.5* (37.7 - 47.2)	38.0* (37.0 - 50.7)	0.002
	Γ	26.5 (25.3 - 35.5)	31.0 (27.0-37.8)	33.5 (26.5-37.3)	38.0* (27.0-43.5)	32.5 (25.0-42.8)	35.5 (31.0-41.5)	0.030
	Δ	43.0 (33.5-55.0)	47.0* (36.0-57.0)	49.0* (35.5-57.0)	49.0* (37.5-66.5)	52.0* (36.5-62.5)	49.0* (40.5-61.0)	0.001
	N	37.5 (30.0-42.3)	36.0 (34.0-41.0)	36.0 (29.0-42.0)	39.0 (28.0-40.8)	35.5 (30.0-40.8)	33.5 (30.0-38.3)	0.846
LDL (mg/dL)	A	120 (105.2 - 136.2)	133 (115.0 - 152.0)	137.0* (115.7 - 188.2)	142.5* (114.0 - 150.0)	141.5* (121.5 - 152.7)	147.7* (117.0 - 176.2)	0.028
	B	98 (80.0 - 125.0)	116.0* (85.5 - 145.2)	107.0* (96.7 - 155.5)	113.5* (105.2 - 142.7)	121 (91.7 - 145.7)	117.5* (98.7 - 146.0)	0.007
	Γ	88.5 (76.8-106.8)	92.5 (73.8-102.8)	77.0 (65.5-125.0)	110.0 (73.3-131.8)	102.0 (80.0-127.5)	96.0 (73.3-126.0)	0.407
	Δ	118.0 (100.0-127.0)	123.0* (110.0-154.0)	121.0 (103.5-142.0)	127.0 (105.5-137.5)	124.0 (100.5-146.5)	119.0 (106.0-137.5)	0.192
	N	117.0 (86.5-140.5)	105.8 (84.8-141.3)	111.5 (72.8-138.0)	110.5 (70.3-139.3)	98.0 (70.8-142.3)	88.5 (79.0-143.0)	0.326
Τριγλυκερίδια (mg/dL)	A	104.5 (63.5 - 133.7)	108.5 (69.0 - 172.5)	114 (83.7 - 146.7)	101.5 (79.7 - 131.5)	112.5 (68.2 - 148.2)	105.5 (79.2 - 158.0)	0.170
	B	77.5 (62.8 - 213.3)	117.0* (93.0 - 387.7)	122.0* (91.7 - 251.5)	122.5* (89.7 - 238.2)	147.5* (92.5 - 548.5)	129.0* (111.7 - 354.0)	0.001
	Γ	131.5 (88.5 - 177.0)	143.0* (129.3-216.0)	149.5 (115.8-196.5)	150.0 (112.8-222.3)	153.5 (96.5-214.3)	168.5 (107.5-230.8)	0.412
	Δ	62.0 (50.0-132.0)	97.0* (84.5-144.5)	126.0* (88.5-229.0)	103.0* (67.5-221.5)	103.0* (92.5-208.0)	135.0* (81.5-259.0)	0.001
	N	83.5 (78.0-103.3)	87.5 (60.4-116.3)	92.0 (63.5-167.8)	88.5 (71.5-137.8)	78.5 (62.0-131.3)	92.5 (55.3-110.3)	0.683

Το p_{time} εκφράζει τη συνολική μεταβολή στη διάρκεια της μελέτης ενώ το * τη στατιστικώς σημαντική διαφοροποίηση ($p < 0.05$) σε σχέση με την έναρξη της αγωγής ($t=0$, baseline). Τα μεγέθη είναι εκφρασμένα σε διάμεσο και ενδοτεταρτημοριακό εύρος (25° - 75°).

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙΙ

Πίνακας 27: Βιοχημικοί δείκτες των ασθενών κατά τη διάρκεια της μελέτης.

Ομάδες		Μήνες						p _{time}
		0	1	3	6	9	12	
Γλυκόζη-GLUC (mg/dL)	Α	92.0	98.5	91.5	104.5	100.0	100.0	0.167
		(87.0-111.0)	(94.3-126.3)	(87.3-114.5)	(92.0-110.3)	(86.5-107.8)	(88.3-103.3)	
	Β	86.0	95.5	95.0*	95.0*	97.5*	97.0	0.143
		(76.8-100.8)	(90.8-105.0)	(91.6-100.0)	(90.8-103.3)	(86.3-104.0)	(88.8-101.0)	
	Γ	90.5	89.0	87.0	90.0	90.5	82.5*	0.090
		(88.3-92.8)	(87.3-94.8)	(82.5-88.8)	(85.5-95.5)	(87.5-94.5)	(80.3-86.8)	
	Δ	82.0	84.0	89.0	85.0	85.0	86.0	0.598
		(72.0-90.5)	(79.0-94.5)	(76.5-96.5)	(75.5-96.0)	(78.0-93.5)	(78.5-98.5)	
	Ν	91.0	90.0	94.0	86.5	85.5*	86.5	0.008
		(89.3-98.0)	(87.0-92.8)	(86.3-95.5)	(77.8-90.8)	(82.0-89.5)	(83.5-90.3)	
Άζωτο Ουρίας ορού-BUN (mg/dL)	Α	12.5	12.5	11.0	12.5	12.0	11.5	0.963
		(8.3-18.3)	(8.8-17.0)	(11.0-17.0)	(9.3-15.8)	(9.3-15.8)	(8.5-16.8)	
	Β	15.0	16.0	16.5	16.0	17.5	15.5	0.799
		(13.5-17.3)	(14.3-18.5)	(11.0-19.0)	(11.8-19.3)	(12.8-18.5)	(12.5-18.0)	
	Γ	13.5	14.5	16.0	14.5	11.5	15.0	0.082
		(12.3-17.0)	(10.8-17.8)	(12.5-17.5)	(13.0-16.5)	(10.3-16.0)	(14.0-18.3)	
	Δ	13.0	14.0	13.0	16.0	14.0	16.0	0.676
		(12.0-18.0)	(11.5-18.5)	(10.0-19.5)	(11.0-19.5)	(12.0-18.0)	(12.0-20.0)	
	Ν	17.0	17.5	15.5	17.5	16.0	13.0*	0.060
		(14.8-17.8)	(14.5-19.0)	(11.3-16.8)	(13.0-21.3)	(12.3-17.8)	(12.3-15.0)	
Κρεατινίνη Ορού – CREA (mg/dL)	Α	0.90	0.85	0.80	0.90	0.80	0.80	0.324
		(0.70-0.98)	(0.80-1.08)	(0.73-0.98)	(0.73-0.98)	(0.70-1.08)	(0.70-1.00)	
	Β	0.80	0.90	0.80	0.80	0.80	0.80	0.480
		(0.70-0.93)	(0.70-0.90)	(0.80-0.83)	(0.70-0.83)	(0.78-0.95)	(0.78-0.80)	
	Γ	0.85	0.85	0.80	0.85	0.85	0.90	0.918
		(0.80-0.90)	(0.80-0.98)	(0.73-0.98)	(0.80-0.90)	(0.80-0.98)	(0.73-1.00)	
	Δ	0.90	0.80	0.70	0.80	0.80	0.80	0.442
		(0.80-1.00)	(0.70-0.95)	(0.70-0.90)	(0.70-0.85)	(0.75-0.85)	(0.75-0.85)	
	Ν	0.90	0.90	0.85	0.90	0.80	0.85	0.348
		(0.83-0.98)	(0.73-1.08)	(0.80-0.98)	(0.80-1.00)	(0.73-1.08)	(0.70-1.00)	

Οξολοξική τρoσασμινάση - SGOT, AST (U/l)	A	25.5 (17.0-30.2)	25.5 (17.5-32.5)	22.5 (18.5-39.8)	26.0 (21.8-35.8)	26.5 (22.3-33.8)	22.5 (18.8-25.0)	0.190
	B	19.0 (14.8-24.8)	18.0 (15.5-25.5)	16.5 (12.8-26.5)	19.5 (14.5-28.3)	16.5 (14.0-18.0)	18.5 (14.5-34.8)	0.082
	Γ	21.5 (17.8-33.3)	23.0 (19.0-29.8)	18.5 (16.3-28.0)	17.0 (17.0-27.3)	20.0 (17.0-24.3)	19.0 (18.3-24.0)	0.192
	Δ	28.0 (19.5-32.5)	23.0* (18.0-30.5)	20.0* (17.5-27.0)	20.0* (18.5-25.5)	21.0 (17.5-28.5)	19.0 (17.0-25.0)	0.398
	N	29.0 (21.8-32.5)	29.0 (19.5-31.5)	27.0 (18.3-34.0)	30.0 (19.0-39.8)	29.5 (19.5-31.8)	33.0 (20.8-43.0)	0.435
Πυροσταφυλική τρoσασμινάση - SGPT, AST (U/l)	A	23.0 (12.0-42.5)	24.0 (16.8-50.8)	26.5 (16.3-52.0)	31.5 (18.8-40.0)	30.0 (19.0-46.8)	25.5 (12.3-34.0)	0.378
	B	22.5 (13.0-36.0)	23.5 (15.8-30.5)	19.0 (12.8-31.8)	16.5 (14.8-25.3)	16.5 (11.8-20.5)	22.5 (17.0-35.0)	0.110
	Γ	19.5 (17.5-51.3)	27.0 (18.8-63.8)	19.0 (14.8-45.5)	23.5 (14.3-42.5)	19.5 (14.3-37.5)	18.5 (14.3-33.8)	0.314
	Δ	25.0 (16.5-33.5)	22.0* (11.0-28.0)	18.0* (12.0-23.0)	16.0 (11.0-25.5)	19.0 (12.0-25.0)	19.0 (11.5-23.5)	0.467
	N	29.0 (21.8-32.5)	32.0 (19.5-31.5)	28.5 (18.3-34.0)	32.5 (19.0-39.8)	28.5 (19.5-31.8)	33.5 (20.8-43.0)	0.621
Γαλακτική Αφυδρογονάση - LDH	A	180.5 (152.0-204.3)	191.0 (155.5-204.3)	186.5 (155.5-217.5)	192.5 (188.3-208.5)	202.0 (192.0-216.8)	190.0 (173.0-205.5)	0.357
	B	172.5 (152.8-204.0)	161.0 (146.3-183.0)	158.5 (135.0-187.8)	159.0 (143.5-186.3)	158.5 (142.8-175.3)	162.0 (137.5-200.0)	0.122
	Γ	189.5 (164.3-217.5)	156.5 (149.0-197.0)	164.0* (130.5-171.0)	159.5* (129.5-170.3)	164.5 (127.8-198.0)	165.5 (133.8-178.8)	0.020
	Δ	205.0 (171.0-211.5)	186.0 (165.0-207.5)	179.0 (173.5-183.0)	169.0 (156.0-179.5)	178.0 (169.0-193.5)	164.0 (154.0-205.5)	0.150
	N	217.0 (192.5-236.8)	211.5 (173.8-240.0)	202.5 (170.0-226.3)	229.5 (189.3-241.5)	202.5 (178.3-248.5)	212.0 (172.8-255.8)	0.033
Αλβουμίνες – ALB	A	45.0 (41.3-45.0)	44.0 (42.3-45.0)	44.0 (43.0-46.0)	44.5 (44.0-46.8)	43.5 (42.0-45.0)	45.5 (44.0-46.0)	0.209
	B	46.0 (44.0-48.0)	45.5 (42.0-47.5)	47.0 (45.0-50.0)	47.0 (46.0-48.0)	47.0 (45.5-49.0)	44.5 (44.0-47.3)	0.110
	Γ	44.0 (43.0-46.5)	43.1 (42.3-45.5)	42.6 (39.5-45.8)	44.2 (44.0-45.8)	44.9 (44.0-45.0)	45.2 (44.0-47.8)	0.107
	Δ	43.0 (41.5-46.5)	43.0 (41.5-44.5)	44.0 (41.5-45.5)	43.0 (43.0-44.0)	44.0 (44.0-46.0)	44.0 (43.0-47.0)	0.370
	N	47.5 (44.5-49.5)	46.8* (44.3-47.0)	44.5* (42.3-46.5)	44.5* (42.5-47.5)	45.5 (40.0-46.8)	43.5 (41.3-46.3)	0.012

