

ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗΣ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑΣ

Διευθυντής: Καθηγητής Μ. Κουτσιλιέρης

**ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΟΥ ΡΟΛΟΥ ΤΗΣ ΣΥΝΔΕΔΕΜΕΝΗΣ ΜΕ ΤΙΣ ΛΙΠΟΠΡΩΤΕΪΝΕΣ
ΦΩΣΦΟΛΙΠΑΣΗΣ A2 (Lp-PLA₂) ΣΤΗΝ ΠΡΟΣΛΗΨΗ ΤΗΣ ΟΞΕΙΔΩΜΕΝΗΣ LDL
ΑΠΟ ΤΑ ΜΑΚΡΟΦΑΓΑ**

Διδακτορική Διατριβή

Κωνσταντίνος Π. Μαρκάκης

Ιατρός

Αθήνα 2013

ΕΘΝΙΚΟΝ & ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟΝ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΝ ΑΘΗΝΩΝ



ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ

ΙΠΠΟΚΡΑΤΙΚΟΣ ΟΡΚΟΣ ΚΕΙΜΕΝΟ

ΟΜΝΥΜΙ ΑΠΟΛΛΩΝΑ ΙΗΤΡΟΝ ΚΑΙ ΑΣΚΛΗΠΙΟΝ ΚΑΙ ΥΓΕΙΑΝ ΚΑΙ ΠΑΝΑΚΕΙΑΝ ΚΑΙ ΘΕΟΥΣ ΠΑΝΤΑΣ ΤΕ ΚΑΙ ΠΑΣΑΣ ΙΣΤΟΡΑΣ ΠΟΙΕΥΜΕΝΟΣ, ΕΠΙΤΕΛΕΑ ΠΟΙΗΣΕΙΝ ΚΑΤΑ ΔΥΝΑΜΙΝ ΚΑΙ ΚΡΙΣΙΝ ΕΜΗΝ ΟΡΚΟΝ ΤΟΝΔΕ ΚΑΙ ΞΥΓΓΡΑΦΗΝ ΤΗΝΔΕ ΗΓΗΣΕΣΘΑΙ ΜΕΝ ΤΟΝ ΔΙΔΑΞΑΝΤΑ ΜΕ ΤΗΝ ΤΕΧΝΗΝ ΤΑΥΤΗΝ ΙΣΑ ΓΕΝΕΤΗΣΙΝ ΕΜΟΙΣΙ, ΚΑΙ ΒΙΟΥ ΚΟΙΝΩΣΕΣΘΑΙ ΚΑΙ ΧΡΕΩΝ ΧΡΗΖΟΝΤΙ ΜΕΤΑΔΟΣΙΝ ΠΟΙΗΣΕΣΘΑΙ ΚΑΙ ΓΕΝΟΣ ΤΟ ΕΞ ΑΥΤΟΥ ΑΔΕΛΦΕΟΙΣ ΊΣΟΝ ΕΠΙΚΡΙΝΕΕΙΝ ΑΡΡΕΣΙ ΚΑΙ ΔΙΔΑΞΕΙΝ ΤΗΝ ΤΕΧΝΗΝ ΤΑΥΤΗΝ, ΗΝ ΧΡΗΖΩΣΙ ΜΑΝΘΑΝΕΙΝ, ΑΝΕΥ ΜΙΣΘΟΥ ΚΑΙ ΞΥΓΓΡΑΦΗΣ ΠΑΡΑΓΓΕΛΙΗΣ ΤΕ ΚΑΙ ΑΚΡΟΗΣΙΟΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΛΟΙΠΗΣ ΑΠΑΣΗΣ ΜΑΘΗΣΙΟΣ ΜΕΤΑΔΟΣΙΝ ΠΟΙΗΣΕΣΘΑΙ ΥΙΟΙΣΙ ΤΕ ΕΜΟΙΣΙ ΚΑΙ ΤΟΙΣΙ ΤΟΥ ΕΜΕ ΔΙΔΑΞΑΝΤΟΣ ΚΑΙ ΜΑΘΗΤΑΙΣΙ ΞΥΓΓΕΓΡΑΜΜΕΝΟΙΣ ΤΕ ΚΑΙ ΟΡΚΙΣΜΕΝΟΙΣ ΝΟΜΩ ΙΗΤΡΙΚΩ ΑΛΛΩ ΔΕ ΟΥΔΕΝΙ ΔΙΑΙΤΗΜΑΣΙ ΤΕ ΧΡΗΣΟΜΑΙ ΕΠ' ΩΦΕΛΕΙΗ ΚΑΜΝΟΝΤΩΝ ΚΑΤΑ ΔΥΝΑΜΙΝ ΚΑΙ ΚΡΙΣΙΝ ΕΜΗΝ, ΕΠΙ ΔΗΛΗΣΕΙ ΔΕ ΚΑΙ ΑΔΙΚΗΝ ΕΙΡΕΞΕΙΝ, ΟΥ ΔΩΣΩ ΔΕ ΟΥΔΕ ΦΑΡΜΑΚΟΝ ΟΥΔΕΝΙ ΑΙΤΗΘΕΙΣ ΘΑΝΑΤΙΜΟΝ, ΟΥΔΕ ΥΦΗΓΗΣΟΜΑΙ ΞΥΜΒΟΥΛΙΗΝ ΤΟΙΗΝΔΕ ΟΜΟΙΩΣ ΔΕ ΟΥΔΕ ΓΥΝΑΙΚΙ ΠΕΣΣΟΝ ΦΘΟΡΙΟΝ ΔΩΣΩ. ΑΓΝΩΣ ΔΕ ΚΑΙ ΟΣΙΩΣ ΔΙΑΤΗΡΗΣΩ ΒΙΟΝ ΤΟΝ ΕΜΟΝ ΚΑΙ ΤΕΧΝΗΝ ΤΗΝ ΕΜΗΝ. ΟΥ ΤΕΜΕΩ ΔΕ ΟΥΔΕ ΜΗΝ ΛΙΘΙΩΝΤΑΣ, ΕΚΧΩΡΗΣΩ ΔΕ ΕΡΓΑΤΗΣΙΝ ΑΝΔΡΑΣΙΝ ΠΡΗΞΙΟΣ ΤΗΣΔΕ ΕΣ ΟΙΚΙΑΣ ΔΕ ΟΚΟΣΑΣ ΑΝ ΕΣΙΩ, ΕΣΕΛΕΥΣΟΜΑΙ ΕΠ' ΩΦΕΛΕΙΗ ΚΑΜΝΟΝΤΩΝ, ΕΚΤΟΣ ΕΩΝ ΠΑΣΗΣ ΑΔΙΚΗΣ ΕΚΟΥΣΙΗΣ ΚΑΙ ΦΘΟΡΙΗΣ ΤΗΣ ΤΕ ΑΛΛΗΣ ΚΑΙ ΑΦΡΟΔΙΣΙΩΝ ΕΡΓΩΝ ΕΠΙ ΤΕ ΓΥΝΑΙΚΕΙΩΝ ΣΩΜΑΤΩΝ ΚΑΙ ΑΝΔΡΕΙΩΝ, ΕΛΕΥΘΕΡΩΝ ΤΕ ΚΑΙ ΔΟΥΛΩΝ. Α Δ' ΑΝ ΕΝ ΘΕΡΑΠΕΙΗ Η ΙΔΩ Η ΑΚΟΥΣΩ, Η ΚΑΙ ΑΝΕΥ ΘΕΡΑΠΕΙΗΣ ΚΑΤΑ ΒΙΟΝ ΑΝΘΡΩΠΩΝ, Α ΜΗ ΧΡΗ ΠΟΤΕ ΕΚΛΑΛΕΕΣΘΑΙ ΕΞΩ, ΣΙΓΗΣΟΜΑΙ ΑΡΡΗΤΑ ΗΓΕΥΜΕΝΟΣ ΕΙΝΑΙ ΤΑ ΤΟΙΑΥΤΑ. ΟΡΚΟΝ ΜΕΝ ΟΥΝ ΜΟΙ ΤΟΝΔΕ ΕΠΙΤΕΛΕΑ ΠΟΙΕΟΝΤΙ ΚΑΙ ΜΗ ΞΥΓΧΕΟΝΤΙ ΕΙΗ ΕΠΑΥΡΑΣΘΑΙ ΚΑΙ ΒΙΟΥ ΚΑΙ ΤΕΧΝΗΣ, ΔΟΞΑΖΟΜΕΝΩ ΠΑΡΑ ΠΑΣΙΝ ΑΝΘΡΩΠΟΙΣ ΕΣ ΤΟΝ ΑΙΕΙ ΧΡΟΝΟΝ ΠΑΡΑΒΑΙΝΟΝΤΙ ΔΕ ΚΑΙ ΕΠΙΟΡΚΕΟΝΤΙ, ΤΑΝΑΝΤΙΑ ΤΟΥΤΕΩΝ.

ΙΠΠΟΚΡΑΤΗΣ

ΙΠΠΟΚΡΑΤΙΚΟΣ ΟΡΚΟΣ ΜΕΤΑΦΡΑΣΗ

ΟΡΚΙΖΟΜΑΙ ΣΤΟΝ ΑΠΟΛΛΩΝΑ ΤΟΝ ΙΑΤΡΟ ΚΑΙ ΣΤΟΝ ΑΣΚΛΗΠΙΟ ΚΑΙ ΣΤΗΝ ΥΓΕΙΑ ΚΑΙ ΣΤΗΝ ΠΙΑΝΑΚΕΙΑ ΚΑΙ Σ' ΟΛΟΥΣ ΤΟΥΣ ΘΕΟΥΣ ΚΑΙ ΤΙΣ ΘΕΕΣ, ΠΟΥ ΒΑΖΩ ΜΑΡΤΥΡΕΣ, ΟΤΙ ΘΑ ΕΚΠΛΗΡΩΣΩ ΤΟΝ ΟΡΚΟ ΜΟΥ ΑΥΤΟ ΚΑΙ ΤΟ ΣΥΜΒΟΛΑΙΟ ΑΥΤΟ ΣΥΜΦΩΝΑ ΜΕ ΤΗ ΔΥΝΑΜΗ ΜΟΥ ΚΑΙ ΤΗΝ ΚΡΙΣΗ ΜΟΥ, ΟΤΙ ΘΑ ΘΕΩΡΩ ΕΚΕΙΝΟΝ ΠΟΥ ΜΟΥ ΔΙΔΑΞΕ ΤΗΝ ΤΕΧΝΗ ΑΥΤΗ, ΙΣΟΝ ΜΕ ΤΟΥΣ ΓΟΝΕΙΣ ΜΟΥ, ΚΑΙ ΘΑ ΤΟΝ ΚΑΝΩ ΚΟΙΝΩΝΟ ΤΟΥ ΒΙΟΥ ΜΟΥ, ΚΑΙ ΘΑ ΤΟΥ ΠΡΟΣΦΕΡΩ ΑΠΟ ΤΑ ΔΙΚΑ ΜΟΥ ΟΤΙ ΧΡΕΙΑΖΕΤΑΙ ΤΟΥΣ ΑΠΟΓΟΝΟΥΣ ΤΟΥ ΘΑ ΘΕΩΡΩ ΩΣ ΑΔΕΛΦΟΥΣ ΜΟΥ ΚΑΙ ΘΑ ΤΟΥΣ ΔΙΔΑΞΩ ΤΗΝ ΤΕΧΝΗ ΑΥΤΗ, ΑΝ ΕΠΙΘΥΜΟΥΝ ΝΑ ΜΑΘΟΥΝ, ΧΩΡΙΣ ΜΙΣΘΟ ΚΑΙ ΧΩΡΙΣ ΣΥΜΦΩΝΙΑ. ΟΤΙ ΘΑ ΜΕΤΑΔΩΣΩ ΤΟΥΣ ΕΠΑΓΓΕΛΜΑΤΙΚΟΥΣ ΚΑΝΟΝΕΣ, ΤΑ ΘΕΩΡΗΤΙΚΑ ΜΑΘΗΜΑΤΑ ΚΑΙ ΤΙΣ ΥΠΟΛΟΙΠΕΣ ΔΙΑΦΟΡΕΣ ΑΣΚΗΣΕΙΣ ΣΤΟΥΣ ΓΙΟΥΣ ΜΟΥ, ΣΤΟΥΣ ΓΙΟΥΣ ΤΟΥ ΔΙΔΑΣΚΑΛΟΥ ΜΟΥ, ΚΑΙ ΣΕ ΜΑΘΗΤΕΣ ΠΟΥ ΘΑ ΕΧΟΥΝ ΣΥΝΔΕΣΗ ΜΑΖΙ ΜΟΥ ΜΕ ΟΡΚΟ ΚΑΙ ΣΥΜΒΟΛΑΙΟ, ΚΑΤΑ ΤΗ ΣΥΝΗΘΕΙΑ ΤΩΝ ΙΑΤΡΩΝ, ΚΑΙ ΣΕ ΚΑΝΕΝΑ ΑΛΛΟ.

ΘΑ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΗΣΩ ΤΗ ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΗ ΔΙΑΙΤΑ ΜΟΝΟ ΓΙΑ ΩΦΕΛΕΙΑ ΤΩΝ ΑΡΡΩΣΤΩΝ, ΟΣΟ ΕΞΑΡΤΑΤΑΙ ΑΠΟ ΤΗ ΔΥΝΑΜΗ ΚΑΙ ΤΗΝ ΚΡΙΣΗ ΜΟΥ, ΚΑΙ (ΥΠΟΣΧΟΜΑΙ ΟΤΙ) ΘΑ ΤΟΥΣ ΠΡΟΦΥΛΑΞΩ ΑΠΟ ΚΑΘΕ ΒΛΑΒΗ ΚΑΙ ΑΔΙΚΙΑ.

ΔΕΝ ΘΑ ΧΟΡΗΓΗΣΩ ΘΑΝΑΤΗΦΟΡΟ ΦΑΡΜΑΚΟ ΣΕ ΚΑΝΕΝΑ, ΟΣΟ ΚΑΙ ΑΝ ΠΑΡΑΚΛΗΣΩ, ΟΥΤΕ ΘΑ ΥΠΟΔΕΙΞΩ ΤΕΤΟΙΑ ΣΥΜΒΟΥΛΗ. ΕΠΙΣΗΣ ΔΕΝ ΘΑ ΔΩΣΩ ΣΕ ΓΥΝΑΙΚΑ ΦΑΡΜΑΚΟ, ΕΚΤΡΩΤΙΚΟ. ΑΓΝΗ ΚΑΙ ΚΑΘΑΡΗ ΘΑ ΔΙΑΤΗΡΗΣΩ ΤΗ ΖΩΗ ΜΟΥ ΚΑΙ ΤΗΝ ΤΕΧΝΗ ΜΟΥ. ΔΕΝ ΘΑ ΧΕΙΡΟΥΡΓΗΣΩ ΟΠΩΣΔΗΠΟΤΕ ΑΥΤΟΥΣ ΠΟΥ ΠΑΣΧΟΥΝ ΑΠΟ ΠΕΤΡΑ, ΑΛΛΑ ΘΑ ΑΦΗΣΩ ΤΗΝ ΠΡΑΞΗ ΑΥΤΗ ΣΤΟΥΣ ΕΞΑΣΚΗΜΕΝΟΥΣ. ΣΕ ΟΣΑ ΣΠΙΤΙΑ ΠΡΟΣΚΑΛΟΥΜΑΙ, ΘΑ ΜΠΑΙΝΩ ΓΙΑ ΤΟ ΚΑΛΟ ΤΩΝ ΑΡΡΩΣΤΩΝ, ΚΡΑΤΩΝΤΑΣ ΤΟΝ ΕΑΥΤΟ ΜΟΥ ΜΑΚΡΙΑ ΑΠΟ ΚΑΘΕ ΘΕΛΗΜΑΤΙΚΗ ΑΔΙΚΙΑ, Η ΑΛΛΗ ΔΙΑΦΘΟΡΑ ΚΑΙ ΠΡΟ ΠΑΝΤΩΝ ΜΑΚΡΙΑ ΑΠΟ ΚΑΘΕ ΑΦΡΟΔΙΣΙΑΚΗ ΠΡΑΞΗ ΣΕ ΣΩΜΑΤΑ ΓΥΝΑΙΚΩΝ ΚΑΙ ΑΝΔΡΩΝ, ΕΛΕΥΘΕΡΩΝ Η ΔΟΥΛΩΝ.

ΟΣΑ ΔΕ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΔΙΑΡΚΕΙΑ ΤΗΣ ΘΕΡΑΠΕΙΑΣ ΘΑ ΔΩ Η ΘΑ ΑΚΟΥΣΩ, Η ΚΑΙ ΠΕΡΑ ΑΠΟ ΤΙΣ ΑΣΧΟΜΕΣ ΜΟΥ ΣΤΗΝ ΚΑΘΗΜΕΡΙΝΗ ΖΩΗ, ΟΣΑ ΔΕΝ ΠΡΕΠΕΙ ΠΟΤΕ ΝΑ ΚΟΙΝΟΛΟΓΟΥΝΤΑΙ ΣΤΟΥΣ ΕΞΩ, ΘΑ ΤΑ ΑΠΟΣΙΩΠΩ, ΥΠΟΛΟΓΙΖΟΝΤΑΣ ΟΤΙ ΑΥΤΑ ΕΙΝΑΙ ΙΕΡΑ ΜΥΣΤΙΚΑ. ΟΣΟ ΛΟΙΠΟΝ ΘΑ ΘΗΡΩ ΤΟΝ ΟΡΚΟ ΜΟΥ ΑΥΤΟ, ΚΑΙ ΔΕΝ ΘΑ ΤΟΝ ΠΑΡΑΒΙΑΣΩ, ΕΙΘΕ ΝΑ ΠΕΤΥΧΑΙΝΩ ΣΤΗ ΖΩΗ ΚΑΙ ΣΤΗΝ ΤΕΧΝΗ ΜΟΥ, ΕΧΟΝΤΑΣ ΚΑΛΟ ΟΝΟΜΑ ΠΑΝΤΟΤΕ ~~ΑΝΑΜΕΣΑ~~ ΣΤΟΥΣ ΑΝΘΡΩΠΟΥΣ. ΕΑΝ ΟΜΩΣ ΤΟΝ ΠΑΡΑΒΩ ΚΑΙ ΓΙΝΩ ΕΠΙΟΡΚΟΣ, ΝΑ ΠΙΑΘΩ ΤΑ ΑΝΤΙΘΕΤΑ.

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

ΠΡΟΣΩΠΙΚΑ ΔΕΔΟΜΕΝΑ

Επώνυμο: Μαρκάκης

Όνομα : Κωνσταντίνος

Ημερομηνία γεννήσεως: 27 Ιουλίου 1967

Εθνικότητα: Ελληνική

Διεύθυνση εργασίας: Αττικό Νοσοκομείο – Μονάδα Έρευνας, Ρίμινι 1, Χαϊδάρι, Αθήνα, ΤΚ 12462

Διεύθυνση οικείας: Αγαθίου 1-3, Νεάπολη, Αθήνα, ΤΚ 114 72

Τηλέφωνο εργασίας: 210 5832357, fax: 210 5831927

Τηλέφωνο οικίας: 210 6428511

Κινητό τηλέφωνο: 6944454807

e-mail: kmarkakis@med.uoa.gr

ΣΠΟΥΔΕΣ

2009: **Απόκτηση τίτλου ειδικότητας Εσωτερικής Παθολογίας**

1999: **Πτυχίο Ιατρικής**, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Ιατρική Σχολή, Αθήνα., βαθμός: Λίαν Καλώς

ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΟΙ ΟΡΓΑΝΙΣΜΟΙ

Μέλος Ιατρικού Συλλόγου Αθηνών

Μέλος Ελληνικής Εταιρείας Φυσιολογίας

Μέλος European Association for the Study of Diabetes (EASD)

ΕΠΑΓΓΕΛΜΑΤΙΚΗ ΕΜΠΕΙΡΙΑ

Παρούσα θέση

Απρίλιος 2009 - σήμερα: **Επιστημονικός συνεργάτης Β' Προπαιδευτικής Παθολογικής Κλινικής – Μονάδα Έρευνας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Αθηνών, Νοσοκομείο «Αττικόν»**. Διευθυντής: Καθηγητής Γ. Δημητριάδης

Προηγούμενες θέσεις

Ιούνιος 2011 - Ιούνιος 2012: Επικουρικός Επιμελητής Παθολογίας Τμήμα επειγόντων περιστατικών, Νοσοκομείο «Αττικών». Διευθυντής: Επίκουρος Καθηγητής Σ. Στεργιόπουλος

Απρίλιος 2010 - Απρίλιος 2011: Επικουρικός Επιμελητής Παθολογίας Β' Προπαιδευτικής Παθολογικής Κλινικής – Μονάδα Έρευνας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Αθηνών, Νοσοκομείο «Αττικών». Διευθυντής: Καθηγητής Γ. Δημητριάδης

Απρίλιος 2009 - σήμερα: Επιστημονικός συνεργάτης Β' Προπαιδευτικής Παθολογικής Κλινικής – Μονάδα Έρευνας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Αθηνών, Νοσοκομείο «Αττικών». Διευθυντής: Καθηγητής Γ. Δημητριάδης

Ιούλιος 2008 - Απρίλιος 2009: Ειδικευόμενος Εσωτερικής Παθολογίας, Β' Προπαιδευτική Παθολογική Κλινική Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Αθηνών, Νοσοκομείο «Αττικών». Διευθυντής: Καθηγητής Θ. Οικονομόπουλος.

Ιανουάριος 2008 - Ιούλιος 2008: Επιστημονικός Συνεργάτης, Τμήμα Διαβήτη, Ενδοκρινολογίας και Εσωτερικής Παθολογίας, King's College London. Διευθυντής: Καθηγητής G. Viberti

Φεβρουάριος 2005 - Ιανουάριος 2008: Ειδικευόμενος Εσωτερικής Παθολογίας, Β' Προπαιδευτική Παθολογική Κλινική Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Αθηνών, Νοσοκομείο «Αττικών». Διευθυντής: Καθηγητής Θ. Οικονομόπουλος.

Ιανουάριος 2002 - Ιανουάριος 2005: Υποψήφιος Διδάκτωρ, Εργαστήριο Πειραματικής Φυσιολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Αθηνών. Διευθυντής: Καθηγητής Μ. Κουτσιλιέρης

Ιανουάριος 2001 - Δεκέμβριος 2001: Υπηρεσία Υπαίθρου, Περιφερικό Ιατρείο Υπάτης, Κέντρο Υγείας Μακρακώμης.

Σεπτέμβριος 2000 - Δεκέμβριος 2000: Ειδικευόμενος Ιατρός, Υποχρεωτική Τρίμηνη Εκπαίδευση, Γενικό Νοσοκομείο Λαμίας.

Φεβρουάριος 2000 - Ιούλιος 2000: Ειδικευόμενος Εσωτερικής Παθολογίας, Παθολογική Κλινική, 404 Στρατιωτικό Νοσοκομείο Λάρισας.

Ιανουάριος 1999 - Ιανουάριος 2000: Ιατρός, Στρατιωτική Θητεία.

Ιανουάριος 1995 - Ιανουάριος 1999: Ερευνητικός Συνεργάτης, Εργαστήριο Πειραματικής Φυσιολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Αθηνών. Διευθυντής: Καθηγητής Ι. Σταυρίδης.

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΜΠΕΙΡΙΑ

Απρίλιος 2009-σήμερα: Επιστημονικός συνεργάτης Β' Προπαιδευτικής Παθολογικής Κλινικής – Μονάδας Έρευνας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Αθηνών, Νοσοκομείο «Αττικόν». Διευθυντής: Καθηγητής Γ. Δημητριάδης

2000-2013: Επιστημονικός συνεργάτης στο Εργαστήριο Πειραματικής Φυσιολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Αθηνών. Διευθυντής: Καθηγητής Μ. Κουτσιλιέρης

Κύριος Ερευνητής. Διερεύνηση του ρόλου της συνδεδεμένης με τις λιποπρωτεΐνες φωσφολιπάσης A₂ (Lp-PLA₂) στην πρόσληψη της οξειδωμένης LDL από τα μακροφάγα. (**Διδακτορική Διατριβή**).

Συνερευνητής. Προσδιορισμός ομάδων ΙΑ και V εκκριτικής φωσφολιπάσης A₂ σε ουλικό υγρό σε ασθενείς με περιοδοντική νόσο.

2008: Επιστημονικός Συνεργάτης, Τμήμα Διαβήτη, Ενδοκρινολογίας και Εσωτερικής Παθολογίας, King's College London. Εκπαίδευση στη μελέτη των πρόδρομων ενδοθηλιακών κυττάρων (Endothelial Progenitor Cells, EPCs). Διευθυντής: Καθηγητής G. Viberti

ΥΠΟΤΡΟΦΙΕΣ

2008: Υποτροφία από την **Ελληνική Συνεργαζόμενη Ογκολογική Ομάδα (HECOG)** για μετεκπαίδευση στο Τμήμα Διαβήτη, Ενδοκρινολογίας και Εσωτερικής Παθολογίας, King's College London στη μελέτη των πρόδρομων ενδοθηλιακών κυττάρων (Endothelial Progenitor Cells, EPCs).

ΔΙΔΑΚΤΙΚΗ ΕΜΠΕΙΡΙΑ

2007 – 2012 : Διδασκαλία στα πλαίσια της ειδικότητάς μου στη Β' Προπαιδευτική Παθολογική Κλινική Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Αθηνών, Νοσοκομείο «Αττικών», κλινικής σημειολογίας και διαφορικής διάγνωσης στους φοιτητές του 7ου και 8ου εξαμήνου και εκπαίδευση στα πλαίσια του τριμήνου Παθολογίας των εκτοετών φοιτητών της Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Αθηνών.

ΕΜΠΕΙΡΙΑ ΣΕ ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΜΕΛΕΤΕΣ

Εκπαίδευση ορθής κλινικής πρακτικής [Good Clinical Practice (GCP) training] (29/11/09)

1. D1680L00002/GENERATION: A 52-Week, Randomised, double blind, active-controlled, multicentre phase IIIb/IV study to evaluate the efficacy and tolerability of saxagliptin compared to glimepiride in elderly patients with type 2 diabetes mellitus who have inadequate glycemic control on metformin monotherapy , RESPONSIBILITY: Sub-investigator (υπό εξέλιξη)

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ

1. Raptis AE, Bacharaki D, Mazioti M, Marathias KP, **Markakis KP**, Raptis SA, Dimitriadis GD, Vlahakos DV. Anemia due to Coadministration of Renin-Angiotensin-System Inhibitors and PPAR γ Agonists in Uncomplicated Diabetic Patients. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 2012 Jul;120(7):416-9
2. Dessapt-Baradez C, Reza M, Sivakumar G, Hernandez-Fuentes M, **Markakis K**, Gnudi L, Karalliedde J. Circulating Vascular Progenitor Cells and Central Arterial Stiffness in Polycystic Ovary Syndrome. *PLoS One*. 2011;6(5):e20317
3. Raptis AE, **Markakis KP**, Mazioti MC, Raptis SA, Dimitriadis GD. What the radiologist needs to know about the diabetic patient. *Insights into Imaging*, 2011, Volume 2, Number 2, Pages 193-203
4. **Markakis KP**, Koropouli MK, Grammenou-Savvoglou S, van Winden EC, Dimitriou AA, Demopoulos CA, Tselepis AD, Kotsifaki EE. Implication of lipoprotein associated phospholipase A2 activity in oxLDL uptake by macrophages. *J Lipid Res*. 2010. 51: 2191–2201.
5. Baltas G, **Markakis KP**, Kotsifaki E. Acute phase response: Clinical significance and related biomarkers. *Analecta Periodologica* 2009; 20:19-54

ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΕΙΣ – ΟΜΙΛΙΕΣ

1. **Κ. Μαρκάκης**, Α. Ράπτης : Ο ρόλος των αναστολέων ρενίνης στην προστασία των οργάνων στόχων. Εκπαιδευτικές ημερίδες πρωτοβάθμιας φροντίδας υγείας «Γ. Παπαδάκης» 16-21 Φεβρουαρίου 2009, Πειραιάς-Στάδιο Ειρήνης και Φιλίας. Τόμος Γ' Διαγνωστική και θεραπευτική αντιμετώπιση καρδιαγγειακής νόσου σελ. 37-48
2. **Κ. Μαρκάκης**, Μ. Μαζιώτη, Α. Ράπτης : «Διαβητική μυοκαρδιοπάθεια». Νεότερα δεδομένα. 11ο Πανελλήνιο Συνέδριο Καρδιακής Ανεπάρκειας 5-7 Φεβρουαρίου 2010 σελ. 20

ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΕΙΣ ΣΕ ΔΙΕΘΝΗ ΣΥΝΕΔΡΙΑ

- 1 **KP Markakis**, MK Koropouli, S Grammenou-Savvoglou, AD Tselepis, EE Kotsifaki. The effect of lipoprotein associated phospholipase A2 on oxLDL uptake by macrophages. 9th International Congress on Coronary Artery Disease, Venice Italy, 2011 October
- 2 C Dessapt-Baradez, M Reza, G Sivakumar, **K Markakis**, L Gnudi and J Karalliedde. Circulating vascular progenitor cells and central arterial stiffness in non-obese subjects with polycystic ovary syndrome. Diabetes UK Annual Professional Conference, 30 March - 1 April 2011, London. Diabetic Medicine Volume 28, Issue Supplement s1, Article first published online.
- 3 **C.P. Markakis**, M.K. Koropouli, S. Grammenou, E. Kotsifaki. Investigation of the role of LpPLA2 activity in oxLDL uptake by macrophages. Abstracts from the 47th International Conference on the Bioscience of Lipids, Pecs Hungary. Chemistry and Physics of Lipids, 2006 Sept, 143(1-2): 66-67
- 4 M.K. Koropouli, **C.P. Markakis**, G Baltas, E. Papageorgiou, E. Kotsifaki. Identification of group IIA and V secretory phospholipase A2 in gingival crevicular fluid of periodontal patients. Abstracts from the 47th International Conference on the Bioscience of Lipids, Pecs Hungary. Chemistry and Physics of Lipids, 2006 Sept, 143(1-2): 66-67.
- 5 G. Baltas, M.K. Koropouli, **C.P. Markakis**, H. Kotsifaki. Implication of secretory phospholipase A2 (sPLA2) in periodontal disease. Europerio 5, 29.6.-1.7.2006 Madrid Spain. Journal of Clinical Periodontology, Vol33, Supplement 7, 2006
- 6 M.K. Koropouli, **C.P. Markakis**, G. Baltas, E. Kotsifaki, «Secretory phospholipase A2 (sPLA2) activity in periodontitis» Abstracts from the 46th International Conference on the Bioscience of Lipids, Ajaccio France. Chemistry and Physics of Lipids, 2005 Sept, 136(2): 150

ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΕΙΣ ΣΕ ΕΛΛΗΝΙΚΑ ΣΥΝΕΔΡΙΑ

1. **Κ. Μαρκάκης**, Μ. Μαζιώτη, Ε. Μαράτου, Α. Τσιρογιάννη, Β. Λαμπαδιάρη, Γ. Δημητριάδης, Σ. Ράπτης, Α. Ράπτης, «Επίδραση του αναστολέα ρενίνης αλισκιρένη στον αριθμό των πρόδρομων ενδοθηλιακών κυττάρων στο περιφερικό αίμα σε ασθενείς με σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2 και αρτηριακή υπέρταση», Αθήνα, 18ο Πανελλήνιο Συνέδριο Εσωτερικής Παθολογίας 18-20 Οκτωβρίου 2012, σελ 86 βιβλίου περιλήψεων
2. Μ.Κ. Κοροπούλη, **Κ.Π. Μαρκάκης**, Γ. Μπαλτάς, Σ. Γραμμένου-Σαββόγλου, Ε. Κοτσιφάκη, «Εκκριτικές φωσφολιπάσες A2 (sPLA2) και περιοδοντίτιδα», ΕΕΑ, 3ο Συμπόσιο των Ομάδων εργασίας, 4&5 Δεκεμβρίου 2009
3. Ε. Κοτσιφάκη, Μ.Κ. Κοροπούλη, **Κ.Π. Μαρκάκης**, Κ.Α. Δημόπουλος, Σ. Αντωνοπούλου, Σ. Γραμμένου - Σαββόγλου, Γ. Μπαλτάς, «Ακετυλοϋδρολάση του παράγοντα ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων (PAF-AH) και περιοδοντίτιδα», ΕΕΑ, 3ο Συμπόσιο των Ομάδων εργασίας, 4&5 Δεκεμβρίου 2009
4. Μ.Κ. Κοροπούλη, **Κ.Π. Μαρκάκης**, Γ. Μπαλτάς, Ε. Παπαγεωργίου, Ε. Κοτσιφάκη, «Ανίχνευση των αθηρογόνων ισομορφών των εκκριτικών φωσφολιπασών A2 (sPLA2) στο ουλικό υγρό ασθενών με περιοδοντίτιδα», Ελληνική Εταιρία Αθηροσκλήρωσης, Συμπόσιο των Ομάδων Εργασίας, Αθήνα, 30 Νοεμβρίου- 1 Δεκεμβρίου 2007
5. **Κ.Π. Μαρκάκης**, Μ.Κ. Κοροπούλη, Α. Δημητρίου, Σ. Γραμμένου-Σαββόγλου, Α. Τσελέπη, Ε. Κοτσιφάκη, «Διερεύνηση του ρόλου της PAF-AH στη σύνδεση της ApoB και του λιπιδικού τμήματος των oxLDL με τους αντίστοιχους υποδοχείς των μακροφάγων», Ελληνική Εταιρία Αθηροσκλήρωσης, Συμπόσιο των Ομάδων Εργασίας, Αθήνα, 30 Νοεμβρίου- 1 Δεκεμβρίου 2007
6. Μ.Κ. Κοροπούλη, Γ. Μπαλτάς, **Κ.Π. Μαρκάκης**, Ε. Κοτσιφάκη, «Ταυτοποίηση του μορίου με δραστικότητα ακετυλοϋδρολάσης του παράγοντα ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων (PAF-AH) σε ουλικό υγρό ασθενών με περιοδοντίτιδα», Ελληνική Εταιρία Αθηροσκλήρωσης,

Συμπόσιο των Ομάδων Εργασίας, Αθήνα, 30 Νοεμβρίου- 1 Δεκεμβρίου 2007

7. Μ.Κ. Κοροπούλη, **Κ.Π. Μαρκάκης**, Γ. Μπαλτάς, Ε. Παπαγεωργίου, Ε. Κοτσιφάκη, «Ανίχνευση των αθηρογόνων ισομορφών των εκκριτικών φωσφολιπασών A2 (sPLA2) στο ουλικό υγρό ασθενών με περιοδοντίτιδα», Ελληνική Εταιρία Αθηροσκλήρωσης, Συμπόσιο των Ομάδων Εργασίας, Αθήνα, 30 Νοεμβρίου- 1 Δεκεμβρίου 2007
8. Μ.Κ. Κοροπούλη, **Κ.Π. Μαρκάκης**, Γ. Μπαλτάς, Ε. Παπαγεωργίου, Ε. Κοτσιφάκη, «Ανίχνευση δραστικότητας εκκριτικών φωσφολιπασών A2 (sPLA2), μορίων με προφλεγμονώδη δράση στο ουλικό υγρό ασθενών με περιοδοντίτιδα», 4ο Ετήσιο Επιστημονικό Συνέδριο Ιατρικής Σχολής, Αθήνα, 1-2 Ιουνίου 2007
9. Μ.Κ. Κοροπούλη, **Κ.Π. Μαρκάκης**, Γ. Μπαλτάς, Ε. Παπαγεωργίου, Ε. Κοτσιφάκη, «Δραστικότητα εκκριτικής φωσφολιπάσης A2 (sPLA2) στο ουλικό υγρό ασθενών με περιοδοντίτιδα», 13ο Επιστημονικό Συνέδριο Φοιτητών Ιατρικής Ελλάδος, 1ο Διεθνές Forum Φοιτητών Ιατρικής & Νέων Ιατρών Ελλάδος, Αθήνα, 20-22 Απριλίου 2007 (Γ΄ Βραβείο Ελεύθερης Ανακοίνωσης Βασικής Έρευνας)
10. **Κ.Π. Μαρκάκης**, Μ.Κ. Κοροπούλη, Σ. Γραμμένου, Ε. Κοτσιφάκη, «Η τροποποίηση του λιπιδικού τμήματος των oxLDL από την LpPLA2 επηρεάζει τη σύνδεση του με τους αντίστοιχους εκκαθαριστές υποδοχείς των μακροφάγων», 2ο Πανελλήνιο Συνέδριο Αθηροσκλήρωσης, Αθήνα, 29 Νοεμβρίου-2 Δεκεμβρίου 2006
11. Μ.Κ. Κοροπούλη, **Κ.Π. Μαρκάκης**, Γ. Μπαλτάς, Ε. Παπαγεωργίου, Ε. Κοτσιφάκη, «Δραστικότητα εκκριτικής φωσφολιπάσης A2 (sPLA2) σε ουλικό υγρό ασθενών με περιοδοντίτιδα», 2ο Πανελλήνιο Συνέδριο Αθηροσκλήρωσης, Αθήνα, 29 Νοεμβρίου-2 Δεκεμβρίου 2006
12. Μ.Κ. Κοροπούλη, **Κ.Π. Μαρκάκης**, Γ. Μπαλτάς, Ε. Κοτσιφάκη, «Εκκριτική φωσφολιπάση A2: Ένα προφλεγμονώδες μόριο στο ουλικό υγρό ασθενών με περιοδοντίτιδα» 1ο Πανελλήνιο Συνέδριο των Βασικών Ιατρικών Επιστημών, Ε.Β.Ι.Ε.Ε., “Από την Εργαστηριακή Εξέταση στην Κλινική Εφαρμογή και Πράξη”, Αθήνα, 7-10 Δεκεμβρίου 2005
13. Μ.Κ. Κοροπούλη, **Κ.Π. Μαρκάκης**, Γ. Μπαλτάς, Ε. Κοτσιφάκη, «Διερεύνηση της δραστικότητας εκκριτικής φωσφολιπάσης A2 σε ουλικό

υγρό ασθενών με περιοδοντίτιδα», 2ο Ετήσιο Επιστημονικό Συνέδριο
Ιατρικής Σχολής, Αθήνα, 20-22 Μαΐου 2005

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή

Καθηγητής Κ. Δημόπουλος

Εργαστήριο Βιοχημείας, Τμήμα Χημείας Πανεπιστημίου Αθηνών

Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Ε. Κοτσιφάκη (επιβλέπουσα)

Εργαστήριο Πειραματικής Φυσιολογίας, Ιατρική Σχολή Πανεπιστημίου Αθηνών

Επίκουρη Καθηγήτρια Σ. Γραμμένου – Σαββόγλου

Τμήμα Παθολογικής Φυσιολογίας, Ιατρική Σχολή Πανεπιστημίου Αθηνών

Επταμελής Εξεταστική Επιτροπή

Καθηγητής Μ. Κουτσιλιέρης

Εργαστήριο Πειραματικής Φυσιολογίας, Ιατρική Σχολή Πανεπιστημίου Αθηνών

Καθηγητής Α. Τζιούφας

Τμήμα Παθολογικής Φυσιολογίας, Ιατρική Σχολή Πανεπιστημίου Αθηνών

Καθηγητής Κ. Δημόπουλος

Εργαστήριο Βιοχημείας, Τμήμα Χημείας Πανεπιστημίου Αθηνών

Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Ε. Κοτσιφάκη

Εργαστήριο Πειραματικής Φυσιολογίας, Ιατρική Σχολή Πανεπιστημίου Αθηνών

Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Π. Αγγελογιάννη

Εργαστήριο Πειραματικής Φυσιολογίας, Ιατρική Σχολή Πανεπιστημίου Αθηνών

Επίκουρη Καθηγήτρια Σ. Γραμμένου – Σαββόγλου

Τμήμα Παθολογικής Φυσιολογίας, Ιατρική Σχολή Πανεπιστημίου Αθηνών

Επίκουρη Καθηγήτρια Κ. Μαυραγάνη

Εργαστήριο Πειραματικής Φυσιολογίας, Ιατρική Σχολή Πανεπιστημίου Αθηνών

Ημερομηνία εξέτασης: 26/2/2013

Βαθμός κρίσης: «άριστα»

Δημοσιεύσεις που προέρχονται από την παρούσα διατριβή:

Markakis KP, Koropouli MK, Grammenou-Savvoglou S, van Winden EC, Dimitriou AA, Demopoulos CA, Tselepis AD, Kotsifaki EE. Implication of lipoprotein associated phospholipase A2 activity in oxLDL uptake by macrophages. J Lipid Res. 2010. 51: 2191–2201.

Ανακοινώσεις που προέρχονται από την παρούσα διατριβή:

KP Markakis, MK Koropouli, S Grammenou-Savvoglou, AD Tselepis, EE Kotsifaki. The effect of lipoprotein associated phospholipase A2 on oxLDL uptake by macrophages. 9th International Congress on Coronary Artery Disease, Venice Italy, 2011 October

Κ.Π. Μαρκάκης, Μ.Κ. Κοροπούλη, Α. Δημητρίου, Σ. Γραμμένου- Σαββόγλου, Α. Τσελέπης, Ε. Κοτσιφάκη, «Διερεύνηση του ρόλου της PAF-AH στη σύνδεση της ApoB και του λιπιδικού τμήματος των oxLDL με τους αντίστοιχους υποδοχείς των μακροφάγων», Ελληνική Εταιρία Αθηροσκλήρωσης, Συμπόσιο των Ομάδων Εργασίας, Αθήνα, 30 Νοεμβρίου- 1 Δεκεμβρίου 2007

Κ.Π. Μαρκάκης, Μ.Κ. Κοροπούλη, Σ. Γραμμένου, Ε. Κοτσιφάκη, «Η τροποποίηση του λιπιδικού τμήματος των oxLDL από την LpPLA2 επηρεάζει τη σύνδεση του με τους αντίστοιχους εκκαθαριστές υποδοχείς των μακροφάγων», 2ο Πανελλήνιο Συνέδριο Αθηροσκλήρωσης, Αθήνα, 29 Νοεμβρίου-2 Δεκεμβρίου 2006

C.P. Markakis, M.K. Koropouli, S. Grammenou, E. Kotsifaki. Investigation of the role of LpPLA2 activity in oxLDL uptake by macrophages. Abstracts from the 47th International Conference on the Bioscience of Lipids, Pecs Hungary. Chemistry and Physics of Lipids, 2006 Sept, 143(1-2): 66-67

στην Άννα

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Πειραματικής Φυσιολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Αθηνών. Οφείλω να ευχαριστήσω θερμά το Διευθυντή του Εργαστηρίου Πειραματικής Φυσιολογίας Καθηγητή κ. Μιχάλη Κουτσιλιέρη για τη δυνατότητα που μου παρείχε να εκπονήσω τη διατριβή μου στο χώρο του Εργαστηρίου. Θα ήθελα να ευχαριστήσω τα μέλη της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής της διδακτορικής διατριβής μου για τις συμβουλές και την πολύτιμη επιστημονική καθοδήγηση αλλά και την αμέριστη συμπαράσταση που μου παρείχαν κατά τη διεξαγωγή της. Πρωτίστως, οφείλω να ευχαριστήσω από καρδιάς την επιβλέπουσα Αναπληρώτρια Καθηγήτρια κ. Ελένη Κοτσιφάκη για τη συνεχή καθοδήγηση αλλά και την ελευθερία για προσωπική πρωτοβουλία που μου παρείχε, η ισορροπία μεταξύ των οποίων υπήρξε ένα από τα πολυτιμότερα διδάγματα κατά τη διάρκεια της επιστημονικής μου πορείας. Ευχαριστώ θερμά τον Καθηγητή κ. Κωνσταντίνο Δημόπουλο, ιδιαίτερα για τη βοήθειά του και τις συμβουλές του σε θέματα βιοχημείας, και την Επίκουρη Καθηγήτρια κ. Σταυρούλα Γραμμένου – Σαββόγλου, ιδιαίτερα για τη συμβολή της στην ανάπτυξη της κυτταροκαλλιέργειας.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τον Καθηγητή Βιοχημείας – Κλινικής Χημείας κ. Αλέξανδρο Τσελέπη και τη μεταπτυχιακή φοιτήτρια κ. Ανδρομάχη Δημητρίου του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, για την συμβολή τους στα πειράματα που περιελάμβαναν κυτταρομετρία ροής και τα οποία διεξήχθησαν στο Τμήμα Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.

Η παρασκευή των λιποσωμάτων και των πρωτεϊνολιποσωμάτων έγινε στις εγκαταστάσεις της εταιρείας βιοτεχνολογίας Regulon AE, με την πολύτιμη βοήθεια του εξειδικευμένου στην παρασκευή λιποσωμάτων βιοχημικού Ewoud C. van Winden.

Ευχαριστώ επίσης τη μεταπτυχιακή φοιτήτρια και φίλη Μαρίτα Κοροπούλη με την οποία είχα τη χαρά να συνεργαστώ στο Εργαστήριο Πειραματικής Φυσιολογίας, για τη βοήθειά της ιδιαίτερα όσον αφορά στις τεχνικές ηλεκτροφόρησης και ανοσοαποτύπωσης κατά Western.

Τέλος, οφείλω να ευχαριστήσω την οικογένειά μου, η ψυχική υποστήριξη της οποίας σε όλη τη διάρκεια της επιστημονικής σταδιοδρομίας μου υπήρξε ανεκτίμητη.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ	i
ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ	ix
I. ΣΚΟΠΟΣ	1
II. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	5
II.1. ΑΘΗΡΟΣΚΛΗΡΥΝΣΗ	7
II.1.1. Δομή των φυσιολογικών αρτηριών	7
II.1.2. Ιστολογική κατηγοριοποίηση των αθηροσκληρυντικών βλαβών	8
II.1.3. Παθογένεση της αθηρωμάτωσης	10
II.1.3.1. Παράγοντες κινδύνου	10
II.1.3.2. Αρχικά στάδια της αθηρογένεσης	12
A) Είσοδος και παραμονή LDL στον έσω χιτώνα	12
B) Οξειδωτικό stress - ενδοθηλιακή δυσλειτουργία	12
B1) Οξειδωτικό stress	12
B2) Ενδοθηλιακή δυσλειτουργία	14
Γ) Στρατολόγηση λευκοκυττάρων	16
Γ1) Προσκόλληση των λευκοκυττάρων	16
Γ1.α) Μόρια προσκόλλησης της οικογένειας των ανοσοσφαιρινών	16
Γ1.β) Σελεκτίνες	17
Γ1.γ) Ιντεγκρίνες	18
Γ2) Μετανάστευση λευκοκυττάρων	18
Δ) Πρόσληψη και ενδοκυττάρια συσσώρευση λιπιδίων	
- σχηματισμός αφρωδών κυττάρων	19
Δ1) Πρόσληψη μέσω εκκαθαριστών υποδοχέων – φαγοκύτωση	19
Δ2) Μεταβολισμός λιποπρωτεϊνών – εκροή χοληστερόλης	21
E) Εντοπισμός των βλαβών	24
II.1.3.3. Εξέλιξη της αθηρωμάτωσης	
A) Μηχανισμοί φλεγμονής - φυσική και επίκτητη ανοσία	25
A1) Φλεγμονή – φυσική ανοσία – μονοκύτταρα/μακροφάγα	25
A1.α) Εκκαθαριστές υποδοχείς (scavenger receptors , SRs)	26
A1.α.1) Τάξη A: SRAI/II και MARCO	27
A1.α.2) Τάξη B: CD36 και SRB1	31

A1.α.3) Τάξη E: LOX1	34
A1.α.4) Τάξη F: SREC-I και II	36
A1.α.5) Τάξη G: SR-PSOX/CXCL16	36
A1.β) Υποδοχείς τύπου Toll (Toll-like receptors, TLRs).....	36
A1.γ) Αλληλεπίδραση εκκαθαριστών υποδοχέων και TLRs	40
A1.δ) Ενδοκυττάρια συσσώρευση λιπιδίων – φλεγμονή	41
A1.ε) Διαφοροποίηση μακροφάγων – υποπληθυσμοί μακροφάγων	43
A1.στ) Δενδριτικά κύτταρα	44
A2) Επίκτητη ανοσία	44
A2.α) Βοηθητικά T λεμφοκύτταρα της υποομάδας 1	45
A2.β) Βοηθητικά T λεμφοκύτταρα της υποομάδας 2	46
A2.γ) Κυτταροτοξικά T λεμφοκύτταρα	46
A2.δ) Ρυθμιστικά T λεμφοκύτταρα	47
A2.ε) Χυμική ανοσία	47
B) Μετανάστευση και πολλαπλασιασμός λείων μυϊκών κυττάρων	47
Γ) Παραγωγή και διάσπαση εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας	48
Δ) Τα μακροφάγα στην προχωρημένη βλάβη	49
Δ1) Απόπτωση των μακροφάγων	50
Δ2) Μείωση της ικανότητας φαγοκυττάρωσης των αποπτωτικών κυττάρων ..	50
E) Λιπώδης-νεκρωτικός πυρήνας – Ινώδης κάψα	51
ΣΤ) Αγγειογένεση	52
Ζ) Αποτιτάνωση	52
Π.1.3.4. Επιπλοκές της αθηρωμάτωσης	53
A) Στένωση του αυλού – ανεπαρκής ανάπτυξη παράπλευρης κυκλοφορίας	53
B) Θρόμβωση – διάβρωση, ρήξη της αθηρωματικής πλάκας	54
Π.2. ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΣΤΙΣ ΛΙΠΟΠΡΩΤΕΪΝΕΣ	57
Π.2.1. Δομή και ιδιότητες λιποπρωτεϊνών.....	57
Π.2.2. Μεταβολισμός λιποπρωτεϊνών	59
Π.2.2.1. Μεταφορά λιπιδίων της τροφής (εξωγενής οδός)	59
Π.2.2.2. Μεταφορά λιπιδίων που παράγονται από το ήπαρ (ενδογενής οδός)	60
Π.2.2.3. Κυτταρική σύνθεση χοληστερόλης – ομοιοστατικοί μηχανισμοί	61
Π.2.2.4. Μεταβολισμός των λιποπρωτεϊνών και οδός της αντίστροφης μεταφοράς χοληστερόλης	62

Π.2.3. Φυσική και οξειδωμένη LDL	62
Π.2.3.1. Φυσική LDL	62
Π.2.3.2. Οξειδωμένη LDL	64
Π.2.4. Σύνδεση της oxLDL στους υποδοχείς των μακροφάγων	66
Π.2.4.1. Σύνδεση μέσω της πρωτεϊνικής ομάδας της oxLDL	66
Π.2.4.2. Σύνδεση μέσω της λιπιδικής ομάδας της oxLDL	69
Π.3. ΑΚΕΤΥΛΟΎΔΡΟΛΑΣΗ ΤΟΥ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗΣ	
ΑΙΜΟΠΕΤΑΛΙΩΝ Ή ΣΥΝΔΕΔΕΜΕΝΗ ΜΕ ΛΙΠΟΠΡΩΤΕΪΝΕΣ	
ΦΩΣΦΟΛΙΠΑΣΗ A2	74
Π.3.1. Φωσφολιπάσες A2	74
Π.3.2. Ακετυλοϋδρολάσες του PAF	75
Π.3.3. PAF-AH του πλάσματος ή Lp-PLA ₂	76
Π.3.3.1. Υποστρώματα της Lp-PLA ₂	77
Π.3.3.2. Κυτταρική προέλευση της Lp-PLA ₂	79
Π.3.3.3. Ρύθμιση της έκφρασης της Lp-PLA ₂	80
Π.3.4. Lp-PLA ₂ και αθηροσκλήρυνση	81
Π.3.4.1. Έκφραση της Lp-PLA ₂ στην αθηρωματική πλάκα	81
Π.3.4.2. Μηχανισμοί μέσω των οποίων η συνδεδεμένη στην LDL Lp-PLA ₂	
εμπλέκεται στην ανάπτυξη της αθηροσκλήρυνσης	81
A) Ρόλος της οξειδωμένης φωσφατιδυλογολίνης και των προϊόντων	
υδρόλυσής της στην αθηροσκλήρυνση	83
A1) Οξειδωμένη φωσφατιδυλογολίνη και αθηροσκλήρυνση	84
A1.α) Επίδραση της oxPC στα ενδοθηλιακά κύτταρα	85
A1.β) Επίδραση της oxPC στα μονοκύτταρα/μακροφάγα	87
A1.γ) Επίδραση της oxPC στα λεία μυϊκά κύτταρα	90
A1.δ) Επίδραση της oxPC στα αιμοπετάλια και πρόκληση υπερπηκτικότητας ..	90
A1.ε) Επίδραση της oxPC στη φυσική και επίκτητη ανοσία	91
A1.ε.1) Φυσική ανοσία	91
A1.ε.2) Επίκτητη ανοσία	92
A2) Λυσοφωσφατιδυλογολίνη και αθηροσκλήρυνση	92
A2.α) Επίδραση της lysoPC στα ενδοθηλιακά κύτταρα	94
A2.β) Επίδραση της lysoPC στα μονοκύτταρα/μακροφάγα	96
A2.γ) Επίδραση της lysoPC στα λεία μυϊκά κύτταρα	98

A2.δ) Υποδοχείς της lysoPC – πρόσληψη της lysoPC	99
A2.ε) Επίδραση της lysoPC στην ανοσία	100
A3) Οξειδωμένα μη εστεροποιημένα λιπαρά οξέα και αθηροσκλήρυνση ...	100
A4) Επίδραση της δραστηριότητας της Lp-PLA ₂ στην πρόσληψη oxLDL ..	101
B) Ρόλος του PAF, αναλόγων του PAF και του υποδοχέα του PAF στην αθηροσκλήρυνση	103
II.3.4.3. ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΜΕΛΕΤΕΣ ΣΥΣΧΕΤΙΣΗΣ ΤΗΣ Lp-PLA₂ ΜΕ ΤΗΝ ΚΑΡΔΙΑΓΓΕΙΑΚΗ ΝΟΣΟ	105
A) Η Lp-PLA ₂ ως προγνωστικός δείκτης καρδιαγγειακής νόσου	105
B) Γενετικές μελέτες: ανεπάρκεια και πολυμορφισμοί της Lp-PLA ₂ και καρδιαγγειακή νόσος	107
B1) Ανεπάρκεια της Lp-PLA ₂	107
B2) Πολυμορφισμοί της Lp-PLA ₂	108
II.3.4.4. ΜΕΛΕΤΕΣ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΗΣ ΤΗΣ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΗΣ Lp-PLA₂ IN VIVO	108
A) Μελέτες υπερέκφρασης της Lp-PLA ₂ in vivo	109
B) Μελέτες αναστολής της Lp-PLA ₂ in vivo	110
III. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	113
III.1 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	115
III.1.1. Απομόνωση λιποπρωτεΐνης LDL από ανθρώπινο πλάσμα με διαδοχικές υπερφυγοκεντρήσεις	115
III.1.2. Ποσοτικός προσδιορισμός πρωτεϊνών	118
III.1.3. Οξείδωση της LDL	120
III.1.4. Οξείδωση φωσφολιπιδίων	122
III.1.5. Εκτίμηση της λιπιδικής υπεροξείδωσης με προσδιορισμό του MDA	124
III.1.6. Σήμανση LDL και oxLDL με FITC	127
III.1.7. Διαχωρισμός των λιπιδίων της φυσικής LDL και των οξειδωμένων LDL με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας	128
III.1.8. Προσδιορισμός φωσφόρου στα φωσφολιπίδια	130
III.1.9. Εκχύλιση λιποειδών κατά Bligh-Dyer	131
III.1.10. Όξινη εκχύλιση λιποειδών	132
III.1.11. Εκχύλιση λιποειδών κατά Folch, Lees, Stanley	133

III.1.12. Μέτρηση ραδιενέργειας με μετρητή σπινθηρισμού υγρών	134
III.1.13. Προσδιορισμός της δραστικότητας της Lp-PLA ₂	135
III.1.14. Αναστολή της δραστικότητας της Lp-PLA ₂	138
III.1.15. Μερικός καθαρισμός της Lp-PLA ₂ από LDL	139
III.1.16. Ανοσοαποτύπωση κατά Western (Western Blot)	146
III.1.17. Σχηματισμός λιποσωμάτων από τα λιπίδια φυσικής ή οξειδωμένης LDL	150
III.1.18. Σχηματισμός λιποσωμάτων από φυσικά ή οξειδωμένα φωσφολιπίδια ...	152
III.1.19. Σχηματισμός πρωτεϊνολιποσωμάτων με ApoB οξειδωμένης LDL	156
III.1.20. Υπερφυγοκέντρωση πρωτεϊνολιποσωμάτων	160
III.1.21. Μελέτες σύνδεσης της oxPAPC και των προϊόντων υδρόλυσής της στην ApoB	162
III.1.22. Καλλιέργεια περιτοναϊκών μακροφάγων ποντικού	165
III.1.23. Πιστοποίηση της παρουσίας των μακροφάγων στην καλλιέργεια των κυττάρων	168
III.1.24. Μελέτες σύνδεσης και πρόσληψης φυσικών ή οξειδωμένων LDL από καλλιέργεια μακροφάγων	170
III.1.25. Μελέτες σύνδεσης και πρόσληψης λιποσωμάτων και πρωτεϊνολιποσωμάτων από καλλιέργεια μακροφάγων	172
III.1.26. Στατιστική ανάλυση	175
III.2. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	177
III.2.1. Επίδραση της οξείδωσης στη δραστικότητα της Lp-PLA ₂	177
III.2.2. Υδρόλυση φωσφατιδυλοχολίνης και λιπιδική υπεροξείδωση κατά τη διάρκεια της οξείδωσης	178
III.2.3. Προκαταρκτικά πειράματα καλλιέργειας περιτοναϊκών μακροφάγων ποντικού	180
III.2.4. Μελέτη σύνδεσης – πρόσληψης φυσικών ή οξειδωμένων LDL σε καλλιέργεια μακροφάγων	181
III.2.5. Διερεύνηση της ενδεχόμενης άμεσης επίδρασης του refabloc στη σύνδεση - πρόσληψη των οξειδωμένων LDL σε καλλιέργεια μακροφάγων	185

III.2.6. Προκαταρκτικά πειράματα παρασκευής πρωτεϊνολιποσωμάτων που περιέχουν oxApoB από MoxLDL ή HoxLDL	188
III.2.7. Μελέτη σύνδεσης – πρόσληψης πρωτεϊνολιποσωμάτων που περιέχουν oxApoB από MoxLDL ή HoxLDL σε καλλιέργεια μακροφάγων	191
III.2.8. Μελέτη του ρόλου της Lp-PLA₂ στη σύνδεση – πρόσληψη της oxApoB από MoxLDL ή HoxLDL σε καλλιέργεια μακροφάγων. Διερεύνηση της πιθανής επίδρασης του refabloc στη σύνδεση – πρόσληψη της oxApoB	195
III.2.9. Μελέτη σύνδεσης της oxPAPC και των μικρού μοριακού βάρους της υδρόλυσής της στην ApoB	198
III.2.10. Μελέτη σύνδεσης – πρόσληψης λιποσωμάτων από λιπίδια φυσικών ή οξειδωμένων LDL σε καλλιέργεια μακροφάγων	206
III.2.11. Μελέτη σύνδεσης – πρόσληψης λιποσωμάτων που περιέχουν κεκορεσμένα (DPPC) ή ακόρεστα (PAPC, PLPC, DOPC) φωσφολιπίδια ή τα οξειδωμένα και τα λυσο παράγωγά τους σε καλλιέργεια μακροφάγων	209
III.2.12. Μελέτη σύνδεσης – πρόσληψης oxPAPC, oxPLPC και lysoPAPC λιποσωμάτων παρουσία ανταγωνιστών	217
III.2.13. Μελέτη σύνδεσης – πρόσληψης MoxLDL(+) παρουσία ανταγωνιστών	221
III.2.14. Μελέτη σύνδεσης – πρόσληψης λιποσωμάτων από λιπίδια MoxLDL(+) παρουσία ανταγωνιστών	225
III.2.15. Μελέτη σύνδεσης – πρόσληψης λιποσωμάτων από λιπίδια MoxLDL(-) παρουσία oxPAPC - λιποσωμάτων ως ανταγωνιστών	229
 III.3. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	233
 III.3.1. Επίδραση της οξείδωσης της LDL στη δραστικότητα της Lp-PLA₂	235
III.3.2. Υδρόλυση της φωσφατιδυλιγολίνης και λιπιδική υπεροξείδωση κατά την οξείδωση της LDL	236
III.3.3. Επίδραση της Lp-PLA₂ στη σύνδεση και στην πρόσληψη της MoxLDL και της HoxLDL στα μακροφάγα	236
III.3.4. Επίδραση της Lp-PLA₂ στη σύνδεση και στην πρόσληψη στα μακροφάγα της MoxLDL και της HoxLDL μέσω της oxApoB	238

III.3.5. Σύνδεση της oxPAPC και των μικρού μοριακού βάρους προϊόντων της υδρόλυσής της στην ApoB	240
III.3.6. Επίδραση της Lp-PLA₂ στη σύνδεση και στην πρόσληψη στα μακροφάγα της MoxLDL και της HoxLDL μέσω της λιπιδικής τους ομάδας	242
III.3.7. Ρόλος της οξειδωμένης φωσφατιδυλογολίνης και της λυσοφωσφατιδυλιχολίνης στη σύνδεση και στην πρόσληψη της oxLDL στα μακροφάγα	243
III.3.8. Συνολική θεώρηση της σημασίας των αποτελεσμάτων	248
IV. ΠΕΡΙΛΗΨΗ	253
V. SUMMARY	259
VI. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	265

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ

AEE	αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο
AY	αρτηριακή υπέρταση
ΣΔ	σακχαρώδης διαβήτης
ABC	ATP-binding cassette transporter
ACAT	acyl-CoA:cholesterol ester transferase, ακυλ-CoA:εστέρας χοληστερόλης τρανσφεράση
acLDL	acetyl-LDL, ακετυλιωμένη LDL
ADMA	assymetric dimethylarginine, ασύμμετρη διμεθυλοαργινίνη
AEBSF	4-(2-aminoethyl) benzenesulfonyl fluoride, 4-(2-αμινοαιθυλο) βενζοσουλφόνυλο φθορίδιο
AT	angiotensin, αγγειοτασίνη
AT1R	angiotensin II receptor 1, υποδοχέας 1 της αγγειοτασίνης II
AGEs	advanced glycation end products, προϊόντα προχωρημένης γλυκοζυλίωσης
AP-1	activator protein 1
Apo	apolipoprotein, απολιποπρωτεΐνη
ASK1	apoptosis signal-regulating kinase 1
BAEC	bovine aortic endothelial cells, ενδοθηλιακά κύτταρα από αορτή βοδιού
bFGF	basic fibroblast growth factor, βασικός αυξητικός παράγοντας των ινοβλαστών
BH4	tetrahydrobiopterin, τετραϋδροπτερίνη
CCL	chemokine (C-C motif) ligand
CCR	C-C motif receptor
CD40L	CD40 ligand, συνδέτης του CD40
CEP	2 (w-carboxyethyl)pyrrole
CETP	cholesterol ester transfer protein, πρωτεΐνη-μεταφορέας εστέρων χοληστερόλης
CHOL	cholesterol, χοληστερόλη
COX	cyclooxygenase, κυκλοοξυγενάση
CREB	camp responsive element-binding protein
CRP	C reactive protein, C αντιδρώσα πρωτεΐνη
CXCL	chemokine (C-X-C motif) ligand
CXCR	C-X-C motif receptor
DFP	diisopropyl fluorophosphates, δι-ισοπροπυλο-φθορο-φωσφορικό οξύ
DOPC	1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine, 1,2-διελαϊκόυλ-sn-3-φωσφοχολίνη
DPPC	1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine, 1,2-διπαλμιτόυλ-sn-3- φωσφοχολίνη
EGF	epidermal growth factor, επιδερμικός αυξητικός παράγοντας
eNOS	endothelial nitric oxide synthase, ενδοθηλιακή συνθετάση του μονοξειδίου του αζώτου
ELK-1	E twenty-six (ETS)-like transcription factor 1
EPCs	endothelial progenitor cells, πρόδρομα ενδοθηλιακά κύτταρα
ERK	extracellular-signal-regulated kinase
FasL	fas ligand
FMD	flow mediated dilatation, μεσολαβούμενη από τη ροή του αίματος διαστολή
G-CSF	granulocyte colony-stimulating factor, παράγοντας διέγερσης αποικιών κοκκιοκυττάρων
GM-CSF	granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, παράγοντας διέγερσης αποικιών κοκκιοκυττάρων και μακροφάγων

HAEC	human aortic endothelial cells, ανθρώπινα αορτικά ενδοθηλιακά κύτταρα
HBEGF	heparin binding epidermal growth factor, συνδεόμενος με ηπαρίνη επιδερμικός αυξητικός παράγοντας
HBEGFR	heparin binding epidermal growth factor receptor, υποδοχέας του συνδεόμενου με ηπαρίνη επιδερμικού αυξητικού παράγοντα
HDdiA-PC	9-hydroxy-10-dodecenedioic acid ester of 2-lyso-PC, 1-ακυλο-2- (9-υδροξυ-12-καρβοξυ-10-δωδεκεδιενοϊκόϋλο)- sn-γλυκερο-3-φωσφοχολίνη
HDL	high density lipoprotein, υψηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνη
HETEs	hydroxyeicosatetraenoic acids, υδροξυ-εικοσα-τετρα-ενοϊκά οξέα
HGF	hepatocyte growth factor, ηπατοκυτταρικός αυξητικός παράγοντας
HIF α	hypoxia-inducible factor alpha, επαγόμενος από την υποξία παράγοντας α
HMGB1	high-mobility group box 1
HMG-CoA	3-hydroxy-methylglutaryl coenzyme A, 3-υδροξυ-μεθυλογλουταρυλο συνένζυμο A
4-HNE	4-hydroxynonenal, 4-υδροξυ-εννεα-2-ενάλης
HO-1	hemoxygenase -1, οξυγενάση της αίμης 1
HODA-PC	9-hydroxy-12-oxo-10-dodecenoic acid ester of 2-lyso-PC, 1-ακυλο-2- (9-υδροξυ-12-κετο-10-δωδεκενοϊκόϋλο)- sn-γλυκερο-3-φωσφοχολίνη
HOdiA-PC	5-hydroxy-8-oxo-6-octenedioic acid ester of 2-lyso-PC, 1-ακυλο-2- (5-υδροξυ-8-καρβοξυ-6-οκταδιενοϊκόϋλο)- sn-γλυκερο-3-φωσφοχολίνη
HOOA-PC	5-hydroxy-8-oxo-6-octenoic acid ester of 2-lyso-PC, 1-ακυλο-2- (5-υδροξυ-8-αλδο-6-οκτενοϊκόϋλο)- sn-γλυκερο-3-φωσφοχολίνη
HPLC	High Performance Liquid Chromatography, υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης
hs-CRP	high sensitivity CRP, υψηλής ευαισθησίας C αντιδρώσα πρωτεΐνη
HODEs	hydroxyoctadecaenoic acids, υδροξυ-δεκαοκταενοϊκά οξέα
HSP	heat shock protein, πρωτεΐνη θερμικού σοκ
HUVEC	human umbilical vein endothelial cells, ανθρώπινα ενδοθηλιακά κύτταρα ομφαλικής φλέβας
ICAM-1	intercellular adhesion molecule 1, διακυτταρικό μόριο προσκόλλησης 1
IDL	intermediate density lipoprotein, ενδιάμεσης πυκνότητας λιποπρωτεΐνη
IFN	interferon, ιντερφερόνη
IGF-1	insulin-like growth factor 1, παρόμοιος προς την ινσουλίνη αυξητικός παράγοντας 1
I κ B α	NF- κ B inhibitor alpha, αναστολέας α του NF- κ B
IL	interleukin, ιντερλευκίνη
IMT	intima and media thickness, πάχος του έσω και του μέσου χιτώνα
IP-10	interferon gamma-induced protein 10
IRF	interferon regulating factor
I-TAC	interferon-inducible T-cell alpha chemoattractant
JNK	c-Jun N-terminal kinase
KODA-PC	9-keto-12-oxo-10-dodecenoic acid ester of 2-lyso-PC, 1-ακυλο-2- (9-κετο-12-αλδο-10-δωδεκενοϊκόϋλο)- sn-γλυκερο-3-φωσφοχολίνη
KDdiA-PC	9-keto-10-dodecenedioic acid ester of 2-lyso-PC, 1-ακυλο-2-(9-κετο-12-καρβοξυ-10-δωδεκεδιενοϊκόϋλο)- sn-γλυκερο-3-φωσφοχολίνη
KOdiA-PC	5-keto-6-octenedioic acid ester of 2-lyso-PC, 1-ακυλο-2- (5-κετο-8-καρβοξυ-6-οκτεδιενοϊκόϋλο)- sn-γλυκερο-3-φωσφοχολίνη
KOOA-PC	5-keto-8-oxo-6-octenoic acid ester of 2-lyso-PC, 1-ακυλο-2- (5,8-κετο-6-οκτενοϊκόϋλο)-sn-γλυκερο-3-φωσφοχολίνη
KLF	Kruppel-like factor

LCAT	lecithin:cholesterol acyl transferase, ακυλο-CoA:λεκιθίνη ακυλοτρανσφεράση
Lp(a)	lipoprotein(a), λιποπρωτεΐνη (a)
LTB4	leukotriene B4, λευκοτριένη B4
LDL	low density lipoprotein, χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνη
LDL-R	LDL receptor, υποδοχέας της LDL
LFA-1	lymphocyte function-associated antigen 1
LOX1	lectin-like oxidized LDL receptor-1, παρόμοιος με λεκτίνη υποδοχέας-1 οξειδωμένης LDL
LRP-1	low-density lipoprotein receptor-related protein 1, σχετιζόμενη με τον υποδοχέα των LDL πρωτεΐνη 1
Lp-PLA ₂	lipoprotein associated phospholipase A ₂ , συνδεδεμένη με τις λιποπρωτεΐνες φωσφολιπάση A ₂
LXR	liver X receptors, ηπατικοί υποδοχείς X
LysoPC	lysophosphatidylcholine, λυσοφωσφατιδυλοχολίνη
MAPK	mitogen-activated protein kinase
MARCO	macrophage receptor with collagenous structure, υποδοχέας μακροφάγων με δομή κολλαγόνου
MCH II	major histocompatibility complex class II, μείζον σύστημα ιστοσυμβατότητας II
MCP-1	monocyte chemoattractant protein-1, χημειοτακτική πρωτεΐνης για τα μονοκύτταρα 1
M-CSF	macrophage colony-stimulating factor, παράγοντας διέγερσης αποικιών μακροφάγων
MDA	malondialdehyde, μαλονδιαλδεΐδη
MERTK	proto-oncogene tyrosine-protein kinase MER
MIG	monokine induced by gamma interferon
MIP	macrophage inflammatory proteins
mmLDL	minimally modified LDL, ελάχιστα οξειδωμένη LDL
MMP	matrix metalloproteinase, μεταλλοπρωτεϊνάση της θεμέλιας ουσίας
MyD88	myeloid differentiation factor 88
NADPH	nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, νικοτιναμινο-αδενινο-φωσφοδινουκλεοτίδιο
NEFA	non esterified fatty acids, μη εστεροποιημένα λιπαρά οξέα
NFAT	nuclear factor of activated T cells
NF-κB	nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells, μεταγραφικός πυρηνικός παράγοντας κB
NLR	Nod (nucleotide oligomerization domain) -like receptor
NO	nitric oxide, μονοξείδιο του αζώτου
NOS	nitric oxide synthase, συνθετάση του μονοξειδίου του αζώτου
NRF2	nuclear factor erythroid 2-like 2
OCT	optical coherence tomography
OG	octyl glucoside
oxLDL	oxidized LDL, οξειδωμένη LDL
oxPC	oxidized phosphatidylcholine
PAF	platelet-activating factor, παράγοντας ενεργοποίησης αιμοπεταλίων
PAF-AH	PAF acetylhydrolase, ακετυλοϋδρολάση του παράγοντα ενεργοποίησης αιμοπεταλίων
PAI-1	plasminogen activator inhibitor 1, αναστολέας 1 του ενεργοποιητή του πλασμινογόνου
PAPC	1-palmitoyl-2-arachidonoyl-sn-3-phosphocholine, 1-παλμιτόϋλο-2-αραχιδονϋλο-sn-γλυκερο-3-φωσφοχολίνη

PC	phosphatidylcholine, φωσφατιδυλοχολίνη
PDGF	platelet-derived growth factor, προερχόμενος από τα αιμοπετάλια αυξητικός παράγοντας
PE	phosphatidylethanolamine, φωσφατιδυλοαιθανολαμίνη
PECAM-1	platelet endothelial cell adhesion molecule 1, μόριο προσκόλλησης 1 αιμοπεταλίων ενδοθηλιακών κυττάρων
PEIPC	1-palmitoyl-2-epoxyisoprostone E2-sn-glycero-3-phosphocholine, 1-παλμιτόυλο-2- (εποξυ-ισοπροστανυλόυλο E2)-sn-γλυκερο-3-φωσφοχολίνη
PI	phosphatidylinositol, φωσφατιδυλοϊνοσιτόλη
PI-3K	phosphatidylinositol 3-kinase
PGPC	1-palmitoyl-2-glutaroyl-sn-glycero-3-phosphocholine, 1-παλμιτόυλο-2-(γλουταρούλο)- sn-γλυκερο-3-φωσφοχολίνη
PKC	protein kinase C, πρωτεϊνική κινάση C
PKD2	protein kinase D2, πρωτεϊνική κινάση D2
PIGF	placental growth factor, πλακουντιακός αυξητικός παράγοντας
PLA ₂	phospholipase A2, φωσφολιπάση A2
PLPC	1-palmitoyl -2-linoleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine, 1-παλμιτόυλο-2-λινελαϊκόυλο - sn-γλυκερο- 3-φωσφοχολίνη
POVPC	1-palmitoyl-2-(5-oxovaleroyl)-sn-glycero-3-phosphocholine, 1-παλμιτόυλο-2-(5-κετοβαλερόυλο)-sn-γλυκερο-3-φωσφοχολίνη
PPAR	peroxisome proliferator-activated receptor, υποδοχείς παραγόντων προκαλούντων πολλαπλασιασμό υπεροξεισωματιών
PRR	pattern recognition receptor, υποδοχέας αναγνώρισης μοριακών προτύπων
PS	phosphatidylserine, φωσφατιδυλοσερίνη
PWV	pulse wave velocity, ταχύτητα σφυγμικού κύματος
RANK	receptor activator of NF-κB, υποδοχέας ενεργοποιητής του NF-κB
RANKL	receptor activator of NF-κB ligand, συνδέτης του υποδοχέα ενεργοποιητή του NF-κB
RANTES	regulated and normal T cell expressed and secreted
ROS	reactive oxygen species, ενεργείς μορφές οξυγόνου
RUNX2	runt-related transcription factor 2
SD	standard deviation, σταθερά απόκλιση
SDF-1	stromal cell-derived factor 1, προερχόμενος από κύτταρα στρώματος παράγοντας 1
SE	standard error, πρότυπο σφάλμα
SO	superoxide, υπεροξειδικό ανιόν
SOD	superoxide dismutase, υπεροξειδική δισμουτάση
SR	scavenger receptor, εκκαθαριστής υποδοχέας
SRA	scavenger receptor A, εκκαθαριστής υποδοχέας A
SRB1	scavenger receptor B1, εκκαθαριστής υποδοχέας B1
SREBPs	sterol regulatory element – binding proteins
SREC	scavenger receptors expressed by endothelial cells, εκκαθαριστές υποδοχείς εκφραζόμενοι σε ενδοθηλιακά κύτταρα
SR-PSOX/ CXCL16	scavenger receptor for phosphatidylserine and oxidized lipoprotein / CXC chemokine ligand 16, εκκαθαριστής υποδοχέας της φωσφατιδυλοσερίνης και οξειδωμένης λιποπρωτεΐνης / CXC συνδέτης χημειοκίνη 16
TBARS	thiobarbituric acid reactive substances, αντιδρώσες ουσίες με το θειοβαρβιτουρικό
TGF	transforming growth factor, μετατρεπτικός αυξητικός παράγοντας

Th	T helper, βοηθητικά T λεμφοκύτταρα
TIMP	tissue inhibitor of metalloproteinases, ιστικός αναστολέας μεταλλοπρωτεϊνών
TLR	Toll-like receptor, υποδοχέας τύπου Toll
TF	tissue factor, ιστικός παράγοντας
TFPI	tissue factor pathway inhibitor, αναστολέας του ιστικού ενεργοποιητή του πλασμινογόνου 1
TNF	tumor necrosis factor, παράγοντας νέκρωσης όγκων
TPA	tissue plasminogen activator, ιστικός ενεργοποιητής του πλασμινογόνου
Treg	regulatory T cells, ρυθμιστικά T λεμφοκύτταρα
Txnip	thioredoxin-interacting protein
VAN	van protein guanine nucleotide exchange factor
VCAM-1	vascular cell adhesion molecule 1, μόριο προσκόλλησης των αγγειακών κυττάρων 1
VEGF	vascular endothelial growth factor, αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας
VEGFR	vascular endothelial growth factor receptor, υποδοχέας του αγγειακού ενδοθηλιακού αυξητικού παράγοντα
VLDL	very low density lipoprotein, πολύ χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνη
VLA-4	very late antigen 4
UPR	unfolded protein response

I. ΣΚΟΠΟΣ

Η οξείδωση της LDL, η σύνδεσή της με τους υποδοχείς των μακροφάγων και η επακόλουθη πρόσληψή της που οδηγεί στο σχηματισμό των αφρωδών κυττάρων αποτελούν πρώιμα και μεγάλης σημασίας γεγονότα στην ανάπτυξη της αθηροσκλήρυνσης. Η οξειδωμένη LDL (oxLDL) προσλαμβάνεται από τα μακροφάγα μέσω εκκαθαριστών υποδοχέων. Η σύνδεση της oxLDL στους εκκαθαριστές υποδοχείς μεσολαβείται από την οξειδωτικά τροποποιημένη απολιποπρωτεΐνη B100 αλλά και από τα οξειδωτικά τροποποιημένα λιπίδια της LDL, ιδιαίτερα την οξειδωμένη φωσφατιδυλοχολίνη. Επιπλέον, τα οξειδωμένα λιπίδια και ιδιαίτερα η οξειδωμένη φωσφατιδυλοχολίνη εμπλέκονται και στην τροποποίηση της ApoB100.

Στην LDL συνδέεται μία εκκριτική φωσφολιπάση, η συνδεδεμένη με τις λιποπρωτεΐνες φωσφολιπάση A2 (lipoprotein associated phospholipase A2, Lp-PLA₂) ή αλλιώς ονομαζόμενη ακετυλοϋδρολάση του παράγοντα ενεργοποίησης αιμοπεταλίων (platelet activating factor acetylhydrolase, PAF-AH). Το ένζυμο αυτό υδρολύοντας κυρίως οξειδωμένα μόρια φωσφατιδυλοχολίνης εμπλέκεται στην τροποποίηση της oxLDL.

Σκοπός της παρούσας διατριβής είναι η διερεύνηση:

- 1) του ρόλου της υδρόλυσης μορίων οξειδωμένης φωσφατιδυλοχολίνης από την Lp-PLA₂ στη σύνδεση και στην επακόλουθη πρόσληψη της oxLDL από τα μακροφάγα
- 2) της επίδρασης της Lp-PLA₂ δραστηριότητας στη σύνδεση – πρόσληψη της oxLDL μέσω της πρωτεϊνικής της ομάδας
- 3) της επίδρασης της Lp-PLA₂ δραστηριότητας στη σύνδεση – πρόσληψη της oxLDL μέσω της λιπιδικής της ομάδας

II. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

III. ΑΘΗΡΟΣΚΛΗΡΥΝΣΗ

Η αθηροσκληρυνση αποτελεί κυρίαρχη αιτία νοσηρότητας και θνησιμότητας στις ανεπτυγμένες κοινωνίες. Προσβάλλει το αρτηριακό τοίχωμα μεγάλων και μεσαίου μεγέθους αρτηριών οδηγώντας σε κλινικές εκδηλώσεις ανάλογα με την περιοχή αιμάτωσης [1, 2]. Τα συνηθέστερα κλινικά σύνδρομα είναι από τις στεφανιαίες αρτηρίες η στηθάγχη και το έμφραγμα του μυοκαρδίου, από τις καρωτίδες και τις σπονδυλικές αρτηρίες τα αγγειακά εγκεφαλικά επεισόδια, και από τις αρτηρίες των κάτω άκρων η διαλείπουσα χωλότητα και η γάγγραινα, από την κοιλιακή αορτή η δημιουργία ανευρυσμάτων, από τις σπλαγγχνικές αρτηρίες η ισχαιμία μεσεντερίου και από την αιμάτωση του νεφρού η στένωση της νεφρικής αρτηρίας και η αθηροεμβολική νόσος. Η αθηροσκληρυνση συνήθως ακολουθεί μακρά ασυμπτωματική πορεία προτού προκαλέσει κλινική συμπτωματολογία. Σήμερα πιστεύεται ότι στις περισσότερες περιπτώσεις οι πρώτες αλλοιώσεις αρχίζουν να αναπτύσσονται ήδη στην παιδική ηλικία. Η συμπτωματολογία, εφόσον τελικά εκδηλωθεί, λαμβάνει τη μορφή είτε της χρόνιας, σταθερής ισχαιμίας που οφείλεται σε στένωση του αυλού του αγγείου όπως στη σταθερή στηθάγχη ή στη διαλείπουσα χωλότητα όπου σε συνθήκες έργου δεν υπάρχει επαρκής αιμάτωση για να καλύψει τις αυξημένες μεταβολικές ανάγκες, είτε έχει οξεία εμφάνιση σε απότομη απόφραξη του αυλού λόγω θρόμβωσης όπως συμβαίνει στο οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου.

III.1.1 Δομή των φυσιολογικών αρτηριών

Το τοίχωμα των μεγάλου και μεσαίου μεγέθους αρτηριών αποτελείται από τρεις στοιβάδες οι οποίες ονομάζονται έσω, μέσος και έξω χιτώνας (**Εικόνα II.1**) [1, 3].

Έσω χιτώνας (intima)

Ο έσω χιτώνας αποτελείται από μονοστοιβάδα ενδοθηλιακών κυττάρων η οποία επικάθεται σε βασική μεμβράνη. Κάτω από τη βασική μεμβράνη βρίσκεται λεπτή στοιβάδα κολλαγόνων και λίγων ελαστικών ινών. Με την πάροδο της ηλικίας στη στοιβάδα αυτή προστίθεται και η παρουσία λείων μυϊκών κυττάρων. Στο όριο μεταξύ έσω και μέσου χιτώνα άθροισμα ελαστικών ινών σχηματίζει την έσω ελαστική μεμβράνη η οποία είναι ευδιάκριτη κυρίως στις μυϊκές αρτηρίες.

Μέσος χιτώνας (tunica media)

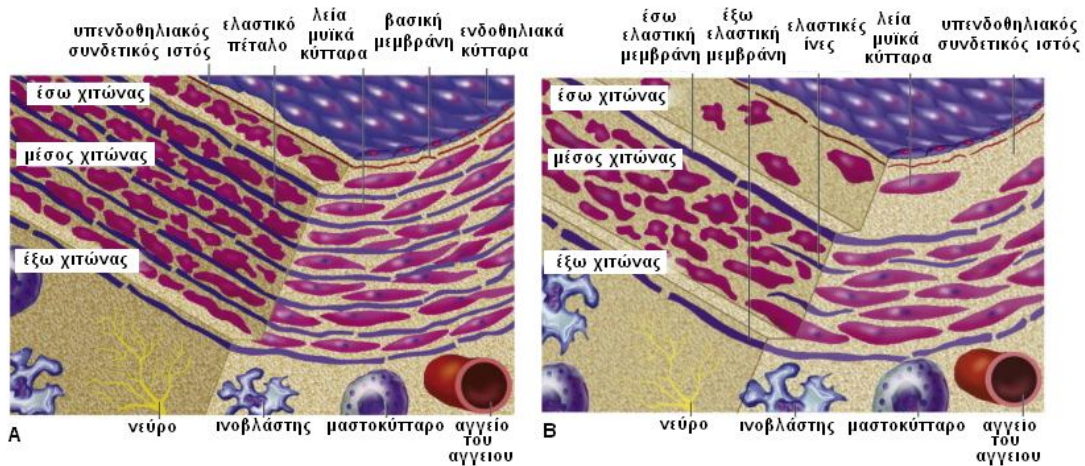
Η δομή του μέσου χιτώνα διαφοροποιείται με το μέγεθος της αρτηρίας και βάσει αυτής της διαφοροποίησης διακρίνονται οι ελαστικές και οι μυϊκές αρτηρίες.

Οι μεγαλύτερες αρτηρίες είναι οι ελαστικές αρτηρίες. Σε αυτές ο μέσος χιτώνας αποτελείται κυρίως από ελαστικές ίνες οι οποίες είναι διατεταγμένες περισσότερο κυκλοτερώς παρά κατά μήκος και σχηματίζουν στρώματα, τα ελαστικά πέταλα. Μεταξύ των ελαστικών πετάλων βρίσκονται λεία μυϊκά κύτταρα και ίνες κολλαγόνου.

Οι ελαστικές αρτηρίες μεταπίπτουν στις μυϊκές αρτηρίες χάνοντας σταδιακά τα ελαστικά πέταλά τους. Ο μέσος χιτώνας στις μυϊκές αρτηρίες αποτελείται κυρίως από λεία μυϊκά κύτταρα συγκεντρικά διατεταγμένα, μεταξύ των οποίων βρίσκονται διασκορπισμένες ελαστικές ίνες. Στο όριο μέσου και έξω χιτώνα σχηματίζεται η έξω ελαστική μεμβράνη.

Έξω χιτώνας (Adventitia)

Ο έξω χιτώνας σχηματίζεται κυρίως από κολλαγόνο και περιέχει λίγα λεία μυϊκά κύτταρα, ινοβλάστες και μαστοκύτταρα. Στον έξω χιτώνα διεισδύουν τα αγγεία των αγγείων (vasa vasorum) και νεύρα.



Εικόνα Π.1. Ιστολογική δομή φυσιολογικής ελαστικής (A) και μυϊκής (B) αρτηρίας

Π.1.2. Ιστολογική κατηγοριοποίηση των αθηροσκληρυντικών βλαβών

Η αθηροσκλήρυνση αποτελεί μία χρόνια διαταραχή που εστιάζεται στον έξω χιτώνα του αρτηριακού τοιχώματος που χαρακτηρίζεται από διαταραχή της ενδοθηλιακής λειτουργίας, συσσώρευση λιπιδίων και χρόνια φλεγμονή και εμπλέκει ένα πλήθος κυττάρων, με κυρίαρχα τα μακροφάγα, τα ενδοθηλιακά κύτταρα, τα λεία μυϊκά κύτταρα και τα T λεμφοκύτταρα [1, 4]. Η κοινώς αποδεκτή κατηγοριοποίηση των αθηροσκληρυντικών βλαβών προέρχεται από την Αμερικανική Καρδιολογική Εταιρεία (American Heart Association, AHA) [5, 6]. Αυτή βασίζεται στη μακροσκοπική εικόνα και στην ιστολογική σύσταση των βλαβών και περιλαμβάνει τους βαθμούς ή τύπους 0 έως 6. Με το βαθμό 0 αντιστοιχείται η φυσιολογική αρτηρία, στους βαθμούς 1-3 αντιστοιχούνται οι πρώιμες βλάβες και στους βαθμούς 4-6 οι προχωρημένες βλάβες.

Τύπος 1, πρῶιμη βλάβη (initial lesion): μεμονωμένα αφρώδη κύτταρα προερχόμενα από μακροφάγα, χωρίς εξωκυττάρια εναπόθεση λίπους, ποικίλος βαθμός προσαρμοστικής πάχυνσης του έσω χιτώνα (λεία μυϊκά κύτταρα). Μακροσκοπικά οι βλάβες αυτές δεν είναι ορατές, ενώ κάποιες καθίστανται ορατές μετά από χρώση για λίπος.

Τύπος 2, λιπώδης γράμμωση (fatty streak): πολυάριθμα αφρώδη κύτταρα προερχόμενα από μακροφάγα, συχνά σε στοιβάδες, με διακριτά σωματίδια λίπους αλλά χωρίς αθροίσεις λίπους στον εξωκυττάριο χώρο, ποικίλος βαθμός προσαρμοστικής πάχυνσης του έσω χιτώνα (λεία μυϊκά κύτταρα). Επίσης μπορεί να παρατηρηθούν λεία μυϊκά κύτταρα που περιέχουν σταγόνες λίπους καθώς και T λεμφοκύτταρα και μαστοκύτταρα. Μακροσκοπικά οι βλάβες μπορεί να είναι ορατές σαν κίτρινες ραβδώσεις ή κηλίδες και χρωματίζονται με χρώση για λίπος.

Τύπος 3, λιπώδης πλάκα, ενδιάμεση βλάβη, προαθήρωμα (fatty plaque, intermediate lesion, preatheroma): πολυάριθμα αφρώδη κύτταρα προερχόμενα από μακροφάγα με αθροίσεις λίπους στον εξωκυττάριο χώρο χωρίς σαφώς σχηματισμένο εξωκυττάριο λιπώδη πυρήνα. Οι βλάβες αυτές είναι ενδιάμεσες μεταξύ του τύπου 2 και του τύπου 4 και μπορεί μακροσκοπικά να παρουσιάζονται επηρμένες.

Τύπος 4, αθήρωμα (atheroma): πολυάριθμα αφρώδη κύτταρα προερχόμενα από μακροφάγα με σαφή σχηματισμό εξωκυττάριου λιπώδη πυρήνα. Μεταξύ του ακυτταρικού λιπώδη πυρήνα και του ενδοθηλίου εκτός από μακροφάγα ανευρίσκονται και λεία μυϊκά κύτταρα που περιέχουν ή όχι σταγόνες λίπους και μπορεί να ανευρευθούν και T λεμφοκύτταρα και μαστοκύτταρα. Πρόκειται κατά κανόνα για επηρμένες βλάβες.

Τύπος 5, ινωδοαθήρωμα, ινώδης πλάκα (fibroatheroma, fibrous plaque): πολυάριθμα αφρώδη κύτταρα προερχόμενα από μακροφάγα με σαφή σχηματισμό ενός ή περισσότερων λιπωδών πυρήνων στον εξωκυττάριο χώρο με ανάπτυξη ινώδους κάψας, αγγείωσης και αποτιτανώσεων. Πρόκειται για επηρμένες βλάβες.

Τύπος 6, επιπλεγμένες βλαβες (complicated lesion): βλάβες τύπου 4 ή 5 επιπλεγμένες με διαταραχή της συνέχειας του ενδοθηλίου, θρόμβωση, αιμάτωμα ή αιμορραγία.

II.1.3. Παθογένεση της αθηρωμάτωσης

I.1.3.1. Παράγοντες κινδύνου

Ένα πλήθος παραγόντων και μηχανισμών εμπλέκονται στην παθογένεση της αθηρωμάτωσης. Μεταξύ αυτών η δυσλιπιδαιμία, το κάπνισμα, η αρτηριακή υπέρταση (ΑΥ) και ο σακχαρώδης διαβήτης (ΣΔ) αποτελούν τους πλέον αναγνωρισμένους παράγοντες κινδύνου που συνδέονται αιτιολογικά με την ανάπτυξη αρτηριοσκλήρυνσης, ενώ κυρίαρχη θέση στους παθογενετικούς μηχανισμούς κατέχουν η ενδοθηλιακή δυσλειτουργία, φλεγμονώδεις και ανοσολογικοί μηχανισμοί.

Οι διαταραχές στα επίπεδα των λιποπρωτεϊνών του πλάσματος αποτελούν ίσως τους πλέον μελετημένους παράγοντες στην παθογένεση της αθηροσκλήρυνσης [1, 2]. Τα υψηλά επίπεδα της χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνης (low density lipoprotein, LDL) αποτελούν έναν απολύτως θεμελιωμένο παράγοντα κινδύνου και κύριο θεραπευτικό στόχο [7, 8]. Η LDL εμπλέκεται στην παθογένεση της αθηρωμάτωσης μέσω της οξειδωσής της η οποία λαμβάνει χώρα πιθανώς και στην κυκλοφορία από επίδραση οξειδωτικών παραγόντων αλλά κυρίως στον έσω χιτώνα των αρτηριών όπου αποτελεί ένα από τα πρωταρχικά γεγονότα στην έναρξη σχηματισμού της βλάβης. Η οξειδωμένη LDL (oxidized LDL, oxLDL) ασκεί ένα πλήθος παθογενετικών δράσεων σε όλα τα στάδια της αθηρωμάτωσης όπως η επαγωγή του οξειδωτικού stress, η ενδοθηλιακή δυσλειτουργία και η στρατολόγηση λευκοκυττάρων, ο σχηματισμός των αφρωδών κυττάρων, η ανάπτυξη φλεγμονής και η παραγωγή πλήθους αθηρογενετικών κυτταροκινών και χημειοκινών, και επιδράσεις που αφορούν στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, την απόπτωση και την παθολογική αναδόμηση του αρτηριακού τοιχώματος και την παραγωγή παραγόντων που επάγουν τη θρόμβωση. Η δράση της oxLDL θα περιγραφεί αναλυτικά παρακάτω. Αντιθέτως, το επίπεδο καρδιαγγειακού κινδύνου σχετίζεται αντιστρόφως ανάλογα με τα επίπεδα της υψηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνης (high density lipoprotein, HDL) [7]. Αυτό αποδίδεται στο ότι η HDL έχει αντιαθηρογόνους ιδιότητες που περιλαμβάνουν την αντίστροφη μεταφορά χοληστερόλης από την περιφέρεια στο ήπαρ, αντιοξειδωτική, αντιφλεγμονώδη και αντιθρομβωτική δράση [9]. Ο ρόλος των τριγλυκεριδίων στην ανάπτυξη της αθηροσκλήρυνσης είναι λιγότερο σαφής ενώ αθηρογόνος θεωρείται η λιποπρωτεΐνη(α) [lipoprotein(α), Lp(α)] [10, 11].

Ο ΣΔ αποτελεί τόσο ισχυρό προδιαθεσικό παράγοντα για την ανάπτυξη αθηροσκλήρυνσης ώστε θεωρείται στη θεραπευτική προσέγγιση ως ισοδύναμο καρδιαγγειακής νόσου [8]. Η υπεργλυκαιμία, η αύξηση των ελεύθερων λιπαρών οξέων, η υπερινσουλιναίμια και η συνοδός ινσουλινοαντίσταση στην περίπτωση του ΣΔ2 αλλά και η

συνοδός δυσλιπιδαιμία αποτελούν τα θεμελιώδη γενεσιουργά αίτια της αθηρογένεσης [12]. Ένα πλήθος μηχανισμών έχουν περιγραφεί να μεσολαβούν στην αθηρογένεση με βασικότερους την επαγωγή του οξειδωτικού stress, το σχηματισμό προϊόντων προχωρημένης γλυκοζυλίωσης (advanced glycation end products, AGEs) και την ενεργοποίηση της πρωτεϊνικής κινάσης C (protein kinase C, PKC) [13-15]. Η οξείδωση της LDL, η μείωση της βιοδιαθεσιμότητας του μονοξειδίου του αζώτου (nitric oxide, NO) και η ανάπτυξη ενδοθηλιακής δυσλειτουργίας, η αύξηση της έκφρασης μορίων προσκόλλησης στα ενδοθηλιακά κύτταρα, και η αύξηση της παραγωγής πλήθους φλεγμονωδών κυτταροκινών όπως της ιντερλευκίνης 6 (interleukin 6, IL-6) και χημειοκινών όπως της χημειοτακτικής πρωτεΐνης για τα μονοκύτταρα 1 (monocyte chemoattractant protein-1, MCP-1), και η επαγωγή υπερπηκτικότητας με αύξηση της παραγωγής του ιστικού παράγοντα (tissue factor, TF) και του αναστολέα του ιστικού ενεργοποιητή του πλασμινογόνου 1 (plasminogen activator inhibitor 1, PAI-1) είναι μερικοί μόνο από τους πολυάριθμους μηχανισμούς που συνδέουν το ΣΔ με την αθηροθρόμβωση. Ειδικότερα όσον αφορά στα μακροφάγα και στο σχηματισμό των αφρωδών κυττάρων στα πλαίσια της υπερινσουλιναϊμίας που χαρακτηρίζει την αντίσταση στην ινσουλίνη στο ΣΔ2, τα υψηλά επίπεδα ινσουλίνης αλλά και τα χαμηλά επίπεδα αδιπονεκτίνης που κατά κανόνα συνυπάρχουν, επάγουν την έκφραση του εκκαθαριστή υποδοχέα CD36 και μειώνουν την εκροή χοληστερόλης μέσω μείωσης της έκφρασης του ABCA-1 (ATP-binding cassette transporter A-1) (βλέπε παρακάτω II.1.3.2.Δ. Πρόσληψη και ενδοκυττάρια συσσώρευση λιπιδίων - σχηματισμός αφρωδών κυττάρων) [16]. Η αθηρογένεση συνδέεται επίσης στενά με την ύπαρξη μεταβολικού συνδρόμου, που αποτελεί συνδυασμό χαρακτηριστικών που περιλαμβάνουν την ινσουλινοαντίσταση, την αυξημένη αρτηριακή πίεση, την κεντρική παχυσαρκία, τα αυξημένα επίπεδα τριγλυκεριδίων και τα χαμηλά επίπεδα HDL [1, 17]

Η ΑΥ αποτελεί άλλον ένα μείζονα προδιαθεσικό παράγοντα για την ανάπτυξη αθηροσκλήρυνσης [18, 19]. Οι παθογενετικοί μηχανισμοί της αθηρογένεσης στην αρτηριακή υπέρταση είναι λιγότερο μελετημένοι σε σχέση με αυτούς της δυσλιπιδαιμίας και του ΣΔ. Σήμερα γίνεται δεκτό ότι η σύνδεση της ΑΥ με την αθηρογένεση σε μοριακό επίπεδο γίνεται με πρόκληση οξειδωτικού stress στο αρτηριακό τοίχωμα μέσω επαγωγής της νικοτιναμινο-αδενινο-φωσφο-δινουκλεοτίδιο (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, NADPH) οξειδάσης [20]. Στους κλασικούς παράγοντες κινδύνου ανήκει και το κάπνισμα [1, 2]. Η επαγωγή οξειδωτικού stress και της οξείδωσης της LDL, η μείωση της βιοδιαθεσιμότητας του NO, η επαγωγή δυσλιπιδαιμίας, η αύξηση της έκφρασης μορίων προσκόλλησης των λευκοκυττάρων, η αύξηση δεικτών φλεγμονής, όπως της C αντιδρώσας πρωτεΐνης (C

reactive protein, CRP) και φλεγμονωδών κυτταροκινών, όπως της IL-6 και του παράγοντα νέκρωσης όγκων α (tumor necrosis factor alpha, TNF α) και η επαγωγή υπερπηκτικότητας με αύξηση του ινωδογόνου και μειωμένη ινωδολύση συνδέουν το κάπνισμα με την αθηρογένεση [21].

II.1.3.2. Αρχικά στάδια της αθηρογένεσης

Τα αρχικά στάδια της αθηρογένεσης περιλαμβάνουν την είσοδο και παραμονή LDL στον έσω χιτώνα, το οξειδωτικό stress και την ανάπτυξη ενδοθηλιακής δυσλειτουργίας, τη μετανάστευση λευκοκυττάρων και το σχηματισμό αφρωδών κυττάρων.

A) Είσοδος και παραμονή LDL στον έσω χιτώνα

Μικρά λιποπρωτεϊνικά σωματίδια κυρίως LDL, φυσιολογικά μπορούν να κυκλοφορούν σε κάποιο βαθμό μέσω του ενδοθηλίου μεταξύ του ενδαγγειακού και του υπενδοθηλιακού χώρου. Η LDL συνδέεται στον έσω χιτώνα με πρωτεογλυκάνη της θεμέλιας ουσίας, γεγονός που παρατείνει το χρόνο παραμονής της LDL καθιστώντας την περισσότερο ευάλωτη σε τροποποίησή της κυρίως μέσω οξείδωσης [22, 23]. Η δυσλιπιδαιμία, αλλά πιθανώς και η αύξηση της διαπερατότητας του ενδοθηλίου επιτείνουν το αρχικό αυτό γεγονός της συσσώρευσης λιποπρωτεϊνών στον έσω χιτώνα [1].

B) Οξειδωτικό stress - ενδοθηλιακή δυσλειτουργία

Η ανάπτυξη οξειδωτικού stress και ενδοθηλιακής δυσλειτουργίας αποτελούν κυρίαρχους μηχανισμούς στην έναρξη αλλά και στην ανάπτυξη της αθηροσκληρυντικής βλάβης που προκαλείται από τους κλασικούς παράγοντες κινδύνου.

B1) Οξειδωτικό stress

Με τον όρο οξειδωτικό stress αναφέρεται η κατάσταση διατάραξης της ισορροπίας μεταξύ οξειδωτικών και αντιοξειδωτικών μηχανισμών υπέρ των πρώτων [24]. Κυρίαρχο ρόλο στην ανάπτυξη οξειδωτικού stress έχει η ενεργοποίηση των μηχανισμών για την παραγωγή ενεργών μορφών οξυγόνου (reactive oxygen species, ROS). Μεγάλη δραστηριότητα παρουσιάζουν το υπεροξειδικό ανιόν ($O_2^{\cdot-}$, superoxide, SO), η υδροϋπεροξειδική ρίζα (HO_2^{\cdot} , hydroperoxyl radical) και η υδροξυλική ρίζα (OH^{\cdot} , hydroxyl radical), ενώ μικρότερη δραστηριότητα έχει το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2 , hydrogen peroxide) που αποτελεί παράγωγο ριζών οξυγόνου χωρίς το ίδιο να αποτελεί ρίζα. Κύριες πηγές ROS αποτελούν η NADPH οξειδάση η οποία αποτελείται από τέσσερις υπομονάδες

(p22^{phox}, gp91^{phox}, p47^{phox}, p67^{phox}), η οξειδάση της ξανθίνης, η συνθετάση του μονοξειδίου του αζώτου (nitric oxide synthase, NOS) όταν αυτή αποσυζευχθεί (βλέπε παρακάτω II.1.3.2.B2. Ενδοθηλιακή δυσλειτουργία), η αναπνευστική αλυσίδα στα μιτοχόνδρια, η μυελοϋπεροξειδάση και οι λιποξυγενάσες. Επίσης, μεταλλικά ιόντα όπως Cu^{2+} και Fe^{2+} προκαλούν οξειδωτικές αντιδράσεις, αν και λόγω της πολύ χαμηλής συγκέντρωσή τους in vivo ο ρόλος τους στην ανάπτυξη της αθηροσκλήρυνσης δεν φαίνεται να είναι σημαντικός σε αντίθεση με τα ανωτέρω οξειδωτικά συστήματα τα οποία επάγονται στα κύτταρα του αρτηριακού τοιχώματος στη θέση ανάπτυξης της αθηρωματικής βλάβης. Κύρια αντιοξειδωτικά συστήματα αποτελούν η υπεροξειδική δισμουτάση (superoxide dismutase, SOD), η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (glutathione peroxidase), η οξυγενάση της αίμης 1 (heme oxygenase 1, HO-1), η καταλάση και αντιοξειδωτικά μόρια που δεσμεύουν οξειδωτικά μόρια όπως το ασκορβικό οξύ (βιταμίνη C), και η α -τοκοφερόλη (βιταμίνη E). Η επίδραση των ROS στα λιπίδια προκαλεί τη λιπιδική υπεροξειδωση η οποία είναι ιδιαίτερα σημαντική και εκδηλώνεται σε ακόρεστες λιπαρές αλυσίδες και περισσότερο σε πολυακόρεστες, όπως αυτή του αραχιδονικού οξέος, οδηγώντας σε μία αλυσιδωτή αντίδραση με την παραγωγή λιποϋδροϋπεροξειδίων.

Η σχηματιζόμενη oxLDL που προκύπτει από την οξείδωση LDL κατέχει θεμελιώδη ρόλο στην πυροδότηση της αθηρογένεσης και στη συνέχεια στην ανάπτυξη της αθηρωματικής πλάκας όπως θα αναπτυχθεί αναλυτικά παρακάτω. Τα ενδοθηλιακά κύτταρα, τα μακροφάγα αλλά και τα λεία μυϊκά κύτταρα μπορούν να οξειδώσουν την LDL και πλέον γίνεται αποδεκτό ότι η οξείδωση της LDL λαμβάνει χώρα κατά κύριο λόγο στον έσω χιτώνα του αρτηριακού τοιχώματος από αυτούς τους κυτταρικούς πληθυσμούς [24-26]. Το οξειδωτικό stress επάγεται, όπως ήδη αναφέρθηκε, από τους κλασικούς παθογενετικούς παράγοντες, την υπερλιπιδαιμία, τον ΣΔ, την ΑΥ και το κάπνισμα. Πλήθος παραγόντων μεταξύ των οποίων η αγγειοτασίνη II, η θρομβίνη, οι κυτταροκίνες TNF α και IL-1 και οι αυξητικοί παράγοντες, όπως ο προερχόμενος από τα αιμοπετάλια αυξητικός παράγοντας (platelet-derived growth factor, PDGF) και ο επιδερμικός αυξητικός παράγοντας (epidermal growth factor, EGF), έχουν βρεθεί να επάγουν το οξειδωτικό stress επιδρώντας σε κύτταρα του αρτηριακού τοιχώματος [24]. Η παρουσία oxLDL και προϊόντων οξείδωσης λιπιδίων έχει καταδειχθεί σε πλήθος εργασιών σε ανθρώπινες αθηρωματικές πλάκες και σε αθηρωματικές πλάκες πειραματοζώων [24, 25, 27].

B2) Ενδοθηλιακή δυσλειτουργία

Ένα άλλο πρώιμο γεγονός κατά την ανάπτυξη της αθηροσκλήρυνσης, παράλληλα με το οξειδωτικό stress και την οξείδωση των λιποπρωτεϊνών, είναι η ανάπτυξη ενδοθηλιακής δυσλειτουργίας. Το ενδοθήλιο, πέρα από το ότι αποτελεί το φυσικό φραγμό μεταξύ του αίματος και του υπενδοθηλιακού ιστού, η επαφή του οποίου με τα αιμοπετάλια και τους παράγοντες πήξης του αίματος θα οδηγούσε σε θρόμβωση, αποτελεί και ρυθμιστή του τόνου και της ομοιοστασίας του αρτηριακού τοιχώματος. Η επίδραση αυτή στον τόνο και την ομοιοστασία εξασκείται κατά κύριο λόγο από το παραγόμενο στα ενδοθηλιακά κύτταρα μονοξείδιο του αζώτου (nitric oxide, NO). Η παραγωγή του NO καταλύεται από την ενδοθηλιακή συνθετάση του NO (endothelial nitric oxide synthase, eNOS) η οποία χρησιμοποιεί ως υπόστρωμα το αμινοξύ L-αργινίνη [28]. Η φυσιολογική ροή του αίματος και το stress που αυτή προκαλεί στα ενδοθηλιακά κύτταρα αποτελεί το φυσιολογικό ερέθισμα παραγωγής του NO [29]. Το NO προκαλεί αγγειοδιαστολή αλλά και ένα πλήθος αντιαθηρογόνων δράσεων [29, 30]. Στα ενδοθηλιακά κύτταρα το NO αναστέλλει την έκφραση μορίων προσκόλλησης, επάγει τον πολλαπλασιασμό και αναστέλλει την απόπτωση. Αντιθέτως, στα λεία μυϊκά κύτταρα η επαγωγή του πολλαπλασιασμού και της μετανάστευσής τους στον έσω χιτώνα από την αγγειοτασίνη II (ATII) και από ποικίλες φλεγμονώδεις κυτταροκίνες και αυξητικούς παράγοντες, καθώς και η παραγωγή εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας αναστέλλονται από το NO. Τέλος το NO παρουσιάζει σημαντική αντιθρομβωτική δράση δρώντας ανασταλτικά στη συγκόλληση και τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων. Ο κυριότερος μηχανισμός με τον οποίο το NO εξασκεί την αντιαθηρογόνο δράση του είναι αύξηση της έκφρασης του IκBα (NF-κB inhibitor alpha) που αποτελεί τον ενδοκυττάριο αναστολέα του μεταγραφικού πυρηνικού παράγοντα κB (NF-κB, nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells) [1, 31]. Ο NFκB είναι ένας μεταγραφικός παράγοντας ο οποίος εμπλέκεται σε πλήθος φλεγμονωδών και αθηρογόνων μηχανισμών, ελέγχοντας τη μεταγραφή των γονιδίων πλήθους κυτταροκινών όπως του TNF, της IL-1β, της IL-6 και της ιντερφερόνης γ (interferon γ, IFNγ), χημειοκινών όπως της MCP1, μορίων προσκόλλησης όπως των VCAM-1 (μόριο προσκόλλησης των αγγειακών κυττάρων 1, vascular cell adhesion molecule 1), ICAM-1 (διακυτταρικό μόριο προσκόλλησης 1, intercellular adhesion molecule 1) και σελεκτινών και ενζύμων που παράγουν ROS και λιπιδικούς μεσολαβητές φλεγμονής όπως τις λιποξυγενάσες 5 και 12 και την κυκλοξυγενάση 2 (cyclooxygenase 2, COX-2) [32]. Η ενδοθηλιακή δυσλειτουργία έγκειται στην απώλεια του ομοιοστατικού ρόλου του ενδοθηλίου και είναι μία από τις πρώτες παρατηρούμενες διαταραχές στην ανάπτυξη της αθηροσκλήρυνσης οφειλόμενη στη

διαταραχή της βιοδιαθεσιμότητας του NO. Είναι παρούσα πολύ πριν το σχηματισμό αθηρώματος, και η ύπαρξή της με την επακόλουθη ανάπτυξη αρτηριακής σκληρίας αποτελεί προβλεπτικό παράγοντα για την εμφάνιση μελλοντικών καρδιαγγειακών συμβαμάτων [33]. Η εκτίμησή της αποτελεί τον πρωιμότερο δείκτη πρόβλεψης της ανάπτυξης αθηροσκλήρυνσης ο οποίος μπορεί να εκτιμηθεί κλινικά με μη επεμβατικές τεχνικές που χρησιμοποιούν υπερήχους, όπως η μέτρηση της μεσολαβούμενης από τη ροή του αίματος διαστολή (flow mediated dilatation, FMD) και η μέτρηση της ταχύτητας του σφυγμικού κύματος (pulse wave velocity, PWV) [34, 35]. Όλοι οι κλασικοί παράγοντες κινδύνου για την ανάπτυξη αθηροσκλήρυνσης, όπως η υπερλιπιδαιμία, ο ΣΔ, η ΑΥ και το κάπνισμα συνδέονται μέσω ποικίλων μηχανισμών με μείωση της βιοδιαθεσιμότητας του NO [36, 37]. Οι μηχανισμοί αυτοί περιλαμβάνουν α) τη μείωση της μεταγραφής της eNOS, β) τη μείωση της φωσφορυλίωσης της eNOS που είναι απαραίτητη για την ενεργοποίησή της, γ) τη σύνδεση στην eNOS πρωτεϊνών, όπως της καβεολίνης, που την αναστέλλουν, δ) την ανταγωνιστική αναστολή της παραγωγής NO από μόρια όπως αυτά η ασύμμετρη διμεθυλοαργινίνη (asymmetric dimethylarginine, ADMA) που ανταγωνίζονται την L-αργινίνη η οποία αποτελεί το φυσιολογικό υπόστρωμα της eNOS, ε) την εξάλειψη του NO μέσω σύνδεσής του με SO και την παραγωγή υπεροξυνιτρικού ανιόντος (ONOO^- , peroxynitrite) και στ) την αποσύζευξη της eNOS (eNOS uncoupling) η οποία συνίσταται στην παραγωγή SO από την eNOS αντί NO [38, 39]. Ο ρόλος του οξειδωτικού stress και της oxLDL είναι ιδιαίτερα σημαντικός [36, 39]. Το SO ενώνεται με το NO με αποτέλεσμα το σχηματισμό υπεροξυνιτρικού ανιόντος. Αυτό οδηγεί στην εξάλειψη του NO, ενώ επιπλέον το υπεροξυνιτρικό ανιόν που σχηματίζεται έχει αθηρογόνο δράση επάγοντας περαιτέρω το οξειδωτικό stress και τη λιπιδική υπεροξειδωση ενώ επίσης επάγει την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων [40]. Σε συνθήκες δε έντονου οξειδωτικού stress όπως συμβαίνει σε προχωρημένες αθηροσκληρυντικές βλάβες προκαλείται οξείδωση της τετραϋδροβιοπτερίνης (tetrahydrobiopterin, BH4) που αποτελεί συμπάραγοντα της eNOS, και η ανεπάρκεια της BH4 που προκύπτει από την οξείδωσή της οδηγεί στη λεγόμενη αποσύζευξη της eNOS η οποία τη μετατρέπει σε πηγή παραγωγής SO αντί NO καθιστώντας έτσι την eNOS σημαντικό παράγοντα επιδείνωσης του οξειδωτικού stress και προαγωγής της αθηρογένεσης [41, 42]. Επίδραση της oxLDL σε ενδοθηλιακά κύτταρα βρέθηκε να αυξάνει τα επίπεδα ADMA καθώς και να μειώνει μέσω σύνδεσης με τον εκκαθαριστή υποδοχέα CD36, τη δραστηριότητα της eNOS [38, 43].

Γ) Στρατολόγηση λευκοκυττάρων

Το ενδοθήλιο των αρτηριών φυσιολογικά ανθίσταται στην προσκόλληση των λευκοκυττάρων. Πρώιμα στις θέσεις ανάπτυξης της αθηροσκλήρυνσης αυξάνει η προσκόλληση και η μετανάστευση των μονοκυττάρων [44]. Η στρατολόγηση των λευκοκυττάρων, κυρίως μονοκυττάρων, στον έσω χιτώνα περιλαμβάνει τα στάδια της προσκόλλησης και της κύλισης στο ενδοθήλιο και στη συνέχεια της μετανάστευσης μέσω του ενδοθηλίου στον έσω χιτώνα [45]. Τα στάδια αυτά επάγονται από πολλούς διεγέρτες όπως η υπερχοληστερολαιμία, η oxLDL, οι ROS, ο TNF-α, η IL-1 κ.α. [46-48].

Τα μονοκύτταρα εισέρχονται στον έσω χιτώνα διεισδύοντας μέσω των συνδέσεων των ενδοθηλιακών κυττάρων αλλά και μέσω των ακέραιων ενδοθηλιακών κυττάρων (transcytosis) [49]. Εκτός από τα μονοκύτταρα, σε πρώιμες βλάβες ανευρίσκονται και T λεμφοκύτταρα [49, 50]. Η στρατολόγηση των λευκοκυττάρων στη θέση της βλάβης περιλαμβάνει διάφορα στάδια τα οποία συνοπτικά είναι α) η αντιστρεπτή σύνδεση με το ενδοθήλιο η οποία οδηγεί σε κύλιση των λευκοκυττάρων πάνω σε αυτό, η οποία ακολουθείται από τη μη αντιστρεπτή σύνδεση και ακινητοποίηση και β) η μετανάστευση στον έσω χιτώνα με διείσδυση των λευκοκυττάρων διαμέσου της ενδοθηλιακής στοιβάδας [51].

Γ1) Προσκόλληση των λευκοκυττάρων

Η αύξηση της προσκόλλησης των λευκοκυττάρων οφείλεται σε μεγάλο βαθμό σε αύξηση της έκφρασης στην ενδοαυλική επιφάνεια των ενδοθηλιακών κυττάρων μορίων προσκόλλησης για τα λευκοκύτταρα [50-53]. Η έκφραση των μορίων προσκόλλησης αυξάνει στη θέση ανάπτυξης της βλάβης. Ένας σημαντικός παράγοντας που επάγει την έκφραση των μορίων προσκόλλησης από την έναρξη ανάπτυξης της βλάβης είναι η oxLDL που προκύπτει από την οξείδωση της LDL στον έσω χιτώνα [54, 55]. Υπάρχουν δύο μεγάλες ομάδες μορίων προσκόλλησης, αυτή των μορίων προσκόλλησης που ανήκουν στην υπεροικογένεια των ανοσοσφαιρινών και αυτή των σελεκτινών. Σημαντικό ρόλο παίζει επίσης και η οικογένεια των ιντεγκρινών που αποτελούν υποδοχείς που εκφράζονται στην επιφάνεια των λευκοκυττάρων [50, 51].

Γ1.α) Μόρια προσκόλλησης της οικογένειας των ανοσοσφαιρινών

Τα κύρια μέλη της ομάδας αυτής είναι το VCAM-1 (μόριο προσκόλλησης των αγγειακών κυττάρων, vascular cell adhesion molecule 1) ή CD106 και το ICAM-1 (διακυτταρικό μόριο προσκόλλησης, intercellular adhesion molecule 1). Η έκφραση και των

δύο αυξάνει στα ενδοθηλιακά κύτταρα που καλύπτουν τις θέσεις των αθηροσκληρυντικών βλαβών [56, 57]. Το VCAM-1 παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον καθώς συνδέεται με μία ιντεγκρίνη την VLA-4 (very late antigen 4), η οποία εκφράζεται μόνον στα μονοκύτταρα και στα T λεμφοκύτταρα δηλαδή μόνο στα λευκοκύτταρα που εμπλέκονται στην πρώιμη φάση της αθηρογένεσης [1, 58]. Η μεγαλύτερη σημασία του VCAM-1 στην αθηρογένεση σε σχέση με το ICAM-1, ενισχύεται και από το ότι η έκφραση του VCAM-1 από τα ενδοθηλιακά κύτταρα παρατηρείται πολύ πρώιμα στη θέση μετέπειτα ανάπτυξης αθηρώματος [49]. Όμως και το ICAM-1 παίζει ρόλο στην εξέλιξη της αθηρογένεσης όπως αποδεικνύεται σε μοντέλα πειραματικής αρτηριοσκλήρυνσης σε πειραματόζωα [59].

Γ1.β) Σελεκτίνες

Στις σελεκτίνες περιλαμβάνονται η E-σελεκτίνη (το E προέρχεται από το endothelial λόγω της αρχικής ανεύρεσης του μορίου στα ενδοθηλιακά κύτταρα) ή CD62E και η P-σελεκτίνη ή CD62P (το P προέρχεται από το platelet λόγω της αρχικής ανεύρεσης του μορίου στα αιμοπετάλια) οι οποίες εκφράζονται κυρίως σε ενδοθηλιακά κύτταρα σε θέσεις φλεγμονής [60]. Οι σελεκτίνες προάγουν την κύλιση των λευκοκυττάρων (saltatory ή rolling locomotion) στο ενδοθήλιο ενώ τα VCAM-1 και ICAM-1 οδηγούν σε ισχυρότερη προσκόλληση και ακινητοποίηση των λευκοκυττάρων [51]. Ο ρόλος της E-σελεκτίνης φαίνεται να είναι λιγότερο σημαντικός στην αθηρογένεση καθώς σε αυτήν προσκολλώνται κατά κύριο λόγο πολυμορφοπύρρηνα, ένας κυτταρικός τύπος που δεν ανευρίσκεται στις αθηρωματικές βλάβες, και επιπροσθέτως εκφράζεται σε μικρό βαθμό στα ενδοθηλιακά κύτταρα στις αθηρωματικές βλάβες [1]. Η P-σελεκτίνη πιθανώς παίζει σημαντικότερο ρόλο καθώς εκφράζεται σε μεγαλύτερο βαθμό από τα ενδοθηλιακά κύτταρα στις αθηρωματικές βλάβες και έχει βρεθεί να παίζει ρόλο σε πρώιμα και σε προχωρημένα στάδια της αρτηριοσκλήρυνσης [61, 62]. Επιπρόσθετα, η P-σελεκτίνη η οποία εκφράζεται στα αιμοπετάλια οδηγεί σε παροδική σύνδεση αιμοπεταλίων σε ενδοθηλιακά κύτταρα σε θέσεις φλεγμονής, κατά τη διάρκεια της οποίας μεταφέρεται από τα αιμοπετάλια στην επιφάνεια των ενδοθηλιακών κυττάρων ο συνδέτης χημειοκίνη CCL5 (chemokine (C-C motif) ligand 5) ο οποίος επάγει τη μετανάστευση των μονοκυττάρων [63, 64]. Η συσσώρευση αιμοπεταλίων στο ενδοθήλιο, ιδιαίτερα σε πιο προχωρημένα στάδια της αθηρωματικής βλάβης, επάγει περαιτέρω τη στρατολόγηση μονοκυττάρων μέσω ενεργοποίησης του μεταγραφικού παράγοντα Nf-κB και της επαγωγής της παραγωγής μορίων προσκόλλησης [65].

Γ1.γ) Ιντεγκρίνες

Οι ιντεγκρίνες είναι υποδοχείς της επιφάνειας των λευκοκυττάρων οι οποίοι συνδέονται με μόρια προσκόλλησης της επιφάνειας των ενδοθηλιακών κυττάρων [51]. Αποτελούνται από α και β υπομονάδες οι οποίες σχηματίζουν ετεροδιμερή. Οι σημαντικότερες ιντεγκρίνες που εμπλέκονται στην προσκόλληση των λευκοκυττάρων είναι η α₁β₂ ή LFA-1 (lymphocyte function-associated antigen 1) η οποία εκφράζεται σε όλα τα λευκοκύτταρα, και η α₄β₁ ή VLA-4 η οποία εκφράζεται στα μονοκύτταρα και στα Τ λεμφοκύτταρα. Αυτές συνδέονται με μόρια προσκόλλησης της επιφάνειας των ενδοθηλιακών κυττάρων. Η LFA-1 συνδέεται με τα ICAM 1 και 2 και η VLA-4 με το VCAM 1 [58, 66, 67].

Γ2) Μετανάστευση λευκοκυττάρων

Η άσκηση χημειοτακτικής δράσης είναι απαραίτητη για τη μετανάστευση των προσκολλημένων στα ενδοθηλιακά κύτταρα λευκοκυττάρων, δηλαδή τη μετακίνησή τους μέσω της μονοστοιβάδας των ενδοθηλιακών κυττάρων στον έσω χιτώνα [49, 68]. Μία από τις κυριότερες χημειοτακτικές κυτταροκίνες ή χημειοκίνες, οι οποίες δίνουν το σήμα για μετανάστευση στα λευκοκύτταρα είναι η MCP-1 ή CCL2. Η MCP-1 ασκεί εκλεκτικά χημειοταξία στα μονοκύτταρα και παράγεται από τα ενδοθηλιακά και τα λεία μυϊκά κύτταρα. Η παραγωγή της MCP-1 διεγείρεται από την oxLDL και από μεσολαβητές της φλεγμονής και βρίσκεται σε αυξημένα επίπεδα σε θέσεις αθηρωματικών βλαβών [69, 70]. Έλλειψη της MCP-1 ή του υποδοχέα της δρα ανασταλτικά στην ανάπτυξη αθηρογένεσης σε μοντέλα πειραματοζώων. Εκτός της MCP-1 και του υποδοχέα της CCR2 (C-C motif receptor 2), δεδομένα υπάρχουν για συμβολή στην αθηρογένεση και άλλων χημειοκινών για τα μονοκύτταρα όπως της IL-8 ή CXCL8 (chemokine (C-X-C motif) ligand), της CX3CL1 ή fractalkine (με υποδοχέα τον CX3CR1, C-X-C motif receptor 1), της CCL5 ή RANTES (regulated upon activation normal T cell expressed and secreted) (με υποδοχέα τον CCR5) και της CCL20 (με υποδοχέα τον CCR6) [68, 71, 72]. Μία άλλη ομάδα χημειοκινών δρα εκλεκτικά στα λεμφοκύτταρα και οδηγεί σε μετανάστευσή τους στην αθηρωματική βλάβη [68]. Σε αυτές ανήκουν οι CXCL9 ή MIG (monokine induced by gamma interferon), CXCL10 ή IP-10 (interferon gamma-induced protein 10) και CXCL11 ή I-TAC (interferon-inducible T-cell alpha chemoattractant) οι οποίες έχουν κοινό υποδοχέα τον CXCR3 και έχουν βρεθεί να εκφράζονται στην αθηρωματική πλάκα [73-75].

Δ) Πρόσληψη και ενδοκυττάρια συσσώρευση λιπιδίων - σχηματισμός αφρωδών κυττάρων

Δ1) Πρόσληψη μέσω εκκαθαριστών υποδοχέων - φαγοκυττάρωση

Ένα από τα αρχικά συμβάντα στην θέση ανάπτυξης της αθηρωματικής βλάβης και το πρώτο παρατηρούμενο ιστολογικά είναι η συσσώρευση λιπιδίων στα μακροφάγα και η μετατροπή τους σε αφρώδη κύτταρα. Η πρόσληψη φυσικής μη τροποποιημένης LDL αποδείχθηκε ότι δεν είναι ικανή να οδηγήσει στο σχηματισμό αφρωδών κυττάρων και πως αυτός συμβαίνει μόνο με την παρουσία τροποποιημένης LDL [1, 76, 77]. Παρά το γεγονός ότι τα μακροφάγα εκφράζουν τον υποδοχέα για τη φυσική LDL (LDL receptor, LDL-R), πρόσληψη μέσω αυτού του υποδοχέα δεν μπορεί να οδηγήσει σε υπερφόρτωση με λίπος καθώς η αύξηση της ενδοκυττάριας χοληστερόλης οδηγεί σε μείωση της έκφρασης του υποδοχέα αυτού αναστέλλοντας έτσι την περαιτέρω αύξηση της ενδοκυττάριας χοληστερόλης [23]. Η διατήρηση της αντίστροφης αυτής σχέσης μεταξύ της συγκέντρωσης ενδοκυττάριας χοληστερόλης και έκφρασης του γονιδίου του LDL-R επιτελείται μέσω μίας σειράς ευαίσθητων στη χοληστερόλη μεταγραφικών παραγόντων, των SREBPs (sterol regulatory element – binding proteins) [78]. Την πλέον πειστική απόδειξη ότι ο LDL-R δεν είναι υπεύθυνος για το σχηματισμό αφρωδών κυττάρων, αποτελεί το γεγονός ότι η έλλειψη του LDL-R στην οικογενή υπερχοληστερολαιμία, οδηγεί σε ανάπτυξη βαριάς αθηρωμάτωσης και ξανθωμάτων όπου η παρουσία αφρωδών κυττάρων είναι πλέον έκδηλη [2, 49]. Είναι πλέον αποδεδειγμένο ότι ο σχηματισμός των αφρωδών κυττάρων αποτελεί το αποτέλεσμα πρόσληψης oxLDL από τα μακροφάγα η οποία γίνεται μέσω μιας διαφορετικής ομάδας υποδοχέων, των εκκαθαριστών υποδοχέων [79, 80]. Ένα μεγάλο πλήθος ερευνών έχει ταυτοποιήσει μέχρι σήμερα πολλούς εκκαθαριστές υποδοχείς οι οποίοι εκφράζονται στα μακροφάγα αλλά και σε άλλα κύτταρα, και έχει προσδιορίσει την ικανότητα σύνδεσης σε αυτούς συστατικών της oxLDL αλλά και άλλων συνδετών, ενώ έχει περιγράψει σηματοδοτικές οδούς που εκκινούν από τους υποδοχείς αυτούς [79, 81, 82] (βλέπε παρακάτω II.1.3.3. A1.α. Εκκαθαριστές υποδοχείς (scavenger receptors , SRs), και II.2.4. Σύνδεση της oxLDL στους υποδοχείς των μακροφάγων). Τα περισσότερα στοιχεία που αφορούν στην εμπλοκή και τη σπουδαιότητά των εκκαθαριστών υποδοχέων στο σχηματισμό των αφρωδών κυττάρων αφορούν στους εκκαθαριστές υποδοχείς SRA, CD36 [80, 83]. Εκτός της oxLDL και άλλες μορφές τροποποιημένης LDL αναγνωρίζονται από τους εκκαθαριστές υποδοχείς, όπως η γλυκοζυλιωμένη LDL η πρόσληψη της οποίας από SRA και CD36 μπορεί επίσης να οδηγήσει σε σχηματισμό αφρωδών κυττάρων [84]. Μία βασική διαφοροποίηση μεταξύ του LDL-R και των εκκαθαριστών υποδοχέων η οποία οδηγεί στην

ανεξέλεγκτη συσσώρευση λιπιδίων, είναι ότι η έκφραση των εκκαθαριστών υποδοχέων δεν αναστέλλεται από την αύξηση της συγκέντρωσης της ενδοκυττάριας χοληστερόλης [77, 85]. Αντιθέτως, η έκφραση των εκκαθαριστών υποδοχέων CD36, LOX-1 και SRA αυξάνει στη θέση ανάπτυξης της βλάβης [77, 85-87]. Η σύνδεση της oxLDL με τον CD36 καταλήγει σε αύξηση της μεταγραφής του γονιδίου του CD36 και αύξηση της έκφρασης του CD36 στην επιφάνεια του κυττάρου, επίδραση η οποία οφείλεται σε ενεργοποίηση αρχικά της PKC η οποία οδηγεί σε ενεργοποίηση του πυρηνικού υποδοχέα που δρα ως μεταγραφικός παράγοντας PPAR γ (peroxisome proliferator-activated receptor gamma, υποδοχείς παραγόντων προκαλούντων πολλαπλασιασμό υπεροξεισωματίων) [85, 88, 89]. Η oxLDL αυξάνει επίσης την έκφραση του LOX-1, δράση που πιθανότατα οφείλεται σε ενεργοποίηση της κινάσης p38 που ανήκει στην ομάδα των κινασών MAPK (mitogen-activated protein kinase) και την ενεργοποίηση μέσω αυτής του NF κ B [90, 91]. Ο SRA έχει βρεθεί να αυξάνεται κατά τη διαφοροποίηση των μονοκυττάρων σε μακροφάγα και να έχει αυξημένη έκφραση στα μακροφάγα/αφρώδη κύτταρα της αθηρωματικής πλάκας [92, 93]. Η οξείδωση της LDL, η οποία επιτελείται σε σημαντικό βαθμό από τα ίδια τα μακροφάγα στον έσω χιτώνα, οδηγεί όχι μόνο σε πρόσληψή της μέσω του CD36, αλλά επιπλέον επάγει την αύξηση της έκφρασης του CD36, όπως αποδεικνύεται από την αναστολή της επαγωγής έκφρασης του CD36, σε επώαση LDL με μακροφάγα παρουσία αντιοξειδωτικών ουσιών [94]. Επιπλέον η έκφραση των εκκαθαριστών υποδοχέων βρίσκεται αυξημένη σε οξειδωτικό stress και με την ύπαρξη κλασικών προδιαθεσικών παραγόντων της αθηροσκλήρυνσης όπως του σακχαρώδη διαβήτη, της αρτηριακής υπέρτασης, και αυτό είναι ιδιαίτερα αποδεδειγμένο για τον LOX-1 [79, 90].

Η επίδραση της oxLDL στα μακροφάγα επάγει περαιτέρω την παραγωγή ROS από αυτά και στην επίδραση αυτή μεσολαβούν εκκαθαριστές υποδοχείς όπως ο CD36 [79, 95, 96]. Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, η σύνδεση της LDL με πρωτεογλυκάνες είναι σημαντική για την κατακράτηση της LDL και την έκθεσή της στους οξειδωτικούς παράγοντες. Αρχικά αυτή η κατακράτηση συμβαίνει με σύνδεση της LDL με πρωτεογλυκάνες που φυσιολογικά βρίσκονται στον έσω χιτώνα ενώ στη συνέχεια η ποσότητα πρωτεογλυκανών που συνδέουν LDL αυξάνει από παραγωγή τους από τα μακροφάγα [97]. Εκτός από τα παραπάνω η επίδραση της oxLDL στο μακροφάγο οδηγεί μέσω σηματοδοτικών οδών που εκκινούν από τους εκκαθαριστές και άλλους υποδοχείς αλλά και μέσω της επίδρασης στο εσωτερικό του κυττάρου των λιπιδίων που ενσωματώνονται και ιδίως της χοληστερόλης, σε παραγωγή προφλεγμονωδών παραγόντων που προκαλούν περαιτέρω στρατολόγηση μακροφάγων στον

έσω χιτώνα (βλέπε Π.1.3.3. Α1. Φλεγμονή – φυσική ανοσία – μονοκύτταρα/μακροφάγα) [52, 53, 79, 98].

Είναι προφανές από τα παραπάνω ότι ήδη σε αυτό το πολύ αρχικό στάδιο δημιουργίας της βλάβης, το σχηματισμό των αφρωδών κυττάρων, σχηματίζεται ένας μηχανισμός θετικής ανατροφοδότησης ανάπτυξης της βλάβης όπου η παρουσία LDL στον έσω χιτώνα και η οξειδωσή της οδηγεί μέσω των εκκαθαριστών υποδοχέων σε υπερφόρτωση των μακροφάγων και περαιτέρω αύξηση της οξειδωσης και έκφραση των εκκαθαριστών υποδοχέων. Ο ανατροφοδοτικός αυτός κύκλος ενισχύεται περαιτέρω καθώς συνοδεύεται από α) παράλληλη αύξηση της κατακράτησης της LDL στον έσω χιτώνα β) μείωση της κινητικότητας των μονοκυττάρων και την παραμονή τους στον έσω χιτώνα και γ) την παραγωγή προφλεγμονωδών παραγόντων που επάγουν την είσοδο στον έσω χιτώνα και άλλων μονοκυττάρων.

Οι εκκαθαριστές υποδοχείς είναι υποδοχείς ενδοκυττάρωσης [77, 79]. Το σύμπλεγμα συνδέτη – εκκαθαριστή υποδοχέα εισέρχεται στο κύτταρο και καταλήγει σε ενδοσώματα όπου ο υποδοχέας αποσυνδέεται. Ο υποδοχέας μετά την αποσύζευξή του είτε επιστρέφει στην κυτταρική μεμβράνη είτε καταβολίζεται. Οι παράγοντες ρύθμισης της διαδικασίας αυτής δεν έχουν διευκρινιστεί. Ο συνδέτης μεταφέρεται από τα ενδοσώματα σε λυσοσώματα όπου και καταβολίζεται. Παρότι η πρόσληψη τροποποιημένων LDL από το μακροφάγο γίνεται κατά κύριο λόγο μέσω των εκκαθαριστών υποδοχέων, μελέτες σε κυτταρικές καλλιέργειες αλλά και δεδομένα από διαγονιδιακά πειραματόζωα με έλλειψη συνδυασμού υποδοχέων, υποδεικνύουν ότι σε ένα μικρό βαθμό πρόσληψη γίνεται και μέσω φαγοκυττάρωσης LDL που κατακρατείται στη θεμέλια ουσία ή βρίσκεται σε συσσωματώματα [80, 99]. Σε μηχανισμούς φαγοκυττάρωσης πιθανότατα συμμετέχουν και εκκαθαριστές υποδοχείς καθώς αφενός η LDL που κατακρατείται στη θεμέλια ουσία στον έσω χιτώνα οξειδώνεται και αφετέρου μόρια της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας αναγνωρίζονται ή συμμετέχουν στην αναγνώριση από εκκαθαριστές υποδοχείς όπως έχει αποδειχτεί για τον CD36 και τα μόρια της θεμέλιας ουσίας biglycan και decorin [100].

Δ2) Μεταβολισμός λιποπρωτεϊνών – εκροή χοληστερόλης

Αντικείμενο έρευνας αποτελεί επίσης το εάν διαταραχή στο μεταβολισμό της χοληστερόλης η οποία ενσωματώνεται στο μακροφάγο συμβάλλει στο σχηματισμό των αφρωδών κυττάρων [79, 80, 99, 101]. Φυσιολογικά, οι λιποπρωτεΐνες που ενσωματώνονται μεταφέρονται σε ενδοσώματα και εν συνεχεία σε λυσοσώματα όπου το πρωτεϊνικό τμήμα υδρολύεται από πρωτεάσες και οι εστέρες χοληστερόλης υδρολύονται από όξινες εστεράσες

σε ελεύθερη χοληστερόλη και λιπαρά οξέα [23, 102]. Η ελεύθερη χοληστερόλη παραλαμβάνεται στο ενδοπλασματικό δίκτυο και μέσω των SREBPs αναστέλλει τη μεταγραφή του LDL-R καθώς και την ενδογενή σύνθεση χοληστερόλης καταστέλλοντας το ένζυμο που ελέγχει το ρυθμό σύνθεσής της, το 3-υδροξυ-μεθυλογλουταρυλο συνένζυμο Α (3-hydroxy-methylglutaryl coenzyme A, HMG-CoA) [78, 80, 103, 104]. Μέρος της ελεύθερης χοληστερόλης επανεστεροποιείται από το ένζυμο ακυλ-CoA:εστέρας χοληστερόλης τρανσφεράση (acyl-CoA:cholesterol ester transferase, ACAT) και η εστεροποιημένη αυτή χοληστερόλη μπορεί εκ νέου να υδρολυθεί [105]. Παράλληλα με την οδό της συνεχούς υδρόλυσης και εστεροποίησης, η ελεύθερη χοληστερόλη μπορεί να ακολουθήσει την οδό της εκροής έξω από το κύτταρο [106, 107]. Η ελεύθερη χοληστερόλη μετακινείται και ενσωματώνεται στην κυτταροπλασματική μεμβράνη και εν συνεχεία παραλαμβάνεται μαζί με φωσφολιπίδια από την HDL [1, 108]. Η εκροή της χοληστερόλης προς την HDL αποτελεί την έναρξη της αντίστροφης μεταφοράς χοληστερόλης από την αρχόμενη αθηρωματική βλάβη προς το ήπαρ, μηχανισμός που μπορεί να αναστρέψει τη συσσώρευση χοληστερόλης στο μακροφάγο και να οδηγήσει σε υποστροφή της βλάβης και για το λόγο αυτό συγκεντρώνει αυξανόμενο ερευνητικό ενδιαφέρον [1, 99, 101]. Η μεταφορά αυτή ελέγχεται από τις πρωτεΐνες ABCA1 και ABCG1 [99, 107]. Οι πρωτεΐνες αυτές ανήκουν στην οικογένεια των διαμεμβρανικών πρωτεϊνών που χρησιμοποιούν ATP για να μεταφέρουν διάφορα υποστρώματα διαμέσου της κυτταροπλασματικής μεμβράνης (ATP-binding cassette transporters) [109]. Σε πειραματικά μοντέλα αθηροσκλήρυνσης σε πειραματόζωα η έλλειψη ή η υπερέκφραση των αντίστοιχων γονιδίων οδήγησε σε αύξηση και σε περιορισμό της ανάπτυξης αθηρωμάτωσης αντίστοιχα [107, 109-112]. Η μεταγραφή των ABCA1 και ABCG1 επάγεται από τους εξαρτώμενους από στερόλες μεταγραφικούς παράγοντες με την ονομασία ηπατικοί υποδοχείς X (liver X receptors, LXRs) και συγκεκριμένα από τους LXRA και β [80, 113]. Οι υποδοχείς αυτοί οι οποίοι ανευρίσκονται στο ηπατικό κύτταρο, από όπου πήραν την ονομασία τους (βλέπε II.2.2. Μεταβολισμός λιποπρωτεϊνών), εκφράζονται και στο μακροφάγο και ενεργοποιούνται από οξυστερόλες [113]. Στο μακροφάγο λειτουργούν όσον αφορά στην ομοιοστασία της χοληστερόλης με τρόπο ανάλογο των SREBPs, καθώς αύξηση της ενσωματωμένης χοληστερόλης αυξάνει την ενεργοποίησή τους η οποία οδηγεί σε επαγωγή της μεταγραφής ABCs με αποτέλεσμα την αύξηση της εκροής χοληστερόλης [113-115]. Χειρισμοί των LXRs σε πειραματικά μοντέλα αθηροσκλήρυνσης σε πειραματόζωα με εξάλειψη γονιδίων οδήγησε σε αύξηση του σχηματισμού αφρωδών κυττάρων και επίταση της φλεγμονής στο αρτηριακό τοίχωμα, ενώ η

αύξηση της ενεργοποίησης με χορήγηση αγωνιστών οδήγησε σε αντίθετα αποτελέσματα [113].

Παρά τις εύλογες θεωρητικές υποθέσεις σχετικά με τη συμβολή στο σχηματισμό των αφρωδών κυττάρων, διαταραχών στο μεταβολισμό των λιποπρωτεϊνών που ενσωματώνονται στο μακροφάγο, λίγα ερευνητικά δεδομένα υπάρχουν μέχρι τώρα. Έχει διατυπωθεί η υπόθεση ότι η ενσωμάτωση της oxLDL μέσω εκκαθαριστών υποδοχέων δεν είναι ικανή να διεγείρει τη φυσιολογική οδό καταβολισμού όπως συμβαίνει με την ενσωμάτωση LDL μέσω του LDL-R. Δεδομένα από σχετική μελέτη σε κυτταροκαλλιέργειες έδειξαν πως αυτό πιθανώς ισχύει για τον SR-B1 αλλά όχι για τον CD36 καθώς ενσωμάτωση της oxLDL μέσω του SR-B1 δεν συνοδεύεται από επαρκή καταβολισμό της σε αντίθεση με την ενσωμάτωση και τον επαρκή καταβολισμό που παρατηρείται με την ύπαρξη του CD36 [116]. Ο SR-B1 εκφράζεται στο μακροφάγο και συνδέεται με τροποποιημένες LDL όμως δεν θεωρείται από τους κύριους εκκαθαριστές υποδοχείς που μεσολαβούν στην πρόσληψη της oxLDL [79, 80]. Όσον αφορά στον μεταβολισμό της χοληστερόλης, έχει βρεθεί ότι όταν η συγκέντρωση της ελεύθερης χοληστερόλης υπερβεί κάποιο όριο προκαλείται σημαντική μείωση της εκροής χοληστερόλης λόγω αυξημένης αποικοδόμησης του ABCA1 [117]. Επίσης, δεδομένα υποδεικνύουν μειωμένη έκφραση των ABCs μέσω αναστολής των LXRs η οποία προκαλείται από την ενεργοποίηση υποδοχέων τύπου Toll (Toll-like receptors, TLRs) οι οποίοι, όπως θα αναφερθεί παρακάτω, εκφράζονται σε αφθονία στην επιφάνεια του μακροφάγου, αποτελούν υποδοχείς για πλήθος συνδέτες, μεταξύ των οποίων η oxLDL, και αποτελούν σημαντικό παράγοντα ανάπτυξης της φλεγμονής (βλέπε παρακάτω Α1.β. Υποδοχείς τύπου Toll) [52, 118].

