



ΧΑΡΟΚΟΠΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ

ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑΣ-ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

Γιώργη Κατερίνα

**Μελέτη της επίδρασης του L- ασπαραγινικού και L-
γλουταμινικού οξέος σε μεσολαβητές φλεγμονής σε
υπερχοληστερολαιμικά κουνέλια**

ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ

ΑΝΤΩΝΟΠΟΥΛΟΥ ΣΜΑΡΑΓΔΗ, Καθηγήτρια

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

ΑΝΤΩΝΟΠΟΥΛΟΥ ΣΜΑΡΑΓΔΗ, Καθηγήτρια

ΝΟΜΙΚΟΣ ΤΖΩΡΤΖΗΣ, Λέκτορας

ΦΡΑΓΚΟΠΟΥΛΟΥ ΕΛΙΣΑΒΕΤ, Λέκτορας

-ΑΘΗΝΑ 2008-

**Μελέτη της επίδρασης του L- ασπαραγινικού και L-
γλουταμινικού οξέος σε μεσολαβητές φλεγμονής σε
υπερχοληστερολαιμικά κουνέλια**

-ΑΘΗΝΑ 2008-

Ευχαριστίες

Η παρούσα πτυχιακή μελέτη πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Βιοχημείας του Χαροκοπείου Πανεπιστημίου Αθηνών στα πλαίσια του προπτυχιακού προγράμματος. Την επίβλεψη της παρούσας εργασίας είχε η Αντιπρύτανης του Χαροκοπείου Πανεπιστημίου, Καθηγήτρια κυρία. Σμαραγδή Αντωνοπούλου την οποία και ευχαριστώ θερμά για την ευκαιρία που μου έδωσε να πραγματοποιήσω αυτή την ερευνητική μελέτη καθώς και για τις πολύτιμες γνώσεις που μου παρείχε στο προπτυχιακό πρόγραμμα.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την κυρία Αμαλία Γιάννη, μεταδιδακτορική ερευνήτρια που με εμπιστεύτηκε και μου έδωσε την ευκαιρία να συμμετάσχω στην ερευνητική της μελέτη, μέρος της οποίας αποτέλεσε η παρούσα πτυχιακή μελέτη.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τον κύριο Τζώρτζη Νομικό, Λέκτορα του Χαροκοπείου Πανεπιστημίου, για την πολύτιμη βοήθεια και παροχή επιστημονικών γνώσεων, την υποστήριξη και την καθοδήγηση κατά την διεξαγωγή των πειραμάτων και την συγγραφή της μελέτης. Η οργάνωση και η μεθοδικότητα που τον διακρίνουν αποτέλεσαν καθοριστικό παράγοντα για την επιτυχή διεξαγωγή της παρούσας μελέτης. Ακόμα, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την κυρία Φραγκοπούλου Ελισάβετ, Λέκτορα του Χαροκοπείου Πανεπιστημίου για την βοήθεια και υποστήριξη της καθώς και τη κυρία Βίβιαν Ντετοπούλου και τον κύριο Καραντώνη Χαράλαμπο.

Την παρούσα πτυχιακή μελέτη την αφιερώνω στους γονείς μου και στον αδελφό μου, οι οποίοι πάντα με στηρίζουν και με βοηθούν να ανέβω κάθε φορά ένα βήμα πιο ψηλά. Είναι το ελάχιστο που μπορώ να τους προσφέρω ως ανταπόδοση σε όσα με κόπο και στέρηση μου πρόσφεραν σε όλα τα χρόνια των σπουδών μου. Τέλος, ευχαριστώ τους καλούς μου φίλους Αμαλία, Λένα και Παναγιώτη για την συμπαράσταση τους και τον Γιάννη για την κατανόηση και την υποστήριξη σε αυτή την προσπάθεια.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

A. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ.....	8
------------------------	----------

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	11
----------------------	-----------

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1. Αθηροσκλήρωση

1.1 Γενικά.....	13
1.2 Κλινικές εκδηλώσεις της νόσου παρουσιάζονται όταν.....	14
1.3 Παθογένεση.....	14
1.3.1 Μορφολογία φυσιολογικής αρτηρίας.....	14
1.3.2 Στάδια αθηροσκληρωτικής διεργασίας.....	16
1.3.3 Ρήξη της πλάκας.....	17
1.4 Θεωρίες ανάπτυξης της αθηροσκλήρωσης.....	17
1.5 Κυτταρικά στοιχεία, χημικοί μεσολαβητές και άλλα στοιχεία που εμπλέκονται στην αθηροσκλήρωση.....	19
1.5.1 Κυτταροκίνες και C-αντιδρώσα πρωτεΐνη.....	19
1.5.2 Λιποπρωτεΐνες και αθηροσκλήρωση.....	20
1.5.3 Το ενδοθήλιο του αρτηριακού τοιχώματος.....	21
1.5.4 Λεία μυϊκά κύτταρα του αρτηριακού τοιχώματος.....	22
1.5.5 Μονοκύτταρα/μακροφάγα.....	24
1.5.6 Εξωκυττάρια θεμέλια ουσία.....	26

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2. Αμινοξέα και αθηροσκλήρωση

2.1 Σύσταση διαιτητικής πρωτεΐνης.....	28
2.2 Αμινοξέα.....	30
2.2.1 L-Αργινίνη.....	30
2.2.2 Ταυρίνη και N-ακέτυλο κυστεΐνη.....	31
2.2.3 Τρυπτοφάνη.....	32

2.3 Γλουταμινικό και ασπαραγινικό οξύ.....	32
2.3.1 Εισαγωγή	32
2.3.2 Προστασία της LDL από την οξείδωση.....	33
2.3.3 Αναστολή του σχηματισμού των λιποειδών ραβδώσεων.....	34
2.3.4 Επίδραση στις λιποπρωτεΐνες ορού και στην αροΑ-1 και Β.....	35

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3. Παράγοντας ενεργοποίησης αιμοπεταλίων

3.1 Εισαγωγή.....	37
3.2 Χημική δομή PAF.....	37
3.3 Κυτταρικές πηγές PAF.....	38
3.4 Δράσεις του PAF	40
3.5 Μεταβολισμός PAF.....	42
3.5.1 Σχηματισμός αιθερικού δεσμού στα γλυκερινούχα φωσφολιποειδή.....	42
3.5.2 Μεταβολικές πορείες βιοσύνθεσης PAF.....	42
<i>De novo πορεία βιοσύνθεσης PAF</i>	43
<i>Remodeling πορεία βιοσύνθεσης του PAF</i>	44
3.5.3 Μεταβολικές πορείες αποικοδόμησης του PAF	46
3.5.4 Ακετυλο-CoA:1-O-αλκυλο-2-λυσω-sn-γλυκερύλοφωσφοχολίνη ακετυλοτρανσφεράση, lyso-PAF AT	49
3.6 Υποδοχείς του PAF.....	51
3.7 Πορείες μεταγωγής σήματος που ενεργοποιούνται από τον PAF.....	51
3.8 Εμπλοκή του PAF σε παθολογικές καταστάσεις.....	52
3.9 Φλεγμονή	56
3.9.1 Γενικά χαρακτηριστικά φλεγμονής.....	56
3.9.2 Οξεία και χρόνια φλεγμονή.....	57
3.9.3 Ειδικοί μεσολαβητές της φλεγμονής.....	57
3.9.4 Εμπλοκή του PAF στη φλεγμονή.....	59

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4. Παράγοντας ενεργοποίησης αιμοπεταλίων και Αθηροσκλήρωση

4.1 Θεωρία εμπλοκής του PAF στην αθηροσκλήρωση.....	61
4.2 Προτεινόμενος μηχανισμός.....	61
4.3 Σημεία αλληλεπίδρασης του PAF στην αθηρογόνο διεργασία.....	62

4.4 Αναστολείς του PAF και αθηροσκλήρωση.....	65
---	----

B. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΣΚΟΠΟΣ.....	67
-------------	----

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: Μεθοδολογία και υλικά

5.1 Πρωτόκολλο παρέμβασης	68
5.2 Παραλαβή και ομογενοποίηση λευκοκυττάρων από αίμα κουνελιού.....	68
5.3 Παραλαβή και ομογενοποίηση αορτής από κουνέλια.....	70
5.4 Προσδιορισμός πρωτεΐνης με την μέθοδο Bradford.....	70
5.5 Εκχύλιση λιποειδών κατά Bligh-Dyer.....	71
5.6 Προσδιορισμός δραστηριότητας της 1-0-αλκυλο-2-λύσο-sn-γλυκέρυλο-3- φωσφόρυλοχολίνης; ΑκέτυλοCoA ακετυλοτρανσφεράση σε ομογενοποίημα λευκοκυττάρων με TLC.....	72
5.7 Απομόνωση πλυμένων αιμοπεταλίων κουνελιού και ποσοτικός προσδιορισμός PAF.....	75
5.8 Παραλαβή μεμβρανών από λευκοκύτταρα κουνελιού. Μέτρηση πρωτεΐνης και χοληστερόλης.....	79
5.9 Στατιστική επεξεργασία.....	80

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6: Αποτελέσματα

6.1 Εισαγωγή.....	82
6.2 Προσδιορισμός πρωτεΐνης σε λευκοκύτταρα κουνελιού με την μέθοδο Bradford.....	82
6.3 Κινητική μελέτη της δραστηριότητας της lyso-PAF AT σε ομογενοποίημα λευκοκυττάρων κουνελιού.....	84
6.4 Μέτρηση της δραστηριότητας της lyso-PAF AT σε ομογενοποίημα λευκοκυττάρων κουνελιού.....	86
6.5 Μέτρηση της δραστηριότητας της lyso-PAF AT σε ομογενοποίημα αορτών κουνελιού..	90
6.6 Μέτρηση χοληστερόλης και πρωτεΐνης σε μεμβράνες λευκοκυττάρων κουνελιού.....	91

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7: Στατιστική ανάλυση

7.1 Έλεγχος κανονικότητας	97
7.2 Επίδραση της παρέμβασης με και χωρίς αμινοξέα στη δραστικότητα της lyso-PAF AT σε λευκοκύτταρα κουνελιού.....	97
7.3 Συσχέτιση της δραστικότητας της lyso-PAF AT των λευκοκυττάρων κουνελιού με βιοχημικούς δείκτες στους διάφορους χρόνους παρέμβασης.....	99
7.4 Πολλαπλή γραμμική παλινδρόμηση.....	102
7.5 Συσχέτιση της δραστικότητας της lyso-PAF AT σε ομογενοποίημα αορτών κουνελιού (7 εβδομάδες) με βιοχημικούς και ιστολογικούς δείκτες.....	105
7.6 Μεταβολή της χοληστερόλη των μεμβρανών των λευκοκυττάρων κουνελιού κατά την διάρκεια παρέμβασης με και χωρίς αμινοξέα.....	111

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8: Συζήτηση

8.1 Εμπλοκή του PAF στην αθηρογένεση - σημασία της lyso-PAF AT.....	113
8.2 Ο συνδυασμός του L-ασπαραγινικού και L-γλουταμινικού.....	114
8.3 Επίδραση της παρέμβασης με και χωρίς αμινοξέα στη δραστικότητα της lyso-PAF AT των λευκοκυττάρων.....	114
8.4 Χοληστερόλη μεμβρανών λευκοκυττάρων κουνελιού.....	117
8.5 Συσχετίσεις της δραστικότητας της lyso-PAF AT με βιοχημικούς δείκτες κατά την διάρκεια της παρέμβασης με και χωρίς αμινοξέα.....	117
8.6 Επίδραση της παρέμβασης με και χωρίς αμινοξέα στη δραστικότητα της lyso-PAF AT των αορτών κουνελιού.....	118
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	120

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ

AAG :	1-O-αλκυλο-2-ακετυλο-γλυκερόλη
AAGPC :	1-O-αλκυλο-2-ακυλο-sn-γλυκερυλο-3-φωσφοχολίνη
AAPA :	1-O-αλκυλο-2-ακετυλο-sn-γλυκερυλο-3-φωσφορικού οξέος
ADI :	αποδεκτή ημερήσια πρόσληψη, acceptable daily intake
ALPA:	1-O-αλκυλο-2-λυσο-sn-γλυκερυλο-3-φωσφορικό οξύ
ακυλο-DHAP :	1-ακυλοφωσφοδιϋδροξυακετόνη
Apo E:	απολιποπρωτεΐνη E
ATP :	τριφωσφορική αδενοσίνη
bFGF :	βασικός αυξητικός παράγοντας των ινοβλαστών, basic fibroblastic growth gactor.
BSA :	βόειος αλβουμίνη ορού
CCR2 :	υποδοχέας των CC χημειοκινών
DAG :	διακυλογλυκερόλη
DHAP :	φωσφοδιϋδροξυακετόνη
ECM:	extracellular matrix : εξωκυττάρια ουσία
FDA :	Federal Drug Administration
γ-GT:	γ- Γλουταμινοτρανσφεράση
GSH:	γλουταθειόνη
HB-EGF:	Αυξητικός παράγοντας που συνδέεται με την ηπαρίνη
HDL :	λιποπρωτεΐνες υψηλής πυκνότητας, High Density Lipoprotein
ICAM-1 :	διακυτταρικό μόριο προσκολλησεως τύπου 1, intercellular adhesion molecule-1
IGF-1 :	αυξητικός παράγοντας ανάλογος της ινσουλίνης
IL :	ιντερλευκίνη
INF-γ :	ιντερφερόνη- γ

Intima t:	πάχος του έσω χιτώνα της θωρακικής αορτής
Intima a:	πάχος του έσω χιτώνα της κοιλιακής αορτής
IP₃:	1,4,5-τριφωσφορική ινοσιτόλη
JEFCA:	Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives
LB₄:	λευκοτριένιο B ₄
LCAT:	λεκιθίνη:χοληστερόλη ακυλοτρανσφεράσης
LDL :	λιποπρωτεΐνες χαμηλής πυκνότητας, Low Density Lipoprotein
LPL :	λιποπρωτεϊνική λιπάση
λυσο-PAF :	1-O-αλκυλο-2-λυσο-sn-γλυκερυλο-3-φωσφοχολίνη
MAPK :	MAP κινάσες
MCP-1 :	πρωτεΐνη χημειοτακτική για τα μονοκύτταρα τύπου 1, monocyte chemoattractant protein-1
MMP:	μεταλλοπρωτεϊνάσες θεμέλιας ουσίας
NFκB:	πυρηνικός παράγοντας κB
NO :	μονοξείδιο του αζώτου
Ox-LDL :	οξειδωμένη LDL
PAF :	Παράγοντας Ενεργοποίησης των Αιμοπεταλίων, Platelet-Activating Factor
PAF-AH:	PAF ακετυλοϋδρολάση
PAFR :	υποδοχέας του PAF
PDGF :	αυξητικός παράγοντας προερχόμενος από τα αιμοπετάλια
PI3K:	κινάση της 3-φωσφατιδυλοϊνοσιτόλης
PLA₂ :	φωσφολιπάση A ₂
PLD :	φωσφολιπάση D
PTK :	τυροσινικές κινάσες
TBARS:	δραστικές ουσίες αντιδράσεως με θειβαρβιτουρικό οξύ (thiobarbituric acid reactive substances)
TNF-α:	παράγοντας νέκρωσης των όγκων, tumor necrosis factor-α

TGF-β:	μετατρεπτικός αυξητικός παράγοντας, transforming growth factor
VCAM-1:	μόριο προσκολλήσεως στα αγγειακά κύτταρα , vascular cell adhesion molecule-1
TG:	τριγλυκερίδια

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Εισαγωγή: Οι αθηρωματικές αλλοιώσεις είναι αποτέλεσμα χρόνιων διεργασιών, οι οποίες απαιτούν παρατεταμένη έκθεση σε παράγοντες που τις προδιαθέτουν. Κάποιοι από αυτούς τους παράγοντες είναι η συστηματική φλεγμονή, η υπερχοληστερολαιμία και το οξειδωτικό στρες. Τελευταίες μελέτες έχουν αναπτύξει μια νέα θεωρία σχηματισμού των αθηρωματικών πλακών στην οποία σαν ισχυρός μεσολαβητής υποδεικνύεται ο PAF. Το ένζυμο που είναι υπεύθυνο για την σύνθεση του PAF σε αυτές τις καταστάσεις είναι η lyso-PAF AT, η οποία σε κυτταρικό επίπεδο ενεργοποιείται από οξειδωτικά και φλεγμονώδη ερεθίσματα τόσο στα ενδοθηλιακά όσο και στα λευκοκύτταρα. Μελέτες έχουν δείξει ότι η από του στόματος χορήγηση L-ασπαραγινικού και L-γλουταμινικού αναστέλλει τον σχηματισμό των λιποειδών γραμμώσεων μέσω της παρεμπόδισης της προσκόλλησης των μονοκυττάρων και της συσσώρευση των αφρωδών κυττάρων στον έσω χιτώνα κουνελιών που έχουν τραφεί με χοληστερόλη. Συνεπώς, θεωρήθηκε ενδιαφέρον να προσδιοριστεί η δραστηριότητα του ενζύμου lyso-PAF AT σε παρέμβαση που στηρίζεται στην αντιοξειδωτική δράση των αμινοξέων L-γλουταμινικού και L-ασπαραγινικού οξέος.

Σκοπός: Η παρούσα μελέτη διερευνά την επίδραση των δύο αμινοξέων στη δραστηριότητα της lyso-PAF AT σε λευκοκύτταρα και σε αορτές υπερχοληστερολαιμικών κουνελών.

Υλικά και Μέθοδοι: Σε αρσενικά κουνέλια χορηγήθηκε κανονική διαίτα (ομάδα ελέγχου, n=4) ή διαίτα με 0,5% χοληστερόλη (ομάδα χοληστερόλης, n=8) ή με 0,5% χοληστερόλη και ταυτόχρονα 12,5 mM L-ασπαραγινικού και 12,5 mM L-γλουταμινικού από το νερό (ομάδα χοληστερόλη και αμινοξέα, n=8) για 7 εβδομάδες. Ακολούθησε ευθανασία, η αορτή μονιμοποιήθηκε σε φορμόλη για ιστολογική εξέταση και τμήμα αυτής ομογενοποιήθηκε για τον προσδιορισμό της lyso-PAF AT αορτών. Δείγματα αίματος λήφθηκαν στις 0, 2, 4 και 7 εβδομάδες. Προσδιορίστηκε η δραστηριότητα της lyso-PAF AT και η χοληστερόλη μεμβρανών των λευκοκυττάρων ($\mu\text{g chol}/\mu\text{g prot}$) στις 0, 2, 4 και 7 εβδομάδες και η δραστηριότητα της lyso-PAF AT αορτών.

Αποτελέσματα: Η δραστηριότητα της lyso-PAF AT των λευκοκυττάρων παρουσίασε αύξηση κατά 3 φορές στην ομάδα της χοληστερόλης και κατά 4 φορές στην ομάδα της χοληστερόλης και αμινοξέα σε σχέση με τις μηδέν εβδομάδες, χωρίς να είναι στατιστικά σημαντική η διαφορά ($p > 0,05$), ενώ υπήρξε στατιστική σημαντική διαφορά στην αύξηση της δραστηριότητας της lyso-PAF AT των λευκοκυττάρων μεταξύ της ομάδας ελέγχου και της ομάδας που έλαβε χοληστερόλη και αμινοξέα στις 7 εβδομάδες παρέμβασης ($p = 0,037$).

Η δραστηριότητα της lyso-PAF AT των λευκοκυττάρων δεν σχετίστηκε με την χοληστερόλη μεμβρανών των λευκοκυττάρων, ενώ συσχετίστηκε θετικά με την lyso-PAF AT των αορτών, τη χοληστερόλη του ορού και την HDL-C στις 7 εβδομάδες παρέμβασης. Η δραστηριότητα της lyso-PAF AT των αορτών είναι αυξημένη σε 4 από τα 8 κουνέλια της ομάδας της χοληστερόλης (2-28 φορές) και σε 4 από 7 κουνέλια της ομάδας χοληστερόλη και αμινοξέα (1,5-9 φορές) σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Στα υπόλοιπα κουνέλια η δραστηριότητα παρέμεινε περίπου στα ίδια επίπεδα σε σχέση με την ομάδα ελέγχου, ωστόσο η διαφορά αυτή δεν είναι στατιστικά σημαντική. Η δραστηριότητα της lyso-PAF AT των αορτών στο σύνολο των κουνελιών συσχετίστηκε θετικά με το πάχος του έσω χιτώνα της θωρακικής αορτής και την HDL-C του ορού.