Κινάση της κρεατίνης-CK	A	144.0 (43.3-252.0)	141.5 (92.5-260.5)	140.5 (65.8-210.5)	168.0* (96.8-363.5)	127.5 (74.5-183.3)	114.5 (83.5-160.3)	0.082
	B	109.5 (41.0-273.3)	108.5 (45.0-250.0)	82.0 (48.0-446.3)	155.5 (56.8-640.5)	90.0 (57.3-214.8)	107.0 (59.8-378.5)	0.374
	Γ	67.5 (33.5-103.0)	106.5* (63.3-228.8)	75.0* (57.8-207.8)	92.0* (63.3-112.0)	83.5 (66.3-134.0)	95.0* (76.5-120.0)	0.044
	Δ	142.0 (77.5-206.5)	158.0 (115.0-297.5)	165.0 (124.0-247.0)	173.0 (109.5-281.5)	146.0 (108.5-223.0)	140.0 (86.5-197.0)	0.416
	N	209.5 (91.0-348.3)	129.0 (89.8-286.0)	118.0 (65.8-174.0)	135.0 (68.3-343.8)	108.5 (70.8-181.3)	183.5 (116.8-257.5)	0.331
γ- γλουταμινική τριανσφεράση - γ-GT (U/l)	A	22.0 (14.0-29.3)	35.5* (23.5-51.5)	35.5* (27.3-58.0)	43.5* (27.3-71.5)	39.0* (25.8-73.0)	40.0* (23.3-68.5)	0.003
	B	17.0 (14.0-23.8)	27.0* (23.5-40.5)	28.0* (22.8-46.0)	27.0* (23.8-38.5)	30.5* (21.5-41.5)	35.0* (26.3-41.0)	0.001
	Γ	22.0 (14.5-42.8)	19.0 (14.5-36.5)	21.5 (15.5-60.8)	25.5* (18.5-81.0)	23.0 (17.5-41.3)	21.5 (18.8-38.0)	0.008
	Δ	21.0 (16.0-25.5)	25.0 (15.5-33.0)	21.0 (14.5-28.5)	22.0 (15.0-29.5)	24.0 (16.0-29.0)	22.0 (17.5-30.5)	0.386
	N	17.0 (11.5-31.8)	18.0 (10.4-35.5)	18.5 (8.8-33.0)	16.0 (10.0-42.8)	19.0 (12.8-36.0)	17.5 (12.3-36.3)	0.280
Αλκαλική φωσφατάση –ALP (U/l)	A	59.0 (48.0-72.8)	75.5* (62.5-83.8)	84.5* (68.5-100.3)	87.5* (69.5-102.5)	97.0* (77.3-108.3)	95.0* (81.8-112.8)	<0.001
	B	61.5 (56.8-68.5)	71.0* (67.3-78.0)	74.5* (65.3-86.5)	76.5* (67.5-95.0)	77.5* (66.8-96.3)	79.5* (73.8-99.8)	<0.001
	Γ	65.5 (56.8-70.8)	78.5* (64.8-84.0)	85.0* (73.5-101.8)	87.5* (80.8-121.5)	92.0* (82.0-125.8)	94.0* (88.0-115.0)	<0.001
	Δ	58.0 (50.0-77.5)	62.0 (51.0-86.0)	63.0* (56.0-87.0)	81.0* (63.0-87.5)	82.0* (64.0-97.5)	78.0* (67.5-98.0)	<0.001
	N	58.5 (52.5-80.3)	68.0 (57.5-79.5)	63.0 (51.3-73.0)	65.5 (52.3-76.0)	66.5 (50.0-69.8)	66.0 (51.8-72.5)	0.104

Το p_{time} εκφράζει τη συνολική μεταβολή στη διάρκεια της μελέτης ενώ το * τη στατιστικώς σημαντική διαφοροποίηση ($p<0.05$) σε σχέση με την έναρξη της αγωγής ($t=0$, baseline). Τα μεγέθη είναι εκφρασμένα σε διάμεσο και ενδοτεταρτημοριακό εύρος (25^o-75^o).

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ IV

Πίνακας 28: Αιματολογικοί δείκτες των ασθενών κατά τη διάρκεια της μελέτης.

	Ομάδες	Μήνες						p _{time}
		0	1	3	6	9	12	
Αριθμός λευκοκυττάρων - WBC (10 ³ /μL)	Α	5.05	5.10	5.45	5.65	5.55	5.60	0.256
		(4.23-5.38)	(4.13-6.28)	(3.98-7.20)	(5.10-6.73)	(4.55-7.50)	(5.10-6.73)	
	Β	5.30	5.10	5.25	6.35	6.00	5.80*	0.091
		(4.63-6.33)	(4.18-6.95)	(4.38-6.13)	(4.73-7.25)	(4.80-6.83)	(5.35-8.03)	
	Γ	6.30	6.40	6.45	6.53	6.15	7.45	0.187
		(5.13-7.13)	(6.05-7.93)	(5.93-8.08)	(5.25-7.78)	(5.78-8.43)	(6.80-9.00)	
	Δ	5.20	4.80	6.70	6.40	6.30	7.30	0.061
		(4.95-7.00)	(4.75-7.45)	(4.60-8.20)	(5.05-8.53)	(5.20-8.75)	(4.75-12.00)	
	Ν	6.05	6.00	5.95	6.65*	5.90	5.75	0.579
		(5.55-7.08)	(4.86-8.60)	(5.30-7.40)	(5.70-7.90)	(5.70-6.58)	(4.83-6.50)	
Αριθμός Αιμοπεταλίων - PLT (10 ³ /μL)	Α	162.5	221.0*	227.0*	209.0*	216.5*	200.5*	0.023
		(118.0-214.8)	(166.3-243.8)	(168.5-254.3)	(184.5-237.8)	(188.8-234.5)	(180.3-236.0)	
	Β	169.0	197.0*	201.5	202.5*	182.0	206.0	0.071
		(139.3-204.8)	(167.0-229.0)	(161.3-222.3)	(176.0-251.5)	(158.8-204.3)	(167.5-237.5)	
	Γ	197.0	228.5*	248.0*	229.5*	242.0*	258.0*	0.008
		(167.8-224.8)	(205.5-273.8)	(222.5-292.5)	(212.5-277.3)	(214.5-270.0)	(220.0-290.3)	
	Δ	172.0	197.0*	222.0	225.0	206.0	210.0	0.027
		(153.5-214.0)	(174.5-249.5)	(165.5-238.0)	(148.0-231.5)	(155.5-219.0)	(183.5-235.0)	
	Ν	243.5	242.5	252.5	216.5	212.5	202.5*	0.034
		(218.8-277.5)	(223.1-331.0)	(217.3-297.3)	(186.3-267.3)	(193.3-258.0)	(178.0-254.5)	
Αριθμός ερυθροκυττάρων - RBC (10 ⁶ /μL)	Α	4.97	4.88	5.04	5.06	4.85	4.92	0.242
		(4.7-5.2)	(4.5-5.2)	(4.6-5.4)	(4.7-5.4)	(4.5-5.2)	(4.6-5.2)	
	Β	5.01	4.93*	4.86*	4.78*	4.83*	4.74*	0.244
		(4.78-5.28)	(4.64-5.30)	(4.54-4.97)	(4.46-4.95)	(4.73-4.96)	(4.51-5.13)	
	Γ	5.04	4.90	4.97	5.16	4.88	5.03	0.623
		(4.66-5.26)	(4.73-5.27)	(4.61-5.17)	(4.82-5.20)	(4.63-5.04)	(4.84-5.11)	
	Δ	4.80	4.50*	4.49*	4.51*	4.54*	4.47*	<0.001
		(4.71-5.28)	(4.43-5.10)	(4.26-4.82)	(4.27-4.75)	(4.21-4.87)	(4.25-4.87)	
	Ν	4.99	5.08	5.13	5.00	5.03	5.04	0.358
		(4.94-5.27)	(5.05-5.14)	(5.04-5.25)	(4.94-5.08)	(4.87-5.17)	(4.89-5.09)	

Αιμοσφαρίνη - Hgb (g/dL)	A	14.3 (13.9-15.2)	14.6 (13.6-14.8)	14.85 (14.2-15.8)	15.25* (14.6-16.0)	14.9 (14.2-15.4)	14.9 (14.5-15.3)	0.002
	B	14.5 (13.9-15.3)	14.6 (13.3-15.4)	14.8 (13.1-15.1)	14.8 (13.7-15.2)	14.7 (13.9-15.5)	14.7 (13.5-15.5)	0.184
	Γ	14.25 (13.43-15.08)	14.30 (13.33-15.40)	14.80 (14.08-15.08)	15.20* (14.60-15.98)	14.75 (13.98-15.43)	15.20* (14.50-15.70)	0.094
	Δ	14.30 (13.90-15.40)	13.60* (12.95-14.95)	14.00 (13.75-14.90)	14.20 (13.60-15.40)	14.30 (13.50-15.80)	14.30 (13.75-15.50)	0.175
	N	14.55 (14.00-15.03)	14.35 (14.20-14.68)	14.45 (14.23-14.75)	14.35 (13.78-15.38)	14.55 (13.28-14.40)	14.35 (13.95-14.93)	0.996
Αιματοκρίτης - HCT (%)	A	41.9 (40.2-45.3)	42.1 (41.0-43.9)	43.3 (41.7-46.6)	44.9* (42.7-46.4)	43.7 (42.1-45.3)	44.1* (43.3-45.5)	0.001
	B	43.8 (42.0-45.4)	42.6 (40.4-45.9)	43.2 (39.9-44.0)	43.6 (41.4-44.5)	43.2 (42.1-46.2)	43.5 (41.1-45.9)	0.079
	Γ	43.0 (40.4-45.0)	42.9 (40.3-45.4)	44.4 (41.6-45.1)	45.2* (43.2-47.3)	44.4 (42.8-46.0)	45.0* (44.0-46.4)	0.036
	Δ	42.5 (41.1-46.3)	41.7* (39.5-44.6)	41.6 (40.4-44.2)	42.7 (40.3-45.8)	42.9 (40.1-46.4)	42.2 (41.0-46.2)	0.080
	N	43.1 (41.6-43.9)	43.1 (42.0-43.7)	43.3 (43.1-44.1)	43.0 (41.7-46.0)	43.2 (41.4-44.9)	43.1 (41.5-44.6)	0.693

Το p_{time} εκφράζει τη συνολική μεταβολή στη διάρκεια της μελέτης ενώ το * τη στατιστικώς σημαντική διαφοροποίηση ($p < 0.05$) σε σχέση με την έναρξη της αγωγής ($t=0$, baseline). Τα μεγέθη είναι εκφρασμένα σε διάμεσο και ενδοτεταρτημοριακό εύρος (25° - 75°).

ΑΝΑΦΟΡΕΣ

1. UN AIDS report on the Global AIDS epidemic. Global Report. 2013.
2. Piot P, Bartos M, Ghys PD, Walker N, Schwartzlander B. The global impact of HIV/AIDS. *Nature* 2001,**410**:968-973.
3. Hellenic Center for Disease Control and Prevention. HIV/AIDS Surveillance Report in Greece. 2013.
4. Centers for Disease Control. Pneumocystis pneumonia--Los Angeles. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 1981,**30**:250-252.
5. Centers for Disease Control. Kaposi's sarcoma and Pneumocystis pneumonia among homosexual men--New York City and California. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 1981,**30**:305-308.
6. Barre-Sinoussi F, Chermann JC, Rey F, Nugeyre MT, Chamaret S, Gruest J, *et al.* Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* 1983,**220**:868-871.
7. Gallo RC, Salahuddin SZ, Popovic M, Shearer GM, Kaplan M, Haynes BF, *et al.* Frequent detection and isolation of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and at risk for AIDS. *Science* 1984,**224**:500-503.
8. Popovic M, Sarngadharan MG, Read E, Gallo RC. Detection, isolation, and continuous production of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and pre-AIDS. *Science* 1984,**224**:497-500.
9. Sarngadharan MG, Popovic M, Bruch L, Schupbach J, Gallo RC. Antibodies reactive with human T-lymphotropic retroviruses (HTLV-III) in the serum of patients with AIDS. *Science* 1984,**224**:506-508.
10. Schupbach J, Popovic M, Gilden RV, Gonda MA, Sarngadharan MG, Gallo RC. Serological analysis of a subgroup of human T-lymphotropic retroviruses (HTLV-III) associated with AIDS. *Science* 1984,**224**:503-505.
11. Vilmer E, Barre-Sinoussi F, Rouzioux C, Gazengel C, Brun FV, Dauguet C, *et al.* Isolation of new lymphotropic retrovirus from two siblings with haemophilia B, one with AIDS. *Lancet* 1984,**1**:753-757.
12. Sharp PM, Hahn BH. Origins of HIV and the AIDS pandemic. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2011,**1**:a006841.
13. International Committee on Taxonomy of Viruses. 61.0.6. Lentivirus. *National Institutes of Health* 2002.
14. International Committee on Taxonomy of Viruses. 61. Retroviridae. *National Institutes of Health* 2002.
15. Σαρόγλου Γ, Λιονή Α, Ποταμούση Π, Γεωργίου Ο. *AIDS/HIV Κλινική Προσέγγιση και Θεραπεία*: Ιατρικές Εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδης; 1999.
16. Gelderblom HR, Hausmann EH, Ozel M, Pauli G, Koch MA. Fine structure of human immunodeficiency virus (HIV) and immunolocalization of structural proteins. *Virology* 1987,**156**:171-176.
17. Gonda MA. Molecular genetics and structure of the human immunodeficiency virus. *J Electron Microscop Tech* 1988,**8**:17-40.
18. Montagnier L. Lymphadenopathy-associated virus: from molecular biology to pathogenicity. *Ann Intern Med* 1985,**103**:689-693.
19. Frankel AD, Young JA. HIV-1: fifteen proteins and an RNA. *Annu Rev Biochem* 1998,**67**:1-25.