Έχει επίσης καταδειχθεί ότι με την πρόοδο της βλάβης αυξάνει η αναλογία ελεύθερης προς εστεροποιημένη χοληστερόλη γεγονός που θα μπορούσε να αποδοθεί σε μειωμένη εκροή χοληστερόλης ή σε μειωμένη δραστηριότητα της ACAT [119]. Η ελεύθερη χοληστερόλη δρα τοξικά στο κύτταρο επάγοντας μεταξύ άλλων την απόπτωση του μακροφάγου. Απόπτωση μακροφάγων παρατηρείται σε πρώιμες αλλά ιδιαίτερα σε προχωρημένες βλάβες όπου θεωρείται σημαντικός παράγοντας του νεκρωτικού πυρήνα της βλάβης και κατ' επέκταση του σχηματισμού ευάλωτης πλάκας [80, 119]. Έχει βρεθεί επίσης ότι στη συσσώρευση ελεύθερης χοληστερόλης παίζει ρόλο και το είδος των οξυστερολών που προκύπτουν από τη χοληστερόλη οι οποίες πιθανώς επηρεάζουν την εκροή ή την εστεροποίησή της, καθώς άλλες οξυστερόλες όπως η 27-υδροξυχοληστερόλη προάγουν τη μείωση της ελεύθερης χοληστερόλης ενώ άλλες οξυστερόλες όπως η 7-κετοχοληστερόλη προκαλούν συσσώρευση ελεύθερης χοληστερόλης [120]. Συμπερασματικά, ο παθολογικός

μεταβολισμός των προσλαμβανόμενων λιπιδίων και κυρίως η προσπάθεια επέμβασης στους μηχανισμούς δημιουργίας των αφρωδών κυττάρων ιδιαίτερα όσον αφορά στην εκροή χοληστερόλης και φωσφολιπιδίων αποτελεί ένα σημαντικό πεδίο έρευνας με πιθανές μελλοντικές θεραπευτικές εφαρμογές.

E) Εντοπισμός των βλαβών

Η εστιακή ανάπτυξη της αρτηριοσκλήρυνσης καθώς και η προτίμηση της ανάπτυξής της σε συγκεκριμένες θέσεις δεν έχει ακόμη πλήρως κατανοηθεί. Παρά το ότι η επίδραση οποιουδήποτε από τους γνωστούς παράγοντες κινδύνου ασκείται ομοιόμορφα σε όλη την έκταση των αρτηριών, η ανάπτυξη των βλαβών κατανέμεται άνισα. Σχετικά με αυτό, έχει υποστηριχθεί από κάποιους η υπόθεση της μονοκλωνικής ανάπτυξης των αθηρωματικών βλαβών η οποία στηρίζεται στην ανεύρεση μονοτυπίας διαφόρων μοριακών δεικτών στα λεία μυϊκά κύτταρα σε διαφορετικές αθηρωματικές βλάβες του ίδιου ατόμου και η οποία θεωρεί τις βλάβες σαν ένα είδος λειομυωμάτων του αγγειακού τοιχώματος [121]. Η ανάπτυξη των αρτηριοσκληρωτικών βλαβών αφορά πολύ συχνότερα στα εγγύτερα τμήματα μετά από διακλαδώσεις. Το γεγονός αυτό οδήγησε στην έρευνα της επίδρασης των μεταβολών της ροής του αίματος στην ανάπτυξη της αρτηριοσκλήρυνσης. Η ροή του αίματος εξασκεί, με την επαφή και τριβή κυρίως των εμμόρφων συστατικών του με τα ενδοθηλιακά κύτταρα, μία συνεχή επίδραση η οποία ορίζεται ως stress διατμητικής τάσης (shear stress) και η οποία είναι διαφορετική από το μηχανικό stress που εξασκείται από τις κάθετες δυνάμεις που εξασκούνται στο αρτηριακό τοίχωμα και το οποίο αναφέρεται στην επίδραση της αρτηριακής πίεσης και οδηγεί σε επαγωγή του οξειδωτικού stress κυρίως μέσω επαγωγής της NADPH οξειδάσης (βλέπε II.1.3.1. Παράγοντες κινδύνου) [20]. Η φυσιολογική σε ταχύτητα και παράλληλη προς το τοίχωμα ροή ασκεί μία ευεργετική προς το αγγειακό τοίχωμα επίδραση επάγοντας στα ενδοθηλιακά κύτταρα, μέσω σηματοδοτικών οδών που ξεκινούν από μηχανοϋποδοχείς, την έκφραση γονιδίων που προστατεύουν από την ανάπτυξη αθηροσκλήρυνσης όπως της eNOS και της SOD [122-124]. Επίσης ενεργοποιεί το μεταγραφικό παράγοντα Kruppel-like factor 2 (KLF2) ο οποίος δρα ανασταλτικά στη λειτουργία του αθηρογόνου μεταγραφικού παράγοντα NF-κB [125]. Μία ακόμη προστατευτική οδός η οποία επάγεται από το φυσιολογικό stress διατμητικής τάσης είναι ο περιορισμός της έκφρασης ενός άλλου ρυθμιστή της ενδοθηλιακής λειτουργίας, της Txnip (thioredoxin-interacting protein) [126]. Η Txnip αναστέλλει τη δράση της thioredoxin η οποία εξασθενεί τη δράση του παράγοντα ASK1 (apoptosis signal-regulating kinase 1) ενόσω ενεργοποιητή κινασών MAPK όπως των JNK (c-Jun N-terminal kinase) και της p38 οι

οποίες αποτελούν βασικά στοιχεία σηματοδοτικών οδών που καταλήγουν σε αθηρογενετικές δράσεις και οι οποίες αποτελούν τις οδούς μέσω των οποίων δρουν φλεγμονώδεις κυτταροκίνες όπως ο TNF. Όταν η ροή του αίματος μεταβάλλεται από το φυσιολογικό πρότυπο, είτε επειδή καθίσταται στροβιλώδης είτε ως προς την ταχύτητά της, τότε η φυσιολογική αθηροπροστατευτική δράση του stress διατμητικής τάσης εξασθενεί ενώ επιπλέον ενεργοποιούνται και αθηρογόνοι οδοί κυρίως με επαγωγή οξειδωτικού stress. Τα δεδομένα αυτά μπορούν εν μέρει να εξηγήσουν την προδιάθεση ανάπτυξης αθηροσκλήρυνσης σε συγκεκριμένες θέσεις όπως μετά από διχασμούς αρτηριών, όπου υπάρχει μεταβολή της ροής και θεμελιώνουν το stress διατμητικής τάσης σαν παράγοντα που παίζει ρόλο τόσο στην έναρξη δημιουργίας της βλάβης όσο και στην περαιτέρω εξέλιξή της, όταν ο σχηματισμός πλακών μεταβάλλει τις συνθήκες ροής του αίματος.

II.1.3.3. Εξέλιξη της αθηρωμάτωσης

A) Μηχανισμοί φλεγμονής - φυσική και επίκτητη ανοσία

Ο ρόλος της φλεγμονής στην αθηρογένεση είναι θεμελιώδης όπως προκύπτει από πλήθος δεδομένων βασικής και κλινικής έρευνας [50, 52, 127]. Η φλεγμονώδης διεργασία προκύπτει από μηχανισμούς της φυσικής αλλά και της επίκτητης ανοσίας. Ο όρος φυσική ανοσία αναφέρεται στη φλεγμονώδη απόκριση η οποία δεν εξαρτάται από αντιγονικό ερεθισμό ενώ με τον όρο επίκτητη ανοσία δηλώνεται η ειδική έναντι αντιγόνων απόκριση. Κύτταρα της φυσικής ανοσίας είναι τα ουδετερόφιλα, τα μονοκύτταρα/μακροφάγα και τα δενδριτικά κύτταρα ενώ της επίκτητης ανοσίας τα T και B λεμφοκύτταρα.

A1) Φλεγμονή – φυσική ανοσία – μονοκύτταρα/μακροφάγα

Ο ρόλος της φυσικής ανοσίας στην αθηρογένεση είναι αυτός που αναγνωρίστηκε νωρίτερα, συγκεντρώνει το μεγαλύτερο όγκο ερευνητικών δεδομένων και επίκεντρό της είναι το μακροφάγο [52, 53, 80, 128]. Τα μακροφάγα είναι τα κύτταρα τα οποία αποτελούν τον πολυπληθέστερο και ενωρίτερα ανευρισκόμενο πληθυσμό λευκοκυττάρων στις θέσεις ανάπτυξης αθηρωμάτωσης [1, 53].

Τα μονοκύτταρα που στρατολογούνται στη θέση ανάπτυξης της βλάβης διαφοροποιούνται σε μακροφάγα και αποκτούν ικανότητα πολλαπλασιασμού [129]. Τα μακροφάγα συγχρόνως με την πρόσληψη και συσσώρευση λιπιδίων παράγουν και εκκρίνουν ένα πλήθος μεσολαβητών φλεγμονής, κυτταροκινών και χημειοκινών, ελεύθερες ρίζες οξυγόνου και ποικίλα εικοσανοειδή και λιπίδια όπως λευκοτριένες και τον παράγοντα ενεργοποίησης αιμοπεταλίων (platelet-activating factor, PAF) [1, 2, 52, 98]. Οι παράγοντες

αυτοί προάγουν και συντηρούν τις φλεγμονώδεις διεργασίες δημιουργώντας με πλήθος επιδράσεων κυκλώματα θετικής ανατροφοδότησης της φλεγμονής και διαδραματίζουν έτσι σημαντικό ρόλο στην έναρξη και στην εξέλιξη της αθηρογένεσης. Τα μονοκύτταρα/μακροφάγα εκφράζουν ένα πλήθος υποδοχέων οι οποίοι ανήκουν στην κατηγορία που πλέον αναγνωρίζεται ως υποδοχείς αναγνώρισης μοριακών προτύπων (pattern recognition receptors, PRRs) [52, 98]. Οι PRRs εμπλέκονται στην αθηρογένεση, εκφράζονται κυρίως στα μακροφάγα αλλά και σε άλλα κύτταρα του αρτηριακού τοιχώματος, και περιλαμβάνουν τους εκκαθαριστές υποδοχείς (scavenger receptors, SRs) και τους υποδοχείς τύπου Toll (Toll-like receptors, TLRs) ενώ πρόσφατα σε αυτούς κατατάσσεται και τμήμα του φλεγμονοσώματος, μίας πρωτεϊνικής δομής του κυτταροπλάσματος με σημαντικό ρόλο στη φλεγμονή.

Οι εκκαθαριστές υποδοχείς είναι υποδοχείς που οδηγούν σε ενδοκυττάρωση του συνδέτη τους και όπως ήδη αναφέρθηκε έχουν κυρίαρχο ρόλο στην πρόσληψη των τροποποιημένων λιποπρωτεϊνών και στο σχηματισμό των αφρωδών κυττάρων. Η είσοδος και συσσώρευση συστατικών της oxLDL οδηγεί σε παραγωγή προφλεγμονωδών κυτταροκινών. Επιπλέον, από τους εκκαθαριστές υποδοχείς εκκινούν σηματοδοτικές οδοί που εμπλέκονται στην αθηρογένεση. Οι TLRs δεν είναι υποδοχείς ενδοκυττάρωσης και η σημασία τους έγκειται στο ότι η ενεργοποίηση από τους συνδέτες τους, εκκινεί ένα πλήθος σηματοδοτικών οδών, η αναγνώριση των οποίων τους έχει προσδώσει κυρίαρχο ρόλο στην έναρξη και διαίونيση της φλεγμονής.

A1.α) Εκκαθαριστές υποδοχείς (scavenger receptors , SRs)

Οι εκκαθαριστές υποδοχείς αναγνωρίζουν ένα ευρύ φάσμα συνδετών που αποτελούν είτε εξωγενή συστατικά όπως συστατικά μικροοργανισμών, είτε ενδογενή συστατικά του οργανισμού όπως oxLDL και συστατικά αποπτωτικών κυττάρων, οδηγώντας σε εκκαθάρισή τους [77, 79]. Η σύνδεση σε εκκαθαριστή υποδοχέα οδηγεί σε ενδοκυττάρωση όπως συμβαίνει με τροποποιημένες LDL ή συμβάλλει στη διαδικασία της φαγοκυττάρωσης όπως συμβαίνει στην περίπτωση αποπτωτικών κυττάρων. Η σημασία τους έχει αποδειχθεί κυρίως όσον αφορά στην αναγνώριση τροποποιημένων LDL όπου ένας μεγάλος όγκος δεδομένων έχει καταδείξει το σημαντικό ρόλο των εκκαθαριστών υποδοχέων στους μηχανισμούς της αθηρογένεσης από την έναρξη ανάπτυξης της αθηρωματικής βλάβης.

Οι εκκαθαριστές υποδοχείς έχουν μελετηθεί κυρίως στα μονοκύτταρα/μακροφάγα, εκφράζονται όμως και σε πλήθος άλλων κυττάρων συμπεριλαμβανομένων και των ενδοθηλιακών και των λείων μυϊκών κυττάρων και των αιμοπεταλίων. Οι εκκαθαριστές

υποδοχείς που εκφράζονται σε κύτταρα της θέσης ανάπτυξης της βλάβης και για τους οποίους υπάρχουν στοιχεία ότι παίζουν ρόλο στην αθηρογένεση, κατηγοριοποιούνται α) στην τάξη A όπου ανήκουν οι SRAI/SRAII και MARCO, β) στην τάξη B η οποία περιλαμβάνει τον SR36 και τον SRBI γ) στην τάξη E που εκπροσωπείται από τον LOX1, δ) στην τάξη F που περιλαμβάνει τους SREC-I και II και ε) στην τάξη G όπου κατατάσσεται ο SR-PSOX/CXCL16 [79].

Ως κυριότεροι εκκαθαριστές υποδοχείς για τα μονοκύτταρα/μακροφάγα και για τα αιμοπετάλια θεωρούνται ο CD36 και οι SRA και για τα ενδοθηλιακά κύτταρα ο LOX1. Συνοπτικά, οι εκκαθαριστές υποδοχείς αναγνωρίζουν ένα πλήθος συνδετών μεταξύ των οποίων oxLDL, απολιποπρωτεΐνες, οξειδωμένα φωσφολιπίδια, AGEs, αποπτωτικά κύτταρα και στοιχεία της εξωκυττάριας ουσίας. Στην εμπλοκή τους στην αθηρογένεση μπορούμε να διακρίνουμε αδρά τρεις οδούς α) την εκκίνηση σηματοδοτικών οδών μετά τη σύνδεση του υποδοχέα με το συνδέτη τους β) την είσοδο στο κύτταρο και τη συσσώρευση συστατικών της oxLDL (βλέπε II.1.3.2.Δ. Πρόσληψη και ενδοκυττάρια συσσώρευση λιπιδίων - σχηματισμός αφρωδών κυττάρων) και γ) τη συνέργεια εκκαθαριστών υποδοχέων με TLRs (βλέπε II.1.3.3.A1. Αλληλεπίδραση εκκαθαριστών υποδοχέων με TLRs). Στη συνέχεια θα αναφερθούν τα σημαντικότερα στοιχεία που αφορούν στην επίδραση των εκκαθαριστών υποδοχέων στην ανάπτυξη της αθηρογένεσης (**Πίνακας II.1**).

A1.a.1) Τάξη A: SRAI/II και MARCO

SRAI/II

Μεταξύ του SRAI και του SRAII δεν έχουν περιγραφεί μέχρι τώρα διαφορές όσον αφορά στην έκφραση, στους συνδέτες και στο ρόλο τους στην αθηρογένεση και ως εκ τούτου αντιμετωπίζονται ως ενιαίο σύνολο. Οι SRA εκφράζονται στα μακροφάγα καθώς και στα δενδριτικά κύτταρα, στα αγγειακά ενδοθηλιακά κύτταρα και στα λεία μυϊκά κύτταρα της αθηρωματικής πλάκας [79]. Αναγνωρίζουν ένα ευρύ φάσμα συνδετών που ανευρίσκονται σε αθηρωματικές πλάκες. Στους συνδέτες τους περιλαμβάνονται η oxLDL, η acLDL, η λυσοφωσφατιδυλοχολίνη η ApoA-I, η ApoB, η ApoE, AGEs όπως γλυκοζυλιωμένο κολλαγόνο τύπου IV και γλυκοζυλιωμένη αλβουμίνη, συστατικά της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας όπως το decorin και το biglycan, πρωτεΐνες θερμικού σοκ (heat shock proteins, HSPs) όπως η HSP70 και αποπτωτικά κύτταρα [100, 130].

Πίνακας Π.1.
Επιδράσεις των εκκαθαριστών υποδοχέων στην ανάπτυξη της αθηροσκλήρυνσης

Τάξη A: SRAI/II και MARCO

SRAI/II

πρόσληψη oxLDL και σχηματισμός αφρωδών κυττάρων [80, 98]
παραγωγή κυταροκινών όπως TNF- α και IL-1 [131, 132]
αύξηση της επαγόμενης από την MCP-1 μετανάστευση των μονοκυττάρων [133]
αναστολή της απομάκρυνσης των μακροφάγων από τη θέση ανάπτυξης της βλάβης [130, 134-136]
αύξηση του πολλαπλασιασμού των μακροφάγων μέσω αύξησης της παραγωγής GM-CSF [137, 138]
επαγωγή απόπτωσης των μακροφάγων [139]
επίδρασης της τροποποίησης της γονιδιακής έκφρασης των SRA σε πειραματόζωα:
εξάλειψη σε ApoE $^{-/-}$ και LDLR $^{-/-}$ ποντίκια \rightarrow μείωση της ανάπτυξης αθηροσκλήρυνσης [133, 140-143]
υπερέκφραση σε ApoE $^{-/-}$ και LDLR $^{-/-}$ ποντίκια \rightarrow χωρίς μεταβολή ή μικρή μείωση της
ανάπτυξης αθηροσκλήρυνσης [144-146]

MARCO

πιθανός ρόλος στη λειτουργία του μακροφάγου σαν αντιγονοπαρουσιαστικό κύτταρο [147]

Τάξη B: CD36 και SRB1

CD36

πρόσληψη oxLDL και σχηματισμός αφρωδών κυττάρων [80, 98]
μείωση εκροής χοληστερόλης και φωσφολιπιδίων από τα μακροφάγα [148]
αύξηση παραγωγής ROS [96, 133]
παραγωγή κυταροκινών όπως TNF- α/β , IL-1 και IFN β/γ [149]
αύξηση της ανταπόκρισης των μονοκυττάρων στη χημειοτακτική δράση της MCP-1 [133]
αναστολή της απομάκρυνσης των μακροφάγων από τη θέση ανάπτυξης της βλάβης [87, 150]
επαγωγή απόπτωσης των μακροφάγων [151]
αύξηση ικανότητας προσκόλλησης των αιμοπεταλίων σε κολλαγόνο [152]
ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων με αύξηση ικανότητας συσσώρευσης, αυξημένη έκφραση P-σελεκτίνης
και της ενεργοποιημένης μορφής του υποδοχέα του ινωδογόνου [153]
πιθανή συμμετοχή στην ινσουλινοαντίσταση [82, 85]
επίδραση της εξάλειψης της έκφρασης CD36 στην ανάπτυξη αθηροσκλήρυνσης σε ApoE $^{-/-}$ ποντίκια:
εξάλειψη γονιδίου CD36 \rightarrow μείωση της ανάπτυξης αθηροσκλήρυνσης [133, 154]
μεταμόσχευση CD36 $^{-/-}$ μυελού των οστών \rightarrow μείωση της ανάπτυξης αθηροσκλήρυνσης [155]

SRB1

αύξηση εκροής χοληστερόλης από τα μακροφάγα και αντίστροφη μεταφορά χοληστερόλης
από την περιφέρεια προς το ήπαρ [1, 77]

επαγωγή της eNOS [156]

επίδραση στην ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων: αύξηση σε μείωση της έκφρασης του SRB1 [157]
αύξηση σε σύνδεση με oxLDL [139]
μείωση σε σύνδεση με oxHDL [139]

Τάξη E: LOX1

αύξηση παραγωγής ROS από τα ενδοθηλιακά κύτταρα [90, 158, 159]
μείωση των επιπέδων NO και της έκφρασης της eNOS [159, 160]
αύξηση της έκφρασης των μορίων προσκόλλησης VCAM-1, ICAM-1, P και E-σελεκτίνης [81, 90]
αύξηση της παραγωγής MCP-1 από τα ενδοθηλιακά κύτταρα [81, 90]
αύξηση της παραγωγής MMPs 1, 3, 9 από τα ενδοθηλιακά κύτταρα [160]
επαγωγή απόπτωσης ενδοθηλιακών κυττάρων [161]
αύξηση παραγωγής TGF β 1 [162]
μεσολάβηση στην αθηρογόνο δράση της αγγειοτασίνης II [163, 164]
εξάλειψη του γονιδίου του LOX-1 σε LDLR $^{-/-}$ ποντίκια \rightarrow μείωση της ανάπτυξης αθηροσκλήρυνσης [165]

Τάξη F: SREC-I και II

μικρή συμμετοχή στην πρόσληψη τροποποιημένων LDL από τα μακροφάγα [77]

Τάξη G: SR-PSOX/CXCL16

σύνδεση πολυμορφισμού του γονιδίου του με τη βαρύτητα της στεφανιαίας νόσου [166]

Ο έλεγχος της έκφρασης των SRA επάγεται κυρίως μέσω του μεταγραφικού παράγοντα AP-1 (activator protein 1) ενώ η ενεργοποίηση των PPAR- γ αναστέλλει τη μεταγραφή τους [130, 167]. Μία σειρά κυτταροκινών και αυξητικών παραγόντων που παράγονται στις θέσεις ανάπτυξης της βλάβης και εμπλέκονται είτε στη διαφοροποίηση και στην ανάπτυξη των μονοκυττάρων/μακροφάγων είτε στην αθηρογένεση, έχουν εξεταστεί για την επίδρασή τους στην έκφραση των SRA στα μακροφάγα. Ο παράγοντας διέγερσης αποικιών μακροφάγων (macrophage colony-stimulating factor, M-CSF) επάγει την έκφραση των SRA ενώ το ίδιο έχει αναφερθεί και για τον παράγοντα διέγερσης αποικιών κοκκιοκυττάρων (granulocyte colony-stimulating factor, G-CSF) μόνο όμως σε μακροφάγα ποντικού ενώ σε ανθρώπινα μονοκύτταρα βρέθηκε να έχει αντίθετη δράση [168-170]. Ο TNF- α , η IFN- γ και ο μετατρεπτικός αυξητικός παράγοντας β (transforming growth factor β , TGF- β) ασκούν αρνητική επίδραση στην έκφραση των SRA ενώ ο PDGF επάγει την έκφρασή τους [130, 171, 172]. Η σύνδεση στους SRA επάγει την παραγωγή κυτταροκινών όπως του TNF- α και της IL-1 και η επαγωγή αυτή μεσολαβείται από διάφορες σηματοδοτικές οδούς που περιλαμβάνουν την κινάση PI-3K (phosphatidylinositol 3-kinase), MAPKs και την PKC [131, 132].

Οι SRA μαζί με τον CD36 θεωρούνται οι κύριοι υποδοχείς που συνδέονται με τη μετατροπή μακροφάγων σε αφρώδη κύτταρα καθώς μέσω αυτών προσλαμβάνονται από τα μακροφάγα μεγάλες ποσότητες λιπιδίων [80, 98, 173]. Οι SRA παίζουν ρόλο και στη στρατολόγηση μονοκυττάρων καθώς η απουσία τους βρέθηκε να μειώνει την επαγόμενη από την MCP-1 μετανάστευση των μονοκυττάρων [133]. Η ικανότητα σύνδεσης των SRA με στοιχεία της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας ή με σύμπλοκά τους με λιποπρωτεΐνες καθώς και με γλυκοζυλιωμένα παράγωγά τους, συμβάλλει στην αναστολή της μετανάστευσης και της απομάκρυνσης των μακροφάγων από τη θέση ανάπτυξης της βλάβης στον έσω χιτώνα [130, 134-136]. Η σύνδεση oxLDL με SRA βρέθηκε να επάγει τον πολλαπλασιασμό και την αύξηση των μακροφάγων, επίδραση η οποία οφειλόταν σε αύξηση της παραγωγής του παράγοντα διέγερσης αποικιών κοκκιοκυττάρων και μακροφάγων (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, GM-CSF) μέσω ενεργοποίησης της PKC [137, 138]. Η αύξηση της παραγωγής του GM-CSF είναι σημαντική στη διαδικασία της αθηρογένεσης πέραν της αυξητικής δράσης και λόγω της επίδρασής της στη διαφοροποίηση των μονοκυττάρων προς τον φλεγμονώδη και αθηρογενετικό M1 υποπληθυσμό των μακροφάγων (βλέπε παρακάτω II.1.3.3.A5. Διαφοροποίηση μακροφάγων – υποπληθυσμοί μακροφάγων). Επιπλέον, η αυξημένη πρόσληψη τροποποιημένων LDL από τους SRA βρέθηκε να είναι ιδιαίτερα σημαντική στην επαγωγή της απόπτωσης των μακροφάγων σε συνθήκες stress του

ενδοπλασματικού δικτύου το οποίο προκαλείται από συσσώρευση ελεύθερης χοληστερόλης σε αυτό, χαρακτηριστικό των μακροφάγων σε θέσεις προχωρημένης αθηρωματικής βλάβης το οποίο παίζει σημαντικό ρόλο στο σχηματισμό του νεκρωτικού πυρήνα της αθηρωματικής πλάκας [174]. Πέραν των μακροφάγων, οι SRA εμπλέκονται και στην ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων. Επίδραση oxLDL μέσω των SRA και του CD36 σε αιμοπετάλια βρέθηκε να διπλασιάζει τη συγκόλλησή τους σε ινωδογόνο [139].

Ο ρόλος των SRA στην αθηρογένεση έχει μελετηθεί σε διαγονιδιακά πειραματόζωα με γονιδιακή εξάλειψη ή υπερέκφραση των SRA. Στην πλειονότητά τους τα αποτελέσματα από τις μελέτες αυτές υποστηρίζουν τον αθηρογόνο ρόλο των SRA, υπήρξαν όμως και μελέτες με αντίθετες εκβάσεις. Γονιδιακή εξάλειψη των SRA σε μοντέλα υπερλιπιδαιμίας όπως τα ApoE^{-/-} και τα LDLR^{-/-} ποντίκια οδήγησε σε διάφορους βαθμούς μείωσης της ανάπτυξης αθηρωμάτωσης [140-143]. Αντιθέτως, μελέτες σε ApoE^{-/-} και σε LDLR^{-/-} ποντίκια με υπερέκφραση των SRA δεν μετέβαλαν την ανάπτυξη αθηρωμάτωσης ή οδήγησαν και σε μικρή μείωσή της [144, 145, 175]. Τα αποτελέσματα αυτά καθιστούν το ρόλο των SRA αμφιλεγόμενο. Έχει διατυπωθεί η υπόθεση ότι σε πρώιμα στάδια η πρόσληψη – κάθαρση της oxLDL από τους SRA πιθανώς έχει έναν ουδέτερο ή και προστατευτικό ρόλο, ενώ η υπερέκφραση της ικανότητας μεταβολισμού της χοληστερόλης σε βαρύτερες και προχωρημένες βλάβες οδηγεί σε τοξική δράση και ενδοπλασματικό stress με αποτέλεσμα την επαγωγή της απόπτωσης η οποία συμβάλλει στο σχηματισμό του νεκρωτικού πυρήνα [77].

MARCO

Ο υποδοχέας MARCO (macrophage receptor with collagenous structure, υποδοχέας μακροφάγων με δομή κολλαγόνου) έχει ανευρεθεί σε υποπληθυσμούς μακροφάγων στον σπλήνα, σε λεμφαδένες αλλά και σε περιτοναϊκά μακροφάγα [79, 176]. Είναι γνωστός κυρίως για την ικανότητα να αναγνωρίζει βακτήρια, επιπλέον όμως αναγνωρίζει και oxLDL και σε μικρότερο βαθμό acLDL (acetyl-LDL). Ο ρόλος του στην αθηροσκλήρυνση δεν έχει διερευνηθεί. Πιθανολογείται ότι παίζει ρόλο στη λειτουργία του μακροφάγου ως αντιγονοπαρουσιαστικού κυττάρου και ως εκ τούτου στην ανοσιακή απάντηση, ιδιαίτερα στην ενεργοποίηση του Β κυττάρου [147].

A1.α.2) Τάξη Β: CD36 και SRB1

CD36

Ο εκκαθαριστής υποδοχέας CD36 περιγράφηκε αρχικά στα αιμοπετάλια αλλά στη συνέχεια βρέθηκε να εκφράζεται σε πλήθος κυττάρων, κυρίως στα μακροφάγα αλλά και σε άλλα κύτταρα όπως τα δενδριτικά κύτταρα, τα ενδοθηλιακά κύτταρα, τα σκελετικά, τα μυοκαρδιακά και τα λεία μυϊκά κύτταρα και τα λιποκύτταρα [79]. Έχουν περιγραφεί πολλοί συνδέτες για τον CD36 με κυριότερους την oxLDL, την acLDL, μόρια οξειδωμένης φωσφατιδυλοχολίνης, τη φωσφατιδυλοσερίνη, AGEs, αποπτωτικά κύτταρα, τη θρομβοσπονδίνη και σε μικρότερο βαθμό μη οξειδωμένες λιποπρωτεΐνες. Η έκφραση του CD36 αυξάνει στην υπεργλυκαιμία, το οξειδωτικό stress, την υπέρταση και κατά τη διαφοροποίηση των μονοκυττάρων σε μακροφάγα [79, 177, 178]. Ιδιαίτερα η έκφραση του CD36 επάγεται από τη σύνδεσή του με oxLDL και με AGEs [85, 179]. Ο GM-CSF και ο M-CSF από τους αυξητικούς παράγοντες και η IL-4 από τις κυτταροκίνες επάγουν την έκφραση του CD36 ενώ η αντιφλεγμονώδης IL-10 την καταστέλλει [85, 180].

Όσον αφορά στις σηματοδοτικές οδούς που εκκινούν από τον CD36 υπάρχει πλούσια βιβλιογραφία από μελέτες σε διάφορους τύπους κυττάρων [77, 85, 87]. Σύνδεση στον CD36 προκαλεί ενεργοποίηση Src κινασών οι οποίες ενεργοποιούν στη συνέχεια κινάσες της ομάδος των MAPKs όπως τις JNKs με τελικό αποτέλεσμα ένα πλήθος επιδράσεων που αφορούν στην προσκόλληση και στη μετανάστευση, στο οξειδωτικό stress, στη φλεγμονή και στον κυτταρικό θάνατο. Η σηματοδότηση σε διαφορετικούς κυτταρικούς πληθυσμούς αλλά και σε κύτταρα του ίδιου τύπου κυττάρων επηρεάζεται από την έκφραση και άλλων μορίων που αποτελούν είτε συνυποδοχείς είτε αλληλεπιδρούν με τον CD36 όπως ορισμένων TLRs (βλέπε παρακάτω II.1.3.3.A1.γ.. Αλληλεπίδραση εκκαθαριστών υποδοχέων και TLRs) και ιντεγκρινών όπως των $\alpha\beta 1$ και $\alpha 6\beta 1$ [77].

Ο CD36 μαζί με τους SRA αποτελούν τους σημαντικότερους υποδοχείς στην πρόσληψη των oxLDL από τα μακροφάγα και στη μετατροπή τους σε αφρώδη κύτταρα (βλέπε II.1.3.2.Δ. Πρόσληψη και ενδοκυττάρια συσσώρευση λιπιδίων - σχηματισμός αφρωδών κυττάρων) [80, 98]. Όπως αναφέρθηκε ήδη παραπάνω, η πρόσληψη oxLDL από τα μακροφάγα οδηγεί σε αύξηση της έκφρασης του CD36 μέσω ενεργοποίησης του πυρηνικού υποδοχέα PPAR γ [85, 88, 89]. Επίσης η σύνδεση oxLDL στον CD36 αυξάνει την παραγωγή ROS επάγοντας τον περαιτέρω σχηματισμό oxLDL [96]. Πέραν της ανεξέλεγκτης ενδοκυττάριας συσσώρευσης λιπιδίων, πιθανώς ο CD36 επηρεάζει και την εκροή χοληστερόλης και φωσφολιπιδίων από το μακροφάγο καθώς σε μακροφάγα από CD36^{-/-}

/ApoE^{-/-} ποντίκια βρέθηκε αυξημένη εκροή χοληστερόλης και φωσφολιπιδίων παρά το μειωμένο φορτίο ενδοκυττάρων λιπιδίων [148]. Η κύρια επίδραση της σύνδεσης oxLDL στον CD36 και της μετέπειτα πρόσληψής της από το μακροφάγο συνίσταται στην ενεργοποίηση του NFκB η οποία μεσολαβείται από την ενεργοποίηση της PKC [181, 182]. Η ενεργοποίηση του NFκB οδηγεί σε παραγωγή πλήθους κυτταροκινών που παίζουν σημαντικό ρόλο στην αθηρογένεση όπως των TNFα/β, IL-1β και INFβ/γ, και η συμμετοχή του CD36 στην παραγωγή τους καταδεικνύεται από τη σημαντική μείωσή της σε μακροφάγα με έλλειψη του CD36 [149]. Ο CD36, όπως και οι SRA, παίζει ρόλο στην στρατολόγηση των μονοκυττάρων στη θέση βλάβης καθώς βρέθηκε πως σε απουσία του μειώνεται σημαντικά η ανταπόκριση των μονοκυττάρων στη σημαντικότερη για αυτά χημειοκίνη την MCP-1 [133]. Ενώ ο CD36 προάγει τη χημειοταξία προς τη θέση της βλάβης, φαίνεται ότι έχει την ακριβώς αντίθετη δράση εντός της βλάβης αναστέλλοντας τη μετανάστευση των μακροφάγων και οδηγώντας έτσι σε παραμονή και παγίδευσή τους σε αυτή. Πράγματι, η επίδραση της oxLDL στα μακροφάγα προκαλεί με τρόπο εξαρτώμενο από τον CD36 την αναστολή της μετανάστευσης των μακροφάγων μέσω επιδράσεων στον πολυμερισμό της ακτίνης και στην πολικότητα της μεμβράνης [87, 150]. Επίσης η πρόσληψη της oxLDL μέσω του CD36 βρέθηκε να επάγει την απόπτωση των μακροφάγων μέσω ενεργοποίησης της κασπάσης 3 [151].

Ο CD36 εκφράζεται, όπως ήδη αναφέρθηκε, και στα αιμοπετάλια. Από τα περιορισμένα δεδομένα που υπάρχουν προκύπτει ότι παίζει ρόλο στην ανάπτυξη ενός προθρομβωτικού φαινότυπου στα αιμοπετάλια καθώς επάγει την ενεργοποίησή τους. Σε ανθρώπινα αιμοπετάλια με έλλειψη του CD36 βρέθηκε μείωση της ικανότητας προσκόλλησής τους σε κολλαγόνο [152]. Σε ApoE^{-/-} ποντίκια επίσης η σύνδεση της oxLDL στον CD36 βρέθηκε να οδηγεί σε ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων όπως αυτό κατεδείχθη από την αυξημένη ικανότητα συσσώρευσης σε χαμηλές συγκεντρώσεις ADP και από την αυξημένη έκφραση δεικτών ενεργοποίησης, όπως η P-σελεκτίνη και η ενεργοποιημένη μορφή του υποδοχέα του ινωδογόνου, ιντεγκρίνη α_{IIb}β₃ [153]. Το φαινόμενο αυτό φάνηκε να συσχετίζεται με τα υψηλά επίπεδα μορίων οξειδωμένης φωσφατιδυλοχολίνης που αποτελούν ισχυρούς συνδέτες του CD36. Οι μηχανισμοί σηματοδότησης που έχουν περιγραφεί στα αιμοπετάλια είναι παρόμοιοι αυτών των μακροφάγων, και οι σηματοδοτικές αυτές οδοί έχουν καταδειχθεί να εμπλέκονται στην ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων [87, 139]. Στα ενδοθηλιακά και λεία μυϊκά κύτταρα ο CD36 παίζει ρόλο στο μεταβολισμό της γλυκόζης και πιθανώς στην αντίσταση στην ινσουλίνη και ιδιαίτερα στην πρόσληψη λιπιδίων χωρίς όμως ο ακριβής ρόλος και η ενδεχόμενη σημασία του στην αθηροσκλήρυνση να έχουν διευκρινιστεί [82, 85].

Ο CD36 έχει μελετηθεί σε μοντέλα αθηροσκλήρυνσης σε πειραματόζωα και οι μελέτες αυτές επιβεβαιώνουν τον σημαντικό αθηρογόνο ρόλο του [77]. Σε ApoE^{-/-} ποντίκια η εξάλειψη του γονιδίου του CD36 οδήγησε σε μείωση της ανάπτυξης αθηρωμάτωσης στην αορτή κατά 70-80% σε σύγκριση με την ομάδα ApoE^{-/-} / CD36^{+/+} [154]. Σε άλλη μελέτη σε ApoE^{-/-} / CD36^{-/-} η ανάπτυξη αθηρωμάτωσης μειώθηκε κατά 60-75%, ενώ συγκριτικά σε ApoE^{-/-} / SRA^{-/-} υπήρξε μείωση κατά ~30% [133]. Σε αυτήν την εργασία υπήρξε παράλληλα και εκτίμηση της παραγωγής κυτταροκινών η οποία ανέδειξε υπερδιπλάσια επίπεδα IL-1α, IL-1β, IL-2, IL-4, IL-12, IFN-γ, TNF-α και των χημειοκινών CCL3 και CCL4 (MIP-1α και MIP-1β, Macrophage Inflammatory Proteins) στα CD36^{+/+} πειραματόζωα [133]. Επίσης, τα μακροφάγα που απομονώθηκαν από τα CD36^{+/+} παρήγαγαν ~4πλάσια ποσότητα ROS σε επώασή τους με oxLDL σε σχέση με τα CD36^{-/-}. Επίσης σε ApoE^{-/-} ποντίκια, μεταμόσχευση CD36^{-/-} μυελού των οστών οδήγησε σε μείωση της ανάπτυξης αθηρωμάτωσης κατά ~90% [155].

SRB1

Ο SRB1 εκφράζεται κυρίως στα μακροφάγα και στα ηπατοκύτταρα καθώς και σε ιστούς που παράγουν στεροειδή (επινεφρίδια, όρχεις, ωθήκες) [79]. Αναγνωρίζει τροποποιημένες LDL (acetyl-LDL, oxLDL) αλλά και φυσικές λιποπρωτεΐνες (HDL, LDL, VLDL) και ανιονικά και οξειδωμένα φωσφολιπίδια. Η σύνδεση της HDL στον SRB1, κυρίως σε συνεργασία με μεταφορείς ABCs (βλέπε II.1.3.2.Δ2. Μεταβολισμός λιποπρωτεϊνών - εκροή χοληστερόλης), οδηγεί στην περίπτωση των μακροφάγων σε εκροή χοληστερόλης προς την HDL, ενώ αντίθετα στο ήπαρ και τους παράγοντες στεροειδή ιστούς οδηγεί σε πρόσληψη χοληστερόλης [77, 183]. Το γεγονός αυτό καθιστά τον SRB1 ιδιαίτερα σημαντικό παράγοντα στην οδό της αντίστροφης μεταφοράς χοληστερόλης από την περιφέρεια προς το ήπαρ όπου μέρος της θα απεκκριθεί στη χολή [1, 77]. Στην οδό αυτή, σε αντίθεση με τη συνήθη λειτουργία των λοιπών SRs, η σύνδεση με τον SRB1 δεν οδηγεί σε ενδοκυττάρωση του συμπλέγματος συνδέτη - υποδοχέα αλλά σε εκλεκτική μεταφορά λιπιδίων από ή προς το κύτταρο. Παράλληλα με την αντιαθηρογόνο αυτή δράση, η σύνδεση του SRB1 μπορεί να συνδεθεί με oxLDL οδηγώντας σε ενδοκυττάρωση. Ο SRB1 εκφράζεται σε μακροφάγα και σε αφρώδη κύτταρα σε ανθρώπινες αθηρωματικές πλάκες αλλά η συμβολή του στο σχηματισμό των αφρωδών κυττάρων μέσω πρόσληψης oxLDL θεωρείται περιορισμένη ενώ αντίθετα η έλλειψή του παίζει ρόλο μέσω της μείωσης της εκροής χοληστερόλης [79, 80]. Μελέτες σε πειραματικά μοντέλα αθηροσκλήρυνσης όπως τα διαγονιδιακά ποντίκια ApoE^{-/-} και LDLR^{-/-} έδειξαν σημαντική αύξηση της ανάπτυξης αθηροσκλήρυνσης σε εξάλειψη του

γονιδίου του SRB1 [184, 185]. Αντίθετα, σε LDLR^{-/-} η ηπατική υπερέκφραση του SRB1 είτε διαγονιδιακά είτε μετά από μεταφορά του γονιδίου με αδενοϊό οδήγησε σε μείωση της ανάπτυξης αθηροσκλήρυνσης [186, 187].

Ενδιαφέρον παρουσιάζουν και οι δράσεις του SRB1 σε άλλα κύτταρα που εμπλέκονται στην αθηροσκλήρυνση όπως τα ενδοθηλιακά κύτταρα και τα αιμοπετάλια. Η σύνδεση HDL στον SRB1 στα ενδοθηλιακά κύτταρα επάγει την ενδοθηλιακή NOS [156]. Στα αιμοπετάλια ο SRB1 παρουσιάζει ένα διπλό ρόλο καθώς σύνδεση oxLDL σε αυτόν προάγει την ενεργοποίησή τους ενώ η σύνδεση oxHDL την αναστέλλει [139]. Πάντως μειωμένα επίπεδα έκφρασης του SRB1 σε ανθρώπινα αιμοπετάλια σχετίζονταν με αυξημένη ενεργοποίησή τους [157].

A1.α.3) Τάξη E: LOX1

Ο υποδοχέας LOX1 (Lectin-like oxidized LDL receptor-1, παρόμοιος με λεκτίνη υποδοχέας-1 οξειδωμένης LDL) εκφράζεται κυρίως στα ενδοθηλιακά κύτταρα όπου έχει κυρίως μελετηθεί, αλλά και στα μακροφάγα και στα αγγειακά λεία μυϊκά κύτταρα ενώ ανευρίσκεται και σε αιμοπετάλια και μυοκαρδιακές ίνες [79, 90]. Σε αυτόν συνδέονται oxLDL, φωσφατισυλοσερίνη, φμπρονεκτίνη, HSP70, AGEs, αποπτωτικά κύτταρα [79, 188]. Εκφράζεται σε αθηρωματικές πλάκες σε ανθρώπους και πειραματόζωα (ποντίκια και κουνέλια) [81].

Σύνδεση oxLDL στον LOX1 οδηγεί σε αύξηση της μεταγραφής του γονιδίου και των επιπέδων της πρωτεΐνης του LOX1 [188]. Ένα πλήθος σηματοδοτικών οδών έχουν περιγραφεί να εκκινούν από τον LOX1 καταλήγοντας σε αθηρογόνους δράσεις καθιστώντας τον έναν από τους σημαντικότερους εκκαθαριστές υποδοχείς στην παθογένεση της αθηροσκλήρυνσης. Σύνδεση oxLDL στον LOX1 σε ενδοθηλιακά κύτταρα οδηγεί σε ενεργοποίηση του NF-κB η οποία επιτελείται μέσω ενεργοποίησης οδών που περιλαμβάνουν ποικίλες κινάσες όπως την p38MAPK, την ERK1/2 (extracellular-signal-regulated kinase) και την PI3K [81]. Η σύνδεση oxLDL με τον LOX1 οδηγεί σε αύξηση της παραγωγής ROS κυρίως μέσω επαγωγής της NADPH οξειδάσης και σε μείωση των επιπέδων NO η οποία οφείλεται αφενός στην αντίδραση του NO με SO και την παραγωγή ONOO⁻ και αφετέρου στη μείωση της έκφρασης της eNOS [158-160]. Η συμμετοχή του LOX1 στο οξειδωτικό stress και στη μείωση της βιοδιαθεσιμότητας του NO με επακόλουθο την ανάπτυξη ενδοθηλιακής δυσλειτουργίας τον καθιστά σημαντικό παράγοντα στην αθηρογένεση. Με βάση τα παραπάνω, μπορούμε να διακρίνουμε ότι η oxLDL και ο LOX1 συμμετέχουν στο σχηματισμό ενός θετικού ανατροφοδοτικού κύκλου όπου η oxLDL συνδεόμενη στον LOX1

οδηγεί στην επίταση του οξειδωτικού stress στον έσω χιτώνα και στη δημιουργία oxLDL και περαιτέρω στην αύξηση της έκφρασης του LOX1 επιτείνοντας την ικανότητα της oxLDL να πυροδοτεί ισχυρότερα την παραγωγή ROS. Επιπρόσθετα, η αυξημένη παραγωγή ROS συμμετέχει στη σηματοδότηση που ξεκινά από τον LOX1 και οδηγεί σε αύξηση της έκφρασης μορίων προσκόλλησης VCAM-1, ICAM-1, και P και E σελεκτινών καθώς και στην παραγωγή της χημειοκίνης MCP-1 [81, 90]. Τέλος, ο LOX1 συμμετέχει σε μεγάλο βαθμό στην αύξηση της παραγωγής των μεταλλοπρωτεϊνών 1, 3, 9 από τα ενδοθηλιακά κύτταρα μετά από επίδραση oxLDL καθώς και στην προκαλούμενη από την oxLDL επαγωγή της απόπτωσης των ενδοθηλιακών κυττάρων [160, 161]. Ενδιαφέρον επίσης παρουσιάζει η σχέση του LOX1 με τον TGFβ1, μία κυτταροκίνη με πολλαπλές δράσεις στην αθηρωματική πλάκα μεταξύ αυτών της αύξησης της σύνθεσης κολλαγόνου, καθώς ο TGFβ1 βρέθηκε να αυξάνει την έκφραση του LOX1 σε ινοβλάστες και αντίστροφα ο LOX1 να αυξάνει την παραγωγή του TGFβ1 [162].

Ο LOX1 αποτελεί σημαντικό παράγοντα στην άσκηση της δράσης της αγγειτασίνης II η οποία πέραν της ισχυρής αγγειοσυσπαστικής δράσης της έχει αναγνωριστεί σαν ένας ιδιαίτερα σημαντικός αθηρογόνος παράγοντας [164]. Η αθηρογόνος αυτή δράση περιλαμβάνει πλήθος επιδράσεων όπως επαγωγή του οξειδωτικού stress, της στρατολόγησης λευκοκυττάρων και της παραγωγής μεσολαβητών φλεγμονής καθώς και επιδράσεις στον πολλαπλασιασμό και στην απόπτωση. Οι αθηρογόνοι αυτές δράσεις ασκούνται μέσω του υποδοχέα 1 της αγγειοτασίνης II (AT1R). Η oxLDL προκαλεί αύξηση της έκφρασης του AT1R μέσω ενός NADPH οξειδάση - MAPK - NF-κB μονοπατιού και αύξηση της έκφρασης του LOX1. Αποκλεισμός του AT1R με συνοδό μείωση της έκφρασης του LOX1 μείωσε την ανάπτυξη αθηροσκλήρυνσης σε ποντίκια ApoE^{-/-} [163]. Παρόμοια, η έκφραση του LOX1 επάγεται από τα AGEs, το stress ροής και τον ισχυρό αγγειοσυσπαστικό παράγοντα ενδοθηλίνη 1 [189-191]. Στην περίπτωση των AGEs, αυτά επιπλέον αποτελούν και συνδέτες του LOX1 και η σύνδεσή τους στον LOX1 επάγει την παραγωγή ROS μέσω της NADPH οξειδάσης και μέσω της αναπνευστικής αλυσίδας των μιτοχονδρίων [90].

Μελέτες σε μοντέλα αθηροσκλήρυνσης σε πειραματόζωα αναμένονται. Μέχρι τώρα, σε μία μελέτη σε LDLR^{-/-} ποντίκια η εξάλειψη του LOX1 οδήγησε σε μείωση της σύνδεσης της oxLDL στο αορτικό ενδοθήλιο με συνοδό διατήρηση της έκφρασης της eNOS, της SOD, και των επιπέδων της αντιφλεγμονώδους κυτταροκίνης IL-10 και μείωση της παραγωγής κολλαγόνου ενώ η ανάπτυξη αθηροσκλήρυνσης μειώθηκε κατά 50% σε σχέση με τα πειραματόζωα που διατηρούσαν την έκφραση του LOX1 [165].

A1.α.4) Τάξη F: SREC-I και II

Οι υποδοχείς SREC-I και II (scavenger receptors expressed by endothelial cells, εκκαθαριστές υποδοχείς εκφραζόμενοι σε ενδοθηλιακά κύτταρα) εκφράζονται κυρίως στα ενδοθηλιακά κύτταρα και σε μικρό βαθμό στα μακροφάγα [79]. Συνδέονται με τροποποιημένες LDL (acetyl-LDL και oxLDL) όμως μόνον ο SREC-I οδηγεί σε ενδοκυττάρωση [77]. Διαθέτουν ενδοκυττάριο τμήμα το οποίο πιθανώς εκκινεί σηματοδότηση χωρίς όμως να υπάρχουν περαιτέρω στοιχεία προς το παρόν για το είδος των επιδράσεων που μπορεί να ασκήσουν [188]. Ο ρόλος τους στο σχηματισμό των αφρωδών κυττάρων είναι ελάσσονος σημασίας σύμφωνα με μελέτη σε μακροφάγα με έλλειψη του SREC-I [77], που ανέδειξε τον SREC-I ως υπεύθυνο για μόλις 6% της πρόσληψης acetyl-LDL [77].

A1.α.5) Τάξη G: SR-PSOX/CXCL16

Ο υποδοχέας SR-PSOX/CXCL16 (scavenger receptor for phosphatidylserine and oxidized lipoprotein / CXC chemokine ligand 16, εκκαθαριστής υποδοχέας φωσφατιδυλοσερίνης και οξειδωμένης λιποπρωτεΐνης / CXC συνδέτης χημειοκίνη 16) εκφράζεται σε μακροφάγα και σε δενδριτικά κύτταρα καθώς και στα ενδοθηλιακά και λεία μυϊκά κύτταρα [77]. Συνδέτες του είναι η φωσφατιδυλοσερίνη και oxLDL [79]. Οφείλει την ονομασία του στην ικανότητα να συνδέεται με φωσφατιδυλοσερίνη και στο γεγονός ότι αποτελεί ταυτόσημο μόριο προς το συνδετικό μόριο χημειοκίνη 16 που έχει βρεθεί να δρα χημειοτακτικά στα CD8+ T λεμφοκύτταρα [188]. Έχει ανιχνευθεί σε ανθρώπινες αθηρωματικές πλάκες αλλά η σημασία του στο σχηματισμό των αφρωδών κυττάρων και στην αθηρογένεση δεν έχει διευκρινιστεί [77]. Σε μελέτη σε ασθενείς με ιστορικό εμφράγματος μυοκαρδίου, πολυμορφισμός του υπεύθυνου γονιδίου βρέθηκε να σχετίζεται με τη βαρύτητα της στεφανιαίας νόσου [166].

A1.β) Υποδοχείς τύπου Toll (Toll-like receptors, TLRs)

Οι TLRs αποτελούν ένα νεώτερο πεδίο έρευνας και ήδη έχει συσσωρευθεί ένας ικανός αριθμός δεδομένων που καταδεικνύει τη συμβολή τους στην αθηρογένεση (**Εικόνα II.2.**) [50, 52]. Οι TLRs εκφράζονται κυρίως στα κύτταρα της φυσικής ανοσίας όπως στα μακροφάγα, στα δενδριτικά κύτταρα και στα μαστοκύτταρα, αλλά και σε πολλά άλλα κύτταρα περιλαμβανομένων των ενδοθηλιακών και των λείων μυϊκών κυττάρων. Η έκφραση διαφόρων TLRs είναι αυξημένη στα μακροφάγα, στα ενδοθηλιακά και στα λεία μυϊκά κύτταρα σε αθηροσκληρωτικές βλάβες σε ανθρώπους [192, 193]. Σε φυσιολογικές και

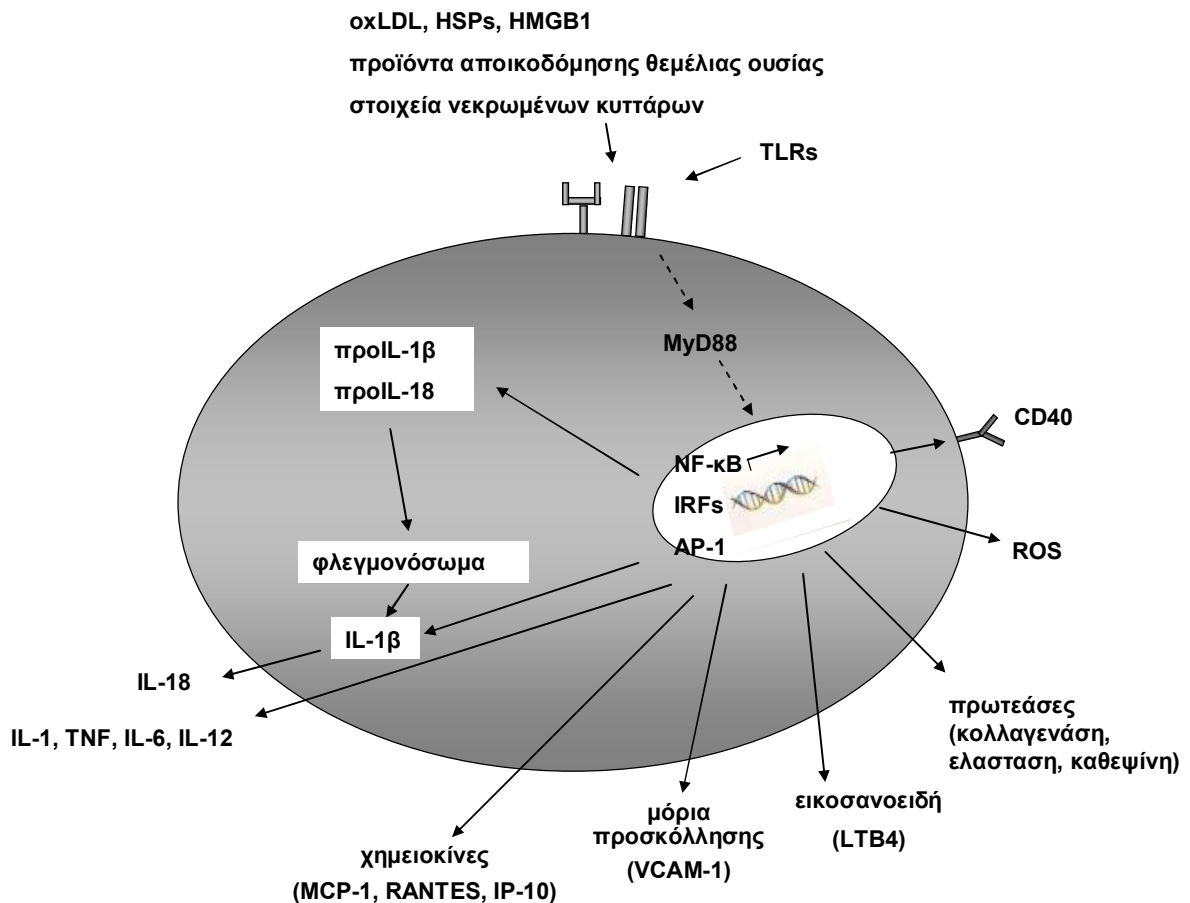
αρτηριοσκληρωτικές αρτηρίες έχει καταδειχθεί η παρουσία διαφόρων TLRs και συγκεκριμένα των TLRs 1 έως 7 και του TLR9 [50, 52]. Τα περισσότερα δεδομένα αφορούν μέχρι τώρα στους TLR2 και 4 και θεμελιώνουν έναν ισχυρό παθογενετικό ρόλο τους στην φλεγμονώδη διεργασία στις θέσεις βλάβης και στην ανάπτυξη της αθηρωματικής πλάκας [83, 194, 195]. Ένα πλήθος από εξωγενείς και ενδογενείς συνδέτες έχουν περιγραφεί για τους TLRs. Στους εξωγενείς συνδέτες περιλαμβάνονται μικροβιακές τοξίνες, όπως λιποπολυσακχαρίτες, γλυκοπρωτεΐνες, RNA και DNA από ιούς και μικρόβια [52]. Τα δεδομένα αυτά πιθανολογούν έναν ισχυρό ρόλο των TLRs στην πιθανή σύνδεση παθογόνων μικροοργανισμών με την αθηρογένεση όπως αυτή προκύπτει από τα ευρήματα πολλών επιδημιολογικών μελετών και από την ανεύρεση γονιδιακού υλικού μικροοργανισμών σε αθηρωματικές πλάκες [196-199]. Οι TLRs αναγνωρίζουν επίσης και ενδογενείς συνδέτες που βρίσκονται στις θέσεις φλεγμονής. Πρόκειται κυρίως για στοιχεία νεκρωμένων κυττάρων και καταβολισμού της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας. Από τους πρώτους συνδέτες αυτής της ομάδας που περιγράφησαν είναι οι HSPs, η απελευθέρωση των οποίων έχει καταδειχθεί ως προαθηρογόνος [200-203]. Ανάμεσά τους περιλαμβάνονται η Hsp60, η Hsp70 και η Grp96 οι οποίες κατά κύριο λόγο απελευθερώνονται από νεκρωτικά κύτταρα αλλά απελευθερώνονται σε αυξημένες ποσότητες και σε άλλες καταστάσεις stress όπως η Hsp60 από τα ενδοθηλιακά κύτταρα σε ανώμαλο stress διατημητικής τάσης [201, 204-207]. Η HMGB1 (high-mobility group box 1), μία συνδεόμενη με DNA πρωτεΐνη που εκκρίνεται από μακροφάγα αλλά απελευθερώνεται και από νεκρωμένα κύτταρα, αποτελεί άλλον ένα αναγνωρισμένο συνδέτη για τους TLRs [208]. Νουκλεϊνικά οξέα αλλά και ανοσοσυμπλέγματα που περιέχουν RNA ή DNA αποτελούν επίσης συνδέτες [209, 210]. Στην ομάδα συνδετών των στοιχείων εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας έχουν περιγραφεί στοιχεία αποδόμησης της φιμπρονεκτίνης, του υαλουρονικού και της θειικής ηπαρίνης [211-214]. Δεδομένα υπάρχουν και για επίδραση της oxLDL μέσω TLRs. Ελάχιστα οξειδωμένη LDL (minimally modified LDL, mmLDL) έχει βρεθεί να επιδρά σε ενδοθηλιακά κύτταρα και μακροφάγα μέσω TLRs. Επώαση mmLDL με μακροφάγα προκάλεσε επαγωγή της παραγωγής ROS και των μεσολαβητών της φλεγμονής IL-1 β , IL-6 μέσω TLRs [215, 216]. Οξειδωμένα φωσφολιπίδια της oxLDL επιδρούν επίσης σε TLRs. Ο ρόλος τους δεν έχει πλήρως διευκρινιστεί καθώς τα δεδομένα που υπάρχουν για την οξειδωμένη 1-παλμιτόυλο-2-αραχιδονυλόυλο-sn-γλυκερο-3-φωσφοχολίνη (oxidized 1-palmitoyl-2-arachidonoyl-sn-3-phosphorylcholine, oxPAPC) δείχνουν πως άλλα προϊόντα της οξείδωσης της PAPC ενεργοποιούν προφλεγμονώδεις σηματοδοτικές οδούς μέσω TLRs και άλλα δρουν ανασταλτικά [217, 218].

Η ενεργοποίηση των TLRs ενεργοποιεί ποικίλες σηματοδοτικές οδούς που επάγουν τη φλεγμονή και συνδέονται με την αθηρογένεση. Τα περισσότερα δεδομένα δεικνύουν το MyD88 (myeloid differentiation factor 88) ως το μόριο που ενεργοποιείται αρχικά σε αυτές τις σηματοδοτικές οδούς οι οποίες καταλήγουν σε ενεργοποίηση διαφόρων μεταγραφικών παραγόντων όπως του NFκB, της AP-1 και των IRFs (interferon regulating factors) με κυρίαρχο ρόλο ανάμεσά τους αυτόν του NFκB [52, 53].

Η ενεργοποίηση αυτή οδηγεί σε μεταγραφή προφλεγμονωδών και προαθηρογόνων παραγόντων. Σε αυτούς περιλαμβάνονται κυτταροκίνες όπως η IL-1β και η IL-18, χημειοκίνες όπως η MCP-1, η RANTES (regulated and normal T cell expressed and secreted) και η IP-10, μόρια προσκόλλησης όπως το VCAM-1, η παραγωγή ROS, πρωτεασών που καταβολίζουν την εξωκυττάρια θεμέλια ουσία και συμβάλλουν στη δημιουργία της ευάλωτης προς ρήξη πλάκας με επακόλουθη θρόμβωση αλλά και άλλοι παράγοντες που επάγουν τη φλεγμονή, την αθηρογένεση και τη θρόμβωση όπως εικοσανοειδή (λευκοτριένες και ιδιαίτερα η B4, LTB4) και ο επίτοπος επιφανείας CD40 του οποίου η σύνδεση με τον προφλεγμονώδη παράγοντα συνδέτη του CD40 (CD40 ligand, CD40L), που παράγεται κυρίως από τα αιμοπετάλια, εκκινεί προφλεγμονώδεις σηματοδοτικές οδούς [50, 52]. Ιδιαίτερα έχει μελετηθεί η επαγωγή της παραγωγής IL-1β και IL-18, δύο ισχυρών μεσολαβητών της φλεγμονής και της αθηρογένεσης, μέσω ενεργοποίησης του NFκB [52, 219-221]. Συγκεκριμένα, επάγεται η παραγωγή των πρόδρομων μορίων προ-IL-1β και προ-IL-18 τα οποία στη συνέχεια μετατρέπονται σε IL-1β και IL-18 στο φλεγμονόσωμα (inflammasome) μία προσφάτως ανακαλυφθείσα μοριακή δομή του κυτταροπλάσματος, της οποίας η σημασία στη φλεγμονή συγκεντρώνει αυξανόμενο ενδιαφέρον [222, 223].

Η σημασία των TLRs στην αθηρογένεση καταδεικνύεται σε πειραματικά μοντέλα αθηροσκλήρυνσης σε πειραματόζωα όπου η έλλειψη συγκεκριμένων TLRs ή η κατάργηση της σηματοδοτικής οδού λόγω έλλειψης του MyD88 είχε ως αποτέλεσμα μεγάλου βαθμού περιορισμό της ανάπτυξης αθηροσκλήρυνσης [194, 224, 225]. Σε προσομοίωση του κυτταρικού περιβάλλοντος αθηρωματικής πλάκας με συνκαλλιέργεια του μεικτού κυτταρικού πληθυσμού που απομονώθηκε από ανθρώπινη αθηρωματική πλάκα και περιελάμβανε μακροφάγα, λεμφοκύτταρα και λεία μυϊκά κύτταρα, η κατάργηση της οδού του TLR2 είτε στο επίπεδο του ίδιου του υποδοχέα είτε στο επίπεδο του Myd88 οδήγησε σε μεγάλη μείωση της ενεργοποίησης του NFκB και της παραγωγής IL6, IL8, MCP-1 και των μεταλλοπρωτεϊνών της θεμέλιας ουσίας (matrix metalloproteinases, MMPs) 1, 3 και 9 [226]. Τέλος, ενδιαφέρον παρουσιάζουν και δεδομένα τα οποία υποδεικνύουν ότι TLRs

παίζουν ρόλο και στο σχηματισμό των αφρωδών κυττάρων και επηρεάζουν την εκροή χοληστερόλης από τα μακροφάγα [52, 118, 227]. Ενεργοποίηση των TLR3 και TLR4 οδηγεί σε αναστολή των μεταγραφικών παραγόντων LXR οι οποίοι όπως αναφέρθηκε ανωτέρω ελέγχουν τη μεταγραφή των ABCs (βλέπε II.1.3.2.Δ2. Μεταβολισμός λιποπρωτεϊνών – εκροή χοληστερόλης) και η αναστολή αυτή των LXR επιτελείται μέσω του IRF-3 [118].



Εικόνα II.2. Συμμετοχή των TLRs στην εξέλιξη της αθηρωματικής βλάβης. Οι TLRs εκφράζονται στη θέση ανάπτυξης της βλάβης κυρίως στα κύτταρα της φυσικής ανοσίας όπως στα μακροφάγα και στα δενδριτικά κύτταρα αλλά και στα ενδοθηλιακά και λεία μυϊκά κύτταρα. Η ενεργοποίηση των TLRs μετά από σύνδεση σε αυτούς της oxLDL αλλά και άλλων συνδετών εκκινεί πλήθος οδών κυρίως προφλεγμονωδών που εμπλέκονται στην ανάπτυξη και τις επιπλοκές της αθηρωματικής πλάκας.

A1.γ) Αλληλεπίδραση εκκαθαριστών υποδοχέων και TLRs

Ιδιαίτερη σημασία έχει η σχέση μεταξύ των εκκαθαριστών υποδοχέων και των TLRs καθώς αυξανόμενος όγκος δεδομένων καταδεικνύει ότι αυτοί αλληλεπιδρούν και ενεργοποιούνται συνεργικά [52, 80].

CD36 και TLR4/TLR6, CD36 και TLR1/TLR6, CD36 και TLR2

Ο εκκαθαριστής υποδοχέας CD36 αποδείχθηκε πως συνεντοπίζεται και αποτελεί απαραίτητο συνυποδοχέα (co-receptor) σε μακροφάγα για το ετεροδιμερές TLR4/TLR6 [228]. Η ενεργοποίηση του CD36 από oxLDL οδηγεί σε ενεργοποίηση του TLR4/TLR6 και εν συνεχεία σε ενεργοποίηση του NFκB με τελικό αποτέλεσμα την επαγωγή παραγωγής ROS, χημειοκινών (RANTES), και κυτταροκινών (IL1β). Σε ανθρώπινα μακροφάγα ο CD36 έχει αποδειχθεί να αποτελεί συνυποδοχέα για το ετεροδιμερές TLR1/TLR6 και η παρουσία του CD36 είναι απαραίτητη για την ενεργοποίηση του TLR1/TLR6 από τροποποιημένη LDL (acLDL) [229]. Επιπλέον μία σειρά από συνδετικά μόρια του CD36, η oxLDL και παράγωγα της οξειδωσης της PAPC όπως το 1 – ακυλο – 2 - (9 – κετο – 12 – καρβοξυ - 10- δωδεκεδιενοϊκόϋλο) – sn – γλυκερο – 3 - φωσφοχολίνη (9 – keto - 10- dodecendioic acid ester of 2 – lyso - PC, KDdia-PC) και το 1 –παλμιτόϋλο – 2 - (5 - κετοβαλερόϋλο) – sn – γλυκερο – 3 - φωσφοχολίνη (1 – palmitoyl – 2 -(5 - oxovaleroyl) – sn – glycerol – 3 - phosphocholine, POVPC) προάγουν την απόπτωση των μακροφάγων η οποία παίζει σημαντικό ρόλο στο σχηματισμό του νεκρωτικού πυρήνα της αθηρωματικής πλάκας, σε συνθήκες stress του ενδοπλασματικού δικτύου, χαρακτηριστικό των μακροφάγων σε θέσεις προχωρημένης αθηρωματικής βλάβης (βλέπε II.1.3.3.Δ. Τα μακροφάγα στην προχωρημένη βλάβη), μόνο με την παρουσία του TLR2 και ιδιαίτερα του ετεροδιμερούς TLR2/ TLR6 [230]. Η επαγωγή της απόπτωσης βρέθηκε να είναι εξαρτώμενη από την αύξηση του οξειδωτικού stress μέσω επαγωγής της υπομονάδας NOX2 της NADPH οξειδάσης. Παρόμοια ήταν και τα ευρήματα για την επαγωγή της απόπτωσης των μακροφάγων σε συνθήκες stress του ενδοπλασματικού δικτύου από την Lp(α).

SR-A και TLR4

Στην επαγωγή της απόπτωσης σε μακροφάγα σε συνθήκες stress του ενδοπλασματικού δικτύου βρέθηκε να παίζουν ρόλο και οι εκκαθαριστές υποδοχείς τύπου A (SR-A) συνεργαζόμενοι με τον TLR4 [231]. Κοινοί συνδέτες για τους TLR4 και SR-A όπως η acLDL επάγουν την απόπτωση μέσω ενεργοποίησης σηματοδοτικών οδών του TLR4 που περιλαμβάνουν την ενεργοποίηση MAP κινασών όπως η JNK και την ενεργοποίηση του

NFκB ενώ μία άλλη σηματοδοτική οδός που εκκινεί από τον TLR4 και οδηγεί σε παραγωγή IFNβ και σε επιβίωση του κυττάρου, αναστέλλεται από την ενεργοποίηση του SR-A.

LOX-1 και TLR2

Ιδιαίτερα σημαντική φαίνεται να είναι και η σχέση του LOX-1 με τους TLRs καθώς στοιχεία καταδεικνύουν ότι ο LOX-1 σηματοδοτεί πιθανώς μόνο μέσω ενεργοποίησης του TLR2 με τον οποίο συνεντοπίζεται και πως η ενεργοποίησή του από τους συνδέτες του οδηγεί σε ενεργοποίηση του TLR2 χωρίς ταυτόχρονη σύνδεση των συνδετών στον ίδιο τον TLR2 [52, 232].

Επαγωγή της έκφρασης εκκαθαριστών υποδοχέων από τους TLR4 και TLR9

Ενεργοποίηση μίας σειράς TLRs σε μακροφάγα βρέθηκε να αυξάνει τη μεταγραφή και την έκφραση των εκκαθαριστών υποδοχέων LOX-1, SR-A, και MARCO με εξαρτώμενη από τη MAPK p38 σηματοδοτική οδό [233]. Ενεργοποίηση των TLR4 και TLR9 οδηγεί σε αύξηση και των τριών αυτών εκκαθαριστών υποδοχέων, ενώ ενεργοποίηση του TLR4 σε αύξηση των LOX-1 και SR-A.

A1.δ) Ενδοκυττάρια συσσώρευση λιπιδίων – φλεγμονή

Παρά το πλήθος των στοιχείων που αφορούν στην επίδραση της oxLDL στο μακροφάγο στις περισσότερες μελέτες δεν καθίσταται σαφές εάν οι επιδράσεις αυτές και οι μοριακές οδοί που ενεργοποιούνται ενδοκυττάρια αποτελούν το αποτέλεσμα σηματοδοτικών οδών που εκκινούν από αυτή καθεαυτή τη σύνδεση της oxLDL με τον υποδοχέα (εκκαθαριστή ή TLR) ή αποτελούν το αποτέλεσμα της ενσωμάτωσης της oxLDL μέσα στο κύτταρο.

Ένας μηχανισμός που επάγει τη φλεγμονή και αφορά αποκλειστικά σε επίδραση της ενσωματωμένης oxLDL στο εσωτερικό του μακροφάγου, είναι η επίδραση των κρυστάλλων χοληστερόλης στο φλεγμονόσωμα [50, 52]. Κρύσταλλοι χοληστερόλης σχηματίζονται πρώιμα στο κυτταρόπλασμα του μακροφάγου που έχει αρχίσει να συσσωρεύει λιπίδια και να σχηματίζει σταγονίδια λίπους [234]. Το φλεγμονόσωμα αποτελεί μοριακή δομή στο κυτταρόπλασμα η οποία συναρμολογείται από πρωτεϊνικά τμήματα μεταξύ των οποίων περιλαμβάνεται ένα τμήμα που λειτουργεί ως ενδοκυττάριος PRR και το οποίο ανήκει στους υποδοχείς NLRs (Nod-like receptors). Η σύνδεση στο τμήμα αυτό οδηγεί μέσω ενός άλλου πρωτεϊνικού τμήματος του φλεγμονοσώματος, του ASC (apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD [caspase activation and recruitment domain]), στη μετατροπή προ-κασπασών σε ενεργείς κασπάσες [222, 223]. Οι κρύσταλλοι χοληστερόλης

ενεργοποιούν το φλεγμονόσωμα NLRP3 με αποτέλεσμα την παραγωγή κασπάσης 1 η οποία μετατρέπει τα πρόδρομα μόρια προ-IL-1 β και προ-IL-18 στα ενεργά μόρια IL-1 β και IL-18 [234, 235]. Ανεπάρκεια στοιχείων του φλεγμονοσώματος σε πειραματόζωα συνοδεύεται από σημαντική μείωση των επιπέδων IL-1 β και IL-18 και παράλληλα της έκτασης των αθηρωματικών βλαβών σε μοντέλα πειραματικής αθηροσκλήρυνσης και της ανάπτυξης νεοχιτώνα μετά από πειραματικό τραυματισμό αρτηρίας [234, 236]. Επομένως, η ενεργοποίηση του φλεγμονοσώματος από τη χοληστερόλη πιθανώς να αποτελεί ένα σημαντικό παράγοντα για την προαγωγή της φλεγμονής από την oxLDL η οποία, όπως ήδη αναφέρθηκε, επάγει την παραγωγή προ-IL-1 β και προ-IL-18 μέσω σύνδεσής της σε TLRs.

Όσον αφορά σε άλλα συστατικά της oxLDL πέραν της χοληστερόλης, στοιχεία σχετικά με δράσεις που εκδηλώνονται μετά από την ενσωμάτωση στο μακροφάγο υπάρχουν για τη λυσοφωσφατιδυλοχολίνη (lysophosphatidylcholine, lysoPC). Η lysoPC αποτελεί σημαντικό συστατικό της oxLDL, καθώς η ποσότητά της αυξάνεται κατά πολύ κατά την οξείδωση της LDL λόγω της υδρόλυσης μορίων οξειδωμένης φωσφατιδυλοχολίνης από τη συνδεδεμένη με τις λιποπρωτεΐνες φωσφολιπάση A₂ (Lipoprotein associated phospholipase A₂, Lp-PLA₂) που περιέχεται στην LDL (βλέπε II.3.3. PAF-AH του πλάσματος ή Lp-PLA₂). Υπάρχουν πολλά στοιχεία που καταδεικνύουν τη lysoPC ως σημαντικό παράγοντα που προάγει τη φλεγμονή και την αθηρογένεση (βλέπε παρακάτω II.3.4.2. A2. Λυσοφωσφατιδυλοχολίνη και αθηροσκλήρυνση). Σε μελέτες που αφορούσαν τη αύξηση της μιτωτικής δραστηριότητας των μακροφάγων καθώς και της παραγωγής GM-CSF από αυτά, καταδείχθη ότι επώαση με lysoPC ή με acetyl-LDL, μορφή τροποποιημένης in vitro LDL που αναγνωρίζεται από εκκαθαριστές υποδοχείς, δεν είχε επίδραση στη μιτωτική δραστηριότητα ή την παραγωγή GM-CSF, ενώ αντιθέτως επώαση με εμπλουτισμένη σε lysoPC μετά από επώαση με φωσφολιπάση A₂ acetyl-LDL, η επίδραση ήταν παρόμοια με αυτή που προκαλείτο από επώαση με oxLDL [137, 237-239]. Η αύξηση αυτή της μιτωτικής δραστηριότητας και της παραγωγής GM-CSF μεσολαβείτο από ενεργοποίηση της PKC [137, 237]. Τα στοιχεία αυτά προτείνουν επίδραση της lysoPC μετά την ενσωμάτωσή της στο κύτταρο και όχι μέσω σηματοδοτικής οδού που ενεργοποιείται από σύνδεση με υποδοχείς της κυτταρικής μεμβράνης. Επιπλέον, υποδεικνύεται ότι μέρος των επιδράσεων της oxLDL ασκείται μέσω της ενσωμάτωσης lysoPC η οποία εισέρχεται στο κύτταρο με την πρόσληψη της oxLDL μέσω των εκκαθαριστών υποδοχέων.

A1ε) Διαφοροποίηση μακροφάγων – υποπληθυσμοί μακροφάγων

Την τελευταία δεκαετία αυξανόμενο ενδιαφέρον συγκεντρώνει ένα νέο ερευνητικό πεδίο το οποίο αφορά στην ετερογένεια των μακροφάγων στην αθηροσκληρυντική βλάβη [128, 240]. Η πιο διαδεδομένη και απλοποιημένη θεώρηση διακρίνει δύο πληθυσμούς μακροφάγων, το M1 ο οποίος επάγει τη φλεγμονή, και το M2 που επάγει την αποδρομή της φλεγμονής και την ιστική αποκατάσταση [80, 128, 240]. Το μικροπεριβάλλον των αυξητικών παραγόντων και κυτταροκινών καθορίζει την οδό διαφοροποίησης και την επικράτηση του ενός ή του άλλου πληθυσμού. Ο αυξητικός παράγοντας M-CSF εκφράζεται υπό φυσιολογικές συνθήκες σταθερά από τα ενδοθηλιακά κύτταρα, τα λεία μυϊκά κύτταρα, τους ινοβλάστες και τα μακροφάγα και επάγει κυρίως τον M2 πληθυσμό σε αντίθεση με τον αυξητικό παράγοντα GM-CSF ο οποίος υπό φυσιολογικές συνθήκες έχει χαμηλή έκφραση από ενδοθηλιακά κύτταρα, τα λεία μυϊκά κύτταρα και τα μακροφάγα αλλά η έκφρασή του αυξάνει σε απάντηση στην επίδραση μεσολαβητών της φλεγμονής όπως ο TNF και η IL-1 ή η oxLDL, και ο οποίος επάγει κυρίως τον πληθυσμό M1 [240]. Επιπρόσθετα η διαφοροποίηση προς το M1 φαινότυπο επάγεται από την IFN γ , και τα M1 μακροφάγα παράγουν προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες όπως ο TNF, η IL-1 β και η IL-6. Αντίθετα, η αντιφλεγμονώδης IL-10 καθώς και η IL-4 επάγουν τη διαφοροποίηση προς το M2 φαινότυπο και τα M2 μακροφάγα παράγουν μικρότερη ποσότητα ROS, έχουν χαμηλότερη ικανότητα αντιγονοπαρουσίασης καθώς έχουν χαμηλότερη έκφραση του μείζονος συστήματος ιστοσυμβατότητας II (major histocompatibility complex class II, MHC II), και παράγουν TGF- β και IL10 που εξασκούν αντιφλεγμονώδη δράση [53, 101, 240]. Η παραγωγή μεσολαβητών της φλεγμονής και η οξείδωση της LDL στο μικροπεριβάλλον ανάπτυξης της αθηρωματικής βλάβης οδηγεί σε επικράτηση του αθηρογενετικού M1 πληθυσμού [53]. Με αυτό τον τρόπο συναντούμε για μία ακόμη φορά ένα αθηρογενετικό κύκλωμα θετικής ανατροφοδότησης στην έναρξη και στη συνέχεια στην εξέλιξη της αθηρωματικής βλάβης καθώς η oxLDL επάγει την παραγωγή προφλεγμονωδών παραγόντων οι οποίοι επάγουν περαιτέρω το οξειδωτικό stress, και οι προφλεγμονώδεις αυτοί παράγοντες και η oxLDL επάγουν τη διαφοροποίηση προς μακροφάγα με ισχυρό αθηρογενετικό δυναμικό, με αποτέλεσμα την ενίσχυση περαιτέρω της οξείδωσης της LDL και της παραγωγής προφλεγμονωδών κυτταροκινών. Τέλος, ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει ένας νέος τύπος πληθυσμού μακροφάγων, ο Mox ο οποίος επάγεται από την επίδραση της oxPAPC η οποία αποτελεί συστατικό της oxLDL [241]. Η παρουσία των Mox μακροφάγων είναι σημαντική σε αθηρωματικές βλάβες σε πειραματικά μοντέλα αθηροσκληρυνσης σε πειραματόζωα. Η διαφοροποίηση προς τον Mox φαινότυπο επιτελείται μέσω του NRF2 (nuclear factor erythroid 2-like 2) και τα μακροφάγα αυτά παρουσιάζουν σημαντική έκφραση α) της

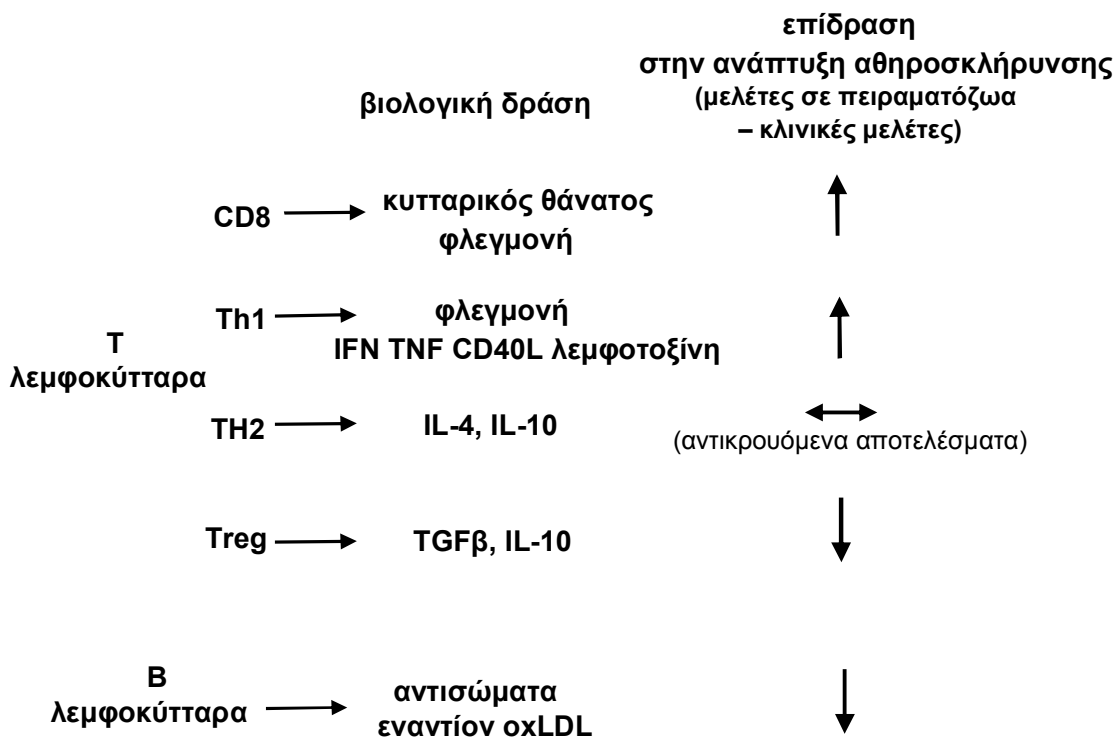
ισχυρής προφλεγμονώδους κυτταροκίνης IL-1β, β) της COX-2 που επάγεται σε θέσεις φλεγμονής και παίζει σημαντικό ρόλο στη ανάπτυξη της φλεγμονής μέσω παραγωγής φλεγμονωδών προσταγλανδινών, πρωτεασών και ριζών οξυγόνου, γ) της hemoxygenase -1 (HO-1), ενός νέου υπό διερεύνηση και θεωρούμενου ως αθηροπροστατευτικού παράγοντα [242], δ) του αγγειογενετικού παράγοντα VEGF (vascular endothelial growth factor, αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας), ε) μειωμένη μεταναστευτική ικανότητα και στ) μειωμένη ικανότητα φαγοκυττάρωσης. Πάντως, ο ακριβής ρόλος των κυτταρικών πληθυσμών των μακροφάγων στην παθογένεση της αθηροσκλήρυνσης δεν έχει ακόμη καθοριστεί.

A1.στ) Δενδριτικά κύτταρα

Τα δενδριτικά κύτταρα είναι παρόντα τόσο στις θέσεις έναρξης της βλάβης όσο και σε σχηματισμένες αθηρωματικές πλάκες. Πρόκειται για κύτταρα της φυσικής ανοσίας των οποίων η διάκριση από τα μακροφάγα είναι αμφιλεγόμενη καθώς πιστεύεται ότι πρόκειται για παρόμοιους πληθυσμούς που πιθανώς προέρχονται αμφότεροι από τα μονοκύτταρα [243]. Διακρίνονται από τα μακροφάγα από την έκφραση του CD11c [80]. Παρομοίως με τα μακροφάγα λειτουργούν ως αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα και επίσης μπορούν να προσλαμβάνουν και να συσσωρεύουν λιπίδια σχηματίζοντας αφρώδη κύτταρα [244]. Όμως μελέτες σε διαγονιδιακά ποντίκια με έλλειψη δενδριτικών κυττάρων καθώς και άλλες σε πειραματικά μοντέλα αθηροσκλήρυνσης έχουν δώσει αντικρουόμενα αποτελέσματα δεικνύοντας έναν ιδιαίτερο ρόλο που δεν έχει ακόμη διευκρινιστεί [80].

A2) Επίκτητη ανοσία

Εκτός από τη φυσική ανοσία όπου πρωτεύοντα ρόλο κατέχει το μακροφάγο, πολλά δεδομένα έχουν συσσωρευθεί τα τελευταία χρόνια τα οποία καταδεικνύουν ένα σημαντικό ρόλο και της επίκτητης ανοσίας [50, 127, 245]. Τα T λεμφοκύτταρα στρατολογούνται στις θέσεις βλάβης με παρόμοιους προς τα μονοκύτταρα μηχανισμούς που περιλαμβάνουν μόρια προσκόλλησης και χημειοκίνες [74, 246]. Β λεμφοκύτταρα ανευρίσκονται επίσης σε αφθονία σε θέσεις περιφερικά της αθηρωματικής βλάβης [247]. Μελέτες σε γονιδιακά τροποποιημένα πειραματόζωα με προδιάθεση στην ανάπτυξη αθηρωμάτωσης κατέδειξαν μεγάλη μείωση της ανάπτυξης αθηρωμάτωσης όταν προστέθηκε σε αυτά ανοσοανεπάρκεια με γονιδιακούς χειρισμούς [50, 248, 249]. Συνοπτικά ο ρόλος της επίκτητης ανοσίας παρουσιάζεται στην **Εικόνα II.3**.



Εικόνα Π.3. Συνοπτική παρουσίαση των κύριων βιολογικών δράσεων των διαφόρων κυττάρων της επίκτητης ανοσίας και της επίδρασής τους στην ανάπτυξη της αθηρωματικής πλάκας

Τα μακροφάγα αλλά και τα δενδριτικά κύτταρα και σε κάποιο βαθμό και τα ενδοθηλιακά κύτταρα λειτουργούν στη θέση ανάπτυξης της αθηρωματικής βλάβης σαν αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα προς τα T λεμφοκύτταρα [50]. Αντιγόνα που παρουσιάζονται στα T λεμφοκύτταρα είναι οι oxLDL, αλλά και άλλα μόρια που ανευρίσκονται στις θέσεις ανάπτυξης της βλάβης όπως HSPs, όπως η hsp60, και πιθανώς μόρια λοιμωδών παραγόντων. Η παρουσίαση των αντιγόνων στα T λεμφοκύτταρα οδηγεί σε ενεργοποίησή τους με αποτέλεσμα την έκκριση κυτταροκινών που επιδρούν με διάφορους τρόπους στην ανάπτυξη της βλάβης.

A2.α) Βοηθητικά T λεμφοκύτταρα της υποομάδας 1

Τα βοηθητικά T λεμφοκύτταρα (λεμφοκύτταρα που φέρουν τον αντιγονικό επίτοπο επιφανείας CD4) της υποομάδας 1 (T helper 1, Th1) εκκρίνουν πλήθος κυτταροκινών όπως IFN-γ, λεμφοτοξίνη, CD40L, και TNF-α [50, 127]. Οι κυτταροκίνες αυτές επάγουν τη φλεγμονή και εμπλέκονται στην ανάπτυξη της βλάβης, επάγουν τη διαφοροποίηση των μακροφάγων προς το φλεγμονώδη πληθυσμό M1, το σχηματισμό ευάλωτης πλάκας και την

αύξηση της θρομβωτικότητας [50, 101, 127, 240]. Ιδιαίτερη σημασία έχει η IFN- γ η οποία αποτελεί τη χαρακτηριστική Th1 κυτταροκίνη. Η παραγωγή της IFN- γ έχει πλήθος επιδράσεων που οδηγούν σε περαιτέρω ανάπτυξη της βλάβης και σε δημιουργία ασταθούς πλάκας. Οι επιδράσεις αυτές περιλαμβάνουν την παραγωγή μορίων προσκόλλησης και χημειοκινών, την παραγωγή προφλεγμονωδών κυτταροκινών, την μείωση της παραγωγής κολλαγόνου, την παραγωγή πρωτεασών, και την υψηλότερη έκφραση αντιγόνων του MCH II [246]. Γονιδιακοί χειρισμοί που οδηγούν σε έλλειψη παραγωγής της IFN- γ ή του υποδοχέα της σε μοντέλα πειραματοζώων έχουν αποδείξει τον ισχυρό αθηρογενετικό ρόλο της IFN- γ [146, 250]. Γονιδιακές τροποποιήσεις που οδηγούν σε εξασθένηση της Th1 απόκρισης σε πειραματικά μοντέλα αθηροσκλήρυνσης σε πειραματόζωα, μείωσαν σε μεγάλο βαθμό την ανάπτυξη αθηρωματικών πλακών επιβεβαιώνοντας έτσι το σημαντικό αθηρογόνο ρόλο των Th1 λεμφοκυττάρων [219, 251].

A2.β) Βοηθητικά T λεμφοκύτταρα της υποομάδας 2

Ο ρόλος των βοηθητικών T λεμφοκυττάρων της υποομάδας 2 (T helper 1, Th2), σε αντίθεση με αυτόν των Th1, δεν έχει διευκρινιστεί. Η IL-4, η οποία αποτελεί τη χαρακτηριστική Th2 κυτταροκίνη, δεν ανευρίσκεται συχνά σε αθηρωματικές πλάκες όπου υπερισχύουν οι Th1 κυτταροκίνες και οι κυτταροκίνες οι προερχόμενες από το μακροφάγο [252]. Η ενεργοποίηση των Th2 λεμφοκυττάρων έχει σαν αποτέλεσμα την έκκριση IL-10 η οποία δρα ανασταλτικά στην ανάπτυξη της φλεγμονής [245]. Μελέτες σε πειραματικά μοντέλα αθηροσκλήρυνσης έχουν δώσει αντικρουόμενα αποτελέσματα [253-255].

A2.γ) Κυτταροτοξικά T λεμφοκύτταρα

Τα κυτταροτοξικά T λεμφοκύτταρα (λεμφοκύτταρα που φέρουν τον αντιγονικό επίτοπο επιφανείας CD8) εκφράζουν κυτταροτοξικούς παράγοντες και παράγοντες που επάγουν την απόπτωση, όπως το Fas συνδέτη επάγοντας τον κυτταρικό θάνατο μέσω λύσης ή απόπτωσης σε ενδοθηλιακά κύτταρα, λεία μυϊκά κύτταρα και μακροφάγα, διαδικασία που συμβάλλει στη διατήρηση και επέκταση της φλεγμονώδους εξεργασίας και κυρίως στο σχηματισμό του νεκρωτικού, ακυτταρικού πυρήνα της βλάβης και στη δημιουργία ασταθούς πλάκας. Αύξηση της ενεργοποίησης των CD8 σε πειραματικά μοντέλα αθηροσκλήρυνσης συνοδεύεται από αύξηση της αθηρογένεσης [256, 257].

A2.δ) Ρυθμιστικά T λεμφοκύτταρα

Τα ρυθμιστικά T λεμφοκύτταρα (λεμφοκύτταρα που φέρουν τους αντιγονικούς επίτοπους επιφανείας CD4 και CD25, regulatory T cells, Treg) παράγουν TGF-β και IL-10 και ασκούν αντιφλεγμονώδη δράση [49, 245]. Η IL-10 επάγει τη διαφοροποίηση των μακροφάγων επάγοντας το M2 πληθυσμό ο οποίος σε αντίθεση με το M1 θεωρείται ότι λειτουργεί προστατευτικά προς την αποδρομή της φλεγμονής [101, 240]. Δεδομένα από μελέτες σε πειραματόζωα με γονιδιακές τροποποιήσεις ή με μεταμόσχευση μυελού ενισχύουν τον προστατευτικό αυτό ρόλο των Treg [258, 259].

A2.ε) Χυμική ανοσία

Ο ρόλος της χυμικής ανοσίας δεν έχει πλήρως διευκρινιστεί, φαίνεται όμως πως δρα περισσότερο αθηροπροστατευτικά [127, 260]. Ανεπάρκεια B λεμφοκυττάρων ή έκπτωση της χυμικής ανοσίας μετά σπληνεκτομή ή χορήγηση αντισώματος εναντίον του CD20 των B λεμφοκυττάρων σε πειραματόζωα, βρέθηκαν να επιτείνουν την ανάπτυξη της αθηροσκλήρυνσης [261-263]. Η οξειδωση των LDL οδηγεί στη δημιουργία αντιγονικών επιτόπων που αφορούν στην τροποποιημένη ApoB και στην οξειδωμένη φωσφατιδυλοχολίνη, που αναγνωρίζονται από το ανοσολογικό σύστημα και οδηγεί στην παραγωγή αντισωμάτων [50, 127, 264]. Αντισώματα εναντίον oxLDL έχει βρεθεί να δρουν προστατευτικά σε μοντέλα πειραματικής αθηροσκλήρυνσης σε πειραματόζωα γεγονός που έχει οδηγήσει σε προσπάθειες πρόληψης και περιορισμού της αθηροσκλήρυνσης με εμβολιασμό με τροποποιημένες LDL [127, 265]. Αντισώματα έναντι οξειδωμένης φωσφατιδυλοχολίνης βρέθηκαν να εμποδίζουν το σχηματισμό αφρωδών κυττάρων και να εξασκούν αντιφλεγμονώδεις δράσεις, πιθανότατα αναστέλλοντας την αναγνώριση της oxLDL από υποδοχείς των μακροφάγων και των ενδοθηλιακών κυττάρων [266, 267]. Σε συμφωνία με τα ανωτέρω, ο τίτλος των αντισωμάτων έναντι φωσφατιδυλοχολίνης βρέθηκε να έχει αντιστρόφως ανάλογη σχέση με την επίπτωση εμφράγματος του μυοκαρδίου και αγγειακού εγκεφαλικού επεισοδίου [268, 269].

B) Μετανάστευση και πολλαπλασιασμός λείων μυϊκών κυττάρων

Η μετανάστευση λείων μυϊκών κυττάρων στον έσω χιτώνα και ο πολλαπλασιασμός τους αποτελούν σημαντικά στοιχεία των προχωρημένων βλαβών. Τα λεία μυϊκά κύτταρα μεταναστεύουν στον έσω χιτώνα από το μέσο χιτώνα όπου φυσιολογικά ανευρίσκονται [1, 23]. Επιπλέον, τα τελευταία χρόνια υπάρχουν στοιχεία πως πρόδρομα κύτταρα κυκλοφορούντα στο περιφερικό αίμα στρατολογούνται στον έσω χιτώνα και

διαφοροποιούνται σε λεία μυϊκά κύτταρα. Τα λεία μυϊκά κύτταρα πολλαπλασιάζονται τοπικά και αποτελούν την κύρια πηγή εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας. Έτσι τα λεία μυϊκά κύτταρα παίζουν σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη της αθηρωματικής πλάκας και σχηματίζουν τον ινώδη χιτώνα γύρω από τον λιπώδη πυρήνα της πλάκας. Επίσης τα λεία μυϊκά κύτταρα προσλαμβάνουν oxLDL μέσω εκκαθαριστών υποδοχέων και είναι δυνατόν να μετατραπούν ακόμη και σε αφρώδη κύτταρα. Διάφορες κυτταροκίνες και αυξητικοί παράγοντες που παράγονται στην αθηρωματική βλάβη έχουν αποδειχθεί να επάγουν τη χημειοταξία και τον πολλαπλασιασμό τους. Τα μόρια αυτά παράγονται κυρίως από τα λευκοκύτταρα (μακροφάγα και T λεμφοκύτταρα) που στρατολογούνται στη θέση ανάπτυξης της βλάβης (παρακρινική δράση) αλλά και από τα ίδια τα λεία μυϊκά κύτταρα (αυτοκρινής δράση). Ο κυριότερος από τους παράγοντες αυτούς θεωρείται ο PDGF ο οποίος προέρχεται από τα μακροφάγα και ο οποίος ασκεί ισχυρή χημειοτακτική δράση στα λεία μυϊκά κύτταρα και επάγει τον πολλαπλασιασμό τους [1, 2, 270]. Άλλοι παράγοντες είναι ο βασικός αυξητικός παράγοντας των ινοβλαστών (basic fibroblast growth factor, bFGF), ο EGF, η IL-1, και ο TNFα [270, 271]. Επιπρόσθετα, η θρομβίνη, η ινική και παράγοντες προερχόμενοι από τα αιμοπετάλια έχουν ισχυρή επίδραση στα λεία μυϊκά κύτταρα [23, 74]. Η επίδραση αυτή της δημιουργίας μικροθρομβώσεων θεωρείται ιδιαίτερα σημαντική και φαίνεται να εξηγεί το γεγονός ότι η αθηρωματική πλάκα δεν ακολουθεί μία αδιάλειπτη γραμμική πορεία ανάπτυξης αλλά αυτή διαταράσσεται από κατά ώσεις αύξηση του μεγέθους της [1, 74]. Μικροθρομβώσεις συμβαίνουν είτε στον αυλό του αγγείου σε μικροσκοπικές διαβρώσεις του ενδοθηλίου που καλύπτει την πλάκα είτε στο δίκτυο μικροκυκλοφορίας που αναπτύσσεται εντός της πλάκας το οποίο συχνά ρήγνυται οδηγώντας σε αιμορραγία εντός της πλάκας [74]. Η θρομβίνη επιδρά στα αιμοπετάλια και προκαλεί την απελευθέρωση PDGF που ασκεί ισχυρή χημειοταξία και κυρίως αποτελεί ισχυρό ερέθισμα πολλαπλασιασμού των λείων μυϊκών κυττάρων, ενώ από τα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια απελευθερώνεται και TGF-β ο οποίος αποτελεί τον ισχυρότερο διεγέρτη παραγωγής κολλαγόνου από τα λεία μυϊκά κύτταρα.

Γ) Παραγωγή και διάσπαση εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας

Η ποσότητα εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας είναι αυτή που κυρίως καθορίζει τον όγκο της αθηρωματικής πλάκας. Τα κύρια συστατικά της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας είναι το κολλαγόνο τύπου I και III, η ελαστίνη, η φιβρονεκτίνη και πρωτεογλυκάνες όπως η biglycan και το decorin ενώ συχνά ανευρίσκεται και αυξημένη παρουσία ελαστικών ινών [1]. Η εξωκυττάρια θεμέλια ουσία παράγεται κατά κύριο λόγο από τα λεία μυϊκά κύτταρα.

Όπως ήδη αναφέρθηκε, ο PDGF που παράγεται από τα μακροφάγα και τα αιμοπετάλια και ο TGF- β που παράγεται από τα μακροφάγα και τα αιμοπετάλια αλλά και από τα Treg, αποτελούν τους υπεύθυνους παράγοντες για την παραγωγή εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας από τα λεία μυϊκά κύτταρα [270]. Αντίθετα η IFN- γ η οποία παράγεται από T λεμφοκύτταρα αποτελεί ισχυρό ανασταλτικό παράγοντα στην παραγωγή κολλαγόνου από τα λεία μυϊκά κύτταρα (411).

Παράλληλα με την παραγωγή της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας, αυτή καταβολίζεται από ένζυμα τα οποία είναι γνωστά ως μεταλλοπρωτεϊνάσες της θεμέλιας ουσίας (matrix metalloproteinases, MMPs). Πλήθος MMPs έχουν περιγραφεί στην αθηρωματική πλάκα με σημαντικότερες τις MMPs 1, 2, 3, 8, 9, 13 [80, 272-274]. Οι MMPs παράγονται κυρίως από τα μακροφάγα αλλά και από ενδοθηλιακά και λεία μυϊκά κύτταρα (229, 371). Μία δεύτερη λιγότερο μελετημένη ομάδα ενζύμων που καταβολίζουν συστατικά της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας είναι οι καθεψίνες S και K [275]. Επιπλέον στο αρτηριακό τοίχωμα εκφράζονται και ανταγωνιστές των MMPs, οι ιστικοί αναστολείς των MMPs (tissue inhibitors of metalloproteinases, TIMPs).

Από τα παραπάνω προκύπτει πως υπάρχει μια δυναμική ισορροπία μεταξύ σύνθεσης θεμέλιας ουσίας και TIMPs από τη μία πλευρά και MMPs από την άλλη. Σημαντικό ρόλο στον ανταγωνισμό αυτό μεταξύ σύνθεσης και καταβολισμού φαίνεται ότι παίζουν τα μακροφάγα και τα T λεμφοκύτταρα. Η ενεργοποίηση TLRs στα μακροφάγα οδηγεί στην παραγωγή MMPs (βλέπε II.1.3.3.A2. Toll-like receptors) [52]. Τα T λεμφοκύτταρα παράγουν το συνδέτη του CD40L ή CD154 ο οποίος συνδεόμενος στο CD40 επάγει την παραγωγή MMPs στα μακροφάγα, στα ενδοθηλιακά και στα λεία μυϊκά κύτταρα [74, 276]. Αφετέρου τα T λεμφοκύτταρα παράγουν IFN- γ η οποία αναστέλλει την παραγωγή κολλαγόνου [277]. Άλλες κυτταροκίνες που εκφράζονται στην αθηρωματική πλάκα και επάγουν την παραγωγή MMPs είναι η Il-1 β και ο TNF α [74]. Η υπερίσχυση του καταβολισμού της θεμέλιας ουσίας θεωρείται ιδιαίτερα σημαντική καθώς η εξασθένηση της ινώδους κάψας που περιβάλλει το λιπώδη πυρήνα της πλάκας, την καθιστά ευάλωτη σε ρήξη και μετέπειτα θρόμβωση [1, 74]. Δευτερευόντως, θεωρείται πιθανό να διευκολύνει τη μετανάστευση των λείων μυϊκών κυττάρων [270].

Δ) Τα μακροφάγα στην προχωρημένη βλάβη

Τα μονοκύτταρα τα οποία εισέρχονται στον έσω χιτώνα έχουν τη δυνατότητα να εξέλθουν και πάλι στην κυκλοφορία [23]. Όμως όπως αναλύθηκε παραπάνω, τα μονοκύτταρα που διαφοροποιούνται σε μακροφάγα στη θέση ανάπτυξης της αθηρωματικής

βλάβης υφίστανται καταστολή της μεταναστευτικής τους ικανότητας, παγιδεύονται και μετατρέπονται σε αφρώδη κύτταρα. Τα μακροφάγα στις θέσεις προχωρημένης βλάβης παρουσιάζουν δύο κρίσιμα χαρακτηριστικά α) την αυξημένη απόπτωση και β) τη μείωση της ικανότητας φαγοκυττάρωσης των αποπτωτικών κυττάρων [80].

Δ1) Απόπτωση των μακροφάγων

Ενώ συνεχίζεται η στρατολόγηση νέων μονοκυττάρων, ο πληθυσμός των μακροφάγων με μακρά παραμονή στη θέση της βλάβης χαρακτηρίζεται από ισχυρή επαγωγή της απόπτωσης. Ο κυτταρικός θάνατος των μακροφάγων που έχει σαν επακόλουθο την απελευθέρωση του πλούσιου σε λιπίδια περιεχομένου τους αποτελεί τον κυριότερο παράγοντα του σταδιακού σχηματισμού ενός νεκρωτικού λιπώδη πυρήνα. Ο κυριότερος μηχανισμός που οδηγεί σε απόπτωση θεωρείται το παρατεταμένο stress του ενδοπλασματικού δικτύου το οποίο προκαλείται από συσσώρευση ελεύθερης χοληστερόλης [174]. Η επαγωγή αυτή της απόπτωσης δεν εξαρτάται μόνο από την παρατεταμένη ανεξέλεγκτη πρόσληψη oxLDL αλλά και από σηματοδοτικές οδούς που εκκινούν από εκκαθαριστές υποδοχείς και TLRs. Όπως ήδη αναφέρθηκε (βλέπε ανωτέρω II.1.3.3.A1.γ. Αλληλεπίδραση εκκαθαριστών υποδοχέων και TLRs) η συνέργεια εκκαθαριστών υποδοχέων και TLRs οδηγεί σε επαγωγή της απόπτωσης σε συνθήκες stress του ενδοπλασματικού δικτύου. Αυτό αποδείχθηκε για τον CD36 και τον TLR2 με συνδέτες την oxLDL αλλά και προϊόντα οξειδωσης της φωσφατιδυλοχολίνης, συγκεκριμένα της PAPC, και την Lp(a) με τη μεσολάβηση αύξησης του οξειδωτικού stress μέσω επαγωγής της υπομονάδας NOX2 της NADPH οξειδάσης [230]. Επίσης αποδείχθηκε για τον SR-A και τον TLR4 με συνδέτη την acLDL και ενεργοποίηση οδών που περιλαμβάνουν την ενεργοποίηση MAP κινασών όπως JNKs και την ενεργοποίηση του NFκB καθώς και την αναστολή σηματοδοτικής οδού που εκκινεί από τον TLR4 και οδηγεί σε παραγωγή IFNβ και σε επιβίωση του κυττάρου [156].

Δ2) Μείωση της ικανότητας φαγοκυττάρωσης των αποπτωτικών κυττάρων

Η ικανότητα φαγοκυττάρωσης αποπτωτικών κυττάρων από τα μακροφάγα (εφεροκυττάρωση, efferocytosis) αποτελεί σημαντική λειτουργία η οποία ανευρίσκεται διαταραγμένη στην προχωρημένη αθηρωματική βλάβη [278]. Η μείωση αυτή της εφεροκυττάρωσης σε συνδυασμό με την αυξημένη απόπτωση μακροφάγων οδηγούν στο σχηματισμό του λιπώδη-νεκρωτικού πυρήνα της αθηρωματικής πλάκας ο οποίος σχηματίζεται από τα νεκρωμένα κύτταρα και το πλούσιο σε λιπίδια ενδοκυττάριο υλικό που διαρρέει από αυτά στον εξωκυττάριο χώρο [80].

Η εφεροκυττάρωση εξαρτάται όπως αναφέρθηκε από εκκαθαριστές υποδοχείς, αλλά και σειρά άλλων παραγόντων όπως ο υποδοχέας τυροσινικής κινάσης MerTK (proto-oncogene tyrosine-protein kinase MER), η σχετιζόμενη με τον υποδοχέα των LDL πρωτεΐνη 1 (low-density lipoprotein receptor-related protein 1, LRP-1), συνδέτες των αποπτωτικών κυττάρων προς τα μακροφάγα όπως η φωσφατιδυλοσερίνη και το κλάσμα του συμπληρώματος C1q και διάφορα μόρια που λειτουργούν ως γέφυρες στην πρόσδεση συνδετών στους υποδοχείς [80, 279]. Η φαγοκυττάρωση των αποπτωτικών κυττάρων επάγει την παραγωγή στη θέση της βλάβης των TGF-β και IL-10. Ο TGF-β και η IL-10 έχουν αντιφλεγμονώδη δράση και επιπλέον ο TGF-β επάγει την παραγωγή εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας ενισχύοντας την κάψα που περιβάλλει το λιπώδη-νεκρωτικό πυρήνα. Τα αίτια της διαταραχής της εφεροκυττάρωσης δεν έχουν πλήρως διευκρινιστεί. Διάφοροι μηχανισμοί και παράγοντες έχουν προταθεί να εμπλέκονται. Σε αυτούς περιλαμβάνονται η διάσπαση του MerTK, η επαγωγή του κυτταρικού θανάτου λόγω αυξημένου οξειδωτικού stress των εφεροκυττάρων λόγω συσσώρευσης μεγάλης ποσότητας χοληστερόλης και η υδρόλυση της οξειδωμένης φωσφατιδυλοσερίνης η οποία αποτελεί συνδέτη της επιφάνειας των αποπτωτικών κυττάρων από την Lp-PLA₂ [280-283]. Η oxLDL πιθανότατα εμπλέκεται άμεσα στη διαταραχή της εφεροκυττάρωσης είτε ανταγωνιζόμενη τους συνδέτες των αποπτωτικών κυττάρων στη σύνδεση σε εκκαθαριστές υποδοχείς, είτε επηρεάζοντας την ικανότητα εφεροκυττάρωσης λόγω διαταραχής του πολυμερισμού της ακτίνης μέσω σηματοδοτικής οδού που εκκινεί από τον TLR4 [279, 284]. Πολυακόρεστα λιπαρά οξέα και προϊόντα οξειδωσής τους βρέθηκαν να επάγουν τη διάσπαση του MerTK, ενώ και η έκθεση μακροφάγων σε κεκορεσμένα λιπαρά οξέα προκάλεσε μείωση της εφεροκυττάρωσης πιθανόν λόγω διαταραχών από την ενσωμάτωση των λιπαρών οξέων στη μεμβράνη τους [282, 285].

Ε) Λιπώδης-νεκρωτικός πυρήνας – Ινώδης κάψα

Ο λιπώδης ή νεκρωτικός πυρήνας αποτελεί χαρακτηριστικό θέσεων προχωρημένης βλάβης. Ο σχηματισμός του λιπώδη πυρήνα είναι, όπως αναπτύχθηκε παραπάνω, το αποτέλεσμα της απόπτωσης μακροφάγων και σε μικρότερο βαθμό λείων μυϊκών κυττάρων σε συνδυασμό με τη μείωση της εφεροκυττάρωσης των μακροφάγων. Πρόκειται για περιοχή συσσώρευσης υπολειμμάτων κυττάρων και λιπιδίων στην οποία υπάρχει μείωση της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας και η οποία διηθείται από μακροφάγα τα οποία ακόμη δεν έχουν νεκρωθεί [6, 286]. Ο λιπώδης πυρήνας περιβάλλεται από ινώδη κάψα που αποτελείται κυρίως από ίνες κολλαγόνου, ο σχηματισμός της οποίας, όπως αναλύθηκε παραπάνω, αποτελεί το αποτέλεσμα παραγωγής εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας από τα λεία μυϊκά

κύτταρα. Η ινώδης κάψα διηθείται από μακροφάγα και σε μικρότερο βαθμό από T λεμφοκύτταρα. Το πάχος της ινώδους κάψας που χωρίζει το λιπώδη πυρήνα από τον αυλό του αγγείου, είναι κρίσιμης σημασίας καθώς καθορίζει την πιθανότητα ρήξης της πλάκας με επακόλουθη θρόμβωση. Η μελέτη των αθηρωματικών πλακών είτε ιστολογικά είτε απεικονιστικά όπως γίνεται σήμερα με πλήθος τεχνικών όπως το ενδοαγγειακό υπέρηχογράφημα και η OCT (optical coherence tomography) και η συσχέτιση αυτών των χαρακτηριστικών με την ανάπτυξη θρόμβωσης ανεξάρτητα από το μέγεθος της πλάκας και τη στένωση του αυλού, οδήγησε στην εισαγωγή της έννοιας της ευάλωτης πλάκας. Πλάκες με ινώδη κάψα με πάχος < 65 μm θεωρούνται ευάλωτες, δηλαδή ιδιαίτερα επιρρεπείς σε ρήξη και συνδέονται σε μεγάλα ποσοστά με την ανάπτυξη οξέων στεφανιαίων συνδρόμων [1, 287, 288].

ΣΤ) Αγγειογένεση

Στην αθηρωματική πλάκα αναπτύσσεται ένα νέο δίκτυο μικροκυκλοφορίας. Η ανάπτυξη των νεοαγγείων αυτών οφείλεται στην επίδραση αγγειογενετικών παραγόντων όπως του VEGF, του FGF και του πλακουντιακού αυξητικού παράγοντα (placental growth factor, PlGF) που παράγονται τοπικά εν μέρει στα πλαίσια ιστικής υποξίας στον αναπτυσσόμενο ιστό [1, 23, 289]. Η σημασία της νεοαγγείωσης στην εξέλιξη της πλάκας συνοψίζεται α) στην παροχή αγγείωσης σε πλάκες των οποίων το μέγεθος έχει φθάσει και ξεπεράσει το κρίσιμο όριο που θα επέτρεπε την επαρκή διάχυση οξυγόνου και θρεπτικών ουσιών από το υπάρχον δίκτυο των vasa vasorum ή από τον αυλό του αγγείου, β) στην αύξηση της επιφάνειας μέσω της οποίας εισέρχονται λιποπρωτεΐνες και στρατολογούνται λευκοκύτταρα στη θέση της βλάβης και γ) στη συχνή πρόκληση αιμορραγιών εντός της πλάκας, καθώς τα νεοαγγεία είναι ευάλωτα σε ρήξη, οι οποίες όπως αναπτύχθηκε ανωτέρω είναι υπεύθυνες για την κατά ώσεις ανάπτυξη της πλάκας μέσω αύξησης των λείων μυϊκών κυττάρων και παραγωγής εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας (βλέπε II.1.3.3.B. Μετανάστευση και πολλαπλασιασμός λείων μυϊκών κυττάρων II.1.3.3.Γ. Παραγωγή και διάσπαση εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας).

Ζ) Αποτιτάνωση

Αποτιτανώσεις μπορεί να εμφανιστούν σε αθηροσκληρυντικές βλάβες. Υποπληθυσμοί λείων μυϊκών κυττάρων αλλά πιθανώς και πρόδρομα κύτταρα από το περιφερικό αίμα παίζουν ρόλο στο σχηματισμό αποτιτανώσεων [1, 290]. Στην διαδικασία της αποτιτάνωσης απαντώνται κοινοί μηχανισμοί με αυτούς της οστεοπόρωσης οι οποίοι όμως λειτουργούν με

έναν αντίστροφο τρόπο οδηγώντας σε εναπόθεση ασβεστίου. Το γεγονός αυτό εξηγεί πιθανώς τη συσχέτιση της ανάπτυξης αθηροσκληρυνσης με την ύπαρξη οστεοπόρωσης. Συγκεκριμένα, σημαντικό ρόλο παίζει ο συνδέτης του υποδοχέα ενεργοποιητή του NF-κB, RANKL (receptor activator of NF-κB ligand), ο οποίος επάγει την αποτιάνωση μέσω των λείων μυϊκών κυττάρων, όπως και τα μειωμένα επίπεδα οστεοπροτεγερίνης η οποία αποτελεί κυτταροκίνη-υποδοχέα η οποία συνδέεται με τον RANKL και αναστέλλει έτσι τη σύνδεσή του με τον RANK [291, 292]. Το οξειδωτικό stress και μεσολαβητές της φλεγμονής εμπλέκονται στην εκδήλωση τη δράσης αυτής των λείων μυϊκών κυττάρων κυρίως μέσω του μεταγραφικού παράγοντα Runx-2 (runt-related transcription factor 2) [293].

II.1.3.4. Επιπλοκές της αθηρωμάτωσης

A) Στένωση του αυλού – ανεπαρκής ανάπτυξη παράπλευρης κυκλοφορίας

Η στένωση του αυλού και η θρόμβωση αποτελούν τις επιπλοκές της αθηρωμάτωσης [1, 2]. Το μέγεθος της αθηρωματικής πλάκας ακολουθεί μία προοδευτική πορεία η οποία διαταράσσεται από ώσεις απότομης αύξησης που πυροδοτούνται από μικροαιμορραγίες εντός της πλάκας (βλέπε ανωτέρω II.1.3.3.B. Μετανάστευση και πολλαπλασιασμός λείων μυϊκών κυττάρων II.1.3.3.Γ. Παραγωγή και διάσπαση εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας). Η στένωση παραμένει ασυμπτωματική εφόσον διατηρείται επαρκής ροή αίματος. Για να εμφανιστούν κλινικές εκδηλώσεις η στένωση συνήθως θα πρέπει να υπερβεί το 60% οπότε εμφανίζονται συμπτώματα από ανεπαρκή ροή αίματος αρχικά σε συνθήκες αυξημένων αναγκών όπως συμβαίνει κατά την επιτέλεση έργου. Τα κλασικότερα εμφανιζόμενα συμπτώματα στην αθηροσκληρυντική νόσο συνίστανται στην εμφάνιση σταθερής στηθάγχης όσον αφορά στη στεφανιαία κυκλοφορία και στην εμφάνιση διαλείπουσας χωλότητας όσον αφορά στην κυκλοφορία των κάτω άκρων.

Παράλληλα με τη στένωση των αρτηριών, σημαντικός παράγοντας για την εμφάνιση ιστικής ισχαιμίας αποτελεί η αδυναμία ανάπτυξης παράπλευρης κυκλοφορίας. Στην ανάπτυξη παράπλευρης κυκλοφορίας σημαντικό ρόλο παίζουν τα πρόδρομα ενδοθηλιακά κύτταρα (endothelial progenitor cells, EPCs) [294, 295]. Τα EPCs παίζουν ρόλο στην ομοιοστασία του αγγειακού ενδοθηλίου και κυρίως στην ανάπτυξη νεοαγγείωσης σε περιοχές ισχαιμίας. Τα EPCs είναι κύτταρα CD34+ προερχόμενα από το μυελό των οστών, τα οποία κυκλοφορούν στο περιφερικό αίμα και έχουν την ικανότητα να διαφοροποιούνται σε ενδοθηλιακά κύτταρα. Επιπλέον εκφράζουν και τον υποδοχέα VEGFR2 (vascular endothelial growth factor receptor 2) ο οποίος είναι σημαντικός για τη διαφοροποίησή τους

προς τον ενδοθηλιακό φαινότυπο. Τα EPCs κινητοποιούνται από το μυελό των οστών σε ανταπόκριση σε μία σειρά από κυτταροκίνες και χημειοκίνες όπως ο VEGF, ο επαγόμενος από την υποξία παράγοντας α (hypoxia-inducible factor alpha, HIF- α) και ο προερχόμενος από κύτταρα στρώματος παράγοντας 1 (stromal cell-derived factor 1, SDF-1) που παράγονται κυρίως σε θέσεις ισχαιμίας [295]. Τα EPCs χαρακτηρίζονται από υψηλό δυναμικό παλλαπλασιασμού και κυρίως από υψηλό δυναμικό παραγωγής κυτταροκινών που προάγουν την αγγειογένεση όπως ο VEGF, ο ηπατοκυτταρικός αυξητικός παράγοντας (hepatocyte growth factor, HGF), ο παρόμοιος προς την ινσουλίνη αυξητικός παράγοντας 1 (insulin-like growth factor 1, IGF-1), ο HIF- α και ο SDF-1 [296]. Τα EPCs ενσωματώνονται περιφερικά στο αγγειακό δίκτυο και συμβάλλουν στην ανάπτυξη νεοαγγείωσης αρχικά δημιουργώντας τριχοειδή και αργότερα και μεγαλύτερου μεγέθους αγγεία. Ο αριθμός τους και η λειτουργικότητά τους συσχετίζονται αρνητικά με την ύπαρξη και τη βαρύτητα της καρδιαγγειακής νόσου και με την ύπαρξη όλων των κλασικών παραγόντων κινδύνου για την ανάπτυξη αθηροσκλήρυνσης όπως το κάπνισμα, ο ΣΔ, η ΑΥ και η δυσλιπιδαιμία με αρνητική συσχέτιση με τις LDL και θετική συσχέτιση με τις HDL [297-301]. Συσχετίζεται αρνητικά με την ύπαρξη ενδοθηλιακής δυσλειτουργίας και βρέθηκε να αποτελεί ανεξάρτητο παράγοντα κινδύνου για την ανάπτυξη καρδιαγγειακής νόσου [302, 303]. Ο ΣΔ αποτελεί τον ισχυρότερο από τους παράγοντες καρδιαγγειακού κινδύνου που επηρεάζουν αρνητικά τον αριθμό και τη λειτουργικότητα των EPCs [304]. Η υπεργλυκαιμία, η μείωση της βιοδιαθεσιμότητας του NO, το οξειδωτικό stress και η επίδραση της oxLDL έχουν αρνητική επίδραση στη διαφοροποίηση και στη λειτουργικότητά τους [81, 305, 306]. Είναι φανερό πως όλες αυτές οι συνθήκες οι οποίες προάγουν την ανάπτυξη της αθηροσκλήρυνσης, ταυτόχρονα επηρεάζουν αρνητικά και τον πληθυσμό των EPCs.

B) Θρόμβωση – διάβρωση, ρήξη της αθηρωματικής πλάκας

Η θρόμβωση αποτελεί τη σοβαρότερη επιπλοκή της αθηρωματικής πλάκας και αποτελεί το αίτιο της συντριπτικής πλειονότητας αν όχι του συνόλου των οξέων στεφανιαίων επεισοδίων τα οποία παρουσιάζονται ως ασταθής στηθάγχη, οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου ή αιφνίδιος θάνατος. Η θρόμβωση επέρχεται όταν αίρεται ο φραγμός του ενδοθηλίου ο οποίος εμποδίζει τα αιμοπετάλια και τους παράγοντες πήξης του αίματος να έλθουν σε επαφή με το υπενδοθηλιακό κολλαγόνο και τον ιστικό παράγοντα (tissue factor, TF) [1, 307]. Η θρόμβωση που οδηγεί σε κλινικό σύνδρομο επέρχεται σαν αποτέλεσμα είτε ρήξης της αθηρωματικής πλάκας που αποτελεί το συχνότερο αίτιο, είτε διάβρωσης της επιφάνειας του έσω χιτώνα [1, 307]. Πρέπει να τονιστεί πως η θρόμβωση δεν συμβαίνει μόνο σε πλάκες

μεγάλου μεγέθους αλλά και σε μικρότερες οι οποίες δεν προκαλούν αιμοδυναμικές μεταβολές. Παρά το ότι μεγάλες πλάκες που προκαλούν σημαντική στένωση φαίνεται να έχουν κάπως μεγαλύτερη πιθανότητα να θρομβωθούν, μόνο το 15% των οξέων εμφραγμάτων μυοκαρδίου προκαλούνται από πλάκες που προκαλούν στένωση μεγαλύτερη του 60% [1].

Η ρήξη της πλάκας αφορά κυρίως στις ευάλωτες αθηρωματικές πλάκες. Οι ευάλωτες σε ρήξη πλάκες χαρακτηρίζονται από το ότι ο λιπώδης πυρήνας περιβάλλεται από λεπτή εξασθενημένη ινώδη κάψα με μικρή παρουσία λείων μυϊκών κυττάρων και μεγάλη διήθηση από μακροφάγα και T λεμφοκύτταρα. Η μεγάλη αυτή κυτταρική διήθηση, η έντονη φλεγμονώδης διεργασία και το οξειδωτικό stress βρίσκονται στο επίκεντρο της δημιουργίας της ευάλωτης πλάκας [289, 308]. Η μετατόπιση της ισορροπίας προς την πλευρά του καταβολισμού της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας σε βάρος της σύνθεσής της αποτελεί τον σημαντικότερο μηχανισμό δημιουργίας της ευάλωτης πλάκας (βλέπε II.1.3.3.Γ. Παραγωγή και διάσπαση εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας, και II.1.3.3.Ε. Λιπώδης-νεκρωτικός πυρήνας – Ινώδης κάψα). Στον μηχανισμό αυτό κυρίαρχο ρόλο έχει η παραγωγή IFN- γ και CD40L από τα T λεμφοκύτταρα. Η IFN- γ επιδρά στα λεία μυϊκά κύτταρα αναστέλλοντας την παραγωγή εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας, ενώ ο CD40L επιδρά στα μακροφάγα προκαλώντας την παραγωγή και απελευθέρωση MMPs [307]. Ρόλο πιθανότατα παίζει και η αύξηση της απόπτωσης των λείων μυϊκών κυττάρων από την επίδραση κυτταροκινών και από την επίδραση T λεμφοκυττάρων που εκφράζουν Fas συνδέτη (Fas ligand, FasL) ο οποίος συνδεόμενος με τον υποδοχέα Fas (Fas receptor ή CD95), στην επιφάνεια των λείων μυϊκών κυττάρων πυροδοτεί την απόπτωση [309]. Επιπλέον η περιοχή της βλάβης και ιδιαίτερα η περιοχή του λιπώδους πυρήνα είναι θέσεις αυξημένης θρομβωτικότητας κυρίως λόγω της υπερέκφρασης του TF αλλά και του PAI-1 [310, 311]. Ιδιαίτερη σημασία στην υπερέκφραση του TF έχει η υπερπαραγωγή του από τα μακροφάγα η οποία επάγεται κυρίως από την επίδραση του CD40L που παράγεται από τα T λεμφοκύτταρα [310].

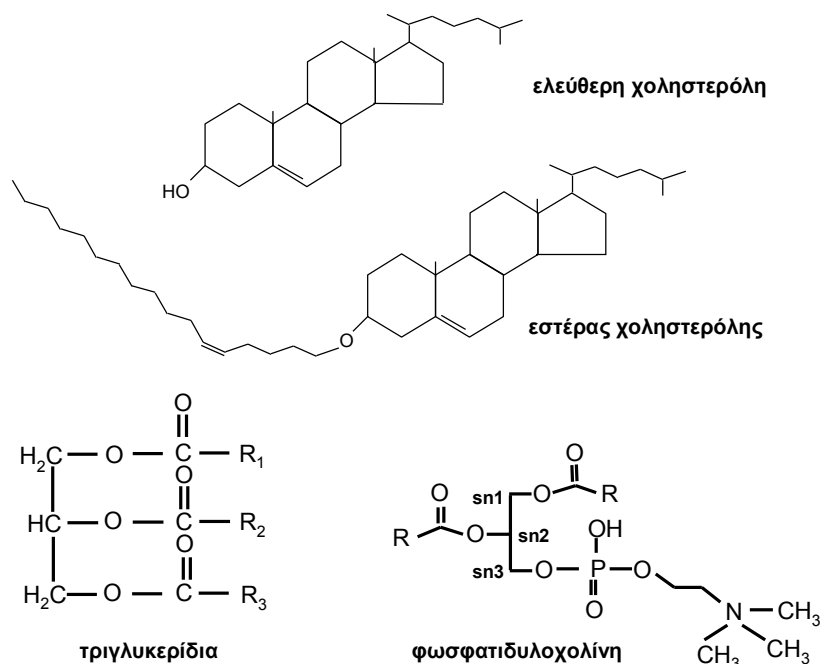
Η διάβρωση του έσω χιτώνα αποτελεί το δεύτερο μηχανισμό πρόκλησης θρόμβωσης στην αθηρωματική πλάκα. Η διάβρωση συνίσταται σε μικρότερη ή μεγαλύτερη απογύμνωση του έσω χιτώνα από ενδοθηλιακά κύτταρα με αποτέλεσμα την επαφή των αιμοπεταλίων και των παραγόντων της πήξης με τη βασική μεμβράνη και επακόλουθη θρόμβωση. Η δημιουργία διαβρώσεων είναι συχνή και μόνο ένα μικρό ποσοστό δίνει γένεση σε θρόμβωση που θα προκαλέσει κλινικό σύνδρομο [307]. Όμως, όπως αναφέρθηκε παραπάνω, οι μικροθρομβώσεις οι οποίες δεν γίνονται κλινικά αντιληπτές έχουν σημασία στην ανάπτυξη της πλάκας καθώς η παραγόμενη θρομβίνη και η ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων προάγουν

μέσω PDGF και TGF- β αφενός τον πολλαπλασιασμό των λείων μυϊκών κυττάρων και αφετέρου την παραγωγή θεμέλιας ουσίας οδηγώντας σε απότομη αύξηση του μεγέθους της πλάκας (βλέπε II.1.3.3.B. Μετανάστευση και πολλαπλασιασμός λείων μυϊκών κυττάρων) [23, 74]. Η διάβρωση του έσω χιτώνα προκαλείται από απόπτωση και επακόλουθη αποφολίδωση των ενδοθηλιακών κυττάρων. Και εδώ η τοπική φλεγμονή έχει κυρίαρχο ρόλο χωρίς όμως η παθογένεση της διάβρωσης να έχει πλήρως διευκρινιστεί. Σαν παράγοντας ιδιαίτερης σημασίας θεωρείται η διήθηση από μακροφάγα και η παραγωγή από αυτά υποχλωρικού οξέος από τη μυελοϋπεροξειδάση η οποία προκαλεί απόπτωση των ενδοθηλιακών κυττάρων [308, 312]. Επιπλέον, η υπερπαραγωγή MMPs από τα μακροφάγα αλλά και τα ίδια τα ενδοθηλιακά κύτταρα, η οποία επάγεται στα πλαίσια της φλεγμονής, προκαλεί τη διάσπαση της θεμέλιας ουσίας και την εξασθένηση των δεσμών μεταξύ των ενδοθηλιακών κυττάρων και των δεσμών μεταξύ αυτών και της βασικής μεμβράνης, διευκολύνοντας την αποφολίδωση των ενδοθηλιακών κυττάρων και την απογύμνωση του έσω χιτώνα [313].

II.2. ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΣΤΙΣ ΛΙΠΟΠΡΩΤΕΪΝΕΣ

II.2.1. ΔΟΜΗ ΚΑΙ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΛΙΠΟΠΡΩΤΕΪΝΩΝ [1, 2, 23]

Τα λιπίδια μεταφέρονται στο πλάσμα από και προς τους ιστούς με τη μορφή των λιποπρωτεϊνών που εξασφαλίζουν τη διαλυτότητά τους. Οι λιποπρωτεΐνες είναι μακρομοριακά συμπλέγματα τα οποία αποτελούνται από εξειδικευμένες πρωτεΐνες οι οποίες ονομάζονται απολιποπρωτεΐνες (apolipoproteins) και λιπίδια τα οποία είναι η ελεύθερη και η εστεροποιημένη χοληστερόλη, φωσφολιπίδια και τριγλυκερίδια (**Εικόνα II.4.**). Η βασική δομή των λιποπρωτεϊνών συνίσταται στην ύπαρξη ενός πυρήνα από υδρόφοβα λιπίδια τα οποία είναι οι εστέρες χοληστερόλης και τα τριγλυκερίδια, ο οποίος περιβάλλεται από υδρόφιλα λιπίδια τα οποία είναι τα φωσφολιπίδια και η ελεύθερη χοληστερόλη, και τις απολιποπρωτεΐνες. Οι απολιποπρωτεΐνες παίζουν ρόλο πέρα από τη δομική σταθερότητα των λιποπρωτεϊνών και ως συμπαραγοντες ενζύμων και ως συνδέτες υποδοχέων με επακόλουθο την πρόσληψη ολόκληρου του μακρομορίου της λιποπρωτεΐνης ή τη μεταφορά λιπιδίων.



Εικόνα II.4. Δομή των βασικών λιπιδικών συστατικών των λιποπρωτεϊνών

Τα τριγλυκερίδια αποτελούνται από ένα γλυκερινικό σκελετό στον οποίο είναι συνδεδεμένα με εστερικό δεσμό τρία λιπαρά οξέα. Η φωσφατιδυλοχολίνη αποτελείται από

ένα μόριο γλυκερόλης το οποίο έχει συνδεδεμένα λιπαρά οξέα στις θέσεις sn-1 και sn-2 με εστερικό δεσμό και ενίοτε ένα αλκάνιο με αιθερικό δεσμό ενώ στη θέση sn-3 βρίσκεται φωσφορική ομάδα η οποία είναι συνδεδεμένη με χολίνη (φωσφατιδυλοχολίνη, phosphatidylcholine, PC) ή με αιθανολαμίνη (φωσφατιδυλοαιθανολαμίνη, phosphatidylethanolamine, PE) ή με σερίνη (φωσφατιδυλοσερίνη, phosphatidylserine, PS) ή με ινοσιτόλη (φωσφατιδυλοϊνοσιτόλη, phosphatidylinositol, PI).

Οι λιποπρωτεΐνες διαφέρουν ως προς το μέγεθος, την πυκνότητα και τη σύστασή τους σε λιπίδια, το είδος απολιποπρωτεϊνών που περιέχουν και την ηλεκτροφορητική τους κινητικότητα. Η πυκνότητά τους εξαρτάται κατά κύριο λόγο από την περιεκτικότητα σε απολιποπρωτεΐνες. Η επικρατούσα κατάταξή τους είναι αυτή που βασίζεται στην πυκνότητά τους και η οποία διακρίνει τα χυλομικρά, τις πολύ χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνες (very low density lipoproteins, VLDL), τις ενδιάμεσης πυκνότητας λιποπρωτεΐνες (intermediate density lipoproteins, IDL), τις χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνες (low density lipoproteins, LDL) και τις υψηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνες (high density lipoproteins, HDL). Το μέγεθος των λιποπρωτεϊνών μεταβάλλεται αντιστρόφως προς την πυκνότητά τους. Τα χυλομικρά και οι VLDL αποτελούν τους κύριους μεταφορείς των τριγλυκεριδίων, ενώ οι LDL και οι HDL είναι οι κύριοι μεταφορείς της χοληστερόλης κυρίως με τη μορφή της εστεροποιημένης χοληστερόλης. Επίσης οι λιποπρωτεΐνες αποτελούν μεταφορείς λιποδιαλυτών πρωτεϊνών και ενζύμων. Τα ένζυμα αυτά είναι η συνδεδεμένη με λιποπρωτεΐνες φωσφολιπάση A2 (lipoprotein associated phospholipase A2, Lp-PLA₂) η οποία υδρολύει μικρές ανθρακικές αλυσίδες από την sn-2 θέση του γλυκερινικού σκελετού του μορίου του PAF και της οξειδωμένης φωσφατιδυλοχολίνης, και για την οποία θα γίνει εκτενής αναφορά παρακάτω, η ακυλο-CoA:λεκιθίνη ακυλοτρανσφεράση (lecithin:cholesterol acyl transferase, LCAT) η οποία καταλύει την αντίδραση εστεροποίησης της χοληστερόλης, η παροξονάση η οποία παρουσιάζει αντιοξειδωτική δράση και η πρωτεΐνη-μεταφορέας εστέρων χοληστερόλης (cholesterol ester transfer protein, CETP) η οποία ανταλλάσσει εστέρες χοληστερόλης με τριγλυκερίδια μεταξύ των λιποπρωτεϊνών. Τα κύρια χαρακτηριστικά των λιποπρωτεϊνών παρουσιάζονται στον **Πίνακα II.2**. Στη συνέχεια θα εκτεθεί συνοπτικά ο μεταβολισμός των λιποπρωτεϊνών.

Πίνακας Π.2. Κύρια χαρακτηριστικά λιποπρωτεϊνών					
Λιποπρωτεΐνη	Πυκνότητα g/ml	Διάμετρος nm	Ηλεκτροφορητική κινητικότητα	Απολιποπρωτεΐνες κύριες άλλες	ένζυμα
Χυλομικρά	<0.95	100-1000	αρχή	B48, E AI, Cs	
Υπολείμματα χυλομικρών	0.95-1.006	30-80	αρχή	B48, E A-I, A-IV, Cs	
VLDL	<1.006	40-50	προ-βήτα	B100 AI, Cs,E	
IDL	1.006-1.019	25-30	ευρεία βήτα	B100, E	
LDL	1.019-1.063	20-25	βήτα	B100	Lp-PLA ₂
HDL	1.063-1.210	6-10	άλφα	A-I, A-II A-IV	Lp-PLA ₂ , LCAT, CETP, παροξόνωση
Lp(a)	1.051-1.082	25	άλφα	B100, (a)	

Π.2.2. ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΣ ΛΙΠΟΠΡΩΤΕΪΝΩΝ [1, 2, 23]

Π.2.2.1. Μεταφορά λιπιδίων της τροφής (εξωγενής οδός)

Τα λιπίδια της τροφής απορροφώνται από το λεπτό έντερο. Τα τριγλυκερίδια τα οποία αποτελούν την κύρια πηγή λίπους της τροφής υδρολύονται από τις παγκρεατικές λιπάσες σε λιπαρά οξέα και μονογλυκερίδια ή διγλυκερίδια και αυτά γαλακτωματοποιούνται με τη βοήθεια των χολικών οξέων σε μικύλλια. Στα μικύλλια, των οποίων η δομή παρομοιάζει με αυτή των λιποπρωτεϊνών, άλλα κύρια συστατικά είναι φωσφολιπίδια και ελεύθερη χοληστερόλη. Μετά την πρόσληψη των μικυλλίων στα εντεροκύτταρα σχηματίζονται εκ νέου τριγλυκερίδια με εστεροποίηση. Τα τριγλυκερίδια, τα φωσφολιπίδια και ελεύθερη χοληστερόλη μαζί με απολιποπρωτεΐνες, κυρίως ApoB48 η οποία παράγεται από τα εντεροκύτταρα, αλλά και ApoE σχηματίζουν τα χυλομικρά τα οποία αποτελούνται έως και 90% από τριγλυκερίδια. Τα χυλομικρά εκκρίνονται στη λέμφο από όπου εισέρχονται στη συστηματική κυκλοφορία. Στην κυκλοφορία τα χυλομικρά εμπλουτίζονται με ApoC-II. Τα τριγλυκερίδια των χυλομικρών υφίστανται υδρόλυση από την λιποπρωτεϊνική λιπάση, συμπάροντας της οποίας είναι η ApoC-II, η οποία βρίσκεται στην επιφάνεια των ενδοθηλιακών κυττάρων στα τριχοειδή του λιπώδη ιστού, των σκελετικών μυών και του

μυοκαρδίου, και τα ελεύθερα λιπαρά οξέα προσλαμβάνονται από τα λιποκύτταρα και τα μυοκύτταρα είτε για να καταβολιστούν είτε για να αποθηκευθούν με εστεροποίηση με τη μορφή τριγλυκεριδίων ενώ κάποια ελεύθερα λιπαρά οξέα θα παραμείνουν στην κυκλοφορία και μεταφερόμενα κυρίως από την αλβουμίνη θα προσληφθούν τελικά από άλλους ιστούς, κυρίως το ήπαρ. Καθώς το μέγεθος του υδρόφοβου πυρήνα των χυλομικρών μειώνεται με την υδρόλυση των τριγλυκεριδίων, υδρόφιλα λιπίδια από την επιφάνεια, φωσφολιπίδια και ελεύθερη χοληστερόλη, μεταφέρονται στην HDL. Αυτά τα μειούμενα προοδευτικά σε μέγεθος λιποπρωτεϊνικά σωματίδια αποτελούν τελικά τα υπολείμματα των χυλομικρών τα οποία προσλαμβάνονται μέσω της ApoE στο ήπαρ. Η πρόσληψη αυτή οδηγεί στη σχεδόν πλήρη εξαφάνιση των χυλομικρών και των υπολειμμάτων τους περίπου 12 ώρες μετά το γεύμα σε άτομα με φυσιολογικό μεταβολισμό των χυλομικρών.

II.2.2.2. Μεταφορά λιπιδίων που παράγονται από το ήπαρ (ενδογενής οδός)

Από τα ηπατικά κύτταρα παράγονται και εκκρίνονται οι VLDL. Οι VLDL, όπως και τα χυλομικρά, είναι πλούσιες σε τριγλυκερίδια αν και με μεγαλύτερη αναλογία χοληστερόλης προς τριγλυκερίδια η οποία είναι ~ 1:5. Η κύρια απολιποπρωτεΐνη των VLDL είναι η ApoB100 η οποία αναγνωρίζεται από τον υποδοχέα των LDL ενώ οι VLDL εμπλουτίζονται και με άλλες απολιποπρωτεΐνες όπως την ApoCII και την ApoE. Οι VLDL υφίστανται υδρόλυση των τριγλυκεριδίων τους από τη λιποπρωτεϊνική λιπάση και προοδευτική μείωση του μεγέθους τους με όμοιο τρόπο όπως περιγράφηκε ήδη για τα χυλομικρά. Σε ύπαρξη αντίστασης της ινσουλίνης υπάρχει μειωμένη δραστηριότητα της λιποπρωτεϊνικής λιπάσης και αυξημένη δραστηριότητα της ορμονοευαίσθητης λιπάσης στην περιφέρεια, η οποία υδρολύει τα ενδοκυττάρια τριγλυκερίδια με απελευθέρωση ελεύθερων λιπαρών οξέων στην κυκλοφορία. Η αυξημένη προσφορά ελεύθερων λιπαρών οξέων στο ήπαρ οδηγεί σε αύξηση της σύνθεσης VLDL. Εκτός από την επίδραση της λιποπρωτεϊνικής λιπάσης στις VLDL, υπάρχει επίσης ανταλλαγή τριγλυκεριδίων των VLDL με εστέρες χοληστερόλης κυρίως από τις HDL μέσω της CETP. Κατά την προοδευτική συρρίκνωση των VLDL λόγω της υδρόλυσης των τριγλυκεριδίων τους, οι ApoCs μεταφέρονται στις HDL και οι VLDL μετατρέπονται σε IDL που αποτελούν τα υπολείμματα των VLDL. Το μακρομόριο της IDL περιέχει πλέον μόνο ApoB100 και ApoE και ίση ποσότητα χοληστερόλης και τριγλυκεριδίων. Μεγάλο μέρος των IDL καθαίρονται από το ήπαρ μέσω σύνδεσης της ApoE στον υποδοχέα των VLDL, στον υποδοχέα των VLDL υπολειμμάτων, και στον LDL υποδοχέα (LDLR, ονομαζόμενο επίσης και apoB/E υποδοχέα). Οι υπόλοιπες IDL υφιστάμενες την επίδραση της ηπατικής λιπάσης η οποία υδρολύει τριγλυκερίδια,

συρρικνώνονται ακόμη περισσότερο και παράλληλα χάνουν το σύνολο της ApoE που μεταφέρεται σε άλλες λιποπρωτεΐνες, κυρίως HDL. Επίσης, φωσφολιπίδια τα οποία λόγω της συρρίκνωσης του μακρομορίου πλεονάζουν στην επιφάνεια μεταφέρονται σε νεοσχηματιζόμενα μόρια HDL μέσω της PLTP (phospholipid transfer protein). Το αποτέλεσμα είναι η μετατροπή των IDL σε LDL που περιέχουν κυρίως χοληστερόλη με τη μορφή εστέρων της και μικρή ποσότητα τριγλυκεριδίων, συνήθως μεταξύ 4 και 8% της μάζας τους. Η περιεκτικότητα σε τριγλυκερίδια μπορεί να αυξηθεί επί αυξημένης συγκέντρωσης τριγλυκεριδίων στο πλάσμα μέσω ανταλλαγής τριγλυκεριδίων των VLDL με εστέρες χοληστερόλης των LDL μέσω της CETP. Σε αυτή την περίπτωση η μετέπειτα υδρόλυση τριγλυκεριδίων από την ηπατική λιπάση θα οδηγήσει σε σχηματισμό μικρότερων και πυκνότερων LDL, για τις οποίες υπάρχουν στοιχεία ότι είναι αυξημένης αθηρογενετικότητας. Όσον αφορά στις απολιποπρωτεΐνες, οι LDL περιέχουν αποκλειστικά ApoB100. Το μεγαλύτερο μέρος της LDL προσλαμβάνεται μέσω του LDL – υποδοχέα από το ήπαρ.