Συμπεράσματα: Η υπερχοληστερολαιμία επάγει την αύξηση της δραστηριότητας της lyso-PAF AT στα λευκοκύτταρα ενώ φαίνεται ότι το μέγεθος της βλάβης των αορτών καθορίζει την δραστηριότητα του ενζύμου σε αυτή. Δεν υπήρξε επίδραση στη δραστηριότητα του ενζύμου lyso-PAF AT των λευκοκυττάρων και των αορτών κουνελιού κατά την διάρκεια παρέμβασης 7 εβδομάδων με L-γλουταμινικού και L-ασπαραγινικού οξέος.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

ΑΘΗΡΟΣΚΛΗΡΩΣΗ

1.1 Γενικά [1-3]

Η αρτηριοσκλήρωση (arteriosclerosis) ή αρτηριοσκληρωτική αγγειοπάθεια αποτελεί μια από τις παθήσεις των αγγείων στην οποία δόθηκε μεγάλη προσοχή, λόγω ίσως της εμφανούς κλινικής σημασίας της. Η πάχυνση και η απώλεια της ελαστικότητας του αρτηριακού τοιχώματος αποτελεί κοινό χαρακτηριστικό των διαταραχών της αρτηριοσκλήρωσης. Στον όρο αρτηριοσκλήρωση περιλαμβάνονται τρεις περιπτώσεις που διαφέρουν μορφολογικά: α) η *αθηροσκλήρωση* (atherosclerosis) που χαρακτηρίζεται από το σχηματισμό του αθηρώματος στον έσω χιτώνα της αρτηρίας, β) η *αγγειίτιδα τύπου Monckberg*, χαρακτηρίζεται από την επασβέστωση του μέσου χιτώνα των αρτηριών, γ) η *αρτηριολοσκλήρυνση* (arteriolosclerosis) η οποία διακρίνεται από την εναπόθεση υαλίνης και την πάχυνση του τοιχώματος των μικρών αρτηριών και των αρτηριολίων.

Η αθηροσκλήρωση είναι η μορφή της αρτηριοσκλήρωσης με τη μεγαλύτερη κλινική σημασία. Έτσι, οι δύο όροι συνήθως χρησιμοποιούνται χωρίς διάκριση εκτός και αν ειδικά προσδιορίζονται. Το έμφραγμα του μυοκαρδίου και τα οξέα εγκεφαλικά επεισόδια είναι επικίνδυνες συνέπειες της νόσου καθώς επίσης η χρόνια ισχαιμική καρδιοπάθεια, η γάγγραινα των κάτω άκρων, η απόφραξη της μεσεντερίου αρτηρίας και η ισχαιμική εγκεφαλοπάθεια.

Η αθηροσκλήρωση είναι μια χρόνια διεργασία η οποία ξεκινά από την δεύτερη δεκαετία της ζωής των ανθρώπων. Χαρακτηρίζεται από περιόδους αργής ανάπτυξης, που εναλλάσσονται με χρονικά διαστήματα ταχείας εξέλιξης ενώ οι κλινικές εκδηλώσεις παρουσιάζονται συνήθως κατά την μέση ηλικία ή αργότερα. Αυτό συμβαίνει διότι οι διαδικασίες που περιλαμβάνονται στην αθηρογένεση, κατά την ανάπτυξη πρώιμων βλαβών, απαιτούν την παρατεταμένη έκθεση στους παράγοντες που την προδιαθέτουν. Στα τελευταία στάδια της νόσου, η αλλοίωση προχωρά σχετικά γρήγορα και οδηγεί στις κλινικές εκδηλώσεις. Υπάρχουν περιπτώσεις όπου παρατηρείται πρόωμη ανάπτυξη αθηροσκλήρωσης σε παιδιά και εφήβους που είναι δύσκολη η εφαρμογή θεραπείας για την αποτροπή της ανάπτυξης αθηροσκληρυντικών βλαβών

1.2 Οι κλινικές εκδηλώσεις της νόσου παρουσιάζονται όταν: [1-3]

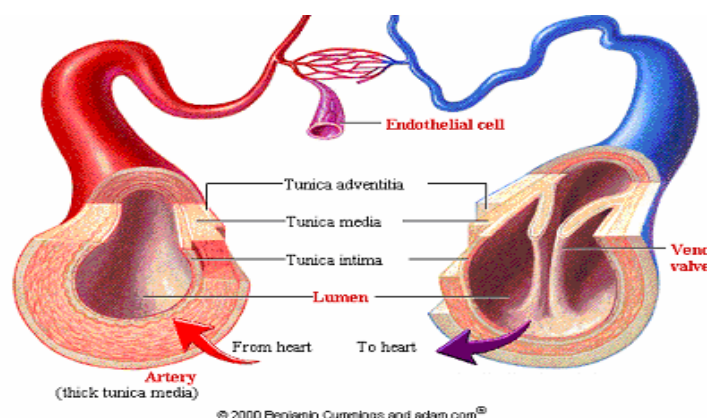
1. Δημιουργείται ισχαιμική ατροφία εξαιτίας της στένωσης του αυλού του αγγείου.
2. Δημιουργούνται εμπόδια στη ροή του αίματος (στροβιλώδης ροή αίματος) εξαιτίας της στένωσης του αυλού της αρτηρίας.
3. Δημιουργείται stress ή επιδρούν ερεθίσματα που αυξάνουν την πιθανότητα σχηματισμού θρόμβου. Ο σχηματισμός του θρόμβου θα οδηγήσει σε απόφραξη και έμφραγμα.
4. Σχηματίζεται θρόμβος που θα οδηγήσει σε εμβολή.
5. Δημιουργείται ρήξη ή ανεύρυσμα εξαιτίας της εξασθένησης του τοιχώματος του αγγείου.

Θεωρητικά κάθε όργανο ή ιστός μπορεί να προσβληθεί από τη νόσο αλλά τα συμπτώματα εντοπίζονται συνήθως στην καρδιά, τον εγκέφαλο, τους νεφρούς, τα κάτω άκρα και το λεπτό έντερο.

1.3 Παθογένεση

1.3. 1 Μορφολογία φυσιολογικής αρτηρίας [1-3]

Το αρτηριακό τοίχωμα αποτελείται από τρεις στιβάδες: α) τον έσω χιτώνα (intima), που αποτελείται από ενδοθηλιακά κύτταρα και τον υποστηρικτικό υπενδοθηλιακό ιστό. Ο υπενδοθηλιακός ιστός είναι πλούσιος σε κολλαγόνο και κύτταρα, όπως ινοβλάστες και τα λεία μυϊκά κύτταρα του έσω χιτώνα, τα οποία διαδραματίζουν καθοριστικό ρόλο στην πορεία της αθηροσκλήρωσης, β) το μέσο χιτώνα (media), που αποτελείται από λεία μυϊκά κύτταρα και πυκνό, ισχυρό κολλαγονικό ιστό και γ) τον έξω χιτώνα (adventitia), επίσης αποτελούμενο από ισχυρό κολλαγονικό ιστό (Σχήμα 1.1). Αυτά τα τρία στρώματα οριοθετούνται από τα ομόκεντρα στρώματα της ελαστίνης, γνωστά ως έσω ελαστικό πέταλο (internal elastic lamina) το οποίο χωρίζει τον έσω από τον μέσο χιτώνα, και έξω ελαστικό πέταλο (external elastic lamina) το οποίο χωρίζει τον μέσο από τον έξω χιτώνα.



Σχήμα 1.1 Μορφολογία φυσιολογικής αρτηρίας

Η επιφάνεια του αυλού, που αποτελεί την εσωτερική κοιλότητα των αρτηριών καλύπτεται από ένα μόνο και ενιαίο στρώμα ενδοθηλιακών κυττάρων που συνδέονται το ένα με το άλλο με μια σειρά κυτταρικών συνδέσμων (junctional complexes). Τα ενδοθηλιακά κύτταρα δημιουργούν ένα εμπόδιο μεταξύ της εσωτερικής επιφάνειας του αυλού της αρτηρίας και του υποενδοθηλιακού χώρου του αρτηριακού τοιχώματος

Ο μέσος χιτώνας αποτελείται από λεία μυϊκά κύτταρα τα οποία διατηρούνται σε συνοχή μέσω κυτταρικών συνδέσμων και από εξωκυττάρια θεμέλια ουσία που αποτελείται κυρίως από ίνες ελαστίνης, κολλαγόνου και πρωτεογλυκάνες. Το πάχος το μέσου χιτώνα μπορεί να ποικίλει με βάση τη λειτουργία μιας δεδομένης αρτηρίας. Στις πολύ μικρές αρτηρίες, για παράδειγμα, ο μέσος χιτώνας μπορεί να έχει πάχος ενός μόνο κυττάρου ενώ στις μεγάλες αρτηρίες το πάχος του μέσου χιτώνα μπορεί να είναι πολλών στρωμάτων κυττάρων και να αποτελείται από σημαντική ποσότητα εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας με βασικό συστατικό την ελαστίνη.

Το ακραίο στρώμα της αρτηρίας που βρίσκεται μετά το έξω ελαστικό πέταλο, είναι ο έξω χιτώνας. Αποτελείται από μια χαλαρή ύλη με μικρό ποσό ινών ελαστίνης, λείων μυϊκών κυττάρων, ινοβλάστες και κολλαγόνο. Το μεγαλύτερο μέρος των αγγειοκινητικών νευρικών ινών του αυτόνομου νευρικού συστήματος στα αγγεία του αίματος διαπερνούν αυτόν τον χιτώνα.

1.3.2 Στάδια αθηροσκληρυντικής διεργασίας [1, 4]

Οι λιποειδείς ραβδώσεις εμφανίζονται από την παιδική ηλικία ήδη μετά το πρώτο έτος της ζωής και αποτελούν την πρόδρομη μορφή της αθηρωματικής πλάκας. Παρουσιάζονται με την μορφή πολλαπλών υποκίτρινων επίπεδων κηλίδων οι οποίες αναπτύσσονται προς επιμήκεις ραβδώσεις. Αποτελούνται από αφρώδη κύτταρα γεμάτα με χοληστερόλη και εστέρες χοληστερόλης, Τ-λεμφοκύτταρα, καθώς και πρωτεογλυκάνες, ίνες κολλαγόνου και ελαστίνης.

Προκαλούνται από μια φλεγμονώδη διαδικασία στην οποία εμπλέκονται κυρίως τα μονοκύτταρα και τα Τ-λεμφοκύτταρα. Όσον αναφορά στην εμπλοκή των κυτταρικών στοιχείων κύριο γεγονός που συμβάλλει στη δημιουργία τους αποτελεί η συσσώρευση των μακροφάγων στον έσω χιτώνα και η επακόλουθη πρόσληψη οξειδωμένων LDL (ox LDL) προς μετατροπή τους σε αφρώδη κύτταρα.

Η ινώδης πλάκα, η οποία θεωρείται βασική μορφολογική αλλοίωση, δηλαδή το αθήρωμα ή αθηρωματική πλάκα. Προέρχεται από την εξέλιξη των λιποειδών ραβδώσεων, αν και όλες οι λιποειδείς ραβδώσεις δεν εξελίσσονται προς αθήρωμα.. Σχηματίζεται στον έσω χιτώνα της αρτηρίας και αναπτύσσεται αργά και αθόρυβα χωρίς κλινικά συμπτώματα επί σειρά ετών. Πρόκειται για περιγεγραμμένο μόρφωμα που προεξέχει προς τον αυλό του αγγείου και καλύπτεται από ινώδη μανδύα, ο οποίος αποτελείται από εναλλασσόμενες στιβάδες τροποποιημένων λείων μυϊκών κυττάρων και συστατικών της βασικής μεμβράνης. Κάτω από τον ινώδη μανδύα υπάρχουν αφρώδη κύτταρα που περιτριγυρίζονται από λευκοκύτταρα και συστατικά του συνδετικού ιστού τα οποία με την σειρά τους καλύπτουν έναν πυρήνα κρυστάλλων χοληστερόλης, νεκρωτικών υπολειμμάτων και επασβεστωμένων αλλοιώσεων. Η ινώδης πλάκα δεν παραμένει στατική, παρουσιάζει μια δυναμική αποτέλεσμα αλληλεπιδράσεων παραγόντων οι οποίοι επηρεάζουν την ανάπτυξη ή την υποστροφή της.

Προχωρημένη ή επιπλεγμένη βλάβη. Στο στάδιο αυτό εμφανίζονται επασβεστώση, έλκη, αιμορραγίες, θρομβώσεις. Θεωρείται ως το στάδιο που θα δώσει τα κλινικά συμπτώματα. Συνήθως ρήξη ή εξέλκωση της πλάκας θα οδηγήσουν στην κλινική εμφάνιση της νόσου.

1.3.3 Ρήξη της πλάκας [1,3,4]

Οι πιο κοινές μορφές ευπαθών πλακών είναι αυτές που έχουν λεπτή ινώδη κάψα (πτωχεία λείων μυϊκών κυττάρων και κολλαγόνου στην ινώδη κάψα), εκτεταμένη διείσδυση μακροφάγων και πυρήνα με υψηλή περιεκτικότητα σε λιπίδια και μεγάλη πυκνότητα αφρωδών κυττάρων. Η ρήξη αυτών των πλακών (ανεξάρτητα του μεγέθους τους) μπορεί να προκαλέσει στεφανιαία σύνδρομο.

Τα σημεία που είναι υπεύθυνα για τη ρήξη των πλακών εντοπίζονται στις παρυφές της πλάκας, σε σημεία όπου η ινώδης πλάκα έχει εξασθενήσει. Η αστάθεια και η εξασθένηση της ινώδους κάψας σε συνδυασμό με το μεγάλο λιποειδή πυρήνα κάνουν τις πλάκες πιο επιρρεπή στη ρήξη. Πλάκες με τα ανωτέρω χαρακτηριστικά συνήθως αποτελούν το 10-20% του συνόλου αλλά είναι υπεύθυνες για το 80-90% των συμβαμάτων.

Η μετανάστευση ή ο θάνατος των λείων μυϊκών κυττάρων και η συσσώρευση μακροφάγων αποτελούν κύριο παράγοντα που οδηγεί στην εξασθένηση και στην αστάθεια της ινώδους κάψας. Τα μακροφάγα συμβάλλουν στη διαδικασία αυτή μέσω των ουσιών που εκκρίνουν, όπως κυτταροτοξικές ενώσεις και πρωτεϊνών που διασπούν το κολλαγόνο. Η έκκριση των πρωτεϊνών προάγεται από την αλληλεπίδραση μακροφάγων-T-λεμφοκυττάρων στην περιοχή της βλάβης.

Ένας άλλος παράγοντας που ευθύνεται για την εξασθένηση της ινώδους κάψας είναι και οι οξειδωμένες LDL μορφές, ως κυτταροτοξικές. Όσο μεγαλύτερη είναι η περιεκτικότητα του πυρήνα της πλάκας σε λιπίδια τόσο αυξάνει η πιθανότητα για ρήξη.

Η επαφή του περιεχομένου της πλάκας με το αίμα πυροδοτεί το σχηματισμό του θρόμβου. Έπειτα ο σχηματισμένος θρόμβος μπορεί είτε να ενσωματωθεί στην πλάκα συμβάλλοντας στην περαιτέρω ανάπτυξή της, είτε να οδηγήσει σε ολική ή μερική απόφραξη του αγγείου ή πρόκληση εμβολής.

1.4 Θεωρίες ανάπτυξης της αθηροσκλήρωσης [1,4-6]

Για την ανάπτυξη της αθηρωματικής πλάκας έχουν διατυπωθεί διάφορες θεωρίες. Οι επικρατέστερες θεωρίες είναι η θεωρία της απόκρισης στον τραυματισμό και η θεωρία των Benditt και Benditt [6] όπως προτείνεται στην μονοκλωνική υπόθεση.

Η πρώτη θεωρία βασίζεται στο ότι η όλη διεργασία αποτελεί απάντηση στην ενδοθηλιακή βλάβη, όπου η υπερλιπιδαιμία έχει κυρίαρχο ρόλο. Η θεωρία της απάντησης στον τραυματισμό δημοσιεύτηκε το 1977 από τον Russell Ross. Στο μοντέλο αυτό, το στάδιο έναρξης είναι η βλάβη του ενδοθηλίου, η οποία προκαλείται από παράγοντες όπως μηχανικοί ή αιμοδυναμικοί, χημικοί όπως η LDL-χοληστερόλη, ιδιαίτερα οι οξειδωμένες LDL μορφές, προϊόντα καπνίσματος, ανοσολογικοί, λοιμώδεις παράγοντες, ενδοτοξίνες, ιοί, μόνιμοι ή σε συνεργασία, με αποτέλεσμα την δυσλειτουργία του ενδοθηλίου και την διαταραχή των ομοιοστατικών μηχανισμών.

Η διαταραχή των ομοιοστατικών μηχανισμών θα οδηγήσει: α) σε αύξηση της έκφρασης των μορίων προσκόλλησης και αύξηση της προσκόλλησης των λευκοκυττάρων και των αιμοπεταλίων στο ενδοθήλιο, τα οποία απελευθερώνουν πλήθος κυτταροκινών, αγγειοδραστικών και αυξητικών παραγόντων, οι οποίοι ετοιμάζουν το περιβάλλον για μια φλεγμονώδη απόκριση, β) σε προσέλκυση των μονοκυττάρων/μακροφάγων και πολλαπλασιασμό των λείων μυϊκών κυττάρων που μεταναστεύουν στην περιοχή της φλεγμονής, γ) σε αύξηση της διαπερατότητας του ενδοθηλίου για τις τροποποιημένες μορφές LDL, πρόσληψη των σωματιδίων αυτών από τα μακροφάγα μέσω των υποδοχέων εκκαθαριστών και σχηματισμός αφρωδών κυττάρων.

Η θεωρία της απόκρισης στον τραυματισμό βασίστηκε αρχικά στην απογύμνωση του ενδοθηλίου ως κύριο στάδιο για την έναρξη της αθηροσκλήρωσης. Πρόσφατα, έγινε σαφές ότι αναπτυσσόμενες αρτηριοσκληρυντικές βλάβες, είναι δυνατόν να καλύπτονται από ένα άθικτο στρώμα ενδοθηλιακών κυττάρων, και ότι η απογύμνωση του ενδοθηλίου αποτελεί την εξαίρεση παρά τον κανόνα. Σε μια πρόσφατη βελτίωση της αρχικής υπόθεσής του, ο Ross πρότεινε ότι η δυσλειτουργία των ενδοθηλιακών κυττάρων είναι επαρκής για την έναρξη της αθηρογένεσης μέσω της αυξημένης διαπερατότητας του ενδοθηλίου από τις αθηρογόνες λιποπρωτεΐνες.

☛ Σύμφωνα με την δεύτερη θεωρία, η ανάπτυξη της αθηρωματικής πλάκας μπορεί να εξηγηθεί αν θεωρηθεί ως ένασμα ο πολλαπλασιασμός των λείων μυϊκών κυττάρων του αρτηριακού τοιχώματος και όχι ο τραυματισμός του ενδοθηλίου, όπως προτείνει η μονοκλωνική υπόθεση των Benditt και Benditt [6]. Ο πολλαπλασιασμός των λείων μυϊκών κυττάρων του αρτηριακού τοιχώματος πυροδοτείται από λιπίδια ή μεταβολίτες τους, τα οποία στους υπερλιπιδαιμικούς διεισδύουν στην στιβάδα των λείων μυϊκών κυττάρων, από ιούς ή από επίκτητες ή γενετικές διαταραχές που μπορούν να προκαλέσουν τον αυτόνομο πολλαπλασιασμό τους.

Και στις δυο θεωρίες πρωταγωνιστούν ο πολλαπλασιασμός των λείων μυϊκών κυττάρων του αρτηριακού τοιχώματος, τα λιπίδια του αίματος και τα μονοκύτταρα/μακροφάγα, ενώ η οξειδωση των λιπιδίων και οι γενετικοί παράγοντες ευθύνονται, σύμφωνα με νεότερα δεδομένα για τις κλινικές συνέπειες τις νόσου.

1.5 Κυτταρικά στοιχεία, χημικοί μεσολαβητές και άλλα στοιχεία που εμπλέκονται στην αθηροσκλήρωση [7]

Είναι καλά τεκμηριωμένο πως η αθηροσκλήρωση είναι μια χρόνια φλεγμονώδης διεργασία, η οποία είναι αποτέλεσμα αλληλεπίδρασης πλήθους παραγόντων επί σειρά ετών. Μεταξύ αυτών κυρίαρχο ρόλο έχουν τα αιμοπετάλια, τα μονοκύτταρα/μακροφάγα και τα T-λεμφοκύτταρα, τα ενδοθηλιακά και λεία μυϊκά κύτταρα, οι χημικοί μεσολαβητές όπως κυτταροκίνες, αυξητικοί, χημειοτακτικοί και θρομβογόνοι παράγοντες, οι λιποπρωτεΐνες και η εξωκυττάρια ουσία. [7]

1.5.1 Κυτταροκίνες και C-αντιδρώσα πρωτεΐνη

Οι κυτταροκίνες, όπως οι IL-1, TNF- α , IL-6 είναι χημειοτακτικές ουσίες που παράγονται από τα μακροφάγα και: α) προκαλούν την έκκριση του αυξητικού παράγοντα των αιμοπεταλίων και των ινοβλαστών, με αποτέλεσμα την εξέλιξη της αθηρωματικής βλάβης, την παραγωγή ινώδους ιστού και την δημιουργία των προϋποθέσεων για θρόμβωση της αθηρωματικής πλάκας, β) επιταχύνουν την απόπτωση των αφρωδών κυττάρων και την δημιουργία του λιπώδους πυρήνα, γ) προωθούν την παραγωγή των μεταλλοπρωτεϊνών οι οποίες αποδομούν την ήδη σχηματισθείσα ινώδη κάψα με αποτέλεσμα την ρήξη της πλάκας, δ) προκαλούν την έκκριση από το ήπαρ αθηρογενετικών παραγόντων, όπως C-αντιδρώσα πρωτεΐνη, ινωδογόνο, αμυλοειδές-A και ομοκυστεΐνη. Αυτοί αποτελούν σημαντικούς δείκτες φλεγμονής και είναι εύκολο να μετρηθούν [8].

