



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ «ΧΗΜΕΙΑΣ»
ΕΙΔΙΚΕΥΣΗ «ΒΙΟΧΗΜΕΙΑ»**

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

ΜΕΛΕΤΗ

**Α) ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΩΝ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ *ABCA1* ΣΕ ΥΓΙΗ ΑΤΟΜΑ
Β) ΕΠΙΠΕΔΩΝ ΚΑΙ ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΥ ΤΟΥ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ
ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗΣ ΑΙΜΟΠΕΤΑΛΙΩΝ
ΣΕ ΑΤΟΜΟ ΜΕ ΜΕΤΑΛΛΑΞΗ ΣΤΟ ΓΟΝΙΔΙΟ *ABCA1***

**ΚΟΛΟΒΟΥ ΝΙΚΗ-ΒΑΪΑ
ΧΗΜΙΚΟΣ**

ΑΘΗΝΑ 2012

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

ΜΕΛΕΤΗ

**A) ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΩΝ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ *ABCA1* ΣΕ ΥΓΙΗ ΑΤΟΜΑ
B) ΕΠΙΠΕΔΩΝ ΚΑΙ ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΥ ΤΟΥ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ
ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗΣ ΑΙΜΟΠΕΤΑΛΙΩΝ
ΣΕ ΑΤΟΜΟ ΜΕ ΜΕΤΑΛΛΑΞΗ ΣΤΟ ΓΟΝΙΔΙΟ *ABCA1***

ΝΙΚΗ-ΒΑΪΑ ΚΟΛΟΒΟΥ

A.M.: 61020

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ:

ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ Α. ΔΗΜΟΠΟΥΛΟΣ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Κ.Α. ΔΗΜΟΠΟΥΛΟΣ, ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ

Σ. ΑΝΤΩΝΟΠΟΥΛΟΥ, ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ

Η. ΛΙΑΝΟΣ, ΑΝΑΠΛΗΡΩΤΗΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΕΞΕΤΑΣΗΣ

04/07/2012

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στο πρώτο μέρος αυτής της διπλωματικής εργασίας μελετώνται συχνοί πολυμορφισμοί του γονιδίου *ABCA1* σε υγιή νεαρό πληθυσμό ($n=447$). Οι πολυμορφισμοί αυτοί (R219K, R1587K και I883M) σχετίζονται με τα επίπεδα λιποειδών του πλάσματος. Με τον τρόπο αυτό επιβεβαιώνεται ο σημαντικός ρόλος της πρωτεΐνης *ABCA1* στην διαμόρφωση των επιπέδων των λιποειδών του πλάσματος.

Η έλλειψη της πρωτεΐνης *ABCA1* οφείλεται σε γενετική μετάλλαξη που προκαλεί τη νόσο Ταγγέρη, που έχει συσχετιστεί με την ύπαρξη στεφανιαίας νόσου και με υψηλή δραστικότητα της λιποπρωτεϊνικής φωσφολιπάσης A_2 (Lipoprotein phospholipase A_2 , Lp-PLA $_2$), αποικοδομητικού ενζύμου του παράγοντα ενεργοποίησης αιμοπεταλίων (Platelet activating factor, PAF). Ο PAF εμπλέκεται σε καταστάσεις χρόνιας φλεγμονής καθώς και στην αρτηριοσκλήρωση.

Η νόσος Ταγγέρη είναι πολύ σπάνια και από το 1961 έχουν αναφερθεί περίπου 50 διαπιστωμένες περιπτώσεις παγκοσμίως, καθώς οφείλεται σε μεταλλάξεις του γονιδίου *ABCA1*. Η νόσος επιδρά στο λιπιδαιμικό προφίλ των ασθενών καθώς στα άτομα αυτά απουσιάζει ή είναι ελάχιστη η υψηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνη (High density lipoprotein, HDL).

Στο δεύτερο μέρος αυτής της διπλωματικής εργασίας, μελετάται σε άτομο με την νόσο Ταγγέρη στο οποίο απουσιάζει η πρωτεΐνη *ABCA1* λόγω της μοναδικής μετάλλαξης C2033A στο εξώνιο 12, η συσχέτιση με υγιείς ανθρώπους α) της ικανότητας συσσώρευσης του πλάσματος πλούσιο σε αιμοπετάλια από τον PAF, ADP και θρομβίνη, β) των επιπέδων του PAF στο αίμα και γ) της ειδικής δραστικότητας των ρυθμιστικών ενζύμων του μεταβολισμού του PAF στο αίμα και στα έμμορφα συστατικά του αίματος, της φωσφοχολινο-τρανσφεράσης (PAF-cholinephosphotransferase, PAF-CPT), ακετυλο-τρανσφεράσης (Lyso-PAF-acetyltransferase, Lyso-PAF-AT), ακετυλο-υδρολάσης (PAF-acetylhydrolase, PAF-AH) και της LpPLA $_2$.

Λέξεις κλειδιά: PAF, *ABCA1*, νόσος Ταγγέρη, αθηροσκλήρωση, πολυμορφισμός, μετάλλαξη, μεταβολισμός PAF

Study of:
A) Common polymorphisms in *ABCA1* gene in healthy Greek population
B) PAF levels and metabolism in a patient with mutation in *ABCA1* gene

Niki - Vaia Kolovou

Dissertation for the master's degree in Biochemistry
Departement of Chemistry, University of Athens

ABSTRACT

This study investigates 3 common polymorphisms (R219K, R1587K and I883M) in *ABCA1* gene in healthy young individuals. These polymorphisms are related with lipids levels. This association of common polymorphisms, indicates the important role of ABCA1 protein in lipid metabolism.

Tangier disease (TD) is a phenotypic expression of rare familial syndrome with mutations in *ABCA1* gene, which can cause absence or less activity of ABCA1 protein and these patients have a characteristic lipid profile. High density lipoprotein (HDL) which has a protective role, in TD patients is very low or is almost absent. However, the risk of coronary artery disease (CAD) in patients with TD is variable, because the progress of CAD depends from many mechanisms, the most of them are not very clear, yet. Moreover, CAD which is a chronic disease is related with inflammation.

The pivotal role of Platelet-Activating Factor (PAF) mediator in atheromatosis is found. Plasma lipoproteins are transporters of the platelet activating factor acetylhydrolase (PAF-AH) also known as lipoprotein-phospholipase A₂ (Lp-PLA₂) and regulate PAF levels in blood. PAF biosynthesis depends on the remodeling and the *de novo* pathways in which lyso-PAF-acetyltransferase (Lyso-PAF-AT) and PAF-cholinephosphotrans-ferase (PAF-CPT) are the regulatory enzymes, respectively.

Another aim of this study is to investigate in a TD patient with a unique mutation (C2033A), the concentration of PAF in blood, the Equivalent Concentration for 50% aggregation (EC₅₀) values of platelet rich plasma (PRP) toward PAF, ADP and thrombin, and the specific activities of PAF metabolic enzymes Lp-PLA₂, PAF-AH, Lyso-PAF-AT and PAF-CPT.

Key words: PAF, ABCA1, Tangier disease, atherosclerosis, polymorphism, mutation, PAF metabolism.

Στην μητέρα μου,
στην οικογενειά μου,
σε όσους αγαπώ
και στα αγαπημένα
μου κατοικίδια.

Ευχαριστίες

Η διπλωματική αυτή εργασία έγινε την περίοδο 2010-2012 στο Εργαστήριο Βιοχημείας του Τμήματος Χημείας του Εθνικού & Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών σε συνεργασία με το Εργαστήριο Μοριακής Ανοσοπαθολογίας και Ιστοσυμβατότητας στο Ωνάσειο Καρδιοχειρουργικό υπό την επίβλεψη του Καθηγητή Κωνσταντίνου Α. Δημόπουλου και της Υπεύθυνης Εξωτερικών Ιατρείων και Προληπτικής Καρδιολογίας Γενοβέφας Κολοβού.

Ευχαριστώ βαθύτατα τον Κωνσταντίνο Α. Δημόπουλο για τις γνώσεις που μου μετέδωσε, για την ευκαιρία να ασχοληθώ με ένα τόσο ενδιαφέρον και πρωτότυπο θέμα, καθώς και για την ενθάρρυνση που μου πρόσφερε σε όλο αυτό το διάστημα. Οφείλω να ευχαριστήσω θερμά την Γενοβέφα Κολοβού που μου έδωσε την ευκαιρία να συμμετάσχω στην ερευνητική της ομάδα και να διδαχθώ την έννοια και τον σκοπό της «έρευνας», καθώς και για την συλλογή του δείγματος από την ασθενή με την νόσο Ταγγέρη.

Στην υλοποίηση αυτής της διπλωματικής εργασίας στο Εργαστήριο Βιοχημείας του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Αθηνών, σημαντικό ρόλο έπαιξαν οι μεταπτυχιακοί φοιτητές Βάσια Παπακωνσταντίνου, Γιώργος Σταματάκης και Σοφία Βερούτη, οι οποίοι με βοήθησαν στην διεξαγωγή και κατανόηση των πειραμάτων και τους ευχαριστώ για αυτό. Καθώς και την μεταπτυχιακή φοιτήτρια Ιωάννα Βλαχογιάννη που με βοήθησε να εξασκηθώ σε δικά της δείγματα και να κατανοήσω στο μέγιστο την πειραματική διαδικασία.

Ευχαριστώ ακόμα την Καθηγήτρια Χριστίνα Μαρβάκη από το Τ.Ε.Ι. Νοσηλευτικής για την συλλογή των δειγμάτων, στα οποία έγινε η ανάλυση των πολυμορφισμών.

Επίσης, ήθελα να ευχαριστήσω τον Διευθυντή του Εργαστηρίου Ανοσοπαθολογίας και Ιστοσυμβατότητας του Ωνάσειου Καρδιοχειρουργικού Κέντρου Δημήτρη Ντεγιάννη που μου έδωσε την ευκαιρία να πραγματοποιήσω μεγάλο μέρος του πειραματικού μέρους της εργασίας στον χώρο του εργαστηρίου του, καθώς και όλο το προσωπικό του εργαστηρίου για το ενδιαφέρον και την υποστήριξή τους.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Θεωρητικό Μέρος	1
Κεφάλαιο 1: Αθηροσκλήρωση	1
1.1. Εισαγωγή	1
1.2. Καρδιακή λειτουργία	1
1.3. Στεφανιαίες αρτηρίες	2
1.4. Αιμόσταση	2
1.5. Αθηροσκλήρωση και Στεφανιαία νόσος	3
1.6. Παράγοντες κινδύνου	5
Κεφάλαιο 2: Λιποειδή	6
2.1. Χοληστερόλη	6
2.2. Τριγλυκερίδια	9
2.3. Φωσφολιποειδή	10
2.4. Λιποπρωτεΐνες	12
2.5. Απολιποπρωτεΐνες	14
Κεφάλαιο 3: Παράγοντας Ενεργοποίησης Αιμοπεταλίων	16
3.1. Εισαγωγή	16
3.2. Χημική δομή του PAF	17
3.3. Βιοσύνθεση του PAF	18
3.3.1. <i>De novo</i> βιοσύνθεση	18
3.3.2. Πορεία αναδιαμόρφωσης (remodeling πορεία)	20
3.4. Αποικοδόμηση του PAF	21
3.5. Βιοσυνθετικά και αποικοδομητικά ένζυμα	22
3.5.1. PAF-CPT	23
3.5.2. Lyso-PAF-AT	24
3.5.3. PAF-AH	25
Κεφάλαιο 4: Λιποπρωτεΐνη HDL	28
4.1. Φυσιολογία της HDL	28
4.2. Σημασία της HDL	29
4.3. Μεταβολισμός και Ανάστροφη μεταφορά της HDL	30
4.4. HDL και άλλες ιδιότητες	33
4.5. HDL και PAF-AH	33
4.5.1. Πρόσδεση της PAF-AH στην HDL	34
Κεφάλαιο 5: Λιποπρωτεΐνη LDL	36
5.1. Φυσιολογία της LDL	36
5.2. Βιοσύνθεση και μεταβολισμός της LDL	37
5.3. Ο ρόλος της LDL	38
5.4. Οξείδωση της LDL	39
5.5. LDL και PAF-AH (Lp-PLA ₂)	40

Κεφάλαιο 6: Η πρωτεΐνη ABCA1	41
6.1. Η δομή της ABCA1	41
6.2. Ο ρόλος της ABCA1 στον σχηματισμό των HDL μορίων	43
6.3. Μεταλλάξεις στο γονίδιο ABCA1	43
Κεφάλαιο 7: Νόσος Ταγγέρη	45
7.1. Παθοφυσιολογία της νόσου Ταγγέρη	45
7.2. Η νόσος Ταγγέρη στην Ελλάδα	46
7.3. Παράγοντας ενεργοποίησης αιμοπεταλίων και νόσος Ταγγέρη	47
Κεφάλαιο 8: Μελέτη του γονιδίου ABCA1	48
8.1. Το DNA και η έννοια του πολυμορφισμού	48
8.1.1. Πολυμορφισμός R219K	49
8.1.2. Πολυμορφισμός R1587K	49
8.1.3. Πολυμορφισμός I883M	50
8.2. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης	50
8.3. Ηλεκτροφόρηση	51
Σκοπός	52
Πειραματικό Μέρος	54
I. Μέθοδοι και Υλικά	54
Μελέτη πολυμορφισμών του γονιδίου ABCA1 σε υγιή άτομα	54
1. Απομόνωση DNA από ολικό αίμα	54
2. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)	56
3. Επώαση με περιοριστική ενδονουκλεάση	58
4. Ηλεκτροφόρηση δειγμάτων	60
Μελέτη ασθενούς με νόσο Ταγγέρη	63
1. Παραλαβή αίματος από ασθενή για μελέτη επιπέδων του PAF	63
2. Εκχύλιση λιποειδών κατά Bligh-Dyer	64
3. Χρωματογραφία στήλης λιποειδών	65
4. Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC)	66
5. Βιολογική δοκιμασία συσσώρευσης αιμοπεταλίων <i>in vitro</i>	67
6. Παραλαβή αίματος από ασθενή για μελέτη των 2 βιοσυνθετικών ενζύμων (PAF-CPT και Lyso-PAF AT) και του αποικοδομητικού ενζύμου του PAF (PAF-AH)	72
6.1. Παραλαβή κυττάρων και πλάσματος από ολικό αίμα	72
6.2. Προσδιορισμός πρωτεΐνης με τη μέθοδο Bradford	75
6.3. Προσδιορισμός δραστηριότητας της PAF ακετυλοϋδρολάσης	76
6.4. Προσδιορισμός δραστηριότητας της DDT-ανεξάρτητης αλκυλο-ακετυλογλυκερολη:CDP-χολίνη φωσφοχολινοτρανσφεράσης (CDP-CPT) σε ομογενοποίημα κυττάρων	78

6.5. Προσδιορισμός δραστηριότητας της 1-O-αλκυλο-2-λυσσο-sn-γλυκερο-3-φωσφοχολίνη:ακετυλο-CoA ακετυλοτρανσφεράσης (λυσσο-PAF-AT).....	82
6.6. Διαχωρισμός του παραγόμενου PAF μετά το πέρας των ενζυμικών αντιδράσεων των βιοσυνθετικών ενζύμων με χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC).....	84
7. Συσσώρευση αιμοπεταλίων σε δείγμα ασθενούς με νόσο Ταγγέρη	87
Στατιστική ανάλυση	89
Αποτελέσματα	90
I. Μελέτη πολυμορφισμών του γονιδίου <i>ABCA1</i> σε υγιή άτομα.....	91
II. Μελέτη ασθενούς με νόσο Ταγγέρη	98
1. Εύρεση του EC ₅₀ στο PRP ασθενούς.....	98
2. Μελέτη των μεταβολικών ενζύμων του PAF στο αίμα ασθενούς	100
3. Μέτρηση των επιπέδων του PAF στο αίμα ασθενούς.....	104
Συζήτηση	106
Πολυμορφισμοί του γονιδίου <i>ABCA1</i> σε υγιή άτομα.....	107
<i>Πολυμορφισμός R219K</i>	107
<i>Πολυμορφισμός R1587K</i>	112
<i>Πολυμορφισμός I883M</i>	113
Μελέτη ασθενούς με τη νόσο της Ταγγέρης.....	115
Ενζυμα μεταβολισμού του PAF	115
Συσσώρευση αιμοπεταλίων	116
Επίπεδα του PAF	117
Συντιμίσσεις	120
Βιβλιογραφία	122

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Κεφάλαιο 1: Αθηροσκλήρωση

1.1. Εισαγωγή

Η αθηροσκλήρωση ή αρτηριοσκλήρυνση αποτελεί την αιτία των καρδιακών νοσημάτων. Στην αρχή του 20^{ου} αιώνα τα καρδιαγγειακά νοσήματα προκαλούσαν λιγότερο από το 10% των θανάτων σε ολόκληρο τον κόσμο [1]. Η αθηροσκλήρωση είναι μια χρόνια φλεγμονώδης κατάσταση, η οποία επηρεάζει τις στεφανιαίες αρτηρίες προκαλώντας στεφανιαία νόσο [2]. Στις μέρες μας, η στεφανιαία νόσος είναι η συχνότερη νόσος που οδηγεί σε θάνατο στις αναπτυγμένες χώρες. Προβλέπεται ότι τουλάχιστον μέχρι το 2020 θα ευθύνεται για την πρώτη αιτία θανάτου παγκοσμίως. Τα χαμηλά επίπεδα της υψηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνης (high-density lipoprotein, HDL) είναι η πιο κοινή λιπιδική ανωμαλία σε ασθενείς με πρώιμη στεφανιαία νόσο [3]. Η προστατευτική δράση της HDL ενάντια στην ανάπτυξη της στεφανιαίας νόσου αναφέρθηκε για πρώτη φορά το 1975 [4]. Η σχέση μεταξύ των τιμών της HDL στο πλάσμα και εμφάνισης στεφανιαίας νόσου έχει επιβεβαιωθεί από πολλές επιδημιολογικές μελέτες [5,6]. Σήμερα, τα χαμηλά επίπεδα της HDL στο πλάσμα θεωρούνται ως ανεξάρτητος παράγοντας κινδύνου για την ανάπτυξη στεφανιαίας νόσου [6]. Επιπλέον, η χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνη (low-density lipoprotein, LDL) διαδραματίζει ένα ρόλο κλειδί στην αθηρογένεση και τα υψηλά επίπεδα της LDL είναι παράγοντας κινδύνου για στεφανιαία νόσο [7].

1.2. Καρδιακή λειτουργία

Η βασική λειτουργία της καρδιάς είναι να ωθεί, μέσω μεγάλων αρτηριών, πλούσιο σε οξυγόνο και θρεπτικά συστατικά, αίμα σε όλο το σώμα. Όταν το οξυγόνο απορροφηθεί από τους ιστούς, οι φλέβες παραλαμβάνουν το αίμα, το οποίο έχει χαμηλή περιεκτικότητα σε οξυγόνο και το μεταφέρουν πίσω στην καρδιά.

Η καρδιά έχει δύο τμήματα, καθένα από τα οποία λειτουργεί ως ξεχωριστή

αντλία. Το δεξιό τμήμα της καρδιάς δέχεται αίμα από τις φλέβες όλου του σώματος και το ωθεί στους πνεύμονες, για να οξυγονωθεί και πάλι. Η αριστερή πλευρά συγκεντρώνει το αίμα που επιστρέφει από τους πνεύμονες και το ωθεί στους ιστούς όλου του σώματος, για να τους εφοδιάσει με αίμα. Για να φθάσει το αίμα σε όλα τα όργανα και τους μύες, πρέπει να ωθείται με μεγάλη πίεση. Ωστόσο, χρειάζεται και η ίδια η καρδιά πολύ καλή παροχή αίματος, ένα έργο που επιτελούν οι στεφανιαίες αρτηρίες και οι κλάδοι τους.

1.3. Στεφανιαίες αρτηρίες

Οι στεφανιαίες αρτηρίες εκφύονται από το τμήμα της αορτής (του κύριου αγγείου της καρδιάς) και είναι οι πρώτες αρτηρίες του σώματος που δέχονται οξυγονωμένο αίμα. Οι δύο στεφανιαίες αρτηρίες, η δεξιά και η αριστερή, είναι σχετικά μικρές, έχοντας διάμετρο 3-4 mm.

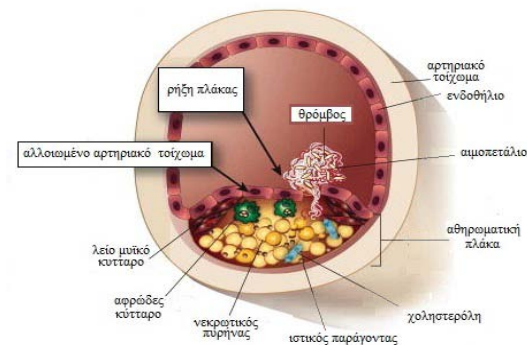
Οι στεφανιαίες αρτηρίες έχουν παρόμοια δομή με τις άλλες αρτηρίες του σώματος. Η καρδιά χρειάζεται ένα πολύ αποτελεσματικό δίκτυο λεπτών αιμοφόρων αγγείων μέσα στον καρδιακό μυ, για να φθάνει το αίμα όπου είναι απαραίτητο. Σε περίπτωση στεφανιαίας νόσου, οι στεφανιαίες αρτηρίες αναπτύσσουν στένωση και ο καρδιακός μυς αρχίζει να στερείται το αίμα και την απαραίτητη ποσότητα οξυγόνου. Αν η στεφανιαία αρτηρία αποφραχθεί πλήρως από έναν θρόμβο, νεκρώνεται η περιοχή του καρδιακού μυός που αυτή τροφοδοτούσε με αίμα.

1.4. Αιμόσταση

Η φυσιολογική απόκριση που αποτρέπει σημαντική απώλεια αίματος μετά από αγγειακή βλάβη, ονομάζεται αιμόσταση [8]. Όταν τραυματιστεί η αρτηρία πυροδοτείται μια σειρά αντιδράσεων: α) η ίδια η αρτηρία παίζει σημαντικό ρόλο στη μείωση της ροής του αίματος, β) τα κυκλοφορούντα αιμοπετάλια προσχωρούν στο αρτηριακό τοίχωμα στο σημείο του τραύματος και γ) τα αιμοπετάλια ενεργοποιούνται και συσσωρεύονται μέσω μιας πολύπλοκης

σειράς από ενζυμικές αντιδράσεις που περιλαμβάνουν πρωτεΐνες πήξης του αίματος παράγοντας ινώδες. Αυτή η διαδικασία συντελεί στη διατήρηση της ακεραιότητας του κυκλοφορικού συστήματος [9].

1.5. Αθηροσκλήρωση και Στεφανιαία νόσος



Εικόνα 1: Αγγείο με αθηρωματική πλάκα [10].

Το τοίχωμα μιας αρτηρίας αποτελείται από τρία βασικά στρώματα. Η εσωτερική επένδυση ή το εσωτερικό στρώμα (ενδοθήλιο) είναι συνήθως ομαλή και συνεχής.

Η αρτηριοσκλήρυνση αρχίζει όταν επιδράσει ένας φλεγμονώδης παράγοντας ή τραυματιστεί το ενδοθήλιο. Κατόπιν, ορισμένα λευκοκύτταρα του αίματος (μονοκύτταρα) ενεργοποιούνται και κινούνται από το αίμα και μέσω του τραυματισμένου ενδοθηλίου μιας αρτηρίας στο τοίχωμα αυτής. Μέσα στο τοίχωμα μετασχηματίζονται σε μακροφάγα και στη συνέχεια σε αφρώδη κύτταρα, τα οποία είναι κύτταρα που συλλέγουν τις λιπαρές ύλες, κυρίως χοληστερόλη. Ταυτόχρονα, τα λεία μυϊκά κύτταρα μεταναστεύουν από το μέσο χιτώνα προς το ενδοθήλιο και εκεί πολλαπλασιάζονται. Ακόμα, ο συνδετικός και ελαστικός ιστός συσσωρεύεται κάτω από το ενδοθήλιο, όπως επίσης και υπολείμματα κυττάρων, κρύσταλλοι χοληστερόλης και ασβέστιο. Αυτή η συσσώρευση των αφρώδων κυττάρων, των λείων μυϊκών κυττάρων, και άλλων υλικών διαμορφώνει μια ετερόκλητη συσσώρευση αποκαλούμενη αθήρωμα ή αθηροσκληρυντική πλάκα (εικόνα 1). Καθώς η πλάκα μεγαλώνει από τη συνεχή εναπόθεση των ανωτέρω υλικών, παχύνεται και καταλαμβάνει

το εσωτερικό της αρτηρίας. Αυτό δημιουργεί τοπικά στένωση της αρτηρίας που εμποδίζει την ομαλή ροή του αίματος.

Η έκταση των αλλοιώσεων αυτών και ο ρυθμός αναπτύξεώς τους μπορεί να επηρεασθούν από τα επίπεδα των λιπιδίων στο αίμα κυρίως από τα επίπεδα της LDL-χοληστερόλης. Οι άνθρωποι με αυξημένα επίπεδα LDL-χοληστερόλης στο αίμα έχουν αυξημένες πιθανότητες να αναπτύξουν αθηροσκλήρωση. Ωστόσο, όλοι είναι πιθανόν να παρουσιάσουν τέτοιες αλλοιώσεις στα αγγεία τους, όταν φθάσουν στη μέση ηλικία. Καθώς τα αθηρώματα μεγαλώνουν, προκαλούν πάχυνση και εξασθένηση του τοιχώματος των αρτηριών, και προοδευτικά μειώνεται η ποσότητα του αίματος που μπορεί να διέρχεται από αυτές.

Η διαδικασία αυτή μπορεί να επηρεάσει κάθε όργανο του σώματος με σοβαρές συνέπειες για την υγεία. Έτσι, τα αθηρώματα των αρτηριών του εγκεφάλου οδηγούν σε εγκεφαλικό, των αρτηριών των κάτω άκρων σε γάγγραινα και των στεφανιαίων αρτηριών σε έμφραγμα. Η διαδικασία σκλήρυνσεως των αρτηριών δεν είναι ίδια σε όλες τις αρτηρίες του σώματος και οι διαφοροποιήσεις μπορεί να είναι ιδιαιτέρως έντονες στις στεφανιαίες αρτηρίες. Η στένωση μπορεί να επηρεάσει μία μόνο στεφανιαία αρτηρία ή τμήμα αυτής ή μπορεί να επηρεάσει μία στεφανιαία αρτηρία καθ' όλο το μήκος της.

Με το χρόνο η πλάκα αυξάνει σε πάχος έτσι ώστε μικραίνει τη διάμετρο του αυλού της αρτηρίας δηλαδή προκαλείται στένωση του αγγείου. Η ελάττωση της προσφοράς οξυγόνου στο μυοκάρδιο εκφράζεται κλινικά με την στηθάγχη. Η δημιουργία αποφρακτικού θρόμβου έχει αποτέλεσμα την παντελή και παρατεταμένη έλλειψη οξυγόνου στο μυοκάρδιο που προκαλεί νέκρωση του μυοκαρδίου (έμφραγμα).

Το έμφραγμα είναι το τελικό επακόλουθο, όταν αποφραχθεί από έναν θρόμβο μια πάσχουσα στεφανιαία αρτηρία. Το τμήμα του καρδιακού μυός (ή μυοκαρδίου) που αιματώνεται από αυτή την αρτηρία, σταματά ξαφνικά να εφοδιάζεται με αίμα και οξυγόνο, με επακόλουθο να αναπτύσσεται πόνος, ο οποίος εντείνεται καθώς περνούν τα λεπτά. Εάν ο θρόμβος δεν διαλυθεί αυτόματα, το τμήμα αυτό νεκρώνεται μέσα σε 10-20 λεπτά.

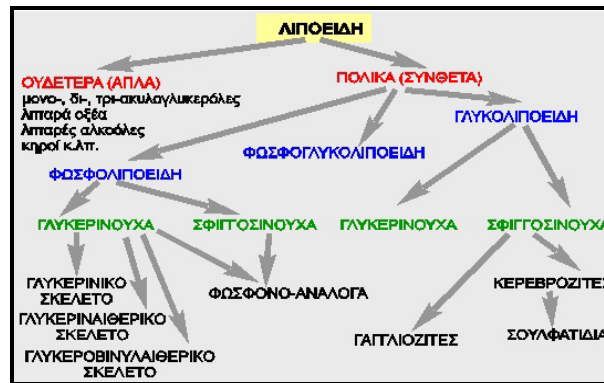
1.6. Παράγοντες κινδύνου

Η ανάπτυξη της αθηροσκλήρωσης φαίνεται να προάγεται από ποικίλους παράγοντες (παράγοντες κινδύνου) όπως: το φύλο, την ηλικία, τα υψηλά επίπεδα LDL χοληστερόλης και τριγλυκεριδίων, τα χαμηλά επίπεδα HDL χοληστερόλης στο πλάσμα, την υψηλή αρτηριακή πίεση, τον σακχαρώδη διαβήτη, το κάπνισμα, την παχυσαρκία κ.α. Εξίσου σημαντικός παράγοντας κινδύνου είναι και ο ρόλος των γονιδίων [11]. Οι παραπάνω παράγοντες κινδύνου χωρίζονται στους τροποποιήσιμους (όπως είναι τα επίπεδα LDL και HDL χοληστερόλης, το κάπνισμα, η αρτηριακή πίεση κ.α.) και στους μη τροποποιήσιμους (όπως είναι το φύλο, η ηλικία, οι γενετικοί παράγοντες).

Πρόσφατα μια άλλη θεωρία [12] (Θεωρία της αρτηριοσκλήρυνσης με εμπλοκή του PAF) προτείνει σαν παράγοντα κινδύνου και τον Παράγοντα Ενεργοποίησης των Αιμοπεταλίων (PAF), έναν ισχυρότατο φλεγμονώδη παράγοντα, τον οποίο θεωρεί ότι προκαλεί την αρχική βλάβη στο ενδοθήλιο οπότε και αρχίζει η αρτηριοσκλήρυνση.

Κεφάλαιο 2: Λιποειδή

Τα λιποειδή κατατάσσονται σύμφωνα με το σχήμα 1 [13] σε ουδέτερα και πολικά λιποειδή.



Σχήμα 1: Κατάταξη των λιποειδών [13]

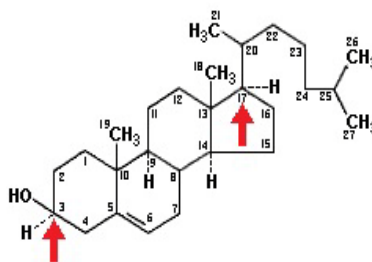
2.1. Χοληστερόλη

Η χοληστερόλη, ένα ουδέτερο λιποειδές, ανακαλύφθηκε το 1815 από το Γάλλο χημικό M. E. Chevreul ως συστατικό ανθρώπινου χολόλιθου. Η χοληστερόλη είναι ένα απαραίτητο συστατικό των μεμβρανών των κυττάρων και αντιπροσωπεύει περίπου το 50% των λιποειδών των μεμβρανών. Έχει προταθεί ότι η εξέλιξη έχει επιλέξει τη χοληστερόλη επειδή βελτιστοποιεί τις φυσικές ιδιότητες της μεμβράνης. Η χοληστερόλη επηρεάζει έντονα τις μηχανικές και θερμοδυναμικές ιδιότητες της μεμβράνης ρυθμίζοντας έτσι τη ρευστότητα και τη διαπερατότητα των μεμβρανών καθώς και την πλευρική κινητικότητα των πρωτεϊνών [14].

Η χοληστερόλη είναι ένα μέσου μεγέθους μόριο που αποτελεί πραγματικά μια δομική μονάδα για σημαντικά μέρη του σώματος. Επιπλέον, σταθεροποιεί το κύτταρο ενάντια στις αλλαγές θερμοκρασίας. Αποτελεί σημαντικό μέρος των μεμβρανών του νευρικού συστήματος, του εγκεφάλου, του νωτιαίου μυελού και των περιφερειακών νεύρων καθώς ενσωματώνεται στη θήκη μυελίνης που μονώνει τα νεύρα από τον περιβάλλοντα ιστό.

Η χοληστερόλη είναι πρόδρομη ένωση σημαντικών ορμονών όπως της γυναικείας ορμόνης οιστραδιόλης, και της αρσενικής ορμόνης τεστοστερόνης, καθώς και της βιταμίνης D, η οποία χρειάζεται για την απορρόφηση του ασβεστίου και την διαμόρφωση των οστών.

Σχεδόν όλοι οι σωματικοί ιστοί είναι ικανοί για την βιοσύνθεση της χοληστερόλης, αλλά το ήπαρ και τα έντερα είναι τα κύρια όργανα βιοσύνθεσής της [15].



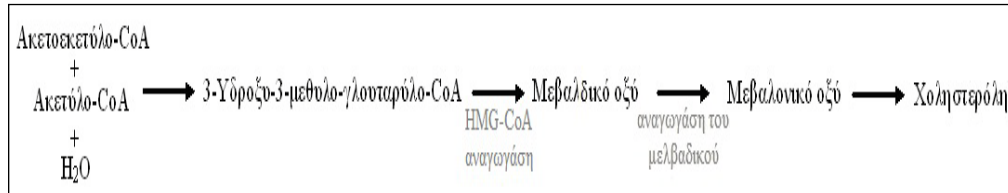
Εικόνα 2: Χημική δομή της χοληστερόλης.

Η χοληστερόλη είναι ένα λιποειδές το οποίο περιέχει ένα ογκώδη στεροειδή πυρήνα (εικόνα 2). Μια υδρογονανθρακική ουρά συνδέεται με το στεροειδές στον D δακτύλιο στον C17, ενώ υπάρχει μια υδροξυλική ομάδα στον δακτύλιο A στον C3, όπως δείχνουν τα βέλη στην εικόνα 2. Αποτελείται από τέσσερις δακτυλίους υδρογονανθράκων, και υπάρχει είτε σε ελεύθερη μορφή είτε σε εστεροποιημένη με ένα λιπαρό οξύ.

Τα λιποειδή ανήκουν σε μία ετερογενή ομάδα ουσιών, οι οποίες έχουν ως κοινή ιδιότητα ότι είναι αδιάλυτες στο νερό, όσο και στο πλάσμα. Στο πλάσμα τα λιποειδή κυκλοφορούν μόνο συνδεδεμένα με πρωτεΐνες με τη μορφή λιποπρωτεϊνών. Η ελεύθερη χοληστερόλη βρίσκεται στους περισσότερους ιστούς και σε σχεδόν όλες τις ζωικές μεμβράνες σε διάφορα ποσοστά. Πολλές μεμβρανικές διεργασίες, όπως η μεταφορά ουσιών και η μεταγωγή σήματος εξαρτώνται από τη ρευστότητα των μεμβρανικών λιποειδών. Στα ζώα και στον άνθρωπο, η χοληστερόλη είναι καθοριστικός ρυθμιστής της μεμβρανικής ρευστότητας.

Η εστεροποιημένη χοληστερόλη υπάρχει στο κυτταρόπλασμα, όπου αποθηκεύεται υπό μορφή σταγονιδίων για να μην αντιδρά με την κυτταρική μεμβράνη. Επίσης υπάρχει στο φλοιό των επινεφριδίων, στο πλάσμα, στις

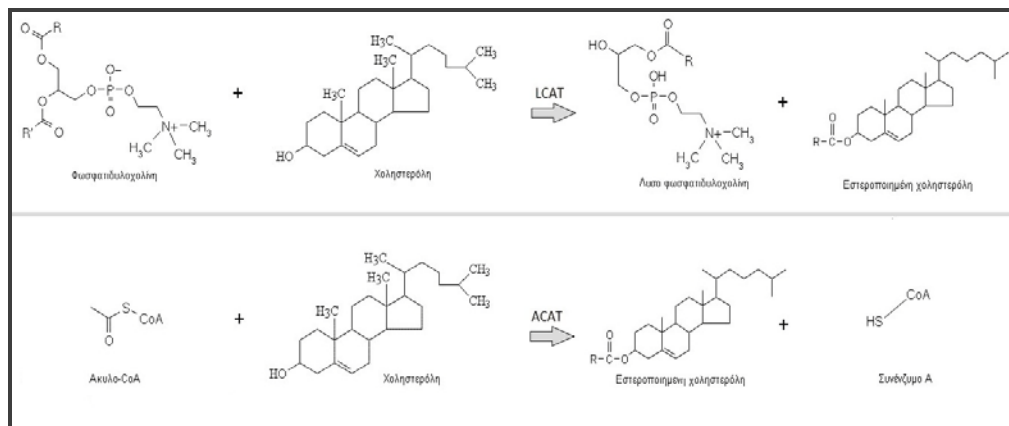
αθηρωματικές πλάκες, στην εντερική λέμφο και στο ήπαρ. Αν και τα περισσότερα κύτταρα μπορούν να συνθέτουν χοληστερόλη, αυτή παράγεται σχεδόν αποκλειστικά στα ηπατικά κύτταρα [11].



Σχήμα 2: Βιοσύνθεση χοληστερόλης.

Η χοληστερόλη συντίθεται από το ακετυλ-συνένζυμο Α (-CoA) που προέρχεται είτε από β-οξειδωση των λιπαρών οξέων είτε από τον καταβολισμό των υδατανθράκων. Στη διαδικασία της σύνθεσης παρεμβαίνουν περίπου τριάντα ένζυμα, αλλά το ένζυμο «κλειδί» είναι η αναγωγή του υδροξυμεθυλογλουταρυλο-συνένζυμου Α (HMG-3 CoA), (σχήμα 2), της οποίας η δράση ρυθμίζεται από το επίπεδο της ελεύθερης χοληστερόλης στο κύτταρο [16].

Η εστεροποίηση της χοληστερόλης επιτελείται κυρίως στο πλάσμα με τη δράση του ενζύμου ακυλοτρανσφεράση λεκιθίνης: χοληστερόλης (lecithin:cholesterol acyl transferase, LCAT) και σε μικρές ποσότητες στο έντερο με τη συμμετοχή του ενζύμου ακυλοτρανσφεράση ακυλο-CoA: χοληστερόλης (acyl CoA cholesterol acyl transferase, ACAT) όπως φαίνεται και στο σχήμα 3 [17].

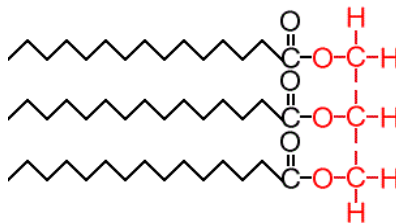


Σχήμα 3: Εστεροποίηση της χοληστερόλης μέσω του ενζύμου LCAT (πάνω) και ACAT (κάτω).

Η χοληστερόλη είναι απαραίτητη στη σύνθεση λιποπρωτεϊνών, στη πέψη των τροφών και ως πρόδρομο μόριο στην παραγωγή στεροειδών ορμονών. Διάφορες μελέτες έχουν αποδείξει την θετική συσχέτιση των επιπέδων της ολικής χοληστερόλης στο πλάσμα με την εμφάνιση πρώιμης στεφανιαίας νόσου [11].

2.2. Τριγλυκερίδια

Τα τριγλυκερίδια (triglycerides, TG) ή όπως αναφέρονται σήμερα τριακυλογλυκερόλες, είναι ουδέτερα λίπη, και το μόριό τους αποτελείται από ένα μόριο γλυκερόλης, ενωμένο με τρία μόρια ανώτερων λιπαρών οξέων (εικόνα 3). Τα τρία λιπαρά οξέα μπορούν να είναι όλα διαφορετικά μεταξύ τους, όλα τα ίδια, ή μόνο δύο από τα τρία να είναι ίδια, μπορούν ακόμα να είναι κορεσμένα ή ακόρεστα λιπαρά οξέα.



Εικόνα 3: Δομή τριγλυκεριδίου.

Τα μήκη των αλυσίδων των λιπαρών οξέων φυσικών τριγλυκεριδίων μπορούν να είναι ποικίλων μηκών με 16, 18 και 20 άνθρακες συνήθως. Τα φυσικά λιπαρά οξέα που βρίσκονται στα φυτά και τα ζώα αποτελούνται συνήθως μόνο από τους άρτιους αριθμούς ατόμων άνθρακα λόγω του τρόπου που είναι βιοσυντεθημένα.

Στον άνθρωπο, τα τριγλυκερίδια συντίθενται, κατά κύριο λόγο, μέσα στα ηπατικά κύτταρα (δηλαδή μέσα στο ήπαρ), καθώς και μέσα στα λιποκύτταρα, δηλαδή μέσα στα κύτταρα του λιπώδη ιστού του σώματος.

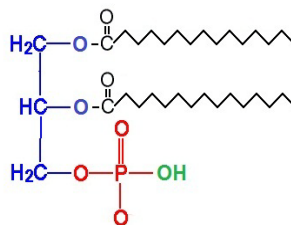
Τα τριγλυκερίδια παράγονται στον οργανισμό: α) από τα ίδια τα τριγλυκερίδια της τροφής είτε αυτά είναι φυτικής είτε είναι ζωικής προέλευσης, β) από τους υδατάνθρακες της τροφής και γ) από τις πρωτεΐνες. Η πέψη των τριγλυκεριδίων πραγματοποιείται σχεδόν αποκλειστικά μέσα στο λεπτό έντερο,

με την επίδραση ενός ισχυρού πεπτικού ενζύμου, της παγκρεατικής λιπάσης, που περιέχεται στο παγκρεατικό υγρό, με την απαραίτητη συνεργασία της χολής που προέρχεται από το ήπαρ.

Τα διασπασμένα τριγλυκερίδια μαζί με τη χοληστερόλη και τα φωσφολιποειδή που απορροφούνται από το έντερο, σχηματίζουν μικροσκοπικά σταγονίδια, τα οποία επικαλύπτονται με μια ειδική πρωτεΐνη που επίσης συντίθεται μέσα σ' αυτά τα κύτταρα, και με αυτό τον τρόπο σχηματίζονται τα χυλομικρά. Τα χυλομικρά φέρονται προς το αίμα με τη λέμφο. Με τον παραπάνω τρόπο, απορροφούνται τα 80 με 90% του λίπους που προσλαμβάνεται με την τροφή.

Άτομα με υψηλά επίπεδα τριγλυκεριδίων έχουν συχνά υψηλά επίπεδα ολικής χοληστερόλης, και LDL χοληστερόλης και χαμηλά επίπεδα HDL χοληστερόλης. Επίσης, συχνά άτομα με σακχαρώδη διαβήτη, παχυσαρκία ή στεφανιαία νόσο έχουν υψηλά επίπεδα τριγλυκεριδίων. Πολλές κλινικές μελέτες έδειξαν ότι άτομα με επίπεδα τριγλυκεριδίων πάνω από 200 mg/dL έχουν αυξημένο κίνδυνο στεφανιαίας νόσου [6].

2.3. Φωσφολιποειδή



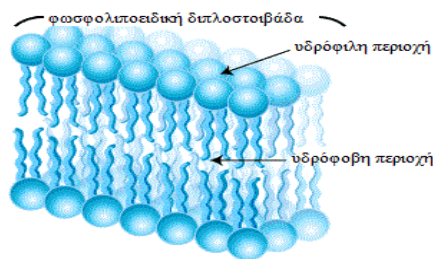
Εικόνα 4: Δομή φωσφολιποειδούς

Τα φωσφολιποειδή, που είναι πολικά λιποειδή, βρίσκονται σε μεγάλη συγκέντρωση σε όλες τις βιολογικές μεμβράνες. Τα φωσφολιποειδή [13] αποτελούνται από τέσσερα συστατικά: λιπαρά οξέα, ένα σκελετό αλκοόλης στον οποίο προσ-δένονται τα λιπαρά οξέα, μια φωσφορική ομάδα και μια βάση προσδεμένη στη φωσφορική ομάδα (εικόνα 4).

Τα λιπαρά οξέα σχηματίζουν έναν υδρόφοβο τμήμα, ενώ το υπόλοιπο μόριο έχει υδρόφιλο χαρακτήρα που του επιτρέπει να αλληλεπιδρά με

υδρόφιλο περιβάλλον. Ο σκελετός των φωσfolιποειδών μπορεί να είναι η γλυκερόλη, μια αλκοόλη τριών ανθράκων ή η σφιγγοσίνη μια πιο πολύπλοκη αμιν-αλκοόλη. Τα φωσfolιποειδή που προκύπτουν από τη γλυκερόλη ονομάζονται γλυκερινούχα φωσfolιποειδή ή φωσφογλυκερίδια.

Τα κύρια γλυκερινούχα φωσfolιποειδή είναι παράγωγα του φωσφατιδικού οξέος με εστεροποίηση της φωσφορικής ομάδας του με την υδροξυλική ομάδα μιας βάσης. Οι πιο κοινές βάσεις των γλυκερινούχων φωσfolιποειδών είναι της σερίνης, της αιθανολαμίνης, της χολίνης, της γλυκερόλης και της ινοσιτόλης [13].



Εικόνα 5: Κυτταρική μεμβράνη.

Οι μεμβράνες των κυτάρων αποτελούνται συνήθως από τα φωσfolιποειδή που διευθετούνται σε ένα διπλό στρώμα με τα λιπαρά οξέα να βρίσκονται στο «εσωτερικό» (δημιουργώντας ένα υδρόφοβο περιβάλλον) και τις πολικές κεφαλές τους - που είναι υδρόφιλες - να βρίσκονται προς τα «έξω» (προς το υδρόφιλο περιβάλλον) και στις δύο επιφάνειες (εικόνα 5).

Οι σημαντικότερες λειτουργίες των φωσfolιποειδών [11]:

- 1) Αποτελούν δομικά και λειτουργικά συστατικά των βιολογικών μεμβρανών
- 2) Αποτελούν πρόδρομες ενώσεις σημαντικών λειτουργικών μορίων στα κύτταρα
- 3) Διαδραματίζουν ενεργό βιολογικό ρόλο στον σχηματισμό των λιποπρωτεϊνών
- 4) Συμμετέχουν στη διαλυτοποίηση και στη μεταφορά των διαφόρων λιποειδών και
- 5) Αποτελούν επιφανειοδραστικές ουσίες στις κυψέλες των πνευμόνων.

2.4. Λιποπρωτεΐνες

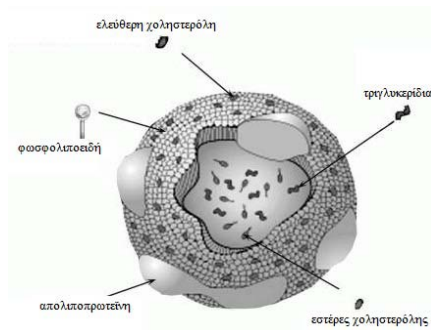
Τα λιποειδή, συχνά παρουσιάζονται συνδεδεμένα και με ενώσεις [13] που ανήκουν σε άλλες τάξεις βιομορίων (π.χ. η περίπτωση των γλυκολιποειδών, τα οποία είναι λιποειδή ενωμένα με υδατάνθρακες). Άλλη τάξη με την οποία βρίσκονται ενωμένα τα λιποειδή είναι οι πρωτεΐνες, με αποτέλεσμα να προκύπτουν (ανάλογα με το αν το κυρίαρχο τμήμα του μορίου είναι το λιποειδικό ή το πρωτεϊνικό) τα πρωτεολιποειδή και οι λιποπρωτεΐνες.