II.2.2.3. Κυτταρική σύνθεση χοληστερόλης – ομοιοστατικοί μηχανισμοί

Μετά την κυτταρική πρόσληψη λιποπρωτεΐνης οι υπεύθυνοι υποδοχείς στο μεγαλύτερο μέρος τους αποσπώνται και επανακάμπτουν στην κυτταροπλασματική μεμβράνη, ενώ οι λιποπρωτεΐνες ενσωματώνονται σε λυσοσώματα όπου με την επίδραση καταλυτικών ενζύμων, κυρίως της υδρολάσης εστέρων χοληστερόλης και καθεψινών, απελευθερώνουν ελεύθερη χοληστερόλη και αποδομούν τις απολιποπρωτεΐνες. Εκτός από την προσλαμβανόμενη χοληστερόλη, χοληστερόλη παράγεται και στο ίδιο το κύτταρο ιδίως στα ηπατοκύτταρα. Η ρύθμιση της ενδογενούς σύνθεσης από τα επίπεδα της ενδοκυττάριας χοληστερόλης έχει μελετηθεί ιδιαίτερα σε σχέση με την είσοδο χοληστερόλης μέσω του LDL-R (βλέπε II.1.3.2.Δ2. Μεταβολισμός λιποπρωτεϊνών – εκροή χοληστερόλης). Η ενδογενής παραγωγή χοληστερόλης καταστέλλεται από την ελεύθερη χοληστερόλη που εισάγεται μέσω του LDL-R. Η ελεύθερη χοληστερόλη μέσω των SREBPs (steroid-responsive element binding proteins) αναστέλλει τη μεταγραφή του LDL-R και επακόλουθα την περαιτέρω πρόσληψη χοληστερόλης, καθώς και την ενδογενή σύνθεση χοληστερόλης καταστέλλοντας το καθορίζον το ρυθμό σύνθεσης της χοληστερόλης ένζυμο, 3-υδροξυ-μεθυλογλουταρυλο συνένζυμο A (3-hydroxy-methylglutaryl coenzyme A, HMG-CoA).

II.2.2.4. Μεταβολισμός των λιποπρωτεϊνών και οδός της αντίστροφης μεταφοράς χοληστερόλης

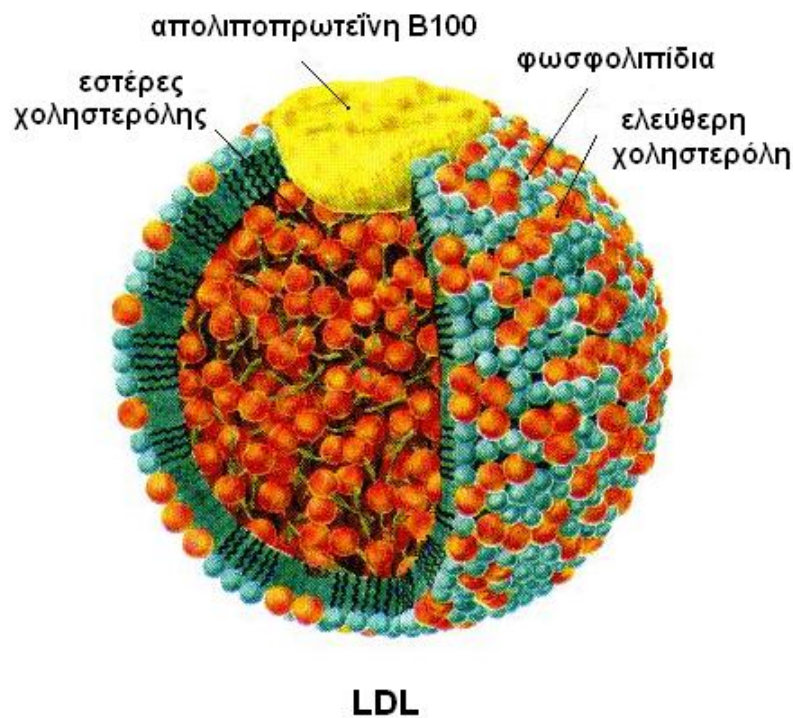
Η μεταφορά χοληστερόλης από περιφερικούς ιστούς προς το ήπαρ από όπου μπορεί να αποβληθεί με τη χολή, αποτελεί την οδό της αντίστροφης μεταφοράς. Η μεταφορά αυτή επιτελείται από τις HDL. Τα πρώιμα μακρομόρια HDL (nascent HDL) συντίθενται στο ήπαρ και στο έντερο. Τα αρχικά αυτά μακρομόρια αποτελούνται κυρίως από ApoA1 και φωσφολιπίδια. Τα μακρομόρια αυτά εμπλουτίζονται προοδευτικά με ελεύθερη χοληστερόλη και φωσφολιπίδια στους περιφερικούς ιστούς μέσω της εκροής χοληστερόλης και φωσφολιπιδίων από κύτταρα σε περιφερικούς ιστούς, η οποία αποτελεί και το αρχικό στάδιο της αντίστροφης μεταφοράς χοληστερόλης (βλέπε II.1.3.2.Δ2. Μεταβολισμός λιποπρωτεϊνών – εκροή χοληστερόλης). Η εκροή χοληστερόλης η οποία έχει ιδιαίτερα μελετηθεί στα μακροφάγα, ελέγχεται από τις πρωτεΐνες ABCA1 και ABCG1 που ανήκουν στην οικογένεια των διαμεμβρανικών πρωτεϊνών που χρησιμοποιούν ATP για να μεταφέρουν διάφορα υποστρώματα διαμέσου της κυτταροπλασματικής μεμβράνης (ATP-binding cassette transporters, ABCs) και απαιτεί την παρουσία της ApoA1, η σύνδεση της οποίας σε ABCs προκαλεί φωσφορυλίωσή τους και επακόλουθη μεταφορά ελεύθερης χοληστερόλης και φωσφολιπιδίων προς πρώιμα ή ώριμα μακρομόρια HDL. Η ελεύθερη χοληστερόλη που μεταφέρεται στην HDL εστεροποιείται από την LCAT και η συσσώρευση εστέρων χοληστερόλης στον πυρήνα οδηγεί σε προοδευτική αύξηση του μακρομορίου της HDL. Η χοληστερόλη που παραλαμβάνεται από τις HDL παραλαμβάνεται από το ήπαρ ή από στεροειδοπαραγωγούς ιστούς μέσω του εκκαθαριστή υποδοχέα SRB1, η σύνδεση στον οποίο έχει την ιδιότητα να οδηγεί σε πρόσληψη εκλεκτικά λιπιδίων από το κύτταρο.

II.2.3. ΦΥΣΙΚΗ ΚΑΙ ΟΞΕΙΔΩΜΕΝΗ LDL

II.2.3.1. Φυσική LDL

Η φυσική, μη οξειδωμένη LDL, περιέχει ως απολιποπρωτεΐνη ένα μόριο απολιποπρωτεΐνης B100 η οποία συντίθεται στο ήπαρ, αποτελείται από 4536 αμινοξέα, έχει μοριακό βάρος 512 KD, και αποτελεί ~ 20-25% του συνολικού βάρους του μακρομορίου της LDL [1, 23, 314]. Το μόριο της ApoB100 εντοπίζεται στην επιφάνεια του μακρομορίου της LDL όχι σαν σφαιρικό μόριο όπως σχηματικά απεικονίζεται αλλά περισσότερο σαν δίχτυ που την περιβάλλει [314]. Το μόριο της ApoB100 είναι γλυκοζυλιωμένο από υδατάνθρακες όπως μαννόζη, γαλακτόζη, γλυκοζαμίνη και σιαλικό οξύ, που αποτελούν ~ 8-10% του συνολικού βάρους της. Το λιπιδικό τμήμα αποτελείται από εστέρες χοληστερόλης και

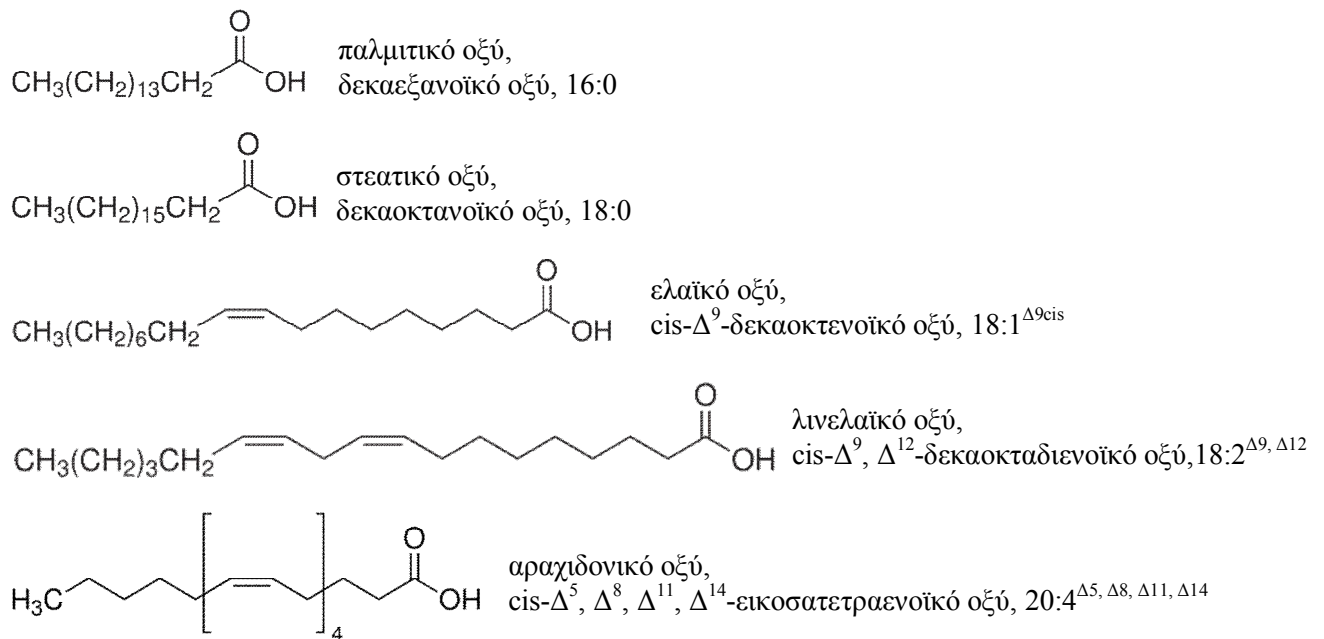
τριγλυκερίδια που εντοπίζονται σαν υδρόφοβα μόρια στο εσωτερικό της LDL και αποτελούν ~ 40% και ~ 4% αντίστοιχα του συνολικού βάρους της LDL, ενώ στην επιφάνεια εντοπίζονται τα υδρόφιλα μόρια των φωσφολιπιδίων και της ελεύθερης χοληστερόλης που αποτελούν ~20-25% και ~8-10% αντίστοιχα του συνολικού βάρους της LDL. Η δομή της LDL απεικονίζεται αδρά στην **Εικόνα II.5**.



Εικόνα II.5. Δομή χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνης (LDL)

Το φωσφολιπιδικό τμήμα της LDL αποτελείται κυρίως από φωσφατιδυλοχολίνη (PC), 62-66%, και σε μικρότερο βαθμό από σφιγγομυελίνη, 24-28%, ενώ μικρότερη είναι η περιεκτικότητά της σε άλλα φωσφολιπίδια μεταξύ των οποίων και η λυσοφωσφατιδυλοχολίνη (lysoPC) [314]. Η μοριακή αναλογία lysoPC/ PC κυμαίνεται σε διάφορες εργασίες από 4% [315], 2,8% [238] έως και >10% [314]. Τα κυριότερα λιπαρά οξέα τα οποία βρίσκονται εστεροποιημένα στα φωσφολιπίδια και στους εστέρες χοληστερόλης της LDL με τη μορφή ακυλ αλυσίδων (δηλαδή συνδεδεμένων με εστερικό δεσμό με το σκελετό των φωσφολιπιδίων ή της χοληστερόλης) είναι τα κεκορεσμένα παλμιτικό οξύ (32%) και στεατικό οξύ (19%), το μονοακόρεστο ελαϊκό οξύ (9%), και τα πολυακόρεστα λινελαϊκό (20%) και αραχιδονικό οξύ (10%) [23]. Στην sn-1 θέση της PC περιέχονται κυρίως κεκορεσμένες αλυσίδες, κυρίως παλμιτικού και δευτερευόντως στεατικού [316]. Στην sn-2 θέση της PC περιέχονται κυρίως ακόρεστες αλυσίδες λινελαϊκού,

αραχιδονικού και ελαϊκού σε ποσοστά ~ 40%, ~ 20%, και ~ 15% αντίστοιχα [316]. Η δομή αυτών των λιπαρών οξέων παρουσιάζεται στην **Εικόνα II.6**. Στην LDL περιέχονται και λιποδιαλυτές βιταμίνες όπως η α-τοκοφερόλη και καροτένια, που δρουν σαν αντιοξειδωτικές ουσίες [24, 314]. Τέλος, η LDL αποτελεί τον κυριότερο φορέα της Lp-PLA₂ στο πλάσμα όπως θα εκτεθεί αναλυτικά παρακάτω (βλέπε II.3.3. PAF-AH του πλάσματος ή Lp-PLA₂).



Εικόνα II.6. Χημική δομή των κυριότερων λιπαρών αλυσίδων που βρίσκονται εστεροποιημένες στην LDL (αριθμός ατόμων άνθρακα/αριθμός διπλών δεσμών και θέση διπλών δεσμών)

II.2.3.2. Οξειδωμένη LDL

Όπως αναφέρθηκε ανωτέρω, η LDL οξειδώνεται *in vivo* κυρίως στο αρτηριακό τοίχωμα από ενδοθηλιακά κύτταρα και μακροφάγα και στην οξείδωσή της εμπλέκονται η NADPH οξειδάση, η οξειδάση της ξανθίνης, η NOS όταν αυτή αποσυζευχθεί, η αναπνευστική αλυσίδα στα μιτοχόνδρια, η μυελοϋπεροξειδάση και οι λιποξυγενάσες [24-26]. Μεταλλικά ιόντα όπως Cu^{2+} και Fe^{2+} προκαλούν οξειδωτικές αντιδράσεις αν και λόγω της πολύ χαμηλής συγκέντρωσή τους *in vivo* ο ρόλος τους στην ανάπτυξη της αθηροσκλήρυνσης δεν φαίνεται να είναι σημαντικός [24, 26]. Ο Cu^{2+} χρησιμοποιείται για την *in vitro* οξείδωση της LDL [317]. Η λιπιδική υπεροξείδωση εκδηλώνεται σε ακόρεστες λιπαρές αλυσίδες και περισσότερο σε πολυακόρεστες όπως του αραχιδονικού οξέος, οδηγώντας σε μία αλυσιδωτή αντίδραση με την παραγωγή λιποϋδροϋπεροξειδίων. Στην οξείδωση της LDL διακρίνεται η

λανθάνουσα φάση κατά την οποία καταναλώνονται τα ενδογενή αντιοξειδωτικά συστατικά τα οποία είναι κυρίως η α-τοκοφερόλη. Η οξειδωμένη LDL στη φάση αυτή ονομάζεται ελάχιστα οξειδωμένη LDL, χαρακτηρίζεται από μικρή ποσότητα λιποϋπεροξειδίων κυρίως οξειδωμένα φωσφολιπίδια και κατέχει ήδη σε σημαντικό βαθμό τις βιολογικές ιδιότητες της πλήρως οξειδωμένης LDL [25]. Τη λανθάνουσα φάση ακολουθεί η παραγωγική φάση που χαρακτηρίζεται από την εκθετική παραγωγή λιποϋδροϋπεροξειδίων και τη μεγάλη παραγωγή αλδεϋδικών μορίων όπως της μαλονδιαλδεϋδης (malondialdehyde, MDA) και 4-υδροξυ-εννέα-2-ενάλης (4-hydroxynonenal, 4-HNE). Εκτός από τη λιπιδική υπεροξείδωση, οξειδώνεται και η πρωτεϊνική ομάδα αν και λιγότερα είναι γνωστά για αυτήν [24]. Προϊόντα οξείδωσης αμινοξέων όπως της τυροσίνης, της λευκίνης και της βαλίνης έχουν ανιχνευθεί σε ανθρώπινες αθηρωματικές πλάκες.

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, oxLDL και προϊόντα οξείδωσης λιπιδίων ανιχνεύονται σε αθηρωματικές πλάκες σε ανθρώπους και πειραματόζωα [1, 23-25, 27, 318-320]. Σε αθηρωματικές πλάκες ανιχνεύονται σε αφθονία υδροξυ παράγωγα του λινελαϊκού (υδροξυ-δεκαοκταενοϊκά οξέα, hydroxyoctadecaenoic acids, HODEs) και του αραχιδονικού οξέος (υδροξυ-εικοσα-τετρα-ενοϊκά οξέα, hydroxyeicosatetraenoic acids, HETEs), αλλά και πλήθος άλλων προϊόντων οξείδωσης όπως F2 – ισοπροστάνια που προέρχονται από την οξείδωση του αραχιδονικού και προϊόντα οξείδωσης της χοληστερόλης (οξυστερόλες) [24]. Όπως θα αναφερθεί στη συνέχεια σχετικά με την τροποποίηση της ApoB100, κατά τη διάρκεια της οξείδωσης, από την οξείδωση ακόρεστων λιπαρών οξέων προκύπτουν αλδεϋδικά μόρια όπως MDA και 4-HNE που συνδέονται σε κατάλοιπα λυσίνης της ApoB100. Με τη χρήση μονοκλωνικών αντισωμάτων τέτοια σύμπλοκα λυσίνης με MDA ή 4-HNE ανιχνεύονται επίσης σε αθηρωματικές πλάκες.

Η οξειδωτική τροποποίηση της LDL περιλαμβάνει: α) τη λιπιδική υπεροξείδωση, β) τη μετατροπή σημαντικής ποσότητας φωσφατιδυλοχολίνης (PC) σε λυσοφωσφατιδυλοχολίνη (lysoPC) (έως το 50% αναλόγως με το βαθμό της οξείδωσης), γ) αύξηση της πυκνότητας, δ) αύξηση του αρνητικού φορτίου που έχει σαν αποτέλεσμα την αύξηση της ηλεκτροφορητικής κινητικότητας, ε) διάσπαση της απολιποπρωτεΐνης (ApoB100) σε μικρότερα πεπτίδια και στ) σύνδεση οξειδωμένων λιπιδίων στην ApoB100 [319, 321, 322]. Κατά την οξείδωση της LDL η ApoB100 διασπάται σε μικρότερα πεπτίδια και από το αρχικό μακρομόριο με μοριακό βάρος ~ 512 KD προκύπτουν μικρότερα πεπτίδια που εξακολουθούν όμως να έχουν αρκετά μεγάλο μέγεθος με μοριακό βάρος > 70 KD [321]. Η ηλεκτροφορητική κινητικότητα της oxLDL αυξάνει και η αύξηση αυτή έχει συσχετιστεί με τροποποίηση της ApoB100 η οποία περιλαμβάνει τροποποίηση των ε-αμινομάδων των καταλοίπων λυσίνης με σύνδεσή τους με

προϊόντα οξειδωσης λιπιδίων, και περαιτέρω με αυξημένη πρόσληψή της από τα μακροφάγα (βλέπε παρακάτω II.2.4.1. Σύνδεση μέσω της πρωτεϊνικής ομάδας της oxLDL) [315, 322-324]. Η μετατροπή σημαντικού μέρους της oxPC σε lysoPC αποδίδεται σε υδρόλυση μορίων oxPC από την Lp-PLA₂ που περιέχεται στην LDL [104, 325]. Αυτό οφείλεται στην ικανότητα της Lp-PLA₂ να χρησιμοποιεί ως υποστρώματα εκτός από τον PAF και μόρια oxPC με βραχείες αλυσίδες ατόμων άνθρακα στην sn-2 θέση οι οποίες αποτελούν κατάλοιπα από τον κατακερματισμό ακόρεστων λιπαρών αλυσίδων κατά την οξειδωσή τους (βλέπε παρακάτω II.3.3.1. Υποστρώματα της Lp-PLA₂) [326, 327]. Ο σχηματισμός μορίων oxPC με κατακερματισμένες αλυσίδες στην sn-2 θέση προερχόμενες ιδιαίτερα από μόρια PC με αλυσίδα αραχιδονικού στην sn-2 θέση και η υδρόλυσή τους από την Lp-PLA₂, επιβεβαιώνεται σε ανάλυση των λιπιδίων oxLDL οξειδωμένης με CuSO₄ [316]. Η κύρια διαφοροποίηση που παρατηρήθηκε με την αναστολή της δραστηριότητας της Lp-PLA₂ ήταν η αύξηση της περιεκτικότητας της oxLDL σε μόρια oxPC με κατακερματισμένες αλυσίδες παράλληλα με τη μεγάλη μείωση της περιεκτικότητας σε lysoPC [316].

II.2.4. ΣΥΝΔΕΣΗ ΤΗΣ OXLDL ΣΤΟΥΣ ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ ΤΩΝ ΜΑΚΡΟΦΑΓΩΝ

Η πρόσληψη της oxLDL από τα μακροφάγα είναι υπεύθυνη για την ανεξέλεγκτη συσσώρευση λιπιδίων στα μακροφάγα με αποτέλεσμα τη μετατροπή τους σε αφρώδη κύτταρα. Όπως αναλύθηκε παραπάνω η ανεξέλεγκτη αυτή πρόσληψη της oxLDL γίνεται μέσω των εκκαθαριστών υποδοχέων (βλέπε II.1.3.2.Δ. Πρόσληψη και ενδοκυττάρια συσσώρευση λιπιδίων - σχηματισμός αφρωδών κυττάρων). Η σύνδεση της oxLDL στους υποδοχείς έχει αποδειχθεί ότι επιτελείται και μέσω της πρωτεϊνικής και μέσω της λιπιδικής της ομάδας.

II.2.4.1. Σύνδεση μέσω της πρωτεϊνικής ομάδας της oxLDL

Η πρόσληψη της oxLDL μέσω της πρωτεϊνικής τους ομάδας έχει αποδειχθεί με πειράματα στα οποία χρησιμοποιήθηκε ApoB η οποία απομονώθηκε από oxLDL (ox ApoB) με απολιπιδιοποίηση. Σημασμένη με ¹²⁵I στην πρωτεϊνική της ομάδα LDL οξειδώθηκε με επώαση με 5μM CuSO₄ ή με επώαση με ενδοθηλιακά κύτταρα και ο ρυθμός καταβολισμού της ¹²⁵I-oxApoB σε καλλιέργεια περιτοναϊκών μακροφάγων ποντικού, όπως εκτιμήθηκε με μέτρηση του ελεύθερου εξωκυττάριου ¹²⁵I, αποδείχθηκε να είναι όμοιος με αυτόν της ¹²⁵I-oxLDL [321]. Η ¹²⁵I-oxApoB απομονώθηκε από ¹²⁵I-oxLDL με απολιπιδιοποίηση και διαλυτοποιήθηκε με χρήση του απορρυπαντικού octyl glucoside το οποίο ανήκει στα μη αποδιατακτικά (non denaturing) της δομής της

πρωτεΐνης απορρυπαντικά. Διαλυτοποιημένη ^{125}I -ApoB από φυσική μη οξειδωμένη LDL παρουσίαζε πολύ μικρότερο ρυθμό καταβολισμού ο οποίος ήταν όμοιος με αυτόν της μη οξειδωμένης ^{125}I -LDL. Επιπλέον, ο καταβολισμός της ^{125}I -oxLDL αναστελλόταν δόσοεξαρτώμενα από την προσθήκη μη σημασμένης oxLDL και μη σημασμένης oxApoB ενώ δεν αναστελλόταν από την προσθήκη φυσικής μη οξειδωμένης LDL. Αντιστρόφως, ο καταβολισμός της ^{125}I - oxApoB αναστελλόταν ομοίως δόσοεξαρτώμενα από την προσθήκη μη σημασμένης oxLDL και μη σημασμένης oxApoB ενώ δεν αναστελλόταν από την προσθήκη φυσικής μη οξειδωμένης LDL. Τα αποτελέσματα αυτά καταδεικνύουν πρόσληψη της oxLDL μέσω υποδοχέων η οποία μεσολαβείται από την oxApoB και επιπλέον ότι οι υποδοχείς αυτοί είναι διαφορετικοί από τον υποδοχέα της φυσικής LDL. Η ικανότητα αυτή πρόσληψης διαλυτοποιημένης oxApoB απομονωμένης από oxLDL από τα μακροφάγα και το πρότυπο της ισχυρής αμοιβαίας ανταγωνιστικής αναστολής μεταξύ της oxLDL και της oxApoB από oxLDL σε αντίθεση με την πολύ ασθενή ανταγωνιστική δράση της φυσικής LDL, έχει καταδειχθεί και σε άλλες εργασίες [328, 329].

Η ικανότητα της αυξημένης σύνδεσης της ApoB με υποδοχείς μπορεί να προέλθει και από τροποποίησή της με σύνδεση σε αυτήν διαφόρων μορίων όπως έχει αποδειχθεί με την ακετυλίωσή της με οξικό ανυδρίτη (acetylLDL) ή με το προϊόν οξείδωσης ακόρεστων λιπαρών οξέων, MDA (MDA-LDL) [319, 330]. Ικανός όγκος δεδομένων καταδεικνύουν ότι η ικανότητα σύνδεσης της ApoB με τους εκκαθαριστές υποδοχείς των μακροφάγων εξαρτάται από την τροποποίηση των ε-αμινομάδων των καταλοίπων λυσίνης. Οξείδωση LDL με $5\mu\text{M}$ CuSO_4 έχει σαν αποτέλεσμα τη μεγάλη μείωση των ελεύθερων αμινομάδων των καταλοίπων λυσίνης η οποία συμβαδίζει με την αύξηση της ηλεκτροφορητικής κινητικότητας και την αυξημένη πρόσληψη που παρουσιάζει η oxLDL [315, 322]. Η τροποποίηση αμινομάδων λυσίνης με μεθυλίωση δεν οδήγησε σε αυξημένη πρόσληψη ούτε σε αύξηση της ηλεκτροφορητικής κινητικότητας οδηγώντας στο συμπέρασμα πως προϊόντα οξείδωσης της LDL με ιδιαίτερη χημική δομή είναι αυτά που τροποποιούν τις αμινομάδες της λυσίνης μεταβάλλοντας το φορτίο και την ηλεκτροφορητική κινητικότητα και παράλληλα τη συγγένεια προς τους υποδοχείς [322, 323]. Όσο μεγαλύτερη είναι η διάρκεια οξείδωσης της LDL με CuSO_4 τόσο μεγαλύτερη είναι η μείωση των ελεύθερων αμινομάδων λυσίνης, η αύξηση της ηλεκτροφορητικής κινητικότητας και η αύξηση του ρυθμού καταβολισμού της oxLDL [323]. Εμπλουτισμός της LDL με σημασμένη με ^{14}C φωσφατιδυλοχολίνη με αλυσίδα αραχιδονικού στην sn-2 θέση, είχε σαν αποτέλεσμα, όταν αυτή οξειδώθηκε, τον πενταπλασιασμό της ραδιενέργειας που ανακτήθηκε στην απομονωθείσα oxApoB σε σχέση με τη ραδιενέργεια η οποία βρέθηκε συνδεδεμένη με

την ApoB από μη οξειδωμένη LDL [322]. Αυτό δεν παρατηρήθηκε όταν χρησιμοποιήθηκε σημασμένη με ^{14}C φωσφατιδυλοχολίνη η οποία δεν ήταν ευάλωτη στην οξείδωση καθώς είχε κεκορεσμένες αλυσίδες παλμιτικού και στην sn-1 στην sn-2 θέση οδηγώντας στο συμπέρασμα πως προϊόντα της οξείδωσης φωσφατιδυλοχολίνης με ακόρεστες αλυσίδες είναι αυτά που τροποποιούν δραστικά αμινομάδες της ApoB [322]. Συνοξείδωση διαφόρων σημασμένων με ^{14}C μορίων φωσφατιδυλοχολίνης ή φωσφατιδυλοαιθανολαμίνης με LDL, οδήγησε επίσης σε ανάκτηση ραδιενέργειας με την ApoB η οποία ήταν πολύ μεγαλύτερη στην περίπτωση φωσφολιπιδίων με πολυακόρεστες λιπαρές αλυσίδες [324]. Περαιτέρω απόδειξη για την ικανότητα προϊόντων οξείδωσης λιπιδίων να τροποποιούν την ApoB αυξάνοντας την πρόσληψή της μέσω υποδοχέων, αποτελεί το γεγονός ότι επώαση LDL με υδατοδιαλυτά προϊόντα της οξείδωσης των ελεύθερων λιπαρών οξέων αραχιδονικού, λινελαϊκού και λινολενικού, οδήγησε σε μεγάλες αυξήσεις του ρυθμού καταβολισμού της παρά το ότι αυτή η ίδια δεν είχε οξειδωθεί [315]. Η πρόσληψη αυτής της τροποποιημένης με προϊόντα της οξείδωσης των ελεύθερων λιπαρών οξέων LDL, δεν αναστελλόταν ανταγωνιστικά από φυσική LDL αλλά αναστελλόταν ισχυρά και δοσοεξαρτώμενα από acLDL, στοιχεία ενδεικτικά πρόσληψης μέσω εκκαθαριστών υποδοχέων. Με διαχωρισμό των προϊόντων οξείδωσης με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) προσδιορίστηκαν τα κλάσματα που ήταν ικανά να προκαλέσουν αύξηση της ηλεκτροφορητικής κινητικότητας και αυτά αναλύθηκαν με φασματομετρία μάζας (mass spectrometry) δεικνύοντας δομές οξειδωμένων αλδεϋδικών παραγώγων μεσαίου μήκους που προήλθαν από την οξείδωση και τον κατακερματισμό των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων [315]. Τα παράγωγα αυτά της οξείδωσης των λιπαρών οξέων είναι ικανά να συνδέονται σε αμινομάδες με διάφορους τρόπους, όπως σχηματίζοντας δεσμούς βάσης Schiff (Schiff base linkages) [315, 322]. Ενδεδειγμένη μελέτη της τροποποίησης των μορίων των αμινοξέων της LDL μετά από τροποποίηση με προϊόντα οξείδωσης αραχιδονικού οξέος η οποία οδηγούσε σε δραματική αύξηση της πρόσληψής τους από μακροφάγα, αποκάλυψε εκλεκτική τροποποίηση των αμινομάδων λυσίνης [331]. Η αυξημένη πρόσληψη της τροποποιημένης από προϊόντα οξείδωσης αραχιδονικού οξέος LDL ανεστάλη μετά από επώαση με Fab τμήματα μονοκλωνικών αντισωμάτων ειδικών έναντι παραγώγων ένωσης προϊόντων οξείδωσης λιπιδίων με λυσίνη.

Εκτός από την τροποποίηση της ApoB από τη σύνδεση σε αυτή προϊόντων οξείδωσης λιπαρών οξέων, κατά τη διάρκεια της οξείδωσης της LDL, υπάρχουν στοιχεία τα οποία υποδεικνύουν σαφώς την παρουσία οξειδωμένων φωσφολιπιδίων δεσμευμένων στην ApoB. Κατά τη διάρκεια της οξείδωσης υπάρχει μία προοδευτική αύξηση της ποσότητας

του φωσφόρου ο οποίος είναι ομοιοπολικά δεσμευμένος στην ApoB, στοιχείο που υποδεικνύει σαφώς τη σύνδεση κατά τη διάρκεια της οξείδωσης μορίων φωσφολιπιδίων στην ApoB [324, 332]. Η τροποποίηση της ApoB από οξειδωμένα φωσφολιπίδια υποστηρίζεται από την ισχυρή αναστολή της σύνδεσης με μακροφάγα της διαλυτοποιημένης ApoB απομονωμένης από oxLDL από το μονοκλωνικό αντίσωμα EO6 εναντίον οξειδωμένων φωσφολιπιδίων, το οποίο μπορούσε να αναγνωρίσει την oxPARC και την POVPC [328].

Σχετικά με την επίδραση της υδρόλυσης των καταλοίπων των λιπαρών αλυσίδων στην sn-2 θέση κατά την οξείδωση των φωσφολιπιδίων, στοιχεία παρέχονται από εργασία η οποία χρησιμοποίησε για το σκοπό αυτό ¹²⁵I-LDL εμπλουτισμένης είτε με 1-O-δεκαεξυλο-2-αραχιδονυλόυλο - sn - γλυκερο - 3 - φωσφοχολίνη (1-O-hexadecyl-2-arachidonoyl-sn-glycero-3-phosphocholine) το οποίο αποτελεί δυνητικό υπόστρωμα υδρόλυσης είτε με 1-O - δεκαεξυλο - 2 - (δεσοξυ - 2 - αμινο - αραχιδονυλόυλο) - sn - γλυκερο - 3 - φωσφοχολίνη (1 - O - hexadecyl - 2 - desoxy - 2 - amino - arachidonoyl - sn - glycero - 3-phosphocholine) στην οποία η αλυσίδα στην sn-2 θέση είναι συνδεδεμένη στο γλυκερινικό σκελετό με μόριο αζώτου, σύνδεση η οποία αποκλείει την υδρόλυση [333]. Η μετέπειτα οξείδωση με CuSO₄ των εμπλουτισμένων με αυτά τα φωσφολιπίδια LDL οδήγησε σε μεγαλύτερη μείωση των δραστικών (ελεύθερων) αμινομάδων λυσίνης, μεγαλύτερη ηλεκτροφορητική κινητικότητα και ταχύτερο καταβολισμό της oxLDL στην περίπτωση της 1-O-δεκαεξυλο-2-αραχιδονυλόυλο- sn-γλυκερο-3-φωσφοχολίνης ενδεικτικό τροποποίησης της ApoB από σύνδεση με μικρού μοριακού βάρους προϊόντα που προκύπτουν από την υδρόλυση από το φωσφολιπιδικό σκελετό των καταλοίπων της λιπαρής αλυσίδας του αραχιδονικού από την Lp-PLA₂. Παρόμοια αποτελέσματα ελήφθησαν και μετά από επώαση με PLA₂.

II.2.4.2. Σύνδεση μέσω της λιπιδικής ομάδας της oxLDL

Εκτός από το ρόλο που παίζουν στην τροποποίηση της ApoB, πολλά στοιχεία καταδεικνύουν ότι η λιπιδική ομάδα της oxLDL μεσολαβεί απευθείας στην πρόσληψη από τους υποδοχείς των μακροφάγων. Λιπосώματα τα οποία παρασκευάστηκαν από τα λιπίδια που εκχυλίστηκαν από oxLDL, οξειδωμένης με CuSO₄, και σημάθηκαν με το φθορίζον μόριο DIO (3,3'-dihexadecyloxacarbocyanine), παρουσίαζαν ισχυρή ικανότητα σύνδεσης σε περιτοναϊκά μακροφάγα ποντικού, όπως αποδείχτηκε με επώαση των λιπосωμάτων αυτών με τα μακροφάγα στους 4⁰C η οποία αποκλείει άλλου είδους ενσωμάτωση όπως μέσω σύντηξης ή άλλου είδους πρόσληψη μέσω φαγοκυττάρωσης [328, 329, 334].

Επιπλέον η σύνδεση των λιποσωμάτων αυτών μέσω υποδοχέων υποστηρίζεται ισχυρά από τη δοσοεξαρτώμενη αναστολή της από μη σημασμένα όμοια λιποσώματα καθώς και από την ακέραιη oxLDL ενώ η προσθήκη ακέραιης φυσικής LDL είτε λιποσωμάτων από λιπίδια φυσικής LDL δεν ανέστειλε παρά ελάχιστα τη σύνδεσή τους.. Περαιτέρω τα λιποσώματα αυτά ανέστειλαν δοσοεξαρτώμενα τη σύνδεση τόσο της ακέραιης oxLDL όσο και της διαλυτοποιημένης oxApoB και μάλιστα η ανταγωνιστική αυτή δράση τους ήταν συγκρίσιμη με αυτή της ακέραιης oxLDL [328, 329, 334].

Λιποσώματα που περιείχαν oxPAPC όπως επίσης και POVPC ενωμένη με αλβουμίνη αποδείχτηκαν αποτελεσματικοί ανταγωνιστές της σύνδεσης τόσο της ακέραιης oxLDL όσο και των λιποσωμάτων από τα εκχυλισθέντα λιπίδια της oxLDL ενώ και η χρήση μονοκλωνικού αντίσωματος εναντίον της oxPAPC και της POVPC, EO6, ανέστειλε σε μεγάλο βαθμό τη σύνδεση τόσο της ακέραιης oxLDL όσο και των λιπιδίων της oxLDL [328, 329, 334, 335]. Το αντίσωμα EO6 μπορούσε να αναστείλει αν και σε μικρότερο βαθμό και τη σύνδεση της oxApoB [328]. Για να ελαχιστοποιηθεί η συμμετοχή της τροποποίησης της ApoB από οξειδωμένα λιπίδια στην πρόσληψη της oxLDL, χρησιμοποιήθηκε μεθυλιωμένη LDL καθώς όπως αναφέρθηκε παραπάνω η μεθυλίωση των καταλοίπων λυσίνης αποκλείει την σύνδεσή τους με παράγωγα οξείδωσης των λιπιδίων χωρίς να αυξάνει τη συγγένεια της ApoB με τους υποδοχείς [336]. Η σύνδεση (επώαση σε 4⁰C) και η πρόσληψη (επώαση σε 37⁰C) αυτής της μεθυλιωμένης oxLDL ήταν συγκρίσιμες με αυτές της μη μεθυλιωμένης oxLDL ενώ και οι δύο παρασκευές είχαν την ικανότητα να αναστέλλουν ανταγωνιστικά την πρόσληψη της άλλης. Στην ίδια εργασία, η μεταφορά προϊόντων οξείδωσης της PLPC σε LDL οδήγησε σε σύνδεσή της σε κυτταρική σειρά διαμολυσμένης με το γονίδιο του εκκαθαριστή υποδοχέα CD36. Η κυτταρική αυτή σειρά αναγνώριζε τη μεθυλιωμένη oxLDL ενώ σε κυτταρική σειρά διαμολυσμένη με το γονίδιο του εκκαθαριστή υποδοχέα SRA1 η μεθυλιωμένη oxLDL αποτελούσε ασθενή ανταγωνιστή της μη μεθυλιωμένης oxLDL. Τα αποτελέσματα αυτά υποστηρίζουν την αναγνώριση της λιπιδικής ομάδας της oxLDL από εκκαθαριστές υποδοχείς ανεξάρτητα από την ApoB και πως κυρίαρχο ρόλο σε αυτήν την ανεξάρτητη της πρωτεϊνικής ομάδας σύνδεση της λιπιδικής ομάδας παίζει ο εκκαθαριστής υποδοχέας CD36.

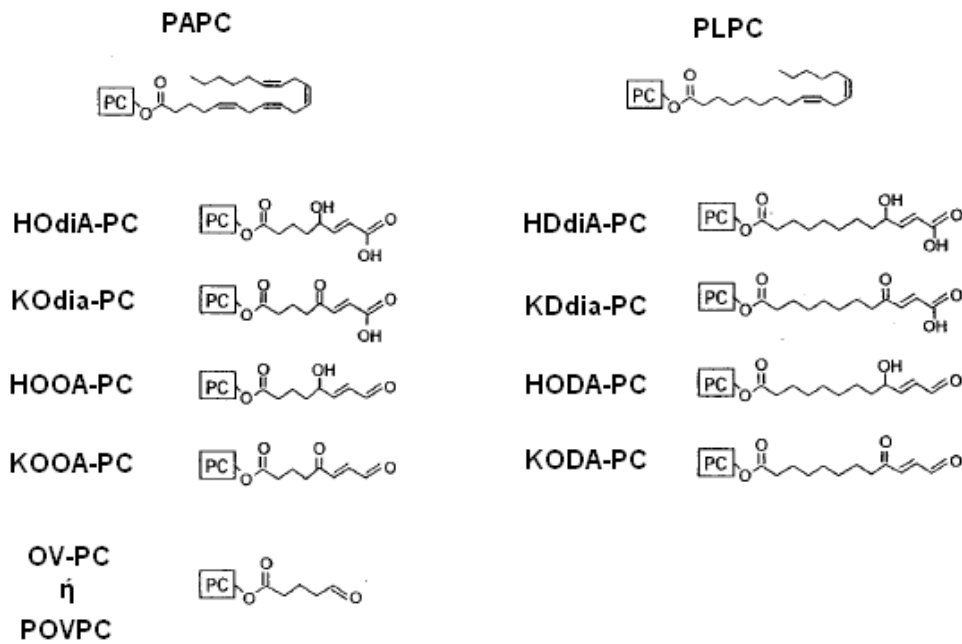
Περαιτέρω στοιχεία για τη θεμελίωση και τη διερεύνηση του ρόλου της λιπιδικής ομάδας στη σύνδεση της oxLDL με τους εκκαθαριστές υποδοχείς παρέχουν πειράματα στα οποία εξετάζεται ο ρόλος συγκεκριμένων μορίων φωσφολιπιδίων. Τα φωσφολιπίδια και κατά κύριο λόγο τα μόρια φωσφατιδυλοχολίνης, αποτελούν όπως αναφέρθηκε μείζον συστατικό του λιπιδικού τμήματος της LDL και εντοπίζονται στην επιφάνεια του

μακρομορίου της LDL έχοντας έτσι τη δυνατότητα να έρθουν σε επαφή με τους υποδοχείς των μακροφάγων. Η συνήθης εξέταση της συμμετοχής των φωσφολιπιδίων στη σύνδεση σε υποδοχείς, περιλαμβάνει είτε το σχηματισμό λιποσωμάτων που σχηματίζονται με βασικά συστατικά φωσφολιπίδια και χοληστερόλη σε ποικίλες μοριακές αναλογίες, συνήθως 2:1 [328, 334, 337-339] ή μονοστρωματικών δομών από φωσφολιπίδια [340] είτε τη σύνδεση φωσφολιπιδίου σε αλβουμίνη η οποία λειτουργεί σαν φορέας του υπό εξέταση φωσφολιπιδίου [329, 335, 336]. Έχει δειχθεί ότι οξειδωμένα φωσφολιπίδια που προέρχονται από την οξείδωση της PAPC και της PLPC έχουν την ικανότητα να δρουν σαν υψηλής συγγένειας συνδέτες για τον CD36 εκκαθαριστή υποδοχέα και μπορούν να ανταγωνιστούν την oxLDL στη σύνδεση στα μακροφάγα [328, 329, 334, 336, 338, 340]. Μεταξύ αυτών η oxPAPC και η POVPC, η οποία προέρχεται από την οξείδωση της PAPC, έχουν περισσότερο μελετηθεί. Λιποσώματα που περιείχαν oxPAPC, οξειδωμένη είτε με CuSO₄ είτε με μυελοϋπεροξειδάση, ανέστειλαν σε σημαντικό βαθμό τη σύνδεση oxLDL, οξειδωμένης αντίστοιχα είτε με CuSO₄ είτε με μυελοϋπεροξειδάση, από περιτοναϊκά μακροφάγα ποντικού [334, 340]. Λιποσώματα που περιείχαν oxPAPC οξειδωμένη με CuSO₄ ανέστειλαν δοσοεξαρτώμενα τη σύνδεση τόσο της oxApoB όσο και των λιποσωμάτων από λιπίδια από oxLDL οξειδωμένης με CuSO₄, ενώ αντίθετα λιποσώματα που περιείχαν μη οξειδωμένη PAPC είχαν αμελητέα επίδραση [328]. Επίσης συνδεδεμένη με αλβουμίνη POVPC μπορούσε να αναστείλει τη σύνδεση τόσο της ακέραιης oxLDL οξειδωμένης με CuSO₄, όσο και της oxApoB και των λιποσωμάτων από λιπίδια της oxLDL [328, 329]. Περαιτέρω απόδειξη για το ρόλο της oxPAPC και της POVPC στη συμμετοχή τους στη σύνδεση της λιπιδικής ομάδας της oxLDL, παρέχουν πειράματα με το μονοκλωνικό αντίσωμα EO6 εναντίον οξειδωμένων φωσφολιπιδίων, το οποίο μπορεί να αναγνωρίσει την oxPAPC και την POVPC [335], και το οποίο όπως ήδη αναφέρθηκε δρα ανασταλτικά στη σύνδεση oxApoB από oxLDL οξειδωμένης με CuSO₄ από περιτοναϊκά μακροφάγα ποντικού [328]. Τα πειράματα αυτά κατέδειξαν ότι το EO6 αναστέλλει δοσοεξαρτώμενα τη σύνδεση της ακέραιης oxLDL οξειδωμένης με CuSO₄ [329] αλλά και των λιποσωμάτων από τα λιπίδια της oxLDL από περιτοναϊκά μακροφάγα ποντικού [335].

Η δομή αρκετών υψηλής συγγένειας συνδετών για τον εκκαθαριστή υποδοχέα CD36, οι οποίοι προέρχονται από την οξείδωση της 1-παλμιτόυλο-2-αραχιδονυλόυλο- sn-γλυκερο-3-φωσφοχολίνης (1-palmitoyl-2-arachidonoyl-sn-3-phosphocholine, PAPC) και της 1-παλμιτόυλο-2- λινελαϊκόυλο - sn-γλυκερο- 3-φωσφοχολίνης (1-palmitoyl -2-linoleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine, PLPC) έχει πλήρως προσδιοριστεί [340]. Τα προϊόντα οξείδωσης με μυελοϋπεροξειδάση της PAPC και της PLPC διαχωρίστηκαν με HPLC, αναλύθηκαν με

φασματομετρία μάζας και δοκιμάστηκαν για την ικανότητα σύνδεσής τους στον εκκαθαριστή υποδοχέα CD36 σε διαμολυσμένη κυτταρική σειρά στην οποία είχε μεταβιβαστεί το γονίδιο του SR-CD36 και συγκριτικά σε αγρίου τύπου κύτταρα. Η συνδετική ικανότητα τεκμηριώθηκε με μελέτες αναστολής της σύνδεσης ^{125}I -oxLDL οξειδωμένης με μυελοϋπεροξειδάση αλλά και με μελέτες άμεσης σύνδεσης με φορείς μονοστρωματικές δομές φωσφολιπιδίων ή και λιποσωμάτων που περιείχαν τα υπό εξέταση προϊόντα, και μη οξειδωμένα μόρια φωσφατιδυλοχολίνης και χοληστερόλη και τα οποία είχαν σημειωθεί με σημασμένη με ^3H 1,2-διπαλμιτοϋλο-sn-γλυκερο-3-φωσφοχολίνη (1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine, DPPC). Τα μόρια που παρουσίαζαν συνδετική ικανότητα ανέστειλαν τη σύνδεση ^{125}I -oxLDL και παρουσίαζαν άμεση σύνδεση στα κύτταρα που παρουσίαζαν έκφραση του SR-CD36, ενώ δεν παρουσίαζαν σύνδεση στα αγρίου τύπου κύτταρα. Επιπλέον, η σύνδεσή τους καταργείται με την προσθήκη αντισώματος που δέσμευε τον SR-CD36. Σε παράλληλα πειράματα με χρησιμοποίηση διαμολυσμένων κυττάρων στα οποία είχε μεταβιβαστεί το γονίδιο SRA1 δεν υπήρξε ούτε ανασταλτική δράση ούτε άμεση σύνδεση, δεικνύοντας ότι τα μόρια αυτά παρουσίαζαν εκλεκτικά συνδετική ικανότητα για τον SR-CD36. Τα μη οξειωμένα μόρια της της PAPC και της PLPC δεν παρουσίαζαν συνδετική ικανότητα. Επίσης συνδετική ικανότητα δεν αναδείχθηκε με τη χρησιμοποίηση της 4-HNE, ενός μικρού μορίου που παράγεται από τη διάσπαση οξειδωμένων λιπαρών οξέων, ούτε με τη χρησιμοποίηση μορίων εστέρων χοληστερόλης με οξειδωμένες λιπαρές αλυσίδες. Η ομάδα των μορίων που παρουσίαζαν συνδετική ικανότητα για τον SR-CD36 περιελάμβανε όχι μόνον την POVPC αλλά επίσης μία σειρά από μόρια με αλυσίδα 8 ατόμων άνθρακα στην sn-2 θέση στην περίπτωση της oxPAPC (HODiA-PC, KODiA-PC, HOOA-PC, KOOA-PC) και 12 ατόμων άνθρακα στην sn-2 θέση στην περίπτωση της oxPLPC (HDdiA-PC, KDdiA-PC, HODA-PC, KODA-PC) (Εικόνα II.7). Προϊόντα οξείδωσης χωρίς κάποιου βαθμού κατακερματισμό της αλυσίδας στην sn-2 θέση δεν παρουσίαζαν συνδετική ικανότητα. Τα μόρια αυτά ανιχνεύθηκαν και σε LDL που οξειδώθηκε με επώαση με $5\mu\text{M}$ CuSO_4 για 24h. Η οξείδωση με CuSO_4 οδήγησε σε μεγαλύτερου κατακερματισμού των ακόρεστων λιπαρών αλυσίδων συγκριτικά με την οξείδωση με μυελοϋπεροξειδάση, όπως καταδείχθη από την αύξηση της παραγωγής μορίων με μικρότερες ομάδες στην sn-2 θέση όπως της POVPC και τη μείωση της παρουσίας των παραγώγων με αλυσίδες 8 ατόμων άνθρακα στην sn-2 θέση στην περίπτωση της oxPAPC και 12 ατόμων άνθρακα στην sn-2 θέση στην περίπτωση της oxPLPC. Σε συνέχεια της εργασίας αυτής, εμπλουτισμός λιποσωμάτων που περιείχαν μη οξειδωμένη PAPC και χοληστερόλη ή λιποσωμάτων από λιπίδια φυσικής LDL, με μόρια oxPAPC με ικανότητα σύνδεσης στον SR-CD36 οδήγησε σε

κατακόρυφη αύξηση της πρόσληψης των λιποσωμάτων αυτών από μακροφάγα που έκφραζαν τον SR-CD36 και του σχηματισμού αφρωδών κυττάρων, και τα αποτελέσματα αυτά βρισκόνταν σε αντίθεση με τα αποτελέσματα που ελήφθησαν σε μακροφάγα SR-CD36^{-/-} [338]. Επίσης η in vivo παρουσία των POVPC, HOdiA-PC, KOdiA-PC, HOOA-PC, KOOA-PC που αποτελούν προϊόντα οξείδωσης της PAPC με ικανότητα σύνδεσης στον SR-CD36, αποδείχτηκε σε αθηρωματικές βλάβες αορτής σε υπερλιπιδαιμικά κουνέλια Watanaba [338].



Εικόνα II.7. Προϊόντα οξείδωσης της PAPC και της PLPC με ικανότητα σύνδεσης στον εκκαθαριστή υποδοχέα CD36. **PAPC:** 1-παλμιτόυλο-2-αραχιδονυλόυλο- sn-γλυκερο-3-φωσφοχολίνη, 1-palmitoyl -2 -arachidonoyl -sn -glycero -3 -phosphocholine ή 1-hexadecanoyl -2 -eicosatetra-5',8',11',14'-enoyl -sn -glycero -3 -phosphocholine, **PLPC:** 1 -παλμιτόυλο -2 -λινελαϊκόυλο -sn-γλυκερο- 3-φωσφο-χολίνη, 1-palmitoyl -2-linoleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine ή 1-hexadecanoyl-2-octadecadi-9',12'-enoyl-sn-glycero-3-phosphocholine, **HOdiA-PC:** 1-ακυλο-2- (5-υδροξυ-8-καρβοξυ-6-οκταδιενοϊκούλο)- sn-γλυκερο-3-φωσφοχολίνη, 5-hydroxy-8-oxo-6-octenedioic acid ester of 2-lyso-PC, **HDdiA-PC:** 1-ακυλο-2- (9-υδροξυ-12-καρβοξυ-10-δωδεκεδιενοϊκούλο)- sn-γλυκερο-3-φωσφοχολίνη, 9-hydroxy-10-dodecenedioic acid ester of 2-lyso-PC, **KOdiA-PC:** 1-ακυλο-2- (5-κετο-8-καρβοξυ-6-οκτεδιενοϊκούλο)- sn-γλυκερο-3-φωσφοχολίνη, 5-keto-6-octenedioic acid ester of 2-lyso-PC, **KDdiA-PC:** 1-ακυλο-2- (9-κετο-12-καρβοξυ-10-δωδεκεδιενοϊκούλο)- sn-γλυκερο-3-φωσφοχολίνη, 9-keto-10-dodecenedioic acid ester of 2-lyso-PC, **HOOA-PC:** 1-ακυλο-2- (5-υδροξυ-8-αλδο-6-οκτενοϊκούλο)- sn-γλυκερο-3-φωσφοχολίνη, 5-hydroxy-8-oxo-6-octenoic acid ester of 2-lyso-PC, **HODA-PC:** 1-ακυλο-2- (9-υδροξυ-12-κετο-10-δωδεκενοϊκούλο)- sn-γλυκερο-3-φωσφοχολίνη, 9-hydroxy-12-oxo-10-dodecenoic acid ester of 2-lyso-PC, **KOOA-PC:** 1-ακυλο-2- (5,8-κετο-6-οκτενοϊκούλο)- sn-γλυκερο-3-φωσφοχολίνη, 5-keto-8-oxo-6-octenoic acid ester of 2-lyso-PC, **KODA-PC:** 1-ακυλο-2- (9-κετο-12-αλδο-10-δωδεκενοϊκούλο)- sn-γλυκερο-3-φωσφοχολίνη, 9-keto-12-oxo-10-dodecenoic acid ester of 2-lyso-PC, **OV-PC:** 5-oxovaleric acid ester of 2-lyso-PC (ή **POVPC:** 1-παλμιτόυλο-2- (5-κετοβαλερόυλο)- sn-γλυκερο- 3-φωσφοχολίνη, 1-palmitoyl-2-(5-oxovaleroyl)-sn-glycero-3-phosphocholine).

Π.3. ΑΚΕΤΥΛΟΨΔΡΟΛΑΣΗ ΤΟΥ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗΣ ΑΙΜΟΠΕΤΑΛΙΩΝ ΤΟΥ ΠΛΑΣΜΑΤΟΣ Ή ΣΥΝΔΕΔΕΜΕΝΗ ΜΕ ΛΙΠΟΠΡΩΤΕΪΝΕΣ ΦΩΣΦΟΛΙΠΑΣΗ A2

Π.3.1. Φωσφολιπάσες A2

Η συνδεδεμένη με τις λιποπρωτεΐνες φωσφολιπάση A2 (lipoprotein phospholipase A2, Lp-PLA₂) ανήκει στην οικογένεια των φωσφολιπασών A2. Οι φωσφολιπάσες A2 (phospholipases A2, PLA₂s) είναι μια κατηγορία ενζύμων που καταλύουν την υδρόλυση του εστερικού δεσμού, στη θέση sn-2 των φωσφολιπιδίων, με αποτέλεσμα την παραγωγή ελεύθερων λιπαρών οξέων και λυσοφωσφολιπιδίων [341-343].

Έχουν αναγνωριστεί και έχουν μελετηθεί δύο ευρείες τάξεις PLA₂s των θηλαστικών, οι ενδοκυτταρικές και οι εξωκυτταρικές ή εκκριτικές [341, 342, 344, 345]. Οι PLA₂s διαδραματίζουν κρίσιμο ρόλο στη φυσιολογική κυτταρική λειτουργία, με τη συμμετοχή τους στο μεταβολισμό και στη μετατροπή (turnover) των φωσφολιπιδίων καθώς και στη βιοσύνθεση ειδικών φωσφολιπιδίων [344]. Οι εκκριτικές PLA₂s είναι ένζυμα μοριακού βάρους 13-18 kDa, χαρακτηρίστηκαν πρώτες και ταξινομήθηκαν σύμφωνα με τη μοριακή τους δομή και τη θέση των δισουλφιδικών τους δεσμών. Έχει χαρακτηριστεί επίσης ένας αριθμός ενδοκυτταρικών PLA₂s, εξαρτώμενων αλλά και ανεξάρτητων από το ασβέστιο, με μεγαλύτερο μοριακό βάρος σε σχέση με τα εκκριτικά ένζυμα. [341, 342].

Οι PLA₂s συμμετέχουν σε ένα σύνθετο δίκτυο μονοπατιών σηματοδότησης που συνδέει υποδοχείς, οξειδωτικούς παράγοντες και προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες. Τα προϊόντα της δράσης των PLA₂s μπορούν να δράσουν ως δεύτεροι αγγελιοφόροι ή να αποτελέσουν πρόδρομα μόρια για τη βιοσύνθεση διάφορων τύπων βιοδραστικών λιπιδίων, όπως προσταγλανδίνες, υδροξυλιωμένα λιπαρά οξέα, λευκοτριένια, θρομβοξάνια και ο παράγοντας ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων (platelet activating factor, PAF) [341, 346]. Η δράση των PLA₂s στα μεμβρανικά φωσφολιπίδια εμπλέκεται στην ενδοκυτταρική μεμβρανική μεταφορά, στη διαφοροποίηση, τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και στις διαδικασίες της απόπτωσης [344, 347]. Οι PLA₂s ενοχοποιούνται για την παθογένεια πολλών διαταραχών, όπως του καρδιαγγειακού και γαστρεντερικού συστήματος, των πνευμόνων, του δέρματος, του συνδετικού ιστού, και του κεντρικού νευρικού συστήματος [344, 347]. Ιδιαίτερα ο ρόλος τους στο μεταβολισμό μεσολαβητών της φλεγμονής όπως τα εικοσανοειδή και ο PAF καθώς και η παραγωγή λυσοφωσφολιπιδίων, εμπλέκει τις PLA₂s στη φλεγμονή, τις αντιδράσεις υπερευαισθησίας και στην καταστροφή ιστών [344].

Οι PLA₂s έχουν ταξινομηθεί σε ομάδες (τύπους), από I έως XII ανάλογα με τις ιδιότητες και την αμινοξική αλληλουχία του ώριμου πρωτεϊνικού μορίου [348]. Απαραίτητο κριτήριο για την κατάταξη ενός ενζύμου στις φωσφολιπάσες είναι η ικανότητα να καταλύει την υδρόλυση του sn-2 εστερικού δεσμού ενός φωσφολιπιδικού υποστρώματος. Μια συνήθης κατάταξη διακρίνει τα ένζυμα αυτά με βάση το καταλυτικό αμινοξύ του ενεργού τους κέντρου, το οποίο μπορεί να είναι σερίνη ή ιστιδίνη.

II.3.2. Ακετυλοϋδρολάσες του PAF

Στην ομάδα των φωσφολιπασών με καταλυτική σερίνη στο ενεργό κέντρο ανήκουν και οι ακετυλοϋδρολάσες του PAF (PAF acetylhydrolases, PAF-AHs) [348]. Οι PAF-AHs αποτελούν μια ιδιαίτερη κατηγορία PLA₂s. Παρουσιάζουν βέλτιστη δράση σε αλκαλικό περιβάλλον και δεν απαιτούν ιόντα Ca²⁺ για τη δραστηρότητά τους. Παρουσιάζουν τη μεγαλύτερη δραστηρότητα για την 1-0-αλκυλο-2-ακετυλο-sn-γλυκερο-3-φωσφοχολίνη (PAF), στην οποία στην sn-1 θέση προσδέεται με αιθερικό δεσμό αλυσίδα μήκους 16 ή 18 ατόμων άνθρακα και στη θέση sn-2 θέση υπάρχει ακετυλομάδα. Παρουσιάζουν, επίσης, δραστηρότητα για φωσφολιπίδια με γλυκερινικό σκελετό τα οποία έχουν sn-1 αλκυλ ή ακυλ ομάδα (λιπαρή ομάδα η οποία ενώνεται με το γλυκερινικό σκελετό με αιθερικό ή με εστερικό δεσμό αντίστοιχα) και τα οποία φέρουν βραχεία αλυσίδα με μήκος έως 9 άτομα άνθρακα στη θέση sn-2. Η δραστηρότητα μειώνεται όσο αυξάνεται το μήκος της αλυσίδας [349, 350]. Τέλος, έχουν την ικανότητα να υδρολύουν βραχείας αλυσίδας υποστρώματα όχι μόνο σε σκελετό γλυκερόλης αλλά και σε σκελετό σφιγγοσίνης ή ακόμα και σε σάκχαρα [351].

Ο PAF είναι ένας ισχυρός φωσφολιπιδικός μεσολαβητής της φλεγμονής με ευρύ φάσμα ισχυρών προφλεγμονωδών δράσεων. Παράγεται από ποικιλία κυττάρων όπως τα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια, τα ουδετερόφιλα πολυμορφοπύρρηνα λευκοκύτταρα, τα λεμφοκύτταρα και τα ενδοθηλιακά κύτταρα. Ο PAF στοχεύει αυτά και άλλα κύτταρα μέσω ειδικών υποδοχέων συνδεδεμένων με G πρωτεΐνες, και επάγει την ενεργοποίησή τους μέσω διάφορων μηχανισμών (εσωκρινής, αυτοκρινής, παρακρινής, με επαφή) [352, 353]. Παρουσιάζει ποικίλες βιολογικές δράσεις μεταξύ των οποίων αυξημένη αγγειακή διαπερατότητα, υπόταση, συστολή των λείων μυών και απόπτωση.

Το αποικοδομητικό ένζυμο του PAF είναι η PAF-AH, η οποία καταλύει την υδρόλυση της ακετυλομάδας στη θέση sn-2 του PAF, για την παραγωγή βιολογικά ανενεργού μορίου, της λυσο-PAF [354]. Μεγάλη δραστηρότητα PAF-AH έχουμε στο πλάσμα, ενώ ανιχνεύεται δραστηρότητά της στα περισσότερα εξωκυττάρια υγρά αλλά και σε ιστούς [349, 352, 355-]

357]. Μοριακός χαρακτηρισμός και κλωνοποίηση της PAF-AH έδειξαν ότι οι ισομορφές του πλάσματος και οι ενδοκυττάριας είναι δομικά διακριτές και κωδικοποιούνται από διαφορετικά γονίδια και πως το ένζυμο απαντάται σε τουλάχιστον τρεις τύπους στα θηλαστικά. Συγκεκριμένα, διακρίνονται η PAF-AH του πλάσματος ή συνδεδεμένη με λιποπρωτεΐνες φωσφολιπάση A2 (lipoprotein associated phospholipase A2, Lp-PLA₂) ή PLA₂-VIIA και οι ενδοκυτταρικοί τύποι II (PLA₂-VIIB) και Ib (PLA₂-VIII) [349, 355-357].

II.3.3. PAF-AH του πλάσματος ή Lp-PLA₂

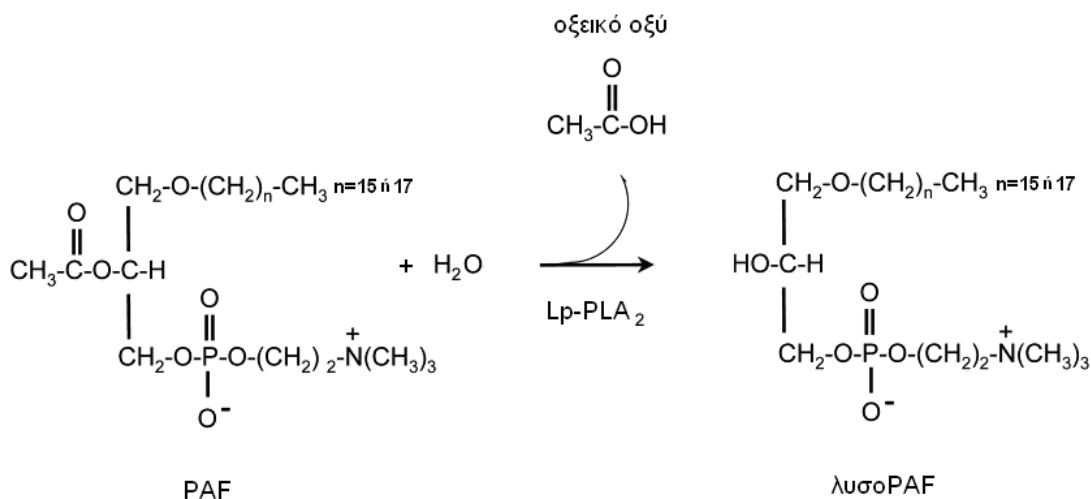
Η ανίχνευση ενζυμικής δραστηριότητας στο πλάσμα που μπορούσε να υδρολύσει τον PAF αναφέρθηκε για πρώτη φορά το 1980 [358]. Το ένζυμο αυτό το οποίο ονομάστηκε αρχικά PAF-AH, βρέθηκε να κυκλοφορεί στο πλάσμα συνδεδεμένο με λιποπρωτεΐνες και για το λόγο αυτό πήρε στη συνέχεια και την ονομασία συνδεδεμένη με λιποπρωτεΐνες φωσφολιπάση A2 (lipoprotein associated phospholipase A2, Lp-PLA₂) η οποία και είναι πλέον η συνήθως χρησιμοποιούμενη [359, 360]. Η Lp-PLA₂ ή PLA₂-VIIA ανήκει στις εκκριτικές φωσφολιπάσες, αποτελείται από 441 αμινοξέα και έχει μοριακό βάρος ~ 45 kDa [354, 359, 361]. Η Lp-PLA₂ κωδικοποιείται από το γονίδιο PLA2G7 [361]. Το μόριο της Lp-PLA₂ κλωνοποιήθηκε το 1995 και περιλαμβάνει ένα μοτίβο λιπάσης και εστεράσης σερίνης (Gly-X-Ser273-X-Gly), και μια κλασική καταλυτική τριάδα υδρολάσης (Ser273, Asp296 και His351) [348, 362]. Έχει αποδειχτεί ότι η LpPLA₂ δεν είναι μεσοφασικό ένζυμο, πράγμα που σημαίνει ότι δεν είναι αναγκαία η παρουσία του υποστρώματος σε μεμβράνη, όπως ισχύει για τις περισσότερες φωσφολιπάσες, αλλά αλληλεπιδρά με μονομερή μέσα σε διάλυμα [348].

Το μεγαλύτερο μέρος της Lp-PLA₂ συνδέεται με την LDL ενώ ένα μικρότερο μέρος, έως 30%, με την HDL [104, 354, 359]. Εκτός από την ικανότητα του ενζύμου αυτού να υδρολύει τον PAF, βρέθηκε πως υδρολύει και μόρια οξειδωμένης φωσφατιδυλοχολίνης και είναι υπεύθυνο για την παραγωγή μεγάλης ποσότητας λυσοφωσφατιδυλοχολίνης (lysophosphatidylcholine, lysoPC) κατά την οξείδωση της LDL η οποία αποτελεί όπως αναφέρθηκε ένα από τα κύρια χαρακτηριστικά της οξειδωτικής τροποποίησης της LDL [104]. Αναστολή της δραστηριότητας της Lp-PLA₂ πριν από την οξείδωση της LDL με CuSO₄ έχει σαν αποτέλεσμα την σχεδόν πλήρη αναστολή της αύξησης της περιεκτικότητας της oxLDL σε lysoPC [104, 325]. Η ικανότητα της Lp-PLA₂ να χρησιμοποιεί ως υποστρώματα μόρια οξειδωμένης φωσφατιδυλοχολίνης θα αναπτυχθεί αναλυτικά παρακάτω. Πρέπει επίσης να σημειωθεί σχετικά με την οξείδωση της LDL ότι έχει βρεθεί πως η Lp-PLA₂ απενεργοποιείται προοδευτικά κατά τη διάρκεια της οξείδωσης [104, 325].

Συγκεκριμένα σε δύο εργασίες με οξείδωση LDL με 20 μM CuSO_4 η δραστηριότητα της Lp-PLA₂ που είχε απομείνει μετά από 24h οξείδωσης ήταν ~10% και 15-25% αντίστοιχα της αρχικής δραστηριότητας της μη οξειδωμένης LDL. Η σύνδεση της LpPLA₂ στην LDL έχει μελετηθεί ιδιαίτερα, και έχει αποδειχθεί ότι η LpPLA₂ συνδέεται με την ApoB και στη σύνδεση αυτή καθοριστικής σημασίας θεωρούνται τα κατάλοιπα αμινοξέων Trp115 και Leu116 [354]. Η σύνδεση με τη ApoB θεωρείται ότι μεσολαβεί και στη σύνδεση της LpPLA₂ με την Lp(a) [354]. Λιγότερα στοιχεία υπάρχουν για τη σύνδεση της LpPLA₂ με την HDL, για την οποία υπάρχουν δεδομένα που υποδεικνύουν ότι αυτή μεσολαβείται από την αλληλουχία αμινοξέων H367-K370 [363]. Επίσης, ο βαθμός γλυκοζυλίωσης του ενζύμου έχει προταθεί σαν παράγοντας που επηρεάζει την κατανομή του ενζύμου στην HDL [364].

II.3.3.1. Υποστρώματα της Lp-PLA₂

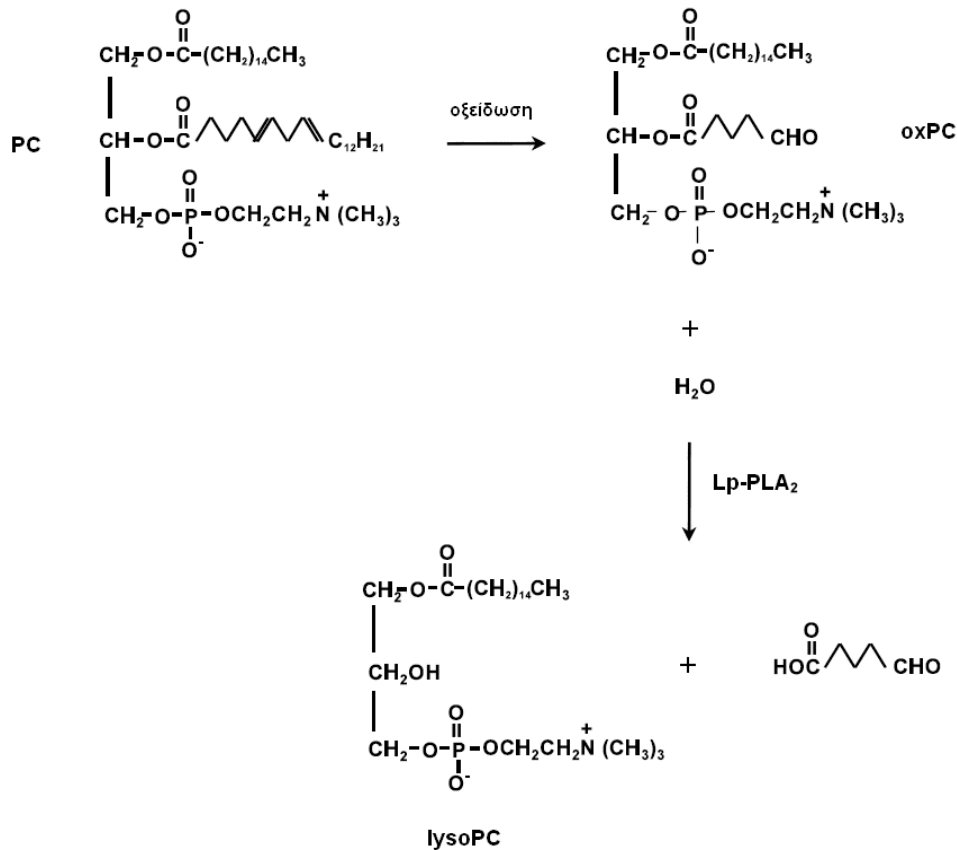
Η Lp-PLA₂ υδρολύει εκτός από τον PAF και άλλα μη οξειδωμένα φωσφολιπίδια με παρόμοια δομή (ανάλογα του PAF), όπου η αλυσίδα sn-1 προσδέεται με αιθερικό ή εστερικό δεσμό και στη θέση sn-2 υπάρχει βραχεία αλυσίδα συνήθως με μήκος ≤ 5 ατόμων άνθρακα (**Εικόνα II.8.**) [365].



Εικόνα II.8. Υδρόλυση του PAF από την Lp-PLA₂

Υπόστρωμα της Lp-PLA₂ αποτελούν και μόρια οξειδωμένης φωσφατιδυλοχολίνης με βραχείες αλυσίδες ατόμων άνθρακα στην sn-2 θέση, οι οποίες αποτελούν κατάλοιπα από τον κατακερματισμό ακόρεστων λιπαρών αλυσίδων κατά την οξείδωσή τους (**Εικόνα II.9.**) [326, 327]. Από την υδρόλυση προκύπτουν λυσοφωσφατιδυλοχολίνη και μικρού μοριακού

βάρους προϊόντα που είναι τα κατάλοιπα των αλυσίδων της sn-2 θέσης που αποκόπτονται αποκτώντας καρβοξυλική ομάδα στη θέση του εστερικού δεσμού με τον οποίο ενώνονταν με το σκελετό του φωσφολιπιδίου. Η μείωση του μήκους με τον κατακερματισμό της λιπαρής αλυσίδας και η κατάληξη αυτού του οξειδωμένου καταλοίπου σε αλδεϋδική ομάδα αντί για μεθυλική ομάδα όπως στις μη οξειδωμένες αλυσίδες, βρέθηκε να μεταβάλλουν την καταλυτική ικανότητα.



Εικόνα Π.9. Παράδειγμα υδρόλυσης oxPC από την Lp-PLA₂

Μόρια φωσφατιδυλοχολίνης με αλυσίδα στην sn-2 θέση η οποία κατέληγε σε καρβοξυλικό άκρο μπορούσαν να υδρολυθούν από την Lp-PLA₂ όταν το μήκος τους έφθανε μέχρι και τα 5 άτομα άνθρακα χωρίς ουσιαστική μείωση της αποτελεσματικότητάς της υδρόλυσης ενώ με περαιτέρω επιμήκυνση της αλυσίδας η αποτελεσματικότητα της υδρόλυσης μειωνόταν δραματικά φθάνοντας μόλις στο 2% αυτής του PAF όταν το μήκος έφθανε στα 9 άτομα άνθρακα [326]. Η 1-παλμιτούλο-2-(5-κετοβαλερόϋλο)- sn-γλυκερο- 3-φωσφο-χολίνη (1-palmitoyl-2-(5-oxovaleroyl)-sn-glycero-3-phosphocholine, POVPC), η οποία αποτελεί παράγωγο οξειδωσης της 1-παλμιτούλο-2-αραχιδονυλοϋλο- sn-γλυκερο-3-

φωσφο-χολίνης (1-palmitoyl-2-arachidonoyl-sn-3-phosphocholine, PAF), και η οποία φέρει αλυσίδα 5 ατόμων άνθρακα με κατάληξη σε αλδεϋδική ομάδα στην θέση sn-2, βρέθηκε να αποτελεί υπόστρωμα της Lp-PLA₂ με αποτελεσματικότητα που έφθανε περίπου στα 2/3 αυτής του PAF [326, 327]. Επιπλέον, ενώ η 1-παλμιτόϋλο-2-εννεανόϋλο-sn-γλυκερο-3-φωσφοχολίνη (1-palmitoyl-2-nonanoyl-sn-glycerol-3-phosphocholine), ένα μόριο φωσφατιδυλοχολίνης με 9 άτομα άνθρακα στην sn-2 θέση και κατάληξη σε μεθυλική ομάδα, βρέθηκε να είναι πολύ φτωχό υπόστρωμα για την Lp-PLA₂ παρουσιάζοντας αποτελεσματικότητα μόλις στο 2% αυτής του PAF, το αλδεϋδικό ανάλογό της που φέρει αλδεϋδική ομάδα αντί της μεθυλικής ομάδας, η 1-παλμιτόϋλο-2-(9-αλδο-εννεανόϋλο)-sn-γλυκερο-3-φωσφοχολίνη (1-palmitoyl-2-(9oxononanoyl)-sn-glycero-3-phosphocholine), αποτελούσε ικανό υπόστρωμα με 20πλάσια περίπου αποτελεσματικότητα [326]. Η ικανότητα υδρόλυσης οξειδωμένων φωσφολιπιδίων από την Lp-PLA₂ καταδεικνύεται και σε μετέπειτα εργασία όπου η Lp-PLA₂ βρέθηκε να υδρολύει φωσφολιπίδια που έφεραν εστεροποιημένα F2 ισοπροστάνια, τα οποία αποτελούν παράγωγα οξείδωσης φωσφολιπιδίων με αλυσίδα αραχιδονικού οξέος στην sn-2 θέση [366]. Αυτό επιβεβαιώθηκε και από την ανεπάρκεια υδρόλυσης POVPC και την ανεπάρκεια απελευθέρωσης F2 ισοπροστανίων με επώαση μορίων φωσφατιδυλοχολίνης που έφεραν F2 ισοπροστάνια με πλάσμα ατόμων με ανεπάρκεια Lp-PLA₂ σε σύγκριση με το πλάσμα ατόμων με φυσιολογική συγκέντρωση Lp-PLA₂. Η υδρόλυση μορίων oxPC με κατακερματισμένες αλυσίδες στην sn-2 θέση από την Lp-PLA₂ επιβεβαιώνεται και σε ανάλυση με φασματομετρία μάζας των μεταβολών της μοριακής αναλογίας της oxPC και της lysoPC σε oxLDL με παρούσα ή ανεσταλμένη τη δραστηριότητα της Lp-PLA₂ κατά τη διάρκεια της οξείδωσης [316]. Η κύρια διαφοροποίηση που παρατηρήθηκε με την αναστολή της δραστηριότητας της Lp-PLA₂ ήταν η αύξηση της περιεκτικότητας της oxLDL σε μόρια oxPC με κατακερματισμένες αλυσίδες παράλληλα με τη μεγάλη μείωση της περιεκτικότητας σε lysoPC.

II.3.3.2. Κυτταρική προέλευση της Lp-PLA₂

Παραγωγή Lp-PLA₂ έχει καταδειχθεί από μακροφάγα, ουδετερόφιλα, ενεργοποιημένα αιμοπετάλια και μαστοκύτταρα [354, 361]. Η διαφοροποίηση των μονοκυττάρων σε μακροφάγα συνοδεύεται από μεγάλη αύξηση της παραγωγής Lp-PLA₂ [367-369]. Σε καλλιέργεια ανθρώπινων μονοκυττάρων περιφερικού αίματος, η ενδοκυττάρια και η εξωκυττάρια συγκέντρωση του ενζύμου παρουσίασε αύξηση από το δεύτερο 24ωρο με επακόλουθη δραματική αύξηση τις επόμενες ημέρες [369]. Πρόσφατη εργασία σε καλλιέργεια ανθρώπινων μονοκυττάρων περιφερικού αίματος επιβεβαίωσε τα ευρήματα

αυτά καταδεικνύοντας ότι η χαμηλή μεταγραφή του γονιδίου της Lp-PLA₂ και η χαμηλή έκφραση πρωτεΐνης της Lp-PLA₂ σε μονοκύτταρα μεταβάλλονταν κατά τη διαφοροποίησή τους σε μακροφάγα με τεράστια αύξησή τους, και η αύξηση αυτή αφορούσε και στην ενδοκυττάρια και στην εκκρινόμενη Lp-PLA₂, με περαιτέρω αύξηση κατά τη μετατροπή των μακροφάγων σε αφρώδη κύτταρα [368]. Μελέτη με *in situ* υβριδισμό και με ανοσοϊστοχημεία σε αθηρωματικές πλάκες σε ανθρώπους και κουνέλια εντόπισε mRNA Lp-PLA₂ και πρωτεΐνη Lp-PLA₂ στα μακροφάγα [370]. Στοιχεία από πειράματα σε καλλιέργεια καρκινικών ηπατικών κυττάρων HepG2 που ανέδειξαν παραγωγή του ενζύμου δεν επιβεβαιώθηκαν σε φυσιολογικά ηπατικά κύτταρα [354]. Συμπερασματικά, από τα υπάρχοντα στοιχεία γίνεται δεκτό πως η παραγωγή και έκκριση από μακροφάγα αποτελεί την κύρια πηγή της Lp-PLA₂ του πλάσματος.

II.3.3.3. Ρύθμιση της έκφρασης της Lp-PLA₂

Η επίδραση ενδοτοξινών και κυτταροκινών που εμπλέκονται στη φλεγμονή στην έκφραση της Lp-PLA₂ φαίνεται να εξαρτάται από το επίπεδο διαφοροποίησης, καθώς έχει καταδειχθεί πως ίδια μόρια έχουν διαφορετική επίδραση σε μονοκύτταρα από ότι σε μακροφάγα [371]. Σε ανθρώπινα μακροφάγα η επίδραση λιποπολυσακχαρίτη, IFN γ , IL-1, IL-8 και TNF α οδήγησε σε μείωση της έκφρασης της Lp-PLA₂ [372-374]. Αντίθετα, η επίδραση λιποπολυσακχαρίτη, IL-1 β , G-CSF, TNF α σε λιγότερα διαφοροποιημένα κύτταρα όπως μονοκύτταρα χοίρου και στις κυτταρικές σειρές RAW264.7 και THP-1 αύξησε την έκκριση Lp-PLA₂ [375, 376]. Επαγωγή του φλεγμονώδη M1 φαινότυπου των μακροφάγων αναφέρθηκε ότι επάγει περαιτέρω την έκφραση της Lp-PLA₂ ενώ τάση μείωσης παρατηρήθηκε με επαγωγή του θεωρούμενου ως προστατευτικού M2 φαινοτύπου [368]. Όσον αφορά στη μεταβολή των επιπέδων της Lp-PLA₂ σε σχέση με την ύπαρξη φλεγμονής σε κλινικό επίπεδο, μειωμένα επίπεδα Lp-PLA₂ έχουν αναφερθεί στη σήψη, στο συστηματικό ερυθματώδη λύκο και στη νόσο του Crohn [377-379].

Η επίδραση της oxLDL στην έκφραση της Lp-PLA₂ έχει μελετηθεί σε καλλιέργεια σειράς ανθρώπινων μονοκυττάρων THP-1 όπου βρέθηκε πως oxLDL οξειδωμένη με 10 μ M CuSO₄ προκαλούσε δόσοεξαρτώμενη και χρονοεξαρτώμενη αύξηση της μεταγραφής του γονιδίου και αύξηση της παραγωγής της πρωτεΐνης της Lp-PLA₂ [380]. Επίδραση μη οξειδωμένης LDL όπως και επίδραση PAF δεν παρουσίασαν την επαγωγική αυτή δράση. Επιπλέον η επαγωγή της έκφρασης της Lp-PLA₂ ενισχύθηκε περαιτέρω όταν χρησιμοποιήθηκε oxLDL στην οποία η δραστηριότητα της Lp-PLA₂ είχε ανασταλεί πριν από την οξείδωσή της. Το γεγονός αυτό, σε συνδυασμό με το ότι δεν παρατηρήθηκε επαγωγική

επίδραση στην έκφραση της Lp-PLA₂ με προσθήκη lysoPC ή lysoPAF, υποδεικνύει πως μόρια oxPC συμμετέχουν στην επαγωγική δράση της oxLDL. Προσπάθεια ταυτοποίησης της υπεύθυνης σηματοδοτικής οδού ανέδειξε ότι η επαγωγική αυτή επίδραση μεσολαβείται από ενεργοποίηση των κινασών p38 MAPK και PI3K. Όσον αφορά στον PAF, σε άλλη εργασία η επίδρασή του σε μακροφάγα οδήγησε σε αύξηση της έκκρισης της Lp-PLA₂ [372]. Η επίδραση αυτή βρέθηκε να ασκείται μέσω σύνδεσης του PAF με τον υποδοχέα του PAF, όπως απέδειξε η κατάργηση της δράσης αυτής με τη χρήση ανταγωνιστών του PAF, αλλά και πειράματα σε κύτταρα διαμολυσμένα με το γονίδιο του υποδοχέα του PAF.

II.3.4. Lp-PLA₂ ΚΑΙ ΑΘΗΡΟΣΚΛΗΡΥΝΣΗ

II.3.4.1. Έκφραση της Lp-PLA₂ στην αθηρωματική πλάκα

Η παρουσία της Lp-PLA₂ στις αθηρωματικές βλάβες οφείλεται κατά κύριο λόγο στην τοπική παραγωγή της από τα μακροφάγα και δευτερευόντως στην παρουσία λιποπρωτεϊνών, όπως έχει αποδειχθεί σε ανθρώπους και πειραματόζωα [370]. Η τοπική παραγωγή Lp-PLA₂ από τα μακροφάγα στον έσω χιτώνα του αγγειακού τοιχώματος και η επακόλουθη απελευθέρωσή της στην κυκλοφορία υποστηρίζεται από την *in vivo* ανάδειξη αρτηριοφλεβικής διαφοράς στη συγκέντρωση της Lp-PLA₂ στο αίμα που ρέει σε αθηροσκληρωτικά στεφανιαία αγγεία σε ανθρώπους, ενώ δεν παρατηρείται αντίστοιχη διαφορά σε μη αθηροσκληρωτικά στεφανιαία αγγεία [381]. Διάφορες ιστοπαθολογικές μελέτες έχουν καταδείξει την παρουσία Lp-PLA₂ σε αθηροσκληρωτικές βλάβες και επιπλέον ότι οι ευάλωτες αθηρωματικές πλάκες χαρακτηρίζονται από υψηλότερες συγκεντρώσεις του ενζύμου [382-384].

Στη συνέχεια θα εκτεθούν στοιχεία σχετικά με τους πιθανούς μηχανισμούς με τους οποίους επιδρά η δραστηριότητα της Lp-PLA₂ της LDL στους μηχανισμούς της αθηρογένεσης όπως προκύπτουν από μελέτες βασικής έρευνας και εν συνεχεία ο ρόλος της Lp-PLA₂ στην αθηροσκλήρυνση θα προσεγγιστεί από επιδημιολογική άποψη και από τα στοιχεία που έχουν προκύψει από μελέτες τροποποίησης της έκφρασής της και ιδιαίτερα από τις κλινικές μελέτες φαρμακολογικής αναστολής της.

II.3.4.2. Μηχανισμοί μέσω των οποίων η συνδεδεμένη στην LDL Lp-PLA₂ εμπλέκεται στην ανάπτυξη της αθηροσκλήρυνσης

Η Lp-PLA₂ υδρολύει κατά την οξείδωση της LDL, όπως αναφέρθηκε παραπάνω, σημαντικό μέρος των μορίων οξειδωμένης φωσφατιδυλοχολίνης αποκόπτοντας τα βραχεία

κατάλοιπα που προκύπτουν από την οξείδωση και τον επακόλουθο κατακερματισμό των αλυσίδων ακόρεστων λιπαρών οξέων στην sn-2 θέση του γλυκερινικού σκελετού της φωσφατιδυλοχολίνης (βλέπε II.3.3.1. Υποστρώματα της Lp-PLA₂). Τα προϊόντα της υδρόλυσης είναι η λυσοφωσφατιδυλοχολίνη και τα μικρού μοριακού βάρους προϊόντα υδρόλυσης που προέρχονται από την sn-2 θέση. Τα sn-1 ακυλ μόρια οξειδωμένης φωσφατιδυλοχολίνης που στην sn1 θέση έχουν λιπαρή ομάδα ενωμένη με εστερικό δεσμό, αποτελούν ποσοτικά το κύριο υπόστρωμα της Lp-PLA₂ κατά την οξείδωση της LDL. Επίσης, υπόστρωμα υδρόλυσης αποτελεί και ο PAF καθώς και άλλα μόρια που προκύπτουν από την οξείδωση sn-1 αλκυλ μορίων φωσφατιδυλοχολίνης δηλαδή μορίων με λιπαρό κατάλοιπο στην sn1 θέση ενωμένο με αιθερικό δεσμό όπως και ο PAF. Τα τελευταία αυτά μόρια στην sn-1 θέση διαθέτουν αλυσίδα άνθρακα που δεν έχει απαραίτητα μήκος 16 ατόμων άνθρακα όπως ο PAF, ενώ στην sn-2 θέση διαθέτουν ακόρεστη λιπαρή αλυσίδα αντί της αλυσίδας του οξικού οξέος του PAF, η οποία κατά την οξείδωση της LDL κατακερματίζεται αφήνοντας βραχέα κατάλοιπα στην sn-2 θέση και καθιστώντας έτσι τα μόρια αυτά υπόστρωμα της Lp-PLA₂. PAF και sn-1 αλκυλ μόρια οξειδωμένης φωσφατιδυλοχολίνης ανιχνεύονται αν και σε μικρότερο βαθμό από τα sn-1 ακυλ μόρια οξειδωμένης φωσφατιδυλοχολίνης (λιπαρό οξύ ενωμένο με εστερικό δεσμό στην sn-1 θέση) κατά την οξείδωση της LDL [354, 385, 386]. Από την υδρόλυση του PAF προκύπτει λυσοPAF και οξικό οξύ και από την υδρόλυση των οξειδωμένων μορίων sn-1 αλκυλ φωσφατιδυλοχολίνης προκύπτουν τα αντίστοιχα μόρια λυσοφωσφατιδυλοχολίνης και τα αντίστοιχα μικρού μοριακού βάρους προϊόντα υδρόλυσης που προέρχονται από την sn2 θέση.

Πλήθος στοιχείων έχουν συσσωρευθεί που καταδεικνύουν σημαντική εμπλοκή της οξειδωμένης φωσφατιδυλοχολίνης και της λυσοφωσφατιδυλοχολίνης στους μηχανισμούς της αθηρογένεσης. Στη συνέχεια θα εκτεθούν τα στοιχεία που υπάρχουν σχετικά με το ρόλο αφενός των υποστρωμάτων της Lp-PLA₂ και αφετέρου των προϊόντων υδρόλυσής τους. Πρέπει βεβαίως να τονιστεί ιδιαίτερα στην περίπτωση της οξειδωμένης φωσφατιδυλοχολίνης πως οι δράσεις που αναφέρονται στις διάφορες μελέτες αποτελούν στις περισσότερες περιπτώσεις το αποτέλεσμα της επίδρασης του συνόλου των προϊόντων που προκύπτουν από την οξείδωση μορίων φωσφατιδυλοχολίνης χωρίς να υπάρχει διάκριση της συμβολής των μορίων που αποτελούν υποστρώματα της Lp-PLA₂ και ως εκ τούτου μπορούν να αποτελέσουν μόνο μία έμμεση εκτίμηση της τροποποίησης της αθηρογενετικής δράσης της oxLDL από την Lp-PLA₂. Το ίδιο ισχύει σε μεγαλύτερο βαθμό για τη δράση των μικρού

μοριακού βάρους προϊόντα υδρόλυσης που προέρχονται από την sn2 θέση των οποίων η δράση εκτιμάται έμμεσα από μελέτες επίδρασης οξειδωμένων ελεύθερων λιπαρών οξέων.

Εν κατακλείδι, η συνολική εκτίμηση του ρόλου της Lp-PLA₂ στην αθηρογένεση προκύπτει από την ισορροπία μεταξύ δράσεων από τη μία πλευρά των υποστρωμάτων και από την άλλη των προϊόντων της υδρόλυσης, και η συνισταμένη αυτή είναι δύσκολο να εκτιμηθεί από τις υπάρχουσες εργασίες βασικής έρευνας αφενός λόγω του πλήθους και της ποικιλίας των επιδράσεων αφετέρου λόγω της μεμονωμένης στις περισσότερες περιπτώσεις εξέτασης κάποιου από τους παράγοντες αυτούς. Από την άποψη αυτή εργασίες σχεδιασμένες να εξετάσουν τη μεταβολή παραμέτρων με ή χωρίς την παρουσία δραστηριότητας της Lp-PLA₂ είναι ιδιαίτερα χρήσιμες.

A) Ρόλος της οξειδωμένης φωσφατιδυλοχολίνης και των προϊόντων υδρόλυσής της στην αθηροσκλήρυνση

Η οξείδωση της LDL αποτελεί ένα από τα πρωταρχικά και θεμελιώδη γεγονότα στη θέση ανάπτυξης της αθηρωματικής βλάβης. Όπως αναπτύχθηκε διεξοδικά στο κεφάλαιο της αθηροσκλήρυνσης η οξείδωση της LDL αποτελεί κυρίαρχο σημείο σύγκλισης στην πυροδότηση της έναρξης ανάπτυξης αθηρωματικής βλάβης και επιπλέον συμμετέχει με καθοριστικό τρόπο σε όλα τα στάδια ανάπτυξης της αθηρωματικής πλάκας από τις πρώιμες βλάβες έως τις προχωρημένες αθηρωματικές πλάκες. Η φωσφατιδυλοχολίνη (PC) αποτελεί ένα από τα σημαντικότερα ποσοτικά συστατικά της LDL και η υδρόλυση μορίων οξειδωμένης φωσφατιδυλοχολίνης (oxidized phosphatidylcholine, oxPC) από την Lp-PLA₂ αποτελεί ένα από τα πλέον σημαντικά χαρακτηριστικά της οξειδωτικής τροποποίησης της LDL. Η οξείδωση των ακόρεστων λιπαρών αλυσίδων της oxPC οδηγεί σε κατακερματισμό τους και μείωση του μήκους των λιπαρών αλυσίδων που εξακολουθούν να είναι συνδεδεμένες στο γλυκερινικό σκελετό της oxPC. Μόρια oxPC με βραχείες οξειδωμένες λιπαρές αλυσίδες στην sn-2 θέση όπως η 1-παλμιτοϋλο-2-(5-κετοβαλερόϋλο)- sn-γλυκερο-3-φωσφοχολίνη (1-palmitoyl-2-(5-oxovaleroyl)-sn-glycero-3-phosphocholine, POVPC) αποτελούν υποστρώματα της Lp-PLA₂, όπως αναφέρθηκε παραπάνω σχετικά με τα υποστρώματα της Lp-PLA₂ [326, 327]. Τα προϊόντα που προκύπτουν από την υδρόλυση της oxPC είναι η lysoPC και τα μικρού μοριακού βάρους προϊόντα που αποτελούν τα κατάλοιπα των οξειδωμένων λιπαρών αλυσίδων στην sn2 θέση τα οποία αποκόπτονται από το γλυκερινικό σκελετό από την Lp-PLA₂. Στη συνέχεια θα ανασκοπηθούν τα στοιχεία που υπάρχουν για το ρόλο της oxPC και των προϊόντων που προκύπτουν από την υδρόλυσή της στους μηχανισμούς ανάπτυξης της αθηροσκλήρυνσης.

A1) Οξειδωμένη φωσφατιδυλογολίνη και αθηροσκλήρυνση

Μόρια PC υπόκεινται σε οξείδωση ως αποτέλεσμα της επίδρασης των ROS ή στο πλαίσιο ενζυμικής οξείδωσης όπως περιγράφηκε στην οξείδωση της LDL. Τα ακόρεστα λιπαρά οξέα που είναι συνδεδεμένα στο γλυκερινικό σκελετό της PC αποτελούν σχεδόν αποκλειστικά το υπόστρωμα της οξείδωσης [264]. Προϊόντα οξείδωσης της φωσφατιδυλογολίνης ανευρίσκονται σε αφθονία σε αθηρωματικές βλάβες σε ανθρώπινες αρτηρίες και σε πειραματόζωα [264]. Μόρια oxPC είτε με τη μορφή πρώιμων προϊόντων οξείδωσης (υδροϋπεροξειδία) είτε με τη μορφή προϊόντων προχωρημένης οξείδωσης με διάσπαση των λιπαρών αλυσίδων, είναι παρόντα στις θέσεις ανάπτυξης βλάβης σε όλα τα στάδια ανάπτυξης της αθηρωμάτωσης από τις πρώιμες βλάβες έως τις προχωρημένες αθηρωματικές βλάβες [264, 387]. Στα προϊόντα οξείδωσης της PAPC που έχουν ανιχνευθεί σε oxLDL καθώς και σε αθηρωματικές πλάκες ανήκουν η 1-παλμιτόϋλο-2-(5κετοβαλερούλο)-sn-γλυκερο-3-φωσφοχολίνη (1-palmitoyl-2-(5-oxovaleroyl)-sn-glycero-3-phosphocholine, POVPC), η 1-παλμιτόϋλο-2-(γλουταρούλο)-sn-γλυκερο-3-φωσφοχολίνη (1-palmitoyl-2-glutaroyl-sn-glycero-3-phosphocholine, PGPC), και η 1-παλμιτόϋλο-2-(εποξυ - ισοπροσταυλούλο E2) - sn - γλυκερο - 3 - φωσφοχολίνη (1 - palmitoyl - 2 - epoxyisopropane E2-sn-glycero-3-phosphocholine, PEIPC) [388, 389]. Μόρια oxPC αποτελούν συνδεδεμένα μόρια για εκκαθαριστές υποδοχείς. Αυτό έχει ιδιαίτερα αποδειχθεί για μόρια προερχόμενα από την οξείδωση της PAPC και της PLPC τα οποία κατέχουν ισχυρή ικανότητα σύνδεσης στον CD36 (βλέπε II.2.4.2. Σύνδεση μέσω της λιπιδικής ομάδας της oxLDL). Επιπλέον στοιχεία υπάρχουν για επιδράσεις μέσω TLRs. Ο ρόλος των SRs στο σχηματισμό των αφρωδών κυττάρων αλλά και το πλήθος των επιδράσεων στην αθηρογένεση που αποτελούν κατάληξη σηματοδοτικών οδών που εκκινούν από SRs και TLRs όπως επίσης και οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ SRs και TLRs έχουν αναπτυχθεί λεπτομερειακά παραπάνω (βλέπε II.1.3.3.A.1.α. Εκκαθαριστές υποδοχείς, II.1.3.3.A.1.β. Υποδοχείς τύπου Toll, II.1.3.3.A.1.γ. Αλληλεπίδραση εκκαθαριστών υποδοχέων και TLRs). Επιπλέον στοιχεία υπάρχουν για επίδραση μορίων oxPC με μικρού μήκους κατάλοιπα οξειδωμένων λιπαρών οξέων μέσω του υποδοχέα του PAF [390, 391]. Τα στοιχεία αυτά μπορούν να δικαιολογήσουν την υπόθεση για ένα σημαντικό ρόλο της oxPC στους μηχανισμούς ανάπτυξης της αθηροσκλήρυνσης. Η επίδραση της oxPC στους κυτταρικούς πληθυσμούς που συμμετέχουν στην ανάπτυξη της αθηρωματικής πλάκας έχει μελετηθεί σε πολλές εργασίες. Οι εργασίες αυτές αναφέρονται σχεδόν αποκλειστικά στην oxPAPC αναδεικνύοντας πλήθος επιδράσεων τις οποίες στερείται το μη οξειδωμένο μόριο της PAPC. Αυτές περιλαμβάνουν ποικίλες αθηρογόνους αλλά και κάποιες αθηροπροστατευτικές

επιδράσεις και άλλες των οποίων ο ρόλος δεν έχει ακόμη διευκρινιστεί. Οι κυριότερες από τις επιδράσεις που έχουν περιγραφεί αναλύονται παρακάτω και παρουσιάζονται συνοπτικά στον **Πίνακα Π.3**.

A1.α) Επίδραση της oxPC στα ενδοθηλιακά κύτταρα

Επώαση ανθρώπινων αορτικών ενδοθηλιακών κυττάρων (human aortic endothelial cells, HAEC) με oxPAPC ή με ένα προϊόν της οξείδωσης της PAPC, το PEIPC, ανέδειξε με τεχνική μικροσυστοιχιών (microarray) επίδραση σε περισσότερα από 1000 γονίδια [392, 393]. Στο πλήθος αυτό των επιδράσεων περιλαμβάνονταν αθηρογόνοι και αθηροπροστατευτικές οδοί ρύθμισης. Στην προσπάθεια οργάνωσης του δικτύου των επιδράσεων αυτών, κυρίαρχο ρόλο φάνηκε να παίζει η ρύθμιση της UPR (unfolded protein response), της αντίδρασης δηλαδή που κινητοποιείται σε συνθήκες stress του ενδοπλασματικού δικτύου κατά την επεξεργασία των πρωτεϊνών. Η αντίδραση αυτή ενώ σε χαμηλά επίπεδα είναι προστατευτική για το κύτταρο, σε παρατεταμένα και υψηλά επίπεδα οδηγεί σε φλεγμονώδη αντίδραση και απόπτωση [390]. Η oxPAPC επάγει την παραγωγή των φλεγμονωδών κυτταροκινών IL-6 και IL-8 και της χημειοκίνης MCP-1, και η επαγωγή αυτή δεν μεσολαβείται από ενεργοποίηση του NFκB αλλά βρέθηκε να εξαρτάται από την UPR [390, 394-397]. Επιπλέον, αύξηση της παραγωγής IL-8 και MCP-1 μετά από επίδραση oxPAPC έχει περιγραφεί να μεσολαβείται από ενεργοποίηση των πυρηνικών υποδοχέων PPARα (peroxisome proliferator-activated receptor alpha, υποδοχείς άλφα παραγόντων προκαλούντων πολλαπλασιασμό υπεροξεισωματίων) που δρουν ως μεταγραφικοί παράγοντες, ενώ ένας ακόμη μηχανισμός που έχει περιγραφεί περιλαμβάνει σηματοδοτικές οδούς που εκκινούν από τον υποδοχέα HBEGFR (heparin binding epidermal growth factor receptor) μετά από απελευθέρωση HBEGF που προκαλείται από ενεργοποίηση μεταλλοπρωτεϊνών από την επίδραση της oxPAPC [395, 398-400]. Επίσης αύξηση της παραγωγής IL-8 μετά από επίδραση oxPAPC σε ανθρώπινα ενδοθηλιακά κύτταρα αποδείχθηκε με τη χρήση εξουδετερωτικών αντισωμάτων και μη κωδικοποιών ολιγονουκλεοτιδίων (antisense oligonucleotides) να είναι ανεξάρτητη του CD36 και εξαρτώμενη από την παρουσία του TLR4 [218]. Σε άλλη εργασία επώαση με oxPAPC αύξησε την επαγόμενη από την IL-1β ή τον TNFα παραγωγή IL-8 και MCP-1 σε HAEC και σε ανθρώπινα ενδοθηλιακά κύτταρα από μικρά αγγεία ενώ αντίθετα μείωσε την επαγόμενη από λιποπολυσακχαρίτη παραγωγή τους [217]. Η διέγερση της παραγωγής IL-8 και MCP-1 από την IL-1β, τον TNFα και το λιποπολυσακχαρίτη εξαρτάτο από την ενεργοποίηση του

TLR4 και η ευδοωτική ή η ανασταλτική επίδραση της oxPAPC εξασκείται μέσω μετατόπισης που προκαλούσε στην κυτταρική μεμβράνη του συμπλέγματος συνδέτη και TLR4.

Εκτός από την επαγωγή της παραγωγής της χημειοκίνης MCP-1, η οποία ήδη αναφέρθηκε υπάρχουν και άλλα δεδομένα που δείχνουν ότι η επίδραση της oxPAPC σε ενδοθηλιακά κύτταρα μπορεί να επηρεάσει τη στρατολόγηση λευκοκυττάρων. Σύνδεση oxPAPC ή PEIPC με τον υποδοχέα προσταγλανδινών τύπου E σε HAEC προκαλεί ενεργοποίηση της ιντεγκρίνης $\alpha_5\beta_1$ που οδηγεί σε εναπόθεση στην επιφάνεια του κυττάρου του συνδετικού τμήματος 1 της φμπρονεκτίνης στο οποίο προσκολλάται η ιντεγκρίνη $\alpha_5\beta_1$ των μονοκυττάρων [401]. Σε αρκετές εργασίες έχει μελετηθεί η επίδραση της oxPAPC στο φραγμό του ενδοθηλίου. Ο φραγμός του ενδοθηλίου εξαρτάται από ποικίλες συνδέσεις μεταξύ των ενδοθηλιακών κυττάρων στις οποίες συμμετέχει ένα πλήθος πρωτεϊνών όπως η VE-cadherin, η paxillin και οι catenins καθώς και ο κυτταροσκελετός ακτίνης [390]. Η oxPAPC εμφανίζει διπλό ρόλο στην τροποποίηση του ενδοθηλιακού φραγμού καθώς σε χαμηλές συγκεντρώσεις ενισχύει τη σύνδεση μεταξύ των κυττάρων ενώ σε υψηλές συγκεντρώσεις προκαλεί την εξασθένησή της [402, 403].

Επίδραση της oxPAPC σε ενδοθηλιακά κύτταρα από αορτή ανθρώπου (human aortic endothelial cells, HAEC) ή βοδιού, bovine aortic endothelial cells, BAEC) οδήγησε σε αύξηση της παραγωγής ROS με πιθανό μηχανισμό την επαγωγή της έκφρασης της NOX4 υπομονάδας της NADPH [404-406]. Από την άλλη πλευρά περιγράφεται η επαγωγή αντιοξειδωτικών μηχανισμών από την oxPAPC, όπως αυτή συνάγεται από την επαγωγή που παρατηρήθηκε με επίδραση της oxPAPC σε HAEC, σε γονίδια που αφορούσαν το μεταβολισμό της γλουταθειόνης, της θειορεδοξίνης, και κυρίως της HO-1 [392, 393]. Ιδιαίτερα έχει μελετηθεί η επαγωγή του γονιδίου της HO-1 όπου δύο διαφορετικές οδοί άσκησης της επίδρασης αυτής της oxPAPC έχουν περιγραφεί με την πρώτη να περιλαμβάνει την ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα NRF2 και τη δεύτερη την ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα CREB (camp responsive element-binding protein) [407, 408].

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η επαγωγή της αγγειογένεσης από την oxPAPC. Δύο διαφορετικοί μηχανισμοί έχουν δειχθεί να οδηγούν στην επαγωγή της αγγειογένεσης. Ο πρώτος περιλαμβάνει την αύξηση των επιπέδων του VEGFA η οποία μεσολαβείται από ενεργοποίηση του NRF2 [409]. Στο δεύτερο μηχανισμό η επαγωγή της αγγειογένεσης εκκινείται από σύνδεση σε TLRs [410]. Η οδός αυτή περιλαμβάνει τη σύνδεση προϊόντων ένωσης μορίων oxPAPC με πρωτεΐνες που ονομάζονται πυρρόλες όπως η CEP (2 [w-carboxyethyl]pyrrole) σε διμερή TLR2/TLR1 με επακόλουθη μέσω του MyD88 ενεργοποίηση του NF κ B. Η ενεργοποίηση του NF κ B οδηγεί σε αλληλεπιδράσεις

ιντεγκρινών με τη φιβρονεκτίνη που επάγουν την αγγειογένεση. Ο ρόλος της επαγωγής της αγγειογένεσης στην αθηροσκλήρυνση είναι διττός. Από τη μία πλευρά οδηγεί σε νεοαγγείωση της αθηρωματικής πλάκας, γεγονός που όπως αναπτύχθηκε παραπάνω συντελεί στην ανάπτυξη της πλάκας. Από την άλλη πλευρά η επαγωγή της αγγειογένεσης αποτελεί την απαρχή ανάπτυξης παράπλευρης κυκλοφορίας στις περιοχές ισχαιμίας. Πράγματι, έγχυση CEP σε ισχαιμικό άκρο σε μοντέλο πειραματικής ισχαιμίας σε ποντίκια οδήγησε σε σημαντική αύξηση της ανάπτυξης παράπλευρης κυκλοφορίας [410].

Τέλος η επίδραση οξειδωμένων φωσφολιπιδίων από oxLDL σε ανθρώπινα ενδοθηλιακά κύτταρα ομφαλικής φλέβας (human umbilical vein endothelial cells, HUVEC) επάγει την ανάπτυξη θρομβωτικότητας. Αυτή αποδίδεται στα οξειδωμένα φωσφολιπίδια που περιέχουν, καθώς βρέθηκε πως το εκχύλισμα των οξειδωμένων φωσφολιπιδίων αλλά και η oxPAPC οδηγούσαν σε αύξηση της μεταγραφής του γονιδίου του ιστικού παράγοντα (tissue factor, TF) και σε μείωση της μεταγραφής του γονιδίου της αντιθρομβωτικής γλυκοπρωτεΐνης θρομβομοδουλίνης [411-413]. Δύο διαφορετικές σηματοδοτικές οδοί έχουν ταυτοποιηθεί να οδηγούν στην αύξηση αυτή της έκφρασης του TF. Στην πρώτη η επίδραση της oxPAPC σε HUVEC οδηγούσε σε είσοδο ασβεστίου στο κύτταρο που προκαλούσε μετατόπιση και σύνδεση του πυρηνικού υποδοχέα των ενεργοποιημένων T κυττάρων που δρα ως μεταγραφικός παράγοντας (nuclear factor of activated T cells, NFAT) στον υποκινητή (promoter) του TF, ενώ η δεύτερη περιγράφηκε σε HAEC και εκκινούσε από ενεργοποίηση (φωσφορυλίωση) του VEGFR2 [412, 413].

A1.β) Επίδραση της oxPC στα μονοκύτταρα/μακροφάγα

Οι επιδράσεις της oxPC στα μακροφάγα ασκούνται μέσω SRs και TLRs. Συνίστανται σε επιδράσεις λόγω της πρόσληψης των oxLDL μέσω κυρίως του CD36 και σε επιδράσεις λόγω ενεργοποίησης σηματοδοτικών οδών που εκκινούν από τους CD36 ή/και TLRs.

Μόρια που προκύπτουν από την οξείδωση της PAPC και της PLPC αποτελούν ισχυρούς συνδέτες εκκαθαριστών υποδοχέων ιδιαίτερα του CD36. Η σύνδεση αυτή είναι πλέον αποδεδειγμένο πως μπορεί να μεσολαβήσει στη πρόσληψη oxLDL από το μακροφάγο με κατάληξη τη συσσώρευση λιπιδίων και το σχηματισμό αφρωδών κυττάρων (II.2.4. Σύνδεση της oxLDL στους υποδοχείς των μακροφάγων). Η οδός που οδηγεί στην πρόσληψη από το μακροφάγο μετά από τη σύνδεση στον CD36 τέτοιων μορίων (oxPC_{CD36}) έχει σε μεγάλο βαθμό διεκρινιστεί και αφορά στην ενδοκυττάρωση και στη διακίνηση ενδοσωμάτων (endosomal vesicle) [414]. Αυτή περιλαμβάνει την ενεργοποίηση των τυροσινικών κινασών Lyn/Fyn που ακολουθείται από την ενεργοποίηση πρωτεϊνών της οικογένειας VAN (Van

protein guanine nucleotide exchange factor) ενώ πιθανότατα συμμετέχει και δεύτερη οδός με την ενεργοποίηση της κινάσης JNK [390, 414].

Πίνακας Π.3. Κύριες επιδράσεις της οξειδωμένης φωσφατιδυλογολίνης στην ανάπτυξη της αθηροσκλήρυνσης

Ενδοθηλιακά κύτταρα

αύξηση παραγωγής ROS, επαγωγή της NADPH (oxPAPC) [404-406]
επαγωγή αντιοξειδωτικών μηχανισμών, κυρίως της HO-1 (oxPAPC) [392, 393, 407, 408]
παραγωγή των προφλεγμονωδών κυτταροκινών IL-6 και IL-8 (oxPAPC) [218, 394, 395, 397, 398, 400]
παραγωγή της χημειοκίνης MCP-1(oxPAPC) [394-396, 399, 400]
επαγωγή προσκόλλησης λευκοκυττάρων μέσω ενεργοποίησης της ιντεγκρίνης $\alpha_5\beta_1$ (oxPAPC, PEIPC) [401]
επίδραση στο φραγμό του ενδοθηλίου (oxPAPC) [402, 403]
επαγωγή της αγγειογένεσης μέσω αύξησης των επιπέδων του VEGFA (oxPAPC) [409]
και αλληλεπιδράσεων ιντεγκρινών με φιμπρονεκτίνη (oxPAPC → πυρόλη CEP) [410]
αύξηση παραγωγής TF (oxPAPC) [412, 413]
μείωση παραγωγής θρομβομοδουλίνης (oxPAPC) [412, 413]

Μακροφάγα

πρόσληψη oxLDL – σχηματισμός αφρωδών κυττάρων (oxPAPC, oxPLPC) [328, 329, 334-336, 338, 340, 390, 414]
επαγωγή φλεγμονής με παραγωγή IL-1 β , TNF α , COX-2 (oxPAPC, POVPC) [415, 416]
και IL-8, COX-1, λιποξυγενάσης 5 (POVPC) [416]
επαγωγή της παραγωγής των χημειοκινών MCP-1, MIP2 (oxPAPC) [415, 417]
επαγωγή απόπτωσης (oxPAPC, KDdia-PC, POVPC) [230, 283]
μείωση εφεροκυττάρωσης (oxPAPC) [283]
διαφοροποίηση προς φαινότυπο Mox (oxPAPC) [241]

Λεία μυϊκά κύτταρα

επαγωγή σύνθεσης εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας (oxPAPC, POVPC, PEIPC) [418]
επαγωγή της παραγωγής των χημειοκινών MCP-1 και -3 (oxPAPC) [390]
επαγωγή πολλαπλασιασμού (oxPAPC, POVPC) [419, 420] αλλά και απόπτωσης (POVPC) [421]

Αιμοπετάλια – πρόκληση υπερπηκτικότητας

συσχέτιση με αύξηση ικανότητας συσσώρευσης των αιμοπεταλίων (oxPC_{CD36}) [153]
αύξηση παραγωγής TF και μείωση παραγωγής θρομβομοδουλίνης από τα ενδοθηλιακά κύτταρα (oxPAPC) [411-413]
αναστολή TFPI (μόρια oxPC με αλυσίδα ελαϊκού) [422]

T λεμφοκύτταρα

ανασταλτική επίδραση στον πολλαπλασιασμό και στην παραγωγή IFN γ και IL-2 (oxPAPC) [423]

Χυμική ανοσία

παραγωγή αντισωμάτων εναντίον oxPC [50, 127, 264]
αντίσωμα EO6 (oxPAPC, POVPC) [328, 329, 335, 424]
ρόλος αντισωμάτων εναντίον oxPC:
αντιστρόφως ανάλογη σχέση με συχνότητα καρδιαγγειακών συμβαμάτων [268, 269]
αναστολή αναγνώρισης της oxLDL από υποδοχείς μακροφάγων και ενδοθηλιακών κυττάρων [266, 267]

Δενδριτικά κύτταρα

ανασταλτική επίδραση στην ικανότητα αντιγονοπαρουσίασης και στην ικανότητα να διεγείρουν τον πολλαπλασιασμό των T λεμφοκυττάρων (oxPAPC) [425]

Όσον αφορά στην παραγωγή φλεγμονωδών κυτταροκινών και χημειοκινών, δεδομένα υπάρχουν όσον αφορά στην επίδραση της oxPAPC. Η oxPAPC, όπως αναφέρθηκε παραπάνω, επάγει στα ενδοθηλιακά κύτταρα την παραγωγή της σημαντικής για τη στρατολόγηση των μονοκυττάρων χημειοκίνης MCP-1 (βλέπε ανωτέρω II.3.4.2.A1.a. Επίδραση της oxPC στα ενδοθηλιακά κύτταρα). Ομοίως επαγωγή της παραγωγής MCP-1 προκάλεσε η επίδραση oxPAPC σε μακροφάγα ποντικού, πιθανότατα μεσολαβούμενη από την ενεργοποίηση της MAPK-1 όπως κατέδειξε η απουσία της επαγωγής αυτής σε μακροφάγα με εξάλειψη της MAPK-1 [417]. Επιπλέον, επίδραση POVPC σε ανθρώπινα μακροφάγα αύξησε τη μεταγραφή του υποδοχέα της MCP-1, CCR2 (578). Στην ίδια εργασία η POVPC προκάλεσε αύξηση της μεταγραφής του υποδοχέα της ATII, των κυτταροκινών IL-1β, IL-8, TNFα καθώς και των COX-1 και -2 και της λιποξυγενάσης 5 αλλά και του ιστικού αναστολέα MMPs, TIMP-4. Επίσης, η oxPAPC διέγειρε την παραγωγή της IL-1β, της COX2 και της MIP2 σε μακροφάγα ποντικού και η επίδραση αυτή μεσολαβείτο από τον TLR2, όπως αποδείκνυε η απουσία της σε TLR2^{-/-} μακροφάγα [415]. Η επίδραση αυτή φάνηκε να μεσολαβείται από τις κινάσες MAPK p38 και JNK. Δεν βρέθηκε να εμπλέκεται ενεργοποίηση του NFκB, γεγονός που βρίσκεται σε συμφωνία με τα δεδομένα από την επίδραση της oxPAPC σε ενδοθηλιακά κύτταρα όπου και εκεί η oxPAPC έδειξε να μην επιδρά στον NFκB (βλέπε ανωτέρω II.3.4.2.A1.a. Επίδραση της oxPC στα ενδοθηλιακά κύτταρα).

Η oxPAPC έχει μελετηθεί και ως προς την επίδρασή της στην απόπτωση των μακροφάγων. Τα παράγωγα της οξειδωσης της PAPC, KDdia-PC και POVPC, που αποτελούν συνδέτες του CD36 προήγαγαν την απόπτωση μακροφάγων ποντικού μέσω του TLR2 και ιδιαίτερα του ετεροδιμερούς TLR2/ TLR6 [230]. Μακροφάγα CD36^{-/-} ή TLR2^{-/-} προστατεύονταν από την επίδραση αυτή. Επώαση των οξειδωμένων αυτών παραγώγων με PLA2, η οποία είχε σαν αποτέλεσμα την αποκοπή του οξειδωμένου κατάλοιπου του λιπαρού οξέος από την sn-2 θέση, καταργούσε επίσης την πρόκληση απόπτωσης. Η επαγωγή της απόπτωσης βρέθηκε να είναι εξαρτώμενη από την αύξηση του οξειδωτικού stress μέσω επαγωγής της υπομονάδας NOX2 της NADPH οξειδάσης η οποία μεσολαβείτο από ενεργοποίηση κινασών ERK, που ανήκουν στις κινάσες MAPK. Επαγωγή στην απόπτωση των μακροφάγων ποντικού μετά από επώαση με oxPAPC με παράλληλη πρόκληση μείωσης της εφεροκυττάρωσης σημειώνεται και σε άλλη μελέτη, εξαρτώμενη κυρίως από την παρουσία του TLR2 αλλά και από την παρουσία του TLR4 ενώ δεν επηρεαζόταν από την παρουσία του CD36 [283]. Η επίδραση αυτή μεσολαβείτο από σηματοδότηση μέσω του MyD88 που οδηγούσε σε αύξηση της NOX2 υπομονάδας της NADPH οξειδάσης με

επακόλουθη ενεργοποίηση της JNK. Προκαλούμενη μετατόπιση από την oxPAPC του συμπλέγματος συνδέτη και TLR4 υποστηρίχθηκε σε άλλη εργασία να αποτελεί τον τρόπο επίδρασης της oxPAPC όσον αφορά στην ενεργοποίηση του TLR4 [217]. Σε αυτή την εργασία η oxPAPC βρέθηκε να τροποποιεί σε ενδοθηλιακά κύτταρα και σε μακροφάγα ευοδωτικά την επαγόμενη από την επίδραση IL-1β ή TNFα παραγωγή της IL-8 και της MCP-1 και ανασταλτικά αυτή που προκαλείτο από λιποπολυσακχαρίτη.

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, στα πλαίσια της διαφοροποίησης μακροφάγων και των υποπληθυσμών των μακροφάγων στη θέση ανάπτυξης της αθηρωματικής βλάβης, η επίδραση της oxPAPC επάγει, μέσω ενεργοποίησης του NRF2, τον Mox φαινότυπο η παρουσία του οποίου είναι σημαντική σε αθηρωματικές βλάβες σε μοντέλα αθηροσκλήρυνσης σε πειραματόζωα (βλέπε II.1.3.3.A1.ε. Διαφοροποίηση μακροφάγων – υποπληθυσμοί μακροφάγων) [241]. Πρόκειται για ένα φαινότυπο με χαρακτηριστικά την παραγωγή IL-1β, COX-2, HO-1, VEGF, μειωμένη μεταναστευτική ικανότητα και μειωμένη ικανότητα φαγοκυττάρωσης.

A1.γ) Επίδραση της oxPC στα λεία μυϊκά κύτταρα

Η oxPAPC έχει βρεθεί να επιδρά στη σύνθεση εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας, στην παραγωγή χημειοκινών, στον πολλαπλασιασμό και στην απόπτωση των λείων μυϊκών κυττάρων. Η oxPAPC αλλά και η POVPC και η PEIPC επάγουν τη σύνθεση πλήθους στοιχείων της θεμέλιας ουσίας, όπως κολλαγόνου VIII, λαμινίνης, φιμπρονεκτίνης μέσω ενεργοποίησης του μεταγραφικού παράγοντα KLF4 (Kruppel-like factor 4) [418]. Επιπλέον, η oxPAPC και η POVPC βρέθηκαν να προκαλούν, μέσω ενεργοποίησης του KLF4 αλλά και μέσω του ELK-1 (E twenty-six (ETS)-like transcription factor 1), φαινοτυπικές μεταβολές στα λεία μυϊκά κύτταρα που παρατηρούνται σε αθηροσκληρυντικές βλάβες [418, 426]. Οι μεταβολές αυτές συνίστανται σε μειωμένη έκφραση χαρακτηριστικών πρωτεϊνών τους, όπως της α-ακτίνης και της βαριάς αλυσίδας της μυοσίνης. Η oxPAPC και η POVPC έχουν δειχθεί να επάγουν τον πολλαπλασιασμό των λείων μυϊκών κυττάρων αλλά υπάρχουν και πειραματικά δεδομένα όπου επώαση ανθρώπινων λείων μυϊκών κυττάρων με POVPC προκάλεσε απόπτωση [419-421]. Επίσης η oxPAPC αύξησε σε λεία μυϊκά κύτταρα την έκφραση των γονιδίων των χημειοκινών MCP-1 και -3 [390].

A1.δ) Επίδραση της oxPC στα αιμοπετάλια και πρόκληση υπερπηκτικότητας

Οι oxLDL προκαλούν αύξηση της θρομβωτικότητας των αιμοπεταλίων μέσω πλήθους φωσφολιπιδίων με δομή παρόμοια του παράγοντα ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων (platelet

activating factor, PAF) τα οποία συνδέονται στον PAF-υποδοχέα που εκφράζεται στα αιμοπετάλια [390, 427]. Πρόκειται για φωσφολιπίδια με αιθερικό δεσμό στην sn-1 θέση σε αντίθεση με τα μόρια φωσφατιδυλοχολίνης τα οποία έχουν εστερικό δεσμό. Επιπλέον όμως και μόρια oxPC sn-1 ακυλ (μόρια με εστερικό δεσμό στην sn-1 θέση) παίζουν ρόλο στην ανάπτυξη θρομβωτικότητας. Αυτό είναι το αποτέλεσμα αφενός της επίδρασής τους στα ενδοθηλιακά κύτταρα όπου, όπως αναπτύχθηκε παραπάνω, επάγει την παραγωγή ιστικού παράγοντα και την καταστολή παραγωγής θρμβομοδουλίνης και αφετέρου της άμεσης επίδρασης στα αιμοπετάλια μέσω σύνδεσης στον υποδοχέα του PAF και στον εκκαθαριστή υποδοχέα CD36. Όπως αναφέρθηκε ήδη, ο CD36 παίζει ρόλο στην ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων (βλέπε II.1.3.3.A1.α. Εκκαθαριστές υποδοχείς, CD36). Σε υπερλιπιδαιμικά ApoE^{-/-} ποντίκια η σύνδεση oxLDL στον CD36 οδήγησε σε αυξημένη ικανότητα συσσώρευσης των αιμοπεταλίων και αυξημένη έκφραση δεικτών ενεργοποίησης όπως η P-σελεκτίνη και η ενεργοποιημένη μορφή του υποδοχέα του ινωδογόνου, ιντεγκρίνη α_{IIb}β₃ [153]. Το φαινόμενο αυτό συσχετιζόταν με υψηλά επίπεδα της ομάδας μορίων οξειδωμένης φωσφατιδυλοχολίνης που αποτελούν ισχυρούς συνδέτες του CD36. Η ενεργοποίηση του CD36 από μόρια oxPC που αποτελούν ισχυρούς συνδέτες του, όπως μόρια oxPAPC και oxPLPC πιθανότατα αποτελεί μηχανισμό ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων. Όμως εργασίες που να το αποδεικνύουν άμεσα με επίδραση τέτοιων μορίων σε αιμοπετάλια προς το παρόν δεν υπάρχουν. Επίσης ένας άλλος τρόπος πρόκλησης υπερπηκτικότητας αποτελεί η αναστολή που προκαλούν οξειδωμένα φωσφολιπίδια στον αναστολέα του ιστικού παράγοντα (tissue factor pathway inhibitor, TFPI) μέσω άμεσης σύνδεσής τους σε αυτόν [422]. Προϊόντα οξείδωσης φωσφατιδυλοχολίνης με αλυσίδα ελαϊκού οξέος στην sn-1 ή/και στην sn-2 θέση αποδείχτηκαν οι ισχυρότεροι αναστολείς ενώ η oxPAPC επέδειξε ασθενή μόνο ανασταλτική δράση.

A1.ε) Επίδραση της oxPC στη φυσική και στην επίκτητη ανοσία

A1.ε.1) Φυσική ανοσία

Εκτός από τις επιδράσεις που αναφέρθηκαν ήδη σχετικά με τα μακροφάγα, στοιχεία υπάρχουν και από κάποιες μελέτες σε δενδριτικά κύτταρα, ένα παραπλήσιο προς τα μακροφάγα πληθυσμό που εκφράζεται αν και σε πολύ μικρότερο βαθμό στην αθηρωματική πλάκα παίζοντας ρόλο μεταξύ άλλων στην αντιγονοπαρουσίαση και τη διέγερση των T λεμφοκυττάρων. Επίδραση oxPAPC σε δενδριτικά κύτταρα βρέθηκε να επηρεάζει αρνητικά την αντιγονοπαρουσιαστική τους ικανότητα και την ικανότητά τους να διεγείρουν τον πολλαπλασιασμό των T λεμφοκυττάρων [390, 425].

A1.ε.2) Επίκτητη ανοσία

Όπως αναφέρθηκε στο ρόλο της χυμικής ανοσίας στην αθηροσκλήρυνση, έχει καταδειχθεί σε πλήθος εργασιών η παραγωγή αντισωμάτων εναντίον της oxLDL και πως ανάμεσα στους αντιγονικούς επιτόπους που οδηγούν στην αντισωματική αυτή απάντηση ανευρίσκονται επιτόποι που προκύπτουν από την οξείδωση μορίων φωσφατιδυλοχολίνης [50, 127, 264]. Από τα αντισώματα αυτά το πλέον μελετημένο είναι το EO6 το οποίο αναγνωρίζει την oxPAPC και το POVC [328, 329, 335, 424]. Αντισώματα έναντι οξειδωμένης φωσφατιδυλοχολίνης πιθανότατα δρουν αθηροπροστατευτικά αναστέλλοντας την αναγνώριση της oxLDL από υποδοχείς των μακροφάγων και των ενδοθηλιακών κυττάρων καθώς βρέθηκαν να εμποδίζουν το σχηματισμό αφρωδών κυττάρων και να εξασκούν αντιφλεγμονώδεις δράσεις [266, 267]. Επίσης, ο τίτλος των αντισωμάτων έναντι φωσφατιδυλοχολίνης βρέθηκε να έχει αντιστρόφως ανάλογη σχέση με την επίπτωση εμφράγματος του μυοκαρδίου και αγγειακού εγκεφαλικού επεισοδίου [268, 269].

Αντίθετα με το πλήθος των στοιχείων σχετικά με τη χυμική ανοσία, λίγα είναι γνωστά σχετικά με πιθανές επιδράσεις της oxPC στα T λεμφοκύτταρα. Ιδιαίτερα ενδιαφέροντα είναι πάντως τα ευρήματα εργασίας στην οποία η oxPAPC μεταξύ άλλων οξειδωμένων φωσφολιπιδίων προκάλεσε βαθμό ανεργίας σε ανθρώπινα T λεμφοκύτταρα με μείωση του πολλαπλασιασμού τους και μείωση της παραγωγής IFN γ και IL-2 [423]

A2) Λυσοφωσφατιδυλοχολίνη και αθηροσκλήρυνση

Η lysoPC βρίσκεται σε μικρή ποσότητα στη φυσική, μη οξειδωμένη LDL ενώ κατά τη διάρκεια της οξείδωσης της LDL η περιεκτικότητα της oxLDL αυξάνει δραματικά καθώς σημαντική ποσότητα της oxPC υδρολύεται σε lysoPC από την Lp-PLA₂ (II.2.3.2. Οξειδωμένη LDL). Το ποσοστό της oxPC που υδρολύεται φθάνει έως και το 50% αναλόγως με το βαθμό της οξείδωσης. Η lysoPC είναι επομένως ένα σημαντικό συστατικό της oxLDL. Η lysoPC εμπλέκεται με πολλούς τρόπους στην παθογένεση της φλεγμονής και της αθηροσκλήρυνσης [428-430]. Η lysoPC και γενικότερα τα lyso-λιπίδια σε μεγάλες ποσότητες ασκούν τοξική δράση στα κύτταρα, διότι παρεμβάλλονται στις κυτταρικές μεμβράνες και τις καταστρέφουν – τις λύνουν, εξ ου και το όνομά τους. Πέραν αυτής της γνωστής δράσης της, η lysoPC παρουσιάζει και πλήθος άλλων επιδράσεων στα κύτταρα. Στη συνέχεια θα εκτεθούν οι σημαντικότερες επιδράσεις της lysoPC που επάγουν τη φλεγμονή και την αθηρογένεση, συνοπτική παρουσίαση των οποίων δίδεται στον **Πίνακα II.4**.

Πίνακας Π.4. Κύριες επιδράσεις της λυσοφωσφατιδυλοχολίνης στην ανάπτυξη της αθηροσκλήρυνσης

Ενδοθηλιακά κύτταρα

αύξηση παραγωγής ROS, επαγωγή της NADPH [431-434]
ανασταλτική επίδραση στην εξαρτώμενη από το ενδοθήλιο αγγειοδιαστολή [433, 435-439]
- κυρίως με μόρια lysoPC με μακρές αλυσίδες ατόμων άνθρακα ($C \geq 16$)
όπως 1-palmitoyl-lysoPC, 1-steatoyl-lysoPC και η 1-oleoyl-lysoPC [435]
επίδραση στην έκφραση της eNOS: μείωση [433, 440], αύξηση [441]
αύξηση της έκφρασης των μορίων προσκόλλησης VCAM-1 και ICAM-1 [442-445], και P-σελεκτίνης [446]
ενεργοποίηση του μορίου προσκόλλησης PECAM-1 [447]
αύξηση της διαπερατότητας του ενδοθηλίου [448]
παραγωγή MMP2 [431]
επαγωγή απόπτωσης [449, 450]
αύξηση της έκφρασης των γονιδίων των αυξητικών παραγόντων PDGF και HB-EGF [451, 452]
αύξηση της έκφρασης των γονιδίων του PAI-1, του TPA και της θρομβομοδουλίνης [452]

Μακροφάγα

αύξηση παραγωγής ROS (1-linoleoyl-lysoPC) [95, 453]
αύξηση έκφρασης EC-SOD [454]
παραγωγή προφλεγμονωδών κυτταροκινών: IL-1 β (1-palmitoyl-lysoPC) [375]
(1-linoleoyl-lysoPC) [453]
(κυρίως μόρια με κεκορεσμένη αλυσίδα 18 ατόμων) [455]
IL-6 (1-palmitoyl-lysoPC) [375]
IL-8 [456]
TNF α (1-palmitoyl-lysoPC) [375]

χημειοταξία προς τα μονοκύτταρα

επαγωγή παραγωγής χημειοκινών MCP-1 και CCL5 (1-linoleoyl-lysoPC) [453]
άμεση χημειοταξία (1-palmitoyl-lysoPC) [445, 457]
διαφοροποίηση μονοκυττάρων προς μακροφάγα [458]
επαγωγή πολλαπλασιασμού [237-239]
κυτταροτοξική δράση (1-linoleoyl-lysoPC) [453]
αύξηση παραγωγής αυξητικών παραγόντων: GM-CSF [137], HB-EGF [459], VEGF [460]

Λεία μυϊκά κύτταρα

επαγωγή της παραγωγής της χημειοκίνης MCP-1 [461]
επαγωγή πολλαπλασιασμού (ισχυρότερη επίδραση της 1-palmitoyl-lysoPC) [462]
συνεργική δράση στην επαγωγή πολλαπλασιασμού
από ROS, θρομβοξάνη A2, αγγειοτασίνη II, ενδοθελίνη 1 [463, 464]
επαγωγή μετανάστευσης [465, 466]
παραγωγή του αυξητικού παράγοντα bFGF (1-palmitoyl-lysoPC) [466]
κυτταροτοξική δράση [467, 468]
επαγωγή απόπτωσης [468]

Αιμοπετάλια

αύξηση έκφρασης P-σελεκτίνης [446]

T λεμφοκύτταρα

εξάσκηση χημειοταξίας και αύξηση της έκφρασης των υποδοχέων χημειοκινών CXCR4 και CCR5 [469, 470]

Επίδραση της εξάλειψης του υποδοχέα G2A

μείωση ανάπτυξης αθηρωμάτωσης σε G2A^{-/-} LDLR^{-/-} ποντίκια [471]

A2.α) Επίδραση της lysoPC στα ενδοθηλιακά κύτταρα

Η επίδραση της lysoPC σε ενδοθηλιακά κύτταρα επάγει το οξειδωτικό stress. Η lysoPC αύξησε την παραγωγή SO σε καλλιέργεια BAEC αυξάνοντας τη δραστικότητα της NADPH οξειδάσης μέσω μιας εξαρτώμενης από τυροσινική κινάση οδού [431, 434]. Σε μία από αυτές τις εργασίες η αύξηση παραγωγής SO συνοδεύτηκε από αύξηση της MPP-2, η οποία είναι ένα σημαντικό μέλος της ομάδας των μεταλλοπρωτεϊνών οι οποίες έχουν σημαντικό ρόλο στην αναδόμηση του αγγειακού τοιχώματος (vascular remodeling) και στην αστάθεια της αθηρωματικής πλάκας [431]. Ομοίως, επίδραση της lysoPC σε καλλιέργεια HUVEC αύξησε τη παραγωγή SO μέσω της NADPH οξειδάσης [432].

Η εξαρτώμενη από το ενδοθήλιο αγγειοδιαστολή, η οποία εξαρτάται από το οξειδωτικό stress και το NO, επηρεάζεται αρνητικά από την επίδραση της lysoPC. Η lysoPC έδρασε ανασταλτικά σε σημαντικό βαθμό στην εξαρτώμενη από το ενδοθήλιο αγγειοδιαστολή σε δακτυλίους αορτής από αρουραίους και κουνέλια [435, 439, 472]. Σε μία από αυτές της εργασίες εξετάστηκε το είδος της lysoPC και η ανασταλτική επίδραση στην εξαρτώμενη από το ενδοθήλιο αγγειοδιαστολή, και παρατηρήθηκε ότι εμπλέκονται κυρίως μόρια lysoPC με μακρές αλυσίδες ατόμων άνθρακα ($C \geq 16$) όπως η 1-παλμιτόϋλο-λυσσο-sn-γλυκερο-3-φωσφοχολίνη (1-palmitoyl-lysoPC), η 1-στεαρόϋλο-λυσσο-sn-γλυκερο-3-φωσφοχολίνη (1-stearoyl-lysoPC) και η 1-ελαϊκόϋλο-λυσσο-sn-γλυκερο-3-φωσφοχολίνη (1-oleoyl-lysoPC) [435]. Η μείωση της εξαρτώμενης από το ενδοθήλιο αγγειοδιαστολής από τη lysoPC επιβεβαιώθηκε και σε μοντέλο μεσεντέριας αρτηρίας αρουραίου [438]. Σε συμφωνία με τα δεδομένα αυτά, η lysoPC ανέστειλε τη μεσολαβούμενη από το NO εξαρτώμενη από το ενδοθήλιο αγγειοδιαστολή σε στεφανιαίες αρτηρίες χοίρου και σε αορτή αρουραίου [436, 437]. Περαιτέρω, η lysoPC βρέθηκε να μειώνει τη μεταγραφή της eNOS και να αυξάνει την παραγωγή SO παράλληλα με μείωση της εξαρτώμενης από το ενδοθήλιο αγγειοδιαστολής σε στεφανιαίες αρτηρίες χοίρου [433]. Σε άλλη εργασία η lysoPC επίσης μείωσε αλλά σε μικρότερο βαθμό την εξαρτώμενη από το ενδοθήλιο αγγειοδιαστολή σε δακτυλίους αορτής από αρουραίους, ενώ δεν βρέθηκε να επηρεάζει την NOS [440]. Από την άλλη πλευρά, η lysoPC βρέθηκε να αυξάνει σε HUVEC τη μεταγραφή της eNOS [441].

Η lysoPC επάγει την παραγωγή μορίων προσκόλλησης από τα ενδοθηλιακά κύτταρα. Η lysoPC αύξησε τη μεταγραφή και την έκφραση στην επιφάνεια των κυττάρων των μορίων προσκόλλησης VCAM-1 και ICAM-1 σε καλλιέργειες ενδοθηλιακών κυττάρων ανθρώπου και κουνελιού [442-445]. Η αύξηση της παραγωγής VCAM-1 και ICAM-1 συνοδεύτηκε από αύξηση της προσκόλλησης μονοκυττάρων κυτταρικών σειρών THP-1 και U937 [444].

Σε όλες τις καλλιέργειες ενδοθηλιακών κυττάρων που εξετάστηκαν, η επίδραση της lysoPC στην παραγωγή E-selectin ήταν αμελητέα [444]. Η lysoPC βρέθηκε να επάγει την έκφραση P σελεκτίνης σε αιμοπετάλια και ενδοθηλιακά κύτταρα, επίδραση η οποία αναστελλόταν από αναστολείς της PKC και περιοριζόταν από δότες NO, καθώς και την προσκόλληση πολυμορφοπύρηνων στο ενδοθήλιο αορτικών δακτυλίων γάτας [446]. Σε καλλιέργεια BAEC η επώαση με lysoPC προκάλεσε μεγάλη αύξηση της ενεργοποίησης του μορίου προσκόλλησης 1 αιμοπεταλίων ενδοθηλιακών κυττάρων (platelet endothelial cell adhesion molecule 1, PECAM-1) όπως αυτή εκτιμήθηκε από την αύξηση της φωσφορυλίωσης της τυροσίνης του μορίου αυτού [447].

Όσον αφορά στην επίδραση της lysoPC στον κυτταρικό θάνατο, υπάρχουν αναφορές ότι η lysoPC επάγει την απόπτωση των ενδοθηλιακών κυττάρων. Στην πρώτη από αυτές, βρέθηκε χρονοεξαρτώμενη και δοσοεξαρτώμενη επαγωγή από τη lysoPC του εξαρτώμενου από την caspase-3 κυτταρικού θανάτου σε HUVEC, η οποία μεσολαβείτο από ενεργοποίηση της p38-MAP κινάσης [450]. Σε πιο πρόσφατη αναφορά, η lysoPC προκάλεσε επίσης επαγωγή του εξαρτώμενου από την caspase-3 κυτταρικού θανάτου σε HUVEC, η οποία συνοδευόταν από αύξηση της παραγωγής SO και μείωση της βιοδιαθεσιμότητας του NO και επιπλέον βρέθηκε ότι η αύξηση της παραγωγής SO οδηγούσε στην ενεργοποίηση της caspase-3 [449]. Εκτός από τα δεδομένα σχετικά με την ενδοθηλιακή δυσλειτουργία και την απόπτωση, μία ακόμη εργασία δίνει δεδομένα σχετικά με το ρόλο της lysoPC στη βλάβη του ενδοθηλίου δεικνύοντας αύξηση της διαπερατότητας του ενδοθηλίου με μείωση μιας σειράς συνδετικών μορίων από τη lysoPC όπως εξετάστηκε σε καλλιέργεια ενδοθηλιακών κυττάρων ανθρώπινης στεφανιαίας αρτηρίας [448]. Η επίδραση αυτή εξασκείτο μέσω επαγωγής του οξειδωτικού stress και ακόλουθης ενεργοποίησης των κινασών p38-MAPK και JNK.