Η C-αντιδρώσα πρωτεΐνη είναι μια από τις πρωτεΐνες οξείας φάσης, παράγεται σε κάθε είδος φλεγμονώδους απάντησης από το ήπαρ με την επίδραση της IL-6. Η C-αντιδρώσα πρωτεΐνη ενδέχεται να σχετίζεται με την αθηροσκλήρωση καθώς: α) έχει βρεθεί στις αθηρωματικές πλάκες, β) η πρόσδεση της στις LDL οδηγεί σε πιο εύκολη πρόσληψη της

LDL από τα μακροφάγα, γ) διεγείρει την παραγωγή των μορίων προσκόλλησης, ιντερλευκινών και MCP-1 και δ) εμποδίζει την παραγωγή του μονοξειδίου του αζώτου [9].

1.5.2 Λιποπρωτεΐνες και αθηροσκλήρωση [10, 11]

Η αθηροσκλήρωση είναι μια ανατροφοδοτούμενη διεργασία. Η ενδοθηλιακή διαπερατότητα για τις LDL επηρεάζεται από την τοπική και την συστηματική φλεγμονή ενώ ο βαθμός της φλεγμονής εμπλέκεται και στην τροποποίηση των LDL. Η τροποποιημένες LDL μορφές ενισχύουν την φλεγμονώδη απάντηση από τα μακροφάγα. Τελικά, η τοπική φλεγμονή ανατροφοδοτεί τον εαυτό της, προάγει την μεταφορά και την τροποποίηση των LDL στο έσω χιτώνα. Αντίθετα, η υψηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνη δρα προστατευτικά δια μέσου της αντίστροφης μεταφοράς της χοληστερόλης καθώς και της ανασταλτικής επίδρασης που ασκούν στην οξειδωτική μετατροπή των LDL και το σχηματισμό των ελεύθερων ριζών. Στους ακόλουθους πίνακες συνοψίζονται οι αθηρογενετικές και οι αντιαθηρογενετικές δράσεις των λιποπρωτεϊνών.

Πίνακας 1.1 Αθηρογενετικές επιδράσεις της ox-LDL [11]

Επίδραση της ox-LDL	Πιθανός μηχανισμός
Προσκόλληση μονοκυττάρων στο ενδοθήλιο ↑	↑ την έκφραση των μορίων προσκόλλησης
Χημειοταξία μονοκυττάρων και T κυττάρων ↑	Επαγωγή παραγωγής MCP-1 & άμεσης χημειοταξίας
Υποδοχέας-εκκαθαριστής A και CD36 ↑	Ενεργοποίηση AP-1
Σχηματισμός αφρωδών κυττάρων ↑	Πρόσληψη ox-LDL μέσω των υποδ. εκκαθαριστών
Επαγωγή των προφλεγμονωδών γονιδίων	Ενεργοποίηση του NFκB και AP-1 και ↑ cAMP
Κυτταρικός θάνατος ↑	Ενεργοποίηση της απόπτωσης και σχηματισμού κρυστάλλων χοληστερόλης
Θρόμβωση ↑	Επάγει τον ιστικό παράγοντα και τη συσσώρευση αιμοπεταλίων
Ρήξη πλάκας ↑	Αυξάνει την παραγωγή μεταλλοπρωτεϊνών, MMP

Πίνακας 1.2 Αντιαθηρογενετικές επιδράσεις της HDL [11]

Επίδραση της HDL	Πιθανός μηχανισμός
Αναστολή του σχηματισμού της αλλοίωσης	Αντίστροφη μεταφορά της χοληστερόλης
Προσκόλληση μονοκυττάρων στο ενδοθήλιο ↓	Αναστολή μορίων προσκόλλησης, ↓ παραγωγής κυτταροκινών
Θρόμβωση ↓	Διαμόρφωση της ενδοθηλιακής αντιθρομβωτικής και ινωδολυτικής ικανότητας
Κυτταρικός θάνατος ↓	Αναστολή της απόπτωσης
Κυτταρικός πολλαπλασιασμός ↓	Αναστολή του πολλαπλασιασμού των λείων μυϊκών κυττάρων
Αντιοξειδωτικές δράσεις ↑	Παρουσία ενζύμου παραοξανάσης

1.5.3 Το ενδοθήλιο του αρτηριακού τοιχώματος [1,5, 12]

Τα ενδοθηλιακά κύτταρα θεωρήθηκαν στο παρελθόν ότι είχαν παθητικό ρόλο. Σήμερα έχει εδραιωθεί η άποψη ότι το αγγειακό ενδοθήλιο αποτελεί ένα δυναμικό ιστό με διαφοροποιημένες ιδιότητες, όπου η δυσλειτουργία του ή η ενεργοποίησή του αποτελούν έναν από τους βασικούς συντελεστές για την ανάπτυξη και την εξέλιξη της αγγειακής νόσου.

Το "φυσιολογικό" ενδοθήλιο παρουσιάζει μη θρομβογόνο επιφάνεια για τα κύτταρα του αίματος, η οποία μπορεί να μετατραπεί σε θρομβογόνο όταν οι συνθήκες το επιτρέπουν [12]. Καλύπτει την εσωτερική επιφάνεια των αγγείων και την εσωτερική στιβάδα του ενδοκαρδίου στις καρδιακές κοιλότητες. Αποτελεί ένα διαπερατό διάφραγμα μέσω του οποίου γίνεται η ανταλλαγή και η ενεργητική μεταφορά ουσιών στο αρτηριακό τοίχωμα. Υπό "φυσιολογικές συνθήκες" παράγει αγγειοδιασταλτικούς (NO, ενδοθηλιακός παράγοντας υπερπόλωσης, προστακυκλίνη), αντιμιτογόνους και αντιθρομβογόνους παράγοντες, οι οποίοι:

- ☛ διασφαλίζουν το πέπρον επίπεδο του αγγειακού τόνου μέσω της διατήρησης της αγγειακής ομοιόστασης,
- ☛ παρεμποδίζουν τον πολλαπλασιασμό των κυτταρικών στοιχείων του αγγειακού τοιχώματος

- ✦ αναστέλλουν την λειτουργία των αιμοπεταλίων,
- ✦ ρυθμίζουν το σύστημα πήξεως-ινωδολύσεως,
- ✦ ρυθμίζουν την αντιγονικότητα του αγγείου.

Η ενεργοποίηση του ενδοθηλίου οφείλεται σε παράγοντες όπως τα αυξημένα επίπεδα τροποποιημένων μορφών LDL ή ox-LDL, η υπερομοκυστεϊναιμία, οι ελεύθερες ρίζες κατά το οξειδωτικό στρες, το κάπνισμα, η αρτηριακή υπέρταση, οι χρόνιες μολύνσεις (π.χ. chlamidia pneumonia), οι γενετικοί και οι περιβαλλοντικοί (διατροφή) παράγοντες [5]. Οι παράγοντες αυτοί έχουν ως κοινό παρανομαστή το αυξημένο οξειδωτικό στρες.

Έτσι, το ενδοθήλιο μπορεί να ενεργοποιηθεί και να συνθέσει παράγοντες οι οποίοι προάγουν την συστολή του αγγείου (ενδοθηλίνες), τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, την προσκόλληση των λευκοκυττάρων και τη θρόμβωση. Οι παράγοντες αυτοί συμβάλλουν άμεσα και έμμεσα στην ανάπτυξη και την εξέλιξη της αθηρωματικής πλάκας. Τα ενδοθηλιακά κύτταρα αντιδρούν σε συνθήκες ή παράγοντες που τα διεγείρουν και μεταβάλλουν τη γονιδιακή έκφρασή τους με αποτέλεσμα :

- ✦ να μεταβάλλεται η έκφραση των υποδοχέων της κυτταρικής τους μεμβράνης, η ανταπόκριση του αγγείου στο NO, η διαπερατότητα της ενδοθηλιακής στιβάδας, και η μετανάστευση της LDL στον έσω χιτώνα,
- ✦ να ευνοείται ο πολλαπλασιασμός των λείων μυϊκών κυττάρων, η προσκόλληση των μονοκυττάρων/μακροφάγων, η μετατροπή τους προς αφρώδη κύτταρα και ο σχηματισμός του θρόμβου.

1.5.4 Λεία μυϊκά κύτταρα του αρτηριακού τοιχώματος [5, 13]

Τα λεία μυϊκά κύτταρα απαντούν σε δύο μορφές, σε αυτή που σχετίζεται με την αγγειοσυστολή και την αγγειοδιαστολή και σε αυτή που σχετίζεται με την έκκριση κυτταροκινών, τη σύνθεση εξωκυττάριας ουσίας και αυξητικών παραγόντων. Κατά την αθηρογένεση τα λεία μυϊκά κύτταρα μεταπηδούν από την πρώτη στην δεύτερη μορφή και απαντούν σε ερεθίσματα με υπέρμετρο πολλαπλασιασμό.

Η μετάβαση από τις σχετικά απλές λιποειδείς ραβδώσεις στη πιο πολύπλοκη μορφή της αλλοίωσης του αρτηριακού τοιχώματος σηματοδοτείται από την μετανάστευση των λείων μυϊκών κυττάρων από τον μέσω χιτώνα του αρτηριακού τοιχώματος δια μέσου του έσω ελαστικού πετάλου στον έσω χιτώνα. Εκεί τα λεία μυϊκά κύτταρα μπορούν να πολλαπλασιαστούν και να προσλαμβάνουν συνεχώς τροποποιημένες λιποπρωτεΐνες με αποτέλεσμα να εξελιχτούν σε αφρώδη κύτταρα. Ακόμα, μπορούν να συνθέσουν συστατικά της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας, γεγονός που οδηγεί στον σχηματισμό της ινώδους πλάκας [5].

Ο πολλαπλασιασμός των λείων μυϊκών κυττάρων επάγεται από το ινωδογόνο και από αυξητικούς παράγοντες, οι οποίοι παράγονται και εκκρίνονται από μακροφάγα και ενδοθηλιακά κύτταρα (αυξητικός παράγοντας αιμοπεταλίων (PDGF), αυξητικός παράγοντας ανάλογο της ινσουλίνης (IGF-1), βασικός αυξητικός παράγοντας των ινοβλαστών (bFGF)) ενώ ο μετασχηματισμός τους προς αφρώδη κύτταρα επάγεται από προϊόντα εκκρίσεως των μακροφάγων, όπως LPL, Apo E, IL-1, TNF-α, γ-INF. Ο TNF-α και η γ-INF διεγείρουν την έκφραση των υποδοχέων εκκαθαριστών των λείων μυϊκών κυττάρων, ενώ η LPL και η Apo E επιδρούν στην πρόσδεση της χοληστερόλης στην κυτταρική μεμβράνη.

Κύριο μιτογόνο ερέθισμα για την έναρξη του πολλαπλασιασμού των λείων μυϊκών κυττάρων είναι ο bFGF. Με τον κυτταρικό τραυματισμό (αίτια μηχανικά, αιμοδυναμικά, υποξία), ο bFGF απελευθερώνεται από τα ενδοθηλιακά και λεία μυϊκά κύτταρα [13], πιθανόν από μια ενδοκυττάρια δεξαμενή όπου βρίσκεται αποθηκευμένος με ταυτόχρονη επαγωγή της έκφρασης των υποδοχέων του. Την ίδια δράση ασκεί και ο PDGF όμως είναι λιγότερο ισχυρός από τον b FGF.

Πίνακας 1.3 Κυτταρικές πηγές και κύτταρα στόχοι για αυξητικούς παράγοντες και κυτταροκίνες [72]

Αυξητικοί παράγοντες/κυτοκίνες	Κυτταρικές πηγές*	Δραστηριότητα	Κύτταρα στόχοι*
Βασικό αυξητικό παράγοντα ινοβλαστών (bFGF)	EK, M, ΛMK	Χημειοταξία	EK, ΛMK
		Πολλαπλασιασμός	EK, ΛMK
Αυξητικό παράγοντα ανάλογο της ινσουλίνης (IGF-1)	EK, M, ΛMK	Χημειοταξία	EK, ΛMK
		Πολλαπλασιασμός	ΛMK

Ιντερφερόνη-γ (INF-γ)	T ,M	Αναστολή Πολλαπλασιασμού	ΛΜΚ
Ιντερλευκίνη-1 (IL-1)	A,EK,M,ΛΜΚ, T	Προσκολλητικά μόρια Χημειοταξία Πολλαπλασιασμός	EK M ΛΜΚ
Ιντερλευκίνη-2 (IL-2)	T	Πολλαπλασιασμός	EK,M, T
Ιντερλευκίνη-8 (IL-8)	EK,M,ΛΜΚ,T	Χημειοταξία	EK, T
Πρωτεΐνη χημειοτακτική για τα μονοκύτταρα τύπου 1 (MCP-1)	EK,M,ΛΜΚ	Χημειοταξία	M
Αυξητικός παράγοντας αιμοπεταλίων (PDFG)	EK,M, A,ΛΜΚ	Χημειοταξία Πολλαπλασιασμός	M,ΛΜ Κ M,ΛΜΚ
Αυξητικός παράγοντας που συνδέεται με την ηπαρίνη (HB-EGF)	EK,M,ΛΜΚ	Χημειοταξία Πολλαπλασιασμός	ΛΜΚ ΛΜΚ
Μετατρεπτικός αυξητικός παράγοντας (TGF-b)	EK,M,A,ΛΜΚ,T	Χημειοταξία Αναστολή Πολλαπλασιασμού	M,ΛΜΚ ΛΜΚ

*Α: αιμοπετάλια, ΕΚ: ενδοθηλιακά κύτταρα, Μ: μονοκύτταρα/μακροφάγα, ΛΜΚ: λεία μυϊκά κύτταρα, Τ: Τ λεμφοκύτταρα.

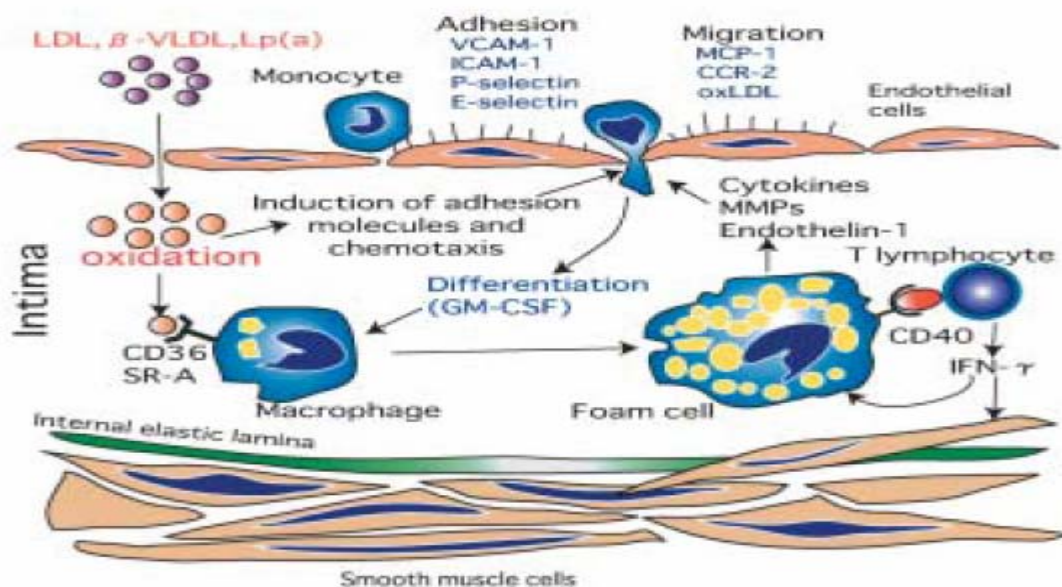
1.5.5 Μονοκύτταρα/μακροφάγα [1,5, 14, 15]

Τα μονοκύτταρα του αίματος, τα οποία μεταναστεύουν στον έσω χιτώνα των αρτηριών και μετασχηματίζονται σε μακροφάγα, ενέχονται σε όλες τις φάσεις της διεργασίας του σχηματισμού της αθηρωματικής πλάκας: έναρξη, πρόοδος και υποστρόφη. Ο φυσιολογικός ρόλος των μακροφάγων που έχουν μεταναστεύσει στον έσω χιτώνα είναι να ενεργούν ως κύτταρα εκκαθαριστές, μέσω των υποδοχέων εκκαθαριστών που φέρουν στην κυτταρική επιφάνεια, αποσύροντας τροποποιημένα σωματίδια LDL και ως πηγή αυξητικών παραγόντων και κυτταροκινών.

Τα μακροφάγα παράγουν αυξητικούς παράγοντες, οι οποίοι επάγουν τον πολλαπλασιασμό των λείων μυϊκών κυττάρων, των ινοβλαστών και των ενδοθηλιακών κυττάρων. Παράγουν επίσης IL-1 και TNF που ευνοούν την προσκόλληση των

μονοκυττάρων στο ενδοθήλιο και τον πολλαπλασιασμό των λείων μυϊκών κυττάρων και LB_4 , ως χημειοτακτικό παράγοντα, που προωθεί τη διείσδυση των μονοκυττάρων στην πλάκα. Ακόμα παράγουν πρωτεϊνάσες (MMP), οι οποίες εκτός των άλλων ευθύνονται για τη νέκρωση που παρατηρείται στο κέντρο της πλάκας και τοξικές ενώσεις, όπως μεταβολίτες του οξυγόνου που προκαλούν βλάβη στα ενδοθηλιακά κύτταρα και οξείδωση των LDL. Αποτελούν το κύριο κυτταρικό στοιχείο της φλεγμονώδους διεργασίας στο μικροπεριβάλλον της αθηρωματικής πλάκας.

Η προσκόλληση και η μετανάστευση των μονοκυττάρων μέσα στο αρτηριακό τοίχωμα διεγείρεται από τις κυτοκίνες, την $Lp(a)$ και από την ox-LDL[5], η οποία μπορεί άμεσα να προσελκύσει τα μονοκύτταρα και να προκαλέσει την παραγωγή μορίων προσκόλλησης από τα ενδοθηλιακά κύτταρα, όπως τα ICAM-1, VCAM-1, E και P σελεκτίνες (Σχήμα 1.5). Το ενδοθήλιο και τα λεία μυϊκά κύτταρα εκκρίνουν τη MCP-1, που λειτουργεί ως χημειοτακτικός παράγοντας των μονοκυττάρων, των T-λεμφοκυττάρων και των βασεόφιλων. Υπάρχουν αρκετές μελέτες που έχουν συσχετίσει τη MCP-1 με την διαδικασία της αθηρογένεσης. Υποστηρίζεται δε πως η ενεργοποίηση του υποδοχέα CCR2, από τη MCP-1 συνεισφέρει στον σχηματισμό αφρωδών κυττάρων, που αποτελούν το στοιχείο-σφραγίδα των πρώιμων αθηρωματικών αλλοιώσεων [14].



Σχήμα 1.2 Φλεγμονώδεις αντιδράσεις κατά την παθογένεση της αθηροσκλήρωσης [7]

Στη συνέχεια, μονοκύτταρα από το αίμα προσκολλώνται στα ενδοθηλιακά κύτταρα με τη βοήθεια των μορίων προσκόλλησης, διαπερνούν την ενδοθηλιακή στιβάδα, μεταναστεύουν στον έσω χιτώνα όπου μετασχηματίζονται σε μακροφάγα. Με την εξέλιξη της αθηρωματικής βλάβης, στο διατεινόμενο έσω χιτώνα αναπτύσσεται δίκτυο νεοσχηματισμένων αγγείων, το οποίο με την σειρά του, ευνοεί την μετανάστευση των μονοκυττάρων στην εξελισσόμενη πλάκα.