20. Levy JA. Pathogenesis of human immunodeficiency virus infection. *Microbiol Rev* 1993,**57**:183-289.
21. Freed EO. HIV-1 replication. *Somat Cell Mol Genet* 2001,**26**:13-33.
22. Smith JA, Daniel R. Following the path of the virus: the exploitation of host DNA repair mechanisms by retroviruses. *ACS Chem Biol* 2006,**1**:217-226.
23. Vaishnav YN, Wong-Staal F. The biochemistry of AIDS. *Annu Rev Biochem* 1991,**60**:577-630.
24. Arts EJ, Hazuda DJ. HIV-1 antiretroviral drug therapy. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2012,**2**:a007161.
25. Porter K, Johnson AM, Phillips AN, Darbyshire JH. The practical significance of potential biases in estimates of the AIDS incubation period distribution in the UK register of HIV seroconverters. *AIDS* 1999,**13**:1943-1951.
26. Mocroft A, Ledergerber B, Katlama C, Kirk O, Reiss P, d'Arminio Monforte A, *et al.* Decline in the AIDS and death rates in the EuroSIDA study: an observational study. *Lancet* 2003,**362**:22-29.
27. Palella FJ, Jr., Delaney KM, Moorman AC, Loveless MO, Fuhrer J, Satten GA, *et al.* Declining morbidity and mortality among patients with advanced human immunodeficiency virus infection. HIV Outpatient Study Investigators. *N Engl J Med* 1998,**338**:853-860.
28. Crum NF, Riffenburgh RH, Wegner S, Agan BK, Tasker SA, Spooner KM, *et al.* Comparisons of causes of death and mortality rates among HIV-infected persons: analysis of the pre-, early, and late HAART (highly active antiretroviral therapy) eras. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2006,**41**:194-200.
29. Broder S. The development of antiretroviral therapy and its impact on the HIV-1/AIDS pandemic. *Antiviral Res* 2010,**85**:1-18.
30. Bansi L, Sabin C, Delpech V, Hill T, Fisher M, Walsh J, *et al.* Trends over calendar time in antiretroviral treatment success and failure in HIV clinic populations. *HIV Med* 2010,**11**:432-438.
31. Lampe FC, Smith CJ, Madge S, Kinloch-de Loes S, Tyrer M, Sabin CA, *et al.* Success of clinical care for human immunodeficiency virus infection according to demographic group among sexually infected patients in a routine clinic population, 1999 to 2004. *Arch Intern Med* 2007,**167**:692-700.
32. Mocroft A, Vella S, Benfield TL, Chiesi A, Miller V, Gargalianos P, *et al.* Changing patterns of mortality across Europe in patients infected with HIV-1. EuroSIDA Study Group. *Lancet* 1998,**352**:1725-1730.
33. Collier AC, Coombs RW, Schoenfeld DA, Bassett RL, Timpone J, Baruch A, *et al.* Treatment of human immunodeficiency virus infection with saquinavir, zidovudine, and zalcitabine. AIDS Clinical Trials Group. *N Engl J Med* 1996,**334**:1011-1017.
34. D'Aquila RT, Hughes MD, Johnson VA, Fischl MA, Sommadossi JP, Liou SH, *et al.* Nevirapine, zidovudine, and didanosine compared with zidovudine and didanosine in patients with HIV-1 infection. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. National Institute of Allergy and Infectious Diseases AIDS Clinical Trials Group Protocol 241 Investigators. *Ann Intern Med* 1996,**124**:1019-1030.
35. Staszewski S, Miller V, Mehmet S, Stark T, De Cree J, De Brabander M, *et al.* Virological and immunological analysis of a triple combination pilot study with loviride, lamivudine and zidovudine in HIV-1-infected patients. *AIDS* 1996,**10**:F1-7.
36. Mocroft A, Brettle R, Kirk O, Blaxhult A, Parkin JM, Antunes F, *et al.* Changes in the cause of death among HIV positive subjects across Europe: results from the EuroSIDA study. *AIDS* 2002,**16**:1663-1671.

37. Autran B, Carcelain G, Li TS, Blanc C, Mathez D, Tubiana R, *et al.* Positive effects of combined antiretroviral therapy on CD4+ T cell homeostasis and function in advanced HIV disease. *Science* 1997,**277**:112-116.
38. Komanduri KV, Viswanathan MN, Wieder ED, Schmidt DK, Bredt BM, Jacobson MA, *et al.* Restoration of cytomegalovirus-specific CD4+ T-lymphocyte responses after ganciclovir and highly active antiretroviral therapy in individuals infected with HIV-1. *Nat Med* 1998,**4**:953-956.
39. Lederman MM, Connick E, Landay A, Kuritzkes DR, Spritzler J, St Clair M, *et al.* Immunologic responses associated with 12 weeks of combination antiretroviral therapy consisting of zidovudine, lamivudine, and ritonavir: results of AIDS Clinical Trials Group Protocol 315. *J Infect Dis* 1998,**178**:70-79.
40. Fauci AS, Folkers GK. Toward an AIDS-free generation. *JAMA* 2012,**308**:343-344.
41. Deeks SG, Lewin SR, Havlir DV. The end of AIDS: HIV infection as a chronic disease. *Lancet* 2013,**382**:1525-1533.
42. Hiv-Causal Collaboration, Ray M, Logan R, Sterne JA, Hernandez-Diaz S, Robins JM, *et al.* The effect of combined antiretroviral therapy on the overall mortality of HIV-infected individuals. *AIDS* 2010,**24**:123-137.
43. Sutinen J, Ristola M. [HIV--from a lethal disease to a chronic illness]. *Duodecim* 2012,**128**:37-46.
44. Nakagawa F, Lodwick RK, Smith CJ, Smith R, Cambiano V, Lundgren JD, *et al.* Projected life expectancy of people with HIV according to timing of diagnosis. *AIDS* 2012,**26**:335-343.
45. Cohen MS, Smith MK, Muessig KE, Hallett TB, Powers KA, Kashuba AD. Antiretroviral treatment of HIV-1 prevents transmission of HIV-1: where do we go from here? *Lancet* 2013,**382**:1515-1524.
46. Palella FJ, Jr., Baker RK, Moorman AC, Chmiel JS, Wood KC, Brooks JT, *et al.* Mortality in the highly active antiretroviral therapy era: changing causes of death and disease in the HIV outpatient study. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2006,**43**:27-34.
47. Phillips AN, Neaton J, Lundgren JD. The role of HIV in serious diseases other than AIDS. *AIDS* 2008,**22**:2409-2418.
48. Soriano VA, Cooper DA. *Antiretroviral therapy*: Permanyer publications; 2008.
49. Young FE. The role of the FDA in the effort against AIDS. *Public Health Rep* 1988,**103**:242-245.
50. Hart GJ, Orr DC, Penn CR, Figueiredo HT, Gray NM, Boehme RE, *et al.* Effects of (-)-2'-deoxy-3'-thiacytidine (3TC) 5'-triphosphate on human immunodeficiency virus reverse transcriptase and mammalian DNA polymerases alpha, beta, and gamma. *Antimicrob Agents Chemother* 1992,**36**:1688-1694.
51. Kohlstaedt LA, Wang J, Friedman JM, Rice PA, Steitz TA. Crystal structure at 3.5 Å resolution of HIV-1 reverse transcriptase complexed with an inhibitor. *Science* 1992,**256**:1783-1790.
52. Tantillo C, Ding J, Jacobo-Molina A, Nanni RG, Boyer PL, Hughes SH, *et al.* Locations of anti-AIDS drug binding sites and resistance mutations in the three-dimensional structure of HIV-1 reverse transcriptase. Implications for mechanisms of drug inhibition and resistance. *J Mol Biol* 1994,**243**:369-387.
53. Witvrouw M, Pannecouque C, Van Laethem K, Desmyter J, De Clercq E, Vandamme AM. Activity of non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors against HIV-2 and SIV. *AIDS* 1999,**13**:1477-1483.
54. Park J, Morrow CD. Mutations in the protease gene of human immunodeficiency virus type 1 affect release and stability of virus particles. *Virology* 1993,**194**:843-850.

55. Espeseth AS, Felock P, Wolfe A, Witmer M, Grobler J, Anthony N, *et al.* HIV-1 integrase inhibitors that compete with the target DNA substrate define a unique strand transfer conformation for integrase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;**97**:11244-11249.
56. Hazuda DJ, Young SD, Guare JP, Anthony NJ, Gomez RP, Wai JS, *et al.* Integrase inhibitors and cellular immunity suppress retroviral replication in rhesus macaques. *Science* 2004;**305**:528-532.
57. Vander A, Sherman J, Luciano D, Tsakopoulos M. *Φυσιολογία του Ανθρώπου, Μηχανισμοί Λειτουργίας του Οργανισμού*. 8th ed: Ιατρικές Εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδης; 2001.
58. Akira S, Takeda K, Kaisho T. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nat Immunol* 2001;**2**:675-680.
59. Selvarajoo K. Immuno Systems Biology: A Macroscopic Approach for Immune Cells Signalling. *New York: Springer* 2013:146.
60. Imler JL, Zheng L. Biology of Toll receptors: lessons from insects and mammals. *J Leukoc Biol* 2004;**75**:18-26.
61. Takeda K, Kaisho T, Akira S. Toll-like receptors. *Annu Rev Immunol* 2003;**21**:335-376.
62. Barton GM. Viral recognition by Toll-like receptors. *Semin Immunol* 2007;**19**:33-40.
63. Pitha PM. Innate antiviral response: role in HIV-1 infection. *Viruses* 2011;**3**:1179-1203.
64. Heil F, Hemmi H, Hochrein H, Ampenberger F, Kirschning C, Akira S, *et al.* Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8. *Science* 2004;**303**:1526-1529.
65. Brenchley JM, Price DA, Schacker TW, Asher TE, Silvestri G, Rao S, *et al.* Microbial translocation is a cause of systemic immune activation in chronic HIV infection. *Nat Med* 2006;**12**:1365-1371.
66. Marchetti G, Tincati C, Silvestri G. Microbial translocation in the pathogenesis of HIV infection and AIDS. *Clin Microbiol Rev* 2013;**26**:2-18.
67. Wolochow H, Hildebrand GJ, Lamanna C. Translocation of microorganisms across the intestinal wall of the rat: effect of microbial size and concentration. *J Infect Dis* 1966;**116**:523-528.
68. Berg RD. Bacterial translocation from the gastrointestinal tract. *Trends Microbiol* 1995;**3**:149-154.
69. Tancrede CH, Andremont AO. Bacterial translocation and gram-negative bacteremia in patients with hematological malignancies. *J Infect Dis* 1985;**152**:99-103.
70. Tedgui A, Mallat Z. Cytokines in atherosclerosis: pathogenic and regulatory pathways. *Physiol Rev* 2006;**86**:515-581.
71. Gessani S, Conti L, Del Corno M, Belardelli F. Type I interferons as regulators of human antigen presenting cell functions. *Toxins (Basel)* 2014;**6**:1696-1723.
72. Barnes BJ, Moore PA, Pitha PM. Virus-specific activation of a novel interferon regulatory factor, IRF-5, results in the induction of distinct interferon alpha genes. *J Biol Chem* 2001;**276**:23382-23390.
73. Taniguchi T, Ogasawara K, Takaoka A, Tanaka N. IRF family of transcription factors as regulators of host defense. *Annu Rev Immunol* 2001;**19**:623-655.
74. Marie I, Durbin JE, Levy DE. Differential viral induction of distinct interferon-alpha genes by positive feedback through interferon regulatory factor-7. *EMBO J* 1998;**17**:6660-6669.
75. Yamaoka S, Courtois G, Bessia C, Whiteside ST, Weil R, Agou F, *et al.* Complementation cloning of NEMO, a component of the IkappaB kinase complex essential for NF-kappaB activation. *Cell* 1998;**93**:1231-1240.
76. Zandi E, Chen Y, Karin M. Direct phosphorylation of IkappaB by IKKalpha and IKKbeta: discrimination between free and NF-kappaB-bound substrate. *Science* 1998;**281**:1360-1363.

77. Ballard DW. Molecular mechanisms in lymphocyte activation and growth. *Immunol Res* 2001,**23**:157-166.
78. De Martin R, Hoeth M, Hofer-Warbinek R, Schmid JA. The transcription factor NF-kappa B and the regulation of vascular cell function. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000,**20**:E83-88.
79. Hunt PW. HIV and inflammation: mechanisms and consequences. *Curr HIV/AIDS Rep* 2012,**9**:139-147.
80. Taiwo B, Barcena L, Tressler R. Understanding and controlling chronic immune activation in the HIV-infected patients suppressed on combination antiretroviral therapy. *Curr HIV/AIDS Rep* 2013,**10**:21-32.
81. Plaeger SF, Collins BS, Musib R, Deeks SG, Read S, Embry A. Immune activation in the pathogenesis of treated chronic HIV disease: a workshop summary. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2012,**28**:469-477.
82. French MA, King MS, Tschampa JM, da Silva BA, Landay AL. Serum immune activation markers are persistently increased in patients with HIV infection after 6 years of antiretroviral therapy despite suppression of viral replication and reconstitution of CD4+ T cells. *J Infect Dis* 2009,**200**:1212-1215.
83. Antiretroviral Therapy Collaboration. Causes of Death in HIV-1-infected individuals on combination antiretroviral therapy of 14 cohort studies. *Clin Infect Dis* 2010,**50**:1387-1396.
84. Guaraldi G, Orlando G, Zona S, Menozzi M, Carli F, Garlassi E, *et al.* Premature age-related comorbidities among HIV-infected persons compared with the general population. *Clin Infect Dis* 2011,**53**:1120-1126.
85. Miller CJ, Baker JV, Bormann AM, Erlandson KM, Huppler Hullsiek K, Justice AC, *et al.* Adjudicated Morbidity and Mortality Outcomes by Age among Individuals with HIV Infection on Suppressive Antiretroviral Therapy. *PLoS One* 2014,**9**:e95061.
86. Shiels MS, Cole SR, Kirk GD, Poole C. A meta-analysis of the incidence of non-AIDS cancers in HIV-infected individuals. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2009,**52**:611-622.
87. Pinzone MR, Fiorica F, Di Rosa M, Malaguarnera G, Malaguarnera L, Cacopardo B, *et al.* Non-AIDS-defining cancers among HIV-infected people. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2012,**16**:1377-1388.
88. Hou W, Fu J, Ge Y, Du J, Hua S. Incidence and risk of lung cancer in HIV-infected patients. *J Cancer Res Clin Oncol* 2013,**139**:1781-1794.
89. Silberstein J, Downs T, Lakin C, Kane CJ. HIV and prostate cancer: a systematic review of the literature. *Prostate Cancer Prostatic Dis* 2009,**12**:6-12.
90. Cachay ER, Mathews WC. Human papillomavirus, anal cancer, and screening considerations among HIV-infected individuals. *AIDS Rev* 2013,**15**:122-133.
91. Latif N, Rana F, Guthrie T. Breast cancer and HIV in the era of highly active antiretroviral therapy: two case reports and review of the literature. *Breast J* 2011,**17**:87-92.
92. Nunnari G, Berretta M, Pinzone MR, Di Rosa M, Berretta S, Cunsolo G, *et al.* Hepatocellular carcinoma in HIV positive patients. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2012,**16**:1257-1270.
93. Hulten E, Mitchell J, Scally J, Gibbs B, Villines TC. HIV positivity, protease inhibitor exposure and subclinical atherosclerosis: a systematic review and meta-analysis of observational studies. *Heart* 2009,**95**:1826-1835.
94. Gibellini D, Borderi M, Clo A, Morini S, Miserocchi A, Bon I, *et al.* HIV-related mechanisms in atherosclerosis and cardiovascular diseases. *J Cardiovasc Med (Hagerstown)* 2013,**14**:780-790.
95. Pereyra F, Lo J, Triant VA, Wei J, Buzon MJ, Fitch KV, *et al.* Increased coronary atherosclerosis and immune activation in HIV-1 elite controllers. *AIDS* 2012,**26**:2409-2412.