Αναφορές υπάρχουν και για την επίδραση της lysoPC στην παραγωγή αυξητικών παραγόντων από τα ενδοθηλιακά κύτταρα. Σε καλλιέργεια HUVEC, βρέθηκε να αυξάνει τη μεταγραφή του PDGF και του HBEGF, δύο ισχυρών αυξητικών παραγόντων για τα λεία μυϊκά κύτταρα και τους ινοβλάστες [451].

Επίδραση της lysoPC σε καλλιέργεια HUVEC ανέδειξε επίσης αύξηση της έκφρασης μίας σειράς γονιδίων που περιελάμβανε γονίδια συνδεόμενα με αυξητικούς παράγοντες με κυριότερο μεταξύ τους το γονίδιο του HBEGF, αλλά και γονίδια σχετιζόμενα με τη θρόμβωση, όπως του PAI-1, του ενεργοποιητή του ιστικού πλασμινογόνου (tissue plasminogen activator, TPA) και της θρομβομοδουλίνης [452].

A2.β) Επίδραση της lysoPC στα μονοκύτταρα/μακροφάγα

Η 1-λινελαϊκούλο-λυσσο-sn-γλυκερο-3-φωσφοχολίνη διεγείρει την παραγωγή ROS και είχε κυτταροτοξική δράση σε σειρά μακροφάγων ποντικού RAW 264.7 [453]. Η κυτταροτοξική δράση στα μακροφάγα ανεστάλη εν μέρει με την προσθήκη των αντιοξειδωτικών magnolol και trolox. Δεν παρατηρήθηκε ανάλογο αποτέλεσμα με τη χρήση άλλων μορίων lysoPC, όπως η 1-μυριστούλο, η 1-παλμιτούλο, η 1-στεαρούλο, η 1-ελαϊκούλο και η 1-αραχιδονυλούλο. Στην ίδια εργασία η 1-λινελαϊκούλο-λυσσο-sn-γλυκερο-3-φωσφοχολίνη προκάλεσε σε RAW 264.7 μακροφάγα μεγάλη αύξηση στην έκφραση προφλεγμονωδών κυτταροκινών όπως IL-1β και των χημειοκινών MCP-1 και CCL5. Επίσης αυξήθηκε η φωσφορυλίωση των ERK1/2, εύρημα που είναι συμβατό με προηγούμενες αναφορές διέγερσης των κινασών ERK1/2 και JNK από τη lysoPC σε ενδοθηλιακά κύτταρα [473, 474]. Παρομοίως, σε άλλη εργασία η επώαση lysoPC με καλλιέργεια ανθρώπινων μονοκυττάρων οδήγησε σε μεγάλη παραγωγή IL-1β [455]. Η διέγερση αυτή της παραγωγής IL-1β διαφοροποιείται από το μήκος της αλυσίδας στη sn-1 θέση. Μόρια lysoPC με αλυσίδα μικρότερη από 16 άτομα άνθρακα δεν προκάλεσαν αυξήσεις, ενώ αυτές παρατηρήθηκαν κυρίως με μόρια με αλυσίδα 18 ατόμων άνθρακα όπου επίσης υπήρχε διαφοροποίηση καθώς η κεκορεσμένη αλυσίδα προκάλεσε μεγαλύτερες αυξήσεις από τη μονοακόρεστη αλυσίδα. Από την άλλη πλευρά όσον αφορά στο οξειδωτικό stress, επώαση lysoPC με σειρά U937 ανθρώπινων μονοκυττάρων οδήγησε σε αύξηση έκφρασης της εξωκυττάριας δεσμουτάσης του υπεροξειδικού ανιόντος (extracellular-superoxide dismutase, EC-SOD) η οποία αποτελεί το σημαντικότερο εκκαθαριστή του SO στο αρτηριακό τοίχωμα και αποτελεί έναν σημαντικό αντιοξειδωτικό παράγοντα [454]. Αντιθέτως, η προκαλούμενη από oxLDL αύξηση της παραγωγής ROS στη σειρά μακροφάγων ποντικού RAW 264.7 αλλά και σε μακροφάγα προερχόμενα από ανθρώπινα μονοκύτταρα βρέθηκε να εξαρτάται από την κυτταροπλασματική PLA₂, στοιχείο που αποτελεί σαφή ένδειξη ότι λυσο παράγωγα ήταν αυτά που επήγαγαν την αύξηση του οξειδωτικού stress [95]. Επίσης η lysoPC βρέθηκε να αυξάνει την παραγωγή από ανθρώπινα μονοκύτταρα IL-8 η οποία αποτελεί ισχυρό χημειοτακτικό παράγοντα ιδιαίτερα για τα T λεμφοκύτταρα [456]. Επώαση oxLDL ή 1-palmitoyl lysoPC με καλλιέργεια μονοπυρήνων περιφερικού αίματος προκάλεσε δόσοεξαρτώμενη αύξηση των φλεγμονωδών κυτταροκινών IL-1β, IL-6, TNF-α [375]. Η προσθήκη αναστολέα της Lp-PLA₂ ανέστειλε την επίδραση αυτή της oxLDL, υποδεικνύοντας την παραγωγή lysoPC από την Lp-PLA₂, η οποία εκφράζεται σε αφθονία στα μονοκύτταρα/μακροφάγα, ως υπεύθυνη για την επίδραση της oxLDL. Αντίθετα, ως ένδειξη πιθανής αθηροπροστατευτικής δράσης της lysoPC μπορεί να θεωρηθεί η αύξηση της

εκροής χοληστερόλης που παρατηρήθηκε σε μακροφάγα ποντικού μετά από προσθήκη 1-παλμιτοϋλο-λυσο- sn-γλυκερο-3-φωσφοχολίνης καθώς και η αύξηση της ικανότητας της HDL με αυξημένη περιεκτικότητα σε lysoPC να παραλαμβάνει χοληστερόλη από μακροφάγα ποντικού μέσω των ABCs και του SRB1 [475, 476].

Η lysoPC έχει δειχθεί να ασκεί χημειοταξία και να επάγει την προσκόλληση και τη μετανάστευση των μακροφάγων, δηλαδή να δρα σε όλα τα στάδια που απαιτούνται για τη στρατολόγηση μακροφάγων στο αρτηριακό τοίχωμα. Συγκεκριμένα, η 1-παλμιτοϋλο-λυσο- sn-γλυκερο-3-φωσφοχολίνη και η lysoPC η οποία απομονώθηκε από LDL που επώαστηκε με PLA₂ επέδειξαν ισχυρή χημειοτακτική δράση σε ανθρώπινα μονοκύτταρα σε αντίθεση με την 1-παλμιτοϋλο-2-λινελαϊκούλο- sn-γλυκερο-3-φωσφοχολίνη (1-palmitoyl-2-linoleoyl-PC, PLPC) και την PC που απομονώθηκε LDL [474]. Σε αορτικά λεία μυϊκά κύτταρα αρουραίου η έκφραση της MCP-1, ενός ισχυρού παράγοντα χημειοταξίας των μονοκυττάρων, τριπλασιάστηκε από την επίδραση της lysoPC [461]. Επώαση της 1-παλμιτοϋλο-λυσο- sn-γλυκερο-3-φωσφοχολίνης με καλλιέργεια ανθρώπινων μονοκυττάρων από το περιφερικό αίμα ή με καλλιέργεια κυτταρικής σειράς THP-1 από ανθρώπινα λευχαιμικά μονοκύτταρα οδήγησε σε αύξηση της μετανάστευσης των κυττάρων ενώ κάτι τέτοιο δεν συνέβη σε επώαση με 1,2-διπαλμιτοϋλο- sn-γλυκερο-3-φωσφοχολίνη, και η επίδραση αυτή της lysoPC μεσολαβείτο από ενεργοποίηση της πρωτεϊνικής κινάσης D2 (protein kinase D2, PKD2) η οποία οδηγούσε σε ενεργοποίηση του συστατικών του συστήματος MAP κινασών ERK και p38MAPK [445]. Η lysoPC και η oxLDL, διπλασίασαν την προσκόλληση ανθρώπινων μονοκυττάρων σε καλλιέργεια ανθρώπινων ενδοθηλιακών κυττάρων και η επίδραση αυτή αναστάλη από τη σταυροσπορίνη, έναν αναστολέα της PKC, όπως και από αντίσωμα εναντίον του CD11b των μονοκυττάρων, η έκφραση του οποίου αυξήθηκε από τη lysoPC και την oxLDL, υποδεικνύοντας ότι η δράση αυτή της lysoPC μεσολαβείται από την PKC και από ενεργοποίηση του CD11b [458]. Στην ίδια εργασία επώαση των μονοκυττάρων με lysoPC ή oxLDL οδήγησε σε διαφοροποίηση προς μακροφάγα όπως κατεδείχθη από την αύξηση της έκφρασης του CD14. Όσον αφορά στην προσκόλληση των μονοκυττάρων στο ενδοθήλιο, αναφέρθηκε ήδη η ικανότητα της lysoPC να προκαλεί αύξηση της παραγωγής μορίων προσκόλλησης όπως των VCAM-1 και ICAM-1 σε καλλιέργειες ενδοθηλιακών κυττάρων [442, 443, 445].

Η lysoPC διεγείρει επίσης τη μιτωτική δραστηριότητα των μακροφάγων. Ενώ η acetyl-LDL είχε αμελητέα επίδραση στη μιτωτική δραστηριότητα σε καλλιέργεια περιτοναϊκών μακροφάγων ποντικού καθώς και σε καλλιέργεια μακροφάγων προερχόμενων από ανθρώπινα μονοκύτταρα, όταν η acetyl-LDL επώαστηκε με φωσφολιπάση A2 και το

μεγαλύτερο μέρος της PC μετατράπηκε σε lysoPC, διέγειρε τη μιτωτική δραστηριότητα σε μεγάλο βαθμό, ισοδύναμο αυτού της oxLDL, και το ίδιο συνέβη όταν acetyl-LDL στην οποία δεν είχε επιδράσει φωσφολιπάση A2 επώαστηκε μαζί με lysoPC με την καλλιέργεια των μακροφάγων [238, 239]. Σε άλλη εργασία επώαση acetyl-LDL με PLA₂ επίσης αύξησε τον πολλαπλασιασμό περιτοναϊκών μακροφάγων ποντικού, και επιπλέον βρέθηκε ότι η επίδραση αυτή εξαρτάτο από την ενεργοποίηση της PKC και αναστελλόταν από τον αναστολέα της PKC calphostin κατά 90% [237]. Στις εργασίες αυτές είναι αξιοσημείωτο ότι ενώ η acetyl-LDL που επώαστηκε με PLA₂ οδηγούσε σε σημαντική αύξηση της μιτωτικής δραστηριότητας αυτό δεν συνέβη σε επώαση μόνο με lysoPC. Η ενσωμάτωση της lysoPC στα κύτταρα ήταν ανάλογη της αυξητικής επίδρασης, υποδεικνύοντας ότι η είσοδος της lysoPC στα κύτταρα μέσω υποδοχέων με φορέα τροποποιημένη LDL είναι αυτή που οδηγεί στην εκδήλωση της επίδρασης στην αύξηση των μακροφάγων. Σε άλλη εργασία, παρόμοια διαδικασία επώασης acetyl-LDL με φωσφολιπάση A2 αύξησε μεν αλλά σε μικρότερο βαθμό τη μιτωτική επίδραση σε καλλιέργεια περιτοναϊκών μακροφάγων ποντικού προκαλώντας μιτωτική δραστηριότητα 7-10 φορές μικρότερη από αυτή της oxLDL [477]. Στην εργασία αυτή η μιτωτική επίδραση της oxLDL αποδόθηκε κυρίως σε επίδραση της τροποποιημένης από οξειδωμένα λιπίδια ApoB της oxLDL.

Η επίδραση της lysoPC στα μακροφάγα τροποποιεί και την παραγωγή από αυτά αυξητικών παραγόντων. Επώαση περιτοναϊκών μακροφάγων ποντικού με acetyl-LDL, της οποίας η περιεκτικότητα σε lysoPC είχε αυξηθεί μετά από επώαση με φωσφολιπάση A2 οδήγησε σε αύξηση της μεταγραφής του GM-CSF [137]. Όπως και ανωτέρω αναφέρθηκε, ούτε η μη επωασμένη με φωσφολιπάση A2 acetyl-LDL αλλά ούτε και η lysoPC μόνη της είχαν το ίδιο αποτέλεσμα ενώ η επίδραση αυτή αναστελλόταν από τον αναστολέα της PKC calphostin. Η παραγωγή του αυξητικού παράγοντα HBEGF, ενός αυξητικού παράγοντα για τα λεία μυϊκά κύτταρα, αυξήθηκε σε ανθρώπινα μονοκύτταρα από τη lysoPC [459]. Σε κυτταρική σειρά μακροφάγων RAW 264 η lysoPC αύξησε την παραγωγή VEGF, ενός ισχυρού αυξητικού παράγοντα για τα ενδοθηλιακά κύτταρα ο οποίος παράγεται στις θέσεις αθηρωματικών βλαβών και συμβάλλει στην ανάπτυξη νεοαγγείωσης η οποία οδηγεί στο σχηματισμό ασταθούς πλάκας [460].

A2.γ) Επίδραση της lysoPC στα λεία μυϊκά κύτταρα

Τα δεδομένα σχετικά με την επίδραση της lysoPC στα λεία μυϊκά κύτταρα αφορούν στην κυτταρική αύξηση, στην κυτταροτοξική δράση και στην απόπτωση. Η lysoPC βρέθηκε να δρα συνεργικά με σειρά αγγειοδραστικών παραγόντων, όπως το υπεροξείδιο του

υδρογόνου, τη θρομβοξάνη A₂, την αγγειοτασίνη II και την ενδοθηλίνη 1 στην επαγωγή του πολλαπλασιασμού λείων μυϊκών κυττάρων αορτής κουνελιού [463, 464]. Η επαγωγή οξειδωτικών μηχανισμών, η PKC και οδοί που περιελάμβαναν MAP κινάσες βρέθηκε να εμπλέκονται στην επίδραση αυτή [464]. Η επίδραση στον πολλαπλασιασμό λείων μυϊκών κυττάρων είτε ανθρώπινων είτε από κουνέλι βρέθηκε να εξαρτάται από το είδος της lysoPC [463]. Η 1-palmitoyl lysoPC είχε ισχυρότερη επίδραση από την 1-oleoyl και την 1-linoleoyl lysoPC, ενώ αξιοσημείωτο είναι πως άλλα λυσοφωσφολιπίδια όπως η λυσοφωσφατιδυλοαιθανολαμίνη δεν αύξησαν τη σύνθεση DNA. Αναφέρθηκε ήδη ανωτέρω η αύξηση της παραγωγής από τα ενδοθηλιακά κύτταρα και τα μονοκύτταρα/μακροφάγα αυξητικών παραγόντων που επιδρούν στα λεία μυϊκά κύτταρα, όπως του PDGF και του HBEGF [451, 459]. Επιπλέον, η 1-παλμιτούλο-λυσο- sn-γλυκερο-3-φωσφοχολίνη όπως και η LDL η οποία είχε επωαστεί με PLA₂ διέγειραν την παραγωγή bFGF σε καλλιέργεια λείων μυϊκών κυττάρων αορτής κουνελιού μέσω ενεργοποίησης της PKC και πιθανώς με συμμετοχή οξειδωτικών μηχανισμών [466]. Από την άλλη πλευρά υπάρχουν δεδομένα ότι η lysoPC έχει κυτταροτοξική δράση και επάγει την απόπτωση σε αγγειακά λεία μυϊκά κύτταρα [467, 468]. Τέλος υπάρχει μία αναφορά επαγωγής της μετανάστευσης σε αγγειακά λεία μυϊκά κύτταρα [465].

A2.δ) Υποδοχείς της lysoPC – πρόσληψη της lysoPC

Η lysoPC συνδέεται με υποδοχείς της ομάδας των συνδεόμενων με G πρωτεΐνη υποδοχέων (G protein coupled receptors) [430]. Συγκεκριμένα, συνδέεται με τους GPR4, G2A και GPR119 [478, 479]. Δεδομένα σχετικά με τον πιθανό ρόλο της σύνδεσης με τους υποδοχείς αυτούς υπάρχουν για τον G2A. Ο G2A είναι ένας υποδοχέας υψηλής συγγένειας για τη lysoPC, εκφράζεται κυρίως σε λεμφοκύτταρα και σε μακροφάγα ενώ έχει ασθενή έκφραση στα ενδοθηλιακά και στα λεία μυϊκά κύτταρα [470, 480, 481]. Στα T λεμφοκύτταρα βρέθηκε να αυξάνει τη χημειοταξία [470]. Όσον αφορά στα μακροφάγα, βρέθηκε να εκφράζεται σε μακροφάγα προερχόμενα από ανθρώπινα μονοκύτταρα καθώς και σε μακροφάγα ποντικού και κουνελιού [480]. Επίσης βρέθηκε σε αφθονία, εκφραζόμενος κυρίως από μακροφάγα, σε αθηροσκληρυντικές πλάκες σε ανθρώπινες στεφανιαίες αρτηρίες όπως επίσης και σε αθηροσκληρυντικές βλάβες σε αορτή από ApoE^{-/-} ποντίκια και από κουνέλια Watanaba με κληρονομική υπερλιπιδαιμία [480]. Σε G2A^{-/-}/LDLR^{-/-} ποντίκια η ανάπτυξη αθηροσκλήρυνσης στην αορτή μειώθηκε σημαντικά σε σύγκριση με τα G2A^{+/+}/LDLR^{-/-} ποντίκια [471].

Η ανακάλυψη των υποδοχέων αυτών και ειδικότερα του G2A θα μπορούσε να ερμηνεύσει πολλές από τις δράσεις της lysoPC και της oxLDL ως την κατάληξη σηματοδοτικών οδών που ξεκινούν από τους υποδοχείς αυτούς. Δεν υπάρχουν προς το παρόν εργασίες όσον αφορά στην πρόσληψη της oxLDL από τα κύτταρα μέσω αναγνώρισης από τον G2A υποδοχέα της lysoPC η οποία είναι ενσωματωμένη στην oxLDL. Η είσοδος της lysoPC στα κύτταρα γίνεται βεβαίως με την είσοδο της oxLDL σε αυτά. Όπως αναφέρθηκε ανωτέρω στην επίδραση της lysoPC στα μακροφάγα, η είσοδος lysoPC στα κύτταρα μέσω acetyl LDL εμπλουτισμένης σε lysoPC μετά από επώαση με φωσφολιπάση A2, είχε επαγωγική δράση στη μιτωτική δραστηριότητα και στην παραγωγή αυξητικών παραγόντων, όμως επώαση μόνο με lysoPC δεν είχε το ίδιο αποτέλεσμα [238, 239, 477]. Τα δεδομένα αυτά υποδεικνύουν ότι η είσοδος στα κύτταρα της lysoPC μέσω υποδοχέων με φορέα τροποποιημένη LDL χωρίς τη σύνδεση της lysoPC με κάποιο υποδοχέα, είναι ικανή να οδηγήσει στην εκδήλωση της επίδρασης στην αύξηση των μακροφάγων. Πρέπει να σημειωθεί σχετικά ότι υπάρχουν δεδομένα που υποστηρίζουν την ενδοκυττάρια σύνδεση του G2A με τη lysoPC [482].

A2.ε) Επίδραση της lysoPC στην ανοσία

Η lysoPC δρώντας μέσω του υποδοχέα G2A ασκεί χημειοτακτική δράση στα μακροφάγα και επίσης επάγει την κάθαρση αποπτωτικών κυττάρων [483, 484]. Ομοίως, βρέθηκε να επιδρά στα T λεμφοκύτταρα και να ασκεί χημειοτακτική δράση μέσω του G2A [470, 485]. Όμως σε G2A^{-/-}/LDLR^{-/-} ποντίκια στα οποία η ανάπτυξη αθηροσκλήρυνσης στην αορτή μειώθηκε σημαντικά, η συγκέντρωση των T λεμφοκυττάρων στις αθηρωματικές βλάβες δεν διέφερε από αυτή στα G2A^{+/+} LDL^{-/-} ποντίκια [471]. Επίδραση της lysoPC στην κυτταρική σειρά CD4 T λεμφοκυττάρων Jurkat οδήγησε σε αύξηση της έκφρασης των υποδοχέων χημειοκινών CXCR4 και CCR5, του εκκαθαριστή υποδοχέα LOX-1 και του μεταγραφικού παράγοντα NF-κB και μορίων στόχων του NF-κB [469]. Έχουν περιγραφεί επίσης επιδράσεις της lysoPC στο ανοσολογικό σύστημα μέσω του G2A στα πλαίσια μελέτης της αυτοανοσίας, η συσχέτιση των οποίων με την παθογένεση της αθηροσκλήρυνσης είναι άγνωστη [486].

A3) Οξειδωμένα μη εστεροποιημένα λιπαρά οξέα και αθηροσκλήρυνση

Από την υδρόλυση μορίων οξειδωμένης φωσφατιδυλοχολίνης από την Lp-PLA₂ προκύπτουν εκτός από την lysoPC και μικρού μοριακού βάρους προϊόντα που αποτελούν τα κατάλοιπα των οξειδωμένων λιπαρών αλυσίδων στην sn-2 θέση που αποκόπτονται από το

γλυκερινικό σκελετό από την Lp-PLA₂. Δεν υπάρχουν προς το παρόν εργασίες οι οποίες να έχουν απομονώσει και εξετάσει τη βιολογική δράση των προϊόντων. Η δράση τους παραλληλίζεται από πολλούς με τη δράση οξειδωμένων μη εστεροποιημένων λιπαρών οξέων (oxidized non esterified fatty acids, oxNEFA) και σε αυτή τη βάση υπάρχουν σχετικές αναφορές σε διάφορες ανασκοπήσεις σχετικά με τη βιολογική δράση της Lp-PLA₂ αλλά η ομοιότητα της χημικής δομής των μορίων αυτών με τα μικρού μοριακού βάρους προϊόντα της υδρόλυσης δεν έχει προς το παρόν αποδειχθεί.

Παράγωγα οξείδωσης ακόρεστων λιπαρών οξέων, όπως του λινελαϊκού και του αραχιδονικού ανιχνεύονται σε ανθρώπινες αθηρωματικές πλάκες [487]. Σε εκτίμηση της χημειοτακτικής επίδρασης της oxLDL οξειδωμένης με επώαση με CuSO₄, σε ανθρώπινα μονοκύτταρα, το μεγαλύτερο μέρος της χημειοτακτικής δράσης βρέθηκε να οφείλεται στο κλάσμα των NEFA [488]. Αναστολή της Lp-PLA₂ πριν από την οξείδωση προκάλεσε πλήρη αναστολή της χημειοτακτικής επίδρασης του κλάσματος των NEFA, γεγονός που στηρίζει το συμπέρασμα πως μικρού μοριακού βάρους προϊόντα της υδρόλυσης ασκούν ισχυρή χημειοτακτική δράση προς τα μονοκύτταρα. Σε άλλη εργασία, η κυτταροτοξική δράση της oxLDL οξειδωμένης με επώαση με CuSO₄ μειώθηκε κατά το ένα τρίτο όταν προηγήθηκε αναστολή της Lp-PLA₂ πριν από την οξείδωση και η μείωση αυτή αποδόθηκε εν μέρει στην αναστολή της παραγωγής των μικρού μοριακού βάρους προϊόντων της υδρόλυσης [489]. Ενδιαφέρον είναι το εύρημα ότι μία σειρά παραγώγων της οξείδωσης του λινελαϊκού και του αραχιδονικού οξέος αποτελούν συνδέτες του υποδοχέα G2A και οδηγούν σε ενεργοποίησή του με εκκίνηση ενδοκυττάριας σηματοδότησης που περιλαμβάνει την ενεργοποίηση κινασών της ομάδας των MAPK όπως η JNK [490].

A4) Επίδραση της δραστηριότητας της Lp-PLA₂ στην πρόσληψη oxLDL

Η επίδραση της δραστηριότητας της Lp-PLA₂ στην πρόσληψη oxLDL από τα μακροφάγα έχει μελετηθεί είτε με αναστολή της δραστηριότητας Lp-PLA₂ πριν την οξείδωση της LDL, είτε με επίδραση εξωγενώς χορηγούμενης Lp-PLA₂ σε oxLDL, είτε με χρησιμοποίηση LDL με αυξημένη περιεκτικότητα σε Lp-PLA₂, η οποία είχε ληφθεί από πειραματόζωα με υπερέκφραση της Lp-PLA₂, η οποία επετεύχθη με μεταφορά του γονιδίου της με αδενοϊό. Ως αναστολείς έχουν χρησιμοποιηθεί ο αναστολέας εστεράσης της σερίνης δι-ισοπροπυλοφθορο-φωσφορικό οξύ (diisopropyl fluorophosphates, DFP) και ο νεότερος αναστολέας εστεράσης της σερίνης 4-(2-αμινοαιθυλο)βενζοσουλφόνυλο φθορίδιο (4-(2-Aminoethyl) benzenesulfonyl fluoride, AEBSF, pefabloc).

Σε μελέτη σε καλλιέργεια μακροφάγων προερχόμενων από ανθρώπινα μονοκύτταρα εξετάστηκε η επίδραση της δραστικότητας της Lp-PLA₂ στην πρόσληψη oxLDL σημασμένης με το λιπόφιλο φθορίζον μόριο Dil και οξειδωμένης με επώαση με 5μM CuSO₄ για 20h (Dil-oxLDL) [491]. Αναστολή της δραστικότητας της Lp-PLA₂ με επώαση με refabloc πριν την οξείδωση οδήγησε σε αύξηση της πρόσληψης της oxLDL κατά 43%, όπως προσδιορίστηκε με μέτρηση του φθορισμού στο πέρας της επώασης. Παρομοίως, η αναστολή της δραστικότητας της Lp-PLA₂ με επώαση με refabloc πριν την οξείδωση οδήγησε σε αύξηση της πρόσληψης της oxLDL κατά 51% σε καλλιέργεια ηπατοκυττάρων (κυτταρική σειρά HepG2). Αντιθέτως, η προσθήκη ανασυνδυασμένης Lp-PLA₂ κατά την επώαση των κυττάρων με Dil-oxLDL ή Dil-oxLp(a) στις οποίες η ενδογενής Lp-PLA₂ είχε ανασταλεί με refabloc, μείωσε την πρόσληψη της oxLDL και της oxLp(a) από τα μακροφάγα και τα ηπατοκύτταρα κατά 30 – 40%. Η αύξηση της πρόσληψης συμβάδιζε με αύξηση της περιεκτικότητας σε χοληστερόλη στα μακροφάγα κατά 29%.

Σε άλλη μελέτη εξετάστηκε η επίδραση της δραστικότητας της Lp-PLA₂ στην πρόσληψη της oxLDL από μακροφάγα με τη χρησιμοποίηση LDL εμπλουτισμένης με Lp-PLA₂ [492]. Έγχυση αδενοϊού που μετέφερε το γονίδιο της ανθρώπινης Lp-PLA₂ σε κουνέλια οδήγησε σε τριπλασιασμό της δραστικότητας της Lp-PLA₂ της LDL. Σημασμένη με ¹²⁵I LDL οξειδώθηκε με επώαση με 20μM CuSO₄ για 18h, και η πρόσληψή της σε καλλιέργεια κυτταρικής σειράς RAW 264 μακροφάγων εκτιμήθηκε με προσδιορισμό της αποικοδόμησης ¹²⁵I-LDL (μέτρηση του ελεύθερου πρωτεΐνης ¹²⁵I). Η αύξηση της περιεκτικότητας σε Lp-PLA₂ οδήγησε σε μείωση της αποικοδόμησης της oxLDL κατά 60 – 80% συγκριτικά με την αποικοδόμηση oxLDL προερχόμενης από πειραματόζωα τα οποία είχαν λάβει αδενοϊό που δεν μετέφερε το γονίδιο της Lp-PLA₂ και όπου δεν παρατηρήθηκε μεταβολή στην περιεκτικότητα της LDL σε Lp-PLA₂. Αναστολή της Lp-PLA₂ με refabloc πριν την οξείδωση οδήγησε σε πρόσληψη η οποία ήταν διπλάσια της πρόσληψης της oxLDL από την ομάδα ελέγχου η οποία διατηρούσε τη φυσιολογική δραστικότητα Lp-PLA₂ στην LDL. Επιπλέον, η ενδοκυττάρια συσσώρευση λιπιδίων και ο σχηματισμός αφρωδών κυττάρων μειώθηκε σε μεγάλο βαθμό με τη χρησιμοποίηση oxLDL που προήλθε από την οξείδωση LDL εμπλουτισμένης με Lp-PLA₂ συγκριτικά με τη χρησιμοποίηση oxLDL από την οξείδωση LDL με φυσιολογική δραστικότητα Lp-PLA₂, ενώ αυξήθηκε περαιτέρω με αναστολή της δραστικότητας της Lp-PLA₂ με refabloc πριν από την οξείδωση.

Η επίδραση της δραστικότητας της Lp-PLA₂ στην πρόσληψη της oxLDL εξετάζεται και σε μία παλαιότερη εργασία όπου η Lp-PLA₂ ανεστάλη με επώαση με DFP πριν από την οξείδωσή της με 5μM CuSO₄ για 20h [104]. Η αποικοδόμηση ¹²⁵I-oxLDL από περιτοναϊκά

μακροφάγα ποντικού εμφανίστηκε αυξημένη μετά από αναστολή της Lp-PLA₂, όμως το αποτέλεσμα είναι δύσκολο να αξιολογηθεί καθώς αύξηση προκαλείτο και στην πρόσληψη μη οξειδωμένης LDL όταν αυτή επωαζόταν με DFP, δεικνύοντας ότι το DFP επιδρά στην πρόσληψη με άλλους ή/και με άλλους τρόπους πέραν της αναστολής της υδρόλυσης της oxPC, πιθανότατα τροποποιώντας με άμεση σύνδεσή του το πρωτεϊνικό τμήμα της LDL και μεταβάλλοντας με τον τρόπο αυτό τη σύνδεσή του με τους υποδοχείς.

Συμπερασματικά, τα παραπάνω αποτελέσματα υποστηρίζουν ότι η υδρόλυση της oxPC από την Lp-PLA₂ κατά τη διάρκεια της οξείδωσης δρα ανασταλτικά στην πρόσληψη της oxLDL από τα μακροφάγα και στην επακόλουθη μετατροπή τους σε αφρώδη κύτταρα.

B) Ρόλος του PAF, αναλόγων του PAF και του υποδοχέα του PAF στην αθηροσκλήρυνση

Ο υποδοχέας του PAF εκφράζεται σε πλήθος κυττάρων, μεταξύ των οποίων στα αιμοπετάλια, στα ουδετερόφιλα, στα μονοκύτταρα και στα λεία μυϊκά κύτταρα [493, 494]. Συνδέτες του υποδοχέα του PAF εκτός από τον PAF αποτελούν και μόρια είτε sn-1 αλκυλ- (λιπαρό οξύ ενωμένο με αιθερικό δεσμό όπως και ο PAF) είτε sn-1 ακυλ- (λιπαρό οξύ ενωμένο με εστερικό δεσμό) oxPC, τα οποία και καλούνται συχνά στη βιβλιογραφία ανάλογα ή μόρια παρόμοιας δομής του PAF (PAF-like) είτε μόρια παρόμοιας του PAF δράσης (PAF-like activity) [264]. Κοινό χαρακτηριστικό των μορίων αυτών είναι ο κατακερματισμός κατά την οξείδωση της ακόρεστης λιπαρής αλυσίδας στην sn-2 θέση με αποτέλεσμα την παραμονή βραχείας αλυσίδας ατόμων άνθρακα. Η παρουσία πάντως sn-1 αλκυλ λιπαρής ομάδας αυξάνει δραματικά τη συγγένεια του μορίου με τον υποδοχέα [493]. Τα λυσο παράγωγα που παράγονται από την υδρόλυση του PAF και των παρόμοιων του PAF μορίων από την Lp-PLA₂ δεν συνδέονται στον υποδοχέα του PAF [416, 494]. Η παρουσία PAF και αναλόγων του PAF, τα οποία μπορούν όπως και ο PAF να προκαλέσουν ενεργοποίηση και συσσώρευση αιμοπεταλίων, έχει διαπιστωθεί σε αθηρωματικές πλάκες [354]. Η παρουσία του PAF οφείλεται στο σχηματισμό του στα πλαίσια μικροθρομβώσεων. Επίσης PAF και μόρια παρόμοιας δράσης του PAF παράγονται κατά την οξείδωση της LDL [325, 354, 385, 386]. Ανάλογα του PAF που έχει διαπιστωθεί ότι παράγονται κατά την οξείδωση της LDL είναι η 1-αλκυλ-2-βουτενόυλ- και η 1-αλκυλ-2-βουτανόυλ- φωσφατιδυλοχολίνη όσον αφορά στα sn-1 αλκυλ μόρια και η POVPC που προέρχεται από την οξείδωση της PAPC όσον αφορά στα sn-1 ακυλ μόρια [354, 385, 416, 495]. Ο PAF και τα ανάλογά του που παράγονται κατά το οξειδωτικό stress απαντώνται είτε στις oxLDL είτε

σε κύτταρα του αίματος και του ενδοθηλίου είτε απελευθερώνονται στην κυκλοφορία του αίματος [325, 496]. Μετά την παραγωγή τους προσδένονται στους υποδοχείς του PAF που υπάρχουν στα κύτταρα του αίματος και του ενδοθηλίου σηματοδοτώντας την πρόκληση φλεγμονής [496, 497]. Επίσης, πέραν των στοιχείων που αναφέρθηκαν ήδη για την ικανότητα σύνδεσης μορίων oxPC σε TLRs (II.1.3.3.A1β Υποδοχείς τύπου Toll), στοιχεία υπάρχουν και για ικανότητα σύνδεσης του PAF σε TLRs, υποδεικνύοντας άλλη μία οδό σύνδεσης του PAF και των αναλόγων του με την αθηρογένεση [498].

Στοιχεία σχετικά με τον PAF και την ανάπτυξη της αθηροσκλήρυνσης υπάρχουν κυρίως σχετικά με τα μακροφάγα και τα λεία μυϊκά κύτταρα. Σε καλλιέργεια μακροφάγων προερχόμενων από ανθρώπινα μονοκύτταρα, επώαση με PAF προκάλεσε αύξηση της μεταγραφής των γονιδίων των CCR2 και CX3CR1 που αποτελούν στα μονοκύτταρα τους υποδοχείς των χημειοκινών MCP-1 και CX3CL1 ή fractalkine αντίστοιχα [416]. Επιπλέον, ο PAF αύξησε τη μεταγραφή του υποδοχέα 1 της ATII, των κυτταροκινών IL-1α και β και TNFα. Σημαντική επίσης ήταν και η επαγωγή της μεταγραφής των COX-1 και -2 που παίζουν σημαντικό ρόλο στο μεταβολισμό του αραχιδονικού οξέος και στην παραγωγή προσταγλανδινών, θρομβοξάνης και λευκοτριενίων, και των λιποξυγενασών 5 και 12 που παίζουν ρόλο στην παραγωγή λευκοτριενίων, ενώ τέλος αύξησε τη μεταγραφή της MMP-13 αλλά και του ιστικού αναστολέα MMPs, TIMP-4. Σε κυτταρική σειρά μονοκυττάρων U-937 η επίδραση PAF αύξησε την έκκριση της IL-1β και την έκφραση της MCP-1, ενώ η επίδραση του PAF καθώς και της oxLDL αύξησε την έκφραση του υποδοχέα του PAF [499]. Σε άλλη εργασία η επώαση ανθρώπινων μονοκυττάρων με PAF αύξησε την παραγωγή HB-EGF ο οποίος έχει μιτογόνο δράση στα λεία μυϊκά κύτταρα [500]. Σε καλλιέργεια λείων μυϊκών κυττάρων η επώαση PAF διέγειρε τον πολλαπλασιασμό και την παραγωγή IL-6 [501]. Η προκαλούμενη από oxLDL, σε λεία μυϊκά κύτταρα, επαγωγή της αύξησης ανεστάλη σημαντικά με τη χορήγηση αναστολέων του υποδοχέα του PAF [502].

Σχετικά με τα αιμοπετάλια, είναι γνωστό ότι ο PAF επάγει τη συσσώρευσή τους μέσω της ιντεγκρίνης αIIbβ3 [503]. Υπάρχουν στοιχεία ότι η προκαλούμενη από oxLDL αύξηση της ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων ασκείται μέσω του υποδοχέα του PAF που εκφράζεται στα αιμοπετάλια [390, 427]. Όσον αφορά τέλος στα ενδοθηλιακά κύτταρα, στοιχεία υπάρχουν πως PAF ο οποίος εκφράζεται στην επιφάνεια των ενδοθηλιακών κυττάρων παίζει ρόλο στην προσκόλληση των λευκοκυττάρων στα ενδοθηλιακά κύτταρα και στην μετέπειτα ανταπόκρισή τους σε κυτταροκίνες, σε συνέργεια με την P-σελεκτίνη [504, 505].

Σε χορήγηση του αποκλειστή του υποδοχέα του PAF, WEB 2086, σε LDLR^{-/-} ποντίκια σημειώθηκε σημαντική μείωση της ανάπτυξης αθηροσκλήρυνσης, πιθανόν όμως η μείωση

αυτή να μην οφειλόταν αποκλειστικά στον αποκλεισμό του υποδοχέα του PAF αλλά και σε άλλες δράσεις του αποκλειστή που χρησιμοποιήθηκε, καθώς αυτός αποδείχθηκε ότι αναστέλλει την επαγόμενη από την POVPC προσκόλληση των μονοκυττάρων σε καλλιέργεια ανθρώπινων αορτικών ενδοθηλιακών κυττάρων με τρόπο ανεξάρτητο του υποδοχέα του PAF [506]. Χορήγηση συνθετικών αναστολέων του PAF σε μοντέλο υπερλιπιδαιμίας σε κουνέλια, οδήγησε σε μείωση της εναπόθεσης χοληστερόλης στην αορτή [507]. Επίσης, σημαντικός αριθμός ερευνών έχει αποδείξει την ύπαρξη ισχυρών ειδικών αναστολέων του PAF φυσικής προέλευσης, πολλοί μάλιστα από τους οποίους βρίσκονται σε τρόφιμα της μεσογειακής διαίτας [508]. Σε πειραματικά μοντέλα αθηροσκλήρυνσης σε κουνέλια και σε ποντίκια, ο εμπλουτισμός της διαίτας με τέτοιους αναστολείς οδήγησε σε σημαντική μείωση της ανάπτυξης αθηρωματικών πλακών ή και σε υποστροφή ήδη υπαρχουσών πλακών [508].

II.3.4.3. ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΜΕΛΕΤΕΣ ΣΥΣΧΕΤΙΣΗΣ ΤΗΣ Lp-PLA₂ ΜΕ ΤΗΝ ΚΑΡΔΙΑΓΓΕΙΑΚΗ ΝΟΣΟ

A) Η Lp-PLA₂ ως προγνωστικός δείκτης καρδιαγγειακής νόσου

Η Lp-PLA₂ έχει αναγνωριστεί ως σημαντικός προγνωστικός δείκτης της καρδιαγγειακής νόσου [509-515]. Τα τελευταία χρόνια διάφορες μελέτες πρωτογενούς και δευτερογενούς πρόληψης υπέδειξαν τα επίπεδα της δραστικότητας ή της μάζας της Lp-PLA₂ ως ανεξάρτητο προγνωστικό δείκτη επεισοδίων ΣΝ, πιθανά ισχυρότερο ακόμη και από τη CRP [509, 511, 512]. Η Lp-PLA₂ παράγεται κυρίως από τα μακροφάγα στον έσω χιτώνα του αγγειακού τοιχώματος και έτσι είναι πιο ειδικός αγγειακός δείκτης από τη CRP ή άλλους δείκτες φλεγμονής που παράγονται στο ήπαρ [516]. Σε συμφωνία με αυτή την παρατήρηση, η Lp-PLA₂ δεν αυξάνεται σε ασθενείς με PA ή συστηματικό ερυθματώδη λύκο, χωρίς ιστορικό καρδιαγγειακής νόσου [517].

Σε μελέτες πρωτογενούς πρόληψης (ασθενείς με ιστορικό ελεύθερο ΣΝ ή καρδιαγγειακού συμβάματος) έχει θεμελιωθεί η συσχέτιση των υψηλών επιπέδων της Lp-PLA₂ με τη μελλοντική εμφάνιση ΣΝ [511, 518-532] ή αγγειακού εγκεφαλικού επεισοδίου (ΑΕΕ) [521, 526, 528]. Η συσχέτιση αυτή έχει επιβεβαιωθεί και σε μελέτες που εστίασαν σε ειδικούς πληθυσμούς όπως ηλικιωμένοι [511, 521, 526], άτομα με μεταβολικό σύνδρομο [529] και ασθενείς με ΣΔ [521, 532]. Στη μελέτη Στεφανιαίας Πρόληψης της Δυτικής Σκωτίας (WOSCOPS), οι ασθενείς στο υψηλότερο πεμπτημόριο των επιπέδων Lp-PLA₂ είχαν 2 φορές υψηλότερο κίνδυνο για ΣΝ συγκριτικά με αυτούς του χαμηλότερου

πεμπτημόριου και η Lp-PLA₂ αποδείχτηκε ότι είναι ισχυρότερος ανεξάρτητος προγνωστικός δείκτης ΣΝ από τη CRP [527]. Στη μελέτη Κοινοτικού Κινδύνου Αθηροσκλήρωσης (ARIC), τα επίπεδα της Lp-PLA₂ και της CRP συσχετίστηκαν στατιστικά σημαντικά και ανεξάρτητα με τη ΣΝ και τα ΑΕΕ σε άτομα με επίπεδα LDL <130 mg/dL [518]. Ο μεγαλύτερος κίνδυνος για εγκεφαλικό ή στεφανιαίο επεισόδιο παρατηρήθηκε σε άτομα με αυξημένα επίπεδα Lp-PLA₂ και CRP (αναλογία κινδύνου 2,95).

Σε μελέτες δευτερογενούς πρόληψης τα υψηλά επίπεδα Lp-PLA₂ είτε άμεσα μετά από οξύ έμφραγμα μυοκαρδίου είτε αργότερα συνοδεύονταν από αυξημένη πιθανότητα μελλοντικού συμβάματος ή δυσμενέστερη πρόγνωση [533-540]. Σε ασθενείς με ιστορικό ΑΕΕ τα υψηλά επίπεδα Lp-PLA₂ συνοδεύονταν από αυξημένη πιθανότητα νέου ΑΕΕ και αποτελούσαν ανεξάρτητο προγνωστικό δείκτη [541]. Επίσης τα υψηλά επίπεδα Lp-PLA₂ σε υλικό ενδαρτηρεκτομής αποδείχθηκαν προγνωστικός δείκτης ΜΙ ή θανάτου από καρδιακό σύμβαμα [542].

Μετα-ανάλυση, το 2007, 14 προοπτικών επιδημιολογικών μελετών με >20.000 συμμετέχοντες, επιβεβαίωσε ότι η Lp-PLA₂ αποτελεί παράγοντα κινδύνου για καρδιαγγειακά επεισόδια ανεξάρτητο από τους κλασικούς παράγοντες κινδύνου [513]. Στη σύγκριση που βασίζεται σε ποσοστημόρια (ανώτερο ποσοστημόριο έναντι κατώτερου ποσοστημόριου), η αναλογία κινδύνου για καρδιαγγειακά επεισόδια ήταν 1,86. Σε μία πιο πρόσφατη μετα-ανάλυση, το 2010, η οποία συμπεριέλαβε δεδομένα 32 προοπτικών μελετών πρωτογενούς και δευτερογενούς πρόληψης από ~ 79.000 συμμετέχοντες, κάθε αύξηση των επιπέδων της Lp-PLA₂ κατά μία σταθερά απόκλιση (standard deviation, SD) συνοδεύονταν από σχετικό κίνδυνο ~ 1,10 για τα πρωτεύοντα τελικά σημεία που σχετίζονταν με τη ΣΝ και για ισχαιμικό ΑΕΕ [543].

Όσον αφορά στην παρουσία πρώιμης φάσης υποκλινικής αθηροσκλήρωσης, διάφορες μελέτες διερεύνησαν τη συσχέτιση των επιπέδων της με το συνδυασμένο πάχος του έσω και του μέσου χιτώνα (intima and media thickness, IMT), όπως αυτό έχει προτυποποιηθεί να μετράται με τη χρήση υπερήχων στην κοινή και στην έσω καρωτίδα. Αύξηση του IMT θεωρείται πρώϊμος φαινότυπος αθηρωμάτωσης και αποτελεί ισχυρό προγνωστικό παράγοντα καρδιαγγειακής νόσου [35, 37, 544]. Κάποιες από τις μελέτες αυτές ανέδειξαν συσχέτιση του IMT με τα επίπεδα της Lp-PLA₂ χωρίς όμως αυτά να αποτελούν ανεξάρτητο από τους παραδοσιακούς παράγοντες κινδύνου δείκτη [526, 545, 546] ενώ σε άλλες δεν αναδείχθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση [547, 548].

Αν και απαιτούνται περισσότερες κλινικές μελέτες για επιβεβαίωση, η μέτρηση της Lp-PLA₂ μπορεί να αποτελέσει ένα σημαντικό παράγοντα για τη διαστρωμάτωση του κινδύνου

και την ανίχνευση πλακών που είναι περισσότερο ευάλωτες σε ρήξη. Πράγματι, μία ομάδα ειδικών πρότεινε ότι επίπεδα μάζας Lp-PLA₂ > 200 ng/mL στην κυκλοφορία θα πρέπει να προτρέπουν τον κλινικό ιατρό να αντιμετωπίζει αυτούς τους ασθενείς σαν να βρίσκονται στην επόμενη υψηλότερη κατηγορία καρδιαγγειακού κινδύνου [549, 550]. Δεν έχει όμως ακόμη διευκρινιστεί, εάν η Lp-PLA₂ είναι απλώς ένας δείκτης κινδύνου που αντανακλά την αγγειακή φλεγμονή, που χαρακτηρίζεται από αυξημένη παραγωγή Lp-PLA₂ από τα συσσωρευμένα μακροφάγα, ή αποτελεί έναν παράγοντα που συμμετέχει στην παθογένεια της αγγειακής φλεγμονής και στο σχηματισμό της πλάκας [354, 383]. Ενδείξεις σχετικά παρέχουν γενετικές μελέτες που αφορούν στη συσχέτιση της ανεπάρκειας και πολυμορφισμών της Lp-PLA₂ με την καρδιαγγειακή νόσο, καθώς και μελέτες τροποποίησης της δραστηριότητας της Lp-PLA₂ in vivo.

B) Γενετικές μελέτες: ανεπάρκεια και πολυμορφισμοί της Lp-PLA₂ και καρδιαγγειακή νόσος

B1) Ανεπάρκεια της Lp-PLA₂

Μετάλλαξη στη θέση 994 (G>T) του γονιδίου PLA2G7 οδηγεί σε αντικατάσταση βαλίνης από φαινυλαλανίνη στη θέση 279 της ώριμης πρωτεΐνης της Lp-PLA₂ κοντά στο ενεργό κέντρο του ενζύμου (V279F) [551]. Η μετάλλαξη αυτή οδηγεί σε ανεπάρκεια της δραστηριότητας της Lp-PLA₂ καθώς οι ομοζυγώτες του αλληλίου V279F διαθέτουν αμελητέα μόνο δραστηριότητα ενώ οι ετεροζυγώτες μόνο το 50% της φυσιολογικής δραστηριότητας. Η μετάλλαξη αυτή αποτελεί τη συχνότερη μετάλλαξη που οδηγεί σε ενζυμική ανεπάρκεια ενώ έχουν περιγραφεί και άλλες σπάνιες μεταλλάξεις που οδηγούν σε ανεπάρκεια [361]. Το αλληλίο V279F απαντάται συχνά σε ασιατικούς πληθυσμούς και ιδιαίτερα σε Ιάπωνες από τους οποίους το 3-4% είναι ομοζυγώτες [552].

Με δεδομένη τη συσχέτιση της δραστηριότητας της Lp-PLA₂ με την καρδιαγγειακή νόσο, η μελέτη της επίπτωσης καρδιαγγειακής νόσου σε πληθυσμούς με ανεπάρκεια της Lp-PLA₂ είναι ιδιαίτερα σημαντική καθώς δίνει την ευκαιρία να εξαχθούν συμπεράσματα για το εάν η συσχέτιση αυτή δηλώνει αιτιολογική σύνδεση ή εάν τα επίπεδα της Lp-PLA₂ αποτελούν απλώς δείκτη της φλεγμονής στο αγγειακό τοίχωμα. Μελέτες σε Ιάπωνες υποδεικνύουν την παρουσία του αλληλίου V279F ως παράγοντα κινδύνου για την ανάπτυξη ΣΝ, για ΑΕΕ και για την ανάπτυξη περιφερικής αποφρακτικής αρτηριοπάθειας [552-556]. Σε άλλη εργασία βρέθηκε επίδραση του φύλου και της ύπαρξης δυσλιπιδαιμίας, καθώς αναφέρεται συσχέτιση του V279F με την καρδιαγγειακή νόσο μόνο σε άνδρες με υπερχοληστερολαιμία ενώ δεν τεκμηριώθηκε συσχέτιση σε νορμολιπιδαιμικούς συμμετέχοντες και σε γυναίκες [557].

Μελέτες σε άλλους ασιατικούς πληθυσμούς έδωσαν αντικρουόμενα αποτελέσματα [361]. Η εικόνα αυτή αντανακλάται και σε μετα-ανάλυση εργασιών σχετικών με τη συσχέτιση του V279F με την καρδιαγγειακή νόσο, στην οποία δεν τεκμηριώθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση παρά μόνο όσον αφορά στον Ιαπωνικό πληθυσμό [558].

B2) Πολυμορφισμοί της Lp-PLA₂

Διάφοροι πολυμορφισμοί της Lp-PLA₂ έχουν περιγραφεί με παγκόσμια κατανομή όπως οι R92H, I198T και A379V [361]. Ο πλέον μελετημένος είναι ο πολυμορφισμός A379V. Υπήρξε αναφορά θετικής συσχέτισης της παρουσίας του πολυμορφισμού αυτού με την ύπαρξη καρδιαγγειακής νόσου στην Ταϊβάν, η οποία όμως δεν επιβεβαιώθηκε από άλλη εργασία σε επίσης ασιατικό πληθυσμό στη Νότια Κορέα, ενώ και σε μετα-ανάλυση εργασιών στην Ευρώπη δεν τεκμηριώθηκε συσχέτιση της παρουσίας του πολυμορφισμού A379V με την ύπαρξη καρδιαγγειακής νόσου [559-561].

II.3.4.4. ΜΕΛΕΤΕΣ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΗΣ ΤΗΣ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΗΣ Lp-PLA₂ IN VIVO

Μία δεύτερη οδός διερεύνησης της ύπαρξης αιτιολογικής σύνδεσης της Lp-PLA₂ με την καρδιαγγειακή νόσο είναι οι μελέτες τροποποίησης της δραστηριότητας της Lp-PLA₂. Οι μελέτες τροποποίησης της δραστηριότητας της Lp-PLA₂ in vivo διακρίνονται σε μελέτες υπερέκφρασης, οι οποίες έχουν διεξαχθεί στο σύνολό τους σε πειραματόζωα, και σε μελέτες αναστολής, οι οποίες έχουν διεξαχθεί σε πειραματόζωα αλλά και σε ανθρώπους. Τα αποτελέσματα των μελετών τροποποίησης της δραστηριότητας της Lp-PLA₂ in vivo είναι αυτά που μπορούν να δώσουν τελικά απάντηση στο εάν η δραστηριότητα της Lp-PLA₂ συνδέεται με την παθογένεση της αθηρογένεσης είτε επάγοντας είτε αναστέλλοντάς την. Η ανακάλυψη του από του στόματος χορηγούμενου εκλεκτικού αναστολέα της Lp-PLA₂ darapladib αποτελεί ίσως ένα κομβικό σημείο στη μελέτη του ρόλου της Lp-PLA₂ στην αθηροσκλήρυνση καθώς έδωσε τη δυνατότητα μελετών σε ανθρώπους.

Από τις μέχρι τώρα διεξαχθείσες μελέτες έχουν καταγραφεί θετικά αποτελέσματα και από τις μελέτες υπερέκφρασης και από τις μελέτες αναστολής. Στους ανθρώπους η αναστολή με darapladib φαίνεται να επιδρά ευεργετικά κυρίως όσον αφορά στη μείωση του μεγέθους του λιπώδη πυρήνα και τη σταθεροποίηση της αθηρωματικής πλάκας.

A) Μελέτες υπερέκφρασης της Lp-PLA₂ in vivo

Μία σειρά εργασιών με μεταφορά του ανθρώπινου γονιδίου της Lp-PLA₂ με φορέα αδενοϊό και επακόλουθη υπερέκφραση της Lp-PLA₂ σε πειραματόζωα, έχει δημοσιευτεί. Τα αποτελέσματα της υπερέκφρασης αυτής μελετήθηκαν όσον αφορά είτε στην ανάπτυξη αθηροσκλήρυνσης είτε στην ανάπτυξη νεοχιτώνα σε θέσεις πειραματικού τραυματισμού ο σχηματισμός του οποίου περιλαμβάνει μηχανισμούς παρόμοιους με αυτούς της αθηρογένεσης [29].

Σε ApoE^{-/-} ποντίκια η έγχυση γονιδίου της Lp-PLA₂ με φορέα αδενοϊό σε σκελετικούς μύες οδήγησε σε αύξηση της δραστηριότητας της Lp-PLA₂ στο πλάσμα έως 2,5 φορές και το γεγονός αυτό συνοδεύτηκε από σημαντική μείωση του πάχους του αορτικού τοιχώματος [562]. Σε αύξηση της ηπατικής παραγωγής Lp-PLA₂ σε ApoE^{-/-} ποντίκια μετά από ενσωμάτωση γονιδίου της Lp-PLA₂ με φορέα αδενοϊό, η δραστηριότητα της Lp-PLA₂ στο πλάσμα αυξήθηκε έως 3,5 φορές με συνοδό μείωση της ανάπτυξης αθηρωμάτωσης κυρίως στα αρσενικά ποντίκια, όπου και η αύξηση της δραστηριότητας της Lp-PLA₂ ήταν μεγαλύτερη [563]. Η μείωση ανάπτυξης αθηρωμάτωσης συνοδευόταν από μείωση των τίτλων των αντισωμάτων εναντίον τροποποιημένων από MDA LDL στο πλάσμα. Παράλληλα σε πειραματικό τραυματισμό καρωτίδας και απογύμνωση του ενδοθηλίου με μπαλόνι, ο σχηματισμός νεοχιτώνα μειώθηκε σημαντικά με μείωση της περιεκτικότητας της βλάβης σε oxLDL, σε μακροφάγα και σε λεία μυϊκά κύτταρα. Παρομοίως σε άλλη εργασία, η αύξηση της δραστηριότητας της Lp-PLA₂ στο πλάσμα κατά 1,5 φορά μετά από έγχυση αδενοϊού φορέα του γονιδίου της Lp-PLA₂ οδήγησε σε μείωση της στρατολόγησης μακροφάγων στο τοίχωμα της αορτής, όπως εκτιμήθηκε με τη χρήση σημασμένων μακροφάγων, η οποία σχετιζόταν με παράλληλη μείωση της έκφρασης των VCAM-1 και ICAM-1 στην αορτή [564].

Σε λευκά κουνέλια Νέας Ζηλανδίας υπό υπερχοληστερολαιμική διαίτα μελετήθηκε η ανάπτυξη νεοχιτώνα μετά από τραυματισμό και απογύμνωση του ενδοθηλίου στην αορτή με ταυτόχρονη μεταφορά στο αρτηριακό τοίχωμα του γονιδίου της Lp-PLA₂ με φορέα αδενοϊό [565]. Η επαγόμενη αύξηση της έκφρασης της Lp-PLA₂ στο αρτηριακό τοίχωμα συνοδεύτηκε από μείωση της ανάπτυξης νεοχιτώνα όπως κατέδειξε ο μειωμένος λόγος του πάχους του έσω χιτώνα προς το πάχος του έξω χιτώνα σε σχέση με την ομάδα που έλαβε αδενοϊό χωρίς μεταφορά Lp-PLA₂ ενώ δεν παρατηρήθηκε διαφορά στην ανάπτυξη επαναενδοθηλιοποίησης. Μειωμένος ρυθμός κυτταρικού πολλαπλασιασμού και μειωμένη απόπτωση παρατηρήθηκαν στην ομάδα που έλαβε Lp-PLA₂. Σε παρόμοιο μοντέλο με τραυματισμό με μπαλόνι στις καρωτίδες σε λευκά κουνέλια Νέας Ζηλανδίας και μεταφορά

στο αρτηριακό τοίχωμα του γονιδίου της Lp-PLA₂ με φορέα αδενοϊό, ο περιορισμός σχηματισμού νεοχιτών από την Lp-PLA₂ συνοδεύτηκε από μικρότερη διήθηση από μακροφάγα, μικρότερη εναπόθεση oxLDL και μικρότερη έκφραση TF και των μορίων προσκόλλησης VCAM-1 και ICAM-1 στη θέση της βλάβης [566].

B) Μελέτες αναστολής της Lp-PLA₂ in vivo

Μελέτες με αναστολή της Lp-PLA₂ in vivo έχουν διεξαχθεί με χρησιμοποίηση του darapladib που βρίσκεται πλέον σε φάση κλινικών δοκιμών σε ανθρώπους.

Μελέτες σε πειραματόζωα

Χορήγηση darapladib σε LDLR^{-/-} και σε ApoE^{-/-} ποντίκια για 6 εβδομάδες προκάλεσε αναστολή της Lp-PLA₂ περισσότερο από 60%, που συνοδεύτηκε από μείωση της ανάπτυξης αθηροσκλήρυνσης στην αορτή, μείωση των επιπέδων της υψηλής ευαισθησίας CRP (high sensitivity CRP, hs-CRP) και της IL-6 στο πλάσμα, και της έκφρασης των γονιδίων της MCP-1 και του VCAM-1 στις αθηροσκληρωτικές βλάβες, ενώ δεν σημειώθηκε μεταβολή στα επίπεδα του PAF στον ορό [567, 568]. Στα ApoE^{-/-} ποντίκια εκτιμήθηκε επιπλέον η έκφραση του γονιδίου του TNFα στις αθηροσκληρωτικές βλάβες ενώ εκτιμήθηκε και η σύσταση των αθηροσκληρωτικών βλαβών όπου σημειώθηκε μειωμένη περιεκτικότητα σε μακροφάγα και αυξημένη περιεκτικότητα σε κολλαγόνο στην ομάδα που έλαβε darapladib, υποδεικνύοντας πέρα από τη μείωση της έκτασης της αθηρωμάτωσης και ανάπτυξη σταθερότερων αθηρωματικών πλακών [567]. Σε χοίρους με ΣΔ και υπερχοληστερολαιμία η χορήγηση darapladib για 4 εβδομάδες μείωσε τη δραστηριότητα της Lp-PLA₂ και την περιεκτικότητα σε lysoPC στο αρτηριακό τοίχωμα καθώς και την έκταση της αθηρωμάτωσης, το μέγεθος του λιπώδη πυρήνα και την περιεκτικότητα σε μακροφάγα, ενώ αύξησε την περιεκτικότητα σε λεία μυϊκά κύτταρα [568]. Μεταβολές στην ποσοτική έκφραση 24 γονιδίων που αφορούσαν στον πληθυσμό των μακροφάγων και των T λεμφοκυττάρων παρατηρήθηκαν στην αθηρωματική πλάκα υποδεικνύοντας πιθανότατα τη χαμηλότερη περιεκτικότητα της βλάβης στους κυτταρικούς αυτούς πληθυσμούς. Σε συμφωνία με τα ανωτέρω αποτελέσματα, σε τοπική καταστολή της έκφρασης του γονιδίου της Lp-PLA₂ με έγχυση παρεμβατικού RNA (RNA interference, RNAi) με φορέα lentivirus σε καρωτίδες ApoE^{-/-} ποντικών, παρατηρήθηκε αναστολή της ανάπτυξης της πλάκας με μείωση του λιπώδη πυρήνα και αύξηση του πάχους του ινώδη χιτώνα και της περιεκτικότητας σε κολλαγόνο [569]. Η μείωση της έκφρασης του γονιδίου της Lp-PLA₂ στο αρτηριακό τοίχωμα συνοδεύταν και από μείωση της έκφρασης των γονιδίων της MCP-1 και

της MMP2 ενώ μειώσεις των επιπέδων της δραστηριότητας της Lp-PLA₂ και της MMP2 και των επιπέδων της MCP-1 παρατηρήθηκαν και στο πλάσμα. Συμπερασματικά, οι μέχρι τώρα μελέτες σε πειραματόζωα υποστηρίζουν ένα ευεργετικό ρόλο της αναστολής της δραστηριότητας της Lp-PLA₂ όσον αφορά στην ανάπτυξη της αθηρωμάτωσης και στη σταθεροποίηση της πλάκας.

Μελέτες σε ανθρώπους

Σε τυχαιοποιημένη μελέτη σε ασθενείς με στεφανιαία νόσο (ΣΝ) ή ισοδύναμο ΣΝ (ΣΔ, στένωση καρωτίδος >50%, ιστορικό επεμβατικής αντιμετώπισης στένωσης καρωτίδων, περιφερική αρτηριακή νόσος, παράγοντες κινδύνου με δεκαετή κίνδυνο στεφανιαίου επεισοδίου >20% σύμφωνα με τη βαθμολογία Framingham) χορήγηση από του στόματος του αναστολέα darapladib οδήγησε σε δοσοεξαρτώμενη αναστολή της δραστηριότητας της Lp-PLA₂ του πλάσματος, η οποία στη μεγαλύτερη χορηγηθείσα δόση των 160 mg έφθασε στο 66% [570]. Στη δόση αυτή μετά από 12 εβδομάδες παρατηρήθηκε μικρή αλλά στατιστικά σημαντική μείωση της hs-CRP και της IL-6 κατά 13% και 12% αντίστοιχα σε σχέση με το εικονικό φάρμακο, υποδεικνύοντας μείωση της έντασης της φλεγμονώδους διεργασίας. Τα επίπεδα των λιπιδίων του πλάσματος, της μυελοϋπεροξειδάσης και της MMP9 στο πλάσμα, καθώς και μίας σειράς δεικτών ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων, η οποία περιελάμβανε την P-σελεκτίνη και το CD40 στο πλάσμα και την 11-διυδροθρομβοξάνη B2 στα ούρα, δεν παρουσίασαν μεταβολές.

Σε άλλη εργασία, ασθενείς με ΣΝ τυχαιοποιήθηκαν να λάβουν 160 mg darapladib ή εικονικό φάρμακο για 12 μήνες. Στην ομάδα που έλαβε darapladib η δραστηριότητα της Lp-PLA₂ ανεστάλη κατά 59% και η αναστολή αυτή συνοδεύτηκε από μείωση του μεγέθους του λιπώδη πυρήνα της αθηρωματικής πλάκας, όπως εκτιμήθηκε με ενδοστεφανιαίο υπέρηχο, σε αντίθεση με την ομάδα του εικονικού φαρμάκου όπου σημειώθηκε αύξηση [571]. Το συνολικό μέγεθος της πλάκας όπως και μία σειρά βιοχημικών παραμέτρων που εκτιμήθηκαν και η οποία περιλάμβανε τα επίπεδα στο πλάσμα της hs-CRP, της μυελοϋπεροξειδάσης, της MMP9 και του ICAM-1, δεν παρουσίασαν διαφοροποίηση μεταξύ των δύο ομάδων.

Δύο μεγάλες πολυκεντρικές, τυχαιοποιημένες, διπλά τυφλές μελέτες με χορήγηση 160 mg darapladib ή εικονικού φαρμάκου, είναι σε εξέλιξη και αναμένεται να διευκρινίσουν την αποτελεσματικότητα της αναστολής της Lp-PLA₂ στην πρόληψη καρδιαγγειακών συμβαμάτων. Στη μελέτη σταθεροποίησης της αθηροσκληρωτικής πλάκας με έναρξη θεραπείας με darapladib (Stabilization of Atherosclerotic Plaque by Initiation of Darapladib Therapy, STABILITY) εξετάζεται η πρόληψη καρδιαγγειακών συμβαμάτων σε ασθενείς με

σταθερή ΣΝ και στη μελέτη σταθεροποίησης της πλάκας με χρήση darapladib – θρομβόλυσης σε έμφραγμα μυοκαρδίου (Stabilization Of pLaques usIng Darapladib-Thrombolysis In Myocardial Infarction 52, SOLID-TIMI 52) εξετάζεται η πρόληψη στεφανιαίου επεισοδίου ή αγγειακού εγκεφαλικού επεισοδίου με άμεση έναρξη θεραπείας με darapladib μετά από οξύ έμφραγμα μυοκαρδίου [572, 573].

III. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

III.1. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

III.1.1. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΛΙΠΟΠΡΩΤΕΪΝΗΣ LDL ΑΠΟ ΑΝΘΡΩΠΙΝΟ ΠΛΑΣΜΑ ΜΕ ΔΙΑΔΟΧΙΚΕΣ ΥΠΕΡΦΥΓΟΚΕΝΤΡΗΣΕΙΣ [574, 575]

Αρχή της μεθόδου

Ο διαχωρισμός των λιποπρωτεϊνών του πλάσματος με υπερφυγοκέντρηση βασίζεται στη διαφορετική πυκνότητα που αυτές εμφανίζουν. Η διαφορετική πυκνότητα των λιποπρωτεϊνών έχει σαν αποτέλεσμα την επίπλευσή τους σε διαφορετικές πυκνότητες. Οι λιποπρωτεΐνες παρουσιάζουν τις εξής πυκνότητες:

VLDL	$d < 1,006 \text{ g/mL}$
IDL	$d = 1,006 - 1,019 \text{ g/mL}$
LDL	$d = 1,019 - 1,063 \text{ g/mL}$
HDL	$d = 1,063 - 1,210 \text{ g/mL}$

Αντιδραστήρια και όργανα

- Ψυχόμενη φυγόκεντρος πάγκου (ALC, International SRL PK131R)
- Υπερφυγόκεντρος (L7-65, Beckman)
- Κεφαλή υπερφυγόκεντρου (Beckman Ti-75)
- Βιδωτοί πλαστικοί σωλήνες υπερφυγόκεντρου χωρητικότητας 10,5 mL (Beckman)
- KBr (MB 119,01) (Ferak). Το KBr ξηραίνεται σε κλίβανο στους 120⁰C για 1 h και διατηρείται σε ξηραντήρα.
- Πενικιλίνη/Στρεπτομυκίνη (10.000 IU penicillin/mL, 10.000 µg/mL) (Biowhittaker Europe)
- Ethylenediaminetetraacetic acid dipotassium salt dihydrate K₂EDTA·2H₂O (MB 404,5) (Serva)
- Ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt dihydrate (Na₂EDTA·2H₂O) (MB 372,24) (Sigma)
- Na₂HPO₄·2H₂O (MB 177,99) (Merck)
- KH₂PO₄ (MB 136,09) (Ferak)
- NaCl (MB 58,44) (Merck)
- Αποστειρωμένες πλαστικές πιπέτες Pasteur με ευρύ χείλος των 3 ml
- Μεμβράνη διαπίδυσης (Visking dialysis tubing 27/32, Serva)

- Φίλτρα διήθησης 0.20 μm (Corning)
- Πλαστικοί σωλήνες φυγοκέντρησης από πολυπροπυλένιο των 15 mL (Corning)

Διαλύματα εργασίας

Διάλυμα 5% K_2EDTA σε dH_2O , pH 7,4. Ζυγίζονται 5,488 g $\text{K}_2\text{EDTA}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ και διαλύονται σε 90 mL dH_2O . Το pH ρυθμίζεται σε 7,4 με KOH 1N και HCl 1N και ο όγκος συμπληρώνεται με dH_2O έως τα 100 mL. Το διάλυμα αποθηκεύεται στους 4°C .

Διάλυμα 5% Na_2EDTA σε dH_2O , pH 7,4. Ζυγίζονται 5,535 g $\text{Na}_2\text{EDTA}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ τα οποία αντιστοιχούν σε 5 g Na_2EDTA , και διαλύονται σε 90 mL dH_2O . Το pH ρυθμίζεται σε 7,4 με NaOH 1N και HCl 1N και ο όγκος συμπληρώνεται έως τα 100 mL με dH_2O . Το διάλυμα αποθηκεύεται στους 4°C .

Διάλυμα KBr σε dH_2O πυκνότητας 1,019 g/mL. Ζυγίζονται 14,92 g KBr και διαλύονται σε dH_2O μέχρι τελικό όγκο 500 mL. Το διάλυμα περιέχει 10 $\mu\text{L}/\text{mL}$ 5% Na_2EDTA και 10 $\mu\text{l}/\text{ml}$ διαλύματος πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη (100UI/100 μg ανά mL). Το διάλυμα φιλτράρεται με φίλτρο διήθησης 0,2 μm και αποθηκεύεται στους 4°C .

Διάλυμα KBr σε dH_2O πυκνότητας 1,063 g/mL. Ζυγίζονται 45,99 g KBr και διαλύονται σε dH_2O μέχρι τελικό όγκο 500 mL. Το διάλυμα περιέχει 10 $\mu\text{L}/\text{mL}$ 5% Na_2EDTA και 10 $\mu\text{L}/\text{mL}$ διαλύματος πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη (100UI/100 μg ανά mL). Το διάλυμα φιλτράρεται με φίλτρο διήθησης 0,2 μm και αποθηκεύεται στους 4°C .

Ρυθμιστικό διάλυμα PBS, 0.2 mM EDTA, pH 7.4. Ζυγίζονται 9 g NaCl , 0,528 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,144 g KH_2PO_4 και 74,44 mg $\text{Na}_2\text{EDTA}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ και διαλύονται σε 900 mL dH_2O . Το pH ρυθμίζεται σε 7,4 με NaOH 1N και HCl 1N και ο όγκος συμπληρώνεται στο 1 lt με dH_2O . Το διάλυμα αποθηκεύεται στους 4°C .

Πειραματική διαδικασία

Απομόνωση του πλάσματος

Το αίμα συλλέγεται σε πλαστικούς σωλήνες που περιέχουν 100 μL διαλύματος 5% K_2EDTA για κάθε 10 mL αίματος. Οι σωλήνες φυγοκεντρούνται σε 1500xg για 30 min, σε θερμοκρασία $0-10^\circ\text{C}$, σε φυγόκεντρο πάγκου για να καταβυθιστούν τα έμμορφα στοιχεία του αίματος. Το πλάσμα συλλέγεται με πιπέτα Pasteur.

Απομόνωση της LDL

Μετράται ο όγκος του πλάσματος σε mL και πολλαπλασιάζεται με το συντελεστή 0,0212 για να βρούμε πόσα g στερεού KBr πρέπει να προστεθούν στο πλάσμα ώστε αυτό να

αποκτήσει πυκνότητα 1,019 g/mL. Μετά την προσθήκη του KBr και τη διαλυτοποίησή του με ήπια ανάδευση το πλάσμα τοποθετείται σε σωληνάκια υπερφυγοκέντρου, μέχρι το μέσο περίπου σε κάθε σωληνάκι, και ο όγκος συμπληρώνεται με διάλυμα KBr πυκνότητας 1,019 g/mL. Τα σωληνάκια αφού ζυγοσταθμιστούν, τοποθετούνται στην κεφαλή της υπερφυγοκέντρου και φυγοκεντρούνται σε 143.000xg, για 10h, στους 14⁰C. Μετά τη φυγοκέντρωση η VLDL και η IDL είναι συγκεντρωμένες στην επιφάνεια σχηματίζοντας μία ευδιάκριτη γαλακτόχροη στοιβάδα. Η στοιβάδα αυτή συλλέγεται προσεκτικά με πιπέτα Pasteur και εν συνεχεία συλλέγεται το υπόλοιπο πλάσμα. Μετράται εκ νέου ο όγκος του πλάσματος σε ml και πολλαπλασιάζεται με το συντελεστή 0,060 για να βρούμε πόσα g στερεού KBr πρέπει να προστεθούν στο πλάσμα ώστε αυτό να αποκτήσει πυκνότητα 1,063 g/mL. Μετά τη διαλυτοποίησή του KBr με ήπια ανάδευση, το πλάσμα τοποθετείται σε σωληνάκια υπερφυγοκέντρου και ο όγκος συμπληρώνεται με διάλυμα KBr πυκνότητας 1,063 g/mL. Τα σωληνάκια ζυγοσταθμίζονται, τοποθετούνται στην κεφαλή της υπερφυγοκέντρου και φυγοκεντρούνται σε 143.000xg, για 10h, στους 14⁰C. Μετά το πέρας της φυγοκέντρωσης η LDL έχει συγκεντρωθεί στην επιφάνεια σχηματίζοντας μία ευδιάκριτη πορτοκαλόχροη στοιβάδα. Η στοιβάδα συλλέγεται προσεκτικά με πιπέτα Pasteur.

Έκπλυση της LDL

Η απομονωμένη LDL υποβάλλεται σε μία ακόμη υπερφυγοκέντρωση ώστε να εξασφαλιστεί η μέγιστη καθαρότητα. Η LDL μοιράζεται σε σωληνάκια υπερφυγοκέντρου και ο όγκος συμπληρώνεται με διάλυμα KBr πυκνότητας 1,063 g/mL. Τα σωληνάκια ζυγοσταθμίζονται, τοποθετούνται στην κεφαλή της υπερφυγοκέντρου και φυγοκεντρούνται σε 143.000xg, για 10h, στους 14⁰C. Μετά το πέρας της φυγοκέντρωσης συλλέγεται από την επιφάνεια η πορτοκαλόχροη στοιβάδα της LDL

Η LDL τοποθετείται σε μεμβράνη διαπίδυσης και τοποθετείται σε ποτήρι που περιέχει 200πλάσιο όγκο PBS, 0,2 mM EDTA, pH 7,4. Η διαπίδυση γίνεται υπό συνεχή ανάδευση στους 4⁰C, για 24h. Το PBS αντικαθίσταται με νέο κάθε 8h. Μετά το πέρας της διαπίδυσης η LDL συλλέγεται και διηθείται από φίλτρο 0,20 μm. Ακολουθεί μέτρηση της πρωτεΐνης με τη μέθοδο Lowry. Η LDL αποθηκεύεται σε ατμόσφαιρα N₂ με τοποθέτηση N₂ στο σωλήνα αποθήκευσης της LDL, ώστε να απομακρυνθεί κατά το δυνατό το O₂ και να μειωθεί στο ελάχιστο η οξειδωση. Εν συνεχεία η LDL αποθηκεύεται στους 4⁰C σε σκοτεινό περιβάλλον (κάλυψη του σωλήνα με αλουμινόχαρτο). Η διάρκεια αποθήκευσης της LDL δεν υπερβαίνει τις 2 εβδομάδες.

III.1.2. ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ

Αρχή της μεθόδου

Ο ποσοτικός προσδιορισμός των πρωτεϊνών έγινε με χρησιμοποίηση kit της Bio-Rad, Bio-Rad DC (Detergent-Compatible) protein assay kit το οποίο στηρίζεται στη μέθοδο Lowry [576]. Επιπλέον το kit αυτό παρέχει τη δυνατότητα ασφαλούς μέτρησης και επί παρουσίας απορρυπαντικών στο διάλυμα στο οποίο είναι διαλυμένες οι πρωτεΐνες.

Η αρχή της μέτρησης πρωτεϊνών με τη μέθοδο Lowry στηρίζεται σε δύο στάδια. Στο πρώτο, οι πρωτεΐνες αντιδρούν με ιόντα Cu^{++} σε αλκαλικό περιβάλλον (αντίδραση διουρίας). Στο δεύτερο στάδιο, το σύμπλοκο που έχει σχηματιστεί με την αντίδραση διουρίας αντιδρά με το αντιδραστήριο Folin και με μια οξειδωαναγωγική αντίδραση που συντελείται αναπτύσσεται μπλε χρώμα. Με φωτομέτρηση στα 750 nm, έναντι προτύπων δειγμάτων, υπολογίζεται η ποσότητα της υπάρχουσας πρωτεΐνης.

Αντιδραστήρια και όργανα

- Bio-Rad DC (Detergent-Compatible) protein assay kit (Bio-Rad)

Το kit περιλαμβάνει τρία αντιδραστήρια, το A στο οποίο περιέχεται CuSO_4 , το B το οποίο αποτελεί το αντιδραστήριο Folin, και το S το οποίο περιέχει SDS (sodium dodecyl sulfate).

- Βόειος αλβουμίνη ορού (Bovine serum albumin, BSA) (Sigma)
- Πλαστικοί σωλήνες από πολυπροπυλένιο με ευρεία βάση των 5 mL
- Κυκλοαναδευτήρας (vortex)
- Πλακίδια Elisa 96 θέσεων (Corning)
- Μετρητής Elisa 96 θέσεων (Molecular Devices, Versa_{max})

Διαλύματα εργασίας

Πρότυπα υδατικά διαλύματα BSA, 2,5 και 0,25 mg/mL. Για την παρασκευή του διαλύματος BSA, 2,5 mg/mL, ζυγίζονται 50 mg BSA και διαλύονται σε 20 mL dH_2O . Για την παρασκευή του διαλύματος BSA, 0,25 mg/mL, 5 ml του διαλύματος BSA, 2,5 mg/mL αραιώνονται σε τελικό όγκο 50 mL με προσθήκη 45mL dH_2O . Τα διαλύματα διατηρούνται στους 4⁰C έως και 2 μήνες.

Διάλυμα A. Το διάλυμα A το οποίο διατηρείται στο ψυγείο, αφήνεται να πάρει θερμοκρασία δωματίου προτού χρησιμοποιηθεί. Το διάλυμα S διατηρείται επίσης στο

ψυγείο και προτού χρησιμοποιηθεί θα πρέπει να θερμανθεί για 5-10 min στους 37°C για να διαλυτοποιηθεί το SDS το οποίο περιέχεται σε αυτό και το οποίο σχηματίζει κρυστάλλους σε χαμηλή θερμοκρασία. Σε 1 mL διαλύματος A προστίθενται 20μL διαλύματος S. Το διάλυμα A' παραμένει σε θερμοκρασία δωματίου εφόσον χρησιμοποιηθεί άμεσα. Μπορεί να διατηρηθεί έως μία εβδομάδα μετά την παρασκευή του στους 4°C. Σε αυτή την περίπτωση επειδή σε χαμηλή θερμοκρασία σχηματίζονται κρύσταλλοι από το SDS, θα πρέπει να χρησιμοποιηθεί μετά από θέρμανση και vortex που εξασφαλίζουν την πλήρη διαλυτοποίηση του SDS.

Πειραματική διαδικασία

Τα διαλύματα A και B τα οποία διατηρούνται στο ψυγείο, αφήνονται να έλθουν σε θερμοκρασία δωματίου προτού χρησιμοποιηθούν. Σε περίπτωση που πρόκειται για προσδιορισμό πρωτεΐνης σε υδατικό διάλυμα που περιέχει απορρυπαντικό, χρησιμοποιείται το διάλυμα A', ενώ σε διαφορετική περίπτωση χρησιμοποιείται το διάλυμα A χωρίς την προηγούμενη προσθήκη διαλύματος S.

Για την παρασκευή προτύπων διαφορετικών συγκεντρώσεων πρωτεΐνης (standards), τοποθετούνται σε πλαστικούς σωλήνες ποσότητες 20, 40 και 50 μL από το πρότυπο διάλυμα BSA 0,25 mg/mL (5, 10, 12,5 μg BSA αντίστοιχα) και 10 και 20 μL από το πρότυπο διάλυμα BSA 2,5 mg/mL (25 και 50 μg BSA αντίστοιχα). Για τη παρασκευή των άγνωστων δειγμάτων (samples) τοποθετείται αντίστοιχα ποσότητα έως 100 μL από το διάλυμα στο οποίο πρόκειται να προσδιοριστεί η περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη, που περιέχει έως 50 μg πρωτεΐνη, ενώ για τη παρασκευή τυφλού (blank) δεν τοποθετείται ούτε πρότυπο διάλυμα BSA ούτε δείγμα. Στους σωλήνες του τυφλού και των προτύπων τοποθετείται ποσότητα του διαλύματος στο οποίο είναι διαλυμένη η πρωτεΐνη του δειγμάτων, ίση με την ποσότητα που έχει τοποθετηθεί στους σωλήνες των δειγμάτων. Σε όλους του σωλήνες ο όγκος συμπληρώνεται με dH₂O έως τελικού όγκου 200 μL. Το τυφλό, τα πρότυπα και τα δείγματα παρασκευάζονται εις διπλούν. Σε όλους τους σωλήνες προστίθενται 100 μL διαλύματος A ή A' και μετά από ανάδευση (vortex) προστίθενται 800 μL διαλύματος B. Μετά από ανάδευση (vortex) οι σωλήνες αφήνονται για 30 min σε θερμοκρασία δωματίου. Εν συνεχεία, 300 μL από κάθε σωλήνα μεταφέρονται σε θέση πλακιδίου Elisa 96 θέσεων το οποίο τοποθετείται στο μετρητή Elisa και ακολουθεί φωτομέτρηση στα 750 nm. Με βάση τις τιμές απορρόφησης του τυφλού και των προτύπων σχεδιάζεται με τη βοήθεια ηλεκτρονικού υπολογιστή η πρότυπη ευθεία. Ακολούθως, χρησιμοποιώντας την εξίσωση της πρότυπης

ευθείας, υπολογίζονται από τις τιμές απορρόφησης των δειγμάτων οι συγκεντρώσεις πρωτεΐνης των δειγμάτων εκφραζόμενες σε mg BSA/mL.

III.1.3. ΟΞΕΙΔΩΣΗ ΤΗΣ LDL

Αρχή της μεθόδου

Η οξειδωτική τροποποίηση της LDL επιτυγχάνεται με επώαση με ιόντα Cu^{2+} στους 37°C .

Αντιδραστήρια και όργανα

- Na_2EDTA (MB 372,24) (Sigma)
- $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (MB 177,99) (Merck)
- KH_2PO_4 (MB 136,09) (Ferak)
- NaCl (MB 58,44) (Merck)
- $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (M.B. 249,69) (Sigma)
- Μεμβράνη διαπίδυσης (Visking dialysis tubing 27/32) (Serva)
- Φίλτρα διήθησης $0.20 \mu\text{m}$ (Corning)
- Ανακινούμενο υδατόλουτρο ρυθμιζόμενης θερμοκρασίας
- Πλαστικοί σωλήνες από πολυπροπυλένιο με ευρεία βάση των 5 mL

Διαλύματα εργασίας

Ρυθμιστικό διάλυμα PBS, pH 7,4. Ζυγίζονται 9 g NaCl , $0,528 \text{ g Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ και $0,144 \text{ g KH}_2\text{PO}_4$, και διαλύονται σε $900 \text{ mL dH}_2\text{O}$. Το pH ρυθμίζεται σε $7,4$ με $\text{NaOH } 1\text{N}$ και $\text{HCl } 1\text{N}$ και ο όγκος συμπληρώνεται στο 1 lt με dH_2O . Το διάλυμα αποθηκεύεται στους 4°C .

Διάλυμα $20,2 \text{ mM EDTA}$ σε PBS, pH 7,4. Ζυγίζονται $750 \text{ mg Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ και διαλύονται σε 90 mL PBS . Προσθέτουμε $1-2$ σταγόνες 0.1 N NaOH ώστε να διαλυτοποιηθεί τελείως το EDTA. Εν συνεχεία το pH ρυθμίζεται σε 7.4 με $\text{NaOH } 1\text{N}$ και $\text{HCl } 1\text{N}$ και ο όγκος συμπληρώνεται στα $99,75 \text{ mL}$. Με την προσθήκη $10 \mu\text{L}$ του διαλύματος αυτού σε 1 mL άλλου διαλύματος προκύπτει διάλυμα $0,2 \text{ mM EDTA}$. Το διάλυμα αποθηκεύεται στους 4°C .

Διάλυμα 5 mM CuSO_4 . Ζυγίζονται $100 \text{ mg CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ και διαλύονται σε $80,1 \text{ mL dH}_2\text{O}$. Το διάλυμα αποθηκεύεται στους 4°C .

Διάλυμα 0.5 mM CuSO₄. 1 mL διαλύματος 5 mM CuSO₄ προστίθεται σε 9 mL dH₂O. Το διάλυμα αποθηκεύεται στους 4⁰C.

Πειραματική διαδικασία

Προετοιμασία της LDL για οξείδωση

Η LDL διατηρείται σε PBS, 0,2 mM EDTA, pH 7,4. Πριν την οξείδωση το διάλυμα της LDL υποβάλλεται σε εκτενή διαπίδυση για την απομάκρυνση του EDTA. Η LDL τοποθετείται σε μεμβράνη διαπίδυσης και τοποθετείται σε ποτήρι που περιέχει 200πλάσιο όγκο PBS pH 7,4. Η διαπίδυση γίνεται υπό συνεχή ανάδευση στους 4⁰C, για 24h. Το PBS αντικαθίσταται με νέο κάθε 8h. Μετά το πέρας της διαπίδυσης η LDL συλλέγεται και διηθείται από φίλτρο 0.20 μm. Ακολουθεί μέτρηση της πρωτεΐνης με τη μέθοδο Lowry. Η LDL θα χρησιμοποιηθεί εντός της ίδιας ημέρας και αποθηκεύεται μέχρι τη χρησιμοποίησή της σε ατμόσφαιρα N₂ με τοποθέτηση N₂ στο σωλήνα αποθήκευσης της LDL, ώστε να απομακρυνθεί κατά το δυνατό το O₂ και να μειωθεί στο ελάχιστο η οξείδωση. Εν συνεχεία η LDL αποθηκεύεται στους 4⁰C σε σκοτεινό περιβάλλον (κάλυψη του σωλήνα με αλουμινόχαρτο).

Οξείδωση της LDL

Η LDL τοποθετείται σε πλαστικούς σωλήνες από πολυπροπυλένιο με ευρεία βάση. Η συγκέντρωση της LDL προσαρμόζεται σε 0,2 mg/ml με την προσθήκη του κατάλληλου όγκου PBS pH 7,4 και η οξείδωση αρχίζει με την προσθήκη διαλύματος 0,5 mM CuSO₄, 10 μL ανά 1 mL τελικό όγκο διαλύματος, ώστε η τελική συγκέντρωση του CuSO₄ να είναι 5μM. Η οξείδωση γίνεται στους 37⁰C με τοποθέτηση σε υδατόλουτρο και υπό συνεχή ήπια ανάδευση. Η διάρκεια της οξείδωσης καθορίζεται στις 6h (μέτρια οξειδωμένη LDL, moderately oxidized LDL, MoxLDL) ή στις 24h (ισχυρά οξειδωμένη LDL, heavily oxidized LDL, HoxLDL)

Τερματισμός της οξείδωσης

Η οξείδωση της LDL τερματίζεται με την προσθήκη διαλύματος 20,2 mM EDTA σε PBS, pH 7,4, 10 μL ανά 1 ml του διαλύματος της LDL, ώστε η τελική συγκέντρωση του EDTA να είναι 0,2 mM. Μετά την προσθήκη του EDTA η οξειδωμένη LDL τοποθετείται αμέσως στους 4⁰C. Η οξειδωμένη LDL χρησιμοποιείται εντός μιας εβδομάδας.

III.1.4. ΟΞΕΙΔΩΣΗ ΦΩΣΦΟΛΙΠΙΔΙΩΝ

Αρχή της μεθόδου

Η οξειδωτική τροποποίηση των φωσφολιπιδίων επιτυγχάνεται με επώαση με ιόντα Cu^{2+} στους 37°C .

Αντιδραστήρια και όργανα

- 1-palmitoyl-2-arachidonyl-sn-glycero-3-phosphocholine (MB 782,1) (Sigma)
- 1-palmitoyl-2-arachidonyl-sn-glycero-3-phosphocholine [arachidonyl $-1\text{-}^{14}\text{C}$] 0,25 mCi/5 mL, 10 Ci/mmol (5 μM) (American Radiolabeled Chemicals).
- 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (MB 786,11) (Sigma)
- 1-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (MB 521,67) (Sigma)
- 1-palmitoyl-2-linoleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (MB 758,06) (Avanti Polar Lipids)
- Πλαστικοί σωλήνες από πολυπροπυλένιο των 5 mL
- Υδατόλουτρο υπερήχων (Elma, Transsonic Digital S)
- Ανακινούμενο υδατόλουτρο ρυθμιζόμενης θερμοκρασίας
- Πλαστικοί σωλήνες φυγοκέντρωσης από πολυπροπυλένιο των 15 mL (Corning)

Διαλύματα εργασίας

Διάλυμα 1 mg/ml 1-παλμιτόυλο-2-αραχιδονόυλο-sn-γλυκερο-3-φωσφοχολίνης (1-palmitoyl-2-arachidonyl-sn-glycero-3-phosphocholine, PAPC). 5 mg PAPC διαλύονται σε 5 mL $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$ (1:1, v/v). Το διάλυμα αποθηκεύεται σε αδιαφανές γυάλινο βιδωτό φιαλίδιο στους -20°C .

Διάλυμα 1-παλμιτόυλο-2-αραχιδονόυλο-sn-γλυκερο-3-φωσφοχολίνης [αραχιδονόυλο- $1\text{-}^{14}\text{C}$] (1-palmitoyl-2-arachidonyl-sn-glycero-3-phosphocholine [arachidonyl $-1\text{-}^{14}\text{C}$], [^{14}C]PAPC). 0,5 mL του αρχικού διαλύματος 1-palmitoyl-2-arachidonyl-sn-glycero-3-phosphocholine [arachidonyl $-1\text{-}^{14}\text{C}$], 0,25 mCi/5 mL διαλύονται με προσθήκη $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$ (1:1, v/v) σε τελικό όγκο 10 mL. Το διάλυμα που προκύπτει έχει περιεκτικότητα 2,5 $\mu\text{Ci/mL}$ και συγκέντρωση 5 μM , και αποθηκεύεται σε αδιαφανές γυάλινο βιδωτό φιαλίδιο στους -20°C .

Διάλυμα 1 mg/ml 1-παλμιτόυλο-2-λινελαϊκούυλο-sn-γλυκερο-3-φωσφοχολίνης (1-palmitoyl-2-linoleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine, PLPC). Σε 2,5 ml διαλύματος PLPC (10 mg/mL) σε CHCl_3 προστίθενται 2,5 ml MeOH (1:1, v/v) και εν συνεχεία 20 mL

CHCl₃:MeOH (1:1, v/v). Το διάλυμα αποθηκεύεται σε αδιαφανή γυάλινα βιδωτά φιαλίδια στους -20⁰C.

Διάλυμα 1 mg/ml 1,2-ελαϊκόϋλο-sn-γλυκερο-3-φωσφοχολίνης (1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine, DOPC). 25 mg DOPC διαλύονται σε 25 mL CHCl₃:MeOH (1:1, v/v). Το διάλυμα αποθηκεύεται σε αδιαφανή γυάλινα βιδωτά φιαλίδια στους -20⁰C.

Διάλυμα 1 mg/ml 1-ελαϊκόϋλο-sn-γλυκερο-3-φωσφοχολίνης (1-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine, lysoDOPC). 25 mg lysoDOPC διαλύονται σε 25 mL CHCl₃:MeOH (1:1, v/v). Το διάλυμα αποθηκεύεται σε αδιαφανή γυάλινα βιδωτά φιαλίδια στους -20⁰C.

Ρυθμιστικό διάλυμα PBS, pH 7,4.

Διάλυμα 20.2 mM EDTA σε PBS, pH 7,4.

Διάλυμα 0.5 mM CuSO₄.

Τα ανωτέρω διαλύματα παρασκευάζονται και αποθηκεύονται όπως περιγράφεται στην οξείδωση της LDL.

Πειραματική διαδικασία

Η ενδεικνυόμενη ποσότητα του προς οξείδωση φωσφολιπιδίου τοποθετείται σε πλαστικούς σωλήνες από πολυπροπυλένιο με ευρεία βάση. Ο διαλύτης απομακρύνεται μέχρι ξηρού με ρεύμα N₂. Σε πειράματα οξείδωσης PAPC στα οποία απαιτείται σήμανση με χρησιμοποίηση [¹⁴C]PAPC, 150μL από το διάλυμα [¹⁴C]PAPC προστίθεται για κάθε 1 mg μη σημασμένης PAPC. Οι διαλύτες απομακρύνονται μέχρι ξηρού με ρεύμα N₂. Στη συνέχεια τοποθετείται ποσότητα PBS pH 7,4 ώστε να προκύψει διάλυμα με τελική συγκέντρωση 0,5 μmol/mL. Ο σωλήνας πολυπροπυλενίου κλείνεται με πώμα και τοποθετείται σε υδατόλουτρο υπερήχων στους 37⁰C για 15 min με ενδιάμεσο vortex. Η οξείδωση αρχίζει με την προσθήκη διαλύματος 0,5 mM CuSO₄, 10 μL ανά 1 mL τελικό όγκο διαλύματος, ώστε η τελική συγκέντρωση του CuSO₄ να είναι 5μM. Η οξείδωση γίνεται στους 37⁰C με τοποθέτηση σε υδατόλουτρο και υπό συνεχή ήπια ανάδευση για 24h. Η οξείδωση τερματίζεται με την προσθήκη διαλύματος 20,2 mM EDTA σε PBS, pH 7,4, 10 μL ανά 1 mL του διαλύματος της LDL, ώστε η τελική συγκέντρωση του EDTA να είναι 0,2 mM. Μετά την προσθήκη του EDTA το οξειδωμένο φωσφολιπίδιο τοποθετείται στους 4⁰C.

III.1.5. ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΗΣ ΛΙΠΙΔΙΚΗΣ ΥΠΕΡΟΞΕΙΔΩΣΗΣ ΜΕ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΤΟΥ MDA [577]

Αρχή της μεθόδου

Κατά την οξειδωση των λιποπρωτεϊνών παράγονται λιπιδικά υπεροξειδία κυρίως αλδεΐδες μία από τις οποίες είναι η μαλονδιαλδεΐδη (malondialdehyde, MDA). Οι ουσίες αυτές αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ (αντιδρώσες ουσίες με το θειοβαρβιτουρικό, Thiobarbituric Reactive Substances, TBARS) παράγοντας φθορίζουσες ενώσεις. Για τον ακριβέστερο προσδιορισμό του MDA τα προϊόντα αντίδρασης με το θειοβαρβιτουρικό οξύ υπόκεινται σε διαχωρισμό με τη χρήση υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) με στήλη αντίστροφης φάσης (reversed phase). Ο διαχωρισμός με στήλη αντίστροφης φάσης βασίζεται στην πολικότητα των μορίων και στην κατανομή τους ανάμεσα στη μη πολική φάση της στήλης και στην πολική φάση του διαλύτη έκλουσης η οποία καθορίζει το χρόνο έκλουσής τους από τη στήλη. Ως πρότυπο χρησιμοποιείται διάλυμα MDA που προκύπτει από την υδρόλυση 1,1,3,3,τετραεθοξυπροπανίου (1,1,3,3,tetraethoxypropane, TEP) σε όξινο περιβάλλον.

Αντιδραστήρια και όργανα

- Στήλη Zorbax eclipse XDB C18 (4,6 x 150 mm, 5 μ m) (Agilent Technologies)
- 1,1,3,3,tetraethoxypropane (TEP), 97-98%, 0,918 g/mL (MB 220,3) (Sigma)
- 1,3-Diethyl-2-thibarbituric acid, DETBA, (MB 220,26) (Sigma)
- Butylated hydroxytoluene (BHT) (MB 220,04) (Sigma)
- H₃PO₄ 84-85% (MB 98) (Fluka)
- H₂O χρωματογραφικής καθαρότητας (Lab-Scan)
- Αιθανόλη χρωματογραφικής καθαρότητας (Lab-Scan)
- KOH (MB 56,11) (Ferak)
- KH₂PO₄ (MB 130,09) (Ferak)
- 1-βουτανόλη (Merck)
- Υγρός χρωματογράφος Hewlett-Packard (Agilent 1100 series) με απαερωτή αερίων και ανιχνευτή φθορισμού
- Μικροσύριγγες ακριβείας 50 και 100 μ L
- Αποστειρωμένα σιφόνια των 10 mL (Corning)

- Αποστειρωμένοι πλαστικοί σωλήνες φυγοκέντρησης από πολυπροπυλένιο των 15 mL (Corning)
- Ψυχόμενη φυγόκεντρος πάγκου (ALC, International SRL PK 131R)

Διαλύματα εργασίας

Διάλυμα αιθανόλης 40%. Αιθανόλη χρωματογραφικής καθαρότητας αναμειγνύεται με H₂O χρωματογραφικής καθαρότητας σε αναλογία όγκου 4:6. Το διάλυμα φιλτράρεται με συσκευή διήθησης 0.22 μm. Φυλάσσεται σε θερμοκρασία δωματίου.

Διάλυμα εργασίας 0,05 BHT σε αιθανόλη. Ζυγίζονται 10 mg BHT και διαλύονται σε 20 mL αιθανόλης χρωματογραφικής καθαρότητας. Φυλλάσσεται σε θερμοκρασία δωματίου.

Πρότυπο διάλυμα 10 mM TEP (stock TEP). Από 100 ml διαλύματος αιθανόλης 40% αφαιρούνται 246 μL και προστίθενται 246 μL πυκνού διαλύματος TEP. Το διάλυμα αποθηκεύεται στους 4⁰C και χρησιμοποιείται έως και 2 μήνες μετά την παρασκευή του.

Διάλυμα 0,44 M H₃PO₄. Από 50 mL H₂O χρωματογραφικής καθαρότητας αφαιρούνται 2,551 mL και προστίθενται 2,551 mL πυκνού διαλύματος H₃PO₄. Φυλάσσεται σε θερμοκρασία δωματίου.

Διάλυμα 42 mM DETBA. Ζυγίζονται 168 mg DETBA και διαλύονται σε H₂O χρωματογραφικής καθαρότητας με ανάδευση στους 50 – 55⁰C με την προσθήκη 0,5 mL 2N NaOH σε τελικό όγκο 20 mL. Το διάλυμα παρασκευάζεται την ημέρα του πειράματος και φυλάσσεται σε θερμοκρασία δωματίου.

Διάλυμα 1N KOH. 5,611 g NaOH διαλύονται σε 500 mL H₂O χρωματογραφικής καθαρότητας. Επειδή το KOH είναι σε μορφή σφαιριδίων και η ακριβής ζύγιση μιας συγκεκριμένης ποσότητας συχνά δεν είναι εφικτή, ζυγίζεται ποσότητα που προσεγγίζει την επιθυμητή και εν συνεχεία υπολογίζεται και προστίθεται ποσότητα H₂O χρωματογραφικής καθαρότητας που αντιστοιχεί ώστε να προκύψει τελική συγκέντρωση 1N. Το διάλυμα φυλάσσεται σε πλαστική φιάλη σε θερμοκρασία δωματίου.

Διάλυμα 50 mM φωσφορικό κάλιο, pH 6,8. Ζυγίζονται 6,804 g KH₂PO₄ και διαλύονται σε 800 mL H₂O χρωματογραφικής καθαρότητας. Το pH ρυθμίζεται σε 6,8 με KOH 2N και HCl 1N και ο όγκος συμπληρώνεται στο 1 lt με H₂O χρωματογραφικής καθαρότητας. Το διάλυμα φιλτράρεται με συσκευή διήθησης 0,22 μm και αποθηκεύεται στους 4⁰C.

Πειραματική διαδικασία

Στην μέτρηση του MDA, 75 μL δείγματος, προτύπων διαλυμάτων και μάρτυρα τοποθετούνται εις διπλούν σε βιδωτούς πλαστικούς σωλήνες φυγοκέντρωσης από πολυπροπυλένιο των 15 mL. Από διαλύματα μη οξειδωμένης LDL χρησιμοποιείται ποσότητα που περιέχει 15-30 μg πρωτεΐνης ενώ στην περίπτωση διαλυμάτων οξειδωμένης LDL τοποθετείται ποσότητα που περιέχει 5-10 μg πρωτεΐνης. Σε κάθε περίπτωση ο όγκος συμπληρώνεται με H_2O χρωματογραφικής καθαρότητας έως τα 75 μL τελικό όγκο. Ως πρότυπα χρησιμοποιούνται 75 μL από διαλύματα 0,25, 0,5, 1, 2, 3, 4 και 5 μM TEP που παρασκευάζονται την ημέρα του προσδιορισμού με κατάλληλες αραιώσεις του πρότυπου διαλύματος 10 mM TEP. Ως μάρτυρας χρησιμοποιείται ποσότητα 75 μL διαλύματος 40% αιθανόλης. Εν συνεχεία, προστίθενται 75 μL διαλύματος 0,05% BHT το οποίο τοποθετείται ως αντιοξειδωτικό για να αποτρέψει περαιτέρω οξείδωση της LDL κατά τη διάρκεια του προσδιορισμού. Ακολούθως προστίθενται 600 μL διαλύματος 0,44 M H_3PO_4 και 150 μL διαλύματος 42 mM DETBA. Ακολουθεί ισχυρή ανάδευση και στη συνέχεια οι σωλήνες τοποθετούνται σε ζέον ύδωρ για 1h. Αμέσως μετά οι σωλήνες τοποθετούνται στους 4⁰C για 10 min και στη συνέχεια τοποθετούνται 375 μL βουτανόλης. Μετά από ισχυρή ανάδευση ακολουθεί φυγοκέντρωση σε 12.000xg στους 4⁰C για 15 min για το διαχωρισμό των φάσεων. Από την άνω βουτανολική φάση παραλαμβάνονται 100 μL που θα χρησιμοποιηθούν για διαχωρισμό με HPLC.

Για τη διενέργεια της HPLC η στήλη Zorbax eclipse XDB C18 τοποθετείται με τις ειδικές συνδέσεις στον υγρό χρωματογράφο. Η ροή ρυθμίζεται σε 1 mL / min διαλύματος 50 mM φωσφορικό κάλιο, pH 6.8. Αρχικά γίνεται έκπλυση της στήλης με 10 mL διαλύματος B. Εν συνεχεία 100 μL από τη βουτανολική φάση που έχουν ληφθεί από την προηγούμενη φάση του προσδιορισμού εισάγονται στο σύστημα και η έκλουση της στήλης γίνεται με 1 mL / min διαλύματος 50 mM φωσφορικό κάλιο, pH 6.8 για 10min. Κατά τη διάρκεια της έκλουσης της στήλης καταγράφεται ο φθορισμός με ρύθμιση του ανιχνευτή φθορισμού σε διέγερση (excitation) στα 532 nm και σε εκπομπή (emission) στα 553nm. Μετά το πέρας της χρωματογραφίας ακολουθεί πλύση της στήλης με διάλυμα 10 ml διαλύματος αιθανόλης 20% με ροή 0,5 mL / min. Η στήλη στη συνέχεια αποθηκεύεται στους 4⁰C. Με βάση τις τιμές εκπομπής του μάρτυρα και των πρότυπων διαλυμάτων στο χρόνο έκλουσης του MDA σχηματίζεται καμπύλη βάσει της οποίας από τις τιμές εκπομπής των δειγμάτων στο χρόνο έκλουσης του MDA υπολογίζεται η συγκέντρωσή τους σε MDA. Τελικά, ο βαθμός οξείδωσης των δειγμάτων εκφράζεται σε nmoles MDA/mg πρωτεΐνης LDL.

III.1.6. ΣΗΜΑΝΣΗ LDL ΜΕ FITC [578]

Αρχή της μεθόδου

LDL επωάζεται με τη φθορίζουσα ουσία FITC (fluorescein isothiocyanate). Η ισοκυανική ομάδα του αντιδρά με αμινοομάδες των πρωτεϊνών. Έτσι μέρος του FITC ενσωματώνεται στη λιποπρωτεΐνη ενώ η ποσότητα που παραμένει ελεύθερη στο διάλυμα απομακρύνεται στη συνέχεια με εκτενή διαπίδυση.

Αντιδραστήρια και όργανα

- Fluorescein isothiocyanate isomer I (FITC ισομερές I), σε σκόνη (Sigma-Aldrich)
- Διάλυμα 0,5M Na₂CO₃ (Fluka)
- Σωλήνες φυγοκέντρησης με φίλτρο Amicon Ultra-15, 10.000 MWCO (molecular weight cut off) (Millirore)
- Ψυχόμενη φυγόκεντρος πάγκου (ALC, Internatinal SRL PK 131R)
- Μembrάνη διαπίδυσης (Visking dialysis tubing 27/32) (Serva)

Αντιδραστήρια για παρασκευή διαλύματος PBS, 0,2 mM EDTA όπως περιγράφηκαν στην απομόνωση των λιποπρωτεϊνών.

Διαλύματα εργασίας

Ρυθμιστικό διάλυμα PBS, 0,2 mM EDTA, pH 7,4. Παρασκευάζεται και αποθηκεύεται όπως περιγράφηκε στην απομόνωση των λιποπρωτεϊνών.

Ρυθμιστικό διάλυμα PBS, 0,2 mM EDTA, pH 8,6. Παρασκευάζεται PBS, 0,2 mM EDTA όπως περιγράφηκε με τη διαφοροποίηση ότι το pH ρυθμίζεται σε 8,6 με την προσθήκη διαλύματος 0,5M Na₂CO₃.

Διάλυμα FITC 2 mg/ml σε PBS, 0,2 mM EDTA, pH 8,6. 50 mg FITC διαλύονται σε 25 mL PBS, 0,2 mM EDTA, pH 8,6. Το διάλυμα προστατεύεται από το φως και χρησιμοποιείται αμέσως για τη σήμανση των λιποπρωτεϊνών.

Πειραματική διαδικασία

Το διάλυμα LDL που θα χρησιμοποιηθεί υπόκειται σε ολονύκτια διαπίδυση στους 4⁰C έναντι διαλύματος PBS, 0,2 mM EDTA, pH 8,6. Μετά το πέρας της διαπίδυσης προσδιορίζεται η συγκέντρωση της πρωτεΐνης και η συγκέντρωση προσαρμόζεται σε 2 mg/ml με προσθήκη διαλύματος PBS, 0,2 mM EDTA, pH 8,6. Στην περίπτωση που η

συγκέντρωση της πρωτεΐνης μετά την διαπύδιση είναι μικρότερη από 2 mg/mL το διάλυμα συμπυκνώνεται με φυγοκέντρηση σε σωλήνες φυγοκέντρησης Amicon Ultra-15 με φίλτρο που επιτρέπει τη διάδοση μορίων με MW < 10.000 5.000xg στους 4°C. Μετά τη συμπύκνωση ακολουθεί νέος προσδιορισμός πρωτεΐνης και η συγκέντρωση προσαρμόζεται σε 2 mg/ml με προσθήκη διαλύματος PBS, 0,2 mM EDTA, pH 8,6. Στο διάλυμα αυτό προστίθεται αργά, στάγδην και υπό συνεχή ήπια ανάδευση ποσότητα διαλύματος FITC 2 mg/mL σε αναλογία όγκου 9:1 έτσι ώστε να προκύψει τελική συγκέντρωση FITC 0,2 mg/mL και τελική συγκέντρωση της LDL 1,8 mg/mL. Το τελικό διάλυμα επωάζεται με ήπια ανάδευση και σε προστασία από φως, για 1h σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια το μη συνδεδεμένο με την πρωτεΐνη FITC απομακρύνεται με ολονύκτια διαπύδιση στους 4°C, στο σκοτάδι έναντι διαλύματος PBS, 0,2 mM EDTA, pH 7.4. Ακολούθως το διάλυμα φυγοκεντρείται σε 10,000 x g για 1 min για να απομακρυνθούν τυχόν αδιάλυτα συστατικά. Τελικά προσδιορίζεται εκ νέου η συγκέντρωση της πρωτεΐνης και το διάλυμα LDL-FITC αποθηκεύεται στους 4°C σε σκοτεινό περιβάλλον (κάλυψη του σωλήνα με αλουμινόχαρτο).

III.1.7. ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΛΙΠΙΔΙΩΝ ΤΗΣ ΦΥΣΙΚΗΣ LDL ΚΑΙ ΤΩΝ ΟΞΕΙΔΩΜΕΝΩΝ LDL ΜΕ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΛΕΠΤΗΣ ΣΤΟΙΒΑΔΑΣ [579]

Αρχή της μεθόδου

Τα λιπίδια κινούνται με διαφορετική ταχύτητα στην πλάκα της χρωματογραφίας λεπτής στοιβάδας (Thin Layer Chromatography, TLC) ανάλογα με την πολικότητά τους και την πολικότητα του μείγματος των διαλυτών που χρησιμοποιείται για την ανάπτυξη της πλάκας.

Αντιδραστήρια και όργανα

- Διάλυμα 50mg/mL σε CHCl₃ φωσφατιδυλοχολίνης από κρόκο αυγού (Sigma)
- Διάλυμα 20mg/mL σε CHCl₃ λυσοφωσφατιδυλοχολίνης από κρόκο αυγού (Sigma)
- Οργανικοί διαλύτες αναλυτικής καθαρότητας: χλωροφόρμιο (CHCl₃) (SDS), μεθανόλη (MeOH) (Merck)
- Πλάκες TLC 5cm x 20cm (Fluka)
- Θάλαμος TLC
- Κρύσταλλοι ιωδίου (Sigma)
- Πλαστικοί σωλήνες φυγοκέντρησης από πολυπροπυλένιο των 15 mL (Corning)

Διαλύματα εργασίας

Διάλυμα 1mg/mL σε CHCl₃ φωσφατιδυλοχολίνης από κρόκο αυγού. Σε 1 mL διαλύματος 50mg/mL σε CHCl₃ φωσφατιδυλοχολίνης από κρόκο αυγού προστίθενται 49 mL CHCl₃ και το διάλυμα αποθηκεύεται στους -20°C.

Διάλυμα 1mg/mL σε CHCl₃ λυσοφωσφατιδυλοχολίνης από κρόκο αυγού. Σε 1 mL διαλύματος 50mg/mL σε CHCl₃ λυσοφωσφατιδυλοχολίνης από κρόκο αυγού προστίθενται 49 mL CHCl₃ και το διάλυμα αποθηκεύεται στους -20°C.

Μείγμα διαλυτών CHCl₃:MeOH:dH₂O (65:35:6 v/v). Αναμειγνύονται 65 mL CHCl₃ με 35 mL MeOH και 5 mL dH₂O .

Πειραματική διαδικασία

Οι εσωτερικές πλευρές του θαλάμου της TLC καλύπτονται με διηθητικό χαρτί. Χρησιμοποιείται μείγμα διαλυτών CHCl₃:MeOH:dH₂O (65:35:6 v/v) το οποίο αποχύνεται μέσα στο θάλαμο της TLC. Ο θάλαμος αφήνεται να κορεστεί για τουλάχιστον 1h και το διηθητικό χαρτί να έχει πλήρως διαβραχεί. Η πλάκα της TLC χωρίζεται σε παράλληλες λωρίδες ανάλογα με τον αριθμό των πρότυπων λιπιδίων και τον αριθμό των δειγμάτων. Τα πρότυπα λιπίδια και τα δείγματα είναι διαλυμένα σε CHCl₃ και τοποθετούνται με πιπέτα Pasteur σε απόσταση 2 cm από την κάτω επιφάνεια της πλάκας (η γραμμή τοποθέτησης πρέπει να βρίσκεται σε επίπεδο ανώτερο από τη στάθμη του μείγματος των διαλυτών). Ως πρότυπα λιπίδια χρησιμοποιούνται φωσφατιδυλοχολίνη και λυσοφωσφατιδυλοχολίνη. Αφού εξατμιστεί ο διαλύτης η πλάκα τοποθετείται στο θάλαμο και αφήνεται να αναπτυχθεί μέχρις ότου το μέτωπο των διαλυτών φθάσει σε απόσταση 3-4 cm από το ανώτερο άκρο της πλάκας. Όταν ολοκληρωθεί η ανάπτυξη η πλάκα αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου μέχρι να εξατμισθούν πλήρως οι διαλύτες. Η εμφάνιση των ουσιών στην πλάκα γίνεται με τοποθέτηση της πλάκας σε θάλαμο στον οποίο έχουν τοποθετηθεί κρύσταλλοι ιωδίου και έχει κορεσθεί με ατμούς ιωδίου. Τα λιποειδή εμφανίζονται ως ιώδεις κηλίδες. Οι κηλίδες των προτύπων και των λιπιδίων των δειγμάτων στις αντίστοιχες θέσεις σημειώνονται πάνω στην πλάκα και στη συνέχεια το ιώδιο απομακρύνεται με ρεύμα N₂ εντός εστίας με απαγωγό. Αποξύνεται προσεκτικά η περιοχή του κάθε λιπιδίου που επιθυμούμε να ανακτήσουμε και το υλικό μεταφέρεται σε σωλήνες φυγοκέντρησης. Τα λιπίδια παραλαμβάνονται με εκχύλιση κατά Bligh-Dyer.

III.1.8. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΦΩΣΦΟΡΟΥ ΣΤΑ ΦΩΣΦΟΛΙΠΙΔΙΑ [580]

Αρχή της μεθόδου

Ο προσδιορισμός φωσφόρου βασίζεται στη μετατροπή του οργανικού φωσφόρου σε ανόργανα φωσφορικά άλατα, μετά από καύση με HClO_4 . Στη συνέχεια, με προσθήκη μολυβδαινικού αμμωνίου σχηματίζεται φωσφομολυβδαινικό αμμώνιο, το οποίο παρουσιάζει αμινο-ναφθολο-σουλφονικού οξέος ως αναγωγικού μέσου σε όξινο περιβάλλον, ανάγεται σε κυανό του φωσφομολυβδαινίου.

Αντιδραστήρια και όργανα

- Υπερχλωρικό οξύ 72% (12N HClO_4) (Merck)
- Ammonium-molybdate·4H₂O ($\text{NH}_4\text{Mo}_7\text{O}_{24}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$)(MB 1235,9) (Serva)
- Sodium hydrogen sulfite, NaHSO_3 (MB 104,06) (Merck)
- Sodium sulfite, Na_2SO_3 (MB 126,04) (Sigma)
- ANSA (4-amino-3-hydroxy-1-naphthalenesulfonic acid, αμινο-ναφθολο-σουλφονικό οξύ) (MB 239,2) (Sigma)
- KH_2PO_4 (MB 130,09) (Ferak)
- Αμμόλουτρο θερμοκρασίας 170-180⁰C
- Ψηλοί γυάλινοι βιδωτοί σωλήνες Pyrex
- Φωτόμετρο (Spectrophotometer U-2001, Hitachi)

Διαλύματα εργασίας

Μολυβδαινικό αμμώνιο 0,4%. Ζυγίζονται 2,125 ammonium-molybdate·4H₂O και διαλύονται σε dH₂O μέχρι τελικού όγκου 500 mL.

Διάλυμα ANSA (αμινο-ναφθολο-σουλφονικό οξύ). Διαλύονται 30 g NaHSO_3 και 6 g Na_2SO_3 σε 250 mL dH₂O. Στο διάλυμα αυτό των θειωδών αλάτων διαλύονται 0,5 g 1,2,4-αμινο-ναφθολο-σουλφονικού οξέος. Το διάλυμα αφήνεται σε ηρεμία και εάν μετά από τρεις ώρες σχηματιστεί ίζημα διηθείται και φυλάσσεται στους 4⁰C. Το διάλυμα θεωρείται κατάλληλο προς χρήση για ένα μήνα από την ημέρα της παρασκευής του.

Αντιδραστήριο ANSA. Παρασκευάζεται πριν από την εκτέλεση του προσδιορισμού με ανάμιξη 4 mL διαλύματος ANSA και 6 mL dH₂O.

Πρότυπο διάλυμα KH_2PO_4 συγκέντρωσης 4 μg P/ml. 1,7575 mg KH_2PO_4 διαλύονται σε 100 mL dH₂O. Το KH_2PO_4 ξηραίνεται στους 105⁰C για 1h πριν από τη ζύγιση.

Πειραματική διαδικασία

Δείγματα λιποειδούς που περιέχουν 0,5-5,0 μg φωσφόρου τοποθετούνται σε σωλήνες Pyrex και ο διαλύτης απομακρύνεται με ρεύμα N₂. Προσθέτονται 0,5 mL 72% HClO₄) και τοποθετούνται σε αμμόλουτρο θερμοκρασίας 170-180⁰C για 1h. Μετά το τέλος της καύσης τα δείγματα ψύχονται και αφήνονται να αποκτήσουν θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια προσθέτονται 1 mL dH₂O. Κατά τη διάρκεια της καύσης ετοιμάζονται τα πρότυπα δείγματα. Από το πρότυπο διάλυμα KH₂PO₄ προστίθενται σε 5 σωλήνες 0, 0,25, 0,5, 0,75 και 1 mL (0, 1, 2, 3, 4 μg φωσφόρου). Σε καθένα από τους σωλήνες της πρότυπης καμπύλης προστίθεται 0,5 mL 72% HClO₄ και ο όγκος συμπληρώνεται έως 1,5 mL με dH₂O. Από το σημείο αυτό τα δείγματα και τα πρότυπα κατεργάζονται με τον ίδιο τρόπο. Σε κάθε σωλήνα προστίθενται 3 mL διαλύματος 0,4% μολυβδαινικού αμμωνίου και 0,5 mL αντιδραστηρίου ANSA (μετά από κάθε προσθήκη γίνεται ανάδευση). Όλοι οι σωλήνες τοποθετούνται σε ζέον υδατόλουτρο για 10 min. Στη συνέχεια αφήνονται να ψυχθούν 20 min και φωτομετρούνται στα 820 nm. Με βάση τις τιμές απορρόφησης των πρότυπων δειγμάτων σχεδιάζεται με τη βοήθεια ηλεκτρονικού υπολογιστή η βέλτιστη ευθεία. Από την εξίσωση της πρότυπης καμπύλης και από τις απορροφήσεις των δειγμάτων υπολογίζεται η περιεκτικότητα των δειγμάτων σε φώσφορο. Με δεδομένα ότι 1 μόριο φωσφολιπιδίου περιέχει 1 άτομο φωσφόρου και το ατομικό βάρος του φωσφόρου είναι 30,97376, τα μmoles που περιέχονται στα μετρηθέντα δείγματα προκύπτουν διαιρώντας τα υπολογιθέντα μg φωσφόρου με το 30,97376.

III.1.9. ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΛΙΠΟΕΙΔΩΝ ΚΑΤΑ BLIGH-DYER [581]

Αρχή της μεθόδου

Με το σχηματισμό κατάλληλης πολικότητας μονοφασικού συστήματος διαλυτών επιτυγχάνεται η εκχύλιση όλων των λιποειδών. Με τη μετατροπή του μονοφασικού συστήματος σε διφασικό τα λιπίδια κατανέμονται στη χλωροφορμική φάση ενώ τα υδατοδιαλυτά συστατικά κατανέμονται στην υδατομεθανολική φάση.

Αντιδραστήρια και όργανα

- Οργανικοί διαλύτες αναλυτικής καθαρότητας: χλωροφόρμιο (CHCl₃) (SDS), μεθανόλη (MeOH) (Merck)

- Πλαστικοί σωλήνες φυγοκέντρησης από πολυπροπυλένιο των 15 ml (Corning)
- Γυάλινες πιπέτες Pasteur των 3 mL
- Κυκλοαναδευτήρας (vortex)
- Ψυχόμενη φυγόκεντρος πάγκου (ALC, International SRL PK 131R)

Πειραματική διαδικασία

Στο προς εκχύλιση δείγμα υδατικού διαλύματος λιποειδούς (στην περίπτωση φυσικής ή οξειδωμένης LDL διάλυμα 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$, στην περίπτωση διαλύματος φωσφολιπιδίων διάλυμα 0,5 $\mu\text{mol}/\text{mL}$) προστίθεται τριπλάσιος όγκος $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$ (1:2, v/v). Σχηματίζεται έτσι μονοφασικό μείγμα $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O}$ (1:2:1 v/v). Μετά από έντονη ανάδευση προστίθενται όγκος CHCl_3 ίσος προς τον αρχικό όγκο του προς εκχύλιση δείγματος και όγκος dH_2O ίσος προς το 0,8 του αρχικού όγκου του προς εκχύλιση δείγματος. Το μείγμα μετατρέπεται έτσι σε διφασικό μείγμα $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O}$ (1:1:0,9, v/v). Μετά από έντονη ανάδευση ακολουθεί φυγοκέντρηση για το διαχωρισμό των φάσεων σε 5.000xg, για 10 min, στους 4°C. Με την ολοκλήρωση της φυγοκέντρησης έχουν σχηματιστεί δύο ευδιάκριτες φάσεις, η άνω υδατομεθανολική και η κάτω χλωροφορμική. Η αναλογία όγκου μεταξύ της άνω και της κάτω φάσης είναι 65:35. Τα λιποειδή περιέχονται στην χλωροφορμική φάση η οποία και παραλαμβάνεται με πιπέτα Pasteur. Το χλωροφορμικό εκχύλισμα εξατμίζεται μέχρι ξηρού σε ρεύμα N_2 και τα λιποειδή επαναδιαλύονται σε $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$ (1:1, v/v) και αποθηκεύονται στους 4°C.

III.1.10. ΟΞΙΝΗ ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΛΙΠΟΕΙΔΩΝ [326, 328]

Αρχή της μεθόδου

Κατά την όξινη εκχύλιση το προς εκχύλιση δείγμα υδατικού διαλύματος λιποειδούς (λιποπρωτεΐνης ή φωσφολιπιδίων) μετατρέπεται σε όξινο διάλυμα με την προσθήκη HCl. Ακολουθεί εκχύλιση κατά Bligh-Dyer όπως αυτή περιγράφεται παραπάνω. Λόγω της έντονης οξינוποίησης, το σύνολο σχεδόν των υδατοδιαλυτών συστατικών (όπως μικρού M.W. προϊόντα υδρόλυσης και προϊόντα οξείδωσης) κατανέμονται στη χλωροφορμική φάση αντί για την υδατομεθανολική φάση στο διφασικό σύστημα που τελικά σχηματίζεται. Επιτυγχάνεται έτσι η εκχύλιση στην ίδια φάση του συνόλου των λιπιδίων και των μορίων που προέρχονται από την οξείδωση και την υδρόλυσή τους.

Αντιδραστήρια και όργανα

- Υδροχλωρικό οξύ 37% (10N HCl) (Mallinckrodt)
- Κωνική γυάλινη φιάλη με γυάλινο πώμα με σμύρισμα χωρητικότητας 25 mL
- Λοιπά όπως περιγράφονται στην εκχύλιση κατά Bligh-Dyer

Διαλύματα εργασίας

Υδροχλωρικό οξύ 0,5N (0,5N HCl). Από το πυκνό διάλυμα 10N HCl μεταφέρεται 1 mL σε κωνική γυάλινη φιάλη με γυάλινο πώμα με σμύρισμα και προστίθενται 19 mL dH₂O. Η αραίωση γίνεται μέσα σε εστία και το διάλυμα αποθηκεύεται εκεί.

Πειραματική διαδικασία

Στο προς εκχύλιση δείγμα υδατικού διαλύματος λιποειδούς προστίθεται ποσότητα 0,5N HCl ώστε να προκύψει τελική συγκέντρωση 10mN HCl (10μL 0,5N HCl για τελικό όγκο 0,5 mL υδατικού διαλύματος λιποειδούς). Ακολουθεί εκχύλιση κατά Bligh-Dyer.

III.1.11. ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΛΙΠΟΕΙΔΩΝ ΚΑΤΑ FOLCH, LEES, STANLEY [582]

Αρχή της μεθόδου

Αρχικά με την προσθήκη μείγματος χλωροφορμίου και μεθανόλης σχηματίζεται μονοφασικό σύστημα διαλυτών με το οποίο επιτυγχάνεται η εκχύλιση όλων των λιποειδών. Με την προσθήκη ποσότητας υδατικού διαλύματος το σύστημα μετατρέπεται στη συνέχεια σε διφασικό, με την κάτω χλωροφορμική φάση να περιέχει τα λιπίδια και την άνω υδατομεθανολική φάση να περιέχει τα υδατοδιαλυτά συστατικά.

Αντιδραστήρια και όργανα

- Οργανικοί διαλύτες αναλυτικής καθαρότητας: χλωροφόρμιο (CHCl₃) (SDS), μεθανόλη (MeOH) (Merck)
- NaCl (MB 58,44) (Merck)
- Πλαστικοί σωλήνες φυγοκέντρωσης από πολυπροπυλένιο των 15 mL (Corning)
- Γυάλινες πιπέττες Pasteur των 3 mL
- Κυκλοαναδευτήρας (vortex)
- Ψυχόμενη φυγόκεντρος πάγκου (ALC, International SRL PK 131R)

Διαλύματα εργασίας

Διάλυμα NaCl 0,9%. Ζυγίζονται 900 mg NaCl και διαλύονται σε 100 mL dH₂O.

Πειραματική διαδικασία

Στο προς εκχύλιση δείγμα υδατικού διαλύματος λιποειδούς προστίθεται 22,5πλάσιος όγκος CHCl₃:MeOH (2:1, v/v). Μετά από έντονη ανάδευση προστίθενται διάλυμα NaCl 0,9% σε όγκο το άθροισμα του οποίου με την αρχική ποσότητα του να αποτελεί το 0,2 του όγκου του CHCl₃:MeOH που προστέθηκε. Το μείγμα μετατρέπεται έτσι σε διφασικό μείγμα CHCl₃:MeOH:H₂O (2:1:0,6, v/v). Μετά από έντονη ανάδευση ακολουθεί φυγοκέντρηση για το διαχωρισμό των φάσεων σε 5.000xg, για 10 min, στους 4⁰C. Με την ολοκλήρωση της φυγοκέντρησης έχουν σχηματιστεί δύο ευδιάκριτες φάσεις, η άνω υδατομεθανολική και η κάτω χλωροφορμική. Η αναλογία όγκου μεταξύ της άνω και της κάτω φάσης είναι 40:60. Τα λιποειδή περιέχονται στην χλωροφορμική φάση ενώ τα υδατοδιαλυτά μόρια κατανέμονται στην υδατομεθανολική φάση. Η παραλαβή των δύο φάσεων γίνεται με πιπέτες Pasteur.

III.1.12. ΜΕΤΡΗΣΗ ΡΑΔΙΕΝΕΡΓΕΙΑΣ ΜΕ ΜΕΤΡΗΤΗ ΣΠΙΝΘΗΡΙΣΜΟΥ ΥΓΡΩΝ

Αρχή της μεθόδου

Το ραδιενεργό δείγμα αναμειγνύεται με το διάλυμα σπινθηρισμού το οποίο περιέχει μία ή περισσότερες φθορίζουσες ουσίες. Τα εκπεμπόμενα από το ραδιενεργό δείγμα β σωματίδια διεγείρουν τις φθορίζουσες ουσίες που εκπέμπουν φωτόνια τα οποία μέσω ενός φωτοπολλαπλασιαστή ανιχνεύονται σαν παλμός. Οι παλμοί καταγράφονται από ένα σύστημα μέτρησης σαν κρούσεις.

Αντιδραστήρια και όργανα

- 2,5-Διφαινυλοξαζόλιο (2,5-Diphenyloxazole, PPO) (MB 221,3) (Serva)
- 1,4-Δι-2-(5-φαινυλοξαζόλιο) βενζόλιο (1,4-Bis[2-(5-phenyl)-oxazolyl]benzene, POPOP) (MB 364,4) (Serva)
- Ναφθαλίνιο (naphthalene) (MB 128,16) (Merck)
- Διοξάνη (Dioxanne-1-4) (SDS)
- Κυκλοαναδευτήρας (vortex)
- Πλαστικά φιαλίδια όγκου 20 mL με βιδωτό πώμα για μετρητή σπινθηρισμού υγρών

- Μετρητής σπινθηρισμού υγρών (Wallac 1209 Racbeta, Pharmacia) συνδεδεμένος με καταγραφέα (Facit B3100)

Διαλύματα εργασίας

Υγρό σπινθηρισμού. Το διάλυμα παρασκευάζεται διαλύοντας 7 g PPO, 0,3 g POPOP και 100 g ναφθαλινίου σε 1 lt διοξάνης και 200 mL H₂O. Το διάλυμα παρασκευάζεται εντός εστίας και αποθηκεύεται σε αδιαφανές γυάλινο δοχείο σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.

Αναλυτική πορεία

Τα δείγματα, όγκου έως 0,3 mL, τοποθετούνται στα πλαστικά φιαλίδια και προστίθενται 5 mL υγρού σπινθηρισμού. Επίσης παρασκευάζεται τυφλό με τοποθέτηση μόνο του υγρού σπινθηρισμού. Μετά από ισχυρή ανάδευση με κυκλοαναδευτήρα, τα φιαλίδια τοποθετούνται με ειδικές υποδοχές (raks) στο μετρητή σπινθηρισμού υγρών. Σε κάθε δείγμα μετρώνται οι κρούσεις ανά λεπτό (cpm) για χρονικό διάστημα που έχει προεπιλεγεί (5 έως 10 min). Από την τιμή που μετράται σε κάθε δείγμα αφαιρείται η τιμή του τυφλού.

III.1.13. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΗΣ Lp-PLA₂ [104]

Αρχή της μεθόδου

Η δραστικότητα της Lp-PLA₂ προσδιορίζεται με τη μέτρηση των ραδιοσημασμένων οξεικών ομάδων που απελευθερώνονται κατά την υδρόλυση του υποστρώματος [³H]-PAF από το ένζυμο. Οι ομάδες αυτές παραμένουν στην άνω υδατομεθανολική φάση μετά από εκχύλιση κατά Folch, Lees, Stanley ενώ το ακέραιο μόριο του PAF εκχυλίζεται στην κάτω χλωροφορμική φάση.

Αντιδραστήρια και όργανα

- [³H]PAF (1-O-palmityl-2-[³H acetyl]-sn-glycero-3-phosphocholine, 1-O- παλμιτυλο - 2-[³H -ακέτυλο]sn-γλύκερο-3-φωσφοχολίνη) 0,25 mCi/5 mL, 10 Ci/mmol (5μM) (New England Nuclear)
- PAF (1-O-palmityl-2-acetyl-sn-glycero-3-phosphocholine, 1-O-παλμιτυλο-2-ακετυλο-sn-γλυκερο-3-φωσφοχολίνη) (M.B.: 541,7) (Sigma)
- Πλαστικοί σωλήνες από πολυπροπυλένιο των 5 mL

- Υδατόλουτρο υπερήχων (Elma, Transsonic Digital S)
- Ανακινούμενο υδατόλουτρο ρυθμιζόμενης θερμοκρασίας
- Πλαστικοί σωλήνες φυγοκέντρησης από πολυπροπυλένιο των 15 mL (Corning)
- Φυγόκεντρος πάγκου (ALC, International SRL PK 131R)
- Πλαστικά φιαλίδια όγκου 20 mL για μετρητή σπινθηρισμού υγρών
- Μετρητής σπινθηρισμού υγρών (Wallac 1209 Racbeta, Pharmacia) συνδεδεμένος με καταγραφέα (Facit B3100)

Διαλύματα εργασίας

Διάλυμα 1 mM PAF. 1 mg PAF διαλύεται σε 1,846 mL CHCl_3 :MeOH (1:1, v/v). Το διάλυμα διατηρείται στους -20°C .

Πυκνό διάλυμα [^3H]PAF. 1 mL του αρχικού διαλύματος [^3H]PAF σε αιθανόλη, 0,25 mCi/5 ml διαλύονται με προσθήκη αιθανόλης αναλυτικής καθαρότητας σε τελικό όγκο 2,5 mL. Το διάλυμα που προκύπτει έχει περιεκτικότητα 10 $\mu\text{Ci/mL}$ και αποθηκεύεται σε αδιαφανές γυάλινο βιδωτό φιαλίδιο στους -20°C .

Διάλυμα 100 μM [^3H]PAF. Το διάλυμα αυτό παρασκευάζεται αμέσως πριν από κάθε πειραματικό προσδιορισμό δραστηριότητας Lp-PLA₂. Η αναγκαία για το πείραμα ποσότητα διαλύματος 1 mM PAF τοποθετείται σε σωλήνα πολυπροπυλενίου των 5 ml. Για κάθε 100 μl διαλύματος 1 mM PAF προστίθενται 15 μL πρότυπου διαλύματος [^3H]PAF. Οι διαλύτες απομακρύνονται μέχρι ξηρού με ρεύμα N_2 . Στη συνέχεια τοποθετείται ποσότητα PBS pH 7,4 ώστε να προκύψει διάλυμα με τελική συγκέντρωση 100 μM PAF (για κάθε 10 μL αρχικής ποσότητας διαλύματος 1 mM PAF τοποθετούνται 100 μL διαλύματος PBS pH 7,4). Ο σωλήνας πολυπροπυλενίου κλείνεται με πώμα και τοποθετείται σε υδατόλουτρο υπερήχων στους 37°C για 15 min με ενδιάμεσο vortex. Στο τέλος της διαδικασίας ο PAF είναι πλήρως διαλυτοποιημένος με τη μορφή μικυλλίων.

Υγρό σπινθηρισμού (dioxane base). Όπως περιγράφεται ανωτέρω.

Πειραματική διαδικασία

Σε πλαστικούς σωλήνες από πολυπροπυλένιο των 5 mL τοποθετούνται 10 μL διαλύματος 10 mM [^3H]PAF (1 nmole PAF). Εν συνεχεία τοποθετείται ποσότητα 5 -10 μL του προς μέτρηση δείγματος το οποίο είναι γνωστής περιεκτικότητας σε πρωτεΐνη (πλάσμα, διάλυμα λιποπρωτεΐνης, διαλύματα που έχουν ληφθεί από τις φάσεις καθαρισμού της Lp-PLA₂). Επίσης ετοιμάζεται και μάρτυρας στον οποίο τοποθετούνται 10 μL διαλύματος 10

mM [^3H]PAF (1 nmole) χωρίς τοποθέτηση ενζυμικού παρασκευάσματος, και τυφλό στο οποίο δεν τοποθετείται ούτε ενζυμικό παρασκεύασμα ούτε [^3H]PAF. Στην περίπτωση που τα μετρούμενα δείγματα είναι πλάσμα, διάλυμα λιποπρωτεΐνης, στο μάρτυρα και στο τυφλό τοποθετείται ίση ποσότητα με αυτή του δείγματος διαλύματος PBS pH 7,4, ενώ στην περίπτωση που τα μετρούμενα δείγματα είναι διαλύματα που έχουν ληφθεί από τις φάσεις καθαρισμού της Lp-PLA₂ τοποθετείται στο μάρτυρα και στο τυφλό ίση ποσότητα του διαλύματος στο οποίο βρίσκονται τα ενζυμικά παρασκευάσματα. Ο όγκος σε όλα τα σωληνάρια (τυφλό, μάρτυρας και δείγματα) συμπληρώνεται έως τελικού όγκου 100 μL με PBS pH 7,4. Η τελική συγκέντρωση του PAF στο μάρτυρα και στα δείγματα είναι 10 μM . Σε κάθε πείραμα όλα τα σωληνάρια (τυφλό, μάρτυρας και δείγματα) προετοιμάζονται εις διπλούν.

Τα σωληνάρια τοποθετούνται σε υδατόλουτρο στους 37⁰C υπό ανάδευση για 5-10 min. Στο τέλος της επώασης η ενζυμική αντίδραση σταματά με την προσθήκη 1,5 mL $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$ (1:1, v/v) που αποτελεί και το πρώτο βήμα για εκχύλιση κατά Folch, Lees, Stanley. Μετά από μεταφορά σε πλαστικούς σωλήνες φυγοκέντρησης από πολυπροπυλένιο των 15 mL συνεχίζεται η διαδικασία της εκχύλισης κατά Folch, Lees, Stanley (όπως περιγράφηκε παραπάνω) με την προσθήκη 0,75 mL CHCl_3 και ακολούθως 0,47 mL υδατικού διαλύματος 0,9% NaCl. Ο τελικός όγκος είναι 2,820 mL. Οι δύο φάσεις διαχωρίζονται πλήρως με φυγοκέντρηση σε 5.000xg, για 10 min, στους 4⁰C. Στην άνω φάση περιέχονται τα ραδιοσημασμένα μόρια οξικού που έχουν απελευθερωθεί με την υδρόλυση ενώ στην κάτω φάση περιέχονται τα ραδιοσημασμένα μόρια του PAF που δεν έχουν υδρολυθεί καθώς και τα μόρια lysoPAF που έχουν προκύψει από την υδρόλυση και τα οποία δεν διαθέτουν πλέον τη ραδιοσημασμένη οξική ομάδα. Από τις δύο φάσεις λαμβάνονται ξεχωριστά από 0,5 mL τα οποία τοποθετούνται σε φιαλίδια μέτρησης β-ακτινοβολίας στα οποία τοποθετούνται 10 mL υγρού σπινθηρισμού και ακολουθεί vortex. Στην ποσότητα 0,5 mL άνω ή κάτω φάσης που λαμβάνεται από το τυφλό προστίθενται 10 μL διαλύματος 10 mM [^3H]PAF (1 nmole). Τα φιαλίδια φυλάσσονται σε σκοτεινό περιβάλλον έως την μέτρηση της β-ακτινοβολίας. Η β-ακτινοβολία μετράται σε Cpm σε β-counter. Με τη μέτρηση της β-ακτινοβολίας γνωστής ποσότητας [^3H]PAF, 1 nmole, στην άνω ή στην κάτω φάση που λαμβάνεται από το τυφλό, προσδιορίζεται ο αριθμός των Cpm που αντιστοιχούν σε 1 nmole [^3H]PAF όταν αυτό είναι διαλυμένο σε 0,5 mL άνω ή κάτω φάσης της εκχύλισης κατά Folch, Lees, Stanley (Cpm_{1nmole [^3H]PAF σε άνω φάση}, Cpm_{1nmole [^3H]PAF σε κάτω φάση}). Καθώς είναι γνωστή η κατανομή των όγκων στην εκχύλιση κατά Folch, Lees, Stanley (40% στην άνω φάση και 60% στην κάτω φάση), υπολογίζεται βάσει του τελικού όγκου της εκχύλισης

(2,820 mL) το σύνολο των nmoles στο σύνολο της άνω και της κάτω φάσης με βάση τους τύπους $nmoles_{\text{σύνολο άνω φάσης}} = (Cpm_{\text{άνω φάσης}} / Cpm_{1nmole [^3H]PAF \text{ σε άνω φάση}}) \times 1128/500$ και $nmoles_{\text{σύνολο κάτω φάσης}} = (Cpm_{\text{άνω φάσης}} / Cpm_{1nmole [^3H]PAF \text{ σε κάτω φάση}}) \times 1692/500$. Στη συνέχεια υπολογίζεται το άθροισμα τους που αντιστοιχεί στο σύνολο του αρχικά τοποθετημένου ραδιενεργά σημασμένου [3H]PAF (nmoles ολικά). Ακολούθως υπολογίζεται το κλάσμα $nmoles_{\text{σύνολο άνω φάσης}} / nmoles_{\text{ολικά}}$. Η ποσότητα του [3H]PAF που υδρολύθηκε σε κάθε δείγμα υπολογίζεται από τη σχέση $(nmoles_{\text{σύνολο άνω φάσης}} / nmoles_{\text{ολικά}})_{\text{δείγματος}} - (nmoles_{\text{σύνολο άνω φάσης}} / nmoles_{\text{ολικά}})_{\text{μάρτυρα}}$. Να σημειωθεί ότι το ποσό της ραδιενέργειας που μετράται στην άνω φάση του μάρτυρα και το οποίο παριστά μη υδρολυθέντα μόρια PAF που ανακτώνται στην άνω φάση, $(nmoles_{\text{σύνολο άνω φάσης}} / nmoles_{\text{ολικά}})_{\text{μάρτυρα}}$, είναι μικρότερο του 0,02. Για τον ακριβέστερο προσδιορισμό της ενζυμικής δραστηριότητας το ποσό αυτό αφαιρείται από το αντίστοιχο του δείγματος. Η δραστηριότητα της Lp-PLA₂ υπολογίζεται από τη διαίρεση της ποσότητας που υδρολύθηκε με τον χρόνο επώασης σε min (t_{min}) και την ποσότητα πρωτεΐνης του δείγματος σε mg : $(nmoles_{\text{σύνολο άνω φάσης}} / nmoles_{\text{ολικά}})_{\text{δείγματος}} - (nmoles_{\text{σύνολο άνω φάσης}} / nmoles_{\text{ολικά}})_{\text{μάρτυρα}}] / t_{\text{min}} \times \text{mg πρωτεΐνης δείγματος}$. Έτσι η δραστηριότητα της Lp-PLA₂ εκφράζεται τελικά ως nmoles PAF που υδρολύονται ανά mg πρωτεΐνης ανά min.

III.1.14. ΑΝΑΣΤΟΛΗ ΤΗΣ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΗΣ Lp-PLA₂ [583]

Αρχή της μεθόδου

Το Pefabloc, 4-[2-aminoethyl]benzenesulfonyl fluoride, ανήκει στους μη αντιστρεπτούς αναστολείς των πρωτεϊνών σερίνης. Επώαση πλάσματος ή λιποπρωτεϊνών με Pefabloc προκαλεί πλήρη αναστολή της δραστηριότητας της Lp-PLA₂ (10).