Τα μακροφάγα που μετανάστευσαν στον έσω χιτώνα παραλαμβάνουν αφειδώς οχ-LDL ή άλλα σωματίδια πλούσια σε χοληστερόλη μέσω των υποδοχέων εκκαθαριστών (scavenger receptor), οι οποίοι δεν υφίστανται κορεσμό. Όταν συσσωρεύσουν μεγάλη ποσότητα χοληστερόλης εξελίσσονται προς αφρώδη κύτταρα και συμμετέχουν στον σχηματισμό των λιποειδών ραβδώσεων και στη δομή της πλάκας. Τα αφρώδη κύτταρα μπορεί να είναι μακροφάγα ή λεία μυϊκά κύτταρα, υπερφορτωμένα με χοληστερόλη, ελεύθερη ή εστεροποιημένη, την οποία αποθηκεύουν με την μορφή λιποσταγόνας.

1.5.6 Εξωκυττάρια θεμέλια ουσία [1,7, 16]

Η εξωκυττάρια θεμέλια ουσία (extracellular matrix, ECM) αποτελεί τον αρχιτεκτονικό σκελετό ο οποίος επηρεάζει τη δομική ακεραιότητα της πλάκας και το μικροπεριβάλλον το οποίο συμμετέχει σε όλες τις διεργασίες που ενέχονται στην αθηρογένεση. Παράγεται και εκκρίνεται από τα λεία μυϊκά κύτταρα του αρτηριακού τοιχώματος υπό την επίδραση αυξητικών παραγόντων ή κυτταροκινών, ενώ τα μακροφάγα ενέχονται στην εναπόθεση και ανάπλαση της θεμέλιας ουσίας. Η μετανάστευση, η ρήξη της πλάκας και οι επιπλοκές της εξαρτώνται κατά μεγάλο βαθμό από την σύνθεση και την αποικοδόμηση της θεμέλιας ουσίας.

Η έκθεση των συστατικών της θεμέλιας ουσίας κατά την ρήξη της πλάκας ή της βλάβης του ενδοθηλίου θα πυροδοτήσει τον σχηματισμό του θρόμβου. Συγχρόνως συστατικά της θεμέλιας ουσίας (φιμπρονεκτίνη, θρομβοσπονδίνη) ρυθμίζουν την συγκόλληση, την προσκόλληση αλλά και τον πολλαπλασιασμό των αιμοπεταλίων. Άλλα συστατικά της θεμέλιας ουσίας όπως η ηπαρίνη δρουν ως αντιθρομβωτικά. Η αλληλεπίδραση των μακροφάγων με συστατικά της εξωκυττάριας ουσίας αποτελεί αναγκαία προϋπόθεση για τον σχηματισμό των αφρωδών κυττάρων. Τέλος, η θεμέλια ουσία ευθύνεται

για την κατακράτηση των λιπιδίων στην αθηρωματική πλάκα και για την εναπόθεση της Lp(a), μιας από τις αθηρογόνες λιποπρωτεΐνες.

Από τα παραπάνω γίνεται κατανοητό ότι η αθηρογένεση είναι μια πολυπαραγοντική διαδικασία, με πληθώρα μοριακών αλληλεπιδράσεων που λαμβάνουν χώρα στον αρτηριακό αυλό συμβάλλοντας στην έναρξη και στην πρόοδο της αθηροσκλήρωσης. Αν και η αθηροσκλήρωση έχει αποτελέσει κύριο αντικείμενο εντατικών επιδημιολογικών και παθοφυσιολογικών ερευνών, υπάρχουν ακόμα πτυχές της που πρέπει να διερευνηθούν ώστε να γίνουν γνωστοί όλοι οι μηχανισμοί που εμπλέκονται στην αθηρογένεση.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

ΑΜΙΝΟΞΕΑ ΚΑΙ ΑΘΗΡΟΣΚΛΗΡΩΣΗ

2.1 Σύσταση διαιτητικής πρωτεΐνης

Ένα κομμάτι της διατροφής μας που θα μπορούσε να συσχετιστεί με την αθηροσκληρωτική διαδικασία είναι και η διαιτητική πρωτεΐνη και πιο συγκεκριμένα η σύστασή της σε αμινοξέα.

Η ανασκόπηση της βιβλιογραφίας έδειξε πλήθος ερευνών που διερευνούν την επίδραση της διαιτητικής πρωτεΐνης στα επίπεδα της χοληστερόλης ορού και κατ' επέκταση στην αθηροσκλήρωση. Το μεγαλύτερο μέρος των ερευνών αυτών πραγματοποιήθηκαν σε ζωικά πρότυπα και ένα μικρό μέρος σε ανθρώπους. Η κύρια κατευθυντήρια γραμμή των ερευνητών ήταν η διάκριση της διαιτητικής πρωτεΐνης σε ζωικής και φυτικής προέλευσης, ενώ λίγες ήταν εκείνες που επέκτειναν την έρευνα τους και διερεύνησαν την σύσταση των αμινοξέων των δυο πηγών πρωτεΐνης για την επίδρασή τους στα επίπεδα της χοληστερόλης ορού και την αθηροσκλήρωση. Στις περισσότερες μελέτες ως φυτική διαιτητική πρωτεΐνη χρησιμοποιήθηκε η πρωτεΐνη σόγιας και ως ζωική η καζεΐνη. Η πρωτεΐνη σόγιας, σε αντίθεση με την καζεΐνη, είναι γνωστή για την υποχοληστερολαιμική δράση της [17-19], είναι πλούσια σε μη απαραίτητα αμινοξέα και περιέχει υψηλότερο ποσοστό αργινίνης και γλυκίνης.

Μελέτες σε ζώα έχουν δείξει πως η διαιτητική φυτική πρωτεΐνη, σε σύγκριση με τη ζωική πρωτεΐνη, τείνει να μειώσει τα επίπεδα χοληστερόλης ορού, και αυτό συνδέεται με μια σταδιακή μείωση στην ανάπτυξη αθηροσκλήρωσης στα ζώα [20-22].

Το 1991, οι Sanchez A, Hubbard R.W έδειξαν ότι η επίδραση των αμινοξέων του πλάσματος στον λόγο ινσουλίνης/γλυκαγόνης αποτελεί μια εξήγηση της τροποποιητικής δράσης της διαιτητικής πρωτεΐνης στην αθηροσκλήρωση. Αυτό ήταν σε συμφωνία με την γενική υπόθεση ότι τα αμινοξέα της διαιτητικής πρωτεΐνης επιδρούν στα επίπεδα της χοληστερόλης ορού μέσω της δράσης των αμινοξέων του πλάσματος στον λόγο ινσουλίνης/γλυκαγόνης [23].

Ο λόγος ινσουλίνης/γλυκαγόνης είναι ένας καθοριστικός παράγοντας των μεταβολικών πορειών της λιπογένεσης/λιπόλυσης, γλυκογένεσης/γλυκογονόλυσης και γλυκονογένεσης/ γλυκόλυσης και για αυτό αποτελεί έναν σημαντικό συντελεστή της μεταβολικής ομοιόστασης. Τα αμινοξέα του πλάσματος και ο λόγος ινσουλίνης/γλυκαγόνης είναι μεταξύ των πιο πρόσφατων δεικτών των αποτελεσμάτων της διαιτητικής πρωτεΐνης στα επίπεδα χοληστερόλης ορού και τα καρδιαγγειακά νοσήματα.

Σύμφωνα με μελέτες της παραπάνω ομάδας, η σύσταση των αμινοξέων της δίαιτας επηρεάζει τα μεταγευματικά επίπεδα των αμινοξέων του πλάσματος και των ορμονών ινσουλίνη και γλυκαγόνη σε ανθρώπους [24,25]. Άνθρωποι που ακολούθησαν μια διατροφή με φυτική πρωτεΐνη σε αντίθεση με τη συνηθισμένη Αμερικανική διατροφή τους, είχαν σημαντικές αυξήσεις στην αργινίνη, τη γλυκίνη, τη σερίνη και τη θρεονίνη πλάσματος [26]. Αυτές οι αλλαγές στα ελεύθερα αμινοξέα συνδέονται με ιδιαίτερα σημαντικές μειώσεις των επιπέδων χοληστερόλης και τριγλυκεριδίων ορού [27]. Σε υπερχοληστερολαιμικά άτομα [28], ο συνδυασμός της καζεΐνης με αργινίνη και γλυκίνη σε ποσά ίδια με αυτά που βρίσκονται στην πρωτεΐνη σόγιας, αυξάνει την αργινίνη και τη γλυκίνη πλάσματος και μειώνει τον υψηλό μεταγευματικό λόγο ινσουλίνης/γλυκαγόνης. Αυτός ο μειωμένος λόγος είναι παρόμοιος με αυτόν που παρατηρείται σε ανθρώπους μετά από γεύμα με πρωτεΐνη σόγιας.

Σε ποντίκια, η καζεΐνη προκαλεί υψηλό λόγο ινσουλίνης/γλυκαγόνης [18] και μια αύξηση στην δραστηριότητα των ηπατικών ενζύμων που είναι υπεύθυνα για την λιπογένεση [29] σε σχέση με τα ποντίκια που ταΐστηκαν με πρωτεΐνη σόγιας.

Τα αμινοξέα αργινίνη και γλυκίνη, που βρίσκονται σε μεγάλο ποσοστό στη σόγια, σχετίζονται με μείωση των επιπέδων χοληστερόλης ορού. Επίσης, η πρωτεΐνη της σόγιας εμφανίζει και αντιαθηρογόνο δράση. Η δράση αυτή εστιάζεται στο ότι η απομονωμένη πρωτεΐνη σόγιας μειώνει την οξείδωση της LDL [30], συμβάλλοντας έτσι στη μείωση των παραγόντων που συντελούν στην αθηροσκλήρωση.

Αντίθετα, η λυσίνη και τα αμινοξέα διακλαδισμένης αλύσου σχετίζονται με αυξημένα επίπεδα χοληστερόλης ορού. Ο λόγος πλάσματος λευκίνη/αργινίνη, αμινοξέα διακλαδισμένης αλύσου/αργινίνη και αρωματικά αμινοξέα/αργινίνη σχετίζεται περισσότερο μεταβολικά με την υπερχοληστερολαιμία και την αθηροσκλήρωση από τον λόγο λυσίνη/αργινίνη [23]. Ωστόσο, σε ζωικά πρότυπα έχει δείχτει ότι ένας υψηλός λόγος λυσίνης/αργινίνης έχει άμεση επίδραση στην αύξηση της χοληστερόλης ορού και στην

αθηρογένεση. Στη καζεΐνη έχει παρατηρηθεί αναλογίαλυσίνης/αργινίνης ίση 2,00, η οποία είναι σημαντικά πιο αθηρογόνος από την πρωτεΐνη σόγιας όπου η αναλογία λυσίνης/αργινίνης είναι ίση με 0,86.

Κατά συνέπεια, τα παραπάνω απαραίτητα αμινοξέα που σχετίζονται με υψηλό λόγο ινσουλίνης/γλυκαγόνης [19], φαίνεται ότι είναι περισσότερο αποτελεσματικά για την απελευθέρωση της ινσουλίνης και την διέγερση των αναβολικών δράσεων, δίνοντας έτσι μια ικανοποιητική εξήγηση για την υπερχοληστερολαιμική τους δράση.

Τα αμινοξέα που προέρχονται από φυτική πρωτεΐνη μειώνουν την απελευθέρωση της ινσουλίνης και προάγουν την απελευθέρωση της γλυκαγόνης, η οποία δρώντας στα ηπατοκύτταρα, προάγει την παραγωγή cAMP μέσω της διέγερσης της αδεनुλικής κυκλάσης. Η αύξηση του cAMP μειώνει τη σύνθεση των ενζύμων που απαιτούνται για την de novo λιπογένεση και τη σύνθεση της χοληστερόλης (HMG-CoA αναγωγή), ενώ αυξάνει τη σύνθεση των ενζύμων της γλυκονογένεσης, τον αριθμό των ηπατικών υποδοχέων της LDL και την παραγωγή του IGF-I ανταγωνιστή. Η ιδιότητες των φυτοφαγικών διαίτων –χαμηλά σε απαραίτητα αμινοξέα, υψηλών σε διαιτητικές ίνες, χαμηλές σε κορεσμένα λιπαρά οξέα– μπορούν να ενισχύσουν αυτές τις επιδράσεις μειώνοντας την έκκριση της ινσουλίνης.

Ένας άλλος προτεινόμενος μηχανισμός της μείωσης της χοληστερόλης και LDL πλάσματος που προκαλείται από την πρωτεΐνη της σόγιας σε ζωικά πρότυπα, εστιάζεται στο ότι η μείωση αυτή μπορεί να οφείλεται: α) στην μείωση της απορρόφησης των στεροειδών στο γαστρεντερικό σύστημα, που πιθανόν να επιτυγχάνεται μέσω της αύξησης της πρόσδεσης στα χολικά οξέα και αύξηση της απέκκρισή τους [31-33], και β) στην αύξηση των Apo B/E υποδοχέων της LDL στα κύτταρα [34].

2.2 Αμινοξέα

2.2.1 L-Αργινίνη

Το αγγειακό ενδοθήλιο έχει αναγνωριστεί ότι παίζει σημαντικό ρόλο στην φυσιολογία του αγγείου. Η προσοχή των ερευνητών εστιάστηκε στην ενδοθηλιακή παραγωγή του NO ως ένα στοιχείο κλειδί σε πολλές διαδικασίες που σχετίζονται με την ανάπτυξη της αθηροσκλήρωσης. Το αμινοξύ που σχετίζεται με την παραπάνω υπόθεση για

το οποίο έχουν δείξει ενδιαφέρον πολλοί ερευνητές είναι η L-Αργινίνη που αποτελεί το υπόστρωμα για την συνθάση του NO, ένα ένζυμο υπεύθυνο για την ενδοθηλιακή παραγωγή του NO. Η επίδραση της από του στόματος χορήγησης L-Αργινίνης στο αγγείο έχει διερευνηθεί σε ανθρώπους και σε ποικίλα ζωικά πρότυπα.

Η δράση της L-Αργινίνης επιτελείται μέσω της αποκατάστασης της παραγωγής του ενδογενούς NO και της επίδρασης αυτού στη λειτουργία του ενδοθηλίου. Μελέτες έχουν δείξει ότι η χρόνια πρόσληψη L-Αργινίνης μειώνει τον πολλαπλασιασμό των λείων μυϊκών κυττάρων και την συσσώρευση των μονοκυττάρων σε υπερχοληστερολαιμικά κουνέλια. Το 1992, ο John P και συνεργάτες απέδειξαν ότι συμπλήρωμα L-Αργινίνης βελτιώνει την ενδοθηλιοεξαρτώμενη αγγειοχάλαση και κατ' επέκταση μειώνει την αθηρογένεση [35]. Ακόμα, έχει παρατηρηθεί ότι μειώνει την επιφάνεια των αθηρωματικών αλλοιώσεων [36], το πάχος του έσω χιτώνα και αναστέλλει την πρόοδο της αθηροσκλήρωσης μέσω του περιορισμού της προσκόλλησης των μονοκυττάρων στο ενδοθήλιο [38], της μείωσης της συσσώρευσης των αφρωδών κυττάρων και της μείωσης του πολλαπλασιασμού των λείων μυϊκών κυττάρων [37] σε υπερχοληστερολαιμικά κουνέλια.

2.2.2 Ταυρίνη και N-ακέτυλο κυστεΐνη

Εκτός από την επίδραση της L-Αργινίνη στη λειτουργία του ενδοθηλίου έχουν μελετηθεί και άλλα αμινοξέα *in vivo* και *in vitro* όπως η ταυρίνη και η N-ακέτυλο κυστεΐνη. Μελέτη έχει δείξει ότι η N-ακέτυλο κυστεΐνη βελτιώνει τη λειτουργία της στεφανιαίας και της μηριαίας αρτηρίας σε ασθενείς με αθηροσκλήρωση [39]. Η ταυρίνη είναι ένα ημι-απαραίτητο αμινοξύ όπου πρόσφατα έχει δειχτεί ότι έχει προστατευτικές επιδράσεις στο ενδοθήλιο. Η χορήγηση ταυρίνης *in vivo* εξασθενεί σημαντικά την ανασταλτική επίδραση της LDL στην ενδοθηλιοεξαρτώμενη αγγειοχάλαση και στα επίπεδα του NO, ενώ ταυτόχρονα μειώνει τα αυξημένα επίπεδα της ADMA (ασυμμετρική διμέθυλο-αργινίνη), MDA (μαλονδιαλδεΰδη) και του TNF-α. Συμπερασματικά, η ταυρίνη προστατεύει το ενδοθήλιο από την LDL προκαλούμενη δυσλειτουργία ή την επίδραση της ox LDL στα ενδοθηλιακά κύτταρα και οι προστατευτικές αυτές δράσεις σχετίζονται με τη μείωση των επιπέδων ADMA [40].

2.2.3. Τρυπτοφάνη

Άλλο ένα αμινοξύ το οποίο έχει μελετηθεί και έχει εμφανίσει προστατευτικές δράσεις στην αθηροσκλήρωση είναι και η τρυπτοφάνη. Τα απαραίτητα αυτό αμινοξύ έχει συσχετιστεί με το πιθανό ρόλο στην αναστολή της ανθρωπίνης μυελουπεροξυδάσης (MPO). Η MPO είναι μια αιμοπρωτεΐνη η οποία δεσμεύει H_2O_2 απουσία ή παρουσία Cl^- και καταλύει το σχηματισμό οξειδωτικών μέσων διαμέσου των $1e^-$ και $2e^-$ οξειδωτικών πορειών. Αυτά τα δραστικά οξειδωτικά εμπλέκονται στη παθογένεση ποικίλων παθολογικών καταστάσεων συμπεριλαμβανομένου και της αθηροσκλήρωσης. Η τρυπτοφάνη αδρανοποιεί την MPO παρουσία ή απουσία Cl^- , διαμέσου της πρόσδεσης στη MPO, σχηματίζοντας έτσι ένα αδρανές σύμπλοκο Trp-MPO και Trp-MPO- Cl^- καθώς και επιταχύνοντας τον σχηματισμό της MPO II, μια αδρανής μορφή της MPO [41].

2.3 Γλουταμινικό οξύ και ασπαραγινικό οξύ

2.3.1 Εισαγωγή

Το ασπαραγινικό και το γλουταμινικό οξύ είναι δύο μη απαραίτητα αμινοξέα τα οποία συντίθενται από τον ανθρώπινο οργανισμό ενώ ταυτόχρονα προσλαμβάνονται και μέσω της διατροφής. Η ημερήσια πρόσληψη των δύο αμινοξέων εξαρτάται από την σύσταση της διαιτητικής πρωτεΐνης. Το γλουταμινικό οξύ είναι ένα ευρέως διαδεδομένο αμινοξύ το οποίο βρίσκεται σε πολλά τρόφιμα και η διαιτητική πρόσληψη είναι επαρκής, ιδιαίτερα όταν η φυτική πρωτεΐνη αποτελεί το κύριο διαιτητικό συστατικό.

Σύμφωνα με την βιβλιογραφία δεν υπάρχει αποδεκτή ημερήσια πρόσληψη (ADI, acceptable daily intake) για το ασπαραγινικό οξύ ενώ η αποδεκτή ημερήσια πρόσληψη για το γλουταμινικό οξύ έχει αποτιμηθεί από τη JEFCA (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives) ως μη καθοριζόμενη ("not specified") [42, 43]. Παρόμοια ασφαλή αποτίμηση για το γλουταμινικό οξύ εξέφρασε η SCF (Scientific Committee for Food) της ευρωπαϊκής επιτροπής, ενώ ο FDA (Federal Drug Administration) δεν κατέδειξε την ύπαρξη κάποιας ευαίσθητης ομάδας του πληθυσμού και συνταυτίστηκε με την ασφαλή αποτίμηση των παραπάνω επιτροπών. Γενικά, η JEFCA διατήρησε τις προηγούμενες θέσεις της για τα

συμπληρώματα διατροφής και επισήμανε ότι δεν θα έπρεπε να χρησιμοποιούνται σε νεογνά κάτω των 12 εβδομάδων[42,43].

Η ημερήσια κατανάλωση τροφίμων πλούσια σε γλουταμινικό και ασπαραγινικό οξύ όπως σιτάλευρο, αγελαδινό γάλα, λαχανικά (peas) και σόγια μπορούν να προστατέψουν το αρτηριακό τοίχωμα. Μια γενική εκτίμηση δείχνει ότι περίπου 9 g ασπαραγινικού και 10g γλουταμινικού οξέος απαιτούνται καθημερινά για ένα άτομο 70kg. [44]

Τα δύο αυτά αμινοξέα αποτελούν νευροδιεγερτικά μόρια και για το λόγο αυτό απαιτούνται περισσότερες μελέτες πριν την κλινική τους χρήση. Υπάρχουν αντιφατικά αποτελέσματα όσον αφορά στη συσχέτισή τους με τη σοβαρή νόσο Alzheimer σε ανθρώπους. Ωστόσο, και τα δύο αμινοξέα είναι ασφαλή για τους ανθρώπους όταν χρησιμοποιούνται ως συμπληρώματα διατροφής και προσπάθειες να αποδείξουν εγκεφαλικές βλάβες είχαν αρνητικά αποτελέσματα [45].