Σε αντίθεση με τις γλυκοπρωτεΐνες και τα γλυκολιποειδή, οι λιποπρωτεΐνες (και τα πρωτεολιποειδή) δεν έχουν κύριους χημικούς δεσμούς μεταξύ των λιποειδών και των πρωτεϊνών, αλλά αποτελούν σύμπλοκες ενώσεις, που σχηματίζονται από την εναπόθεση των λιποειδών πάνω σε ορισμένες πρωτεΐνες και οι οποίες σταθεροποιούνται με δευτερεύοντες δεσμούς (υδρόφοβους κ.λ.π.). Οι πεπτιδικές αλυσίδες του πρωτεϊνικού μέρους (το οποίο ονομάζεται απο-λιποπρωτεΐνη) των συμπλόκων των λιποπρωτεϊνών έχουν τις υδρόφιλες περιοχές στην εξωτερική επιφάνεια, ενώ τις υδρόφοβες περιοχές στο εσωτερικό.

Οι λιποπρωτεΐνες κατατάσσονται σε λιποπρωτεΐνες μεταφοράς (που η δυνατότητα να μεταβάλλουν τη σύστασή τους, τους επιτρέπει να μεταφέρουν λιποειδή) και σε λιποπρωτεΐνες μεμβρανών (που αποτελούν δομικά συστατικά των μεμβρανών).

Οι λιποπρωτεΐνες μεταφοράς βρίσκονται κυρίως στο πλάσμα του αίματος και οι βασικές τους δράσεις είναι: 1) η μεταφορά των λιποειδών με το αίμα από ιστό σε ιστό και 2) η συμμετοχή τους στο μεταβολισμό των λιποειδών [13].

Οι λιποπρωτεΐνες είναι υδατοδιαλυτά σφαιρικά σύμπλοκα μόρια με την εξής διάταξη των συστατικών τους [11]:



Εικόνα 6: Δομή λιποπρωτεΐνης [18].

α) Το εσωτερικό τους τμήμα, αποτελείται από εστεροποιημένη χοληστερόλη και τριγλυκερίδια και περιβάλλεται από στρώμα φωσφολιποειδών και ελεύθερης χοληστερόλης, διατεταγμένης με τα λιπόφιλα άκρα της προς το εσωτερικό και τα υδρόφιλα άκρα της προς την εξωτερική επιφάνεια (εικόνα 6).
 β) Το εξωτερικό τμήμα συνίσταται από απολιποπρωτεΐνες, των οποίων το τμήμα που είναι πλούσιο σε μη πολικά αμινοξέα διεισδύει στο εσωτερικό των λιποπρωτεϊνών και το τμήμα που είναι πλούσιο σε πολικά αμινοξέα βρίσκεται στην εξωτερική επιφάνεια και σε επαφή με το υδατικό περιβάλλον.

Οι λιποπρωτεΐνες ταξινομούνται είτε με βάση την πυκνότητά τους, είτε με βάση την ηλεκτροφορητική τους κινητικότητα.

Ταξινόμηση των λιποπρωτεϊνών με βάση την πυκνότητα [11, 13]:

- 1) *Χυλομικρά*, μεταφέρουν τα λιποειδή της τροφής (δηλαδή τα εξωγενή λιποειδή) από το έντερο στους ιστούς. Σχηματίζονται στο βλεννογόνο του εντέρου και με το λεμφικό σύστημα μεταφέρονται στο αίμα, από όπου παραλαμβάνονται από τους μύες και το λιπώδη ιστό. Εκεί, με τη δράση της λιποπρωτεϊνικής λιπάσης που ενεργοποιείται από την απολιποπρωτεΐνη CII, υδρολύονται σε μεγάλο βαθμό τα τριγλυκερίδιά τους και επανέρχονται στη κυκλοφορία με τη μορφή των λιποπρωτεϊνών, οι οποίες τελικά προσλαμβάνονται από το ήπαρ.
- 2) *Πολύ χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνες* (Very Low Density Lipoproteins, VLDL), παράγονται στα ηπατικά κύτταρα και μεταφέρουν τα ενδογενή τριγλυκερίδια από το ήπαρ στους ιστούς και κυρίως στο λιπώδη ιστό.

- 3) *Ενδιάμεσης πυκνότητας λιποπρωτεΐνες* (Intermediate Density Lipoproteins, IDL) προέρχονται από τις VLDL που με τη δράση της λιποπρωτεϊνικής λιπάσης, απομακρύνονται τα λιπαρά οξέα και μετατρέπονται σε IDL.
- 4) *Χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνες* (LDL), προέρχονται από τις VLDL και μεταφέρουν την χοληστερόλη στους ιστούς. Αν οι LDL τροποποιηθούν (οξειδωθούν) πυροδοτούν την αθηρογένεση. Πολλοί ερευνητές πιστεύουν ότι η οξειδωμένη LDL είναι από τις πλέον αθηρογόνες λιποπρωτεΐνες. Τα μόρια των LDL είναι μικρά και πλούσια σε χοληστερόλη και εισέρχονται ευκολότερα από τις άλλες λιποπρωτεΐνες στο αρτηριακό τοίχωμα.
- 5) *Υψηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνες* (HDL), παράγονται από το ήπαρ και το έντερο σε πρόδρομη μορφή και με την προσθήκη της χοληστερόλης μετεξελίσσονται σε ώριμες HDL. Κύριος ρόλος τους είναι να επαναφέρουν από τους ιστούς στο ήπαρ την περίσσεια της ενδογενούς χοληστερόλης, μια διαδικασία που ονομάζεται ανάστροφη μεταφορά της χοληστερόλης (θα αναφερθεί εκτενέστερα σε επόμενη ενότητα).

2.5. Απολιποπρωτεΐνες

Τα πρωτεϊνικά συστατικά των λιποπρωτεϊνικών μορίων λέγονται απολιποπρωτεΐνες. Αποτελούν ειδική ομάδα πρωτεϊνών που συνδέονται με τα λιποειδή και συμμετέχουν σε διάφορα βήματα του μεταβολισμού τους. Διακρίνονται σε ανταλλασσόμενες και μη ανταλλασσόμενες απολιποπρωτεΐνες.

Οι κύριες λειτουργίες τους είναι οι εξής: α) μεταφέρουν τα λιποειδή στο πλάσμα, β) διεγείρουν ένζυμα που αποικοδομούν λιποειδή του πλάσματος και γ) εμπεριέχουν τα προσδεδεμένα μόρια που συμμετέχουν στη σύνδεση των λιποπρωτεϊνών με τους υποδοχείς που υπάρχουν στις βιολογικές μεμβράνες.

Οι ανταλλασσόμενες απολιποπρωτεΐνες είναι αυτές που μετακινούνται μεταξύ των λιποπρωτεϊνών κατά τη διάρκεια του μεταβολισμού. Σε αυτές ανήκουν οι απολιποπρωτεΐνες: A, C, D, E, F, G, H, J, L, M και (a). Ενώ στις μη ανταλλασσόμενες απολιποπρωτεΐνες ανήκει η απολιποπρωτεΐνη B.

Συγκεκριμένα, η απολιποπρωτεΐνη A είναι η κύρια απολιποπρωτεΐνη των μορίων της HDL και διαδραματίζει σπουδαίο ρόλο στην πρόληψη της αθηρογένεσης. Η ομάδα αυτή συμπεριλαμβάνει τρεις υποομάδες: την AI, την AII και την AIV. Η απολιποπρωτεΐνη AI ρυθμίζει την συγκέντρωση της απολιποπρωτεΐνης C στις HDL, ενεργοποιεί την LCAT και σταθεροποιεί την πρωτεΐνη ABCA1 (ATP-binding cassette transporter A1) [11].

Κεφάλαιο 3: Παράγοντας Ενεργοποίησης Αιμοπεταλίων

3.1. Εισαγωγή

Ο Παράγοντας Ενεργοποίησης Αιμοπεταλίων (PAF, Platelet Activating Factor) είναι από τα πιο σημαντικά φωσφολιποειδή, το οποίο είναι βιολογικά δραστικό και αποτελεί έναν χημικό μεσολαβητή.

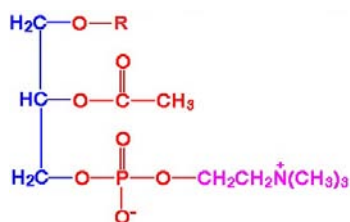
Οι Barbaro και συν. [19] το 1966 υπέδειξαν έναν μηχανισμό ο οποίος εξαρτιόταν από τα λευκοκύτταρα και μπορούσε να προκαλεί έκκριση ισταμίνης από τα αιμοπετάλια κουνελιού. Το 1970 ο Henson [20] απέδειξε ότι ο μηχανισμός αυτός οφειλόταν σε ένα διαλυτό παράγοντα, ευδιάλυτο σε οργανικούς διαλύτες ο οποίος εκλυόταν κατά την επίδραση αντιγόνου σε λευκοκύτταρα ευαισθητοποιημένου (στο αντιγόνο αυτό) ζώου και ο οποίος είχε την ικανότητα να ενεργοποιεί τα αιμοπετάλια. Το 1971 οι Siraganian και Olser έδειξαν ότι ο παράγοντας αυτός δεν ελευθερώνεται από όλους τους τύπους λευκοκυττάρων, αλλά μόνο από τα βασεόφιλα (περίπου το 1% των λευκοκυττάρων) [21]. Το 1972 οι Benveniste και συν. [22] και ονόμασε αυτόν τον βιολογικό παράγοντα ως Παράγοντα Ενεργοποίησης Αιμοπεταλίων (PAF). Τα επόμενα χρόνια το μόριο αυτό μελετήθηκε εκτενώς και περιγράφηκαν οι φυσικοχημικές του ιδιότητες [23], καθώς συσχετίστηκε με την υπερευαισθησία τύπου I και το αναφυλακτικό σοκ [24-26]. Το 1979 οι Demopoulos και συν. [27] απέδειξαν τη δομή του PAF και τον παρασκεύασαν ημισυνθετικά. Την ίδια περίπου περίοδο, και άλλες ομάδες που εργάζονταν στο ίδιο θέμα δημοσίευσαν ανάλογα αποτελέσματα για την δομή του PAF [28-30]. Ένα χρόνο αργότερα, οι Hanahan και συν. [31] απέδειξαν τη δομή του φυσικά παραγόμενου PAF (από την *in vitro* βιοσύνθεσή του από βασεόφιλα κουνελιού) η οποία ήταν όμοια με τη δομή του συνθετικά παραγόμενου PAF.

Η μελέτη του PAF συνεχίστηκε μέχρι και σήμερα καθώς εμπλέκεται σε παθολογικές και μη καταστάσεις. Έχει βρεθεί ο υποδοχέας του σε πολλά κύτταρα, οι μεταβολικές πορείες βιοσύνθεσης και αποικοδόμησης του και μελετώνται εκτεταμένα και τα ένζυμα που συμμετέχουν σε αυτές τις πορείες.

Επίσης, έχουν μελετηθεί τα επίπεδα του PAF σε βιολογικά δείγματα ανθρώπου σε φυσιολογικές και παθολογικές καταστάσεις ώστε να γίνει συσχέτιση με διάφορες ασθένειες.

3.2. Χημική δομή του PAF

Ο PAF ο οποίος έχει προσδιοριστεί χημικά ως 1-Ο-αλκυλο-2-ακετυλο-*sn*-γλυκερο-3-φωσφοχολίνη (1-O-alkyl-2-acetyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine) [27] αντιπροσωπεύει μια τάξη εξαιρετικά δραστικών μεσολαβητών των λιπιδίων. Παράγεται και απελευθερώνεται από διάφορα κύτταρα όπως λευκοκύτταρα, λεμφοκύτταρα, ενδοθηλιακά κύτταρα, νευρώνες, μυϊκά κύτταρα, ηπατικά κύτταρα [32]. Ο φυσικά παραγόμενος PAF αποτελείται από μία μεγάλη ομάδα δομικά όμοιων, *sn*-2 ακετυλιωμένων φωσφογλυκεριδίων, που διαφέρουν κυρίως στο μήκος, τη δομή και τον τρόπο σύνθεσης της ανθρακικής αλυσίδας στην πρώτη θέση του γλυκερινικού σκελετού. Η μοριακή σύνθεση του φυσικά παραγόμενου PAF εξαρτάται τόσο από το είδος του κυττάρου ή ιστού που παράγει τον PAF όσο και από τη φύση της διέγερσης που προκαλείται για την παραγωγή του.



Εικόνα 7: Δομή του PAF.

Το 1980 βρέθηκε ότι ο PAF στην *sn*-1 θέση του γλυκερινικού σκελετού περιέχει δύο είδη ανθρακικών αλυσίδων με 16 και 18 άτομα άνθρακα σε ποσοστό 10% και 90%, αντίστοιχα [31]. Όσο περισσότερο αναπτύχθηκαν οι μέθοδοι διαχωρισμού των φωσφολιπιδίων και προσδιορισμού του PAF, ανιχνεύθηκε η ύπαρξη και άλλων ειδών ανθρακικής αλυσίδας σε αυτή τη θέση όπως: 12:2, 14:0, 15:0, 16:0, 16:1, 16:2, 17:0, 17:1, 18:0, 18:1, 18:2, 19:0, 19:1, 20:0, και 22:0 [33, 34, 35]. Στην *sn*-1 θέση του γλυκερινικού σκελετού

εκτός από αλκυλο-ανάλογα του PAF, βρέθηκαν και ακυλο-ανάλογα του PAF με δομή 14:0, 16:0, 16:1, 18:0 και 18:1 [36].

Στην *sn*-2 θέση του γλυκερινικού σκελετού βρίσκεται εστεροποιημένο ένα οξικό οξύ, το οποίο είναι υπεύθυνο για τη μοναδικότητα που χαρακτηρίζει τον PAF, καθώς και για την βιολογική του δραστηριότητα. Όταν απομακρυνθεί η ακετυλο-ομάδα τότε προκύπτει ένα λυσο-παράγωγο (Lyso-PAF) που είναι ανενεργό. Τέλος, στην *sn*-3 θέση του σκελετού υπάρχει η φωφορυλοχολίνη και η οποία προσδίδει την μεγαλύτερη δραστηριότητα στο μόριο του PAF [37].

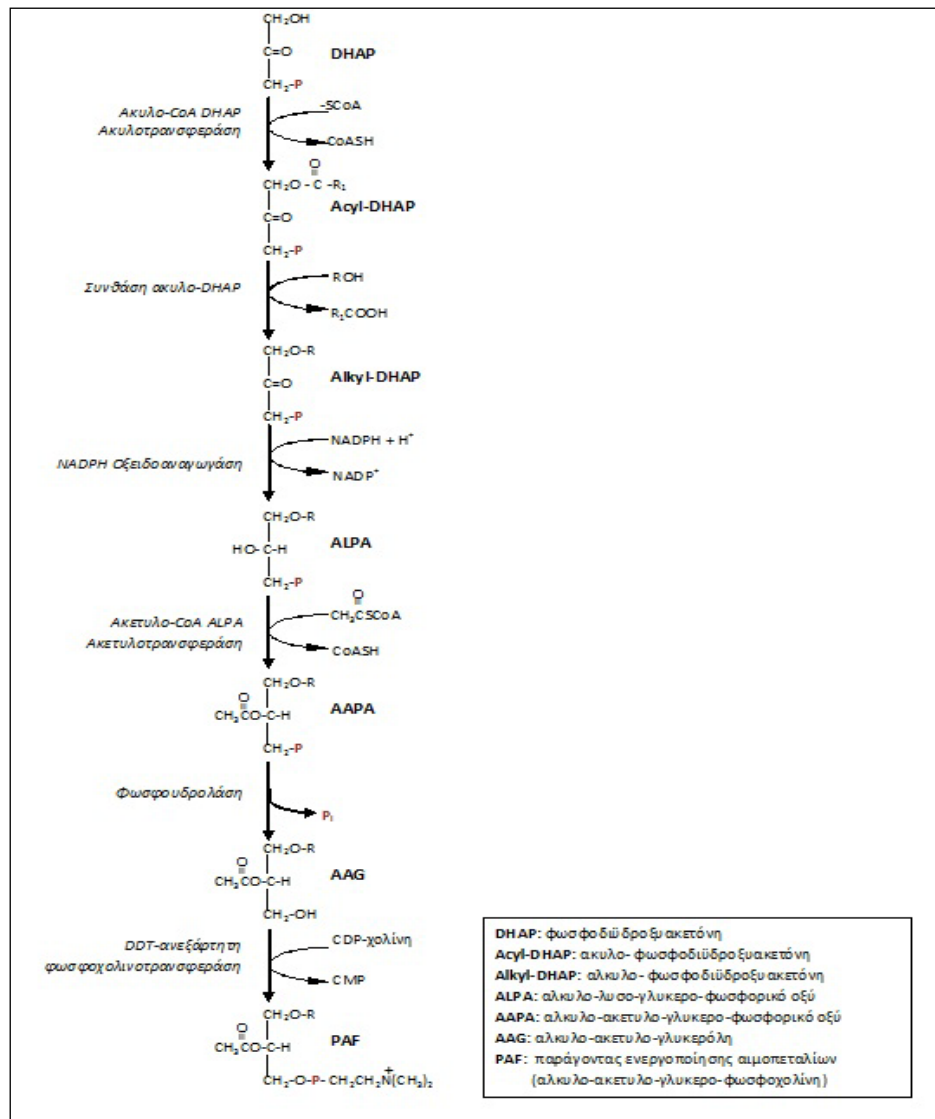
3.3. Βιοσύνθεση του PAF [38-42]

Η βιοσύνθεση του PAF μπορεί να γίνει μέσα από δύο πορείες είτε α) από την κλασική *de novo* πορεία βιοσύνθεσης των γλυκεριναιθερικών αναλόγων, ξεκινώντας από φωσφοδιυδροξυακετόνη (DHAP), είτε β) από την πορεία αναδιαμόρφωσης (remodeling) ξεκινώντας από το γλυκεριναιθερικό ανάλογο της φωφατιδυλοχολίνης (GEPc) το οποίο τροποποιείται με απακυλίωση και στη συνέχεια με ακετυλίωση.

3.3.1. *De novo* βιοσύνθεση

Σύμφωνα με το σχήμα 4, η DHAP μετατρέπεται σε ακυλο-DHAP με την δράση του ενζύμου ακυλο-CoA: DHAP ακυλοτρανσφεράση. Στη συνέχεια η ακυλο-ομάδα της ακυλο-DHAP αντικαθίσταται από μία αλειφατική ανθρακική αλυσίδα μιας λιπαρής αλκοόλης η οποία ενώνεται με αιθερικό δεσμό στην DHAP για να σχηματιστεί η 1-αλκυλο-φωφο-διυδροξυακετόνη (αλκυλο-DHAP). Επόμενο βήμα είναι η αναγωγή της αλκυλο-DHAP μέσω της NADPH οξειδοαναγωγής προς σχηματισμό του 1-αλκυλο-2-λυσο-*sn*-γλυκερο-3-φωσφορικού οξέος (ALPA). Στη συνέχεια, λαμβάνει χώρα ακετυλίωση στην *sn*-2 θέση του γλυκερινικού σκελετού 1-αλκυλο-2-ακετυλο-*sn*-γλυκερο-3-φωσφορικού οξέος (AAPA) με τη βοήθεια του ενζύμου ακετυλοτρανσφεράση

του ακετυλο-CoA. Ακολουθεί φωσφορόλυση στην sn-3 θέση με την δράση του ενζύμου φωσφοϋδρολάση του AAPA, που υδρολύει την φωσφορική ομάδα.

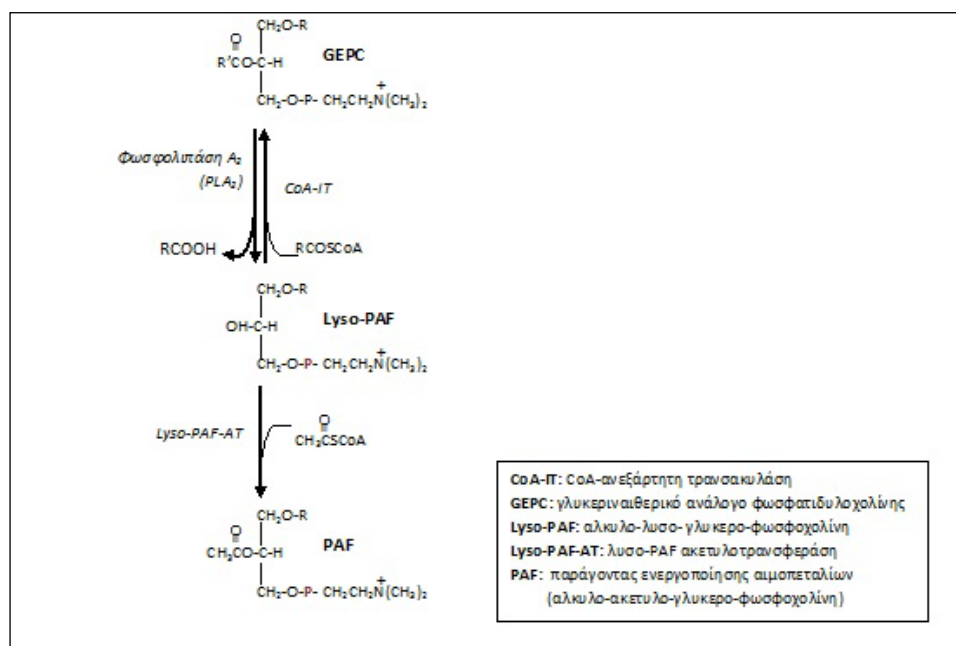


Σχήμα 4: Η *de novo* βιοσύνθεση του PAF.

Τέλος, με την βοήθεια μιας DTT ανεξάρτητης φωσφοχολινοτρανσφεράσης του PAF (PAF-CPT) μεταφέρεται η ομάδα της φωσφοχολίνης ενεργοποιημένης υπο την μορφή κυτιδυλο-διφωσφο-χολίνης (CDP-χολίνης) στη θέση 3 και έτσι ολοκληρώνεται η *de novo* βιοσύνθεση του PAF. Η ενεργοποίηση της PAF-CPT είναι το καθοριστικό στάδιο αυτής της πορείας.

3.3.2. Πορεία αναδιαμόρφωσης (remodeling πορεία) [38]

Η remodeling βιοσύνθεση του PAF από αλκυλο-ακυλο-GEPC με διαδοχικές δράσεις της φωσφολιπάσης A_2 (phospholipase A_2 , PLA_2) και της ακετυλοτρασφεράσης του PAF (Lyso-PAF-AT) αποτελεί το ήμισυ του κύκλου απακυλίωσης-επανακυλίωσης του PAF, όπως φαίνεται και στο σχήμα 5. Η βιοσυνθετική αυτή πορεία εξαρτάται από τη διέγερση του κυττάρου. Η δράση των ενζύμων που συμμετέχουν σε αυτή την πορεία απαιτεί την παρουσία Ca^{2+} .



Σχήμα 5: Η πορεία αναδιαμόρφωσης (remodeling) του PAF.

Η πρόδρομη ένωση στην πορεία αυτή είναι το γλυκερινικό ανάλογο της φωσφατιδυλο-χολίνης, το οποίο στη *sn*-2 θέση του γλυκερινικού σκελετού έχει μια λιπαρή αλυσίδα μεγάλου μήκους. Με διέγερση του κυττάρου ενεργοποιείται η PLA_2 που βρίσκεται στη κυτταρική μεμβράνη και η οποία απακυλώνει την αλκυλο-ακυλο-GEPC και την μετατρέπει σε 1-Ο-αλκυλο-2-λυσω-γλυκερο-3-φωσφοχολίνη (λυσω-PAF). Στη συνέχεια, η Lyso-PAF-AT μεταφέρει την ακετυλομάδα ενεργοποιημένη σαν ακετυλο-CoA στον λυσω-PAF. Το τελευταίο στάδιο ρυθμίζει την ταχύτητα της βιοσύνθεσης.

Ένα από τα κυριότερα λιπαρά οξέα που βρίσκονται εστεροποιημένα στην *sn*-2 θέση του γλυκερινικού σκελετού της αλκυλο-ακυλο-GEPC, είναι το

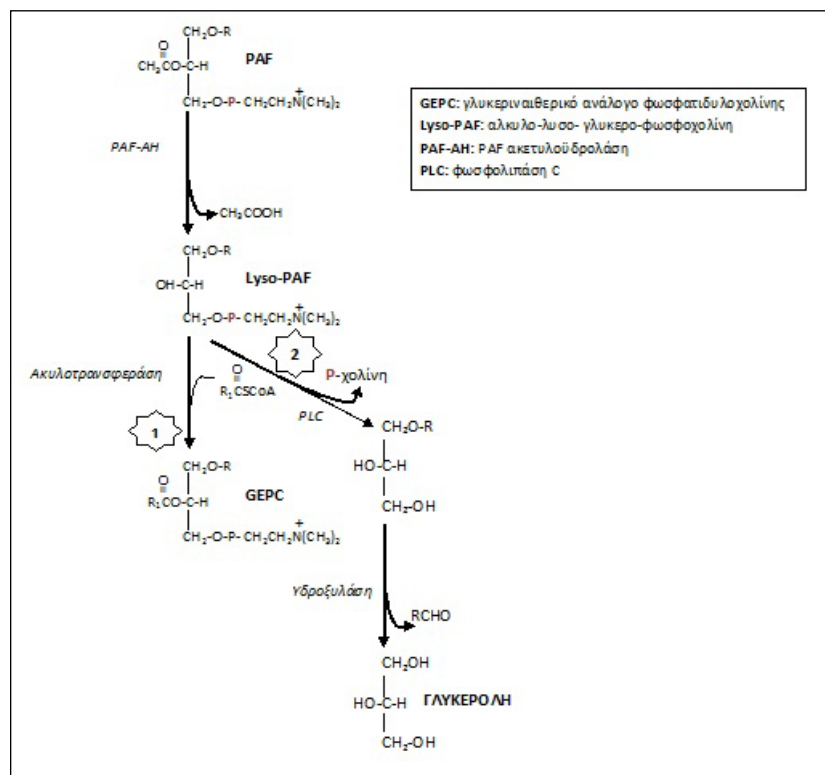
αραχιδονικό οξύ (AA). Έτσι η αλκυλο-ακυλο-GEPC εκτός από πρόδρομη ένωση για τον σχηματισμό του PAF, αποτελεί και εξαιρετική πηγή για το αραχιδονικό οξύ και τους μεταβολίτες του. Η δράση της PLA₂ (κατά συνέπεια και η βιοσύνθεση του PAF) εξαρτάται εκτός από Ca²⁺ και από την παρουσία ζυμοζάνης και ιονοφόρου A23187.

Ο λυσο-PAF που παράγεται καθώς ενεργοποιείται η PLA₂ με την κατάλληλη διέγερση του κυττάρου μπορεί να ακυλιωθεί με μία ακυλοτρανσφεράση ή να ακετυλιωθεί με την Lyso-PAF-AT, η οποία αποτελεί το ένζυμο-κλειδί της remodeling βιοσυνθετικής πορείας του PAF.

Γενικά, έχει προταθεί ότι η *de novo* πορεία συμβάλλει κυρίως στην βιοσύνθεση του PAF για την διατήρηση των βασικών του επιπέδων κάτω από φυσιολογικές καταστάσεις, ενώ η remodeling πορεία εμπλέκεται περισσότερο στην παραγωγή PAF κατά την διάρκεια φλεγμονώδους απόκρισης [39, 40].

3.4. Αποικοδόμηση του PAF [38, 43-46]

Η αποικοδόμηση του PAF στα κύτταρα και στο κυτταρικό περιβάλλον περιλαμβάνει την απομάκρυνση της ακετυλομάδας με τη δράση της ακετυλοϋδρολάσης προς σχηματισμό του λυσο-PAF, ο οποίος είναι βιολογικά αδρανής. Στη συνέχεια υπάρχουν δυο πορείες που μπορεί να συμβούν. Η πρώτη όπως φαίνεται και στο σχήμα 6 είναι να ακυλιωθεί ο λυσο-PAF με τη δράση της ακυλοτρανσφεράσης ώστε να σχηματιστεί η GEPC. Εναλλακτικά, ο λυσο-PAF μέσω της φωσφολιπάσης C (PLC) μετατρέπεται σε γλυκεριναιθερικό ανάλογο μονογλυκεριδίου και έπειτα μέσω μιας υδροξυλάσης σχηματίζεται γλυκερόλη και αλδεΐδη. Σε αντίθεση με την βιοσυνθετική πορεία, η πορεία αποικοδόμησης του PAF είναι ανεξάρτητη από τη διέγερση του κυττάρου.



Σχήμα 6: Η αποικοδόμηση του PAF.

Το ένζυμο-κλειδί στην αποικοδομητική πορεία είναι η PAF-ακετυλοϋδρολάση (PAF-AH) η οποία καταλύει την υδρόλυση του εστερικού δεσμού στην *sn*-2 θέση του PAF αλλά και των σχετικών προφλεγμονωδών φωφολιποειδών (οξειδωμένων φωσφολιποειδών, δομικών αναλόγων του PAF με μικρή ανθρακική αλυσίδα στην θέση *sn*-2) μειώνοντας την βιοδραστικότητά τους. Η PAF-AH του πλάσματος ονομάζεται και Lp-PLA₂ (Lipoprotein-associated PLA₂) γιατί συνδέεται με τις λιποπρωτεΐνες (κύριως με τις LDL και λιγότερο με τις HDL) για να μεταφερθεί [48].

3.5. Βιοσυνθετικά και αποικοδομητικά ένζυμα

Από τα ένζυμα που λαμβάνουν χώρα κατά τη βιοσύνθεση και αποικοδόμηση του PAF, στη βιοσύνθεση με την *de novo* πορεία το ένζυμο - κλειδί είναι η PAF-CPT, ενώ με τη remodeling πορεία το ένζυμο που την

καθορίζει είναι η Lyso-PAF-AT. Στην αποικοδόμηση του PAF το ένζυμο που έχει πρωταρχικό ρόλο είναι η PAF-AH.

3.5.1. PAF-CPT [48]

Το ρυθμιστικό ένζυμο-κλειδί της *de novo* βιοσυνθετικής πορείας, η PAF-CPT, κατανέμεται ευρέως στους ιστούς των θηλαστικών και βρίσκεται στην κυτταροπλασματική επιφάνεια του ενδοπλασματικού δικτύου [40]. Έχει βρεθεί σε μια ποικιλία ιστών αρουραίου [39-40, 49-50] και παρουσιάζει την υψηλότερη δραστικότητα στην σπλήνα, τους πνεύμονες, το ήπαρ, τους νεφρούς. Ακόμα, έχουν βρεθεί σημαντικές ποσότητες της PAF-CPT σε ανθρώπινα καρκινικά νεφροκύτταρα [51], σε σπλήνα χοίρου [52], καθώς και σε ανθρώπινα ουδετερόφιλα, στον ανθρώπινο εγκέφαλο, στους πνεύμονες έμβριου κουνελιού, σε μη γονιμοποιημένα ωοκύτταρα ποντικών [40, 53].

Παρόλο που η δραστικότητα του διαλυτοποιημένου ενζύμου είναι σχετικά σταθερή, περαιτέρω καθαρισμός με διαδοχική χρωματογραφία προκάλεσε μια αξιοσημείωτη μείωση στη δραστικότητα του ενζύμου. Αυτή η μείωση της δραστικότητας διορθώθηκε εν μέρει από την προσθήκη φωσφολιποειδών όπως φωσφατιδυλοχολίνη αυγού [52]. Αντίθετα, το διελαύλο-φωσφατιδικό οξύ (dioleoylphosphatidic acid, DOPA) και τα λυσοφωσφολιποειδή δρούν ανασταλτικά στην ενζυμική δραστικότητα της PAF-CPT [52].

Το μοριακό βάρος της PAF-CPT, που διαλυτοποιήθηκε από μικροσωμάτια σπλήνας χοίρου, ήταν 440 kD με βάση τη χρωματογραφία στήλης. Με αυτό τον τρόπο, αποδείχθηκε ότι το ένζυμο αυτό σχηματίζει ένα σύμπλεγμα με άλλα πρωτεϊνικά μόρια και μεμβρανικά φωσφολιποειδή, τα οποία είναι απαραίτητα για την διατήρηση της δραστικότητας του ενζύμου [52].

Η PAF-CPT που εμπλέκεται και στη σύνθεση της φωσφατιδυλοχολίνης (phosphatidylcholine, PC) όπως και η φωσφοχολινοτρανσφεράση (PC-cholinephosphotransferase, PC-CPT), έχουν αρκετά κοινά χαρακτηριστικά. Ωστόσο, υπάρχουν και σημαντικές διαφορές μεταξύ αυτών των δύο ενζύμων

λαμβάνοντας υπόψιν και την συμπεριφορά τους στα αποδιατακτικά μόρια, την διθειοθρεϊτόλη (dithiothreitol, DTT), την αιθανόλη και το pH [40].

Η *de novo* πορεία και συγκεκριμένα η PAF-CPT, ενδεχομένως να συμβάλει σε συστηματικές διαταραχές όπως ο καρκίνος [51] και η ανεπάρκεια του κεντρικού νευρικού συστήματος [49], μέσω μιας ελαφράς και μακροπρόθεσμης βελτίωσης της δραστηριότητας του ενζύμου, με πιθανό αποτέλεσμα την σταθερή αύξηση των επιπέδων του PAF.

3.5.2. Lyso-PAF-AT [54]

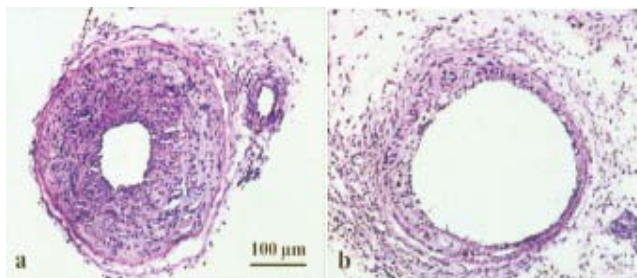
Το τελευταίο βήμα της remodeling πορείας, η οποία ενεργοποιείται σε καταστάσεις φλεγμονής, καταλύεται από το ένζυμο ακετυλο-CoA: 1-O-αλκυλο-*sn*-γλυκερο-3-φωσφοχολίνη ακετυλοτρανσφεράση (Lyso-PAF-AT), η οποία μεταφέρει μια ακετυλομάδα στην *sn*-2 θέση του λυσο-PAF. Η Lyso-PAF AT δρα στο κλάσμα των μικροσωμάτων σε μια ποικιλία ιστών [55] και στα ερυθροκύτταρα [56, 57]. Το ένζυμο αυτό είναι μια μικροσωμική πρωτεΐνη 60kDa με τρεις εκτεινόμενες μεμβρανικές περιοχές [58].

Η ειδικότητα του υποστρώματος για της Lyso-PAF-AT είναι ευρεία αφού η 1- ακυλο- 2- λυσογλυκεροφωσφοχολίνη, η 1- αλκυλο- 1-ενυλο- 2- λυσογλυκεροφωσφοχολίνη και άλλα ανάλογα μπορούν να λειτουργήσουν ως υποστρώματα. Όμοια, μικρής αλυσίδας ακυλο-CoA (από 2 μέχρι 6 άτομα άνθρακα) μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως υποστρώματα για την ακετυλοτρανσφεράση [59]. Έχει διαπιστωθεί ότι τα ιόντα Ca^{2+} είναι απαραίτητα για τη δραστηριότητα της Lyso-PAF-AT, αν και υπάρχουν και αντικρουόμενα στοιχεία [55, 60, 61]. Η Lyso-PAF-AT ενεργοποιείται /απενεργοποιείται από έναν μηχανισμό φωσφορυλίωσης-αποφωσφορυλίωσης [62-67]. Στη φωσφορυλίωση του ενζύμου συμμετέχουν μία εξαρτώμενη από AMP πρωτεϊνική κινάση C και μία κινάση p38.

3.5.3. PAF-AH [68]

Ένας μεγάλος αριθμός εργασιών είχε δημοσιευθεί μέχρι να γίνει η ανακάλυψη η PAF-AH στο πλάσμα και η αύξηση της δραστικότητάς της στο πλάσμα με τη συσχέτιση με αυξημένο κίνδυνο εκδήλωσης διαφόρων καρδιαγγειακών νόσων [69, 70]. Αυτό οδήγησε πολλούς ερευνητές να προτείνουν τη χρήση της PAF-AH του πλάσματος ως βιοδείκτης για την αξιολόγηση του μελλοντικού κινδύνου για στεφανιαία νόσο. Μέχρι στιγμής δεν είναι ακόμα γνωστό αν η PAF-AH του πλάσματος είναι αιτιολογικός παράγοντας για στεφανιαία νόσο ή αν είναι ένας δείκτης φλεγμονής. Η βιολογική λειτουργία της PAF-AH του πλάσματος στην ανάπτυξη της στεφανιαίας νόσου είναι αμφιλεγόμενη, καθώς της έχουν προσδοθεί ο αντι- και προ-φλεγμονώδης ρόλος.

Η PAF-AH του πλάσματος θεωρείται ότι είναι αντιφλεγμονώδης λόγω της ικανότητάς της να υδρολύει τον PAF και τα βιοενεργά και προφλεγμονώδη οξειδωμένα φωσφολιποειδή που παράγονται κατά την οξείδωση της LDL. Το ένζυμο βρίσκεται εκεί για να παίξει προστατευτικό ρόλο στην στεφανιαία νόσο, προλαμβάνοντας την δημιουργία/ενσωμάτωση αυτών των βιοενεργών μορίων στην LDL. Αυτή η συσχέτιση είναι η φυσιολογική απόκριση σε αυξημένη αγγειακή φλεγμονή. Η άποψη ότι η φλεγμονή αυτή μπορεί να προκαλείται από τον φλεγμονώδη παράγοντα PAF, ενισχύεται από την παρατήρηση της μείωσης της αθηροσκλήρωσης σε αορτή ποντικού με ανεπάρκεια σε Aro E (όπου αναπτύσσει αυθόρμητα αθηροσκλήρωση) μετά από επιμόλυνση του ποντικού με ανθρώπινο γονίδιο PAF-AH όπως φαίνεται και στην εικόνα 8 [71].

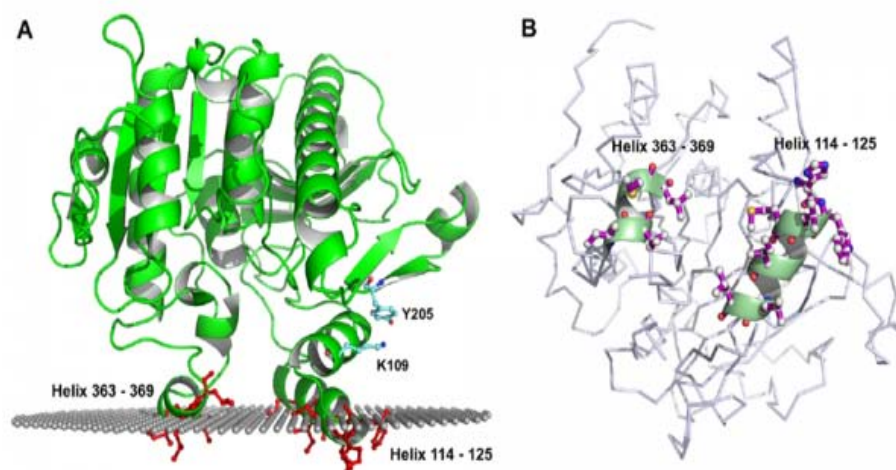


Εικόνα 8: α) **Ανεπάρκεια σε Aro E.** Η αορτή ποντικού με ανεπάρκεια σε Aro E αναπτύσσει αυθόρμητα αθηροσκλήρωση, β) **Αναστολή βλάβης.** Η βλάβη αναστέλλεται μετά από επιμόλυνση του ποντικού με ανθρώπινο γονίδιο PAF-AH [71].

Από την άλλη μεριά, η υδρόλυση των βιοενεργών μορίων από την PAF-AH του πλάσματος έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό λυσοφωσφατιδυλοχολίνης και οξειδωμένων μη εστεροποιημένων λιπαρών οξέων. Αυτά τα μόρια έχουν αποδειχθεί ότι είναι άκρως προ-αθηρογόνοι φλεγμονώδη μεσολαβητές [72-75]. Πιστεύεται ότι η PAF-AH του πλάσματος που λαμβάνει μέρος στην υδρόλυση, προκαλεί την συσσώρευση αυτών των μορίων και προάγει την ανάπτυξη αθηρωματικών πλακών.

Μια άποψη που υπάρχει, είναι ότι μόνο η PAF-AH του πλάσματος που είναι ενωμένη με την LDL δρα προαθηρωματικά, ενώ η PAF-AH που είναι ενωμένη με την HDL δρα αντι-αθηροσκληρωτικά. Είναι κατανοητό ότι οι περιοχές του ενζύμου PAF-AH που αλληλεπιδρούν με τις LDL και τις HDL, είναι διαφορετικές. Ωστόσο, δεν είναι ακόμα γνωστό ο τρόπος με τον οποίο αυτές οι δύο περιοχές συμμετέχουν για την αλληλεπίδραση τους με τα μόρια των LDL και HDL.

Οι Srinivasan και συν. [68] ανέπτυξαν ένα μοντέλο της PAF-AH για το πώς συνδέεται σε μια λιποειδική επιφάνεια χρησιμοποιώντας τη μέθοδο του προσανατολισμού των πρωτεϊνών στις μεμβράνες (Orientation of Proteins in Membranes, OPM) [76, 77]. Στην εικόνα 9 φαίνονται οι δύο περιοχές του ενζύμου που συνδέονται με τα δύο είδη λιποπρωτεϊνών.



Εικόνα 9: Αναπαράσταση της PAF-AH. A) Η πρωτεϊνική δομή της PAF-AH και B) Οι δύο λειτουργικές περιοχές μέσω των οποίων συνδέεται με τις λιποπρωτεΐνες [68].

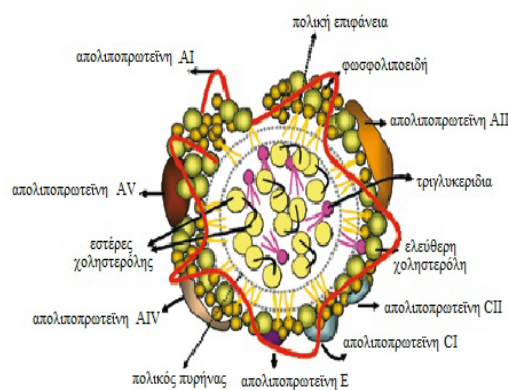
Οι δύο α-ελικάσες της PAF-AH του πλάσματος είναι πλούσιες σε υδρόφοβα αμινοξέα και προτιμούν να αλληλεπιδρούν με τα μονοστρωματικά φωσφολιποειδή των μορίων LDL και HDL. Ένα σύμπλεγμα από αρνητικά φορτισμένα αμινοξέα που υπάρχουν στην PAF-AH, είναι υπεύθυνα για την αλληλεπίδραση με τα πρωτεϊνικά συστατικά (apo B100) των LDL μορίων.

Κεφάλαιο 4: Λιποπρωτεΐνη HDL

Όπως έχει ήδη αναφερθεί η λειτουργία των λιποπρωτεϊνών είναι να μεταφέρουν τη χοληστερόλη και τα τριγλυκερίδια στο αίμα. Η πρώτη σύνδεση μεταξύ της χοληστερόλης και αθηροσκλήρωσης έγινε από Γερμανούς επιστήμονες το 1910. Στα μέσα της δεκαετίας του '50 ο John W. Gofman, MD, σε ένα Πανεπιστήμιο της Καλιφόρνιας και ο βιοφυσικός Berkley, παρατήρησε ότι τα υψηλά επίπεδα της HDL χοληστερόλης συνδέθηκαν με το μειωμένο κίνδυνο εμφάνισης καρδιακών επεισοδίων. Η μελέτη Framingham Heart Study το 1977 [5] συσχέτισε τα χαμηλά επίπεδα της HDL χοληστερόλης με παράγοντα κινδύνου για την εμφάνιση στεφανιαίας νόσου.

4.1. Φυσιολογία της HDL

Τα μόρια της HDL περιλαμβάνουν έναν ετερογενή πληθυσμό σωματιδίων που ποικίλλουν στο μέγεθος, την πυκνότητα, στην ηλεκτροφορητική κινητικότητα, την απολιποπρωτεϊνική σύσταση, τη μορφολογία και τη λειτουργία τους. Αυτή η ποικιλία αντανακλά τα πολλαπλά στάδια ωρίμανσης και αναδιοργάνωσης που περνούν οι HDL μόρια κατά τον μεταβολισμό τους.



Εικόνα 10: Δομή HDL μορίου [7].

Το μόριο της HDL αποτελείται από: απολιποπρωτεΐνες, που καταλαμβάνουν το 50% του μορίου (με την AI σε μεγαλύτερο ποσοστό, από

τις AII, CI, CII, CIII, E και J), 20% από ελεύθερη χοληστερόλη (free cholesterol) και εστεροποιημένη χοληστερόλη (esterified cholesterol), 15% από φωσφολιποειδή (phospholipids) και 5% από τριγλυκερίδια (triglycerides). Με υπερφυγοκέντρωση τα μόρια της HDL διαχωρίζονται σε διάφορες πυκνότητες που κυμαίνονται από 1.063-1.210 g/mL, τα δύο κύρια κλάσματα της HDL, είναι η HDL2 και η HDL3 [78].

Η μη εστεροποιημένη χοληστερόλη κατανέμεται στην επιφάνεια των HDL μορίων με την υδροξυλομάδα προς την εξωτερική πλευρά, ενώ τα φωσφολιποειδή, οι πρωτεΐνες και τα φορτισμένα λιποειδή εντοπίζονται κυρίως στα εξωτερικά τμήματα της λιποπρωτεΐνης. Στο κεντρικό τμήμα του μορίου βρίσκονται τα μη πολικά στοιχεία, όπως η εστεροποιημένη χοληστερόλη και τα τριγλυκερίδια. Τα πρωτεϊνικά στοιχεία του μορίου HDL αποτελούν κατά κύριο λόγο η apo AI και σε μικρότερο ποσοστό οι απολιποπρωτεΐνες AII, AIV, C, E και J (εικόνα 10). Οι πρωτεΐνες που διαθέτουν ενζυμική δραστηριότητα και σχετίζονται με την HDL είναι η LCAT, η πρωτεΐνη μεταφοράς εστέρων της χοληστερόλης (cholesterol ester transfer protein, CETP), η πρωτεΐνη μεταφοράς των φωσφολιποιδών (phospholipid transfer protein, PLTP), η PAF-AH [79] και η παραοξονάση. Η HDL2 και η HDL3 έχουν σχήμα σφαιρικό.