Αντιδραστήρια και όργανα

- Pefabloc, 4 - [2 - aminoethyl] benzenesulfonyl fluoride (4 - (2 -αμινοαιθυλο) βενζοσουλφόνυλο φθορίδιο) (MB 239,7) (Sigma)
- Πλαστικοί σωλήνες από πολυπροπυλένιο των 5 mL
- Ανακινούμενο υδατόλουτρο ρυθμιζόμενης θερμοκρασίας
- Μembrάνη διαπίδυσης (Visking dialysis tubing 27/32) (Serva)

Διαλύματα εργασίας

Διάλυμα 20mM Pefabloc. 10 mg Pefabloc διαλύονται σε 4,172 mL dH₂O. Το διάλυμα αποθηκεύεται στους -20⁰C.

Ρυθμιστικό διάλυμα PBS, 0,2 mM EDTA, pH 7,4. (βλέπε απομόνωση λιποπρωτεϊνών)

Πειραματική διαδικασία

Σε πλαστικούς σωλήνες από πολυπροπυλένιο των 5 mL τοποθετούνται 0,5 mg πρωτεΐνης LDL από διάλυμα LDL σε PBS pH 7.4. Προστίθενται 50 μ L από το διάλυμα 20 mM Pefabloc. Ο όγκος συμπληρώνεται με PBS pH 7.4 έως τελικού όγκου 1 ml. Η τελική συγκέντρωση της LDL είναι 0,5 mg πρωτεΐνης/ml και η τελική συγκέντρωση του Pefabloc είναι 1mM. Οι πλαστικοί σωλήνες τοποθετούνται σε υδατόλουτρο στους 37⁰C υπό ανάδευση για 1h. Στο τέλος της επώασης η περίσσεια του Pefabloc απομακρύνεται με τοποθέτηση του διαλύματος της LDL σε μεμβράνη διαπίδυσης και ακολουθεί διαδικασία διαπίδυσης έναντι PBS, 0,2 mM EDTA, pH 7,4 όπως έχει περιγραφεί στην απομόνωση της LDL. Στο τέλος της διαδικασίας διαπίδυσης γίνεται νέα μέτρηση της πρωτεΐνης με τη μέθοδο Lowry. Η πλήρης αναστολή της δραστηριότητας της Lp-PLA₂ ελέγχεται με μέτρηση ενζυμικής δραστηριότητας όπως περιγράφηκε ανωτέρω. Η LDL αποθηκεύεται σε ατμόσφαιρα N₂ στους 4⁰C σε σκοτεινό περιβάλλον όπως έχει περιγραφεί στην απομόνωση της LDL.

III.1.15. ΜΕΡΙΚΟΣ ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ Lp-PLA₂ ΑΠΟ LDL [359]

Ο μερικός καθαρισμός Lp-PLA₂ από LDL περιλαμβάνει τα εξής στάδια: α) απομόνωση LDL από ανθρώπινο πλάσμα β) χρωματογραφία με στήλη DEAE-Sepharose CL-6B γ) χρωματογραφία υψηλής απόδοσης με στήλη Resource Q δ) επαναδιάλυση της μερικώς καθαρισμένης Lp-PLA₂ σε διάλυμα που περιέχει ως απορρυπαντικό το octyl glucoside (OG).

A) Απομόνωση LDL από ανθρώπινο πλάσμα

Η απομόνωση της LDL από ανθρώπινο πλάσμα γίνεται όπως περιγράφηκε παραπάνω. Στο πλάσμα και στο διάλυμα της LDL μετρώνται η περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη και η δραστηριότητα της Lp-PLA₂.

B) Χρωματογραφία με στήλη DEAE-Sepharose CL-6B [359]

Αρχή της μεθόδου

Ο καθαρισμός με τη χρήση στήλης DEAE-Sepharose CL-6B στηρίζεται στην ανταλλαγή ανιόντων η οποία γίνεται μέσω των φορτισμένων διαιθυλο-αμινο-αίθυλο-ομάδων (diethylaminoethyl, DEAE) που περιέχονται στο υλικό της στήλης. Η συνήθης διαδικασία περιλαμβάνει αρχικά τη σύνδεση των μορίων της πρωτεΐνης που επιθυμείται να απομονωθεί στο υλικό της στήλης επιτρέποντας σε άλλες ουσίες να εκκλούνται από τη στήλη, ενώ στη συνέχεια και τα μόρια που είχαν συνδεθεί στη στήλη εκκλούνται με μεταβολή της συγκέντρωσης του άλατος ή του pH του διαλύματος έκλυσης της στήλης.

Αντιδραστήρια και όργανα

- DEAE Sepharose CL-6B (Pharmacia Biotech)
- Potassium dihydrogen phosphate, KH_2PO_4 (MB 136,09) (Ferak)
- Tween 20, ειδικό βάρος 1.1 g/mL (Serva)
- Butylated hydroxytoluene (BHT) (MB 220,04) (Sigma)
- Υδροξείδιο του καλίου (KOH) σε σφαιρίδια (pellets) (MB 56.11) (Merck)
- KCl (MB 74,56) (Merck)
- Υδροξείδιο του νατρίου, NaOH σε σφαιρίδια (pellets) (M.B. 40) (Merck)
- Αιθανόλη αναλυτικής καθαρότητας (Merck)
- Γυάλινη στήλη με ηθμό πορσελάνης διαμέτρου 1,2 cm και ύψους 20 cm
- Μεμβράνη διαπίδυσης (Visking dialysis tubing 27/32) (Serva)
- Σωλήνες φυγοκέντρωσης με φίλτρο, Amicon Ultra-15 (10.000 MWCO) (Millipore)
- Αποστειρωμένα σιφόνια των 10 mL (Corning)
- Αποστειρωμένοι πλαστικοί σωλήνες φυγοκέντρωσης από πολυπροπυλένιο των 15 και 50 mL (Corning)
- Πλαστικοί σωλήνες από πολυπροπυλένιο με ευρεία βάση των 5 mL
- Φίλτρα διήθησης 0.20 μm (Corning)
- Αποστειρωμένες συσκευές διήθησης 0,22 μm , 500mL, (Corning)
- Ψυχόμενη φυγόκεντρος πάγκου (ALC, International SRL PK 131R)
- Συσκευή αντλίας κενού
- Συσκευή επίπεδης περιστροφικής ανάδευσης

Διαλύματα εργασίας

Διάλυμα εργασίας 5,5% Tween 20. Το Tween 20 είναι ιξώδες υγρό και η ακριβής λήψη μικρών ποσοτήτων με αυτόματη πιπέτα είναι ιδιαίτερα επισφαλής. Για το λόγο αυτό παρασκευάζεται αραιό διάλυμα εργασίας με αραιώση όγκου 1 προς 20 του Tween 20 σε dH₂O. Λαμβάνεται ποσότητα 10 ml Tween 20 με σιφόνιο των 10 ml και προστίθεται σε 190 ml dH₂O με έκπλυση του σιφωνίου με πολλαπλές αναρροφήσεις και αποχύσεις. Το Tween 20 διαλύεται με ήπια ανάδευση, φιλτράρεται με συσκευή διήθησης 0.22 μm και παραμένει σε θερμοκρασία δωματίου.

Διάλυμα εργασίας 200 mM BHT σε αιθανόλη. Ζυγίζονται 50 mg butylated hydroxytoluene (BHT) και διαλύονται σε 1134 μL αιθανόλης. Το διάλυμα παραμένει σε θερμοκρασία δωματίου.

Διάλυμα 1N KOH. 2,81 gr KOH διαλύονται σε 50 ml dsH₂O. Επειδή το KOH είναι σε μορφή σφαιριδίων και η ακριβής ζύγιση μιας συγκεκριμένης ποσότητας συχνά δεν είναι εφικτή, ζυγίζεται ποσότητα που προσεγγίζει την επιθυμητή και εν συνεχεία υπολογίζεται και προστίθεται ποσότητα dsH₂O που αντιστοιχεί ώστε να προκύψει τελική συγκέντρωση 1N. Το διάλυμα φυλάσσεται σε πλαστική φιάλη σε θερμοκρασία δωματίου.

Ρυθμιστικό διάλυμα A: 10 mM φωσφορικό κάλιο, 0,1% Tween 20, 10μM butylated hydroxytoluene, pH 6,8. 1,3609 g KH₂PO₄, 18,182 mL διαλύματος εργασίας Tween 20 και 1134 μL διαλύματος εργασίας BHT διαλύονται σε 900 mL dH₂O. Το pH ρυθμίζεται σε 6,8 με KOH 1N και HCl 1N και ο όγκος συμπληρώνεται στο 1 lt με dH₂O. Το διάλυμα φιλτράρεται με συσκευή διήθησης 0,22 μm και αποθηκεύεται στους 4⁰C.

Ρυθμιστικό διάλυμα A 0,3M KCl: Το διάλυμα παρασκευάζεται όπως το ρυθμιστικό διάλυμα A με την προσθήκη 22,368 g KCl για 1 lt τελικού όγκου διαλύματος. Το pH ρυθμίζεται σε 6,8 με KOH 1N και HCl 1N και ο όγκος συμπληρώνεται στο 1 lt με dH₂O. Το διάλυμα φιλτράρεται με συσκευή διήθησης 0,22 μm και αποθηκεύεται στους 4⁰C.

Διάλυμα 1N NaOH. 4 g NaOH διαλύονται σε 100 mL dsH₂O. Επειδή το NaOH είναι σε μορφή σφαιριδίων και η ακριβής ζύγιση μιας συγκεκριμένης ποσότητας συχνά δεν είναι εφικτή, ζυγίζεται ποσότητα που προσεγγίζει την επιθυμητή και εν συνεχεία υπολογίζεται και προστίθεται ποσότητα dsH₂O που αντιστοιχεί ώστε να προκύψει τελική συγκέντρωση 1N. Το διάλυμα φυλάσσεται σε πλαστική φιάλη σε θερμοκρασία δωματίου.

Διάλυμα αιθανόλης 70%. Αιθανόλη αναμειγνύεται με dsH₂O σε αναλογία όγκου 7:3. Το διάλυμα φιλτράρεται με συσκευή διήθησης 0,22 μm και αποθηκεύεται στους 4⁰C.

Διάλυμα αιθανόλης 20%. Αιθανόλη αναμειγνύεται με dsH₂O σε αναλογία όγκου 2:8. Το διάλυμα φιλτράρεται με συσκευή διήθησης 0,22 μm και αποθηκεύεται στους 4⁰C.

Πειραματική διαδικασία

Σε διάλυμα LDL σε PBS pH 7,4 προστίθεται ποσότητα διαλύματος εργασίας 5,5% Tween 20 ώστε να προκύψει διάλυμα LDL σε 0.1% σε Tween 20. Προστίθενται 182 μ L διαλύματος εργασίας 5,5% Tween 20 για κάθε 10ml τελικού όγκου διαλύματος LDL σε 0.1% σε Tween 20. Ακολουθεί ήπια ανάδευση του διαλύματος σε συσκευή επίπεδης περιστροφικής ανάδευσης στους 4⁰C για 2h. Τα διάλυμα τοποθετείται στη συνέχεια εντός μεμβράνης διαπίδυσης και τίθεται σε διαπίδυση έναντι ρυθμιστικού διαλύματος A στους 4⁰C. Η διαπίδυση διενεργείται όπως περιγράφηκε στην απομόνωση των λιποπρωτεϊνών.

Υλικό στήλης DEAE Sepharose CL-6B τοποθετείται στη γυάλινη στήλη και εκλούεται με ρυθμιστικό διάλυμα A. Η ροή της στήλης ρυθμίζεται με κατάλληλη ρύθμιση της στρόφιγγας της στήλης σε ~ 9 mL / h. Ακολουθεί έκλυση της στήλης στους 4⁰C μέχρι ότου το pH του υγρού που απορρέει από τη στήλη εξισωθεί με αυτό του ρυθμιστικού διαλύματος A.

Το υλικό της στήλης που έχει εξισορροπηθεί με ρυθμιστικό διάλυμα A λαμβάνεται από τη στήλη και αναμειγνύεται με το διάλυμα της LDL που έχει ληφθεί μετά το πέρας της dialysis με αναλογία όγκου 1:1. Τα διάλυμα που προκύπτει τίθεται σε ήπια ανάδευση στους 4⁰C για 9h. Εν συνεχεία, το διάλυμα αυτό τίθεται σε απαέρωση σε αντλία κενού στους 4⁰C για 3h. Ακολουθεί απόχυση του υλικού στη γυάλινη στήλη αργά προσέχοντας να μη σχηματιστούν φυσαλίδες και να μη σχηματιστούν κενά. Ακολουθεί έκλυση της στήλης στους 4⁰C αρχικά με ρυθμιστικό διάλυμα A για 2¹/₂ h με ροή ~ 9 mL / h και ακολούθως με ρυθμιστικό διάλυμα A 0,3M KCl για 2¹/₂ h με ροή ~ 9 mL / h. Στη διάρκεια της έκλυσης της στήλης συλλέγονται κλάσματα του 1 mL του υγρού που εκλούεται. Τα κλάσματα αποθηκεύονται στους -20⁰C.

Μετά το πέρας της χρησιμοποίησης της στήλης ακολουθεί πλύση της στήλης κατά σειρά με 1N NaOH για 2h με ροή ~ 20 mL / h, με διάλυμα αιθανόλης 70% για 2h με ροή ~ 20 ml / h και τελικά με διάλυμα αιθανόλης 20% για 2h με ροή ~ 20 mL / h. Το υλικό της στήλης αποθηκεύεται σε διάλυμα αιθανόλης 20% στους 4⁰C.

Στα κλάσματα που ελήφθησαν από τη στήλη μετρώνται η περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη με Lowry DC και η δραστηριότητα της Lp-PLA₂. Τα κλάσματα στα οποία ανιχνεύεται δραστηριότητα Lp-PLA₂ ενώνονται και τοποθετούνται σε σωλήνα των 50 mL μετά από διήθηση με φίλτρο 0,20 μ m και ακολουθεί συμπύκνωση με χρησιμοποίηση σωλήνων φυγοκέντρησης με φίλτρο Amicon Ultra-15 (10.000 MWCO). Η διάμετρος των πόρων των φίλτρων αυτών επελέγη έτσι ώστε μόρια με MB > 10.000 όπως η Lp-PLA₂ να παραμένουν

στο υπερκείμενο. Το διάλυμα των κλασμάτων με ενζυμική δραστηριότητα φυγοκεντρείται στα 3.000xg στους 4°C για χρονικό διάστημα επαρκές να επιτύχει την επιθυμητή συμπύκνωση. Στο τέλος της διαδικασίας λαμβάνεται και μετράται η ποσότητα που έχει παραμείνει άνωθεν του φίλτρου και τοποθετείται σε σωληνάριο erendorff. Εκπλένεται ο θάλαμος του σωληναρίου άνωθεν του φίλτρου με μικρή ποσότητα ρυθμιστικού διαλύματος A η οποία προστίθεται στην ποσότητα που έχει ληφθεί. Ο συνολικός όγκος που λαμβάνεται στη φάση αυτή ρυθμίζεται να είναι 300 µL για κάθε 10 ml διαλύματος LDL που χρησιμοποιήθηκε στην αρχή της διαδικασίας. Στο διάλυμα αυτό μετράται η περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη και η δραστηριότητα της Lp-PLA₂. Η ποσότητα αυτή αποθηκεύεται στους -20°C.

Γ) Χρωματογραφία υψηλής απόδοσης με στήλη Resource Q [359]

Αρχή της μεθόδου

Ο διαχωρισμός με τη χρήση χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) με στήλη Resource Q βασίζεται στο φορτίο των πρωτεϊνών. Η στήλη Resource Q είναι μία ανιονική στήλη της οποίας το θετικό φορτίο οφείλεται σε ομάδες τεταρτοταγούς αμμωνίου. Αρχικά τα πρωτεϊνικά μόρια συνδέονται στο υλικό της στήλης και εν συνεχεία αποσυνδέονται από αυτό με τη σταδιακή αύξηση της συγκέντρωσης του άλατος στο διάλυμα έκλουσης ανάλογα με το φορτίο τους.

Αντιδραστήρια και όργανα

- Στήλη Resource Q (6,4 x 30 mm, 15µm) (Amersham Biosciences)
- Tween 20, ειδικό βάρος 1.1 g/mL (Serva)
- Tris(hydroxymethyl)aminomethane hydrochloride, TRIS HCl (MB 157,6) (Sigma)
- Butylated hydroxytoluene (BHT) (MB 220,04) (Sigma)
- KCl (MB 74,56) (Merck)
- Αιθανόλη χρωματογραφικής καθαρότητας (Schrlan)
- H₂O χρωματογραφικής καθαρότητας (Lab-Scan)
- Υγρός χρωματογράφος Hewlett-Packard με απαερωτή αερίων και ανιχνευτή υπεριώδους ακτινοβολίας (Agilent 1100 series)
- Μικροσύριγγες ακριβείας 50 και 100 µL
- Μεμβράνη διαπίδυσης (Visking dialysis tubing 27/32) (Serva)
- Σωλήνες φυγοκέντρωσης με φίλτρο, Amicon Ultra-15 (10.000 MWCO) (Millipore)

- Αποστειρωμένα σιφόνια των 10 mL (Corning)
- Αποστειρωμένοι πλαστικοί σωλήνες φυγοκέντρωσης από πολυπροπυλένιο των 15 και 50 mL (Corning)
- Πλαστικοί σωλήνες από πολυπροπυλένιο με ευρεία βάση των 5 mL
- Φίλτρα διήθησης 0.20 μm (Corning)
- Αποστειρωμένες συσκευές διήθησης 0,22 μm , 500mL, (Corning)
- Ψυχόμενη φυγόκεντρος πάγκου (ALC, International SRL PK 131R)
- Συσκευή επίπεδης περιστροφικής ανάδευσης

Διαλύματα εργασίας

Διάλυμα εργασίας 5,5% Tween 20. Παρασκευάζεται όπως περιγράφηκε στη χρωματογραφία με στήλη DEAE-Sepharose CL-6B

Διάλυμα εργασίας 200 mM BHT σε αιθανόλη. Παρασκευάζεται όπως περιγράφηκε στη χρωματογραφία με στήλη DEAE-Sepharose CL-6B

Ρυθμιστικό διάλυμα B: 5 mM Tris-HCl, 0,1% Tween 20, 10 μM butylated hydroxytoluene, pH 7,5. 788 mg Tris-HCl, 18,182 mL διαλύματος εργασίας Tween 20 και 1134 μL διαλύματος εργασίας BHT διαλύονται σε 900 ml H₂O χρωματογραφικής καθαρότητας. Το pH ρυθμίζεται σε 7,5 με NaOH 1N και HCl 1N και ο όγκος συμπληρώνεται στο 1 lt με H₂O χρωματογραφικής καθαρότητας. Το διάλυμα φιλτράρεται με συσκευή διήθησης 0,22 μm και αποθηκεύεται στους 4⁰C.

Ρυθμιστικό διάλυμα B 0,6M KCl: Το διάλυμα παρασκευάζεται όπως το ρυθμιστικό διάλυμα B με την προσθήκη 44,736 g KCl για 1 lt τελικού όγκου διαλύματος. Το pH ρυθμίζεται σε 7,5 με NaOH 1N και HCl 1N και ο όγκος συμπληρώνεται στο 1 lt με H₂O χρωματογραφικής καθαρότητας. Το διάλυμα φιλτράρεται με συσκευή διήθησης 0,22 μm και αποθηκεύεται στους 4⁰C.

Διάλυμα αιθανόλης 20%. Αιθανόλη χρωματογραφικής καθαρότητας αναμειγνύεται με H₂O χρωματογραφικής καθαρότητας σε αναλογία όγκου 2:8. Το διάλυμα φιλτράρεται με συσκευή διήθησης 0,22 μm .

Πειραματική διαδικασία

Το διάλυμα που έχει προκύψει από τη συμπύκνωση των κλασμάτων της στήλης DEAE Sepharose CL-6B με δραστηκότητα Lp-PLA₂ τίθεται σε διαπίδυση έναντι ρυθμιστικού

διαλύματος Β στους 4⁰C. Η διαπίδυση διενεργείται όπως περιγράφηκε στην απομόνωση των λιποπρωτεϊνών (Μέθοδοι 1). Μετά το πέρας της διαπίδυσης το διάλυμα διηθείται με φίλτρο 0,20 μm και αποθηκεύεται στους -20⁰C μέχρι τη χρησιμοποίησή του στην HPLC.

Για τη διενέργεια της HPLC η στήλη Resource Q τοποθετείται με τις ειδικές συνδέσεις στον υγρό χρωματογράφο. Η στήλη και τα διαλύματα που θα χρησιμοποιηθούν είναι τοποθετημένα σε πάγο. Η ροή ρυθμίζεται σε 0,5 mL / min. Αρχικά γίνεται έκπλυση της στήλης με 5 ml διαλύματος Β. Εν συνεχεία 50 μL του διαλύματος που περιέχει τη Lp-PLA₂ εισάγονται στο σύστημα και η έκλυση της στήλης γίνεται με βαθμιδωτό σύστημα αρχίζοντας με 100% ρυθμιστικό διάλυμα Β και καταλήγοντας σε 100% ρυθμιστικό διάλυμα Β 0,6M KCl με ροή 0,5 mL / min για 20min. Κατά τη διάρκεια της έκλυσης της στήλης καταγράφεται η απορρόφηση στα 280 nm και συλλέγονται κλάσματα του 1 mL του υγρού που εκλούεται. Τα κλάσματα αποθηκεύονται στους -20⁰C. Μετά το πέρας της χρωματογραφίας ακολουθεί πλύση της στήλης με διάλυμα 10 mL διαλύματος αιθανόλης 20% με ροή 0,5 mL / min. Η στήλη στη συνέχεια αποθηκεύεται στους 4⁰C.

Στα κλάσματα που συλλέχθηκαν μετρώνται η περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη με Lowry DC και η δραστικότητα της Lp-PLA₂. Τα κλάσματα στα οποία ανιχνεύεται δραστικότητα Lp-PLA₂ ενώνονται και το διάλυμα μετά από διήθηση με φίλτρο 0,20 μm συμπυκνώνεται με χρησιμοποίηση σωλήνων φυγοκέντρησης με φίλτρο Amicon Ultra-15 (10000 MWCO) όπως περιγράφηκε στη χρωματογραφία με στήλη DEAE-Sepharose CL-6B. Στο συμπυκνωμένο διάλυμα μετράται η περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη και η δραστικότητα της Lp-PLA₂ και το διάλυμα αποθηκεύεται σε σωληνάριο erpendorf στους -20⁰C.

Δ) Επαναδιάλυση της μερικώς καθαρισμένη Lp-PLA₂ σε διάλυμα που περιέχει ως απορρυπαντικό το octyl glucoside (OG)

Αρχή της μεθόδου

Η Lp-PLA₂ δεν είναι υδατοδιαλυτή και στα μέχρι τώρα στάδια καθαρισμού της διατηρείται διαλυμένη στα υδατικά διαλύματα με τη χρήση Tween 20 ως απορρυπαντικού. Η μερικώς καθαρισμένη Lp-PLA₂ θα επαναδιαλυθεί σε διάλυμα που περιέχει ως απορρυπαντικό τον κ-οκτυλο-β-D-γλυκοζίτη (OG) με απομάκρυνση του Tween 20. Αυτό γίνεται με δεδομένο ότι η μερικώς καθαρισμένη Lp-PLA₂ θα χρησιμοποιηθεί στη συνέχεια σε πειράματα με LDL και το OG είναι ένα ήπιο απορρυπαντικό που δεν επηρεάζει τη δομή των πρωτεϊνών και έχει δείχθει πως η χρήση του δεν επηρεάζει τη σύνδεση της ApoB με τους υποδοχείς των μακροφάγων [321].

Αντιδραστήρια και όργανα

- Octyl β-D-glucopyranoside (κ-οκτυλο-β-D-γλυκοζίτης, octyl glucoside, OG) σε σκόνη (MB 292,37) (Sigma Alexis)

Λοιπά όπως αναγράφονται στη χρωματογραφία με στήλη DEAE-Sepharose CL-6B και στη χρωματογραφία υψηλής απόδοσης με στήλη Resource Q

Διαλύματα εργασίας

Ρυθμιστικό διάλυμα Γ: 5 mM Tris-HCl, 0.5M KCl, 25 mM OG, 10μM butylated hydroxytoluene, pH 7,5. 394 mg Tris-HCl, 3,654 g OG, 18,64 g KCl και 567 μL διαλύματος εργασίας BHT διαλύονται σε 450 mL dH₂O. Το pH ρυθμίζεται σε 7,5 με NaOH 1N και HCl 1N και ο όγκος συμπληρώνεται στα 500 mL με dH₂O. Το διάλυμα φιλτράρεται με συσκευή διήθησης 0,22 μm και αποθηκεύεται στους 4⁰C.

Πειραματική διαδικασία

Η μερικώς καθαρισμένη Lp-PLA₂ επαναδιαλύεται στη συνέχεια σε διάλυμα διάλυμα Γ. Αυτό επιτυγχάνεται με αραιώση με διάλυμα Γ 1:60 και συμπύκνωση εκ νέου με χρησιμοποίηση σωλήνων φυγοκέντρησης με φίλτρο Amicon Ultra-15 (10.000 MWCO) όπως περιγράφηκε ανωτέρω, διαδικασία η οποία επαναλαμβάνεται τρεις φορές. Στο τελικό διάλυμα μετράται η περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη και η δραστηριότητα της Lp-PLA₂ και το διάλυμα αποθηκεύεται σε σωληνάριο erpendorf στους -20⁰C. Ως μία μονάδα δραστηριότητας Lp-PLA₂ θεωρείται ποσότητα που υδρολύει 1 nmole PAF σε 1h, 1 μονάδα = 1 nmole PAF/1h).

III.1.16. ΑΝΟΣΟΑΠΟΤΥΠΩΣΗ ΚΑΤΑ WESTERN (WESTERN BLOT)

Αρχή της μεθόδου

Η τεχνική αυτή εφαρμόζεται για τη μεταφορά πρωτεϊνών που έχουν διαχωριστεί με βάση το μοριακό τους βάρος με πηκτή πολυακρυλαμίδης-SDS, από την πηκτή σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης ή PVDF. Τη μεταφορά των πρωτεϊνών στη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης ακολουθεί η ανίχνευση της επιθυμητής πρωτεΐνης με τη χρήση αντισωμάτων που στρέφονται εναντίον της υπό εξέταση πρωτεΐνης. Κατά τη διαδικασία της μεταφοράς, η πηκτή πολυακρυλαμίδης τοποθετείται προς τον αρνητικό πόλο της συσκευής και η μεμβράνη όπου θα μεταφερθούν προς τον αρνητικό, με αποτέλεσμα οι πρωτεΐνες οι οποίες

είναι αρνητικά φορτισμένες να μετακινούνται από τον αρνητικό στο θετικό πόλο. Στη συνέχεια πραγματοποιείται ανίχνευση της επιθυμητής πρωτεΐνης. Η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης επώαζεται με αντίσωμα, το οποίο είναι ειδικό προς την πρωτεΐνη που θέλουμε να ανιχνεύσουμε και προσδέεται σε αυτή πάνω στη μεμβράνη. Η περίσσεια του αντισώματος που δεν έχει προσδεθεί απομακρύνεται με πλύση και στη συνέχεια η μεμβράνη επώαζεται με δεύτερο αντίσωμα έναντι του πρώτου αντισώματος, και το οποίο είναι προσδεμένο σε υπεροξειδάση αγριοραπανιού (Horseradish peroxidase, HRP). Η περίσσεια του δεύτερου αντισώματος που δεν έχει προσδεθεί απομακρύνεται με πλύση της μεμβράνης. Με τη σύνδεση του δεύτερου αντισώματος ανιχνεύεται η παρουσία συνδεδεμένου πρώτου αντισώματος πάνω στη μεμβράνη η οποία δηλώνει την παρουσία της υπό εξέταση πρωτεΐνης. Η χρήση διαλύματος blocking το οποίο αποτελεί πρωτεϊνικό διάλυμα, στη φάση επώασης της μεμβράνης με τα αντισώματα, περιορίζει τη μη ειδική σύνδεση των αντισωμάτων στη μεμβράνη. Μετά την πρόσδεση των αντισωμάτων στη μεμβράνη, πραγματοποιείται επώαση με διάλυμα ECL το οποίο περιέχει λουμινόλη. Η HRP υδρολύει τη λουμινόλη σε 3-αμινοφθαλάτη και η αντίδραση συνοδεύεται από την εκπομπή χαμηλής έντασης φωτός (428 nm). Με την παρουσία συγκεκριμένων χημικών ουσιών που περιέχονται στο διάλυμα ECL, η εκπομπή του φωτός ενισχύεται έως και χίλιες φορές, με αποτέλεσμα να είναι ανιχνεύσιμο σε σκοτεινό θάλαμο με ακτινολογικό φιλμ. Όσο μεγαλύτερη είναι η ποσότητα της υπό εξέταση πρωτεΐνης τόσο μεγαλύτερες θα είναι και οι ποσότητες του πρώτου και εν συνεχεία του δεύτερου αντισώματος που έχουν συνδεθεί και ανάλογη θα είναι η εκπομπή φωτός που θα καταγραφεί στο φιλμ. Η αναλογία αυτή επιτρέπει και τον αδρό ποσοτικό προσδιορισμό της υπό εξέταση πρωτεΐνης καθιστώντας τη μέθοδο της ανοσοαποτύπωσης κατά Western μέθοδο ημιποσοτικού προσδιορισμού.

Αντιδραστήρια και όργανα

- Συσκευή Western Blot, (Biorad)
- Tris (Sigma)
- Tris-HCl, (Sigma)
- Acrylamide, (Sigma)
- Methanol, αναλυτικής καθαρότητας (Merck)
- N'-methylene-bis-acrylamide, (Sigma)
- DL-Dithiothreitol (DTT), (Sigma)
- N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamin (TEMED), (Serva)

- Ammonium persulfate (APS), (Serva)
- Glycerol, (Sigma)
- Glycine, (Serva)
- Tween 20, ειδικό βάρος 1,1 g/mL (Serva)
- Sodium dodecyl sulfate (SDS), (Serva)
- 2-mercaptoethanol, (Serva)
- Δείκτες μοριακού βάρους Precision Plus Kaleidoscope, (Biorad)
- Γάλα σε σκόνη, (Regilait)
- Rabbit anti-human PAF-AH polyclonal antibody, (Cayman Chemical)
- Goat anti-rabbit IgG HRP, (Chemicon International)
- Μεμβράνες νιτροκυτταρίνης 0.2μm, (Biorad)
- Chemilucifer ECL Detection System, (Chemicon)
- Φιλμ BioMax XAR, (KODAK)
- Εξοπλισμένος σκοτεινός θάλαμος

Διαλύματα εργασίας

A) Ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE

Διάλυμα Acrylamide/Bis 30%. Για την παρασκευή διαλύματος 100 mL, ζυγίζονται 29,2 g Acrylamide και 0,8g N'-N'-bis-methylene-acrylamide και διαλύονται σε 100mL dH₂O σε αδιαφανή φιάλη.

Διάλυμα SDS 10%. 10g SDS διαλύονται σε 90mL dH₂O με ταυτόχρονη ανάδευση. Αφού διαλυθεί προστίθεται dH₂O μέχρι τελικό όγκο 100mL.

Διάλυμα Tris 1,5 M, pH 8,8. Για την παρασκευή διαλύματος 50mL ζυγίζονται 9,075g Tris-HCl και διαλύονται σε 30mL dH₂O. Ρυθμίζεται το pH 8,8 και προστίθεται dH₂O μέχρι τελικό όγκο 50mL.

Διάλυμα Tris 0,5 M, pH 6,8. Για την παρασκευή διαλύματος 50mL ζυγίζονται 3g Tris-HCl και διαλύονται σε 30mL dH₂O. Ρυθμίζεται το pH 6,8 και προστίθεται dH₂O μέχρι τελικό όγκο 50mL.

APS 10%. Για την παρασκευή διαλύματος 1 mL διαλύονται 0,1g APS σε 1 mL dH₂O. Το διάλυμα πρέπει να είναι φρέσκο πριν τη χρήση.

Sample buffer 6x. Για την παρασκευή διαλύματος 10ml χρησιμοποιούνται 7ml διαλύματος Tris 0,5M pH 6,8 (125mM), 2,6mL Glycerol (20% v/v), 0,5mL 2-

mercaptoethanol (1,8% v/v), 0,06mL Bromophenol Blue (0,002% w/v), 0,4mL SDS 10% (4% w/v).

Πηκτή διαχωρισμού (Separating gel), 16% SDS-PAGE gel. Για την παρασκευή διαλύματος 15mL χρησιμοποιούνται 2,976mL dH₂O, 7,998 mL Acrylamide/Bis 30%, 3,75mL Tris 1,5 M, pH 8,8, 150μL SDS 10%, 150 μL APS 10%, 15 μL TEMED.

Πηκτή επιστοίβασης (Stacking gel), 4% SDS-PAGE gel. Για την παρασκευή διαλύματος 8mL χρησιμοποιούνται 3,975mL dH₂O, 1 mL Acrylamide/Bis 30%, 2,5mL Tris 0,5 M, pH 6,8, 75μL SDS 10%, 150 μL APS 10%, 15 μL TEMED).

Electrode buffer pH 8,3. Για την παρασκευή διαλύματος 1lt διαλύονται 3,025g Tris (14,6 mM) και 14,4g Glycine (1,44%) σε 850mL dH₂O. Ρυθμίζεται το pH 8,3 και προστίθεται 1gr SDS (0.1% w/v) με ταυτοχρονη ανάδευση. Στη συνέχεια προστίθεται dH₂O μέχρι τελικό όγκο 1lt.

B) Μεταφορά σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης (TRANSFER)

Transfer buffer. Για την παρασκευή διαλύματος 1lt διαλύονται 3,03g Tris (14,6 mM) και 14,4g Glycine (1.44%) σε 200mL methanol (20% v/v). Προστίθεται dH₂O μέχρι τελικό όγκο 1lt. Το διάλυμα φυλάσσεται στους 4⁰C.

TBS 10x, pH 7,6. 12,1g Tris-HCl και 40g NaCl διαλύονται σε 450mL dH₂O. Ρυθμίζεται το pH 7,6 και προστίθεται H₂O μέχρι τελικό όγκο 500mL.

TBS 1x. Σε 450mL dH₂O προστίθενται 50mL TBS 10x

TBS/T. Σε 500mL TBS 1x προστίθενται 50μL Tween 20.

Διάλυμα Blocking 5%. 1g γάλα σκόνη διαλύεται σε 20mL TBS/T.

Διάλυμα Blocking 1%. Σε 8mL TBS/T προστίθενται 2mL blocking 5%

Διάλυμα πρώτου αντισώματος. Αραίωση 1:2000. 5μL rabbit anti-human PAF-AH προστίθενται σε 10mL διαλύματος blocking 1%.

Διάλυμα δεύτερου αντισώματος. Αραίωση 1:2000. 5μL goat anti-rabbit IgG HRP προστίθενται σε 10mL διαλύματος blocking 1%.

Πειραματική διαδικασία

A) Ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE

Παρασκευάζονται τα διαλύματα των πηκτών Stacking gel και Separating gel. Ετοιμάζεται η συσκευή με τζαμάκια για πηκτή 1mm. Στρώνεται πρώτα το Separating gel και όταν πολυμεριστεί στρώνεται το Stacking gel. Όταν ολοκληρωθεί ο πολυμερισμός της πηκτής αυτή τοποθετείται στη συσκευή του Western blot. Πραγματοποιείται prerun στα 100V για 30 λεπτά. Στη συνέχεια φορτώνουμε κατάλληλη ποσότητα από τους δείκτες

μοριακού βάρους, sample buffer ως αρνητικό μάρτυρα και το δείγμα (έως 30μg πρωτεΐνης ανά πηγαδάκι). Πριν τη χρήση, τα δείγματα, εκτός από τους δείκτες μοριακού βάρους, θερμαίνονται στους 95⁰C για 3 λεπτά. Πραγματοποιείται ηλεκτροφόρηση στα 100V έως ότου το sample buffer φτάσει στο τέλος της πηκτής.

Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης η πηκτή παραλαμβάνεται και τοποθετείται στη συσκευή του Western blot προς τον αρνητικό πόλο μαζί με τη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης που τοποθετείται προς το θετικό πόλο. Στη συνέχεια πραγματοποιείται μεταφορά (transfer) πρωτεϊνών στα 100V, με ταυτόχρονη ανάδευση για 90 λεπτά στους 4⁰C.

B) Μεταφορά σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης (TRANSFER)

Μετά το πέρας της διαδικασίας μεταφοράς η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης παραλαμβάνεται και τοποθετείται σε πλαστικό λεκανάκι όπου ξεπλένεται με TBS/T 3x5 λεπτά. Στη συνέχεια η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης επωάζεται με διάλυμα blocking 5% για 1 ώρα με ταυτόχρονη ανακίνηση. Ξεπλένεται με TBS/T 3x5 λεπτά. Ακολουθεί ολονύκτια επώαση με το διάλυμα του πρώτου αντισώματος στους 4⁰C με ταυτόχρονη ανακίνηση. Μετά το πέρας της επώασης η μεμβράνη ξεπλένεται με TBS/T 3x10 λεπτά, και στη συνέχεια επωάζεται με το διάλυμα του δεύτερου αντισώματος για 1 ώρα με ταυτόχρονη ανακίνηση. Η μεμβράνη ξεπλένεται με TBS/T 3x10 λεπτά, στη συνέχεια τοποθετείται σε TBS 1x για 5 λεπτά και μεταφέρεται στο σκοτεινό θάλαμο για την εμφάνιση του φιλμ. Μέσα στο σκοτεινό θάλαμο η μεμβράνη επωάζεται με το διάλυμα ECL για 3-5 λεπτά. Στη συνέχεια μεταφέρεται στην κασετίνα της εμφάνισης. Στο σκοτάδι τοποθετούνται φιλμ πάνω στη μεμβράνη και εκτίθενται για 1, 5 και 10 λεπτά. Στη συνέχεια εμφανίζονται τα φιλμ.

III.1.17. ΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΛΙΠΟΣΩΜΑΤΩΝ ΑΠΟ ΤΑ ΛΙΠΙΔΙΑ ΦΥΣΙΚΗΣ Ή ΟΞΕΙΔΩΜΕΝΗΣ LDL [334]

Αρχή της μεθόδου

Τα εκχυλισθέντα λιπίδια από διάλυμα φυσικής ή οξειδωμένης λιποπρωτεΐνης διαλυτοποιούνται με τη βοήθεια υπερήχων με τη μορφή μικυλλίων σε υδατικό διάλυμα. Στη συνέχεια η δίοδος υπό πίεση από πολυανθρακική μεμβράνη με πόρους διαμέτρου 0,1 μm (extrusion) μετατρέπει τα μικύλλια σε λιποσώματα ομοιόμορφης διαμέτρου.

Αντιδραστήρια και όργανα

- L-a-dipalmitoyl [dipalmitoyl-1-¹⁴C] phosphatidylcholine ([¹⁴C]DPPC) 0,1 mCi/ mL, 55 mCi/mmol (1,818 mM) (American Radiolabeled Chemicals).
- Συσκευή εξώθησης (extrusion device) (10 mL LIPEX™ Thermobarrel Extruder, Northern Lipids)
- Πολυανθρακικές μεμβράνες (polycarbonate membranes) με πόρους διαμέτρου 0,1 μm (Nuclepore Track-Etched Membranes, Whatman)
- Συσκευή για την εκτίμηση του μεγέθους σωματιδίων με τη μέθοδο του δυναμικού σκεδασμού φωτός (dynamic light scattering, DLS) (Beckmann Coulter N4Plus DLS Particle Sizer)
- Κυψελίδες (semi-micro UV-cuvettes PLASTIBRAND®) (Brand GmbH)
- Πλαστικοί σωλήνες από πολυπροπυλένιο των 15 mL (Corning)

Λοιπά αντιδραστήρια και όργανα για όξινη εκχύλιση λιποειδών, προσδιορισμό φωσφόρου και προσδιορισμό β-ακτινοβολίας όπως έχουν ήδη περιγραφεί.

Διαλύματα εργασίας

Διάλυμα ([¹⁴C]DPPC). 0,1 mL του αρχικού διαλύματος 1,2 – διπαλμιτόυλο – sn – γλυκερο – 3 - φωσφοχολίνης [διπαλμιτόυλο – 1 -¹⁴C] (L – a - dipalmitoyl [dipalmitoyl – 1 -¹⁴C] phosphatidylcholine, [¹⁴C]DPPC) 0,1 mCi/mL διαλύονται με προσθήκη αιθανόλης:τολουένης (1:1, v/v) σε τελικό όγκο 10 mL. Το διάλυμα που προκύπτει έχει περιεκτικότητα 0,1 μCi/mL και συγκέντρωση 1,818μM, και αποθηκεύεται σε αδιαφανές γυάλινο βιδωτό φιαλίδιο στους -20⁰C.

Λοιπά διαλύματα εργασίας για όξινη εκχύλιση λιποειδών, προσδιορισμό φωσφόρου και προσδιορισμό β-ακτινοβολίας όπως έχουν ήδη περιγραφεί.

Πειραματική διαδικασία

LDL ή oxLDL σε συγκέντρωση 0,2 mg/mL υπόκεινται σε όξινη εκχύλιση των λιπιδίων. Η χλωροφορμική φάση συλλέγεται και οι διαλύτες εξατμίζονται μέχρι ξηρού σε ρεύμα N₂ και τα λιποειδή επαναδιαλύονται σε 500 μL CHCl₃:MeOH (1:1, v/v) και αποθηκεύονται στους 4⁰C. Ακολουθεί προσδιορισμός φωσφόρου και προσδιορισμός της συγκέντρωσης των φωσφολιπιδίων. Εν συνεχεία η ενδεικνυόμενη για τις ανάγκες του πειράματος ποσότητα φωσφολιπιδίων τοποθετείται σε σωλήνα πολυπροπυλενίου. Για την παρασκευή σημασμένων λιποσωμάτων προστίθενται 100 μL διαλύματος [¹⁴C]DPPC ανά 0,5 μmoles του συνόλου

των φωσφολιπιδίων. Οι διαλύτες εξατμίζονται μέχρι ξηρού σε ρεύμα N₂ και τοποθετείται ποσότητα PBS pH 7.4 ώστε να προκύψει διάλυμα με τελική συγκέντρωση φωσφολιπιδίων 0,2 mM στην περίπτωση των σημασμένων λιποσωμάτων και 2,5 mM στην περίπτωση των μη σημασμένων λιποσωμάτων. Ο σωλήνας πολυπροπυλενίου κλείνεται με πώμα και τοποθετείται σε υδατόλουτρο υπερήχων στους 37⁰C για 15 min με ενδιάμεσο vortex. Στο τέλος της διαδικασίας τα λιποειδή είναι διαλυτοποιημένα με τη μορφή μικυλλίων προσδίδοντας στο διάλυμα γαλακτόχροη όψη. Το γαλάκτωμα αυτό των λιπιδίων υποβάλλεται 8-10 φορές σε διήθηση υπό πίεση μέσω πολυανθρακικής μεμβράνης με πόρους διαμέτρου 0.1 μm στους 37⁰C. Το διάλυμα που προκύπτει είναι πλέον διαυγές έχοντας απωλέσει τη γαλακτόχροη όψη. Το διάλυμα τοποθετείται σε κυψελίδα η οποία τοποθετείται στο Coulter και το μέγεθος των λιποσωμάτων υπολογίζεται με τη μέθοδο δυναμικού σκεδασμού φωτός (dynamic light scattering, DLS) με πηγή διέγερσης (excitation source) στα 633 nm HeNe. Η μέση αποδεκτή διάμετρος των λιποσωμάτων είναι 120-160 nm. Κατά τη διαδικασία της διήθησης υπό πίεση μπορεί να υπάρξει μικρός βαθμός απώλειας λιποειδών και μεταβολή της συγκέντρωσης του προκύπτοντος διαλύματος. Η συγκέντρωση του τελικού διαλύματος των μη σημασμένων λιποσωμάτων (C_{τελική}) σε nmole φωσφολιπιδίων ανά ml προσδιορίζεται με μέτρηση φωσφόρου. Η C_{τελική} των σημασμένων λιποσωμάτων προσδιορίζεται βάσει της συγκέντρωσης στο αρχικό γαλάκτωμα των μικυλλίων (C_{αρχική}) και της μέτρησης της β-ακτινοβολίας σε ποσότητες 20 μL (εις διπλούν) από το τελικό διάλυμα των λιποσωμάτων (C_{pmτελικά}) και από αρχικό γαλάκτωμα των μικυλλίων (C_{pmαρχικά}). Ο υπολογισμός γίνεται με τον τύπο $C_{τελική} = C_{αρχική} \times C_{pmτελικά} / C_{pmαρχικά}$. Το διάλυμα των λιποσωμάτων αποθηκεύεται στους 4⁰C σε σκοτεινό περιβάλλον (κάλυψη του σωλήνα με αλουμινόχαρτο). Το διάλυμα χρησιμοποιείται πάντοτε την επόμενη ημέρα παρότι ήταν σταθερό για αρκετές ημέρες.

III.1.18. ΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΛΙΠΟΣΩΜΑΤΩΝ ΑΠΟ ΦΥΣΙΚΑ Ή ΟΞΕΙΔΩΜΕΝΑ ΦΩΣΦΟΛΙΠΙΔΙΑ [337]

Αρχή της μεθόδου

Φυσικά ή οξειδωμένα φωσφολιπίδια με την προσθήκη ελεύθερης (μη εστεροποιημένης) χοληστερόλης διαλυτοποιούνται με τη βοήθεια υπερήχων με τη μορφή μικυλλίων σε υδατικό διάλυμα. Στη συνέχεια η δίοδος υπό πίεση από πολυανθρακική μεμβράνη με πόρους διαμέτρου 0,1 μm (εξώθηση) μετατρέπει τα μικύλλια σε λιποσώματα ομοιόμορφης

διαμέτρου. Στον πυρήνα των λιποσωμάτων βρίσκεται η ελεύθερη χοληστερόλη η οποία είναι υδρόφοβη ενώ στην περιφέρεια των λιποσωμάτων βρίσκονται τα φωσφολιπίδια τα οποία διαθέτουν υδρόφιλες ομάδες.

Αντιδραστήρια και όργανα

- L- α -dipalmitoyl [dipalmitoyl-1- ^{14}C] phosphatidylcholine (^{14}C]DPPC) 0,1 mCi/ mL, 55 mCi/mmol (1,818 mM) (American Radiolabeled Chemicals).
- 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DPPC), σε συσκευασία των 25 mg, (MB 734,04) (Sigma)
- 1-palmitoyl-2-arachidonyl-sn-glycero-3-phosphocholine (PAPC), σε συσκευασία των 5 mg, (MB 782,08) (Sigma)
- 1-palmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine σε συσκευασία των 25 mg, (MB 495,63) (Sigma)
- Διάλυμα 1-palmitoyl-2-linoleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (PLPC) 10 mg/mL σε χλωροφόρμιο, ποσότητα 2,5 mL, (MB 758,06) (Avanti Polar Lipids)
- 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DOPC) σε συσκευασία των 25 mg (MB 786,11) (Sigma)
- 1-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine σε συσκευασία των 25 mg (MB 521,67) (Sigma)
- Χοληστερόλη (MB 386,65) σε συσκευασία του 1 g (Sigma)
- Συσκευή εξώθησης (extrusion device) (10 mL LIPEX™ Thermobarrel Extruder, Northern Lipids)
- Πολυανθρακικές μεμβράνες (polycarbonate membranes) με πόρους διαμέτρου 0,1 μm (Nuclepore Track-Etched Membranes, Whatman)
- Συσκευή για την εκτίμηση του μεγέθους σωματιδίων με τη μέθοδο του δυναμικού σκεδασμού φωτός (dynamic light scattering, DLS) (Beckmann Coulter N4Plus DLS Particle Sizer)
- Κυψελίδες (semi-micro UV-cuvettes PLASTIBRAND®) (Brand GmbH)
- Πλαστικοί σωλήνες από πολυπροπυλένιο των 15 mL (Corning)

Λοιπά αντιδραστήρια και όργανα για όξινη εκχύλιση λιποειδών, προσδιορισμό φωσφόρου και προσδιορισμό β -ακτινοβολίας όπως έχουν ήδη περιγραφεί.

Διαλύματα εργασίας

Διάλυμα ($[^{14}\text{C}]$ DPPC). 0,1 mL του αρχικού διαλύματος 1,2-διπαλμιτούλο-sn-γλυκερο-3-φωσφοχολίνης [$[^{14}\text{C}]$ DPPC] (L-a-dipalmitoyl [dipalmitoyl-1- ^{14}C] phosphatidylcholine, [^{14}C]DPPC) 0,1 mCi/mL διαλύονται με προσθήκη αιθανόλης:τολουένης (1:1, v/v) σε τελικό όγκο 10 mL. Το διάλυμα που προκύπτει έχει περιεκτικότητα 0,1 $\mu\text{Ci/mL}$ και συγκέντρωση 1,818 μM , και αποθηκεύεται σε αδιαφανές γυάλινο βιδωτό φιαλίδιο στους -20°C .

Διάλυμα 1 mg/ml 1,2-διπαλμιτούλο-sn-γλυκερο-3-φωσφοχολίνης (1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine, DPPC). 25 mg DPPC διαλύονται σε 25 mL CHCl_3 :MeOH (1:1, v/v). Το διάλυμα αποθηκεύεται σε αδιαφανή γυάλινα βιδωτά φιαλίδια στους -20°C .

Διάλυμα 1 mg/ml 1-παλμιτούλο-2-αραχιδονούλο-sn-γλυκερο-3-φωσφοχολίνης (1-palmitoyl-2-arachidonoyl-sn-glycero-3-phosphocholine, PAPC). 5 mg PAPC διαλύονται σε 5 mL CHCl_3 :MeOH (1:1, v/v). Το διάλυμα αποθηκεύεται σε αδιαφανές γυάλινο βιδωτό φιαλίδιο στους -20°C .

Διάλυμα 1 mg/ml 1-παλμιτούλο-sn-γλυκερο-3-φωσφοχολίνης (1-palmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine, lysoPAPC). 25 mg lysoPAPC διαλύονται σε 25 mL CHCl_3 :MeOH (1:1, v/v). Το διάλυμα αποθηκεύεται σε αδιαφανή γυάλινα βιδωτά φιαλίδια στους -20°C .

Διάλυμα 1 mg/ml 1-παλμιτούλο-2-λινελαϊκόυλο-sn-γλυκερο-3-φωσφοχολίνη (1-palmitoyl-2-linoleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine, PLPC). Σε 2,5 ml διαλύματος PLPC (10 mg/mL) σε CHCl_3 προστίθενται 2,5 mL MeOH (1:1, v/v) και εν συνεχεία 20 mL CHCl_3 :MeOH (1:1, v/v). Το διάλυμα αποθηκεύεται σε αδιαφανή γυάλινα βιδωτά φιαλίδια στους -20°C .

Διάλυμα 1 mg/ml 1,2-διελαϊκόυλο-sn-γλυκερο-3-φωσφοχολίνης (1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine, DOPC). 25 mg DOPC διαλύονται σε 25 mL CHCl_3 :MeOH (1:1, v/v). Το διάλυμα αποθηκεύεται σε αδιαφανή γυάλινα βιδωτά φιαλίδια στους -20°C .

Διάλυμα 1 mg/ml 1-ελαϊκόυλο-sn-γλυκερο-3-φωσφοχολίνης (1-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine, lysoDOPC). 25 mg lysoDOPC διαλύονται σε 25 mL CHCl_3 :MeOH (1:1, v/v). Το διάλυμα αποθηκεύεται σε αδιαφανή γυάλινα βιδωτά φιαλίδια στους -20°C .

Διάλυμα 20 mg/ml χοληστερόλης (CHOL). 100 mg CHOL διαλύονται σε 5 mL CHCl_3 . Το διάλυμα αποθηκεύεται σε αδιαφανές γυάλινο βιδωτό φιαλίδιο στους -20°C .

Λοιπά διαλύματα εργασίας για όξινη εκχύλιση λιποειδών, προσδιορισμό φωσφόρου και προσδιορισμό β -ακτινοβολίας όπως έχουν ήδη περιγραφεί.

Πειραματική διαδικασία

Τα λιποσώματα παρασκευάζονται με χρησιμοποίηση συνδυασμού διαφόρων συνθετικών φωσφολιπιδίων (οξειδωμένων ή μη) και χοληστερόλης με διατήρηση πάντοτε σταθερής της μοριακής αναλογίας μεταξύ του συνόλου των φωσφολιπιδίων και της χοληστερόλης σε 2 προς 1 (ολικά φωσφολιπίδια/χοληστερόλη 2:1, mol/mol). Η σύνθεση του μέρους των φωσφολιπιδίων ποικίλλει και είναι αυτή που αναγράφεται σε κάθε επιμέρους πείραμα. Ως μη οξειδωμένα φωσφολιπίδια χρησιμοποιούνται DPPC, PAPC, PLPC, DOPC, lysoPAPC, lysoDOPC και ως οξειδωμένα φωσφολιπίδια oxPAPC, oxPLPC, oxDOPC, oxlysoDOPC. Όσον αφορά στη μοριακή αναλογία της σύνθεσης του τμήματος των φωσφολιπιδίων σε κάθε περίπτωση στα 10 μέρη τα 7 ήταν DPPC και τα υπόλοιπα 3 μέρη συμπληρώνονται όπως αναγράφεται σε κάθε επιμέρους πείραμα με οξειδωμένα ή μη ακόρεστα φωσφολιπίδια ή λυσο παράγωγα, με την εξαίρεση των DPPC – λιποσωμάτων όπου και τα 10 μέρη αποτελούνταν από DPPC. Στην περίπτωση των οξειδωμένων φωσφολιπιδίων, αφού αυτά οξειδωθούν σε συγκέντρωση 0,5 $\mu\text{mol/mL}$ όπως περιγράφηκε ανωτέρω, υπόκεινται σε όξινη εκχύλιση των λιπιδίων. Η χλωροφορμική φάση συλλέγεται και οι διαλύτες εξατμίζονται μέχρι ξηρού σε ρεύμα N_2 και τα λιποειδή επαναδιαλύονται σε 500 μL $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$ (1:1, v/v) και αποθηκεύονται στους 4⁰C. Ακολουθεί προσδιορισμός φωσφόρου και προσδιορισμός της συγκέντρωσης των φωσφολιπιδίων. Οι ενδεικνυόμενες για τις ανάγκες του πειράματος ποσότητες φωσφολιπιδίων από τα διαλύματα εργασίας είτε από τα διαλελυμένα σε $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$ οξειδωμένα φωσφολιπίδια τοποθετούνται σε σωλήνα πολυπροπυλενίου. Για την παρασκευή σημασμένων λιποσωμάτων προστίθενται 100 μl διαλύματος [¹⁴C]DPPC ανά 0,5 μmoles του συνόλου των φωσφολιπιδίων. Οι διαλύτες εξατμίζονται μέχρι ξηρού σε ρεύμα N_2 και τοποθετείται ποσότητα PBS pH 7.4 ώστε να προκύψει διάλυμα με τελική συγκέντρωση φωσφολιπιδίων 0,2 mM στην περίπτωση των σημασμένων λιποσωμάτων και 2,5 mM στην περίπτωση των μη σημασμένων λιποσωμάτων. Στη συνέχεια ακολουθείται η ίδια διαδικασία όπως περιγράφηκε ανωτέρω στην παρασκευή των λιποσωμάτων από τα λιπίδια που εκχυλίζονται από LDL ή oxLDL. Το γαλάκτωμα τοποθετείται σε λουτρό υπερήχων για 15 min σε θερμοκρασία 37⁰C όταν πρόκειται για παρασκευή λιποσωμάτων που περιλαμβάνουν ακόρεστα φωσφολιπίδια και σε θερμοκρασία 45⁰C όταν πρόκειται για παρασκευή λιποσωμάτων που περιλαμβάνουν αποκλειστικά κεκορεσμένα φωσφολιπίδια. Ακολουθεί διήθηση υπό πίεση 8-10 φορές μέσω πολυανθρακικής μεμβράνης διαμέτρου 0,1 μm στους 37⁰C είτε στους 45⁰C για παρασκευή λιποσωμάτων που περιλαμβάνουν ακόρεστα φωσφολιπίδια και για παρασκευή λιποσωμάτων που περιλαμβάνουν αποκλειστικά κεκορεσμένα φωσφολιπίδια αντίστοιχα. Το μέγεθος των

λιποσωμάτων υπολογίζεται με τη μέθοδο δυναμικού σκεδασμού φωτός. Η μέση αποδεκτή διάμετρος των λιποσωμάτων είναι 120-160 nm. Η συγκέντρωση του τελικού διαλύματος ($C_{\text{τελική}}$) σε nmole φωσφολιπιδίων ανά mL προσδιορίζεται με μέτρηση φωσφόρου στα μη σημασμένα λιποσωμάτων και μέτρηση β-ακτινοβολίας στα σημασμένα λιποσώματα. Τα διαλύματα των λιποσωμάτων αποθηκεύονται στους 4°C σε σκοτεινό περιβάλλον (κάλυψη του σωλήνα με αλουμινόχαρτο). Τα λιποσώματα χρησιμοποιούνταν στα πειράματα πάντοτε την επόμενη ημέρα παρότι ήταν σταθερά για αρκετές ημέρες.

III.1.19. ΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΠΡΩΤΕΪΝΟΛΙΠΟΣΩΜΑΤΩΝ ΜΕ ΑΡΟΒ ΟΞΕΙΑΩΜΕΝΗΣ LDL[321, 584]

Αρχή της μεθόδου

Η ΑροΒ δεν είναι υδατοδιαλυτή και κυκλοφορεί στο αίμα μόνο ενωμένη με τα μόρια των λιποπρωτεϊνών. Για να καταστεί υδατοδιαλυτή η ΑροΒ που έχει απομονωθεί από oxLDL (oxΑροΒ) συνδέεται με λιποσώματα. Αρχικά oxΑροΒ απομονώνεται από oxLDL με εκχύλιση των λιπιδίων με $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$ (1:1, v/v) [321, 584]. Κατά την εκχύλιση αυτή σχηματίζονται δύο φάσεις, μία ανώτερη υδατομεθανολική η οποία περιέχει υδατοδιαλυτά μόρια και μία κατώτερη χλωροφορμική η οποία περιέχει τα λιπίδια, ενώ στο ενδιάμεσο των δύο αυτών φάσεων παραμένει η στοιβάδα της πρωτεΐνης. Μετά την απομάκρυνση των δύο φάσεων η πρωτεϊνική στοιβάδα πλένεται με dH_2O και ακετόνη για την περαιτέρω απομάκρυνση μη πρωτεϊνικών συστατικών. Για την ενσωμάτωση της ΑροΒ σε λιποσώματα ακολουθείται μία μέθοδος διαλυτοποίησης με χρήση απορρυπαντικού και ακόλουθη απομάκρυνσή του παρόμοια με αυτή των Lundberg και συν. [584]. Ως απορρυπαντικό χρησιμοποιείται ο κ-οκτυλο-β-D-γλυκοζίτης (octyl glucoside, OG) καθώς έχει δειχθεί πως η χρήση του δεν επηρεάζει τη σύνδεση της oxΑροΒ με τους υποδοχείς των μακροφάγων [321, 584]. Παρασκευάζεται γαλάκτωμα που περιέχει DPPC, CHOL και OG σε αναλογία βάρους 5:0.5:30 και με τελική συγκέντρωση OG 25 mM. Για τη σήμανση των πρωτεϊνολιποσωμάτων προστίθεται [^{14}C]DPPC. Το γαλάκτωμα αυτό προστίθεται στην απολιπιδιοποιημένη oxΑροΒ σε αναλογία βάρους μεταξύ DPPC και oxΑροΒ 5:1 (αναλογία βάρους μεταξύ OG και oxΑροΒ 30:1). Η τελική αναλογία βάρους μεταξύ oxΑροΒ:DPPC:CHOL είναι 1:5:0,5. Ακολουθεί έντονη ανάδευση και εν συνεχεία το OG απομακρύνεται στη συνέχεια με εκτενή διαπίδυση. Μη διαλυτοποιημένα συστατικά απομακρύνονται με φυγοκέντρηση. Μετά από δίοδο υπό πίεση μέσω πολυανθρακικής

μεμβράνης με πόρους διαμέτρου 0,2 μm λαμβάνονται πρωτεϊνολιποσώματα ομοιόμορφης διαμέτρου.

Αντιδραστήρια και όργανα

- L-α-dipalmitoyl [dipalmitoyl-1-14C] phosphatidylcholine ($[^{14}\text{C}]$ DPPC) 0,1 mCi/ mL, 55 mCi/mmol (1,818 mM) (American Radiolabeled Chemicals).
- 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine, σε συσκευασία των 25 mg, (MB 734,04) (Sigma)
- Χοληστερόλη (MB 386,65) σε συσκευασία του 1 g σκόνης (Sigma)
- Octyl β-D-glucopyranoside (κ-οκτυλο-β-D-γλυκοζίτης, octyl glucoside, OG) σε σκόνη (MB 292,37) (Sigma Alexis)
- Ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt dihydrate ($\text{Na}_2\text{EDTA}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$) (MB 372,24) (Sigma)
- NaCl (MB 58,44) (Merck)
- N-(2-Hydroxyethyl)piperazine-N'-(2-ethanesulfonic acid) (HEPES) (MB 238,3) (Sigma)
- Οργανικοί διαλύτες αναλυτικής καθαρότητας: χλωροφόρμιο (CHCl_3) (SDS), μεθανόλη (MeOH) (Merck), τολουένη (toluene) (Merck), ακετόνη (Acetone) (Ferak)
- Γυάλινες πιπέτες Pasteur των 3 mL
- Αποστειρωμένες συσκευές διήθησης 0,22μm (Corning)
- Κυκλοαναδευτήρας (vortex)
- Συσκευή εξώθησης (extrusion device) (10 mL LIPEX™ Thermobarrel Extruder, Northern Lipids)
- Πολυανθρακικές μεμβράνες (polycarbonate membranes) με πόρους διαμέτρου 0,2 μm (Nuclepore Track-Etched Membranes, Whatman)
- Συσκευή για την εκτίμηση του μεγέθους σωματιδίων με τη μέθοδο του δυναμικού σκεδασμού φωτός (dynamic light scattering, DLS) (Beckmann Coulter N4Plus DLS Particle Sizer)
- Κυψελίδες (semi-micro UV-cuvettes PLASTIBRAND®) (Brand GmbH)
- Πλαστικοί σωλήνες από πολυπροπυλένιο των 15 mL (Corning)
- Ψυχόμενη φυγόκεντρος πάγκου (ALC, International SRL PK 131R)

Λοιπά αντιδραστήρια και όργανα για παρασκευή διαλύματος PBS, διαπίδυση, μέτρηση πρωτεΐνης, και προσδιορισμό β-ακτινοβολίας όπως έχουν ήδη περιγραφεί.

Διαλύματα εργασίας

Διάλυμα ($[^{14}\text{C}]$ DPPC). 0,1 mL του αρχικού διαλύματος 1,2-διπαλμιτόυλο-sn-γλυκερο-3-φωσφοχολίνης [$[^{14}\text{C}]$ DPPC] (L-a-dipalmitoyl [dipalmitoyl-1- ^{14}C] phosphatidylcholine, [^{14}C]DPPC) 0,1 mCi/mL διαλύονται με προσθήκη αιθανόλης:τολουένης (1:1, v/v) σε τελικό όγκο 10 mL. Το διάλυμα που προκύπτει έχει περιεκτικότητα 0,1 $\mu\text{Ci/mL}$ και συγκέντρωση 1,818 μM , και αποθηκεύεται σε αδιαφανές γυάλινο βιδωτό φιαλίδιο στους -20°C .

Διάλυμα 1 mg/mL 1,2-διπαλμιτόυλο-sn-γλυκερο-3-φωσφοχολίνης (1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine, DPPC). 25 mg DPPC διαλύονται σε 25 mL CHCl_3 :MeOH (1:1, v/v). Το διάλυμα αποθηκεύεται σε αδιαφανή γυάλινα βιδωτά φιαλίδια στους -20°C .

Διάλυμα 10 mg/mL χοληστερόλης (CHOL). 100 mg CHOL διαλύονται σε 10 mL CHCl_3 . Το διάλυμα αποθηκεύεται σε αδιαφανές γυάλινο βιδωτό φιαλίδιο στους -20°C .

Διάλυμα 5% Na_2EDTA σε dH_2O , pH 7.4. Παρασκευάζεται και αποθηκεύεται όπως περιγράφηκε στην απομόνωση LDL από πλάσμα.

Ρυθμιστικό διάλυμα PBS, 0,2 mM EDTA, pH 7,4. Παρασκευάζεται και αποθηκεύεται όπως περιγράφηκε στην απομόνωση LDL από πλάσμα.

Διάλυμα 2,5 mM HEPES, 75 mM NaCl, 50 μM EDTA, pH 7,4. Για την παρασκευή 100 mL διαλύματος, 438,3 mg NaCl, 59,6 mg διαλύονται σε 90 mL dH_2O . Προστίθενται 33,62 μL διαλύματος 5% Na_2EDTA . Το pH ρυθμίζεται σε 7,4 με NaOH 1N και HCl 1N και ο όγκος συμπληρώνεται στα 100 mL με dH_2O . Το διάλυμα διηθείται σε συσκευή διήθησης 0,22 μm και αποθηκεύεται στους 4°C .

Διάλυμα 10% OG. 100 mg OG διαλύονται σε 1 mL dH_2O . Το διάλυμα αποθηκεύεται στους 4°C . Το διάλυμα χρησιμοποιείται εντός τριών ημερών.

Πειραματική διαδικασία

Απολιπιδιοποίηση oxApoB από oxLDL.

Σε διάλυμα MoxLDL ή HoxLDL 0,2 mg πρωτεΐνης/mL σε PBS, pH 7,4 προστίθεται CHCl_3 :MeOH (1:1, v/v) το οποίο είχε τοποθετηθεί στους 4°C . Η τελική αναλογία υδατικού διαλύματος, CHCl_3 , MeOH είναι αυτή της εκχύλισης κατά Bligh Dyer: 0,9:1:1. Μετά από έντονη ανάδευση ακολουθεί φυγοκέντρηση για το διαχωρισμό των φάσεων σε 5.000xg, για 10 min, στους 4°C . Στο ενδιάμεσο των δύο φάσεων (άνω υδατομεθανολικής και κάτω χλωροφορμικής) βρίσκεται η πρωτεΐνη με τη μορφή μίας ευδιάκριτης λευκής στοιβάδας - μεμβράνης. Μετά την απομάκρυνση των δύο φάσεων με πιπέττα Pasteur, η πρωτεϊνική στοιβάδα πλένεται δύο φορές με dH_2O , μία φορά με ακετόνη και άλλη μία φορά με dH_2O .

Το dH₂O και η ακετόνη έχουν τοποθετηθεί πριν τη χρησιμοποίησή τους στις πλύσεις στους 4°C.

Παρασκευή διαλύματος μικυλλίων DPPC, CHOL και OG σε αναλογία βάρους 5:0.5:30, τελική συγκέντρωση OG 25 mM.

Το γαλάκτωμα που παρασκευάζεται θα προστεθεί στη συνέχεια στην απολιπιδιοποιημένη oxApoB. Για κάθε 100 µg απολιπιδιοποιημένης oxApoB, στην οποία θα προστεθεί το γαλάκτωμα, τοποθετούνται σε πλαστικό σωλήνα 0,5 mL διαλύματος DPPC (500 µg), 5 µL διαλύματος CHOL (50 µg), 30 µL διαλύματος OG (3 mg) και για τη σήμανση των πρωτεϊνολιποσωμάτων 125 µL διαλύματος [¹⁴C]DPPC. Οι διαλύτες εξατμίζονται μέχρι ξηρού σε ρεύμα N₂ και προστίθενται 410,5 µL διαλύματος 2,5 mM HEPES, 75 mM NaCl, 50 µM EDTA, pH 7,4 για κάθε 3 mg OG έτσι ώστε να προκύψει τελική συγκέντρωση OG 25 mM. Μετά από έντονη ανάδευση (vortex), ο σωλήνας πολυπροπυλενίου κλείνεται με πώμα και τοποθετείται σε υδατόλουτρο υπερήχων στους 37°C για 15 min με ενδιάμεση έντονη ανάδευση (vortex). Το διάλυμα καθίσταται διαυγές και χρησιμοποιείται άμεσα.

Παρασκευή πρωτεϊνολιποσωμάτων.

Το διάλυμα μικυλλίων DPPC, CHOL και OG προστίθεται στην απολιπιδιοποιημένη oxApoB η οποία μόλις έχει προετοιμαστεί. Ακολουθεί έντονη ανάδευση (vortex) για 10 min και το διάλυμα τοποθετείται αμέσως μετά σε μεμβράνη διαπίδυσης. Η διαπίδυση εκτελείται έναντι PBS pH 7,4 στους 4°C, υπό συνεχή ανάδευση για 24 h όπως περιγράφηκε στην απομόνωση των λιποπρωτεϊνών. Μετά το πέρας της διαπίδυσης το διάλυμα φυγοκεντρείται στα 400xg για 10 min στους 4°C για την απομάκρυνση αδιάλυτων συστατικών. Το υπερκείμενο παραλαμβάνεται και ακολουθεί δίοδος υπό πίεση 8-10 φορές μέσω πολυανθρακικής μεμβράνης με πόρους διαμέτρου 0,2 µm στους 37°C. Το μέγεθος των λιποσωμάτων υπολογίζεται με τη μέθοδο σκεδασμού φωτός. Η μέση αποδεκτή διάμετρος των λιποσωμάτων είναι 180-220 nm. Τα πρωτεϊνολιποσώματα αποθηκεύονται στους 4°C. Σε δείγματα του διαλύματος προσδιορίζεται η περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη με τη DC-Lowry και μετράται η β-ακτινοβολία. Μετά από 24h αποθήκευσης στους 4°C αρχίζει να παρατηρείται σχηματισμός ιζήματος που πιθανότατα παριστά βαθμό σύντηξης μεταξύ των πρωτεϊνολιποσωμάτων με σχηματισμό μεγαλύτερων και αδιάλυτων πρωτεϊνολιποσωμάτων. Για το λόγο αυτό τα παρασκευασθέντα πρωτεϊνολιποσώματα χρησιμοποιούνται στα πειράματα άμεσα μετά την παρασκευή τους.

Παρασκευή αντίστοιχων μη συνδεδεμένων με πρωτεΐνη λιποσωμάτων.

Στα πειράματα πρόσληψης πρωτεϊνολιποσωμάτων από τα μακροφάγα χρησιμοποιούνται επίσης και αντίστοιχα των πρωτεϊνολιποσωμάτων λιποσώματα τα οποία χρησιμοποιούνται

σαν μάρτυρες για να τεκμηριωθεί η ειδική οφειλόμενη στη παρουσία της οxApoB σύνδεση και επακόλουθη πρόσληψη των πρωτεϊνολιποσωμάτων από τα μακροφάγα. Τα μη συνδεδεμένα με πρωτεΐνη λιποσώματα παρασκευάζονται με DPPC και CHOL παρουσία OG και σημαίνονται με [¹⁴C]DPPC με τον ίδιο ακριβώς τρόπο όπως αυτόν των πρωτεϊνολιποσωμάτων χωρίς όμως την προσθήκη της απολιπιδιοποιημένης οxApoB. Τα λιποσώματα αποθηκεύονται στους 4⁰C. Σε δείγμα του διαλύματος μετράται η β-ακτινοβολία. Τα λιποσώματα παρασκευάζονται και χρησιμοποιούνται στα πειράματα συγχρόνως με τα πρωτεϊνολιποσώματα.

III.1.20. ΥΠΕΡΦΥΓΟΚΕΝΤΡΗΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΟΛΙΠΟΣΩΜΑΤΩΝ [575, 585]

Αρχή της μεθόδου

Για την πιστοποίηση της σταθερότητας του εναιωρήματος των πρωτεϊνολιποσωμάτων ελέγχεται η επίπλευσή τους μετά από υπερφυγοκέντρησή τους σε διάλυμα KBr πυκνότητας 1.140 g/mL [585]. Μετά την υπερφυγοκέντρωση μετρώνται η πρωτεΐνη και η β-ακτινοβολία στο υπερκείμενο.

Αντιδραστήρια και όργανα

- Υπερφυγόκεντρος (L7-65, Beckman)
- Κεφαλή υπερφυγοκέντρου (Beckman Ti-75)
- Βιδωτοί πλαστικοί σωλήνες υπερφυγοκέντρου χωρητικότητας 10,5 mL (Beckman)
- KBr (MB 119,01) (Ferak). Το KBr ξηραίνεται σε κλίβανο στους 120⁰C για 1 h και διατηρείται σε ξηραντήρα.
- Ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt dihydrate (Na₂EDTA·2H₂O) (MB 372,24) (Sigma)
- Μεμβράνη διαπίδυσης (Visking dialysis tubing 27/32) (Serva)

Διαλύματα εργασίας

Διάλυμα 5% Na₂EDTA σε dH₂O, pH 7,4. Παρασκευάζεται και αποθηκεύεται όπως περιγράφηκε στην απομόνωση LDL από πλάσμα.

Διάλυμα KBr σε dH₂O πυκνότητας 1,019 g/mL. 14,92 g KBr διαλύονται μέχρι τελικό όγκο 500 mL. Το διάλυμα περιέχει 10μL/mL 5% Na₂EDTA και 10μL/mL διαλύματος

πενικιλίνης/στρεπτομυκίνης (100UI/100μg ανά mL). Το διάλυμα φιλτράρεται με φίλτρο διήθησης 0,2 μm και αποθηκεύεται στους 4°C.

Διάλυμα KBr σε dH₂O πυκνότητας 1.210 g/mL. 159,3 gr KBr διαλύονται μέχρι τελικό όγκο 500 mL. Το διάλυμα περιέχει 10μL/mL 5% Na₂EDTA και 10μL/mL διαλύματος πενικιλίνης/στρεπτομυκίνης (100UI/100μg ανά mL). Το διάλυμα φιλτράρεται με φίλτρο διήθησης 0,2 μm και αποθηκεύεται στους 4°C.

Πειραματική διαδικασία

Ποσότητα πρωτεϊνολιποσωμάτων σημασμένων με [¹⁴C]DPPC που παρασκευάστηκαν όπως περιγράφηκε ανωτέρω, τίθενται σε διαπίδυση έναντι διαλύματος KBr πυκνότητας 1,019 g/mL στους 4°C για 24 h (η διαδικασία της διαπίδυσης έχει περιγραφεί στην απομόνωση LDL από πλάσμα). Στο τέλος της διαπίδυσης το διάλυμα των πρωτεϊνολιποσωμάτων έχει πρακτικά πυκνότητα 1,019 g/mL. Στο διάλυμα αυτό προστίθεται όγκος διαλύματος KBr πυκνότητας 1,210 g/mL ώστε να προκύψει διάλυμα πυκνότητας 1,140 g/mL με βάση την εξίσωση $V_1 \times 1,019 + V_2 \times 1,210 = V_{\text{τελικός}} \times 1,140$ (V_1 : όγκος διαλύματος με πυκνότητα 1,019, V_2 : όγκος διαλύματος με πυκνότητα 1,210 και $V_{\text{τελικός}}$: $V_1 + V_2$). Έτσι σε κάθε 1 mL του διαλύματος των πρωτεϊνολιποσωμάτων προστίθεται 1,0475 mL διαλύματος KBr πυκνότητας 1,210 g/mL. Μετά από ήπια ανάδευση του τελικού διαλύματος, τοποθετείται στους πλαστικούς σωλήνες υπερφυγοκέντρου ανά 1 mL σε κάθε σωλήνα. Ο όγκος συμπληρώνεται με διάλυμα KBr πυκνότητας 1,210 g/mL. Τα σωληνάκια αφού ζυγοσταθμιστούν τοποθετούνται στην κεφαλή της υπερφυγοκέντρου και φυγοκεντρούνται σε 143.000xg, για 10h, στους 14°C. Μετά το πέρας της φυγοκέντρωσης αναρροφώνται προσεκτικά με πιπέτα Pasteur τα 2 ανώτερα mL και ακολούθως ξεχωριστά ποσότητες ανά 2 mL. Στα δείγματα αυτά προσδιορίζονται η πρωτεΐνη και η β-ακτινοβολία. Με βάση τις μετρήσεις αυτές και τις μετρήσεις πρωτεΐνης και β-ακτινοβολίας στο αρχικό διάλυμα των πρωτεϊνολιποσωμάτων προσδιορίζεται η ανάκτηση των πρωτεϊνολιποσωμάτων μετά την φυγοκέντρωση.

III.1.21. ΜΕΛΕΤΕΣ ΣΥΝΔΕΣΗΣ ΤΗΣ ΟΧΡΑΡC ΚΑΙ ΤΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΥΔΡΟΛΥΣΗΣ ΤΗΣ ΣΤΗΝ ΑΡΟΒ

Αρχή της μεθόδου

Η οχΡΑΡC αποτελεί υπόστρωμα της Lp-PLA₂. Η οξείδωση του αραχιδονικού στην sn-2 θέση οδηγεί σε ποικίλες μορφές οχΡΑΡC κάποιες από τις οποίες περιέχουν βραχύτερες αλυσίδες στην sn-2 θέση μετά από απόσπαση περιφερικού τμήματος της αλυσίδας. Από τα μόρια αυτά οχΡΑΡC με βραχύτερη αλυσίδα στην sn-2 θέση κάποια αποτελούν υποστρώματα της Lp-PLA₂. Από την υδρόλυση της οχΡΑΡC προκύπτει lysoΡΑΡC και μικρού μοριακού βάρους προϊόντα της υδρόλυσης που αποτελούν τις συνδεδεμένες αλυσίδες στην sn-2 θέση της οχΡΑΡC οι οποίες αποκόπτονται από την Lp-PLA₂.

Για τη διαπίστωση του βαθμού σύνδεσης της μη υδρολυμένης οχΡΑΡC και των μικρού μοριακού βάρους προϊόντων της υδρόλυσης στην ΑροΒ χρησιμοποιείται [¹⁴C]ΡΑΡC της οποίας η σήμανση με ¹⁴C βρίσκεται στο 1ο άτομο άνθρακα της αλυσίδας του αραχιδονικού, το εγγύτερο στο γλυκερινικό σκελετό, και έτσι τα μικρού μοριακού βάρους προϊόντα της υδρόλυσης της [¹⁴C]ΡΑΡC είναι σημασμένα με ¹⁴C ενώ αυτό δεν συμβαίνει για τα μικρού μοριακού βάρους προϊόντα της οξείδωσης τα οποία αποσπώνται από το περιφερικό τμήμα της αλυσίδας του αραχιδονικού πριν από την υδρόλυση. Ακολουθούνται δύο οδοί: α) συνοξείδωση [¹⁴C]ΡΑΡC με LDL με διατηρημένη τη δραστηριότητα της Lp-PLA₂ [LDL(+)] ή με LDL με ανεσταλμένη τη δραστηριότητα της Lp-PLA₂ μετά από επώαση με refabloc [LDL(-)] και β) επώαση LDL(+ ή -) και oxLDL (+ ή -) με [¹⁴C]ΡΑΡC ή με μικρού μοριακού βάρους προϊόντα της υδρόλυσης της [¹⁴C]ΡΑΡC τα οποία έχουν απομονωθεί μετά από επώαση [¹⁴C]ΡΑΡC με μερικώς καθαρισμένη Lp-PLA₂. Στο τέλος και των δύο οδών η ΑροΒ ή η οχΑροΒ απομονώνεται, μετρώνται η πρωτεΐνη και η β-ακτινοβολία και υπολογίζεται το ποσοστό των ραδιενεργών μορίων που βρίσκονται συνδεδεμένα με την πρωτεΐνη.

Αντιδραστήρια και όργανα

- 1 – palmitoyl – 2 – arachidonyl –sn–glycero–3–phosphocholine (ΡΑΡC) (Sigma)
- 1 – palmitoyl – 2 – arachidonyl –sn–glycer–3–phosphocholine [arachidonyl–1–¹⁴C], ([¹⁴C]ΡΑΡC) (American Radiolabeled Chemicals) 0,25 mCi/5 ml, 10 Ci/mmol (5μM).
- Δωδεκυλοθειϊκό νάτριο (Sodium Dodecyl Sulphate Na salt, SDS) (M.B. 288,38) (Serva)

- Υδροξείδιο του νατρίου NaOH, σε σφαιρίδια (M.B. 40) (Merck)

Λοιπά αντιδραστήρια και όργανα όπως περιγράφηκαν στη οξείδωση της LDL, στην οξείδωση φωσφολιπιδίων, στη μέθοδο Bligh Dyer, στην απομόνωση της ApoB, στη μέτρηση πρωτεΐνης και στον προσδιορισμό β-ακτινοβολίας.

Διαλύματα εργασίας

Διάλυμα 1 mg/ml 1-παλμιτόϋλο-2-αραχιδονόϋλο-sn-γλυκερο-3-φωσφοχολίνης (1-palmitoyl-2-arachidonyl-sn-glycero-3-phosphocholine, PAPC). 5 mg PAPC διαλύονται σε 5 mL $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$ (1:1, v/v). Το διάλυμα αποθηκεύεται σε αδιαφανές γυάλινο βιδωτό φιαλίδιο στους -20°C .

Διάλυμα 1-παλμιτόϋλο-2-αραχιδονόϋλο-sn-γλυκερο-3-φωσφοχολίνης [αραχιδονόϋλο -1- ^{14}C] (1-palmitoyl-2-arachidonyl-sn-glycero-3-phosphocholine [arachidonyl -1- ^{14}C], [^{14}C]PAPC). 0,5 mL του αρχικού διαλύματος [^{14}C]PAPC, 0,25 mCi/5 mL διαλύονται με προσθήκη $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$ (1:1, v/v) σε τελικό όγκο 10 mL. Το διάλυμα που προκύπτει έχει περιεκτικότητα 2,5 $\mu\text{Ci/mL}$ και αποθηκεύεται σε αδιαφανές γυάλινο βιδωτό φιαλίδιο στους -20°C .

Διάλυμα 2N NaOH. 4 g NaOH διαλύονται σε 50 mL dsH_2O . Επειδή το NaOH είναι σε μορφή σφαιριδίων και η ακριβής ζύγιση μιας συγκεκριμένης ποσότητας συχνά δεν είναι εφικτή, ζυγίζεται ποσότητα που προσεγγίζει την επιθυμητή και εν συνεχεία υπολογίζεται και προστίθεται η ποσότητα dsH_2O που αντιστοιχεί ώστε να προκύψει τελική συγκέντρωση 2N. Το διάλυμα φυλάσσεται σε πλαστική φιάλη σε θερμοκρασία δωματίου.

Διάλυμα 0,111% SDS. 111 mg SDS διαλύονται σε 100 mL dsH_2O . Το διάλυμα φυλάσσεται σε γυάλινη φιάλη σε θερμοκρασία δωματίου.

Λοιπά διαλύματα εργασίας όπως περιγράφηκαν στη οξείδωση της LDL, στην οξείδωση φωσφολιπιδίων, στη μέθοδο Bligh Dyer, στην απομόνωση της ApoB, στη μέτρηση πρωτεΐνης και στον προσδιορισμό β-ακτινοβολίας.

Πειραματική διαδικασία

A) Συνοξειδωση [^{14}C]PAPC με LDL με διατηρημένη τη δραστηριότητα της Lp-PLA₂ [LDL(+)] ή με LDL με ανεσταλμένη τη δραστηριότητα της Lp-PLA₂ μετά από επώαση με refabloc [LDL(-)]. Διάλυμα LDL(+) ή LDL(-) σε συγκέντρωση 100 μg πρωτεΐνης/mL και PAPC σε συγκέντρωση 25 nmoles/mL σημασμένη με προσθήκη [^{14}C]PAPC, σε διάλυμα PBS pH 7,4 συνοξειδώθηκαν παρουσία 5 μM CuSO_4 για 24 h στους 37°C . Η παρασκευή του διαλύματος της PAPC σε PBS και η σήμανση με προσθήκη ποσότητας πρότυπου

διαλύματος [^{14}C]PAPC γίνεται όπως περιγράφηκε ανωτέρω στις Μεθόδους (Μέθοδοι III.1.4. Οξείδωση των φωσφολιπιδίων). Στο τέλος της οξείδωσης η oxApoB απομονώνεται όπως περιγράφηκε ήδη στην παρασκευή των πρωτεϊνολιποσωμάτων (Μέθοδοι III.1.19). Η oxApoB διαλυτοποιείται σε 0,5 mL 0.2M NaOH, 0.1% SDS. Αυτό γίνεται με την προσθήκη 450 μL διαλύματος 0,111% SDS και 50 μL διαλύματος 2N NaOH που ακολουθείται από έντονη ανάδευση. Ποσότητα 100 μL χρησιμοποιείται για μέτρηση πρωτεΐνης με DC-Lowry και ποσότητα 300 μL χρησιμοποιείται για μέτρηση β -ακτινοβολίας (σε cpm). Επίσης μετράται η β -ακτινοβολία σε ποσότητα από το αρχικό διάλυμα της σημασμένης PAPC. Έτσι με γνωστή την αναλογία β -ακτινοβολίας ανά nmole σημασμένης PAPC υπολογίζεται το ποσοστό των σημασμένων μορίων που έχει συνδεθεί στην oxApoB και το οποίο εκφράζεται ως % της συνολικής β -ακτινοβολίας που βρίσκεται συνδεδεμένο στην oxApoB.

B) Επώαση LDL(+ ή -) και oxLDL(+ ή -) με [^{14}C]PAPC ή με μικρού μοριακού βάρους προϊόντα της υδρόλυσης της [^{14}C]PAPC τα οποία έχουν απομονωθεί μετά από επώαση [^{14}C]PAPC με μερικώς καθαρισμένη Lp-PLA₂. PAPC σε συγκέντρωση 0.5 $\mu\text{moles/mL}$ σημασμένη με προσθήκη [^{14}C]PAPC, οξειδώθηκε σε διάλυμα PBS pH 7,4 παρουσία 5 μM CuSO₄ για 24 h στους 37°C. Στο τέλος της οξείδωσης η ox[^{14}C]PAPC λαμβάνεται με εκχύλιση Bligh Dyer στη χλωροφορμική φάση. Η χλωροφορμική φάση συλλέγεται, οι διαλύτες εξατμίζονται μέχρι ξηρού σε ρεύμα N₂ και η ox[^{14}C]PAPC επαναδιαλύεται σε PBS pH 7,4 σε τελική συγκέντρωση 2 $\mu\text{moles/mL}$. Δείγματα των 0,5 μmole ox[^{14}C]PAPC επωάζονται με ή χωρίς την προσθήκη 200 μονάδων μερικώς καθαρισμένης Lp-PLA₂ (1 μονάδα υδρολύει 1 nmole PAF σε 1h, 1 μονάδα = 1 nmole PAF/1h) σε τελικό όγκο 250 μL (η συμπλήρωση του όγκου έως τα 250 μL γίνεται με PBS pH 7.4) για 24 h στους 37°C υπό συνεχή ανάδευση σε υδατόλουτρο. Δεδομένου ότι η μερικώς καθαρισμένη Lp-PLA₂ βρίσκεται διαλυμένη σε ρυθμιστικό διάλυμα Γ (5 mM Tris-HCl, 0.5M KCl 0.1%, 25 mM OG, 10 μM butylated hydroxytoluene, pH 7,5) στην περίπτωση των δειγμάτων που επωάζονται χωρίς την προσθήκη μερικώς καθαρισμένης Lp-PLA₂ (μάρτυρες), προστίθεται αντίστοιχη ποσότητα ρυθμιστικού διαλύματος Γ. Μετά την ολοκλήρωση της επώασης, τα μικρού μοριακού βάρους προϊόντα της υδρόλυσης διαχωρίζονται από τη μη υδρολυμένη oxPAPC με εκχύλιση Bligh-Dyer (12). Η άνω, υδατομεθανολική, φάση περιέχει τα μικρού μοριακού βάρους προϊόντα της υδρόλυσης ενώ η κάτω, χλωροφορμική, την oxPAPC. Η άνω φάση συλλέγεται και πλένεται με ίσο όγκο χλωροφορμίου. Η άνω φάση συλλέγεται εκ νέου μετά από φυγοκέντρηση, και οι διαλύτες εξατμίζονται μέχρι ξηρού σε ρεύμα N₂. Τα μικρού μοριακού βάρους προϊόντα της υδρόλυσης επαναδιαλύονται με προσθήκη PBS pH 7,4 έτσι ώστε ποσότητα μικρού μοριακού βάρους προϊόντων υδρόλυσης που προέρχονται από

επώαση 0.5 μmole $\text{ox}[^{14}\text{C}]\text{PAPC}$ με Lp-PLA_2 να διαλυθούν σε 250 μL PBS pH 7.4. Η ίδια διαδικασία ακολουθήθηκε και για τα δείγματα μάρτυρες. Η συγκέντρωση της $\text{ox}[^{14}\text{C}]\text{PAPC}$ και των μικρού μοριακού βάρους προϊόντων της υδρόλυσης υπολογίζεται σε κάθε περίπτωση με μέτρηση της β -ακτινοβολίας, καθώς με μέτρηση της β -ακτινοβολίας στο αρχικό διάλυμα της σημασμένης PAPC είναι γνωστή η αναλογία β -ακτινοβολίας ανά nmole σημασμένης PAPC. Στη συνέχεια LDL(+ ή -) και oxLDL(+ ή -) σε τελική συγκέντρωση 100 μg πρωτεΐνης/mL επώαστηκαν είτε με μικρού μοριακού βάρους προϊόντων της υδρόλυσης είτε με $\text{ox}[^{14}\text{C}]\text{PAPC}$ είτε με μη οξειδωμένη $[^{14}\text{C}]\text{PAPC}$ σε τελική συγκέντρωση 25 nmol/mL για 24 h στους 37°C. Επίσης όσον αφορά στην επώαση με τα μικρού μοριακού βάρους προϊόντα της υδρόλυσης, ως μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε επώαση με ίσο όγκο διαλύματος που προήλθε από την άνω φάση της εκχύλισης των δειγμάτων μαρτύρων. Στο τέλος της επώασης η αποπρωτεΐνη B (μη οξειδωμένη ApoB ή oxApoB) απομονώνεται, διαλυτοποιείται σε 0,5 mL 0,2M NaOH, 0,1% SDS και δείγματα χρησιμοποιούνται για μέτρηση πρωτεΐνης και β -ακτινοβολίας όπως περιγράφηκε ανωτέρω. Το ποσοστό των σημασμένων μορίων που έχει συνδεθεί στην ApoB ή στην oxApoB εκφράζεται ως % της συνολικής β -ακτινοβολίας που βρίσκεται συνδεδεμένο στην ApoB ή στην oxApoB. Οι τιμές που ελήφθησαν από την επώαση με τα δείγματα μάρτυρες αφαιρέθηκαν από τις τιμές που ελήφθησαν από την επώαση με τα μικρού μοριακού βάρους προϊόντα της υδρόλυσης.

III.1.22. ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΠΕΡΙΤΟΝΑΪΚΩΝ ΜΑΚΡΟΦΑΓΩΝ ΠΟΝΤΙΚΟΥ [328]

Αρχή της μεθόδου

Με ενδοπεριτοναϊκή έγχυση διαλύματος θειογλυκολικού οξέος (thioglycollate medium) προκαλείται αύξηση του αριθμού των λευκοκυττάρων στην περιτοναϊκή κοιλότητα τα οποία στην πλειονότητά τους είναι μακροφάγα και λεμφοκύτταρα. Με περιτοναϊκή πλύση αμέσως μετά τη θανάτωση των πειραματοζώων συλλέγονται τα κύτταρα. Μετά από πλύσεις των κυττάρων, αυτά τοποθετούνται σε πλακίδια καλλιέργειας μαζί με θρεπτικό υλικό. Τα μακροφάγα διακρίνονται για την ικανότητά τους να προσκολλώνται γρήγορα στον πυθμένα της θέσης του πλακιδίου καλλιέργειας. Με την απομάκρυνση του υπερκειμένου μετά από λίγες ώρες, τα κύτταρα που δεν έχουν προσκολληθεί απομακρύνονται. Ο πληθυσμός κυττάρων που παραμένει προσκολλημένος και συνεχίζει να καλλιεργείται αποτελείται σχεδόν αποκλειστικά από μακροφάγα.

Πειραματόζωα

Χρησιμοποιήθηκαν θηλυκά ποντίκια BALB/c ηλικίας 6-8 εβδομάδων τα οποία προμήθευσε το Ινστιτούτο Pasteur. Όλες οι σχετικές με τη μεταχείριση των πειραματοζώων διαδικασίες ήταν σε συμφωνία με τις αρχές των οδηγιών για τη φροντίδα και τη μεταχείριση πειραματοζώων.

Αντιδραστήρια και όργανα

- Thioglycollate medium, σε σκόνη, (Sigma)
- RPMI 1640 (BioWhittaker)
- Fetal calf serum, (FCS) (BioWhittaker)
- HBSS (Hank's Balanced Salt Solution) με CaCl_2 και MgCl_2 (BioWhittaker)
- Διάλυμα πενικιλίνης-στρεπτομυκίνης (10.000 units/mL, 10.000 $\mu\text{g/mL}$) (BioWhittaker)
- Αποστειρωμένες σύριγγες των 2,5 mL
- Αποστειρωμένες βελόνες 30G x 8mm
- Γυάλινα βιδωτά δοχεία pyrex των 250 mL και των 500 mL
- Αποστειρωμένες σύριγγες των 2,5 mL και βελόνες διαμέτρου
- Αποστειρωμένα πλακίδια καλλιέργειας κυττάρων 12 θέσεων (Corning)
- Πλαστικοί αποστειρωμένοι κωνικοί σωλήνες από πολυπροπυλένιο των 50 mL (Corning)
- Αποστειρωμένα σιφόνια των 5, 10 mL (Corning)
- Αποστειρωμένες πλαστικές πιπέτες Pasteur με ευρύ χείλος των 3 mL
- Σωληνάκια Eppendorf του 1 mL (Corning)
- Διάλυμα 0,4% Trypan blue (Sigma)
- Αιματοκυτταρομετρική πλάκα Newbauer
- Οπτικό μικροσκόπιο
- Ανεστραμμένο μικροσκόπιο (Leica)
- Κλίβανος αποστείρωσης
- Ψυχόμενη φυγόκεντρος (ACL, Internatinal SRL PK 131R)
- Εστία κυτταροκαλλιιεργειών
- Κλίβανος κυτταροκαλλιιεργειών με ατμόσφαιρα 5% CO_2

Διαλύματα εργασίας

Διάλυμα 2,98% thioglycollate medium. 2,98 g thioglycollate medium τοποθετούνται σε γυάλινο βιδωτό δοχείο pyrex των 250 mL και προστίθενται 100 mL dH₂O. Ακολουθεί ανάδευση στο τέλος της οποίας το διάλυμα είναι θολερό. Το διάλυμα τοποθετείται σε κλίβανο αποστείρωσης. Στο τέλος της αποστείρωσης το διάλυμα έχει πλήρως διαυγάσει και αφού αφηθεί να κρυώσει σε θερμοκρασία δωματίου, αποθηκεύεται στους 4⁰C. Για κάθε πείραμα παρασκευάζεται νέο διάλυμα.

RPMI 1640, 10% FCS, με πενικιλίνη-στρεπτομυκίνη 100 units/mL, 100 μg/mL (RPMI, 10% FCS, P/S). Σε πλαστικό αποστειρωμένο σωλήνα των 50 mL τοποθετούνται 44,5 mL RPMI 1640, 5 mL FCS και 0,5 mL διαλύματος πενικιλίνης-στρεπτομυκίνης (10.000 units/mL, 10.000 μg/mL) (τελικός όγκος 50 mL). Το διάλυμα αποθηκεύεται στους 4⁰C.

Ρυθμιστικό διάλυμα PBS, pH 7,4. 9 g NaCl, 0,528 g Na₂HPO₄·2H₂O και 0,144 g KH₂PO₄ διαλύονται σε 900 mL dH₂O. Το pH ρυθμίζεται σε 7.4 με NaOH 1N και HCl 1N, ο όγκος συμπληρώνεται στο 1 lt με dH₂O. Το διάλυμα μοιράζεται σε γυάλινα βιδωτά δοχεία pyrex των 500 mL και τοποθετείται σε κλίβανο αποστείρωσης. Μετά το πέρας της αποστείρωσης και αφού αφηθεί να κρυώσει σε θερμοκρασία δωματίου το διάλυμα αποθηκεύεται στους 4⁰C.

Πειραματική διαδικασία

Συλλογή κυττάρων

Στα πειραματόζωα γίνεται ενδοπεριτοναϊκή εγχυση 2 mL 2,98% thioglycollate medium. Μετά από 4 ημέρες τα πειραματόζωα θανατώνονται με αυχενική απεξάρθρωση. Τα κύτταρα της περιτοναϊκής κοιλότητας λαμβάνονται με περιτοναϊκή πλύση με PBS, pH 7,4 το οποίο διατηρείται σε πάγο, και συλλέγονται σε αποστειρωμένο σωλήνα από πολυπροπυλένιο των 50 mL ο οποίος είναι τοποθετημένος σε πάγο. Ακολουθεί φυγοκέντρηση σε 400xg για 5 min στους 4⁰C. Το υπερκείμενο απορρίπτεται και η στοιβάδα των κυττάρων η οποία έχει καθιζήσει, επαναδιαλύεται σε 25 mL PBS, pH 7,4. Μετά από φυγοκέντρηση και απόχυση του υπερκείμενου η στοιβάδα των κυττάρων επαναδιαλύεται σε 25 mL RPMI, 10% FCS, P/S. Τα κύτταρα συλλέγονται εκ νέου με φυγοκέντρηση και διαλύονται σε 1 mL RPMI 1640, 10% FCS, P/S.

Μέτρηση των κυττάρων

Ποσότητα 10 μL από το εναιώρημα των κυττάρων τοποθετείται σε σωληνάκι erpendorf, προστίθενται 90 μL PBS, pH 7,4 και 100 μL διαλύματος Trypan blue και ακολουθεί ανάδευση. Ποσότητα του εναιωρήματος των κυττάρων τοποθετείται και στις δύο πλευρές

της πλάκας Newbauer. Μετρώνται τα λευκοκύτταρα που είναι στην πλειονότητά τους μονοκύτταρα/μακροφάγα, σε κάθε μεγάλο τετράγωνο. Κύτταρα στα οποία έχει διεισδύσει Trypan blue εμφανίζονται με χρωματισμένο μπλέ κυτταρόπλασμα. Τα κύτταρα αυτά θεωρούνται νεκρά και δεν περιλαμβάνονται στην καταμέτρηση. Υπολογίζεται ο μέσος όρος του αριθμού των ζωντανών λευκοκυττάρων σε ένα τετράγωνο (αριθμός κυττάρων ανά τετράγωνο), ο οποίος αντιστοιχεί σε 0,1 μL του εναιωρήματος των κυττάρων που τοποθετήθηκε. Η συγκέντρωση των λευκοκυττάρων στο αρχικό εναιώρημα σε RPMI 1640, 10% FCS, P/S υπολογίζεται βάσει του τύπου: αριθμός κυττάρων / mL εναιωρήματος = αριθμός κυττάρων ανά τετράγωνο $\times 2 \times 10^3$.

Καλλιέργεια μονοκυττάρων/μακροφάγων

Σε κάθε θέση των πλακιδίων καλλιέργειας κυττάρων 12 θέσεων τοποθετείται ποσότητα από το εναιώρημα των κυττάρων που περιέχει 1×10^6 κύτταρα και ο όγκος σε κάθε θέση συμπληρώνεται με RPMI 1640, 10% FCS, P/S έως τελικού όγκου 1 mL. Τα κύτταρα που δεν έχουν προσκολληθεί στον πυθμένα της θέσης του πλακιδίου καλλιέργειας απομακρύνονται με απομάκρυνση του υπερκειμένου μετά από 4h και πλύση με 1 mL HBSS $\times 3$. Στη συνέχεια τοποθετείται 1 mL RPMI 1640, 10% FCS, P/S. Η καλλιέργεια των κυττάρων που έχουν προσκολληθεί, χρησιμοποιείται την επόμενη ημέρα στα πειράματα.

III.1.23. ΠΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΗΣ ΠΑΡΟΥΣΙΑΣ ΤΩΝ ΜΑΚΡΟΦΑΓΩΝ ΣΤΗΝ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ [586]

Αρχή της μεθόδου

Τα μακροφάγα ποντικού εκφράζουν τον αντιγονικό επίτοπο επιφανείας CD11b. Η καλλιέργεια των μακροφάγων επώάζεται με σημασμένο με φθορίζουσα ουσία αντίσωμα ειδικό έναντι του CD11b ή αντίσωμα ομοίως σημασμένο με την ίδια φθορίζουσα ουσία το οποίο αποτελεί ισοτυπικό μάρτυρα του ειδικού αντισώματος. Η επώαση με ισοτυπικό μάρτυρα γίνεται για να εκτιμηθεί η μη ειδική αντισωματική σύνδεση. Μετά το τέλος της επώασης η σύνδεση των αντισωμάτων εκτιμάται με μέτρηση της έντασης φθορισμού των κυττάρων με κυτταρομετρία ροής.

Αντιδραστήρια και όργανα

- Συνδεδεμένο με φυκοερυθρίνη μονοκλωνικό αντίσωμα εναντίον CD11b ποντικού (Phycoerythrin (PE)-conjugated monoclonal anti-mouse CD11b) (25 µg/mL) (R&D systems)
- Συνδεδεμένο με φυκοερυθρίνη ισοτυπικό αντίσωμα μάρτυρας (PE-conjugated isotype control) (R&D systems)
- HBSS (Hank's Balanced Salt Solution) με CaCl₂ και MgCl₂ (BioWhittaker)
- Διάλυμα 30% BSA (Bovine serum albumin), αποστειρωμένο, δοκιμασμένο σε κυτταρικές καλλιέργειες (Sigma)
- Κυτταροροόμετρο ροής (FACScalibur, Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) με λογισμικό ανάλυσης δεδομένων (CELLQUEST software, Becton-Dickinson)
- Πλαστικοί σωλήνες για κυτταρομετρία ροής
- Πλαστικοί αποστειρωμένοι κωνικοί σωλήνες από πολυπροπυλένιο των 15 mL (Corning)
- Αποστειρωμένα σιφόνια των 5, 10 mL (Corning)
- Αποστειρωμένες πλαστικές πιπέτες Pasteur με ευρύ χείλος των 3 mL
- Αποστειρωμένες συσκευές διήθησης 0,22µm (Corning)
- Εστία κυτταροκαλλιιεργειών
- Κλίβανος κυτταροκαλλιιεργειών με ατμόσφαιρα 5% CO₂

Διαλύματα εργασίας

Διάλυμα PBS pH 7,4, 0,1% BSA. 0,333 mL διαλύματος 30% BSA προστίθενται σε 96,666 mL διαλύματος PBS pH 7,4 (τελικός όγκος 100 mL). Μετά από ήπια ανάδευση το διάλυμα διηθείται σε συσκευή διήθησης 0,22µm και αποθηκεύεται στους 4⁰C.

Πειραματική διαδικασία

Γίνεται συλλογή και καλλιέργεια περιτοναϊκών μακροφάγων όπως περιγράφηκε ανωτέρω (III.1.22. καλλιέργεια περιτοναϊκών μακροφάγων ποντικού). Την επόμενη ημέρα της τοποθέτησης των κυττάρων απομακρύνεται το υπερκείμενο και ακολουθούν 3 πλύσεις με 1 mL HBSS. Σε κάθε θέση στην οποία έχουν αρχικά τοποθετηθεί 1x10⁶ κύτταρα, τοποθετείται 1 mL διαλύματος PBS pH 7,4, 0,1% BSA και τα κύτταρα αποκολλώνται με ελαφρά απόξεση από τον πυθμένα με πιπέτα Pasteur. Τα κύτταρα κάθε θέσης αναδεύονται και μεταφέρονται σε πλαστικό σωλήνες φυγοκέντρωσης και φυγοκεντρώνονται σε 400xg για

5 min στους 4⁰C. Μετά από απόχυση του υπερκειμένου, τα κύτταρα επαναδιαλύονται σε τελικό όγκο 90 μL διαλυματος PBS pH 7,4, 0,1% BSA. Ακολουθεί προσθήκη 10 μL του αντισώματος έναντι του CD11b ή του ισοτυπικού μάρτυρα και μετά από ήπια ανάδευση γίνεται επώαση για 45 min στους 4⁰C. Εν συνεχεία, η περίσσεια των αντισωμάτων απομακρύνεται με δύο πλύσεις με 5 mL διαλυματος PBS pH 7,4, 0,1% BSA. Τα κύτταρα επανασυλλέγονται μετά από κάθε πλύση με φυγοκέντρηση όπως περιγράφηκε και τελικά επαναδιαλύονται σε 1 mL PBS pH 7,4, 0,1% BSA και υποβάλλονται σε κυτταρομετρία ροής.

III.1.24. ΜΕΛΕΤΕΣ ΣΥΝΔΕΣΗΣ ΚΑΙ ΠΡΟΣΛΗΨΗΣ ΦΥΣΙΚΩΝ Ή ΟΞΕΙΔΩΜΕΝΩΝ LDL ΑΠΟ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΜΑΚΡΟΦΑΓΩΝ [328, 587]

Αρχή της μεθόδου

Η καλλιέργεια των μακροφάγων επωάζεται με σημασμένη με FITC φυσική ή οξειδωμένη LDL με ή χωρίς την παρουσία ανταγωνιστών στην πρόσληψη από τα μακροφάγα για να εκτιμηθεί η ειδική (μέσω υποδοχέων) σύνδεση και επακόλουθη πρόσληψη της σημασμένης λιποπρωτεΐνης. Ως ανταγωνιστές χρησιμοποιούνται μη σημασμένη φυσική ή οξειδωμένη LDL ή μη σημασμένα λιποσώματα. Η επώαση γίνεται σε RPMI 1640 χωρίς την παρουσία FCS που περιέχει λιποπρωτεΐνες και ως εκ τούτου θα επηρέαζε την πρόσληψη της υπό μελέτη σημασμένης λιποπρωτεΐνης. Η επώαση γίνεται στους 37⁰C ή στους 4⁰C. Η επώαση στους 37⁰C προσεγγίζει περισσότερο τις φυσιολογικές συνθήκες πρόσληψης (uptake) ενώ η επώαση στους 4⁰C πλεονεκτεί στο ότι ελαχιστοποιεί τη μη ειδική σύνδεση της λιποπρωτεΐνης στα κύτταρα. Επίσης στην επώαση στους 4⁰C μελετάται μόνο η σύνδεση (binding) με τα κύτταρα αφού η ολοκλήρωση της πρόσληψης αναστέλλεται, ενώ στην επώαση στους 37⁰C η ανευρισκόμενη τιμή φθορισμού τελικά στα κύτταρα αφορά στη σύνδεση και στην ολοκληρωμένη πρόσληψη από τα κύτταρα [587]. Η μη ειδική σύνδεση-πρόσληψη της λιποπρωτεΐνης στα κύτταρα εκτιμάται επίσης με τη μέτρηση της σύνδεσης-πρόσληψης της σημασμένης λιποπρωτεΐνης μετά από επώασή της με τα κύτταρα με την παρουσία περίσσειας της ίδιας αλλά μη σημασμένης λιποπρωτεΐνης. Ως περίσσεια μη σημασμένης λιποπρωτεΐνης χρησιμοποιείται συγκέντρωση 25 φορές μεγαλύτερη αυτής της προστιθέμενης σημασμένης λιποπρωτεΐνης. Στη συγκέντρωση αυτή η μη σημασμένη λιποπρωτεΐνη θα αναστείλει σχεδόν πλήρως την ειδική σύνδεση-πρόσληψη της σημασμένης λιποπρωτεΐνης ενώ η μη ειδική σύνδεση-πρόσληψη πρακτικά δεν θα

επηρεασθεί. Μετά το τέλος της επώασης η σύνδεση-πρόσληψη της σημασμένης λιποπρωτεΐνης εκτιμάται με μέτρηση της έντασης φθορισμού των κυττάρων με κυτταρομετρία ροής.

Αντιδραστήρια και όργανα

- RPMI 1640 (BioWhittaker)
- HBSS (Hank's Balanced Salt Solution) με CaCl_2 και MgCl_2 (BioWhittaker)
- Διάλυμα πενικιλίνης-στρεπτομυκίνης (10.000 units/mL, 10.000 $\mu\text{g/mL}$) (BioWhittaker)
- Διάλυμα 30% BSA, αποστειρωμένο, δοκιμασμένο σε κυτταρικές καλλιέργειες (Bovine serum albumin) (Sigma)
- Κυτταροροόμετρο ροής (FACScalibur, Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) με λογισμικό ανάλυσης δεδομένων (CELLQUEST software, Becton-Dickinson)
- Πλαστικοί σωλήνες για κυτταρομετρία ροής
- Πλαστικοί αποστειρωμένοι κωνικοί σωλήνες από πολυπροπυλένιο των 50 mL (Corning)
- Αποστειρωμένα σιφόνια των 5, 10 mL (Corning)
- Αποστειρωμένες πλαστικές πιπέτες Pasteur με ευρύ χείλος των 3 mL
- Αποστειρωμένες συσκευές διήθησης 0,22 μm (Corning)
- Εστία κυτταροκαλλιεργειών
- Κλίβανος κυτταροκαλλιεργειών με ατμόσφαιρα 5% CO_2

Διαλύματα εργασίας

Διάλυμα PBS pH 7,4, 0,1% BSA. 0,333 mL διαλύματος 30% BSA προστίθενται σε 96, 666 mL διαλύματος PBS pH 7.4 (τελικός όγκος 100 mL). Μετά από ήπια ανάδευση το διάλυμα διηθείται σε συσκευή διήθησης 0,22 μm και αποθηκεύεται στους 4⁰C.

RPMI 1640 με πενικιλίνη-στρεπτομυκίνη 100 units/mL, 100 $\mu\text{g/mL}$ (RPMI P/S). Σε πλαστικό αποστειρωμένο σωλήνα των 50 mL τοποθετούνται 49,5 mL RPMI 1640 και 0,5 mL διαλύματος πενικιλίνης-στρεπτομυκίνης (10.000 units/mL, 10.000 $\mu\text{g/mL}$) (τελικός όγκος 50 mL). Το διάλυμα αποθηκεύεται στους 4⁰C.

Πειραματική διαδικασία

Η καλλιέργεια των μακροφάγων χρησιμοποιείται στα πειράματα πρόσληψης LDL ή oxLDL την επόμενη ημέρα από την τοποθέτηση των κυττάρων στα πλακίδια καλλιέργειας.

Τα πλακίδια που θα χρησιμοποιηθούν για επώαση στους 4⁰C τοποθετούνται στο ψυγείο 2h πριν την έναρξη της επώασης ενώ τα πλακίδια που θα χρησιμοποιηθούν για επώαση στους 37⁰C παραμένουν στον κλίβανο κυτταροκαλλιεργειών στους 37⁰C. Εν συνεχεία απομακρύνεται από κάθε θέση των πλακιδίων το υπερκείμενο και ακολουθούν 3 πλύσεις με 1 mL HBSS. Μετά την ολοκλήρωση των πλύσεων τα κύτταρα επώάζονται με τις ενδεικνυόμενες συγκεντρώσεις σημασμένης λιποπρωτεΐνης με ή χωρίς την παρουσία της ενδεικνυόμενης συγκέντρωσης ανταγωνιστών σε RPMI P/S σε τελικό όγκο 1 mL. Κάθε συνδυασμός συγκέντρωσης σημασμένης λιποπρωτεΐνης με ή χωρίς την παρουσία ανταγωνιστών τοποθετείται εις τριπλούν. Οι ποσότητες HBSS και RPMI P/S που χρησιμοποιούνται στην επώαση στους 37⁰C έχουν τοποθετηθεί πριν σε αποστειρωμένους σωλήνες των 50 mL στον κλίβανο κυτταροκαλλιεργειών για 1h για να αποκτήσουν θερμοκρασία 37⁰C, ενώ αυτές που χρησιμοποιούνται στην επώαση στους 4⁰C διατηρούνται στο ψυγείο. Η διάρκεια της επώασης είναι 4h. Μετά το πέρας της επώασης απομακρύνεται το υπερκείμενο και ακολουθούν 3 πλύσεις με 1 mL HBSS. Τελικά σε κάθε θέση τοποθετείται 1 mL διαλύματος PBS pH 7,4, 0,1% BSA και τα κύτταρα αποκολλώνται με ελαφρά απόξεση από τον πυθμένα με πιπέτα Pasteur. Τα κύτταρα αναδεύονται και μεταφέρονται σε πλαστικούς σωλήνες κυτταρομετρίας ροής και υποβάλλονται αμέσως σε κυτταρομετρία ροής. Υπολογίζεται η μέση ένταση φθορισμού (ΜΕΦ) των κυττάρων από κάθε θέση μετά από ανάλυση τουλάχιστον 10.000 κυττάρων. Η ΜΕΦ που μετράται αποτελεί το άθροισμα του φθορισμού που προκύπτει από την ειδική και τη μη ειδική σύνδεση της σημασμένης λιποπρωτεΐνης καθώς και του αυτοφθορισμού των κυττάρων (ΜΕΦ_{ολική}). Ο μέσος όρος της ΜΕΦ από τις θέσεις όπου έγινε επώαση παρουσία περίσσειας μη σημασμένης λιποπρωτεΐνης (x25) θεωρείται ότι παριστά το άθροισμα του φθορισμού από τη μη ειδική σύνδεση της σημασμένης λιποπρωτεΐνης και του μικρής έντασης αυτοφθορισμού των κυττάρων (ΜΕΦ_{μη ειδική}). Η ειδική σύνδεση-πρόσληψη στις υπόλοιπες περιπτώσεις (ΜΕΦ_{ειδική}) υπολογίζεται με την αφαίρεση της ΜΕΦ_{μη ειδική} από την συνολική ΜΕΦ_{ολική} : $ΜΕΦ_{ειδική} = ΜΕΦ_{ολική} - ΜΕΦ_{μη ειδική}$. Η υψηλότερη τιμή ΜΕΦ_{ειδική} σε κάθε πείραμα, η οποία αντιστοιχεί στην υψηλότερη συγκέντρωση σημασμένης λιποπρωτεΐνης ή σε θέση επώασης με σημασμένη λιποπρωτεΐνη χωρίς την παρουσία ανταγωνιστών λαμβάνεται ως 100% και οι υπόλοιπες τιμές ΜΕΦ_{ειδική} από τις υπόλοιπες θέσεις εκφράζονται ως το % ποσοστό αυτής.

III.1.25. ΜΕΛΕΤΕΣ ΣΥΝΔΕΣΗΣ ΚΑΙ ΠΡΟΣΛΗΨΗΣ ΛΙΠΟΣΩΜΑΤΩΝ ΚΑΙ ΠΡΩΤΕΪΝΟΛΙΠΟΣΩΜΑΤΩΝ ΑΠΟ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΜΑΚΡΟΦΑΓΩΝ [337]

Αρχή της μεθόδου

Τα πειράματα για την εκτίμηση της σύνδεσης-πρόσληψης ακολουθούν τις ίδιες αρχές με αυτές που περιγράφηκαν στις αντίστοιχες μελέτες για τη σύνδεση-πρόσληψη των λιποπρωτεϊνών. Η καλλιέργεια των μακροφάγων επώάζεται είτε με σημασμένα με [¹⁴C]DPPC λιποσώματα παρασκευασμένα από λιπίδια LDL ή oxLDL ή από φυσικά ή οξειδωμένα φωσφολιπίδια είτε με σημασμένα με [¹⁴C]DPPC πρωτεϊνολιποσώματα που περιέχουν φυσική ή οξειδωμένη ApoB. Η επώαση γίνεται με ή χωρίς την παρουσία ανταγωνιστών στην πρόσληψη από τα μακροφάγα. Ως ανταγωνιστές χρησιμοποιούνται μη σημασμένη φυσική ή οξειδωμένη λιποπρωτεΐνη ή μη σημασμένα λιποσώματα. Η επώαση γίνεται στους 37⁰C για την εκτίμηση της πρόσληψης ή στους 4⁰C για την εκτίμηση της σύνδεσης. Η προετοιμασία των κυττάρων και η επώαση γίνονται όπως περιγράφηκε ανωτέρω για τις λιποπρωτεΐνες. Η μη ειδική σύνδεση εκτιμάται με επώαση παρουσία περίσσειας του ίδιου αλλά μη σημασμένου λιποσώματος ή πρωτεϊνολιποσώματος (συγκέντρωση 25 φορές μεγαλύτερη αυτής του προστιθέμενου σημασμένου λιποσώματος ή πρωτεϊνολιποσώματος). Μετά το τέλος της επώασης τα κύτταρα διαλυτοποιούνται πλήρως με την προσθήκη διαλύματος 0,2N NaOH και 0,1% SDS και δείγματα χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό της περιεκτικότητας σε πρωτεΐνη και τη μέτρηση της β-ακτινοβολίας. Η σύνδεση-πρόσληψη εκφράζεται τελικά σε ποσότητα λιποσώματος ή πρωτεϊνολιποσώματος ανά μονάδα κυτταρικής πρωτεΐνης.

Αντιδραστήρια και όργανα

- Δωδεκυλοθειϊκό νάτριο (Sodium Dodecyl Sulphate Na salt, SDS) (M.B. 288,38) (Serva)
- Υδροξείδιο του νατρίου NaOH, σφαιρίδια (M.B. 40) (Merck)
- Πλαστικά φιαλίδια όγκου 20 mL με βιδωτό πόμα για μετρητή σπινθηρισμού υγρών
- Μετρητής σπινθηρισμού υγρών (Wallac 1209 Racbeta, Pharmacia) συνδεδεμένος με καταγραφέα (Facit B3100)
- Εστία κυτταροκαλλιιεργειών
- Κλίβανος κυτταροκαλλιιεργειών με ατμόσφαιρα 5% CO₂
- Συσκευή επίπεδης περιστροφικής ανάδευσης

Λοιπά αντιδραστήρια και όργανα όπως περιγράφηκαν στις μελέτες πρόσληψης LDL και στον προσδιορισμό β-ακτινοβολίας.

Διαλύματα εργασίας

Διάλυμα PBS pH 7,4, 0,1% BSA. Παρασκευή και αποθήκευση όπως περιγράφηκε στις μελέτες πρόσληψης LDL.

RPMI 1640 με πενικιλίνη-στρεπτομυκίνη 100 units/mL, 100 µg/mL (RPMI P/S). Παρασκευή και αποθήκευση όπως περιγράφηκε στις μελέτες πρόσληψης LDL.

Διάλυμα 2N NaOH. 4 g NaOH διαλύονται σε 50 mL dsH₂O. Επειδή το NaOH είναι σε μορφή σφαιριδίων και η ακριβής ζύγιση μιας συγκεκριμένης ποσότητας συχνά δεν είναι εφικτή, ζυγίζεται ποσότητα που προσεγγίζει την επιθυμητή και εν συνεχεία υπολογίζεται και προστίθεται ποσότητα dsH₂O που αντιστοιχεί ώστε να προκύψει τελική συγκέντρωση 2N. Το διάλυμα φυλάσσεται σε πλαστική φιάλη σε θερμοκρασία δωματίου.

Διάλυμα 0,111% SDS. 111 mg SDS διαλύονται σε 100 mL dsH₂O. Το διάλυμα φυλάσσεται σε γυάλινη φιάλη σε θερμοκρασία δωματίου.

Υγρό σπινθηρισμού υγρών. Όπως περιγράφηκε ανωτέρω.

Πειραματική διαδικασία

Η καλλιέργεια των μακροφάγων χρησιμοποιείται στα πειράματα την επόμενη ημέρα από την τοποθέτηση των κυττάρων στα πλακίδια καλλιέργειας. Τα πλακίδια που θα χρησιμοποιηθούν για επώαση στους 4⁰C τοποθετούνται στο ψυγείο 2h πριν την έναρξη της επώασης ενώ τα πλακίδια που θα χρησιμοποιηθούν για επώαση στους 37⁰C παραμένουν στον κλίβανο κυτταροκαλλιεργειών στους 37⁰C. Μετά από 3 πλύσεις με 1 mL HBSS τα κύτταρα επωάζονται με τις ενδεικνύμενες συγκεντρώσεις σημασμένων με [¹⁴C]DPPC πρωτεϊνολιποσωμάτων ή λιποσωμάτων με ή χωρίς την παρουσία της ενδεικνύμενης συγκέντρωσης ανταγωνιστών σε RPMI P/S σε τελικό όγκο 1 mL. Κάθε συνδυασμός τοποθετείται εις τριπλούν. Οι ποσότητες HBSS και RPMI P/S που χρησιμοποιούνται στην επώαση στους 37⁰C έχουν τοποθετηθεί πριν σε αποστειρωμένους σωλήνες των 50 mL στον κλίβανο κυτταροκαλλιεργειών για 1h για να αποκτήσουν θερμοκρασία 37⁰C, ενώ αυτές που χρησιμοποιούνται στην επώαση στους 4⁰C διατηρούνται στο ψυγείο. Η διάρκεια της επώασης είναι 4h. Μετά το πέρας της επώασης ακολουθούν 3 πλύσεις με 1 mL HBSS. Μετά την τελευταία πλύση τοποθετούνται σε κάθε θέση 450 µL διαλύματος 0,111% SDS και 50 µL διαλύματος 2N NaOH. Σε κάθε θέση ο τελικός όγκος είναι 500 µL με τελικές συγκεντρώσεις 0,1% SDS και 0,2N NaOH. Τα πλακίδια κλείνονται με το σκέπαστρό τους

και τοποθετούνται σε συσκευή επίπεδης περιστροφικής ανάδευσης σε θερμοκρασία δωματίου μέχρι την επόμενη ημέρα. Τα κύτταρα διαλυτοποιούνται πλήρως. Ποσότητα 100 μL χρησιμοποιείται για μέτρηση πρωτεΐνης με DC-Lowry και ποσότητα 300 μL χρησιμοποιείται για μέτρηση β -ακτινοβολίας (σε cpm). Επίσης μετράται η β -ακτινοβολία σε ποσότητα από το αρχικό διάλυμα του σημασμένου λιποσώματος ή πρωτεϊνολιποσώματος διαλυμένης σε 300 μL διαλυτοποιημένων με 0,1% SDS και 0,2N NaOH κυττάρων από θέσεις του πλακιδίου στις οποίες δεν προστέθηκαν ούτε σημασμένα λιποσώματα ή πρωτεϊνολιποσώματα ούτε ανταγωνιστές (εις διπλούν).

Η τιμή των cpm κάθε θέσης προκύπτει από το άθροισμα της β -ακτινοβολίας της ειδικής και της μη ειδικής σύνδεσης-πρόσληψης ($\text{cpm}_{\text{σύνολο}}$). Η τιμή των cpm από τις θέσεις όπου έγινε επώαση παρουσία περίσσειας μη σημασμένου λιποσώματος ή πρωτεϊνολιποσώματος ($\times 25$) αντιστοιχεί στη β -ακτινοβολία της μη ειδικής σύνδεσης-πρόσληψης ($\text{cpm}_{\text{μη ειδική}}$). Η τιμή της β -ακτινοβολίας της ειδικής σύνδεσης-πρόσληψης ($\text{cpm}_{\text{ειδική}}$) προκύπτει αφαιρώντας την τιμή $\text{cpm}_{\text{μη ειδική}}$ από την τιμή $\text{cpm}_{\text{σύνολο}}$: $\text{cpm}_{\text{ειδική}} = \text{cpm}_{\text{σύνολο}} - \text{cpm}_{\text{μη ειδική}}$. Από τις μετρήσεις β -ακτινοβολίας σε ποσότητα από το αρχικό διάλυμα του σημασμένου λιποσώματος ή πρωτεϊνολιποσώματος υπολογίζεται η τιμή των cpm που αντιστοιχεί στο σύνολο της ποσότητας του σημασμένου λιποσώματος ή πρωτεϊνολιποσώματος που προστέθηκε για επώαση με τα κύτταρα. Βάσει της τιμής αυτής υπολογίζεται η ποσότητα του αρχικού σημασμένου λιποσώματος (σε nmole) ή πρωτεϊνολιποσώματος (σε μg) που αντιστοιχεί στην τιμή $\text{cpm}_{\text{ειδική}}$. Από τη διαίρεση της τιμής αυτής με την αντίστοιχη τιμή της πρωτεΐνης (η τιμή που μετρήθηκε σε 100 μL $\times 3$ για να αντιστοιχεί στην τιμή των cpm που μετρήθηκε σε 300 μL) προκύπτει ο λόγος της ειδικής πρόσληψης του λιποσώματος (σε nmole) ή του πρωτεϊνολιποσώματος (σε μg) ανά ποσότητα κυτταρικής πρωτεΐνης (σε mg).

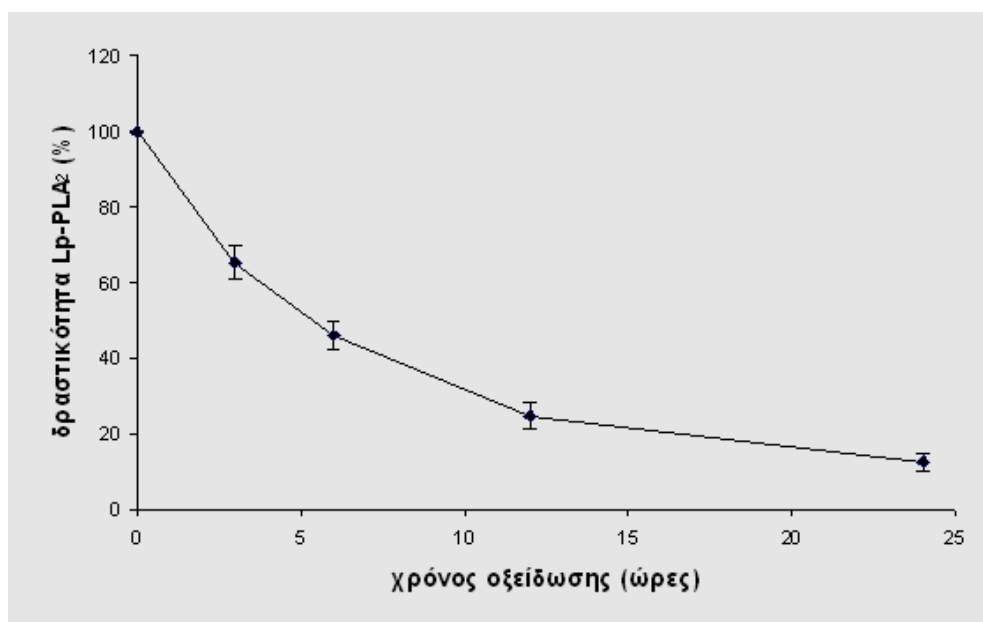
III.1.26. ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Η στατιστική ανάλυση διενεργήθηκε με χρησιμοποίηση της στατιστικής δοκιμασίας t-test δύο κατευθύνσεων (two tailed t-test).

II.2. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

III.2.1. ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΟΞΕΙΔΩΣΗΣ ΣΤΗ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑ ΤΗΣ Lp-PLA₂

LDL σε συγκέντρωση 0,2 mg/mL σε PBS pH 7,4 οξειδώθηκε παρουσία 5μM CuSO₄ στους 37⁰C για 24h. Κάθε πείραμα περιελάμβανε την οξείδωση δύο δειγμάτων LDL. Η δραστηριότητα της Lp-PLA₂ προσδιορίστηκε αμέσως πριν την έναρξη της οξείδωσης και εν συνεχεία στις 3, 6, 12, και 24h από την έναρξη της οξείδωσης. Η δραστηριότητα της Lp-PLA₂ πριν την έναρξη της οξείδωσης λαμβάνεται ως 100% και η δραστηριότητα στις 3, 6, 12, και 24h παρουσιάζεται ως το % ποσοστό της αρχικής δραστηριότητας. Οι τιμές αποτελούν τους μέσους όρους ± SD διπλών προσδιορισμών από ένα σύνολο τριών ξεχωριστών πειραμάτων. Όπως φαίνεται στην **Εικόνα III.1** και στον **Πίνακα III.1** η δραστηριότητα της Lp-PLA₂ προοδευτικά αναστέλλεται έτσι ώστε στις 6h από την έναρξη της οξείδωσης να διατηρείται ~ 40-50% της δραστηριότητας ενώ στις 24h να διατηρείται μόνο ~ 10-15%.



Εικόνα III.1. Δραστηριότητα της Lp-PLA₂ κατά τη διάρκεια της οξείδωσης.

Πίνακας III.1. Επίδραση της οξειδωσης στη δραστικότητα της Lp-PLA₂					
	Διάρκεια οξειδωσης (ώρες)				
	0	3	6	12	24
Δραστικότητα Lp-PLA₂ (%)	100 +/-2,80	62,25 +/-4,34	45,85 +/-3,65	24,70 +/-3,54	12,48 +/-2,43
LDL σε συγκέντρωση 0.2 mg/mL σε PBS pH 7.4 οξειδώθηκε παρουσία 5μM CuSO ₄ για 24h. Η δραστικότητα της Lp-PLA ₂ προσδιορίστηκε αμέσως πριν την έναρξη της οξειδωσης και εν συνεχεία στις 3, 6, 12, και 24h. Η δραστικότητα της Lp-PLA ₂ στις 3, 6, 12, και 24h παρουσιάζεται ως το % ποσοστό της αρχικής δραστικότητας. Οι τιμές αποτελούν τους μέσους όρους ± SD διπλών προσδιορισμών από ένα σύνολο τριών ξεχωριστών πειραμάτων.					

Με βάση την καμπύλη αυτή της προοδευτικής αναστολής της δραστικότητας της Lp-PLA₂ κατά τη διάρκεια της οξειδωσης, επελέγησαν τα χρονικά διαστήματα των 6h και 24h για να χρησιμοποιηθούν στη συνέχεια ως χρόνος οξειδωσης των LDL. Η επιλογή αυτή έγινε ώστε να εξεταστεί η ενδεχόμενη διαφορά μεταξύ λιποπρωτεϊνών που έχουν οξειδωθεί για ένα μικρότερο διάστημα κατά το οποίο το μεγαλύτερο μέρος της δραστικότητας της Lp-PLA₂ είναι παρόν, και λιποπρωτεϊνών των οποίων η οξειδωση έχει παραταθεί για ένα μεγαλύτερο διάστημα κατά το οποίο η δραστικότητα της Lp-PLA₂ έχει σημαντικά εξασθενήσει.

III.2.2. ΥΔΡΟΛΥΣΗ ΦΩΣΦΑΤΙΔΥΛΟΧΟΛΙΝΗΣ ΚΑΙ ΛΙΠΙΔΙΚΗ ΥΠΕΡΟΞΕΙΔΩΣΗ ΚΑΤΑ ΤΗ ΔΙΑΡΚΕΙΑ ΤΗΣ ΟΞΕΙΔΩΣΗΣ

Εξετάστηκε ο βαθμός υδρόλυσης της φωσφατιδυλοχολίνης (PC) σε lysoPC και η παραγωγή MDA ως δείκτης της λιπιδικής οξειδωσης, μετά από 6 και 24 ώρες οξειδωσης της LDL τα οποία αποτελούν τα χρονικά διαστήματα που επελέγησαν να χρησιμοποιηθούν για την οξειδωση της LDL. LDL σε συγκέντρωση 0,2 mg/mL σε PBS pH 7,4 οξειδώθηκε παρουσία 5μM CuSO₄ στους 37⁰C για 24h.

Δείγματα τα οποία ελήφθησαν αμέσως πριν την έναρξη της οξειδωσης και εν συνεχεία στις 6 και στις 24h, χρησιμοποιήθηκαν α) για τον προσδιορισμό της περιεκτικότητας σε

lysoPC και PC μετά από εκχύλιση των λιπιδίων, διαχωρισμό των λιπιδίων με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας και προσδιορισμό φωσφόρου και β) για προσδιορισμό MDA. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον **Πίνακα III.2** και εκφράζονται ως τιμές του λόγου lysoPC/PC (% μοριακή αναλογία) όσον αφορά στην υδρόλυση της PC και ως nmoles MDA/mg πρωτεΐνης LDL όσον αφορά στην οξείδωση των λιπιδίων. Οι τιμές αποτελούν τους μέσους όρους \pm SD διπλών προσδιορισμών από ένα σύνολο τριών ξεχωριστών πειραμάτων.

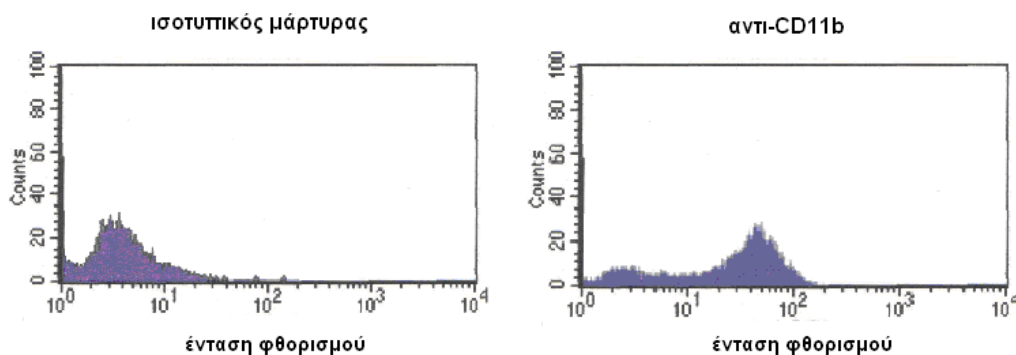
Το μεγαλύτερο μέρος της υδρόλυσης της PC είχε επιτελεστεί στις πρώτες 6 ώρες της οξείδωσης με αύξηση του λόγου lysoPC/PC από $\sim 0,05$ στη φυσική (μη οξειδωμένη) LDL σε $\sim 0,24$, ενώ περαιτέρω αύξηση του λόγου lysoPC/PC σε $\sim 0,36$ παρατηρήθηκε στις 24 ώρες της οξείδωσης. Η μέτρηση του MDA (nmoles MDA/mg πρωτεΐνης LDL) ανέδειξε σημαντικό βαθμό λιπιδικής οξείδωσης με τη συμπλήρωση 6 ωρών οξείδωσης με αύξηση της τιμής τους από 1,8 στη φυσική (μη οξειδωμένη) LDL σε 33,5. Περαιτέρω αύξηση της παραγωγής MDA σε 44,2 αναδείχτηκε στις 24 ώρες.

Πίνακας III. 2. Μεταβολή της αναλογίας lysoPC/PC και παραγωγή MDA κατά τη διάρκεια της οξείδωσης		
χρόνος οξείδωσης (ώρες)	lysoPC/PC (% μοριακή αναλογία)	MDA (nmoles MDA/mg πρωτεΐνης LDL)
0	4,94 \pm 1,20	1,82 \pm 0,39
6	24,22 \pm 3,81	33,47 \pm 3,62
24	35,79 \pm 6,16	44,21 \pm 4,75

LDL σε συγκέντρωση 0,2 mg/mL σε PBS pH 7,4 οξειδώθηκε παρουσία 5μM CuSO₄ για 24h. Δείγματα τα οποία ελήφθησαν αμέσως πριν την έναρξη της οξείδωσης και εν συνεχεία στις 6 και στις 24h, χρησιμοποιήθηκαν α) για τον προσδιορισμό της περιεκτικότητας σε lysoPC και PC και τον υπολογισμό του λόγου lysoPC/PC (μοριακή αναλογία) και β) για προσδιορισμό MDA. Οι τιμές αποτελούν τους μέσους όρους \pm SD διπλών προσδιορισμών από ένα σύνολο τριών ξεχωριστών πειραμάτων.

III.2.3. ΠΡΟΚΑΤΑΡΚΤΙΚΑ ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ ΠΕΡΙΤΟΝΑΪΚΩΝ ΜΑΚΡΟΦΑΓΩΝ ΠΟΝΤΙΚΟΥ

Η καλλιέργεια περιτοναϊκών μακροφάγων ποντικού έγινε όπως αναλυτικά περιγράφηκε στις Μεθόδους (III.1.22). Συνοπτικά, μετά από 4 ημέρες μετά από περιτοναϊκή έγχυση διαλύματος θειογλυκολλικού σε ποντίκια BALB/c, γίνεται συλλογή κυττάρων με περιτοναϊκή πλύση και τα κύτταρα τοποθετήθηκαν σε πλακίδιο καλλιέργειας. Μετά από 4h τα κύτταρα που δεν είχαν προσκολληθεί απομακρύνθηκαν και τα προσκολλημένα κύτταρα καλλιεργήθηκαν μέχρι την επόμενη ημέρα οπότε και χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα σύνδεσης και πρόσληψης λιποπρωτεϊνών. Μικροσκόπηση της καλλιέργειας ανέδειξε ότι η συντριπτική πλειονότητα των κυττάρων αυτών παρουσίαζε επιμήκυνση και ακανόνιστο σχήμα με ψευδοπόδια, μορφολογία που χαρακτηρίζει τα μακροφάγα. Η συντριπτική υπεροχή των μακροφάγων στην καλλιέργεια επιβεβαιώθηκε από την μεγάλη έκφραση του CD11b, που αποτελεί αντιγονικό επίτοπο επιφανείας των μακροφάγων του ποντικού, όπως αυτή καταδείχτηκε με κυτταρομετρία ροής μετά από επώαση των κυττάρων με ειδικό μονοκλωνικό αντίσωμα εναντίον του CD11b σημασμένο με φυκοερυθρίνη (**Εικόνα III.2**).



Εικόνα III.2. Έκφραση του CD11b στην καλλιέργεια περιτοναϊκών κυττάρων. Κύτταρα τα οποία συνελέγησαν 4 ημέρες με περιτοναϊκή πλύση μετά από περιτοναϊκή έγχυση διαλύματος θειογλυκολλικού σε ποντίκια BALB/c, τοποθετήθηκαν σε πλακίδιο καλλιέργειας και τα κύτταρα τα οποία είχαν προσκολληθεί μετά από 4h καλλιεργήθηκαν μέχρι την επόμενη ημέρα οπότε και επώαστηκαν είτε με μονοκλωνικό αντίσωμα ειδικό έναντι του αντιγονικού επίτοπου των μακροφάγων CD11b (αντι-CD11b), είτε με αντίσωμα ισοτυπικό μάρτυρα (ισοτυπικός μάρτυρας). Τα αντισώματα ήταν σημασμένα με τη φθορίζουσα ουσία φυκοερυθρίνη και η σύνδεσή τους στα κύτταρα εκτιμήθηκε με κυτταρομετρία ροής.

III.2.4. ΜΕΛΕΤΗ ΣΥΝΔΕΣΗΣ – ΠΡΟΣΛΗΨΗΣ ΦΥΣΙΚΩΝ Ή ΟΞΕΙΔΩΜΕΝΩΝ LDL ΣΕ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΜΑΚΡΟΦΑΓΩΝ

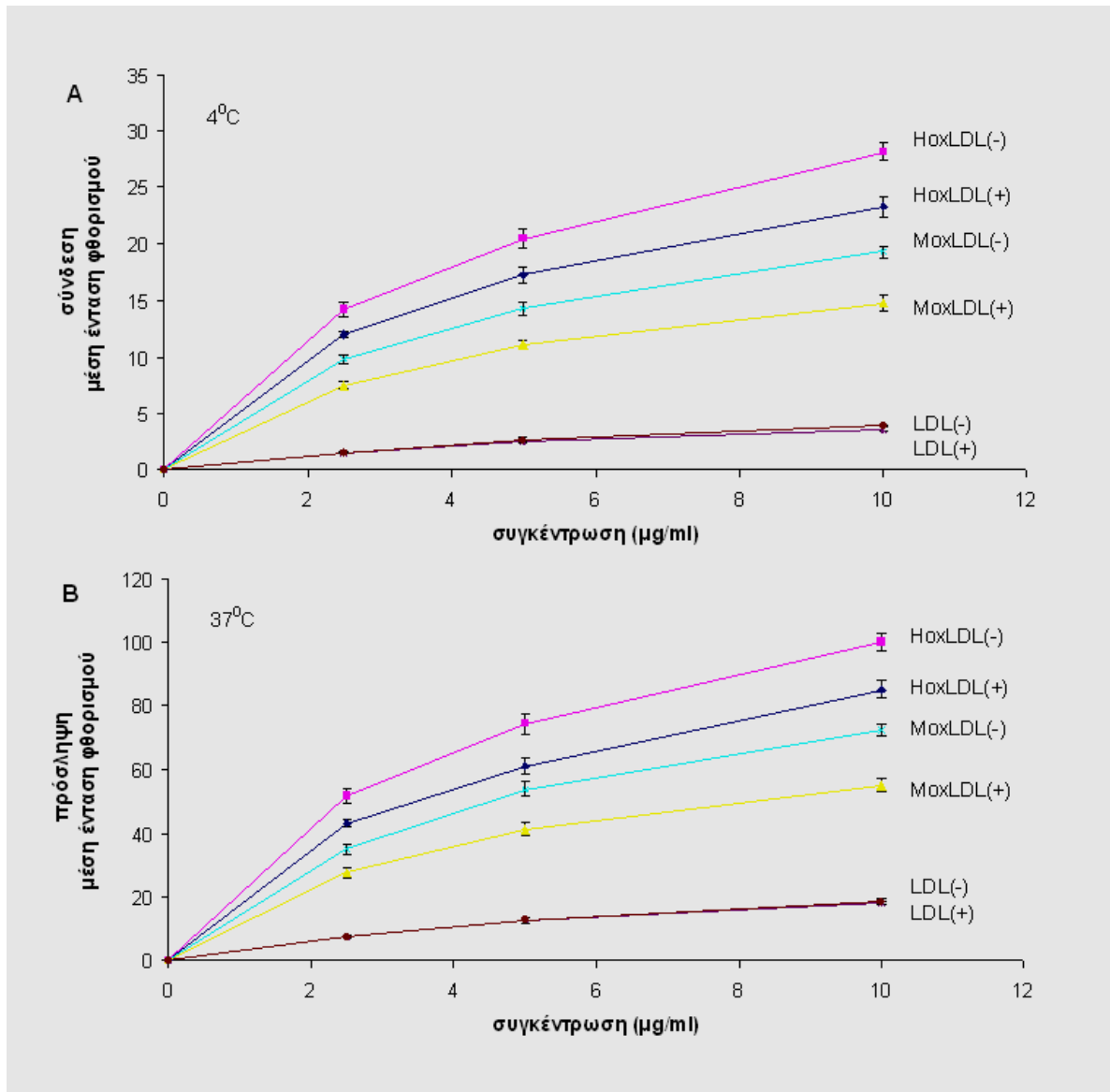
Στα πειράματα χρησιμοποιήθηκαν σημασμένες με FITC λιποπρωτεΐνες και εξετάστηκε η σύνδεση και η πρόσληψή τους σε καλλιέργεια περιτοναϊκών μακροφάγων ποντικού. Η σύνδεση και η πρόσληψη των λιποπρωτεϊνών εξετάστηκε με επώασή τους με τα μακροφάγα στους 4⁰C και 37⁰C αντίστοιχα. Όπως αναφέρθηκε στις Μεθόδους (III.1.24. Μελέτες σύνδεσης και πρόσληψης φυσικών ή οξειδωμένων LDL από καλλιέργεια μακροφάγων) η επώαση στους 37⁰C προσεγγίζει τις φυσιολογικές συνθήκες πρόσληψης ενώ με την επώαση στους 4⁰C μελετάται μόνο η σύνδεση με τα κύτταρα αφού η ολοκλήρωση της πρόσληψης αναστέλλεται. Επίσης η επώαση στους 4⁰C πλεονεκτεί στο ότι ελαχιστοποιεί την πιθανότητα μη ειδικής σύνδεσης της λιποπρωτεΐνης στα κύτταρα.