Το γλουταμινικό οξύ αποτελεί τον κύριο νευροδιαβιβαστή στο κεντρικό νευρικό σύστημα των θηλαστικών και το ασπαραγινικό είναι νευροδιαβιβαστής που βρίσκεται στον εγκέφαλο με παρόμοιες διεγερτικές ιδιότητες. Το γλουταμινικό οξύ είναι ένα από τα τρία αμινοξέα που απαιτούνται για την σύνθεση της γλουταθειόνης(GSH), ενός μορίου που δρα ως εκκαθαριστής των ελεύθερων ριζών[46].

2.3.2 Προστασία της LDL από την οξείδωση

Είναι πολύ καλά τεκμηριωμένο πως τα αυξημένα επίπεδα την χοληστερόλης ορού και ειδικά της LDL χοληστερόλης αποτελούν παράγοντα κινδύνου για καρδιαγγειακά νοσήματα. Η οξείδωση της LDL αποτελεί κύριο αίτιο για την ενδοθηλιακή βλάβη μιας και αποτελεί ισχυρό παράγοντα που οδηγεί στην αποτελεσματική αλληλεπίδραση μονοκυττάρων-ενδοθηλιακών κυττάρων και στον σχηματισμό αφρωδών κυττάρων στο υπενδοθηλιακό χώρο οδηγώντας έτσι στον σχηματισμό των λιποειδικών ραβδώσεων [4, 5, 47]. Η προστασία της από την οξείδωση προλαμβάνει την αθηρογένεση.

Το 1995, οι Morita και συνεργάτες [48], απέδειξαν ότι η χορήγηση συμπληρωμάτων ασπαραγινικού και γλουταμινικού οξέος στην καρδιοπληγία κατά την διάρκεια των εγχειρήσεων ανοιχτής καρδιάς ελαττώνει τα δυσμενή αποτελέσματα της επανοξυγόνωσης, δηλαδή τη δυσλειτουργία του μυοκαρδίου και την περιορισμένη ανοχή στο οξειδωτικό στρες

που λαμβάνουν χώρα κατά την επανοξυγόνωση στις εγχειρήσεις ανοιχτής καρδιάς σε πρόωρα υποξαιμικά γουρούνια. Αυτό αποτέλεσε το έναυσμα για την διερεύνηση του ρόλου των δύο αμινοξέων στην αθηρογένεση.

2.3.3 Αναστολή του σχηματισμού των λιποειδών ραβδώσεων

Είναι γνωστό ότι οι πρώιμες αλλοιώσεις στο αγγειακό τοίχωμα των υπερχοληστερολαιμικών ζώων επάγονται από τα προσκολλημένα μονοκύτταρα στο ενδοθήλιο τα οποία παρατηρούνται και στις πρώτες εβδομάδες μετά τη χορήγηση δίαιτας υψηλής περιεκτικότητας σε χοληστερόλη. Το γεγονός αυτό επάγεται από την έκφραση των ενδοθηλιακών μορίων προσκόλλησης και των χημειοτακτικών μορίων που επιφέρει η υπερχοληστερολαίμια [4,5]. Στη συνέχεια τα προσκολλημένα μονοκύτταρα, αφού εισέλθουν στον έσω χιτώνα, διαφοροποιούνται σε μακροφάγα όπου προσλαμβάνουν αφειδώς LDL και τελικά μετατρέπονται σε αφρώδη κύτταρα.

Το 2003, οι Yanni και συνεργάτες [44] σχεδίασαν μια μελέτη σε υπερχοληστερολαιμικά κουνέλια, με κύριο σκοπό να διερευνήσουν τις επιδράσεις της πρόσληψης του διαιτητικού γλουταμινικού και ασπαραγινικού οξέος στην έναρξη των λιποειδών ραβδώσεων (fatty streak). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η χρόνια πρόσληψη των δυο αμινοξέων μείωσε σημαντικά τον αριθμό των προσκολλημένων μονοκυττάρων στο ενδοθήλιο και τον σχηματισμό αφρώδων κυττάρων στον έσω χιτώνα της θωρακικής αορτής σε σχέση με την ομάδα ελέγχου, χωρίς καμία επίδραση στα επίπεδα της χοληστερόλης του πλάσματος, αφού στο τέλος της παρέμβασης παρατηρήθηκε αύξηση της χοληστερόλης πλάσματος και στις δύο ομάδες χωρίς στατιστικά σημαντικές διαφορές.

Από τα παραπάνω, η ερευνητική ομάδα συμπεραίνανε ότι ο συνδυασμός ασπαραγινικού και γλουταμινικού οξέος οδηγεί σε εξασθένηση της προσκόλλησης των μονοκυττάρων στο ενδοθήλιο και παρεμποδίζει το σχηματισμό των αφρώδων κυττάρων, αναστέλλοντας με αυτό το τρόπο τον σχηματισμό των πρώιμων αθηρωματικών αλλοιώσεων. Το γεγονός ότι ο συνδυασμός γλουταμινικού και ασπαραγινικού αναστέλλει τον σχηματισμό των λιποειδών ραβδώσεων παρά τη σημαντική αύξηση της χοληστερόλης του πλάσματος δείχνει ότι οι αντιαθηρογόνες ιδιότητές τους δεν αποδίδονται σε επίδραση τους στο μεταβολισμό της χοληστερόλης.

2.3.4 Επίδραση στις λιποπρωτεΐνες ορού και στην ApoA-1 και Apo B

Πλήθος ερευνών αποδεικνύουν τον ρόλο της HDL-χοληστερόλης στην προστασία ενάντια στον σχηματισμό της αθηροσκλήρωσης δια μέσου της αντίστροφης μεταφοράς της χοληστερόλης. Η HDL δρα ως εξωκυττάριος αποδέκτης της χοληστερόλης συμβάλλοντας στην απομάκρυνσή της από τα κύτταρα. Επίσης έχει αναφερθεί ότι η HDL αναστέλλει την έκφραση των ενδοθηλιακών μορίων προσκόλλησης και έχει αντιοξειδωτικές ιδιότητες[1, 49,50]. Ο ρόλος της HDL στην αντίστροφη μεταφορά της χοληστερόλης εξηγεί εν μέρει ότι ο κίνδυνος για αθηροσκλήρωση είναι αντίστροφα συσχετισμένος με τα επίπεδα της HDL. [51]

Η κύρια πρωτεϊνική συνιστώσα της HDL είναι η ApoA-1 και της LDL είναι η ApoB-100, οι οποίες παίζουν σημαντικό ρόλο στον σχηματισμό αυτών των λιποπρωτεϊνών. Τα επίπεδα των απολιποπρωτεϊνών στο αίμα είναι ενδεικτικά του τύπου και της έκτασης της αθηροσκλήρωσης. Όταν τα επίπεδα της ολικής χοληστερόλης ή και της LDL-χοληστερόλης είναι αυξημένα, η ApoB-100 είναι πάντα αυξημένη και η ApoA-1 είναι συχνά μειωμένη. Η μείωση της ApoA-1 είναι πιο σημαντική, εάν μαζί με τα αυξημένα επίπεδα της χοληστερόλης συνυπάρχει και αύξηση των τριγλυκεριδίων [52].

Η apoA-1 χρησιμεύει για τη σύνδεση της HDL με τους κυτταρικούς υποδοχείς (Apo B/E) και ενέχεται στην αντίστροφη μεταφορά της χοληστερόλης. Ασκεί έντονη αντιαθηρογόνο επίδραση στο αρτηριακό τοίχωμα γιατί, εκτός που προάγει την μετακίνηση της χοληστερόλης από τα κύτταρα του αρτηριακού τοιχώματος στις HDL και την παραλαβή της χοληστερόλης από τις κυτταρικές μεμβράνες, αναστέλλει την οξειδωτική μετατροπή των LDL [1]

Το 2005, οι Yanni και συνεργάτες [53] διερεύνησαν την μεταβολή των λιποπρωτεϊνών του ορού και της απολιποπρωτεΐνης A-1 και B σε κουνέλια που έλαβαν μια δίαιτα υψηλή σε χοληστερόλη και ταυτόχρονα ασπαραγινικό και γλουταμινικό από το νερό. Η έρευνα έδειξε ότι τα δύο αμινοξέα διατήρησαν τη συγκέντρωση της απολιποπρωτεΐνης A-1 και αύξησαν την HDL-χοληστερόλη με οριακά σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο ομάδων στο τέλος της μελέτης. Από την άλλη μεριά, η ολική χοληστερόλη, η LDL-χοληστερόλη και η ApoB ήταν σημαντικά αυξημένα και στις δύο ομάδες κατά την διάρκεια της διαιτητικής παρέμβασης. Στη συγκέντρωση των TAG παρατηρήθηκαν παρόμοιες αλλαγές και στις δύο ομάδες οι οποίες δεν ήταν σημαντικές. Φαίνεται λοιπόν ότι ο

συνδυασμός ασπαραγινικού και γλουταμινικού δεν έχει καμία επίδραση στην συγκέντρωση της ολικής χοληστερόλης, της LDL και της ApoB.

Από τα παραπάνω, οι ερευνητές συμπέραναν ότι η αντιαθηρογόνος δράση των δύο αμινοξέων δεν αποδίδεται στην μείωση των αθηρογενετικών παραγόντων, όπως η LDL-C, TAG, η ολική χοληστερόλη και η ApoB. Η αύξηση της HDL-C και η διατήρηση των επιπέδων της ApoA-1 που παρατηρήθηκε στην ομάδα γλουταμινικού και του ασπαραγινικού μπορεί να εμπλέκονται στον προστατευτικό μηχανισμό δράσης τους.

Συμπερασματικά, για να έχουμε πιο σφαιρική άποψη σχετικά με τη δράση των δύο αμινοξέων αλλά και τη διαλεύκανση των μηχανισμών μέσω των οποίων εκδηλώνουν τη αντιαθηρογόνο δράση τους απαιτούνται περαιτέρω μελέτες. Μια από αυτές αποτελεί και η μελέτη της δικής μας ερευνητικής ομάδας.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

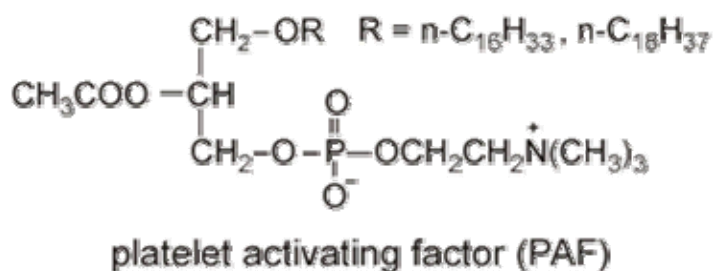
ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗΣ ΑΙΜΟΠΕΤΑΛΙΩΝ

3.1 Εισαγωγή [54]

Ο PAF, ένα γλυκεριναιθερικό φωσφολιποειδές, είναι ισχυρός μεσολαβητής της φλεγμονής, εκδηλώνει ένα ευρύ φάσμα παθοφυσιολογικών δράσεων, που επιτυγχάνονται σε συγκεντρώσεις τόσο χαμηλές όπως 10^{-12} M σε μερικά συστήματα και σχεδόν πάντα από 10^{-9} M ως διακυτταρικό αγγελιοφόρο μόριο. Ο PAF έχει χαρακτηριστεί ως νέα, ισχυρή και μοναδική κατηγορία χημικών μεσολαβητών (λιπιδίων), ενώ άλλοι θεωρούν τον PAF ως ορμόνη ή αρχέγονο-καθολικό κυτταρικό βιολογικό ρυθμιστή. Ακόμα, η πλειοψηφία των αιθερικών λιποειδών έχει αντικατασταθεί με τα εστεροποιημένα ανάλογά τους κατά τη διάρκεια της εξέλιξης, όμως ο PAF και μερικά δευτερεύοντα γλυκεριναιθερικά φωσφολιποειδή διατηρήθηκαν σε διάφορους οργανισμούς λόγω των σημαντικών βιολογικών ρόλων τους

3.2 Χημική δομή PAF

Ο PAF είναι ένα γλυκεριναιθερικό φωσφολιποειδές. Στην πρώτη θέση του γλυκερινικού σκελετού συνδέεται, με αιθερικό δεσμό, μια λιπαρή αλυσίδα που περιλαμβάνει συνήθως 16 ή 18 άτομα άνθρακα και είναι κορεσμένη ή ακόρεστη με έναν ή δύο διπλούς δεσμούς. Στη δεύτερη θέση βρίσκεται εστεροποιημένο ένα οξικό οξύ και στην τρίτη θέση υπάρχει μια ομάδα φωσφορυλοχολίνης (Σχήμα 3.1).



Σχήμα 3.1. Χημική δομή του παράγοντα ενεργοποίησης αιμοπεταλίων, PAF

Η παραπάνω δομή αντιπροσωπεύει την πιο δραστική μορφή του PAF όχι όμως και τη μοναδική αφού στη φύση έχει βρεθεί μια μεγάλη ποικιλία μοριακών ειδών και αναλόγων του PAF με παρόμοιες βιολογικές δράσεις. Η ύπαρξη όλων αυτών των μοριακών ειδών και αναλόγων του PAF οφείλεται κυρίως στην σχετικά ευρεία εξειδίκευση των ενζύμων βιοσύνθεσης και αποικοδόμησης του. Το κάθε είδος κυττάρου δίνει ένα διαφορετικό μίγμα μοριακών ειδών PAF, το οποίο εξαρτάται από την σύσταση των φωσφολιποειδών στις μεμβράνες του κυττάρου, την κατανομή του αραχιδονικού οξέος στις διάφορες τάξεις των φωσφολιποειδών καθώς και από την σχετική ταχύτητα βιοσύνθεσης και αποικοδόμησης αυτών των ενώσεων. Τα ανάλογα του PAF έχει βρεθεί ότι έχουν βιολογική δράση ενδογενούς ρυθμιστή στην δραστηριότητα του PAF [55].

3.3 Κυτταρικές πηγές PAF

Ο PAF συντίθεται και εκκρίνεται από ένα πλήθος κυττάρων, τόσο σε φυσιολογικές καταστάσεις (βασικά επίπεδα) όσο και σε απόκριση διαφόρων ερεθισμάτων. Η σύνθεση του PAF διαπιστώθηκε αρχικά σε κύτταρα θηλαστικών που συμμετέχουν σε φλεγμονώδεις και αλλεργικές διεργασίες, όπως ουδετερόφιλα, βασεόφιλα, μονοκύτταρα/μακροφάγα, αιμοπετάλια, μαστοκύτταρα, ηωσινόφιλα και ενδοθηλιακά κύτταρα. Στην συνέχεια βρέθηκε ότι τα κύτταρα των περισσότερων ιστών έχουν την ικανότητα να συνθέτουν PAF σε φυσιολογικές καταστάσεις αλλά και μετά από διέγερση. Ακόμα, ο PAF έχει βρεθεί και σε φυτικά κύτταρα, σε κατώτερους ζωικούς οργανισμούς και σε μονοκύτταρους ευκαρυωτικούς οργανισμούς. Επίσης, έχει πιστοποιηθεί η ικανότητα πολλών προκαρυωτικών οργανισμών να συνθέτουν PAF μετά από χορήγηση της πρόδρομης ένωσης του PAF του λυσο-PAF (Πίνακας 3.1). Η ευρεία παρουσία του PAF σε οργανισμούς όλης της εξελικτικής βαθμίδας υποδηλώνει τον ευρύτερο ρόλο του ως αρχέγονου βιολογικού ρυθμιστή [56].

Πίνακας 3.1 Κύτταρα που παράγουν PAF.

<i>Κύτταρο</i>	<i>Είδος</i>
Βακτήρια	Escherichia coli, Helicobacter pylori, Staphylococcus aureus, Streptococcus faecalis, Proteus mirabilis
Πρωτόζωα	Tetrahymena pyriformis, Dictyostelium discoideum
Φυτικά κύτταρα	Φράουλα, Τσουκνίδα
Ζυμομύκητες	Saccharomyces cerevisiae
Κύτταρα ασπόνδυλων οργανισμών	Incilaria bilineata (σαλιγκάρι), Eisenia foetida
Κύτταρα κατώτερων σπονδυλωτών	Salmo gairdneri (σολομός)
Κύτταρα θηλαστικών	
αιμοπετάλια, λευκοκύτταρα, μαστοκύτταρα, λεμφοκύτταρα	Ανθρώπου, επίμυος, κουνελιού, ινδικού χοιριδίου κ.α.
Ενδοθηλιακά κύτταρα	Ανθρώπου, ποντικού, κουνελιού κ.α.
Νευρώνες, εγκεφαλικά κύτταρα	Ανθρώπου, επίμυος, κουνελιού
Μυοκύτταρα καρδιάς	Επίμυος
Ηπατικά κύτταρα Kupffer	Επίμυος
Σπερματοζώαρια	Ανθρώπου, κουνελιού, βοδιού
Εμβρυϊκά κύτταρα	Ανθρώπου, ποντικού, κουνελιού
HaCaT κυτταρική σειρά κερατινοκυττάρων	Ανθρώπου
Νεφρικά κύτταρα	Ανθρώπου, επίμυος κ.α.

3.4 Δράσεις του PAF [57,58,59]

Ο PAF που παράγεται από τα κύτταρα μπορεί:

- Να εκκριθεί από τα κύτταρα και να δράσει, είτε αυτοκρινώς πάνω στα κύτταρα από τα οποία παράχθηκε, είτε παρακρινικά ενεργοποιώντας γειτονικά κύτταρα του ίδιου ή διαφορετικού είδους.
- Να συντεθεί από τα κύτταρα και να ενσωματωθεί στην πλασματική τους μεμβράνη δρώντας από εκεί ως διακυτταρικός μεσολαβητής ενεργοποιώντας γειτονικά κύτταρα.
- Να παραμείνει στα κύτταρα από τα οποία συντίθεται και να δράσει ως ενδοκυτταρικός μεσολαβητής.
- Να μεταβολιστεί άμεσα.

Το ποσό του PAF που παράγεται και εκκρίνεται από τα κύτταρα εξαρτάται τόσο από το είδος του κυττάρου, όσο και από τις συνθήκες ενεργοποίησης του. Τα ανθρώπινα λευκοκύτταρα μπορούν να εκκρίνουν 0 έως 60% του νεοσυντιθέμενου PAF ανάλογα το εξωτερικό ερέθισμα και τις συνθήκες ενεργοποίησης. Αντίθετα, τα ενδοθηλιακά κύτταρα εκκρίνουν από λίγο έως καθόλου PAF ανεξαρτήτως ερεθίσματος¹²¹⁻¹²².

Στα ενδοθηλιακά κύτταρα ο PAF δεν εκκρίνεται αλλά μετά την σύνθεση του μπορεί να βρεθεί στην εξωτερική πλευρά της πλασματικής μεμβράνης και από εκεί να δράσει ως διακυτταρικός μεσολαβητής. Με αυτόν τον τρόπο ο παραγόμενος από τα ενδοθηλιακά κύτταρα PAF μπορεί να ενεργοποιήσει τα ουδετερόφιλα, ενώ με παρόμοιο μηχανισμό ο PAF των ουδετεροφίλων μπορεί να ενεργοποιήσει την προσκόλληση αιμοπεταλίων σε αυτά δρώντας από την επιφάνειά τους.

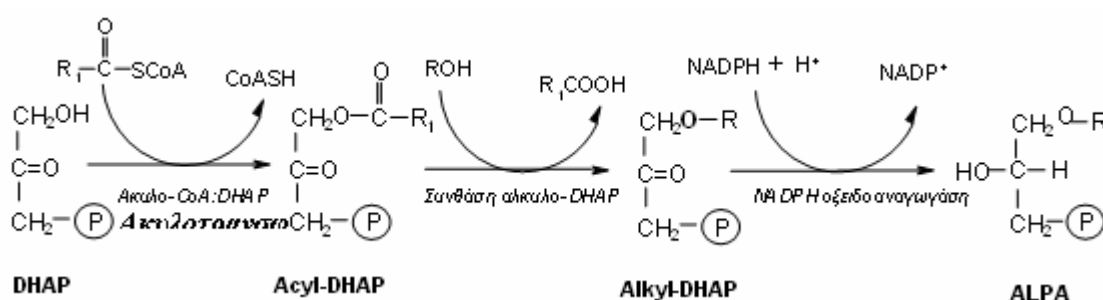
Πίνακας 3.2 Δράσεις του PAF σε κύτταρα και απομονωμένους ιστούς.