Τα νεοσχηματισμένα μόρια της HDL διαθέτουν πολικό πυρήνα, έχουν δισκοειδές σχήμα, χαρακτηρίζονται από pre-α ή pre-β ηλεκτροφορητική κινητικότητα και κυκλοφορούν στο πλάσμα και το εντερικό υγρό. Οι παράγοντες που καθορίζουν τη συγκέντρωσή τους στο πλάσμα παραμένουν άγνωστοι. Τα pre-β σωματίδια περιέχουν συνήθως apo AI είτε σαν ελεύθερο μόριο είτε μαζί με μόρια σφιγγομυελίνης και φωσφατιδυλοχολίνης.

4.2. Σημασία της HDL

Όλα τα κύτταρα του οργανισμού έχουν την ικανότητα να συνθέτουν χοληστερόλη αλλά και να την προσλαμβάνουν από τις λιποπρωτεΐνες του πλάσματος και τα γηρασμένα ερυθροκύτταρα.

Η συσσώρευση περίσσειας ελεύθερης χοληστερόλης μέσα στο κύτταρο έχει τοξική δράση, προκαλώντας διαταραχές της βιοσύνθεσης των πεπτιδίων στο ενδοπλασματικό δίκτυο. Προκειμένου να προληφθεί η υπερφόρτωση του σε χοληστερόλη, το κύτταρο έχει την ικανότητα να αποβάλλει την περίσσεια της με μία πληθώρα αντιρροπιστικών μηχανισμών. Το ήπαρ είναι το όργανο με τη μεγαλύτερη δυνατότητα απομάκρυνσης της περίσσειας χοληστερόλης, μέσω της σύνθεσης των χολικών αλάτων και την αποβολή τους με τη χολή (ανάστροφη μεταφορά της χοληστερόλης). Παρά το γεγονός ότι όλα τα HDL μόρια είναι δέκτες χοληστερόλης, ο υποπληθυσμός των μικρών pre-β σωματιδίων που περιέχουν apo AI, είναι ο κύριος αποδέκτης της χοληστερόλης που απομακρύνεται από τα κύτταρα. Η διαδικασία αυτή επιτυγχάνεται μέσω του ATP εξαρτώμενου πρωτεϊνικού μεταφορέα ABCA1.

Ο ABCA1 ανήκει στη υπεροικογένεια των ABC πρωτεϊνικών μεταφορέων που είναι υπεύθυνοι για τη διαμεμβρανική μεταφορά πρωτεϊνών, ιόντων και λιποειδών. Ο ABCA1 εκφράζεται σε όλους τους ιστούς μέσω του cAMP και διάφορων πυρηνικών υποδοχέων, ενώ ο ρόλος του είναι να συμμετέχει στη μεταφορά της χοληστερόλης και των φωσfolιποειδών, διαμέσου της κυτταρικής μεμβράνης, στις λιποπρωτεΐνες με τις οποίες και απομακρύνονται [80].

4.3. Μεταβολισμός και Ανάστροφη μεταφορά της HDL

Αρχικά, οι ελεύθερες ή οι φτωχές σε λιποειδή apo AI και apo AII, που εκκρίνονται από το ήπαρ και το έντερο, ενώνονται με τις υπάρχουσες λιποπρωτεΐνες ή με αυτές που υφίστανται λιπόλυση και δεσμεύουν φωσfolιποειδή και χοληστερόλη τα οποία εκρέουν από τα κύτταρα μέσω του ABCA1 μεταφορέα. Η διαδικασία αυτή δεν είναι ακόμη γνωστή που επιτελείται (ενδοκυτταρικά, εξωκυτταρικά ή και στα δύο). Έτσι σχηματίζονται τα πρόδρομα μόρια HDL που ονομάζονται preβ-1-HDL. Τα preβ-1-HDL είναι μικρότερα σε μέγεθος HDL και περιέχουν apo AI, είτε ελεύθερες σε λιποειδή είτε σε συνδυασμό με την σφιγγομυελίνη και την φωσφατιδυλοχολίνη. Αυτά

στη συνέχεια μετατρέπονται σε pre β -2-HDL και pre β -3-HDL.

Οι τρεις αυτές μορφές έχουν δισκοειδές σχήμα και pre- β ηλεκτροφορητική κινητικότητα (βλέπε παραπάνω). Τα μόρια αυτά μπορεί να περιέχουν αντί για apo A1 μόνο apo E ή μόνο apo AIV [81]. Όσο συσσωρεύεται η εστεροποιημένη χοληστερόλη (με τη δράση της LCAT) στα μόρια των HDL, το δισκοειδές σχήμα αλλάζει και γίνεται σφαιρικό και τα pre- β μόρια μετατρέπονται σε ώριμα α -HDL που χαρακτηρίζονται από α -ηλεκτροφορητική κινητικότητα. Τα ώριμα α -HDL χωρίζονται σε HDL2 και HDL3.

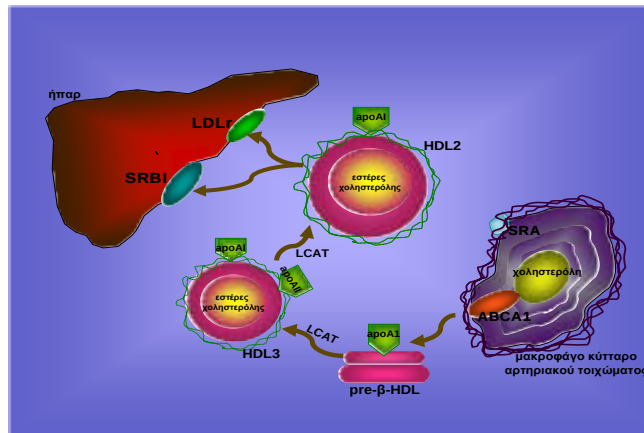
Τα HDL2 μόρια περιέχουν την περισσότερη εστεροποιημένη χοληστερόλη και είναι τα μεγαλύτερα. Οι HDL μέσα στο πλάσμα συνεχίζουν τις μεταβολές. Οι HDL2 με τη δράση της CETP και της PLTP, ανταλλάζουν την εστεροποιημένη χοληστερόλη με τριγλυκερίδια και φωσφολιποειδή. Οι HDL2 συρρικνώνονται ακόμη περισσότερο με την υδρόλυση των τριγλυκεριδίων και των φωσφολιποειδών με την δράση της ηπατικής λιπάσης (hepatic lipase, HL), παράγοντας μικρότερα HDL μόρια.

Τα σωματίδια pre- β -HDL είναι πιο αποτελεσματικοί αποδέκτες ελεύθερης χοληστερόλης από τα κύτταρα και τις άλλες λιποπρωτεΐνες. Τα πρόδρομα μόρια HDL προκύπτουν είτε από τα εντερικά κύτταρα και ηπατοκύτταρα ως νέα μόρια, είτε από τη μετατροπή των HDL2 σε HDL3 με τη δράση των παραπάνω ενζύμων αλλά και από τα χυλομικρά και VLDL κατά την υδρόλυση των τριγλυκεριδίων από τη λιποπρωτεϊνική λιπάση (lipoprotein lipase, LpL) [17].

Η ομοίωση της χοληστερόλης στον άνθρωπο είναι απαραίτητη. Η ανάστροφη μεταφορά της χοληστερόλης μειώνει τη συσσώρευση περίσσειας χοληστερόλης στα κύτταρα και κατά συνέπεια τον κίνδυνο εμφάνισης αθηροσκλήρωσης. Τα επίπεδα της HDL μπορούν να καθορίσουν την αποδοτικότητα της εκροής της χοληστερόλης και κατά την ανάστροφη μεταφορά της.

Η ανάστροφη μεταφορά της χοληστερόλης (reverse cholesterol transport, RCT) είναι μια διαδικασία κατά την οποία μεταφέρεται χοληστερόλη από τα εξωτερικά ηπατοκύτταρα και τους ιστούς στο ήπαρ και στο έντερο για την

έκκρισή της. Ουσιαστικά το μεταφορικό σύστημα, το οποίο επαναφέρει τη χοληστερόλη στο ήπαρ εξαρτάται από τα μόρια της HDL (εικόνα 11).



Εικόνα 11: Μεταβολισμός της HDL. Αρχικά, μεταφέρεται η ελεύθερη χοληστερόλη από το εσωτερικό των μακροφάγων στα pre-β-HDL μέσω της ABCA1, μετά η χοληστερόλη εστεροποιείται μέσω της LCAT και μεταφέρεται στα HDL3 και HDL2, και τελικά η χοληστερόλη εναποτίθεται στο ήπαρ μέσω του SRBI και LDLr υποδοχέων.

Η περίσσεια χοληστερόλης που βρίσκεται στα κύτταρα του αρτηριακού τοιχώματος είναι εστεροποιημένη. Μόνο η ελεύθερη χοληστερόλη μπορεί να απομακρυνθεί από τα κύτταρα. Το μόριο της HDL διαπερνά το ενδοθήλιο των αγγείων και συνδέεται στους μεταφορικούς υποδοχείς (όπως η πρωτεΐνη ABCA1), που βρίσκονται στην επιφάνεια των κυττάρων.

Η ελεύθερη χοληστερόλη που υπάρχει εντός των κυττάρων διαπερνά τις βιολογικές μεμβράνες τους και συνδέεται με τα σωματίδια της HDL. Η ελεύθερη χοληστερόλη γρήγορα εστεροποιείται από την LCAT και τοποθετείται στο εσωτερικό των μορίων της HDL.

Στη συνέχεια η εστεροποιημένη χοληστερόλη των ώριμων HDL επιστρέφει στο ήπαρ όπου και εναποτίθεται με τρεις διαφορετικούς τρόπους [11]:

- α. Όλο το HDL σωματίδιο εισέρχεται στο ηπατοκύτταρο κυρίως μέσω των LDL-υποδοχέων (το μεγαλύτερο μέρος της HDL ανακυκλώνεται).
- β. Με επιλεκτική πρόσληψη της χοληστερόλης μέσω του ειδικού καθαριστικού υποδοχέα κλάσης B τύπου 1 (scavenger receptor class B type I, SRB1) σε συνεργασία με την ηπατική λιπάση.
- γ. Μεταφέρεται με τη δράση της CETP στις πλούσιες σε τριγλυκερίδια λιποπρωτεΐνες.

4.4. HDL και άλλες ιδιότητες [11]

1. *Αντιοξειδωτικές ιδιότητες*: Τα σωματίδια της HDL εμπλέκονται και στην αθηρογένεση, μέσω αντιοξειδωτικών παραγόντων που μεταφέρουν [82]. Ένας πολλά υποσχόμενος τέτοιος παράγοντας είναι η παραοξονάση (PON), που μεταφέρεται από τα σωματίδια της HDL εντός του αρτηριακού τοιχώματος και προστατεύει τα σωματίδια της LDL από την οξείδωση. Ένα άλλο, σχετιζόμενο με την HDL, αντιοξειδωτικό ένζυμο είναι η PAF-ακετυλο-υδρολάση το οποίο καταβολίζει τον PAF και τα ανάλογά του στις οξειδωμένες λιποπρωτεΐνες, που θεωρείται ότι εμπλέκονται στην αθηρογένεση [13].

2. *Αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες*: Τα σωματίδια της HDL ελαττώνουν την έκφραση μορίων προσκόλλησης, όπως είναι τα ενδοαγγειακά συνδετικά μόρια (vascular cell adhesion molecule-1, VCAM1) και οι χημοκίνες. Επίσης ελαττώνουν και τη συνάθροιση φλεγμονωδών κυττάρων.

3. *Δράση στο ενδοθήλιο*: Τα μόρια της HDL έχουν ευνοϊκή δράση σε όλα τα στάδια της αθηρογένεσης [18].

4. *Αντιθρομβωτική δράση*: Κατά την αθηρογένεση σχηματίζονται και θρόμβοι ως επιπλοκή. Πιστεύεται ότι τα μόρια της HDL εμποδίζουν το σχηματισμό του θρόμβου με συνέπεια την παρεμπόδιση της απόφραξης του αυλού του αγγείου [83].

4.5. HDL και PAF-AH

Η PAF-AH του πλάσματος ή Lp-PLA₂ (όπως αναφέρθηκε και στο προηγούμενο κεφάλαιο) για να μεταφερθεί συνδέεται με τις λιποπρωτεΐνες (κύριως με τις LDL και λιγότερο με τις HDL) [47]. Από *in vivo* και *in vitro* μελέτες σε ζώα καθώς και από κλινικές δοκιμές έχει εξαχθεί το συμπέρασμα ότι η Lp-PLA₂ εμπλέκεται στην αθηροσκλήρωση και τις καρδιαγγειακές νόσους. Η ανθρώπινη Lp-PLA₂ παράγεται και εκκρίνεται από κύτταρα προερχόμενα από τα αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα, όπως μονοκύτταρα/μακροφάγα, μαστοκύτταρα, T-λεμφοκύτταρα και αιμοπετάλια [84, 85, 86, 87, 88, 89]. Η

κυτταρική έκφραση της Lp-PLA₂ στο πλάσμα ρυθμίζεται από διάφορους παράγοντες όπως είναι ο βαθμός διαφοροποίησης του κυττάρου και ο βαθμός ενεργοποίησής του από μεσολαβητές όπως ο PAF [90].

4.5.1. Πρόσδεση της PAF-AH στην HDL [84]

Αρχικά, είχε προταθεί ότι στην HDL δεν υπάρχει καθόλου Lp-PLA₂ και η δραστικότητα Lp-PLA₂ που εμφανίζεται οφείλεται στην παραοξονάση-1 (paraoxonase-1, PON1) [91], ένα ένζυμο αποκλειστικά συνδεδεμένο με την HDL [92]. Είχε βρεθεί ότι η PON1 είχε την ικανότητα να υδρολύει τόσο τον PAF [91], όσο και συγκεκριμένα οξειδωμένα φωσφολιποειδή (oxPL) με μικρού αριθμού ατόμων άνθρακα λιπαρές αλυσίδες στην sn-2 θέση [93].

Σε αντίθεση με τις παραπάνω μελέτες, αποδείχθηκε ότι η δραστικότητα της Lp-PLA₂ στην PON1 [91, 93, 94] δεν οφειλόταν σε αυτό καθαυτό το ένζυμο, αλλά σε ίχνη Lp-PLA₂ που εξακολουθούσε να βρίσκεται στην απομονωμένη και καθαρισμένη PON1 που χρησιμοποιήθηκε στα πειράματα [95]. Οι τελευταίες εργασίες έδειξαν ότι η Lp-PLA₂ είναι η μόνη φωσφολιπάση A2 της HDL και ότι η PON1 δεν εμφανίζει δραστικότητα φωσφολιπάσης ως προς τον PAF και τα oxPL [95].

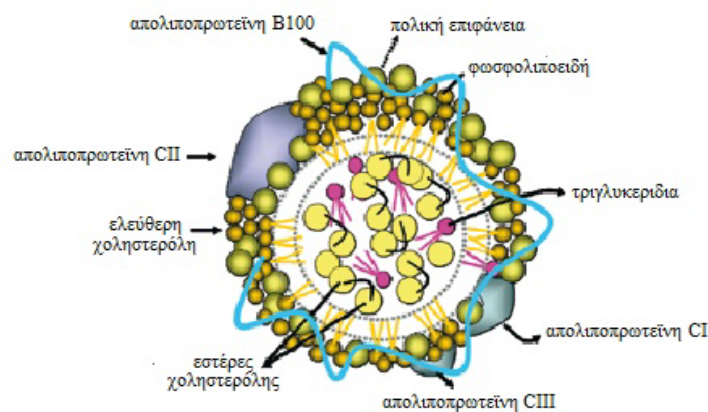
Δύο μελέτες [96, 97] με βάση τα κλινικά και βιοχημικά τους αποτελέσματα, υποστηρίζουν ότι η θέση της Lp-PLA₂ επηρεάζει την λειτουργία της, αλλά οι μηχανισμοί που καθορίζουν την κατανομή της μεταξύ των λιποπρωτεϊνών είναι μόνο εν μέρει κατανοητοί. Πρόσφατα, έγινε η ταυτοποίηση της περιοχής η οποία είναι απαραίτητη για τη σύνδεση της Lp-PLA₂ με την HDL και η σύγκριση μεταξύ των αλληλουχιών αυτής της περιοχής σε 6 διαφορετικά είδη, οδήγησε στο συμπέρασμα ότι η Lp-PLA₂ αλληλεπιδρά με τα HDL μόρια κατά ένα μοναδικό τρόπο σε κάθε είδος [79]. Μεταξύ των λιποπρωτεϊνών που περιέχουν apo A1, η Lp-PLA₂ συνδέεται κατά προτίμηση με υποκλάσμα της HDL3 [98].

Η HDL που δεσμεύεται με την Lp-PLA₂ είναι αντι-αθηροσκληρωτική. Η Lp-PLA₂ συμβάλλει σημαντικά στην προστατευτική επίδραση της HDL στην πρόληψη της οξείδωσης της LDL [99].

Κεφάλαιο 5: Λιποπρωτεΐνη LDL

Η υπερχοληστερολαιμία και συγκεκριμένα τα υψηλά επίπεδα της LDL χοληστερόλης αποτελούν σημαντικό παράγοντα κινδύνου για πρόωμη αθηροσκλήρωση και ισχαιμική καρδιακή νόσο [100]. Η LDL διαδραματίζει σπουδαίο ρόλο στην παθογένεση της αθηροθρομβωτικής διαδικασίας. Τα μόρια της LDL τροποποιούν τις αντιθρομβωτικές ιδιότητες του αγγειακού ενδοθηλίου και αλλάζουν την συσταλτικότητα του αγγείου μειώνοντας την διαθέσιμη ποσότητα του ενδοθηλιακού μονοξειδίου του αζώτου και ενεργοποιώντας προφλεγμονώδεις σηματοδοτικές πορείες [7].

5.1. Φυσιολογία της LDL

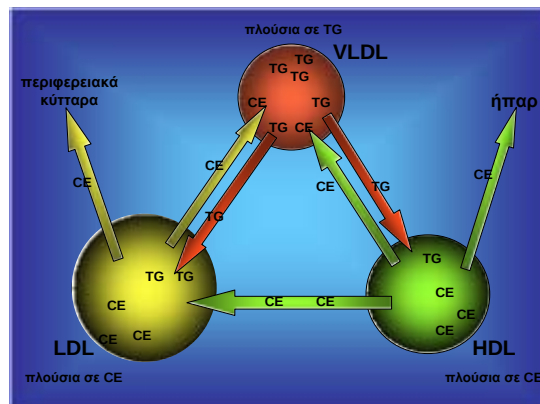


Εικόνα 12: Δομή του LDL μορίου [7].

Τα μόρια της LDL είναι μια ετερογενής τάξη των λιπο-πρωτεϊνών με πυκνότητα $1.019 < d < 1.063$ g/ml και διάμετρο 20-25 nm. Όπως φαίνεται και στην εικόνα 12 τα μόρια της LDL αποτελούνται από έναν υδρόφοβο πυρήνα ο οποίος περιέχει τριγλυκερίδια και εστέρες χοληστερόλης. Ο πυρήνας περιβάλλεται από μια υδρόφιλη επιφάνεια που αποτελείται από φωσφολιποειδή, ελεύθερη χοληστερόλη και πρωτεΐνες (κυρίως apo B100, η οποία δρα ως σύνδεσμος για τους κυτταρικούς υποδοχείς [7].

5.2. Βιοσύνθεση και μεταβολισμός της LDL [84]

Τα περισσότερα μόρια της LDL προέρχονται από μεγαλύτερα μόρια, που περιέχουν την αρσ Β και είναι πλούσια σε τριγλυκερίδια, όπως η VLDL η οποία βιοσυντίθεται και εκκρίνεται από το ήπαρ. Μελέτες μεταβολισμού των λιποπρωτεϊνών που περιέχουν την αρσ Β, έδειξαν ότι εκκρίνονται περισσότερες από μία μορφές VLDL από το ήπαρ. Έτσι, διακρίνονται τα μεγάλα σε μέγεθος μόρια τα οποία είναι πλούσια σε τριγλυκερίδια και λέγονται VLDL-1 και τα μικρότερα VLDL-2 που είναι φτωχά σε τριγλυκερίδια. Στην κυκλοφορία με τη δράση της LpL υδρολύεται μέρος μέρος των τριγλυκεριδίων της VLDL-1, η οποία μετατρέπεται πρώτα σε VLDL-2 και στη συνέχεια σε μικρότερα και πυκνότερα μόρια, τις IDL. Τα IDL αν παραμείνουν στην κυκλοφορία, και δεν προχωρήσουν προς το ήπαρ, η LpL και η HL συνεχίζουν να δρουν στις IDL με αποτέλεσμα να μετατραπούν σε ακόμα περισσότερο πυκνά μόρια, τις LDL [101].



Εικόνα 13: Μεταφορά των τριγλυκεριδίων (TG) από τα VLDL μόρια στα LDL και HDL μόρια με ταυτόχρονη ανταλλαγή εστέρων χοληστερόλης (CE).

Κατά τη διάρκεια της λιπόλυσης (εικόνα 13) για τον σχηματισμό της LDL τα επιφανειακά συστατικά (χοληστερόλη, φωσφολιποειδή, αρσ C, αρσ E) ελευθερώνονται και μεταφέρονται στην HDL. Οι CE παραμένουν και η λιποπρωτεΐνη που σχηματίζεται είναι μια μεγάλη σε μέγεθος LDL πλούσια σε CE. Η CETP μεταφέρει τους CE από την LDL στη VLDL με αντάλλαγμα τη μεταφορά τριγλυκεριδίων από την VLDL στην LDL. Έτσι, σχηματίζεται LDL που είναι πλούσια σε τριγλυκερίδια [102]. Τα τριγλυκερίδια αυτά υδρολύονται

συνεχώς με τη δράση των LpL και HL, οδηγώντας στη σταδιακή μείωση του μεγέθους των μορίων της LDL. Κατά την διάρκεια της λιπόλυσης το πρωτεϊνικό μέρος των LDL παραμένει αμετάβλητο.

Το περιεχόμενο σε τριγλυκερίδια των πρόδρομων λιποπρωτεϊνών είναι ο καθοριστικός παράγοντας για το μέγεθος των μορίων της LDL που θα σχηματιστούν στην λιπόλυση [103, 104]

5.3. Ο ρόλος της LDL [17]

Ο ρόλος των LDL είναι να μεταφέρουν τη χοληστερόλη σε κύτταρα για επιδιόρθωση και βιοσύνθεση της κυτταρικής μεμβράνης και σε συγκεκριμένους ιστούς όπως τα επινεφρίδια, τους γενετικούς αδένες και το δέρμα. Οι LDL ποικίλουν όσον αφορά το μέγεθος και τη σύστασή τους. Οι LDL εισέρχονται στα κύτταρα με δύο τρόπους:

1. Ο πρώτος είναι μέσω μεμβρανικών υποδοχέων (LDL-υποδοχέων). Μετά τη σύνδεση της LDL, όλο το σύμπλεγμα, υποδοχέας και LDL ενδοκυτταρώνεται και μεταφέρεται στο λυσόσωμα όπου η apo B100 διασπάται σε αμινοξέα μέσω της λυσοσωματικής όξινης λιπάσης, και η εστεροποιημένη χοληστερόλη μετατρέπεται σε ελεύθερη. Τα αμινοξέα και η ελεύθερη χοληστερόλη, στη συνέχεια διαχέονται στο κυτταρόπλασμα. Ο LDL-υποδοχέας επανέρχεται στη μεμβράνη του κυτάρου [11]. Η απελευθέρωση της χοληστερόλης έχει τις εξής συνέπειες:

- i. Την ενσωμάτωσή της στις μεμβράνες ή την εστεροποίησή της ως αποθήκη ενέργειας.
- ii. Την αναστολή της σύνθεσης των LDL-υποδοχέων
- iii. Την αναστολή της σύνθεσης της χοληστερόλης μειώνοντας τη σύνθεση του ενζύμου HMG-CoA.
- iv. Την ενεργοποίηση του ενζύμου ACAT για την εστεροποίηση της χοληστερόλης.

2. Ο δεύτερος τρόπος με τον οποίο οι LDL εισέρχονται στα κύτταρα είναι μέσω των SRB1. Σημαντικό ρόλο σε αυτό παίζουν οι πρωτεογλυκάνες [105].

5.4. Οξείδωση της LDL

Ακόμα ένας παράγοντας κινδύνου για την αθηροσκλήρωση, είναι η οξειδωμένη LDL ή oxLDL. Η oxLDL διεγείρει τα ενεργοποιημένα μονοκύτταρα αυξάνοντας έτσι την ικανότητά τους να διεισδύσουν στο αγγειακό τοίχωμα. Αυτή η αυξημένη διείσδυση είναι το πρώτο στάδιο της αθηρογένεσης [106, 107]

Η LDL του πλάσματος μεταφέρεται σε όλο το ανέπαφο ενδοθήλιο και παγιδεύεται στην εξωκυττάρια μήτρα (extracellular matrix, ECM) του ενδοθηλιακού χώρου όπου η LDL υπόκειται σε οξείδωση με αποτέλεσμα την παραγωγή oxLDL.

Διάφοροι κυτταρικοί και βιοχημικοί μεσολαβητές όπως: τα δραστικά μόρια οξυγόνου (Reactive Oxygen Species, ROS), το ένζυμο σφιγγομυελινάση (sphingomyelinase, SMase), η εκκριτική φωσφολιπάση A₂ (secreted phospholipase A₂, sPLA₂), άλλες λιπάσες, και η μυελοϋπεροξειδάση (myeloperoxidase, MPO) έχουν προταθεί για την έναρξη και τη ρύθμιση της οξείδωσης της LDL. Τα διάφορα συστατικά στις oxLDL περιλαμβάνουν λιποειδικά υδροϋπεροξειδία, οξυστερόλες, λυσο-φωσφατιδυλοχολίνη και αλδεϋδες [108].

Η ox-LDL είναι ένας ισχυρός παράγοντας πρόκλησης φλεγμονωδών μορίων. Διεγείρει φλεγμονώδεις σηματοδοτικές πορείες στα ενδοθηλιακά κύτταρα, απελευθερώνοντας πρωτεΐνες όπως η χημειοτακτική πρωτεΐνη-1 των μονοκυττάρων (Monocyte Chemotactic Protein-1, MCP1) και παράγοντες ανάπτυξης όπως ο διεγερτικός παράγοντας μονοκυττάρων αποικιών (Monocyte Colony Stimulating Factor, mCSF), τα οποία βοηθούν στην πρόσληψη των μονοκυττάρων στο αρτηριακό τοίχωμα [109.].

Ακόμα, οι ox-LDL προάγουν τη διαφοροποίηση των μονοκυττάρων σε μακροφάγα τα οποία προσλαμβάνουν την ox-LDL σε μια διαδικασία που τα μετατρέπει σε αφρώδη κύτταρα. Εκτός από αυτό, η ox-LDL έχει και άλλες επιπτώσεις, όπως η αναστολή της παραγωγής του μονοξειδίου του αζώτου (nitric oxide, NO). Τα ox-LDL μόρια αναγνωρίζονται από καθαριστικούς υποδοχείς όπως τον SR-A (Scavenger Receptor-A), το CD36 (CD36

αντιγόνου) και το CD68 (μακροφάγα αντιγόνου). Τα μακροφάγα που προσλαμβάνουν τις ox-LDLs, διογκώνονται και γεμίζουν από λιποειδή. Τα κύτταρα αυτά συσσωρεύονται στον ιστό και μετατρέπονται σε αφρώδη λιποειδικά κύτταρα, σχηματίζοντας αθηρωματικές πλάκες [108]

Όλες οι παραπάνω ιδιότητες της ox-LDL αποτελούν και γνωστές ιδιότητες του PAF. Για το λόγο αυτό αναζητήθηκε και πιστοποιήθηκε με χημικές βιολογικές μεθόδους η ύπαρξη PAF σε ox-LDL [110]. Έτσι, στην ox-LDL υπάρχουν ο PAF και δομικά ανάλογα του που προέρχονται από οξείδωση της φωσφατιδυλο-χολίνης, τα οποία παρουσιάζουν και βιολογική δράση ανάλογη του PAF.

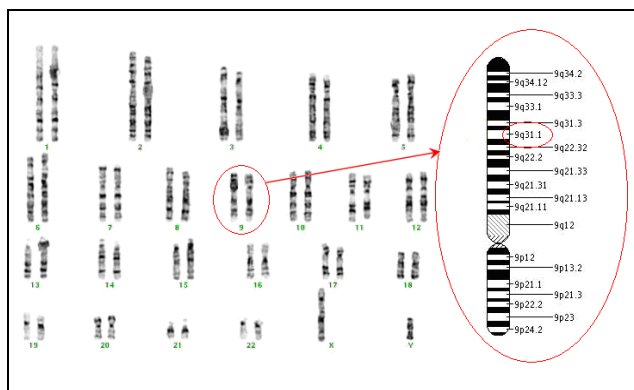
5.5. LDL και PAF-AH (Lp-PLA₂)

Η PAF-AH του πλάσματος (Lp-PLA₂) προτιμά να ενώνεται με συγκεκριμένα υποκλάσματα της LDL λιποπρωτεΐνης, όπως τα μικρής πυκνότητας (small density, sdLDL) [111, 112]. Έχει αποδειχθεί ότι η Lp-PLA₂ είναι κυρίως συνδεδεμένη με ένα υποκλάσμα της LDL με αυξημένο ηλεκτρικότητα φορτίο, την LDL(-) [113]. Η LDL(-) είναι αυξημένη σε άτομα με αυξημένο καρδιαγγειακό κίνδυνο και έχει αποδειχθεί ότι σχετίζεται με προφλεγμονώδης και κυτταροτοξικές επιδράσεις στα ενδοθηλιακά κύτταρα [113]. Επιπλέον, σε άτομα με αυξημένα επίπεδα Lp(a), η Lp-PLA₂ έδειξε να έχει μεγαλύτερη συγγένεια για την Lp(a) σε σχέση με την LDL [114]. Η Lp(a) είναι μια λιποπρωτεΐνη διαφορετική από την LDL γιατί έχει μια επιπρόσθετη γλυκοπρωτεΐνη apo(a), ενωμένη με δισουλφιδικό δεσμό στην apo B100. Η Lp(a) μεταφέρει τα προφλεγμονώδη οξειδωμένα φωσφολιποειδή και για τον λόγο αυτό τα αυξημένα επίπεδα της Lp(a) είναι παράγοντας κινδύνου [115, 116]. Ο λόγος που η Lp-PLA₂ έχει αυξημένη συγγένεια με αυτά τα δύο είδη λιποπρωτεϊνών είναι ακόμα αδιευκρίνιστος. Έχει βρεθεί ότι η apo B100, που είναι η μόνη απολιπορωτεΐνη στην LDL, συμμετέχει στην αλληλεπίδραση της Lp-PLA₂ του πλάσματος και της LDL [117]. Ενδεχομένως, αυτή η διαμόρφωση της apo B100 στην LDL να οφείλεται για τη σύνδεση της Lp-PLA₂.

Κεφάλαιο 6: Η πρωτεΐνη ABCA1

Οι ABC πρωτεΐνες αποτελούν συστατικά των βιολογικών μεμβρανών και χρησιμοποιούν το αδενοσινό-τριφωσφορικό οξύ (ATP) σαν πηγή ενέργειας για τη μεταφορά μιας μεγάλης ποικιλίας σωματιδίων, συμπεριλαμβανομένων υδρόφοβων μεταβολιτών, όπως τα λιποειδή [118]. Είναι ταξινομημένες σε επτά ευδιάκριτες υπεροικογένειες μεταφορέων (από ABCA σε ABCG), οι οποίες διαιρούνται πάλι σε υποομάδες. Ένα μέλος της οικογένειας είναι και ο μεταφορέας ABCA1 που είναι ένας ATP-συνδεόμενος μεταφορέας 1, μέλος της υπεροικογένειας των ABCA πρωτεϊνών (ATP-binding cassette transporter 1, member 1 of human transporter subfamily ABCA). Μέχρι σήμερα έχουν ανιχνευθεί στο ανθρώπινο σώμα 48 μεταφορείς ABC [119, 120].

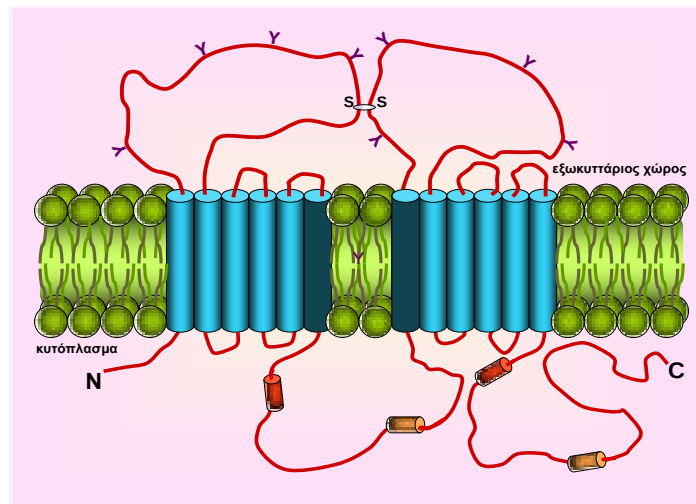
6.1. Η δομή της ABCA1



Εικόνα 14: Ο καρυότυπος του ανθρώπου και συγκεκριμένα το χρωμόσωμα 9, καθώς και η περιοχή του γονιδίου ABCA1.

Η γονιδιακή περιοχή της ABCA1 βρίσκεται στο μεγάλο σκέλος του χρωμοσώματος 9 (9q31.1) (εικόνα 14). Το γονίδιο αυτό κωδικοποιεί την πρωτεΐνη ABCA1 που ονομάζεται και πρωτεΐνη ρύθμισης εκροής της χοληστερόλης (cholesterol-efflux regulatory protein, CERP) και εκφράζεται σε πολλούς ιστούς όπως το ήπαρ, τα μακροφάγα, το έντερο, οι πνεύμονες, ο πλακούντας και τα επινεφρίδια.

Η ABCA1 είναι ένα μεγάλο, συμμετρικό μόριο που έχει τη δομή καναλιού. Περιέχει δύο κυτταροπλασματικούς ATP-συνδεόμενους μεταφορείς και δύο διαμεμβρανικές περιοχές από τις οποίες η κάθε μία αποτελείται από έξι διαμεμβρανικά τμήματα (εικόνα 15). Τα διαμεμβρανικά τμήματα σχηματίζουν ένα τοίχος υδάτινου καναλιού μέσα στην κυτταρική μεμβράνη. Αυτό το κανάλι ανοίγει προς τον εξωκυττάριο χώρο τη λιποειδική επιφάνεια της μεμβράνης, αλλά ποτέ προς το κυτταρόπλασμα.



Εικόνα 15: Η δομή της πρωτεΐνης ABCA1.

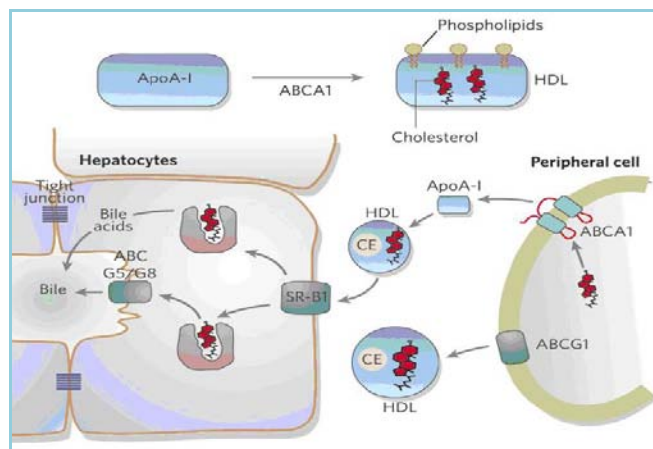
Υποστρώματα της ABCA1 που μπορούν να περάσουν μέσα από το κανάλι είναι η χοληστερόλη, τα φωσφολιποειδή (σφιγγομυελίνη, φωσφατιδυλοσερίνη), οι βιταμίνες A, E και K κ.α. Τα μόρια αυτά μεταφέρονται από το εσωτερικό προς το εξωτερικό στρώμα της διπλοστιβάδας των φωσφολιποειδών. Στην περίπτωση της χοληστερόλης και των φωσφολιποειδών, η μεταφορά αυτή ευνοεί την πρόσληψή τους από ελεύθερες σε λιποειδή απολιποπρωτεΐνες, ή σε μόρια φτωχά σε λιποειδή.

Η πρωτεΐνη ABCA1 επιτελεί δύο λειτουργίες: 1) συμμετέχει στην εκροή της χοληστερόλης και των φωσφολιποειδών από τα κύτταρα και 2) συμμετέχει στον σχηματισμό και στην ωρίμανση των ηπατικών και εντερικών μορίων της HDL [81].

6.2. Ο ρόλος της ABCA1 στον σχηματισμό των HDL μορίων

Τα φωσφολιποειδή δεσμεύονται στον μεταφορέα ABCA1 και συνδέονται με τις apo A, σχηματίζοντας HDL με δισκοειδές σχήμα (pre-β-HDL) (εικόνα 16).

Η ελεύθερη χοληστερόλη από τα περιφερικά κύτταρα εισέρχεται στις pre-β-HDL. Όταν υπάρχει πλεόνασμα χοληστερόλης στο κύτταρο, τότε οι SR-BI συμμετέχουν στην έξοδο της ελεύθερης χοληστερόλης από τα κύτταρο. Η ελεύθερη χοληστερόλη εστεροποιείται από την LCAT και σχηματίζονται ώριμα HDL [11]. Στη συνέχεια τα μόρια μετακινούνται στο ήπαρ, όπου εναποτίθεται η χοληστερόλη με τους τρόπους που έχουν αναφερθεί παραπάνω (υποκεφάλαιο 4.3.).

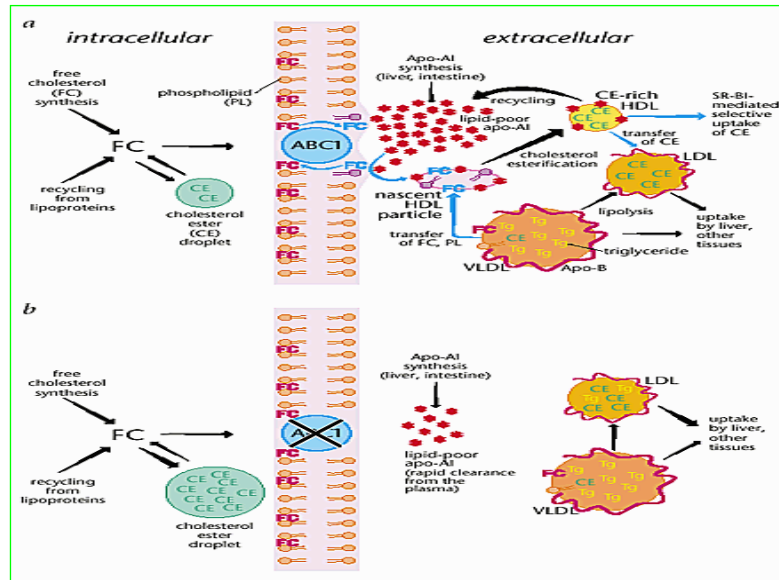


Εικόνα 16: Ο ρόλος της ABCA1 στον σχηματισμό των HDL μορίων. Οι απολιποπρωτεΐνες A1 (apo A1) μέσω της ABCA1 συνδέονται με τα φωσφολιποειδή, σχηματίζοντας pre-β-HDL.

6.3. Μεταλλάξεις στο γονίδιο ABCA1

Η διαπίστωση ότι οι μεταλλάξεις του γονιδίου ABCA1 προκαλούν την νόσο Ταγγέρη έχει υποκινήσει τη μελέτη των λειτουργιών του ABCA1 *in vivo* και *in vitro*. Οι μελέτες επιβεβαιώνουν το κεντρικό ρόλο της πρωτεΐνης ABCA1 στο σχηματισμό των μορίων HDL καθώς και τον προστατευτικό της ρόλο ενάντια στην αθηρογένεση. Το μόριο ABCA1 έχει δύο μεγάλες εξωκυττάρειες θηλιές και συνδέονται από έναν δισουλφιδικό δεσμό. Πολλές μεταλλάξεις του ABCA1

που προκαλούν την ασθένεια αυτή έχουν προσδιοριστεί σε αυτές τις θηλίες [121].



Εικόνα 17: α) Η φυσιολογική λειτουργία της ABCA1. Η ABCA1 συμμετέχει στη δημιουργία pre-β-HDL και β) Νόσος Ταγγέρη. Η έλλειψη της πρωτεΐνης ABCA1 προκαλεί μείωση των HDL και εναπόθεση εστεροποιημένης χοληστερόλης στα μακροφάγα διαφόρων οργάνων.

Κεφάλαιο 7: Νόσος Ταγγέρη

Η νόσος της Ταγγέρη περιγράφηκε το 1961 από τον Fredrickson [122], οφείλει την ονομασία της στους δύο πρώτους ασθενείς οι οποίοι ήταν κάτοικοι του νησιού Ταγγέρη (το νησί βρίσκεται στην Βιρτζίνια των Η.Π.Α). Ο πρώτος ασθενής με την νόσο αυτή ήταν ένα αγόρι πέντε χρονών, το οποίο παρουσίασε μεγάλες κιτρινοπορτοκλόχρωμες αμυγδαλές που έφραζαν την στοματική κοιλότητα, χαμηλά επίπεδα της HDL, αυξημένα επίπεδα τριγλυκεριδίων καθώς και ηπατομεγαλία.

7.1. Παθοφυσιολογία της νόσου Ταγγέρη

Η ανωμαλία οφείλεται σε έλλειψη του μεταφορέα ABCA1, γεγονός που οδηγεί σε σοβαρή μείωση των επιπέδων της HDL και σε εναπόθεση της εστεροποιημένης χοληστερόλης στα μακροφάγα διαφόρων οργάνων [123].

Η εναπόθεση εστεροποιημένης χοληστερόλης γίνεται κυρίως στις αμυγδαλές, τους λεμφαδένες, το θύμο αδέν, το μυελό των οστών, το ήπαρ, το σπλήνα και τα λεία μυϊκά κύτταρα του εντέρου. Τα τοιχώματα των αγγείων προσβάλλονται από τη νόσο στο 30% των νοσούντων. Η διάγνωση γίνεται από τις μεγάλες κιτρινοπορτοκλόχρωμες αμυγδαλές και τα χαμηλά επίπεδα της HDL [124].

Τα μακροφάγα, που παρουσιάζονται ως αφρώδη κύτταρα στον προσβεβλημένο ιστό, είναι ο πρωταρχικός τύπος κυττάρου που ενσωματώνει την περίσσεια χοληστερόλης. Η γενετική έλλειψη στην νόσο Ταγγέρη έχει συσχετιστεί με τη μείωση της αντίστροφης μεταφοράς της χοληστερόλης, η οποία έχει αναλυθεί παραπάνω και είναι πολύ βασική για την απομάκρυνση της περίσσειας χοληστερόλης. Συγκεκριμένα, η εκροή της χοληστερόλης στις HDL (πρώτο βήμα στην αντίστροφη μεταφορά χοληστερόλης) έχει αναφερθεί ότι δεν είναι φυσιολογική στη νόσο Ταγγέρη [125].

Οι Gordon και συν. [126] πρότειναν ότι η έλλειψη στην μετα-μεταφραστική τροποποίηση της apo AI στο πλάσμα ασθενή με νόσο Ταγγέρη παράγει ένα μη φυσιολογικό μόριο το οποίο καταβολίζεται ταχύτατα.

Γενικά, ενώ τα χαμηλά επίπεδα της HDL χοληστερόλης έχουν συσχετιστεί με εμφάνιση στεφανιαίας νόσου, στη νόσο Ταγγέρη δεν εκδηλώνεται πρώιμη στεφανιαία νόσο [127]. Αυτό ενδεχομένως να οφείλεται στα χαμηλά επίπεδα και της LDL χοληστερόλης σε συνδυασμό με την σχεδόν ολοκληρωτική έλλειψη της HDL χοληστερόλης [128].

Η θεραπεία της νόσου Ταγγέρη δεν έχει οριστεί ακόμα. Η υπολιπιδαιμική δίαιτα και τα υπολιπιδαιμικά φάρμακα (νιασίνη, γεμφιβροζίλη και λοβαστατίνη) δεν κατόρθωσαν να αυξήσουν τα επίπεδα της HDL. Ωστόσο, η χορήγηση βεζαφιβράτης βελτίωσε τη λειτουργικότητα του ενδοθηλίου και αύξησε τα επίπεδα της HDL και της απολιποπρωτεΐνης A στο πλάσμα [129].

7.2. Η νόσος Ταγγέρη στην Ελλάδα [124]

Οι Κολονου και συν. [123] αναφέρουν την περίπτωση μιας γυναίκας 32 χρονών με νόσο Ταγγέρη, η οποία δεν είχε κλινικά σημάδια της νόσου, εκτός από ηπατοσπληνομεγαλία. Η γυναίκα αυτή ήταν παιδί από δύο 2^{ου} βαθμού ξαδέρφια και η ίδια μητέρα τριών κοριτσιών. Οι γονείς της και τα δέκα αδέρφια της ήταν ασυμπτωματικά χωρίς παθολογικά ευρήματα, εκτός από στοιχεία β-θαλασσαιμίας σε τρία αδέρφια. Περαιτέρω εξετάσεις που έγιναν στη γυναίκα αυτή έδειξαν ότι δεν είχε αθηρωματικές πλάκες. Οι αιματολογικές εξετάσεις αποκάλυψαν ότι ήταν ετερόζυγη για την β-θαλασσαιμία, ενώ οι υπόλοιπες εξετάσεις ήταν στα φυσιολογικά πλαίσια.

Το λιπιδαιμικό προφίλ με επίπεδα της HDL χοληστερόλης 2 mg/dL ταίριαζε με αυτό της νόσου Ταγγέρη και ύστερα από γονιδιακή ανάλυση στο γονίδιο *ABCA1* διαγνώστηκε η νόσος. Η ανάλυση έδειξε ότι υπήρχε μια υποκατάσταση στο εξώνιο 12 στη θέση 2033 και αντί για κυτοσίνη (C) υπήρχε αδερίνη (A). Αυτή η μετάλλαξη είχε ως συνέπεια την μετατροπή ενός αμινοξέος

στο κωδικόνιο 573 και συγκεκριμένα της τυροσίνης (TAC) σε κωδικόνιο λήξης (TAA).