Εξετάστηκε η επίδραση της αναστολής της δραστηριότητας της Lp-PLA₂ στη σύνδεση και στην πρόσληψη των oxLDL από τα μακροφάγα. Όπως αναφέρθηκε ήδη ανωτέρω, για την οξείδωση των LDL επελέγησαν να χρησιμοποιηθούν τα χρονικά διαστήματα των 6 και 24h. Αυτό έγινε με σκοπό να εξεταστεί η ενδεχόμενη διαφορά όσον αφορά στη σύνδεση και στην πρόσληψη μεταξύ LDL που έχει οξειδωθεί για ένα μικρότερο διάστημα κατά το οποίο το μεγαλύτερο μέρος της δραστηριότητας της Lp-PLA₂ ήταν παρόν (LDL που έχει οξειδωθεί για 6h, μέτρια οξειδωμένα LDL, moderately oxidized LDL, **MoxLDL**) και LDL της οποίας η οξείδωση έχει παραταθεί για ένα μεγαλύτερο διάστημα κατά το οποίο η δραστηριότητα της Lp-PLA₂ έχει σημαντικά εξασθενήσει (LDL που έχει οξειδωθεί για 24h, ισχυρά οξειδωμένα LDL, heavily oxidized LDL, **HoxLDL**).

Χρησιμοποιήθηκαν φυσικές (μη οξειδωμένες) LDL με διατηρημένη [**LDL(+)**] ή ανεσταλμένη μετά από επώαση με refabloc τη δραστηριότητα της Lp-PLA₂ [**LDL(-)**] και μέτρια ή ισχυρά οξειδωμένες LDL(+ ή -), [**MoxLDL(+ ή -)** και **HoxLDL(+ ή -)**]. Τονίζεται ότι στην περίπτωση των οξειδωμένων λιποπρωτεϊνών με ανεσταλμένη τη δραστηριότητα της Lp-PLA₂, η αναστολή της Lp-PLA₂ έγινε πριν την οξείδωσή τους. LDL(+ ή -), MoxLDL(+ ή -) και HoxLDL(+ ή -) επώαστηκαν ταυτόχρονα στους 4⁰ ή στους 37⁰C για 4h. Οι λιποπρωτεΐνες επώαστηκαν σε τελικές συγκεντρώσεις 2,5, 5 και 10 μg πρωτεΐνης (ApoB) / mL. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στην **Εικόνα III.3** και στον **Πίνακα III.3**. Οι τιμές πρόσληψης και σύνδεσης αποτελούν τους μέσους όρους τριπλών προσδιορισμών από ένα σύνολο τριών ξεχωριστών πειραμάτων. Κάθε ξεχωριστό πείραμα δεν περιορίζεται μόνον σε νέα επώαση των λιποπρωτεϊνών με καλλιέργεια μακροφάγων, αλλά αφορά σε όλα τα στάδια του πειράματος από την απομόνωση των λιποπρωτεϊνών και την προετοιμασία

των διαφορετικών παρασκευών φυσικών ή οξειδωμένων LDL έως την προετοιμασία της καλλιέργειας των μακροφάγων. Η σύνδεση ή η πρόσληψη εκφράζεται από την τιμή της μέσης έντασης φθορισμού (ΜΕΦ) των κυττάρων (ΜΕΦ_{ειδική}) η οποία μετράται με κυτταρομετρία ροής. Η υψηλότερη τιμή ΜΕΦ_{ειδική} σε κάθε πείραμα λαμβάνεται ως 100% και οι υπόλοιπες τιμές ΜΕΦ_{ειδική} από τις υπόλοιπες θέσεις εκφράζονται ως το % ποσοστό αυτής.

Οι καμπύλες σύνδεσης και πρόσληψης ήταν ποιοτικά ομοιόμορφες παρουσιάζοντας όμοιες αναλογίες σύνδεσης και πρόσληψης μεταξύ των φυσικών και των οξειδωμένων LDL που χρησιμοποιήθηκαν. Η σύνδεση και η πρόσληψη των οξειδωμένων LDL ήταν κατά πολύ μεγαλύτερες αυτών των φυσικών LDL. Μεταξύ των οξειδωμένων LDL, οι τιμές σύνδεσης και πρόσληψης των HoxLDL ήταν μεγαλύτερες από αυτές των MoxLDL ($p < 0,0001$). Όσον αφορά στην επίδραση της αναστολής της δραστηριότητας της Lp-PLA₂ στη σύνδεση ή στην πρόσληψη, δεν παρατηρήθηκαν διαφορές μεταξύ LDL(+) και LDL(-) ενώ αντιθέτως η σύνδεση και η πρόσληψη της MoxLDL(-) και της HoxLDL(-) ήταν στατιστικά σημαντικά αυξημένες έναντι αυτών της MoxLDL(+) και της HoxLDL(+) αντίστοιχα. Οι αυξήσεις ήταν μεγαλύτερες στην περίπτωση των MoxLDL και κυμαίνονταν στο επίπεδο του 30%, σε σχέση με τις αυξήσεις που παρατηρήθηκαν στις HoxLDL, οι οποίες κυμαίνονταν στο επίπεδο του 20% (Πίνακας III.4).



Εικόνα III.3. Σύνδεση (A) και πρόσληψη (B) σημασμένων με FITC LDL(+ ή -), MoxLDL(+ ή -) και HoxLDL(+ ή -) από καλλιέργεια μακροφάγων. Οι LDL(+ ή -), MoxLDL(+ ή -) και HoxLDL(+ ή -) επωάστηκαν σε τελικές συγκεντρώσεις 2,5, 5 και 10 µg πρωτεΐνης (ApoB) / mL στους 4⁰C ή στους 37⁰C για 4h με καλλιέργεια μακροφάγων. Οι τιμές σύνδεσης και πρόσληψης αποτελούν τους μέσους όρους ± SE τριπλών προσδιορισμών από ένα σύνολο τριών ξεχωριστών πειραμάτων.

Πίνακας III.3. Σύνδεση - πρόσληψη των LDL(+ ή -), MoxLDL(+ ή -) και HoxLDL(+ ή -) σε καλλιέργεια μακροφάγων.

	Σύνδεση (4 ⁰ C)								
	LDL(+)	LDL(-)	p	MoxLDL(+)	MoxLDL(-)	p	HoxLDL(+)	HoxLDL(-)	p
2,5 μg/ml	1,51 +/-0,24	1,54 +/-0,17	NS	7,47 +/-0,59	9,80 +/-0,94	0,00017	11,95 +/-0,76	14,21 +/-1,59	0,00894
5 μg/ml	2,51 +/-0,36	2,66 +/-0,37	NS	11,04 +/-0,95	14,30 +/-1,36	0,00033	17,25 +/-1,61	20,50 +/-2,03	0,01055
10 μg/ml	3,58 +/-0,26	3,84 +/-0,43	NS	14,77 +/-1,60	19,28 +/-1,27	0,00011	23,28 +/-1,94	28,19 +/-1,83	0,0006
	Πρόσληψη (37 ⁰ C)								
	LDL(+)	LDL(-)	p	MoxLDL(+)	MoxLDL(-)	p	HoxLDL(+)	HoxLDL(-)	p
2,5 μg/ml	7,50 +/-1,21	7,33 +/-0,97	NS	27,67 +/-3,33	35,22 +/-3,76	0,00316	41,60 +/-2,63	51,64 +/-5,76	0,00209
5 μg/ml	12,55 +/-1,72	12,78 +/-1,82	NS	41,27 +/-4,89	54,34 +/-5,15	0,00061	60,05 +/-5,60	74,49 +/-7,38	0,0024
10 μg/ml	17,85 +/-1,19	18,42 +/-2,23	NS	54,66 +/-4,90	73,26 +/-4,84	0,00001	85,28 +/-6,09	100,00 +/-6,74	0,00177

Οι τιμές αποτελούν τους μέσους όρους ± τα κατά 95% όρια αξιοπιστίας από τριπλούς προσδιορισμούς από ένα σύνολο τριών ξεχωριστών πειραμάτων. Σημειώνεται το επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας (p) της διαφοράς των τιμών μεταξύ LDL(+) και LDL(-), MoxLDL(+) και MoxLDL(-) και μεταξύ HoxLDL(+) και HoxLDL(-) για κάθε συγκέντρωση στην οποία επωάστηκαν αυτές με την καλλιέργεια των μακροφάγων.

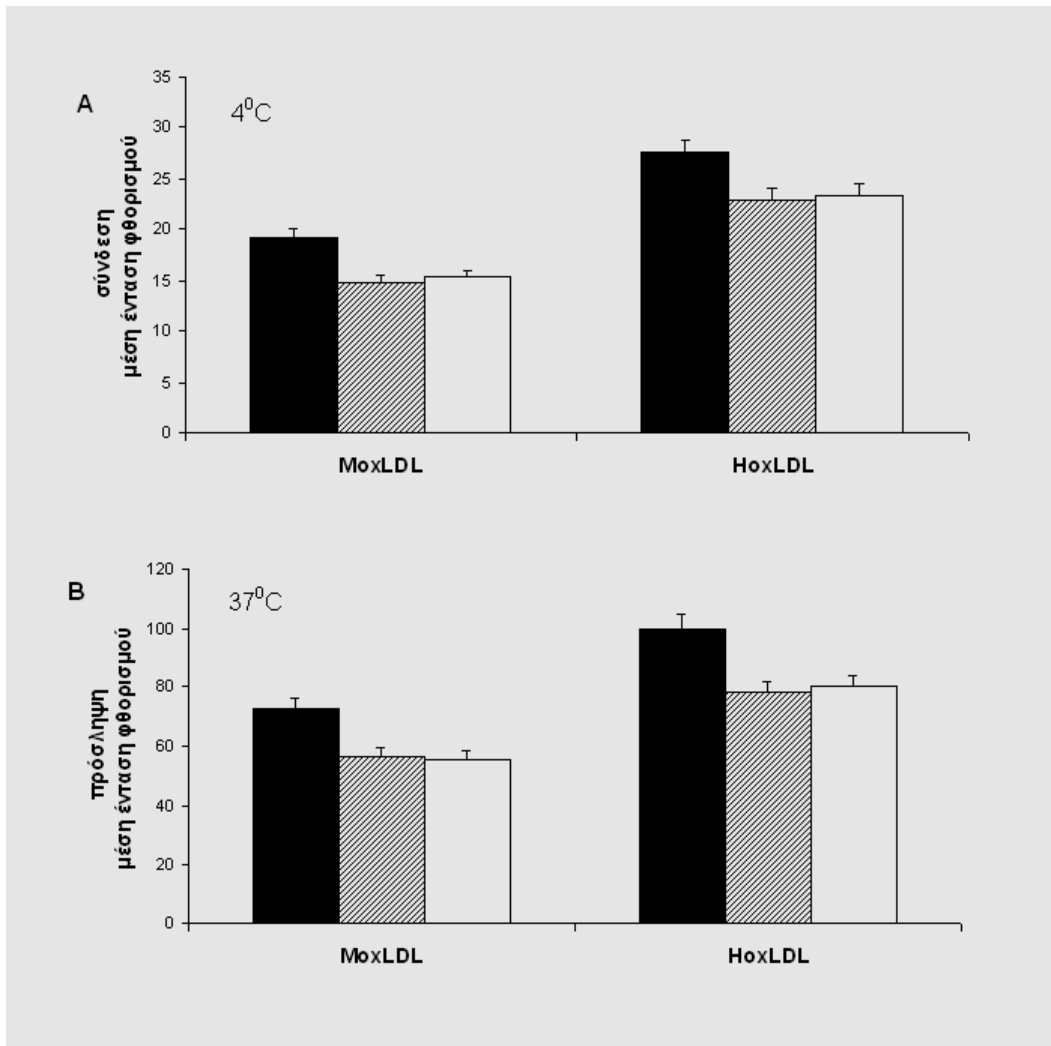
Πίνακας III.4. Επίδραση της αναστολής της Lp-PLA₂ στη σύνδεση και στην πρόσληψη των MoxLDL και των HoxLDL

	Σύνδεση (4 ⁰ C)		Πρόσληψη (37 ⁰ C)	
	MoxLDL(-)/MoxLDL(+) % ± τα κατά 95% όρια αξιοπιστίας	HoxLDL(-)/HoxLDL(+) % ± τα κατά 95% όρια αξιοπιστίας	MoxLDL(-)/MoxLDL(+) % ± τα κατά 95% όρια αξιοπιστίας	HoxLDL(-)/HoxLDL(+) % ± τα κατά 95% όρια αξιοπιστίας
2,5 μg/ml	131,29+/-13,65	118,92+/-13,49	127,30+/-16,68	122,16+/-12,82
5 μg/ml	129,50+/-13,76	118,83+/-14,16	131,67+/-15,47	124,05+/-14,16
10 μg/ml	130,50+/-12,68	121,08+/-10,50	134,02+/-11,56	119,12+/-10,83

III.2.5. ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΕΝΔΕΧΟΜΕΝΗΣ ΑΜΕΣΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΟΥ REFABLOC ΣΤΗ ΣΥΝΔΕΣΗ - ΠΡΟΣΛΗΨΗ ΤΩΝ ΟΞΕΙΔΩΜΕΝΩΝ LDL ΣΕ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΜΑΚΡΟΦΑΓΩΝ

Στην ομάδα αυτή πειραμάτων εξετάστηκε η πιθανότητα η επώαση της LDL με refabloc να επιδρά στην επακόλουθη σύνδεση – πρόσληψη της MoxLDL και της HoxLDL από τα μακροφάγα με διαφορετικό ή/και με διαφορετικό μηχανισμό (άμεση επίδραση) πέραν της αναστολής της δραστηριότητας της Lp-PLA₂ (έμμεση επίδραση). Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν τρεις παρασκευές σημασμένων με FITC MoxLDL και HoxLDL: α) **MoxLDL** και **HoxLDL** οι οποίες δεν επώαστηκαν με refabloc σε κανένα χρονικό σημείο, β) MoxLDL και HoxLDL οι οποίες επώαστηκαν με refabloc πριν την οξείδωσή τους [Mox(LDL + pef) και Hox(LDL + pef)] και γ) MoxLDL και HoxLDL οι οποίες επώαστηκαν με refabloc μετά την οξείδωσή τους [MoxLDL + pef και HoxLDL + pef]. Η σύνδεση και η πρόσληψη των οξειδωμένων LDL υπολογίστηκε μετά από επώαση με καλλιέργεια μακροφάγων για 4h σε συγκέντρωση 5μg πρωτεΐνης/mL στους 4⁰ και 37⁰C αντίστοιχα. Οι τιμές σύνδεσης και πρόσληψης προέκυψαν από τριπλούς προσδιορισμούς από ένα σύνολο τριών ξεχωριστών πειραμάτων. Η σύνδεση ή η πρόσληψη εκφράζεται από την τιμή της μέσης έντασης φθορισμού όπως αναφέρθηκε ανωτέρω (III.2.3). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στην **Εικόνα III.4** και στον **Πίνακα III.5**.

Η σύνδεση και η πρόσληψη των MoxLDL και HoxLDL στις οποίες δεν προστέθηκε refabloc σε καμία φάση της παρασκευής τους δεν παρουσίασαν στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με αυτές των MoxLDL + pef και HoxLDL + pef αντίστοιχα. Αντιθέτως, οι Mox(LDL + pef) και Hox(LDL + pef) στις οποίες η δραστηριότητα της Lp-PLA₂ ανεστάλη πριν την έναρξη της οξείδωσης παρουσίασαν μεγαλύτερη σύνδεση και πρόσληψη από τις MoxLDL + pef και HoxLDL + pef αντίστοιχα, οι οποίες οξειδώθηκαν παρουσία της Lp-PLA₂ δραστηριότητας και στις οποίες το refabloc προστέθηκε μετά το πέρας της οξείδωσης. Η Mox(LDL + pef) παρουσίασε μεγαλύτερη σύνδεση κατά 29,8% (p<0,0001) και μεγαλύτερη πρόσληψη κατά 29,3% (p<0,0001) σε σχέση με τη MoxLDL + pef. Η Hox(LDL + pef) παρουσίασε μεγαλύτερη σύνδεση κατά 19,9% (p<0,02) και μεγαλύτερη πρόσληψη κατά 27,9% (p<0,003) σε σχέση με τη HoxLDL + pef.



Εικόνα III.4. Σύνδεση (A) και πρόσληψη (B) σημασμένων με FITC MoxLDL και HoxLDL οι οποίες έχουν επωαστεί πριν ή μετά την οξείδωση με refabloc ή δεν έχουν επωαστεί καθόλου με refabloc, από καλλιέργεια μακροφάγων. Καλλιέργεια μακροφάγων επώαστηκε με MoxLDL ή HoxLDL οι οποίες επώαστηκαν με refabloc πριν την οξείδωσή τους (μαύρες στήλες) ή μέτρια και ισχυρά οξειδωμένες LDL οι οποίες επώαστηκαν με refabloc μετά την οξείδωσή τους (γραμμοσκιασμένες στήλες) ή MoxLDL ή HoxLDL οι οποίες δεν επώαστηκαν με refabloc σε κανένα χρονικό σημείο (λευκές στήλες). Οι οξειδωμένες LDL επώαστηκαν με την καλλιέργεια των μακροφάγων σε συγκέντρωση 5μg πρωτεΐνης/mL στους 4⁰C ή στους 37⁰C για 4h. Οι τιμές σύνδεσης και πρόσληψης αποτελούν τους μέσους όρους ± SE τριπλών προσδιορισμών από ένα σύνολο τριών ξεχωριστών πειραμάτων.

Πίνακας III.5. Επίδραση της επώασης της LDL με refabloc πριν ή μετά την οξειδωση στη σύνδεση - πρόσληψη της oxLDL σε καλλιέργεια μακροφάγων.							
Σύνδεση (4 ⁰ C)							
Mox[LDL+Pef]	MoxLDL+Pef	MoxLDL	p	Hox[LDL+Pef]	HoxLDL+Pef	HoxLDL	p
19,20 +/- 1,99 †. ††	14,79 +/- 1,57 †. ††	15,32 +/- 1,63 ††. ††	†, †† <0,0001 ¶ NS	27,52 +/- 2,96 †. ††	22,96 +/- 2,70 †. ††	23,46 +/- 2,45 ††. ††	†, †† <0,02 ¶ NS
Πρόσληψη (37 ⁰ C)							
Mox[LDL+Pef]	MoxLDL+Pef	MoxLDL	p	Hox[LDL+Pef]	HoxLDL+Pef	HoxLDL	p
72,95 +/- 6,92 †. ††	56,40 +/- 7,01 †. ††	55,40 +/- 6,55 ††. ††	†, †† <0,0001 ¶ NS	100,00 +/- 9,89 †. ††	78,21 +/- 7,86 †. ††	80,62 +/- 7,52 ††. ††	†, †† <0,003 ¶ NS
<p>Ως Mox[LDL+Pef] και Hox[LDL+Pef] αναφέρονται οι μέτρια και ισχυρά οξειδωμένες LDL οι οποίες επωάστηκαν με refabloc πριν την οξειδωσή τους ενώ ως MoxLDL+Pef και HoxLDL+Pef αναφέρονται οι μέτρια και ισχυρά οξειδωμένες LDL οι οποίες επωάστηκαν με refabloc μετά την οξειδωσή τους. Οι MoxLDL και οι HoxLDL δεν επωάστηκαν με refabloc σε κανένα χρονικό σημείο. Οι οξειδωμένες LDL επωάστηκαν με την καλλιέργεια των μακροφάγων σε συγκέντρωση 5μg/ml. Οι τιμές αποτελούν τους μέσους όρους ± τα κατά 95% όρια αξιοπιστίας από τριπλούς προσδιορισμούς από ένα σύνολο τριών ξεχωριστών πειραμάτων. Σημειώνεται το επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας (p) της διαφοράς των τιμών μεταξύ των διαφόρων παρασκευών των οξειδωμένων LDL.</p>							

Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν ότι η επώαση με refabloc διαφοροποιεί τη σύνδεση και την πρόσληψη της MoxLDL και HoxLDL μόνο όταν γίνει προ της οξειδωσης οπότε και η LDL οξειδώνεται με ανεσταλμένη τη δραστηριότητα της Lp-PLA₂, ενώ δεν υπάρχει διαφοροποίηση όταν γίνει μετά την οξειδωση οπότε και η LDL οξειδώνεται παρουσία της δραστηριότητας της Lp-PLA₂. Το συμπέρασμα που συνάγεται είναι πως το refabloc δεν έχει άμεση επίδραση στη σύνδεση – πρόσληψη των οξειδωμένων LDL από τα μακροφάγα και πως η επίδρασή του είναι μόνο έμμεση μέσω της αναστολής της δραστηριότητας της Lp-PLA₂.

III.2.6. ΠΡΟΚΑΤΑΡΚΤΙΚΑ ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ ΠΑΡΑΣΚΕΥΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΟΛΙΠΟΣΩΜΑΤΩΝ ΠΟΥ ΠΕΡΙΕΧΟΥΝ oxApoB ΑΠΟ MoxLDL Ή HoxLDL

Η σύνδεση της oxLDL με τους υποδοχείς των μακροφάγων και η επακόλουθη πρόσληψή της μεσολαβείται και από την πρωτεϊνική και από τη λιπιδική της ομάδα. Όπως εκτέθηκε αναλυτικά ανωτέρω, τα πειράματά μας ανέδειξαν ότι η αναστολή της δραστηριότητας της Lp-PLA₂ πριν την οξειδωση της LDL οδήγησε σε αύξηση της σύνδεσης και της πρόσληψης κατά ~ 30% στην περίπτωση της MoxLDL και κατά ~ 20% στην περίπτωση της HoxLDL. Στη συνέχεια διερευνήθηκε το εάν η επίδραση αυτή της αναστολής της δραστηριότητας της Lp-PLA₂ οφείλεται σε διαφοροποίηση της σύνδεσης και της πρόσληψης μέσω της

πρωτεϊνικής ομάδας ή/και σε διαφοροποίηση της σύνδεσης και της πρόσληψης μέσω της λιπιδικής ομάδας της oxLDL.

Προκειμένου να ελεγχθεί η σύνδεση - πρόσληψη των oxLDL μέσω της πρωτεϊνικής τους ομάδας παρασκευάστηκαν πρωτεϊνολιποσώματα με χρησιμοποίηση oxApoB που είχε απομονωθεί από oxLDL μετά από εκχύλιση των λιπιδίων. Με απομόνωση oxApoB είτε από MoxLDL (MoxApoB) είτε από HoxLDL (HoxApoB) παρασκευάστηκαν αντίστοιχα MoxApoB-πρωτεϊνολιποσώματα και HoxApoB-πρωτεϊνολιποσώματα.

Για την ενσωμάτωση της oxApoB σε λιποσώματα ακολουθήθηκε μέθοδος διαλυτοποίησης της oxApoB με χρήση απορρυπαντικού και ακόλουθη απομάκρυνσή του. Ως απορρυπαντικό χρησιμοποιήθηκε ο κ-οκτυλο-β-D-γλυκοζίτης (octyl glucoside, OG). Το OG επελέγη ως απορρυπαντικό καθώς έχει δειχθεί πως η χρήση του δεν επηρεάζει τη σύνδεση της oxApoB με τους υποδοχείς των μακροφάγων [321]. Βάσει της διαδικασίας παρασκευής, η οποία περιγράφεται αναλυτικά στις Μεθόδους, η oxApoB ενσωματώνεται μαζί με 1,2-διπαλμιτόυλο-sn-γλυκερο-3-φωσφοχολίνη (1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine, DPPC) και χοληστερόλη (cholesterol, CHOL) σε πρωτεϊνολιποσώματα με αναλογία βάρους μεταξύ oxApoB:DPPC:CHOL 1:5:0,5. Η διαδικασία παρασκευής περιλαμβάνει περιληπτικά τα εξής στάδια: α) απολιπιδιοποίηση της oxApoB β) παρασκευή γαλακτώματος που περιέχει DPPC, CHOL και OG σε αναλογία βάρους 5:0,5:30 γ) προσθήκη του γαλακτώματος που περιέχει DPPC, CHOL και OG στην απολιπιδιοποιημένη oxApoB σε αναλογία βάρους μεταξύ DPPC και oxApoB 5:1, και έντονη ανάδευση δ) απομάκρυνση του OG με εκτενή διαπίδυση (dialysis) έναντι PBS ε) απομάκρυνση μη διαλυτοποιημένων συστατικών με φυγοκέντρωση στ) σχηματισμός ομοιόμορφης διαμέτρου πρωτεϊνολιποσωμάτων με δίοδο υπό πίεση μέσω πολυανθρακικής μεμβράνης με πόρους διαμέτρου 0,2 μm (εξώθηση, extrusion). Η σήμανση των πρωτεϊνολιποσωμάτων γίνεται με προσθήκη [¹⁴C]DPPC στο γαλάκτωμα που περιέχει DPPC, CHOL και OG.

Στην πρώτη ομάδα προκαταρκτικών πειραμάτων εκτιμήθηκε η διατήρηση της αναλογίας μεταξύ λιπιδίων και πρωτεΐνης μετά από κάθε φάση παρασκευής των πρωτεϊνολιποσωμάτων με υπολογισμό του λόγου της περιεκτικότητας σε oxApoB προς την περιεκτικότητα σε DPPC. Ελήφθησαν δείγματα α) μετά την προσθήκη του γαλακτώματος από DPPC, CHOL και OG στην απολιπιδιοποιημένη oxApoB αμέσως πριν τεθεί το γαλάκτωμα σε διαπίδυση (δείγμα προ διαπίδυσης) β) μετά το πέρας της διαπίδυσης (δείγμα μετά διαπίδυση) γ) μετά τη φυγοκέντρωση (μετά φυγοκέντρωση) και δ) μετά τη διαδικασία εξώθησης (μετά εξώθηση). Σε κάθε δείγμα μετρήθηκε η β-ακτινοβολία και βάσει αυτής εκτιμήθηκε η περιεκτικότητα σε DPPC καθώς και η συγκέντρωση της πρωτεΐνης με τη μέθοδο Lowry DC.

Βάσει των μετρήσεων αυτών υπολογίστηκε ο λόγος μεταξύ oxApoB:DPPC. Οι τιμές αποτελούν τους μέσους όρους \pm SD διπλών προσδιορισμών από ένα σύνολο τριών ξεχωριστών πειραμάτων και εκφράζονται ως % λόγος βάρους. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον **Πίνακα III.6**. Η αναλογία βάρους μεταξύ της oxApoB και της DPPC που χρησιμοποιήθηκαν αρχικά για την παρασκευή των πρωτεϊνολιποσωμάτων ήταν 1:5 δηλαδή 20% εκφραζόμενη σε % λόγο βάρους. Η αναλογία αυτή παρουσίασε μικρή προοδευτική μείωση στις διάφορες φάσεις παρασκευής των πρωτεϊνολιποσωμάτων, η οποία ήταν παρόμοια όσον αφορά στην παρασκευή και των MoxApoB και των HoxApoB-πρωτεϊνολιποσωμάτων. Ο τελικός λόγος βάρους μεταξύ της oxApoB και της DPPC ήταν $17,11 \pm 0,47\%$ και $16,85 \pm 0,55\%$ όσον αφορά στα MoxApoB και στα HoxApoB-πρωτεϊνολιποσώματα αντίστοιχα. Τα αποτελέσματα αυτά καταδεικνύουν επαρκή και επαναλήψιμη διατήρηση της αναλογίας μεταξύ oxApoB και λιπιδίων κατά την ολοκλήρωση της παρασκευής των πρωτεϊνολιποσωμάτων.

Πίνακας III.6. Αναλογία oxApoB/DPPC στα στάδια παρασκευής πρωτεϊνολιποσωμάτων			
MoxApoB/DPPC (% λόγος βάρους)			
προ διαπίδυσης	μετά διαπίδυση	μετά φυγοκέντρωση	μετά εξώθηση
19,03 \pm 0,66	17,94 \pm 0,59	17,08 \pm 0,51	17,11 \pm 0,47
HoxApoB/DPPC (% λόγος βάρους)			
προ διαπίδυσης	μετά διαπίδυση	μετά φυγοκέντρωση	μετά εξώθηση
18,71 \pm 0,59	18,35 \pm 0,70	16,93 \pm 0,67	16,85 \pm 0,55
Οι τιμές αποτελούν τους μέσους όρους \pm SD διπλών προσδιορισμών από ένα σύνολο τριών ξεχωριστών πειραμάτων και εκφράζονται ως % λόγος βάρους.			

Σε μία δεύτερη ομάδα προκαταρκτικών πειραμάτων εκτιμήθηκε η σταθερότητα του εναιωρήματος των πρωτεϊνολιποσωμάτων. Για το σκοπό αυτό ελέγχθηκε η επίπλευση των σημασμένων με [¹⁴C]DPPC MoxApoB και HoxApoB πρωτεϊνολιποσωμάτων μετά από υπερφυγοκέντρωσή τους σε διάλυμα KBr πυκνότητας 1,140 g/mL για 10h, στους 14⁰C όπως

περιγράφηκε στις Μεθόδους. Μετρήθηκαν η πρωτεΐνη με τη μέθοδο Lowry DC και η β-ακτινοβολία στο αρχικό διάλυμα των πρωτεϊνολιποσωμάτων και μετά την υπερφυγοκέντρωση στο υπερκείμενο. Βάσει των μετρήσεων αυτών υπολογίστηκε η ανάκτηση της πρωτεΐνης και της DPPC. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον **Πίνακα III.7**. Οι τιμές αποτελούν τους μέσους όρους \pm SD διπλών προσδιορισμών από ένα σύνολο τριών ξεχωριστών πειραμάτων και εκφράζονται ως % της ποσότητας του αρχικού διαλύματος των πρωτεϊνολιποσωμάτων. Η ανάκτηση της DPPC ήταν παρόμοια μεταξύ των ΜοxΑροΒ και στα ΗοxΑροΒ-πρωτεϊνολιποσωμάτων φθανοντας στο $96,34 \pm 2,43\%$ και στο $95,87 \pm 2,52\%$ αντίστοιχα. Παρόμοιες ήταν οι τιμές της ανάκτησης της οxΑροΒ μεταξύ των ΜοxΑροΒ και στα ΗοxΑροΒ-πρωτεϊνολιποσωμάτων φθανοντας στο $96,79 \pm 2,13\%$ και στο $96,09 \pm 2,20\%$ αντίστοιχα.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα αυτά η μέθοδος παρασκευής πρωτεϊνολιποσωμάτων που ακολουθήθηκε οδηγεί επαναλήψιμα σε υψηλό ποσοστό διατήρησης του εναιωρήματος των ΜοxΑροΒ και ΗοxΑροΒ πρωτεϊνολιποσωμάτων.

Πίνακας III.7. Σταθερότητα του εναιωρήματος των ΜοxΑροΒ και ΗοxΑροΒ πρωτεϊνολιποσωμάτων		
	ΜοxΑροΒ πρωτεϊνολιποσώματα	ΗοxΑροΒ πρωτεϊνολιποσώματα
ανάκτηση οxΑροΒ μετά υπερφυγοκέντρωση (%)	96,34 \pm 2,43	95,87 \pm 2,52
ανάκτηση DPPC μετά υπερφυγοκέντρωση (%)	96,79 \pm 2,13	96,09 \pm 2,20

Σημασμένα με [¹⁴C]DPPC ΜοxΑροΒ και ΗοxΑροΒ πρωτεϊνολιποσώματα υπεβλήθησαν σε υπερφυγοκέντρωση σε διάλυμα KBr πυκνότητας 1,140 g/mL για 10h, στους 14^oC. Η πρωτεΐνη και η β-ακτινοβολία μετρήθηκαν στο αρχικό διάλυμα των πρωτεϊνολιποσωμάτων και στο υπερκείμενο μετά την υπερφυγοκέντρωση. Βάσει των μετρήσεων αυτών υπολογίστηκε η ανάκτηση της πρωτεΐνης και της DPPC. Οι τιμές αποτελούν τους μέσους όρους \pm SD διπλών προσδιορισμών από ένα σύνολο τριών ξεχωριστών πειραμάτων και εκφράζονται ως % της ποσότητας του αρχικού διαλύματος των πρωτεϊνολιποσωμάτων.

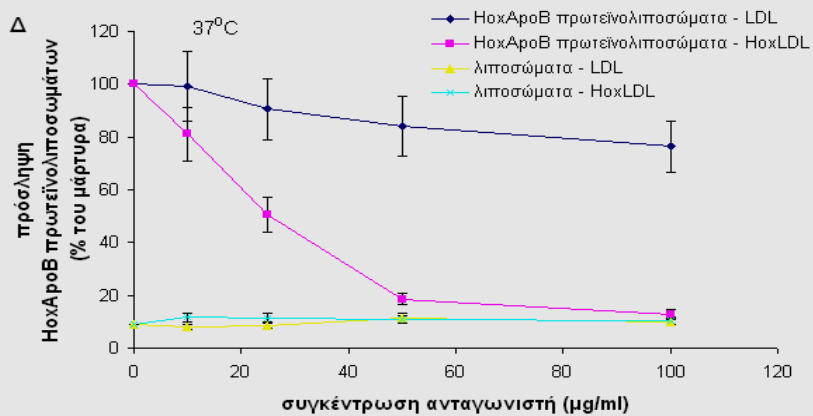
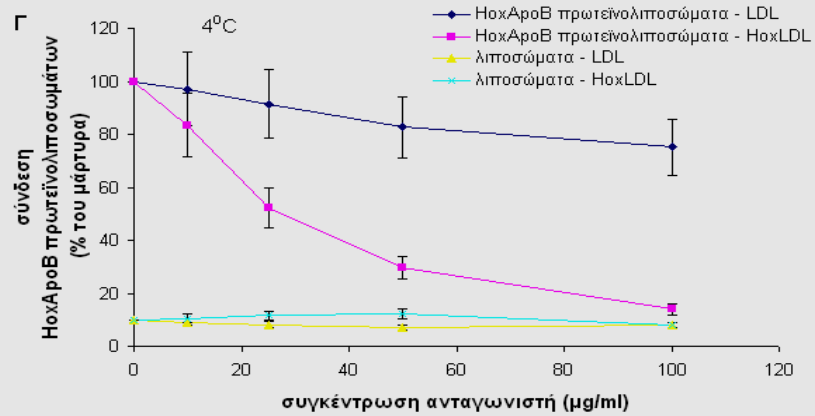
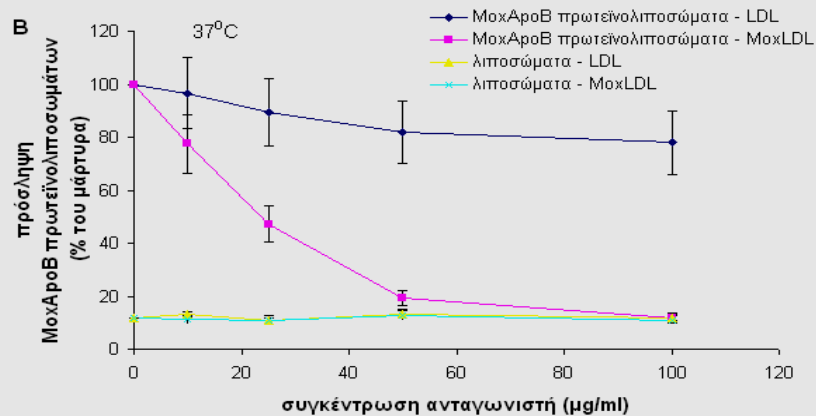
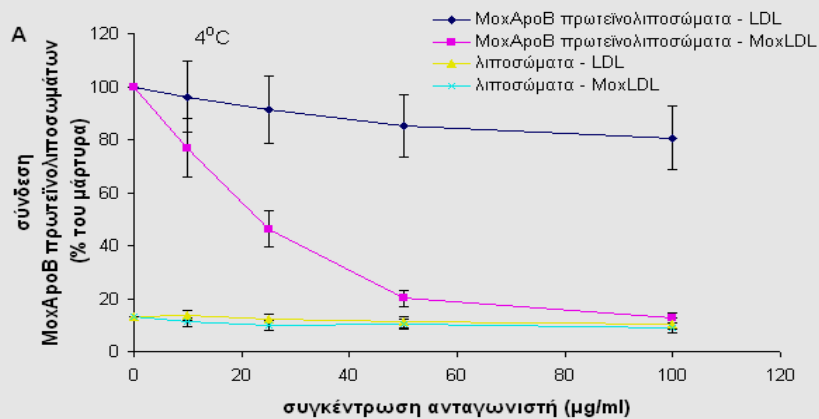
III.2.7. ΜΕΛΕΤΗ ΣΥΝΔΕΣΗΣ – ΠΡΟΣΛΗΨΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΟΛΙΠΟΣΩΜΑΤΩΝ ΠΟΥ ΠΕΡΙΕΧΟΥΝ oxApoB ΑΠΟ MoxLDL Ή HoxLDL ΣΕ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΜΑΚΡΟΦΑΓΩΝ

Στην ομάδα αυτή πειραμάτων εξετάστηκε εάν η ενσωμάτωση oxApoB σε πρωτεϊνολιποσώματα συνοδεύεται από διατήρηση της ικανότητας της oxApoB να συνδέεται με τους υποδοχείς των μακροφάγων. Παρασκευάστηκαν σημασμένα με [¹⁴C]DPPC πρωτεϊνολιποσώματα με ενσωμάτωση MoxApoB και HoxApoB (MoxApoB πρωτεϊνολιποσώματα και HoxApoB πρωτεϊνολιποσώματα) και αναλογία βάρους μεταξύ oxApoB:DPPC:CHOL 1:5:0,5. Επίσης παρασκευάστηκαν αντίστοιχα σημασμένα με [¹⁴C]DPPC μη συνδεδεμένα με πρωτεΐνη λιποσώματα μάρτυρες με αναλογία βάρους μεταξύ DPPC:CHOL 5:0,5. Η σύνδεση και η πρόσληψη των MoxApoB πρωτεϊνολιποσωμάτων και των HoxApoB πρωτεϊνολιποσωμάτων εξετάστηκε με επώαση στους 4⁰ και 37⁰C αντίστοιχα για 4h με καλλιέργεια μακροφάγων σε συγκέντρωση 5μg πρωτεΐνης / mL. Η επώαση έγινε χωρίς ή με την παρουσία μη σημασμένων LDL ή oxLDL ως ανταγωνιστών. Ως ανταγωνιστές για τα MoxApoB πρωτεϊνολιποσώματα χρησιμοποιήθηκαν LDL ή MoxLDL και για τα HoxApoB πρωτεϊνολιποσώματα LDL ή HoxLDL. Οι LDL, MoxLDL και HoxLDL τοποθετήθηκαν σε συγκεντρώσεις 10, 25, 50 και 100 μg πρωτεΐνης / mL. Μη συνδεδεμένα με πρωτεΐνη λιποσώματα επώαστηκαν ταυτόχρονα στην αντίστοιχη συγκέντρωση των 25μg DPPC / mL με ή χωρίς την παρουσία των ίδιων ανταγωνιστών που χρησιμοποιήθηκαν για τα πρωτεϊνολιποσώματα. Η σύνδεση ή η πρόσληψη των πρωτεϊνολιποσωμάτων εκφράζεται ως το % ποσοστό αυτής χωρίς την παρουσία ανταγωνιστή (μάρτυρας) η οποία λαμβάνεται ως 100%. Οι τιμές για τα μη συνδεδεμένα με πρωτεΐνη λιποσώματα προέκυψαν από τον υπολογισμό του ποσοστού της ραδιενέργειας που ανακτήθηκε στο τέλος της δοκιμασίας, το οποίο εκφράστηκε στη συνέχεια ως % ποσοστό της τιμής πρόσληψης ή σύνδεσης των πρωτεϊνολιποσωμάτων χωρίς την παρουσία ανταγωνιστή η οποία λαμβάνεται ως 100%. Οι τιμές σύνδεσης και πρόσληψης προέκυψαν από τριπλούς προσδιορισμούς από ένα σύνολο τριών ξεχωριστών πειραμάτων. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στην **Εικόνα III.5** και στον **Πίνακα III.8**.

Οι τιμές σύνδεσης και πρόσληψης των πρωτεϊνολιποσωμάτων ήταν κατά πολύ μεγαλύτερες των αντίστοιχων τιμών των μη συνδεδεμένων με πρωτεΐνη λιποσωμάτων αποδεικνύοντας περαιτέρω πως η ακολουθούμενη μέθοδος παρασκευής των πρωτεϊνολιποσωμάτων πράγματι οδηγεί σε ενσωμάτωση της oxApoB σε αυτά. Η προσθήκη MoxLDL ως ανταγωνιστού έδρασε ανασταλτικά στη σύνδεση και στην πρόσληψη των

MoxApoB πρωτεΐνολιποσωμάτων με δοσοεξαρτώμενο τρόπο και ομοίως η HoxLDL ανταγωνίστηκε δοσοεξαρτώμενα τη σύνδεση και την πρόσληψη των HoxApoB πρωτεΐνολιποσωμάτων. Αντιθέτως η προσθήκη LDL προκάλεσε μόνο μικρή αναστολή στη σύνδεση και στην πρόσληψη των MoxApoB και των HoxApoB πρωτεΐνολιποσωμάτων. Όσον αφορά στα μη συνδεδεμένα με πρωτεΐνη λιποσώματα η προσθήκη LDL, MoxLDL ή HoxLDL δεν επηρέασε το ποσοστό της ραδιενέργειας που ανακτήθηκε στο τέλος της δοκιμασίας. Τα αποτελέσματα αυτά υποδεικνύουν διατήρηση της ικανότητας σύνδεσης της ενσωματωμένης στα πρωτεΐνολιποσώματα oxApoB με τους υποδοχείς των μακροφάγων.

Εικόνα III.5. Σύνδεση και πρόσληψη σημασμένων με [¹⁴C]DPPC MoxApoB πρωτεΐνολιποσωμάτων (A, B) και HoxApoB πρωτεΐνολιποσωμάτων (Γ, Δ) παρουσία μη σημασμένων LDL ή oxLDL ως ανταγωνιστών. Τα πρωτεΐνολιποσώματα επώαστηκαν με καλλιέργεια μακροφάγων σε συγκέντρωση 5μg πρωτεΐνης / mL στους 4⁰C ή στους 37⁰C για 4h με ή χωρίς την παρουσία ανταγωνιστών. Ως ανταγωνιστές χρησιμοποιήθηκαν LDL ή MoxLDL για τα **MoxApoB πρωτεΐνολιποσώματα** και LDL ή HoxLDL για τα **HoxApoB πρωτεΐνολιποσώματα** σε συγκεντρώσεις 10, 25, 50 και 100 μg πρωτεΐνης / mL . Σημασμένα με [¹⁴C]DPPC **μη συνδεδεμένα με πρωτεΐνη λιποσώματα** επώαστηκαν ταυτόχρονα στην αντίστοιχη συγκέντρωση των 25μg DPPC / mL με ή χωρίς την παρουσία των ίδιων ανταγωνιστών που χρησιμοποιήθηκαν για τα πρωτεΐνολιποσώματα. Οι τιμές αποτελούν τους μέσους όρους ± SE τριπλών προσδιορισμών από ένα σύνολο τριών ξεχωριστών πειραμάτων.



Πίνακας III.8. Σύνδεση - πρόσληψη σημασμένων με [¹⁴C]DPPC ΜοxΑροΒ και ΗοxΑροΒ πρωτεϊνολιποσωμάτων παρουσία μη σημασμένων LDL ή οxLDL ως ανταγωνιστών.

	Σύνδεση ΜοxΑροΒ πρωτεϊνολιποσωμάτων (4 ⁰ C)								
	(-)	LDL (μg/ml)				ΜοxLDL (μg/ml)			
		10	25	50	100	10	25	50	100
ΜοxΑροΒ	100+/- 30,52	96,1+/- 33,96	91,4+/- 31,51	85,34+/- 26,84	80,62+/- 25,02	76,79+/- 26,31	46,18+/- 17,72	20,05+/- 7,07	12,81+/- 4,13
Λιποσώματα μάρτυρες	13,09+/- 4,71	13,60+/- 5,96	12,41+/- 5,45	11,07+/- 4,60	10,56+/- 4,16	11,22+/- 6,01	9,89+/- 4,75	10,57+/- 4,20	8,96+/- 4,13
	Πρόσληψη ΜοxΑροΒ πρωτεϊνολιποσωμάτων (37 ⁰ C)								
	(-)	LDL (μg/ml)				ΜοxLDL (μg/ml)			
		10	25	50	100	10	25	50	100
ΜοxΑροΒ	100+/- 33,83	96,7+/- 30,85	89,5+/- 29,60	82,02+/- 27,16	77,91+/- 27,73	77,48+/- 25,70	47,26+/- 15,77	19,33+/- 6,71	11,72+/- 4,37
Λιποσώματα μάρτυρες	11,64+/- 3,65	13,06+/- 4,00	10,64+/- 3,57	13,28+/- 4,50	11,95+/- 5,33	11,10+/- 3,66	10,86+/- 3,88	12,73+/- 4,32	10,99+/- 3,99
	Σύνδεση ΗοxΑροΒ πρωτεϊνολιποσωμάτων (4 ⁰ C)								
	(-)	LDL (μg/ml)				ΗοxLDL (μg/ml)			
		10	25	50	100	10	25	50	100
ΗοxΑροΒ	100+/- 32,72	97,09+/- 31,77	91,38+/- 29,90	82,63+/- 27,03	75,06+/- 24,56	83,49+/- 27,32	52,34+/- 17,12	29,81+/- 9,75	13,89+/- 4,54
Λιποσώματα μάρτυρες	9,68+/- 3,17	9,17+/- 3,00	8,04+/- 2,63	7,17+/- 2,35	7,93+/- 2,59	10,52+/- 3,44	11,67+/- 3,82	12,22+/- 4,00	8,01+/- 2,62
	Πρόσληψη ΗοxΑροΒ πρωτεϊνολιποσωμάτων (37 ⁰ C)								
	(-)	LDL (μg/ml)				ΗοxLDL (μg/ml)			
		10	25	50	100	10	25	50	100
ΗοxΑροΒ	100+/- 29,60	99,24+/- 30,28	90,50+/- 26,72	84,17+/- 26,19	76,48+/- 22,47	81,04+/- 23,62	50,63+/- 15,57	18,55+/- 5,16	12,69+/- 4,07
Λιποσώματα μάρτυρες	9,02+/- 2,73	8,18+/- 2,36	8,34+/- 2,32	11,45+/- 3,61	10,01+/- 2,82	11,62+/- 3,38	11,48+/- 3,57	10,72+/- 3,09	10,46+/- 3,15

Σύνδεση και πρόσληψη σημασμένων με [¹⁴C]DPPC ΜοxΑροΒ και ΗοxΑροΒ πρωτεϊνολιποσωμάτων παρουσία μη σημασμένων LDL ή οxLDL ως ανταγωνιστών. Τα **ΜοxΑροΒ πρωτεϊνολιποσώματα (ΜοxΑροΒ)** και **ΗοxΑροΒ πρωτεϊνολιποσώματα (ΗοxΑροΒ)** επώαστηκαν σε συγκέντρωση 5μg πρωτεΐνης /ml. Σημασμένα με [¹⁴C]DPPC **μη συνδεδεμένα με πρωτεΐνη λιποσώματα (λιποσώματα μάρτυρες)** επώαστηκαν ταυτόχρονα στην αντίστοιχη συγκέντρωση των 25μg DPPC /ml. Ως ανταγωνιστές χρησιμοποιήθηκαν LDL ή ΜοxLDL για τα ΜοxΑροΒ πρωτεϊνολιποσώματα και LDL ή ΗοxLDL για τα ΗοxΑροΒ πρωτεϊνολιποσώματα σε συγκεντρώσεις 10, 25, 50 και 100 μg πρωτεΐνης /ml. Οι τιμές σύνδεσης και πρόσληψης αποτελούν τους μέσους όρους ± τα κατά 95% όρια αξιοπιστίας τριπλών προσδιορισμών από ένα σύνολο τριών ξεχωριστών πειραμάτων. Η σύνδεση ή η πρόσληψη των πρωτεϊνολιποσωμάτων εκφράζεται ως % ποσοστό αυτής χωρίς την παρουσία ανταγωνιστή (-) η οποία λαμβάνεται ως 100%.

III.2.8. ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΡΟΛΟΥ ΤΗΣ Lp-PLA₂ ΣΤΗ ΣΥΝΔΕΣΗ – ΠΡΟΣΛΗΨΗ ΤΗΣ oxApoB ΑΠΟ MoxLDL Ή HoxLDL ΣΕ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΜΑΚΡΟΦΑΓΩΝ. ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΠΙΘΑΝΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΟΥ REFABLOC ΣΤΗ ΣΥΝΔΕΣΗ – ΠΡΟΣΛΗΨΗ ΤΗΣ oxApoB

Στα πειράματα αυτά μελετήθηκε η επίδραση της δραστηριότητας της Lp-PLA₂ στην τροποποίηση της πρωτεϊνικής ομάδας της oxLDL (oxApoB) και επακόλουθα στη σύνδεση και στην πρόσληψη της oxLDL μέσω αυτής. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν σημασμένα με [¹⁴C]DPPC πρωτεϊνολιποσώματα στα οποία είχε ενσωματωθεί oxApoB η οποία είχε απομονωθεί από oxLDL, και εξετάστηκε η σύνδεση και η πρόσληψη των πρωτεϊνολιποσωμάτων αυτών σε καλλιέργεια μακροφάγων. Η σύνδεση και η πρόσληψη των πρωτεϊνολιποσωμάτων εξετάστηκε με επώασή τους για 4h με τα μακροφάγα στους 4⁰ και 37⁰C αντίστοιχα. Χρησιμοποιήθηκαν τρεις παρασκευές MoxLDL και HoxLDL: α) **MoxLDL** και **HoxLDL** οι οποίες οξειδώθηκαν παρουσία της δραστηριότητας της Lp-PLA₂ και οι οποίες δεν επώαστηκαν με refabloc σε κανένα χρονικό σημείο β) MoxLDL και HoxLDL οι οποίες επώαστηκαν με refabloc πριν την οξείδωσή τους και οι οποίες οξειδώθηκαν απουσία της δραστηριότητας της Lp-PLA₂ [**Mox(LDL + pef)** και **Hox(LDL + pef)**] και γ) MoxLDL και HoxLDL οι οποίες οξειδώθηκαν παρουσία της δραστηριότητας της Lp-PLA₂ και οι οποίες επώαστηκαν με refabloc μετά την οξείδωσή τους (**MoxLDL + pef** και **HoxLDL + pef**). Από τις παρασκευές αυτές των oxLDL απομονώθηκε η oxApoB και η απολιπιδιοποιημένη oxApoB ενσωματώθηκε μαζί με DPPC και CHOL σε πρωτεϊνολιποσώματα σημασμένα με [¹⁴C]DPPC όπως περιγράφηκε στις Μεθόδους (III.1.19). Τα πρωτεϊνολιποσώματα που παρασκευάστηκαν αναφέρονται αντίστοιχα προς τις oxLDL από τις οποίες προήλθε η oxApoB που χρησιμοποιήθηκε για την παρασκευή τους ως MoxLDL και HoxLDL πρωτεϊνολιποσώματα, Mox(LDL+Pef) και Hox(LDL+Pef) πρωτεϊνολιποσώματα και MoxLDL+Pef και HoxLDL+Pef πρωτεϊνολιποσώματα.

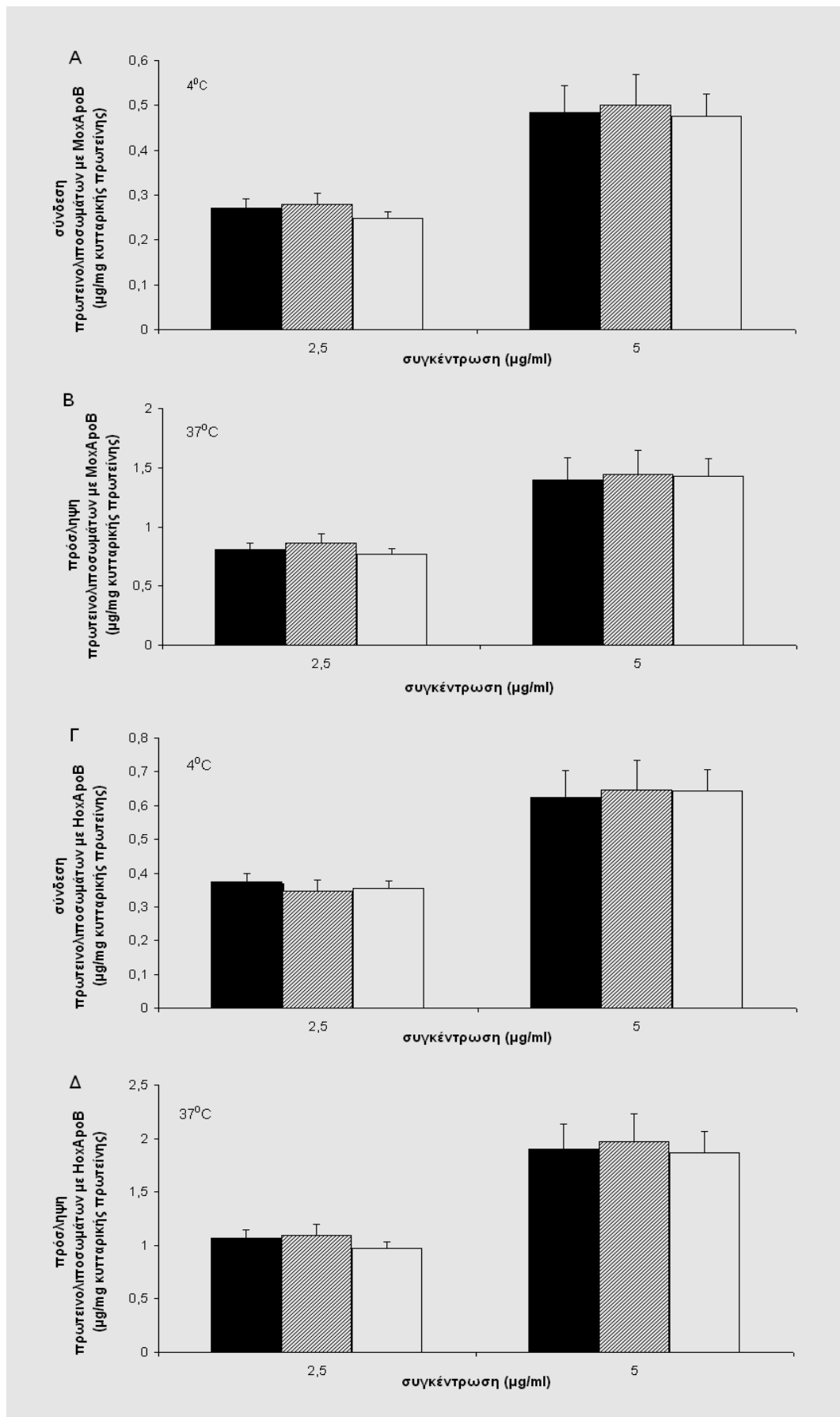
Τα πρωτεϊνολιποσώματα επώαστηκαν με τα μακροφάγα σε τελικές συγκεντρώσεις 2,5 και 5 μg πρωτεΐνης (ApoB) / mL. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στην **Εικόνα III.6** και στον **Πίνακα III.9**. Η σύνδεση ή η πρόσληψη εκφράζεται σε μg πρωτεΐνης (ApoB) /mg κυτταρικής πρωτεΐνης. Οι τιμές αποτελούν τους μέσους όρους από τριπλούς προσδιορισμούς από ένα σύνολο τεσσάρων ξεχωριστών πειραμάτων.

Οι τιμές πρόσληψης των πρωτεϊνολιποσωμάτων ήταν μεγαλύτερες από τις τιμές σύνδεσης. Οι τιμές σύνδεσης και πρόσληψης των πρωτεϊνολιποσωμάτων που περιείχαν oxApoB από HoxLDL ήταν μεγαλύτερες από αυτές των πρωτεϊνολιποσωμάτων που

περιείχαν oxApoB από MoxLDL. Οι τιμές σύνδεσης και πρόσληψης των Mox(LDL+Pef) πρωτεϊνολιποσωμάτων από τη μία πλευρά και των MoxLDL και MoxLDL+Pef πρωτεϊνολιποσωμάτων από την άλλη πλευρά ήταν παρόμοιες και δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές. Το ίδιο συνέβη και στην περίπτωση των Hox(LDL+Pef), HoxLDL και HoxLDL+Pef.

Συμπερασματικά, η αναστολή της Lp-PLA₂ πριν την οξείδωση δεν είχε επίδραση στη σύνδεση και στην πρόσληψη των πρωτεϊνολιποσωμάτων σε αντίθεση με την αύξηση που αυτή προκάλεσε στη σύνδεση και στην πρόσληψη των oxLDL, όπως περιγράφηκε παραπάνω. Η σύνδεση και η πρόσληψη των MoxLDL+Pef και HoxLDL+Pef πρωτεϊνολιποσωμάτων δεν παρουσίασαν στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με αυτές των MoxLDL και HoxLDL πρωτεϊνολιποσωμάτων αντίστοιχα. Τα αποτελέσματα αυτά είναι σύμφωνα με αυτά της αντίστοιχης ομάδας πειραμάτων με oxLDL που αναπτύχθηκαν παραπάνω, δεικνύοντας ότι το refabloc δεν έχει άμεση επίδραση στη σύνδεση – πρόσληψη της oxApoB μέσω ενδεχόμενης σύνδεσής του με αμινομάδες της ApoB.

Εικόνα III.6. Σύνδεση και πρόσληψη σημασμένων με [¹⁴C]DPPC πρωτεϊνολιποσωμάτων που παρασκευάστηκαν με ενσωμάτωση oxApoB που απομονώθηκε από MoxLDL ή HoxLDL οι οποίες έχουν επωαστεί πριν ή μετά την οξείδωση με refabloc ή δεν έχουν επωαστεί καθόλου με refabloc, από καλλιέργεια μακροφάγων. Καλλιέργεια μακροφάγων επώαστηκε με πρωτεϊνολιποσώματα με oxApoB από MoxLDL ή HoxLDL οι οποίες επώαστηκαν με refabloc πριν την οξείδωσή τους (**μαύρες στήλες**) ή MoxLDL ή HoxLDL οι οποίες επώαστηκαν με refabloc μετά την οξείδωσή τους (**γραμμοσκιασμένες στήλες**) ή MoxLDL ή HoxLDL οι οποίες δεν επώαστηκαν με refabloc σε κανένα χρονικό σημείο (**λευκές στήλες**). Η σύνδεση και η πρόσληψη των πρωτεϊνολιποσωμάτων υπολογίστηκε μετά από επώαση με καλλιέργεια μακροφάγων των MoxApoB πρωτεϊνολιποσωμάτων (**A, B**) και των HoxApoB πρωτεϊνολιποσωμάτων (**Γ, Δ**) σε συγκέντρωση 2,5 ή 5μg πρωτεΐνης/mL στους 4⁰C ή στους 37⁰C για 4h. Οι τιμές πρόσληψης και σύνδεσης αποτελούν τους μέσους όρους ± SE τριπλών προσδιορισμών από ένα σύνολο τεσσάρων ξεχωριστών πειραμάτων.



Πίνακας III.9. Σύνδεση - πρόσληψη πρωτεϊνολιποσωμάτων που περιέχουν οxApoB από MoxLDL ή HoxLDL. Επίδραση της επώασης της LDL με refabloc πριν ή μετά την οξείδωση στην πρόσληψη - σύνδεση των πρωτεϊνολιποσωμάτων.								
	Σύνδεση (4 ⁰ C)							
	Mox[LDL+Pef]	MoxLDL+Pef	MoxLDL	p	Hox[LDL+Pef]	HoxLDL+Pef	HoxLDL	p
2,5 μg/ml	0,272 +/- 0,043 †. ††	0,279 +/- 0,056 †. ††	0,248 +/- 0,035 ††. ††	†. ††. ††: NS	0,373 +/- 0,057 †. ††	0,346 +/- 0,074 †. ††	0,356 +/- 0,045 ††. ††	†. ††. ††: NS
5 μg/ml	0,483 +/- 0,134 †. ††	0,501 +/- 0,150 †. ††	0,475 +/- 0,109 ††. ††	†. ††. ††: NS	0,623 +/- 0,175 †. ††	0,646 +/- 0,196 †. ††	0,643 +/- 0,143 ††. ††	†. ††. ††: NS
	Πρόσληψη (37 ⁰ C)							
	Mox[LDL+Pef]	MoxLDL+Pef	MoxLDL	p	Hox[LDL+Pef]	HoxLDL+Pef	HoxLDL	p
2,5 μg/ml	0,806 +/- 0,141 †. ††	0,862 +/- 0,160 †. ††	0,765 +/- 0,174 ††. ††	†. ††. ††: NS	1,069 +/- 0,170 †. ††	1,097 +/- 0,221 †. ††	0,974 +/- 0,136 ††. ††	†. ††. ††: NS
5 μg/ml	1,400 +/- 0,402 †. ††	1,442 +/- 0,499 †. ††	1,426 +/- 0,327 ††. ††	†. ††. ††: NS	1,899 +/- 0,526 †. ††	1,968 +/- 0,588 †. ††	1,868 +/- 0,429 ††. ††	†. ††. ††: NS

Ως **Mox[LDL+Pef]** και **Hox[LDL+Pef]** αναφέρονται τα πρωτεϊνολιποσώματα που περιέχουν οxApoB από MoxLDL ή HoxLDL οι οποίες επωάστηκαν με refabloc πριν την οξείδωσή τους, ως **MoxLDL+Pef** και **HoxLDL+Pef** αναφέρονται τα πρωτεϊνολιποσώματα που περιέχουν οxApoB από MoxLDL ή HoxLDL οι οποίες επωάστηκαν με refabloc μετά την οξείδωσή τους και ως **MoxLDL** και **HoxLDL** αναφέρονται τα πρωτεϊνολιποσώματα που περιέχουν οxApoB από MoxLDL ή HoxLDL οι οποίες δεν επωάστηκαν με refabloc σε κανένα χρονικό σημείο. Τα πρωτεϊνολιποσώματα επωάστηκαν με την καλλιέργεια των μακροφάγων σε συγκεντρώσεις 2,5 και 5μg/ml. Η σύνδεση - πρόσληψη εκφράζεται σε μg/1mg κυτταρικής πρωτεΐνης. Οι τιμές αποτελούν τους μέσους όρους ± τα κατά 95% όρια αξιοπιστίας από τριπλούς προσδιορισμούς από ένα σύνολο τεσσάρων ξεχωριστών πειραμάτων. Σημειώνεται το επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας (p) της διαφοράς των τιμών σύνδεσης - πρόσληψης μεταξύ των διαφόρων παρασκευών των οξειδωμένων LDL.

III.2.9. ΜΕΛΕΤΗ ΣΥΝΔΕΣΗΣ ΤΗΣ οxPAPC ΚΑΙ ΤΩΝ ΜΙΚΡΟΥ ΜΟΡΙΑΚΟΥ ΒΑΡΟΥΣ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΤΗΣ ΥΔΡΟΛΥΣΗΣ ΤΗΣ ΣΤΗΝ ApoB

Προκειμένου να εξεταστεί εάν τα προϊόντα της υδρόλυσης οξειδωμένων φωσφολιπιδίων από τη Lp-PLA₂ μπορούν να συνδεθούν στην ApoB χρησιμοποιήθηκε σαν υπόστρωμα η 1-παλμιτόυλο – 2 – αραχιδονόυλο – sn – γλυκερο – 3 - φωσφοχολίνη (1 - palmitoyl - 2 – arachidonoyl -phosphatidylcholine, PAPC). Η LDL περιέχει σημαντική ποσότητα PAPC και η οxPAPC αποτελεί υπόστρωμα της Lp-PLA₂. Η οξείδωση του αραχιδονικού στην sn-2 θέση οδηγεί σε ποικίλες μορφές οxPAPC κάποιες από τις οποίες περιέχουν βραχύτερες αλυσίδες στην sn-2 θέση μετά από απόσπαση περιφερικού τμήματος της αλυσίδας. Από τα μόρια αυτά οxPAPC με βραχύτερη αλυσίδα στην sn-2 θέση κάποια αποτελούν υποστρώματα της Lp-PLA₂. Από την υδρόλυσή της προκύπτουν το λυσο-παράγωγο της PAPC (lysoPAPC) και μικρού μοριακού βάρους προϊόντα της υδρόλυσης που αποτελούν τις συνδεδεμένες αλυσίδες στην sn-2 θέση της οxPAPC οι οποίες αποκόπτονται από την Lp-

PLA₂. Χρησιμοποιήθηκε [¹⁴C]PAPC της οποίας η σήμανση με ¹⁴C βρίσκεται στο 1ο άτομο άνθρακα της αλυσίδας του αραχιδονικού, το εγγύτερο στο γλυκερινικό σκελετό, και έτσι τα μικρού μοριακού βάρους προϊόντα της υδρόλυσης είναι σημασμένα με ¹⁴C.

Στα πλαίσια των πειραμάτων για τη διαπίστωση του βαθμού σύνδεσης της μη υδρολυμένης oxPAPC και των μικρού μοριακού βάρους προϊόντων της υδρόλυσης στην ApoB, [¹⁴C]PAPC επώαστηκε με μερικώς καθαρισμένη από LDL Lp-PLA₂ και απομονώθηκαν τα μικρού μοριακού βάρους προϊόντα της υδρόλυσης για να επωαστούν στη συνέχεια με LDL.

Μερικός καθαρισμός Lp-PLA₂ από LDL

Ο μερικός καθαρισμός Lp-PLA₂ από LDL έγινε όπως αναλυτικά περιγράφεται στις Μεθόδους (III.1.15) και συνοπτικά περιελάμβανε τα εξής στάδια: **α) την απομόνωση LDL από ανθρώπινο πλάσμα β) χρωματογραφία με στήλη DEAE-Sepharose CL-6B.** Το διάλυμα της LDL αναμειγνύεται με το υλικό της στήλης που έχει εξισορροπηθεί με ρυθμιστικό διάλυμα A (10 mM φωσφορικό κάλιο, 0,1% Tween 20, 10μM butylated hydroxytoluene, pH 6,8) και ακολουθεί έκλυση της στήλης αρχικά με ρυθμιστικό διάλυμα A και ακολούθως με ρυθμιστικό διάλυμα A 0,3M KCl κατά τη διάρκεια της οποίας εκλύεται το ένζυμο, **γ) χρωματογραφία υψηλής απόδοσης με στήλη Resource Q.** Η έκλυση της στήλης γίνεται με βαθμιδωτό σύστημα αρχίζοντας με 100% ρυθμιστικό διάλυμα B (5 mM Tris-HCl, 0,1% Tween 20, 10μM butylated hydroxytoluene, pH 7,5) και καταλήγοντας σε 100% ρυθμιστικό διάλυμα B 0,6M KCl. Τελικά η μερικώς καθαρισμένη Lp-PLA₂ **επαναδιαλύεται σε ρυθμιστικό διάλυμα που περιέχει octyl glycoside (OG)** ως απορρυπαντικό (ρυθμιστικό διάλυμα Γ: 5 mM Tris-HCl, 0,5M KCl 0.1%, 25 mM OG, 10μM butylated hydroxytoluene, pH 7,5). Αυτό έγινε με δεδομένο ότι η μερικώς καθαρισμένη Lp-PLA₂ θα χρησιμοποιηθεί στη συνέχεια σε πειράματα με LDL και το OG είναι ένα ήπιο απορρυπαντικό που δεν επηρεάζει τη δομή των πρωτεϊνών και έχει δείχθει πως η χρήση του δεν επηρεάζει τη σύνδεση της ApoB με τους υποδοχείς των μακροφάγων [321]. Μετρήθηκε η ενζυμική δραστηριότητα και η περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη σε όλα τα ανωτέρω στάδια (Πίνακας III.10). Η δραστηριότητα της Lp-PLA₂ εκφράζεται ως nmoles PAF που υδρολύονται ανά mg πρωτεΐνης ανά min (**nmol PAF/mg πρωτεΐνης ανά min**). Ως 1 μονάδα ενζυμικής δραστηριότητας ορίζεται ποσότητα που υδρολύει 1 nmole PAF σε 1h (**1 μονάδα = 1 nmol PAF/h**). Στο τελικό διάλυμα η ενζυμική δραστηριότητα ήταν ~ 36,5 φορές μεγαλύτερη από αυτή του αρχικού διαλύματος της LDL. Ο όγκος του διαλύματος που

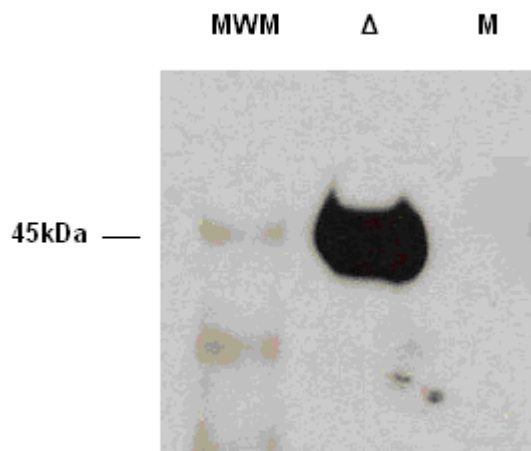
περιείχε την Lp-PLA₂ σε ρυθμιστικό διάλυμα Γ προσαρμόστηκε έτσι ώστε το τελικό διάλυμα να περιέχει 10³ μονάδες ενζυμικής δραστηριότητας / mL.

Πίνακας III.10. Δραστηριότητα Lp-PLA₂ στα στάδια καθαρισμού της από LDL (nmol PAF/mg πρωτεΐνης ανά min)			
LDL	DEAE-Sepharose	Resource Q	Διάλυμα OG
2,24	3,81	69,10	81,98

Ελέγχθηκε η επίδραση του Tween 20 και του OG που περιέχονταν ως απορρυπαντικά στα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν, στην ενζυμική δραστηριότητα της Lp-PLA₂. Μετρήθηκε η ενζυμική δραστηριότητα χρησιμοποιώντας σαν πηγή του ενζύμου το διάλυμα της LDL. Ποσότητα 10 μL διαλύματος 100 μM [³H]PAF (1 nmole PAF) επωάστηκε με 10 μL διαλύματος της LDL. Στο δείγμα μάρτυρα ο όγκος συμπληρώθηκε έως τελικού όγκου 100 μL με PBS pH 7,4. Προκειμένου να προσομοιωθεί η προσθήκη διαλυμάτων από τις φάσεις διαδικασίας του καθαρισμού του ενζύμου στο διάλυμα μέτρησης της ενζυμικής δραστηριότητας, στα δείγματα για τον έλεγχο της επίδρασης του Tween 20 και του OG προστέθηκαν 10 μL διαλύματος 0,1% Tween 20 ή 10 μL διαλύματος 25 mM OG και ο όγκος συμπληρώθηκε έως τελικού όγκου 100 μL με PBS pH 7,4. Η τελική συγκέντρωση στο διάλυμα μέτρησης της ενζυμικής δραστηριότητας του Tween 20 ήταν 0,01% και του OG 2,5 mM. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον **Πίνακα III.11**. Οι τιμές αποτελούν τους μέσους όρους ± SD διπλών προσδιορισμών από ένα σύνολο τριών ξεχωριστών πειραμάτων. Η παρουσία Tween 20 ανέστειλε σε μικρό βαθμό την Lp-PLA₂ μειώνοντας τη δραστηριότητά της στο 83% του μάρτυρα σε αντίθεση με το OG το οποίο δεν προκαλεί αναστολή. Τα αποτελέσματα αυτά είναι σύμφωνα με αυτά της Stafforini και συν. [359]. Τα αποτελέσματα αυτά εξηγούν και την αύξηση της ενζυμικής δραστηριότητας που παρατηρήθηκε με την επαναδιάλυση της μερικώς καθαρισμένης στη στήλη Resource Q Lp-PLA₂ σε ρυθμιστικό διάλυμα Γ που περιέχει OG.

Πίνακας III.11. Επίδραση απορρυπαντικών στην ενζυμική δραστικότητα της Lp-PLA₂		
Μάρτυρας	0,01% Tween 20	2,5 mM OG
100 ± 1,91	83,02 ± 1,63	99,37 ± 2,28
<p>Ποσότητα 10 µL διαλύματος LDL επώαστηκε σε PBS pH 7,4 με 10 µM [³H]PAF σε τελικό όγκο 100 µL στους 37°C για 5 min χωρίς την παρουσία απορρυπαντικού (μάρτυρας) ή την παρουσία Tween 20 ή OG σε τελικές συγκεντρώσεις 0,01% και 2,5 mM αντίστοιχα. Η δραστικότητα του μάρτυρα λαμβάνεται ως 100% και η δραστικότητα παρουσία Tween 20 ή OG παρουσιάζεται ως το % ποσοστό του μάρτυρα. Οι τιμές αποτελούν τους μέσους όρους ± SD διπλών προσδιορισμών από ένα σύνολο τριών ξεχωριστών πειραμάτων.</p>		

Τέλος, ποσότητα της μερικώς καθαρισμένης Lp-PLA₂ υποβλήθηκε σε ανοσοαποτύπωση κατά Western (**Εικόνα III.7**). Η ανοσοαποτύπωση κατά Western επιβεβαίωσε την παρουσία της Lp-PLA₂ αναδεικνύοντας μεγάλη πρόσδεση του ειδικού προς αυτήν αντισώματος στη θέση του αναμενόμενου μοριακού βάρους των 45kDa.



Εικόνα III.7. Ανοσοαποτύπωση κατά Western σε δείγμα διαλύματος μερικώς καθαρισμένης Lp-PLA₂. MWM: molecular weight markers (δείκτες μοριακού βάρους), Δ: δείγμα, M: μάρτυρας

Διαπίστωση του βαθμού σύνδεσης της μη υδρολυμένης oxPAPC και των μικρού μοριακού βάρους προϊόντων της υδρόλυσης στην ApoB

Διενεργήθηκαν δύο ομάδες πειραμάτων: Α) συνοξείδωση [¹⁴C]PAPC με LDL με διατηρημένη τη δραστικότητα της Lp-PLA₂ (LDL) ή με LDL με ανεσταλμένη τη δραστικότητα της Lp-PLA₂ μετά από επώαση με refabloc (LDL + ref) και Β) επώαση LDL, LDL + ref, oxLDL και ox(LDL + ref) με [¹⁴C]PAPC ή με μικρού μοριακού βάρους προϊόντα της υδρόλυσης της [¹⁴C]PAPC τα οποία έχουν απομονωθεί μετά από επώαση

[¹⁴C]PAPC με μερικώς καθαρισμένη Lp-PLA₂. Στην κατάληξη και των δύο ομάδων πειραμάτων η ApoB ή η oxApoB απομονώνεται, μετρώνται η πρωτεΐνη και η β-ακτινοβολία και υπολογίζεται το ποσοστό των ραδιενεργών μορίων που βρίσκονται συνδεδεμένα με την πρωτεΐνη. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον **Πίνακα III.12**. Οι τιμές αποτελούν τους μέσους όρους ± τα 95% όρια αξιοπιστίας από τριπλούς προσδιορισμούς από ένα σύνολο τριών πειραμάτων.

Αποτελέσματα πειραμάτων A: συνοξείδωση [¹⁴C]PAPC με LDL με διατηρημένη τη δραστηριότητα της Lp-PLA₂ [LDL(+)] ή με LDL με ανεσταλμένη τη δραστηριότητα της Lp-PLA₂ μετά από επώαση με refabloc [LDL(-)]

Στην ομάδα αυτή πειραμάτων η συνοξείδωση [¹⁴C]PAPC με LDL με διατηρημένη τη δραστηριότητα της Lp-PLA₂ σε διάλυμα PBS pH 7,4 παρουσία 5 μM CuSO₄ για 24 h στους 37°C, οδήγησε σε μικρή μόνο μείωση κατά 14,2% της συνδεδεμένης με την oxApoB β-ακτινοβολίας έναντι αυτής που παρατηρήθηκε όταν [¹⁴C]PAPC συνοξειδώθηκε με LDL με ανεσταλμένη τη δραστηριότητα της Lp-PLA₂ (P < 0.05).

Αποτελέσματα πειραμάτων B: επώαση LDL(+ ή -) και oxLDL(+ ή -) με [¹⁴C]oxPAPC ή με μικρού μοριακού βάρους προϊόντα της υδρόλυσης της [¹⁴C]oxPAPC τα οποία έχουν απομονωθεί μετά από επώαση [¹⁴C]oxPAPC με μερικώς καθαρισμένη Lp-PLA₂

Στη δεύτερη αυτή ομάδα πειραμάτων η ox[¹⁴C]PAPC επώαζεται με ή χωρίς την προσθήκη μερικώς καθαρισμένης Lp-PLA₂ για 24 h στους 37°C. Δείγματα των 0,5 μmole ox[¹⁴C]PAPC επώαζονται με ή χωρίς την προσθήκη 200 μονάδων μερικώς καθαρισμένης Lp-PLA₂ (1 μονάδα υδρολύει 1 nmole PAF σε 1h, 1 μονάδα = 1 nmole PAF/1h) σε τελικό όγκο 250 μL (η συμπλήρωση του όγκου έως τα 250 μL γίνεται με PBS pH 7,4) για 24 h στους 37°C υπό συνεχή ανάδευση σε υδατόλουτρο. Δεδομένου ότι η μερικώς καθαρισμένη Lp-PLA₂ βρίσκεται διαλυμένη σε ρυθμιστικό διάλυμα Γ που περιέχει 25 mM OG στην περίπτωση των δειγμάτων που επώαζονται χωρίς την προσθήκη μερικώς καθαρισμένης Lp-PLA₂ (μάρτυρες) προστίθεται αντίστοιχη ποσότητα ρυθμιστικού διαλύματος Γ. Ο τελικός όγκος του διαλύματος επώασης της ox[¹⁴C]PAPC ήταν σε κάθε περίπτωση τέτοιος ώστε η τελική συγκέντρωση του OG που προστίθεται με την προσθήκη του διαλύματος να είναι ≤ 2,5 mM, συγκέντρωση η οποία δείχτηκε ανωτέρω ότι δεν επηρεάζει την ενζυμική δραστηριότητα της Lp-PLA₂. Τα μικρού μοριακού βάρους προϊόντα της υδρόλυσης

διαχωρίζονται από τη μη υδρολυμένη oxPAPC με εκχύλιση Bligh-Dyer. Τα μικρού μοριακού βάρους προϊόντα της υδρόλυσης περιέχονται στην άνω, υδατομεθανολική, φάση ενώ η oxPAPC στην κάτω, χλωροφορμική. Η άνω φάση πλένεται με ίσο όγκο χλωροφορμίου, συλλέγεται εκ νέου και οι διαλύτες εξατμίζονται μέχρι ξηρού σε ρεύμα N₂. Τα μικρού μοριακού βάρους προϊόντα της υδρόλυσης επαναδιαλύονται σε PBS pH 7,4. Στην περίπτωση των δειγμάτων μαρτύρων η ραδιενέργεια που περιεχόταν τελικά στην άνω φάση της εκχύλισης ήταν μικρότερη του 2% της συνολικής.

Πειράματα τα οποία έγιναν για να διαπιστωθεί εάν η παρουσία του ρυθμιστικού διαλύματος Γ στις συγκεντρώσεις που αυτό χρησιμοποιείται επηρεάζει την κατανομή της ox[¹⁴C]PAPC ή των μικρού μοριακού βάρους προϊόντων της υδρόλυσης στην εκχύλιση Bligh-Dyer και στη μετέπειτα πλύση της άνω φάσης με ίσο όγκο χλωροφορμίου δεν ανέδειξαν καμία διαφοροποίηση.

Επίσης μετρήσεις της β-ακτινοβολίας πριν την εξάτμιση των διαλυτών της άνω φάσης μέχρι ξηρού σε ρεύμα N₂ και μετά την επαναδιαλυτοποίηση των μικρού μοριακού βάρους προϊόντων της υδρόλυσης σε PBS pH 7,4 ανέδειξαν πλήρη ανάκτηση της β-ακτινοβολίας αποκλείοντας έτσι το ενδεχόμενο κάποια από τα μικρού μοριακού βάρους προϊόντα της υδρόλυσης να είναι πτητικά και να χάνονται στη φάση της εξάτμισης.

LDL, LDL + ref, oxLDL και ox(LDL + ref) επώαστηκαν είτε με μικρού μοριακού βάρους προϊόντα της υδρόλυσης είτε με ox[¹⁴C]PAPC είτε με μη οξειδωμένη [¹⁴C]PAPC για 24 h στους 37°C. Όσον αφορά στην επώαση με τα μικρού μοριακού βάρους προϊόντα της υδρόλυσης, ως μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε επώαση με ίσο όγκο διαλύματος που προήλθε από την άνω φάση της εκχύλισης των δειγμάτων μαρτύρων. Οι τιμές που ελήφθησαν από την επώαση με τα δείγματα μάρτυρες αφαιρέθηκαν από τις τιμές που ελήφθησαν από την επώαση με τα μικρού μοριακού βάρους προϊόντα της υδρόλυσης. Η επώαση μικρού μοριακού βάρους προϊόντων της υδρόλυσης με LDL και LDL + ref ανέδειξε την ικανότητά τους να συνδέονται στην ApoB σε παραπλήσιο βαθμό με αυτόν της oxPAPC. Η συνδεδεμένη στην ApoB β-ακτινοβολία ήταν μόνο κατά 10,2% (P < 0.05) και 13,8% (P < 0.01) μικρότερη αυτής που ανακτήθηκε με την ApoB μετά από επώαση ox[¹⁴C]PAPC με LDL και LDL + ref αντίστοιχα. Σε συμφωνία με τα ανωτέρω αποτελέσματα, η συνδεδεμένη στην ApoB β-ακτινοβολία μετά από επώαση ox[¹⁴C]PAPC με LDL ήταν μόλις κατά 9,8% μικρότερη αυτής μετά από επώαση ox[¹⁴C]PAPC με LDL + ref (P < 0,05) δεικνύοντας πως η υδρόλυση μέρους της ox[¹⁴C]PAPC οδηγεί σε μικρή μείωση της σύνδεσης ραδιενεργών μορίων στην ApoB καθώς μόρια ox[¹⁴C]PAPC υδρολύονται και τη θέση τους παίρνουν σημασμένα μικρού μοριακού βάρους προϊόντα της υδρόλυσης με παραπλήσια αλλά

ελαφρώς μικρότερη ικανότητα σύνδεσης. Εξετάστηκε επίσης το εάν το refabloc επηρεάζει άμεσα, πέραν της αναστολής της δραστηριότητας της Lp-PLA₂, τη σύνδεση της ox[¹⁴C]PAPC ή των σημασμένων μικρού μοριακού βάρους προϊόντων της υδρόλυσης. Αυτό ελέγχθηκε με προσθήκη του refabloc στο πέρασ της επώασης της ox[¹⁴C]PAPC ή των σημασμένων μικρού μοριακού βάρους προϊόντων της υδρόλυσης με LDL ή oxLDL και η προσθήκη αυτή δεν επέφερε καμία διαφοροποίηση. Όσον αφορά στην προσθήκη είτε μικρού μοριακού βάρους προϊόντων της υδρόλυσης είτε ox[¹⁴C]PAPC σε oxLDL και ox(LDL + ref), αυτή οδήγησε σε πολύ μικρότερες τιμές συνδεδεμένης στην oxApoB β-ακτινοβολίας πιθανότατα λόγω του ότι οι υπεύθυνες για τη σύνδεση θέσεις της oxApoB είχαν ήδη καταληφθεί από μόρια που παράχθηκαν κατά τη διάρκεια της οξειδωσης. Τέλος, οι τιμές σύνδεσης που προέκυψαν με την επώαση μη οξειδωμένης [¹⁴C]PAPC ήταν πολύ μικρότερες από αυτές των επώασεων είτε με μικρού μοριακού βάρους προϊόντα της υδρόλυσης είτε με ox[¹⁴C]PAPC και έφθαναν περίπου στο 1/3 αυτών όσον αφορά στην επώαση με LDL και LDL + ref και περίπου στο 1/2 αυτών όσον αφορά στην επώαση με oxLDL και ox(LDL + ref).

Το συμπέρασμα των ανωτέρω πειραμάτων είναι πως τα μικρού μοριακού βάρους προϊόντα της υδρόλυσης διαθέτουν ικανότητα σύνδεσης στην ApoB παραπλήσια με αυτή της oxPAPC. Το δεδομένο αυτό θα μπορούσε να στηρίζει ως εξήγηση για την όμοια σύνδεση - πρόσληψη από τα μακροφάγα της oxApoB από oxLDL(+) ή oxLDL(-), την παρόμοια τροποποίηση της oxApoB από τα μικρού μοριακού βάρους προϊόντα της υδρόλυσης και από την μη υδρολυμένη οξειδωμένη φωσφατιδυλοχολίνη.

Πίνακας III.12. Σύνδεση της oxPAPC και των μικρού μοριακού βάρους προϊόντων της υδρόλυσης στην ApoB

		% σύνδεση στην ApoB (± 95% όρια αξιοπιστίας)
A	ox[LDL + PAPC]	6,640 ± 0,780 *
	ox [(LDL + pef) + PAPC]	7,766 ± 0,722 *
B	LDL + μικρού μοριακού βάρους προϊόντα της υδρόλυσης	3,650 ± 0,573 ‡
	LDL + oxPAPC	4,064 ± 0,251 ‡, ¶
	LDL + PAPC	1,266 ± 0,117
	(LDL + pef) + μικρού μοριακού βάρους προϊόντα της υδρόλυσης	3,886 ± 0,400 †
	(LDL + pef) + oxPAPC	4,506 ± 0,336 †, ¶
	(LDL + pef) + PAPC	1,362 ± 0,193
	oxLDL + μικρού μοριακού βάρους προϊόντα της υδρόλυσης	1,067 ± 0,172
	oxLDL + oxPAPC	1,164 ± 0,217
	oxLDL + PAPC	0,537 ± 0,056
	ox(LDL + pef) + μικρού μοριακού βάρους προϊόντα της υδρόλυσης	1,009 ± 0,175
	ox(LDL + pef) + oxPAPC	1,372 ± 0,250
	ox(LDL + pef) + PAPC	0,629 ± 0,071

A. LDL ή LDL + pef σε συγκέντρωση 100 µg πρωτεΐνης/mL συνοξειδώθηκε με [¹⁴C]PAPC σε συγκέντρωση 25 nmoles/mL παρουσία 5 µM CuSO₄ για 24 h στους 37°C. **B.** [¹⁴C]PAPC οξειδώθηκε παρουσία 5 µM CuSO₄ για 24 h στους 37°C και η ox[¹⁴C] PAPC παρελήφθη με εκχύλιση Bligh Dyer και επαναδιαλύθηκε σε PBS pH 7.4. Δείγματα των 0,5 µmol ox[¹⁴C] PAPC επώαστηκαν με την προσθήκη 200 μονάδων μερικώς καθαρισμένης Lp-PLA₂ (1 μονάδα υδρολύει 1 nmole PAF σε 1h) ή χωρίς την προσθήκη Lp-PLA₂ (μάρτυρες), σε τελικό όγκο 250 µL για 24 h στους 37°C. Με εκχύλιση Bligh Dyer τα μικρού μοριακού βάρους προϊόντα της υδρόλυσης απομονώθηκαν στην άνω φάση η οποία επιπλέον πλύθηκε με ίσο όγκο χλωροφορμίου, και επαναδιαλύθηκαν σε PBS pH 7,4. LDL, LDL + pef, oxLDL και ox(LDL + pef) σε τελική συγκέντρωση 100 µg πρωτεΐνης/mL επώαστηκαν είτε με μικρού μοριακού βάρους προϊόντων της υδρόλυσης είτε με ox[¹⁴C]PAPC σε τελική συγκέντρωση 25 nmoles/mL για 24 h στους 37°C. Τελικά, και στις δύο ομάδες πειραμάτων (A και B), η αποπρωτεΐνη B (μη οξειδωμένη ApoB ή oxApoB) απομονώνεται, διαλυτοποιείται σε 0,5 mL 0,2M NaOH, 0,1% SDS και δείγματα χρησιμοποιούνται για μέτρηση πρωτεΐνης και β-ακτινοβολίας όπως περιγράφεται στις Μεθόδους. Η σύνδεση εκφράζεται ως το % ποσοστό της συνολικής β-ακτινοβολίας, της β-ακτινοβολίας που βρέθηκε συνδεδεμένη στην ποσότητα της αποπρωτεΐνης B που χρησιμοποιήθηκε.. Όσον αφορά στην επώαση με τα μικρού μοριακού βάρους προϊόντων της υδρόλυσης ως μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε επώαση με ίσο όγκο διαλύματος που προήλθε από την άνω φάση της εκχύλισης των δειγμάτων μαρτύρων. Οι τιμές που ελήφθησαν από την επώαση με τα δείγματα μάρτυρες αφαιρέθηκαν από τις τιμές που ελήφθησαν από την επώαση με τα μικρού μοριακού βάρους προϊόντα της υδρόλυσης. Οι τιμές αποτελούν τους μέσους όρους ± τα 95% όρια αξιοπιστίας από τριπλούς προσδιορισμούς από ένα σύνολο τριών πειραμάτων.
† P < 0.01 ; * , ¶ , ‡ P < 0.05.

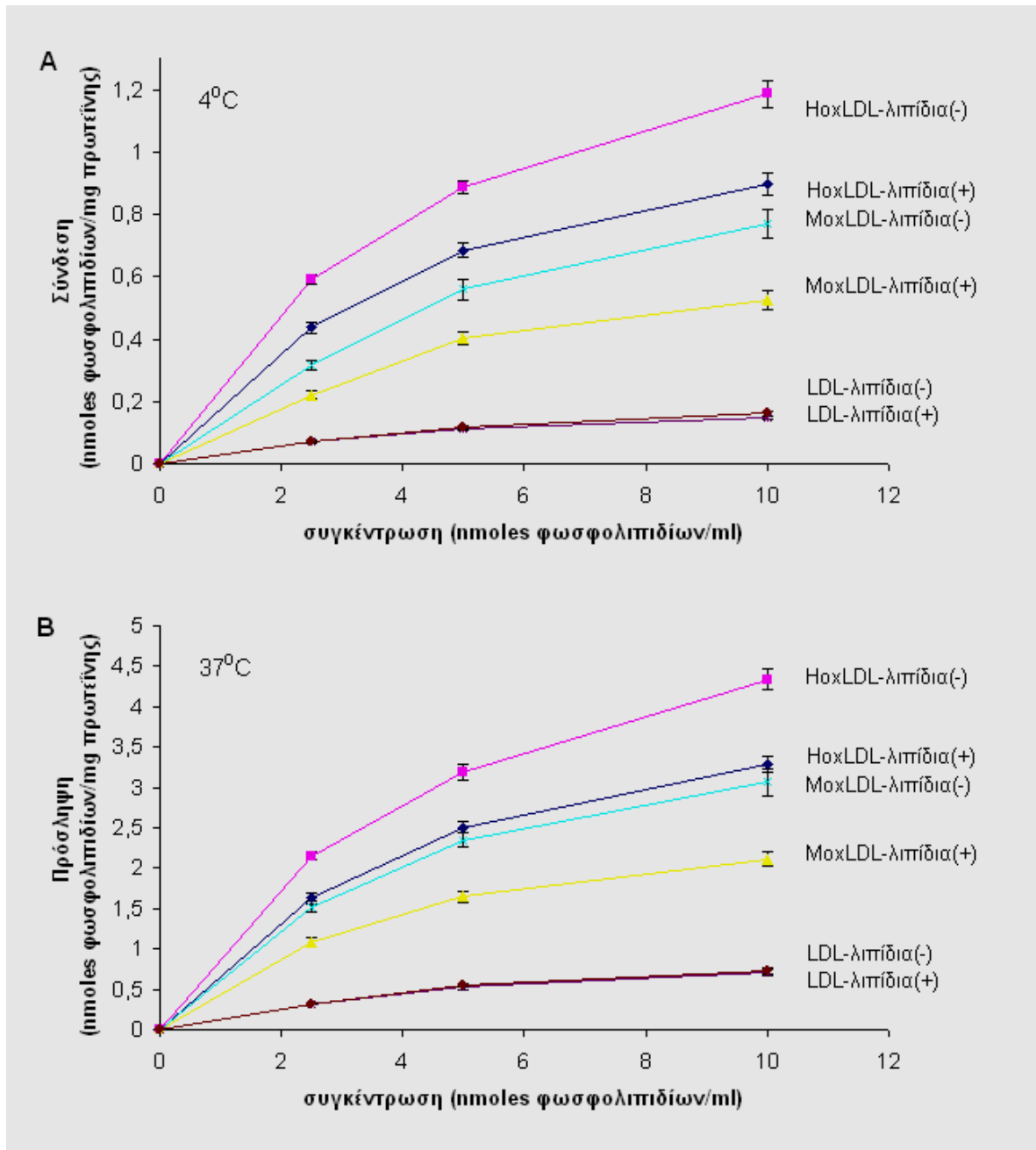
III.2.10. ΜΕΛΕΤΗ ΣΥΝΔΕΣΗΣ – ΠΡΟΣΛΗΨΗΣ ΛΙΠΟΣΩΜΑΤΩΝ ΑΠΟ ΛΙΠΙΔΙΑ ΦΥΣΙΚΩΝ Ή ΟΞΕΙΔΩΜΕΝΩΝ LDL ΣΕ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΜΑΚΡΟΦΑΓΩΝ

Στην ενότητα αυτή μελετήθηκε η επίδραση της δραστηριότητας της Lp-PLA₂ στη σύνδεση και στην πρόσληψη των oxLDL μέσω της λιπιδικής τους ομάδας. Στα πειράματα χρησιμοποιήθηκαν σημασμένα με [¹⁴C]DPPC λιποσώματα τα οποία παρασκευάστηκαν από λιπίδια μη οξειδωμένων LDL με διατηρημένη ή ανεσταλμένη τη δραστηριότητα της Lp-PLA₂ [LDL(+ ή -)] και μέτρια ή ισχυρά οξειδωμένων LDL(+ ή -), [MoxLDL(+ ή -)] και HoxLDL(+ ή -)]. Όσον αφορά στις οξειδωμένες λιποπρωτεΐνες με ανεσταλμένη τη δραστηριότητα της Lp-PLA₂, τονίζεται ότι η αναστολή της δραστηριότητας της Lp-PLA₂ έγινε πριν την οξείδωση. Εξετάσθηκε η σύνδεση και η πρόσληψη των λιποσωμάτων σε καλλιέργεια μακροφάγων.

Τα λιποσώματα από λιπίδια LDL(+ ή -), MoxLDL(+ ή -) και HoxLDL(+ ή -) επώαστηκαν ταυτόχρονα στους 4⁰ ή στους 37⁰C με τα μακροφάγα για 4h. Τα λιποσώματα επώαστηκαν σε τελικές συγκεντρώσεις 2,5, 5 και 10 nmoles φωσφολιπιδίων / mL. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στην **Εικόνα III.8** και στον **Πίνακα III.13**. Η σύνδεση ή η πρόσληψη των λιποσωμάτων εκφράζεται σε nmoles φωσφολιπιδίων/mg κυτταρικής πρωτεΐνης. Οι τιμές σύνδεσης και πρόσληψης αποτελούν τους μέσους όρους τετραπλών προσδιορισμών από ένα σύνολο τεσσάρων ξεχωριστών πειραμάτων.

Οι καμπύλες σύνδεσης και πρόσληψης ήταν ποιοτικά ομοιόμορφες παρουσιάζοντας όμοιες αναλογίες σύνδεσης και πρόσληψης μεταξύ των λιποσωμάτων από λιπίδια των φυσικών και των οξειδωμένων LDL που χρησιμοποιήθηκαν. Η σύνδεση και η πρόσληψη των λιποσωμάτων από οξειδωμένες LDL ήταν κατά πολύ μεγαλύτερες αυτών των λιποσωμάτων από λιπίδια φυσικών LDL. Μεταξύ των λιποσωμάτων από λιπίδια οξειδωμένων LDL, οι τιμές σύνδεσης και πρόσληψης των λιποσωμάτων από λιπίδια των HoxLDL ήταν μεγαλύτερες από αυτές των λιποσωμάτων από λιπίδια των MoxLDL. Όσον αφορά στην επίδραση της αναστολής της δραστηριότητας της Lp-PLA₂ στη σύνδεση και στην πρόσληψη, δεν παρατηρήθηκαν διαφορές μεταξύ των λιποσωμάτων από LDL(+) και LDL(-) ενώ αντιθέτως η σύνδεση και η πρόσληψη λιποσωμάτων από MoxLDL(-) και από HoxLDL(-) ήταν στατιστικά σημαντικά αυξημένες έναντι της σύνδεσης και της πρόσληψης των λιποσωμάτων από MoxLDL(+) και HoxLDL(+) αντίστοιχα (p < 0,0001). Οι αυξήσεις που παρατηρήθηκαν παρουσιάζονται στον **Πίνακα III.14**. Οι αυξήσεις ήταν μεγαλύτερες στην περίπτωση των λιποσωμάτων από MoxLDL και κυμαίνονταν στο επίπεδο του 40%, σε

σχέση με τις αυξήσεις που παρατηρήθηκαν στα λιποσώματα από HoxLDL, οι οποίες κυμαίνονταν στο επίπεδο του 30%.



Εικόνα 3.8. Σύνδεση (A) και πρόσληψη (B) σημασμένων με $[^{14}\text{C}]$ DPPC λιποσωμάτων από λιπίδια LDL(+ ή -), MoxLDL(+ ή -) και HoxLDL(+ ή -). Η σύνδεση και η πρόσληψη των λιποσωμάτων υπολόγιστηκε μετά από επώαση με καλλιέργεια μακροφάγων στους 4°C ή στους 37°C για 4h. Οι τιμές σύνδεσης και πρόσληψης αποτελούν τους μέσους όρους \pm SE τετραπλών προσδιορισμών από ένα σύνολο τεσσάρων ξεχωριστών πειραμάτων.

Πίνακας III.13. Σύνδεση - πρόσληψη λιποσωμάτων από τα λιπίδια LDL(+ ή -), MoxLDL(+ ή -) και HoxLDL(+ ή -) σε καλλιέργεια μακροφάγων.								
	Σύνδεση (4 ⁰ C) (nmoles φωσφολιπιδίων / mg κυτταρικής πρωτεΐνης)							
	LDL(+) Λιπίδια	LDL(-) Λιπίδια	MoxLDL(+) Λιπίδια	MoxLDL(-) Λιπίδια	p	HoxLDL(+) Λιπίδια	HoxLDL(-) Λιπίδια	p
2,5 nmoles /ml	0,070 +/-0,006	0,073 +/-0,009	0,221 +/-0,026	0,314 +/-0,036	< 0,0001	0,437 +/-0,039	0,590 +/-0,033	< 0,0001
5 nmoles /ml	0,113 +/-0,015	0,118 +/-0,008	0,402 +/-0,052	0,559 +/-0,075	0,0002	0,685 +/-0,045	0,887 +/-0,040	< 0,0001
10 nmoles /ml	0,148 +/-0,014	0,162 +/-0,017	0,526 +/-0,083	0,770 +/-0,127	0,0001	0,897 +/-0,073	1,188 +/-0,092	< 0,0001
	Πρόσληψη (37 ⁰ C) (nmoles φωσφολιπιδίων / mg κυτταρικής πρωτεΐνης)							
	LDL(+) Λιπίδια	LDL(-) Λιπίδια	MoxLDL(+) Λιπίδια	MoxLDL(-) Λιπίδια	p	HoxLDL(+) Λιπίδια	HoxLDL(-) Λιπίδια	p
2,5 nmoles /ml	0,325 +/-0,020	0,324 +/-0,018	1,080 +/-0,114	1,509 +/-0,115	< 0,0001	1,639 +/-0,101	2,150 +/-0,111	< 0,0001
5 nmoles /ml	0,528 +/-0,036	0,546 +/-0,030	1,645 +/-0,153	2,345 +/-0,204	< 0,0001	2,505 +/-0,147	3,183 +/-0,213	0,0002
10 nmoles /ml	0,705 +/-0,045	0,726 +/-0,048	2,108 +/-0,195	3,064 +/-0,363	< 0,0001	3,284 +/-0,205	4,339 +/-0,278	< 0,0001
Οι τιμές αποτελούν τους μέσους όρους ± τα κατά 95% όρια αξιοπιστίας από τετραπλούς προσδιορισμούς από ένα σύνολο τεσσάρων ξεχωριστών πειραμάτων. Σημειώνεται το επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας (p) της διαφοράς των τιμών σύνδεσης ή πρόσληψης μεταξύ λιποσωμάτων από λιπίδια MoxLDL(+) και MoxLDL(-) και μεταξύ λιποσωμάτων από λιπίδια HoxLDL(+) και HoxLDL(-) για κάθε συγκέντρωση στην οποία επωάστηκαν αυτά με την καλλιέργεια των μακροφάγων.								

Συμπερασματικά, το πρότυπο σύνδεσης – πρόσληψης των λιποσωμάτων από λιπίδια LDL(+ ή -), MoxLDL(+ ή -) και HoxLDL(+ ή -) ήταν παρόμοιο με αυτό της σύνδεσης – πρόσληψης των αντίστοιχων λιποπρωτεϊνών LDL(+ ή -), MoxLDL(+ ή -) και HoxLDL(+ ή -). Η αναστολή της δραστηριότητας της Lp-PLA₂ οδήγησε σε μεγαλύτερες αυξήσεις στη σύνδεση και στη πρόσληψη των λιποσωμάτων από λιπίδια των MoxLDL και των HoxLDL (~ 40% και ~ 30% αντίστοιχα) από αυτές που παρατηρήθηκαν στην πρόσληψη και στη σύνδεση των λιποπρωτεϊνών MoxLDL και HoxLDL (~ 30% και ~ 20% αντίστοιχα).

Πίνακας III.14. Επίδραση της αναστολής της Lp-PLA₂ στη σύνδεση και στην πρόσληψη λιποσωμάτων από τα λιπίδια των MoxLDL και των HoxLDL				
	Σύνδεση (4⁰C)		Πρόσληψη (37⁰C)	
	MoxLDL(-)/MoxLDL(+) % ± τα κατά 95% όρια αξιοπιστίας	HoxLDL(-)/HoxLDL(+) % ± τα κατά 95% όρια αξιοπιστίας	MoxLDL(-)/MoxLDL(+) % ± τα κατά 95% όρια αξιοπιστίας	HoxLDL(-)/HoxLDL(+) % ± τα κατά 95% όρια αξιοπιστίας
2,5 nmoles /ml	142,03±18,34	131,12±13,38	139,70±13,38	131,20±8,87
5 nmoles /ml	139,07±20,07	127,06±10,02	142,84±15,01	127,06±9,97
10 nmoles /ml	146,39±28,71	132,13±10,17	145,32±18,94	132,84±12,16

III.2.11. ΜΕΛΕΤΗ ΣΥΝΔΕΣΗΣ – ΠΡΟΣΛΗΨΗΣ ΛΙΠΟΣΩΜΑΤΩΝ ΠΟΥ ΠΕΡΙΕΧΟΥΝ ΚΕΚΟΡΕΣΜΕΝΑ (DPPC) Ή ΑΚΟΡΕΣΤΑ (PAPC, PLPC, DPPC) ΦΩΣΦΟΛΙΠΙΔΙΑ Ή ΤΑ ΟΞΕΙΔΩΜΕΝΑ ΚΑΙ ΤΑ ΛΥΣΟ ΠΑΡΑΓΩΓΑ ΤΟΥΣ ΣΕ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΜΑΚΡΟΦΑΓΩΝ

Από τις προηγούμενες ενότητες πειραμάτων αναδείχτηκε ότι η αναστολή της δραστηριότητας της Lp-PLA₂ οδηγεί σε αυξημένη σύνδεση – πρόσληψη των oxLDL. Η αναστολή της δραστηριότητας της Lp-PLA₂ δεν μετέβαλε τη σύνδεση και την πρόσληψη της oxApoB ενώ αντιθέτως συνοδεύτηκε από αυξημένη σύνδεση και πρόσληψη των λιπιδίων τους. Με βάση το συμπέρασμα ότι η αναστολή της δραστηριότητας της Lp-PLA₂ οδηγεί σε αυξημένη σύνδεση – πρόσληψη των oxLDL μέσω αυξημένη σύνδεσης – πρόσληψης της λιπιδικής τους ομάδας και δεδομένου ότι η δράση της συνίσταται στην υδρόλυση μέρους της οξειδωμένης φωσφατιδυλοχολίνης σε λυσοφωσφατιδυλοχολίνη, ο ρόλος της φωσφατιδυλοχολίνης διερευνήθηκε περαιτέρω.

Στα πειράματα της ενότητας αυτής χρησιμοποιήθηκαν σημασμένα με [¹⁴C]DPPC λιποσώματα τα οποία παρασκευάστηκαν με συνδυασμό διαφόρων συνθετικών φωσφολιπιδίων (οξειδωμένων ή μη) και χοληστερόλης με διατήρηση πάντοτε σταθερής της μοριακής αναλογίας μεταξύ του συνόλου των φωσφολιπιδίων και της χοληστερόλης σε 2 προς 1 (ολικά φωσφολιπίδια/χοληστερόλη 2:1, mol/mol). Η αναλογία αυτή χρησιμοποιήθηκε καθώς αποτελεί τη συχνότερα χρησιμοποιούμενη στη βιβλιογραφία αναλογία για το σχηματισμό λιποσωμάτων για την εξέταση της σύνδεσης διαφόρων φωσφολιπιδίων σε υποδοχείς μακροφάγων (βλέπε II.2.4.2. Σύνδεση μέσω της λιπιδικής

ομάδας της oxLDL). Ως μη οξειδωμένα φωσφολιπίδια χρησιμοποιήθηκαν α) το κεκορεσμένο φωσφολιπίδιο 1,2-διπαλμιτόϋλο-sn-γλυκερο-3-φωσφοχολίνη (1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine, **DPPC**) το οποίο φέρει την κεκορεσμένη λιπαρή αλυσίδα του παλμιτικού στην sn-1 και στην sn-2 θέση, β) το πολυακόρεστο φωσφολιπίδιο 1-παλμιτούλο-2-αραχιδονόϋλο-sn-γλυκερο-3-φωσφοχολίνη (1-palmitoyl-2-arachidonyl-sn-glycero-3-phosphocholine, **PAPC**) το οποίο φέρει την κεκορεσμένη λιπαρή αλυσίδα του παλμιτικού στην sn-1 και την πολυακόρεστη λιπαρή αλυσίδα του αραχιδονικού στην sn-2 θέση, γ) το πολυακόρεστο φωσφολιπίδιο 1-παλμιτούλο-2-λινελαϊκούϋλο-sn-γλυκερο-3-φωσφοχολίνη (1-palmitoyl-2-linoleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine, **PLPC**) το οποίο φέρει την κεκορεσμένη λιπαρή αλυσίδα του παλμιτικού στην sn-1 και την πολυακόρεστη λιπαρή αλυσίδα του λινελαϊκού στην sn-2 θέση, και δ) το ακόρεστο φωσφολιπίδιο 1,2-διελαϊκούϋλο-sn-γλυκερο-3-φωσφοχολίνη (1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine, **DOPC**) το οποίο φέρει τη μονοακόρεστη λιπαρή αλυσίδα του ελαϊκού στην sn-1 και στην sn-2 θέση. Τα φωσφολιπίδια αυτά επελέγησαν καθώς η αλυσίδα παλμιτικού που περιέχεται και στην sn-1 και στην sn-2 θέση της DPPC και στην sn-1 θέση της PAPC και της PLPC αποτελεί την κυριότερη κεκορεσμένη λιπαρή αλυσίδα της LDL, η αλυσίδα ελαϊκού που περιέχεται στην sn-1 και στην sn-2 θέση της DOPC την κυριότερη μονοακόρεστη λιπαρή αλυσίδα της LDL και οι αλυσίδες του λινελαϊκού και του αραχιδονικού τις κυριότερες πολυακόρεστες λιπαρές αλυσίδες της LDL (βλέπε II.2.3.1. Φυσική LDL). Χρησιμοποιήθηκαν επίσης τα λυσο παράγωγα α) της PAPC και της PLPC (**lysoPAPC**) *, 1-παλμιτούλο-sn-γλυκερο-3-φωσφοχολίνη (1-palmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine) το οποίο διατηρεί την κεκορεσμένη λιπαρή αλυσίδα του παλμιτικού στην sn-1 θέση ενώ η πολυακόρεστη λιπαρή αλυσίδα του αραχιδονικού ή του λινελαϊκού στην sn-2 θέση έχει αντικατασταθεί από -OH, και β) της DOPC, 1-ελαϊκούϋλο-sn-γλυκερο-3-φωσφοχολίνη (1-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine, **lysoDOPC**) το οποίο διατηρεί τη μονοακόρεστη λιπαρή αλυσίδα του ελαϊκού στην sn-1 θέση ενώ η μονοακόρεστη λιπαρή αλυσίδα του ελαϊκού στην sn-2 θέση έχει αντικατασταθεί από -OH. Ως οξειδωμένα φωσφολιπίδια χρησιμοποιήθηκαν α) **oxPAPC**, β) **oxPLPC**, γ) **oxDOPC**, και δ) **oxlysoDOPC** που προέκυψαν μετά από οξείδωση παρουσία 5μM CuSO₄ για 24 h των PAPC, PLPC, DOPC και lysoDOPC αντίστοιχα.

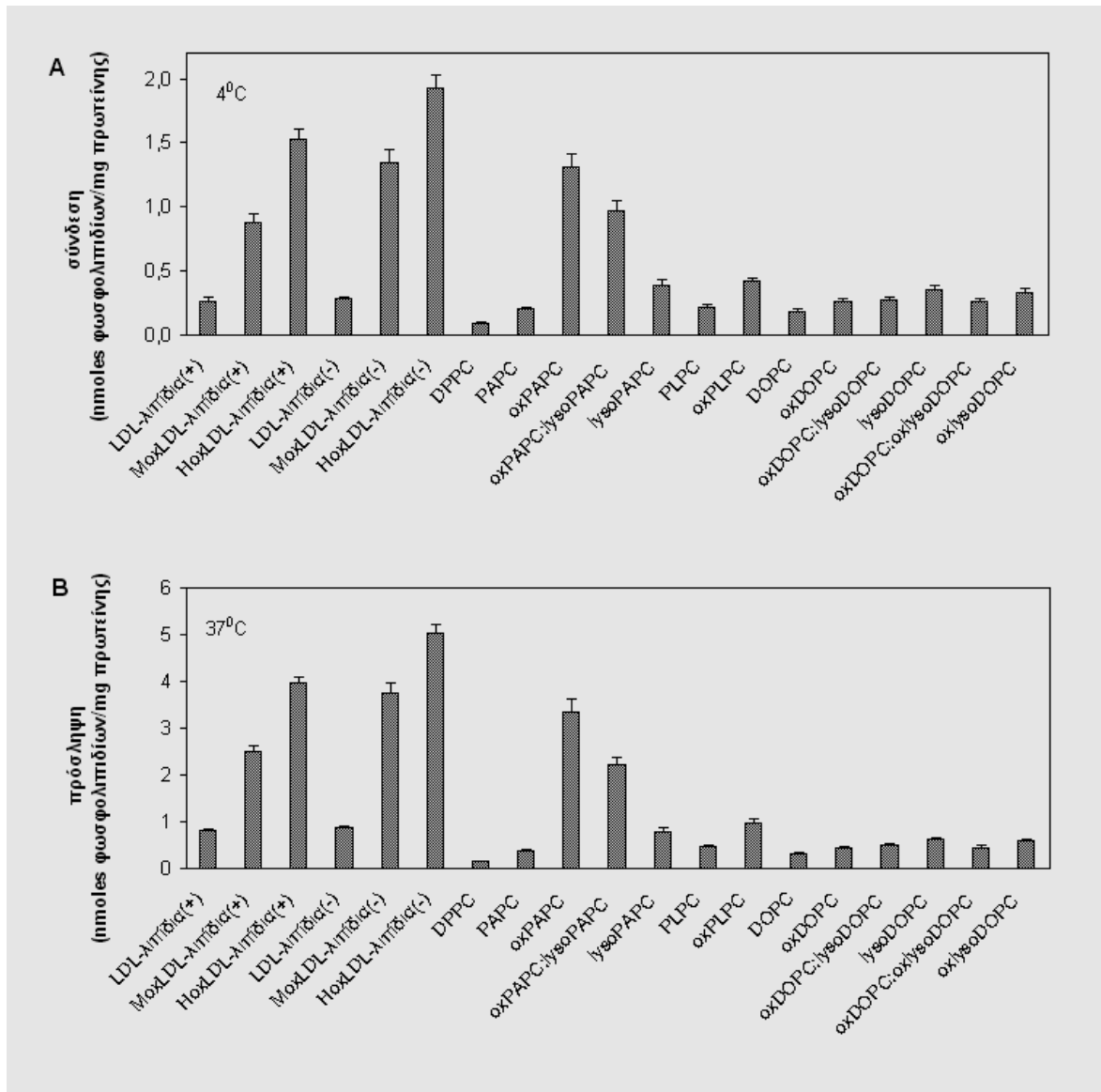
* Θα πρέπει να υπογραμμισθεί ότι η PAPC και η PLPC έχουν ως κοινό λυσο-παράγωγο την 1-παλμιτούλο-sn-γλυκερο-3-φωσφοχολίνη (1-palmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine) η οποία διατηρεί την κεκορεσμένη λιπαρή αλυσίδα του παλμιτικού στην sn-1 θέση ενώ η πολυακόρεστη λιπαρή αλυσίδα του αραχιδονικού ή του λινελαϊκού στην sn-2 θέση έχει αντικατασταθεί από -OH. Για λόγους ευκολίας της παρουσίασης των αποτελεσμάτων χρησιμοποιείται μόνον η συντομογραφία lysoPAPC.

Στα λιποσώματα που περιείχαν ακόρεστα φωσφολιπίδια ή οξειδωμένα ή λυσο παράγωγά τους ή συνδυασμούς τους, τα φωσφολιπίδια αυτά αποτελούσαν τα 3/10 της συνολικής ποσότητας φωσφολιπιδίων (μοριακή αναλογία) ενώ το υπόλοιπο μέρος συμπληρώθηκε με DPPC. Η αναλογία αυτή τηρήθηκε καθώς η DPPC δεν έχει την ικανότητα σύνδεσης σε υποδοχείς, όπως θα αναφερθεί παρακάτω, και καθώς προσομοιώνει αδρά τη συμμετοχή των διαφόρων μορίων PC με ακόρεστες αλυσίδες στην sn-2 θέση, στο σύνολο της PC (βλέπε II.2.3.1. Φυσική LDL). Η σύνθεση των λιποσωμάτων παρουσιάζεται στον **Πίνακα III.15**. Το DPPC-λιπόσωμα περιέχει στο φωσφολιπιδικό τμήμα του αποκλειστικά το κεκορεσμένο φωσφολιπίδιο DPPC, ενώ σε όλες τις υπόλοιπες παρασκευές λιποσωμάτων μέρος του DPPC αντικαθίσταται από ακόρεστο φωσφολιπίδιο οξειδωμένο ή μη ή το λυσο-παράγωγό του ή συνδυασμό του οξειδωμένου ακόρεστου φωσφολιπιδίου με το λυσο-παράγωγό του. Επίσης χρησιμοποιήθηκαν λιποσώματα που περιείχαν οξειδωμένη lysoDOPC καθώς η lysoDOPC περιέχει στην sn-1 θέση αλυσίδα με ακόρεστο λιπαρό οξύ (ελαϊκό) το οποίο δύναται να οξειδωθεί και επομένως δυνητικά να τροποποιηθεί η ικανότητα σύνδεσης με υποδοχείς σε αντίθεση με τη lysoPAPC η οποία περιέχει στην sn-1 θέση αλυσίδα με κεκορεσμένο λιπαρό οξύ (παλμιτικό) το οποίο δεν δύναται να οξειδωθεί. Επίσης χρησιμοποιήθηκαν συγκριτικά σημασμένα με [^{14}C]DPPC λιποσώματα από λιπίδια LDL(+ ή -), MoxLDL(+ ή -) και HoxLDL(+ ή -). Εξετάστηκε η σύνδεση και η πρόσληψη των λιποσωμάτων σε καλλιέργεια μακροφάγων με επώαση για 4h στους 4⁰ και 37⁰C αντίστοιχα. Τα λιποσώματα επώαστηκαν σε τελική συγκέντρωση 10 nmoles φωσφολιπιδίων/mL. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στην **Εικόνα III.9** και στον **Πίνακα III.16**. Η σύνδεση ή η πρόσληψη των λιποσωμάτων εκφράζεται σε nmoles φωσφολιπιδίων/mg κυτταρικής πρωτεΐνης. Οι τιμές σύνδεσης και πρόσληψης αποτελούν τους μέσους όρους τριπλών προσδιορισμών από ένα σύνολο τριών ξεχωριστών πειραμάτων.

Πίνακας III.15. Παρασκευή λιποσωμάτων που περιέχουν κεκορεσμένα (DPPC) ή ακόρεστα (PAPC, PLPC, DOPC) φωσφολιπίδια ή τα οξειδωμένα και λυσο παράγωγά τους

Συντομογραφίες λιποσωμάτων	Παρασκευή λιποσωμάτων (μοριακή αναλογία)			
DPPC	CHOL 5	DPPC 10		
PAPC	CHOL 5	DPPC 7	PAPC 3	
oxPAPC	CHOL 5	DPPC 7	oxPAPC 3	
oxPAPC:lysoPAPC	CHOL 5	DPPC 7	oxPAPC 1,5	lysoPAPC 1,5
lysoPAPC	CHOL 5	DPPC 7	lysoPAPC 3	
PLPC	CHOL 5	DPPC 7	PLPC 3	
oxPLPC	CHOL 5	DPPC 7	oxPLPC 3	
DOPC	CHOL 5	DPPC 7	DOPC 3	
oxDOPC	CHOL 5	DPPC 7	oxDOPC 3	
oxDOPC:lysoDOPC	CHOL 5	DPPC 7	oxDOPC 1,5	lysoDOPC 1,5
lysoDOPC	CHOL 5	DPPC 7	lysoDOPC 3	
oxDOPC:oxlysoDOPC	CHOL 5	DPPC 7	oxDOPC 1,5	oxlysoDOPC 1,5
oxlysoDOPC	CHOL 5	DPPC 7	oxlysoDOPC 3	

CHOL, χοληστερόλη, DPPC, 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine; PAPC, 2-arachidonoyl-1-palmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine; oxPAPC, PAPC οξειδωμένη για 24h; lysoPAPC, το λυσο παράγωγο της PAPC, 1-palmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine; PLPC, 2-linoleoyl-1-palmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine; oxPLPC, PLPC οξειδωμένη για 24h; DOPC, 1,2-dioleoyl-sn glycero-3-phosphocholine; oxDOPC, DOPC οξειδωμένη για 24h; lysoDOPC, το λυσο παράγωγο της DOPC, 1-oleoyl-sn-glycero-phosphocholine; oxlysoDOPC, lysoDOPC οξειδωμένη για 24h



Εικόνα 3.9. Σύνδεση (A) και πρόσληψη (B) σημασμένων με [¹⁴C]DPPC λιποσωμάτων που περιέχουν κεκορεσμένα (DPPC) ή ακόρεστα (PAPC, PLPC, DOPC) φωσφολιπίδια ή τα οξειδωμένα και λυσο-παράγωγά τους συγκριτικά με λιποσώματα από λιπίδια LDL(+ ή -), MoxLDL(+ ή -) και HoxLDL(+ ή -). Τα λιποσώματα επώαστηκαν σε τελική συγκέντρωση 10 nmoles φωσφολιπιδίων/mL στους 4°C ή στους 37°C για 4h με καλλιέργεια μακροφάγων. Οι τιμές σύνδεσης και πρόσληψης αποτελούν τους μέσους όρους ± SE τριπλών προσδιορισμών από ένα σύνολο τριών ξεχωριστών πειραμάτων.

LDL(+) λιπίδια		Πίνακας III.16. Πρόσληψη - σύνδεση λιποσωμάτων που περιέχουν κεκορεσμένα ή ακόρεστα φωσφολιπίδια ή τα οξειδωμένα και λυσο παράγωγά τους σε καλλιέργεια μακροφάγων.																
		Σύνδεση (4°C)																
LDL(+) λιπίδια		MoxLDL(+) λιπίδια	HoxLDL(+) λιπίδια	LDL(-) λιπίδια	MoxLDL(-) λιπίδια	HoxLDL(-) λιπίδια	DPPC	PAPC	oxPAPC	lysoPAPC	oxPAPC: lysoPAPC	PLPC	oxPLPC	DOPC	oxDOPC	lysoDOPC	oxDOPC: lysoDOPC	oxlysoDOPC
0,260 ± 0,077	0,875 ± 0,155	1,530 ± 0,172	0,280 ± 0,049	1,345 ± 0,247	1,925 ± 0,228	0,095 ± 0,014	0,206 ± 0,029	1,307 ± 0,250	0,390 ± 0,177	0,368 ± 0,091	0,221 ± 0,043	0,418 ± 0,074	0,186 ± 0,033	0,260 ± 0,055	0,273 ± 0,054	0,350 ± 0,080	0,264 ± 0,058	0,334 ± 0,071
LDL(+) λιπίδια		Πρόσληψη (37°C)																
LDL(+) λιπίδια		MoxLDL(+) λιπίδια	HoxLDL(+) λιπίδια	LDL(-) λιπίδια	MoxLDL(-) λιπίδια	HoxLDL(-) λιπίδια	DPPC	PAPC	oxPAPC	lysoPAPC	oxPAPC: lysoPAPC	PLPC	oxPLPC	DOPC	oxDOPC	lysoDOPC	oxDOPC: lysoDOPC	oxlysoDOPC
0,803 ± 0,094	2,488 ± 0,323	3,957 ± 0,346	0,864 ± 0,106	3,738 ± 0,560	5,033 ± 0,451	0,152 ± 0,028	0,374 ± 0,087	3,354 ± 0,594	0,775 ± 0,200	2,209 ± 0,380	0,458 ± 0,099	0,973 ± 0,192	0,317 ± 0,049	0,432 ± 0,082	0,492 ± 0,095	0,611 ± 0,126	0,447 ± 0,093	0,578 ± 0,119

Τα λιποσώματα επωάστηκαν σε τελική συγκέντρωση 10 nmoles φωσφολιπίδιων / ml για 4h με καλλιέργεια μακροφάγων. Η σύνδεση ή η πρόσληψη των λιποσωμάτων εκφράζεται σε nmoles φωσφολιπίδιων ανά mg κυτταρικής πρωτεΐνης. Οι τιμές αποτελούν τους μέσους όρους ± τα κατά 85% όρια αξιοπιστίας από τριπλούς προσδιορισμούς από ένα σύνολο τριών ξεχωριστών πειραμάτων.

Τα διαγράμματα σύνδεσης και πρόσληψης ήταν ποιοτικά ομοιόμορφα παρουσιάζοντας παρόμοιες αναλογίες σύνδεσης και πρόσληψης μεταξύ των διαφόρων παρασκευών λιποσωμάτων. Τα λιποσώματα που περιείχαν oxPAPC παρουσίασαν τις υψηλότερες τιμές σύνδεσης και πρόσληψης ενώ ακολούθησαν τα oxPLPC-λιποσώματα και τα lysoPAPC-λιποσώματα. Η σύνδεση και η πρόσληψη των oxPAPC-λιποσωμάτων συγκρινόμενες με αυτές των PAPC-λιποσωμάτων ήταν 6,3 και 9 φορές μεγαλύτερες αντίστοιχα ($p < 0,001$ και $p < 0,001$ αντίστοιχα). Οι τιμές σύνδεσης και πρόσληψης των oxPAPC-λιποσωμάτων έφθασαν στο 68% και 66% αντίστοιχα αυτών των λιποσωμάτων από HoxLDL(-) λιπίδια αντίστοιχα. Η χρησιμοποίηση oxPAPC:lysoPAPC-λιποσωμάτων, στα οποία το μισό της ποσότητας της oxPAPC είχε αντικατασταθεί από lysoPAPC προσομοιώνοντας το αποτέλεσμα υδρόλυσης της μισής ποσότητας της oxPAPC σε lysoPAPC, οδήγησε σε διατήρηση υψηλών τιμών σύνδεσης και πρόσληψης που έφθασαν στο 74% και στο 66% των αντίστοιχων τιμών των oxPAPC-λιποσωμάτων. Η σύνδεση και η πρόσληψη των lysoPAPC-λιποσωμάτων, στα οποία το σύνολο της ποσότητας της oxPAPC είχε αντικατασταθεί από lysoPAPC προσομοιώνοντας το αποτέλεσμα της πλήρους υδρόλυσης oxPAPC, ήταν ακόμη μικρότερη φθάνοντας στο 30% και στο 23% των αντίστοιχων τιμών των oxPAPC-λιποσωμάτων. Η σύνδεση και η πρόσληψη των lysoPAPC-λιποσωμάτων συγκρινόμενες με αυτές των PAPC-λιποσωμάτων ήταν αντίστοιχα 1,9 και 2,1 φορές μεγαλύτερες ($p < 0,001$ και $p < 0,001$ αντίστοιχα). Οι τιμές σύνδεσης και πρόσληψης των oxPLPC-λιποσωμάτων ήταν αυξημένες σε σχέση με αυτές των PLPC-λιποσωμάτων κατά 1,9 και 2,1 φορές ($p < 0,001$ και $p < 0,001$ αντίστοιχα) ενώ ήταν σημαντικά μικρότερες σε σχέση με τις τιμές σύνδεσης και πρόσληψης των oxPAPC-λιποσωμάτων φθάνοντας στο 32% και στο 29% αυτών αντίστοιχα.

Όσον αφορά στην ομάδα λιποσωμάτων που περιείχαν DOPC ή παράγωγά της εκτιμήθηκε η σύνδεση και η πρόσληψη DOPC-λιποσωμάτων που περιείχαν ανοξειδωτή DOPC, oxDOPC-λιποσωμάτων στα οποία η ανοξειδωτή DOPC αντικαταστάθηκε από oxDOPC, oxDOPC:lysoDOPC-λιποσωμάτων και oxDOPC:oxlysoDOPC-λιποσωμάτων στα οποία το μισό της ποσότητας της oxDOPC είχε αντικατασταθεί από lysoDOPC ή oxlysoDOPC αντίστοιχα, και lysoDOPC-λιποσωμάτων και oxlysoDOPC-λιποσωμάτων τα οποία είχαν μόνο lysoDOPC και oxlysoDOPC αντίστοιχα ως συστατικό του τμήματος του λιποσώματος που περιελάμβανε ακόρεστο ή οξειδωμένο φωσφολιπίδιο ή λυσο-παράγωγό του. Η χρησιμοποίηση των lysoDOPC-λιποσωμάτων και oxlysoDOPC-λιποσωμάτων κρίθηκε απαραίτητη καθώς η lysoDOPC διαθέτει στην sn-1 θέση ακόρεστη αλυσίδα ελαϊκού η οποία δύναται να οξειδωθεί γεγονός που θα μπορούσε να μεταβάλλει τη σύνδεση του

μορίου με τους υποδοχείς των μακροφάγων. Η χρησιμοποίηση oxDOPC οδήγησε σε μικρότερες αυξήσεις στη σύνδεση και στην πρόσληψη σε σύγκριση με τη μη οξειδωμένη DOPC ενώ μεγαλύτερες αυξήσεις παρατηρήθηκαν με τη χρησιμοποίηση lysoDOPC και oxlysoDOPC. Συγκεκριμένα, τα λιποσώματα oxDOPC, oxDOPC:lysoDOPC, lysoDOPC, oxDOPC:oxlysoDOPC και oxlysoDOPC παρουσίασαν σε σύγκριση με τα DOPC-λιποσώματα σύνδεση αυξημένη κατά 40% ($p = 0,016$), 47% ($p = 0,006$), 57% ($p = 0,004$), 42% ($p = 0,014$) και 47% ($p = 0,007$) αντίστοιχα. Οι αντίστοιχες αυξήσεις όσον αφορά στην πρόσληψη ήταν 36% ($p = 0,014$), 55% ($p = 0,002$), 92% ($p < 0,001$), 41% ($p = 0,011$) και 82% ($p < 0,001$) αντίστοιχα. Η χρησιμοποίηση των lysoDOPC και oxlysoDOPC λιποσωμάτων παρουσίασε τις υψηλότερες τιμές σύνδεσης και πρόσληψης στην ομάδα αυτή των λιποσωμάτων. Οι τιμές σύνδεσης των lysoDOPC και oxlysoDOPC λιποσωμάτων έφθασαν στο 22% και στο 21% των αντίστοιχων τιμών των oxPAPC-λιποσωμάτων. Οι αντίστοιχες τιμές όσον αφορά στην πρόσληψη ήταν 18% και 17%. Η πρόσληψη lysoDOPC και oxlysoDOPC λιποσωμάτων συγκρινόμενη με αυτή των oxDOPC λιποσωμάτων ήταν μεγαλύτερη κατά 41% ($p = 0,014$) και 34% ($p = 0,033$) αντίστοιχα. Όσον αφορά στη σύνδεση οι αντίστοιχες αυξήσεις ήταν 35% για τα lysoDOPC-λιποσώματα, διαφορά η οποία ήταν οριακά στατιστικά σημαντική ($p = 0,047$), και 28% για τα oxlysoDOPC-λιποσώματα, διαφορά η οποία δεν ήταν στατιστικά σημαντική ($p = 0,076$). Μεταξύ lysoDOPC και oxlysoDOPC λιποσωμάτων δεν υπήρξαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στη σύνδεση ή στη πρόσληψη.

Συμπερασματικά, η χρησιμοποίηση οξειδωμένων ακόρεστων φωσφολιπιδίων (oxPAPC, oxPLPC, oxDOPC) ή λυσο-παραγώγων τους (lysoPAPC, lysoDOPC, oxlysoDOPC) οδήγησε σε αύξηση της σύνδεσης και της πρόσληψης των λιποσωμάτων συγκριτικά με τα λιποσώματα που περιέχουν αποκλειστικά τα αντίστοιχα μη οξειδωμένα φωσφολιπίδια (PAPC, PLPC, DOPC) ή τα λιποσώματα που περιέχουν αποκλειστικά κεκορεσμένα φωσφολιπίδια (DPPC). Η oxPAPC ανέδειξε ιδιαίτερα υψηλές τιμές σύνδεσης και πρόσληψης ενώ ακολούθησαν η oxPLPC και τα λυσο-παραγώγα αναδεικνύοντας όμως σημαντικά μικρότερη ικανότητα σύνδεσης και πρόσληψης σε σχέση με την oxPAPC. Τα lysoDOPC και oxlysoDOPC λιποσώματα παρουσίασαν ελαφρώς μεγαλύτερες τιμές σύνδεσης και πρόσληψης σε σχέση με τα oxDOPC λιποσώματα καταδεικνύοντας ότι η λυσομορφή πιθανώς είναι σημαντικότερος παράγοντας σύνδεσης – πρόσληψης από ότι η παρουσία παραγώγου οξείδωσης ελαϊκού στην sn-1 και sn-2 θέση. Η μη ύπαρξη διαφοράς στις τιμές σύνδεσης – πρόσληψης μεταξύ lysoDOPC και oxlysoDOPC λιποσωμάτων

καταδεικνύει ότι η οξειδωση του ελαϊκού στην sn-1 θέση δεν επηρεάζει τη σύνδεση – πρόσληψη των λιποσωμάτων.

III.2.12. ΜΕΛΕΤΗ ΣΥΝΔΕΣΗΣ – ΠΡΟΣΛΗΨΗΣ oxPAPC, oxPLPC ΚΑΙ lysoPAPC ΛΙΠΟΣΩΜΑΤΩΝ ΠΑΡΟΥΣΙΑ ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΩΝ

Η σύνδεση – πρόσληψη των oxPAPC, oxPLPC και lysoPAPC λιποσωμάτων εξετάστηκε περαιτέρω σε πειράματα με την παρουσία ανταγωνιστών. Εξετάστηκε η ικανότητα δοσοεξαρτώμενης αναστολής της σύνδεσης – πρόσληψης από όμοια αλλά μη σημασμένη παρασκευή λιποσωμάτων, στοιχείο που καταδεικνύει οδό πρόσληψης μέσω υποδοχέων. Επίσης εξετάστηκε η ικανότητα αναστολής της σύνδεσης – πρόσληψης με τη χρησιμοποίηση ως ανταγωνιστών φυσικών ή οξειδωμένων LDL ή λιποσωμάτων από τα λιπίδια φυσικών ή οξειδωμένων LDL προκειμένου να διαπιστωθεί η ύπαρξη κοινών οδών πρόσληψης μέσω υποδοχέων.

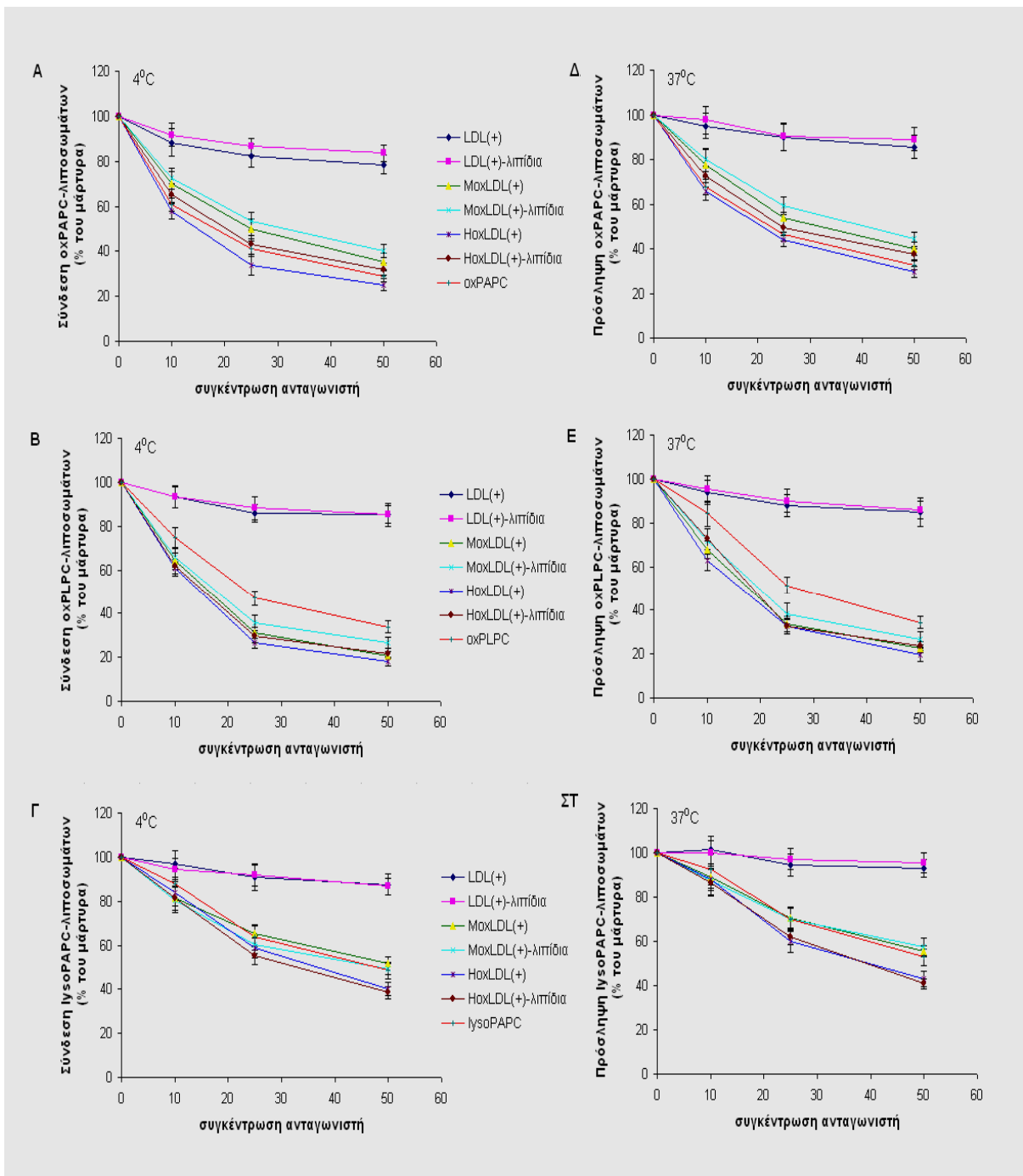
Εξετάστηκε η σύνδεση και η πρόσληψη oxPAPC, oxPLPC και lysoPAPC λιποσωμάτων σημασμένων με [¹⁴C]DPPC παρουσία μη σημασμένων ανταγωνιστών. Τα σημασμένα λιποσώματα επωάστηκαν με καλλιέργεια μακροφάγων σε συγκέντρωση 5 nmoles/mL με ή χωρίς την παρουσία μη σημασμένων ανταγωνιστών. Για κάθε παρασκευή σημασμένων λιποσωμάτων χρησιμοποιήθηκαν ως ανταγωνιστές α) όμοια αλλά μη σημασμένη παρασκευή λιποσωμάτων σε συγκεντρώσεις 10, 25, και 50 nmoles φωσφολιπιδίων/mL β) LDL(+), MoxLDL(+), HoxLDL(+) σε συγκεντρώσεις 10, 25, και 50 μg πρωτεΐνης/mL και γ) λιποσώματα από λιπίδια LDL(+), λιποσώματα από λιπίδια MoxLDL(+) και λιποσώματα από λιπίδια HoxLDL(+) σε συγκεντρώσεις 10, 25, και 50 nmoles φωσφολιπιδίων/mL. Τα αποτελέσματα προέκυψαν από τριπλούς προσδιορισμούς από ένα σύνολο τριών ξεχωριστών πειραμάτων και παρουσιάζονται στην **Εικόνα III.10** και στους **Πίνακες III.17-19**. Η σύνδεση και η πρόσληψη εκφράζεται ως % ποσοστό αυτής χωρίς την παρουσία ανταγωνιστή (μάρτυρας), η οποία λαμβάνεται ως 100%.

Οι καμπύλες σύνδεσης καθενός από τα σημασμένα λιποσώματα ήταν παρόμοιες με τις καμπύλες πρόσληψης του ίδιου λιποσώματος. Η χρησιμοποίηση όμοιας αλλά μη σημασμένης παρασκευής λιποσωμάτων οδήγησε σε όλες τις περιπτώσεις σε δοσοεξαρτώμενη μείωση της σύνδεσης και της πρόσληψης. Συγκεκριμένα στη μέγιστη συγκέντρωση ανταγωνιστή οι τιμές σύνδεσης και πρόσληψης μειώθηκαν αντίστοιχα σε 29,0% και 34,5% όσον αφορά στα oxPAPC-λιποσώματα, σε 33,8% και 34,3% αντίστοιχα όσον αφορά στα oxPLPC-λιποσώματα ενώ μικρότερη αναστολή παρατηρήθηκε στην

περίπτωση των lysoPAPC-λιποσωμάτων όπου η σύνδεση και η πρόσληψη μειώθηκαν σε 48,5% και 52,8% αντίστοιχα. Η χρησιμοποίηση LDL(+) και λιποσωμάτων από λιπίδια LDL(+) δεν οδήγησε σε αξιόλογη αναστολή της σύνδεσης ή της πρόσληψης οποιασδήποτε από τις τρεις παρασκευές λιποσωμάτων. Αντιθέτως, και στις τρεις παρασκευές λιποσωμάτων παρατηρήθηκε δόσοεξαρτώμενη αναστολή της σύνδεσης και της πρόσληψης όταν επώαστηκαν με MoxLDL(+) ή HoxLDL(+) είτε με λιποσώματα από λιπίδια MoxLDL(+) ή λιποσώματα από λιπίδια HoxLDL(+). Η αναστολή ήταν μικρότερη στην περίπτωση των lysoPAPC-λιποσωμάτων. Η μεγαλύτερη αναστολή παρατηρήθηκε με τη χρησιμοποίηση ως ανταγωνιστή HoxLDL(+) ή λιποσωμάτων από λιπίδια HoxLDL(+). Ενδεικτικά, στη μέγιστη συγκέντρωση HoxLDL(+) οι τιμές σύνδεσης και πρόσληψης των oxPAPC-λιποσωμάτων μειώθηκαν αντίστοιχα σε 25,2%, και 29,5%, αυτές των oxPLPC-λιποσωμάτων σε 18,1% και 19,5% αντίστοιχα, ενώ μικρότερη αναστολή παρατηρήθηκε στην περίπτωση των lysoPAPC-λιποσωμάτων όπου η σύνδεση και η πρόσληψη μειώθηκαν σε 42,9% και 40,0% αντίστοιχα.