<i>Είδος κυττάρου/ιστού</i>	<i>Δράσεις</i>
<i>Αιμοπετάλια</i>	Αποκοκκίωση, αλλαγή σχήματος, συσσώρευση, έκκριση εικοσανοειδών
<i>Ουδετερόφιλα</i>	Αποκοκκίωση, συσσώρευση, χημειοταξία, παραγωγή υπεροξειδίων, αύξηση προσκολλητικής ικανότητας, έκκριση εικοσανοειδών
<i>Μονοκύτταρα/Μακροφάγα</i>	Συσσώρευση, σύνθεση εικοσανοειδών, παραγωγή υπεροξειδίων, παραγωγή IL-1, έκκριση λυσοσωμιακών ενζύμων
<i>Ηωσινόφιλα</i>	Χημειοταξία, έκκριση κατιοντικών πρωτεϊνών, αύξηση κυτταροτοξικότητας, σύνθεση LTC ₄ , παραγωγή υπεροξειδίων, μετανάστευση διαμέσου των επιθηλιακών κυττάρων, σύνθεση IL-8, πολυμερισμός ακτίνης
<i>Λεμφοκύτταρα</i>	Βλαστική τροποποίηση, καταστολή παραγωγής IL-2
<i>Ενδοθηλιακά</i>	Ανακατανομή κυτταροσκελετού και αλλαγή σχήματος, σύνθεση εικοσανοειδών, μετανάστευση, αύξηση της προσκολλητικής τους ικανότητα με τα ουδετερόφιλα
<i>Νευρώνες</i>	Αύξηση ενδοκυτταρικού Ca ²⁺ , ενεργοποίηση του κύκλου της φωσφατιδυλοϊνοσιτόλης, ενεργοποίηση της έκφρασης των πρωτοογκογονιδίων c-fos και c-jun, έκκριση προλακτίνης
<i>Σπερματοζωάρια</i>	Αύξηση κινητικότητας, διεισδυτικότητας στον τράχηλο της μήτρας
<i>Πρωτόζωα</i>	Σύνθεση εικοσανοειδών, αύξηση γλυκογονόλυσης, μεταβολή στην σύσταση των λιποειδών
<i>Φυτικά κύτταρα</i>	Ρύθμιση δραστηριότητας H ⁺ ATPασών, επίδραση στο φωτοσύστημα II των θυλακοειδών
<i>Ήπαρ</i>	Αύξηση γλυκογονόλυσης, μεταβατική αύξηση στην πίεση της πυλαίας φλέβας, αύξηση έκκρισης γαλακτικού και οξαλοξικού οξέος
<i>Πνεύμονας</i>	Μείωση της επιφάνειας των τριχοειδών, σύσπαση απομονωμένου πνευμονικού ιστού και μείωση της διατασιμότητας του, αγγειοσύσπαση, πνευμονικό οίδημα
<i>Καρδιά</i>	Μείωση της συσταλτικής ικανότητας της κοιλίας, σύσπαση των στεφανιαίων, μείωση της ροής αίματος, πρόκληση αρρυθμιών
<i>Έντερο</i>	Σύσπαση, ισχαιμική νέκρωση

3.5.Μεταβολισμός PAF – Ένζυμα μεταβολισμού [60,61,62]

3.5.1 Σχηματισμός αιθερικού δεσμού στα γλυκερινούχα φωσφολιποειδή

Ο αιθερικός δεσμός στα γλυκερινούχα φωσφολιποειδή σχηματίζεται με πορεία τριών σταδίων: 1) μετατροπή της φωσφοδιϋδροξυακετόνης (DHAP), η οποία προέρχεται από την γλυκολυτική πορεία, σε 1-ακυλοφωσφοδιϋδροξυακετόνη (ακυλο-DHAP) με την δράση του ενζύμου ακυλο-CoA:DHAP ακυλοτρανσφεράση, 2) αντικατάσταση της ακυλο-ομάδας της ακυλο-DHAP από μία αλειφατική ανθρακική αλυσίδα μίας λιπαρής αλκοόλης, η οποία ενώνεται με αιθερικό δεσμό στην DHAP, προς σχηματισμό της 1-αλκυλοφωσφοδιϋδροξυακετόνης (αλκυλο-DHAP) με τη δράση της συνθάσης της αλκυλο-DHAP, 3) αναγωγή της αλκυλο-DHAP από μία NADPH εξαρτώμενη οξειδοαναγωγή προς 1-O-αλκυλο-2-λυσσο-sn-γλυκερυλο-3-φωσφορικό οξύ (ALPA). Το ALPA είναι το ενδιάμεσο προϊόν από το οποίο μπορούν να σχηματιστούν, είτε τα κλασσικά γλυκεριναιθερικά φωσφολιποειδή των μεμβρανών, είτε ο PAF.



Σχήμα 3.2 Πορεία σχηματισμού αιθερικού δεσμού στα γλυκεριναιθερικά λιποειδή.

3.5.2 Μεταβολικές πορείες βιοσύνθεσης PAF

Ο PAF μπορεί να συντεθεί από δύο διαφορετικές ενζυματικές πορείες. Αυτές είναι η πορεία ανασχηματισμού ή αλλιώς remodeling και η *de novo* πορεία βιοσύνθεσης.

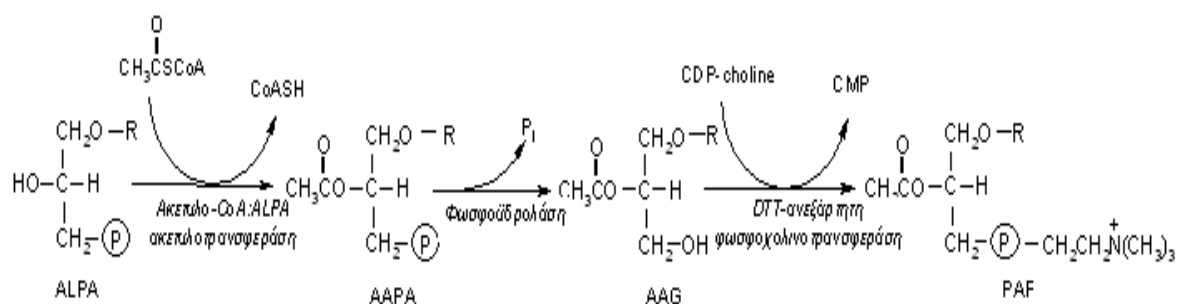
Όλα τα ένζυμα της *de novo* πορείας είναι μεμβρανικά και διαφέρουν στα βιοχημικά χαρακτηριστικά τους από τα αντίστοιχα ένζυμα που είναι υπεύθυνα για την *de novo* σύνθεση των άλλων μεμβρανικών γλυκεριναιθερικών φωσφολιποειδών. Η *de novo* πορεία

βιοσύνθεσης του PAF δεν ενεργοποιείται από φλεγμονώδη ερεθίσματα και είναι υπεύθυνη για την συνεχή, σταθερή παραγωγή PAF από τα κύτταρα με σκοπό τη διατήρηση των φυσιολογικών επιπέδων του στο αίμα και στους ιστούς .

Η πορεία ανασχηματισμού, που είναι η πρώτη πορεία βιοσύνθεσης του PAF που περιγράφηκε, ενεργοποιείται σε απόκριση φλεγμονωδών και αλλεργικών ερεθισμάτων με σκοπό την άμεση παραγωγή του από τα κύτταρα. Η βιοσύνθεση του PAF μέσω της remodeling πορείας περιλαμβάνει την μετατροπή γλυκεριναιθερικών φωσφολιποειδών, που προϋπάρχουν στις μεμβράνες των κυττάρων, σε PAF.

De novo πορεία βιοσύνθεσης PAF

Στην *de novo* πορεία λαμβάνουν χώρα οι εξής αντιδράσεις: α) μεταφορά μίας ακετυλομάδας από το ακέτυλο-CoA στο ALPA προς σχηματισμό του 1-O-αλκυλο-2-ακετυλο-sn-γλυκερυλο-3-φωσφορικού οξέος (AAPA). Η αντίδραση καταλύεται από το ένζυμο ακετυλο-CoA:ALPA ακετυλοτρανσφεράση (*de novo AT*), β) απόσπαση της φωσφορικής ομάδας του AAPA με δράση μίας φωσφοϋδρολάσης, που υδρολύει την φωσφορική ομάδα και μετατρέπει το AAPA σε AAG, γ) μεταφορά μιας ομάδας φωσφορυλοχολίνης με την μορφή κιτυδιλο-διφωσφορικής χολίνης (CDP-choline) στην sn-3 θέση του γλυκερινικού σκελετού με τη δράση μίας DTT ανεξάρτητης φωσφοχολινοτρανσφεράσης προς σχηματισμό του PAF (Σχήμα 3.3)

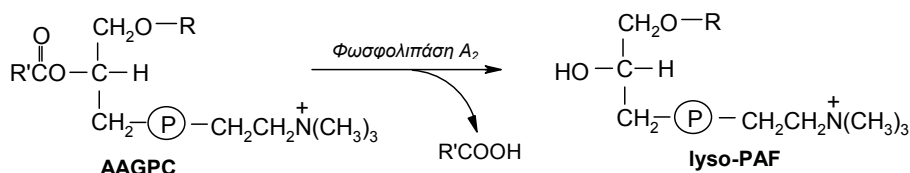


Σχήμα 3.3 De novo πορεία βιοσύνθεσης του PAF

Remodeling πορεία βιοσύνθεσης του PAF

Όπως δηλώνει και το όνομά της, η remodeling πορεία περιλαμβάνει τη χημική τροποποίηση της δομής των προϋπαρχόντων λιποειδικών μορίων που βρίσκονται συνδεδεμένα στην κυτταρική μεμβράνη. Πρόδρομη ένωση του PAF στην *remodeling* πορεία είναι το μεμβρανικό γλυκεριναιθερικό φωσφολιποειδές 1-O-ακυλο-2-ακυλο-sn-γλυκερυλο-3-φωσφοχολίνη (AAGPC). Στην sn-2 θέση του φωσφολιποειδούς βρίσκονται εστεροποιημένα κυρίως αραχιδονικό οξύ και λιγότερο άλλα μονοακόρεστα και πολυακόρεστα οξέα. Το πρώτο στάδιο της *remodeling* πορείας περιλαμβάνει την υδρόλυση της AAGPC προς 1-O-ακυλο-2-λυσω-sn-γλυκερυλο-3-φωσφοχολίνη (λυσω-PAF). Αρχικά, η αντίδραση αυτή αποδίδονταν αποκλειστικά στην δράση μιας υποθετικής φωσφολιπάσης A₂ (PLA₂), με εξειδίκευση για αιθερικά υποστρώματα. Ωστόσο σήμερα έχει βρεθεί ότι η αντίδραση μπορεί να γίνει με δύο διαφορετικές πορείες ανάλογα το είδος του κυττάρου.

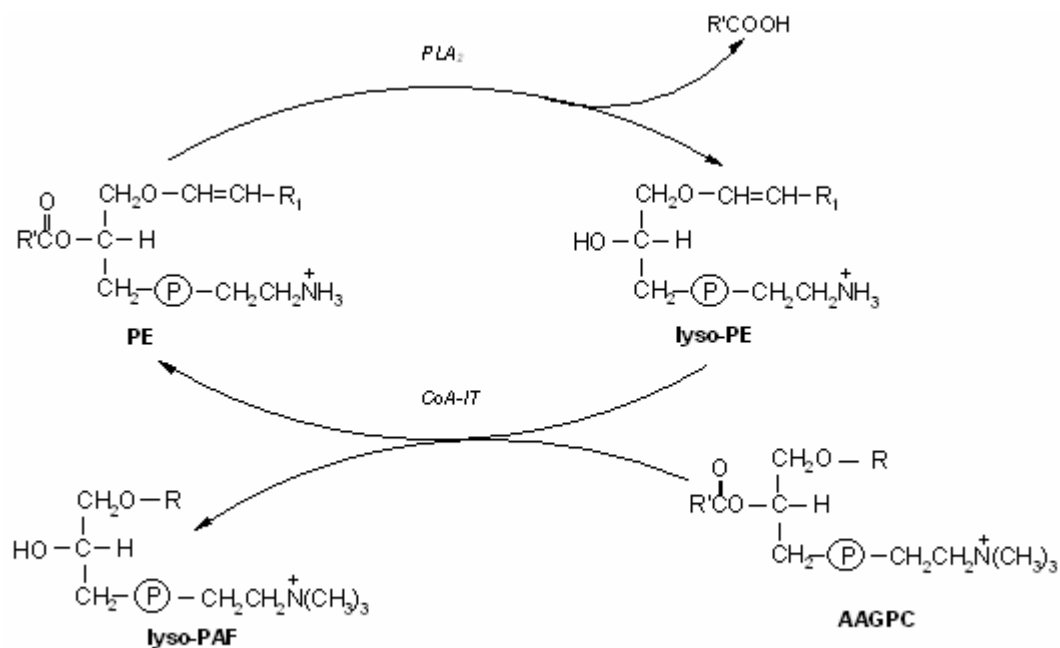
Η πρώτη πορεία περιλαμβάνει την δράση μιας PLA₂, η οποία έχει εξειδίκευση για πολυακόρεστες αλυσίδες στην sn-2 θέση του γλυκερινικού σκελετού της AAGPC αλλά δεν φαίνεται να δείχνει ιδιαίτερη εξειδίκευση για το είδος του δεσμού στην sn-1 θέση (Σχήμα 3.4). Μέχρι σήμερα δεν έχει αποδειχτεί η ύπαρξη ειδικής PLA₂, η οποία υδρολύει εξειδικευμένα την AAGPC σε λυσω-PAF. Με αυτόν το τρόπο σχηματίζεται ο λυσω-PAF σε περιτοναϊκά κύτταρα ποντικού, σε μακροφάγα αρουραίου, σε ουδετερόφιλα και ηωσινόφιλα ανθρώπου κ.α.



Σχήμα 3.4 Σχηματισμός λυσω-PAF από AAGPC με την δράση PLA₂

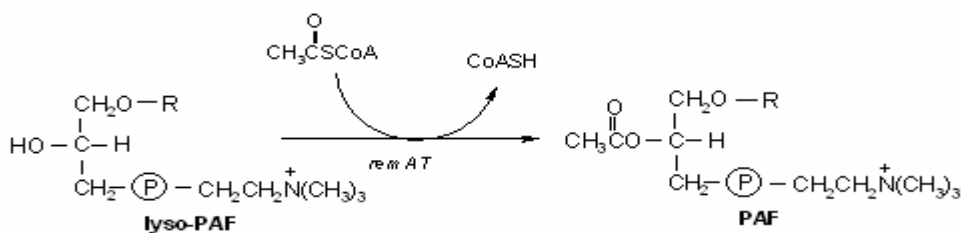
Στη δεύτερη πορεία σχηματισμού του λυσω-PAF, η οποία έχει αποδειχτεί τα τελευταία χρόνια, μια CoA-ανεξάρτητη τρανσακυλάση (CoA-IT) μεταφέρει την ακυλο-

ομάδα (κυρίως αραχιδονόυλο-) από την sn-2 θέση της AAGPC σε λυσο-πλάσμαλογόνα αιθανολαμίνης (λυσο-PE). Η λυσο-PE σχηματίζεται από PE με την δράση μιας PLA₂ ειδικής για τα πλάσμαλογόνα αιθανολαμίνης και για αραχιδονόυλο-ομάδες στην sn-2 θέση των πλάσμαλογόνων (Σχήμα 3.5). Χαρακτηριστικό της *remodeling* πορείας είναι ότι και στις δύο πορείες σχηματισμού του λυσο-PAF ελευθερώνεται αραχιδονικό οξύ, το οποίο στη συνέχεια μπορεί να μετατραπεί σε βιολογικά δραστικά εικοσανοειδή όπως προσταγλανδίνες, λευκοτριένια, κ.α.



Σχήμα 3.5 Σχηματισμός λυσο-PAF με τη δράση τρανσακυλασών

Το δεύτερο στάδιο της *remodeling* πορείας είναι η ακετυλίωση του λυσο-PAF προς PAF από το ένζυμο ακετυλο-CoA:λυσο-PAF ακετυλοτρανσφεράση (*lyso-PAF AT*). Η λυσο-PAF AT δείχνει εξειδίκευση για *αιθερικό δεσμό* στην sn-1 θέση και μεταφέρει μικρού Mr ακυλο-ομάδες (2 ή 3 ατόμων C) στην sn-2 θέση (Σχήμα 3.6).

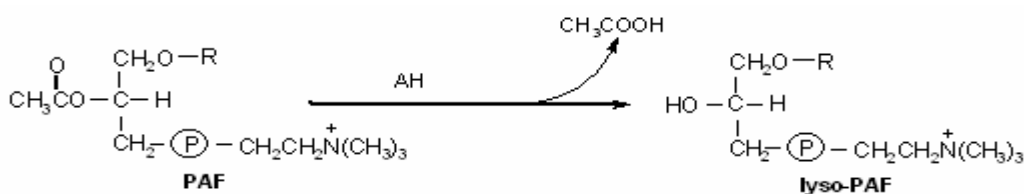


Σχήμα 3.6 Ακετυλίωση λυσο-PAF προς PAF.

3.5.3 Μεταβολικές πορείες αποικοδόμησης του PAF

Το πρώτο και σημαντικότερο στάδιο αποικοδόμησης του PAF είναι η υδρόλυση της ακετυλομάδας από την sn-2 θέση του γλυκερινικού σκελετού, η οποία οδηγεί στον σχηματισμό του βιολογικά ανενεργού λυσο-PAF. Η αντίδραση υδρόλυσης της ακετυλομάδας μπορεί να επιτευχθεί με τους εξής τρόπους :

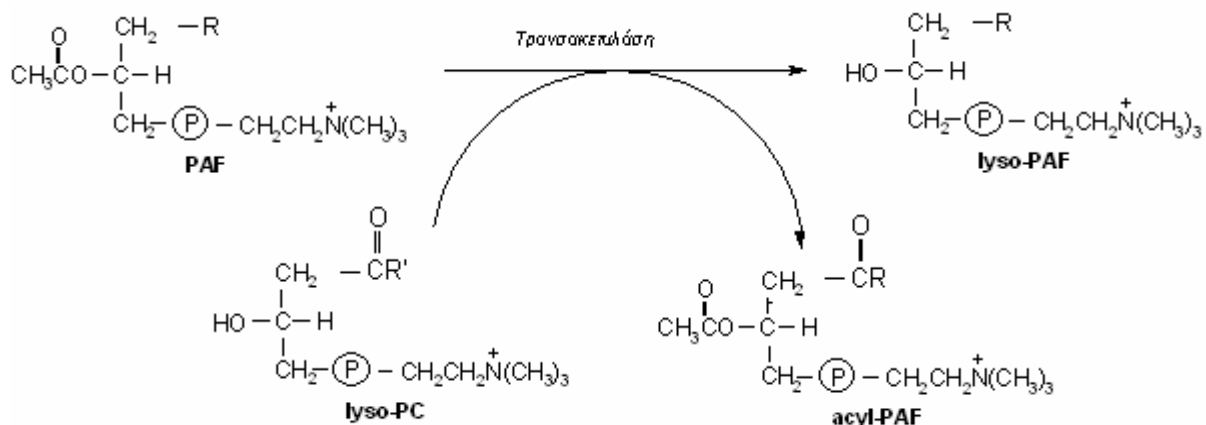
α) Με την δράση της PAF ακετυλοϋδρολάσης (PAF-AH), μίας Ca^{2+} -ανεξάρτητης PLA_2 που δείχνει εξειδίκευση για μικρού Mr (2 ή 3 ατόμων C) και οξειδωμένα λιπαρά οξέα στην sn-2 θέση του γλυκερινικού σκελετού (Σχήμα 3.7). Έχουν βρεθεί τόσο εξωκυτταρικές όσο και ενδοκυτταρικές ισομορφές του ενζύμου που παίζουν σημαντικό ρόλο στην ρύθμιση της βιολογικής δραστηριότητας του PAF



Σχήμα 3.7 Υδρόλυση του PAF από την AH.

β) Με τη δράση τρανσακετυλασών που μεταφέρουν την ακετυλομάδα σε άλλα λιποειδικά υποστρώματα με ελεύθερο υδροξύλιο όπως λυσο-πλασμαλογόνα, λυσο-φωσφατιδυλογολίνη (Σχήμα 3.8), λιπαρές αλκοόλες, σφινγγοσίνη κ.α. Μέσω αυτής της αντίδρασης σχηματίζονται ακετυλιωμένα μόρια στα οποία έχουν αποδοθεί σημαντικές βιολογικές δράσεις τα τελευταία

χρόνια. Ενζυμική δραστηριότητα τρανσακετυλάσης έχει βρεθεί σε HL-60 κύτταρα, σε ενδοθηλιακά κύτταρα καθώς και σε κλάσματα LDL ανθρώπινου πλάσματος.