Μέχρι σήμερα έχουν βρεθεί πάνω από 40 διαπιστωμένες περιπτώσεις της νόσου Ταγγέρη, ενώ η περίπτωση αυτής της ασθενούς φανέρωσε μια νέα μετάλλαξη του γονιδίου ABCA1. Συγκεκριμένα, αυτή η μετάλλαξη προκάλεσε την έλλειψη και των δύο μεμβρανικών περιοχών της πρωτεΐνης, με αποτέλεσμα να μην είναι λειτουργική.

Ο λόγος που η ασθενής αυτή δεν ανέπτυξε αφρώδη κύτταρα είναι άγνωστος. Οι κλινικές εκδηλώσεις της νόσου Ταγγέρη, τουλάχιστον σε ασθενείς με μη λειτουργική ABCA1 πρωτεΐνη, μπορεί να διαφέρουν αρκετά λόγω μηχανισμών που είναι ανεξάρτητοι από το γονίδιο ABCA1 και η άκρως χαμηλή HDL χοληστερόλη να επηρεάζεται και από άλλους γενετικούς παράγοντες.

7.3. Παράγοντας ενεργοποίησης αιμοπεταλίων και νόσος Ταγγέρη

Οι Farr και συν. [130, 131] έχουν πρωτοαναφέρει την παρουσία δραστηριότητας μιας φωσφολιπάσης η οποία σχετίζεται με την τάξη των LDL λιποπρωτεϊνών στο πλάσμα. Ωστόσο, αυτή η δραστηριότητα πιθανότατα είναι εξειδικευμένη για την φωσφατιδυλοχολίνη. Αυτή η φωσφολιπάση (LpPLA₂, PAF ακετυλοϋδρολάση) είναι ειδική για μια ομάδα βιολογικά ενεργών φωσφολιπιδίων, του PAF [131, 132]. Έχει αποδειχθεί ότι σε ασθενείς με την νόσο Ταγγέρη προκαλείται συσσώρευση αιμοπεταλίων και από με προσθήκη μικρής συγκέντρωσης PAF [133] και επίσης ότι ο PAF παρουσιάζει υποτασική δράση [134]. Στη νόσο Ταγγέρη η δραστηριότητα της LpPLA₂ είναι υψηλή, όμως δεν μπορεί να διαπιστωθεί αν ο παθοφυσιολογικός μεταβολισμός του PAF σχετίζεται με την φαινοτυπική έκφραση της νόσου. Είναι πιθανότερο ότι η αυξημένη δραστηριότητα της LpPLA₂ να είναι αποτέλεσμα της γενικότερης αύξησης της δραστηριότητας των φωσφολιπασών στο πλάσμα και να μην σχετίζεται άμεσα με την μετάλλαξη της νόσου [135].

Κεφάλαιο 8: Μελέτη του γονιδίου ABCA1

8.1. Το DNA και η έννοια του πολυμορφισμού

Το ανθρώπινο πυρηνικό DNA δεν είναι μία ομοιογενής αλληλουχία δεοξυριβονουκλεοτιδίων αλλά ένα ασυνεχές, ανομοιογενές μόριο. Η οργάνωσή του ανθρώπινου γονιδιώματος αποτελεί αντικείμενο μελέτης της μοριακής βιολογίας και παραμένει κατά το μεγαλύτερο μέρος της ακόμη αδιευκρίνιστη.

Έχει υπολογιστεί ότι το μέσο μήκος ενός γονιδίου είναι 10.000 ζεύγη βάσεων (bp) και ότι ο συνολικός αριθμός των γονιδίων που εκφράζονται σε όλα τα διαφορετικά κύτταρα του ανθρώπινου οργανισμού είναι περίπου 50.000-100.000. Το ανθρώπινο DNA έχει μήκος $3 \cdot 10^9$ bp, άρα περίπου το 1/5 του γονιδιώματος αποτελείται από αλληλουχίες που κωδικοποιούν γονίδια ή σχετίζονται με γονίδια.

Το ακριβές μέγεθος του γονιδιώματος, η ετερογένεια και η πολυπλοκότητα του μελετώνται με πειράματα αναδιάταξης. Η αρχή της μεθόδου έγκειται στην ιδιότητα του αποδιαταγμένου DNA να αναδιατάσσεται με τυχαία σύνδεση των αλυσίδων του, όπου αυτές είναι συμπληρωματικές, κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες θερμοκρασίας και συγκέντρωσης αλάτων.

Η ύπαρξη γενετικής ποικιλομορφίας σε έναν πληθυσμό λέγεται πολυμορφισμός. Σε μη κωδικές θέσεις του γονιδιώματος, συχνά η αλληλουχία των βάσεων διαφέρει μεταξύ ατόμων. Όταν μια τέτοια διαφορά απαντά σταθερά σε ποσοστό μεγαλύτερο από 1% σε έναν πληθυσμό τότε ορίζεται ως πολυμορφισμός θέσης. Τόσο στο μοναδικό όσο και στο επαναλαμβανόμενο μη κωδικό DNA καθώς και στα εσώνια υπάρχει πληθώρα τέτοιων πολυμορφισμών θέσης. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι τυχαίες αλλαγές στην αλληλουχία των βάσεων συμβαίνουν και συντηρούνται στο ανθρώπινο γονιδίωμα, όταν η θέση στην οποία συμβαίνει η αλλαγή δεν συνδέεται με κάποια γονιδιακή λειτουργία που πιθανόν θα μεταβληθεί, οπότε δεν υπάρχει καμία επιλεκτική πίεση.

Πολυμορφισμοί θέσης στο γενωμικό DNA υπάρχουν περίπου κάθε 200-500 bp. Οι πολυμορφισμοί αυτοί μπορεί να επηρεάσουν την θέση τομής του μορίου από κάποια περιοριστική ενδονουκλεάση, δημιουργώντας ή καταργώντας την αλληλουχία αναγνώρισης. Τα τμήματα που προκύπτουν μετά από επώαση του ολικού γενωμικού DNA κάθε ατόμου με την περιοριστική ενδονουκλεάση ονομάζονται πολυμορφισμοί μήκους τμημάτων περιορισμού (Restriction Fragment Length Polymorphisms-RFLPs).

8.1.1. Πολυμορφισμός R219K

Ο R219K είναι ο πιο μελετημένος πολυμορφισμός της πρωτεΐνης ABCA1. Αρκετές μελέτες έχουν εξετάσει τον ρόλο του στην ομοιόσταση των λιπιδίων και της αθηρογένεσης. Από αυτές τις μελέτες, κάποιες έχουν αναφέρει ότι ο R219K έχει θετική συσχέτιση με τα υψηλά επίπεδα της HDL χοληστερόλης στο πλάσμα και με τη μείωση της αθηρογένεσης. Ομόζυγες μεταλλάξεις στην ABCA1 προκαλούν τη νόσο Ταγγέρη, ενώ ετερόζυγες μεταλλάξεις προκαλούν υποαλφαλιποπρωτεϊνέμια. Ο πολυμορφισμός R219K (G1051A) έχει σαν αποτέλεσμα την αλλαγή της αργινίνης σε λυσίνη στο κωδικόνιο 219. Η παρουσία του K αλληλίου έχει συσχετιστεί με μειωμένο κίνδυνο εμφάνισης στεφανιαίας νόσου σε κάποιους Ευρωπαϊκούς και Αμερικανικούς πληθυσμούς [136].

8.1.2. Πολυμορφισμός R1587K

Ο πολυμορφισμός R1587K βρίσκεται στην εξωτερική θηλιά της ABCA1. Η θέση αυτή είναι πολύ σημαντική για την σύνδεση της πρωτεΐνης με την απολιποπρωτεΐνη AI (apo AI) και για την εκροή της χοληστερόλης. Ο πολυμορφισμός R1587K έχει σαν αποτέλεσμα την αλλαγή της αργινίνης σε λυσίνη στο κωδικόνιο 1587. Έχει βρεθεί ότι ο R1587K εμφανίζεται περισσότερο σε πληθυσμό με χαμηλά επίπεδα HDL χοληστερόλης [137].

8.1.3. Πολυμορφισμός I883M

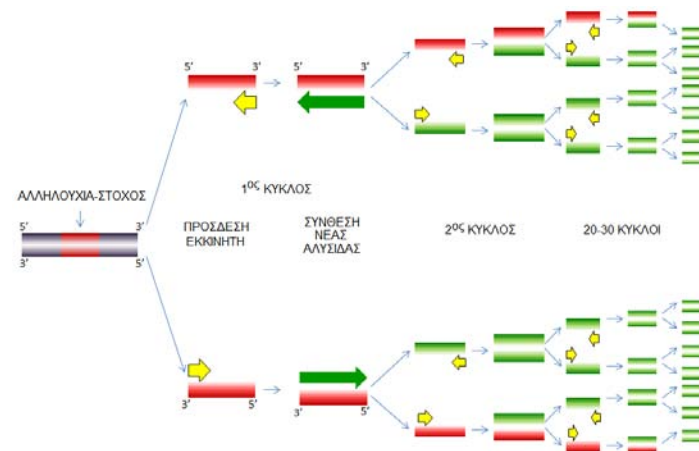
Ο πολυμορφισμός I883M, όπως και ο R219K, έχει συσχετιστεί με τα υψηλά επίπεδα της HDL στο πλάσμα. Ωστόσο, δεν επιβεβαιώνεται από όλες τις μελέτες καθώς κάποιες δεν απέδειξαν αυτή τη συσχέτιση [138]. Ο I883M βρίσκεται στην εσωτερική θηλιά της πρωτεΐνης ABCA1. Ο πολυμορφισμός I883M έχει σαν αποτέλεσμα την αλλαγή της ισολευκίνης σε μεθειονίνη στο κωδικόνιο 883.

8.2. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης

Το 1984, ο Kary Mullis σκέφτηκε μια ευφυέστατη μέθοδο αύξησης της συγκέντρωσης των ειδικών αλληλουχιών DNA που ονομάστηκε αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR). Η PCR χρειάζεται την προσθήκη των ακόλουθων αντιδραστηρίων στο διάλυμα που περιέχει την αλληλουχία-στόχο: α) ένα ζεύγος εκκινητών (primers) που μπορούν να υβριδοποιηθούν με τις παράπλευρες αλληλουχίες του στόχου, β) τέσσερις δεοξυριβονουκλεοζίτες τριφωσφορικού οξέος (dNTPs) και γ) μια θερμοανθεκτική DNA πολυμεράση [139].

Σύμφωνα με τη μέθοδο αυτή (εικόνα 18) [13]:

- Η διπλή αλυσίδα του προς μελέτη DNA, διαχωρίζεται με θέρμανση σε δύο μονές αλυσίδες.
- Προστίθενται οι εκκινητές (δύο ολιγονουκλεοτίδια), κάθε ένα από τα οποία προσδένεται (λόγω των συμπληρωματικών του βάσεων) σε κάθε μία από τις δύο αλυσίδες του DNA και μάλιστα στα δύο άκρα του τμήματος που πρόκειται να πολλαπλασιαστεί.
- Η πρόσδεση των εκκινητών γίνεται με ψύξη μετά από θέρμανση του δείγματος. Η κυκλική θέρμανση και ψύξη ρυθμίζεται από ηλεκτρονικό θερμικό κυκλοποιητή.



Εικόνα 18: Η σχηματική διαδικασία της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης.

- Στη συνέχεια, παρουσία των dNTPs και της ειδικής θερμοανθεκτικής DNA πολυμεράσης, βιοσυντίθενται νέες αλυσίδες του DNA προς τις δύο κατευθύνσεις, ξεκινώντας από τους δύο εκκινητές.
- Η διεργασία αυτή επαναλαμβάνεται με το ίδιο μίγμα αντίδρασης για πολλές φορές (20-30 φορές). Από τον τρίτο κύκλο σχηματίζονται διπλές αλυσίδες DNA με μήκος αντίστοιχο της απόστασης μεταξύ των δύο εκκινητών, των οποίων η συγκέντρωση διπλασιάζεται περίπου σε κάθε κύκλο, μέχρι που όλα σχεδόν τα τμήματα που βιοσυντίθενται να έχουν το σωστό μήκος.

8.3. Ηλεκτροφόρηση

Η επώαση ολικού γενωμικού DNA με περιοριστικά ένζυμα αποδίδει τμήματα με συγκεκριμένα μοριακά μεγέθη. Η ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης είναι μια τεχνική διαχωρισμού. Τα τμήματα DNA διαχωρίζονται στο πήκτωμα αγαρόζης με βάση το μοριακό τους μέγεθος, τη συγκέντρωση της αγαρόζης στο πήκτωμα, τη διαμόρφωση του DNA, τη διαφορά τάσης του ηλεκτρικού πεδίου, το χρόνο της ηλεκτροφόρησης και τη χημική σύνθεση του ρυθμιστικού διαλύματος στο οποίο γίνεται η ηλεκτροφόρηση.

Σκοπός

Όπως έχει αναφερθεί, τα χαμηλά επίπεδα της HDL χοληστερόλης και της apo AI, τα υψηλά επίπεδα της LDL χοληστερόλης και των τριγλυκεριδίων είναι παράγοντες κινδύνου για την εμφάνιση καρδιαγγειακών νοσημάτων και για το λόγο αυτό είναι σημαντικό να μελετηθεί η συσχέτιση τους με συχνούς πολυμορφισμούς του γονιδίου ABCA1 (R219K, R1587K, I883M).

Σύμφωνα με διάφορες μελέτες που έγιναν σε διάφορους πληθυσμούς, οι πολυμορφισμοί του ABCA1 πιθανώς σχετίζονται με τα υψηλά και τα χαμηλά επίπεδα των λιποειδών στο πλάσμα.

Επιπλέον, η έλλειψη της ABCA1 πρωτεΐνης οφείλεται σε γενετική μετάλλαξη που προκαλεί τη νόσο της Ταγγέρης. Η νόσος αυτή έχει συσχετιστεί και με υψηλή δραστικότητα της LpPLA₂ το οποίο είναι το αποικοδομητικό ένζυμο του PAF.

Σκοπός της μελέτης αυτής είναι να διαπιστωθεί αν υπάρχει συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων των λιποειδών του πλάσματος και των τριών πολυμορφισμών της πρωτεΐνης ABCA1 σε υγιή ελληνικό πληθυσμό. Ακόμα, σε άτομο με την νόσο της Ταγγέρη στο οποίο απουσιάζει η πρωτεΐνη ABCA1 θα μελετηθούν: α) τα επίπεδα του PAF στο αίμα β) τα ένζυμα μεταβολισμού του PAF στο αίμα και στα έμμορφα συστατικά του αίματος και γ) η ικανότητα συσσώρευσης των αιμοπεταλίων στον PAF και σε άλλους συσσωρευτικούς παράγοντες.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

I. ΜΕΘΟΔΟΙ ΚΑΙ ΥΛΙΚΑ

Μελέτη πολυμορφισμών του γονιδίου *ABCA1* σε υγιή άτομα

1. Απομόνωση DNA από ολικό αίμα

Αντιδραστήρια:

Για την απομόνωση του δεοξυριβονουκλεϊκού οξέος (DNA) χρησιμοποιήθηκε:

- FlexiGene DNA kit (250 mL) το οποίο περιείχε: διάλυμα απομόνωσης των λευκών αιμοσφαιρίων (Buffer FG1, lysis buffer), διάλυμα αποδιάταξης (Buffer FG2, denaturation buffer), υδατικό διάλυμα (Buffer FG3, hydration buffer) και πρωτεϊνάση K (QIAGEN® Protease)
- Ισοπροπανόλη 100%
- Αιθανόλη 70%
- Δισαποσταγμένο νερό (water for injection)

Υλικά:

- Γάντια latex μιας χρήσεως
- Πιπέττες πλαστικές pasteur με πουάρ 3 mL
- Αυτόματες πιπέττες των 10 µL, 20 µL, 200 µL και 1000 µL
- Αποστειρωμένα σωληνάρια (tubes) των 50 mL
- Αποστειρωμένα σωληνάρια (tubes) των 15 mL
- Αποστειρωμένα σωληνάρια (tubes) των 0.5 mL

Αρχή μεθόδου:

Η απομόνωση του δεοξυριβονουκλεϊκού οξέος (DNA) από το ολικό αίμα γίνεται ύστερα από τη λύση των εμπύρηνων λευκοκυττάρων και τον περαιτέρω καθαρισμό του DNA από διάφορες πρωτεΐνες και άλατα.

Προετοιμασία:

Η πρωτεϊνάση K (QIAGEN® Protease) που είναι σε μορφή σκόνης, διαλύεται σε 1.4 mL υδατικού διαλύματος Buffer FG3. Μετά από καλή

ανακίνηση το διάλυμα μοιράζεται ανά 100 μL σε μικρά σωληνάρια των 0.5 mL, τα οποία φυλάσσονται στους -20°C . (Αυτή η διαδικασία γίνεται μόνο όταν ανοίγεται για πρώτη φορά ένα kit).

Τα δείγματα αποψύχονται από τους -80°C που φυλάσσονται, επειδή πρέπει να βρίσκονται σε θερμοκρασία δωματίου πριν ξεκινήσει η διαδικασία.

Υπολογίζεται η ποσότητα του διαλύματος (mix, είναι διάλυμα αποδιάταξης Buffer FG2 και πρωτεΐνάσης K) που θα χρησιμοποιηθεί στην πορεία ανάλογα με τα δείγματα που υπάρχουν κάθε φορά. Για το κάθε δείγμα απαιτούνται 0.5 mL διάλυμα αποδιάταξης Buffer FG2 και 5 μL πρωτεΐνάση K.

Το υδατόλουτρο τίθεται σε λειτουργία και ρυθμίζεται στους 65°C .

Πειραματική διαδικασία:

1. Μεταφέρονται 2.5 mL από το διάλυμα απομόνωσης των λευκών αιμοσφαιρίων Buffer FG1 σε σωληνάριο των 15 mL. Προστίθεται 1.0 mL ολικού αίματος και γίνεται καλή ανακίνηση. Στο στάδιο αυτό γίνεται η αιμόλυση των αιμοπεταλίων.
2. Το δείγμα φυγοκεντρείται για 7 min σε 2000 xg.
3. Αποχύνεται προσεκτικά το υπερκείμενο υγρό και το σωληνάριο αφήνεται ανάποδα για λίγα min επάνω σε καθαρή επιφάνεια διηθητικού χαρτιού.
4. Προστίθεται στο ίζημα 0.5 mL από το διάλυμα που έχει παρασκευαστεί κατά την προετοιμασία. Αμέσως το δείγμα τοποθετείται σε vortex μέχρι να διαλυθεί πλήρως το ίζημα. Το δείγμα τοποθετείται στο υδατόλουτρο των 65°C και αφήνεται για επώαση για περίπου 15 min. Στο στάδιο αυτό λύνονται οι πυρήνες των κυττάρων και αποικοδομούνται οι πρωτεΐνες με το διάλυμα αποδιάταξης Buffer FG2/ πρωτεΐνάσης K.
5. Προστίθεται 0.5 mL ισοπροπανόλης 100% και το σωληνάριο ανακινείται ήρεμα. Στο στάδιο αυτό γίνεται ορατό το DNA σαν λεπτή λευκή «κλωστή».
6. Το δείγμα φυγοκεντρείται για 3 min σε 2000 xg.

7. Αποχύνεται προσεκτικά το υπερκείμενο υγρό και το σωληνάριο αφήνεται ανάποδα για λίγα min επάνω σε καθαρή επιφάνεια διηθητικού χαρτιού. Με το υπερκείμενο υγρό απομακρύνονται οι πρωτεΐνες.
8. Προστίθεται 0.5 mL αιθανόλης 70% και το σωληνάριο ανακινείται καλά.
9. Το δείγμα φυγοκεντρείται για 3 min σε 2000 xg.
10. Αποχύνεται προσεκτικά το υπερκείμενο υγρό και το σωληνάριο αφήνεται ανάποδα για λίγα λεπτά επάνω σε καθαρή επιφάνεια διηθητικού χαρτιού. Το ίζημα είναι το DNA.
11. Το σωληνάριο (χωρίς καπάκι) τοποθετείται στο υδατόλουτρο με ανοικτό το σκέπασμα για να εξατμιστεί η περίσσεια αιθανόλης.
12. Προστίθενται 300 µL δισαποσταγμένο νερό και το δείγμα ανακινείται πολύ καλά.
13. Το δείγμα τοποθετείται στο υδατόλουτρο των 65 °C για περίπου 1 ώρα.
14. Το δείγμα αφού φυγοκεντρηθεί ελάχιστα (spin down) μεταφέρεται σε σωληνάριο των 0.5 mL.
15. Το δείγμα που περιέχει το DNA φυλάσσεται στους -80 °C.

2. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Αντιδραστήρια:

- Εκκινητές (primers)
- Ρυθμιστικό διάλυμα για PCR (10xPCR Buffer)
- Δεοξυριβονουκλεοζίτες Τριφωσφορικού οξέος (dNTPs)
- Χλωριούχο μαγνήσιο (MgCl₂)
- Taq DNA πολυμεράση (New England Biolabs)
- Δισαποσταγμένο νερό

Υλικά:

- Γάντια latex μιας χρήσεως
- Αυτόματες πιπέττες των 10 µL, 20 µL, 200 µL και 1000 µL

- Σωληνάρια για PCR (PCR tubes)
- Σωληνάρια (falcon) του 1.5 mL

Αρχή Μεθόδου:

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) είναι μία ενζυμική μέθοδος κατά την οποία πολλαπλασιάζεται μια συγκεκριμένη αλληλουχία του DNA *in vitro* ώστε να προκύπτουν εκατομμύρια αντίγραφα αυτής της αλληλουχίας. Η μέθοδος στηρίζεται στη χρήση ζεύγους εκκινητών (συγκεκριμένο ζεύγος για τον κάθε πολυμορφισμό), χλωριούχου μαγνησίου ($MgCl_2$), ρυθμιστικού διαλύματος και του ενζύμου Taq πολυμεράσης. Η διαδικασία είναι όμοια και για τους τρεις πολυμορφισμούς (R219K, R1587K και I883M) εκτός από το ζεύγος των εκκινητών οι οποίοι είναι διαφορετικοί για τον κάθε πολυμορφισμό (πίνακας 1).

Προετοιμασία:

Τα δείγματα αφήνονται να ξεψυχθούν από τους $-80^{\circ}C$ σε θερμοκρασία δωματίου. Όταν ξεπαγώσουν γίνεται μια γρήγορη φυγοκέντρηση (spin down).

Προετοιμάζεται το διάλυμα (mix) που θα χρησιμοποιηθεί στην PCR. Για κάθε δείγμα υπολογίζεται ότι χρειάζεται 12.5 μ mol για κάθε εκκινητή, 200 μ M dNTPs, 1.5 mM $MgCl_2$ και 0.85 U Taq DNA πολυμεράση σε τελικό όγκο 24 μ L.

Οι όγκοι που απαιτούνται για κάθε δείγμα για το PCR διάλυμα (mix) είναι: 2.50 μ L ρυθμιστικό διάλυμα για PCR (kit), 0.50 μ L dNTPs, 1.5 μ L $MgCl_2$, 0.25 μ L Primer Forward, 0.25 μ L Primer Reverse, 0.15 μ L Taq και 18.85 μ L δισαπποσταγμένο νερό.

Οπότε ανάλογα με τον αριθμό των δειγμάτων υπολογίζονται και οι ανάλογες ποσότητες.

Η προετοιμασία του PCR mix γίνεται σε παγοκύστη επειδή τα dNTPs και η Taq πολυμεράση είναι πολύ ευαίσθητα και πρέπει να παραμένουν σε χαμηλή θερμοκρασία.

Πειραματική διαδικασία:

1. Σε σωληνάριο για PCR μεταφέρονται 1 μL DNA (50 ng DNA)
2. Προστίθεται το PCR mix (24 μL) και το tube ανακινείται ελαφριά για να φτάσει το διάλυμα στον πάτο.
3. Το σωληνάριο τοποθετείται στον θερμικό κυκλοποιητή. Οι συνθήκες της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης είναι 95 °C για 5 min, 30 κύκλοι από 95 °C για 30 s, T_m (πίνακας 1) για 30 s, 72 °C για 30 s και ένα τελικό στάδιο στους 72°C για 7 min.
4. Μετά την PCR το δείγμα (PCR product) τοποθετείται στους -20 °C.

Το μέγεθος της περιοχής που απομονώνεται με την PCR αναφέρεται σε ζεύγη βάσεων (bp) και είναι διαφορετικό για τον κάθε πολυμορφισμό.

Ο R219K έχει PCR product 309 bp, ο R1587K έχει PCR product 139 bp και ο I883M έχει PCR product 132 bp.

SNP	Εκκινητές (5'→3')	T_m (°C)	Αναφορά
R219K	F: AAAGACTTCAAGGACCCAGCTT	55	Saleheen D και συν. [140]
	R: CCTCACATTCCGAAAGCATTA		
R1587K	F: AAGATTTATGACAGGACTGGACACGA	60	Tupitsina TV και συν.[141]
	R: TGAATGCCCTGCCAAGCTTTAC		
I883M	F:GAGAAGAGCCACCCTGGTTCCAACCAGAAGAGGAT	65	Clee SM και συν.[142]
	R: AGAAAGGCAGGAGACATCGCTT		

Πίνακας 1: Τα ζεύγη των εκκινητών για τον κάθε πολυμορφισμό (SNP:single nucleotide polymorphism) ξεχωριστά. T_m : είναι η θερμοκρασία υβριδοποίησης των εκκινητών.

3. Επώαση με περιοριστική ενδονουκλεάση

Αντιδραστήρια:

- Περιοριστικές ενδονουκλεάσες ανάλογα με τον πολυμορφισμό EcoNI (15.000U/mL), BssSI (4.000 U/mL), EcoRV (20.000U/mL)
- Ρυθμιστικό διάλυμα ανάλογα με τις συνθήκες που χρειάζεται το ένζυμο: 1XNEBuffer 4 (50mM οξικό κάλιο, 20mM Tris-οξικό, 10mM οξικό μαγνήσιο, 1mM διθειοθρεϊτόλη) ή 1XNEBuffer 3 (100 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl_2 , 1 mM διθειοθρεϊτόλη)

- 100xBSA (100 $\mu\text{g/mL}$ bovine serum albumin) (ανάλογα με το ένζυμο)
- Δισαποσταγμένο νερό

Υλικά:

- Γάντια latex μιας χρήσεως
- Αυτόματες πιπέττες των 10 μL , 20 μL , 200 μL
- Plates των 96 θέσεων (bio-greiner)

Αρχή Μεθόδου:

Μετά την ενίσχυση της επιθυμητής αλληλουχίας με την μέθοδο της PCR, ακολουθεί η χρήση των περιοριστικών ενδονουκλεασών. Με τα ένζυμα αυτά διασπάται η περιοχή του DNA στη θέση όπου εντοπίζεται ο πολυμορφισμός. Το ένζυμο που απαιτείται για τον κάθε πολυμορφισμό συγκεκριμένο και απαιτούνται διαφορετικές συνθήκες αντίδρασης (πίνακας 2). Η ενδονουκλεάση αφήνεται να δράσει για τουλάχιστον 8 ώρες σε σταθερή θερμοκρασία, η οποία καθορίζεται από την κατασκευάστρια εταιρεία (πίνακας 2).

Προετοιμασία:

Τα δείγματα, στα οποία έχει προηγηθεί η PCR, αφήνονται σε θερμοκρασία δωματίου να ξεπαγώσουν από τους -20°C .

Προετοιμάζεται το διάλυμα (mix) που θα χρησιμοποιηθεί στην επώαση. Για κάθε δείγμα υπολογίζεται ότι χρειάζεται επαρκή συγκέντρωση ενζύμου, 2 μL από το ειδικό ρυθμιστικό ένζυμο σύμφωνα με τον πίνακα 2, σε τελικό όγκο 10 μL . Σε δύο από τους τρεις πολυμορφισμούς γίνεται η χρήση 100xBSA (πίνακας 2) σε ποσότητα 0.4 μL .

Πειραματική διαδικασία:

1. Μεταφέρονται 10 μL από το προϊόν της PCR σε σωληνάριο του 0.5 mL.

2. Προστίθενται 10 μ L από το διάλυμα που έχει προπαρασκευαστεί (mix).
3. Το δείγμα αφήνεται για επώαση σε υδατόλουτρο σε θερμοκρασία που απαιτεί το ένζυμο (πίνακας 2) για τουλάχιστον 8 ώρες.
4. Το δείγμα φυλάσσεται στους 4°C.

SNP	Περιοριστικό ένζυμο	[E]	Ρυθμιστικό διάλυμα	100xBSA	Επώαση (°C)
R219K	EcoNI	5U	1XNEBuffer 4	☒	37
R1587K	BssSI	6U	1XNEBuffer 3	☒	37
I883M	EcoRV	10U	1XNEBuffer 3	☒	37

Πίνακας 2: Στον πίνακα φαίνονται τα περιοριστικά ένζυμα που χρησιμοποιήθηκαν για τον κάθε πολυμορφισμό με τις αντίστοιχες συνθήκες. [E]: είναι η συγκέντρωση του ενζύμου που μετρείται σε Units (U).

Για τον κάθε πολυμορφισμό:

R219K: Το ένζυμο αναγνωρίζει το K αλληλίο και το υδρολύει σε 184 bp και 125 bp.

R1587K: Το ένζυμο αναγνωρίζει το R αλληλίο και το υδρολύει σε 117 bp και 22 bp.

I883M: Το ένζυμο αναγνωρίζει το I αλληλίο και το υδρολύει σε 97 bp και 35 bp.

4. Ηλεκτροφόρηση δειγμάτων

Αντιδραστήρια:

- Διάλυμα χρώσης 6x Loading Dye (10 mM Tris-HCl, 0.03% κυανούν της βρωμοφαινόλης, 0.03% κυανούν της ξυλόλης, 60% γλυκερόλης, 60 mM EDTA)
- δείγμα αναφοράς: φX174DNA-Hae III Digest (New England Biolabs)
- Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης Tris-Borate-EDTA (TBE) συγκέντρωσης 10xTBE
- Gel αγαρόζης Nusieve 4%, 24 wells, Lonza

- Βρωμιούχο αιθίδιο

Όργανα:

- Ηλεκτροφορητικές συσκευές:
 1. Electrophoresis Power Supply EPS 1000, Pharmacia Biotech
 2. Feather Volt 500, Stratagene
- Τραπεζα UV: Transilluminator 4000, Statagene
- Σύστημα φωτογράφισης:
 1. Φωτογραφικός θάλαμος: DigiGenius Hood 20x26
 2. Φωτογραφική μηχανή: PowerShot G10, Canon

Υλικά:

- Γάντια latex μιας χρήσεως
- Αυτόματη πιπέττα των 20 μL

Αρχή Μεθόδου:

Με την μέθοδο αυτή διαχωρίζονται τα κομμάτια του DNA που έχουν προκύψει από την επώαση με περιοριστικά ένζυμα ανάλογα με το μήκος της αλυσίδας τους (ζευγών βάσεων) και του φορτίου τους με την βοήθεια της διαφοράς τάσεως του ρεύματος και του υλικού στο οποίο γίνεται η όλη διεργασία. Ο έλεγχος του μεγέθους των θραυσμάτων του DNA γίνεται με την παρατήρηση του πηκτώματος αγαρόζης σε τράπεζα υπεριώδους φωτός και με την λήψη φωτογραφίας από ειδική κάμερα.

Διαδικασία ηλεκτροφόρησης:

1. Σε κάθε δείγμα που έχει επωαστεί, προστίθενται 3 μL από το διάλυμα χρώσης
2. Μεταφέρονται 10 μL από το κάθε δείγμα στις θέσεις υποδοχής του gel
3. Σε μία θέση υποδοχής μεταφέρονται 3 μL από το δείγμα αναφοράς (lader)
4. Στην ηλεκτροφορητική συσκευή εφαρμόζεται τάση 90 Volt και η ηλεκτροφόρηση διαρκεί περίπου 30 min. Η ηλεκτροφόρηση γίνεται

με διάλυμα TBE 0.5 % (το οποίο αραιώνεται από αρχική συγκέντρωση 10x).

5. Ο γονότυπος σε κάθε πολυμορφισμό καθορίζεται με βάση το ηλεκτροφορητικό πρότυπο με παρατήρηση κάτω από υπεριώδη ακτινοβολία (UV)
6. Τα gel φωτογραφίζονται όσο βρίσκονται σε UV με ειδική φωτογραφική μηχανή.

Η διαδικασία είναι πανομοιότυπη για όλους τους πολυμορφισμούς.

Μελέτη ασθενούς με νόσο Ταγγέρη

1. Παραλαβή αίματος από ασθενή για μελέτη επιπέδων του PAF

Αντιδραστήρια – Όργανα

- Σωλήνες (falcon) των 50 mL
- Οργανικοί διαλύτες: αιθανόλη, χλωροφόρμιο
- Δοκιμαστικοί σωλήνες
- Φυγόκεντρος Heraeus LABOFUGE 400R
- Ποτήρια ζέσεως

Αρχή Μεθόδου:

Το αίμα παραλαμβάνεται και αποχύνεται άμεσα σε διάλυμα αιθανόλης, ώστε να απενεργοποιηθεί το ένζυμο ακετυλο-υδρολάση που υπάρχει σε αυτό και θα υδρολύσει τον PAF που περιέχεται στο εν λόγω αίμα κατά την παραμονή του. Στην συνέχεια φυγοκεντρείται και διαχωρίζεται σε υπερκείμενο που περιέχει τον PAF που εκχυλίστηκε με την αιθανόλη και ο οποίος είναι ο PAF που ευρίσκεται συνδεδεμένος στις λιποπρωτεΐνες του πλάσματος, ενώ στο ίζημα περιλαμβάνεται ο PAF που περιέχεται στα έμμορφα συστατικά του αίματος. Ο PAF που ευρίσκεται συνδεδεμένος στις λιποπρωτεΐνες του πλάσματος λέγεται «ελεύθερος – PAF» (Free–PAF) σε αντιδιαστολή με τον PAF που περιέχεται δεσμευμένος στα έμμορφα συστατικά του αίματος και λέγεται «δεσμευμένος PAF» (Bound–PAF). Στην συνέχεια ο PAF και στις δύο περιπτώσεις εκχυλίζεται από το υπερκείμενο και το ίζημα σύμφωνα με την μέθοδο εκχύλισης λιποειδών κατά Bligh-Dyer.

Πειραματική διαδικασία:

1. Σε 2 σωλήνες των 50 mL τοποθετούνται 20 mL αιθανόλης στο καθένα.
2. Σε κάθε tube προστίθενται 5 mL αίματος και γίνεται ήπια ανάδευση.
3. Ακολουθεί φυγοκέντρωση για 10 min σε 300 xg στους 4 °C.
4. Παραλαμβάνεται το υπερκείμενο και από τα δύο tubes και αποχύνεται σε ένα νέο σωλήνα των 50 mL. Σε αυτό το tube υπάρχει ο ελεύθερος PAF (Free–PAF).

5. Το ίζημα της φυγοκέντρωσης του 3^{ου} βήματος από το κάθε tube, αναδιαλύεται σε 8 mL νερού.
6. Τα διαλύματα 5^{ου} βήματος αποχύνονται σε μεγάλους δοκιμαστικούς σωλήνες που περιέχουν 20 mL μεθανόλης και 10 mL χλωροφόρμιο. Με αυτόν τον τρόπο επιτυγχάνεται μονοφασικό σύστημα.
7. Ακολουθεί φυγοκέντρωση για 10 min σε 1140 xg στους 4 °C.
8. Παραλαμβάνεται το υπερκείμενο και από τους 2 σωλήνες και αποχύνεται σε ένα νέο σωλήνα των 50 mL. Σε αυτόν τον σωλήνα υπάρχει ο δεσμευμένος PAF (Bound-PAF).
9. Το υπερκείμενο του tube του 8^{ου} βήματος που περιέχει τον Bound-PAF αποχύνεται σε υάλινο ποτήρι ζέσεως το οποίο περιέχει 20 mL νερό και 20 mL χλωροφόρμιο. Έτσι, προκύπτει διφασικό σύστημα 1:1:0.9 (v/v/v).
10. Το υπερκείμενο του σωλήνα του 4^{ου} βήματος που περιέχει τον Free-PAF αποχύνεται σε υάλινο ποτήρι ζέσεως το οποίο περιέχει 8 mL νερό και 12 mL χλωροφόρμιο και είναι μονοφασικό σύστημα. Στην συνέχεια προστίθενται ακόμα 15 mL χλωροφόρμιο και 12 mL νερό. Έτσι, προκύπτει διφασικό σύστημα.
11. Από τα 2 ποτήρια ζέσεως των βημάτων 9 και 10, τα οποία περιέχουν τον Bound-PAF και Free-PAF αντίστοιχα, παραλαμβάνονται οι κάτω φάσεις (χλωροφορμικές φάσεις) που περιέχουν τα λιποειδή και τον PAF. Αν δεν έχουν διαχωριστεί επαρκώς οι φάσεις σε σύντομο διάστημα, τότε καλύπτονται με αλουμινόχαρτο και τοποθετούνται στους -20 °C για αρκετές ώρες για να διαχωριστούν οι 2 φάσεις.

2. Εκχύλιση λιποειδών κατά Bligh-Dyer [143]

Αντιδραστήρια – Όργανα

- Οργανικοί διαλύτες (χλωροφόρμιο, μεθανόλη) αναλυτικής καθαρότητας.
- Περιστρεφόμενη συσκευή εξάτμισης σε ελαττωμένη πίεση (flash evaporator)

Αρχή μεθόδου

Με κατάλληλης πολικότητας μονοφασικό σύστημα διαλυτών επιτυγχάνεται η εκχύλιση όλων των λιποειδών καθώς επίσης και η εκχύλιση μικρών ποσοτήτων υδατοδιαλυτών ουσιών όπως αλάτων, αμινοξέων, σακχάρων κλπ. Με τη μετατροπή του μονοφασικού συστήματος σε διφασικό γίνεται η κατανομή όλων των λιποειδών στην χλωροφορμική φάση και των υδατοδιαλυτών ουσιών στην υδατική.

Αναλυτική πορεία:

Το δείγμα εκχυλίζεται με κατάλληλης ποσότητας μίγμα χλωροφορμίου, μεθανόλης, νερού (1:2:0.8 v/v/v), φυγοκεντρείται αν χρειάζεται να απομακρυνθούν τα αδιάλυτα συστατικά και στη συνέχεια προστίθενται υπολογισμένες ποσότητες χλωροφορμίου και νερού ώστε η αναλογία να μετατραπεί σε 1:1:0.9 (v/v/v). Η χλωροφορμική στιβάδα που περιέχει τα λιποειδή μεταφέρεται σε σφαιρική φιάλη και ο διαλύτης απομακρύνεται με περιστρεφόμενη συσκευή εξάτμισης με ελαττωμένη πίεση και σε θερμοκρασία 30-35 °C. Τα λιποειδή μεταφέρονται με μικρή ποσότητα χλωροφορμίου-μεθανόλης 1:1 v/v (4 φορές από 2 mL) σε δοκιμαστικό σωλήνα. Ο κάθε δοκιμαστικός σωλήνας (Free-PAF και Bound-PAF) που περιέχει συνολικά 8 mL χλωροφορμίου-μεθανόλης 1:1 v/v σφραγίζεται με αλουμινόχαρτο, με καπάκι και παραφίλμ. Οι δοκιμαστικοί σωλήνες τοποθετούνται στους -20 °C για περαιτέρω επεξεργασία.

3. Χρωματογραφία στήλης λιποειδών

Αντιδραστήρια –Όργανα:

- Υλικό πλήρωσης στήλης: Πυριτικό οξύ (silica), (Kieselgel 60, 35-70 mesh ASTM, Merck)
- Οργανικοί διαλύτες (διαιθυλαιθέρας, χλωροφόρμιο, μεθανόλη) αναλυτικής καθαρότητας
- Υάλινη στήλη με ηθμό πορσελάνης

Αρχή μεθόδου

Με την χρωματογραφική αυτή μέθοδο απομακρύνουμε από το δείγμα τις πρωτεΐνες και μεγάλο μέρος των λιποειδών, ώστε να εμπλουτιστεί το δείγμα στον PAF και να μειωθεί η μάζα του και να γίνει κατάλληλο να καθαριστεί περαιτέρω ο PAF με χρωματογραφία υψηλής πίεσης (HPLC).

Προετοιμασία:

Το πυριτικό οξύ εκπλένεται διαδοχικά 3 φορές με απεσταγμένο νερό και 1 φορά με μεθανόλη. Έπειτα, αφήνεται για μία μέρα ώστε να εξατμιστεί η περίσσεια μεθανόλης και εν συνεχεία αφήνεται για μία νύκτα στον φούρνο στους 100 °C για να ενεργοποιηθεί. Με αυτόν τον τρόπο η silica είναι πλέον έτοιμη για χρήση.

Αναλυτική πορεία:

Το πυριτικό οξύ διασπείρεται σε διάλυμα μεθανόλης-νερού 1:1.5 (v/v), που αποτελεί το πρώτο σύστημα έκλουσης. Αποχύνεται σε υάλινη στήλη διαμέτρου 1 cm μέχρι το κατάλληλο ύψος αυτής (20 cm). Η απόχυση γίνεται προσεκτικά, ώστε να προκύψει ομοιογενής στήλη και να μην σχηματιστούν κενά ή φυσαλίδες αέρα. Η στήλη εκλούεται 3 φορές με ίσο όγκο του πρώτου συστήματος έκλουσης, προσέχοντας πάντα στην όλη διαδικασία να υπάρχει ποσότητα υγρού υπεράνω του πυριτικού οξέος. Στη συνέχεια, τοποθετείται το δείγμα διαλυμένο σε μικρό όγκο κατάλληλου διαλύτη και εκλούεται η στήλη με τους διάφορους διαλύτες έκλουσης.

4. Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) [144]

Αντιδραστήρια –Όργανα:

- Οργανικοί διαλύτες χρωματογραφικής καθαρότητας (ακετονιτρίλιο, μεθανόλη, τετραϋδροφουράνιο, ισοπροπανόλη, κυκλοεξάνιο, αιθανόλη) απαερομένοι σε υδρόλουτρο υπερήχων.
- Νερό χρωματογραφικής καθαρότητας
- Πρότυπα λιποειδή: Sigma
- Υγρός χρωματογράφος Hewlett-Packard, Hp Series 1100

- Ανιχνευτής Hewlett-Packard, Hp Series 1100
- Καταγραφέας – Ολοκληρωτής Hewlett-Packard, Hp-3395
- Μικροσύριγγες ακριβείας των 50 μL και 250 μL
- Στήλη κατιοανταλλαγής WCS Analytical Column PARTISIL 10 SCX 4.6 mm x 250mm
- Υδρόλουτρο υπερήχων: Branson 1200

Αρχή μεθόδου

Με την χρωματογραφική αυτή μέθοδο λαμβάνεται κλάσμα που περιέχει μόνο τον PAF. Έτσι, η βιολογική δραστηριότητα που θα προσδιοριστεί στην συνέχεια με βιολογική μέθοδο να μην έχει τροποποιηθεί λόγω πιθανών αναστολέων ή/και άλλων δραστικών ουσιών που περιέχονται στο προς εξέταση δείγμα.

Αναλυτική πορεία:

Πρίν την χρήση της στήλης, απαιτείται ο καθαρισμός της με κατάλληλους διαλύτες ανάλογα με το υλικό πλήρωσης της. Στη συνέχεια, η στήλη πρέπει να σταθεροποιηθεί με τον πρώτο διαλύτη έκλουσης και μετά τοποθετείται το δείγμα με τη μικροσύριγγα. Το δείγμα είναι διαλυμένο σε μικρό όγκο 1-50 μL κατάλληλου διαλύτη (χλωροφόρμιο-μεθανόλη 1:1). Η έκλουση των διαχωρισμένων ουσιών ελέγχεται με την μεταβολή της οπτικής απορρόφησης στα 208 nm και τα κλάσματα παραλαμβάνονται σε υάλινους δοκιμαστικούς σωλήνες.

5. Βιολογική δοκιμασία συσσώρευσης αιμοπεταλίων *in vitro* [27]

Αντιδραστήρια-Όργανα:

- Διάλυμα 10xTyrodes φύλαξης (stock) : Σε 1L περιέχονται 80 g NaCl, 1.95 g $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 10 g γλυκόζης
- Διάλυμα 100x CaCl_2 stock: Ποσότητα 1.911 g CaCl_2 σε 100 mL H_2O
- Διάλυμα φύλαξης 0.2 M EGTA (stock) : Ποσότητα 0.76 g EGTA διαλύεται σε 10 mL H_2O , Ρυθμίζεται το pH του διαλύματος στα 7.5 με 5 M NaOH

- Διάλυμα ζελατίνης 10% σε νερό
- Ρυθμιστικά διαλύματα για ρύθμιση του pH-μέτρου
- Διαλύματα Tyrodes-Gelatin pH 6,5 (Tg pH 6.5), Tyrodes-Gelatin-EGTA pH 6.5 (Tg-EGTA pH 6.5): Σε 80 mL νερού προστίθενται 10 mL Tyrodes 10 X stock. Χρησιμοποιώντας μαγνητικό αναδευτήρα καθ' όλη τη διάρκεια της προσθήκης, προστίθενται 2.5 mL ζελατίνης 10% (λιωμένης στο σημείο βρασμού) και 5 mL διαλύματος NaHCO_3 (0.2030 g NaHCO_3 σε 10 mL νερού), το οποίο πρέπει να χρησιμοποιείται αμέσως μετά την παρασκευή του. Κατόπιν συμπληρώνεται ο όγκος στα 100 mL με νερό και το διάλυμα χωρίζεται σε δύο τμήματα ίσων όγκων (50 mL το καθένα). Στο πρώτο προστίθενται 25 μL 0.2 M EGTA. Το pH και των δύο κλασμάτων ρυθμίζεται στο 6.46 με 1 N HCl. Αμέσως γεμίζονται σωλήνες των 15 mL μέχρι επάνω (δίχως φυσαλίδες) και σκεπάζονται με ταινία στερεής παραφίνης (parafilm). Τα διαλύματα φυλάσσονται σε θερμοκρασία δωματίου.
- Διάλυμα Tyrodes και ασβεστίου, pH 7.2 (Tg-Ca pH 7.2): Σε 5 mL διαλύματος φύλαξης Tyrodes 10 X (stock) προστίθενται 40 mL νερού. Με συνεχή χρήση μαγνητικού αναδευτήρα, προστίθενται 1.25 mL 10% ζελατίνη. Έπειτα προστίθενται 0.5 mL 100 X φύλαξης CaCl_2 (stock). Στη συνέχεια, προστίθενται 2.5 mL διαλύματος NaHCO_3 . Ο όγκος συμπληρώνεται μέχρι τα 50 mL με νερό και το pH ρυθμίζεται στο 7.16 με 1 N HCl. Διατηρείται στους 37 °C, σε υδρόλουτρο, σε ερμητικά κλειστούς σωλήνες με απομονωτική ταινία στερεής παραφίνης (parafilm).
- Αντιπηκτικό διάλυμα κιτρικών με γλυκόζη (ACD): Σε 1000 mL H_2O περιέχονται 13.65 g κιτρικού οξέος, 25 g κιτρικού νατρίου και 20 g δεξτρόζης.
- Αλβουμίνη βοδινού ορού (BSA) stock: Ποσότητα 100 mg BSA ελεύθερης λιπαρών οξέων (Sigma)/mL φυσιολογικού ορού. Φυλάσσεται στους -20 °C.