Συμπερασματικά, τα αποτελέσματα από αυτή την ομάδα πειραμάτων είναι ενδεικτικά σύνδεσης – πρόσληψης των oxPAPC, oxPLPC και lysoPAPC λιποσωμάτων μέσω υποδοχέων καθώς και του ότι αυτά μοιράζονται κοινούς υποδοχείς για τη σύνδεση και την πρόσληψή τους από τα μακροφάγα με τις οξειδωμένες LDL καθώς και με τα λιποσώματα από τα λιπίδια των οξειδωμένων LDL.

Εικόνα III.10. Σύνδεση - πρόσληψη σημασμένων με [¹⁴C]DPPC oxPAPAC, oxPLPC και lysoPAPC λιποσωμάτων παρουσία μη σημασμένων ανταγωνιστών. Σημασμένα με [¹⁴C]DPPC oxPAPC-λιποσώματα (A, Δ), oxPLPC λιποσώματα (B, E) και lysoPAPC λιποσωμάτων (Γ, ΣΤ) επώαστηκαν σε συγκέντρωση 5 nmoles φωσφολιπιδίων/ml για 4h στους 4⁰C ή στους 37⁰C με καλλιέργεια μακροφάγων με ή χωρίς την παρουσία μη σημασμένων ανταγωνιστών. Ως ανταγωνιστές χρησιμοποιήθηκαν LDL(+), MoxLDL(+), HoxLDL(+) σε συγκεντρώσεις 10, 25, και 50 μg πρωτεΐνης/mL καθώς και λιποσώματα από λιπίδια LDL(+) [LDL(+)-λιπίδια], λιποσώματα από λιπίδια MoxLDL(+) [MoxLDL(+)-λιπίδια] και λιποσώματα από λιπίδια HoxLDL(+) [HoxLDL(+)-λιπίδια] σε συγκεντρώσεις 10, 25, και 50 nmoles φωσφολιπιδίων/mL. Επίσης εκτιμήθηκε η πρόσληψη – σύνδεση παρουσία όμοιας αλλά μη σημασμένης παρασκευής λιποσωμάτων σε συγκεντρώσεις 10, 25, και 50 nmoles φωσφολιπιδίων/mL. Οι τιμές αποτελούν τους μέσους όρους ± SE τριπλών προσδιορισμών από ένα σύνολο τριών ξεχωριστών πειραμάτων. Η πρόσληψη ή η σύνδεση εκφράζεται ως % ποσοστό αυτής χωρίς την παρουσία ανταγωνιστή η οποία λαμβάνεται ως 100%.



Πίνακας III.17. Σύνδεση - πρόσληψη oxPAPC-λιποσωμάτων σημασμένων με [¹⁴ C]DPPC παρουσία μη σημασμένων ανταγωνιστών								
ανταγωνιστής	Σύνδεση oxPAPC-λιποσωμάτων (4°C) (% του μάρτυρα ± 95% όρια αξιοπιστίας)				Πρόσληψη oxPAPC-λιποσωμάτων (37°C) (% του μάρτυρα ± 95% όρια αξιοπιστίας)			
	συγκέντρωση ανταγωνιστή				συγκέντρωση ανταγωνιστή			
	0	10	25	50	0	10	25	50
LDL(+) (μg/ml)	100,00+/- 11,67	88,25+/- 14,01	82,44+/- 11,80	78,51+/- 9,77	100,00+/- 12,45	94,89+/- 12,97	89,78+/- 13,83	85,64+/- 12,38
LDL(+)-Λιπίδια (nmoles/ml)		91,78+/- 11,79	86,57+/- 8,69	83,68+/- 8,35		97,61+/- 14,07	90,12+/- 14,46	89,08+/- 11,59
MoxLDL(+) (μg/ml)		69,92+/- 12,67	50,08+/- 10,37	35,31+/- 8,69		77,46+/- 16,28	53,72+/- 6,25	40,17+/- 6,93
MoxLDL(+)-Λιπίδια (nmoles/ml)		72,29+/- 11,04	53,45+/- 8,72	40,09+/- 6,60		79,98+/- 12,00	59,26+/- 9,48	44,20+/- 7,18
HoxLDL(+) (μg/ml)		58,81+/- 8,07	34,04+/- 10,42	25,19+/- 6,07		65,64+/- 9,52	44,04+/- 7,31	29,51+/- 5,60
HoxLDL(+)-Λιπίδια (nmoles/ml)		65,26+/- 10,14	43,20+/- 7,15	32,01+/- 5,92		72,51+/- 11,02	49,48+/- 7,77	37,69+/- 5,68
oxPAPC (nmoles/ml)		60,71+/- 7,21	41,20+/- 8,21	29,01+/- 6,21		67,67+/- 7,83	46,36+/- 6,41	32,54+/- 4,24

Σημασμένα με [¹⁴C]DPPC oxPAPC-λιποσώματα επώαστηκαν σε συγκέντρωση 5 nmoles φωσφολιπιδίων/ml για 4h στους 4 ή στους 37°C με καλλιέργεια μακροφάγων με ή χωρίς την παρουσία μη σημασμένων ανταγωνιστών. Ως ανταγωνιστές χρησιμοποιήθηκαν **LDL(+)**, **MoxLDL(+)**, **HoxLDL(+)**, λιποσώματα από λιπίδια LDL(+)**[LDL(+)-Λιπίδια]**, λιποσώματα από λιπίδια MoxLDL(+)**[MoxLDL(+)-Λιπίδια]**, λιποσώματα από λιπίδια HoxLDL(+)**[HoxLDL(+)-Λιπίδια]** καθώς και μη σημασμένα oxPAPC-λιποσώματα (**oxPAPC**). Οι συγκεντρώσεις στις οποίες χρησιμοποιήθηκαν οι ανταγωνιστές ήταν 10, 25, και 50 μg πρωτεΐνης /ml όσον αφορά στις λιποπρωτεΐνες και 10, 25, και 50 nmoles φωσφολιπιδίων/ml όσον αφορά στα λιποσώματα. Οι τιμές πρόσληψης και σύνδεσης αποτελούν τους μέσους όρους ± τα κατά 95% όρια αξιοπιστίας τριπλών προσδιορισμών από ένα σύνολο τριών ξεχωριστών πειραμάτων. Η σύνδεση ή η πρόσληψη των oxPAPC-λιποσωμάτων εκφράζεται ως % ποσοστό αυτής χωρίς την παρουσία ανταγωνιστή (μάρτυρας) η οποία λαμβάνεται ως 100%.

Πίνακας III.18. Σύνδεση - πρόσληψη oxPLPC-λιποσωμάτων σημασμένων με [¹⁴ C]DPPC παρουσία μη σημασμένων ανταγωνιστών								
ανταγωνιστής	Σύνδεση oxPLPC-λιποσωμάτων (4°C) (% του μάρτυρα ± 95% όρια αξιοπιστίας)				Πρόσληψη oxPLPC-λιποσωμάτων (37°C) (% του μάρτυρα ± 95% όρια αξιοπιστίας)			
	συγκέντρωση ανταγωνιστή				συγκέντρωση ανταγωνιστή			
	0	10	25	50	0	10	25	50
LDL(+) (μg/ml)	100,00+/- 10,19	93,14+/- 10,52	85,93+/- 9,08	85,20+/- 12,22	100,00+/- 11,04	94,02+/- 12,97	87,68+/- 11,52	84,86+/- 14,69
LDL(+)-Λιπίδια (nmoles/ml)		96,64+/- 11,60	88,24+/- 12,02	85,40+/- 9,17		95,55+/- 14,07	90,04+/- 12,15	86,08+/- 9,28
MoxLDL(+) (μg/ml)		64,05+/- 8,70	31,30+/- 5,65	29,78+/- 4,30		67,80+/- 9,35	33,66+/- 8,56	22,34+/- 4,62
MoxLDL(+)-Λιπίδια (nmoles/ml)		65,54+/- 9,93	35,57+/- 8,01	26,72+/- 5,92		71,72+/- 13,16	38,25+/- 11,10	26,80+/- 8,10
HoxLDL(+) (μg/ml)		60,59+/- 7,39	26,43+/- 5,27	18,12+/- 5,02		63,00+/- 10,68	32,49+/- 8,00	19,49+/- 6,75
HoxLDL(+)-Λιπίδια (nmoles/ml)		61,60+/- 7,74	29,46+/- 6,38	21,82+/- 5,14		72,61+/- 10,80	32,75+/- 6,61	23,46+/- 4,53
oxPLPC (nmoles/ml)		74,84+/- 10,72	46,96+/- 7,88	33,77+/- 6,55		84,12+/- 13,84	51,34+/- 8,72	34,31+/- 6,55

Σημασμένα με [¹⁴C]DPPC oxPLPC-λιποσώματα επώαστηκαν σε συγκέντρωση 5 nmoles φωσφολιπιδίων/ml για 4h στους 4 ή στους 37°C με καλλιέργεια μακροφάγων με ή χωρίς την παρουσία μη σημασμένων ανταγωνιστών. Ως ανταγωνιστές χρησιμοποιήθηκαν **LDL(+)**, **MoxLDL(+)**, **HoxLDL(+)**, λιποσώματα από λιπίδια LDL(+)**[LDL(+)-Λιπίδια]**, λιποσώματα από λιπίδια MoxLDL(+)**[MoxLDL(+)-Λιπίδια]**, λιποσώματα από λιπίδια HoxLDL(+)**[HoxLDL(+)-Λιπίδια]** καθώς και μη σημασμένα oxPLPC-λιποσώματα (**oxPLPC**). Οι συγκεντρώσεις στις οποίες χρησιμοποιήθηκαν οι ανταγωνιστές ήταν 10, 25, και 50 μg πρωτεΐνης /ml όσον αφορά στις λιποπρωτεΐνες και 10, 25, και 50 nmoles φωσφολιπιδίων/ml όσον αφορά στα λιποσώματα. Οι τιμές σύνδεσης και πρόσληψης αποτελούν τους μέσους όρους ± τα κατά 95% όρια αξιοπιστίας τριπλών προσδιορισμών από ένα σύνολο τριών ξεχωριστών πειραμάτων. Η σύνδεση ή η πρόσληψη των oxPLPC-λιποσωμάτων εκφράζεται ως % ποσοστό αυτής χωρίς την παρουσία ανταγωνιστή (μάρτυρας) η οποία λαμβάνεται ως 100%.

Πίνακας III.19. Σύνδεση - πρόσληψη lysoPAPC-λιποσωμάτων σημασμένων με [¹⁴ C]DPPC παρουσία μη σημασμένων ανταγωνιστών								
	Σύνδεση lysoPAPC-λιποσωμάτων (4°C) (% του μάρτυρα ± 95% όρια αξιοπιστίας)				Πρόσληψη lysoPAPC-λιποσωμάτων (37°C) (% του μάρτυρα ± 95% όρια αξιοπιστίας)			
ανταγωνιστής	συγκέντρωση ανταγωνιστή				συγκέντρωση ανταγωνιστή			
	0	10	25	50	0	10	25	50
LDL(+) (μg/ml)	100,00± 12,08	96,74±/ 13,91	90,72±/ 13,28	87,54±/ 10,83	100,00± 13,54	101,30±/ 14,25	94,49±/ 11,25	92,81±/ 9,22
LDL(+)-Λιπίδια (nmoles/ml)		94,22±/ 11,80	92,03±/ 11,46	86,77±/ 8,75		99,76±/ 13,31	97,18±/ 11,09	95,34±/ 10,65
MoxLDL(+) (μg/ml)		81,19±/ 11,39	65,16±/ 8,13	51,89±/ 6,28		89,18±/ 11,46	70,35±/ 10,28	55,50±/ 5,52
MoxLDL(+)-Λιπίδια (nmoles/ml)		80,54±/ 13,03	60,42±/ 9,45	49,23±/ 5,47		87,49±/ 15,55	70,10±/ 12,31	57,45±/ 9,59
HoxLDL(+) (μg/ml)		83,80±/ 13,58	58,92±/ 10,56	40,00±/ 7,02		87,97±/ 11,06	59,91±/ 10,81	42,86±/ 8,02
HoxLDL(+)-Λιπίδια (nmoles/ml)		81,36±/ 12,66	55,08±/ 9,15	38,45±/ 5,96		86,4±/ 13,51	62,24±/ 9,15	40,88±/ 5,41
lysoPAPC (nmoles/ml)		87,63±/ 16,54	63,64±/ 13,24	48,52±/ 9,03		92,42±/ 16,52	70,17±/ 11,16	52,78±/ 8,85

Σημασμένα με [¹⁴C]DPPC lysoPAPC-λιποσώματα επωάστηκαν σε συγκέντρωση 5 nmoles φωσφολιπιδίων/ml για 4h στους 4 ή στους 37°C με καλλιέργεια μακροφάγων με ή χωρίς την παρουσία μη σημασμένων ανταγωνιστών. Ως ανταγωνιστές χρησιμοποιήθηκαν LDL(+), MoxLDL(+), HoxLDL(+), λιποσώματα από λιπίδια LDL(+), [LDL(+)-Λιπίδια], λιποσώματα από λιπίδια MoxLDL(+), [MoxLDL(+)-Λιπίδια], λιποσώματα από λιπίδια HoxLDL(+), [HoxLDL(+)-Λιπίδια] καθώς και μη σημασμένα lysoPAPC-λιποσώματα (lysoPAPC). Οι συγκεντρώσεις στις οποίες χρησιμοποιήθηκαν οι ανταγωνιστές ήταν 10, 25, και 50 μg πρωτεΐνης /ml όσον αφορά στις λιποπρωτεΐνες και 10, 25, και 50 nmoles φωσφολιπιδίων/ml όσον αφορά στα λιποσώματα. Οι τιμές σύνδεσης και πρόσληψης αποτελούν τους μέσους όρους ± τα κατά 95% όρια αξιοπιστίας τριπλών προσδιορισμών από ένα σύνολο τριών ξεχωριστών πειραμάτων. Η σύνδεση ή η πρόσληψη των lysoPAPC-λιποσωμάτων εκφράζεται ως % ποσοστό αυτής χωρίς την παρουσία ανταγωνιστή (μάρτυρας) η οποία λαμβάνεται ως 100%.

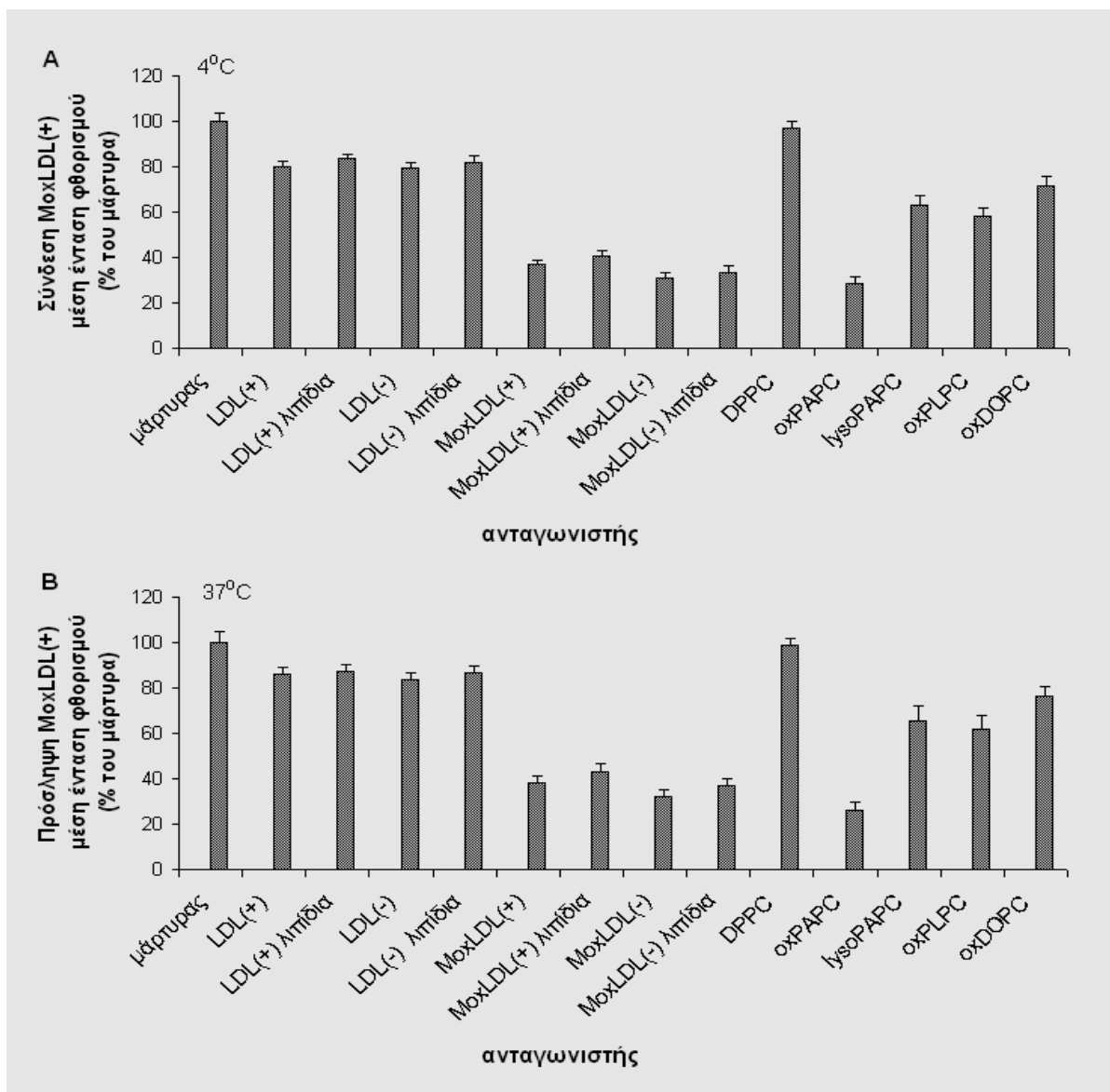
III.2.13. ΜΕΛΕΤΗ ΣΥΝΔΕΣΗΣ – ΠΡΟΣΛΗΨΗΣ MoxLDL(+) ΠΑΡΟΥΣΙΑ ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΩΝ

Στα πειράματα αυτά εκτιμήθηκε η σύνδεση και η πρόσληψη σημασμένων με FITC MoxLDL(+) παρουσία μη σημασμένων ανταγωνιστών. Η σημασμένη λιποπρωτεΐνη επωάστηκε με καλλιέργεια μακροφάγων σε συγκέντρωση 5 μg/mL με ή χωρίς την παρουσία μη σημασμένων ανταγωνιστών. Ως ανταγωνιστές χρησιμοποιήθηκαν α) LDL(+ ή -) και MoxLDL(+ ή -), β) λιποσώματα από λιπίδια LDL(+ ή -) και λιποσώματα από λιπίδια MoxLDL(+ ή -) και γ) DPPC, oxPAPC, lysoPAPC, oxPLPC και oxDOPC λιποσώματα. Οι συγκεντρώσεις στις οποίες χρησιμοποιήθηκαν οι ανταγωνιστές ήταν 50 μg πρωτεΐνης /mL όσον αφορά στις λιποπρωτεΐνες και 50 nmoles φωσφολιπιδίων/mL όσον αφορά στα λιποσώματα. Τα αποτελέσματα προέκυψαν από τριπλούς προσδιορισμούς από ένα σύνολο τριών ξεχωριστών πειραμάτων και παρουσιάζονται στην **Εικόνα III.11** και στον **Πίνακα III.20**. Η πρόσληψη ή η σύνδεση εκφράζεται ως % ποσοστό αυτής χωρίς την παρουσία ανταγωνιστή (μάρτυρας), η οποία λαμβάνεται ως 100%.

Η εικόνα των αποτελεσμάτων των πειραμάτων σύνδεσης ήταν παρόμοια αυτής των πειραμάτων πρόσληψης. Η ομάδα των LDL και των λιποσωμάτων από τα λιπίδιά τους δεν ανέδειξε αξιόλογη ικανότητα ανταγωνισμού σε αντίθεση με την ομάδα των MoxLDL και των λιποσωμάτων από τα λιπίδιά τους που αποδείχθηκαν ισχυροί ανταγωνιστές. Με τη χρησιμοποίηση των MoxLDL(-) η σύνδεση και η πρόσληψη μειώθηκαν σε 31,2% και σε 32,1% αντίστοιχα, ενώ οι αντίστοιχες τιμές με τη χρησιμοποίηση των λιποσωμάτων από τα λιπίδια των MoxLDL(-) ήταν 33,6% και 37,0%. Η MoxLDL(+) ως ανταγωνιστής οδήγησε σε μείωση της σύνδεσης και της πρόσληψης σε 36,8% και σε 38,1% αντίστοιχα ενώ τα λιποσώματα από τα λιπίδια των MoxLDL(+) μείωσαν τη σύνδεση σε 40,8% και την πρόσληψη σε 43,2%. Παρατηρείται μία τάση ισχυρότερου ανταγωνισμού από τη MoxLDL(-) και τα λιποσώματα από λιπίδια MoxLDL(-) σε σχέση με τη MoxLDL(+) και τα λιποσώματα από λιπίδια MoxLDL(+) αντίστοιχα, η οποία όμως δεν έφθασε σε επίπεδα στατιστικής σημαντικότητας.

Από την ομάδα των DPPC, oxPAPC, lysoPAPC, oxPLPC και oxDOPC λιποσωμάτων, τα oxPAPC-λιποσώματα αποτέλεσαν τον ισχυρότερο ανταγωνιστή προκαλώντας μείωση της σύνδεσης σε 28,6% και της πρόσληψης σε 25,9%. Τα oxPLPC και lysoPAPC λιποσώματα προκάλεσαν μικρότερες μειώσεις και ακόμη μικρότερες τα oxDOPC-λιποσώματα. Τα DPPC-λιποσώματα δεν είχαν καμία επίδραση στο βαθμό σύνδεσης ή πρόσληψης. Οι διαφορές όσον αφορά στη μείωση στη σύνδεση και στην πρόσληψη μεταξύ αυτής που σημειώθηκε στην περίπτωση των oxPAPC-λιποσωμάτων από τη μία πλευρά και αυτών που σημειώθηκαν από τα lysoPAPC, oxPLPC oxDOPC και DPPC λιποσώματα από την άλλη, ήταν σε όλες τις περιπτώσεις στατιστικά σημαντικές ($p < 0,0001\%$).

Συνοπτικά, τα αποτελέσματα αυτά καταδεικνύουν το λιπιδικό τμήμα των οξειδωμένων LDL να συνδέεται ισχυρά με τους υποδοχείς των μακροφάγων που είναι υπεύθυνοι για την πρόσληψη των oxLDL. Επίσης καταδεικνύεται περαιτέρω η ισχυρή ικανότητα σύνδεσης της oxPAPC με τους υποδοχείς αυτούς και πως η υδρόλυση της oxPAPC οδηγεί σε σημαντική μείωση της ικανότητας αυτής. Η oxPLPC και η lysoPC επέδειξαν κάποια ικανότητα σύνδεσης αλλά σημαντικά μικρότερη αυτή της oxPAPC, ενώ ακόμη μικρότερη φαίνεται πως είναι η συνδετική ικανότητα της oxDOPC. Τέλος, η DPPC και σε αυτά τα πειράματα δεν ανέδειξε καμία ικανότητα σύνδεσης.



Εικόνα III.11. Σύνδεση – πρόσληψη σημασμένης με FITC MoxLDL(+) παρουσία ανταγωνιστών.

Σημασμένη με FITC MoxLDL(+) επώαστηκε με καλλιέργεια μακροφάγων σε συγκέντρωση 5 μg πρωτεΐνης/mL για 4h στους 4⁰C ή στους 37⁰C με ή χωρίς την παρουσία μη σημασμένων ανταγωνιστών. Ως ανταγωνιστές χρησιμοποιήθηκαν LDL(+ ή -) και MoxLDL(+ ή -), λιποσώματα από λιπίδια LDL(+ ή -) [λιπίδια LDL(+ ή -)], λιποσώματα από λιπίδια MoxLDL(+ ή -) [λιπίδια MoxLDL(+ ή -)] και DPPC-, oxPAPC-, lysoPAPC-, oxPLPC- και oxDOPC-λιποσώματα (DPPC, oxPAPC, lysoPAPC, oxPLPC και oxDOPC). Οι συγκεντρώσεις στις οποίες χρησιμοποιήθηκαν οι ανταγωνιστές ήταν 50 μg πρωτεΐνης /mL όσον αφορά στις λιποπρωτεΐνες και 50 nmoles φωσφολιπιδίων/mL όσον αφορά στα λιποσώματα. Οι τιμές σύνδεσης και πρόσληψης αποτελούν τους μέσους όρους \pm SE τριπλών προσδιορισμών από ένα σύνολο τριών ξεχωριστών πειραμάτων. Η σύνδεση ή η πρόσληψη της MoxLDL(+) εκφράζεται ως % ποσοστό αυτής χωρίς την παρουσία ανταγωνιστή (μάρτυρας) η οποία λαμβάνεται ως 100%.

Πίνακας III.20. Σύνδεση - πρόσληψη MoxLDL(+) παρουσία ανταγωνιστών

Σύνδεση (4°C)													
ανταγωνιστής													
μάρτυρας	LDL(+)	LDL(+) Λιπίδια	LDL(-)	LDL(+) Λιπίδια	MoxLDL(+)	MoxLDL(+) Λιπίδια	MoxLDL(+)	MoxLDL(+) Λιπίδια	DPPC	oxPAPC	lysoPAPC	oxPLPC	oxDOPC
100 +/- 8,59	82,21 +/- 5,51	83,44 +/- 4,98	79,61 +/- 5,19	81,64 +/- 6,98	36,77 +/- 4,86	40,83 +/- 5,56	31,18 +/- 5,23	33,61 +/- 6,06	96,67 +/- 7,30	28,59 +/- 8,80	63,05 +/- 9,23	58,18 +/- 8,00	71,33 +/- 9,89
Πρόσληψη (37°C)													
ανταγωνιστής													
μάρτυρας	LDL(+)	LDL(+) Λιπίδια	LDL(-)	LDL(+) Λιπίδια	MoxLDL(+)	MoxLDL(+) Λιπίδια	MoxLDL(+)	MoxLDL(+) Λιπίδια	DPPC	oxPAPC	lysoPAPC	oxPLPC	oxDOPC
100 +/- 11,84	86,02 +/- 6,63	87,28 +/- 6,54	83,42 +/- 7,79	86,47 +/- 7,07	38,13 +/- 7,33	43,25 +/- 7,78	32,11 +/- 6,57	36,96 +/- 6,43	98,64 +/- 6,88	25,88 +/- 8,41	65,69 +/- 14,30	61,78 +/- 14,2	76,08 +/- 10,45

Σημειώνεται με FITC MoxLDL(+) επώαστηκε με καλλιέργεια μακροφάγων σε συγκέντρωση 5 μg πρωτεΐνης /ml με ή χωρίς την παρουσία μη σημασμένων ανταγωνιστών. Ως ανταγωνιστές χρησιμοποιήθηκαν LDL(+ ή -) και MoxLDL(+ ή -), λιπασώματα από λιπίδια LDL(+ ή -) [Λιπίδια LDL(+ ή -)] [Λιπίδια MoxLDL(+ ή -)] [Λιπίδια MoxLDL(+ ή -)] [Λιπίδια MoxLDL(+ ή -)] και DPPC-, oxPAPC-, lysoPAPC-, oxPLPC- και oxDOPC-λιπασώματα (DPPC, oxPAPC, lysoPAPC, oxPLPC και oxDOPC). Οι συγκεντρώσεις στις οποίες χρησιμοποιήθηκαν οι ανταγωνιστές ήταν 50 μg πρωτεΐνης /ml όσον αφορά στις λιπιδιωμένες και 50 nmoles φωσφολιπιδίων/ml όσον αφορά στα λιπασώματα. Οι τιμές σύνδεσης και πρόσληψης αποτελούν τους μέσους όρους ± τα κατά 95% όρια αξιοπιστίας τριπλών προσδιορισμών από ένα σύνολο τριών ξεχωριστών πειραμάτων. Η σύνδεση ή η πρόσληψη της MoxLDL(+) εκφράζεται ως % ποσοστό αυτής χωρίς την παρουσία ανταγωνιστή (μάρτυρας) η οποία λαμβάνεται ως 100%.

III.2.14. ΜΕΛΕΤΗ ΣΥΝΔΕΣΗΣ – ΠΡΟΣΛΗΨΗΣ ΛΙΠΟΣΩΜΑΤΩΝ ΑΠΟ ΛΙΠΙΔΙΑ MoxLDL(+) ΠΑΡΟΥΣΙΑ ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΩΝ

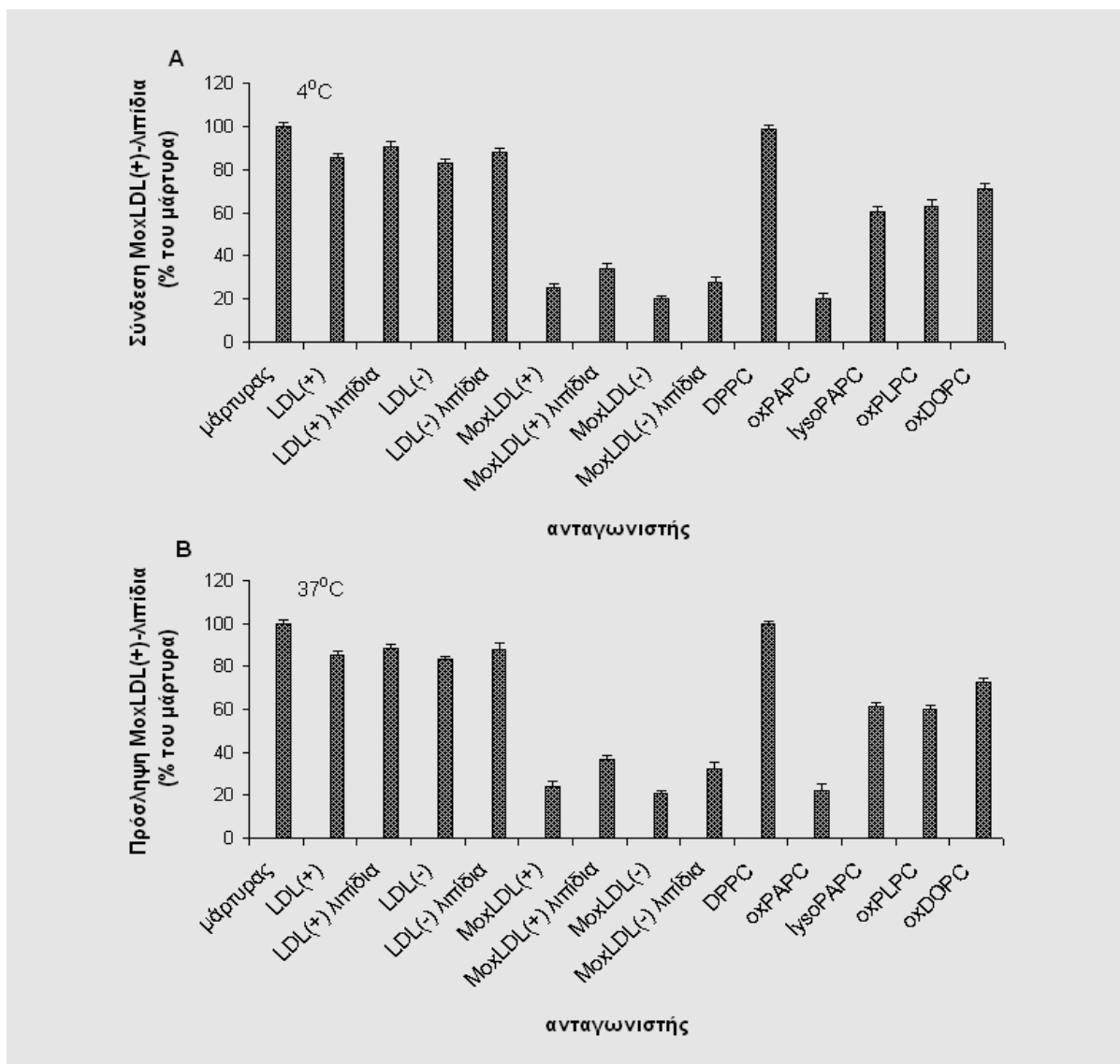
Εκτιμήθηκε η σύνδεση και η πρόσληψη σημασμένων με [¹⁴C]DPPC λιποσωμάτων από λιπίδια MoxLDL(+) παρουσία μη σημασμένων ανταγωνιστών. Τα σημασμένα λιποσώματα επώαστηκαν με καλλιέργεια μακροφάγων σε συγκέντρωση 5 nmoles φωσφολιπιδίων/mL με ή χωρίς την παρουσία μη σημασμένων ανταγωνιστών. Ως ανταγωνιστές χρησιμοποιήθηκαν οι ίδιοι που χρησιμοποιήθηκαν και στην προηγούμενη ενότητα πειραμάτων ανταγωνισμού σύνδεσης – πρόσληψης της MoxLDL(+): α) LDL(+ ή -) και MoxLDL(+ ή -), β) λιποσώματα από λιπίδια LDL(+ ή -) και λιποσώματα από λιπίδια MoxLDL(+ ή -) και γ) DPPC-, oxPAPC-, lysoPAPC-, oxPLPC- και oxDOPC- λιποσώματα. Οι συγκεντρώσεις στις οποίες χρησιμοποιήθηκαν οι ανταγωνιστές ήταν 50 μg πρωτεΐνης/mL όσον αφορά στις λιποπρωτεΐνες και 50 nmoles φωσφολιπιδίων/mL όσον αφορά στα λιποσώματα. Τα αποτελέσματα προέκυψαν από τριπλούς προσδιορισμούς από ένα σύνολο τριών ξεχωριστών πειραμάτων και παρουσιάζονται στην **Εικόνα III.12** και στον **Πίνακα III.21**. Η πρόσληψη ή η σύνδεση εκφράζεται ως % ποσοστό αυτής χωρίς την παρουσία ανταγωνιστή (μάρτυρας) η οποία λαμβάνεται ως 100%.

Τα αποτελέσματα των πειραμάτων σύνδεσης και πρόσληψης συγκρινόμενα μεταξύ τους ήταν όπως και σε όλες τις προηγούμενες ομάδες πειραμάτων παρόμοια. Η ομάδα των LDL και των λιποσωμάτων από τα λιπίδιά τους δεν ανέδειξε αξιόλογη ικανότητα ανταγωνισμού σε αντίθεση με την ομάδα των MoxLDL και των λιποσωμάτων από τα λιπίδιά τους που αποδείχθηκαν ισχυροί ανταγωνιστές. Η MoxLDL(-) μείωσε τη σύνδεση και την πρόσληψη σε 19,9% και σε 20,7% αντίστοιχα και τα λιποσώματα από τα λιπίδια των MoxLDL(-) προκάλεσαν αντίστοιχα μείωση σε 27,9% και 32,2%. Η MoxLDL(+) μείωσε τη σύνδεση και την πρόσληψη σε 25,1% και σε 24,3% αντίστοιχα και τα λιποσώματα από τα λιπίδια των MoxLDL(+) προκάλεσαν αντίστοιχα μείωση σε 34,1% και 36,8%. Όπως και στην προηγούμενη ενότητα πειραμάτων ανταγωνισμού της πρόσληψης και της σύνδεσης σημασμένων με FITC MoxLDL(+), παρατηρείται μία τάση ισχυρότερου ανταγωνισμού από τη MoxLDL(-) και τα λιποσώματα από λιπίδια MoxLDL(-) σε σχέση με τη MoxLDL(+) και τα λιποσώματα από λιπίδια MoxLDL(+) αντίστοιχα, η οποία όμως δεν έφθασε σε επίπεδα στατιστικής σημαντικότητας.

Τα oxPAPC-λιποσώματα αποτέλεσαν ισχυρό ανταγωνιστή προκαλώντας μείωση της σύνδεσης σε 20,4% και της πρόσληψης σε 22,4% ενώ τα oxPLPC και τα lysoPAPC λιποσώματα προκάλεσαν μικρότερες μειώσεις και ακόμη μικρότερες τα oxDOPC-

λιποσώματα. Τέλος, καμία επίδραση δεν παρατηρήθηκε με τη χρησιμοποίηση των DPPC-λιποσωμάτων. Η διαφορά όσον αφορά στις μειώσεις στη σύνδεση και στην πρόσληψη, μεταξύ αυτών που προκλήθηκαν από τα oxPAPC-λιποσώματα από τη μία πλευρά και από την άλλη αυτών που προκλήθηκαν από τα lysoPAPC, oxPLPC oxDOPC και DPPC λιποσώματα ήταν σε κάθε περίπτωση στατιστικά σημαντική ($p < 0,0001\%$).

Τα αποτελέσματα αυτά βρίσκονται σε απόλυτη συμφωνία με αυτά της προηγούμενης ενότητας πειραμάτων ανταγωνισμού της σύνδεσης και της πρόσληψης σημασμένης με FITC MoxLDL(+) και επιβεβαιώνουν την ισχυρή ικανότητα σύνδεσης της oxPAPC με τους υποδοχείς των μακροφάγων που είναι υπεύθυνοι για την πρόσληψη των oxLDL. Η ικανότητα σύνδεσης της oxPAPC υπερέρχει σημαντικά αυτής του προϊόντος υδρόλυσής της, της lysoPAPC καθώς και της ικανότητας σύνδεσης των δύο άλλων οξειδωμένων φωσφολιπιδίων που χρησιμοποιήθηκαν, της oxPLPC και της oxDOPC, ενώ η DPPC δεν ανέδειξε ούτε στα πειράματα αυτά κάποια συνδετική ικανότητα.



Εικόνα III.12. Σύνδεση – πρόσληψη σημασμένων με $[^{14}\text{C}]\text{DPPC}$ λιποσωμάτων από λιπίδια MoxLDL(+) παρουσία ανταγωνιστών. Σημασμένα με $[^{14}\text{C}]\text{DPPC}$ λιποσώματα από λιπίδια MoxLDL(+) επιάστηκαν με καλλιέργεια μακροφάγων σε συγκέντρωση 5 nmoles φωσφολιπιδίων/mL για 4h στους 4°C ή στους 37°C με ή χωρίς την παρουσία μη σημασμένων ανταγωνιστών. Ως ανταγωνιστές χρησιμοποιήθηκαν LDL(+ ή -) και MoxLDL(+ ή -), λιποσώματα από λιπίδια LDL(+ ή -) [λιπίδια LDL(+ ή -)], λιποσώματα από λιπίδια MoxLDL(+ ή -) [λιπίδια MoxLDL(+ ή -)] και DPPC-, oxPAPC-, lysoPAPC-, oxPLPC- και oxDOPC-λιποσώματα (DPPC, oxPAPC, lysoPAPC, oxPLPC και oxDOPC). Οι συγκεντρώσεις στις οποίες χρησιμοποιήθηκαν οι ανταγωνιστές ήταν 50 μg πρωτεΐνης/mL όσον αφορά στις λιποπρωτεΐνες και 50 nmoles φωσφολιπιδίων/mL όσον αφορά στα λιποσώματα. Οι τιμές πρόσληψης και σύνδεσης αποτελούν τους μέσους όρους \pm SE τριπλών προσδιορισμών από ένα σύνολο τριών ξεχωριστών πειραμάτων. Η σύνδεση ή η πρόσληψη εκφράζεται ως % ποσοστό αυτής χωρίς την παρουσία ανταγωνιστή (μάρτυρας) η οποία λαμβάνεται ως 100%.

Πίνακας III.21. Σύνδεση- πρόσληψη MoxLDL(+)-λιπιδίων παρουσία ανταγωνιστών

Σύνδεση (4°C)															
ανταγωνιστής															
μάρτυρας	LDL(+)	LDL(+) λιπίδια	LDL(-)	LDL(-) λιπίδια	MoxLDL(+)	MoxLDL(+) λιπίδια	MoxLDL(+)	MoxLDL(+) λιπίδια	MoxLDL(-)	MoxLDL(-) λιπίδια	DPPC	oxPAPC	lysoPAPC	oxPLPC	oxDOPC
100,00 +/- 4,05	85,50 +/- 3,90	90,56 +/- 4,97	83,08 +/- 4,59	87,81 +/- 4,35	25,07 +/- 5,00	34,13 +/- 5,32	19,91 +/- 3,87	27,88 +/- 5,10	98,77 +/- 3,79	20,41 +/- 5,58	60,30 +/- 5,67	62,91 +/- 6,82	70,76 +/- 7,03		
Πρόσληψη (37°C)															
ανταγωνιστής															
μάρτυρας	LDL(+)	LDL(+) λιπίδια	LDL(-)	LDL(-) λιπίδια	MoxLDL(+)	MoxLDL(+) λιπίδια	MoxLDL(+)	MoxLDL(+) λιπίδια	MoxLDL(-)	MoxLDL(-) λιπίδια	DPPC	oxPAPC	lysoPAPC	oxPLPC	oxDOPC
100,00 +/- 3,39	85,23 +/- 4,18	88,56 +/- 4,09	83,08 +/- 3,70	87,81 +/- 7,32	24,27 +/- 4,82	36,83 +/- 4,21	20,71 +/- 3,91	32,19 +/- 7,72	99,47 +/- 3,60	22,41 +/- 6,57	61,00 +/- 4,37	59,91 +/- 5,27	72,76 +/- 3,61		

Σημασμένα με [¹⁴C]DPPC λιποσώματα από λιπίδια MoxLDL(+) επωάστηκαν με καλλιέργεια μακροφάγων σε συγκέντρωση 5 ημολιές φωσφολιπιδίων/ml με ή χωρίς την παρουσία μη σημασμένων ανταγωνιστών. Ως ανταγωνιστές χρησιμοποιήθηκαν LDL(+ ή -) και MoxLDL(+ ή -), λιποσώματα από λιπίδια LDL(+ ή -) [λιπίδια LDL(+ ή -)], λιποσώματα από λιπίδια MoxLDL(+ ή -) [λιπίδια MoxLDL(+ ή -)] και DPPC-, oxPAPC-, lysoPAPC-, oxPLPC- και oxDOPC-λιποσώματα (DPPC, oxPAPC, lysoPAPC, oxPLPC και oxDOPC). Οι συγκεκριμένες στις οποίες χρησιμοποιήθηκαν οι ανταγωνιστές ήταν 50 μg πρωτεΐνης /ml όταν αφορά στις λιποπρωτεΐνες και 50 ημολιές φωσφολιπιδίων/ml όταν αφορά στα λιποσώματα. Οι τιμές σύνδεσης και πρόσληψης αποτελούν τους μέσους όρους ± τα κατά 95% όρια αξιοπιστίας τριπλών προσδιορισμών από ένα σύνολο τριών ξεχωριστών πειραμάτων. Η σύνδεση ή η πρόσληψη των λιποσωμάτων από λιπίδια MoxLDL(+) εκφράζεται ως % ποσοστό αυτής χωρίς την παρουσία ανταγωνιστή (μάρτυρας) ή οποία λαμβάνεται ως 100%.

III.2.15. ΜΕΛΕΤΗ ΣΥΝΔΕΣΗΣ – ΠΡΟΣΛΗΨΗΣ ΛΙΠΟΣΩΜΑΤΩΝ ΑΠΟ ΛΙΠΙΔΙΑ MoxLDL(-) ΠΑΡΟΥΣΙΑ oxPAPC-ΛΙΠΟΣΩΜΑΤΩΝ ΩΣ ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΩΝ

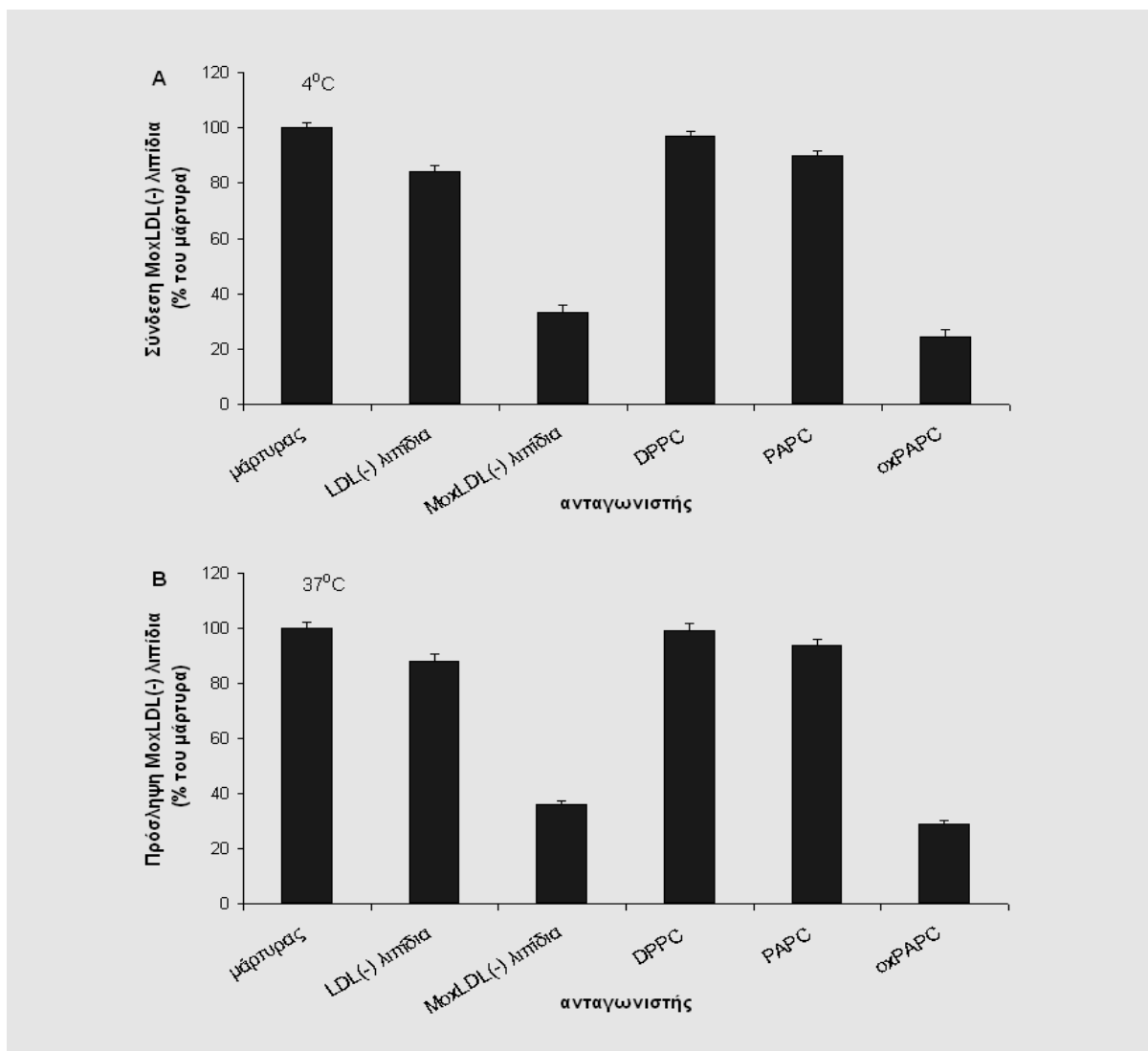
Η oxPAPC ανέδειξε στα πειράματα που προηγήθηκαν ισχυρή ικανότητα σύνδεσης με τους υποδοχείς των μακροφάγων αναδεικνύοντας δυνητικά την περιεκτικότητα των oxLDL σε oxPAPC σε παράγοντα που καθορίζει την ικανότητα σύνδεσής τους με τους υποδοχείς των μακροφάγων. Προκειμένου το συμπέρασμα αυτό να ενισχυθεί περαιτέρω, εκτιμήθηκε επιπλέον η ικανότητα oxPAPC-λιποσωμάτων να δράσουν ανταγωνιστικά στη σύνδεση και στην πρόσληψη λιποσωμάτων από λιπίδια MoxLDL(-) τα οποία λόγω της αναστολής της Lp-PLA₂ έχουν αυξημένη περιεκτικότητα σε οξειδωμένα φωσφολιπίδια.

Η σύνδεση και η πρόσληψη σημασμένων με [¹⁴C]DPPC λιποσωμάτων από λιπίδια MoxLDL(-) εκτιμήθηκε με ή χωρίς την παρουσία μη σημασμένων oxPAPC-λιποσωμάτων ως ανταγωνιστή. Επιπλέον χρησιμοποιήθηκαν συγκριτικά ως ανταγωνιστές λιποσώματα από λιπίδια LDL(-), λιποσώματα από λιπίδια MoxLDL(-), καθώς και DPPC- και PAPC-λιποσώματα. Τα σημασμένα λιποσώματα επώαστηκαν με καλλιέργεια μακροφάγων σε συγκέντρωση 5 nmoles φωσφολιπιδίων/mL. Η συγκέντρωση στην οποία χρησιμοποιήθηκαν οι ανταγωνιστές ήταν 50 nmoles φωσφολιπιδίων/mL. Τα αποτελέσματα προέκυψαν από τριπλούς προσδιορισμούς από ένα σύνολο τριών ξεχωριστών πειραμάτων και παρουσιάζονται στην **Εικόνα III.13** και στον **Πίνακα III.22**. Η πρόσληψη ή η σύνδεση εκφράζεται ως το % ποσοστό αυτής χωρίς την παρουσία ανταγωνιστή (μάρτυρας) η οποία λαμβάνεται ως 100%.

Η εικόνα των αποτελεσμάτων των πειραμάτων σύνδεσης και πρόσληψης ήταν και σε αυτή την ομάδα πειραμάτων παρόμοια. Τα λιποσώματα από τα λιπίδια των MoxLDL(-) αποτέλεσαν ισχυρούς ανταγωνιστές προκαλώντας μείωση της σύνδεσης και της πρόσληψης σε 33,3% και σε 35,9% αντίστοιχα, ενώ τα λιποσώματα από τα λιπίδια των LDL(-) δεν παρουσίασαν αξιόλογο ανταγωνισμό.

Η προσθήκη oxPAPC-λιποσωμάτων οδήγησε σε μεγάλη μείωση της σύνδεσης σε 20,4% και της πρόσληψης σε 22,4%, σε αντίθεση με τη χρησιμοποίηση PAPC-λιποσωμάτων που δεν εμφάνισε αξιόλογη επίδραση και η διαφορά μεταξύ των μειώσεων που σημειώθηκαν στη σύνδεση και στην πρόσληψη των λιποσωμάτων από λιπίδια MoxLDL(-) με επώαση με oxPAPC-λιποσώματα από τη μία πλευρά και με επώαση με PAPC-λιποσώματα από την άλλη, ήταν στατιστικά σημαντική ($p < 0,0001\%$). Καμία επίδραση δεν παρατηρήθηκε με τη χρησιμοποίηση των DPPC-λιποσωμάτων.

Επιβεβαιώνεται και σε αυτή την ενότητα πειραμάτων η ισχυρή ικανότητα της oxPAPC να συνδέεται με τους υπεύθυνους για την πρόσληψη των oxLDL υποδοχείς των μακροφάγων.



Εικόνα III.13. Σύνδεση – πρόσληψη σημασμένων με [¹⁴C]DPPC λιποσωμάτων από λιπίδια MoxLDL(-) παρουσία ανταγωνιστών. Σημασμένα με [¹⁴C]DPPC λιποσώματα από λιπίδια MoxLDL(-) επώαστηκαν με καλλιέργεια μακροφάγων σε συγκέντρωση 5 nmoles φωσφολιπιδίων/mL για 4h στους 4⁰C ή στους 37⁰C με ή χωρίς την παρουσία μη σημασμένων ανταγωνιστών. Ως ανταγωνιστές χρησιμοποιήθηκαν λιποσώματα από λιπίδια LDL(-) [**λιπίδια LDL(-)**], λιποσώματα από λιπίδια MoxLDL(-) [**λιπίδια MoxLDL(-)**] και DPPC-, PAPC- και oxPAPC-λιποσώματα (**DPPC, PAPC, oxPAPC**). Οι συγκεντρώσεις στις οποίες χρησιμοποιήθηκαν οι ανταγωνιστές ήταν 50 nmoles φωσφολιπιδίων/mL. Οι τιμές σύνδεσης και πρόσληψης αποτελούν τους μέσους όρους ± SE τριπλών προσδιορισμών από ένα σύνολο τριών ξεχωριστών πειραμάτων, και εκφράζονται ως % ποσοστό της τιμής χωρίς την παρουσία ανταγωνιστή (mάρτυρας) η οποία λαμβάνεται ως 100%.

Πίνακας III.22. Πρόσληψη - σύνδεση MoxLDL(-)- λιπιδίων παρουσία ανταγωνιστών					
Σύνδεση (4 ⁰ C)					
μάρτυρας	ανταγωνιστής				
	LDL(-) Λιπίδια	MoxLDL(-) Λιπίδια	DPPC	PAPC	oxPAPC
100,00 +/- 4,01	84,12 +/- 4,64	33,26 +/- 5,59	96,95 +/- 4,18	90,01 +/-3,89	24,50 +/- 6,03
Πρόσληψη (37 ⁰ C)					
μάρτυρας	ανταγωνιστής				
	LDL(-) Λιπίδια	MoxLDL(-) Λιπίδια	DPPC	PAPC	oxPAPC
100,00 +/- 4,94	87,97 +/- 6,03	35,94 +/- 3,28	98,93 +/- 6,26	93,85 +/- 5,28	28,75 +/- 3,72
<p>Σύνδεση – πρόσληψη σημασμένων με [¹⁴C]DPPC λιποσωμάτων από λιπίδια MoxLDL(-) παρουσία ανταγωνιστών. Σημασμένα με [¹⁴C]DPPC λιποσώματα από λιπίδια MoxLDL(-) επωάστηκαν με καλλιέργεια μακροφάγων σε συγκέντρωση 5 nmoles φωσφολιπιδίων/ml με ή χωρίς την παρουσία μη σημασμένων ανταγωνιστών. Ως ανταγωνιστές χρησιμοποιήθηκαν λιποσώματα από λιπίδια LDL(-) [λιπίδια LDL(-)], λιποσώματα από λιπίδια MoxLDL(-) [λιπίδια MoxLDL(-)] και DPPC-, PAPC- και oxPAPC-λιποσώματα (DPPC, PAPC, oxPAPC) σε συγκέντρωση 50 nmoles φωσφολιπιδίων/ml. Οι τιμές σύνδεσης και πρόσληψης αποτελούν τους μέσους όρους ± τα κατά 95% όρια αξιοπιστίας τριπλών προσδιορισμών από ένα σύνολο τριών ξεχωριστών πειραμάτων και εκφράζονται ως % ποσοστό της τιμής χωρίς την παρουσία ανταγωνιστή (μάρτυρας) η οποία λαμβάνεται ως 100%.</p>					

III.3. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η οξείδωση της LDL θεωρείται ένα απαραίτητο γεγονός στη διαδικασία ανάπτυξης της αθηροσκλήρυνσης. Η οξείδωση της LDL επιτελείται από τα ενδοθηλιακά κύτταρα, τα λεία μυϊκά κύτταρα και τα μακροφάγα στον αρτηριακό χιτώνα και η οξειδωμένη LDL (oxLDL) βρίσκεται σε αφθονία στις αθηρωματικές βλάβες [1, 23, 24, 318-320]. Η οξειδωτική τροποποίηση της LDL περιλαμβάνει: α) τη λιπιδική υπεροξείδωση, β) τη μετατροπή ποσότητας φωσφατιδυλοχολίνης (PC) σε λυσοφωσφατιδυλοχολίνη (lysoPC) (έως το 50% ανάλογα με το βαθμό της οξείδωσης), γ) την αύξηση της πυκνότητας, δ) την αύξηση του αρνητικού φορτίου που έχει σαν αποτέλεσμα την αύξηση της ηλεκτροφορητικής κινητικότητας, ε) τη διάσπαση της απολιποπρωτεΐνης B100 (ApoB100) σε μικρότερα πεπτίδια και στ) τη σύνδεση οξειδωμένων λιπιδίων στην ApoB100 [319, 321, 322]. Με την οξείδωσή της η LDL προάγει την αθηρογένεση με διάφορους τρόπους, όπως την αύξηση της πρόσληψής της από τα μακροφάγα και τα λεία μυϊκά κύτταρα που οδηγεί στο σχηματισμό αφρωδών κυττάρων, την αυξημένη παραγωγή μορίων προσκόλλησης, την επαγωγή του πολλαπλασιασμού των μονοκυττάρων / μακροφάγων και των λείων μυϊκών κυττάρων, την επαγωγή του οξειδωτικού stress, την εξασθένηση της εξαρτώμενης από το ενδοθήλιο αγγειοδιαστολής, την επαγωγή της παραγωγής αθηρογόνων κυτταροκινών και της παραγωγής χημειοκινών που προκαλούν στρατολόγηση ιδιαίτερα μονοκυττάρων στον έσω χιτώνα, και την κυτταροτοξική δράση στα ενδοθηλιακά κύτταρα [24, 108, 138, 588-590]. Οι επιδράσεις αυτές ασκούνται μέσω της ενδοκυττάριας συσσώρευσης λιπιδίων και μέσω σηματοδοτικών οδών που εκκινούν από τους εκκαθαριστές υποδοχείς (scavenger receptors, SRs) και από τους υποδοχείς τύπου Toll (Toll like receptors, TLRs) [50, 52, 77, 79].

Ο σχηματισμός αφρωδών κυττάρων θεωρείται ως ένα πρώιμο και σημαντικό γεγονός στην ανάπτυξη της αθηρωματικής πλάκας [271, 318, 332]. Η oxLDL προσλαμβάνεται από τα μακροφάγα μέσω των εκκαθαριστών υποδοχέων. Διάφοροι εκκαθαριστές υποδοχείς, όπως οι SR-AI, SR-AII, CD36 και LOX-1 έχουν περιγραφεί μέχρι τώρα [77]. Αρχικά είχε θεωρηθεί ότι η oxLDL μπορούσε να αναγνωρισθεί αποκλειστικά μέσω της πρωτεϊνικής της ομάδας. Έχει δείχθει ότι ApoB που απομονώθηκε από oxLDL μετά από εκχύλιση των λιπιδίων, μπορεί να συνδεθεί σε μακροφάγα και επίσης να ανταγωνιστεί στη σύνδεση την oxLDL [321]. Αργότερα καταδείχτηκε ότι τα λιποσώματα που σχηματίζονται από τα λιπίδια που εκχυλίζονται από oxLDL μπορούν επίσης να συνδεθούν στα μακροφάγα και να ανταγωνιστούν στη σύνδεση και στην πρόσληψη την ακέραιη oxLDL [329, 334]. Δείχτηκε περαιτέρω ότι λιποσώματα που περιέχουν οξειδωμένη 1-παλμιτόυλο-2-αραχιδονόυλο-sn-

γλυκερο-3-φωσφοχολίνη (oxidized 1-palmitoyl 2-arachidonoyl-phosphatidylcholine, oxPAPC) μπορούν να αναστείλουν ανταγωνιστικά την πρόσληψη της oxLDL [334]. Επιπλέον, η οξείδωση διαφόρων λιπιδίων περιλαμβανομένων και φωσφατιδυλοχολινών όπως της PAPC ή ελεύθερων λιπαρών οξέων όπως του αραχιδονικού και του λινολενικού, οδηγεί στην παραγωγή μορίων τα οποία μπορούν να συνδεθούν στην ApoB. Η τροποποίηση των αμινο-ομάδων η οποία είναι το αποτέλεσμα αυτής της διαδικασίας, φαίνεται πως τροποποιεί τη συγγένεια της ApoB με τους υποδοχείς των μακροφάγων [315, 322, 324]. Ιδιαίτερα έχει μελετηθεί ένα συγκεκριμένο προϊόν της οξείδωσης της PAPC, η 1-παλμιτόυλο – 2 - (5 - κετοβαλερόυλο) – sn – γλυκερο – 3 - φωσφοχολίνη (1 – palmitoyl – 2 - (5 - oxovaleroyl)-phosphatidylcholine, POVPC), η οποία έχει απομονωθεί σαν συστατικό της oxLDL [328]. Αλβουμίνη στην οποία είχε συνδεθεί POVPC έχει δειχθεί να αναστέλλει τη σύνδεση στα μακροφάγα της ακέραιης oxLDL, των λιποσωμάτων που έχουν παρασκευαστεί από τα λιπίδια της oxLDL καθώς και της ApoB που έχει απομονωθεί από oxLDL [328, 329, 335]. Ομοίως, η χρήση μονοκλωνικού αντίσωματος εναντίον της oxPAPC και της POVPC ανέστειλε σε μεγάλο βαθμό τη σύνδεση της ακέραιης oxLDL, των λιπιδίων της oxLDL και της ApoB που είχε απομονωθεί από oxLDL [328, 329, 335]. Είναι, ως εκ τούτου, αναγνωρισμένο ότι η λιπιδική ομάδα παίζει ένα σημαντικό ρόλο στην αναγνώριση της oxLDL από τα μακροφάγα μεσολαβώντας στη σύνδεση στους υποδοχείς είτε ανεξάρτητα από την ApoB είτε μέσω ομοιοπολικής σύνδεσης σε αυτή.

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, κατά τη διάρκεια της οξείδωσης της LDL μία σημαντική ποσότητα της oxPC διασπάται σε lysoPC. Η υδρόλυση αυτή καταλύεται από τη συνδεδεμένη με τις λιποπρωτεΐνες φωσφολιπάση A₂ (lipoprotein associated phospholipase A₂, Lp-PLA₂) [104]. Η Lp-PLA₂ η οποία παλαιότερα καλείτο ακετυλοϋδρολάση του παράγοντα ενεργοποίησης αιμοπεταλίων (platelet-activating factor acetylhydrolase, PAF-AH), καθώς είχε αρχικά περιγραφεί σαν το ένζυμο που καταλύει την υδρόλυση του PAF, ανήκει στην υπεροικογένεια των φωσφολιπασών A₂ και κυκλοφορεί στο πλάσμα συνδεδεμένη κυρίως με την LDL [354, 359]. Η Lp-PLA₂ κατά προτίμηση υδρολύει φωσφολιπίδια με βραχεία ακυλ- αλυσίδα, με μήκος < 6 άτομα άνθρακα στην sn-2 θέση του γλυκερινικού σκελετού [104, 326, 327]. Όμως και ορισμένα παράγωγα οξείδωσης φωσφολιπιδίων με μεγαλύτερες αλυσίδες ατόμων άνθρακα στη sn-2 θέση μπορούν να αποτελέσουν υπόστρωμά της. Ενώ φωσφατιδυλοχολίνη με 9 άτομα άνθρακα στην sn-2 θέση βρέθηκε να είναι πολύ φτωχό υπόστρωμα για την Lp-PLA₂, το αλδεϋδικό ανάλογό της που αποτελεί παράγωγο της οξείδωσης αποτελούσε αποτελεσματικό υπόστρωμα [326]. Κατά τη διάρκεια της οξείδωσης της LDL, ο κατακερματισμός των ακόρεστων ακυλ- ομάδων στην

sn-2 θέση, παράγει μόρια με βραχείες ακυλ- αλυσίδες στην sn-2 θέση, όπως η POVPC, τα οποία μπορούν να αποτελέσουν υπόστρωμα της Lp-PLA₂ [327, 354]. Πρέπει να σημειωθεί ότι η Lp-PLA₂ σταδιακά απενεργοποιείται κατά τη διάρκεια της οξείδωσης [325, 333]. Η Lp-PLA₂ είναι παρούσα στις αθηροσκληρυντικές βλάβες όπου παράγεται από τα μακροφάγα. [370, 382, 383]. Τα τελευταία χρόνια διάφορα επιδημιολογικά δεδομένα δεικνύουν ότι τα επίπεδα της κυκλοφορούσας Lp-PLA₂ είναι ένας ανεξάρτητος παράγοντας κινδύνου για την εκδήλωση στεφανιαίας νόσου [509, 511]. Δεν έχει ακόμη διευκρινιστεί εάν η Lp-PLA₂ είναι μόνο ένας δείκτης της φλεγμονής στο αγγειακό τοίχωμα, η οποία χαρακτηρίζεται από συσσώρευση μακροφάγων και επακόλουθη αύξηση της παραγωγής της Lp-PLA₂, ή αποτελεί έναν αιτιολογικό παράγοντα που προάγει τη φλεγμονή στο αγγειακό τοίχωμα και την ανάπτυξη της αθηρωματικής βλάβης [354, 383].

Στην παρούσα εργασία εστίασαμε στην επίδραση της Lp-PLA₂ στην αναγνώριση της oxLDL από τα μακροφάγα, καθώς φαίνεται εύλογη η υπόθεση ότι η τροποποίηση της λιπιδικής ομάδας της LDL η οποία προκαλείται από τη δραστικότητα της Lp-PLA₂, μπορεί να επηρεάζει τη σύνδεση της oxLDL στους υποδοχείς των μακροφάγων και την επακόλουθη πρόσληψή της.

III.3.1. Επίδραση της οξείδωσης της LDL στη δραστικότητα της Lp-PLA₂

Για την οξείδωση της LDL χρησιμοποιήθηκε η επώασή της με CuSO₄ η οποία αποτελεί έναν κλασικό τρόπο οξείδωσης που χρησιμοποιείται στην πλειονότητα των εργασιών (ενδεικτική βιβλιογραφία [104, 323, 325, 328, 329, 333-335, 340, 424, 491, 492]). Η LDL οξειδώθηκε παρουσία 5μM CuSO₄ στους 37⁰C για 24h και μετρήθηκε η δραστικότητα της Lp-PLA₂ σε διάφορα χρονικά διαστήματα. Τα αποτελέσματα ήταν παρόμοια με αυτά που έχουν αναφερθεί στη βιβλιογραφία, παρουσιάζοντας προοδευτική αναστολή της Lp-PLA₂ [325, 333]. Βρέθηκε ότι στις 6h από την έναρξη της οξείδωσης διατηρείται ~ 40-50% της αρχικής δραστικότητας ενώ στις 24h έχει απομείνει ~ 10-15%. Με βάση τα ευρήματα αυτά τα χρονικά διαστήματα των 6 και 24h επελέγησαν για να χρησιμοποιηθούν στη συνέχεια ως χρόνος οξείδωσης των LDL. Η επιλογή αυτή έγινε ώστε να εξεταστεί η ενδεχόμενη διαφορά μεταξύ λιποπρωτεϊνών που έχουν οξειδωθεί για μικρότερο διάστημα κατά το οποίο το μεγαλύτερο μέρος της δραστικότητας της Lp-PLA₂ ήταν παρόν, και λιποπρωτεϊνών των οποίων η οξείδωση έχει παραταθεί για μεγαλύτερο διάστημα κατά το οποίο η δραστικότητα της Lp-PLA₂ έχει σημαντικά εξασθενήσει.

III.3.2. Υδρόλυση της φωσφατιδυλογολίνης και λιπιδική υπεροξείδωση κατά την οξείδωση της LDL

Βάσει της επιλογής να χρησιμοποιηθούν στη συνέχεια τα χρονικά διαστήματα των 6 και των 24 ωρών οξείδωσης, εκτιμήθηκε η υδρόλυση της PC και η λιπιδική οξείδωση στα διαστήματα αυτά. Το μεγαλύτερο μέρος της υδρόλυσης της PC έχει επιτελεστεί στις πρώτες 6 ώρες της οξείδωσης με αύξηση του λόγου lysoPC/PC από ~ 0,05 στη φυσική (μη οξειδωμένη) LDL σε ~ 0,24, ενώ στις 24 ώρες της οξείδωσης παρατηρήθηκε περαιτέρω αύξηση του λόγου lysoPC/PC σε ~ 0,36. Η προοδευτική αυτή μεταβολή του λόγου lysoPC/PC είναι παραπλήσια με προηγούμενως δημοσιευθέντα δεδομένα [104, 323, 325]. Παρομοίως, η εκτίμηση της λιπιδικής οξείδωσης με μέτρηση του MDA (nmoles/mg πρωτεΐνης LDL) ανέδειξε σημαντικό βαθμό λιπιδικής οξείδωσης με τη συμπλήρωση 6 ωρών οξείδωσης, με αύξηση της τιμής του MDA από 1,8 στη μη οξειδωμένη LDL σε 24,2, και περαιτέρω αύξηση της παραγωγής τους σε 44,2 στις 24 ώρες. Τα αποτελέσματα αυτά είναι παρόμοια με αυτά που έχουν αναφερθεί προηγούμενως σε οξείδωση LDL παρουσία 5μM CuSO₄ στους 37⁰C [591].

III.3.3. Επίδραση της Lp-PLA₂ στη σύνδεση και στην πρόσληψη της MoxLDL και της HoxLDL στα μακροφάγα

Η εκτίμηση της επίδρασης της Lp-PLA₂ στη σύνδεση και στην πρόσληψη της oxLDL στα μακροφάγα έγινε αφενός με τη χρησιμοποίηση LDL με διατηρημένη [LDL(+)] ή ανεσταλμένη μετά από επώαση με refabloc [LDL(-)] τη δραστηριότητα της Lp-PLA₂ και αφετέρου με τη χρησιμοποίηση είτε LDL που είχε οξειδωθεί για μικρότερο διάστημα, κατά το οποίο το μεγαλύτερο μέρος της δραστηριότητας της Lp-PLA₂ ήταν παρόν (LDL που έχει οξειδωθεί για 6h, μέτρια οξειδωμένη LDL, moderately oxidized LDL, MoxLDL) είτε LDL της οποίας η οξείδωση είχε παραταθεί για μεγαλύτερο διάστημα, κατά το οποίο η δραστηριότητα της Lp-PLA₂ είχε σημαντικά εξασθενήσει (LDL που έχει οξειδωθεί για 24h, ισχυρά οξειδωμένη LDL, heavily oxidized LDL, HoxLDL).

Στα πειράματα χρησιμοποιήθηκαν σημασμένες με FITC λιποπρωτεΐνες και εξετάστηκε η σύνδεση και η πρόσληψή τους σε καλλιέργεια περιτοναϊκών μακροφάγων ποντικού. Η σύνδεση και η πρόσληψη των λιποπρωτεϊνών εξετάστηκε με επώασή τους με τα μακροφάγα στους 4⁰C και 37⁰ αντίστοιχα. Η επώαση στους 37⁰C προσεγγίζει τις φυσιολογικές συνθήκες πρόσληψης ενώ με την επώαση στους 4⁰C μελετάται μόνο η σύνδεση με τα κύτταρα, αφού η ολοκλήρωση της πρόσληψης αναστέλλεται, ενώ επιπλέον η επώαση στους 4⁰C πλεονεκτεί στο ότι ελαχιστοποιεί την πιθανότητα μη ειδικής σύνδεσης της λιποπρωτεΐνης στα κύτταρα.

Η καλλιέργεια περιτοναϊκών μακροφάγων ποντικού χρησιμοποιείται ευρύτατα εδώ και δεκαετίες σε μελέτες πρόσληψης μη οξειδωμένων και οξειδωμένων LDL (βλέπε Π.2.4. Σύνδεση της oxLDL στους υποδοχείς των μακροφάγων).

Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης έδειξαν ότι η υδρόλυση οξειδωμένων φωσφολιπιδίων από την Lp-PLA₂ μειώνει τη σύνδεση και την πρόσληψη σημασμένης με FITC oxLDL από τα μακροφάγα. Η αναστολή της δραστηριότητας της Lp-PLA₂ πριν την οξείδωση της LDL με επώαση με refabloc οδήγησε σε αύξηση της σύνδεσης και της πρόσληψης κατά ~ 30% όσον αφορά στην MoxLDL και κατά ~ 20% όσον αφορά στην HoxLDL. Η HoxLDL είχε απωλέσει το μέγιστο μέρος της δραστηριότητας της Lp-PLA₂ στο τέλος της 24ωρης οξείδωσής της, όμως η διαφορά στη σύνδεση και στην πρόσληψη μεταξύ HoxLDL(-) και HoxLDL(+) δεν θα αναμενόταν να είναι αμελητέα, καθώς στην περίπτωση της HoxLDL(+) ένα μεγάλο μέρος της οξειδωμένης φωσφατιδυλοχολίνης είχε ήδη υδρολυθεί πριν επισυμβεί σοβαρή εξασθένηση της δραστηριότητας της Lp-PLA₂. Επιπλέον, μία πρόσθετη ποσότητα οξειδωμένης φωσφατιδυλοχολίνης υδρολύεται μετά τις πρώτες 6 ώρες της οξείδωσης. Συγκεκριμένα, ο μοριακός λόγος lysoPC/PC ήταν ~ 0,05 στη φυσική (μη οξειδωμένη) LDL, μετά από 6 ώρες οξείδωσης ήταν ~ 0,24 και αυξήθηκε περαιτέρω σε ~ 0,36 στο τέλος της 24ωρης οξείδωσης. Πρέπει επίσης να σημειωθεί ότι ακόμη και με την ολοκλήρωση της 24ωρης οξείδωσης είχε διατηρηθεί ένα 10 – 15% της αρχικής ενζυμικής δραστηριότητας. Όμως είναι πιθανό η συνεχιζόμενη παραγωγή οξειδωμένων μορίων, όπως αυτή καταδεικνύεται από την περαιτέρω αύξηση του MDA, όταν πλέον η δραστηριότητα της Lp-PLA₂ είχε σημαντικά μειωθεί, να τείνει να μειώσει τη διαφορά μεταξύ της oxLDL(-) και της oxLDL(+) σε παρατεταμένη οξείδωση. Επώαση με refabloc μετά το πέρας της οξείδωσης δεν είχε επίδραση στη σύνδεση ή στην πρόσληψη αποδεικνύοντας ότι το refabloc είναι ένας κατάλληλος αναστολέας για μελέτες πρόσληψης καθώς δεν παρουσιάζει κάποια άμεση επίδραση στη σύνδεση – πρόσληψη της oxLDL στα μακροφάγα αλλά η επίδρασή του είναι μόνο έμμεση μέσω αναστολής της δραστηριότητας της Lp-PLA₂. Στη μελέτη των Yang και συν., αναφέρεται ότι η αναστολή της δραστηριότητας της Lp-PLA₂ με refabloc αύξησε την πρόσληψη oxLDL σε καλλιέργεια μακροφάγων προερχόμενων από ανθρώπινα μονοκύτταρα και σε καλλιέργεια ηπατοκυττάρων κατά 43% και 51% αντίστοιχα, ενώ η προσθήκη ανασυνδυασμένης Lp-PLA₂ μείωσε την πρόσληψη oxLDL και την πρόσληψη oxLp(a) στα μακροφάγα και στα ηπατοκύτταρα κατά 30 – 40% [491]. Τα αποτελέσματα αυτά βρίσκονται κοντά σε αυτά της δικής μας μελέτης. Σε μελέτη των Turunen και συν., έγινε έγχυση αδενοϊού που έφερε το γονίδιο της ανθρώπινης Lp-PLA₂ σε κουνέλια προκαλώντας τριπλασιασμό της δραστηριότητας της Lp-PLA₂ στην LDL [492]. Οξείδωση

αυτής της υπερεκφράζουσας Lp-PLA₂ δραστικότητα LDL είχε ως αποτέλεσμα η πρόσληψή της από κυτταρική σειρά RAW 264 μακροφάγων να είναι μειωμένη κατά 60 – 80% σε σύγκριση με την πρόσληψη oxLDL από τα πειραματόζωα μάρτυρες. Η αναστολή της Lp-PLA₂ με refabloc πριν την οξείδωση οδήγησε σε πρόσληψη η οποία ήταν διπλάσια της πρόσληψης της oxLDL από την ομάδα ελέγχου στην οποία έγινε έγχυση αδενοϊού που δεν έφερε το γονίδιο της ανθρώπινης Lp-PLA₂ και η οποία διατηρούσε τη φυσιολογική δραστικότητα Lp-PLA₂ στην LDL. Αυξημένη πρόσληψη oxLDL από περιτοναϊκά μακροφάγα ποντικού μετά από αναστολή της δραστικότητας της Lp-PLA₂ αναφέρεται και σε παλαιότερη εργασία στην οποία χρησιμοποιήθηκε ως αναστολέας το DFP [104]. Όμως το αποτέλεσμα αυτό είναι δύσκολο να αξιολογηθεί καθώς αύξηση προκαλείτο και στην πρόσληψη μη οξειδωμένης LDL όταν αυτή επωαζόταν με DFP δεικνύοντας ότι το DFP επιδρά στην πρόσληψη με άλλους ή/και με άλλους τρόπους πέραν της αναστολής υδρόλυσης της oxPC, πιθανότατα τροποποιώντας με άμεση σύνδεσή του το πρωτεϊνικό τμήμα της LDL μεταβάλλοντας τη σύνδεσή του με τους υποδοχείς. Η επίδραση αυτή του DFP βρίσκεται σε αντίθεση με αυτή του refabloc που χρησιμοποιήθηκε στη μελέτη μας και το οποίο όπως αναφέρθηκε ήδη δεν παρουσίασε άλλη επίδραση στη σύνδεση – πρόσληψη της oxLDL στα μακροφάγα πέραν της αναστολής της δραστικότητας της Lp-PLA₂.

III.3.4. Επίδραση της Lp-PLA₂ στη σύνδεση και στην πρόσληψη στα μακροφάγα της MoxLDL και της HoxLDL μέσω της oxApoB

Έχει καταδειχθεί ότι η ικανότητα της ApoB να αναγνωρίζεται από τους εκκαθαριστές υποδοχείς εξαρτάται από διάφορες χημικές τροποποιήσεις οι οποίες έχουν σαν κοινό χαρακτηριστικό την τροποποίηση με το σχηματισμό ενώσεων με τις ε-αμινομάδες των καταλοίπων λυσίνης [315, 322]. Fab τμήματα μονοκλωνικών αντισωμάτων ειδικών έναντι παραγώγων ένωσης προϊόντων οξείδωσης λιπιδίων με λυσίνη, εμπόδισαν την αυξημένη πρόσληψη τροποποιημένης από προϊόντα οξείδωσης LDL [331]. Η σύνδεση με μακροφάγα διαλυτοποιημένης ApoB απομονωμένης από oxLDL, ανεστάλη από μονοκλωνικό αντίσωμα εναντίον οξειδωμένων φωσφολιπιδίων, το οποίο μπορούσε να αναγνωρίσει την oxPAPC και την POVPC, υποδεικνύοντας την παρουσία οξειδωμένων φωσφολιπιδίων δεσμευμένων στην ApoB [328]. Έχει επίσης δειχθεί ότι κατά τη διάρκεια της οξείδωσης της LDL υπάρχει μία προοδευτική αύξηση της ποσότητας του φωσφόρου ο οποίος είναι ομοιοπολικά δεσμευμένος στην ApoB, στοιχείο που υποδεικνύει σαφώς τη σύνδεση κατά τη διάρκεια της οξείδωσης μορίων φωσφολιπιδίων στην ApoB [332].

Με δεδομένο το εύρημα στην πρώτη φάση της μελέτης μας ότι η δραστηριότητα της Lp-PLA₂ μειώνει τη σύνδεση – πρόσληψη της oxLDL στα μακροφάγα, εξετάσαμε στη συνέχεια εάν το αποτέλεσμα αυτό οφειλόταν σε μείωση της σύνδεσης – πρόσληψης μέσω της oxApoB ή μέσω της λιπιδικής ομάδας της oxLDL ή και των δύο.

Η μελέτη της σύνδεσης - πρόσληψης των oxLDL μέσω της πρωτεϊνικής τους ομάδας έγινε με απομόνωση της oxApoB από oxLDL μετά από εκχύλιση των λιπιδίων και ακόλουθη ενσωμάτωση της oxApoB σε πρωτεϊνολιποσώματα. Με απομόνωση oxApoB είτε από MoxLDL (MoxApoB) είτε από HoxLDL (HoxApoB) παρασκευάστηκαν αντίστοιχα MoxApoB-πρωτεϊνολιποσώματα και HoxApoB-πρωτεϊνολιποσώματα. Για την ενσωμάτωση της oxApoB σε λιποσώματα ακολουθήθηκε μία μέθοδος διαλυτοποίησης της oxApoB με χρήση απορρυπαντικού και ακόλουθη απομάκρυνσή του παρόμοια με αυτή των Lundberg και συν. [584]. Ως απορρυπαντικό χρησιμοποιήθηκε το octyl glucoside (OG) το οποίο επελέγη καθώς έχει δείχθει πως η χρήση του δεν επηρεάζει τη σύνδεση της oxApoB με τους υποδοχείς των μακροφάγων [321]. Η oxApoB ενσωματώθηκε μαζί με 1,2-διπαλμιτούλο-sn-γλυκερο-3-φωσφοχολίνη (1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine, DPPC) και χοληστερόλη (CHOL) σε πρωτεϊνολιποσώματα με αναλογία βάρους μεταξύ oxApoB:DPPC:CHOL 1:5:0,5. Σε προκαταρκτικά πειράματα αποδείχθηκε η επαναλήψιμη διατήρηση της αναλογίας μεταξύ oxApoB και λιπιδίων κατά την ολοκλήρωση της παρασκευής των πρωτεϊνολιποσωμάτων ενώ μετά από υπερφυγοκέντρωση αποδείχθηκε και το υψηλό ποσοστό διατήρησης της σταθερότητας του εναιωρήματος των MoxApoB- και HoxApoB-πρωτεϊνολιποσωμάτων. Σε επόμενη ομάδα πειραμάτων αποδείχθηκε η διατήρηση της ικανότητας σύνδεσης της ενσωματωμένης σε πρωτεϊνολιποσώματα oxApoB με τους υποδοχείς των μακροφάγων. Οι τιμές σύνδεσης και πρόσληψης σημασμένων με [¹⁴C]DPPC MoxApoB- και HoxApoB-πρωτεϊνολιποσωμάτων ήταν κατά πολύ μεγαλύτερες των αντίστοιχων τιμών των μη συνδεδεμένων με πρωτεΐνη λιποσωμάτων μαρτύρων οι οποίες ήταν αμελητέες, αποδεικνύοντας περαιτέρω πως η ακολουθούμενη μέθοδος παρασκευής των πρωτεϊνολιποσωμάτων πράγματι οδηγεί σε ενσωμάτωση της oxApoB σε αυτά. Η προσθήκη MoxLDL ως ανταγωνιστού ανέστειλε δόσοεξαρτώμενα τη σύνδεση και την πρόσληψη των MoxApoB πρωτεϊνολιποσωμάτων και το ίδιο συνέβη με την προσθήκη HoxLDL ως ανταγωνιστού στη σύνδεση και στην πρόσληψη των HoxApoB πρωτεϊνολιποσωμάτων, ενώ η προσθήκη LDL προκάλεσε μόνο μικρή αναστολή στη σύνδεση και στην πρόσληψη των MoxApoB και των HoxApoB πρωτεϊνολιποσωμάτων. Αντιθέτως, η προσθήκη LDL, MoxLDL ή HoxLDL δεν επηρέασε το ποσοστό της ραδιενέργειας που ανακτήθηκε στα κύτταρα στο τέλος της επώασης με σημασμένα μη

συνδεδεμένα με πρωτεΐνη λιποσώματα μάρτυρες. Η αναστολή της Lp-PLA₂ πριν από την οξείδωση της LDL δεν διαφοροποίησε τη σύνδεση και την πρόσληψη ούτε των MoxApoB-πρωτεϊνολιποσωμάτων ούτε και των HoxApoB-πρωτεϊνολιποσωμάτων. Επίσης η επώαση MoxLDL ή HoxLDL με refabloc μετά την ολοκλήρωση της οξείδωσης δεν μετέβαλε τη σύνδεση και την πρόσληψη των αντίστοιχων πρωτεϊνολιποσωμάτων, δεικνύοντας ότι το refabloc δεν έχει άμεση επίδραση στη σύνδεση – πρόσληψη της oxApoB μέσω της ενδεχόμενης σύνδεσής του με αμινομάδες της ApoB. Τα δεδομένα αυτά αποδεικνύουν ότι η ανευρεθείσα μείωση της σύνδεσης – πρόσληψης της oxLDL στα μακροφάγα που προκαλείται από τη δραστηριότητα της Lp-PLA₂ δεν οφείλεται σε μεταβολή της σύνδεσης – πρόσληψης μέσω της oxApoB.

III.3.5. Σύνδεση της oxPAPC και των μικρού μοριακού βάρους προϊόντων της υδρόλυσής της στην ApoB

Παράλληλα με τα στοιχεία που αναφέρθηκαν ήδη και τα οποία αφορούν στην ένωση οξειδωμένων φωσφολιπιδίων με την ApoB και στο ρόλο της ένωσης αυτής στην τροποποίηση της ApoB και στην ακόλουθη σύνδεσή της με τους υποδοχείς των μακροφάγων, υπάρχουν στοιχεία και για ανάλογη ένωση με την ApoB προϊόντων οξείδωσης λιπαρών οξέων. Έχει αποδειχθεί ότι προϊόντα οξείδωσης ελεύθερων λιπαρών οξέων όπως το αραχιδονικό, το λινελαϊκό και το λινολενικό, μπορούν να συνδέονται στην ApoB, τροποποιώντας τα κατάλοιπα λυσίνης και οδηγώντας σε ταχεία πρόσληψη από τα μακροφάγα [315]. Οξείδωση LDL μαζί με φωσφατιδυλοχολίνη που έφερε στην sn-2 θέση αλυσίδα αραχιδονικού σημασμένη με [¹⁴C], ανέδειξε στο πέρας της οξείδωσης ποσότητα β-ακτινοβολίας δεσμευμένη στην ApoB [322, 324]. Θεωρητικά, αυτό θα μπορούσε να οφείλεται όχι μόνο στη σύνδεση oxPAPC αλλά επίσης και στη σύνδεση υπολειμμάτων του αραχιδονικού στην sn-2 θέση τα οποία προκύπτουν από την οξείδωση του αραχιδονικού και τα οποία απελευθερώνονται από το μόριο της φωσφατιδυλοχολίνης με υδρόλυση από την Lp-PLA₂.

Μία εύλογη εξήγηση για την όμοια πρόσληψη της oxApoB από oxLDL(+) ή oxLDL(-) στα πειράματά μας θα μπορούσε να είναι το ότι τα μικρού μοριακού βάρους προϊόντα της υδρόλυσης της oxPC, τα οποία απελευθερώνονται από την sn-2 θέση από την Lp-PLA₂, είναι επίσης ικανά να τροποποιούν επαρκώς την ApoB. Εξετάσαμε εάν τα προϊόντα της υδρόλυσης οξειδωμένων φωσφολιπιδίων από την Lp-PLA₂ μπορούν να συνδεθούν στην ApoB. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε σαν υπόστρωμα [¹⁴C]PAPC της οποίας η σήμανση με ¹⁴C βρίσκεται στο 1ο άτομο άνθρακα της αλυσίδας του αραχιδονικού, το

εγγύτερο στο γλυκερινικό σκελετό, και έτσι τα μικρού μοριακού βάρους προϊόντα της υδρόλυσης είναι σημασμένα με ^{14}C . Η LDL περιέχει σημαντική ποσότητα PAPC και η oxPAPC αποτελεί υπόστρωμα της Lp-PLA₂. Μεταξύ των μορίων που προκύπτουν από την οξείδωση της PAPC, προκύπτουν και μόρια που περιέχουν στην sn-2 θέση υπολείμματα του αραχιδονικού τα οποία προκύπτουν από τον κατακερματισμό της αλυσίδας του αραχιδονικού κατά την οξείδωση. Κάποια από αυτά τα μόρια της oxPAPC με βραχύτερες αλυσίδες στην sn-2 θέση μετά από απόσπαση περιφερικού τμήματος της αλυσίδας αποτελούν υποστρώματα της Lp-PLA₂ [326, 327]. Από την υδρόλυση προκύπτουν lysoPAPC και μικρού μοριακού βάρους προϊόντα της υδρόλυσης που αποτελούν τις συνδεδεμένες αλυσίδες στην sn-2 θέση της oxPAPC οι οποίες αποκόπτονται από την Lp-PLA₂.

Για να απομονώσουμε τα μικρού μοριακού βάρους προϊόντα της υδρόλυσης έγινε μερικός καθαρισμός Lp-PLA₂ από LDL και η μερικώς καθαρισμένη Lp-PLA₂ επώαστηκε με ox[^{14}C]PAPC. Η Lp-PLA₂ στο πέρας της διαδικασίας καθαρισμού της είναι διαλυμένη σε ρυθμιστικό διάλυμα που περιέχει octyl glycoside (OG). Το OG, όπως έχει ήδη αναφερθεί, είναι ένα ήπιο απορρυπαντικό που δεν επηρεάζει τη δομή των πρωτεϊνών και έχει δείχθει πως η χρήση του δεν επηρεάζει τη σύνδεση της ApoB με τους υποδοχείς των μακροφάγων [321] και για τους λόγους αυτούς το OG επελέγη να χρησιμοποιηθεί, δεδομένου ότι η μερικώς καθαρισμένη Lp-PLA₂ θα χρησιμοποιηθεί στη συνέχεια σε πειράματα με LDL. Στο τελικό διάλυμα η ενζυμική δραστηριότητα ήταν ~ 36,5 φορές μεγαλύτερη από αυτή του αρχικού διαλύματος της LDL. Πρέπει να σημειωθεί πως δείξαμε πως το OG δεν επηρεάζει την ενζυμική δραστηριότητα της Lp-PLA₂ στην αραίωση που χρησιμοποιείται για τη μέτρηση της ενζυμικής δραστηριότητας της Lp-PLA₂ όπως επίσης και στη μετέπειτα επώαση με ox[^{14}C]PAPC. Με τη χρήση μερικώς καθαρισμένης Lp-PLA₂ επιτύχαμε υδρόλυση της ox[^{14}C]PAPC χρησιμοποιώντας Lp-PLA₂ από LDL και έχοντας ελαχιστοποιήσει το επιπρόσθετο πρωτεϊνικό φορτίο έτσι ώστε να ελαχιστοποιηθεί και η δυνητική πρόσδεση oxPAPC ή μικρού μοριακού βάρους προϊόντων της υδρόλυσης σε αυτό και να μην επηρεαστεί η μετέπειτα απομόνωσή τους.

Μετά από επώαση ox[^{14}C]PAPC με μερικώς καθαρισμένη Lp-PLA₂, τα μικρού μοριακού βάρους προϊόντα της υδρόλυσης απομονώθηκαν και αποδείχθηκε ότι μπορούν να συνδεθούν στην ApoB σχεδόν στον ίδιο βαθμό με την oxPAPC. Η συνδεδεμένη στην ApoB β-ακτινοβολία μετά από επώαση των μικρού μοριακού βάρους προϊόντων της υδρόλυσης με LDL ή LDL που είχε προεπωαστεί με refabloc (LDL+ref), ήταν μόνο κατά 10,2% και 13,8% μικρότερη αυτής που ανακτήθηκε με την ApoB μετά από επώαση με ox[^{14}C]PAPC

αντίστοιχα. Οι αντίστοιχες τιμές σύνδεσης των μικρού μοριακού βάρους προϊόντων της υδρόλυσης είτε της ox[¹⁴C]PAPC όταν επώαστηκαν με oxLDL ή ox(LDL + ref) ήταν πολύ μικρότερες πιθανότατα λόγω του ότι οι υπεύθυνες για τη σύνδεση θέσεις της oxApoB είχαν ήδη καταληφθεί από μόρια που παράχθηκαν κατά τη διάρκεια της οξειδωσης. Επίσης πολύ μικρότερες ήταν οι τιμές σύνδεσης που προέκυψαν με την επώαση μη οξειδωμένης [¹⁴C]PAPC. Τέλος, η προσθήκη του refabloc στο πέρας της επώασης της ox[¹⁴C]PAPC με LDL ή με oxLDL δεν επέφερε καμία διαφοροποίηση, δεικνύοντας ότι το refabloc δεν επηρεάζει άμεσα, μέσω πιθανής σύνδεσής του με την ApoB ή την oxApoB, τη σύνδεση της ox[¹⁴C]PAPC ή των σημασμένων μικρού μοριακού βάρους προϊόντων της υδρόλυσης.

Το δεδομένο της ικανής σύνδεσης των σημασμένων μικρού μοριακού βάρους προϊόντων της υδρόλυσης με την ApoB θα μπορούσε να στηρίζει τουλάχιστον ως μερική εξήγηση για την όμοια σύνδεση - πρόσληψη από τα μακροφάγα της oxApoB από oxLDL(+) ή oxLDL(-), το ότι τα μικρού μοριακού βάρους προϊόντα της υδρόλυσης προκαλούν παρόμοια τροποποίηση της oxApoB με αυτή που προκαλεί η οξειδωμένη φωσφατιδυλοχολίνη από την υδρόλυση της οποίας προέρχονται. Όμως, θα πρέπει να ληφθεί υπόψιν το ότι τα μικρού μοριακού βάρους προϊόντα της υδρόλυσης αναμένεται να είναι υδρόφιλα και πως οι πειραματικές συνθήκες απέκλειαν τη διάχυσή τους. Αυτό πιθανώς δεν προσομοιώνει τις πραγματικές συνθήκες της οξειδωσης της LDL στο αρτηριακό τοίχωμα όπου αυτά τα μόρια θα μπορούσαν να διαχυθούν μακριά από την LDL και/ή να συνδεθούν σε άλλες πρωτεΐνες όπως η αλβουμίνη η οποία είναι γνωστό ότι διαθέτει θέσεις σύνδεσης για λιπαρά οξέα [333].

III.3.6. Επίδραση της Lp-PLA₂ στη σύνδεση και στην πρόσληψη στα μακροφάγα της MoxLDL και της HoxLDL μέσω της λιπιδικής τους ομάδας

Εκτός από την ApoB και η λιπιδική ομάδα της oxLDL είναι επίσης σημαντική για την πρόσληψη της oxLDL από τα μακροφάγα. Όπως έχει ήδη αναφερθεί, αρκετές μελέτες έχουν δείξει ότι τα λιπίδια της oxLDL μπορούν να μεσολαβούν στη σύνδεση της oxLDL στους υποδοχείς των μακροφάγων. Λιποσώματα που παρασκευάστηκαν από τα λιπίδια από oxLDL μπορούσαν να συνδεθούν σε μακροφάγα και επίσης να ανταγωνιστούν στη σύνδεση την ακέραιη oxLDL και τη διαλυτοποιημένη ApoB που είχε απομονωθεί από oxLDL [328, 329, 334]. Λιποσώματα που περιείχαν oxPAPC όπως επίσης και POVPC ενωμένη με αλβουμίνη αποδείχτηκαν ισχυροί ανταγωνιστές για τη σύνδεση τόσο της ακέραιης oxLDL όσο και των λιποσωμάτων από τα εκχυλισθέντα λιπίδια της oxLDL, ενώ και η χρήση μονοκλωνικού αντίσωματος εναντίον της oxPAPC και της POVPC ανέστειλε σε μεγάλο βαθμό τη σύνδεση τόσο της ακέραιης oxLDL όσο και των λιπιδίων της oxLDL [328, 329, 334, 335].

Στην εργασία μας μελετήθηκε η επίδραση της δραστηριότητας της Lp-PLA₂ στη σύνδεση και στην πρόσληψη των oxLDL μέσω της λιπιδικής τους ομάδας. Χρησιμοποιήθηκαν σημασμένα με [¹⁴C]DPPC λιποσώματα τα οποία παρασκευάστηκαν από λιπίδια LDL(+ ή -) ή MoxLDL(+ ή -) ή HoxLDL(+ ή -). Το πρότυπο σύνδεσης - πρόσληψης των λιποσωμάτων από λιπίδια LDL(+ ή -), MoxLDL(+ ή -) και HoxLDL(+ ή -) ήταν παρόμοιο με αυτό της σύνδεσης - πρόσληψης των αντίστοιχων λιποπρωτεϊνών LDL(+ ή -), MoxLDL(+ ή -) και HoxLDL(+ ή -). Η αναστολή της δραστηριότητας της Lp-PLA₂ οδήγησε σε αύξηση της σύνδεσης και της πρόσληψης κατά ~ 40% των λιποσωμάτων από λιπίδια των MoxLDL και κατά ~ 30% των λιποσωμάτων από λιπίδια των HoxLDL. Τα αποτελέσματα αυτά, σε συνδυασμό με την απουσία διαφοράς στη σύνδεση - πρόσληψη των oxApoB πρωτεϊνολιποσωμάτων, δείχνουν ισχυρά τη λιπιδική ομάδα ως υπεύθυνη για την αύξηση της σύνδεσης και της πρόσληψης της oxLDL όταν η ενζυμική δραστηριότητα της Lp-PLA₂ έχει ανασταλεί πριν από την οξειδωση. Η διαφορά στη σύνδεση - πρόσληψη μεταξύ των λιποσωμάτων από τα λιπίδια της MoxLDL(-) και της MoxLDL(+) ήταν μεγαλύτερη από αυτή μεταξύ των λιποσωμάτων από τα λιπίδια της HoxLDL(-) και της HoxLDL(+) όπως αντίστοιχα συνέβη και στη σύνδεση - πρόσληψη των ακέραιων λιποπρωτεϊνών. Όπως αναφέρθηκε ανωτέρω σχετικά με τη σύνδεση-πρόσληψη των ακέραιων λιποπρωτεϊνών, είναι πιθανό σε παρατεταμένη οξειδωση η συνεχιζόμενη παραγωγή οξειδωμένων μορίων, όταν πλέον η δραστηριότητα της Lp-PLA₂ έχει σημαντικά μειωθεί, να τείνει να μειώσει το αρχικό αποτέλεσμα καθώς η αρχική διαφορά μεταξύ LDL(+) και LDL(-) δηλαδή η παρουσία ενζυμικής δραστηριότητας Lp-PLA₂ στην LDL(+) τείνει να εξαλειφθεί λόγω της προοδευτικής αδρανοποίησης του ενζύμου προϊούσας της οξειδωσης. Οι αυξήσεις που παρατηρήθηκαν στη σύνδεση - πρόσληψη των λιποσωμάτων από τα λιπίδια MoxLDL και HoxLDL μετά από αναστολή της Lp-PLA₂ ήταν μεγαλύτερες από τις αντίστοιχες που παρατηρήθηκαν στη σύνδεση - πρόσληψη των ακέραιων λιποπρωτεϊνών MoxLDL και HoxLDL (~ 30% και ~ 20% αντίστοιχα). Αυτό είναι συμβατό με το ότι η σύνδεση - πρόσληψη μέσω της oxApoB δεν έχει διαφοροποιηθεί καθώς η όμοια σύνδεση - πρόσληψη της oxLDL μέσω της oxApoB μετριάξει την αύξηση που τείνει να δημιουργηθεί από την αυξημένη σύνδεση - πρόσληψη της oxLDL μέσω της λιπιδικής ομάδας.

III.3.7. Ρόλος της οξειδωμένης φωσφατιδυλοχολίνης και της λυσοφωσφατιδυλοχολίνης στη σύνδεση και στην πρόσληψη της oxLDL στα μακροφάγα

Η φωσφατιδυλοχολίνη αποτελεί ένα μείζον συστατικό του λιπιδικού τμήματος της LDL (II.2.3.1. Φυσική LDL). Έχει δειχθεί ότι οξειδωμένα φωσφολιπίδια που προέρχονται από την

οξειδωση της PAPC και της PLPC έχουν την ικανότητα να δρουν σαν υψηλής συγγένειας συνδέτες για αναγνώριση από το CD36 εκκαθαριστή υποδοχέα και μπορούν να ανταγωνιστούν την oxLDL στη σύνδεση στα μακροφάγα [328, 329, 334, 338, 340]. Μεταξύ αυτών η POVPC η οποία προέρχεται από την οξειδωση της PAPC, είναι αυτή που έχει περισσότερο μελετηθεί. Πρέπει να σημειωθεί ότι έχει αποδειχθεί ότι η Lp-PLA₂ υδρολύει αποτελεσματικά την POVPC [326, 327]. Επιπλέον, η δομή αρκετών υψηλής συγγένειας συνδετών για τον εκκαθαριστή υποδοχέα CD36, οι οποίοι προέρχονται από την οξειδωση της PAPC και της PLPC έχει πλήρως προσδιοριστεί [340]. Αυτοί περιλαμβάνουν όχι μόνο την POVPC αλλά επίσης μία σειρά από μόρια με αλυσίδα 8 ατόμων άνθρακα στην sn-2 θέση στην περίπτωση της oxPAPC και 12 ατόμων άνθρακα στην sn-2 θέση στην περίπτωση της oxPLPC. Δεν μπορούμε να αποκλείσουμε την πιθανότητα κάποια από αυτά τα μόρια να αποτελούν υποστρώματα της Lp-PLA₂, ιδιαίτερα όσον αφορά στα αναφερθέντα παράγωγα της οξειδωσης της PAPC, καθώς έχει αποδειχθεί ότι ορισμένα οξειδωμένα φωσφολιπίδια με αλυσίδες μακρύτερες των 6 ατόμων άνθρακα στην sn-2 θέση όπως η 1 – παλμιτοϋλο – 2 - (9 - αλδο-εννεανούλο) - sn -γλυκερο – 3 - φωσφοχολίνη (1 – palmitoyl – 2 - (9 - oxononanoyl) – sn –glycero – 3 - phosphocholine), αποτελούν υπόστρωμά της [326].

Στα πειράματα της ενότητας αυτής χρησιμοποιήθηκαν σημασμένα με [¹⁴C]DPPC λιποσώματα τα οποία παρασκευάστηκαν με συνδυασμό διαφόρων συνθετικών φωσφολιπιδίων (οξειδωμένων ή μη) και χοληστερόλης με διατήρηση πάντοτε σταθερής της μοριακής αναλογίας μεταξύ του συνόλου των φωσφολιπιδίων και της χοληστερόλης σε 2:1 (ολικά φωσφολιπίδια/χοληστερόλη 2:1, mol/mol). Η αναλογία αυτή μεταξύ φωσφολιπιδίων και χοληστερόλης είναι η συνηθέστερα χρησιμοποιούμενη στη βιβλιογραφία [328, 334, 339].

Στα λιποσώματα που περιείχαν ακόρεστα φωσφολιπίδια ή οξειδωμένα ή λυσο παράγωγά τους ή συνδυασμούς τους, τα φωσφολιπίδια αυτά αποτελούσαν τα 3/10 της συνολικής ποσότητας φωσφολιπιδίων (μοριακή αναλογία) ενώ το υπόλοιπο μέρος συμπληρώθηκε με DPPC. Η αναλογία αυτή τηρήθηκε καθώς αφενός η DPPC δεν έχει την ικανότητα σύνδεσης σε υποδοχείς και αφετέρου προσομοιώνει αδρά τη συμμετοχή των διαφόρων μορίων PC με ακόρεστες αλυσίδες στην sn-2 θέση, στο σύνολο της PC (βλέπε II.2.3.1. Φυσική LDL). Στην περίπτωση λιποσωμάτων που περιείχαν οξειδωμένα ακόρεστα φωσφολιπίδια η αντικατάσταση μέρους ή ολόκληρης της ποσότητας του οξειδωμένου ακόρεστου φωσφολιπιδίου από το αντίστοιχο λυσο παράγωγο σε άλλη παρασκευή λιποσωμάτων προσομοίωνε το αποτέλεσμα της υδρόλυσης μέρους ή ολόκληρης της ποσότητας του οξειδωμένου ακόρεστου φωσφολιπιδίου.

Καθώς οι λιπαρές αλυσίδες του αραχιδονικού, του λινελαϊκού, του ελαϊκού και του παλμιτικού αποτελούν τις κύριες λιπαρές αλυσίδες που περιέχονται στην LDL (βλέπε II.2.3.1. Φυσική LDL) και προκειμένου να διερευνήσουμε περαιτέρω την αύξηση της σύνδεσης – πρόσληψης της oxLDL η οποία προκαλείται από την αναστολή της Lp-PLA₂, εξετάσαμε την ικανότητα σύνδεσης και πρόσληψης της oxPAPC, της oxPLPC, της oxDOPC και των αντίστοιχων λυσο-παραγώγων lysoPAPC * και lysoDOPC. Η PAPC και η PLPC περιέχουν αντίστοιχα τις πολυακόρεστες λιπαρές αλυσίδες του αραχιδονικού και του λινελαϊκού στην sn-2 θέση, ενώ στην sn-1 φέρουν την κεκορεσμένη λιπαρή αλυσίδα του παλμιτικού ενώ η DOPC φέρει τη μονοακόρεστη λιπαρή αλυσίδα του ελαϊκού στην sn-1 και στην sn-2 θέση.

Όπως και στις προηγούμενες ομάδες πειραμάτων, και σε αυτή τα αποτελέσματα των πειραμάτων πρόσληψης στους 37⁰C ήταν συγκρίσιμα με αυτά που ελήφθησαν στα πειράματα σύνδεσης στους 4⁰C, μία θερμοκρασία που ελαχιστοποιεί την πιθανότητα μη ειδικής σύνδεσης των λιποσωμάτων, όπως σύντηξη των λιποσωμάτων στην κυτταρική μεμβράνη, στα κύτταρα. Η σύνδεση και η πρόσληψη των λιποσωμάτων που περιείχαν οξειδωμένα ακόρεστα φωσφολιπίδια υπερέιχαν της σύνδεσης και της πρόσληψης των λιποσωμάτων που περιείχαν τα αντίστοιχα μη οξειδωμένα ακόρεστα φωσφολιπίδια. Τα oxPAPC λιποσώματα παρουσίασαν υψηλές τιμές σύνδεσης και πρόσληψης που έφθασαν περίπου στα 2/3 των αντίστοιχων τιμών των λιποσωμάτων από HoxLDL(-) λιπίδια. Η αντικατάσταση μέρους ή ολόκληρης της ποσότητας της oxPAPC από lysoPAPC οδήγησε σε κλιμακούμενη πτώση των τιμών σύνδεσης και πρόσληψης, δεικνύοντας ότι η υδρόλυση της oxPAPC οδηγεί σε μείωση της ικανότητας σύνδεσης με τους υποδοχείς των μακροφάγων, αποτέλεσμα που είναι συμβατό με τη μείωση της σύνδεσης-πρόσληψης των oxLDL και των λιποσωμάτων από λιπίδια των oxLDL που παρατηρήθηκε στις προηγούμενες ομάδες πειραμάτων όταν η δραστηριότητα της Lp-PLA₂ ήταν παρούσα κατά τη διάρκεια της οξείδωσης. Τα oxPLPC λιποσώματα και τα λυσοPC λιποσώματα παρουσίασαν σημαντικά μικρότερη σύνδεση και πρόσληψη φθάνοντας περίπου στο 30% των αντίστοιχων τιμών των oxPAPC λιποσωμάτων. Τα αποτελέσματα αυτά είναι σύμφωνα με τα δεδομένα που αναφέρθηκαν ανωτέρω όσον αφορά στην ισχυρή συγγένεια της oxPAPC με τους υποδοχείς των μακροφάγων.

* Η PAPC και η PLPC έχουν ως κοινό λυσο-παραγόγο την 1-palmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine η οποία φέρει την κεκορεσμένη λιπαρή αλυσίδα του παλμιτικού στην sn-1 θέση ενώ η πολυακόρεστη λιπαρή αλυσίδα του αραχιδονικού ή του λινελαϊκού στην sn-2 θέση έχει αντικατασταθεί από -OH. Για λόγους ευκολίας της παρουσίασης των αποτελεσμάτων χρησιμοποιείται μόνον η συντομογραφία lysoPAPC.

Σε αντίθεση με την oxPAPC για την οποία υπάρχουν τα περισσότερα δεδομένα στη βιβλιογραφία, τα δεδομένα για την oxPLPC είναι περιορισμένα. Από τα ποικίλα μόρια που προκύπτουν από την οξείδωση και των οποίων η δομή προσδιορίστηκε, κάποια βρέθηκε να έχουν υψηλή ικανότητα σύνδεσης σε κυτταρική σειρά με υψηλή έκφραση του εκκαθαριστή υποδοχέα CD36 [340]. Στην εργασία μας, η σύνδεση – πρόσληψη των oxPLPC λιποσωμάτων υπολειπόταν κατά πολύ της αντίστοιχης των oxPAPC λιποσωμάτων φθάνοντας περίπου στο 1/3 αυτής. Μία πιθανή εξήγηση θα μπορούσε να είναι το ότι ποσοτικά η παραγωγή τέτοιων μορίων με υψηλή συνδετική ικανότητα κατά την οξείδωση της PLPC δεν είναι τόση ώστε να οδηγήσει σε μεγάλες αυξήσεις στη σύνδεση – πρόσληψη του συνόλου της οξειδωμένης PLPC, ενώ μία άλλη εξήγηση θα μπορούσε να αφορά σε διαφορές στο είδος των κυττάρων και στη διαφορετική έκφραση υποδοχέων.

Η σύνδεση και η πρόσληψη των oxDOPC λιποσωμάτων ήταν ακόμη μικρότερη, ενώ η σύνδεση και η πρόσληψη των λιποσωμάτων που περιείχαν μόνο DPPC σαν φωσφολιπίδιο ήταν αμελητέα. Τα lysoDOPC και oxlysoDOPC λιποσώματα παρουσίασαν ελαφρώς μεγαλύτερες τιμές σύνδεσης και πρόσληψης σε σχέση με τα oxDOPC λιποσώματα, καταδεικνύοντας ότι η λυσο μορφή πιθανώς είναι σημαντικότερος παράγοντας σύνδεσης – πρόσληψης από την παρουσία παραγώγου οξείδωσης ολεϊκού στις sn-1 και sn-2 θέσεις. Η οξείδωση του ελαϊκού στην sn-1 θέση δεν φάνηκε να επηρεάζει τη σύνδεση – πρόσληψη των λιποσωμάτων όπως καταδείχθηκε από την μη ύπαρξη διαφοράς στις τιμές σύνδεσης – πρόσληψης μεταξύ lysoDOPC και oxlysoDOPC.

Η ικανότητα των λιποσωμάτων να ανταγωνίζονται στη σύνδεση και στην πρόσληψη την ακέραιης oxLDL ή τα λιποσώματα από τα λιπίδια των oxLDL ήταν ανάλογη της συνδετικής τους ικανότητάς όπως αυτή καταδείχτηκε στα πειράματα που εξέτασαν άμεσα τη σύνδεση και την πρόσληψή τους. Τα oxPAPC λιποσώματα αποδείχτηκαν ο ισχυρότερος ανταγωνιστής αναστέλλοντας τη σύνδεση και την πρόσληψη της MoxLDL(+) και των λιποσωμάτων από τα λιπίδια από MoxLDL(+) περίπου κατά 70 – 80%. Αντίστοιχα oxLDL(+) και λιποσώματα από τα λιπίδια των oxLDL(+) ανέστειλαν ισχυρά τη σύνδεση και την πρόσληψη των oxPAPC, oxPLPC και lysoPAPC λιποσωμάτων, με υπεροχή της αναστολής από τη HoxLDL(+) και από τα λιποσώματα από τα λιπίδιά της. Αντίθετα η LDL(+) και τα λιποσώματα από τα λιπίδια της LDL(+) δεν ανέδειξαν παρά ελάχιστη ικανότητα αναστολής. Ισχυρή ικανότητα αναστολής ανέδειξε επίσης η χρησιμοποίηση για κάθε λιπόσωμα από τα oxPAPC-, oxPLPC- και lysoPAPC- λιποσώματα, όμοιων μη σημασμένων λιποσωμάτων. Τα αποτελέσματα αυτά αποδεικνύουν ότι η σύνδεση – πρόσληψη των oxPAPC-, oxPLPC- και lysoPAPC- λιποσωμάτων γίνεται μέσω υποδοχέων

καθώς και ότι αυτά μοιράζονται κοινούς υποδοχείς για τη σύνδεση και την πρόσληψή τους από τα μακροφάγα με τις oxLDL καθώς και με τα λιποσώματα από τα λιπίδια των oxLDL. Η oxPAPC έδειξε στα προηγούμενα πειράματα μακράν την ισχυρότερη ικανότητα σύνδεσης με τους υποδοχείς των μακροφάγων αναδεικνύοντας δυνητικά την περιεκτικότητα των oxLDL σε oxPAPC σε παράγοντα που καθορίζει την ικανότητα σύνδεσής τους με τους υποδοχείς των μακροφάγων. Προκειμένου το συμπέρασμα αυτό να ενισχυθεί περαιτέρω, εκτιμήθηκε επιπλέον η ικανότητα των oxPAPC-λιποσωμάτων να ανταγωνίζονται στη σύνδεση και στην πρόσληψη τα λιποσώματα από λιπίδια MoxLDL(-) τα οποία λόγω της αναστολής της Lp-PLA₂ έχουν αυξημένη περιεκτικότητα σε οξειδωμένα φωσφολιπίδια. Και στη σειρά αυτή πειραμάτων τα oxPAPC λιποσώματα έδειξαν ισχυρή ανασταλτική ικανότητα σε αντίθεση με τη χρησιμοποίηση PAPC-λιποσωμάτων που δεν εμφάνισε αξιόλογη επίδραση.

Η lysoPC ανέδειξε στα πειράματά μας μία μικρή σε σχέση με την oxPAPC, αλλά αξιοσημείωτη ικανότητα σύνδεσης – πρόσληψης από τα μακροφάγα. Η σημαντική αναστολή της σύνδεσης – πρόσληψής της από τις oxLDL, από λιποσώματα από τα λιπίδια των oxLDL και από όμοια παρασκευή μη σημασμένων lysoPC λιποσωμάτων, καθώς και ο πολύ μικρός βαθμός αναστολής από LDL και τα λιποσώματα από τα λιπίδια LDL, δεικνύουν πρόσληψη της lysoPC μέσω υποδοχέων και πως οι υποδοχείς αυτοί αναγνωρίζουν επίσης τη λιπιδική ομάδα των oxLDL. Πριν μία δεκαετία ένας συνδεδεμένος με πρωτεΐνη G υποδοχέας, ο G2A, ανιχνεύθηκε σαν ένας υποδοχέας υψηλής συγγένειας για τη lysoPC [480]. Ο υποδοχέας αυτός δείχθηκε ότι εκφράζεται σε ανθρώπινα μακροφάγα και βρέθηκε σε αφθονία σε αθηροσκληρυντικές πλάκες σε ανθρώπινες στεφανιαίες αρτηρίες όπως επίσης και σε αθηροσκληρυντικές βλάβες σε αορτή από ApoE^{-/-} ποντίκια και κουνέλια Watanabe με κληρονομική υπερλιπιδαιμία, εκφραζόμενος κυρίως στα μακροφάγα [480]. Ο G2A βρέθηκε να μεσολαβεί σε διέγερση των μακροφάγων και σε χημειοταξία των T λεμφοκυττάρων [470, 484]. Η ανάπτυξη αθηροσκλήρυνσης στην αορτή μειώθηκε σημαντικά σε G2A^{-/-} / LDLR^{-/-} ποντίκια σε σύγκριση με αυτή σε G2A^{+/+} / LDLR^{-/-} ποντίκια [471]. Δεν υπάρχουν προς το παρόν εργασίες που να έχουν εξετάσει το εάν η αναγνώριση της lysoPC η οποία είναι ενσωματωμένη στην oxLDL από τον G2A υποδοχέα μπορεί να οδηγήσει σε πρόσληψη της oxLDL από τα μακροφάγα.

Στην εργασία μας, όταν το ήμισυ της ποσότητας της oxPAPC αντικαταστάθηκε από lysoPAPC, αυτά τα oxPAPC – lysoPAPC λιποσώματα διατήρησαν ~ 70% της σύνδεσης και της πρόσληψης των oxPAPC λιποσωμάτων και αυτό καθιστά εύλογη την υπόθεση ότι η μερική διατήρηση της oxPAPC μπορεί να διατηρήσει έναν υψηλό ρυθμό σύνδεσης –

πρόσληψης. Συμπερασματικά, μπορούμε να υποθέσουμε ότι η οξείδωση της PC της LDL παράγει μόρια τα οποία δρουν ως συνδέτες για τους υποδοχείς των μακροφάγων. Κάποια από τα μόρια αυτά και ιδιαίτερα αυτά με κατακερματισμένες οξειδωμένες ακυλ-αλυσίδες στην sn-2 θέση, όπως η POVPC, αποτελούν υποστρώματα της Lp-PLA₂. Η υδρόλυση των μορίων αυτών μπορεί να εξηγήσει τη μειωμένη σύνδεση – πρόσληψη της oxLDL όταν η δραστηριότητα της Lp-PLA₂ είναι παρούσα κατά τη διάρκεια της οξείδωσης. Δείξαμε επίσης ότι η oxPAPC είναι ιδιαίτερα ισχυρός συνδέτης για τους υποδοχείς των μακροφάγων, σε συμφωνία με τα προηγουμένως δημοσιευθέντα δεδομένα, και αυτό, σε συνδυασμό με δεδομένα που υπάρχουν σχετικά με το ότι προϊόντα οξείδωσης της PAPC αποτελούν υποστρώματα της Lp-PLA₂, δείχνει ότι η oxPAPC κατέχει ένα κυρίαρχο ρόλο στο μηχανισμό που οδηγεί σε μείωση της σύνδεσης – πρόσληψης της oxLDL στα μακροφάγα όταν είναι παρούσα η δραστηριότητα της Lp-PLA₂.

III.3.8. Συνολική θεώρηση της σημασίας των αποτελεσμάτων

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της εργασίας μας μπορούμε να υποθέσουμε ότι η υδρόλυση μορίων oxPC από την Lp-PLA₂ οδηγεί σε μειωμένη σύνδεση – πρόσληψη της oxLDL μέσω της λιπιδικής της ομάδας στα μακροφάγα. Η διατηρημένη αναγνώριση μέσω της ApoB, η παραγωγή οξειδωμένων φωσφολιπιδίων με μακρές αλυσίδες στην sn-2 θέση (τα οποία μπορούν να δράσουν σαν συνδέτες με τους υποδοχείς των μακροφάγων αλλά είναι λιγότερα ευαίσθητα στη δράση της Lp-PLA₂), και η προοδευτική απώλεια της δραστηριότητάς της Lp-PLA₂ τείνουν να εξασθενίσουν τη διαφορά μεταξύ των oxLDL(+) και oxLDL(-) όσον αφορά στη σύνδεση και στην πρόσληψή τους.

Το ερώτημα που προκύπτει είναι εάν η μείωση της σύνδεσης – πρόσληψης της oxLDL στα μακροφάγα, που προκαλείται από την παρουσία της δραστηριότητας της Lp-PLA₂, θα μπορούσε να θεωρηθεί σαν προστατευτική ή σαν επιβλαβής όσον αφορά στην ανάπτυξη της αθηροσκλήρυνσης. Όπως έχει ήδη αναφερθεί παραπάνω, η λιπιδική ομάδα της oxLDL μπορεί να συνδέεται σε εκκαθαριστές υποδοχείς και μόρια oxPC φαίνεται να παίζουν τον πρωτεύοντα ρόλο σε αυτό. Μόρια που προκύπτουν από την οξείδωση της PAPC και της PLPC αποδείχτηκαν ισχυροί συνδέτες για τον CD36. Ως εκ τούτου η συμμετοχή μορίων oxPC στη σύνδεση με εκκαθαριστές υποδοχείς και την επακόλουθη πρόσληψη της oxLDL, μπορεί να θεωρηθεί πως συνδέει την oxPC με το πλήθος των αθηρογόνων επιδράσεων της oxLDL οι οποίες σχετίζονται είτε με την υπερφόρτωση σε χοληστερόλη και το σχηματισμό των αφρωδών κυττάρων είτε με αθηρογόνους δράσεις που εκκινούν από εκκαθαριστές υποδοχείς ή από την αλληλεπίδραση εκκαθαριστών υποδοχέων και TLRs. Έχουν περιγραφεί

διάφορες σηματοδοτικές οδοί οι οποίες ξεκινούν από τους εκκαθαριστές υποδοχείς και οι οποίες οδηγούν σε προσκόλληση και μετανάστευση μονοκυττάρων, παραγωγή ROS, φλεγμονή και απόπτωση [77]. Ειδικότερα η σύνδεση oxLDL στον εκκαθαριστή υποδοχέα CD36 συνοδεύεται εκτός από το σχηματισμό αφρωδών κυττάρων [80, 98, 148] και από πλήθος άλλων δράσεων, όπως την αύξηση παραγωγής ROS [96, 133], την παραγωγή κυτταροκινών TNF α / β , IL-1, IFN γ [149] και της χημειοκίνης MCP-1 [133], και τη μείωση της απομάκρυνσης των μακροφάγων από τη θέση ανάπτυξης βλάβης [87, 150] καθώς και την επαγωγή απόπτωσής τους [151], ενώ σημαντικό ρόλο φαίνεται να έχει και η αλληλεπίδραση του CD36 με TLRs [228-230]. Επιπλέον, μελέτες σε μοντέλα ανάπτυξης αθηροσκλήρυνσης σε πειραματόζωα τεκμηριώνουν τον αθηρογόνο ρόλο του CD36 [133, 154, 155]. Μελέτες εστιασμένες στην επίδραση της oxPC οι οποίες στην πλειονότητά τους αφορούσαν την oxPAPC ή συγκεκριμένα μόρια που προέρχονται από την οξείδωση της PAPC, ανέδειξαν πλήθος δράσεων στα κύτταρα που παίζουν ρόλο στην ανάπτυξη της αθηρωμάτωσης (βλέπε II.3.4.2.A1. Οξειδωμένη φωσφατιδυλοχολίνη και αθηροσκλήρυνση). Συγκεκριμένα, όσον αφορά στα μακροφάγα, πέραν των στοιχείων που αφορούν στην πρόσληψη της oxLDL και στην οποία φαίνεται ότι παίζουν ρόλο προϊόντα οξείδωσης της PAPC και της PLPC [340, 390, 414], η επίδραση της oxPAPC είτε μεμονωμένων προϊόντων της οξείδωσης της PAPC (POVPC, KDdia-PC) οδηγεί σε επαγωγή της φλεγμονής με παραγωγή COX-1 και 2, λιποξυγενάσης 5, των κυτταροκινών IL-1 β , IL-8, TNF α και των χημειοκινών MCP-1 και MIP2 [415-417] καθώς και σε επαγωγή της μείωσης της εφεροκυττάρωσης και της απόπτωσης [230, 283]. Επιπλέον, ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η επαγωγή από την επίδραση της oxPAPC του φαινοτύπου Mox στα μακροφάγα, ενός φαινοτύπου με σημαντική παρουσία σε αθηρωματικές βλάβες (βλέπε II.1.3.3.A1.ε. Διαφοροποίηση μακροφάγων – υποπληθυσμοί μακροφάγων) [241]. Τα μακροφάγα με το φαινότυπο αυτό παρουσιάζουν σημαντική έκφραση IL-1 β και COX-2, μειωμένη ικανότητα μετανάστευσης που οδηγεί σε παγίδευσή τους στη θέση βλάβης, μειωμένη ικανότητα φαγοκυττάρωσης, αλλά και αυξημένη έκφραση HO-1 και VEGF. Ο ακριβής ρόλος του φαινοτύπου αυτού δεν έχει ακόμη καθοριστεί. Επίσης στα πλαίσια εξέτασης του γενικότερου ρόλου της Lp-PLA $_2$ στην αθηρογένεση πρέπει να αναφερθεί πως και ο PAF, ο οποίος παράγεται κατά την οξείδωση της LDL, εξασκεί αθηρογόνους δράσεις επιδρώντας μέσω του υποδοχέα του PAF σε διάφορους κυτταρικούς πληθυσμούς που συμμετέχουν στην ανάπτυξη της αθηροσκλήρυνσης (βλέπε II.3.4.2.B. Ρόλος του PAF, μορίων παρόμοιων του PAF και του υποδοχέα του PAF στην αθηροσκλήρυνση). Ειδικότερα στα μακροφάγα ο PAF έχει βρεθεί να επάγει την έκφραση της χημειοκίνης MCP-1, των

υποδοχέων χημειοκινών CCR2 και CX3CR1, των κυτταροκινών IL-1α και β και TNFα, του υποδοχέα 1 της ATII, των COX-1 και -2, της MMP-13 αλλά και του ιστικού αναστολέα MMPs, TIMP-4, καθώς και την παραγωγή του αυξητικού παράγοντα HB-EGF [416, 500]. Συμπερασματικά, ένα πλήθος στοιχείων υποστηρίζει ότι η υδρόλυση από την Lp-PLA₂ ενός συνόλου υποστρωμάτων τα οποία περιλαμβάνουν μόρια oxPC και ιδιαίτερα της oxPAPC, τον PAF και άλλα μόρια με δομή παρόμοια του PAF, αναστέλλει σημαντικές αθηρογενετικές δράσεις και ως εκ τούτου θα μπορούσε να θεωρηθεί ως αθηροπροστατευτική. Από την άλλη πλευρά, και η lysoPC εμπλέκεται στην ανάπτυξη της αθηροσκλήρυνσης εξασκώντας πλήθος επιδράσεων σε όλους του κυτταρικούς πληθυσμούς της θέσης ανάπτυξης της βλάβης (βλέπε II.3.4.2.A2 Λυσοφωσφατιδυλοχολίνη και αθηροσκλήρυνση). Ειδικότερα η επίδραση lysoPC στα μακροφάγα έχει δειχθεί ότι επάγει την παραγωγή ROS [95, 453] αλλά και την έκφραση της SOD [454], την παραγωγή των κυτταροκινών IL-1β, IL-6, IL-8, TNFα [375, 453] και των χημειοκινών MCP-1 και CCL5 [453]. Επίσης επάγει τη διαφοροποίηση των μονοκυττάρων σε μακροφάγα [458] και τον πολλαπλασιασμό των μακροφάγων [237-239] ενώ αναφέρεται και κυτταροτοξική δράση σε αυτά [453], ενώ τέλος σημαντική για την ανάπτυξη της βλάβης θεωρείται και η επαγωγή της παραγωγής αυξητικών παραγόντων όπως των GM-CSF, HB-EGF, VEGF [137, 459, 460]. Εξάλειψη του υποδοχέα G2A ο οποίος αναγνωρίζει την lysoPC σε υπερλιπιδαιμικά ποντίκια συνοδεύτηκε από μείωση της ανάπτυξης αθηροσκλήρυνσης [471].

Μέχρι τώρα δεν υπάρχουν δεδομένα που να υποδεικνύουν ποιές επιδράσεις στα μακροφάγα, αυτές των υποστρωμάτων της Lp-PLA₂ δηλαδή της oxPC και του PAF από τη μία πλευρά ή αυτές της lysoPC που παράγεται από τη δράση του ενζύμου από την άλλη πλευρά, είναι σημαντικότερες όσον αφορά στην πρόοδο της αθηροσκληρωτικής βλάβης. Εξετάζοντας τις επιδράσεις της oxPC, μπορούμε να θεωρήσουμε τη μειωμένη αναγνώριση της oxLDL η οποία προκαλείται από τη δραστηριότητα της Lp-PLA₂, ως ωφέλιμη. Αντιθέτως, εάν θεωρήσουμε τη lysoPC ως περισσότερο επιβλαβή, μπορούμε να συμπεράνουμε ότι η μείωση της σύνδεσης - πρόσληψης κατά 30% της MoxLDL(+) και 20% της HoxLDL(+) που προκαλείται από τη δραστηριότητα της Lp-PLA₂, είναι πολύ περιορισμένη για να αντιρροπήσει τη δράση της κατά ~ 4 και ~ 5,5 φορές μεγαλύτερης ποσότητας lysoPC που περιέχουν αντίστοιχα η MoxLDL(+) και η HoxLDL(+), ως αποτέλεσμα της υδρόλυσης oxPC από την Lp-PLA₂, και επομένως η υδρόλυση από τη Lp-PLA₂ μπορεί να θεωρηθεί ως επιβλαβής.

Συμπερασματικά, η παρούσα εργασία παρέχει στοιχεία που δείχνουν ότι η προοδευτική απενεργοποίηση της Lp-PLA₂ κατά τη διάρκεια της οξείδωσης της LDL οδηγεί σε αυξημένη

σύνδεση και πρόσληψη της oxLDL στα μακροφάγα, ως αποτέλεσμα της αυξημένης σύνδεσης και πρόσληψης μέσω της εμπλουτισμένης σε οξειδωμένα φωσφολιπίδια λιπιδικής ομάδας της oxLDL. Η βιολογική σημασία του ρόλου αυτού της συνδεδεμένης με την LDL Lp-PLA₂ χρήζει περαιτέρω διερεύνησης.

**ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΟΥ ΡΟΛΟΥ ΤΗΣ ΣΥΝΔΕΔΕΜΕΝΗΣ ΜΕ ΤΙΣ ΛΙΠΟΠΡΩΤΕΪΝΕΣ
ΦΩΣΦΟΛΙΠΑΣΗΣ A2 (Lp-PLA₂) ΣΤΗΝ ΠΡΟΣΛΗΨΗ ΤΗΣ ΟΞΕΙΔΩΜΕΝΗΣ LDL
ΑΠΟ ΤΑ ΜΑΚΡΟΦΑΓΑ**

ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

Κ. Π. ΜΑΡΚΑΚΗΣ

Η αναγνώριση και η πρόσληψη της οξειδωμένης LDL (oxidized LDL, oxLDL) από τους εκκαθαριστές υποδοχείς των μακροφάγων και ο σχηματισμός των αφρωδών κυττάρων μεσολαβούνται από την οξειδωτικά τροποποιημένη απολιποπρωτεΐνη B100 (apolipoprotein B100, ApoB100) και την λιπιδική ομάδα της oxLDL. Η λιπιδική ομάδα επιδεικνύει ένα διπλό ρόλο όσον αφορά στην αναγνώριση της oxLDL από τους εκκαθαριστές υποδοχείς. Προϊόντα οξείδωσης λιπιδίων έχουν την ικανότητα να συνδέονται στην ApoB με το σχηματισμό ενώσεων με κατάλοιπα λυσίνης, με αποτέλεσμα την αυξημένη αναγνώριση του μακρομορίου της ApoB από τους εκκαθαριστές υποδοχείς και επιπλέον οξειδωμένα λιπίδια λειτουργούν σαν ισχυροί συνδέτες των εκκαθαριστών υποδοχέων, ανεξάρτητα από τη σύνδεση τους με την ApoB. Μία σημαντική ποσότητα οξειδωμένης φωσφατιδυλοχολίνης (oxidized phosphatidylcholine, oxPC) της oxLDL υδρολύεται στην sn-2 θέση από τη συνδεδεμένη με τις λιποπρωτεΐνες φωσφολιπάση A2 (lipoprotein associated phospholipase A2, Lp-PLA₂) σε λυσοφωσφατιδυλοχολίνη (lysophosphatidylcholine, lysoPC) και μικρά προϊόντα υδρόλυσης. Η εργασία αυτή εξέτασε τη συμμετοχή της Lp-PLA₂ στη σύνδεση και στην πρόσληψη της oxLDL από μακροφάγα. Για το σκοπό αυτό, χρησιμοποιήθηκαν LDL με ακέραιη τη δραστικότητα της Lp-PLA₂ [LDL(+)] και LDL με ανεσταλμένη τη δραστικότητα της Lp-PLA₂ [LDL(-)]. Αναστολή της δραστικότητας της Lp-PLA₂ επιτεύχθηκε με επώαση LDL με 1 mM refabloc πριν την οξείδωση.

Είναι γνωστό πως κατά τη διάρκεια της οξείδωσης της LDL η δραστικότητα της Lp-PLA₂ προοδευτικά μειώνεται. Σε συμφωνία με τα προηγούμενα ευρήματα, στα πειράματά μας κατά τη διάρκεια οξείδωσης LDL με 5μM CuSO₄, η εναπομείνουσα δραστικότητα της Lp-PLA₂ μετά από 6 h ήταν περίπου 40–50%, και μετά από 24 h μόνο 10–15% της αρχικής δραστικότητας είχε διατηρηθεί. Η έκταση της υδρόλυσης της oxPC και της λιπιδικής υπεροξείδωσης εκτιμήθηκαν με προσδιορισμό αντίστοιχα της μοριακής αναλογίας lysoPC/PC και των επιπέδων MDA. Η μοριακή αναλογία lysoPC/PC ήταν ~ 0,05 στη φυσική LDL και ~ 0,24 και ~ 0,36 μετά από 6 h ή 24 h οξείδωσης, αντίστοιχα. Τα επίπεδα

MDA, εκφραζόμενα σε nmoles/mg πρωτεΐνης LDL, ήταν ~ 1,8 στη φυσική LDL και ~ 33,5 και ~ 44,2 μετά από 6 h ή 24 h οξείδωσης, αντίστοιχα. Χρησιμοποιήθηκαν τα δύο αυτά χρονικά διαστήματα, και η LDL οξειδώθηκε για 6 h (μέτρια οξειδωμένη LDL, moderately oxidized LDL, MoxLDL) ή 24 h (ισχυρά οξειδωμένη LDL, heavily oxidized LDL, HoxLDL) για να ελεγχθεί η πιθανή διαφορά μεταξύ ενός βραχύτερου διαστήματος οξείδωσης με παρόν το μεγαλύτερο μέρος της δραστηριότητας της Lp-PLA₂ και ενός μεγαλύτερου διαστήματος κατά τη διάρκεια του οποίου σημαντικό μέρος της δραστηριότητας της Lp-PLA₂ έχει απωλεστεί.

Η σύνδεση και η πρόσληψη MoxLDL και HoxLDL, παρασκευασμένων από LDL(+) ή LDL(-) και σημασμένες με FITC, εξετάστηκαν με επώαση με περιτοναϊκά μακροφάγα ποντικού στους 4⁰C ή 37⁰C αντίστοιχα. Η σύνδεση και η πρόσληψη της MoxLDL(-) ήταν περίπου κατά 30% αυξημένες σε σύγκριση με εκείνες της MoxLDL(+), και η σύνδεση και η πρόσληψη της HoxLDL(-) ήταν περίπου κατά 20% αυξημένες σε σύγκριση με εκείνες της HoxLDL(+). Επώαση με refabloc στο τέλος της οξείδωσης δεν μετέβαλε τη σύνδεση και τη πρόσληψη της MoxLDL ή της HoxLDL που οξειδώθηκαν παρουσία της δραστηριότητας της Lp-PLA₂, δεικνύοντας ότι δεν υπάρχει άλλη άμεση επίδραση του refabloc στη σύνδεση και στην πρόσληψη της oxLDL εκτός από την αναστολή της δραστηριότητας της Lp-PLA₂.

Με δεδομένο ότι οι υποδοχείς των μακροφάγων αναγνωρίζουν και την πρωτεϊνική και τη λιπιδική ομάδα της oxLDL, ο επόμενος στόχος μας ήταν να διακρίνουμε για πρώτη φορά ποιά από τις δύο ομάδες ήταν υπεύθυνη για την αυξημένη σύνδεση και πρόσληψη της oxLDL(-). Η εμπλοκή της ApoB εξετάστηκε αξιολογώντας τη σύνδεση και την πρόσληψη ApoB-πρωτεϊνολιποσωμάτων που περιείχαν ApoB απομονωμένη από oxLDL. Για το σκοπό αυτό, ApoB από oxLDL ενσωματώθηκε σε ApoB-πρωτεϊνολιποσώματα αποτελούμενα από 1,2-διπαλμιτόϋλο-sn-γλυκερο-3-φοσφοχολίνη (dipalmitoyl-phosphatidylcholine, DPPC), χοληστερόλη και ApoB στην αναλογία 10:5:2 (αναλογία βάρους). Τα ApoB-πρωτεϊνολιποσώματα παρασκευάστηκαν με μέθοδο διαλυτοποίησης με χρήση απορρυπαντικού και με ακόλουθη απομάκρυνσή του, χρησιμοποιώντας σαν απορρυπαντικό το octyl glycoside (OG), καθώς έχει δειχθεί ότι επώαση της ApoB με OG δεν επηρεάζει τη σύνδεση της ApoB από oxLDL στους υποδοχείς των μακροφάγων. Για να εξετάσουμε εάν η ApoB είναι συζευγμένη στα λιποσώματα, ApoB-πρωτεϊνολιποσώματα σημάνθηκαν με [¹⁴C]DPPC και αυτά τα [¹⁴C]DPPC-ApoB-πρωτεϊνολιποσώματα υποβλήθηκαν σε υπερφυγοκέντρηση σε πυκνότητα 1,14 g/mL. Η ανάκτηση και της πρωτεΐνης και της [¹⁴C]DPPC ραδιενέργειας στην ανώτερη στοιβάδα ήταν μεγαλύτερες από 95%. Οι τιμές σύνδεσης και πρόσληψης των πρωτεϊνολιποσωμάτων που περιείχαν ApoB από oxLDL ήταν

κατά πολύ μεγαλύτερες των αντίστοιχων τιμών των μη συνδεδεμένων με πρωτεΐνη λιποσωμάτων μαρτύρων. Η σύνδεση και η πρόσληψη των [^{14}C]-ApoB-πρωτεϊνολιποσωμάτων που περιείχαν ApoB από oxLDL αναστελλόταν με εξαρτώμενο από τη συγκέντρωση τρόπο από την oxLDL, ενώ η φυσική LDL είχε μόνο μικρή ανασταλτική επίδραση. Τα αποτελέσματα αυτά υποδεικνύουν διατήρηση της ικανότητας σύνδεσης της ενσωματωμένης στα πρωτεϊνολιποσώματα ApoB με τους υποδοχείς των μακροφάγων. Η αναστολή της δραστηριότητας της Lp-PLA₂ δεν είχε επίδραση στη σύνδεση ή στην πρόσληψη των [^{14}C]-ApoB-πρωτεϊνολιποσωμάτων που παρασκευάστηκαν από ApoB απομονωμένη από MoxLDL(-), MoxLDL(+), HoxLDL(-), και HoxLDL(+). Η σύνδεση και η πρόσληψη των [^{14}C]-ApoB-πρωτεϊνολιποσωμάτων που περιείχαν ApoB από MoxLDL ή HoxLDL έμεινε ανεπηρέαστη από την επώαση με refabloc στο τέλος της οξειδωσης. Το εύρημα αυτό ήταν σύμφωνο με τα αποτελέσματα που αναφέρθηκαν ανωτέρω όσον αφορά στη σύνδεση και στην πρόσληψη της ακέραιης oxLDL, υποδεικνύοντας ξανά τη μη ύπαρξη άμεσης επίδρασης του refabloc στη σύνδεση στους υποδοχείς.

Για να εξετάσουμε την πιθανότητα προϊόντα υδρόλυσης της oxPC από την Lp-PLA₂ να μπορούν να συνδέονται στην ApoB, χρησιμοποιήσαμε σαν υπόστρωμα 1-παλμιτόυλο-2-[^{14}C]αραχιδονόυλο-sn-γλυκερο-3-φωσφοχολίνη (1- palmitoyl – 2 - [^{14}C]arachidonoyl – phosphatidylcholine, [^{14}C]PAPC) η οποία είχε οξειδωθεί με επώαση με 5μM CuSO₄ για 24h. Ox[^{14}C]PAPC επώαστηκε με Lp-PLA₂ μερικώς καθαρισμένη από LDL, και τα ραδιενεργά χαμηλού μοριακού βάρους προϊόντα της υδρόλυσης που απελευθερώθηκαν από την Lp-PLA₂ από την sn-2 θέση απομονώθηκαν. Επώαση αυτών των χαμηλού μοριακού βάρους προϊόντων της υδρόλυσης με LDL(+) ή LDL(-) ανέδειξε για πρώτη φορά την ικανότητά τους να συνδέονται με την ApoB σε βαθμό παραπλήσιο αυτού που παρατηρήθηκε μετά από επώαση με ox[^{14}C]PAPC. Μία εύλογη εξήγηση της παρόμοιας πρόσληψης της ApoB από oxLDL(+) ή oxLDL(-) στην εργασία μας, θα μπορούσε να είναι το ότι χαμηλού μοριακού βάρους προϊόντα της υδρόλυσης της oxPC, που απελευθερώνονται από την Lp-PLA₂ από την sn-2 θέση, είναι επίσης ικανά να τροποποιούν επαρκώς την ApoB.

Ο ρόλος της Lp-PLA₂ στη σύνδεση και στην πρόσληψη της oxLDL μέσω της λιπιδικής ομάδας εξετάστηκε χρησιμοποιώντας σημασμένα με [^{14}C]DPPC λιποσώματα παρασκευασμένα από τα λιπίδια που εκχυλίστηκαν από MoxLDL(-), MoxLDL(+), HoxLDL(-), και HoxLDL(+). Η σύνδεση και η πρόσληψη αυτών των λιποσωμάτων επέδειξαν όμοιο πρότυπο με αυτό των αντίστοιχων σημασμένων με FITC λιποπρωτεϊνών. Επώαση με λιποσώματα από MoxLDL(-) λιπίδια οδήγησε σε μεγαλύτερη κατά ~ 40% σύνδεση και πρόσληψη σε σύγκριση με αυτές των λιποσωμάτων από MoxLDL(+) λιπίδια.

Παρομοίως, η αναστολή της Lp-PLA₂ οδήγησε σε αυξημένη σύνδεση και πρόσληψη, αν και σε μικρότερο βαθμό, των λιποσωμάτων από HoxLDL(-) λιπίδια κατά ~ 30% σε σύγκριση με αυτές των λιποσωμάτων από HoxLDL(+) λιπίδια.