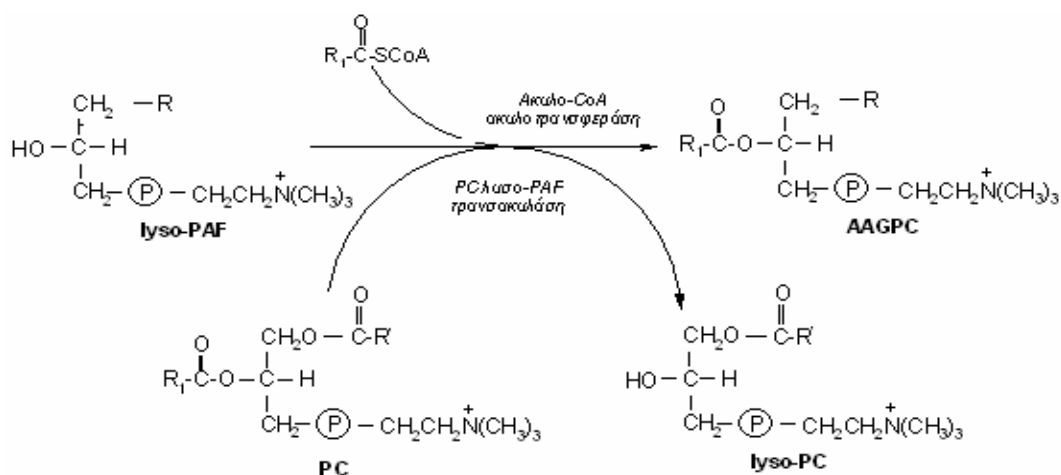


Σχήμα 3.8 Υδρόλυση PAF από τρανσακετυλάσες.

γ) Με τη δράση της λεκιθίνη:χοληστερόλη ακυλοτρανσφεράσης (LCAT), η οποία μπορεί να μεταφέρει την ακετυλομάδα σε λυσο-PC στο πλάσμα ανθρώπου. Βιοχημικές μελέτες έχουν δείξει ότι η τρανσακετυλάση και η LCAT αποτελούν διαφορετικά ένζυμα.

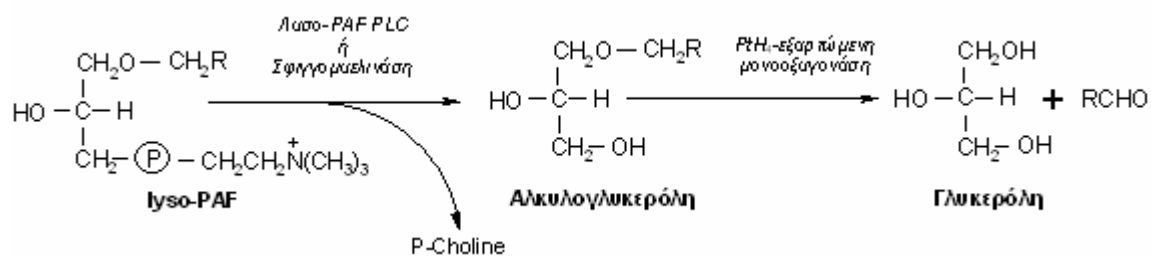
Ενδοκυτταρικά, ο λυσο-PAF είναι ιδιαίτερα κυτταροτοξικός λόγω των απορρυπαντικών ιδιοτήτων του γι' αυτό είτε εκκρίνεται στον εξωκυτταρικό χώρο, είτε μεταβολίζεται περαιτέρω στο εσωτερικό του κυττάρου. Η μεταβολική τύχη του λυσο-PAF εξαρτάται από το είδος του κυττάρου και μπορεί να είναι η εξής :

α) Μπορεί να επανακυλιωθεί προς AAGPC, το οποίο στην συνέχεια ενσωματώνεται στις μεμβράνες των κυττάρων. Η ακυλίωση μπορεί να γίνει είτε από ακυλο-CoA ακυλοτρανσφεράσες, είτε από τρανσακυλάσες που μεταφέρουν ακόρεστα λιπαρά οξέα, κυρίως αραχιδονικό οξύ, από την PC στον λυσο-PAF (Σχήμα 3.9). Η μετατροπή του PAF σε AAGPC είναι ο συνηθέστερος τρόπος αποικοδόμησης του στα περισσότερα κύτταρα, κυρίως στα λευκοκύτταρα και στα αιμοπετάλια.



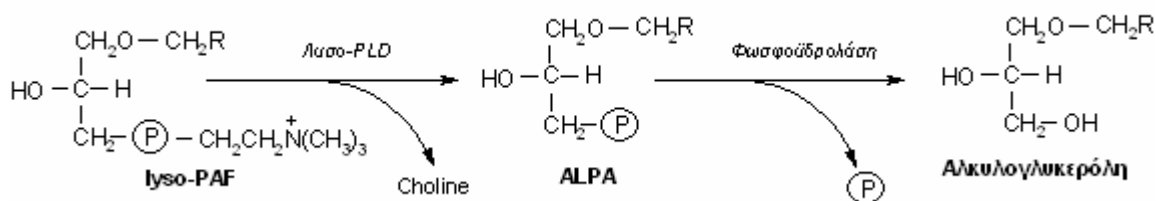
Σχήμα 3.9 Ακυλίωση του λυσο-PAF προς 1-Ο-αλκυλο-2-ακυλο-sn-γλυκερυλο-3-φωσφοχολίνη.

β) Μπορεί να μεταβολιστεί από λυσο-φωσφολιπάση C σε αλκυλογλυκερόλη, η οποία είναι δυνατόν στη συνέχεια να διασπαστεί περαιτέρω σε γλυκερόλη και λιπαρή αλδεύδη από την τετραϋδροπτερίδινη-εξαρτώμενη μονοοξυγονάση (Σχήμα 3.10). Η πορεία αυτή έχει αποδειχτεί σε ηπατοκύτταρα αρουραίου. Επίσης, έχει βρεθεί ότι κλωνοποιημένη ουδέτερη σφιγγομυελινάση μπορεί να λειτουργήσει και ως λυσο-PAF PLC στα κύτταρα



Σχήμα 3.10 Υδρόλυση λυσο-PAF προς γλυκερόλη.

γ) Μπορεί να υδρολυθεί από μία λυσο-PLD σε ALPA, το οποίο στη συνέχεια μπορεί να μετατραπεί σε AAG με την δράση μίας φωσφοϋδρολάσης (Σχήμα 3.11). Η πορεία αυτή αποκωδόμησης του λυσο-PAF έχει βρεθεί σε μυοκύτταρα αρουραίου, σε επιθηλιακά κύτταρα εντέρου αρουραίου και σε πλάσμα κουνελιού.



Σχήμα 3.11 Υδρόλυση λυσο-PAF από PLD.

δ) Ο αιθερικός δεσμός του λυσο-PAF μπορεί να διασπαστεί από την τετραϋδροπτερίδινη-εξαρτώμενη μονοοξυγονάση προς λιπαρές αλδεϋδες. Η μονοοξυγονάση διασπά τον αιθερικό δεσμό στα γλυκεριναιθερικά λιποειδή και για να δράσει απαιτεί τουλάχιστον ένα ελεύθερο υδροξύλιο.

3.5.4 Ακετυλο-CoA:1-O-αλκυλο-2-λυσο-sn-γλυκερύλοφωσφοχολίνη ακετυλοτρανσφεράση, lyso PAF AT[61,63]

Η *lyso-PAF AT* καταλύει το τελευταίο στάδιο της *remodeling* πορείας που είναι η ακετυλίωση του λυσο-PAF προς PAF (Σχήμα 3.6). Εντοπίζεται στο μικροσωμιακό κλάσμα σχεδόν όλων των ιστών και των κυττάρων που παράγουν PAF, ενώ έχει βρεθεί και σε μικροσώματα σκουληκιών και μαλακίων. Πειράματα υποκυτταρικής κατανομής του ενζύμου έχουν δείξει ότι η *lyso-PAF AT* κατανέμεται στις πλασματικές μεμβράνες, στο ER και στα τεταρτοταγή κοκκία ανθρώπινων ουδετερόφιλων και HL-60 κυττάρων, ενώ σε φλοιό εγκεφάλου αρουραίου και κουνελιού εντοπίζεται στην πυρηνική μεμβράνη και στον πυρηνικό φάκελο.

Το ένζυμο παρουσιάζει σχετικά ευρεία εξειδίκευση όσον αφορά τα λιποειδικά υποστρώματα αφού μπορεί να ακετυλιώσει αιθερικά και εστερικά ανάλογα PAF καθώς και ανάλογα με σκελετό αιθανολαμίνης. Επίσης, μικρού Mr ακυλο-CoA (C₂-C₆) αποτελούν υποστρώματα για την *lyso-PAF AT*. Μελέτες εξειδίκευσης του ενζύμου ως προς τα διάφορα λιποειδικά υποστρώματα έχουν δείξει ότι η σειρά προτίμησης της *lyso-PAF AT* είναι: αλκυλο-λυσο-PAF > ακυλο-λυσο-PAF > αλκενυλο-λυσο-PAF > αλκυλο-λυσοφωσφατιδυλοαιθανολαμίνη > ακυλο-λυσο-φωσφατιδυλοαιθανολαμίνη. Τα λιποειδή

ακυλο -λυσω-φωσφατιδυλοσερίνη, αλκυλο-λυσω-φωσφατιδυλοϊνδοσιτόλη και ακυλο-λυσω-φωσφατιδικό οξύ δεν αποτελούν υποστρώματα για την *lyso-PAF AT*, ενώ μεγάλου Mr ακυλο-CoA, όπως παλμιτοϋλο-CoA, ελαϋλό-CoA, αραχιδονοϋλό-CoA είναι συναγωνιστικοί αναστολείς του ενζύμου. Το ένζυμο προτιμά ως υπόστρωμα τον C_{16:0}-λυσω-PAF από τον C_{18:0}-λυσω-PAF. Το ακετυλο-CoA δεν συναγωνίζεται το ακυλο-CoA στο ενζυμικό προσδιορισμό της ακυλο-CoA ακυλοτρανσφεράσης, ενώ η ακετυλοτρανσφεράση είναι πιο ευαίσθητη σε απορρυπαντικά και στην θερμική απενεργοποίηση. Τα παραπάνω αποτελέσματα διαχωρίζουν την δραστηριότητα της ακυλοτρανσφεράσης από αυτή της ακετυλοτρανσφεράσης.

Το ένζυμο έχει ασβέστιο-εξαρτώμενη δραστηριότητα, με βέλτιστο pH περίπου 7,4 και αναστέλλεται από φυσικά παραγόμενες ενώσεις όπως ακυλο-CoA, αραχιδονικό οξύ, ελαϊκό οξύ, λυσω-PC, από μη ειδικούς αναστολείς όπως τα χηλικά αντιδραστήρια EDTA, EGTA, Ca²⁺, Mg²⁺, Mn²⁺, DIFP καθώς και από συνθετικές ενώσεις που αντιδρούν με -SH ομάδες πάνω στο ένζυμο και δεν επηρεάζεται από το φθορίδιο phenylmethylsulfonyl (PMSF) ή diisopropylphosphorofluoridate (DIPF). Τα φλαβονοειδή luteolin, κερκετίνη και το αντιφλεγμονώδες σουλφασαλαζίνη εμποδίζουν τη δράση της ακετυλοτρανσφεράσης *in vitro*. Η ασπιρίνη και τριφλουπεραζίνη εμποδίζουν επίσης τη δραστηριότητα ακετυλοτρανσφερασών αν και η ασπιρίνη μπορεί επίσης μη-ενζυματικά να ακετυλιώσει το λυσω-PAF *in vitro*.

Το ένζυμο υφίσταται ομοιοπολική ρύθμιση της δραστηριότητας τους μέσω φωσφορυλίωσης-αποφωσφορυλίωσης όπως έχουν δείξει μελέτες σε σπλήνα αρουραίου, ανθρώπινα ουδετερόφιλα, παρωτιδικούς αδένες ινδικού χοιριδίου και μαστοκύτταρα ποντικού. Το ένζυμο είναι ενεργό φωσφορυλιωμένο και απενεργοποιείται με αποφωσφορυλίωση. Καταλυτικές υπομονάδες της cAMP-εξαρτώμενης PK και της Ca/καλμοδουλίνης-εξαρτώμενης PK ενεργοποιούν την rem AT *in vitro*. Αντιθέτως, η rem AT από νευρώνες κουνελιού είναι ευαίσθητη σε πυρηνικές και κυτοσολικές φωσφατάσες, ενώ αναστολείς φωσφατασών επιμηκύνουν την ενεργοποίηση της *lyso-PAF AT* σε ανθρώπινα EC. Σε πειράματα φωσφορυλίωσης που έχουν γίνει σε μερικώς καθαρισμένο ένζυμο, έχει βρεθεί ότι ένα κατάλοιπο σερίνης φωσφορυλιώνεται. Επίσης, στους μηχανισμούς ενεργοποίησης της φαίνεται ότι συμμετέχει και η PKC αφού φορβολικοί εστέρες και η AAG ενεργοποιούν το ένζυμο, ενώ η σφιγγοσίνη το αναστέλλει.

Αν και διάφορες ομάδες έχουν προσπαθήσει να προσδιορίσουν και να χαρακτηρίσουν το ένζυμο από τις διάφορες πηγές, το ένζυμο δεν έχει καθαριστεί ακόμα. Εντούτοις, η

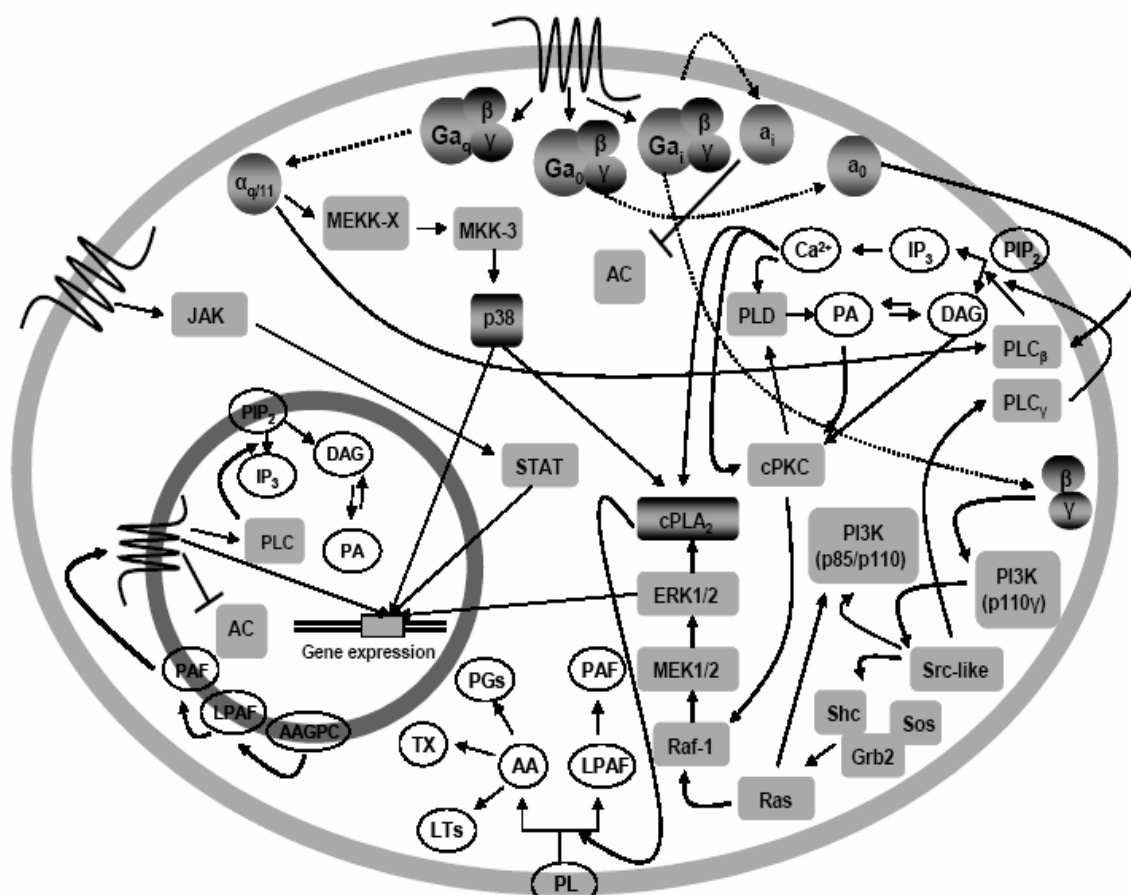
κλωνοποίηση του ενζύμου αναφέρθηκε πρόσφατα [64] και έδειξε ότι το ένζυμο διαθέτει και δραστηριότητα lyso-PC ακυλοτρανσφεράσης ρυθμίζοντας με αυτόν τον τρόπο την σύσταση των μεμβρανών των κυττάρων.

3.6 Υποδοχείς του PAF [57, 65]

Ο PAF ασκεί τις δράσεις του αυτοκρινικά ή παρακρινικά μέσω της σύνδεσής του σε καλά χαρακτηρισμένο G-πρωτεϊνικό υποδοχέα συνδεδεμένο στη πλασματική μεμβράνη των κυττάρων. Οι ενδοκυτταρικές ενέργειες ασκούνται μέσω της σύνδεσής του στους πυρηνικούς υποδοχείς. Η αλληλεπίδραση του PAF με το υποδοχέα του (PAFR) αρχίζει με ένα μονοπάτι διαφορετικών ενδοκυτταρικών πορειών μεταγωγής σήματος, οι οποίες μεταφράζουν το μήνυμα του μεσολαβητή στην τελική κυτταρική απάντηση. Οι πορείες μεταγωγής σήματος που ενεργοποιούνται από τον PAF εξαρτώνται από το είδος του κυττάρου και ρυθμίζονται από διάφορους μηχανισμούς. Αυτοί περιλαμβάνουν την ομοιοπολική τροποποίηση και την εσωτερική του PAFR, τη διαμόρφωση της έκφρασης των γονιδίων του PAFR και τη δεσμευτική δυνατότητα μαζί με τον ακριβή καθορισμό των πορειών μεταγωγής σημάτων από έναν μεγάλο αριθμό ενδοκυτταρικών και εξωκυτταρικών διαμορφωτών.

3.7 Πορείες μεταγωγής σήματος που ενεργοποιούνται από τον PAF [62]

Η σύνδεση του PAF στον υποδοχέα του προκαλεί την ενεργοποίηση πορειών στο εσωτερικό του κυττάρου που οδηγούν στον σχηματισμό ή στην αύξηση της συγκέντρωσης ενδοκυτταρικών μηνυματοφόρων μορίων όπως Ca^{2+} , cAMP, 1,4,5-τριφωσφορική ινοσιτόλη (IP_3), διακυλογλυκερόλη (DAG), αραχιδονικό οξύ, τα οποία με την σειρά τους προκαλούν την τελική απόκριση του κυττάρου. Στην ενεργοποίηση αυτών των μηχανισμών μεσολαβούν G πρωτεΐνες, οι οποίες είναι συζευγμένες με τον υποδοχέα του PAF. Το είδος του μηχανισμού μεταγωγής σήματος εξαρτάται από το είδος του κυττάρου και βρίσκεται υπό αυστηρή ρύθμιση ενώ πολλές φορές η σύνδεση του PAF στον υποδοχέα του ενεργοποιεί παραπάνω από ένα μηχανισμούς που αλληλεπιδρούν μεταξύ τους. Οι σημαντικότεροι μηχανισμοί μεταγωγής σήματος, που επάγονται από τον PAF, φαίνονται στο παρακάτω σχήμα.



Σχήμα 3.12 Σχηματική αναπαράσταση των κυριότερων μηχανισμών μεταγωγής σήματος που επάγονται από τον PAF.