96. Desvarieux M, Boccard F, Meynard JL, Bastard JP, Mallat Z, Charbit B, *et al.* Infection duration and inflammatory imbalance are associated with atherosclerotic risk in HIV-infected never-smokers independent of antiretroviral therapy. *AIDS* 2013;**27**:2603-2614.
97. Boccard F, Cohen A. Immune activation and coronary atherosclerosis in HIV-infected women: where are we now, and where will we go next? *J Infect Dis* 2013;**208**:1729-1731.
98. Boccard F, Lang S, Meuleman C, Ederhy S, Mary-Krause M, Costagliola D, *et al.* HIV and coronary heart disease: time for a better understanding. *J Am Coll Cardiol* 2013;**61**:511-523.
99. Cerrato E, D'Ascenzo F, Biondi-Zoccai G, Calcagno A, Frea S, Grosso Marra W, *et al.* Cardiac dysfunction in pauci symptomatic human immunodeficiency virus patients: a meta-analysis in the highly active antiretroviral therapy era. *Eur Heart J* 2013;**34**:1432-1436.
100. Joska JA, Ghouse H, Paul RH, Stein DJ, Flisher AJ. Does highly active antiretroviral therapy improve neurocognitive function? A systematic review. *J Neurovirol* 2010;**16**:101-114.
101. Hardy DJ, Hinkin CH. Reaction time slowing in adults with HIV: results of a meta-analysis using brinley plots. *Brain Cogn* 2002;**50**:25-34.
102. Redig AJ, Berliner N. Pathogenesis and clinical implications of HIV-related anemia in 2013. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2013;**2013**:377-381.
103. Benjamin M, Terrell DR, Vesely SK, Voskuhl GW, Dezube BJ, Kremer Hovinga JA, *et al.* Frequency and significance of HIV infection among patients diagnosed with thrombotic thrombocytopenic purpura. *Clin Infect Dis* 2009;**48**:1129-1137.
104. Matos MA, Alencar RW, Matos SS. Avascular necrosis of the femoral head in HIV infected patients. *Braz J Infect Dis* 2007;**11**:31-34.
105. Lin D, Rieder MJ. Interventions for the treatment of decreased bone mineral density associated with HIV infection. *Cochrane Database Syst Rev* 2007:CD005645.
106. Sturm LP, Cooter RD, Mutimer KL, Graham JC, Maddern GJ. A systematic review of permanent and semipermanent dermal fillers for HIV-associated facial lipoatrophy. *AIDS Patient Care STDS* 2009;**23**:699-714.
107. McGoldrick C, Leen CL. The management of dyslipidaemias in antiretroviral-treated HIV infection: a systematic review. *HIV Med* 2007;**8**:325-334.
108. Ryan JG. Increased risk for type 2 diabetes mellitus with HIV-1 infection. *Insulin* 2010;**5**:37-45.
109. Berenstein EG, Ortiz Z. Megestrol acetate for the treatment of anorexia-cachexia syndrome. *Cochrane Database Syst Rev* 2005:CD004310.
110. Norman SP, Kommareddi M, Kaul DR. Update on kidney transplantation in HIV-infected recipients. *AIDS Rev* 2012;**14**:195-207.
111. Yahaya I, Uthman AO, Uthman MM. Interventions for HIV-associated nephropathy. *Cochrane Database Syst Rev* 2009:CD007183.
112. Ciesla JA, Roberts JE. Meta-analysis of the relationship between HIV infection and risk for depressive disorders. *Am J Psychiatry* 2001;**158**:725-730.
113. Grunfeld C, Pang M, Doerrler W, Shigenaga JK, Jensen P, Feingold KR. Lipids, lipoproteins, triglyceride clearance, and cytokines in human immunodeficiency virus infection and the acquired immunodeficiency syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 1992;**74**:1045-1052.
114. Riddler SA, Smit E, Cole SR, Li R, Chmiel JS, Dobs A, *et al.* Impact of HIV infection and HAART on serum lipids in men. *JAMA* 2003;**289**:2978-2982.
115. Riddler SA, Li X, Chu H, Kingsley LA, Dobs A, Evans R, *et al.* Longitudinal changes in serum lipids among HIV-infected men on highly active antiretroviral therapy. *HIV Med* 2007;**8**:280-287.
116. Palella FJ, Jr., Phair JP. Cardiovascular disease in HIV infection. *Curr Opin HIV AIDS* 2011;**6**:266-271.

117. Karparkin S, Nardi M, Green D. Platelet and coagulation defects associated with HIV-1-infection. *Thromb Haemost* 2002;**88**:389-401.
118. Bussolino F, Mitola S, Serini G, Barillari G, Ensoli B. Interactions between endothelial cells and HIV-1. *Int J Biochem Cell Biol* 2001;**33**:371-390.
119. de Gaetano Donati K, Rabagliati R, Iacoviello L, Cuda R. HIV infection, HAART, and endothelial adhesion molecules: current perspectives. *Lancet Infect Dis* 2004;**4**:213-222.
120. Baliga RS, Chaves AA, Jing L, Ayers LW, Bauer JA. AIDS-related vasculopathy: evidence for oxidative and inflammatory pathways in murine and human AIDS. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005;**289**:H1373-1380.
121. Solages A, Vita JA, Thornton DJ, Murray J, Heeren T, Craven DE, *et al.* Endothelial function in HIV-infected persons. *Clin Infect Dis* 2006;**42**:1325-1332.
122. Lau B, Sharrett AR, Kingsley LA, Post W, Palella FJ, Visscher B, *et al.* C-reactive protein is a marker for human immunodeficiency virus disease progression. *Arch Intern Med* 2006;**166**:64-70.
123. Hsue PY, Hunt PW, Sinclair E, Bredt B, Franklin A, Killian M, *et al.* Increased carotid intima-media thickness in HIV patients is associated with increased cytomegalovirus-specific T-cell responses. *AIDS* 2006;**20**:2275-2283.
124. Kuller LH, Tracy R, Belloso W, De Wit S, Drummond F, Lane HC, *et al.* Inflammatory and coagulation biomarkers and mortality in patients with HIV infection. *PLoS Med* 2008;**5**:e203.
125. Phillips AN, Carr A, Neuhaus J, Visnegarwala F, Prineas R, Burman WJ, *et al.* Interruption of antiretroviral therapy and risk of cardiovascular disease in persons with HIV-1 infection: exploratory analyses from the SMART trial. *Antivir Ther* 2008;**13**:177-187.
126. Grunfeld C, Wanke C, Currier J, Scherzer R, Biggs M, Sidney S, *et al.* HIV infection Is an Independent Risk Factor for Atherosclerosis Similar in Magnitude to Traditional Cardiovascular Disease Risk Factors. In: *18th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections*. Boston, MA; 2011.
127. Carr A, Cooper DA. Adverse effects of antiretroviral therapy. *Lancet* 2000;**356**:1423-1430.
128. Carr A, Samaras K, Thorisdottir A, Kaufmann GR, Chisholm DJ, Cooper DA. Diagnosis, prediction, and natural course of HIV-1 protease-inhibitor-associated lipodystrophy, hyperlipidaemia, and diabetes mellitus: a cohort study. *Lancet* 1999;**353**:2093-2099.
129. Grinspoon S, Carr A. Cardiovascular risk and body-fat abnormalities in HIV-infected adults. *N Engl J Med* 2005;**352**:48-62.
130. Wang X, Chai H, Yao Q, Chen C. Molecular mechanisms of HIV protease inhibitor-induced endothelial dysfunction. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2007;**44**:493-499.
131. Shankar SS, Dube MP, Gorski JC, Klaunig JE, Steinberg HO. Indinavir impairs endothelial function in healthy HIV-negative men. *Am Heart J* 2005;**150**:933.
132. Stein JH, Klein MA, Bellehumeur JL, McBride PE, Wiebe DA, Otvos JD, *et al.* Use of human immunodeficiency virus-1 protease inhibitors is associated with atherogenic lipoprotein changes and endothelial dysfunction. *Circulation* 2001;**104**:257-262.
133. Friis-Moller N, Weber R, Reiss P, Thiebaut R, Kirk O, d'Arminio Monforte A, *et al.* Cardiovascular disease risk factors in HIV patients--association with antiretroviral therapy. Results from the DAD study. *AIDS* 2003;**17**:1179-1193.
134. Worm SW, Sabin C, Weber R, Reiss P, El-Sadr W, Dabis F, *et al.* Risk of myocardial infarction in patients with HIV infection exposed to specific individual antiretroviral drugs from the 3 major drug classes: the data collection on adverse events of anti-HIV drugs (D:A:D) study. *J Infect Dis* 2010;**201**:318-330.
135. Data Collection on Adverse Events of Anti HIVDSG, Sabin CA, d'Arminio Monforte A, Friis-Moller N, Weber R, El-Sadr WM, *et al.* Changes over time in risk factors for cardiovascular

- disease and use of lipid-lowering drugs in HIV-infected individuals and impact on myocardial infarction. *Clin Infect Dis* 2008,**46**:1101-1110.
136. Group DADS, Sabin CA, Worm SW, Weber R, Reiss P, El-Sadr W, *et al.* Use of nucleoside reverse transcriptase inhibitors and risk of myocardial infarction in HIV-infected patients enrolled in the D:A:D study: a multi-cohort collaboration. *Lancet* 2008,**371**:1417-1426.
137. Strategies for Management of Antiretroviral Therapy Study G, Emery S, Neuhaus JA, Phillips AN, Babiker A, Cohen CJ, *et al.* Major clinical outcomes in antiretroviral therapy (ART)-naïve participants and in those not receiving ART at baseline in the SMART study. *J Infect Dis* 2008,**197**:1133-1144.
138. Bedimo R, Westfall A, Drechsler H, Tebas P. Abacavir use and risk of acute myocardial infarction and cerebrovascular disease in the HAART era. In: *5th IAS Conference on HIV Pathogenesis and Treatment*; Cape Town, South Africa; 2009.
139. Benson C, Ribaudo H, Zheng E, Koletar S, Smurzynski M, Bosch R, *et al.* No Association of Abacavir Use with Risk of Myocardial Infarction or Severe Cardiovascular Disease Events: Results from ACTG A5001. In: *16th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections*. Boston, MA; 2009.
140. Ding XA-CE, Cooper C, Miele P, Kornegay C, Soukup M, Marcus, *et al.* No Association of Myocardial Infarction with ABC Use: An FDA Meta-analysis. In: *18th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections*. Boston, MA; 2009.
141. Durand M, Baril J-G, Leloir J, Tremblay C. Relation between use of nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NRTI) and risk of myocardial infarction (MI): a nested case control study using Quebec's public health insurance database (QPHID). In: *5th IAS Conference on HIV Pathogenesis and Treatment*; Cape Town. Cape Town, South Africa; 2009.
142. Lang S, M-MK, Cotte L, Gilquin J, Partisani M, Simon A, *et al.* A Case-Control Study Nested within FHDH ANRS CO4. In: *16th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections*. Boston, MA; 2009.
143. Palella FJ, Jr., Gange SJ, Benning L, Jacobson L, Kaplan RC, Landay AL, *et al.* Inflammatory biomarkers and abacavir use in the Women's Interagency HIV Study and the Multicenter AIDS Cohort Study. *AIDS* 2010,**24**:1657-1665.
144. Padilla S, Masia M, Garcia N, Jarrin I, Tormo C, Gutierrez F. Early changes in inflammatory and pro-thrombotic biomarkers in patients initiating antiretroviral therapy with abacavir or tenofovir. *BMC Infect Dis* 2011,**11**:40.
145. McComsey GA, Kitch D, Daar ES, Tierney C, Jahed NC, Melbourne K, *et al.* Inflammation markers after randomization to abacavir/lamivudine or tenofovir/emtricitabine with efavirenz or atazanavir/ritonavir. *AIDS* 2012,**26**:1371-1385.
146. Baum PD, Sullam PM, Stoddart CA, McCune JM. Abacavir increases platelet reactivity via competitive inhibition of soluble guanylyl cyclase. *AIDS* 2011,**25**:2243-2248.
147. Sprinz E, Lazzaretti RK, Kuhmmer R, Ribeiro JP. Dyslipidemia in HIV-infected individuals. *Braz J Infect Dis* 2010,**14**:575-588.
148. Tsantila N, Tsoupras AB, Fragopoulou E, Antonopoulou S, Iatrou C, Demopoulos CA. In vitro and in vivo effects of statins on platelet-activating factor and its metabolism. *Angiology* 2011,**62**:209-218.
149. De Wit S, Delforge M, Necsoi CV, Clumeck N. Downregulation of CD38 activation markers by atorvastatin in HIV patients with undetectable viral load. *AIDS* 2011,**25**:1332-1333.
150. Ganesan A, Crum-Cianflone N, Higgins J, Qin J, Rehm C, Metcalf J, *et al.* High dose atorvastatin decreases cellular markers of immune activation without affecting HIV-1 RNA levels: results of a double-blind randomized placebo controlled clinical trial. *J Infect Dis* 2011,**203**:756-764.