- Διάλυμα BSA 2.5 mg /mL φυσιολογικού ορού: Από 10 mL φυσιολογικού ορού αφαιρούνται 250 μ L και προστίθενται 250 μ L BSA stock
- Ficoll-Paque (Pharmacia)
- Aggregometer (CHRONO-LOG)
- PH-μετρο (CHEMTRIX Type 60A)
- Φωτόμετρο Pharmacia Biotech/Novasped II
- Υδρόλουτρο 37°C
- Φυγόκεντρος Heraeus LABOFUGE 400R
- Διάλυμα εργασίας PAF συγκέντρωσης 10^{-8} και 10^{-9} M

Αρχή μεθόδου:

Τα αιμοπετάλια απομονώνονται με φυγοκέντρηση από το αίμα σαν πλούσιο σε αιμοπετάλια πλάσμα (platelet rich plasma, PRP) και στην συνέχεια με συνεχείς εκπλύσεις με Ficoll-Paque και φυγοκεντρήσεις λαμβάνονται σε καθαρή μορφή σε κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα. Με την βοήθεια του κατάλληλου οργάνου (συσσωρευματομέτρου) που είναι ένα τροποποιημένο φωτόμετρο, μετράται το ύψος της προκαλούμενης συσσώρευσης των αιμοπεταλίων που προκαλείται από γνωστό όγκο του προς ανάλυση δείγματος και συγκρίνεται με πρότυπη καμπύλη που δίνει το ύψος συσσώρευσης σε συνάρτηση με την συγκέντρωση πρότυπου διαλύματος PAF. Στην συνέχεια προσδιορίζεται υπολογιστικά η συγκέντρωση του PAF στο προς μελέτη δείγμα.

Αναλυτική πορεία:

Απομόνωση πλυμένων αιμοπεταλίων από αίμα κουνελιού:

Σε πλαστικούς σωλήνες των 50 mL προστίθενται 7 mL ACD. Το αίμα συλλέγεται από την κεντρική αρτηρία του αυτιού του κουνελιού και ο σωλήνας γεμίζεται με αίμα μέχρι τα 50 mL. Αναμιγνύεται ήπια με αναστροφή. Στη συνέχεια, ακολουθεί φυγοκέντρηση στους 24°C επί 15 min στα 500 xg.

Κατά τη διάρκεια της φυγοκέντρωσης μεταφέρουμε 2 mL Ficoll-Paque σε πλαστικούς σωλήνες των 14 mL. Αναρροφώνται τα 2/3 του υπερκείμενου πλάσματος (πλάσμα πλούσιο σε αιμοπετάλια, PRP) με πλαστικό σιφώνιο των 20mL και μεταφέρονται σε άλλο πλαστικό σωλήνα των 50 mL. Τοποθετείται το πλάσμα πάνω στο στρώμα του Ficoll, με μέγιστο ποσό πλάσματος τα 9 mL για κάθε 2 mL Ficoll, με πλαστικά σιφώνια και μεταφέροντας ίσους όγκους πλάσματος σε 2 ή 3 σωλήνες, ανάλογα με τον συνολικό όγκο του πλάσματος. Σκεπάζονται οι σωλήνες με απομονωτική ταινία στερεής παραφίνης (parafilm).

Ακολουθεί φυγοκέντρωση στους 24°C επί 20 min στα 780 xg. Τα αιμοπετάλια εμφανίζονται σαν ταινία μεταξύ της στιβάδας του υπερκείμενου πλάσματος και του στρώματος του Ficoll μετά τη φυγοκέντρωση. Το υπερκείμενο πλάσμα (φτωχό σε αιμοπετάλια) αναρροφάται και απορρίπτεται με πλαστική σύριγγα των 20 mL. Το στρώμα των αιμοπεταλίων διαπερνάται με σιλικοναρισμένη πιπέτα Pasteur, το Ficoll αναρροφάται και απορρίπτεται.

A) Αν υπάρχουν 2 σωλήνες: Προστίθενται 7 mL (Tg-EGTA pH 6.5) σε κάθε σωλήνα. Το διάλυμα αφήνεται να τρέξει ήπια στα τοιχώματα του σωλήνα και χωρίς ανάμιξη, αποχύνεται το αιώρημα σε άλλο πλαστικό σωλήνα των 14 mL, αφήνοντας τα ερυθρά αιμοσφαίρια στον αρχικό σωλήνα.

B) Αν υπάρχουν 3 σωλήνες: Προστίθενται 3 mL (Tg-EGTA pH 6.5) σε κάθε σωλήνα. Το διάλυμα αφήνεται να τρέξει ήπια στα τοιχώματα του σωλήνα και χωρίς ανάμιξη, αποχύνεται το αιώρημα σε άλλο πλαστικό σωλήνα των 14 mL, του οποίου το περιεχόμενο χωρίζεται σε 2 ίσα μέρη που μεταφέρονται σε δύο χωριστούς σωλήνες και προστίθενται περίπου 3 mL (Tg-EGTA pH 6.5)

Το περιεχόμενο του κάθε σωλήνα μεταφέρεται σε 2 mL Ficoll (8 mL αιμοπεταλίων σε κάθε σωλήνα) και καλύπτεται με parafilm. Ακολουθεί φυγοκέντρωση επί 15 min στους 24°C στα 750 xg

Αναρροφάται και απορρίπτεται το υπερκείμενο ρυθμιστικό διάλυμα. Διαπερνάται το στρώμα αιμοπεταλίων με πιπέτα Pasteur και αναρροφάται και απορρίπτεται το Ficoll.

Προστίθενται ίσοι όγκοι (~8 mL) Tg pH 6.5 σε κάθε σωλήνα, αφήνοντας το διάλυμα να τρέξει στα τοιχώματα του σωλήνα και χωρίς ανάμειξη, μεταφέρεται το αιώρημα σε καθαρό πλαστικό σωλήνα των 14 mL, ενώ καλύπτεται με parafilm. Ακολουθεί φυγοκέντρωση επί 15 min στους 24°C στα 2800 xg.

Απορρίπτεται το υπερκείμενο ρυθμιστικό διάλυμα. Με πιπέτα Pasteur, αφαιρείται και η τελευταία σταγόνα από τα τοιχώματα του δοχείου.

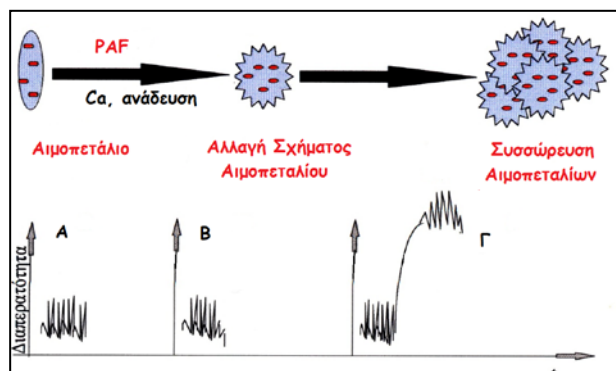
Με αυτόματη πιπέτα προστίθενται 0.8 mL Tg pH 6.5 σε κάθε συσσωμάτωμα αιμοπεταλίων και αναδιασπείρονται τα κύτταρα με προσοχή. Το περιεχόμενο των σωλήνων ενώνεται σε πλαστικό σωλήνα. Ετοιμάζεται αιώρημα αιμοπεταλίων σε Tg pH 6.5 που να περιέχει 1.25×10^9 κύτταρα/mL: Από το πυκνό διάλυμα αιμοπεταλίων λαμβάνονται 10 μ L και 990 μ L Tg pH 6.5 και φωτομετρούνται στα 530 nm. Ο αριθμός των κυττάρων στα 10λ δίνεται από τη σχέση: αριθμός κυττάρων/10λ=A x 1.25×10^8 , όπου A η απορρόφηση. Με βάση την πρότυπη καμπύλη της οπτικής απορρόφησης συναρτήσει του αριθμού αιμοπεταλίων υπολογίζεται ο αριθμός αιμοπεταλίων και ετοιμάζεται το επιθυμητό εναιώρημα αιμοπεταλίων.

Συσσώρευση πλυμένων αιμοπεταλίων κουνελιού:

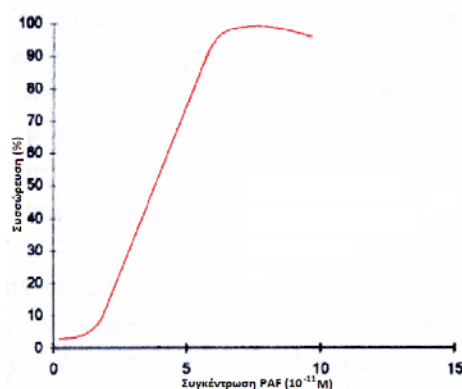
Στις ειδικές κυψελίδες του aggregometer προστίθενται 50 μ L από το αιώρημα αιμοπεταλίων και 200 μ L (Tg Ca pH 7.2) καθώς και μικρός μαγνητικός αναδευτήρας. Επωάζονται επί 15 min σε υδρόλουτρο 37°C. Παρασκευάζονται πρότυπα διαλύματα PAF, διαλυτοποιημένα σε BSA 2.5 mg/mL, από διάλυμα PAF stock, γνωστής συγκέντρωσης, κάνοντας τις κατάλληλες αραιώσεις έτσι ώστε στην κυψελίδα του aggregometer να υπάρχουν συγκεντρώσεις PAF 10^{-9} (1 mL), 10^{-10} , 10^{-11} , όταν προστίθενται διάλυμα PAF 10 μ L.

Ρυθμίζεται το 100 της κλίμακας του aggregometer με (Tg Ca pH 7.2) και το 0 με το εναιώρημα αιμοπεταλίων σε (Tg Ca pH 7.2). Τοποθετείται η κυψελίδα με το εναιώρημα αιμοπεταλίων στη θερμοστατούμενη κυψελίδα του aggregometer και προστίθενται τα διαλύματα PAF. Σαν 100% συσσώρευση ορίζεται εκείνη η συγκέντρωση PAF που προκαλεί μέγιστη

αντιστρεπτή συσσώρευση, ενώ η τιμή EC_{50} αντιστοιχεί σε εκείνη τη συγκέντρωση PAF που προκαλεί 50% συσσώρευση στα αιμοπετάλια.



Εικόνα 5.1: Σχηματική παράσταση συσσώρευσης αιμοπεταλίων μετά την προσθήκη PAF (όπου A: Αιμοπετάλια, B: Αιμοπετάλια μετά από προσθήκη του PAF, Γ: Συσσώρευση αιμοπεταλίων).



Εικόνα 5.2.: Καμπύλη % συσσώρευσης αιμοπεταλίων συναρτήσει της συγκέντρωσης PAF.

6. Παραλαβή αίματος από ασθενή για μελέτη των 2 βιοσυνθετικών ενζύμων (PAF-CPT και Lyso-PAF AT) και του αποικοδομητικού ενζύμου του PAF (PAF-AH)

6.1. Παραλαβή κυττάρων και πλάσματος από ολικό αίμα

Αντιδραστήρια –Όργανα:

- Διάλυμα κιτρικών (0.6825 g κιτρικό οξύ και 1.25 g κιτρικό νάτριο διαλυμένα σε 50 mL νερού)
- Φυσιολογικός ορός

- Δεξτράνη 3%
- Ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl
- Lysis buffer (8.29 g χλωριούχο αμμώνιο, 1.0012 g όξινο ανθρακικό κάλιο και 0.038 g EDTA διαλυμένα σε 1 L νερού)
- Tubes των 15 mL
- Φυγόκεντρος Heraeus LABOFUGE 400R
- Υπερφυγόκεντρος
- Συσκευή υπερήχων
- Σωληνάρια (eppendorfs) του 1.5 mL

Αρχή μεθόδου:

Ο διαχωρισμός των έμμορφων συστατικών του αίματος βασίζεται στην διαφορετική ταχύτητα καταβύθισης τους. Από την πρώτη φυγοκέντρωση λαμβάνεται με το υπερκείμενο το πλάσμα πλούσιο σε αιμοπετάλια (PRP). Με τις επόμενες φυγοκεντρήσεις και ύστερα από χρήση διαφόρων διαλυμάτων όπως δεξτράνης, φυσιολογικού ορού και Tris-HCl, λαμβάνονται τα αιμοπετάλια, τα ερυθροκύτταρα και τα λευκοκύτταρα. Τα κλάσματα φυλλάσσονται στους -20 °C.

Πειραματική διαδικασία:

1. Σε σωλήνα των 15 mL τοποθετείται 1 mL από το διάλυμα κιτρικών (λειτουργεί ως αντιπηκτικό) και στη συνέχεια προστίθενται 9 mL αίματος και γίνεται ήπια ανάδευση.
2. Ακολουθεί φυγοκέντρωση για 10 min σε 194 xg στους 25 °C.
3. Παραλαμβάνεται το υπερκείμενο της φυγοκέντρωσης (πρόκειται για το πλάσμα πλούσιο σε αιμοπετάλια, platelet-rich plasma, PRP) και τοποθετείται σε σωλήνα.
4. Στο ίζημα της φυγοκέντρωσης του 2^{ου} βήματος συμπληρώνεται φυσιολογικός ορός μέχρι τα 10 mL και γίνεται ήπια ανάδευση.
5. Από το διάλυμα του 4^{ου} βήματος λαμβάνονται 5 mL και αποχύνονται σε σωλήνα, προστίθεται 1.7 mL δεξτράνης και το διάλυμα αφήνεται για 1 ώρα ώστε να καταβυθιστούν τα ερυθρά.

6. Το υπερκείμενο του 3^{ου} βήματος φυγοκεντρείται για 20 min σε 1400 xg στους 25 °C.
7. Λαμβάνεται το υπερκείμενο, μοιράζεται σε eppendorfs και τοποθετούνται σε πάγο για αποθήκευση. Πρόκειται για το πλάσμα που θα περιέχει την PAF-AH.
8. Το ίζημα της φογοκέντρησης του 6^{ου} βήματος αναδιαλύεται σε 1 mL Tris-HCl. Αυτό είναι το διάλυμα των αιμοπεταλίων, συμβολίζεται ως P (platelets) και φυλάσσεται σε πάγο μέχρι να γίνει ομογενοποίηση.
9. Από το διάλυμα του 5ου βήματος μετά το πέρας 1 ώρας, λαμβάνεται το υπερκείμενο και φυγοκεντρείται για 10 min σε 500 xg στους 25 °C.
10. Από το ίζημα του 4^{ου} βήματος λαμβάνονται 500 μL και αποχύνονται σε σωλήνες που περιέχουν 2.5 mL φυσιολογικό ορό και γίνεται ήπια ανάδευση. Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 15 min σε 200 xg στους 25 °C.
11. Μετά την φυγοκέντρηση του 9^{ου} βήματος, απορρίπτεται το υπερκείμενο και στο ίζημα προστίθενται 5 mL Lysis buffer, γίνεται ήπια ανάδευση και αφήνεται για 10 min.
12. Από την φυγοκέντρηση του 4^{ου} βήματος, απορρίπτεται το υπερκείμενο και στο ίζημα γίνεται 2 φορές έκπλυση με 3 mL φυσιολογικού ορού. Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 10 min σε 500 xg στους 25 °C μετά από κάθε έκπλυση.
13. Μετά την τελευταία φυγοκέντρηση του 12^{ου} βήματος, απορρίπτεται το υπερκείμενο και το ίζημα αναδιαλύεται σε 2 mL Tris-HCl. Πρόκειται για το κλάσμα των ερυθρών και συμβολίζεται ως E (erythrocytes).
14. Μετά το πέρας των 10 λεπτών, το διάλυμα του 11^{ου} βήματος φυγοκεντρείται για 10 min σε 300 xg στους 25 °C. Μετά το τέλος της φυγοκέντρησης απορρίπτεται το υπερκείμενο και το ίζημα αναδιαλύεται σε 1 mL Tris-HCl. Αυτό είναι το διάλυμα των λευκών, συμβολίζεται ως L (leukocytes) και φυλάσσεται στον πάγο μέχρι να γίνει η ομογενοποίηση.
15. Ακολουθεί ομογενοποίηση στα διαλύματα των βημάτων 8 και 14 και στη συνέχεια φυγοκέντρηση 10 min σε 500 xg στους 4 °C.

16. Μετά την φυγοκέντρωση του 15^{ου} βήματος, λαμβάνεται 1 mL από το κάθε υπερκείμενο (P και L) και μοιράζεται σε erpendorfs.
17. Παρόμοια, από τα βήματα 7 και 13 λαμβάνονται τα κλάσματα του πλάσματος και των ερυθρών, αντίστοιχα.
18. Όλα τα δείγματα φυλάσσονται στο ψυγείο των -20°C για περαιτέρω επεξεργασία.

6.2. Προσδιορισμός πρωτεΐνης με τη μέθοδο Bradford [145]

Αντιδραστήρια – Όργανα

- Αλβουμίνη βόειου ορού (BSA): 3.3 mg/10 mL : Διαλύονται 33 mg BSA σε 100 mL νερό ή ρυθμιστικό διάλυμα
- Προκατασκευασμένο αντιδραστήριο Bradford (Sigma), το οποίο είναι διάλυμα Brilliant Blue G και φωσφορικού οξέος σε μεθανόλη
- Φωτόμετρο 4040-LKB Biochrom, Novaspec

Αρχή μεθόδου:

Η χρωστική που περιέχεται στο αντιδραστήριο Bradford συμπλέκεται με τις πρωτεΐνες προκαλώντας μια μετατόπιση της μέγιστης απορρόφησης της χρωστικής από 465 σε 595 nm. Η απορρόφηση είναι ανάλογη της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης. Η γραμμικότητα της ανάλυσης κυμαίνεται από 1 µg σε 140 µg πρωτεΐνης, ως προς BSA.

Αναλυτική πορεία:

Παρασκευάζονται πρότυπα διαλύματα BSA των οποίων οι συγκεντρώσεις κυμαίνονται από 1-10 µg/mL. Παρασκευάζεται διάλυμα του άγνωστου δείγματος σε νερό ώστε η τελική του συγκέντρωση να βρίσκεται στην περιοχή από 1-10 µg/mL. Τα διαλύματα των προτύπων και των αγνώστων δειγμάτων πρέπει να έχουν τελικό όγκο 1 mL. Προστίθεται 200 µL αντιδραστηρίου Bradford. Προσδιορίζεται η απορρόφηση των προτύπων και των δειγμάτων μετά από 5 min. Το σύμπλοκο πρωτεΐνης-χρωστικής είναι σταθερό για 60 min. Ο υπολογισμός της περιεκτικότητας

του δείγματος σε πρωτεΐνη γίνεται με βάση την πρότυπη καμπύλη αναφοράς.

Χημική ένωση	Συγκέντρωση
DOC	0.1 % w.v
DTT	1.0 M
EDTA	0.05 M
Γλυκερόλη	99 % w.v
Μερκαπτοαιθανόλη	1.0 M
Tris	2.0 M

Πίνακας 6.2.1: Επιτρεπτές τιμές συγκεντρώσεων της μεθόδου Bradford για τις ενώσεις που χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη.

6.3. Προσδιορισμός δραστηριότητας της PAF ακετυλοϋδρολάσης (PAF-AH) [146]

Αντιδραστήρια – Όργανα

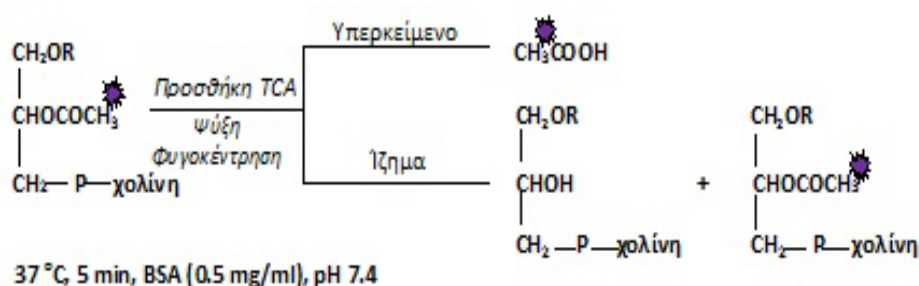
- PAF (C_{16:0}), Sigma
- BSA ελεύθερης λιπαρών οξέων, Sigma
- Ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl (50 mM-pH 7.4) : Διαλύονται 0.605 g Tris σε νερό, ρυθμίζεται το pH με HCl 1 M στο 7.4 και αραιώνεται το διάλυμα στα 100 mL νερό.
- Διάλυμα φύλαξης (stock) PAF σε CHCl₃/MeOH (1:1), 10⁻⁴ M
- Διάλυμα BSA 100 mg/mL : Διαλύονται 1000 mg BSA ελεύθερης λιπαρών οξέων (Sigma) σε 10 mL ρυθμιστικού διαλύματος Tris-HCl (50 mM-pH 7.4)
- Διάλυμα BSA 10 mg/mL : Διαλύονται 100 mg BSA ελεύθερης λιπαρών οξέων (Sigma) σε 10 mL ρυθμιστικού διαλύματος Tris-HCl (50 mM-pH 7.4)
- Διάλυμα PAF σε BSA (10 mg/mL) συγκέντρωσης 800 μM και ειδικής δραστηριότητας 1000 cpm/nmol (διάλυμα εργασίας: Φέρεται κατάλληλη ποσότητα διαλύματος PAF 10⁻⁴ M σε βιδωτό σωλήνα, εξατμίζεται ο διαλύτης σε ρεύμα αζώτου και το ίζημα αναδιαλύεται σε κατάλληλη ποσότητα διαλύματος BSA 10 mg/mL έτσι ώστε να προκύψει συγκέντρωση PAF 800 μM. Παρασκευάζεται καινούριο διάλυμα κάθε φορά. Προσθήκη 5 μL από το διάλυμα αυτό στον

ενζυμικό προσδιορισμό δίνουν τελική συγκέντρωση PAF 20 μM (20.000 cpm) και τελική συγκέντρωση BSA 0.25 mg/mL.

- Διάλυμα TCA 40%
- Μικροφυγόκεντρος
- Ανακινούμενο υδρόλουτρο
- Σωλήνες erpendorf

Αρχή μεθόδου:

Ο προσδιορισμός της δραστηριότητας της PAF-AH βασίζεται στη μέτρηση της ραδιενέργειας του επισημασμένου προϊόντος ($[\text{H}^3]\text{-CH}_3\text{COOH}$) που απελευθερώνεται στο υπερκείμενο διάλυμα μετά την επώαση του ενζυμικού παρασκευάσματος με $[\text{H}^3]\text{-PAF}$, παρουσία BSA και την καταβύθιση των πρωτεϊνών με TCA. Το επισημασμένο οξικό οξύ διαχωρίζεται από τον μη αντιδρώντα $[\text{H}^3]\text{-PAF}$ αφού αυτός καταβυθίζεται ως σύμπλοκο με την BSA. Διαγραμματική αναπαράσταση του προσδιορισμού φαίνεται στην εικόνα 6.3.1.



Εικόνα 6.3.1 : Συνοπτική απεικόνιση του προσδιορισμού της PAF-AH

Αναλυτική πορεία:

Σε σωλήνα erpendorf φέρονται το ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCL (50 mM-pH 7.4), 5 μL διαλύματος εργασίας λυσο-PAF (τελική συγκέντρωση 20 μM), το ρυθμιστικό διάλυμα αναδιάλυσης και η αντίδραση ξεκινά με την προσθήκη του ενζυμικού παρασκευάσματος. Επειδή η προστιθέμενη ποσότητα του ενζυμικού παρασκευάσματος, το οποίο είναι διαλυμένο σε ρυθμιστικό διάλυμα αναδιάλυσης, μπορεί να κυμαίνεται από 2-50 μL προστίθεται κατάλληλη ποσότητα ρυθμιστικού διαλύματος ώστε όλοι οι προσδιορισμοί να περιέχουν 50 μL ρυθμιστικού διαλύματος αναδιάλυσης. Ο τελικός όγκος του μίγματος επώασης είναι 200 μL . Η επώαση της

αντίδρασης γίνεται σε θερμοστατούμενο υδρόλουτρο υπό ανάδευση στους 37°C για 15-30 min. Μετά το τέλος της αντίδρασης προσθέτονται 2 μL διαλύματος BSA 100 mg/mL για να εξασφαλιστεί η ποσοτική δέσμευση του μη αντιδρώντος PAF και μετά από 10 min προστίθενται 64 μL ψυχρού διαλύματος TCA 40 % (τελικός όγκος TCA 10 %). Το διάλυμα αφήνεται σε πάγο για 30 min ώστε να καταβυθιστούν οι πρωτεΐνες και στην συνέχεια φυγοκεντρείται σε μικροφυγόκεντρο στα 9503 xg για 2 min. Παραλαμβάνονται 100 μL από το υπερκείμενο και μεταφέρονται, με την βοήθεια του υγρού σπινθηρισμού (dioxane base), σε vials για την μέτρηση της ραδιενέργειας. Γίνεται επίσης και δείγμα αναφοράς, το οποίο δεν περιέχει ενζυμικό παρασκεύασμα. Η ειδική δραστηριότητα της PAF-AH υπολογίζεται από τον τύπο:

Ειδική δραστηριότητα PAF-AH (nmol/min/mg πρωτεΐνης) :

$$\frac{[\text{RA}_{\text{δείγματος}}(\text{cpm}) - \text{RA}_{\text{τυφλού}}(\text{cpm})] \times \text{ειδική δραστηριότητα } [^3\text{H}]\text{-PAF (nmol/cpm)}}{\text{Χρόνος επώασης (min)} \times \text{Ποσότητα ενζυμικού παρασκευάσματος (mg πρωτεΐνης)}}$$

6.4. Προσδιορισμός δραστηριότητας της DDT-ανεξάρτητης αλκυλο-ακετυλογλυκερόλη:CDP-χολίνη φωσφοχολινοτρανσφεράσης (CDP-CPT) σε ομογενοποίηση κυττάρων [48]

Αντιδραστήρια – Όργανα:

- 1-O-αλκυλο-2-sn-ακετυλο-γλυκερόλη (AAG) (BIOMOL Int. L.P)
- CDP-Χολίνη (Sigma)
- Διθειοθρεϊτόλη (DTT) (Sigma)
- EDTA (Sigma)
- MgCl_2 (Sigma)
- Οργανικοί διαλύτες (οξικό οξύ, ακετόνη, μεθανόλη, αιθανόλη, χλωροφόρμιο) αναλυτικής καθαρότητας.
- Προσροφητικό υλικό : πηκτή SiO_2 (Silica Gel G 60)
- Σύστημα επίστρωσης πλακών TLC: Desaga.

- Γυάλινες πλάκες διαστάσεων 20x20 cm.
- Ψυχόμενες φυγόκεντροι Heraeus Labofug 400R και Sorvall RC-5B.
- Γυάλινοι θάλαμοι ανάπτυξης διαστάσεων 25x25x10 cm.
- Ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl, 100 mM pH 8.0: Διαλύονται 12,114 g Tris σε νερό, ρυθμίζεται το pH στο 8.0 με HCl 1N και ρυθμίζεται ο όγκος στα 1000 mL σε ογκομετρική φιάλη με προσθήκη νερού.
- Διάλυμα EDTA 20 mM σε Tris-HCl, 100 mM pH 8.0: Διαλύονται 0.3723 g EDTA σε 50 mL ρυθμιστικού διαλύματος Tris-HCl, 100 mM pH 8.0.
- Διάλυμα φύλαξης (stock) MgCl_2 2.1 M: Διαλύονται 100 g MgCl_2 σε 500 mL απεσταγμένου νερού.
- Διάλυμα εργασίας MgCl_2 0.4 M: Αναμιγνύονται 3.8 mL διαλύματος φύλαξης MgCl_2 2.1 M με 16.2 mL ρυθμιστικού διαλύματος Tris-HCl, 100 mM pH 8.0.
- Διάλυμα DTT 0.2 M: Διαλύονται 0.617 g DTT σε 20 mL απεσταγμένου νερού.
- Διάλυμα φύλαξης (stock) CDP-Χολίνης 100 mM: Διαλύονται 0.25 g CDP-Χολίνης σε 4.6 mL απεσταγμένου νερού.
- Διάλυμα εργασίας CDP-Χολίνης 4mM: Αναμιγνύονται 40 μL διαλύματος φύλαξης CDP-Χολίνης 100 mM με 960 μL απεσταγμένου νερού.
- Αιθανολικό διάλυμα AAG 10mM: Διαλύονται 5 mg AAG (95% καθαρότητας) σε 1.325 mL αιθανόλης.
- Αλβουμίνη βοδινού ορού (BSA) stock (100 mg/mL): Ποσότητα 100 mg BSA ελεύθερης λιπαρών οξέων (Sigma) /mL φυσιολογικού ορού, φυλάσσεται στους 20 °C.
- Διάλυμα BSA 2.5 mg /mL φυσιολογικού ορού: Από 10 mL φυσιολογικού ορού αφαιρούνται 250 μL και προστίθενται 250 μL BSA stock.
- Διάλυμα BSA 40 mg/mL: Διαλύονται 0.400 g BSA ελεύθερης λιπαρών οξέων σε 10 mL αποσταγμένου νερού.
- Θερμοστατούμενο υδρόλουτρο.
- Σωλήνες πολυπροπυλενίου.

- Γυάλινοι σωλήνες.
- Vortex.

Αρχή μεθόδου:

Το προϊόν της ενζυμικής αντίδρασης είναι ο PAF, όπου η ομάδα της φωσφοχολίνης μεταφέρεται από την CDP-Χολίνη στην AAG. Μετά την επώαση του ενζυμικού παρασκευάσματος με AAG και CDP-Χολίνη, προστίθεται κατάλληλη ποσότητα μεθανόλης για την απενεργοποίηση του ενζύμου, ενώ με κατάλληλη εκχύλιση με την μέθοδο Bligh-Dyer εκχυλίζεται από το μίγμα της αντίδρασης ο παραγόμενος PAF στην χλωροφορμική φάση και απομονώνεται. Με την διαδικασία της TLC ο παραγόμενος PAF διαχωρίζεται από την AAG και τυχόν παραπροϊόντα, ενώ τα επίπεδα του παραγόμενου PAF προσδιορίζονται μέσω της βιολογικής δοκιμασίας σε πλυμένα αιμοπετάλια κουνελιού. Ο προσδιορισμός της δραστηριότητας της PAF-CPT βασίζεται στην μέτρηση των επιπέδων του παραγομένου PAF.

Αναλυτική πορεία:

Σε σωλήνα πολυπροπυλενίου φέρονται το ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl, 100 mM pH 8.0, 10 μ L διαλύματος εργασίας $MgCl_2$ (τελική συγκέντρωση 20 mM), 5 μ L διαλύματος EDTA (τελική συγκέντρωση 0.5 mM), 15 μ L διαλύματος DTT (τελική συγκέντρωση 15 mM), 5 μ L διαλύματος BSA συγκέντρωσης 40 mg/mL (τελική συγκέντρωση 1 mg/mL) και το ρυθμιστικό διάλυμα αναδιάλυσης. Ακολουθεί κυκλοανάδευση με χρήση του Vortex και το όλο μίγμα επωάζεται σε θερμοστατούμενο υδρόλουτρο στους 37°C για 5 min. Στο μίγμα αυτό προστίθενται το ενζυμικό παρασκεύασμα με ανάδευση και μετά από 30 sec 2 μ L αιθανολικού διαλύματος AAG (τελική συγκέντρωση 100 mM) με ανάδευση, ενώ μετά από άλλα 30 sec προστίθεται 5 μ L διαλύματος εργασίας CDP-χολίνης (τελική συγκέντρωση 100 mM) με ανάδευση, οπότε και ξεκινά η αντίδραση. Επειδή η προστιθέμενη ποσότητα του ενζυμικού παρασκευάσματος, το οποίο είναι διαλυμένο σε ρυθμιστικό διάλυμα αναδιάλυσης, μπορεί να κυμαίνεται από 1-10 μ L προστίθεται κατάλληλη ποσότητα ρυθμιστικού διαλύματος αναδιάλυσης ώστε όλοι οι

προσδιορισμοί να περιέχουν 10 μL ρυθμιστικού διαλύματος αναδιάλυσης. Ο τελικός όγκος του μίγματος επώασης είναι 200 μL . Η επώαση της αντίδρασης γίνεται σε θερμοστατούμενο υδρόλουτρο στους 37°C για 20 min. Μετά το τέλος της αντίδρασης προστίθενται 300 μL παγωμένου νερού και 1111 μL μίγματος χλωροφορμίου/μεθανόλης (2% σε οξικό οξύ) που προκαλεί απενεργοποίηση του ενζυμικού παρασκευάσματος.

Το μίγμα φυγοκεντρείται έντονα ώστε να διαχωριστούν οι δύο φάσεις και παραλαμβάνεται η χλωροφορμική φάση. Ξεπλένεται η υδατική με 0.5 mL χλωροφορμίου, επαναλαμβάνεται η φυγοκέντρηση και οι ενωμένες χλωροφορμικές φάσεις φυλάσσονται στους -20°C μέχρι τον διαχωρισμό τους με TLC.

Ο διαχωρισμός του παραγομένου PAF επιτυγχάνεται με την μέθοδο της TLC. Μεταφέρεται το διάλυμα που περιέχει τον παραγόμενο από την ενζυμική αντίδραση PAF σε στρωμένη σε πλάκα TLC Silica G και ακολουθεί ανάπτυξη της χρωματογραφικής πλάκας TLC σε κορεσμένο θάλαμο ανάπτυξης που περιέχει σύστημα ανάπτυξης Χλωροφόρμιο : Μεθανόλη : Οξικό οξύ : Νερό σε αναλογία 100:57:16:8, v/v/v/v. Οι διάφορες ζώνες των λιποειδών εμφανίζονται σε ατμούς Ιωδίου ενώ τα φωσφολιποειδικά κλάσματα ταυτοποιούνται με συγχρωματογράφιση προτύπων.

Ακολουθεί απόξεση της ζώνης που περιέχει τον PAF ο οποίος εκχυλίζεται από την Silica με την μέθοδο Bligh-Dyer. Συλλέγεται το διάλυμα του PAF της χλωροφορμικής φάσης, εξατμίζεται σε ρεύμα N_2 , αναδιαλύεται σε διάλυμα BSA 2.5 mg/mL φυσιολογικού ορού και τα επίπεδα του παραγομένου PAF προσδιορίζονται με την *in vitro* βιολογική δοκιμασία σε πλυμένα αιμοπετάλια κουνελιού.

Για κάθε προσδιορισμό γίνεται και ο αντίστοιχος τυφλός προσδιορισμός απουσία AAG.

6.5. Προσδιορισμός δραστηριότητας της 1-O-αλκυλο-2-λυσσο-sn-γλυκερο-3-φωσφοχολίνη:ακετυλο-CoA ακετυλοτρανσφεράσης (λυσσο-PAF-AT) [54, 60]

Αντιδραστήρια – Όργανα

- Λυσσο-PAF (Sigma)
- Ακετυλο-CoA (Sigma)
- BSA ελεύθερη λιπαρών οξέων (Sigma)
- Ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl, 50 mM pH 7.4 : Διαλύονται 0.605 g Tris σε νερό, ρυθμίζεται το pH στο 7.4 με HCl 1N και ρυθμίζεται ο όγκος στα 100 mL σε ογκομετρική φιάλη με προσθήκη νερού.
- Διάλυμα φύλαξης (stock) lyso-PAF σε μεθανόλη 2.5 mg/mL : Διαλύονται 10 mg lyso-PAF σε 4 mL μεθανόλη. Το διάλυμα φυλάσσεται σε βιδωτό σωλήνα στους -20 °C.
- Διάλυμα BSA 100 mg/mL: Διαλύονται 1000 mg BSA ελεύθερης λιπαρών οξέων σε 10 mL νερού.
- Διάλυμα BSA 12.5 mg/mL: Διαλύονται 100 mg BSA ελεύθερης λιπαρών οξέων σε 10 mL νερού.
- Διάλυμα lyso-PAF σε BSA 12.5 mg/mL συγκέντρωσης 1000 μ M (διάλυμα εργασίας): Φέρονται 144 μ L διαλύματος lyso-PAF 3.47 mM σε βιδωτό σωλήνα, εξατμίζεται ο διαλύτης σε ρεύμα αζώτου και το ίζημα αναδιαλύεται σε 500 μ L BSA 12.5 mg/mL. Παρασκευάζεται καινούριο διάλυμα κάθε φορά. Προσθήκη 4 μ L ή 10 μ L από το διάλυμα αυτό στον ενζυμικό προσδιορισμό για τελικό όγκο 200 μ L και 500 μ L αντίστοιχα δίνουν τελική συγκέντρωση lyso-PAF 20 μ M και τελική συγκέντρωση BSA 0.25 mg/mL
- Διάλυμα ακετυλο-CoA 20 μ M σε ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl, 50 mM pH 7.4 (διάλυμα φύλαξης): Διαλύονται 25 mg (95% καθαρότητας – Sigma) σε 1352 mL ρυθμιστικού διαλύματος.
- Θερμοστατούμενο υδρόλουτρο.
- Σωλήνες πολυπροπυλενίου.
- Σωλήνες υάλινοι.

- Οργανικοί διαλύτες (οξικό οξύ, ακετόνη, μεθανόλη, αιθανόλη, χλωροφόρμιο).
- Πρότυπα λιποειδή: Merck, Supelco, Sigma.
- Προσροφητικό υλικό: πηκτή SiO₂ (Silica Gel G 60).
- Σύστημα επίστρωσης πλακών TLC: Desaga.
- Γυάλινες πλάκες διαστάσεων 20x20cm.
- Ψυχόμενες φυγόκεντροι Heraeus Labofug 400R και Sorvall RC-5B.
- Γυάλινοι θάλαμοι ανάπτυξης διαστάσεων 25x25x10cm.
- Αλβουμίνη βοδινού ορού (BSA) stock (100 mg/mL): Ποσότητα 100mg BSA ελεύθερης λιπαρών οξέων (Sigma) /mL φυσιολογικού ορού. Φυλάσσεται στους 20 °C.
- Διάλυμα BSA 2.5mg/mL φυσιολογικού ορού: Από 10 mL φυσιολογικού ορού αφαιρούνται 250μL και προστίθενται 250μL BSA stock.
- Vortex.

Αρχή μεθόδου:

Το προϊόν της ενζυμικής αντίδρασης είναι ο PAF όπου η ακετυλο-ομάδα μεταφέρεται από το ακετυλο-CoA στο λυσο-PAF. Προστίθεται κατάλληλη ποσότητα μεθανόλης για την απενεργοποίηση του ενζύμου, ενώ με κατάλληλη εκχύλιση με την μέθοδο Bligh-Dyer εκχυλίζεται από το μίγμα της αντίδρασης ο παραγόμενος PAF στην χλωροφορμική φάση και απομονώνεται. Με την διαδικασία της TLC ο παραγόμενος PAF διαχωρίζεται από τυχόν παραπροϊόντα, ενώ τα επίπεδα του παραγόμενου PAF προσδιορίζονται μέσω της βιολογικής δοκιμασίας σε πλυμένα αιμοπετάλια. Ο προσδιορισμός της ειδικής δραστηριότητας της Lyso-PAF-AT βασίζεται στην μέτρηση των επιπέδων του παραγομένου PAF.

Αναλυτική πορεία:

Σε σωλήνα πολυπροπυλενίου φέρονται το ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl, 50 mM pH 7.4, 4 μL διαλύματος εργασίας lyso-PAF (τελική συγκέντρωση 20 μM), 2 μL διαλύματος εργασίας ακετυλο-CoA (τελική συγκέντρωση 200 μM), το ρυθμιστικό διάλυμα αναδιάλυσης και η

αντίδραση ξεκινά με την προσθήκη του ενζυμικού παρασκευάσματος. Επειδή η προστιθέμενη ποσότητα του ενζυμικού παρασκευάσματος, το οποίο είναι διαλυμένο σε ρυθμιστικό διάλυμα αναδιάλυσης, μπορεί να κυμαίνεται από 10-50 μL προστίθεται κατάλληλη ποσότητα ρυθμιστικού διαλύματος ώστε όλοι οι προσδιορισμοί να περιέχουν 50 μL ρυθμιστικού διαλύματος αναδιάλυσης. Ο τελικός όγκος του μίγματος επώασης είναι 200 μL . Για κάθε προσδιορισμό γίνεται και ο αντίστοιχος τυφλός προσδιορισμός απουσία λυσο-PAF.

Η επώαση της αντίδρασης γίνεται σε θερμοστατούμενο υδρόλουτρο στους 37°C για 30 min. Η αντίδραση σταματά με την προσθήκη 1.11 mL μίγματος χλωροφορμίου-μεθανόλης (2% σε οξικό οξύ) που προκαλεί απενεργοποίηση του ενζυμικού παρασκευάσματος και 300 μL νερού. Το μίγμα φυγοκεντρείται έντονα ώστε να διαχωριστούν οι δύο φάσεις και παραλαμβάνεται η χλωροφορμική φάση. Ξεπλένεται η υδατική με 0.5 mL χλωροφορμίου, επαναλαμβάνεται η φυγοκέντρωση και οι ενωμένες χλωροφορμικές φάσεις φυλάσσονται στους -20° C μέχρι τον διαχωρισμό τους με TLC. Ο διαχωρισμός του παραγομένου PAF επιτυγχάνεται με την μέθοδο της TLC.

6.6. Διαχωρισμός του παραγόμενου PAF μετά το πέρας των ενζυμικών αντιδράσεων των βιοσυνθετικών ενζύμων με χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC) [147]

Αντιδραστήρια - Όργανα

- Οργανικοί διαλύτες αναλυτικής καθαρότητας (χλωροφόρμιο, μεθανόλη, ακετόνη, οξικό οξύ)
- Υάλινοι θάλαμοι χρωματογραφίας
- Θάλαμος ιωδίου
- Υάλινες πλάκες 20X20 cm
- Προσροφητικό υλικό: πηκτή SiO_2 (Silica gel G 60) (Merck)
- Συσκευή Desaga για την επίστρωση των πλακών
- Πρότυπα διαλύματα λιποειδών
- Φυγόκεντρος: Heraeus LABOFUGE 400R

Αναλυτική πορεία

A) Επίστρωση και ενεργοποίηση των πλακών.

Παρασκευάζεται εναιώρημα πυριτικού οξέος σε νερό, με ανάμειξη των συστατικών. Σε 60 g Silica gel G προσθέτουμε 120 mL νερού και ακολουθεί έντονη ανάδευση για 2 min. Στη συνέχεια, το εναιώρημα επιστρώνεται γρήγορα και ομοιόμορφα στις πλάκες με τη συσκευή Desaga, με πάχος επίστρωσης 0.5 mm. Οι πλάκες φυλάσσονται σε ξηραντήρα και λίγο πριν την χρησιμοποίησή τους ενεργοποιούνται με αφαίρεση της υγρασίας που περιέχει η πυριτική πηκτή. Για το σκοπό αυτό, τοποθετούνται σε θερμοστατούμενο κλίβανο υπό σταθερή θερμοκρασία 110° C για 1 h.

B) Προετοιμασία θαλάμων ανάπτυξης και ανάπτυξη χρωματογραφήματος.

Προετοιμάζεται ο θάλαμος χρωματογραφίας με σύστημα ανάπτυξης $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}/\text{AcOH}/\text{H}_2\text{O}$ 100:57:16:8 v:v:v. Ο θάλαμος καλύπτεται εσωτερικά με διηθητικό χαρτί και αφήνεται να κορεσθεί για τουλάχιστον 1h. Το δείγμα ή οι πρότυπες ουσίες διαλυμένες σε μικρό όγκο (100 μL) κατάλληλου κάθε φορά διαλύτη, τοποθετούνται στις πλάκες (σε ύψος 3 cm), οι οποίες έχουν χωριστεί σε παράλληλες κάθετες λωρίδες και μετά την εξάτμιση του διαλύτη αναπτύσσονται (μέχρι ύψος 15 cm), σε προκεκορεσμένο θάλαμο με το κατάλληλο σύστημα ανάπτυξης. Όταν ολοκληρωθεί η ανάπτυξη, οι πλάκες αφήνονται να στεγνώσουν σε θερμοκρασία δωματίου στον απαγωγό.

Γ) Εμφάνιση χρωματογραφήματος.

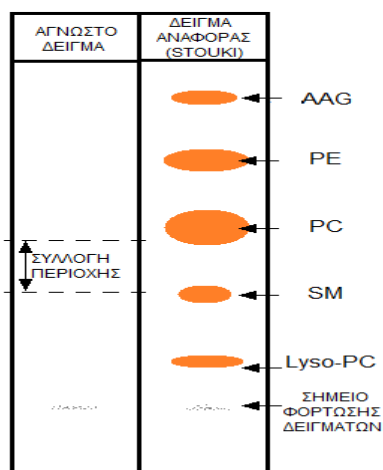
Οι πλάκες εισάγονται σε γυάλινο κλειστό θάλαμο που περιέχει στο πυθμένα του κρυστάλλους ιωδίου, οι ατμοί του οποίου προσδίδουν στις διαχωριζόμενες ουσίες φαιά απόχρωση σε ανοιχτοκίτρινη επιφάνεια.

Δ) Συλλογή περιοχών του χρωματογραφήματος.

Αφού καθοριστεί η περιοχή όπου βρίσκεται ο PAF, περιοχή ανάμεσα στη PC και τη SM, αυτή ξύνεται και το ξύσμα συλλέγεται σε υάλινους σωλήνες. Στους σωλήνες προστίθενται 2 mL μίγματος $\text{CH}_3\text{Cl}:\text{CH}_3\text{OH}:\text{H}_2\text{O}$ (1:2:0.8 v/v/v). Το εναιώρημα φυγοκεντρείται στα 437 xg (1500 στροφές) για 10 min στους 4°C και παραλαμβάνεται το υπερκείμενο. Ακολουθεί η ίδια διαδικασία με άλλα 2 mL μίγματος $\text{CH}_3\text{Cl}:\text{CH}_3\text{OH}:\text{H}_2\text{O}$ (1:2:0.8 v/v/v). Στα ενωμένα υπερκείμενα προστίθενται 1 mL C και 1 mL W ώστε το σύστημα να γίνει διφασικό και παραλαμβάνεται η κάτω χλωροφορμική φάση. Η

υδατική φάση εκπλένεται με άλλα 0.5 mL C και οι ενωμένες χλωροφορμικές φάσεις φυλάσσονται στους -20°C για περαιτέρω ανάλυση.