Για να διερευνήσουμε περαιτέρω την αυξημένη σύνδεση και πρόσληψη της oxLDL μέσω της λιπιδικής ομάδας που προκαλείται από την αναστολή της Lp-PLA₂, εξετάσαμε την ικανότητα της οξειδωμένης 1-παλμιτόϋλο-2-αραχιδονόϋλο-sn-γλυκερο-3-φωσφοχολίνης (oxidized 1-palmitoyl-2-arachidonoyl-sn-glycero-3-phosphocholine, oxPAPC), της οξειδωμένης 1-παλμιτόϋλο-2-λινελαϊκόϋλο-sn-γλυκερο-3-φωσφοχολίνης (oxidized 1-palmitoyl-2-linonoyl-sn-glycero-3-phosphocholine, oxPLPC) και του λυσο-παραγώγου τους, της 1-παλμιτόϋλο-sn-γλυκερο-3-φωσφοχολίνης (1-palmitoyl-sn-glycerol-3-phosphocholine), όπως επίσης και την ικανότητα της οξειδωμένης 1,2-ελαϊκόϋλο-sn-γλυκερο-3-φωσφοχολίνης (oxidized 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine, oxDOPC) και του λυσο-παραγώγου της, της 1-ελαϊκόϋλο-sn-γλυκερο-3-φωσφοχολίνης (1-oleoyl-sn-glycerol-phosphocholine), να μεσολαβούν στη σύνδεση και στην πρόσληψη. Η οξείδωση των φωσφολιπιδίων διενεργήθηκε με επώαση με 5μM CuSO₄ για 24h. PAPC, PLPC και DOPC συμπεριλήφθηκαν στη μελέτη καθώς παριστούν κοινά μόρια φωσφατιδυλοχολίνης με πολυακόρεστες (PAPC, PLPC) ή μονοακόρεστες (DOPC) ακυλ-αλυσίδες στην sn-2 θέση. Επιπλέον, διάφορα μόρια προερχόμενα από την οξείδωση των PAPC και PLPC έχουν δειχθεί να λειτουργούν σαν συνδέτες για εκκαθαριστές υποδοχείς και περαιτέρω είναι δυνητικά ευάλωτα σε υδρόλυση από την LpPLA₂, όπως έχει αποδειχτεί στην περίπτωση μορίων προερχόμενων από την οξείδωση PAPC, όπως η 1-παλμιτόϋλο-2-(5-κετοβαλερόϋλο)-sn-γλυκερο-3-φωσφοχολίνης (1-palmitoyl-2-(5-oxovaleroyl)-sn-glycero-3-phosphocholine, POVPC). Παρασκευάστηκαν λιποσώματα που περιείχαν χοληστερόλη, DPPC σαν συστατικό κορεσμένης φωσφατιδυλοχολίνης, και το υπό εξέταση μόριο φωσφατιδυλοχολίνης, σε μοριακή αναλογία 2:1 μεταξύ ολικών φωσφολιπιδίων και χοληστερόλης. Λιποσώματα σημασμένα με [¹⁴C]DPPC χρησιμοποιήθηκαν σε άμεσες μελέτες σύνδεσης και πρόσληψης, ενώ μη σημασμένες παρασκευές χρησιμοποιήθηκαν σε μελέτες αναστολής. Τα oxPAPC λιποσώματα επέδειξαν σημαντική σύνδεση και πρόσληψη, φθάνοντας περίπου στο 60-70% της σύνδεσης και πρόσληψης των λιποσωμάτων από HoxLDL(-) λιπίδια. Η επώαση με oxPLPC λιποσώματα ή lysoPC λιποσώματα είχε σαν αποτέλεσμα περίπου το 30% της σύνδεσης και της πρόσληψης που παρατηρήθηκε με τη χρησιμοποίηση oxPAPC λιποσωμάτων. Τα oxDOPC λιποσώματα έδειξαν ακόμη λιγότερη σύνδεση και πρόσληψη. Η σύνδεση και η πρόσληψη των λιποσωμάτων που περιείχαν μη οξειδωμένη PAPC ή μη οξειδωμένη PLPC ήταν πολύ μικρότερες αυτών που περιείχαν τα

αντίστοιχα οξειδωμένα φωσφολιπίδια, ενώ η σύνδεση και η πρόσληψη λιποσωμάτων που περιείχαν αποκλειστικά DPPC σαν φωσφολιπιδικό συστατικό, ήταν αμελητέες. Τα oxPAPC λιποσώματα, όπως επίσης και τα oxPLPC λιποσώματα, αλλά και τα lysoPC λιποσώματα επέδειξαν πρότυπο σύνδεσης και πρόσληψης μεσολαβούμενων από υποδοχέα, καθώς παρατηρήθηκε μία δοσοεξαρτώμενη αναστολή της σύνδεσης και της πρόσληψης σημασμένων παρασκευών από μη σημασμένες παρασκευές του ίδιου λιποσώματος όπως και από MoxLDL(+) και HoxLDL(+) ή από λιποσώματα από MoxLDL(+) λιπίδια και λιποσώματα από HoxLDL(+) λιπίδια, όχι όμως από LDL(+) ή λιποσώματα από LDL(+) λιπίδια. Το πρότυπο των αποτελεσμάτων των μελετών που εξέτασαν την ικανότητα μη σημασμένων λιποσωμάτων να ανταγωνιστούν στη σύνδεση και στην πρόσληψη σημασμένες oxLDL ή σημασμένα λιποσώματα από oxLDL λιπίδια, ήταν αντίστοιχο αυτού των άμεσων μελετών σύνδεσης και πρόσληψης, με τα oxPAPC λιποσώματα να αναδεικνύουν ισχυρή ικανότητα να αναστέλλουν τη σύνδεση και την πρόσληψη της ακέραιης MoxLDL(+) και των λιποσωμάτων από MoxLDL(+) λιπίδια ή MoxLDL(-) περίπου κατά 70-80%.

Στην παρούσα μελέτη, δείχθηκε ότι αναστολή της δραστηριότητας της Lp-PLA₂ πριν από την οξείδωση της LDL, έχει σαν αποτέλεσμα την αυξημένη αναγνώριση της λιπιδικής ομάδας από τους υποδοχείς των μακροφάγων και την επακόλουθη αυξημένη πρόσληψη της oxLDL. Η επίδραση αυτή είναι περισσότερο έκδηλη στη μέτρια οξείδωση (6h) από ότι στην ισχυρή οξείδωση (24h), πιθανότατα λόγω της προοδευτικής απενεργοποίησης της Lp-PLA₂ κατά τη διάρκεια της οξείδωσης. Εκτός από την προοδευτική απώλεια της δραστηριότητας της Lp-PLA₂ κατά τη διάρκεια της οξείδωσης, η διατήρηση της αναγνώρισης μέσω της ApoB και πιθανώς η παραγωγή οξειδωμένων φωσφολιπιδίων με μακρές αλυσίδες στην sn-2 θέση, τα οποία θα μπορούσαν να δράσουν σαν συνδέτες των εκκαθαριστών υποδοχέων αλλά δεν είναι ευαίσθητα στην υδρόλυση από την Lp-PLA₂, παριστούν πιθανούς παράγοντες που τείνουν να εξασθενίσουν τη διαφορά στη σύνδεση και στην πρόσληψη μεταξύ της oxLDL(+) και της oxLDL(-). Όσον αφορά στη μειωμένη αναγνώριση της λιπιδικής ομάδας της oxLDL από τους υποδοχείς των μακροφάγων η οποία προκαλείται από τη δραστηριότητα της Lp-PLA₂, αυτή πιθανώς οφείλεται σε σημαντικό βαθμό στη μείωση των μορίων της oxPAPC τα οποία δρουν σαν ισχυροί συνδέτες για αυτούς τους υποδοχείς.

Τα αποτελέσματα της μελέτης αυτής υποστηρίζουν το συμπέρασμα ότι η προοδευτική αναστολή της δραστηριότητας της Lp-PLA₂ κατά τη διάρκεια της οξείδωσης οδηγεί σε αυξημένη αναγνώριση της oxLDL από τους υποδοχείς των μακροφάγων και αυτό κυρίως αποδίδεται στην αυξημένη αναγνώριση της εμπλουτισμένης σε οξειδωμένα φωσφολιπίδια λιπιδικής ομάδας της oxLDL.

**INVESTIGATION OF THE ROLE OF LIPOPROTEIN ASSOCIATED
PHOSPHOLIPASE A2 (Lp-PLA₂) IN THE UPTAKE OF OXIDIZED LDL
BY MACROPHAGES**

SYMMARY OF DOCTORAL THESIS

K. P. MARKAKIS

Recognition and uptake of oxidized LDL (oxLDL) by scavenger receptors of macrophages and foam cell formation are mediated by the oxidatively modified apolipoprotein B (ApoB) and the lipid moiety of oxLDL. Lipid moiety exhibits a dual role concerning recognition of oxLDL by scavenger receptors. Lipid oxidation products have the ability to bind to ApoB causing derivatization of lysine residues which results in increased recognition of ApoB molecule by scavenger receptors and furthermore oxidized lipids independently of their association with ApoB can serve as strong ligands for scavenger receptors. A great amount of oxidized phosphatidylcholine (oxPC) of oxLDL is hydrolyzed at the sn-2 position by lipoprotein associated phospholipase A2 (Lp-PLA₂) to lysophosphatidylcholine and small products of hydrolysis. This study examined the involvement of Lp-PLA₂ in the binding and the uptake of oxLDL by macrophages. For this purpose, LDL with intact Lp-PLA₂ activity [LDL(+)] and LDL with inhibited Lp-PLA₂ activity [LDL(-)] were used. Inhibition of Lp-PLA₂ activity was achieved by incubation of LDL with 1 mM pefabloc prior to oxidation.

It is known that during the LDL oxidation the Lp-PLA₂ activity progressively decreases. Consistent with the previous findings, in our experiments, during LDL oxidation with 5μM CuSO₄, the remaining Lp-PLA₂ activity after 6 h was approximately 40–50%, and after 24 h only 10–15% of the initial activity was preserved. The extent of the hydrolysis of oxPC and the lipid peroxidation were estimated by determination of the lysoPC/PC molar ratio and levels of MDA respectively. LysoPC/PC molar ratio was ~ 0,05 at native LDL and ~ 0,24 and ~ 0,36 after 6 h or 24 h oxidation, respectively. MDA levels expressed as nmoles /mg protein of LDL were ~ 1,8 at native LDL and ~ 33,5 and ~ 44,2 after 6 h or 24 h oxidation, respectively. These two time intervals were used, and LDL was oxidized for 6 h (moderately oxidized LDL, MoxLDL) or 24 h (heavily oxidized LDL, HoxLDL) to assess the possible difference between a shorter oxidation with the major percentage of Lp-PLA₂ activity present and a longer oxidation during which Lp-PLA₂ activity was significantly attenuated.

Binding and uptake of MoxLDL and HoxLDL prepared from LDL(+) or LDL(-) and labelled with FITC were assessed by incubation with mouse peritoneal macrophages at 4⁰C or 37⁰C respectively. The binding and the uptake of MoxLDL(-) were increased by about 30% compared with those of MoxLDL(+), and HoxLDL(-) binding and uptake were increased by about 20% compared with those of HoxLDL(+). Incubation with pefabloc at the end of the oxidation did not alter the binding or the uptake of MoxLDL or HoxLDL oxidized in the presence of Lp-PLA₂ activity, indicating no direct effect of pefabloc on oxLDL binding and uptake other than the inhibition of Lp-PLA₂ activity.

Provided that macrophage receptors recognize both the protein and the lipid moieties of oxLDL, our next goal was to distinguish which of the two moieties is responsible for the increased binding and uptake of oxLDL(-). The implication of ApoB was examined by assessing the binding and the uptake of ApoB-liposome conjugates containing ApoB isolated from oxLDL. ApoB from oxLDL was incorporated into ApoB-liposome conjugates consisting of dipalmitoyl-phosphatidylcholine (DPPC), cholesterol and ApoB in the proportion 10:5:2 (weight ratio). The ApoB-liposome conjugates were prepared by a detergent solubilization and removal method using as detergent octyl glycoside (OG), as it has been shown that treatment of ApoB with OG does not affect the binding of ApoB from oxLDL to macrophage receptors. To examine if the ApoB was conjugated to the liposomes, ApoB-liposome conjugates were labelled with [¹⁴C]1,2-dipalmitoyl-phosphatidylcholine ([¹⁴C]DPPC) and these [¹⁴C]DPPC-ApoB liposome conjugates were subjected to ultracentrifugation at a density of 1,14 g/mL. The recovery of both the protein and the [¹⁴C]DPPC radioactivity at the upper layer were greater than 95%. The use of ApoB-liposome conjugates containing ApoB from oxLDL resulted in binding and uptake which were by far greater compared with the corresponding values obtained by unconjugated liposomes which were negligible. The binding and the uptake of [¹⁴C]ApoB-liposome conjugates containing ApoB from oxLDL was inhibited in a concentration-dependent manner by oxLDL, while native LDL had only minor inhibitory effect. These results suggest that the incorporated into proteoliposomes ApoB preserves its ability to bind to macrophage receptors. The inhibition of Lp-PLA₂ activity had no effect on the uptake of [¹⁴C]ApoB-liposomes conjugates prepared with ApoB isolated from MoxLDL(-), MoxLDL(+), HoxLDL(-), and HoxLDL(+). The binding and the uptake of [¹⁴C]ApoB-liposome conjugates containing ApoB from MoxLDL or HoxLDL was unaffected by treatment with pefabloc at the end of oxidation. This finding was in agreement with the results mentioned

above concerning the oxLDL binding and uptake, indicating once again no direct effect of pefabloc on receptor binding.

To examine the possibility that products of oxPC hydrolysis by Lp-PLA₂ can bind on ApoB, we used as a substrate 1-palmitoyl-2-[1-¹⁴C]arachidonoyl-phosphatidylcholine, [¹⁴C]PAPC which has been oxidized with incubation with 5μM CuSO₄ for 24h. Ox[¹⁴C]PAPC was treated with Lp-PLA₂ partially purified from LDL, and the radioactive low molecular weight products of hydrolysis released by Lp-PLA₂ from the sn-2 position were isolated. Incubation of these low molecular weight products of hydrolysis with LDL(+) or LDL(-) revealed their ability to bind to ApoB in a degree comparable to that observed after incubation with ox[¹⁴C]PAPC. A plausible explanation of the similar uptake of ApoB from oxLDL(+) or oxLDL(-) in our study could be that the low molecular weight products of hydrolysis of oxPC, released by Lp-PLA₂ from the sn-2 position, are also able to sufficiently derivatize ApoB.

The role of Lp-PLA₂ in the binding and the uptake of oxLDL via the lipid moiety was investigated using [¹⁴C]DPPC-labeled liposomes prepared from the lipid extract of MoxLDL(-), MoxLDL(+), HoxLDL(-), and HoxLDL(+). The binding and the uptake of these liposomes exhibited a similar pattern to that of the corresponding FITC-labeled lipoproteins. Incubation with liposomes from MoxLDL(-) lipids resulted in greater binding and uptake compared with those of liposomes from MoxLDL(+) lipids by ~ 40%. Similarly, the inhibition of Lp-PLA₂ led to increased binding and uptake, though to a lesser extent, of liposomes from HoxLDL(-) lipids compared with those of liposomes from HoxLDL(+) lipids by ~ 30%.

To further investigate the increased binding and uptake of oxLDL via its lipid moiety caused by inhibition of Lp-PLA₂, we examined the ability of oxidized 2-arachidonoyl-1-palmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (oxPAPC), oxidized 2-linoneloyl-1-palmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (oxPLPC) and their lyso derivative 1-palmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine as well as the ability of oxidized 1,2-dioleoyl-sn glycero-3-phosphocholine (oxDOPC) and its lyso derivative 1-oleoyl-sn-glycero-phosphocholine to mediate binding and uptake. Oxidation of phospholipids was carried out with incubation with 5μM CuSO₄ for 24h. PAPC, PLPC and DOPC were included in the study as they represent common phosphatidylcholine molecules with polyunsaturated (PAPC, PLPC) or monounsaturated (DOPC) acyl chains at the sn-2 position. Moreover, several molecules derived from oxidation of PAPC and PLPC have been shown to serve as ligands for scavenger receptors and furthermore are potentially susceptible to LpPLA₂ hydrolysis as this has been

demonstrated in the case of molecules derived from oxidation of PAPC such as 1-palmitoyl-2-(5-oxovaleroyl)-sn-glycero-3-phosphocholine (POVPC). Liposomes containing cholesterol, 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DPPC) as saturated phosphatidylcholine component and the phosphatidylcholine molecule of interest, in a molecular ratio 2:1 between total phospholipids and cholesterol, were prepared. Liposomes labelled with [¹⁴C]DPPC were used in direct binding and uptake studies, while unlabelled preparations were used for inhibition studies. The oxPAPC liposomes exhibited significant binding and uptake, reaching approximately 60-70% of the binding and the uptake of liposomes from HoxLDL(-) lipids. Incubation with oxPLPC liposomes or lysoPC liposomes resulted in approximately 30% of the binding and the uptake of oxPAPC liposomes. The oxDOPC liposomes revealed even less binding and uptake. The binding and the uptake of liposomes containing unoxidized PAPC or unoxidized PLPC were much lesser than those containing the corresponding oxidized phospholipids while binding and uptake of liposomes containing exclusively DPPC as phospholipid component, were negligible. The oxPAPC liposomes as well the oxPLPC liposomes but also the lysoPC liposomes exhibited a receptor mediated pattern of binding and uptake as a dose-dependent inhibition of the binding and the uptake of labelled preparations by unlabelled preparations of the same liposomes as well by MoxLDL(+) and HoxLDL(+) or MoxLDL(+) lipids liposomes and HoxLDL(+) lipids liposomes but not by LDL(+) or LDL(+) lipids liposomes, was observed. The pattern of the results of studies assessing the ability of unlabelled liposomes to compete labelled oxLDL and oxLDL-lipids liposomes for binding or uptake was corresponding to that of the direct studies of binding and uptake, with liposomes containing oxPAPC revealing strong capacity to inhibit binding and the uptake of MoxLDL(+) or MoxLDL(+) lipids liposomes or MoxLDL(-) lipids liposomes by approximately 70-80%.

In the present study, it was shown that inhibition of Lp-PLA₂ activity prior to oxidation of LDL, results in increased recognition of lipid moiety by macrophage receptors and subsequent increased uptake of oxLDL. This effect is more pronounced in moderate oxidation (6h) rather than heavy oxidation (24h), probably due to gradual inactivation of Lp-PLA₂ during oxidation. Besides the progressive loss of Lp-PLA₂ activity during oxidation, the preserved recognition via ApoB and probably the production of oxidized phospholipids with long chains at the sn-2 position which act as ligands for scavenger receptors but are not sensitive to hydrolysis by Lp-PLA₂, represent possible factors that tend to attenuate the difference in the binding and the uptake between oxLDL(+) and oxLDL(-). Regarding the decreased recognition of oxLDL lipid moiety by macrophage receptors caused by the Lp-

PLA₂ activity, this is probably mainly due to reduction of oxPAPC molecules which serve as strong ligands for these receptors.

The results of this study support the conclusion that the progressive inactivation of Lp-PLA₂ during LDL oxidation leads to an increased recognition of oxLDL by macrophage receptors which could be primarily attributed to the increased recognition of the oxidized phospholipids enriched lipid moiety of oxLDL.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Braunwald, E., ed. *Heart Disease, a Textbook of Cardiovascular Medicine* 9th ed. 2012, Saunders: Philadelphia.
2. Kasper, D., et al., *Harrison's Principles of Internal Medicine*. 16th ed. 2005: McGraw-Hill.
3. Stevens, A. and J. Lowe, *Ιστολογία*. 1993, Αθήνα: Ιατρικές Εκδόσεις Πασχαλίδης.
4. Ballantyne, C., J. O' Keere, and A. Gotto, *Βασικές Αρχές στη Δυσλιπιδαιμία και την Αθηροσκλήρωση*. 4η ed. 2009, Αθήνα Ιατρικές Εκδόσεις Βαγιονάκης.
5. Stary, H.C., et al., *A definition of the intima of human arteries and of its atherosclerosis-prone regions. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association*. *Circulation*, 1992. **85**(1): p. 391-405.
6. Stary, H.C., et al., *A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1995. **15**(9): p. 1512-31.
7. *Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) final report*. *Circulation*, 2002. **106**(25): p. 3143-421.
8. Grundy, S.M., et al., *Implications of recent clinical trials for the National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III guidelines*. *Circulation*, 2004. **110**(2): p. 227-39.
9. Soran, H., et al., *HDL functionality*. *Curr Opin Lipidol*, 2012. **23**(4): p. 353-66.
10. Nordestgaard, B.G., et al., *Lipoprotein(a) as a cardiovascular risk factor: current status*. *Eur Heart J*, 2010. **31**(23): p. 2844-53.
11. Sarwar, N. and N. Sattar, *Triglycerides and coronary heart disease: have recent insights yielded conclusive answers?* *Curr Opin Lipidol*, 2009. **20**(4): p. 275-81.
12. Stratmann, B. and D. Tschoepe, *Atherogenesis and atherothrombosis--focus on diabetes mellitus*. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, 2009. **23**(3): p. 291-303.
13. Beckman, J.A., M.A. Creager, and P. Libby, *Diabetes and atherosclerosis: epidemiology, pathophysiology, and management*. *JAMA*, 2002. **287**(19): p. 2570-81.
14. Rask-Madsen, C. and G.L. King, *Proatherosclerotic mechanisms involving protein kinase C in diabetes and insulin resistance*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2005. **25**(3): p. 487-96.
15. Walcher, D. and N. Marx, *Advanced glycation end products and C-peptide-modulators in diabetic vasculopathy and atherogenesis*. *Semin Immunopathol*, 2009. **31**(1): p. 103-11.
16. Park, Y.M., et al., *Insulin promotes macrophage foam cell formation: potential implications in diabetes-related atherosclerosis*. *Lab Invest*, 2012. **92**(8): p. 1171-80.
17. Alberti, K.G., et al., *Harmonizing the metabolic syndrome: a joint interim statement of the International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute;*

- American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; and International Association for the Study of Obesity. Circulation, 2009. 120(16): p. 1640-5.*
18. Chobanian, A.V., et al., *The Seventh Report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure: the JNC 7 report. JAMA, 2003. 289(19): p. 2560-72.*
 19. Lawes, C.M., S. Vander Hoorn, and A. Rodgers, *Global burden of blood-pressure-related disease, 2001. Lancet, 2008. 371(9623): p. 1513-8.*
 20. Paravicini, T.M. and R.M. Touyz, *NADPH oxidases, reactive oxygen species, and hypertension: clinical implications and therapeutic possibilities. Diabetes Care, 2008. 31 Suppl 2: p. S170-80.*
 21. Ambrose, J.A. and R.S. Barua, *The pathophysiology of cigarette smoking and cardiovascular disease: an update. J Am Coll Cardiol, 2004. 43(10): p. 1731-7.*
 22. Beisiegel, U. and R.W. St Clair, *An emerging understanding of the interactions of plasma lipoproteins with the arterial wall that leads to the development of atherosclerosis. Curr Opin Lipidol, 1996. 7(5): p. 265-8.*
 23. Gotto, A. and H. Pownall, *Manuel of Lipid Disorders 2th ed. 1999, Baltimore: Williams & Wilkins.*
 24. Stocker, R. and J.F. Keaney, Jr., *Role of oxidative modifications in atherosclerosis. Physiol Rev, 2004. 84(4): p. 1381-478.*
 25. Steinberg, D., *The LDL modification hypothesis of atherogenesis: an update. J Lipid Res, 2009. 50 Suppl: p. S376-81.*
 26. Yoshida, H. and R. Kisugi, *Mechanisms of LDL oxidation. Clin Chim Acta, 2010. 411(23-24): p. 1875-82.*
 27. Yla-Herttuala, S., et al., *Evidence for the presence of oxidatively modified low density lipoprotein in atherosclerotic lesions of rabbit and man. J Clin Invest, 1989. 84(4): p. 1086-95.*
 28. Janssens, S.P., et al., *Cloning and expression of a cDNA encoding human endothelium-derived relaxing factor/nitric oxide synthase. J Biol Chem, 1992. 267(21): p. 14519-22.*
 29. Ahanchi, S.S., N.D. Tsihlis, and M.R. Kibbe, *The role of nitric oxide in the pathophysiology of intimal hyperplasia. J Vasc Surg, 2007. 45 Suppl A: p. A64-73.*
 30. Davignon, J. and P. Ganz, *Role of endothelial dysfunction in atherosclerosis. Circulation, 2004. 109(23 Suppl 1): p. III27-32.*
 31. Mohan, S., et al., *IkappaBalpha-dependent regulation of low-shear flow-induced NF-kappa B activity: role of nitric oxide. Am J Physiol Cell Physiol, 2003. 284(4): p. C1039-47.*
 32. de Winther, M.P., et al., *Nuclear factor kappaB signaling in atherogenesis. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2005. 25(5): p. 904-14.*
 33. Kitta, Y., et al., *Persistent impairment of endothelial vasomotor function has a negative impact on outcome in patients with coronary artery disease. J Am Coll Cardiol, 2009. 53(4): p. 323-30.*
 34. Deanfield, J., et al., *Endothelial function and dysfunction. Part I: Methodological issues for assessment in the different vascular beds: a statement by the Working Group on Endothelin and Endothelial Factors of the European Society of Hypertension. J Hypertens, 2005. 23(1): p. 7-17.*
 35. Lane, H.A., J.C. Smith, and J.S. Davies, *Noninvasive assessment of preclinical atherosclerosis. Vasc Health Risk Manag, 2006. 2(1): p. 19-30.*

36. Kawashima, S. and M. Yokoyama, *Dysfunction of endothelial nitric oxide synthase and atherosclerosis*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2004. **24**(6): p. 998-1005.
37. Su, Y., et al., *Endothelial dysfunction in impaired fasting glycemia, impaired glucose tolerance, and type 2 diabetes mellitus*. *Am J Cardiol*, 2008. **102**(4): p. 497-8.
38. Chatterjee, A., S.M. Black, and J.D. Catravas, *Endothelial nitric oxide (NO) and its pathophysiologic regulation*. *Vascul Pharmacol*, 2008. **49**(4-6): p. 134-40.
39. Huang, P.L., *eNOS, metabolic syndrome and cardiovascular disease*. *Trends Endocrinol Metab*, 2009. **20**(6): p. 295-302.
40. Uppu, R.M., et al., *Cardiovascular effects of peroxynitrite*. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2007. **34**(9): p. 933-7.
41. Li, H. and U. Forstermann, *Prevention of atherosclerosis by interference with the vascular nitric oxide system*. *Curr Pharm Des*, 2009. **15**(27): p. 3133-45.
42. Schmidt, T.S. and N.J. Alp, *Mechanisms for the role of tetrahydrobiopterin in endothelial function and vascular disease*. *Clin Sci (Lond)*, 2007. **113**(2): p. 47-63.
43. Ito, A., et al., *Novel mechanism for endothelial dysfunction: dysregulation of dimethylarginine dimethylaminohydrolase*. *Circulation*, 1999. **99**(24): p. 3092-5.
44. Muller, W.A., *Mechanisms of transendothelial migration of leukocytes*. *Circ Res*, 2009. **105**(3): p. 223-30.
45. Ley, K., *Molecular mechanisms of leukocyte recruitment in the inflammatory process*. *Cardiovasc Res*, 1996. **32**(4): p. 733-42.
46. de Prost, D. and J. Hakim, *Phagocyte implications in advanced atherosclerosis*. *Atherosclerosis*, 1997. **131 Suppl**: p. S19-21.
47. Faruqi, R.M. and P.E. DiCorleto, *Mechanisms of monocyte recruitment and accumulation*. *Br Heart J*, 1993. **69**(1 Suppl): p. S19-29.
48. van de Stolpe, A. and P.T. van der Saag, *Intercellular adhesion molecule-1*. *J Mol Med (Berl)*, 1996. **74**(1): p. 13-33.
49. Taleb, S., A. Tedgui, and Z. Mallat, *Regulatory T-cell immunity and its relevance to atherosclerosis*. *J Intern Med*, 2008. **263**(5): p. 489-99.
50. Hansson, G.K. and A. Hermansson, *The immune system in atherosclerosis*. *Nat Immunol*, 2011. **12**(3): p. 204-12.
51. Galkina, E. and K. Ley, *Vascular adhesion molecules in atherosclerosis*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2007. **27**(11): p. 2292-301.
52. Lundberg, A.M. and G.K. Hansson, *Innate immune signals in atherosclerosis*. *Clin Immunol*, 2010. **134**(1): p. 5-24.
53. Shalhoub, J., et al., *Innate immunity and monocyte-macrophage activation in atherosclerosis*. *J Inflamm (Lond)*, 2011. **8**: p. 9.
54. Gebuhrer, V., et al., *Oxidized low-density lipoprotein induces the expression of P-selectin (GMP140/PADGEM/CD62) on human endothelial cells*. *Biochem J*, 1995. **306 (Pt 1)**: p. 293-8.
55. Khan, B.V., et al., *Modified low density lipoprotein and its constituents augment cytokine-activated vascular cell adhesion molecule-1 gene expression in human vascular endothelial cells*. *J Clin Invest*, 1995. **95**(3): p. 1262-70.
56. Cybulsky, M.I., et al., *A major role for VCAM-1, but not ICAM-1, in early atherosclerosis*. *J Clin Invest*, 2001. **107**(10): p. 1255-62.

57. Iiyama, K., et al., *Patterns of vascular cell adhesion molecule-1 and intercellular adhesion molecule-1 expression in rabbit and mouse atherosclerotic lesions and at sites predisposed to lesion formation*. *Circ Res*, 1999. **85**(2): p. 199-207.
58. Yusuf-Makagiansar, H., et al., *Inhibition of LFA-1/ICAM-1 and VLA-4/VCAM-1 as a therapeutic approach to inflammation and autoimmune diseases*. *Med Res Rev*, 2002. **22**(2): p. 146-67.
59. Patel, S.S., et al., *Inhibition of alpha4 integrin and ICAM-1 markedly attenuate macrophage homing to atherosclerotic plaques in ApoE-deficient mice*. *Circulation*, 1998. **97**(1): p. 75-81.
60. McEver, R.P., *Selectins: lectins that initiate cell adhesion under flow*. *Curr Opin Cell Biol*, 2002. **14**(5): p. 581-6.
61. Dong, Z.M., A.A. Brown, and D.D. Wagner, *Prominent role of P-selectin in the development of advanced atherosclerosis in ApoE-deficient mice*. *Circulation*, 2000. **101**(19): p. 2290-5.
62. Johnson, R.C., et al., *Absence of P-selectin delays fatty streak formation in mice*. *J Clin Invest*, 1997. **99**(5): p. 1037-43.
63. Huo, Y. and K.F. Ley, *Role of platelets in the development of atherosclerosis*. *Trends Cardiovasc Med*, 2004. **14**(1): p. 18-22.
64. Huo, Y., et al., *Circulating activated platelets exacerbate atherosclerosis in mice deficient in apolipoprotein E*. *Nat Med*, 2003. **9**(1): p. 61-7.
65. Mestas, J. and K. Ley, *Monocyte-endothelial cell interactions in the development of atherosclerosis*. *Trends Cardiovasc Med*, 2008. **18**(6): p. 228-32.
66. Elices, M.J., et al., *VCAM-1 on activated endothelium interacts with the leukocyte integrin VLA-4 at a site distinct from the VLA-4/fibronectin binding site*. *Cell*, 1990. **60**(4): p. 577-84.
67. Long, E.O., *ICAM-1: getting a grip on leukocyte adhesion*. *J Immunol*, 2011. **186**(9): p. 5021-3.
68. Koenen, R.R. and C. Weber, *Chemokines: established and novel targets in atherosclerosis*. *EMBO Mol Med*, 2011. **3**(12): p. 713-25.
69. Steinberg, D., *Atherogenesis in perspective: hypercholesterolemia and inflammation as partners in crime*. *Nat Med*, 2002. **8**(11): p. 1211-7.
70. Witztum, J.L. and D. Steinberg, *The oxidative modification hypothesis of atherosclerosis: does it hold for humans?* *Trends Cardiovasc Med*, 2001. **11**(3-4): p. 93-102.
71. Tacke, F., et al., *Monocyte subsets differentially employ CCR2, CCR5, and CX3CR1 to accumulate within atherosclerotic plaques*. *J Clin Invest*, 2007. **117**(1): p. 185-94.
72. Wan, W., et al., *Genetic deletion of chemokine receptor Ccr6 decreases atherogenesis in ApoE-deficient mice*. *Circ Res*, 2011. **109**(4): p. 374-81.
73. Heller, E.A., et al., *Chemokine CXCL10 promotes atherogenesis by modulating the local balance of effector and regulatory T cells*. *Circulation*, 2006. **113**(19): p. 2301-12.
74. Libby, P., *Inflammation in atherosclerosis*. *Nature*, 2002. **420**(6917): p. 868-74.
75. Veillard, N.R., et al., *Differential influence of chemokine receptors CCR2 and CXCR3 in development of atherosclerosis in vivo*. *Circulation*, 2005. **112**(6): p. 870-8.

76. Greaves, D.R. and S. Gordon, *The macrophage scavenger receptor at 30 years of age: current knowledge and future challenges*. J Lipid Res, 2009. **50 Suppl**: p. S282-6.
77. Moore, K.J. and M.W. Freeman, *Scavenger receptors in atherosclerosis: beyond lipid uptake*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2006. **26**(8): p. 1702-11.
78. Yokoyama, C., et al., *SREBP-1, a basic-helix-loop-helix-leucine zipper protein that controls transcription of the low density lipoprotein receptor gene*. Cell, 1993. **75**(1): p. 187-97.
79. Kzhyshkowska, J., C. Neyen, and S. Gordon, *Role of macrophage scavenger receptors in atherosclerosis*. Immunobiology, 2012. **217**(5): p. 492-502.
80. Moore, K.J. and I. Tabas, *Macrophages in the pathogenesis of atherosclerosis*. Cell, 2011. **145**(3): p. 341-55.
81. Chen, X.P., T.T. Zhang, and G.H. Du, *Lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1, a new promising target for the therapy of atherosclerosis?* Cardiovasc Drug Rev, 2007. **25**(2): p. 146-61.
82. Febbraio, M. and R.L. Silverstein, *CD36: implications in cardiovascular disease*. Int J Biochem Cell Biol, 2007. **39**(11): p. 2012-30.
83. Shinohara, M., et al., *Local overexpression of toll-like receptors at the vessel wall induces atherosclerotic lesion formation: synergism of TLR2 and TLR4*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2007. **27**(11): p. 2384-91.
84. Brown, B.E., et al., *Glycation of low-density lipoprotein results in the time-dependent accumulation of cholesteryl esters and apolipoprotein B-100 protein in primary human monocyte-derived macrophages*. FEBS J, 2007. **274**(6): p. 1530-41.
85. Collot-Teixeira, S., et al., *CD36 and macrophages in atherosclerosis*. Cardiovasc Res, 2007. **75**(3): p. 468-77.
86. Brown, M.S., et al., *Reversible accumulation of cholesteryl esters in macrophages incubated with acetylated lipoproteins*. J Cell Biol, 1979. **82**(3): p. 597-613.
87. Silverstein, R.L., et al., *Mechanisms of cell signaling by the scavenger receptor CD36: implications in atherosclerosis and thrombosis*. Trans Am Clin Climatol Assoc, 2010. **121**: p. 206-20.
88. Kavanagh, I.C., et al., *Degree of oxidation of low density lipoprotein affects expression of CD36 and PPARgamma, but not cytokine production, by human monocyte-macrophages*. Atherosclerosis, 2003. **168**(2): p. 271-82.
89. Tontonoz, P., et al., *PPARgamma promotes monocyte/macrophage differentiation and uptake of oxidized LDL*. Cell, 1998. **93**(2): p. 241-52.
90. Mitra, S., T. Goyal, and J.L. Mehta, *Oxidized LDL, LOX-1 and atherosclerosis*. Cardiovasc Drugs Ther, 2011. **25**(5): p. 419-29.
91. Pirillo, A., et al., *Upregulation of lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1 (LOX-1) by 15-lipoxygenase-modified LDL in endothelial cells*. Atherosclerosis, 2011. **214**(2): p. 331-7.
92. Geng, Y.J., et al., *Expression of the macrophage scavenger receptor in atheroma. Relationship to immune activation and the T-cell cytokine interferon-gamma*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1995. **15**(11): p. 1995-2002.
93. Gough, P.J., et al., *Analysis of macrophage scavenger receptor (SR-A) expression in human aortic atherosclerotic lesions*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1999. **19**(3): p. 461-71.

94. Fuhrman, B., N. Volkova, and M. Aviram, *Oxidative stress increases the expression of the CD36 scavenger receptor and the cellular uptake of oxidized low-density lipoprotein in macrophages from atherosclerotic mice: protective role of antioxidants and of paraoxonase*. *Atherosclerosis*, 2002. **161**(2): p. 307-16.
95. Calay, D., et al., *Copper and myeloperoxidase-modified LDLs activate Nrf2 through different pathways of ROS production in macrophages*. *Antioxid Redox Signal*, 2010. **13**(10): p. 1491-502.
96. Maxeiner, H., et al., *Complementary roles for scavenger receptor A and CD36 of human monocyte-derived macrophages in adhesion to surfaces coated with oxidized low-density lipoproteins and in secretion of H₂O₂*. *J Exp Med*, 1998. **188**(12): p. 2257-65.
97. Williams, K.J. and I. Tabas, *The response-to-retention hypothesis of early atherogenesis*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1995. **15**(5): p. 551-61.
98. Yan, Z.Q. and G.K. Hansson, *Innate immunity, macrophage activation, and atherosclerosis*. *Immunol Rev*, 2007. **219**: p. 187-203.
99. Pennings, M., et al., *Regulation of cholesterol homeostasis in macrophages and consequences for atherosclerotic lesion development*. *FEBS Lett*, 2006. **580**(23): p. 5588-96.
100. Pluddemann, A., C. Neyen, and S. Gordon, *Macrophage scavenger receptors and host-derived ligands*. *Methods*, 2007. **43**(3): p. 207-17.
101. McLaren, J.E., et al., *Cytokines, macrophage lipid metabolism and foam cells: implications for cardiovascular disease therapy*. *Prog Lipid Res*, 2011. **50**(4): p. 331-47.
102. Maxfield, F.R. and I. Tabas, *Role of cholesterol and lipid organization in disease*. *Nature*, 2005. **438**(7068): p. 612-21.
103. Brown, M.S. and J.L. Goldstein, *The SREBP pathway: regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane-bound transcription factor*. *Cell*, 1997. **89**(3): p. 331-40.
104. Steinbrecher, U.P. and P.H. Pritchard, *Hydrolysis of phosphatidylcholine during LDL oxidation is mediated by platelet-activating factor acetylhydrolase*. *J Lipid Res*, 1989. **30**(3): p. 305-15.
105. Brown, M.S., Y.K. Ho, and J.L. Goldstein, *The cholesteryl ester cycle in macrophage foam cells. Continual hydrolysis and re-esterification of cytoplasmic cholesteryl esters*. *J Biol Chem*, 1980. **255**(19): p. 9344-52.
106. Li, A.C. and C.K. Glass, *The macrophage foam cell as a target for therapeutic intervention*. *Nat Med*, 2002. **8**(11): p. 1235-42.
107. Tall, A.R., et al., *HDL, ABC transporters, and cholesterol efflux: implications for the treatment of atherosclerosis*. *Cell Metab*, 2008. **7**(5): p. 365-75.
108. Morel, D.W., P.E. DiCorleto, and G.M. Chisolm, *Endothelial and smooth muscle cells alter low density lipoprotein in vitro by free radical oxidation*. *Arteriosclerosis*, 1984. **4**(4): p. 357-64.
109. Higgins, C.F., *ABC transporters: from microorganisms to man*. *Annu Rev Cell Biol*, 1992. **8**: p. 67-113.
110. Out, R., et al., *Macrophage ABCG1 deletion disrupts lipid homeostasis in alveolar macrophages and moderately influences atherosclerotic lesion development in LDL receptor-deficient mice*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2006. **26**(10): p. 2295-300.

111. van Eck, M., et al., *Leukocyte ABCA1 controls susceptibility to atherosclerosis and macrophage recruitment into tissues*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(9): p. 6298-303.
112. Van Eck, M., et al., *Macrophage ATP-binding cassette transporter A1 overexpression inhibits atherosclerotic lesion progression in low-density lipoprotein receptor knockout mice*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2006. **26**(4): p. 929-34.
113. Calkin, A.C. and P. Tontonoz, *Liver x receptor signaling pathways and atherosclerosis*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2010. **30**(8): p. 1513-8.
114. Costet, P., et al., *Sterol-dependent transactivation of the ABCA1 promoter by the liver X receptor/retinoid X receptor*. J Biol Chem, 2000. **275**(36): p. 28240-5.
115. Schwartz, K., R.M. Lawn, and D.P. Wade, *ABCA1 gene expression and ApoA-I-mediated cholesterol efflux are regulated by LXR*. Biochem Biophys Res Commun, 2000. **274**(3): p. 794-802.
116. Sun, B., et al., *Distinct mechanisms for OxLDL uptake and cellular trafficking by class B scavenger receptors CD36 and SR-BI*. J Lipid Res, 2007. **48**(12): p. 2560-70.
117. Feng, B. and I. Tabas, *ABCA1-mediated cholesterol efflux is defective in free cholesterol-loaded macrophages. Mechanism involves enhanced ABCA1 degradation in a process requiring full NPC1 activity*. J Biol Chem, 2002. **277**(45): p. 43271-80.
118. Castrillo, A., et al., *Crosstalk between LXR and toll-like receptor signaling mediates bacterial and viral antagonism of cholesterol metabolism*. Mol Cell, 2003. **12**(4): p. 805-16.
119. Tabas, I., *Consequences of cellular cholesterol accumulation: basic concepts and physiological implications*. J Clin Invest, 2002. **110**(7): p. 905-11.
120. Brown, A.J. and W. Jessup, *Oxysterols and atherosclerosis*. Atherosclerosis, 1999. **142**(1): p. 1-28.
121. Majesky, M.W., *Developmental basis of vascular smooth muscle diversity*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2007. **27**(6): p. 1248-58.
122. Chatzizisis, Y.S., et al., *Role of endothelial shear stress in the natural history of coronary atherosclerosis and vascular remodeling: molecular, cellular, and vascular behavior*. J Am Coll Cardiol, 2007. **49**(25): p. 2379-93.
123. Wentzel, J.J., et al., *Endothelial shear stress in the evolution of coronary atherosclerotic plaque and vascular remodeling: current understanding and remaining questions*. Cardiovasc Res, 2012. **96**(2): p. 234-43.
124. Zaragoza, C., S. Marquez, and M. Saura, *Endothelial mechanosensors of shear stress as regulators of atherogenesis*. Curr Opin Lipidol, 2012. **23**(5): p. 446-52.
125. Parmar, K.M., et al., *Integration of flow-dependent endothelial phenotypes by Kruppel-like factor 2*. J Clin Invest, 2006. **116**(1): p. 49-58.
126. Yamawaki, H., et al., *Fluid shear stress inhibits vascular inflammation by decreasing thioredoxin-interacting protein in endothelial cells*. J Clin Invest, 2005. **115**(3): p. 733-8.
127. Libby, P., P.M. Ridker, and G.K. Hansson, *Inflammation in atherosclerosis: from pathophysiology to practice*. J Am Coll Cardiol, 2009. **54**(23): p. 2129-38.
128. Woollard, K.J. and F. Geissmann, *Monocytes in atherosclerosis: subsets and functions*. Nat Rev Cardiol, 2010. **7**(2): p. 77-86.

129. Sakai, M., et al., *Macrophage proliferation in atherosclerosis*. Curr Opin Lipidol, 2000. **11**(5): p. 503-9.
130. de Winther, M.P., et al., *Macrophage scavenger receptor class A: A multifunctional receptor in atherosclerosis*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2000. **20**(2): p. 290-7.
131. Coller, S.P. and D.M. Paulnock, *Signaling pathways initiated in macrophages after engagement of type A scavenger receptors*. J Leukoc Biol, 2001. **70**(1): p. 142-8.
132. Hsu, H.Y., et al., *Ligands of macrophage scavenger receptor induce cytokine expression via differential modulation of protein kinase signaling pathways*. J Biol Chem, 2001. **276**(31): p. 28719-30.
133. Kuchibhotla, S., et al., *Absence of CD36 protects against atherosclerosis in ApoE knock-out mice with no additional protection provided by absence of scavenger receptor A I/II*. Cardiovasc Res, 2008. **78**(1): p. 185-96.
134. el Khoury, J., et al., *Macrophages adhere to glucose-modified basement membrane collagen IV via their scavenger receptors*. J Biol Chem, 1994. **269**(14): p. 10197-200.
135. Neyen, C., et al., *Macrophage scavenger receptor A mediates adhesion to apolipoproteins A-I and E*. Biochemistry, 2009. **48**(50): p. 11858-71.
136. Santiago-Garcia, J., T. Kodama, and R.E. Pitas, *The class A scavenger receptor binds to proteoglycans and mediates adhesion of macrophages to the extracellular matrix*. J Biol Chem, 2003. **278**(9): p. 6942-6.
137. Biwa, T., et al., *Induction of murine macrophage growth by oxidized low density lipoprotein is mediated by granulocyte macrophage colony-stimulating factor*. J Biol Chem, 1998. **273**(43): p. 28305-13.
138. Sakai, M., et al., *The scavenger receptor serves as a route for internalization of lysophosphatidylcholine in oxidized low density lipoprotein-induced macrophage proliferation*. J Biol Chem, 1996. **271**(44): p. 27346-52.
139. Ashraf, M.Z. and N. Gupta, *Scavenger receptors: Implications in atherothrombotic disorders*. Int J Biochem Cell Biol, 2011. **43**(5): p. 697-700.
140. Babaev, V.R., et al., *Reduced atherosclerotic lesions in mice deficient for total or macrophage-specific expression of scavenger receptor-A*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2000. **20**(12): p. 2593-9.
141. Linton, M.F. and S. Fazio, *Class A scavenger receptors, macrophages, and atherosclerosis*. Curr Opin Lipidol, 2001. **12**(5): p. 489-95.
142. Sakaguchi, H., et al., *Role of macrophage scavenger receptors in diet-induced atherosclerosis in mice*. Lab Invest, 1998. **78**(4): p. 423-34.
143. Suzuki, H., et al., *A role for macrophage scavenger receptors in atherosclerosis and susceptibility to infection*. Nature, 1997. **386**(6622): p. 292-6.
144. Herijgers, N., et al., *Effect of human scavenger receptor class A overexpression in bone marrow-derived cells on lipoprotein metabolism and atherosclerosis in low density lipoprotein receptor knockout mice*. J Lipid Res, 2000. **41**(9): p. 1402-9.
145. Van Eck, M., et al., *Effect of human scavenger receptor class A overexpression in bone marrow-derived cells on cholesterol levels and atherosclerosis in ApoE-deficient mice*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2000. **20**(12): p. 2600-6.

146. Whitman, S.C., et al., *Macrophage-specific expression of class A scavenger receptors in LDL receptor(-/-) mice decreases atherosclerosis and changes spleen morphology.* J Lipid Res, 2002. **43**(8): p. 1201-8.
147. Jordo, E.D., et al., *Scavenger receptors as regulators of natural antibody responses and B cell activation in autoimmunity.* Mol Immunol, 2011. **48**(11): p. 1307-18.
148. Yue, P., et al., *Enhanced hepatic apoA-I secretion and peripheral efflux of cholesterol and phospholipid in CD36 null mice.* PLoS One, 2010. **5**(3): p. e9906.
149. Janabi, M., et al., *Oxidized LDL-induced NF-kappa B activation and subsequent expression of proinflammatory genes are defective in monocyte-derived macrophages from CD36-deficient patients.* Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2000. **20**(8): p. 1953-60.
150. Park, Y.M., M. Febbraio, and R.L. Silverstein, *CD36 modulates migration of mouse and human macrophages in response to oxidized LDL and may contribute to macrophage trapping in the arterial intima.* J Clin Invest, 2009. **119**(1): p. 136-45.
151. Wintergerst, E.S., et al., *Apoptosis induced by oxidized low density lipoprotein in human monocyte-derived macrophages involves CD36 and activation of caspase-3.* Eur J Biochem, 2000. **267**(19): p. 6050-9.
152. Knowles, D.M., 2nd, et al., *Monoclonal anti-human monocyte antibodies OKM1 and OKM5 possess distinctive tissue distributions including differential reactivity with vascular endothelium.* J Immunol, 1984. **132**(5): p. 2170-3.
153. Podrez, E.A., et al., *Platelet CD36 links hyperlipidemia, oxidant stress and a prothrombotic phenotype.* Nat Med, 2007. **13**(9): p. 1086-95.
154. Febbraio, M., et al., *Targeted disruption of the class B scavenger receptor CD36 protects against atherosclerotic lesion development in mice.* J Clin Invest, 2000. **105**(8): p. 1049-56.
155. Febbraio, M., E. Guy, and R.L. Silverstein, *Stem cell transplantation reveals that absence of macrophage CD36 is protective against atherosclerosis.* Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2004. **24**(12): p. 2333-8.
156. Seetharam, D., et al., *High-density lipoprotein promotes endothelial cell migration and reendothelialization via scavenger receptor-B type I.* Circ Res, 2006. **98**(1): p. 63-72.
157. Imachi, H., et al., *Expression of human scavenger receptor B1 on and in human platelets.* Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2003. **23**(5): p. 898-904.
158. Cominacini, L., et al., *Oxidized low density lipoprotein (ox-LDL) binding to ox-LDL receptor-1 in endothelial cells induces the activation of NF-kappaB through an increased production of intracellular reactive oxygen species.* J Biol Chem, 2000. **275**(17): p. 12633-8.
159. Cominacini, L., et al., *The binding of oxidized low density lipoprotein (ox-LDL) to ox-LDL receptor-1 reduces the intracellular concentration of nitric oxide in endothelial cells through an increased production of superoxide.* J Biol Chem, 2001. **276**(17): p. 13750-5.
160. Chen, M., T. Masaki, and T. Sawamura, *LOX-1, the receptor for oxidized low-density lipoprotein identified from endothelial cells: implications in endothelial dysfunction and atherosclerosis.* Pharmacol Ther, 2002. **95**(1): p. 89-100.

161. Li, D. and J.L. Mehta, *Intracellular signaling of LOX-1 in endothelial cell apoptosis*. *Circ Res*, 2009. **104**(5): p. 566-8.
162. Hu, C., et al., *Regulation of TGFbeta1-mediated collagen formation by LOX-1: studies based on forced overexpression of TGFbeta1 in wild-type and lox-1 knock-out mouse cardiac fibroblasts*. *J Biol Chem*, 2008. **283**(16): p. 10226-31.
163. Chen, J., et al., *Cross-talk between dyslipidemia and renin-angiotensin system and the role of LOX-1 and MAPK in atherogenesis studies with the combined use of rosuvastatin and candesartan*. *Atherosclerosis*, 2006. **184**(2): p. 295-301.
164. Ferrario, C.M. and W.B. Strawn, *Role of the renin-angiotensin-aldosterone system and proinflammatory mediators in cardiovascular disease*. *Am J Cardiol*, 2006. **98**(1): p. 121-8.
165. Mehta, J.L., et al., *Deletion of LOX-1 reduces atherogenesis in LDLR knockout mice fed high cholesterol diet*. *Circ Res*, 2007. **100**(11): p. 1634-42.
166. Lundberg, G.A., et al., *Severity of coronary artery stenosis is associated with a polymorphism in the CXCL16/SR-PSOX gene*. *J Intern Med*, 2005. **257**(5): p. 415-22.
167. Neve, B.P., J.C. Fruchart, and B. Staels, *Role of the peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR) in atherosclerosis*. *Biochem Pharmacol*, 2000. **60**(8): p. 1245-50.
168. de Villiers, W.J., et al., *Macrophage-colony-stimulating factor selectively enhances macrophage scavenger receptor expression and function*. *J Exp Med*, 1994. **180**(2): p. 705-9.
169. Guidez, F., et al., *Differential utilization of Ras signaling pathways by macrophage colony-stimulating factor (CSF) and granulocyte-macrophage CSF receptors during macrophage differentiation*. *Mol Cell Biol*, 1998. **18**(7): p. 3851-61.
170. van der Kooij, M.A., et al., *Decrease in scavenger receptor expression in human monocyte-derived macrophages treated with granulocyte macrophage colony-stimulating factor*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1996. **16**(1): p. 106-14.
171. Aviram, M., *Platelet secretory products enhance LDL receptor activity and inhibit scavenger receptor activity in human monocyte derived macrophages*. *Metabolism*, 1989. **38**(5): p. 425-30.
172. Nishimura, N., et al., *Acquisition of secretion of transforming growth factor-beta 1 leads to autonomous suppression of scavenger receptor activity in a monocyte-macrophage cell line, THP-1*. *J Biol Chem*, 1998. **273**(3): p. 1562-7.
173. Kunjathoor, V.V., et al., *Scavenger receptors class A-I/II and CD36 are the principal receptors responsible for the uptake of modified low density lipoprotein leading to lipid loading in macrophages*. *J Biol Chem*, 2002. **277**(51): p. 49982-8.
174. Devries-Seimon, T., et al., *Cholesterol-induced macrophage apoptosis requires ER stress pathways and engagement of the type A scavenger receptor*. *J Cell Biol*, 2005. **171**(1): p. 61-73.
175. Whitman, S.C., P. Ravisankar, and A. Daugherty, *IFN-gamma deficiency exerts gender-specific effects on atherogenesis in apolipoprotein E-/- mice*. *J Interferon Cytokine Res*, 2002. **22**(6): p. 661-70.

176. Karlsson, M.C., et al., *Macrophages control the retention and trafficking of B lymphocytes in the splenic marginal zone*. J Exp Med, 2003. **198**(2): p. 333-40.
177. Geng, Y., T. Kodama, and G.K. Hansson, *Differential expression of scavenger receptor isoforms during monocyte-macrophage differentiation and foam cell formation*. Arterioscler Thromb, 1994. **14**(5): p. 798-806.
178. Griffin, E., et al., *A link between diabetes and atherosclerosis: Glucose regulates expression of CD36 at the level of translation*. Nat Med, 2001. **7**(7): p. 840-6.
179. Iwashima, Y., et al., *Advanced glycation end products-induced gene expression of scavenger receptors in cultured human monocyte-derived macrophages*. Biochem Biophys Res Commun, 2000. **277**(2): p. 368-80.
180. Silverstein, R.L., *Inflammation, atherosclerosis, and arterial thrombosis: role of the scavenger receptor CD36*. Cleve Clin J Med, 2009. **76 Suppl 2**: p. S27-30.
181. Han, C.Y., S.Y. Park, and Y.K. Pak, *Role of endocytosis in the transactivation of nuclear factor-kappaB by oxidized low-density lipoprotein*. Biochem J, 2000. **350 Pt 3**: p. 829-37.
182. Lipsky, R.H., et al., *The carboxyl-terminal cytoplasmic domain of CD36 is required for oxidized low-density lipoprotein modulation of NF-kappaB activity by tumor necrosis factor-alpha*. Recept Signal Transduct, 1997. **7**(1): p. 1-11.
183. Zhao, Y., et al., *Hypocholesterolemia, foam cell accumulation, but no atherosclerosis in mice lacking ABC-transporter A1 and scavenger receptor BI*. Atherosclerosis, 2011. **218**(2): p. 314-22.
184. Braun, A., et al., *Loss of SR-BI expression leads to the early onset of occlusive atherosclerotic coronary artery disease, spontaneous myocardial infarctions, severe cardiac dysfunction, and premature death in apolipoprotein E-deficient mice*. Circ Res, 2002. **90**(3): p. 270-6.
185. Covey, S.D., et al., *Scavenger receptor class B type I-mediated protection against atherosclerosis in LDL receptor-negative mice involves its expression in bone marrow-derived cells*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2003. **23**(9): p. 1589-94.
186. Kozarsky, K.F., et al., *Gene transfer and hepatic overexpression of the HDL receptor SR-BI reduces atherosclerosis in the cholesterol-fed LDL receptor-deficient mouse*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2000. **20**(3): p. 721-7.
187. Wang, N., et al., *Liver-specific overexpression of scavenger receptor BI decreases levels of very low density lipoprotein ApoB, low density lipoprotein ApoB, and high density lipoprotein in transgenic mice*. J Biol Chem, 1998. **273**(49): p. 32920-6.
188. Murphy, J.E., et al., *Biochemistry and cell biology of mammalian scavenger receptors*. Atherosclerosis, 2005. **182**(1): p. 1-15.
189. Jono, T., et al., *Lectin-like oxidized low density lipoprotein receptor-1 (LOX-1) serves as an endothelial receptor for advanced glycation end products (AGE)*. FEBS Lett, 2002. **511**(1-3): p. 170-4.
190. Li, D.Y., et al., *Upregulation of endothelial receptor for oxidized low-density lipoprotein (LOX-1) in cultured human coronary artery endothelial cells by angiotensin II type I receptor activation*. Circ Res, 1999. **84**(9): p. 1043-9.

191. Murase, T., et al., *Fluid shear stress transcriptionally induces lectin-like oxidized LDL receptor-1 in vascular endothelial cells*. *Circ Res*, 1998. **83**(3): p. 328-33.
192. Edfeldt, K., et al., *Expression of toll-like receptors in human atherosclerotic lesions: a possible pathway for plaque activation*. *Circulation*, 2002. **105**(10): p. 1158-61.
193. Otsui, K., et al., *Enhanced expression of TLR4 in smooth muscle cells in human atherosclerotic coronary arteries*. *Heart Vessels*, 2007. **22**(6): p. 416-22.
194. Michelsen, K.S., et al., *Lack of Toll-like receptor 4 or myeloid differentiation factor 88 reduces atherosclerosis and alters plaque phenotype in mice deficient in apolipoprotein E*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004. **101**(29): p. 10679-84.
195. Schoneveld, A.H., et al., *Toll-like receptor 2 stimulation induces intimal hyperplasia and atherosclerotic lesion development*. *Cardiovasc Res*, 2005. **66**(1): p. 162-9.
196. Desvarieux, M., et al., *Periodontal microbiota and carotid intima-media thickness: the Oral Infections and Vascular Disease Epidemiology Study (INVEST)*. *Circulation*, 2005. **111**(5): p. 576-82.
197. Friedewald, V.E., et al., *The American Journal of Cardiology and Journal of Periodontology Editors' Consensus: periodontitis and atherosclerotic cardiovascular disease*. *Am J Cardiol*, 2009. **104**(1): p. 59-68.
198. Michelsen, K.S., et al., *TLR signaling: an emerging bridge from innate immunity to atherogenesis*. *J Immunol*, 2004. **173**(10): p. 5901-7.
199. Bahekar, A.A., et al., *The prevalence and incidence of coronary heart disease is significantly increased in periodontitis: a meta-analysis*. *Am Heart J*, 2007. **154**(5): p. 830-7.
200. Basu, S., et al., *Necrotic but not apoptotic cell death releases heat shock proteins, which deliver a partial maturation signal to dendritic cells and activate the NF-kappa B pathway*. *Int Immunol*, 2000. **12**(11): p. 1539-46.
201. Ohashi, K., et al., *Cutting edge: heat shock protein 60 is a putative endogenous ligand of the toll-like receptor-4 complex*. *J Immunol*, 2000. **164**(2): p. 558-61.
202. Wick, G., et al., *Role of heat shock protein 65/60 in the pathogenesis of atherosclerosis*. *Int Arch Allergy Immunol*, 1995. **107**(1-3): p. 130-1.
203. Xu, Q., *Infections, heat shock proteins, and atherosclerosis*. *Curr Opin Cardiol*, 2003. **18**(4): p. 245-52.
204. Asea, A., et al., *Novel signal transduction pathway utilized by extracellular HSP70: role of toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4*. *J Biol Chem*, 2002. **277**(17): p. 15028-34.
205. Hochleitner, B.W., et al., *Fluid shear stress induces heat shock protein 60 expression in endothelial cells in vitro and in vivo*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2000. **20**(3): p. 617-23.
206. Vabulas, R.M., et al., *HSP70 as endogenous stimulus of the Toll/interleukin-1 receptor signal pathway*. *J Biol Chem*, 2002. **277**(17): p. 15107-12.
207. Vabulas, R.M., et al., *The endoplasmic reticulum-resident heat shock protein Gp96 activates dendritic cells via the Toll-like receptor 2/4 pathway*. *J Biol Chem*, 2002. **277**(23): p. 20847-53.

208. Park, J.S., et al., *Involvement of toll-like receptors 2 and 4 in cellular activation by high mobility group box 1 protein*. J Biol Chem, 2004. **279**(9): p. 7370-7.
209. Boule, M.W., et al., *Toll-like receptor 9-dependent and -independent dendritic cell activation by chromatin-immunoglobulin G complexes*. J Exp Med, 2004. **199**(12): p. 1631-40.
210. Kariko, K., et al., *mRNA is an endogenous ligand for Toll-like receptor 3*. J Biol Chem, 2004. **279**(13): p. 12542-50.
211. Johnson, G.B., et al., *Receptor-mediated monitoring of tissue well-being via detection of soluble heparan sulfate by Toll-like receptor 4*. J Immunol, 2002. **168**(10): p. 5233-9.
212. Okamura, Y., et al., *The extra domain A of fibronectin activates Toll-like receptor 4*. J Biol Chem, 2001. **276**(13): p. 10229-33.
213. Taylor, K.R., et al., *Hyaluronan fragments stimulate endothelial recognition of injury through TLR4*. J Biol Chem, 2004. **279**(17): p. 17079-84.
214. Termeer, C., et al., *Oligosaccharides of Hyaluronan activate dendritic cells via toll-like receptor 4*. J Exp Med, 2002. **195**(1): p. 99-111.
215. Miller, Y.I., et al., *Toll-like receptor 4-dependent and -independent cytokine secretion induced by minimally oxidized low-density lipoprotein in macrophages*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2005. **25**(6): p. 1213-9.
216. Shi, W., et al., *Endothelial responses to oxidized lipoproteins determine genetic susceptibility to atherosclerosis in mice*. Circulation, 2000. **102**(1): p. 75-81.
217. Walton, K.A., et al., *Specific phospholipid oxidation products inhibit ligand activation of toll-like receptors 4 and 2*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2003. **23**(7): p. 1197-203.
218. Walton, K.A., et al., *Receptors involved in the oxidized 1-palmitoyl-2-arachidonoyl-sn-glycero-3-phosphorylcholine-mediated synthesis of interleukin-8. A role for Toll-like receptor 4 and a glycosylphosphatidylinositol-anchored protein*. J Biol Chem, 2003. **278**(32): p. 29661-6.
219. Elhage, R., et al., *Reduced atherosclerosis in interleukin-18 deficient apolipoprotein E-knockout mice*. Cardiovasc Res, 2003. **59**(1): p. 234-40.
220. Gerdes, N., et al., *Expression of interleukin (IL)-18 and functional IL-18 receptor on human vascular endothelial cells, smooth muscle cells, and macrophages: implications for atherogenesis*. J Exp Med, 2002. **195**(2): p. 245-57.
221. Kirii, H., et al., *Lack of interleukin-1beta decreases the severity of atherosclerosis in ApoE-deficient mice*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2003. **23**(4): p. 656-60.
222. Mariathasan, S. and D.M. Monack, *Inflammasome adaptors and sensors: intracellular regulators of infection and inflammation*. Nat Rev Immunol, 2007. **7**(1): p. 31-40.
223. Schroder, K. and J. Tschopp, *The inflammasomes*. Cell, 2010. **140**(6): p. 821-32.
224. Liu, X., et al., *Toll-like receptor 2 plays a critical role in the progression of atherosclerosis that is independent of dietary lipids*. Atherosclerosis, 2008. **196**(1): p. 146-54.
225. Mullick, A.E., P.S. Tobias, and L.K. Curtiss, *Modulation of atherosclerosis in mice by Toll-like receptor 2*. J Clin Invest, 2005. **115**(11): p. 3149-56.

226. Monaco, C., et al., *Toll-like receptor-2 mediates inflammation and matrix degradation in human atherosclerosis*. *Circulation*, 2009. **120**(24): p. 2462-9.
227. Funk, J.L., et al., *Lipopolysaccharide stimulation of RAW 264.7 macrophages induces lipid accumulation and foam cell formation*. *Atherosclerosis*, 1993. **98**(1): p. 67-82.
228. Stewart, C.R., et al., *CD36 ligands promote sterile inflammation through assembly of a Toll-like receptor 4 and 6 heterodimer*. *Nat Immunol*, 2010. **11**(2): p. 155-61.
229. Triantafilou, M., et al., *Membrane sorting of toll-like receptor (TLR)-2/6 and TLR2/1 heterodimers at the cell surface determines heterotypic associations with CD36 and intracellular targeting*. *J Biol Chem*, 2006. **281**(41): p. 31002-11.
230. Seimon, T.A., et al., *Atherogenic lipids and lipoproteins trigger CD36-TLR2-dependent apoptosis in macrophages undergoing endoplasmic reticulum stress*. *Cell Metab*, 2010. **12**(5): p. 467-82.
231. Seimon, T.A., et al., *Combinatorial pattern recognition receptor signaling alters the balance of life and death in macrophages*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006. **103**(52): p. 19794-9.
232. Jeannin, P., et al., *Complexity and complementarity of outer membrane protein A recognition by cellular and humoral innate immunity receptors*. *Immunity*, 2005. **22**(5): p. 551-60.
233. Doyle, S.E., et al., *Toll-like receptors induce a phagocytic gene program through p38*. *J Exp Med*, 2004. **199**(1): p. 81-90.
234. Duewell, P., et al., *NLRP3 inflammasomes are required for atherogenesis and activated by cholesterol crystals*. *Nature*, 2010. **464**(7293): p. 1357-61.
235. Rajamaki, K., et al., *Cholesterol crystals activate the NLRP3 inflammasome in human macrophages: a novel link between cholesterol metabolism and inflammation*. *PLoS One*, 2010. **5**(7): p. e11765.
236. Yajima, N., et al., *Critical role of bone marrow apoptosis-associated speck-like protein, an inflammasome adaptor molecule, in neointimal formation after vascular injury in mice*. *Circulation*, 2008. **117**(24): p. 3079-87.
237. Matsumura, T., et al., *Two intracellular signaling pathways for activation of protein kinase C are involved in oxidized low-density lipoprotein-induced macrophage growth*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1997. **17**(11): p. 3013-20.
238. Sakai, M., et al., *Lysophosphatidylcholine plays an essential role in the mitogenic effect of oxidized low density lipoprotein on murine macrophages*. *J Biol Chem*, 1994. **269**(50): p. 31430-5.
239. Sakai, M., et al., *Lysophosphatidylcholine potentiates the mitogenic activity of modified LDL for human monocyte-derived macrophages*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1996. **16**(4): p. 600-5.
240. Wolfs, I.M., M.M. Donners, and M.P. de Winther, *Differentiation factors and cytokines in the atherosclerotic plaque micro-environment as a trigger for macrophage polarisation*. *Thromb Haemost*, 2011. **106**(5): p. 763-71.
241. Kadl, A., et al., *Identification of a novel macrophage phenotype that develops in response to atherogenic phospholipids via Nrf2*. *Circ Res*, 2010. **107**(6): p. 737-46.
242. Dulak, J., et al., *Heme oxygenase-1 and carbon monoxide in vascular pathobiology: focus on angiogenesis*. *Circulation*, 2008. **117**(2): p. 231-41.

243. Leon, B., M. Lopez-Bravo, and C. Ardavin, *Monocyte-derived dendritic cells*. *Semin Immunol*, 2005. **17**(4): p. 313-8.
244. Paulson, K.E., et al., *Resident intimal dendritic cells accumulate lipid and contribute to the initiation of atherosclerosis*. *Circ Res*, 2010. **106**(2): p. 383-90.
245. Andersson, J., P. Libby, and G.K. Hansson, *Adaptive immunity and atherosclerosis*. *Clin Immunol*, 2010. **134**(1): p. 33-46.
246. Hansson, G.K., A.K. Robertson, and C. Soderberg-Naucler, *Inflammation and atherosclerosis*. *Annu Rev Pathol*, 2006. **1**: p. 297-329.
247. Grabner, R., et al., *Lymphotoxin beta receptor signaling promotes tertiary lymphoid organogenesis in the aorta adventitia of aged ApoE^{-/-} mice*. *J Exp Med*, 2009. **206**(1): p. 233-48.
248. Reardon, C.A., et al., *Effect of immune deficiency on lipoproteins and atherosclerosis in male apolipoprotein E-deficient mice*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2001. **21**(6): p. 1011-6.
249. Zhou, X., et al., *Transfer of CD4(+) T cells aggravates atherosclerosis in immunodeficient apolipoprotein E knockout mice*. *Circulation*, 2000. **102**(24): p. 2919-22.
250. Buono, C., et al., *Influence of interferon-gamma on the extent and phenotype of diet-induced atherosclerosis in the LDLR-deficient mouse*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2003. **23**(3): p. 454-60.
251. Buono, C., et al., *T-bet deficiency reduces atherosclerosis and alters plaque antigen-specific immune responses*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005. **102**(5): p. 1596-601.
252. Frostegard, J., et al., *Cytokine expression in advanced human atherosclerotic plaques: dominance of pro-inflammatory (Th1) and macrophage-stimulating cytokines*. *Atherosclerosis*, 1999. **145**(1): p. 33-43.
253. Huber, S.A., et al., *T helper-cell phenotype regulates atherosclerosis in mice under conditions of mild hypercholesterolemia*. *Circulation*, 2001. **103**(21): p. 2610-6.
254. King, V.L., L.A. Cassis, and A. Daugherty, *Interleukin-4 does not influence development of hypercholesterolemia or angiotensin II-induced atherosclerotic lesions in mice*. *Am J Pathol*, 2007. **171**(6): p. 2040-7.
255. King, V.L., S.J. Szilvassy, and A. Daugherty, *Interleukin-4 deficiency decreases atherosclerotic lesion formation in a site-specific manner in female LDL receptor^{-/-} mice*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2002. **22**(3): p. 456-61.
256. Gotsman, I., et al., *Proatherogenic immune responses are regulated by the PD-1/PD-L pathway in mice*. *J Clin Invest*, 2007. **117**(10): p. 2974-82.
257. Ludewig, B., et al., *Linking immune-mediated arterial inflammation and cholesterol-induced atherosclerosis in a transgenic mouse model*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000. **97**(23): p. 12752-7.
258. Ait-Oufella, H., et al., *Natural regulatory T cells control the development of atherosclerosis in mice*. *Nat Med*, 2006. **12**(2): p. 178-80.
259. Mor, A., et al., *Role of naturally occurring CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells in experimental atherosclerosis*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2007. **27**(4): p. 893-900.
260. Binder, C.J., et al., *Natural antibodies in murine atherosclerosis*. *Curr Drug Targets*, 2008. **9**(3): p. 190-5.
261. Ait-Oufella, H., et al., *B cell depletion reduces the development of atherosclerosis in mice*. *J Exp Med*, 2010. **207**(8): p. 1579-87.

262. Caligiuri, G., et al., *Protective immunity against atherosclerosis carried by B cells of hypercholesterolemic mice*. J Clin Invest, 2002. **109**(6): p. 745-53.
263. Major, A.S., S. Fazio, and M.F. Linton, *B-lymphocyte deficiency increases atherosclerosis in LDL receptor-null mice*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2002. **22**(11): p. 1892-8.
264. Bochkov, V.N., et al., *Generation and biological activities of oxidized phospholipids*. Antioxid Redox Signal, 2010. **12**(8): p. 1009-59.
265. Binder, C.J., et al., *The role of natural antibodies in atherogenesis*. J Lipid Res, 2005. **46**(7): p. 1353-63.
266. de Faire, U., et al., *Low levels of IgM antibodies to phosphorylcholine predict cardiovascular disease in 60-year old men: effects on uptake of oxidized LDL in macrophages as a potential mechanism*. J Autoimmun, 2010. **34**(2): p. 73-9.
267. Rahman, I., et al., *Genetic and environmental regulation of inflammatory CVD biomarkers Lp-PLA2 and IgM anti-PC*. Atherosclerosis, 2011. **218**(1): p. 117-22.
268. Fiskesund, R., et al., *Low levels of antibodies against phosphorylcholine predict development of stroke in a population-based study from northern Sweden*. Stroke, 2010. **41**(4): p. 607-12.
269. Gronlund, H., et al., *Low levels of IgM antibodies against phosphorylcholine predict development of acute myocardial infarction in a population-based cohort from northern Sweden*. Eur J Cardiovasc Prev Rehabil, 2009. **16**(3): p. 382-6.
270. Newby, A.C. and A.B. Zaltsman, *Fibrous cap formation or destruction--the critical importance of vascular smooth muscle cell proliferation, migration and matrix formation*. Cardiovasc Res, 1999. **41**(2): p. 345-60.
271. Ross, R., *The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s*. Nature, 1993. **362**(6423): p. 801-9.
272. Galis, Z.S., et al., *Increased expression of matrix metalloproteinases and matrix degrading activity in vulnerable regions of human atherosclerotic plaques*. J Clin Invest, 1994. **94**(6): p. 2493-503.
273. Herman, M.P., et al., *Expression of neutrophil collagenase (matrix metalloproteinase-8) in human atheroma: a novel collagenolytic pathway suggested by transcriptional profiling*. Circulation, 2001. **104**(16): p. 1899-904.
274. Sukhova, G.K., et al., *Evidence for increased collagenolysis by interstitial collagenases-1 and -3 in vulnerable human atheromatous plaques*. Circulation, 1999. **99**(19): p. 2503-9.
275. Sukhova, G.K., et al., *Expression of the elastolytic cathepsins S and K in human atheroma and regulation of their production in smooth muscle cells*. J Clin Invest, 1998. **102**(3): p. 576-83.
276. Santilli, F., et al., *CD40/CD40L system and vascular disease*. Intern Emerg Med, 2007. **2**(4): p. 256-68.
277. Libby, P., *Molecular bases of the acute coronary syndromes*. Circulation, 1995. **91**(11): p. 2844-50.
278. Tabas, I., *Macrophage death and defective inflammation resolution in atherosclerosis*. Nat Rev Immunol, 2010. **10**(1): p. 36-46.
279. Thorp, E. and I. Tabas, *Mechanisms and consequences of efferocytosis in advanced atherosclerosis*. J Leukoc Biol, 2009. **86**(5): p. 1089-95.

280. Garbin, U., et al., *Expansion of necrotic core and shedding of Merck receptor in human carotid plaques: a role for oxidized polyunsaturated fatty acids?* Cardiovasc Res, 2013. **97**(1): p. 125-33.
281. Sather, S., et al., *A soluble form of the Mer receptor tyrosine kinase inhibits macrophage clearance of apoptotic cells and platelet aggregation.* Blood, 2007. **109**(3): p. 1026-33.
282. Wilensky, R.L. and C.H. Macphee, *Lipoprotein-associated phospholipase A(2) and atherosclerosis.* Curr Opin Lipidol, 2009. **20**(5): p. 415-20.
283. Yvan-Charvet, L., et al., *ABCA1 and ABCG1 protect against oxidative stress-induced macrophage apoptosis during efferocytosis.* Circ Res, 2010. **106**(12): p. 1861-9.
284. Miller, Y.I., et al., *Minimally modified LDL binds to CD14, induces macrophage spreading via TLR4/MD-2, and inhibits phagocytosis of apoptotic cells.* J Biol Chem, 2003. **278**(3): p. 1561-8.
285. Li, S., et al., *Defective phagocytosis of apoptotic cells by macrophages in atherosclerotic lesions of ob/ob mice and reversal by a fish oil diet.* Circ Res, 2009. **105**(11): p. 1072-82.
286. Virmani, R., et al., *Lessons from sudden coronary death: a comprehensive morphological classification scheme for atherosclerotic lesions.* Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2000. **20**(5): p. 1262-75.
287. Burke, A.P., et al., *Coronary risk factors and plaque morphology in men with coronary disease who died suddenly.* N Engl J Med, 1997. **336**(18): p. 1276-82.
288. Soloperto, G. and S. Casciaro, *Progress in atherosclerotic plaque imaging.* World J Radiol, 2012. **4**(8): p. 353-71.
289. Lutgens, E., et al., *Atherosclerotic plaque rupture: local or systemic process?* Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2003. **23**(12): p. 2123-30.
290. Fadini, G.P., et al., *Procalcific phenotypic drift of circulating progenitor cells in type 2 diabetes with coronary artery disease.* Exp Diabetes Res, 2012. **2012**: p. 921685.
291. Baldini, V., et al., *Cardiovascular disease and osteoporosis.* J Endocrinol Invest, 2005. **28**(10 Suppl): p. 69-72.
292. Morony, S., et al., *Osteoprotegerin inhibits vascular calcification without affecting atherosclerosis in ldlr(-/-) mice.* Circulation, 2008. **117**(3): p. 411-20.
293. Byon, C.H., et al., *Oxidative stress induces vascular calcification through modulation of the osteogenic transcription factor Runx2 by AKT signaling.* J Biol Chem, 2008. **283**(22): p. 15319-27.
294. Tousoulis, D., et al., *Role of inflammation and oxidative stress in endothelial progenitor cell function and mobilization: therapeutic implications for cardiovascular diseases.* Atherosclerosis, 2008. **201**(2): p. 236-47.
295. Urbich, C. and S. Dimmeler, *Endothelial progenitor cells: characterization and role in vascular biology.* Circ Res, 2004. **95**(4): p. 343-53.
296. Jujo, K., M. Ii, and D.W. Losordo, *Endothelial progenitor cells in neovascularization of infarcted myocardium.* J Mol Cell Cardiol, 2008. **45**(4): p. 530-44.
297. Chen, J.Z., et al., *Number and activity of endothelial progenitor cells from peripheral blood in patients with hypercholesterolaemia.* Clin Sci (Lond), 2004. **107**(3): p. 273-80.
298. Fadini, G.P., et al., *Circulating CD34+ cells, metabolic syndrome, and cardiovascular risk.* Eur Heart J, 2006. **27**(18): p. 2247-55.

299. Fadini, G.P., et al., *Number and function of endothelial progenitor cells as a marker of severity for diabetic vasculopathy*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2006. **26**(9): p. 2140-6.
300. Kunz, G.A., et al., *Circulating endothelial progenitor cells predict coronary artery disease severity*. *Am Heart J*, 2006. **152**(1): p. 190-5.
301. Vasa, M., et al., *Number and migratory activity of circulating endothelial progenitor cells inversely correlate with risk factors for coronary artery disease*. *Circ Res*, 2001. **89**(1): p. E1-7.
302. Hill, J.M., et al., *Circulating endothelial progenitor cells, vascular function, and cardiovascular risk*. *N Engl J Med*, 2003. **348**(7): p. 593-600.
303. Werner, N., et al., *Circulating endothelial progenitor cells and cardiovascular outcomes*. *N Engl J Med*, 2005. **353**(10): p. 999-1007.
304. Fadini, G.P., et al., *Significance of endothelial progenitor cells in subjects with diabetes*. *Diabetes Care*, 2007. **30**(5): p. 1305-13.
305. Imanishi, T., et al., *Oxidized low-density lipoprotein induces endothelial progenitor cell senescence, leading to cellular dysfunction*. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2004. **31**(7): p. 407-13.
306. Thum, T., et al., *Endothelial nitric oxide synthase uncoupling impairs endothelial progenitor cell mobilization and function in diabetes*. *Diabetes*, 2007. **56**(3): p. 666-74.
307. Libby, P., *Molecular and cellular mechanisms of the thrombotic complications of atherosclerosis*. *J Lipid Res*, 2009. **50 Suppl**: p. S352-7.
308. Virmani, R., et al., *Pathology of the vulnerable plaque*. *J Am Coll Cardiol*, 2006. **47**(8 Suppl): p. C13-8.
309. Kavurma, M.M., N.Y. Tan, and M.R. Bennett, *Death receptors and their ligands in atherosclerosis*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2008. **28**(10): p. 1694-702.
310. Mach, F., et al., *Activation of monocyte/macrophage functions related to acute atheroma complication by ligation of CD40: induction of collagenase, stromelysin, and tissue factor*. *Circulation*, 1997. **96**(2): p. 396-9.
311. Shindo, J., et al., *Increased plasminogen activator inhibitor-1 and apolipoprotein (a) in coronary atherectomy specimens in acute coronary syndromes*. *Coron Artery Dis*, 2001. **12**(7): p. 573-9.
312. Sugiyama, S., et al., *Hypochlorous acid, a macrophage product, induces endothelial apoptosis and tissue factor expression: involvement of myeloperoxidase-mediated oxidant in plaque erosion and thrombogenesis*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2004. **24**(7): p. 1309-14.
313. Dollery, C.M. and P. Libby, *Atherosclerosis and proteinase activation*. *Cardiovasc Res*, 2006. **69**(3): p. 625-35.
314. Esterbauer, H., et al., *The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL*. *Free Radic Biol Med*, 1992. **13**(4): p. 341-90.
315. Steinbrecher, U.P., et al., *Recognition of oxidized low density lipoprotein by the scavenger receptor of macrophages results from derivatization of apolipoprotein B by products of fatty acid peroxidation*. *J Biol Chem*, 1989. **264**(26): p. 15216-23.
316. Davis, B., et al., *Electrospray ionization mass spectrometry identifies substrates and products of lipoprotein-associated phospholipase A2 in oxidized human low density lipoprotein*. *J Biol Chem*, 2008. **283**(10): p. 6428-37.

317. Esterbauer, H., et al., *Continuous monitoring of in vitro oxidation of human low density lipoprotein*. Free Radic Res Commun, 1989. **6**(1): p. 67-75.
318. Steinberg, D., et al., *Beyond cholesterol. Modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity*. N Engl J Med, 1989. **320**(14): p. 915-24.
319. Goldstein, J.L., et al., *Binding site on macrophages that mediates uptake and degradation of acetylated low density lipoprotein, producing massive cholesterol deposition*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1979. **76**(1): p. 333-7.
320. Gotto, A., G. Assmann, and R. Carmera, *The ILIB Lipid Handbook for Clinical Practice*. 2nd ed. 2000, New York: International Lipid Information Bureau.
321. Parthasarathy, S., et al., *Recognition of solubilized apoproteins from delipidated, oxidized low density lipoprotein (LDL) by the acetyl-LDL receptor*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1987. **84**(2): p. 537-40.
322. Steinbrecher, U.P., *Oxidation of human low density lipoprotein results in derivatization of lysine residues of apolipoprotein B by lipid peroxide decomposition products*. J Biol Chem, 1987. **262**(8): p. 3603-8.
323. Steinbrecher, U.P., et al., *Decrease in reactive amino groups during oxidation or endothelial cell modification of LDL. Correlation with changes in receptor-mediated catabolism*. Arteriosclerosis, 1987. **7**(2): p. 135-43.
324. Tertov, V.V., et al., *Apolipoprotein B-bound lipids as a marker for evaluation of low density lipoprotein oxidation in vivo*. Biochem Biophys Res Commun, 1995. **214**(2): p. 608-13.
325. Liapikos, T.A., et al., *Platelet-activating factor formation during oxidative modification of low-density lipoprotein when PAF-acetylhydrolase has been inactivated*. Biochim Biophys Acta, 1994. **1212**(3): p. 353-60.
326. Stremler, K.E., et al., *Human plasma platelet-activating factor acetylhydrolase. Oxidatively fragmented phospholipids as substrates*. J Biol Chem, 1991. **266**(17): p. 11095-103.
327. Stremler, K.E., et al., *An oxidized derivative of phosphatidylcholine is a substrate for the platelet-activating factor acetylhydrolase from human plasma*. J Biol Chem, 1989. **264**(10): p. 5331-4.
328. Bird, D.A., et al., *Receptors for oxidized low-density lipoprotein on elicited mouse peritoneal macrophages can recognize both the modified lipid moieties and the modified protein moieties: implications with respect to macrophage recognition of apoptotic cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(11): p. 6347-52.
329. Boullier, A., et al., *The binding of oxidized low density lipoprotein to mouse CD36 is mediated in part by oxidized phospholipids that are associated with both the lipid and protein moieties of the lipoprotein*. J Biol Chem, 2000. **275**(13): p. 9163-9.
330. Fogelman, A.M., et al., *Malondialdehyde alteration of low density lipoproteins leads to cholesteryl ester accumulation in human monocyte-macrophages*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1980. **77**(4): p. 2214-8.
331. Zhang, H., Y. Yang, and U.P. Steinbrecher, *Structural requirements for the binding of modified proteins to the scavenger receptor of macrophages*. J Biol Chem, 1993. **268**(8): p. 5535-42.
332. Witztum, J.L. and D. Steinberg, *Role of oxidized low density lipoprotein in atherogenesis*. J Clin Invest, 1991. **88**(6): p. 1785-92.

333. Fyrnys, B., C. Blencowe, and H.P. Deigner, *Susceptibility of phospholipids of oxidizing LDL to enzymatic hydrolysis modulates uptake by P388D1 macrophage-like cells*. FEBS Lett, 1995. **357**(1): p. 7-12.
334. Terpstra, V., D.A. Bird, and D. Steinberg, *Evidence that the lipid moiety of oxidized low density lipoprotein plays a role in its interaction with macrophage receptors*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(4): p. 1806-11.
335. Horkko, S., et al., *Monoclonal autoantibodies specific for oxidized phospholipids or oxidized phospholipid-protein adducts inhibit macrophage uptake of oxidized low-density lipoproteins*. J Clin Invest, 1999. **103**(1): p. 117-28.
336. Podrez, E.A., et al., *Phospholipids in oxidized LDL not adducted to apoB are recognized by the CD36 scavenger receptor*. Free Radic Biol Med, 2003. **34**(3): p. 356-64.
337. Nishikawa, K., H. Arai, and K. Inoue, *Scavenger receptor-mediated uptake and metabolism of lipid vesicles containing acidic phospholipids by mouse peritoneal macrophages*. J Biol Chem, 1990. **265**(9): p. 5226-31.
338. Podrez, E.A., et al., *A novel family of atherogenic oxidized phospholipids promotes macrophage foam cell formation via the scavenger receptor CD36 and is enriched in atherosclerotic lesions*. J Biol Chem, 2002. **277**(41): p. 38517-23.
339. Sambrano, G.R. and D. Steinberg, *Recognition of oxidatively damaged and apoptotic cells by an oxidized low density lipoprotein receptor on mouse peritoneal macrophages: role of membrane phosphatidylserine*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(5): p. 1396-400.
340. Podrez, E.A., et al., *Identification of a novel family of oxidized phospholipids that serve as ligands for the macrophage scavenger receptor CD36*. J Biol Chem, 2002. **277**(41): p. 38503-16.
341. Cupillard, L., et al., *Cloning, chromosomal mapping, and expression of a novel human secretory phospholipase A2*. J Biol Chem, 1997. **272**(25): p. 15745-52.
342. Higashino Ki, K., et al., *Identification of a soluble form phospholipase A2 receptor as a circulating endogenous inhibitor for secretory phospholipase A2*. J Biol Chem, 2002. **277**(16): p. 13583-8.
343. Suzuki, N., et al., *Structures, enzymatic properties, and expression of novel human and mouse secretory phospholipase A(2)s*. J Biol Chem, 2000. **275**(8): p. 5785-93.
344. Kramer, R.M., et al., *Structure and properties of a human non-pancreatic phospholipase A2*. J Biol Chem, 1989. **264**(10): p. 5768-75.
345. Touqui, L. and M. Alaoui-El-Azher, *Mammalian secreted phospholipases A2 and their pathophysiological significance in inflammatory diseases*. Curr Mol Med, 2001. **1**(6): p. 739-54.
346. Hanasaki, K., et al., *Purified group X secretory phospholipase A(2) induced prominent release of arachidonic acid from human myeloid leukemia cells*. J Biol Chem, 1999. **274**(48): p. 34203-11.
347. Sun, G.Y., et al., *Phospholipase A2 in the central nervous system: implications for neurodegenerative diseases*. J Lipid Res, 2004. **45**(2): p. 205-13.
348. Six, D.A. and E.A. Dennis, *The expanding superfamily of phospholipase A(2) enzymes: classification and characterization*. Biochim Biophys Acta, 2000. **1488**(1-2): p. 1-19.

349. Ho, Y.S., et al., *Probing the substrate specificity of the intracellular brain platelet-activating factor acetylhydrolase*. Protein Eng, 1999. **12**(8): p. 693-700.
350. Kell, P.J., et al., *Inhibition of platelet-activating factor (PAF) acetylhydrolase by methyl arachidonyl fluorophosphonate potentiates PAF synthesis in thrombin-stimulated human coronary artery endothelial cells*. J Pharmacol Exp Ther, 2003. **307**(3): p. 1163-70.
351. Demopoulos, C.A. and S. Antonopoulou, *A discovery trip to compounds with PAF-like activity*. Adv Exp Med Biol, 1996. **416**: p. 59-63.
352. Memon, R.A., et al., *In vivo regulation of plasma platelet-activating factor acetylhydrolase during the acute phase response*. Am J Physiol, 1999. **277**(1 Pt 2): p. R94-103.
353. Yost, C.C., A.S. Weyrich, and G.A. Zimmerman, *The platelet activating factor (PAF) signaling cascade in systemic inflammatory responses*. Biochimie, 2010. **92**(6): p. 692-7.
354. Tselepis, A.D. and M. John Chapman, *Inflammation, bioactive lipids and atherosclerosis: potential roles of a lipoprotein-associated phospholipase A2, platelet activating factor-acetylhydrolase*. Atheroscler Suppl, 2002. **3**(4): p. 57-68.
355. Arai, H., *Platelet-activating factor acetylhydrolase*. Prostaglandins Other Lipid Mediat, 2002. **68-69**: p. 83-94.
356. Arai, H., et al., *Platelet-activating factor acetylhydrolase (PAF-AH)*. J Biochem, 2002. **131**(5): p. 635-40.
357. McMullen, T.W., et al., *The functional implications of the dimerization of the catalytic subunits of the mammalian brain platelet-activating factor acetylhydrolase (Ib)*. Protein Eng, 2000. **13**(12): p. 865-71.
358. Farr, R.S., et al., *Preliminary studies of an acid-labile factor (ALF) in human sera that inactivates platelet-activating factor (PAF)*. Clin Immunol Immunopathol, 1980. **15**(3): p. 318-330.
359. Stafforini, D.M., S.M. Prescott, and T.M. McIntyre, *Human plasma platelet-activating factor acetylhydrolase. Purification and properties*. J Biol Chem, 1987. **262**(9): p. 4223-30.
360. Stafforini, D.M., et al., *Human plasma platelet-activating factor acetylhydrolase. Association with lipoprotein particles and role in the degradation of platelet-activating factor*. J Biol Chem, 1987. **262**(9): p. 4215-22.
361. Rosenson, R.S. and D.M. Stafforini, *Modulation of oxidative stress, inflammation, and atherosclerosis by lipoprotein-associated phospholipase A2*. J Lipid Res, 2012. **53**(9): p. 1767-82.
362. Tjoelker, L.W., et al., *Plasma platelet-activating factor acetylhydrolase is a secreted phospholipase A2 with a catalytic triad*. J Biol Chem, 1995. **270**(43): p. 25481-7.
363. Gardner, A.A., et al., *Identification of a domain that mediates association of platelet-activating factor acetylhydrolase with high density lipoprotein*. J Biol Chem, 2008. **283**(25): p. 17099-106.
364. Tselepis, A.D., et al., *N-linked glycosylation of macrophage-derived PAF-AH is a major determinant of enzyme association with plasma HDL*. J Lipid Res, 2001. **42**(10): p. 1645-54.

365. Wardlow, M.L., et al., *Substrate specificity and partial characterization of the PAF-acetylhydrolase in human serum that rapidly inactivates platelet-activating factor*. J Immunol, 1986. **136**(9): p. 3441-6.
366. Stafforini, D.M., et al., *Release of free F2-isoprostanes from esterified phospholipids is catalyzed by intracellular and plasma platelet-activating factor acetylhydrolases*. J Biol Chem, 2006. **281**(8): p. 4616-23.
367. Elstad, M.R., et al., *Platelet-activating factor acetylhydrolase increases during macrophage differentiation. A novel mechanism that regulates accumulation of platelet-activating factor*. J Biol Chem, 1989. **264**(15): p. 8467-70.
368. Ferguson, J.F., et al., *Translational studies of lipoprotein-associated phospholipase A(2) in inflammation and atherosclerosis*. J Am Coll Cardiol, 2012. **59**(8): p. 764-72.
369. Stafforini, D.M., et al., *Human macrophages secrete platelet-activating factor acetylhydrolase*. J Biol Chem, 1990. **265**(17): p. 9682-7.
370. Hakkinen, T., et al., *Lipoprotein-associated phospholipase A(2), platelet-activating factor acetylhydrolase, is expressed by macrophages in human and rabbit atherosclerotic lesions*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1999. **19**(12): p. 2909-17.
371. Stafforini, D.M., *Biology of platelet-activating factor acetylhydrolase (PAF-AH, lipoprotein associated phospholipase A2)*. Cardiovasc Drugs Ther, 2009. **23**(1): p. 73-83.
372. Cao, Y., et al., *Expression of plasma platelet-activating factor acetylhydrolase is transcriptionally regulated by mediators of inflammation*. J Biol Chem, 1998. **273**(7): p. 4012-20.
373. Kawano, Y., H. Narahara, and J.M. Johnston, *Inhibitory effect of interleukin-8 on the secretion of platelet-activating factor acetylhydrolase by human decidual macrophages*. J Soc Gynecol Investig, 1999. **6**(6): p. 328-32.
374. Narahara, H. and J.M. Johnston, *Effects of endotoxins and cytokines on the secretion of platelet-activating factor-acetylhydrolase by human decidual macrophages*. Am J Obstet Gynecol, 1993. **169**(3): p. 531-7.
375. Shi, Y., et al., *Role of lipoprotein-associated phospholipase A2 in leukocyte activation and inflammatory responses*. Atherosclerosis, 2007. **191**(1): p. 54-62.
376. Wu, X., et al., *The p38 MAPK pathway mediates transcriptional activation of the plasma platelet-activating factor acetylhydrolase gene in macrophages stimulated with lipopolysaccharide*. J Biol Chem, 2004. **279**(34): p. 36158-65.
377. Graham, R.M., et al., *Plasma degradation of platelet-activating factor in severely ill patients with clinical sepsis*. Crit Care Med, 1994. **22**(2): p. 204-12.
378. Kald, B., et al., *Platelet-activating factor acetylhydrolase activity in intestinal mucosa and plasma of patients with Crohn's disease*. Digestion, 1996. **57**(6): p. 472-7.
379. Tetta, C., et al., *Release of platelet-activating factor in systemic lupus erythematosus*. Int Arch Allergy Appl Immunol, 1990. **91**(3): p. 244-56.
380. Wang, W.Y., et al., *OxLDL stimulates lipoprotein-associated phospholipase A2 expression in THP-1 monocytes via PI3K and p38 MAPK pathways*. Cardiovasc Res, 2010. **85**(4): p. 845-52.
381. Lavi, S., et al., *Local production of lipoprotein-associated phospholipase A2 and lysophosphatidylcholine in the coronary circulation: association with*

- early coronary atherosclerosis and endothelial dysfunction in humans. Circulation, 2007. 115(21): p. 2715-21.*
382. Kolodgie, F.D., et al., *Lipoprotein-associated phospholipase A2 protein expression in the natural progression of human coronary atherosclerosis. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2006. 26(11): p. 2523-9.*
 383. Lerman, A. and J.P. McConnell, *Lipoprotein-associated phospholipase A2: a risk marker or a risk factor? Am J Cardiol, 2008. 101(12A): p. 11F-22F.*
 384. Sarlon-Bartoli, G., et al., *Circulating lipoprotein-associated phospholipase A2 in high-grade carotid stenosis: a new biomarker for predicting unstable plaque. Eur J Vasc Endovasc Surg, 2012. 43(2): p. 154-9.*
 385. Marathe, G.K., et al., *Oxidized LDL contains inflammatory PAF-like phospholipids. Trends Cardiovasc Med, 2001. 11(3-4): p. 139-42.*
 386. Tokumura, A., et al., *Lipid peroxidation in low density lipoproteins from human plasma and egg yolk promotes accumulation of 1-acyl analogues of platelet-activating factor-like lipids. Lipids, 1996. 31(12): p. 1251-8.*
 387. Ravandi, A., et al., *Phospholipids and oxophospholipids in atherosclerotic plaques at different stages of plaque development. Lipids, 2004. 39(2): p. 97-109.*
 388. Watson, A.D., et al., *Structural identification by mass spectrometry of oxidized phospholipids in minimally oxidized low density lipoprotein that induce monocyte/endothelial interactions and evidence for their presence in vivo. J Biol Chem, 1997. 272(21): p. 13597-607.*
 389. Watson, A.D., et al., *Structural identification of a novel pro-inflammatory epoxyisoprostane phospholipid in mildly oxidized low density lipoprotein. J Biol Chem, 1999. 274(35): p. 24787-98.*
 390. Lee, S., et al., *Role of phospholipid oxidation products in atherosclerosis. Circ Res, 2012. 111(6): p. 778-99.*
 391. McIntyre, T.M., *Bioactive oxidatively truncated phospholipids in inflammation and apoptosis: Formation, targets, and inactivation. Biochim Biophys Acta, 2012. 1818(10): p. 2456-64.*
 392. Gargalovic, P.S., et al., *Identification of inflammatory gene modules based on variations of human endothelial cell responses to oxidized lipids. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. 103(34): p. 12741-6.*
 393. Romanoski, C.E., et al., *Network for activation of human endothelial cells by oxidized phospholipids: a critical role of heme oxygenase 1. Circ Res, 2011. 109(5): p. e27-41.*
 394. Gargalovic, P.S., et al., *The unfolded protein response is an important regulator of inflammatory genes in endothelial cells. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2006. 26(11): p. 2490-6.*
 395. Lee, H., et al., *Role for peroxisome proliferator-activated receptor alpha in oxidized phospholipid-induced synthesis of monocyte chemotactic protein-1 and interleukin-8 by endothelial cells. Circ Res, 2000. 87(6): p. 516-21.*
 396. Schwartz, D., et al., *Role of the GRO family of chemokines in monocyte adhesion to MM-LDL-stimulated endothelium. J Clin Invest, 1994. 94(5): p. 1968-73.*
 397. Yeh, M., et al., *Increased transcription of IL-8 in endothelial cells is differentially regulated by TNF-alpha and oxidized phospholipids. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2001. 21(10): p. 1585-91.*

398. Gharavi, N.M., et al., *Role of the Jak/STAT pathway in the regulation of interleukin-8 transcription by oxidized phospholipids in vitro and in atherosclerosis in vivo*. J Biol Chem, 2007. **282**(43): p. 31460-8.
399. Singh, N.K., et al., *15-Lipoxygenase-1-enhanced Src-Janus kinase 2-signal transducer and activator of transcription 3 stimulation and monocyte chemoattractant protein-1 expression require redox-sensitive activation of epidermal growth factor receptor in vascular wall remodeling*. J Biol Chem, 2011. **286**(25): p. 22478-88.
400. Subbanagounder, G., et al., *Epoxyisoprostane and epoxycyclopentenone phospholipids regulate monocyte chemotactic protein-1 and interleukin-8 synthesis. Formation of these oxidized phospholipids in response to interleukin-1beta*. J Biol Chem, 2002. **277**(9): p. 7271-81.
401. Cole, A.L., et al., *Oxidized phospholipid-induced endothelial cell/monocyte interaction is mediated by a cAMP-dependent R-Ras/PI3-kinase pathway*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2003. **23**(8): p. 1384-90.
402. Birukova, A.A., et al., *A role for VEGFR2 activation in endothelial responses caused by barrier disruptive OxPAPC concentrations*. PLoS One, 2012. **7**(1): p. e30957.
403. Birukova, A.A., et al., *Association between adherens junctions and tight junctions via Rap1 promotes barrier protective effects of oxidized phospholipids*. J Cell Physiol, 2011. **226**(8): p. 2052-62.
404. DeMaio, L., et al., *Oxidized phospholipids mediate occludin expression and phosphorylation in vascular endothelial cells*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2006. **290**(2): p. H674-83.
405. Li, R., et al., *OKL38 is an oxidative stress response gene stimulated by oxidized phospholipids*. J Lipid Res, 2007. **48**(3): p. 709-15.
406. Rouhanizadeh, M., et al., *Oxidized-1-palmitoyl-2-arachidonoyl-sn-glycero-3-phosphorylcholine induces vascular endothelial superoxide production: implication of NADPH oxidase*. Free Radic Biol Med, 2005. **39**(11): p. 1512-22.
407. Kronke, G., et al., *Oxidized phospholipids induce expression of human heme oxygenase-1 involving activation of cAMP-responsive element-binding protein*. J Biol Chem, 2003. **278**(51): p. 51006-14.
408. Lee, S., et al., *Ox-PAPC activation of PMET system increases expression of heme oxygenase-1 in human aortic endothelial cell*. J Lipid Res, 2009. **50**(2): p. 265-74.
409. Afonyushkin, T., et al., *Oxidized phospholipids regulate expression of ATF4 and VEGF in endothelial cells via NRF2-dependent mechanism: novel point of convergence between electrophilic and unfolded protein stress pathways*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2010. **30**(5): p. 1007-13.
410. West, X.Z., et al., *Oxidative stress induces angiogenesis by activating TLR2 with novel endogenous ligands*. Nature, 2010. **467**(7318): p. 972-6.
411. Bochkov, V.N., et al., *Oxidized phospholipids stimulate tissue factor expression in human endothelial cells via activation of ERK/EGR-1 and Ca(++)/NFAT*. Blood, 2002. **99**(1): p. 199-206.
412. Ishii, H., et al., *Oxidized phospholipids in oxidized low-density lipoprotein down-regulate thrombomodulin transcription in vascular endothelial cells through a decrease in the binding of RARbeta-RXRalpha heterodimers and Sp1 and Sp3 to their binding sequences in the TM promoter*. Blood, 2003. **101**(12): p. 4765-74.

413. Zimman, A., et al., *Vascular endothelial growth factor receptor 2 plays a role in the activation of aortic endothelial cells by oxidized phospholipids*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2007. **27**(2): p. 332-8.
414. Rahaman, S.O., G. Zhou, and R.L. Silverstein, *Vav protein guanine nucleotide exchange factor regulates CD36 protein-mediated macrophage foam cell formation via calcium and dynamin-dependent processes*. *J Biol Chem*, 2011. **286**(41): p. 36011-9.
415. Kadl, A., et al., *Oxidized phospholipid-induced inflammation is mediated by Toll-like receptor 2*. *Free Radic Biol Med*, 2011. **51**(10): p. 1903-9.
416. Pegorier, S., et al., *Oxidized phospholipid: POVPC binds to platelet-activating-factor receptor on human macrophages. Implications in atherosclerosis*. *Atherosclerosis*, 2006. **188**(2): p. 433-43.
417. Imaizumi, S., et al., *Mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 deficiency decreases atherosclerosis in apolipoprotein E null mice by reducing monocyte chemoattractant protein-1 levels*. *Mol Genet Metab*, 2010. **101**(1): p. 66-75.
418. Cherepanova, O.A., et al., *Oxidized phospholipids induce type VIII collagen expression and vascular smooth muscle cell migration*. *Circ Res*, 2009. **104**(5): p. 609-18.
419. Chatterjee, S., et al., *Identification of a biologically active component in minimally oxidized low density lipoprotein (MM-LDL) responsible for aortic smooth muscle cell proliferation*. *Glycoconj J*, 2004. **20**(5): p. 331-8.
420. Johnstone, S.R., et al., *MAPK phosphorylation of connexin 43 promotes binding of cyclin E and smooth muscle cell proliferation*. *Circ Res*, 2012. **111**(2): p. 201-11.
421. Loidl, A., et al., *Oxidized phospholipids in minimally modified low density lipoprotein induce apoptotic signaling via activation of acid sphingomyelinase in arterial smooth muscle cells*. *J Biol Chem*, 2003. **278**(35): p. 32921-8.
422. Ohkura, N., et al., *Oxidized phospholipids in oxidized low-density lipoprotein reduce the activity of tissue factor pathway inhibitor through association with its carboxy-terminal region*. *Antioxid Redox Signal*, 2004. **6**(4): p. 705-12.
423. Seyerl, M., et al., *Oxidized phospholipids induce anergy in human peripheral blood T cells*. *Eur J Immunol*, 2008. **38**(3): p. 778-87.
424. Itabe, H., et al., *Oxidized phosphatidylcholines that modify proteins. Analysis by monoclonal antibody against oxidized low density lipoprotein*. *J Biol Chem*, 1996. **271**(52): p. 33208-17.
425. Bluml, S., et al., *Epigenetic regulation of dendritic cell differentiation and function by oxidized phospholipids*. *Blood*, 2009. **114**(27): p. 5481-9.
426. Yoshida, T., Q. Gan, and G.K. Owens, *Kruppel-like factor 4, Elk-1, and histone deacetylases cooperatively suppress smooth muscle cell differentiation markers in response to oxidized phospholipids*. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2008. **295**(5): p. C1175-82.
427. Chen, R., et al., *Platelet activation by low concentrations of intact oxidized LDL particles involves the PAF receptor*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2009. **29**(3): p. 363-71.
428. Chisolm, G.M., 3rd and Y. Chai, *Regulation of cell growth by oxidized LDL*. *Free Radic Biol Med*, 2000. **28**(12): p. 1697-707.
429. Kougiyas, P., et al., *Lysophosphatidylcholine and secretory phospholipase A2 in vascular disease: mediators of endothelial dysfunction and atherosclerosis*. *Med Sci Monit*, 2006. **12**(1): p. RA5-16.

430. Schmitz, G. and K. Ruebsaamen, *Metabolism and atherogenic disease association of lysophosphatidylcholine*. *Atherosclerosis*, 2010. **208**(1): p. 10-8.
431. Inoue, N., et al., *Lysophosphatidylcholine increases the secretion of matrix metalloproteinase 2 through the activation of NADH/NADPH oxidase in cultured aortic endothelial cells*. *Atherosclerosis*, 2001. **155**(1): p. 45-52.
432. Kugiyama, K., et al., *Burst production of superoxide anion in human endothelial cells by lysophosphatidylcholine*. *Atherosclerosis*, 1999. **143**(1): p. 201-4.
433. Safaya, R., et al., *Effect of lysophosphatidylcholine on vasomotor functions of porcine coronary arteries*. *J Surg Res*, 2005. **126**(2): p. 182-8.
434. Takeshita, S., et al., *Lysophosphatidylcholine enhances superoxide anions production via endothelial NADH/NADPH oxidase*. *J Atheroscler Thromb*, 2000. **7**(4): p. 238-46.
435. Chen, L., et al., *Oxidative modification of low density lipoprotein in normal and hyperlipidemic patients: effect of lysophosphatidylcholine composition on vascular relaxation*. *J Lipid Res*, 1997. **38**(3): p. 546-53.
436. Eizawa, H., et al., *Lysophosphatidylcholine inhibits endothelium-dependent hyperpolarization and N omega-nitro-L-arginine/indomethacin-resistant endothelium-dependent relaxation in the porcine coronary artery*. *Circulation*, 1995. **92**(12): p. 3520-6.
437. Froese, D.E., et al., *Inhibition of endothelium-dependent vascular relaxation by lysophosphatidylcholine: impact of lysophosphatidylcholine on mechanisms involving endothelium-derived nitric oxide and endothelium derived hyperpolarizing factor*. *Mol Cell Biochem*, 1999. **197**(1-2): p. 1-6.
438. Fukao, M., et al., *Evidence for selective inhibition by lysophosphatidylcholine of acetylcholine-induced endothelium-dependent hyperpolarization and relaxation in rat mesenteric artery*. *Br J Pharmacol*, 1995. **116**(1): p. 1541-3.
439. Liu, S.Y., et al., *Alteration of lysophosphatidylcholine content in low density lipoprotein after oxidative modification: relationship to endothelium dependent relaxation*. *Cardiovasc Res*, 1994. **28**(10): p. 1476-81.
440. Wong, W.T., et al., *Relative contribution of individual oxidized components in ox-LDL to inhibition on endothelium-dependent relaxation in rat aorta*. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*, 2011. **21**(3): p. 157-64.
441. Cieslik, K., et al., *Transcriptional regulation of endothelial nitric-oxide synthase by lysophosphatidylcholine*. *J Biol Chem*, 1998. **273**(24): p. 14885-90.
442. Cybulsky, M.I. and M.A. Gimbrone, Jr., *Endothelial expression of a mononuclear leukocyte adhesion molecule during atherogenesis*. *Science*, 1991. **251**(4995): p. 788-91.
443. Kita, T., *LOX-1, a possible clue to the missing link between hypertension and atherogenesis*. *Circ Res*, 1999. **84**(9): p. 1113-5.
444. Kume, N., M.I. Cybulsky, and M.A. Gimbrone, Jr., *Lysophosphatidylcholine, a component of atherogenic lipoproteins, induces mononuclear leukocyte adhesion molecules in cultured human and rabbit arterial endothelial cells*. *J Clin Invest*, 1992. **90**(3): p. 1138-44.
445. Tan, M., et al., *Lysophosphatidylcholine activates a novel PKD2-mediated signaling pathway that controls monocyte migration*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2009. **29**(9): p. 1376-82.
446. Murohara, T., R. Scalia, and A.M. Lefer, *Lysophosphatidylcholine promotes P-selectin expression in platelets and endothelial cells. Possible involvement*

- of protein kinase C activation and its inhibition by nitric oxide donors.* Circ Res, 1996. **78**(5): p. 780-9.
447. Ochi, H., et al., *Tyrosine phosphorylation of platelet endothelial cell adhesion molecule-1 induced by lysophosphatidylcholine in cultured endothelial cells.* Biochem Biophys Res Commun, 1998. **243**(3): p. 862-8.
 448. Yan, S., et al., *Effects of lysophosphatidylcholine on monolayer cell permeability of human coronary artery endothelial cells.* Surgery, 2005. **138**(3): p. 464-73.
 449. Park, S., et al., *Superoxide is a potential culprit of caspase-3 dependent endothelial cell death induced by lysophosphatidylcholine.* J Physiol Pharmacol, 2010. **61**(4): p. 375-81.
 450. Takahashi, M., et al., *Lysophosphatidylcholine induces apoptosis in human endothelial cells through a p38-mitogen-activated protein kinase-dependent mechanism.* Atherosclerosis, 2002. **161**(2): p. 387-94.
 451. Kume, N. and M.A. Gimbrone, Jr., *Lysophosphatidylcholine transcriptionally induces growth factor gene expression in cultured human endothelial cells.* J Clin Invest, 1994. **93**(2): p. 907-11.
 452. Sato, N., et al., *Changes of gene expression by lysophosphatidylcholine in vascular endothelial cells: 12 up-regulated distinct genes including 5 cell growth-related, 3 thrombosis-related, and 4 others.* J Biochem, 1998. **123**(6): p. 1119-26.
 453. Park, C.H., et al., *Lysophosphatidylcholine exhibits selective cytotoxicity, accompanied by ROS formation, in RAW 264.7 macrophages.* Lipids, 2009. **44**(5): p. 425-35.
 454. Yamamoto, M., H. Hara, and T. Adachi, *The expression of extracellular-superoxide dismutase is increased by lysophosphatidylcholine in human monocytic U937 cells.* Atherosclerosis, 2002. **163**(2): p. 223-8.
 455. Liu-Wu, Y., E. Hurt-Camejo, and O. Wiklund, *Lysophosphatidylcholine induces the production of IL-1beta by human monocytes.* Atherosclerosis, 1998. **137**(2): p. 351-7.
 456. Terkeltaub, R., et al., *Oxidized LDL induces monocytic cell expression of interleukin-8, a chemokine with T-lymphocyte chemotactic activity.* Arterioscler Thromb, 1994. **14**(1): p. 47-53.
 457. Quinn, M.T., S. Parthasarathy, and D. Steinberg, *Lysophosphatidylcholine: a chemotactic factor for human monocytes and its potential role in atherogenesis.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1988. **85**(8): p. 2805-9.
 458. Weber, C., W. Erl, and P.C. Weber, *Enhancement of monocyte adhesion to endothelial cells by oxidatively modified low-density lipoprotein is mediated by activation of CD11b.* Biochem Biophys Res Commun, 1995. **206**(2): p. 621-8.
 459. Nakano, T., et al., *Lysophosphatidylcholine upregulates the level of heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor mRNA in human monocytes.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(3): p. 1069-73.
 460. Ramos, M.A., et al., *Induction of macrophage VEGF in response to oxidized LDL and VEGF accumulation in human atherosclerotic lesions.* Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1998. **18**(7): p. 1188-96.
 461. Rong, J.X., et al., *Lysophosphatidylcholine stimulates monocyte chemoattractant protein-1 gene expression in rat aortic smooth muscle cells.* Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2002. **22**(10): p. 1617-23.

462. Chai, Y.C., D.G. Binion, and G.M. Chisolm, *Relationship of molecular structure to the mechanism of lysophospholipid-induced smooth muscle cell proliferation*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2000. **279**(4): p. H1830-8.
463. Watanabe, T., et al., *Lysophosphatidylcholine potentiates the mitogenic effect of various vasoactive compounds on rabbit aortic smooth muscle cells*. Jpn Heart J, 2002. **43**(4): p. 409-16.
464. Watanabe, T., et al., *Lysophosphatidylcholine is a major contributor to the synergistic effect of mildly oxidized low-density lipoprotein with endothelin-1 on vascular smooth muscle cell proliferation*. J Cardiovasc Pharmacol, 2002. **39**(3): p. 449-59.
465. Kohno, M., et al., *Suppression by eicosapentaenoic acid of oxidized low-density lipoprotein and lysophosphatidylcholine-induced migration in cultured rat vascular smooth muscle cells*. Metabolism, 2000. **49**(5): p. 560-2.
466. Chai, Y.C., et al., *Oxidized low density lipoprotein and lysophosphatidylcholine stimulate cell cycle entry in vascular smooth muscle cells. Evidence for release of fibroblast growth factor-2*. J Biol Chem, 1996. **271**(30): p. 17791-7.
467. Chen, Y., et al., *Lysophosphatidylcholine causes Ca²⁺ influx, enhanced DNA synthesis and cytotoxicity in cultured vascular smooth muscle cells*. Atherosclerosis, 1995. **112**(1): p. 69-76.
468. Hsieh, C.C., et al., *Lysophosphatidylcholine induces apoptotic and non-apoptotic death in vascular smooth muscle cells: in comparison with oxidized LDL*. Atherosclerosis, 2000. **151**(2): p. 481-91.
469. Hara, Y., et al., *Lysophosphatidylcholine upregulates LOX-1, chemokine receptors, and activation-related transcription factors in human T-cell line Jurkat*. J Thromb Thrombolysis, 2008. **26**(2): p. 113-8.
470. Radu, C.G., et al., *T cell chemotaxis to lysophosphatidylcholine through the G2A receptor*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(1): p. 245-50.
471. Parks, B.W., A.J. Lusis, and J.H. Kabarowski, *Loss of the lysophosphatidylcholine effector, G2A, ameliorates aortic atherosclerosis in low-density lipoprotein receptor knockout mice*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2006. **26**(12): p. 2703-9.
472. Miwa, Y., et al., *Lysophosphatidylcholine inhibits receptor-mediated Ca²⁺ mobilization in intact endothelial cells of rabbit aorta*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1997. **17**(8): p. 1561-7.
473. Murugesan, G., et al., *Lysophosphatidylcholine regulates human microvascular endothelial cell expression of chemokines*. J Mol Cell Cardiol, 2003. **35**(11): p. 1375-84.
474. Ozaki, H., et al., *Lysophosphatidylcholine activates mitogen-activated protein kinases by a tyrosine kinase-dependent pathway in bovine aortic endothelial cells*. Atherosclerosis, 1999. **143**(2): p. 261-6.
475. Rosenblat, M., et al., *Paraoxonase 1 (PON1) enhances HDL-mediated macrophage cholesterol efflux via the ABCA1 transporter in association with increased HDL binding to the cells: a possible role for lysophosphatidylcholine*. Atherosclerosis, 2005. **179**(1): p. 69-77.
476. Hara, S., et al., *Lysophosphatidylcholine promotes cholesterol efflux from mouse macrophage foam cells*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1997. **17**(7): p. 1258-66.

477. Martens, J.S., et al., *A modification of apolipoprotein B accounts for most of the induction of macrophage growth by oxidized low density lipoprotein*. J Biol Chem, 1999. **274**(16): p. 10903-10.
478. Meyer zu Heringdorf, D. and K.H. Jakobs, *Lysophospholipid receptors: signalling, pharmacology and regulation by lysophospholipid metabolism*. Biochim Biophys Acta, 2007. **1768**(4): p. 923-40.
479. Soga, T., et al., *Lysophosphatidylcholine enhances glucose-dependent insulin secretion via an orphan G-protein-coupled receptor*. Biochem Biophys Res Commun, 2005. **326**(4): p. 744-51.
480. Rikitake, Y., et al., *Expression of G2A, a receptor for lysophosphatidylcholine, by macrophages in murine, rabbit, and human atherosclerotic plaques*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2002. **22**(12): p. 2049-53.
481. Weng, Z., et al., *A DNA damage and stress inducible G protein-coupled receptor blocks cells in G2/M*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(21): p. 12334-9.
482. Wang, L., et al., *Lysophosphatidylcholine-induced surface redistribution regulates signaling of the murine G protein-coupled receptor G2A*. Mol Biol Cell, 2005. **16**(5): p. 2234-47.
483. Frasch, S.C., et al., *NADPH oxidase-dependent generation of lysophosphatidylserine enhances clearance of activated and dying neutrophils via G2A*. J Biol Chem, 2008. **283**(48): p. 33736-49.
484. Yang, L.V., et al., *Gi-independent macrophage chemotaxis to lysophosphatidylcholine via the immunoregulatory GPCR G2A*. Blood, 2005. **105**(3): p. 1127-34.
485. Kabarowski, J.H., et al., *Lysophosphatidylcholine as a ligand for the immunoregulatory receptor G2A*. Science, 2001. **293**(5530): p. 702-5.
486. Kabarowski, J.H., *G2A and LPC: regulatory functions in immunity*. Prostaglandins Other Lipid Mediat, 2009. **89**(3-4): p. 73-81.
487. Waddington, E.I., et al., *Fatty acid oxidation products in human atherosclerotic plaque: an analysis of clinical and histopathological correlates*. Atherosclerosis, 2003. **167**(1): p. 111-20.
488. MacPhee, C.H., et al., *Lipoprotein-associated phospholipase A2, platelet-activating factor acetylhydrolase, generates two bioactive products during the oxidation of low-density lipoprotein: use of a novel inhibitor*. Biochem J, 1999. **338** (Pt 2): p. 479-87.
489. Carpenter, K.L., et al., *Inhibition of lipoprotein-associated phospholipase A2 diminishes the death-inducing effects of oxidised LDL on human monocyte-macrophages*. FEBS Lett, 2001. **505**(3): p. 357-63.
490. Obinata, H., et al., *Identification of 9-hydroxyoctadecadienoic acid and other oxidized free fatty acids as ligands of the G protein-coupled receptor G2A*. J Biol Chem, 2005. **280**(49): p. 40676-83.
491. Yang, M., et al., *Lipoprotein-associated phospholipase A2 decreases oxidized lipoprotein cellular association by human macrophages and hepatocytes*. Biochim Biophys Acta, 2010. **1801**(2): p. 176-82.
492. Turunen, P., et al., *Adenovirus-mediated gene transfer of Lp-PLA2 reduces LDL degradation and foam cell formation in vitro*. J Lipid Res, 2004. **45**(9): p. 1633-9.

493. Marathe, G.K., et al., *Inflammatory platelet-activating factor-like phospholipids in oxidized low density lipoproteins are fragmented alkyl phosphatidylcholines*. J Biol Chem, 1999. **274**(40): p. 28395-404.
494. Marathe, G.K., et al., *Activation of vascular cells by PAF-like lipids in oxidized LDL*. Vascul Pharmacol, 2002. **38**(4): p. 193-200.
495. Androulakis, N., et al., *Molecular and mechanistic characterization of platelet-activating factor-like bioactivity produced upon LDL oxidation*. J Lipid Res, 2005. **46**(9): p. 1923-32.
496. Mehta, J.L., T.G. Saldeen, and K. Rand, *Interactive role of infection, inflammation and traditional risk factors in atherosclerosis and coronary artery disease*. J Am Coll Cardiol, 1998. **31**(6): p. 1217-25.
497. Antonopoulou, S., et al., *PAF, a potent lipid mediator*, in *Bioactive Phospholipids: Role in Inflammation and Atherosclerosis*, A.D. Tselepis, Editor. 2008, Transworld Research Network.
498. Shimizu, T., *Lipid mediators in health and disease: enzymes and receptors as therapeutic targets for the regulation of immunity and inflammation*. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 2009. **49**: p. 123-50.
499. Verouti, S.N., et al., *PAF effects on MCP-1 and IL-6 secretion in U-937 monocytes in comparison with oxLDL and IL-1beta effects*. Atherosclerosis, 2011. **219**(2): p. 519-25.
500. Pan, Z., V.V. Kravchenko, and R.D. Ye, *Platelet-activating factor stimulates transcription of the heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor in monocytes. Correlation with an increased kappa B binding activity*. J Biol Chem, 1995. **270**(14): p. 7787-90.
501. Gaumont, F., et al., *Differential signaling pathways in platelet-activating factor-induced proliferation and interleukin-6 production by rat vascular smooth muscle cells*. J Cardiovasc Pharmacol, 1997. **30**(2): p. 169-75.
502. Heery, J.M., et al., *Oxidatively modified LDL contains phospholipids with platelet-activating factor-like activity and stimulates the growth of smooth muscle cells*. J Clin Invest, 1995. **96**(5): p. 2322-30.
503. Demopoulos, C., H. Karantonis, and S. Antonopoulou, *Platelet activating factor - a molecular link between atherosclerosis theories*. European Journal of Lipid Science and Technology, 2003. **105**(11): p. 705-716.
504. Lorant, D.E., et al., *Inflammatory roles of P-selectin*. J Clin Invest, 1993. **92**(2): p. 559-70.
505. Lorant, D.E., et al., *Platelet-activating factor mediates procoagulant activity on the surface of endothelial cells by promoting leukocyte adhesion*. Semin Cell Biol, 1995. **6**(5): p. 295-303.
506. Subbanagounder, G., et al., *Evidence that phospholipid oxidation products and/or platelet-activating factor play an important role in early atherogenesis : in vitro and In vivo inhibition by WEB 2086*. Circ Res, 1999. **85**(4): p. 311-8.
507. Feliste, R., et al., *Protective effect of BN 52021, a specific antagonist of platelet-activating factor (PAF-acether) against diet-induced cholesteryl ester deposition in rabbit aorta*. Atherosclerosis, 1989. **78**(2-3): p. 151-8.
508. Σταματάκης, Γ. and Κ. Δημόπουλος, *Φυσικής προέλευσης ενώσεις με in vitro αντι-PAF δράση και in vivo αντιαθηρογόνο δράση*. Καρδιολογική Γνώμη, 2012. **7**(2): p. 134-142.
509. Anderson, J.L., *Lipoprotein-associated phospholipase A2: an independent predictor of coronary artery disease events in primary and secondary prevention*. Am J Cardiol, 2008. **101**(12A): p. 23F-33F.

510. Colley, K.J., R.L. Wolfert, and M.E. Cobble, *Lipoprotein associated phospholipase A(2): role in atherosclerosis and utility as a biomarker for cardiovascular risk*. EPMA J, 2011. **2**(1): p. 27-38.
511. Daniels, L.B., et al., *Lipoprotein-associated phospholipase A2 is an independent predictor of incident coronary heart disease in an apparently healthy older population: the Rancho Bernardo Study*. J Am Coll Cardiol, 2008. **51**(9): p. 913-9.
512. Epps, K.C. and R.L. Wilensky, *Lp-PLA(2)- a novel risk factor for high-risk coronary and carotid artery disease*. J Intern Med, 2011. **269**(1): p. 94-106.
513. Garza, C.A., et al., *Association between lipoprotein-associated phospholipase A2 and cardiovascular disease: a systematic review*. Mayo Clin Proc, 2007. **82**(2): p. 159-65.
514. Rosenson, R.S., *Lp-PLA(2) and risk of atherosclerotic vascular disease*. Lancet, 2010. **375**(9725): p. 1498-500.
515. Sudhir, K., *Lipoprotein-associated phospholipase A2, vascular inflammation and cardiovascular risk prediction*. Vasc Health Risk Manag, 2006. **2**(2): p. 153-6.
516. McConnell, J.P. and D.M. Hoefner, *Lipoprotein-associated phospholipase A2*. Clin Lab Med, 2006. **26**(3): p. 679-97, vii.
517. Cederholm, A., et al., *Platelet-activating factor-acetylhydrolase and other novel risk and protective factors for cardiovascular disease in systemic lupus erythematosus*. Arthritis Rheum, 2004. **50**(9): p. 2869-76.
518. Ballantyne, C.M., et al., *Lipoprotein-associated phospholipase A2, high-sensitivity C-reactive protein, and risk for incident coronary heart disease in middle-aged men and women in the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) study*. Circulation, 2004. **109**(7): p. 837-42.
519. Blake, G.J., et al., *A prospective evaluation of lipoprotein-associated phospholipase A(2) levels and the risk of future cardiovascular events in women*. J Am Coll Cardiol, 2001. **38**(5): p. 1302-6.
520. Caslake, M.J., et al., *Lipoprotein-associated phospholipase A(2), inflammatory biomarkers, and risk of cardiovascular disease in the Prospective Study of Pravastatin in the Elderly at Risk (PROSPER)*. Atherosclerosis, 2010. **210**(1): p. 28-34.
521. Hatoum, I.J., et al., *Lipoprotein-associated phospholipase A2 activity and incident coronary heart disease among men and women with type 2 diabetes*. Diabetes, 2010. **59**(5): p. 1239-43.
522. Hou, L., et al., *Associations of PLA2G7 gene polymorphisms with plasma lipoprotein-associated phospholipase A2 activity and coronary heart disease in a Chinese Han population: the Beijing atherosclerosis study*. Hum Genet, 2009. **125**(1): p. 11-20.
523. Jenny, N.S., et al., *Lipoprotein-associated phospholipase A(2) (Lp-PLA(2)) and risk of cardiovascular disease in older adults: results from the Cardiovascular Health Study*. Atherosclerosis, 2010. **209**(2): p. 528-32.
524. Kim, J.Y., et al., *Lipoprotein-associated phospholipase A2 activity is associated with coronary artery disease and markers of oxidative stress: a case-control study*. Am J Clin Nutr, 2008. **88**(3): p. 630-7.
525. Koenig, W., et al., *Lipoprotein-associated phospholipase A2 adds to risk prediction of incident coronary events by C-reactive protein in apparently healthy middle-aged men from the general population: results from the 14-*

- year follow-up of a large cohort from southern Germany.* *Circulation*, 2004. **110**(14): p. 1903-8.
526. Oei, H.H., et al., *Lipoprotein-associated phospholipase A2 activity is associated with risk of coronary heart disease and ischemic stroke: the Rotterdam Study.* *Circulation*, 2005. **111**(5): p. 570-5.
527. Packard, C.J., et al., *Lipoprotein-associated phospholipase A2 as an independent predictor of coronary heart disease. West of Scotland Coronary Prevention Study Group.* *N Engl J Med*, 2000. **343**(16): p. 1148-55.
528. Persson, M., et al., *Lp-PLA2 activity and mass are associated with increased incidence of ischemic stroke: a population-based cohort study from Malmo, Sweden.* *Atherosclerosis*, 2008. **200**(1): p. 191-8.
529. Persson, M., et al., *Elevated Lp-PLA2 levels add prognostic information to the metabolic syndrome on incidence of cardiovascular events among middle-aged nondiabetic subjects.* *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2007. **27**(6): p. 1411-6.
530. Raichlin, E., et al., *Lipoprotein-associated phospholipase A2 predicts progression of cardiac allograft vasculopathy and increased risk of cardiovascular events in heart transplant patients.* *Transplantation*, 2008. **85**(7): p. 963-8.
531. Tsimikas, S., et al., *Lipoprotein-associated phospholipase A2 activity, ferritin levels, metabolic syndrome, and 10-year cardiovascular and non-cardiovascular mortality: results from the Bruneck study.* *Eur Heart J*, 2009. **30**(1): p. 107-15.
532. Winkler, K., et al., *Fluvastatin slow-release lowers platelet-activating factor acetyl hydrolase activity: a placebo-controlled trial in patients with type 2 diabetes.* *J Clin Endocrinol Metab*, 2004. **89**(3): p. 1153-9.
533. Corsetti, J.P., et al., *High lipoprotein-associated phospholipase A2 is a risk factor for recurrent coronary events in postinfarction patients.* *Clin Chem*, 2006. **52**(7): p. 1331-8.
534. Gerber, Y., et al., *Lipoprotein-associated phospholipase A2 and prognosis after myocardial infarction in the community.* *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2006. **26**(11): p. 2517-22.
535. Koenig, W., et al., *Lipoprotein-associated phospholipase A2 predicts future cardiovascular events in patients with coronary heart disease independently of traditional risk factors, markers of inflammation, renal function, and hemodynamic stress.* *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2006. **26**(7): p. 1586-93.
536. May, H.T., et al., *Lipoprotein-associated phospholipase A2 independently predicts the angiographic diagnosis of coronary artery disease and coronary death.* *Am Heart J*, 2006. **152**(5): p. 997-1003.
537. O'Donoghue, M., et al., *Lipoprotein-associated phospholipase A2 and its association with cardiovascular outcomes in patients with acute coronary syndromes in the PROVE IT-TIMI 22 (PRavastatin Or atorVastatin Evaluation and Infection Therapy-Thrombolysis In Myocardial Infarction) trial.* *Circulation*, 2006. **113**(14): p. 1745-52.
538. Robins, S.J., et al., *Cardiovascular events with increased lipoprotein-associated phospholipase A(2) and low high-density lipoprotein-cholesterol: the Veterans Affairs HDL Intervention Trial.* *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2008. **28**(6): p. 1172-8.
539. Sabatine, M.S., et al., *Prognostic utility of lipoprotein-associated phospholipase A2 for cardiovascular outcomes in patients with stable*

- coronary artery disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2007. **27**(11): p. 2463-9.
540. Winkler, K., et al., *Lipoprotein-associated phospholipase A2 predicts 5-year cardiac mortality independently of established risk factors and adds prognostic information in patients with low and medium high-sensitivity C-reactive protein (the Ludwigshafen risk and cardiovascular health study)*. *Clin Chem*, 2007. **53**(8): p. 1440-7.
541. Elkind, M.S., et al., *Lipoprotein-associated phospholipase A2 activity and risk of recurrent stroke*. *Cerebrovasc Dis*, 2009. **27**(1): p. 42-50.
542. Herrmann, J., et al., *Expression of lipoprotein-associated phospholipase A(2) in carotid artery plaques predicts long-term cardiac outcome*. *Eur Heart J*, 2009. **30**(23): p. 2930-8.
543. Thompson, A., et al., *Lipoprotein-associated phospholipase A(2) and risk of coronary disease, stroke, and mortality: collaborative analysis of 32 prospective studies*. *Lancet*, 2010. **375**(9725): p. 1536-44.
544. Mancia, G., et al., *2007 ESH-ESC Practice Guidelines for the Management of Arterial Hypertension: ESH-ESC Task Force on the Management of Arterial Hypertension*. *J Hypertens*, 2007. **25**(9): p. 1751-62.
545. Gong, H.P., et al., *Plasma lipoprotein-associated phospholipase A2 in patients with metabolic syndrome and carotid atherosclerosis*. *Lipids Health Dis*, 2011. **10**: p. 13.
546. Persson, M., et al., *The epidemiology of Lp-PLA(2): distribution and correlation with cardiovascular risk factors in a population-based cohort*. *Atherosclerosis*, 2007. **190**(2): p. 388-96.
547. Campo, S., et al., *Platelet-activating factor acetylhydrolase is not associated with carotid intima-media thickness in hypercholesterolemic Sicilian individuals*. *Clin Chem*, 2004. **50**(11): p. 2077-82.
548. Kiortsis, D.N., et al., *Lack of association between carotid intima-media thickness and PAF-acetylhydrolase mass and activity in patients with primary hyperlipidemia*. *Angiology*, 2005. **56**(4): p. 451-8.
549. Davidson, M.H., et al., *Consensus panel recommendation for incorporating lipoprotein-associated phospholipase A2 testing into cardiovascular disease risk assessment guidelines*. *Am J Cardiol*, 2008. **101**(12A): p. 51F-57F.
550. Lanman, R.B., et al., *Lipoprotein-associated phospholipase A2: review and recommendation of a clinical cut point for adults*. *Prev Cardiol*, 2006. **9**(3): p. 138-43.
551. Stafforini, D.M., et al., *Platelet-activating factor acetylhydrolase deficiency. A missense mutation near the active site of an anti-inflammatory phospholipase*. *J Clin Invest*, 1996. **97**(12): p. 2784-91.
552. Yamada, Y., et al., *Correlations between plasma platelet-activating factor acetylhydrolase (PAF-AH) activity and PAF-AH genotype, age, and atherosclerosis in a Japanese population*. *Atherosclerosis*, 2000. **150**(1): p. 209-16.
553. Hiramoto, M., et al., *A mutation in plasma platelet-activating factor acetylhydrolase (Val279-->Phe) is a genetic risk factor for stroke*. *Stroke*, 1997. **28**(12): p. 2417-20.
554. Unno, N., et al., *Plasma platelet-activating factor acetylhydrolase deficiency is associated with atherosclerotic occlusive disease in japan*. *J Vasc Surg*, 2000. **32**(2): p. 263-7.

555. Yamada, Y., et al., *Identification of the G994--> T missense in exon 9 of the plasma platelet-activating factor acetylhydrolase gene as an independent risk factor for coronary artery disease in Japanese men.* Metabolism, 1998. **47**(2): p. 177-81.
556. Yamada, Y., et al., *Prediction of the risk of myocardial infarction from polymorphisms in candidate genes.* N Engl J Med, 2002. **347**(24): p. 1916-23.
557. Shimokata, K., et al., *Association of gene polymorphisms with coronary artery disease in individuals with or without nonfamilial hypercholesterolemia.* Atherosclerosis, 2004. **172**(1): p. 167-73.
558. Zheng, G.H., et al., *Lipoprotein-associated phospholipase A2 gene V279F polymorphisms and coronary heart disease: a meta-analysis.* Mol Biol Rep, 2011. **38**(6): p. 4089-99.
559. Casas, J.P., et al., *PLA2G7 genotype, lipoprotein-associated phospholipase A2 activity, and coronary heart disease risk in 10 494 cases and 15 624 controls of European Ancestry.* Circulation, 2010. **121**(21): p. 2284-93.
560. Jang, Y., et al., *The Val279Phe variant of the lipoprotein-associated phospholipase A2 gene is associated with catalytic activities and cardiovascular disease in Korean men.* J Clin Endocrinol Metab, 2006. **91**(9): p. 3521-7.
561. Liu, P.Y., et al., *Platelet-activating factor-acetylhydrolase A379V (exon 11) gene polymorphism is an independent and functional risk factor for premature myocardial infarction.* J Thromb Haemost, 2006. **4**(5): p. 1023-8.
562. Hase, M., et al., *Reduction in the extent of atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice induced by electroporation-mediated transfer of the human plasma platelet-activating factor acetylhydrolase gene into skeletal muscle.* Prostaglandins Other Lipid Mediat, 2002. **70**(1-2): p. 107-18.
563. Quarck, R., et al., *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**(20): p. 2495-500.
564. Theilmeyer, G., et al., *HDL-associated PAF-AH reduces endothelial adhesiveness in apoE^{-/-} mice.* FASEB J, 2000. **14**(13): p. 2032-9.
565. Turunen, P., et al., *Intravascular adenovirus-mediated lipoprotein-associated phospholipase A2 gene transfer reduces neointima formation in balloon-denuded rabbit aorta.* Atherosclerosis, 2005. **179**(1): p. 27-33.
566. Arakawa, H., et al., *Local expression of platelet-activating factor-acetylhydrolase reduces accumulation of oxidized lipoproteins and inhibits inflammation, shear stress-induced thrombosis, and neointima formation in balloon-injured carotid arteries in nonhyperlipidemic rabbits.* Circulation, 2005. **111**(24): p. 3302-9.
567. Hu, M.M., et al., *The inhibition of lipoprotein-associated phospholipase A2 exerts beneficial effects against atherosclerosis in LDLR-deficient mice.* Acta Pharmacol Sin, 2011. **32**(10): p. 1253-8.
568. Wilensky, R.L., et al., *Inhibition of lipoprotein-associated phospholipase A2 reduces complex coronary atherosclerotic plaque development.* Nat Med, 2008. **14**(10): p. 1059-66.
569. Zhang, H., et al., *Regression of atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice by lentivirus-mediated gene silencing of lipoprotein-associated phospholipase A2.* Biochem Biophys Res Commun, 2012. **427**(3): p. 557-62.

570. Mohler, E.R., 3rd, et al., *The effect of darapladib on plasma lipoprotein-associated phospholipase A2 activity and cardiovascular biomarkers in patients with stable coronary heart disease or coronary heart disease risk equivalent: the results of a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled study.* J Am Coll Cardiol, 2008. **51**(17): p. 1632-41.
571. Serruys, P.W., et al., *Effects of the direct lipoprotein-associated phospholipase A(2) inhibitor darapladib on human coronary atherosclerotic plaque.* Circulation, 2008. **118**(11): p. 1172-82.
572. O'Donoghue, M.L., et al., *Study design and rationale for the Stabilization of pLaques usIng Darapladib-Thrombolysis in Myocardial Infarction (SOLID-TIMI 52) trial in patients after an acute coronary syndrome.* Am Heart J, 2011. **162**(4): p. 613-619 e1.
573. White, H., et al., *Study design and rationale for the clinical outcomes of the STABILITY Trial (STabilization of Atherosclerotic plaque By Initiation of darapLadIb TherapY) comparing darapladib versus placebo in patients with coronary heart disease.* Am Heart J, 2010. **160**(4): p. 655-61.
574. Karabina, S.A., et al., *Distribution of PAF-acetylhydrolase activity in human plasma low-density lipoprotein subfractions.* Biochim Biophys Acta, 1994. **1213**(1): p. 34-8.
575. Havel, R.J., H.A. Eder, and J.H. Bragdon, *The distribution and chemical composition of ultracentrifugally separated lipoproteins in human serum.* J Clin Invest, 1955. **34**(9): p. 1345-53.
576. Lowry, O.H., et al., *Protein measurement with the Folin phenol reagent.* J Biol Chem, 1951. **193**(1): p. 265-75.
577. Agarwal, R. and S.D. Chase, *Rapid, fluorimetric-liquid chromatographic determination of malondialdehyde in biological samples.* J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2002. **775**(1): p. 121-6.
578. Smythe, C.D., et al., *The state of macrophage differentiation determines the TNF alpha response to nitrated lipoprotein uptake.* Atherosclerosis, 2003. **170**(2): p. 213-21.
579. Kates, M., *Techniques in Lipidology. Isolation, analysis and identification of lipids in Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology.* 1972: North-Holland Publishing.
580. Bartlett, G.R., *Phosphorus assay in column chromatography.* J Biol Chem, 1959. **234**(3): p. 466-8.
581. Bligh, E.G. and W.J. Dyer, *A rapid method of total lipid extraction and purification.* Can J Biochem Physiol, 1959. **37**(8): p. 911-7.
582. Folch, J., M. Lees, and G.H. Sloane Stanley, *A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues.* J Biol Chem, 1957. **226**(1): p. 497-509.
583. Dentan, C., et al., *Pefabloc, 4-[2-aminoethyl]benzenesulfonyl fluoride, is a new, potent nontoxic and irreversible inhibitor of PAF-degrading acetylhydrolase.* Biochim Biophys Acta, 1996. **1299**(3): p. 353-7.
584. Lundberg, B., K. Hong, and D. Papahadjopoulos, *Conjugation of apolipoprotein B with liposomes and targeting to cells in culture.* Biochim Biophys Acta, 1993. **1149**(2): p. 305-12.
585. Walsh, M.T. and D. Atkinson, *Solubilization of low-density lipoprotein with sodium deoxycholate and recombination of apoprotein B with dimyristoylphosphatidylcholine.* Biochemistry, 1983. **22**(13): p. 3170-8.

586. Janatpour, M.J., et al., *Tumor necrosis factor-dependent segmental control of MIG expression by high endothelial venules in inflamed lymph nodes regulates monocyte recruitment*. J Exp Med, 2001. **194**(9): p. 1375-84.
587. Wang, X., et al., *Binding and uptake of differently oxidized low density lipoprotein in mouse peritoneal macrophages and THP-1 macrophages: involvement of negative charges as well as oxidation-specific epitopes*. J Cell Biochem, 2001. **81**(3): p. 557-69.
588. Adachi, H. and M. Tsujimoto, *Endothelial scavenger receptors*. Prog Lipid Res, 2006. **45**(5): p. 379-404.
589. Galle, J., et al., *Impact of oxidized low density lipoprotein on vascular cells*. Atherosclerosis, 2006. **185**(2): p. 219-26.
590. Kugiyama, K., et al., *Impairment of endothelium-dependent arterial relaxation by lysolecithin in modified low-density lipoproteins*. Nature, 1990. **344**(6262): p. 160-2.
591. Lenz, M.L., et al., *Lipid hydroperoxy and hydroxy derivatives in copper-catalyzed oxidation of low density lipoprotein*. J Lipid Res, 1990. **31**(6): p. 1043-50.