151. Aslangul E, Fellahi S, Assoumou LK, Bastard JP, Capeau J, Costagliola D. High-sensitivity C-reactive protein levels fall during statin therapy in HIV-infected patients receiving ritonavir-boosted protease inhibitors. *AIDS* 2011;**25**:1128-1131.
152. Calza L, Trapani F, Bartoletti M, Manfredi R, Colangeli V, Borderi M, *et al.* Statin therapy decreases serum levels of high-sensitivity C-reactive protein and tumor necrosis factor-alpha in HIV-infected patients treated with ritonavir-boosted protease inhibitors. *HIV Clin Trials* 2012;**13**:153-161.
153. Fichtenbaum CJ, Yeh TM, Evans SR, Aberg JA. Treatment with pravastatin and fenofibrate improves atherogenic lipid profiles but not inflammatory markers in ACTG 5087. *J Clin Lipidol* 2010;**4**:279-287.
154. Fehr T, Kahlert C, Fierz W, Joller-Jemelka HI, Riesen WF, Rickli H, *et al.* Statin-induced immunomodulatory effects on human T cells in vivo. *Atherosclerosis* 2004;**175**:83-90.
155. Adih WK, Selik RM, Hu X. Trends in Diseases Reported on US Death Certificates That Mentioned HIV Infection, 1996-2006. *J Int Assoc Physicians AIDS Care (Chic)* 2011;**10**:5-11.
156. Longenecker CT, Scherzer R, Bacchetti P, Lewis CE, Grunfeld C, Shlipak MG. HIV viremia and changes in kidney function. *AIDS* 2009;**23**:1089-1096.
157. Jacobson DL. Proteinuria among HIV-Infected HAART recipients in the multicenter AIDS cohort study (MACS). In: *4th Conference on HIV Pathogenesis and Treatment and Prevention*. Sydney;; 2007.
158. Calza L, Vanino E, Magistrelli E, Salvadori C, Cascavilla A, Colangeli V, *et al.* Prevalence of renal disease within an urban HIV-infected cohort in northern Italy. *Clin Exp Nephrol* 2014;**18**:104-112.
159. Szczech LA, Gange SJ, van der Horst C, Bartlett JA, Young M, Cohen MH, *et al.* Predictors of proteinuria and renal failure among women with HIV infection. *Kidney Int* 2002;**61**:195-202.
160. Gupta SK, Mamlin BW, Johnson CS, Dollins MD, Topf JM, Dube MP. Prevalence of proteinuria and the development of chronic kidney disease in HIV-infected patients. *Clin Nephrol* 2004;**61**:1-6.
161. Gardner LI, Holmberg SD, Williamson JM, Szczech LA, Carpenter CC, Rompalo AM, *et al.* Development of proteinuria or elevated serum creatinine and mortality in HIV-infected women. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2003;**32**:203-209.
162. Szczech LA, Hoover DR, Feldman JG, Cohen MH, Gange SJ, Gooze L, *et al.* Association between renal disease and outcomes among HIV-infected women receiving or not receiving antiretroviral therapy. *Clin Infect Dis* 2004;**39**:1199-1206.
163. Eitner F, Cui Y, Hudkins KL, Stokes MB, Segerer S, Mack M, *et al.* Chemokine receptor CCR5 and CXCR4 expression in HIV-associated kidney disease. *J Am Soc Nephrol* 2000;**11**:856-867.
164. Marras D, Bruggeman LA, Gao F, Tanji N, Mansukhani MM, Cara A, *et al.* Replication and compartmentalization of HIV-1 in kidney epithelium of patients with HIV-associated nephropathy. *Nat Med* 2002;**8**:522-526.
165. Medapalli RK, He JC, Klotman PE. HIV-associated nephropathy: pathogenesis. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2011;**20**:306-311.
166. Strategies for Management of Antiretroviral Therapy Study G, El-Sadr WM, Lundgren J, Neaton JD, Gordin F, Abrams D, *et al.* CD4+ count-guided interruption of antiretroviral treatment. *N Engl J Med* 2006;**355**:2283-2296.
167. Atta MG, Gallant JE, Rahman MH, Nagajothi N, Racusen LC, Scheel PJ, *et al.* Antiretroviral therapy in the treatment of HIV-associated nephropathy. *Nephrol Dial Transplant* 2006;**21**:2809-2813.
168. Cooper RD, Tonelli M. Renal disease associated with antiretroviral therapy in the treatment of HIV. *Nephron Clin Pract* 2011;**118**:c262-268.

169. Crane HM, Kestenbaum B, Harrington RD, Kitahata MM. Amprenavir and didanosine are associated with declining kidney function among patients receiving tenofovir. *AIDS* 2007;**21**:1431-1439.
170. Gallant JE, Parish MA, Keruly JC, Moore RD. Changes in renal function associated with tenofovir disoproxil fumarate treatment, compared with nucleoside reverse-transcriptase inhibitor treatment. *Clin Infect Dis* 2005;**40**:1194-1198.
171. Patel KK, Patel AK, Ranjan RR, Patel AR, Patel JK. Tenofovir-associated renal dysfunction in clinical practice: An observational cohort from western India. *Indian J Sex Transm Dis* 2010;**31**:30-34.
172. Calza L, Trapani F, Salvadori C, Magistrelli E, Manfredi R, Colangeli V, *et al.* Incidence of renal toxicity in HIV-infected, antiretroviral-naïve patients starting tenofovir/emtricitabine associated with efavirenz, atazanavir/ritonavir, or lopinavir/ritonavir. *Scand J Infect Dis* 2013;**45**:147-154.
173. Seaberg EC, Wiley D, Martinez-Maza O, Chmiel JS, Kingsley L, Tang Y, *et al.* Cancer incidence in the multicenter AIDS Cohort Study before and during the HAART era: 1984 to 2007. *Cancer* 2010;**116**:5507-5516.
174. Silverberg MJ, Chao C, Leyden WA, Xu L, Horberg MA, Klein D, *et al.* HIV infection, immunodeficiency, viral replication, and the risk of cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2011;**20**:2551-2559.
175. Simard EP, Pfeiffer RM, Engels EA. Spectrum of cancer risk late after AIDS onset in the United States. *Arch Intern Med* 2010;**170**:1337-1345.
176. Sigel K, Wisnivesky J, Gordon K, Dubrow R, Justice A, Brown ST, *et al.* HIV as an independent risk factor for incident lung cancer. *AIDS* 2012;**26**:1017-1025.
177. Shiels MS, Pfeiffer RM, Gail MH, Hall HI, Li J, Chaturvedi AK, *et al.* Cancer burden in the HIV-infected population in the United States. *J Natl Cancer Inst* 2011;**103**:753-762.
178. Howlader N, Noone AM, Krapcho M, Neyman N, Aminou R, Waldron W. SEER Cancer Statistics Review, 1975-2009 (Vintage 2009 Populations). In. Edited by Altekruse SF, Kosary CL, Ruhl J, *et al.*: National Cancer Institute, Bethesda, MD; 2012.
179. De Vuyst H, Lillo F, Broutet N, Smith JS. HIV, human papillomavirus, and cervical neoplasia and cancer in the era of highly active antiretroviral therapy. *Eur J Cancer Prev* 2008;**17**:545-554.
180. Alter MJ. Epidemiology of viral hepatitis and HIV co-infection. *J Hepatol* 2006;**44**:S6-9.
181. O'Brien TR, Kedes D, Ganem D, Macrae DR, Rosenberg PS, Molden J, *et al.* Evidence for concurrent epidemics of human herpesvirus 8 and human immunodeficiency virus type 1 in US homosexual men: rates, risk factors, and relationship to Kaposi's sarcoma. *J Infect Dis* 1999;**180**:1010-1017.
182. Rahmanian S, Wewers ME, Koletar S, Reynolds N, Ferketich A, Diaz P. Cigarette smoking in the HIV-infected population. *Proc Am Thorac Soc* 2011;**8**:313-319.
183. Braithwaite RS, Conigliaro J, Roberts MS, Shechter S, Schaefer A, McGinnis K, *et al.* Estimating the impact of alcohol consumption on survival for HIV+ individuals. *AIDS Care* 2007;**19**:459-466.
184. Vesely MD, Kershaw MH, Schreiber RD, Smyth MJ. Natural innate and adaptive immunity to cancer. *Annu Rev Immunol* 2011;**29**:235-271.
185. Schottenfeld D, Beebe-Dimmer J. Chronic inflammation: a common and important factor in the pathogenesis of neoplasia. *CA Cancer J Clin* 2006;**56**:69-83.
186. Grivennikov SI, Greten FR, Karin M. Immunity, inflammation, and cancer. *Cell* 2010;**140**:883-899.

187. Monini P, Toschi E, Sgadari C, Bacigalupo I, Palladino C, Carlei D, *et al.* The use of HAART for biological tumour therapy. *J HIV Ther* 2006,**11**:53-56.
188. Monini P, Sgadari C, Toschi E, Barillari G, Ensoli B. Antitumour effects of antiretroviral therapy. *Nat Rev Cancer* 2004,**4**:861-875.
189. Ji HJ, Rha SY, Jeung HC, Yang SH, An SW, Chung HC. Cyclic induction of senescence with intermittent AZT treatment accelerates both apoptosis and telomere loss. *Breast Cancer Res Treat* 2005,**93**:227-236.
190. Landriscina M, Spadafora C, Cignarelli M, Barone C. Anti-tumor activity of non-nucleosidic reverse transcriptase inhibitors. *Curr Pharm Des* 2007,**13**:737-747.
191. cancer Whoiafro. *Some Antiviral and Antineoplastic Drugs, and Other Pharmaceutical Agents*. Lyon France: IARC 2000.
192. Olivero OA, Tejera AM, Fernandez JJ, Taylor BJ, Das S, Divi RL, *et al.* Zidovudine induces S-phase arrest and cell cycle gene expression changes in human cells. *Mutagenesis* 2005,**20**:139-146.
193. Gulick RM, Su Z, Flexner C, Hughes MD, Skolnik PR, Wilkin TJ, *et al.* Phase 2 study of the safety and efficacy of vicriviroc, a CCR5 inhibitor, in HIV-1-Infected, treatment-experienced patients: AIDS clinical trials group 5211. *J Infect Dis* 2007,**196**:304-312.
194. Krishnan S, Schouten JT, Jacobson DL, Benson CA, Collier AC, Koletar SL, *et al.* Incidence of non-AIDS-defining cancer in antiretroviral treatment-naïve subjects after antiretroviral treatment initiation: an ACTG longitudinal linked randomized trials analysis. *Oncology* 2011,**80**:42-49.
195. Crum-Cianflone NF, Hullsiek KH, Marconi V, Weintrob A, Ganesan A, Barthel RV, *et al.* The impact of nelfinavir exposure on cancer development among a large cohort of HIV-infected patients. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2009,**51**:305-309.
196. Demopoulos CA, Pinckard RN, Hanahan DJ. Platelet-activating factor. Evidence for 1-O-alkyl-2-acetyl-sn-glycerol-3-phosphorylcholine as the active component (a new class of lipid chemical mediators). *J Biol Chem* 1979,**254**:9355-9358.
197. Zimmerman GA, Elstad MR, Lorant DE, McIntyre TM, Prescott SM, Topham MK, *et al.* Platelet-activating factor (PAF): signalling and adhesion in cell-cell interactions. *Adv Exp Med Biol* 1996,**416**:297-304.
198. Zimmerman GA, McIntyre TM, Prescott SM, Stafforini DM. The platelet-activating factor signaling system and its regulators in syndromes of inflammation and thrombosis. *Crit Care Med* 2002,**30**:S294-S301.
199. Benveniste J, Henson PM, Cochrane CG. Leukocyte-dependent histamine release from rabbit platelets. The role of IgE, basophils, and a platelet-activating factor. *J Exp Med* 1972,**136**:1356-1377.
200. Cusack NJ. Platelet-activating factor. *Nature* 1980,**285**:193.
201. Hanahan DJ, Demopoulos CA, Liehr J, Pinckard RN. Identification of platelet activating factor isolated from rabbit basophils as acetyl glyceryl ether phosphorylcholine. *J Biol Chem* 1980,**255**:5514-5516.
202. Pinckard RN, Farr RS, Hanahan DJ. Physicochemical and functional identity of rabbit platelet-activating factor (PAF) released in vivo during IgE anaphylaxis with PAF released in vitro from IgE sensitized basophils. *J Immunol* 1979,**123**:1847-1857.
203. Kulikov VI, Muzya GI. Ether lipids and platelet-activating factor: evolution and cellular function. *Biochemistry (Mosc)* 1997,**62**:1103-1108.
204. Antonopoulou S, Demopoulos CA, Argyropoulos D, Baltas G, Kotsifaki H, Diamanti-Kipioti A. Identification of a new endogenous platelet-activating factor-like molecule in gingival crevicular fluid. *Biochem J* 1998,**330 (Pt 2)**:791-794.