Το διαλύματα του PAF της χλωροφορμικής φάσης, εξατμίζονται σε ρεύμα N₂, αναδιαλύονται σε διάλυμα BSA 2.5 mg/mL φυσιολογικού ορού και τα επίπεδα του παραγομένου PAF προσδιορίζονται με την *in vitro* βιολογική δοκιμασία σε πλυμένα αιμοπετάλια κουνελιού όπως αναφέρεται στην ενότητα 5.



Εικόνα 6.6.1: Χρωματογραφική συμπεριφορά και τιμές R_f προτύπων διαλυμάτων φωσφολιποειδών (PC, Lyso-PC, SM, PE), AAG σε Silica G και σύστημα ανάπτυξης CHCl₃:MeOH:AcOH:H₂O (100:57:16:8, v/v/v/v)

7. Συσσώρευση αιμοπεταλίων σε δείγμα ασθενούς με νόσο Ταγγέρη [148]

Αντιδραστήρια –Όργανα

- Aggregometer (CHRONO-LOG)
- Φωτόμετρο Pharmacia Biotech/Novasped II
- Υδρόλουτρο 37 °C
- Φυγόκεντρος Heraeus LABOFUGE 400R
- Διάλυμα εργασίας PAF συγκέντρωσης 190.95×10^{-6} M
- ADP συγκέντρωσης 125×10^{-9} M
- Θρομβίνη συγκέντρωσης (56U/mL)

Πειραματική πορεία:

Απομόνωση αιμοπεταλίων από αίμα ασθενούς:

1. Σε tube των 15 mL, τοποθετείται 1 mL διαλύματος κιτρικών και στη συνέχεια προστίθενται 9 mL αίματος.
2. Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 10 min σε 250 xg στους 25 °C.
3. Λαμβάνεται το υπερκείμενο, το οποίο είναι το πλάσμα πλούσιο σε αιμοπετάλια (PRP).
4. Η συσσώρευση του πλάσματος που είναι πλούσιο σε αιμοπετάλια γίνεται στο aggregometer στους 37 °C.

Συσσώρευση αιμοπεταλίων του αίματος της ασθενούς:

Στις ειδικές κυψελίδες του aggregometer προστίθενται 250 μ L από το PRP Επωάζονται επί 10 min σε υδρόλουτρο 37°C. Παρασκευάζονται πρότυπα διαλύματα PAF, διαλυτοποιημένα σε BSA 2.5 mg/mL, από διάλυμα PAF stock, γνωστής συγκέντρωσης, κάνοντας τις κατάλληλες αραιώσεις έτσι ώστε στην κυψελίδα του aggregometer να υπάρχουν τελικές συγκεντρώσεις PAF 10^{-6} M. Παράλληλα παρασκευάζεται διάλυμα σε φυσιολογικό ορό του ADP συγκέντρωσης 125×10^{-10} M και της θρομβίνης συγκέντρωσης 90-370 U/L (τελικής συγκέντρωσης στην κυψελίδα).

Ρυθμίζεται το 0 της κλίμακας της διαπερατότητας του aggregometer με PRP και το 100 με το PPP. Τοποθετείται η κυψελίδα με το εναιώρημα αιμοπεταλίων στη θερμοστατούμενη κυψελίδα του aggregometer και προστίθενται τα διαλύματα PAF ή ADP ή θρομβίνης. Σαν 100% συσσώρευση ορίζεται εκείνη η συγκέντρωση PAF που προκαλεί μέγιστη αντιστρεπτή συσσώρευση, ενώ η τιμή EC_{50} αντιστοιχεί σε εκείνη τη συγκέντρωση PAF που προκαλεί 50% συσσώρευση στα αιμοπετάλια. Αντίστοιχα ισχύει για το ADP και την θρομβίνη.

Δείγματα προς μελέτη από φυσιολογικούς εθελοντές

Παράλληλα με την ανάλυση των δειγμάτων από την ασθενή με νόσο Ταγγέρη, έγιναν με την ίδια μεθοδολογία και οι αντίστοιχες αναλύσεις από 12 φυσιολογικές εθελόντριες.

Περιγραφή του πληθυσμού της μελέτης

Μελέτη πολυμορφισμών

Η μελέτη των πολυμορφισμών έγινε σε δείγματα εθελοντών ελληνικής καταγωγής από το T.E.I Νοσηλευτικής. Απομονώθηκε το γενετικό υλικό (DNA) από ολικό αίμα σε 447 άτομα νεαρής ηλικίας (360 γυναίκες και 87 άνδρες) και στη συνέχεια ακολούθησε PCR, επώαση με περιοριστική ενδονουκλεάση και ηλεκτροφόρηση. Τα ανθρωπομετρικά χαρακτηριστικά τους αναφέρονται στο μέρος των αποτελεσμάτων.

Μελέτη ασθενούς με νόσο Ταγγέρη

Η ασθενής με τη νόσο Ταγγέρη είναι Ελληνίδα 43 χρόνων, η οποία έχει το χαρακτηριστικό λιπιδαιμικό προφίλ αυτής της πάθησης. Οι γονείς της είναι 2^{ου} βαθμού ξαδέρφια και η ίδια είναι μητέρα τριών κοριτσιών. Η κλινική εξέταση παρουσίασε μια ελαφρά ηπατοσπληνομεγαλία, και η σταφανιογραφία έδειξε ότι δεν έχει αθηρωματικές πλάκες και στεφανιαία

νόσο. Η αιμοληψία έγινε την 21^η μέρα του έμμηνου κύκλου και για περίοδο τουλάχιστον 15 ημερών πριν της αιμοληψίας δεν ελάβε κάποιο παυσίπονο (π.χ. ασπιρίνη). Παράλληλα, έγινε αιμοληψία από 12 φυσιολογικές γυναίκες παρόμοιας ηλικίας για να συγκριθεί η διαφορά με την ασθενή της νόσου Ταγγέρη. Σε όλα αυτά τα δείγματα μελετήθηκε ο μεταβολισμός του και τα επίπεδα του PAF.

Στατιστική ανάλυση

Μελέτη πολυμορφισμών

Εφαρμόστηκε η ανάλυση κατά Shapiro-Wilk test για να εξετάσει την φυσιολογική κατανομή των συνεχόμενων μεταβλητών. Τα αποτελέσματα δίνονται ως μεσαίο και διατεταρτημοριακό εύρος (median and interquartile range, IQR), ενώ όλες οι ποιοτικές μεταβλητές παρουσιάζονται σε απόλυτες ή σχετικές συχνότητες. Η ανάλυση κατά Mann-Whitney U ή Fisher χρησιμοποιήθηκε για την συσχέτιση των συνεχόμενων ή κατηγοριοποιημένων μεταβλητών, αντίστοιχα. Η ανάλυση κατά Kruskal-Wallis Η εφαρμόστηκε για να ανιχνεύσει διαφορές στα επίπεδα των λιποειδών σύμφωνα με τους τρεις διαφορετικούς πολυμορφισμούς του ABCA1 γονιδίου (R219K, R158K and I883M).

Όλοι οι προσδιορισμοί ήταν δύο κατευθύνσεων και το όριο του στατιστικά σημαντικού καθιερώθηκε στα 5% ($p < 0.05$). Τα δεδομένα αναλύθηκαν χρησιμοποιώντας STATA[™] (Version 10.1 MP, Stata Corporation, College Station, TX 77845, USA).

Μελέτη ασθενούς με νόσο Ταγγέρη

Η σύγκριση του δείγματος της ασθενούς με τα δείγματα των φυσιολογικών γυναικών πραγματοποιήθηκε με τη μη παραμετρική στατιστική μελέτη Wilcoxon και το όριο του στατιστικά σημαντικού καθιερώθηκε στα 5% ($p < 0.05$). Οι τιμές παρουσιάζονται με τη διάμεσο τιμή και στη παρένθεση τα τεταρτημόρια (25%-75%).

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Αποτελέσματα

Ι. Μελέτη πολυμορφισμών του γονιδίου *ABCA1* σε υγιή άτομα

Από την σύγκριση αρκετών χαρακτηριστικών σύμφωνα με το φύλο φάνηκε ότι η μελετώμενη ομάδα είναι ομογενής όσο αφορά την ηλικία ($p>0.05$) (πίνακας 1). Ωστόσο, σημαντικές διαφορές βρέθηκαν συμπεριλαμβάνοντας άλλα ανθρωπομετρικά χαρακτηριστικά και το λιπιδαιμικό προφίλ (πίνακας 1). Συγκεκριμένα, το BMI, η περίμετρος μέσης και η μέση αρτηριακή πίεση ήταν πιο αυξημένα στους άνδρες συγκριτικά με τις γυναίκες ($p<0.001$, $p<0.001$ and $p=0.007$, αντίστοιχα) (πίνακας 1). Επιπλέον, τα επίπεδα των τριγλυκεριδίων ($p<0.001$) ήταν σημαντικά πιο αυξημένα στους άνδρες, ενώ τα επίπεδα της HDL-χοληστερόλης ($p=0.01$) και της απολιποπρωτεΐνης A1 ($p<0.001$) ήταν σημαντικά πιο αυξημένα στις γυναίκες. Δεν βρέθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές για τα επίπεδα της ολικής χοληστερόλης μεταξύ ανδρών και γυναικών ($p>0.05$) (πίνακας 1).

Πίνακας 1: Χαρακτηριστικά του πληθυσμού μελέτης.

	Ανδρες (n=87)	Γυναίκες (n=360)	Σύνολο (n=447)	P*
Ανθρωπομετρικά χαρακτηριστικά				
Ηλικία (χρόνια)	21 [20-25]	23 [21-25]	22 [21-25]	0.13
BMI (Kg/m ²)	24.22 [22.22-26.06]	21.64 [19.94-24.38]	22.25 [20.32-24.9]	<0.001
Περίμετρος μέσης (cm)	92 [87.5-97]	87 [80-94]	88 [81-95]	<0.001
Μέση αρτηριακή πίεση (mmHg)	86.66 [80-90]	83.33 [76.66-90]	86.66 [80-90]	0.007
Λιπιδαιμικό προφίλ				
Ολική χοληστερόλη (mg/dL)	204 [155-250]	198 [158-238]	198 [158-240]	0.38
Τριγλυκερίδια (mg/dL)	131 [97-185]	89 [61-152]	97.5 [65-167]	<0.001
HDL χοληστερόλη (mg/dL)	59 [46-76]	66 [52-83]	65 [51-82]	0.01
LDL χοληστερόλη (mg/dL)	108 [74-149]	105 [76-128]	106 [76-132]	0.25
Απο A1 (mg/dL)	114 [96-154]	153 [111-189]	147 [107-183]	<0.001

Άλλες μεταβλητές				
Κάπνισμα (ναι/όχι)-(%)	48/38 (55.81%- 44.19%)	127/207 (38.02%-61.98%)	175/245 (41.67%-58.33%)	0.003
Ιστορικό CAD (ναι/όχι)-(%)	12/68 (15%-85%)	79/228 (25.73%-74.27)	91/296 (23.51%-76.49%)	0.04

*Οι συγκρίσεις έγιναν με βάση το φύλο.

Η συμμετοχή όλων των πολυμορφισμών του γονιδίου ABCA1 που εξετάστηκαν δεν διέφεραν σε σχέση με το φύλο (πίνακας 2). Ωστόσο, μόνο στον R219K πολυμορφισμό υπάρχει οριακά στατιστική σημασία ($p=0.08$) μεταξύ των δύο ομάδων (πίνακας 2). Επιπλέον, στις συχνότητες των αλληλίων των R219K και R1587K πολυμορφισμών δεν υπήρξε διαφορά σε σχέση με το φύλο (πίνακας 2). Στον I883M πολυμορφισμό οι συχνότητες των αλληλίων ήταν διαφορετικές στις δύο ομάδες (πίνακας 2). Η συχνότητα του I αλληλίου ήταν αυξημένη, ενώ η συχνότητα του M αλληλίου ήταν μειωμένη στους άνδρες σε σχέση με τις γυναίκες ($p<0.001$).

Πίνακας 2: Συσχέτιση των R219K, R1587K και I883M πολυμορφισμών και των αλληλίων τους με το φύλο.

	Άνδρες (n=87)	Γυναίκες (n=360)	P
R219K			
RR	39 (17.3%)	186 (82.7%)	0.08*
RK	45 (23.8%)	144 (76.2%)	
KK	3(9.4%)	29 (90.6%)	
R1587K			
RR	37 (17.5%)	174 (82.5%)	0.12*
RK	45 (23.5%)	146 (76.5%)	
KK	5 (11.4%)	39 (88.6%)	
I883M			
II	64 (20.7%)	245 (79.3%)	0.66*
IM	22 (17.2%)	106 (82.8%)	
MM	1 (12.5%)	7 (87.5%)	

Αλληλία για τον R219K			
συχνότητα R αλληλίου	0.71	0.72	0.85**
συχνότητα K αλληλίου	0.29	0.28	
Αλληλία για τον R1587K			
συχνότητα R αλληλίου	0.68	0.69	0.85**
συχνότητα K αλληλίου	0.32	0.31	
Αλληλία για τον I883M			
συχνότητα I αλληλίου	0.86	0.83	0.10**
συχνότητα M αλληλίου	0.14	0.17	

*Fisher's exact test - **Test for equality of proportions

Συνολικά, δεν φαίνεται να υπάρχει συσχέτιση των επιπέδων των λιποειδών στο αίμα με τους εξετασθέντες πολυμορφισμούς του ABCA1 όταν εξετάστηκε όλος ο πληθυσμός (άνδρες και γυναίκες) (πίνακας 3) ούτε όταν εξετάστηκαν ξεχωριστά οι άνδρες και οι γυναίκες (πίνακας 4 και 5, αντίστοιχα).

Μια στατιστικά σημαντική διαφορά υπήρξε στα επίπεδα της LDL χοληστερόλης σε όλο τον πληθυσμό σε σχέση με τον γονότυπο του R1587K πολυμορφισμού. Ο KK γονότυπος συσχετίστηκε με χαμηλότερα επίπεδα της LDL χοληστερόλης ($p=0.0025$) (πίνακας 3). Αυτή η συσχέτιση δεν εντοπίστηκε όταν εξετάστηκε μόνο ο γυναικείος πληθυσμός, όπου ο RR γονότυπος ήταν αυτός που συσχετίστηκε με χαμηλότερα επίπεδα της LDL χοληστερόλης ($p=0.0053$) (πίνακας 5).

Πίνακας 3: Επίπεδα λιποειδών του αίματος σε σχέση με τους πολυμορφισμούς του ABCA1 σε όλο τον πληθυσμό.

Όλος ο πληθυσμός (n=447)	Γονότυπος	Median	IQR	P [†]
R219K				
Ολική χοληστερόλη (mg/dl)	RR	199	[160 – 239]	0.74
	RK	194	[158 – 241]	
	KK	205	[160.5 - 244.5]	
Τριγλυκερίδια (mg/dl)	RR	98	[65 – 162]	0.66
	RK	98.5	[63.5 – 170]	
	KK	95.5	[69.5 – 140]	
HDL χοληστερόλη (mg/dl)	RR	66	[51 – 80]	0.94
	RK	64	[52.5 – 84]	
	KK	63.5	[50.5 – 85]	
LDL χοληστερόλη (mg/dl)	RR	106	[78 – 131]	0.18
	RK	104.5	[71.5 - 131.5]	
	KK	117.8	[92.5 - 147.5]	
Apo A1 (mg/dl)	RR	139	[108 – 180]	0.09
	RK	152.5	[106 - 187.5]	
	KK	164	[115.5 - 202.5]	

R1587K				
Ολική χοληστερόλη (mg/dl)	RR	190	[145 – 238]	0.08
	RK	203	[170 – 241]	
	KK	199.5	[158.5 – 222]	
Τριγλυκερίδια (mg/dl)	RR	95	[60 – 167]	0.35
	RK	103.5	[68 – 168]	
	KK	85	[69 - 150.5]	
HDL χοληστερόλη (mg/dl)	RR	65	[51 – 81]	0.73
	RK	65	[53 – 83]	
	KK	62.5	[47 – 85]	
LDL χοληστερόλη (mg/dl)	RR	100	[66 – 122]	0.0025
	RK	114	[84 –139]	
	KK	88	[87 – 89]	
Απο Α1 (mg/dl)	RR	145	[104 – 185]	0.78
	RK	148	[109 – 180]	
	KK	147.5	[107 – 194]	
I883M				
Ολική χοληστερόλη (mg/dl)	II	198.5	[155 – 240]	0.74
	IM	198	[164.5 – 238.5]	
	MM	197.5	[175 – 253.5]	
Τριγλυκερίδια (mg/dl)	II	99	[65.5 – 163.5]	0.49
	IM	91.5	[62 – 171]	
	MM	170	[78 – 233.5]	
HDL χοληστερόλη (mg/dl)	II	65	[51 – 82]	0.83
	IM	64.5	[52 – 82.5]	
	MM	68.5	[55 – 95.5]	
LDL χοληστερόλη (mg/dl)	II	105	[73.9 – 130]	0.52
	IM	108.5	[81.3 – 133]	
	MM	117.5	[64.5 – 132.5]	
Απο Α1 (mg/dl)	II	143.5	[104 – 182]	0.62
	IM	148.5	[109.5 – 184.5]	
	MM	153	[111 – 200]	

HDL: Υψηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνη, LDL: Χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνη,

Απο Α1: απολιποπρωτεΐνη Α1.

[†]P: τιμές μεταξύ γονοτύπων με τη χρήση του Kruskal Wallis test.

Πίνακας 4: Επίπεδα λιπιδίων του αίματος σε σχέση με τους πολυμορφισμούς του ABCA1 στους άνδρες.

Άνδρες (n=87)	Γονότυπος	Median	IQR	P[†]
R219K				
Ολική χοληστερόλη (mg/dl)	RR	199	[149 – 250]	0.86
	RK	205	[164 – 258]	
	KK	222	[122 – 240]	
Τριγλυκερίδια (mg/dl)	RR	125	[100 – 177]	0.58
	RK	142	[97 – 196]	
	KK	134	[50 – 163]	
HDL χοληστερόλη (mg/dl)	RR	61	[49 – 74]	0.28
	RK	57	[46 – 81]	
	KK	46	[45 – 48]	
LDL χοληστερόλη (mg/dl)	RR	109	[66 – 146]	0.84
	RK	106.4	[76 – 150]	
	KK	149	[67 – 159]	
Απο Α1 (mg/dl)	RR	112	[100 – 135]	0.58
	RK	117	[95 – 168]	
	KK	116	[81 – 180]	

R1587K				
Ολική χοληστερόλη (mg/dl)	RR	192	[146 – 273]	0.28
	RK	206	[166 – 241]	
	KK	122	[110 – 205]	
Τριγλυκερίδια (mg/dl)	RR	131	[79 – 199]	0.92
	RK	131	[100 – 176]	
	KK	153	[108 – 170]	
HDL χοληστερόλη (mg/dl)	RR	60	[51 – 74]	0.41
	RK	58	[48 – 76]	
	KK	45	[42 – 48]	
LDL χοληστερόλη (mg/dl)	RR	99	[70 – 150]	0.16
	RK	119	[81 – 149]	
	KK	67	[58 - 106.4]	
Απο Α1 (mg/dl)	RR	114	[94 – 156]	0.79
	RK	116	[100 – 149]	
	KK	100	[96 – 116]	
I883M				
Ολική χοληστερόλη (mg/dl)	II	201.5	[148 – 255]	0.27
	IM	214	[180 – 241]	
	MM	120	-	
Τριγλυκερίδια (mg/dl)	II	126.5	[84 - 177.5]	0.18
	IM	169.5	[118 – 250]	
	MM	152	-	
HDL χοληστερόλη (mg/dl)	II	59.5	[47 – 75]	0.44
	IM	57.5	[48 – 78]	
	MM	41	-	
LDL χοληστερόλη (mg/dl)	II	111	[70.5 - 148.5]	0.39
	IM	105.5	[80 – 149]	
	MM	49	-	
Απο Α1 (mg/dl)	II	110	[94 – 148]	0.14
	IM	148	[107 – 169]	
	MM	112	-	

HDL: Υψηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνη, LDL: Χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνη,
Απο Α1: απολιποπρωτεΐνη Α1.

[†]P: τιμές μεταξύ γονοτύπων με τη χρήση του Kruskal Wallis test.

Πίνακας 5: Επίπεδα λιπιδίων του αίματος σε σχέση με τους πολυμορφισμούς του ABCA1 στις γυναίκες.

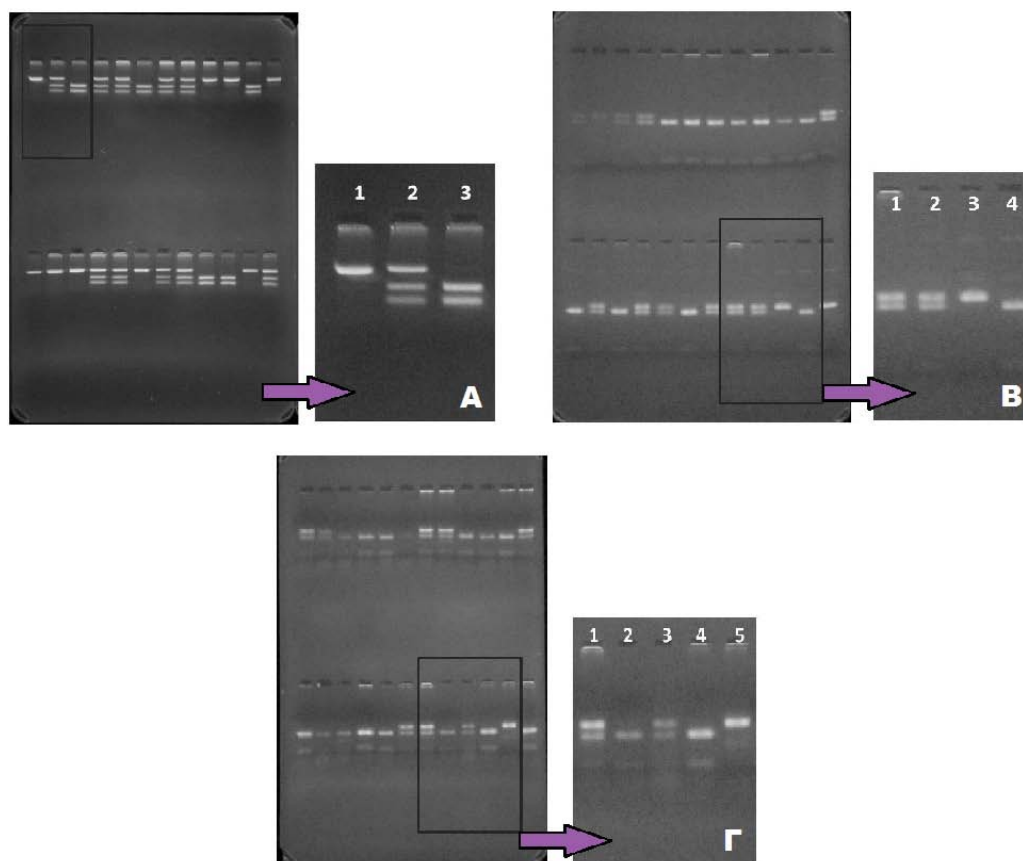
Γυναίκες (n=360)	Γονότυπος	Median	IQR	P[†]
R219K				
Ολική χοληστερόλη (mg/dl)	RR	200	[160 – 238]	0.64
	RK	193	[155 – 238]	
	KK	204	[163 – 249]	
Τριγλυκερίδια (mg/dl)	RR	89.5	[57 – 152]	0.88
	RK	87	[61 – 159]	
	KK	94	[70 – 134]	
HDL χοληστερόλη (mg/dl)	RR	66.5	[52 – 82]	0.84
	RK	65	[55 – 85]	
	KK	66	[55 – 85]	
LDL χοληστερόλη (mg/dl)	RR	105.5	[79 – 127]	0.18
	RK	104	[70 – 126]	
	KK	116.6	[93 – 141]	
Απο Α1 (mg/dl)	RR	145	[111 – 187]	0.16
	RK	155	[110 – 194]	
	KK	164	[122 – 204]	

R1587K				
Ολική χοληστερόλη (mg/dl)	RR	189.5	[145 – 231]	0.09
	RK	203	[172 – 240]	
	KK	203	[163 – 224]	
Τριγλυκερίδια (mg/dl)	RR	87	[57 – 146]	0.61
	RK	96	[61 – 160]	
	KK	81	[69 – 136]	
HDL χοληστερόλη (mg/dl)	RR	66	[51 – 82]	0.82
	RK	67	[55 – 84]	
	KK	64	[52 – 86]	
LDL χοληστερόλη (mg/dl)	RR	100	[66 – 121]	0.0053
	RK	112	[84.8 – 132]	
	KK	105.6	[82.6 – 133]	
Απο Α1 (mg/dl)	RR	152	[109 – 189]	0.59
	RK	155	[114 – 188]	
	KK	153	[116 – 194]	
I883M				
Ολική χοληστερόλη (mg/dl)	II	198	[156.5 – 237]	0.54
	IM	196	[160 – 238]	
	MM	214	[181 – 273]	
Τριγλυκερίδια (mg/dl)	II	90.5	[61 - 155.5]	0.45
	IM	86.5	[58 – 148]	
	MM	188	[73 – 274]	
HDL χοληστερόλη (mg/dl)	II	66	[52 - 82.5]	0.61
	IM	66	[53 – 83]	
	MM	73	[60 – 111]	
LDL χοληστερόλη (mg/dl)	II	104.4	[74 – 125]	0.34
	IM	109.5	[82.6 – 132]	
	MM	124	[66 – 134]	
Απο Α1 (mg/dl)	II	154	[111.5 - 189.5]	0.86
	IM	149.5	[110 – 188]	
	MM	166	[110 – 226]	

HDL: Υψηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνη, LDL: Χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνη,

Απο Α1: απολιποπρωτεΐνη Α1.

[†]P: τιμές μεταξύ γονοτύπων με τη χρήση του Kruskal Wallis test.



Εικόνα 1: Στις φωτογραφίες φαίνονται οι χαρακτηριστικές φωτογραφίες gel αгарόζης 4% για τους πολυμορφισμούς R219K, R1587K και I883M, αντίστοιχα. **A:** η θέση 1 αντιστοιχεί στον γονότυπο RR, η θέση 2 στον γονότυπο RK και η θέση 3 στον γονότυπο KK, **B:** η θέση 1 και 2 αντιστοιχεί στον γονότυπο RK, η θέση 3 στον γονότυπο KK και η θέση 4 στον γονότυπο RR, **Γ:** η θέση 1 και 3 αντιστοιχεί στον γονότυπο IM, η θέση 2 και 4 στον γονότυπο II και η θέση 5 στον γονότυπο MM.

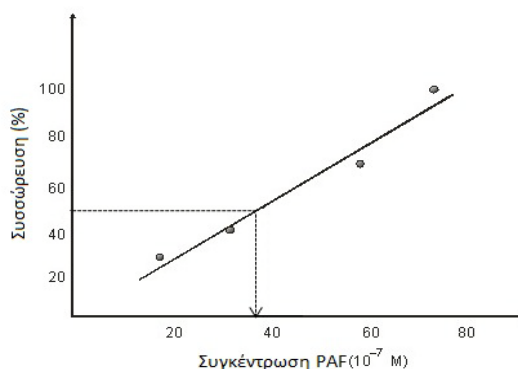
II. Μελέτη ασθενούς με νόσο Ταγγέρη

1. Εύρεση του EC_{50} στο PRP ασθενούς

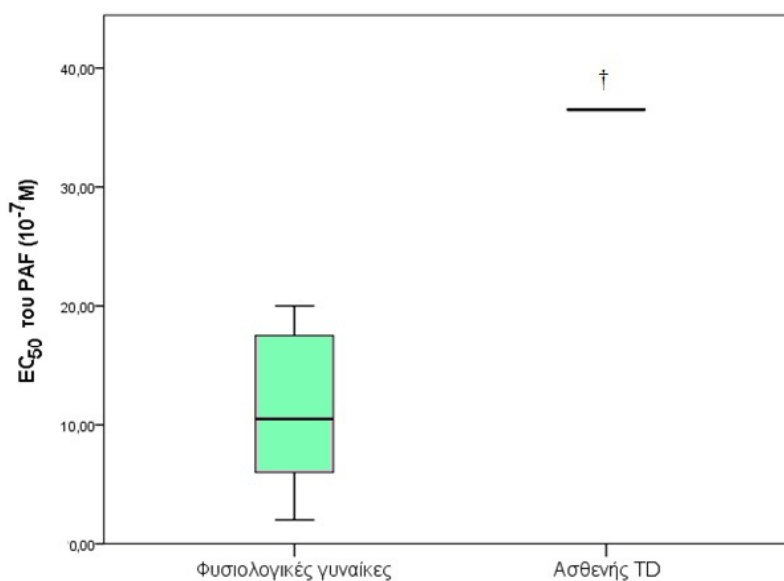
Σε αίμα ασθενούς με την νόσο της Ταγγέρης έγινε, όπως αναφέρεται στο Πειραματικό Μέρος, προσδιορισμός του EC_{50} για τον PAF, το ADP και την θρομβίνη.

PAF

Το EC_{50} της ασθενούς για τον PAF ήταν 36.5×10^{-7} M PAF (γράφημα 1) ενώ οι φυσιολογικές γυναίκες είχαν διάμεση τιμή 9.5×10^{-7} (5-17) M PAF. Αυτή η διαφορά είναι στατιστικά σημαντική. (γράφημα 2)



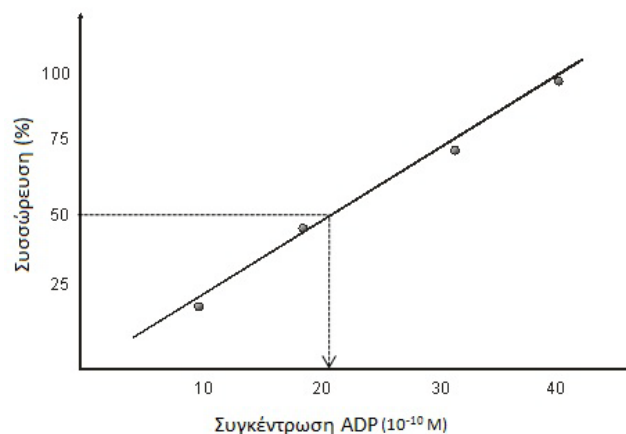
Γράφημα 1: Γραφική παράσταση η οποία δείχνει την συσσώρευση που προκαλείται από τον PAF σε δείγμα PRP ασθενούς. Το διακεκομμένο βέλος δείχνει το EC_{50} .



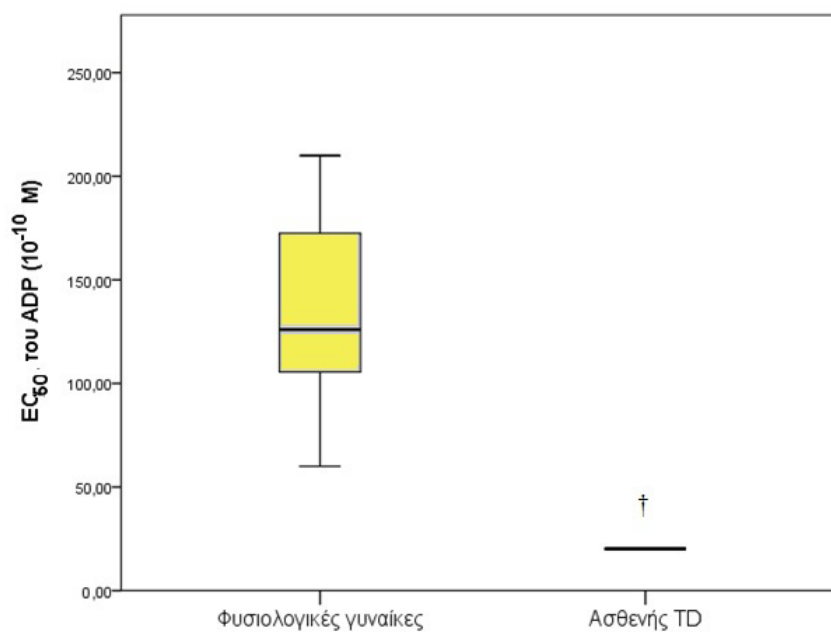
Γράφημα 2: Το EC_{50} του PAF των φυσιολογικών γυναικών σε σχέση με την τιμή της ασθενούς TD. (†: στατιστικά σημαντική διαφορά με $p < 0.05$).

ADP

Το EC_{50} της ασθενούς για το ADP ήταν 20.15×10^{-10} M ADP (γράφημα 3) ενώ οι φυσιολογικές γυναίκες είχαν διάμεση τιμή 126×10^{-10} (111-165) M ADP. Αυτή η διαφορά είναι στατιστικά σημαντική. (γράφημα 4)



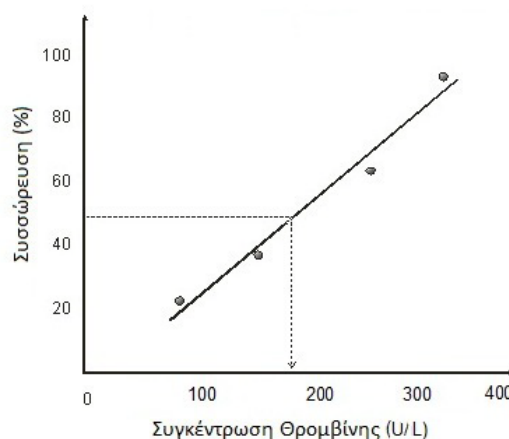
Γράφημα 3: Γραφική παράσταση η οποία δείχνει την συσσώρευση που προκαλείται από το ADP σε δείγμα PRP ασθενούς. Το διακεκομμένο βέλος δείχνει το EC_{50} .



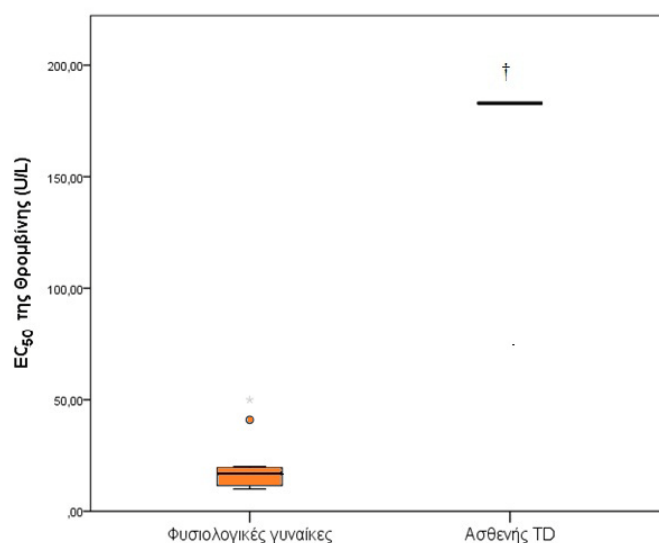
Γράφημα 4: Το EC_{50} του ADP των φυσιολογικών γυναικών σε σχέση με την τιμή της ασθενούς TD. (†: στατιστικά σημαντική διαφορά με $p < 0.05$).

Θρομβίνη

Το EC_{50} για την θρομβίνη ήταν 183 U/L θρομβίνης (γράφημα 5) ενώ οι φυσιολογικές γυναίκες είχαν διάμεση τιμή 17 (12-20) U/L θρομβίνης. Αυτή η διαφορά είναι στατιστικά σημαντική. (γράφημα 6).



Γράφημα 5: Γραφική παράσταση η οποία δείχνει την συσώρευση που προκαλείται από την θρομβίνη σε δείγμα PRP ασθενούς. Το διακεκομμένο βέλος δείχνει το EC_{50} .



Γράφημα 6: Το EC_{50} της θρομβίνης των φυσιολογικών γυναικών σε σχέση με την τιμή της ασθενούς TD. (†: στατιστικά σημαντική διαφορά με $p < 0.05$).

2. Μελέτη των μεταβολικών ενζύμων του PAF στο αίμα ασθενούς

Με μεθοδολογία που περιλαμβάνεται λεπτομερώς στο Πειραματικό Μέρος, έγιναν ενζυμικοί προσδιορισμοί της δραστηριότητας των ενζύμων της PAF-CPT, της Lyso-PAF-AT, της PAF-AH και της LpPLA₂ στα κύτταρα του αίματος ασθενούς με την νόσο της Ταγγέρης (πίνακας 1). Στα γραφήματα

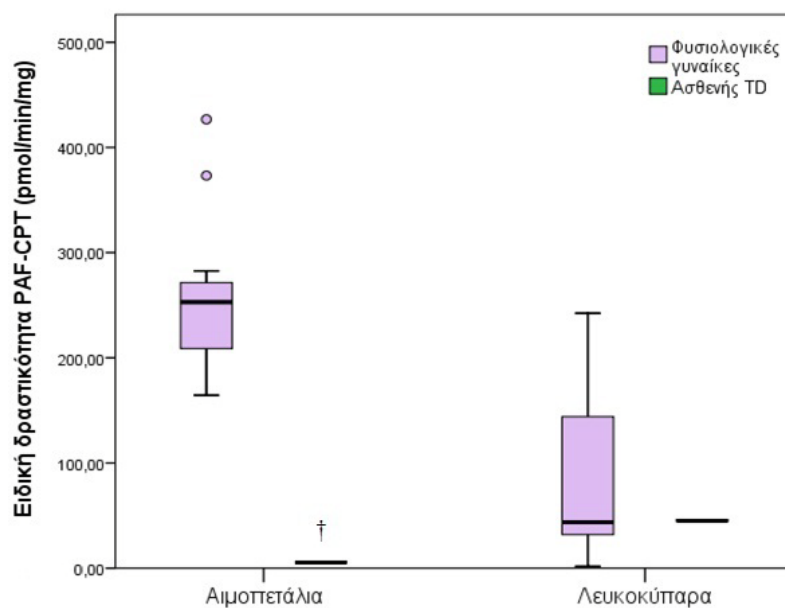
7-10 φαίνονται τα αποτελέσματα των ενζυμικών προσδιορισμών συγκριτικά με φυσιολογικές γυναίκες.

Στην εργασία αυτή βρέθηκε ότι η ειδική δραστικότητα της PAF-CPT στα λευκοκύτταρα και τα αιμοπετάλια ήταν 45.29 και 5.61 pmol/min/mg πρωτεΐνης, αντίστοιχα, ενώ στα φυσιολογικά άτομα βρέθηκε 43.54 (33.88-121.14) και 252.93 (212.36-282.48) pmol/min/mg πρωτεΐνης, αντίστοιχα (γράφημα 7). Η ειδική δραστικότητα της Lyso-PAF-AT στα λευκοκύτταρα και στα αιμοπετάλια ήταν 5.52 και 0.37 pmol/min/mg πρωτεΐνης, αντίστοιχα. Ωστόσο, στα φυσιολογικά άτομα η ειδική δραστικότητα της Lyso-PAF-AT στα λευκοκύτταρα και στα αιμοπετάλια βρέθηκε 20.31 (4.05-44.15) και 9.18 (3.61-11.41) pmol/min/mg πρωτεΐνης, αντίστοιχα (γράφημα 8).

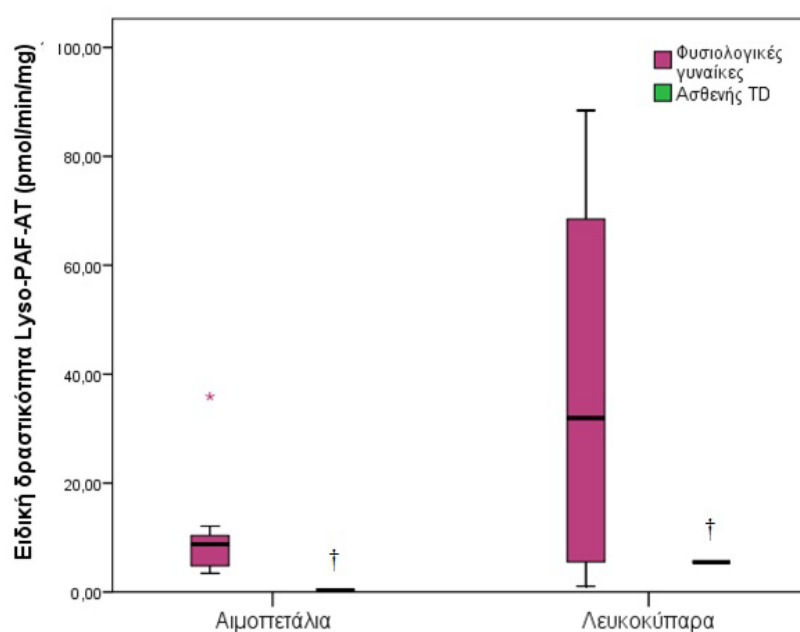
Η ειδική δραστικότητα της Lp-PLA₂ ήταν 37.12 pmol/min/μL σε TD ασθενή ενώ σε 12 φυσιολογικές γυναίκες ήταν 22.25 (17.40-25.01) pmol/min/μL (γράφημα 9). Στην ασθενή TD η ειδική δραστικότητα της PAF-AH στα λευκοκύτταρα, ερυθροκύτταρα και τα αιμοπετάλια ήταν 77.56, 9.01 και 821.41 pmol/min/mg πρωτεΐνης, αντίστοιχα και στα φυσιολογικά άτομα 6.60 (2.14-15.48), 17.26 (13.08-19.91) και 14.19 (11.74-17.92) pmol/min/mg πρωτεΐνης, αντίστοιχα (γράφημα 10).

Πίνακας 3: Αποτελέσματα των ειδικών ενζυμικών δραστικοτήτων σε ασθενή με τη νόσο Ταγγέρη

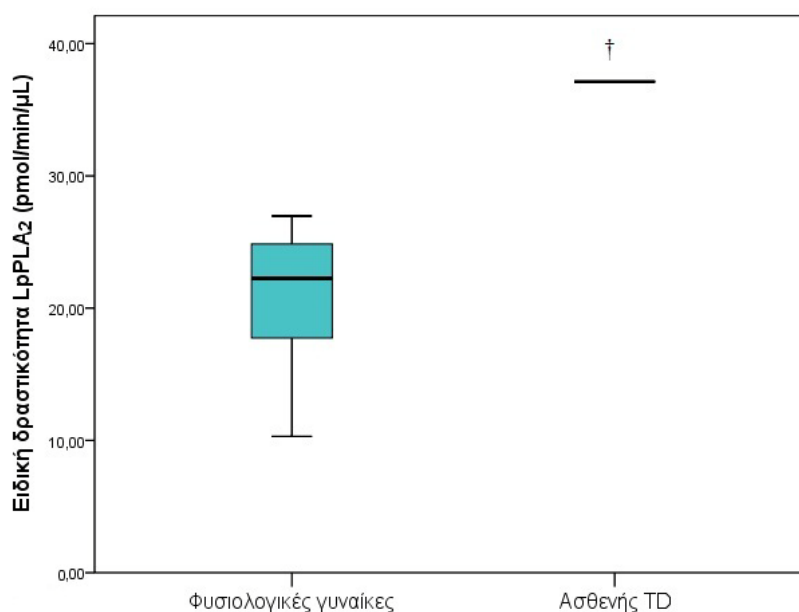
	PAF-CPT (pmoles/min/mg πρωτεΐνης)	Lyso-PAF-AT (pmoles/min/mg πρωτεΐνης)	PAF-AH (pmoles/min/mg πρωτεΐνης)
Λευκοκύτταρα	45.29 ± 12.89	5.52 ± 1.16	77.56 ± 33.13
Αιμοπετάλια	5.61 ± 1.97	0.37 ± 0.09	821.41 ± 51.70
Ερυθροκύτταρα	0.11 ± 0.03	0.13 ± 0.05	9.01 ± 1.35
			LpPLA₂ (pmoles/min/μL)
Πλάσμα αίματος	-	-	37.12 ± 3.56



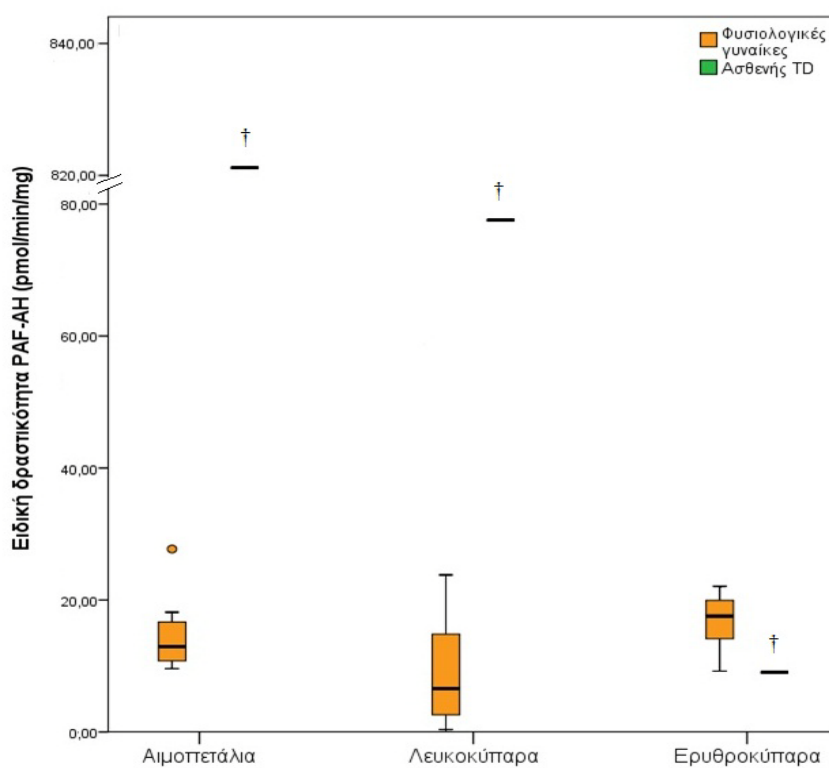
Γράφημα 7: Η ειδική δραστικότητα της PAF-CPT στην ασθενή με TD και σε φυσιολογικούς. Η διαφορά μεταξύ της ασθενούς και των φυσιολογικών στο κλάσμα των αιμοπεταλίων είναι στατιστικά σημαντική (†: στατιστικά σημαντική διαφορά με $p < 0.05$).



Γράφημα 8: Η ειδική δραστικότητα της Lyso-PAF-AT στην ασθενή με TD και σε φυσιολογικούς. Η διαφορά που υπάρχει είναι στατιστικά σημαντική (†: στατιστικά σημαντική διαφορά με $p < 0.05$).