205. Hanahan DJ. Platelet activating factor: a biologically active phosphoglyceride. *Annu Rev Biochem* 1986,**55**:483-509.
206. Kulikov VI, Muzia GI. [Acyl and plasmalogen analogs of platelet activating factor--new lipid cellular bioregulators]. *Biokhimiia* 1992,**57**:803-816.
207. McManus LM, Woodard DS, Deavers SI, Pinckard RN. PAF molecular heterogeneity: pathobiological implications. *Lab Invest* 1993,**69**:639-650.
208. Pinckard RN, Woodard DS, Showell HJ, Conklyn MJ, Novak MJ, McManus LM. Structural and (patho)physiological diversity of PAF. *Clin Rev Allergy* 1994,**12**:329-359.
209. Tokumura A. A family of phospholipid autacoids: occurrence, metabolism and bioactions. *Prog Lipid Res* 1995,**34**:151-184.
210. Demopoulos CA, Antonopoulou S. A discovery trip to compounds with PAF-like activity. *Adv Exp Med Biol* 1996,**416**:59-63.
211. Venable ME, Zimmerman GA, McIntyre TM, Prescott SM. Platelet-activating factor: a phospholipid autacoid with diverse actions. *J Lipid Res* 1993,**34**:691-702.
212. Elstad MR, Prescott SM, McIntyre TM, Zimmerman GA. Synthesis and release of platelet-activating factor by stimulated human mononuclear phagocytes. *J Immunol* 1988,**140**:1618-1624.
213. Balestrieri ML, Castaldo D, Balestrieri C, Quagliuolo L, Giovane A, Servillo L. Modulation by flavonoids of PAF and related phospholipids in endothelial cells during oxidative stress. *J Lipid Res* 2003,**44**:380-387.
214. Prescott SM, Zimmerman GA, Stafforini DM, McIntyre TM. Platelet-activating factor and related lipid mediators. *Annu Rev Biochem* 2000,**69**:419-445.
215. Honda Z, Ishii S, Shimizu T. Platelet-activating factor receptor. *J Biochem* 2002,**131**:773-779.
216. Honda Z, Nakamura M, Miki I, Minami M, Watanabe T, Seyama Y, *et al*. Cloning by functional expression of platelet-activating factor receptor from guinea-pig lung. *Nature* 1991,**349**:342-346.
217. Honda Z, Nakamura M, Seyama Y, Shimizu T. Properties of the guinea-pig lung platelet-activating factor receptor encoded by the cloned cDNA. *J Lipid Mediat* 1992,**5**:105-107.
218. Ishii S, Nagase T, Shimizu T. Platelet-activating factor receptor. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 2002,**68-69**:599-609.
219. Wykle RL, Miller CH, Lewis JC, Schmitt JD, Smith JA, Surles JR, *et al*. Stereospecific activity of 1-O-alkyl-2-O-acetyl-sn-glycero-3-phosphocholine and comparison of analogs in the degranulation of platelets and neutrophils. *Biochem Biophys Res Commun* 1981,**100**:1651-1658.
220. Guinot P. Clinical experience with platelet-activating factor antagonists. Past, present, and near future. *Clin Rev Allergy* 1994,**12**:397-417.
221. Koltai M, Braquet PG. Platelet-activating factor antagonists. *Clin Rev Allergy* 1994,**12**:361-380.
222. Koltai M, Guinot P, Hosford D, Braquet PG. Platelet-activating factor antagonists: scientific background and possible clinical applications. *Adv Pharmacol* 1994,**28**:81-167.
223. Saunders RN, Handley DA. Platelet-activating factor antagonists. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1987,**27**:237-255.
224. Summers JB, Albert DH. Platelet activating factor antagonists. *Adv Pharmacol* 1995,**32**:67-168.
225. Castro-Faria-Neto HC, Araujo CV, Moreira S, Bozza PT, Thomas G, Barbosa-Filho JM, *et al*. Yangambin: a new naturally-occurring platelet-activating factor receptor antagonist: in vivo pharmacological studies. *Planta Med* 1995,**61**:106-112.

226. Castro-Faria-Neto HC, Bozza PT, Cruz HN, Silva CL, Violante FA, Barbosa-Filho JM, *et al.* Yangambin: a new naturally-occurring platelet-activating factor receptor antagonist: binding and in vitro functional studies. *Planta Med* 1995,**61**:101-105.
227. Shen TY, Hwang SB, Chang MN, Doeber TW, Lam MH, Wu MS, *et al.* Characterization of a platelet-activating factor receptor antagonist isolated from haifenteng (Piper futokadsura): specific inhibition of in vitro and in vivo platelet-activating factor-induced effects. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1985,**82**:672-676.
228. Snyder F. Platelet-activating factor: the biosynthetic and catabolic enzymes. *Biochem J* 1995,**305 (Pt 3)**:689-705.
229. Snyder F. Platelet-activating factor and its analogs: metabolic pathways and related intracellular processes. *Biochim Biophys Acta* 1995,**1254**:231-249.
230. Antonopoulou S, Fragopoulou E, Karantonis HC, Mitsou E, Sitara M, Rementzis J, *et al.* Effect of traditional Greek Mediterranean meals on platelet aggregation in normal subjects and in patients with type 2 diabetes mellitus. *J Med Food* 2006,**9**:356-362.
231. Karantonis HC, Antonopoulou S, Demopoulos CA. Antithrombotic lipid minor constituents from vegetable oils. Comparison between olive oils and others. *J Agric Food Chem* 2002,**50**:1150-1160.
232. Karantonis HC, Antonopoulou S, Perrea DN, Sokolis DP, Theocharis SE, Kavantzis N, *et al.* In vivo antiatherogenic properties of olive oil and its constituent lipid classes in hyperlipidemic rabbits. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2006,**16**:174-185.
233. Tsantila N, Karantonis HC, Perrea DN, Theocharis SE, Iliopoulos DG, Antonopoulou S, *et al.* Antithrombotic and antiatherosclerotic properties of olive oil and olive pomace polar extracts in rabbits. *Mediators Inflamm* 2007,**2007**:36204.
234. Tsantila N, Karantonis HC, Perrea DN, Theocharis SE, Iliopoulos DG, Iatrou C, *et al.* Atherosclerosis regression study in rabbits upon olive pomace polar lipid extract administration. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2010,**20**:740-747.
235. Fragopoulou E, Antonopoulou S, Demopoulos CA. Biologically active lipids with antiatherogenic properties from white wine and must. *J Agric Food Chem* 2002,**50**:2684-2694.
236. Fragopoulou E, Antonopoulou S, Nomikos T, Demopoulos CA. Structure elucidation of phenolic compounds from red/white wine with antiatherogenic properties. *Biochim Biophys Acta* 2003,**1632**:90-99.
237. Fragopoulou E, Nomikos T, Antonopoulou S, Mitsopoulou CA, Demopoulos CA. Separation of biologically active lipids from red wine. *J Agric Food Chem* 2000,**48**:1234-1238.
238. Fragopoulou E, Nomikos T, Tsantila N, Mitropoulou A, Zabetakis I, Demopoulos CA. Biological activity of total lipids from red and white wine/must. *J Agric Food Chem* 2001,**49**:5186-5193.
239. Antonopoulou S, Semidalas CE, Koussissis S, Demopoulos CA. Platelet-Activating Factor (PAF) antagonists in foods: A study of lipids with PAF or Anti-PAF-like activity in Cow's milk and yogurt. *J. Agric. Food Chem* 1996,**44**:3047-3051.
240. Nasopoulou C, Gogaki V, Stamatakis G, Papaharisis L, Demopoulos CA, Zabetakis I. Evaluation of the in vitro anti-atherogenic properties of lipid fractions of olive pomace, olive pomace enriched fish feed and gilthead sea bream (*Sparus aurata*) fed with olive pomace enriched fish feed. *Mar Drugs* 2013,**11**:3676-3688.
241. Nasopoulou C, Tsoupras AB, Karantonis HC, Demopoulos CA, Zabetakis I. Fish polar lipids retard atherosclerosis in rabbits by down-regulating PAF biosynthesis and up-regulating PAF catabolism. *Lipids Health Dis* 2011,**10**:213.

242. Keam SJ, Plosker GL. Rupatadine: a review of its use in the management of allergic disorders. *Drugs* 2007,**67**:457-474.
243. Woodard DS, Ostrom KK, McManus LM. Lipid inhibitors of platelet-activating factor (PAF) in normal human plasma. *J Lipid Mediat Cell Signal* 1995,**12**:11-28.
244. Antonopoulou S, Nomikos T, Karantonis HC, Fragopoulou E, Demopoulos CA. PAF, a potent lipid mediator. In: *Bioactive Phospholipids. Role in inflammation and Atherosclerosis*. Edited by Tselepis AD. 1st ed. Kerala, India: Transworld Research Network; 2008. pp. 85-134.
245. Lee TC, Snyder F. 1-alkyl-2-acetyl-sn-glycerol cholinephosphotransferase. *Methods Enzymol* 1992,**209**:279-283.
246. Lee TC, Vallari DS, Snyder F. 1-alkyl-2-lyso-sn-glycero-3-phosphocholine acetyltransferase. *Methods Enzymol* 1992,**209**:396-401.
247. Snyder F. CDP-choline:alkylacetyl-glycerol cholinephosphotransferase catalyzes the final step in the de novo synthesis of platelet-activating factor. *Bba-Lipid Lipid Met* 1997,**1348**:111-116.
248. Yamashita A, Sugiura T, Waku K. Acyltransferases and transacylases involved in fatty acid remodeling of phospholipids and metabolism of bioactive lipids in mammalian cells. *J Biochem* 1997,**122**:1-16.
249. Shindou H, Hishikawa D, Nakanishi H, Harayama T, Ishii S, Taguchi R, *et al*. A single enzyme catalyzes both platelet-activating factor production and membrane biogenesis of inflammatory cells. Cloning and characterization of acetyl-CoA:LYSO-PAF acetyltransferase. *J Biol Chem* 2007,**282**:6532-6539.
250. Derewenda ZS, Derewenda U. The structure and function of platelet-activating factor acetylhydrolases. *Cell Mol Life Sci* 1998,**54**:446-455.
251. Derewenda ZS, Ho YS. PAF-acetylhydrolases. *Biochim Biophys Acta* 1999,**1441**:229-236.
252. Stafforini DM, McIntyre TM, Prescott SM. Platelet-activating factor acetylhydrolase from human plasma. *Methods Enzymol* 1990,**187**:344-357.
253. Stafforini DM, Prescott SM, McIntyre TM. Human plasma platelet-activating factor acetylhydrolase. Purification and properties. *J Biol Chem* 1987,**262**:4223-4230.
254. Stafforini DM, Prescott SM, McIntyre TM. Platelet-activating factor acetylhydrolase in human erythrocytes. *Methods Enzymol* 1991,**197**:411-425.
255. Stafforini DM, Prescott SM, Zimmerman GA, McIntyre TM. Platelet-activating factor acetylhydrolase activity in human tissues and blood cells. *Lipids* 1991,**26**:979-985.
256. Stafforini DM, Tjoelker LW. Human plasma platelet-activating factor acetylhydrolase. *Methods Mol Biol* 1999,**109**:49-58.
257. Tsoukatos DC, Liapikos TA, Tselepis AD, Chapman MJ, Ninio E. Platelet-activating factor acetylhydrolase and transacetylase activities in human plasma low-density lipoprotein. *Biochem J* 2001,**357**:457-464.
258. Squinto SP, Braquet P, Block AL, Bazan NG. Platelet-activating factor activates HIV promoter in transfected SH-SY5Y neuroblastoma cells and MOLT-4 T lymphocytes. *J Mol Neurosci* 1990,**2**:79-84.
259. Del Sorbo L, DeMartino A, Biancone L, Bussolati B, Conaldi PG, Toniolo A, *et al*. The synthesis of platelet-activating factor modulates chemotaxis of monocytes induced by HIV-1 Tat. *Eur J Immunol* 1999,**29**:1513-1521.
260. Maggirwar SB, Tong N, Ramirez S, Gelbard HA, Dewhurst S. HIV-1 Tat-mediated activation of glycogen synthase kinase-3 β contributes to Tat-mediated neurotoxicity. *J Neurochem* 1999,**73**:578-586.

261. Biancone L, Cantaluppi V, Boccellino M, Bussolati B, Del Sorbo L, Conaldi PG, *et al.* Motility induced by human immunodeficiency virus-1 Tat on Kaposi's sarcoma cells requires platelet-activating factor synthesis. *Am J Pathol* 1999,**155**:1731-1739.
262. Del Sorbo L, Arese M, Giraudo E, Tizzani M, Biancone L, Bussolino F, *et al.* Tat-induced platelet-activating factor synthesis contributes to the angiogenic effect of HIV-1 Tat. *Eur J Immunol* 2001,**31**:376-383.
263. Perry SW, Norman JP, Litzburg A, Zhang D, Dewhurst S, Gelbard HA. HIV-1 transactivator of transcription protein induces mitochondrial hyperpolarization and synaptic stress leading to apoptosis. *J Immunol* 2005,**174**:4333-4344.
264. Wang J, Zhang W, Nardi MA, Li Z. HIV-1 Tat-induced platelet activation and release of CD154 contribute to HIV-1-associated autoimmune thrombocytopenia. *J Thromb Haemost* 2011,**9**:562-573.
265. Arese M, Ferrandi C, Primo L, Camussi G, Bussolino F. HIV-1 Tat protein stimulates in vivo vascular permeability and lymphomononuclear cell recruitment. *J Immunol* 2001,**166**:1380-1388.
266. Mitola S, Sozzani S, Luini W, Primo L, Borsatti A, Weich H, *et al.* Tat-human immunodeficiency virus-1 induces human monocyte chemotaxis by activation of vascular endothelial growth factor receptor-1. *Blood* 1997,**90**:1365-1372.
267. Ensoli B, Barillari G, Salahuddin SZ, Gallo RC, Wong-Staal F. Tat protein of HIV-1 stimulates growth of cells derived from Kaposi's sarcoma lesions of AIDS patients. *Nature* 1990,**345**:84-86.
268. Gelbard HA, Nottet HS, Swindells S, Jett M, Dzenko KA, Genis P, *et al.* Platelet-activating factor: a candidate human immunodeficiency virus type 1-induced neurotoxin. *J Virol* 1994,**68**:4628-4635.
269. Genis P, Jett M, Bernton EW, Boyle T, Gelbard HA, Dzenko K, *et al.* Cytokines and arachidonic metabolites produced during human immunodeficiency virus (HIV)-infected macrophage-astroglia interactions: implications for the neuropathogenesis of HIV disease. *J Exp Med* 1992,**176**:1703-1718.
270. MacLennan KM, Smith PF, Darlington CL. Platelet-activating factor in the CNS. *Prog Neurobiol* 1996,**50**:585-596.
271. Epstein LG, Gelbard HA. HIV-1-induced neuronal injury in the developing brain. *J Leukoc Biol* 1999,**65**:453-457.
272. Bellizzi MJ, Lu SM, Masliah E, Gelbard HA. Synaptic activity becomes excitotoxic in neurons exposed to elevated levels of platelet-activating factor. *J Clin Invest* 2005,**115**:3185-3192.
273. Anderson E, Zink W, Xiong H, Gendelman HE. HIV-1-associated dementia: a metabolic encephalopathy perpetrated by virus-infected and immune-competent mononuclear phagocytes. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2002,**31 Suppl 2**:S43-54.
274. Smith DG, Guillemin GJ, Pemberton L, Kerr S, Nath A, Smythe GA, *et al.* Quinolinic acid is produced by macrophages stimulated by platelet activating factor, Nef and Tat. *J Neurovirol* 2001,**7**:56-60.
275. Xiong H, Zeng YC, Lewis T, Zheng J, Persidsky Y, Gendelman HE. HIV-1 infected mononuclear phagocyte secretory products affect neuronal physiology leading to cellular demise: relevance for HIV-1-associated dementia. *J Neurovirol* 2000,**6 Suppl 1**:S14-23.
276. Tong N, Perry SW, Zhang Q, James HJ, Guo H, Brooks A, *et al.* Neuronal fractalkine expression in HIV-1 encephalitis: roles for macrophage recruitment and neuroprotection in the central nervous system. *J Immunol* 2000,**164**:1333-1339.

277. Perry SW, Hamilton JA, Tjoelker LW, Dbaiho G, Dzenko KA, Epstein LG, *et al.* Platelet-activating factor receptor activation. An initiator step in HIV-1 neuropathogenesis. *J Biol Chem* 1998;**273**:17660-17664.
278. Schifitto G, Sacktor N, Marder K, McDermott MP, McArthur JC, Kieburtz K, *et al.* Randomized trial of the platelet-activating factor antagonist lexipafant in HIV-associated cognitive impairment. Neurological AIDS Research Consortium. *Neurology* 1999;**53**:391-396.
279. Davidson DC, Hirschman MP, Spinelli SL, Morrell CN, Schifitto G, Phipps RP, *et al.* Antiplatelet activity of valproic acid contributes to decreased soluble CD40 ligand production in HIV type 1-infected individuals. *J Immunol* 2011;**186**:584-591.
280. Eggert D, Dash PK, Serradji N, Dong CZ, Clayette P, Heymans F, *et al.* Development of a platelet-activating factor antagonist for HIV-1 associated neurocognitive disorders. *J Neuroimmunol* 2009;**213**:47-59.
281. Martin M, Serradji N, Dereuddre-Bosquet N, Bensaid O, Fichet G, Lamouri A, *et al.* [Antiretroviral and anti-inflammatory properties of a novel platelet activation factor antagonist, PMS-601]. *Pathol Biol (Paris)* 2000;**48**:513-519.
282. Martin M, Serradji N, Dereuddre-Bosquet N, Le Pavec G, Fichet G, Lamouri A, *et al.* PMS-601, a new platelet-activating factor receptor antagonist that inhibits human immunodeficiency virus replication and potentiates zidovudine activity in macrophages. *Antimicrob Agents Chemother* 2000;**44**:3150-3154.
283. Serradji N, Bensaid O, Martin M, Kan E, Dereuddre-Bosquet N, Redeuilh C, *et al.* Structure-activity relationships in platelet-activating factor (PAF). 10. From PAF antagonism to inhibition of HIV-1 replication. *J Med Chem* 2000;**43**:2149-2154.
284. Weissman D, Poli G, Bousseau A, Fauci AS. A platelet-activating factor antagonist, RP 55778, inhibits cytokine-dependent induction of human immunodeficiency virus expression in chronically infected promonocytic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993;**90**:2537-2541.
285. Sallem W, Serradji N, Dereuddre-Bosquet N, Dive G, Clayette P, Heymans F. Structure-activity relationships in platelet-activating factor. Part 14: synthesis and biological evaluation of piperazine derivatives with dual anti-PAF and anti-HIV-1 activity. *Bioorg Med Chem* 2006;**14**:7999-8013.
286. Serradji N, Bensaid O, Martin M, Sallem W, Dereuddre-Bosquet N, Benmehdi H, *et al.* Structure-activity relationships in platelet-activating factor. Part 13: synthesis and biological evaluation of piperazine derivatives with dual anti-PAF and anti-HIV-1 or pure antiretroviral activity. *Bioorg Med Chem* 2006;**14**:8109-8125.
287. Serradji N, Martin M, Bensaid O, Cisternino S, Rousselle C, Dereuddre-Bosquet N, *et al.* Structure-activity relationships in platelet-activating factor. 12. Synthesis and biological evaluation of platelet-activating factor antagonists with anti-HIV-1 activity. *J Med Chem* 2004;**47**:6410-6419.
288. Persidsky Y, Limoges J, Rasmussen J, Zheng J, Gearing A, Gendelman HE. Reduction in glial immunity and neuropathology by a PAF antagonist and an MMP and TNFalpha inhibitor in SCID mice with HIV-1 encephalitis. *J Neuroimmunol* 2001;**114**:57-68.
289. Persidsky Y, Gendelman HE. Murine models for human immunodeficiency virus type 1-associated dementia: the development of new treatment testing paradigms. *J Neurovirol* 2002;**8 Suppl 2**:49-52.
290. Gibellini D, Zauli G, Re MC, Milani D, Furlini G, Caramelli E, *et al.* Recombinant human immunodeficiency virus type-1 (HIV-1) Tat protein sequentially up-regulates IL-6 and TGF-beta 1 mRNA expression and protein synthesis in peripheral blood monocytes. *Br J Haematol* 1994;**88**:261-267.

291. Scala G, Ruocco MR, Ambrosino C, Mallardo M, Giordano V, Baldassarre F, *et al.* The expression of the interleukin 6 gene is induced by the human immunodeficiency virus 1 TAT protein. *J Exp Med* 1994,**179**:961-971.
292. Buonaguro L, Buonaguro FM, Giraldo G, Ensoli B. The human immunodeficiency virus type 1 Tat protein transactivates tumor necrosis factor beta gene expression through a TAR-like structure. *J Virol* 1994,**68**:2677-2682.
293. Westendorp MO, Shatrov VA, Schulze-Osthoff K, Frank R, Kraft M, Los M, *et al.* HIV-1 Tat potentiates TNF-induced NF-kappa B activation and cytotoxicity by altering the cellular redox state. *EMBO J* 1995,**14**:546-554.
294. Dhawan S, Weeks BS, Soderland C, Schnaper HW, Toro LA, Asthana SP, *et al.* HIV-1 infection alters monocyte interactions with human microvascular endothelial cells. *J Immunol* 1995,**154**:422-432.
295. Le Naour R, Raoul H, Mabondzo A, Ripoll L, Bartholeyns J, Romet-Lemonne JL, *et al.* Functional consequences of monocyte/macrophage infection by HIV1. *Res Immunol* 1992,**143**:49-56.
296. Epstein LG. HIV neuropathogenesis and therapeutic strategies. *Acta Paediatr Jpn* 1998,**40**:107-111.
297. Bernatchez PN, Allen BG, Gelinas DS, Guillemette G, Sirois MG. Regulation of VEGF-induced endothelial cell PAF synthesis: role of p42/44 MAPK, p38 MAPK and PI3K pathways. *Br J Pharmacol* 2001,**134**:1253-1262.
298. Bernatchez PN, Soker S, Sirois MG. Vascular endothelial growth factor effect on endothelial cell proliferation, migration, and platelet-activating factor synthesis is Flk-1-dependent. *J Biol Chem* 1999,**274**:31047-31054.
299. Gelinas DS, Bernatchez PN, Rollin S, Bazan NG, Sirois MG. Immediate and delayed VEGF-mediated NO synthesis in endothelial cells: role of PI3K, PKC and PLC pathways. *Br J Pharmacol* 2002,**137**:1021-1030.
300. Montrucchio G, Lupia E, Battaglia E, Del Sorbo L, Boccellino M, Biancone L, *et al.* Platelet-activating factor enhances vascular endothelial growth factor-induced endothelial cell motility and neoangiogenesis in a murine matrigel model. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000,**20**:80-88.
301. Sirois MG, Edelman ER. VEGF effect on vascular permeability is mediated by synthesis of platelet-activating factor. *Am J Physiol* 1997,**272**:H2746-2756.
302. Munford RS, Pugin J. The crucial role of systemic responses in the innate (non-adaptive) host defense. *J Endotoxin Res* 2001,**7**:327-332.
303. Bochkov VN, Kadl A, Huber J, Gruber F, Binder BR, Leitinger N. Protective role of phospholipid oxidation products in endotoxin-induced tissue damage. *Nature* 2002,**419**:77-81.
304. Leitinger N. Oxidized phospholipids as modulators of inflammation in atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol* 2003,**14**:421-430.
305. Abbas KA, Lichtman HA. Cytokines. In: *Cellular and Molecular Immunology*; 2003. pp. 243-248.
306. Alexander WS, Hilton DJ. The role of suppressors of cytokine signaling in regulation of the immune response. In: *Annual review of Immunology*; 2004. pp. 503-529.
307. Cavaillon JM. Pro- versus anti-inflammatory cytokines: myth or reality. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 2001,**47**:695-702.
308. Berger A. Th1 and Th2 responses: what are they? *BMJ* 2000,**321**:424.
309. Cannon JG. Inflammatory Cytokines in Nonpathological States. *News Physiol Sci* 2000,**15**:298-303.

310. Ψαρρά Α. Κυτταροκίνες. In: *ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΑΚΑ ΧΡΟΝΙΚΑ*; 2008.
311. McInnes IB. Cytokines. In: *Kelley's textbook of rheumatology*. Edited by Firestein GS. 8th ed; 2009. pp. 367-378.
312. Alfano M, Poli G. Role of cytokines and chemokines in the regulation of innate immunity and HIV infection. *Mol Immunol* 2005;**42**:161-182.
313. Fernandez-Ortega C, Dubed M, Ramos Y, Navea L, Alvarez G, Lobaina L, *et al*. Non-induced leukocyte extract reduces HIV replication and TNF secretion. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;**325**:1075-1081.
314. Leghmari K, Bennasser Y, Bahraoui E. HIV-1 Tat protein induces IL-10 production in monocytes by classical and alternative NF-kappaB pathways. *Eur J Cell Biol* 2008;**87**:947-962.
315. Leghmari K, Bennasser Y, Tkaczuk J, Bahraoui E. HIV-1 Tat protein induces IL-10 production by an alternative TNF-alpha-independent pathway in monocytes: role of PKC-delta and p38 MAP kinase. *Cell Immunol* 2008;**253**:45-53.
316. Van Antwerp DJ, Martin SJ, Kafri T, Green DR, Verma IM. Suppression of TNF-alpha-induced apoptosis by NF-kappaB. *Science* 1996;**274**:787-789.
317. Nambu A, Nakae S. IL-1 and Allergy. *Allergol Int* 2010;**59**:125-135.
318. Venketaraman V, Morris D, Donohou C, Sipin A, Kung S, Oh H, *et al*. Role of Cytokines and Chemokines in HIV Infection. In: *HIV and AIDS - Updates on Biology, Immunology, Epidemiology and Treatment Strategies*. Edited by Dumais N. Croatia: InTech; 2011. pp. 281-300.
319. Trinchieri G. Interleukin-10 production by effector T cells: Th1 cells show self control. *J Exp Med* 2007;**204**:239-243.
320. Ascherl G, Hohenadl C, Schatz O, Shumay E, Bogner J, Eckhart L, *et al*. Infection with human immunodeficiency virus-1 increases expression of vascular endothelial cell growth factor in T cells: implications for acquired immunodeficiency syndrome-associated vasculopathy. *Blood* 1999;**93**:4232-4241.
321. Mercie P, Devianne I, Viallard JF, Faure I, Pellegrin I, Leng B, *et al*. Vascular endothelial growth factor (VEGF165) plasma level increase with immunodepression in AIDS patients with Kaposi's sarcoma. *Microvasc Res* 1999;**57**:208-210.
322. Sporer B, Koedel U, Paul R, Eberle J, Arendt G, Pfister HW. Vascular endothelial growth factor (VEGF) is increased in serum, but not in cerebrospinal fluid in HIV associated CNS diseases. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2004;**75**:298-300.
323. Bruce Alberts DB, Julian Lewis, Martin Raff, Keith Roberts, James D. Watson. *Molecular Biology of the Cell*: Garland Science; 1994.
324. Papayannopoulou T, Abkowitz J, D'Andrea A, Migliaccio AR, In: (e. Hematology: Basic Principles and Practice. In: *Biology of erythropoiesis, erythroid differentiation and maturation*.
. Edited by R Hoffman, EJ Benz, SJ Shattil, *et al*. 5th ed. Philadelphia, PA, USA,: Elsevier; 2009. pp. 276-294.
325. Mohandas N, Evans E. Mechanical properties of the red cell membrane in relation to molecular structure and genetic defects. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 1994;**23**:787-818.
326. Handin RI, Lux SE, Stossel TP. *Blood, Principles and Practice of Hematology*. 2nd ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2003.
327. Verkleij AJ, Zwaal RF, Roelofsen B, Comfurius P, Kastelijn D, van Deenen LL. The asymmetric distribution of phospholipids in the human red cell membrane. A combined study using phospholipases and freeze-etch electron microscopy. *Biochim Biophys Acta* 1973;**323**:178-193.