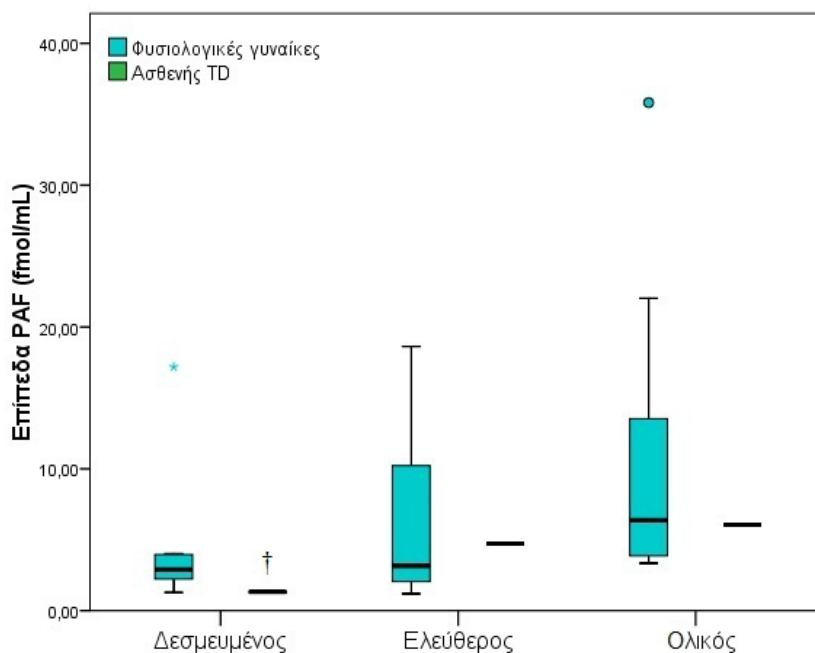
Γράφημα 9: Η ειδική δραστηριότητα της Lp-PLA₂ στην ασθενή με TD και σε φυσιολογικούς. Η διαφορά που υπάρχει είναι στατιστικά σημαντική (†: στατιστικά σημαντική διαφορά με $p < 0.05$).



Γράφημα 10: Η ειδική δραστηριότητα της PAF-AH στην ασθενή με TD και σε φυσιολογικούς. (†: στατιστικά σημαντική διαφορά με $p < 0.05$).

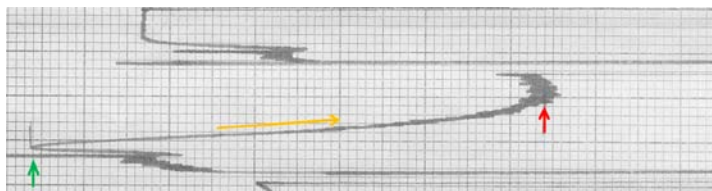
3. Μέτρηση των επιπέδων του PAF στο αίμα ασθενούς

Με μέθοδο που αναπτύσσεται στο Πειραματικό Μέρος, έγινε και προσδιορισμός των επιπέδων του PAF στο αίμα του ίδιου ασθενούς (γράφημα 11).



Γράφημα 11: Στο σχήμα φαίνονται τα επίπεδα του ελεύθερου, του δεσμευμένου και του ολικού PAF. (†: στατιστικά σημαντική διαφορά με $p < 0.05$).

Τα ολικά επίπεδα του PAF στο αίμα ήταν 6.06 fmol/mL ή 3.32 pg/mL. Ο ελεύθερος PAF ήταν 4.74 fmol/mL ή 2.60 pg/mL ενώ ο δεσμευμένος PAF ήταν 1.32 fmol/mL ή 0.73 pg/mL. Ενώ σε 12 υγιείς γυναίκες η ολική τιμή του PAF ήταν 6.40 (3.92-16.31) fmol/mL ή 3.50 pg/mL (ο ελεύθερος PAF: 3.16 (1.89-12.86) fmol/mL και δεσμευμένος PAF 2.92 (2.27-3.99) fmol/mL ή 1.73 και 1.60 pg/mL, αντίστοιχα). Ο υπολογισμός έγινε σύμφωνα με τις καμπύλες συσσώρευσης στο aggregometer όπως ενδεικτικά φαίνεται στην εικόνα 2.



Εικόνα 2: Ενδεικτική εικόνα που λαμβάνεται από τον καταγραφέα του aggregometer κατά την συσσώρευση των πλυμένων αιμοπεταλίων κουνελιού μετά από την προσθήκη του δείγματος που περιέχει τον PAF. Το πράσινο βέλος δηλώνει την στιγμή προσθήκης του δείγματος, το κίτρινο βέλος δείχνει την συσσώρευση των αιμοπεταλίων και το κόκκινο βέλος είναι η μέγιστη συσσώρευση. Με βάση μιας πρότυπης καμπύλης που γίνεται αρχικά με γνωστές ποσότητες PAF υπολογίζεται και η ποσότητα του PAF στο εξεταζόμενο δείγμα.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Συζήτηση

Πολυμορφισμοί του γονιδίου *ABCA1* σε υγιή άτομα

Σε αυτή την εργασία μελετήθηκε η συσχέτιση τριών πολυμορφισμών του γονιδίου *ABCA1* με το λιπιδαιμικό προφίλ σε ελληνικό γενικό πληθυσμό νεαρής ηλικίας.

Πολυμορφισμός R219K

Μία από τις πρώτες εργασίες που μελέτησαν τη συσχέτιση πολυμορφισμών του γονιδίου *ABCA1* με το λιπιδαιμικό προφίλ, ήταν αυτή των Clee και συν. [142] που δημοσιεύτηκε το 2001. Στη μελέτη αυτή βρέθηκε ότι στους Ευρωπαίους ο πολυμορφισμός R219K έχει 46% αλληλομορφική συχνότητα. Οι φορείς του K αλληλίου έχει μειωμένο κίνδυνο για εμφάνιση στεφανιαίας νόσου (ΣΝ) και κίνδυνο αθηροσκλήρωσης, καθώς και λιγότερα καρδιακά συμβάματα. Οι Clee και συν. [142] βρήκαν συγκεκριμένα, ότι η αθηροσκλήρωση έχει πιο αργή εξέλιξη στους φορείς του K αλληλίου σε σχέση με αυτούς που φέρουν το R αλληλίο. Επιπρόσθετα, το K αλληλίο συσχετίστηκε με μειωμένα επίπεδα τριγλυκεριδίων και με τάση προς αυξημένα επίπεδα της χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνης (high density lipoprotein cholesterol, HDL-C).

Από το 2001 και μετά οι εργασίες που μελέτησαν τον πολυμορφισμό R219K αυξήθηκαν και βρέθηκαν ενδιαφέροντα και ποικίλα αποτελέσματα, καθώς αυτός ο πολυμορφισμός συνδέθηκε τόσο με το λιπιδαιμικό προφίλ όσο και με τον κίνδυνο για εμφάνιση ΣΝ σε διαφορετικής εθνικότητας πληθυσμούς.

Οι Pasdar και συν. [149] μελέτησαν τον R219K πολυμορφισμό σε ασθενείς με ισχαιμικό εγκεφαλικό επεισόδιο και κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι το γονίδιο *ABCA1* δεν συμμετέχει σημαντικά ως παράγοντας κινδύνου για την εμφάνιση ισχαιμικού εγκεφαλικού επεισοδίου. Αντίθετα, οι Tregouet και συν. [150] συσχέτισαν τον πολυμορφισμό R219K

με τον κίνδυνο εμφάνισης εμφράγματος του μυοκαρδίου (myocardial infarction, MI).

Οι Srinivasan *και συν.* [151] βρήκαν ότι η συχνότητα του K αλληλίου διαφέρει σημαντικά ανάμεσα σε λευκούς και έγχρωμους. Επιπλέον, το K αλληλίο καθορίζει τη συσχέτιση μεταξύ ηλικίας και των επιπέδων της HDL-C, καθώς και μεταξύ του βάρους και των τριγλυκεριδίων μόνο σε λευκούς. Οι Zhao *και συν.* [152] βρήκαν συσχέτιση του πολυμορφισμού R219K με τα επίπεδα της HDL-C. Συγκεκριμένα, βρέθηκε μεγάλη διαφορά μεταξύ του RR γονότυπου ($50,4 \text{ mg/dl} \pm 15,6 \text{ mg/dl}$; $1,3 \text{ mmol/L} \pm 0,4 \text{ mmol/L}$) and του KK γονότυπου ($54,5 \text{ mg/dl} \pm 15,6 \text{ mg/dl}$; $1,4 \text{ mmol/L} \pm 0,4 \text{ mmol/L}$), ιδιαίτερα στους άνδρες. Περαιτέρω ανάλυση έδειξε ότι τα επίπεδα της HDL-C έχουν θετική συσχέτιση με την ηλικία σε αυτούς που έχουν RR γονότυπο, ενώ τα επίπεδα των τριγλυκεριδίων έχουν αρνητική συσχέτιση με την ηλικία σε αυτούς με RK και KK γονότυπο.

Οι Mantaring *και συν.* [153] βρήκαν ότι τα πολύ υψηλά επίπεδα της HDL-C είχαν συσχέτιση με μεγαλύτερη συχνότητα εμφάνισης των RK και KK γονοτύπων, αλλά δεν βρέθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά σε συχνότητα αλληλίων.

Οι Wu *και συν.* [154] μελέτησαν τον R219K πολυμορφισμό σε Κινέζους ασθενείς με υπερτριγλυκεριδαιμία και βρήκαν ότι δεν υπήρχε καμία σημαντική διαφορά μεταξύ της ομάδας των υγιών και της ομάδας με υπερτριγλυκεριδαιμία, τόσο στις συχνότητες των αλληλίων όσο και στις συχνότητες των γονοτύπων. Όσοι είχαν τον KK γονότυπο και στις δύο ομάδες, είχαν υψηλότερα επίπεδα HDL-C συγκριτικά με όσους είχαν τον RR γονότυπο. Στην ομάδα των υγιών, όσοι είχαν τον RK γονότυπο είχαν χαμηλότερα επίπεδα τριγλυκεριδίων συγκριτικά με αυτούς που είχαν RR γονότυπο. Επιπλέον, όσοι ήταν φορείς του K αλληλίου στην ομάδα HTG, ο λόγος της ολικής χοληστερόλης (total cholesterol, TC) προς τα επίπεδα της HDL-C (TC/HDL-C) ήταν μικρότερος σε σχέση με τους φορείς του R αλληλίου.

Παρόμοια, οι Benton *και συν.* [136] στους συμμετέχοντες της μελέτης Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis (MESA) βρήκαν ότι ο KK γονότυπος συσχετίστηκε με $2,4 \text{ mg/dL}$ υψηλότερα επίπεδα HDL-C, μετά από προσαρμογή για την ηλικία, το φύλο, την φυλή/εθνικότητα και την κλινική

εικόνα. Επίσης, συσχετίστηκε με μικρότερη παρουσία ασβεστοποίησης στα στεφανιαία αγγεία. Οι Tsai και συν. [155] δύο χρόνια αργότερα στους 999 συμμετέχοντες της μελέτης MESA, βρήκαν ότι ο KK γονότυπος συσχετίστηκε με 5.5% υψηλότερη συγκέντρωση των μικρών HDL μορίων. Ενώ, ένα χρόνο αργότερα η ομάδα των Tsai και συν. [156] μελέτησε τον πολυμορφισμό R219K σε ασθενείς που βρίσκονταν υπό θεραπεία με φαινοφιβράτη και βρήκαν ότι ο KK γονότυπος εμφανιζόταν περισσότερο σε αυτούς με υψηλότερα επίπεδα HDL-C, ενώ Ο RK γονότυπος συσχετίστηκε σημαντικά με υψηλότερα επίπεδα των μικρών HDL μορίων.

Τα ίδια αποτελέσματα είχαν οι Huang και συν. [157] σε παχύσαρκους Κινέζους, όπου οι ασθενείς με τον KK γονότυπο είχαν υψηλότερα επίπεδα HDL-C, καθώς και οι Sun και συν. [158].

Οι Ma και συν. [159] υποστήριξαν ότι ο R219K πολυμορφισμός σχετίζεται με υψηλότερα επίπεδα HDL-C στους Ασιάτες και με τον προστατευτικό του ρόλο ως προς τον κίνδυνο εμφάνισης ΣΝ τόσο στους Ασιάτες όσο και στους Καυκάσιους. Παρόμοια αποτελέσματα είχαν και οι Rejeb και συν. [160] οι οποίοι μελέτησαν τον R219K πολυμορφισμό σε Τυνήσιους ασθενείς που υποβλήθηκαν σε στεφανιογραφία και οι φορείς του K αλληλίου συσχετίστηκαν με αυξημένες συγκεντρώσεις της HDL-C.

Οι Bertolini και συν. [161] βρήκαν ότι οι ασθενείς με ΣΝ είχαν μικρότερη εμφάνιση των γονοτύπων RK και KK με ποσοστό 33,0% σε σχέση με αυτούς που δεν είχαν ΣΝ σε ποσοστό 51,5%. Τα ίδια συμπεράσματα είχαν οι Evans και συν. [162] όμως η διαφορά στις συχνότητες των αλληλίων δεν ήταν στατιστικά σημαντική. Οι Evans και συν. [162] κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι ο πολυμορφισμός R219K του *ABCA1* γονιδίου δρα είτε άμεσα, είτε με αλληλεπίδραση άλλων πολυμορφισμών, έχοντας προστατευτικό ρόλο ως προς την εμφάνιση ΣΝ και με τη συσχέτιση μικρότερων επιπέδων τριγλυκεριδίων στο πλάσμα σε ασθενείς με υπερλιπιδαιμία.

Επιπρόσθετα, οι Porchay-Baldérelli και συν. [163] βρήκαν ότι ο KK γονότυπος εμφανιζόταν σε μικρότερο ποσοστό σε ασθενείς με ΣΝ οι οποίοι έπασχαν από σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2. Σε προηγούμενη μελέτη των Porchay και συν. [164] το K αλληλίο συσχετίστηκε με υψηλότερα επίπεδα

HDL-C σε ομάδα υγιών με φυσιολογικό βάρος, ενώ στην ομάδα των υπέρβαρων ατόμων συσχετίστηκε με χαμηλότερα επίπεδα HDL-C.

Οι Li και συν. [165] μελέτησαν τον R219K πολυμορφισμό σε Κινέζους ασθενείς με ΣΝ οι οποίοι βρίσκονταν υπό θεραπεία με 20 mg ημερησίως με πραβαστατίνη και βρήκαν ότι οι ασθενείς με τον RR γονότυπο είχαν υψηλότερα επίπεδα τριγλυκεριδίων και χαμηλότερα επίπεδα HDL-C σε σχέση με τον KK γονότυπο. Επίσης, οι ασθενείς με τον KK γονότυπο είχαν καλύτερη επίδραση με την πραβαστατίνη στην αύξηση των επιπέδων της HDL-C.

Οι Doosti και συν. [166] μελετώντας τον R219K πολυμορφισμό σε Ιρανικό πληθυσμό, βρήκαν ότι ο RR γονότυπος συσχετίστηκε με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης ΣΝ ενώ ο RK γονότυπος δεν έδειξε σημαντική συσχέτιση.

Οι Cenarro και συν. [167] που μελέτησαν Ισπανούς ασθενείς με οικογενή υπερχοληστερολαιμία (familial hypercholesterolemia, FH) έδειξαν ότι το K αλληλίο ήταν σημαντικά πιο συχνό στους ασθενείς με FH χωρίς πρώιμη ΣΝ σε σχέση με αυτούς με FH που είχαν πρώιμη ΣΝ. Τα αποτελέσματά τους δείχνουν ότι ο πολυμορφισμός R219K μπορεί να επηρεάσει την ανάπτυξη και εξέλιξη της αθηροσκλήρωσης σε ασθενείς με FH. Επιπλέον, οι Cenarro και συν. [167] βρήκαν ότι το K αλληλίο τροποποιεί τον κίνδυνο για ΣΝ χωρίς να επηρεάζει τα επίπεδα της HDL-C και είναι πιο προστατευτικός στους καπνιστές. Ανάλογα αποτελέσματα είχαν και οι Li και συν. [168] σε Κινέζους Χαν.

Οι Li και συν. [169] μετά από μετα-ανάλυση για την συσχέτιση του R219K πολυμορφισμού και την εμφάνιση ΣΝ, βρήκαν ότι το K αλληλίο συνδέθηκε σημαντικά με τον κίνδυνο για ΣΝ. Ωστόσο, υπήρξε σημαντική ετερογένεια λόγω της εθνικότητας. Συγκεκριμένα, στους Ασιάτες το K αλληλίο έχει προστατευτικό ρόλο ενώ στους Καυκάσιους δεν υπήρξε κάποια σημαντική συσχέτιση. Τα ίδια αποτελέσματα είχαν και οι Jiang και συν. [170]. Ωστόσο, οι Andrikovics και συν. [171] βρήκαν τον προστατευτικό ρόλο του R219K ως προς τον κίνδυνο εμφάνισης ΣΝ σε Ουγγαρέζους ασθενείς.

Όλες οι παραπάνω μελέτες βρήκαν κάποια συσχέτιση του R219K πολυμορφισμού με το λιπιδαιμικό προφίλ ή με τον κίνδυνο εμφάνισης ΣΝ,

σε διάφορες ομάδες ασθενών ή υγιών ατόμων και ανάλογα με την εθνικότητα. Ωστόσο, υπάρχουν μελέτες στις οποίες δεν υπάρχει κάποια συσχέτιση ή τα αποτελέσματά τους είναι αντίθετα με όλα τα παραπάνω.

Οι Saleheen και συν. [140] δεν βρήκαν καμία συσχέτιση του πολυμορφισμού R219K με τα επίπεδα της HDL-C, της LDL-C, της ολικής χοληστερόλης και των τριγλυκερίδων. Παρόμοια αποτελέσματα είχαν οι Hodoğlugil και συν. [138] σε Τούρκους, οι Harada και συν. [172] σε Ιάπωνες, οι Frikke-Schmidt και συν. [173] σε Δανούς και οι Delgado-Lista και συν. [174] σε 88 φυσιολογικούς νεαρούς Ισπανούς άνδρες.

Οι Sandhofer και συν. [175] μελέτησαν 688 άνδρες ηλικίας 40-60 χρονών και δεν βρήκαν καμία επίδραση αυτού του πολυμορφισμού στα επίπεδα των λιπιδίων του πλάσματος. Βέβαια, οι φορείς του K αλληλίου εμφάνισαν μικρότερο πάχος του έσω χιτώνα και μειωμένο κίνδυνο για ανάπτυξη αθηρωματικών πλακών σε σχέση με τους φορείς του R αλληλίου.

Στη μελέτη των Κολονου και συν. [176] δεν υπήρξε καμία διαφορά όσο αφορά τις γονοτυπικές και αλληλομορφικές συχνότητες του R219K πολυμορφισμού σε σχέση με το λιπιδαιμικό προφίλ σε νεαρό ελληνικό πληθυσμό.

Οι Karadeniz και συν. [177] μελέτησαν τον πολυμορφισμό R219K με την εκκρινόμενη ινσουλίνη και τα επίπεδα της ομοκυστεΐνης σε άτομα με πολυκυστικές ωοθήκες. Ο ΚΚ γονότυπος συσχετίστηκε με υψηλότερα επίπεδα ινσουλίνης και ομοκυστεΐνης αντίθετα από τους γονότυπους RK και RR. Ωστόσο, δεν βρέθηκε καμία συσχέτιση με το λιπιδαιμικό προφίλ.

Από την άλλη πλευρά, υπάρχουν μελέτες οι οποίες συσχέτισαν το Κ αλληλίο του R219K πολυμορφισμού με αρνητική επίδραση στο λιπιδαιμικό προφίλ. Οι Kitjaroentharn και συν. [178] που μελέτησαν υπέρβαρα/παχύσαρκα άτομα από την Thai και των δύο φύλων, βρήκαν ότι αυτοί που ήταν φορείς του Κ αλληλίου είχαν χαμηλότερα επίπεδα HDL-C σε σχέση με τους φυσιολογικούς.

Οι Turpitsina και συν. [141] συσχέτισαν αυτόν τον πολυμορφισμό με την εμφάνιση στηθάγχης, με τα επίπεδα της LDL-C και κυρίως με παράγοντες που επηρεάζουν την σκλήρυνση των αρτηριών στην ομάδα των ασθενών. Οι ΚΚ και RK γονότυποι συνδέθηκαν με σοβαρότερη στένωση των αρτηριών σε σχέση αυτούς που είχαν τον RR γονότυπο. Επιπρόσθετα, το

K αλληλίο συσχετίστηκε με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης ΣΝ. Ενώ, σε Καυκάσιους Ισπανούς οι Abellán και συν. [179] βρήκαν ότι το K αλληλίο του πολυμορφισμού R219K συσχετίστηκε με αυξημένα επίπεδα της LDL-C στους άνδρες.

Στην εργασία αυτή [180], δεν βρέθηκε καμία συσχέτιση με το λιπιδαιμικό προφίλ. Βέβαια, στον πολυμορφισμό R219K μπορεί να μην υπήρξε διαφορά ανάμεσα στα δύο φύλα με το λιπιδαιμικό προφίλ, όμως ήταν στο όριο να θεωρηθεί στατιστικά σημαντική η συσχέτιση με την LDL-C, $p=0.08$.

Πολυμορφισμός R1587K

Οι Clee και συν. [142] μελέτησαν και τον R1587K πολυμορφισμό και βρήκαν ότι οι γονότυποι RK και KK είχαν χαμηλότερα επίπεδα HDL-C σε σχέση με τον RR γονότυπο σε μια δοσο-εξαρτώμενη τάση. Σε πολλαπλή ανάλυση συμπεριλαμβάνοντας την ηλικία, τον δείκτη μάζας σώματος (body mass index, BMI), το κάπνισμα και τα επίπεδα των τριγλυκεριδίων, ο πολυμορφισμός R1587K παρέμεινε σημαντικός προγνωστικός παράγοντας για τα επίπεδα της HDL-C. Ωστόσο, δεν υπήρξαν σημαντικές διαφορές ανάμεσα στους φορείς του K αλληλίου και στους φορείς του R αλληλίου στους ασθενείς με ΣΝ. Αντίθετα οι Jensen και συν. [181] βρήκαν συσχέτιση του R1587K πολυμορφισμού με τον κίνδυνο εμφάνισης CAD, ενώ οι Tregouet και συν. [150] δεν βρήκαν καμία συσχέτιση με τον κίνδυνο για MI. Οι Tupitsina και συν. [141] βρήκαν αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης ΣΝ στους φορείς του R αλληλίου σε ρωσικό πληθυσμό.

Οι Frikke-Schmidt και συν. [137] το 2004 συσχέτισαν τον R1587K πολυμορφισμό με μια σταδιακή μείωση των επιπέδων της HDL-C με τους RK και KK γονότυπους στις γυναίκες και στους άνδρες. Σε μια άλλη μελέτη των Frikke-Schmidt και συν. [173], ο πολυμορφισμός R1587K συσχετίστηκε και αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης ισχαιμικής καρδιακής νόσου.

Οι Mantaring και συν. [153] δεν βρήκαν καμία στατιστικά σημαντική συσχέτιση με το λιπιδαιμικό προφίλ. Ωστόσο, οι Tsai και συν. [156] βρήκαν

ότι οι ασθενείς που λαμβάναν φαινοφιβράτη και είχαν τον KK γονότυπο είχαν σημαντικά πιο αυξημένα επίπεδα των μικρών HDL μορίων.

Οι Porchay-Baldérelli και συν. [163] βρήκαν ότι η συχνότητα του K αλληλίου ήταν υψηλότερη σε ασθενείς με στηθάγχη.

Σε προηγούμενη μελέτη των Κολονου και συν. [176] το 2011 ο πολυμορφισμός R1587K συσχετίστηκε με τα επίπεδα της ολικής χοληστερόλης, της LDL-C και των τριγλυκεριδίων. Συγκεκριμένα, οι γυναίκες με τον RK γονότυπο είχαν πιο αυξημένα επίπεδα τριγλυκεριδίων (134.25 mg/dL έναντι 108.89 mg/dL, $p=0.014$, αντίστοιχα), ολικής χοληστερόλης (207.41 mg/dL έναντι 187.69 mg/dL, $p=0.006$, αντίστοιχα) και της LDL-C (110.6 mg/dL έναντι 96.9 mg/dL, $p=0.004$, αντίστοιχα) σε σχέση με τον RR γονότυπο.

Στην εργασία αυτή [180] υπήρξε στατιστικά σημαντική διαφορά υποδεικνύοντας ότι ο KK γονότυπος σχετίζεται με χαμηλότερα επίπεδα LDL-C στην ομάδα των γυναικών.

Πολυμορφισμός I883M

Οι Clee και συν. [142] βρήκαν ότι δεν υπήρχαν διαφορές στα επίπεδα των λιπιδίων σε σχέση με τους γονότυπους IM και MM του πολυμορφισμού I883M αλλά όσοι είχαν τον MM γονότυπο είχαν αυξημένη πρόοδο της διαμέτρου των αρτηριών (minimum obstruction diameter, MOD) και των διπλασιασμό των καρδιακών συμβαμάτων συγκριτικά με τα άτομα με II γονότυπο.

Οι Tan και συν. [182] μελέτησαν τον I883M πολυμορφισμό σε άτομα από τη Μαλαισία και την Κίνα. Συγκεκριμένα ο I883M συσχετίστηκε με την λιποπρωτεΐνη α [lipoprotein(a), Lp(a)] στον πληθυσμό από την Μαλαισία και με την απολιποπρωτεΐνη B (apolipoprotein B, apo B) στους Κινέζους. Επιπλέον, υπήρξε συσχέτιση με την εμφάνιση ΣΝ στους Μαλαισιανούς αλλά δεν υπήρξε επίδραση στα επίπεδα της HDL-C και στην απολιποπρωτεΐνη A1 (apolipoprotein A1, apo A1). Αντίθετα, οι Andrikovics και συν. δεν βρήκαν καμία συσχέτιση του προστατευτικού ρόλου του πολυμορφισμού I883M με τον κίνδυνο εμφάνισης ΣΝ.

Οι Sun και συν. [158] βρήκαν ότι ο II γονότυπος σχετίζεται με μικρότερο κίνδυνο εμφάνισης ΣΝ συγκριτικά με τους γονότυπους IM και MM.

Οι Hodoşlugil και συν. [138] συσχέτισαν αυτόν τον πολυμορφισμό με υψηλότερα επίπεδα της HDL-C και στα δύο φύλα. Παρόμοια αποτελέσματα είχαν και οι Jensen και συν [181] μεταξύ νεαρών γυναικών και οι Porchay-Baldérelli και συν. [163] βρήκαν ότι ο MM γονότυπος εμφανιζόταν με υψηλότερα επίπεδα HDL-C.

Ωστόσο, οι Mantaring και συν. [153] βρήκαν μικρές διαφορές στη συχνότητα αλληλίων μεταξύ των ομάδων με υψηλότερα και χαμηλότερα επίπεδα της HDL-C.

Αντίθετα, οι Kitjaroentharn και συν. [178] βρήκαν ότι δεν υπήρχε διαφορά στα επίπεδα της HDL-C μεταξύ των γονοτύπων του πολυμορφισμού I883M. Παρόλο που ο πολυμορφισμός αυτός είναι συχνός σε άτομα Thai εθνικότητας, δεν υπήρξε διαφορά στη συχνότητα των γονοτύπων μεταξύ υπέρβαρων/παχύσαρκων και φυσιολογικών ατόμων.

Παρόμοια, οι Frikke-Schmidt και συν. [173] βρήκαν ότι ο I883M πολυμορφισμός δεν επιδρά στα επίπεδα της HDL-C αλλά σχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο ισχαιμικής καρδιοπάθειας. Ακόμα, οι Sandhofer και συν. [175] που μελέτησαν τον I883M πολυμορφισμό δεν βρήκαν καμία επίδραση στα λιπίδια του πλάσματος, καθώς και στην αρτηριοσκλήρυνση των καρωτίδων. Οι Jiang και συν. [170] δεν βρήκαν κανένα στατιστικά σημαντικό αποτέλεσμα με όλα τα γενετικά μοντέλα που χρησιμοποίησαν.

Σε αυτή την εργασία [180] που μελετήθηκε και ο I883M πολυμορφισμός, δεν βρέθηκε καμία συσχέτιση στη συχνότητα των γονοτύπων ή των αλληλίων με το λιπιδαιμικό προφίλ, τόσο στις γυναίκες όσο και στους άνδρες.

Μελέτη ασθενούς με τη νόσο της Ταγγέρης

Ένζυμα μεταβολισμού του PAF

Η μελέτη των επιπέδων του PAF καθώς και τα ένζυμα που τον βιοσυνθέτουν (Lyso-PAF-AT, PAF-CPT), δεν έχουν μελετηθεί έως τώρα σε ασθενή με τη νόσο Ταγγέρη (Tangier Disease, TD). Οι Pritchard και συν. [135] το 1985 μελέτησαν το ένζυμο της PAF-AH στο πλάσμα ασθενούς με TD. Με τη μελέτη τους επιβεβαίωσαν ότι η PAF-AH συνδέεται με τα μόρια των λιποπρωτεϊνών (VLDL, LDL, HDL) και συγκεκριμένα η υψηλή δραστικότητα της PAF-AH σχετίζεται με την LDL. Η PAF-AH του πλάσματος που μελέτησαν είναι η λεγόμενη Lp-PLA₂ και βρήκαν ότι είχε αυξημένη ειδική δραστικότητα σε σχέση με τους υγιείς. Το 1989 οι Stafforini και συν. [97] βρήκαν ότι στο πλάσμα ασθενούς με TD η ειδική δραστικότητα της PAF-AH (Lp-PLA₂) εντοπίζεται εξ ολοκλήρου στα μόρια των LDL αφού λόγω της πάθησης απουσιάζει η HDL. Η δραστικότητα στο πλάσμα σε ασθενή με TD βρέθηκε αυξημένη.

Ωστόσο, στις μελέτες αυτές δεν μετρήθηκαν τα επίπεδα του PAF ώστε να υπάρχει μια σφαιρική εκτίμηση για τον μεταβολισμό του PAF. Από τότε μέχρι σήμερα, δεν έχει μελετηθεί εκτενώς ο μεταβολισμός του PAF σε ασθενή TD.

Είναι η πρώτη φορά που μετρώνται οι ειδικές δραστικότητες των ενζύμων μεταβολισμού σε ασθενή με μια τόσο σπάνια πάθηση όπως η νόσος Ταγγέρη, ενώ έχουν μελετηθεί εκτενώς σε πολλές παθολογικές καταστάσεις και στις περισσότερες από αυτές οι δραστικότητες των ενζύμων είναι διαφορετικές από αυτές των φυσιολογικών.

Σε αρκετές παθολογικές καταστάσεις όπως η καρδιακή ανεπάρκεια [181], το AIDS [182], το σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών [183], στην σπειραματονεφρίτιδα [184], στον συστηματικό ερυθηματώδη λύκο [185], σε ασθενείς με θετική δοκιμασία κοπώσεως [186], σε υπερτασικούς [187], σε ασθενείς με ΣΝ [188, 189], σε ασθενείς με οικογενή υπερχοληστερολαιμία [190], στον σακχαρώδη διαβήτη τύπου Ι [191] η ειδική δραστικότητα της Lp-PLA₂ βρέθηκε πιο αυξημένη σε σχέση με τους υγιείς.

Αντίθετα, υπάρχουν εργασίες στις οποίες βρέθηκε ότι η ειδική δραστηριότητα της Lp-PLA₂ ήταν μειωμένη όπως στην αναφυλαξία [192], την περιοδοντίτιδα [193, 194], την στηθάγχη και το οξύ στεφανιαίο σύνδρομο [195], κατά την σήψη [196], σε σχέση με τους φυσιολογικούς.

Σύμφωνα με τα παραπάνω υπάρχουν πολλές εργασίες που συσχετίζουν τις αυξημένες ή μειωμένες ειδικές δραστηριότητες των PAF-CPT, Lyso-PAF-AT, PAF-AH ή Lp-PLA₂ με διάφορες παθολογικές καταστάσεις.

Στην εργασία αυτή [197], οι ειδικές δραστηριότητες των βιοσυνθετικών ενζύμων (PAF-CPT, Lyso-PAF-AT) είναι μειωμένες ενώ αυτή του καταβολικού ενζύμου (PAF-AH στα κύτταρα και Lp-PLA₂ στο πλάσμα) είναι αυξημένη στην ασθενή TD έναντι των φυσιολογικών ατόμων, με στατιστικά σημαντικές διαφορές ($p < 0.05$). Το γεγονός αυτό ενισχύει τα αποτελέσματα των επιπέδων PAF στο αίμα. Παρόλο που τα επίπεδα του PAF είναι στα φυσιολογικά πλαίσια, ο δεσμευμένος PAF είναι σημαντικά μειωμένος σε σχέση με τις υγιείς γυναίκες ($p < 0.05$).

Συσσώρευση αιμοπεταλίων

Το ποσοστό συσώρευσης αιμοπεταλίων στο πλάσμα πλούσιο σε αιμοπετάλια (platelet rich plasma, PRP) από διάφορους πηκτικούς παράγοντες όπως ο PAF, το ADP και η θρομβίνη, επηρεάζεται από διάφορες παθολογικές καταστάσεις.

Οι Tseliris και συν. [198] μελέτησαν ασθενείς με ασταθή στηθάγχη πριν και μετά την θεραπεία με αμπισιξιμάμπη. Στο PRP των ασθενών, οι τιμές του EC₅₀ για τον PAF ήταν σημαντικά χαμηλότερες την ημέρα λήψης του φαρμάκου αλλά το ποσοστό συσώρευσης ήταν υψηλότερο σε σχέση με τα φυσιολογικά άτομα. Παρόμοια αποτελέσματα είχε και η επίδραση με το ADP. Ενώ οι Goudevenos και συν. [186] μελέτησαν την επίδραση του PAF στο PRP 44 ασθενών με ΣΝ μετά από δοκιμασία κοπώσεως. Στους ασθενείς με θετική δοκιμασία κόπωσης το EC₅₀ για τον PAF βρέθηκε σημαντικά μειωμένο σε σχέση με φυσιολογικά άτομα.

Επιπρόσθετα, οι Demopoulos και συν. [199] σε ασθενείς με ομόζυγη μορφή β-θαλασσαιμίας βρήκαν ότι το ADP (5 μM) προκαλούσε μειωμένη ή φυσιολογική συσώρευση αιμοπεταλίων, ενώ στους ετερόζυγους η

συσσώρευση ήταν φυσιολογική. Οι ασθενείς που υπεβλήθησαν σε σπληνεκτομή είχαν αυξημένη συσσώρευση.

Οι Harmon και συν. [200] βρήκαν ότι η δέσμευση της θρομβίνης ήταν αυξημένη σε ασθενή TD αλλά παρατηρήθηκε λιγότερη ανταπόκριση σε μικρότερες συγκεντρώσεις θρομβίνης. Με βάση τα αποτελέσματά τους, υπέθεσαν ότι τα αιμοπετάλια του ασθενή TD ήταν λιγότερο δραστικά συγκριτικά με αυτά των υγιών.

Στην εργασία αυτή [197] είναι η πρώτη φορά που μελετάται η συσσώρευση αιμοπεταλίων από τον PAF, το ADP και τη θρομβίνη σε TD ασθενή. Το EC_{50} της συσσώρευσης στο PRP από τον PAF ήταν $36.5 \cdot 10^{-7}$ M PAF, από το ADP ήταν $20.15 \cdot 10^{-10}$ M ADP και από την θρομβίνη ήταν 183 U/L θρομβίνης (τελική συγκέντρωση στην κυβέττα).

Το EC_{50} της θρομβίνης βρέθηκε σημαντικά αυξημένο συγκριτικά με τις υγιείς γυναίκες που μελετήθηκαν ($p < 0.05$). Ενδεχομένως, αυτό να οφείλεται στη μειωμένη συγκέντρωση ή δραστηριότητα συμπαραγόντων του PRP της ασθενούς TD.

Το EC_{50} του PAF είναι αυξημένο σε σχέση με το EC_{50} των 12 υγιών γυναικών που μελετήθηκαν. Το γεγονός αυτό πιθανόν να οφείλεται στην αυξημένη δραστηριότητα στο πλάσμα της Lp-PLA₂ στην ασθενή TD και όχι στην διαφορετική δραστηριότητα των αιμοπεταλίων.

Επίπεδα του PAF

Τα επίπεδα του PAF εξαρτώνται άμεσα από την δραστηριότητα του καταβολικού και των βιοσυνθετικών ενζύμων του. Σε αρκετές παθολογικές καταστάσεις οι οποίες δημιουργούν φλεγμονή, τα επίπεδα του PAF και των ενζύμων του είναι διαφορετικά σε σχέση με τις φυσιολογικές τιμές. Σε πολλές εργασίες τα επίπεδα του PAF εκφράζονται σε pg/mL, και σε άλλες σε pmol/mL. Ωστόσο, τα pmol/mL παρόλο που είναι πιο ορθή έκφραση, μπορούν να μετατραπούν με βάση ένα μέσο θεωρητικό μοριακό βάρος του PAF 548 σε pg/mL, αφού στην βιβλιογραφία συνήθως δίνονται με αυτό τον τρόπο.

Στην περίπτωση της περιοδοντίτιδας, οι Chen και συν. [201] μελέτησαν ασθενείς με και χωρίς ΣΝ. Όσοι είχαν ΣΝ και περιοδοντίτιδα, παρουσίασαν

πιο αυξημένες τιμές PAF συγκριτικά με τους υγιείς. Αυξημένα επίπεδα του PAF σε ασθενείς με περιοδοντίτιδα βρήκαν οι Antonopoulou και συν. [202] και οι Zheng και συν. [203]. Αντίστοιχα αποτελέσματα είχαν οι Gao και συν. [204] που μελέτησαν ασθενείς με άσθμα και οι Vadas και συν. [192] σε ασθενείς με αναφυλαξία.

Οι Detoroulou και συν. [181] σε ασθενείς με καρδιακή ανεπάρκεια βρήκαν ότι τα επίπεδα του PAF κυμαίνονταν από 0.03 μέχρι 5.6 pmol/mL. Αυξημένες τιμές του PAF βρέθηκαν και σε ασθενείς με σπειραματονεφρίτιδα [184]. Πιο πρόσφατα, στον συστηματικό ερυθρηματώδη λύκο τα επίπεδα του PAF δεν διέφεραν συγκριτικά με τα υγιή άτομα [185].

Οι τιμές του PAF διαφέρουν από εργασία σε εργασία κυρίως λόγω της μεθόδου προσδιορισμού. Ωστόσο, οι διαφορές μεταξύ παθολογικών καταστάσεων και υγιών είναι εμφανείς. Στην εργασία αυτή [197] η ολική τιμή του PAF στην ασθενή με TD ήταν μέσα στα φυσιολογικά όρια των υγιών γυναικών. Ωστόσο, ο δεσμευμένος PAF ήταν σημαντικά μειωμένος συγκριτικά με τις φυσιολογικές γυναίκες, πιθανώς λόγω της αυξημένης ειδικής δραστηριότητας της Lp-PLA₂.

Ο λόγος που η ασθενής δεν έχει αναπτύξει αφρώδη κύτταρα και ΣΝ είναι άγνωστος, διότι συμμετέχουν πολλοί μηχανισμοί σε αυτές τις διαδικασίες. Ο μεταβολισμός του PAF, ενδεχομένως να μπορεί να εξηγήσει την απουσία ΣΝ. Από τη στιγμή που ο PAF διαδραματίζει σπουδαίο ρόλο στην αθηροσκλήρωση και την ανάπτυξη ΣΝ, τα επίπεδά του στο αίμα εξαρτώνται από την βιοσύνθεση και αποικοδόμησή του.

Όλα τα ανωτέρω μας οδηγούν στο ακόλουθο τελικό συμπέρασμα: Η ειδική δραστηριότητα των βιοσυνθετικών ενζύμων του PAF (PAF-CPT και Lyso-PAF-AT) ήταν μειωμένη συγκριτικά με τις φυσιολογικές γυναίκες, εξηγεί τα μειωμένα επίπεδα του δεσμευμένου PAF. Η ειδική δραστηριότητα του αποικοδομητικού (PAF-AH στα κύτταρα και Lp-PLA₂ στο πλάσμα) ήταν αυξημένη στην ασθενή TD συγκριτικά με τις φυσιολογικές γυναίκες. Πιθανώς, λόγω αυτών των επιπέδων του PAF στην ασθενή TD, να αποτελεί πιθανό λόγο που η ασθενής ενώ έχει τη νόσο Ταγγέρη δεν έχει εμφανίσει στεφανιαία νόσο και αθηροσκλήρωση.

ΣΥΝΤΜΙΣΕΙΣ

ΣΥΝΤΜΙΣΕΙΣ

AAG: 1-αλκυλο-2-ακετυλο-σn-γλυκερόλη
AAPA: 1-αλκυλο-2-ακετυλο-σn-γλυκερο-3-φωσφορικό οξύ
ABCA1: ATP-συνδεδεμένος μεταφορέας A1
ACAT: ακυλοτρανσφεράση ακυλο-συνένζυμου A : χοληστερόλης
ALPA: 1-αλκυλο-2-λυσσο-σn-γλυκερο-3-φωσφορικό οξύ
AMP: αδενοσινό-μονοφωσφορικό οξύ
Apo A1: απολιποπρωτεΐνη A1
Apo B100: απολιποπρωτεΐνη B100
ATP: αδενοσινό-τριφωσφορικό οξύ
CDP-χολίνη: κυτιδυλο-διφωσφο-χολίνη
CE: εστεροποιημένη χοληστερόλη
CERP: πρωτεΐνη ρύθμισης της εκροής χοληστερόλης
CETP: πρωτεΐνη μεταφοράς εστέρων της χοληστερόλης
DHAP: φωσφοδιυδροξυακετόνη
DNA: δεοξυριβονουκλεϊκό οξύ
dNTPs: τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια
DOPA: διελαύλο-φωσφατιδικό οξύ
DTT: διθειοθρεϊτόλη
GEPC: γλυκεριναιθερικό ανάλογο φωσφατιδυλοχολίνης
HDL: υψηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνη
HL: ηπατική λιπάση
HMG-CoA: υδροξυμεθυλογλουταρυλο-συνένζυμο A αναγωγή
IDL: ενδιάμεσης πυκνότητας λιποπρωτεΐνες
LCAT: ακυλοτρανσφεράση λεκιθίνης : χοληστερόλης
LDL: χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνη
Lp(a): λιποπρωτεΐνη a
LpL: λιποπρωτεϊνική λιπάση
Lp-PLA₂: λιποπρωτεϊνική φωσfolιπάση A₂
Lyso-PAF-AT: ακετυλοτρανσφεράση του λυσο-PAF
MCP1: χημειοτακτική πρωτεΐνη-1 των μονοκυττάρων
mCSF: διεγερτικός παράγοντας μονοκυττάρων αποικιών
MPO: μυελοϋπεροξειδάση
NADPH: νικοτιναμιδο-αδενινο-φωσφορικό δινουκλεοτίδιο

NO: μονοξείδιο του αζώτου
PAF: παράγοντας ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων
PAF- AH: PAF-ακετυλοϋδρολάση
PAF-CPT: φωσφοχολινοτρανσφεράση του PAF
PC: φωσφατιδυλοχολίνη
PC-CPT: φωσφοχολινοτρανσφεράση της PC
PCR: αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης
PL: φωσφολιποειδή
PLA₂: φωσφολιπάση A₂
PLC: φωσφολιπάση C
PLTP: πρωτεΐνη μεταφοράς φωσφολιποειδών
PON1: παραοξονάση-1
oxLDL: οξειδωμένη LDL
oxPL: οξειδωμένα φωσφολιποειδή
RCT: ανάστροφη μεταφορά της χοληστερόλης
RFLPs: πολυμορφισμοί μήκους τμημάτων περιορισμού
ROS: δραστικά μόρια οξυγόνου
SMase: σφιγγομυελινάση
sPLA₂: εκκριτική φωσφολιπάση A₂
SR-A: καθαριστικός υποδοχέας A
SRBI: καθαριστικός υποδοχέας κλάσης B τύπου 1
TG: τριγλυκερίδια, τριακυλογλυκερόλες
VLDL: πολύ χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνες

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Gaziano JM. Global burden of cardiovascular disease. In 'Heart Disease' 6th edition. Edited by Braunwald E., Zipes DZ, Libby P. Saunders WB 2001.
2. Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature* 1993;362:801-9.
3. Singaraja RR, Brunham LR, Visscher H, Kastelein JJ, Hayden MR. Efflux and atherosclerosis: the clinical and biochemical impact of variations in the ABCA1 gene. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003;23:1322-32.
4. Miller GJ, Miller NE. Plasma-high-density-lipoprotein concentration and development of ischaemic heart-disease. *Lancet* 1975;1:16-9.
5. Wilson PW, Castelli WP, Kannel WB. Coronary risk prediction in adults (the Framingham Heart Study). *Am J Cardiol* 1987;59:91G-4G.
6. Vrentzos GE, Papadakis JA, Ganotakis ES, Paraskevas KI, Gazi IF, Tzanakis N, Nair DR, Mikhailidis DP. Predicting coronary heart disease risk using the Framingham and PROCAM equations in dyslipidaemic patients without overt vascular disease. *Int J Clin Pract* 2007;61:1643-53.
7. Badimón L, Vilahur G, Padró T. Lipoproteins, Platelets, and Atherothrombosis. *Rev Esp Cardiol* 2009;62:1161-78.
8. Colman RW, Clowes AW, George JN, Goldhaber SZ, Marder VJ. Hemostasis and Thrombosis: Basic Principles and Clinical Practice. 5th ed. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins, 2006.
9. Adams GL, Manson RJ, Turner I, Sindram D, Lawson JH. The balance of thrombosis and hemorrhage in surgery. *Hematol Oncol Clin North Am* 2007;21:13-24.
10. Mackman N. Triggers, targets and treatments for thrombosis. *Nature* 2008;451:914-18.
11. Κολοβού Δ. Γενοβέφα, «Σύγχρονη Αντιμετώπιση των Διαταραχών του Μεταβολισμού των Λιπιδίων», Εκδόσεις: INFO HEALTH, Αθήνα 2008
12. Demopoulos CA, Karantonis HC, Antonopoulou S. Platelet activating factor- a molecular link between atherosclerosis theories. *Eur J Lipid Sci Technol* 2003;150:705-16.
13. Δημόπουλος Α. Κωνσταντίνος, Αντωνοπούλου Σμαραγδή, «Βασική Βιοχημεία», 2η έκδοση, Αθήνα 2009.
14. Cournia Z, Vaiana AC, Ullmann MG, Smith JC. Derivation of a molecular mechanics force field for cholesterol. *Pure Appl Chem* 2004;76:189-196.
15. Emsley John, «The Consumers Good Chemical Guide», Corgi 1996

16. Fielding CJ, Fielding PE. Intracellular cholesterol transport. *J Lipid Res* 1997;38:1503-21.
17. Κολοβού Δ. Γενοβέφα, Κόκκινος Φ. Διονύσιος, «Τα λιπίδια στην κλινική πράξη», Επιστημονικές Εκδόσεις Παρισιάνου, Αθήνα 2005
18. Kostner K. Beyond LDL-Cholesterol: New Treatments Raising HDLCholesterol or Enhancing Reverse Cholesterol Transport. *J. Kardiol* 2002;9:328-331.
19. Barbaro JF, Zvaifler NJ. Antigen induced histamine release from platelets of rabbits producing homologous PCA antibody. *Proc Soc Exp Biol Med* 1966;122:1245-7.
20. Henson PM. Release of vasoactive amines from rabbit platelets induced by sensitized mononuclear leukocytes and antigen. *J.Exp Med* 1970;131:287-306.
21. Siraganian RP, Osler AG. "Destruction of rabbit platelets in the allergic response of sensitized leukocytes. Demonstration of a fluid phase intermediate. *Journal of Immunology* 1971;106:1244-1251.
22. 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.
23. Benveniste J. Characteristics and semi purification of a platelet activating factor from human and rabbit leukocytes. *Fed Proc* 1974;33:797(Abstr.).
24. Henson PM, Pinckard RN. Basophil-derived platelet-activating factor as an in vivo mediator of acute allergic reactions: anaphylaxis in the rabbit. *J Immunol* 1977;119:2179-84.
25. Pinckard RN, Halonen M, Palmer JD, Bulter C, Shaw JO, Henson PM. Intravascular aggregation and pulmonary sequestration of platelets during IgE-induced systemic anaphylaxis in the rabbit: abrogation of lethal anaphylactic shock by platelet depletion. *J Immunol* 1977;119:2185-93.
26. Pinckard RN, Farr RS, Hanahan DJ. Physicochemical and functional identity of rabbit platelet-activating factor (PAF) please in vivo during IgE anaphylaxis with PAF released in vitro from IgE sensitized basophils. *J Immunol* 1979;123:1847-57.
27. 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;254:9355-8.
28. Benveniste J, Tence M, Varenne P, Bidault J, Boullet C, Polonsky J. Semi-synthesis and proposed structure of platelet-activating factor (P.A.F.): PAF-acether an alkyl ether analog of lysophosphatidylcholine. *C R Seances Acad Sci D* 1979; 289:1037-1040.

29. Blank ML, Snyder F, Byers LW, Brooks B, Murhead EE. Antihypertensive activity of an alkyl ether analog of phosphatidylcholine. *Biochem.Biophys.Res.Commun.*, 1979;90:1194-1200.
30. Polonsky J, Tencé M, Varenne P, Das BC, Lunel J, Benveniste J. Release of 1-O-alkylglyceryl 3-phosphorylcholine, O-deacetyl platelet-activating factor, from leukocytes: chemical ionization mass spectrometry of phospholipids. *Proc Natl Acad Sci USA* 1980;77:7019-23.
31. 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(12):5514-5516.
32. Prescott SM, Zimmerman GA, Stafforini DM, McIntyre TM. Platelet-activating factor and related lipid mediators. *Annu. Rev. Biochem.* 2000;69:419-445.
33. Jackson EM, Mott GE, Hoppens C, McManus LM, Weintraub ST, Ludwig JC, Pinckard RN. High performance liquid chromatography of platelet-activating factors. *J Lipid Res.* 1984;25:753-7.
34. Satsangi RK, Ludwig JC, Weintraub ST, Pinckard RN. A novel method for the analysis of platelet-activating factor: direct derivatization of glycerophospholipids. *J Lipid Res.* 1989;30:929-37.
35. Weintraub ST, Lear CS, Pinckard RN. Analysis of platelet-activating factor by GC-MS after direct derivatization with pentafluorobenzoyl chloride and heptafluorobutyric anhydride. *J Lipid Res.* 1990;31:719-25.
36. Mueller HW, O'Flaherty JT, Wykle RL. The molecular species distribution of platelet-activating factor synthesized by rabbit and human neutrophils. *J Biol Chem.* 1984;259:14554-9.
37. Moschidis MC, Demopoulos CA. Silicic acid column chromatography of phospholipids. Separation of 1-O-alkyl-2-acetyl-sn-glyceryl-3-phosphoryl choline, cardiolipin and other related phospholipids. *J Chromatogr* 1983;259:504-7.
38. Τσούπρας Αλέξανδρος, Μελέτη του μεταβολισμού του παράγοντα ενεργοποίησης αιμοπεταλίων (PAF) σε ανθρώπινα μεσαγγειακά κύτταρα-επίδραση αντι-φλεγμονοδών, αντι-καρκινικών και αντι-ϊικών παραγόντων στη δράση του PAF και των ενζύμων του. Διδακτορική Διατριβή, Αθήνα 2008.
39. Francescangeli E, Boila A, Goracci G. Properties and regulation of microsomal PAF- synthesizing enzymes in rat brain cortex. *Neurochem Res* 2000;25:705-13.
40. Snyder F. CDP-choline alkylacetyl glycerol cholinephosphotransferase catalyzes the final step in the de novo synthesis of platelet-activating factor. *Biochem. Biophys Acta* 1997;1348:111-6.

41. Francescangeli E, Freysz L, Goracci G. PAF-synthesizing enzymes in neutral cells during differentiation and in gerbil brain during ischemia. *Adv Exp Med Biol* 1996;416:21-7.
42. Πετράς Δημήτρης, Βιοσύνθεση και αποικοδόμηση του παράγοντα ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων (PAF) σε ασθενείς με ιδιοπαθή σπειραματονεφρίτιδα (μελέτη in vivo). Διδακτορική Διατριβή, Αθήνα 2008.
43. Peplow PV. Regulation of platelet-activating factor (PAF) activity in human diseases by phospholipase A2 inhibitors, PAF acetylhydrolases, PAF receptor antagonists and free radical scavengers. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 1999;61:65-82.
44. Karabina SA, Ninio E. Plasma PAF-acetylhydrolase: an unfulfilled promise? *Biochim. Biophys. Acta.* 2006;1761:1351-8., Derewenda ZS, Ho YS. PAF-acetylhydrolases. *Biochim Biophys Acta* 1999;1441:229-36.
45. Prescott SM. Inflammatory actions of platelet-activating factor: control by PAF acetylhydrolase. *J Investg Allergol Clin Immunol* 1997;7:416.
46. Antonopoulou S., Demopoulos CA, Iatrou C, Moustakas G, Ziropiannis P. Platelet-activating factor acetylhydrolase (PAF-AH) in human kidney. *Int J Biochem* 1994;26:1157-62.
47. Suckling, K. E., and C. H. Macphee. Lipoprotein-associated phospholipase A2: a target directed at the atherosclerotic plaque. *Expert Opin Ther Targets* 2002;6:309–314.
48. 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.
49. Giménez R, Aguilar J. Cytidine (5') diphosphocholine-induced decrease in cerebral platelet activating factor is due to inactivation of its synthesizing enzyme cholinephosphotransferase in aged rats. *Neurosci Lett* 2001;299:209–212.
50. Renooij W, Snyder F. Biosynthesis of 1-alkyl-2-acetyl-sn-glycero-3-phosphocholine (platelet activating factor and a hypotensive lipid) by cholinephosphotransferase in various rat tissues. *Biochim Biophys Acta* 1981;663:545-56.
51. Imagawa M, Mimata H, Takahashi S, Nakagawa M, Nomura Y, Ogata J. Modulation of platelet-activating factor synthesis by recombinant interferon-alpha in human renal cell carcinoma. *Urol Int* 1996;57:11-6.
52. Satoh N, Harada A, Yokoyama K, Karasawa K, Inoue K, Setaka M. Regulation of Activities of Cytidine 5'-Diphospho-Choline: 1-O-Alkyl-2-Acetyl-sn-Glycerol Cholinephosphotransferase, an Enzyme Responsible for de novo Synthesis of

- Platelet-Activating Factor, by Membrane Phospholipids. *J Health Sci* 2003;49:13-21
53. Wells XE, O'Neill C. Detection and preliminary characterization of two enzymes involved in biosynthesis of platelet-activating factor in mouse oocytes, zygotes and preimplantation embryos: dithiothreitol-insensitive cytidine-diphosphocholine:1-O-alkyl-2-acetyl-sn-glycerol cholinephospho-transferase and acetyl-coenzyme A: 1-O-alkyl-2-lyso-sn-glycero-3-phosphocholine acetyl-transferase. *J Reprod Fertil* 1994;101:385-91.
54. Fragopoulou E, Iatrou C, Demopoulos CA. Characterization of acetyl-CoA: lyso-PAF acetyltransferase of human mesangial cells. *Mediators Inflamm* 2005;5:263-72.
55. Wykle RL, Malone B, Snyder F. Enzymatic synthesis of 1-alkyl-2-acetyl-sn-glycero-3-phosphocholine, a hypotensive and platelet-aggregating lipid. *J Biol Chem* 1980;255:10256–10260.
56. Lee TC, Malone B, Wasserman SI, Fitzgerald V, Snyder F. Activities of enzymes that metabolize platelet-activating factor (1-Alkyl-2-acetyl-sn-glycero-3-phosphocholine) in neutrophils and eosinophils from humans and the effect of a calcium ionophore. *Biochem Biophys Res Commun* 1982;105:1303–1308.
57. Ribbes G, Ninio E, Fontan P, et al. Evidence that biosynthesis of platelet-activating factor (pafacether) by human neutrophils occurs in an intracellular membrane. *FEBS Lett* 1985;191:195–199.
58. Shindou H, Hishikawa D, Nakanishi H, Harayama T, Ishii S, Taguchi R, Shimizu T. 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;282:6532-9.
59. Snyder F, Lee TC, Blank ML. Platelet-activating factor and related ether lipid mediators. Biological activities, metabolism, and regulation. *Ann N Y Acad Sci* 1989;568:35–43.
60. Nomikos TN, Iatrou C, Demopoulos CA. Acetyl-CoA:1-O-alkyl-sn-glycero-3-phosphocholine acetyltransferase (lyso-PAF AT) activity in cortical and medullary human renal tissue. *Eur J Biochem* 2003;270:2992–3000.
61. Gomez-Cambronero J, Nieto ML, Mato JM, Sanchez-Crespo M. Modulation of lyso-plateletactivating factor: acetyl-CoA acetyltransferase from rat splenic microsomes. The role of calcium ions. *Biochim Biophys Acta* 1985;845:511–515.
62. Gomez-Cambronero J, Mato JM, Vivanco F, Sanchez-Crespo M. Phosphorylation of partially purified 1-O-alkyl-2-lyso-sn-glycero-3-phosphocholine:acetyl-CoA acetyltransferase from rat spleen. *Biochem J* 1987;245:893–897.

63. Lenihan DJ, Lee TC. Regulation of platelet activating factor synthesis: modulation of 1-alkyl-2-lyso-snglycero-3-phosphocholine:acetyl-CoA acetyltransferase by phosphorylation and dephosphorylation in rat spleen microsomes. *Biochem Biophys Res Commun* 1984;120:834–839.
64. Nieto ML, Velasco S, Sanchez-Crespo M. Modulation of acetyl-CoA:1-alkyl-2-lyso-sn-glycero-3-phosphocholine (lyso-PAF) acetyltransferase in human polymorphonuclears. The role of cyclic amp-dependent and phospholipid sensitive, calcium-dependent protein kinases. *J Biol Chem* 1988;263:4607–4611.
65. Ninio E, Joly F, Hieblot C, Bessou G, Mencia-Huerta JM, Benveniste J. Biosynthesis of paf-acether. IX. Role for a phosphorylation-dependent activation of acetyltransferase in antigen-stimulated mouse mast cells. *J Immunol* 1987;139:154–160.
66. Baker PR, Owen JS, Nixon AB, et al. Regulation of platelet-activating factor synthesis in human neutrophils by map kinases. *Biochim Biophys Acta* 2002;1592:175–184.
67. 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.
68. Srinivasan P, Bahnson BJ. Molecular Model of Plasma PAF Acetylhydrolase-Lipoprotein Association: Insights from the Structure. *Pharmaceuticals* 2010;3:541-557
69. Sudhir, K. Clinical review: Lipoprotein-associated phospholipase A2, a novel inflammatory biomarker and independent risk predictor for cardiovascular disease. *J Clin Endocrinol Metab* 2005;90:3100–3105.
70. Anderson, JL. Lipoprotein-associated phospholipase A2: An independent predictor of coronary artery disease events in primary and secondary prevention. *Am J Cardiol* 2008;101:23F–33F.
71. Quarck R, De Geest B, Stengel D, Mertens A, Lox M, Theilmeier G, Michiels C, Raes M, Bult H, Collen D, Van Veldhoven P, Ninio E, Holvoet P. Adenovirus-mediated gene transfer of human platelet-activating factor-acetylhydrolase prevents injury-induced neointima formation and reduces spontaneous atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation* 2001;103:2495-500.
72. Ruderman, N. Free fatty acids produce insulin resistance and activate the proinflammatory nuclear factor-kappaB pathway in rat liver. *Diabetes* 2005;54:3458–3465.
73. Shankar, SS; Steinberg, HO. FFAs: Do they play a role in vascular disease in the insulin resistance syndrome? *Curr Diab Rep* 2005;5: 30–35.

74. Sakata-Kaneko, S.; Wakatsuki, Y.; Usui, T.; Matsunaga, Y.; Itoh, T.; Nishi, E.; Kume, N; Kita T. Lysophosphatidylcholine upregulates CD40 ligand expression in newly activated human CD4+T cells. *FEBS Lett* 1998;433:161–165.
75. Kume, N; Gimbrone MA. Lysophosphatidylcholine transcriptionally induces growth factor gene expression in cultured human endothelial cells. *J Clin Invest* 1994;93:907–911.
76. Lomize AL; Pogozheva ID; Lomize MA; Mosberg HI. Positioning of proteins in membranes: A computational approach. *Protein Sci* 2006;15:1318–1333.
77. Lomize MA; Lomize AL; Pogozheva ID; Mosberg HI. OPM: Orientations of proteins in membranes database. *Bioinformatics* 2006;22:623–625.
78. Forti N, Diament J. High-density lipoproteins: metabolic, clinical, epidemiological and therapeutic intervention aspects. An update for clinicians. *Arq Bras Cardiol* 2006;87:671-9
79. Gardner AA, Reichert EC, Topham MK, Stafforini DM. Identification of a domain that mediates association of platelet-activating factor acetylhydrolase with high density lipoprotein. *J Biol Chem* 2008;283:17099-10 6.
80. Κολοβού Δ. Γενοβέφα, Αναγνωστοπούλου Κ. Κατερίνα, Παυλίδης Ν. Αντώνης, «αθηροσκλήρωση», 2004.
81. von Eckardstein A, Nofer JR, Assmann G. High density lipoproteins and arteriosclerosis. Role of cholesterol efflux and reverse cholesterol transport. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001;21:13-27. Review.
82. Rader DJ. Molecular regulation of HDL metabolism and function: implications for novel therapies. *J Clin Invest* 2006;116:3090-100.
83. Choi BG, Viilahur G, Viles-Gonzalez JF, Badimon JJ. The role of high-density lipoprotein cholesterol in atherothrombosis. *Mt Sinai J Med* 2006;73:690-701.
84. Πετράκη Μαρία, Ο ρόλος της PAF-ακετυλοϋδρολάσης (PAF-AH) και της παραοξονάσης-1 (PON-1) στις αντιοξειδωτικές και αντιφλεγμονώδεις δράσεις της HDL καθώς και στην αντίστροφη μεταφορά της χοληστερόλης. Διδακτορική διατριβή, Ιωάννινα 2009.
85. Asano K, Okamoto S, Fukunaga K, Shiomi T, Mori T, Iwata M, Ikeda Y, Yamaguchi K. Cellular source(s) of platelet-activating-factor acetylhydrolase activity in plasma. *Biochem Biophys Res Commun.* 1999;261:511-4.
86. Goudevenos J, Tselepis AD, Vini MP, Michalis L, Tsoukatos DC, Elisaf M, Ninio E, Sideris DA. Platelet-associated and secreted PAF-acetylhydrolase activity in patients with stable angina: sequential changes of the enzyme activity after angioplasty. *Eur J Clin Invest* 2001;31:15-23.

87. Mitsios JV, Vini MP, Stengel D, Ninio E, Tselepis AD. Human platelets secrete the plasma type of platelet-activating factor acetylhydrolase primarily associated with microparticles. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006;26:1907-13.
88. Nakajima K, Murakami M, Yanoshita R, Samejima Y, Karasawa K, Setaka M, Nojima S, Kudo I. Activated mast cells release extracellular type platelet-activating factor acetylhydrolase that contributes to autocrine inactivation of platelet-activating factor. *J Biol Chem* 1997;272:19708-13.
89. Narahara H, Frenkel RA, Johnston JM. Secretion of platelet-activating factor acetylhydrolase following phorbol ester-stimulated differentiation of HL-60 cells. *Arch Biochem Biophys* 1993;301:275-81.
90. Stafforini DM. Biology of platelet-activating factor acetylhydrolase (PAF-AH, lipoprotein associated phospholipase A2). *Cardiovasc Drugs Ther* 2009;23:73-83. Review.
91. Rodrigo L, Mackness B, Durrington PN, Hernandez A, Mackness MI. Hydrolysis of platelet-activating factor by human serum paraoxonase. *Biochem J* 2001;354:1-7.
92. Marchegiani F, Marra M, Olivieri F, Cardelli M, James RW, Boemi M, Franceschi C. Paraoxonase 1: genetics and activities during aging. *Rejuvenation Res* 2008;11:113-27.
93. Ahmed Z, Ravandi A, Maguire GF, Emili A, Draganov D, La Du BN, Kuksis A, Connelly PW. Apolipoprotein A-I promotes the formation of phosphatidylcholine core aldehydes that are hydrolyzed by paraoxonase (PON-1) during high density lipoprotein oxidation with a peroxynitrite donor. *J Biol Chem* 2001;276:24473-81.
94. Ahmed Z, Ravandi A, Maguire GF, Emili A, Draganov D, La Du BN, Kuksis A, Connelly PW. Multiple substrates for paraoxonase-1 during oxidation of phosphatidylcholine by peroxynitrite. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;290:391-6.
95. Marathe GK, Zimmerman GA, McIntyre TM. Platelet-activating factor acetylhydrolase, and not paraoxonase-1, is the oxidized phospholipid hydrolase of high density lipoprotein particles. *J Biol Chem* 2003;278:3937-47.
96. Ostermann, G., Kertscher, H. P., Winkler, L., Schlag, B., Ruhling, K., Till, U. The role of lipoproteins in the degradation of platelet-activating factor. *Thromb Res* 1986;44:303-314.
97. Stafforini DM, Carter ME, Zimmerman GA, McIntyre TM, Prescott SM. Lipoproteins alter the catalytic behavior of the platelet-activating factor acetylhydrolase in human plasma. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 1989;86:2393-2397.
98. Tsimihodimos V, Kakafika A, Tambaki AP, Bairaktari E, Chapman MJ, Elisaf M, Tselepis AD. Fenofibrate induces HDL-associated PAF-AH but attenuates

- enzyme activity associated with apoB-containing lipoproteins. *J Lipid Res* 2003;44:927-34.
99. Watson AD; Navab M; Hama SY, Sevanian A, Prescott SM, Stafforini DM, McIntyre TM, Du BN, Fogelman AM, Berliner JA. Effect of platelet activating factor acetylhydrolase on the formation and action of minimally oxidized low density lipoprotein. *J. Clin. Invest* 1995;95:774–782.
100. Yusuf S, Reddy S, Ounpuu S, Anand S. Global burden of cardiovascular diseases: Part I: General considerations, the epidemiologic transition, risk factors, and impact of urbanization. *Circulation* 2001;104:2746-53.
101. Zambon A, Torres A, Bijvoet S, Gagne C, Moorjani S, Lupien PJ, Hayden MR, Brunzell JD. Prevention of raised low-density lipoprotein cholesterol in a patient with familial hypercholesterolaemia and lipoprotein lipase deficiency. *Lancet* 1993;13:427-34.
102. Kane J. Structure and function of the plasma lipoproteins and their receptors. In *Atherosclerosis and Coronary Artery Disease* edited by Fuster V, Ross R, Topol EJ. Lippincott-Raven Publishers. Philadelphia 1996.
103. Krauss RM. Relationship of intermediate and low-density lipoprotein subspecies to risk of coronary artery disease. *Am Heart J* 1987;113:578-82.
104. Musliner TA, McVicker KM, Iosefa JF, Krauss RM. Metabolism of human intermediate and very low density lipoprotein subfractions from normal and dysbetalipoproteinemic plasma. *In vivo* studies in rat. *Arteriosclerosis* 1987;7:408-20.
105. Swarnakar S, Temel RE, Connelly MA, Azhar S, Williams DL. Scavenger receptor class B, type I, mediates selective uptake of low density lipoprotein cholesteryl ester. *J Biol Chem* 1999;274:29733-9.
106. Holvoet P, De Keyser D, Jacobs RD. Oxidized LDL and the metabolic syndrome. *Future Lipidol* 2008;3637–649.
107. Cipolletta C, Ryan KE, Hanna EV, Trimble ER. Activation of peripheral blood CD14+monocytes occurs in diabetes. *Diabetes* 2005;54:2779–2786.
108. Meydani M. Vitamin E and atherosclerosis: beyond prevention of LDL oxidation. *J Nutr.* 2001;131:366S-8S.
109. Catapano AL, Maggi FM, Tragni E. Low density lipoprotein oxidation, antioxidants, and atherosclerosis. *Curr Opin Cardiol* 2000;15:355-63.
110. Liapikos TA, Antonopoulou S, Karabina SA, Tsoukatos DC, Demopoulos CA, Tselepis AD. Platelet-Activating Factor formation during oxidative modification of low-density lipoprotein when PAF-acetylhydrolase has been inactivated. *Biochim Biophys Acta* 1994;1212:353-60.

111. Tselepis AD, Dentan C, Karabina SA, Chapman MJ, Ninio E. PAF-degrading acetylhydrolase is preferentially associated with dense LDL and VHDL-1 in human plasma. Catalytic characteristics and relation to the monocyte-derived enzyme. *Arterioscler. Thromb Vasc Biol* 1995;15:1764-1773.
112. Karabina SA, Liapikos TA, Grekas G, Goudevenos J, Tselepis AD. Distribution of PAFacetylhydrolase activity in human plasma low-density lipoprotein subfractions. *Biochim Biophys Acta* 1994;1213:34–38.
113. Sanchez-Quesada JL; Benitez S; Ordonez-Llanos J. Electronegative low-density lipoprotein. *Curr Opin Lipidol* 2004;15:329-335.
114. Blencowe C, Hermetter A, Kostner GM, Daigner HP Enhanced association of plateletactivating factor acetylhydrolase with lipoprotein (a) in comparison with low density lipoprotein *J Biol Chem* 1995;270:31151-31157.
115. Erqou S, Kaptoge S, Perry PL, Di Angelantonio E, Thompson A, White IR, Marcovina SM, Collins R, Thompson SG, Danesh J. Lipoprotein(a) concentration and the risk of coronary heart disease stroke and nonvascular mortality. *JAMA* 2009;302:412-423.
116. Tsimikas S, Witztum J L The role of oxidized phospholipids in mediating lipoprotein (a) atherogenicity *Curr Opin Lipidol* 2008;19:369-377.
117. Stafforini DM, Tjoelker LW, McCormick SP, Vaitkus D, McIntyre TM, Gray PW, Young SG, Prescott SM. Molecular basis of the interaction between plasma platelet-activating factor acetylhydrolase and low density lipoprotein *J Biol Chem* 1999;274:7018-7024.
118. Kolovou GD, Mikhailidis DP, Anagnostopoulou KK, Daskalopoulou SS, Cokkinos DV. Tangier disease four decades of research: a reflection of the importance of HDL. *Curr Med Chem* 2006;13:771-82.
119. Dean M, Hamon Y, Chimini G. The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *J Lipid Res* 2001;42:1007–1017.
120. van der Deen M, de Vries EG, Timens W, Scheper RJ, Timmer-Bosscha H, Postma DS. ATP-binding cassette (ABC) transporters in normal and pathological lung. *Respir Res* 2005;6:59. Review.
121. Wang N, Tall AR. Regulation and Mechanisms of ATP-Binding Cassette Transporter A1-Mediated Cellular Cholesterol Efflux. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003;23:1178-84.
122. Fredrickson DS. The Inheritance of High Density Lipoprotein Deficiency (Tangier Disease). *J Clin Invest* 1964;43:228-36.
123. Kolovou GD, Wade DP, Sengupta R, Cokkinos DV. Tangier Disease with unusual clinical manifestations. *Clin Genet* 2003;63:323-4.

124. Kolovou GD, Mikhailidis DP, Anagnostopoulou KK, Daskalopoulou SS, Cokkinos DV. Tangier disease four decades of research: a reflection of the importance of HDL. *Curr Med Chem* 2006;13:771-82.
125. Remaley AT, Rust S, Rosier M, Knapper C, Naudin L, Broccardo C, Peterson KM, Koch C, Arnould I, Prades C, Duverger N, Funke H, Assman G, Dinger M, Dean M, Chimini G, Santamarina-Fojo S, Fredrickson DS, Deneffe P, Brewer HB. Human ATP-binding cassette transporter 1 (ABC1): Genomic organization and identification of the genetic defect in the original Tangier disease kindred. *PNAS* 1999;96:12685-12690.
126. Gordon JL, Sims HF, Lentz SR, Edelstein C, Scannu AM, Straus AW: Proteolytic processing of human preproapolipoprotein A-I. *J Biol Chem* 1983;258:4037.
127. Serfaty-Lacrosniere C, Civeira F, Lanzberg A, Isaia P, Berg J, Janus ED, Smith MP Jr, Pritchard PH, Frohlich J, Lees RS. Homozygous Tangier disease and cardiovascular disease. *Atherosclerosis* 1994;107:85-98.
128. Ferrans VJ, Fredrickson DS. The pathology of Tangier disease. A light and electron microscopic study. *Am J Pathol* 1975;78:101-158.
129. Meco JF, Vila R, Pujol R, Bros R, Domènech P, Fiol C, Pintó X. Improvement in endothelial dysfunction in patients with hypoalphalipoproteinemia and coronary artery disease treated with bezafibrate. *J Cardiovasc Pharmacol* 2001;38:250-8.
130. Farr RS, Cox CP, Warldow ML, Jorgensen R. Preliminary studies of an acid-labile factor (ALF) in human sera that inactivates platelet-activating factor (PAF). *Clin Immunol Immunopathol* 1980;15:318-330.
131. Farr RS, Warlow ML, Cox CP, Meng KE, Greene DE. Human serum acid-labile factor is an acylhydrolase that inactivates platelet-activating factor. *Fed Proc* 1983;42:3120-2.
132. Blank ML, Hall MN, Cress EA, Snyder F. Inactivation of 1-alkyl-2-acetyl-sn-glycero-3-phosphocholine by a plasma acetylhydrolase: higher activities in hypertensive rats. *Biochem Biophys Res Commun* 1983;113:666-71.
133. Chignard M, Le Couedic JP, Vargaftig BB, Benveniste J. Platelet-activating factor (PAF-acether) secretion from platelets: effect of aggregating agents. *Br J Haematol* 1980;46:455-64.
134. Hubbard JW, Cox RH, Lawler JE, Blank ML, Snyder F. Antihypertensive effects of 1-hexadecyl-2-acetyl-sn-glycero-3-phosphocholine on plasma renin activity and catecholamine responses in spontaneously hypertensive rats. *Life Sci* 1983;32:221-32.
135. Pritchard PH, Chonn A, Yeung CC. The degradation of platelet-activating factor in the plasma of a patient with familial high density lipoprotein deficiency (Tangier disease). *Blood* 1985;66:1476-8.

136. Benton JL, Ding J, Tsai MY, Shea S, Rotter JI, Burke GL, Post W. Associations between two common polymorphisms in the ABCA1 gene and subclinical atherosclerosis: Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis (MESA). *Atherosclerosis* 2007;193:352-60.
137. Frikke-Schmidt R, Nordestgaard BG, Jensen GB, Tybjaerg-Hansen A. Genetic variation in ABC transporter A1 contributes to HDL-cholesterol in the general population. *J Clin Invest* 2004;114:1343-53.
138. Hodoğlugil U, Williamson DW, Huang Y, Mahley RW. Common polymorphisms of ATP binding cassette transporter A1, including a functional promoter polymorphism, associated with plasma high density lipoprotein cholesterol levels in Turks *Atherosclerosis* 2005;183:199-212.
139. Berg M. Jeremy, Tymoczko L. John, Stryer Lubert, «Biochemistry», 5th Edition, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, Ηράκλειο 2006.
140. Saleheen D, Khanum S, Haider SR, Nazir A, Ahmad U, Khalid H, Hussain I, Shuja F, Shahid K, Habib A, Frossard PM. A novel haplotype in ABCA1 gene effects plasma HDL-C concentration. *Int J Cardiol* 2007;31;115:7-13.
141. Tupitsina TV, Slominsky PA, Yefereva YM, Perova NI, Aronov DM, Limborska SA. Linkage analysis by a transmission/ Disequilibrium of Russian sibling pairs with coronary artery disease. *BJMG* 2007;10:43-54.
142. Clee SM, Zwinderman AH, Engert JC, Zwartz KY, Molhuizen HO, Roomp K, Jukema JW, van Wijland M, van Dam M, Hudson TJ, Brooks-Wilson A, Genest JJr, Kastelein JJ, Hayden MR. Common genetic variation in ABCA1 is associated with altered lipoprotein levels and a modified risk for coronary artery disease. *Circulation* 2001;103:1198-205.
143. Bligh EG, Dyer WJ. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol* 1959;37:911-7.
144. 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;29:305-9.
145. Bradford MM, Williams WL. New, Rapid, Sensitive method for protein determination. *Federation Proceedings* 1976;35:274.
146. Antonopoulou S, Demopoulos CA, Iatrou C, Moustakas G, Ziropiannis P. Platelet-activating factor acetylhydrolase (PAF-AH) in human kidney. *Int J Biochem* 1994;26:1157-62.
147. Rouser G, Siakotos AN, Fleischer S. Quantative analysis of phospholipids by thin-layer chromatography and phosphorus analysis of spots. *Lipids* 1966;1:85-86.

148. Nofer JR, Herminghaus G, Brodde M, Morgenstern E, Rust S, Engel T, Seedorf U, Assmann G, Bluethmann H, Kehrel BE. Impaired platelet activation in familial high density lipoprotein deficiency (Tangier Disease). *J Biol Chem* 2004;279:34032-7.
149. Pasdar A, Yadegarfar G, Cumming A, Whalley L, St Clair D, MacLeod MJ. The effect of ABCA1 gene polymorphisms on ischaemic stroke risk and relationship with lipid profile. *BMC Med Genet* 2007;8:30.
150. Tregouet DA, Ricard S, Nicaud V, Arnould I, Soubigou S, Rosier M, Duverger N, Poirier O, Macé S, Kee F, Morrison C, Denèfle P, Tiret L, Evans A, Deleuze JF, Cambien F. In-depth haplotype analysis of ABCA1 gene polymorphisms in relation to plasma ApoA1 levels and myocardial infarction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004;24:775-81.
151. Srinivasan SR, Li S, Chen W, Boerwinkle E, Berenson GS. R219K polymorphism of the ABCA1 gene and its modulation of the variations in serum high-density lipoprotein cholesterol and triglycerides related to age and adiposity in white versus black young adults. The Bogalusa heart study. *Metabolism* 2003;52:930-4.
152. Zhao SP, Xiao ZJ, Li QZ, Nie S, Tan LM, Jiang B, Wu J. Relationship between ATP-binding cassette transporter 1 R219K genetic variation and blood lipids]. [Article in Chinese]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 2004;84:1421-5.
153. Mantaring M, Rhyne J, Ho Hong S, Miller M. Genotypic variation in ATP-binding cassette transporter-1 (ABCA1) as contributors to the high and low high-density lipoprotein-cholesterol (HDL-C) phenotype. *Transl Res* 2007;149:205-10.
154. Wu Y, Bai H, Liu R, Liu Y, Liu BW. Analysis of ATP binding cassette A1 gene R219K polymorphism in patients with endogenous hypertriglyceridemia in Chinese population. [Article in Chinese]. *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi* 2007;24:177-81.
155. Tsai MY, Li N, Sharrett AR, Shea S, Jacobs DR Jr, Tracy R, Arnett D, Arends V, Post W. Associations of genetic variants in ATP-binding cassette A1 and cholesteryl ester transfer protein and differences in lipoprotein subclasses in the multi-ethnic study of atherosclerosis. *Clin Chem* 2009;55:481-8.
156. Tsai MY, Ordovas JM, Li N, Straka RJ, Hanson NQ, Arends VL, Arnett D. Effect of fenofibrate therapy and ABCA1 polymorphisms on high-density lipoprotein subclasses in the Genetics of Lipid Lowering Drugs and Diet Network. *Mol Genet Metab* 2010;100:118-22.
157. Huang Y, Wu Y, Liu R, Fan P, Zhang J, Wang F, Luo X, Liu Y, Liu B, Bai H. Differential effect of ATP binding cassette transporter A1 R219K and cholesteryl ester transfer protein TaqIB genotypes on HDL-C levels in overweight/obese and non-obese Chinese subjects. *Acta Cardiol* 2011;66:231-7.

158. Sun P, Bo XP, Guo DP, Li XY, Hu ZB, Wang J, Li XR, Fan LM, Chen Q. Study on the association of ABCA1 gene common variants with the risk of coronary atherosclerotic heart disease [Article in Chinese] *Zhonghua Xin Xue Guan Bing Za Zhi* 2005;33:627-30.
159. Ma XY, Liu JP, Song ZY. Associations of the ATP-binding cassette transporter A1 R219K polymorphism with HDL-C level and coronary artery disease risk: a meta-analysis. *Atherosclerosis* 2011;215:428-34.
160. Rejeb J, Omezzine A, Rebhi L, Boumaiza I, Kchock K, Belkahla R, Rejeb NB, Nabli N, Abdelaziz AB, Boughzala E, Bouslama A. Associations between common polymorphisms of adenosine triphosphate-binding cassette transporter A1 and coronary artery disease in a Tunisian population. *Arch Cardiovasc Dis* 2010;103:530-7.
161. Bertolini S, Pisciotta L, Di Scala L, Langheim S, Bellocchio A, Masturzo P, Cantafora A, Martini S, Averna M, Pes G, Stefanutti C, Calandra S. Genetic polymorphisms affecting the phenotypic expression of familial hypercholesterolemia. *Atherosclerosis* 2004;174:57-65.
162. Evans D, Beil FU. The association of the R219K polymorphism in the ATP-binding cassette transporter 1 (ABCA1) gene with coronary heart disease and hyperlipidaemia. *J Mol Med (Berl)* 2003;81:264-70.
163. Porchay-Baldérelli I, Péan F, Emery N, Maimaitiming S, Bellili N, Travert F, Mohammedi K, Roussel R, Marre M, Fumeron F, DIABHYCAR Study Group. Relationships between common polymorphisms of adenosine triphosphate-binding cassette transporter A1 and high-density lipoprotein cholesterol and coronary heart disease in a population with type 2 diabetes mellitus. *Metabolism* 2009;58:74-9.
164. Porchay I, Péan F, Bellili N, Royer B, Cogneau J, Chesnier MC, Caradec A, Tichet J, Balkau B, Marre M, Fumeron F. ABCA1 single nucleotide polymorphisms on high-density lipoprotein-cholesterol and overweight: the D.E.S.I.R. study. *Obesity (Silver Spring)* 2006;14:1874-9.
165. Li J, Wang LF, Li ZQ, Pan W. Effect of R219K polymorphism of the ABCA1 gene on the lipid-lowering effect of pravastatin in Chinese patients with coronary heart disease. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2009;36:567-70.
166. Doosti M, Najafi M, Reza JZ, Nikzamir A. The role of ATP-binding-cassette-transporter-A1 (ABCA1) gene polymorphism on coronary artery disease risk. *Transl Res* 2010;155:185-90.
167. Cenarro A, Artieda M, Castillo S, Mozas P, Reyes G, Tejedor D, Alonso R, Mata P, Pocoví M, Civeira F; Spanish FH group. A common variant in the ABCA1 gene

- is associated with a lower risk for premature coronary heart disease in familial hypercholesterolaemia. *J Med Genet* 2003;40:163-8.
168. Li Y, Zhang SZ, Ma YX, He Y, Dong JT, Sun Y, He GP, Zhang W. Relationship between the R219K polymorphism of ATP-binding cassette transporter 1 gene and coronary heart disease Yi Chuan [Article in Chinese] 2005;27:549-22.
 169. Li Y, Tang K, Zhou K, Wei Z, Zeng Z, He L, Wan C. Quantitative assessment of the effect of ABCA1 R219K polymorphism on the risk of coronary heart disease. *Mol Biol Rep* 2012;39:1809-13.
 170. Jiang Z, Zhou R, Xu C, Feng G, Zhou Y. Genetic variation of the ATP-binding cassette transporter A1 and susceptibility to coronary heart disease. *Mol Genet Metab* 2011;103:81-8.
 171. Andrikovics H, Pongrácz E, Kalina E, Szilvási A, Aslanidis C, Schmitz G, Tordai A. Decreased frequencies of ABCA1 polymorphisms R219K and V771M in Hungarian patients with cerebrovascular and cardiovascular diseases. *Cerebrovasc Dis* 2006;21:254-9.
 172. Harada T, Imai Y, Nojiri T, Morita H, Hayashi D, Maemura K, Fukino K, Kawanami D, Nishimura G, Tsushima K, Monzen K, Yamazaki T, Mitsuyama S, Shintani T, Watanabe N, Seto K, Sugiyama T, Nakamura F, Ohno M, Hirata Y, Yamazaki T, Nagai R. A common Ile 823 Met variant of ATP-binding cassette transporter A1 gene (ABCA1) alters high density lipoprotein cholesterol level in Japanese population. *Atherosclerosis* 2003;169:105-12.
 173. Frikke-Schmidt R, Nordestgaard BG, Jensen GB, Steffensen R, Tybjaerg-Hansen A. Genetic variation in ABCA1 predicts ischemic heart disease in the general population. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008;28:180-6.
 174. Delgado-Lista J, Perez-Martinez P, Perez-Jimenez F, Garcia-Rios A, Fuentes F, Marin C, Gómez-Luna P, Camargo A, Parnell LD, Ordovas JM, Lopez-Miranda J. ABCA1 gene variants regulate postprandial lipid metabolism in healthy men. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2010;30:1051-7.
 175. Sandhofer A, Iglseder B, Kaser S, Morè E, Paulweber B, Patsch JR. The influence of two variants in the adenosine triphosphate-binding cassette transporter 1 gene on plasma lipids and carotid atherosclerosis. *Metabolism* 2008;57:1398-404.
 176. Kolovou V, Kolovou G, Marvaki A, Karakosta A, Vasilopoulos G, Kalogiani A, Degiannis D, Marvaki C, Demopoulos CA. ATP-binding cassette transporter A1 gene polymorphisms and serum lipid levels in young Greek nurses. *Lipids Health Dis* 2011;10:56.
 177. Karadeniz M, Erdoğan M, Ayhan Z, Yalcın M, Olukman M, Cetinkalp S, Alper GE, Eroglu Z, Tetik A, Cetintas V, Ozgen AG, Saygılı F, Yılmaz C. Effect Of G2706A

- and G1051A polymorphisms of the ABCA1 gene on the lipid, oxidative stress and homocystein levels in Turkish patients with polycystic ovary syndrome. *Lipids Health Dis* 2011;10:193.
178. Kitjaroentharn A, Hananantachai H, Tungtrongchitr A, Pooudong S, Tungtrongchitr R. R219K polymorphism of ATP binding cassette transporter A1 related with low HDL in overweight/obese Thai males. *Arch Med Res* 2007;38:834-8.
179. Abellán R, Mansego ML, Martínez-Hervás S, Martín-Escudero JC, Carmena R, Real JT, Redon J, Castrodeza-Sanz JJ, Chaves FJ. Association of selected ABC gene family single nucleotide polymorphisms with postprandial lipoproteins: results from the population-based Horteiga study. *Atherosclerosis* 2010;211:203-9.
180. Kolovou V, Marvaki A, Karakosta A, Vasilopoulos G, Kalogianni A, Mavrogeni S, Degiannis D, Marvaki C, Kolovou G. Association of gender, ABCA1 gene polymorphisms and lipid profile in Greek young nurses. *Lipids in Health and Disease* 2012. In press
181. Detopoulou P, Nomikos T, Fragopoulou E, Antonopoulou S, Kotroyiannis I, Vassiliadou C, Panagiotakos DB, Chrysoshoou C, Pitsavos C, Stefanadis C. Platelet activating factor (PAF) and activity of its biosynthetic and catabolic enzymes in blood and leukocytes of male patients with newly diagnosed heart failure. *Clin Biochem* 2009;42:44-9.
182. Khovidhunkit W, Memon RA, Shigenaga JK, Pang M, Schambelan M, Mulligan K, Feingold KR, Grunfeld C. Plasma platelet-activating factor acetylhydrolase activity in human immunodeficiency virus infection and the acquired immunodeficiency syndrome. *Metabolism* 1999;48:1524-31.
183. Wan DH, Fan P, Bai H, Song Q, Liu HW. Activity and distribution of plasma platelet-activating factor acetylhydrolase in polycystic ovary syndrome patients with insulin resistance. [Article in Chinese] *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi* 2010;45:30-4.
184. Iatrou C, Moustakas G, Antonopoulou S, Demopoulos CA, Ziroyiannis P. Platelet-activating factor levels and PAF acetylhydrolase activities in patients with primary glomerulonephritis. *Nephron* 1996;72:611-6.
185. Denizot Y, Liozon E, Guglielmi L, Ly K, Soria P, Loustaud V, Vidal E, Jauberteau MO. No evidence for a putative involvement of platelet-activating factor in systemic lupus erythematosus without active nephritis. *Mediators Inflamm* 2003;12:101-5.

186. Goudevenos J, Tselepis AD, Tsoukatos D, Grekas G, Kritikakos J, Sideris D. Platelet aggregability to platelet activating factor at rest and after exercise in patients with coronary artery disease. *Eur Heart J* 1995;16:1036-43.
187. Satoh K, Imaizumi T, Kawamura Y, Yoshida H, Takamatsu S, Takamatsu M. Increased activity of the platelet-activating factor acetylhydrolase in plasma low density lipoprotein from patients with essential hypertension. *Prostaglandins* 1989;37:673-82.
188. Samsamshariat S, Basati G, Movahedian A, Pourfarzam M, Sarrafzadegan N. Elevated plasma platelet-activating factor acetylhydrolase activity and its relationship to the presence of coronary artery disease. *J Res Med Sci* 2011;16:674-9.
189. Blankenberg S, Stengel D, Rupprecht HJ, Bickel C, Meyer J, Cambien F, Tiret L, Ninio E. Plasma PAF-acetylhydrolase in patients with coronary artery disease: results of a cross-sectional analysis. *J Lipid Res* 2003;44:1381-6.
190. Elisaf M, Karabina SA, Bairaktari E, Goudevenos JA, Siamopoulos KC, Tselepis AD. Increased platelet reactivity to the aggregatory effect of platelet activating factor, in vitro, in patients with heterozygous familial hypercholesterolaemia. *Platelets* 1999;10:124-31.
191. de Castro SH, Faria Neto HC, Gomes MB Platelet-activating factor acetylhydrolase (PAF-AH) activity in patients with type 1 diabetes mellitus. *Arq Bras Cardiol* 2007;88:179-84.
192. Vadas P, Gold M, Perelman B, Liss GM, Lack G, Blyth T, Simons FE, Simons KJ, Cass D, Yeung J. Platelet-activating factor, PAF acetylhydrolase, and severe anaphylaxis. *N Engl J Med* 2008;358:28-35.
193. Rufail ML, Schenkein HA, Barbour SE, Tew JG, van Antwerpen R. Altered lipoprotein subclass distribution and PAF-AH activity in subjects with generalized aggressive periodontitis. *J Lipid Res* 2005;46:2752-60.
194. Lösche W, Marshal GJ, Apatzidou DA, Krause S, Kocher T, Kinane DF. Lipoprotein-associated phospholipase A2 and plasma lipids in patients with destructive periodontal disease. *J Clin Periodontol* 2005;32:640-4.
195. Serebruany VL, Gurbel PA, Murugesan SR, Lowry DR, Sturm E, Svetlov SI. Depressed plasma platelet-activating factor acetylhydrolase in patients presenting with acute myocardial infarction. *Cardiology* 1998;90:127-30.
196. Trimoreau F, François B, Desachy A, Besse A, Vignon P, Denizot Y. Platelet-activating factor acetylhydrolase and haemophagocytosis in the sepsis syndrome. *Mediators Inflamm* 2000;9:197-200.

197. Kolovou V, Papakonstantinou V, Stamatakis G, Verouti S, Xanthopoulou M, Kolovou G, Demopoulos CA. Platelet Activating Factor levels and metabolism in Tangier Disease: a case study. *Lipids in Health and Disease* 2012 (in press).
198. Tselepis AD, Goudevenos JA, Tambaki AP, Michalis L, Stroumbis CS, Tsoukatos DC, Elisaf M, Sideris DA. Platelet aggregatory response to platelet activating factor (PAF), ex vivo, and PAF-acetylhydrolase activity in patients with unstable angina: effect of c7E3 Fab (abciximab) therapy. *Cardiovasc Res* 1999;43:183-91.
199. Demopoulos CA, Andrikopoulos NK, Stathopoulou-Sparou R. Abnormal platelet response to PAF and ADP in beta-thalassaemia. *Int J Biochem* 1988;20:599-604.
200. Harmon JT, Tandon NN, Hoeg JM, Jamieson GA. Thrombin binding and response in platelets from patients with dyslipoproteinemias: increased stimulus-response coupling in type II hyperlipoproteinemia. *Blood* 1986;68:498-505.
201. Chen H, Zheng P, Zhu H, Zhu J, Zhao L, El Mokhtari NE, Eberhard J, Lins M, Jepsen S. Platelet-activating factor levels of serum and gingival crevicular fluid in nonsmoking patients with periodontitis and/or coronary heart disease. *Clin Oral Investig* 2010;14:629-36.
202. Antonopoulou S, Tsoupras A, Baltas G, Kotsifaki H, Mantzavinos Z, Demopoulos CA. Hydroxyl-platelet-activating factor exists in blood of healthy volunteers and periodontal patients. *Mediators Inflamm* 2003;12:221-7.
203. Zheng P, Chen H, Shi S, Jepsen S, Eberhard J. Periodontal parameters and platelet-activating factor levels in serum and gingival crevicular fluid in a Chinese population. *J Clin Periodontol* 2006;33:797-802.
204. Gao F, Liu L, Li F. The levels of platelet-activating factor and nitric oxide synthase in bronchial asthma at high altitude. [Article in Chinese] *Zhonghua Jie He He Hu Xi Za Zhi* 2010;33:578-81.