328. Zwaal RF, Schroit AJ. Pathophysiologic implications of membrane phospholipid asymmetry in blood cells. *Blood* 1997;**89**:1121-1132.
329. Daleke DL. Regulation of phospholipid asymmetry in the erythrocyte membrane. *Curr Opin Hematol* 2008;**15**:191-195.
330. Sims PJ, Wiedmer T. Unraveling the mysteries of phospholipid scrambling. *Thromb Haemost* 2001;**86**:266-275.
331. Salzer U, Prohaska R. Stomatin, flotillin-1, and flotillin-2 are major integral proteins of erythrocyte lipid rafts. *Blood* 2001;**97**:1141-1143.
332. Bosman GJ, Willekens FL, Werre JM. Erythrocyte aging: a more than superficial resemblance to apoptosis? *Cell Physiol Biochem* 2005;**16**:1-8.
333. Arese P, Turrini F, Schwarzer E. Band 3/complement-mediated recognition and removal of normally senescent and pathological human erythrocytes. *Cell Physiol Biochem* 2005;**16**:133-146.
334. Cimen MY. Free radical metabolism in human erythrocytes. *Clin Chim Acta* 2008;**390**:1-11.
335. Foller M, Bobbala D, Koka S, Huber SM, Gulbins E, Lang F. Suicide for survival--death of infected erythrocytes as a host mechanism to survive malaria. *Cell Physiol Biochem* 2009;**24**:133-140.
336. Lang F, Gulbins E, Lerche H, Huber SM, Kempe DS, Foller M. Eryptosis, a window to systemic disease. *Cell Physiol Biochem* 2008;**22**:373-380.
337. Berg CP, Engels IH, Rothbart A, Lauber K, Renz A, Schlosser SF, *et al*. Human mature red blood cells express caspase-3 and caspase-8, but are devoid of mitochondrial regulators of apoptosis. *Cell Death Differ* 2001;**8**:1197-1206.
338. Bratosin D, Estaquier J, Petit F, Arnoult D, Quatannens B, Tissier JP, *et al*. Programmed cell death in mature erythrocytes: a model for investigating death effector pathways operating in the absence of mitochondria. *Cell Death Differ* 2001;**8**:1143-1156.
339. Daugas E, Cande C, Kroemer G. Erythrocytes: death of a mummy. *Cell Death Differ* 2001;**8**:1131-1133.
340. Lang F, Qadri SM. Mechanisms and significance of eryptosis, the suicidal death of erythrocytes. *Blood Purif* 2012;**33**:125-130.
341. Lang F, Gulbins E, Lang PA, Zappulla D, Foller M. Ceramide in suicidal death of erythrocytes. *Cell Physiol Biochem* 2010;**26**:21-28.
342. Klarl BA, Lang PA, Kempe DS, Niemoeller OM, Akel A, Sobiesiak M, *et al*. Protein kinase C mediates erythrocyte "programmed cell death" following glucose depletion. *Am J Physiol Cell Physiol* 2006;**290**:C244-253.
343. Lang KS, Roll B, Myssina S, Schittenhelm M, Scheel-Walter HG, Kanz L, *et al*. Enhanced erythrocyte apoptosis in sickle cell anemia, thalassemia and glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *Cell Physiol Biochem* 2002;**12**:365-372.
344. Barvitenko NN, Adragna NC, Weber RE. Erythrocyte signal transduction pathways, their oxygenation dependence and functional significance. *Cell Physiol Biochem* 2005;**15**:1-18.
345. Bilmen S, Aksu TA, Gumuslu S, Korgun DK, Canatan D. Antioxidant capacity of G-6-PD-deficient erythrocytes. *Clin Chim Acta* 2001;**303**:83-86.
346. Mavelli I, Ciriolo MR, Rossi L, Meloni T, Forteleoni G, De Flora A, *et al*. Favism: a hemolytic disease associated with increased superoxide dismutase and decreased glutathione peroxidase activities in red blood cells. *Eur J Biochem* 1984;**139**:13-18.
347. Lang PA, Kempe DS, Tanneur V, Eisele K, Klarl BA, Myssina S, *et al*. Stimulation of erythrocyte ceramide formation by platelet-activating factor. *J Cell Sci* 2005;**118**:1233-1243.

348. Sullivan PS, Hanson DL, Chu SY, Jones JL, Ward JW. Epidemiology of anemia in human immunodeficiency virus (HIV)-infected persons: results from the multistate adult and adolescent spectrum of HIV disease surveillance project. *Blood* 1998;**91**:301-308.
349. Barroso J. A review of fatigue in people with HIV infection. *J Assoc Nurses AIDS Care* 1999;**10**:42-49.
350. Volberding P. The impact of anemia on quality of life in human immunodeficiency virus-infected patients. *J Infect Dis* 2002;**185 Suppl 2**:S110-114.
351. Clumeck N, Pozniak A, Raffi F, Committee EE. European AIDS Clinical Society (EACS) guidelines for the clinical management and treatment of HIV-infected adults. *HIV Med* 2008;**9**:65-71.
352. Panel on Antiretroviral Guidelines for Adults and Adolescents. Guidelines for the use of antiretroviral agents in HIV-1 infected adults and adolescents. *Department of Health and Human Services* 2009.
353. Bligh EG, Dyer WJ. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol* 1959;**37**:911-917.
354. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976;**72**:248-254.
355. Demopoulos CA, Andrikopoulos NK, Antonopoulou S. A simple and precise method for the routine determination of platelet-activating factor in blood and urine. *Lipids* 1994;**29**:305-309.
356. Skipski VP, Peterson RF, Barclay M. Quantitative analysis of phospholipids by thin-layer chromatography. *Biochem J* 1964;**90**:374-378.
357. Hax WM, van Kessel WS. High-performance liquid chromatographic separation and photometric detection of phospholipids. *J Chromatogr* 1977;**142**:735-741.
358. Tsoupras AB, Fragopoulou E, Nomikos T, Iatrou C, Antonopoulou S, Demopoulos CA. Characterization of the de novo biosynthetic enzyme of platelet activating factor, DDT-insensitive cholinephosphotransferase, of human mesangial cells. *Mediators Inflamm* 2007;**2007**:27683.
359. Fragopoulou E, Iatrou C, Demopoulos CA. Characterization of acetyl-CoA: lyso-PAF acetyltransferase of human mesangial cells. *Mediators Inflamm* 2005;**2005**:263-272.
360. Antonopoulou S, Demopoulos CA, Iatrou C, Moustakas G, Ziogiannis P. Platelet-activating factor acetylhydrolase (PAF-AH) in human kidney. *Int J Biochem* 1994;**26**:1157-1162.
361. Aberg JA. Aging, inflammation, and HIV infection. *Top Antivir Med* 2012;**20**:101-105.
362. Wilson MG, Chambers L, Bacon J, Rueda S, Ragan M, Rourke SB. Issues of comorbidity in HIV/AIDS: An overview of systematic reviews. Toronto, . ON: *Ontario HIV Treatment Network*; 7 December 2010.
363. Tsoupras AB, Chini M, Tsogas N, Fragopoulou E, Nomikos T, Lioni A, *et al.* Anti-Platelet-Activating Factor Effects of Highly Active Antiretroviral Therapy (HAART): A New Insight in the Drug Therapy of HIV Infection? *Aids Res Human Retroviruses* 2008;**24**:1079-1086.
364. Lesho EP, Gey DC. Managing issues related to antiretroviral therapy. *Am Fam Physician* 2003;**68**:675-686.
365. Moreno S, Miralles C, Negredo E, Domingo P, Estrada V, Gutierrez F, *et al.* Disorders of body fat distribution in HIV-1-infected patients. *AIDS Rev* 2009;**11**:126-134.
366. Balasubramanyam A, Sekhar RV, Jahoor F, Jones PH, Pownall HJ. Pathophysiology of dyslipidemia and increased cardiovascular risk in HIV lipodystrophy: a model of 'systemic steatosis'. *Curr Opin Lipidol* 2004;**15**:59-67.
367. Abebe M, Kinde S, Belay G, Gebreegziabxier A, Challa F, Gebeyehu T, *et al.* Antiretroviral treatment associated hyperglycemia and dyslipidemia among HIV infected patients at

- Burayu Health Center, Addis Ababa, Ethiopia: a cross-sectional comparative study. *BMC Res Notes* 2014,**7**:380.
368. Manfredi R, Chiodo F. Disorders of lipid metabolism in patients with HIV disease treated with antiretroviral agents: frequency, relationship with administered drugs, and role of hypolipidaemic therapy with bezafibrate. *J Infect* 2001,**42**:181-188.
369. Parienti JJ, Massari V, Rey D, Poubreau P, Verdon R, team Ss. Efavirenz to nevirapine switch in HIV-1-infected patients with dyslipidemia: a randomized, controlled study. *Clin Infect Dis* 2007,**45**:263-266.
370. El-Sadr WM, Mullin CM, Carr A, Gibert C, Rappoport C, Visnegarwala F, *et al.* Effects of HIV disease on lipid, glucose and insulin levels: results from a large antiretroviral-naïve cohort. *HIV Med* 2005,**6**:114-121.
371. Ward MM. Factors predictive of acute renal failure in rhabdomyolysis. *Arch Intern Med* 1988,**148**:1553-1557.
372. Manfredi R, Calza L, Chiodo F. Prospective, open-label comparative study of liver toxicity in an unselected population of HIV-infected patients treated for the first time with efavirenz or nevirapine. *HIV Clin Trials* 2005,**6**:302-311.
373. Scaradavou A. HIV-related thrombocytopenia. *Blood Rev* 2002,**16**:73-76.
374. Klatt NR, Chomont N, Douek DC, Deeks SG. Immune activation and HIV persistence: implications for curative approaches to HIV infection. *Immunol Rev* 2013,**254**:326-342.
375. Detopoulou P, Nomikos T, Fragopoulou E, Stamatakis G, Panagiotakos DB, Antonopoulou S. PAF and its metabolic enzymes in healthy volunteers: interrelations and correlations with basic characteristics. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 2012,**97**:43-49.
376. Lp PLASC, Thompson A, Gao P, Orfei L, Watson S, Di Angelantonio E, *et al.* Lipoprotein-associated phospholipase A(2) and risk of coronary disease, stroke, and mortality: collaborative analysis of 32 prospective studies. *Lancet* 2010,**375**:1536-1544.
377. Gomes MB, Cobas RA, Nunes E, Nery M, Castro-Faria-Neto HC, Tibirica E. Serum platelet-activating factor acetylhydrolase activity: a novel potential inflammatory marker in type 1 diabetes. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 2008,**87**:42-46.
378. Koba S, Hirano T. [Dyslipidemia and atherosclerosis]. *Nihon Rinsho* 2011,**69**:138-143.
379. Calza L, Vanino E, Salvadori C, Manfredi R, Colangeli V, Cascavilla A, *et al.* Tenofovir/emtricitabine/efavirenz plus rosuvastatin decrease serum levels of inflammatory markers more than antiretroviral drugs alone in antiretroviral therapy-naïve HIV-infected patients. *HIV Clin Trials* 2014,**15**:1-13.
380. Lundgren J, Neuhaus J, Babiker A, Cooper D, Duprez D, El-Sadr W, *et al.* Use of nucleoside reverse transcriptase inhibitors and risk of myocardial infarction in HIV-infected patients. *AIDS* 2008,**22**:F17-24.
381. MacLeod IJ, Rowley CF, Lockman S, Ogwu A, Moyo S, van Widenfelt E, *et al.* Abacavir alters the transcription of inflammatory cytokines in virologically suppressed, HIV-infected women. *J Int AIDS Soc* 2012,**15**:17393.
382. Behrens GM, Reiss P. Abacavir and cardiovascular risk. *Curr Opin Infect Dis* 2010,**23**:9-14.
383. Packard CJ. Lipoprotein-associated phospholipase A2 as a biomarker of coronary heart disease and a therapeutic target. *Curr Opin Cardiol* 2009,**24**:358-363.
384. Khovidhunkit W, Memon RA, Shigenaga JK, Pang M, Schambelan M, Mulligan K, *et al.* Plasma platelet-activating factor acetylhydrolase activity in human immunodeficiency virus infection and the acquired immunodeficiency syndrome. *Metabolism* 1999,**48**:1524-1531.
385. <http://www.athero.org/commentaries/COMM1004.ASP>. In.
386. Demopoulos CA, Karantonis HC, Antonopoulou S. Platelet activating factor - a molecular link between atherosclerosis theories. *Eur J Lipid Sci Technol* 2003,**105**:705-716.

387. Doublier S, Zennaro C, Spatola T, Lupia E, Bottelli A, Deregibus MC, *et al.* HIV-1 Tat reduces nephrin in human podocytes: a potential mechanism for enhanced glomerular permeability in HIV-associated nephropathy. *AIDS* 2007,**21**:423-432.
388. Nowlan ML, Drewe E, Bulsara H, Esposito N, Robins RA, Tighe PJ, *et al.* Systemic cytokine levels and the effects of etanercept in TNF receptor-associated periodic syndrome (TRAPS) involving a C33Y mutation in TNFRSF1A. *Rheumatology (Oxford)* 2006,**45**:31-37.
389. Bussolino F, Camussi G, Baglioni C. Synthesis and release of platelet-activating factor by human vascular endothelial cells treated with tumor necrosis factor or interleukin 1 alpha. *J Biol Chem* 1988,**263**:11856-11861.
390. Ruis NM, Rose JK, Valone FH. Tumor necrosis factor release by human monocytes stimulated with platelet-activating factor. *Lipids* 1991,**26**:1060-1064.