3.8 Εμπλοκή του PAF σε παθολογικές καταστάσεις [57,66]

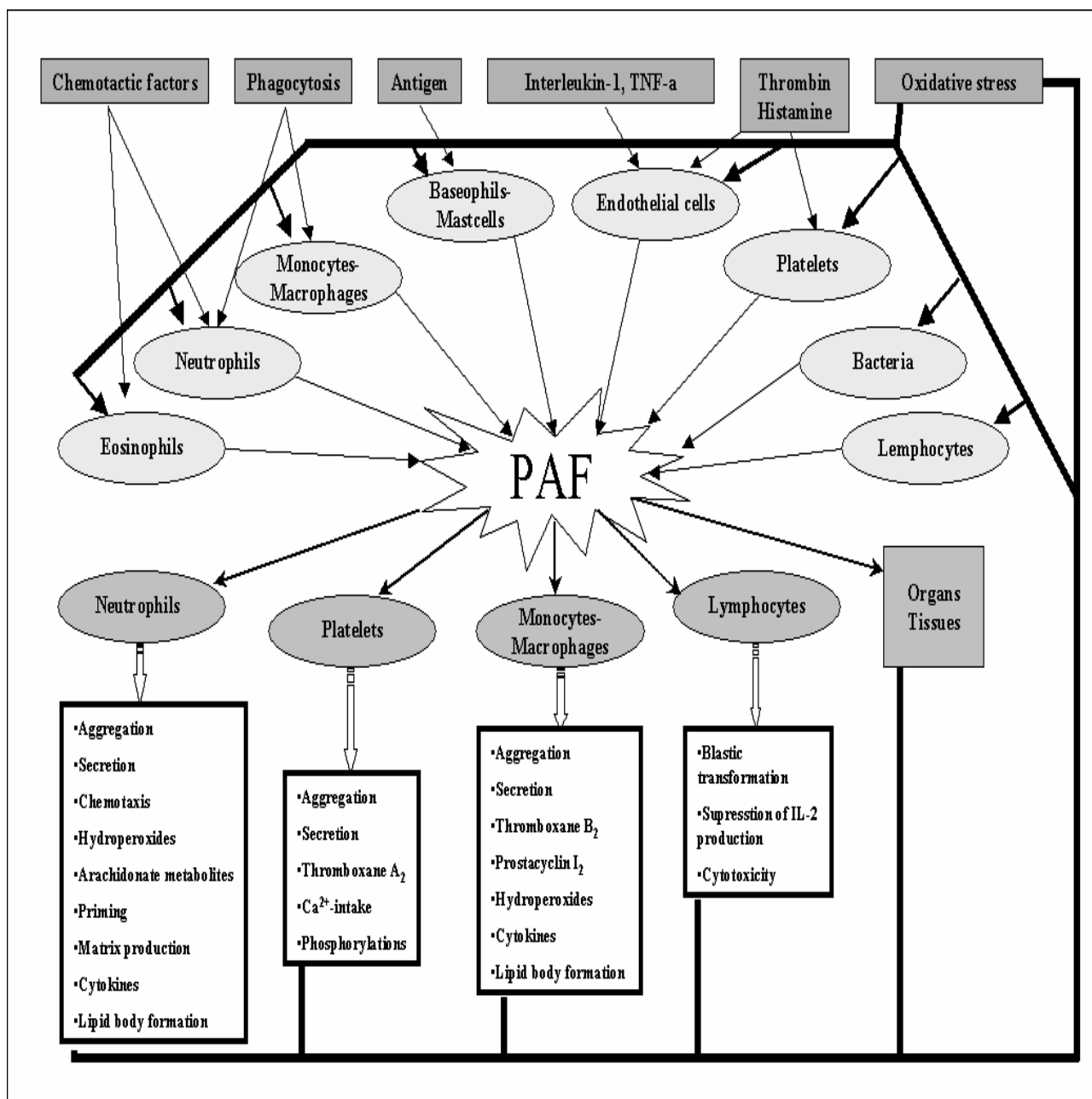
Ο PAF συμμετέχει σε διάφορους παθοφυσιολογικές καταστάσεις ασκώντας διάφορες δράσεις σε κύτταρα και ιστούς. Αυτή η ποικιλομορφία προέρχεται από το γεγονός ότι ένας μεγάλος αριθμός ερεθισμάτων, κυρίως θρομβωτικά και φλεγμονώδη, ενεργοποιούν τις βιοσυνθετικές πορείες του. Κατ' αυτό τον τρόπο, ο PAF αποτελεί έναν μεσολαβητή που ενοποιεί πολλαπλά μοριακά σήματα. Ο μεγάλος αριθμός των δράσεων του PAF εξαρτάται επίσης και από την ευρεία έκφραση του υποδοχέα του σε πολλά και διαφορετικά είδη κυττάρων.

Ο PAF είναι ένας φυσιολογικός μεσολαβητής της φλεγμονής, της αναπαραγωγής, της μνήμης, του αγγειακού τόνου, της απόπτωσης και της αγγειογένεσης. Το ακατάλληλο σήμα

του PAF αποτρέπεται από την PAF AH, που αναστέλλει (αποικοδομεί) τη δραστηριότητα του PAF,

καθώς επίσης και από τους συγκεκριμένους ανασταλτικούς παράγοντες του PAF που εμποδίζουν τις ενέργειές του. Όταν αυτές οι πορείες αδρανοποίησης αποσύρονται, ο PAF προσδένεται στον υποδοχέα του και οδηγεί σε καταστάσεις που συνδέονται με πολλές ασθένειες, όπως η αλλεργία, το άσθμα, αθηροσκλήρωση, ο διαβήτης, οι νεφρικές ασθένειες, ο καρκίνος, η παθογένεση HIV και η περιοδοντίτιδα . Σε αυτές τις ασθένειες η φλεγμονή είναι το κύριο χαρακτηριστικό γνώρισμα.

In vitro πειράματα, μελέτες σε ζωικά πρότυπα και κλινικές παρατηρήσεις στους ανθρώπους έχουν δείξει ότι η παρεμπόδιση ή λήξη των ενεργειών του PAF έχει ευεργετικά αποτελέσματα προς τις φλεγμονώδεις καταστάσεις. Οι μηχανισμοί φλεγμονής που σχετίζονται με το PAF ρυθμίζονται από α) τη ρύθμιση του μεταβολισμού του β) την ειδική κυτταρική έκφραση του υποδοχέα του PAF και γ) την απευαισθητοποίηση του υποδοχέα του PAF. Οι κύριες βιολογικές απαντήσεις των κυττάρων και των ιστών στις δράσεις του PAF παρουσιάζεται στο σχήμα 3.13, ενώ οι σημαντικότερες παθοφυσιολογικές καταστάσεις στις οποίες εμπλέκεται φαίνονται στον πίνακα 3.3.



Σχήμα 3. 13. Οι κύριες κυτταρικές και ιστικές βιολογικές απαντήσεις από τον PAF.

Πίνακας 3.3 PAF και παθοφυσιολογικές καταστάσεις [58,59]

Βρογχόσπασμος

Θρομβοπενία, ουδετεροπενία, βασηοφιλοπενία

Σηπτικό σοκ

Μεσολαβητής του σηπτικού σοκ που επάγεται από βακτηριακές λοιμώξεις και χορήγηση ενδοτοξίνης

Αναφυλακτικές αντιδράσεις

α) *Στον αναπνευστικό*: Μείωση αναπνευστικής συχνότητας, βρογχόσπασμο, αύξηση πνευμονικών αντιστάσεων, αύξηση της ενδοτικότητας του πνεύμονα, αύξηση της πίεσης στις πνευμονικές αρτηρίες με αποτέλεσμα πρόκληση πνευμονικού οιδήματος. Μεσολαβητής του άσθματος

β) *Στο κυκλοφοριακό*: Μείωση της συστολικής και διαστολικής πίεσης, αύξηση της κεντρικής φλεβικής πίεσης, αύξηση της πίεσης στο δεξιό κόλπο, μείωση της τελοδιαστολικής πίεσης

Επίδραση στο καρδιαγγειακό σύστημα

Αρνητική ινότροπη δράση, μείωση της μέσης αρτηριακής πίεσης (υπόταση), μείωση του κατά λεπτό όγκου αίματος, μείωση των περιφερειακών αντιστάσεων

Καρδιακή ισχαιμία και κοιλιακές αρρυθμίες

Συμμετέχει στην παθογένεια της αρτηριοσκλήρυνσης

Επίδραση στο πεπτικό σύστημα

Βλάβη γαστρικού βλεννογόνου, ισχαιμική νέκρωση εντέρου, μορφολογικές αλλοιώσεις στην άνω παγκρεατοδωδεκαδακτυλική αρτηρία

Συμμετοχή στην παθογένεια του πεπτικού έλκους και της παγκρεατίτιδας

Επίδραση στο σύστημα αναπαραγωγής

Συμμετοχή στην κινητοποίηση του σπέρματος, στην ωορρηξία, στην εμφύτευση του ωαρίου στη μήτρα και στην υπέρταση της εγκυμοσύνης

Συμμετοχή στην έναρξη και διατήρηση του τοκετού

Επίδραση στην εγκεφαλική λειτουργία

Μεσολαβητής της εγκεφαλικής ισχαιμίας και του τραυματισμού των νευρώνων σε ισχαιμικές καταστάσεις

Ενεργοποίηση του άξονα υποθάλαμος-υπόφυση-επινεφρίδια και έκκριση ορμονών, ρυθμίζει τα επίπεδα των νευροπεπτιδίων

Συμμετέχει στο LTP και θεωρείται ανάδρομος (retrograde) μεσολαβητής

Επίδραση στο ανοσολογικό

Συμμετέχει στην ανοσολογική κυτταρική απόκριση, είτε άμεσα ρυθμίζοντας τα επίπεδα και τον πολλαπλασιασμό των λεμφοκυττάρων και την παραγωγή κυτταροκινών από αυτά, είτε έμμεσα ενεργοποιώντας τα λευκοκύτταρα και την παραγωγή εικοσανοειδών από αυτά.

Μεσολαβητής της οξείας απόρριψης των μοσχευμάτων

3.9 Φλεγμονή

3.9.1 Γενικά χαρακτηριστικά φλεγμονής [67]

Φλεγμονή ορίζεται ως η τοπική αντίδραση σε τραυματισμό ή μόλυνση που χαρακτηρίζεται από οίδημα, άλγος, ερυθρότητα και θερμότητα. Αποτελεί μορφή φυσικής ανοσίας που ονομάζεται και απόκριση οξείας φάσης. Ανεξάρτητα από την αιτιολογία, η φλεγμονή είναι σχετικώς στερεότυπη διαδικασία αφού ο μηχανισμός πυροδότησής της περιλαμβάνει κυρίως τον κυτταρικό ή ιστικό τραυματισμό.

Ο φυσιολογικός ρόλος της φλεγμονής είναι να καταστρέψει, να μετριάσει, ή να απαλλαγεί ο οργανισμός από τον επιβλαβή παράγοντα, και στη συνέχεια, να προκαλέσει μια σειρά γεγονότων που θεραπεύουν και ανασυγκροτούν τον κατεστραμμένο ιστό.

Η εκκίνηση των μηχανισμών που ευθύνονται για τον εντοπισμό και την εξάλειψη των ξένων ουσιών και τον προσβεβλημένων ιστών ενεργοποιείται από την αναγνώριση ότι έχει συμβεί ιστική βλάβη. Ακολουθεί η ενίσχυση της φλεγμονώδους απάντησης κατά την οποία ενεργοποιούνται διαλυτοί μεσολαβητές και κυτταρικοί φλεγμονώδεις μηχανισμοί. Ο τερματισμός της φλεγμονώδους αντίδρασης, μετά την δημιουργία των παραγόντων φλεγμονής και την εξάλειψη του ξένου παράγοντα, ολοκληρώνεται από ειδικούς αναστολείς των διαβιβαστών [68].

Η ακούσια ενεργοποίηση της διαδικασίας της φλεγμονής ή η απουσία κατάλληλου σημείου τερματισμού της μπορεί να προκαλέσει τον δριμύ τραυματισμό και δυσλειτουργία των ιστών που συνδέεται με διάφορες παθολογικές διαταραχές, όπως συμβαίνει και στην περίπτωση της αθηροσκλήρωσης .

Τα κύρια κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος είναι τα ουδετερόφιλα, τα ηωσινόφιλα, τα βασεόφιλα, τα μαστοκύτταρα, τα λεμφοκύτταρα, και τα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα (APCs, Antigen Presenting Cells). Οι ειδικές ανοσολογικές αποκρίσεις στα αντιγόνα γίνονται μέσω των T και B-λεμφοκυττάρων.

3.9.2 Οξεία και χρόνια φλεγμονή [67]

Η φλεγμονή μπορεί να είναι οξεία ή χρόνια. Οι αγγειακές και κυτταρικές αποκρίσεις της οξείας και της χρόνιας φλεγμονής γίνονται μέσω χημικών παραγόντων του πλάσματος ή από κύτταρα που ενεργοποιούνται από φλεγμονώδη ερεθίσματα. Αυτοί οι μεσολαβητές ενεργούν μεμονωμένα, σε συνδυασμό, ή σε σειρά, ενισχύοντας την φλεγμονώδη απόκριση και την εξέλιξή της. Οι χημικοί παράγοντες του πλάσματος περιλαμβάνουν τα συστατικά τεσσάρων ενζυμικών καταρρακτών: το σύστημα του συμπληρώματος, το σύστημα της κινίνης, το σύστημα πήξης και το ινωδολυτικό σύστημα.

Η άμεση και σύντομης διάρκειας απόκριση του οργανισμού σε ένα επιβλαβή παράγοντα χαρακτηρίζεται ως *οξεία φλεγμονή*. Τα κύρια χαρακτηριστικά της εκδηλώνονται μέσω της μη ειδικής απόκρισης, ενώ ο βαθμός συμμετοχής της ειδικής ανοσολογικής απόκρισης ποικίλει. Πιο συγκεκριμένα, παρατηρείται αγγειοδιαστολή, έκκριση υγρών και πρωτεϊνών του πλάσματος που οδηγούν στη δημιουργία οιδήματος, μετανάστευση λευκοκυττάρων, κυρίως ουδετερόφιλων, από τη κυκλοφορία προς συσσώρευσή τους στην περιοχή της βλάβης. Τα λευκοκύτταρα φαγοκυτταρώνουν τα αντιγόνα και αποικοδομούν το νεκρωτικό ιστό ενώ ταυτόχρονα μπορούν να παρατείνουν τη φλεγμονή και να προκαλέσουν βλάβη σε ιστούς μέσω της απελευθέρωσης ενζύμων, ελεύθερων ριζών και χημικών μεσολαβητών.

Όταν ο φλεγμονώδης παράγοντας εμμένει, η φλεγμονή μπορεί να μεταβεί σε *χρόνια*. Η χρόνια φλεγμονή είναι μια αργή αντίδραση που υποβόσκει για μήνες ή ακόμα και για πολλά χρόνια και περιλαμβάνει καταστροφή ιστού, πολλαπλασιασμό και μετανάστευση μονοπύρηνων κυττάρων (λεμφοκύτταρα, μακροφάγα και άλλα κύτταρα πλάσματος), προσπάθειες επιδιόρθωσης της βλάβης με αντικατάσταση του συνδετικού ιστού, αγγειογένεση και ίνωση. Η χρόνια φλεγμονή αποτελεί κύριο χαρακτηριστικό για μερικές από τις πιο κοινές ασθένειες, όπως είναι και η αθηροσκλήρωση.

3. 9.3 Ειδικοί μεσολαβητές της φλεγμονής

Οι ειδικοί μεσολαβητές της φλεγμονής που παράγονται στο σημείο της βλάβης ρυθμίζουν την αντίδραση της αγγειακής κυκλοφορίας ως προς τη βλάβη. Μεταξύ των

μεσολαβητών περιλαμβάνονται αγγειοδραστικά μόρια που δρουν απευθείας στην κυκλοφορία προκαλώντας: α) αγγειοδιαστολή που οδηγεί σε αυξημένη αιματική ροή στην φλεγμαίνουσα περιοχή, β) αύξηση της αγγειακής διαπερατότητας των πρωτεϊνών στα τοπικά τριχοειδή και φλεβίδια επιφέροντας τη συστολή των ενδοθηλιακών τους κυττάρων, προκαλώντας κατ' αυτόν τον τρόπο ανοίγματα μεταξύ αυτών, δια των οποίων μπορούν να μετακινηθούν οι πρωτεΐνες [67]. Επιπλέον δημιουργούνται χημειοτακτικοί παράγοντες που επιστρατεύουν τα λευκοκύτταρα του αίματος προς τη περιοχή της βλάβης. Από την στιγμή που εμφανίζονται στη φλεγμαίνουσα περιοχή, τα ενεργοποιημένα λευκοκύτταρα εκκρίνουν επιπρόσθετους φλεγμονώδεις μεσολαβητές που είτε επιτείνουν είτε αναστέλλουν τη φλεγμονώδη αντίδραση [67, 68].

Πίνακας 3.4. Μερικοί σημαντικοί τοπικοί μεσολαβητές της φλεγμονής [67]

<i>ΜΕΣΟΛΑΒΗΤΕΣ</i>	<i>ΠΡΟΕΛΕΥΣΗ</i>
Ισταμίνη	Εκκρίνεται από τα μαστοκύτταρα
Παράγοντας ενεργοποίησης αιμοπεταλίων	Εκκρίνεται από πολλούς τύπους κυττάρων
Κινίνες	Παράγονται μέσω ενζυμικής δράσης από τις πρωτεΐνες του πλάσματος
Συμπλήρωμα	Παράγονται μέσω ενζυμικής δράσης από τις πρωτεΐνες του πλάσματος
Παράγοντες πήξης	Παράγονται μέσω ενζυμικής δράσης από τις πρωτεΐνες του πλάσματος
Κυτταροκίνες, περιλαμβανομένων και των χημειοκινών	Εκκρίνονται από τα μονοκύτταρα/μακροφάγα, ουδετερόφιλα, λεμφοκύτταρα και κύτταρα που δεν ανήκουν στο ανοσοποιητικό σύστημα, όπως τα ενδοθηλιακά κύτταρα και ινοβλάστες
Λευκοτριένια/προσταγλαδίνες	Εκκρίνονται από πολλούς τύπους κυττάρων
Λυσοσωμικά ένζυμα,Οξείδιο του αζώτου και άλλες ουσίες που παράγονται από το οξυγόνο	Εκκρίνονται από τα μακροφάγα και τα ουδετερόφιλα

3.9.4 Εμπλοκή του Παράγονται Ενεργοποίησης Αιμοπεταλίων στη φλεγμονή [58, 59, 66, 69]

Όταν τα φλεγμονώδη κύτταρα ενεργοποιούνται ή υπόκεινται σε βλάβες, παράγονται ο PAF, τα εικοσανοειδή, η ισταμίνη και κυτταροκίνες. Ο PAF είναι ένα συνδετικό στοιχείο που εμπλέκεται στις φυσιολογικές καθώς επίσης και παθολογικές φλεγμονώδεις διαδικασίες. Ενεργεί με έναν τρόπο μεμβρανosύνδετο, παρακρινικό, ενδοκρινικό, αυτοκρινικό και διακρινικό. Η συμμετοχή του PAF στην φλεγμονή προέρχεται από την ικανότητά του να διεγείρει τα φλεγμονώδη κύτταρα, να μεσολαβήσει στις αλληλεπιδράσεις κυττάρου-κυττάρου και στην ενδοκυτταρική σήμανση (intracellular signaling).

Η έκκριση του PAF από φλεγμονώδη κύτταρα, όπως τα μονοκύτταρα και φαγοκύτταρα αποτελεί έναν μηχανισμό για τη διακυττάρια σήμανση και την ενίσχυση της φλεγμονώδους απάντησης. Ο PAF που παράγεται από αυτά τα ενεργοποιημένα φλεγμονώδη κύτταρα μπορεί να είναι μεμβρανosύνδετος και μπορεί να ενεργοποιεί άλλα κύτταρα σε έναν ζωντανό οργανισμό, ενισχύοντας κατ' αυτό τον τρόπο την αρχική σήμανση που οδηγεί στην τοπική φλεγμονώδη απάντηση.

Ο PAF προκαλεί συσώρευση αιμοπεταλίων, απελευθέρωση ισταμίνης και αλλαγή της μορφής τους παρόμοια με αυτήν που παρατηρείται με άλλους ενεργοποιητές αιμοπεταλίων. Ο PAF ασκεί επίσης παρόμοιες δράσεις σε φαγοκύτταρα και άλλα κυκλοφορούντα φλεγμονώδη κύτταρα μέσω του υποδοχέα του. Επιπλέον, αυτή η διέγερση αυξάνει τις CD11/CD18 -α β2- ιντεγκρίνες - και οδηγεί σε ισχυρή προσκόλληση των φαγοκύτταρα επάνω σε μια ευρεία ποικιλία επιφανειών, όπως τις επιφάνειες των ενδοθηλιακών κυττάρων και συστατικών της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας (ECM). Οι ανταγωνιστές του PAFR εμποδίζουν τις ανωτέρω ενέργειες σχετικά με τα αιμοπετάλια και τα φαγοκύτταρα . Παρόμοια αποτελέσματα του PAF παρατηρούνται σε άλλα φλεγμονώδη κύτταρα αν και οι συγκεκριμένες απαντήσεις ποικίλλουν μεταξύ κυτταρικών τύπων.

Τα ενεργοποιημένα ενδοθηλιακά κύτταρα εκκρίνουν PAF και τον εκθέτουν στην επιφάνειά τους. Το αποτέλεσμα αυτής της κίνησης είναι η σταθερή προσκόλληση των φαγοκυττάρων σε αυτά. Η σύνθεση του PAF από τα ενδοθηλιακά κύτταρα είναι γρήγορη και οδηγεί σε έκθεσή τους σε συγκεκριμένους αγωνιστές όπως τη θρομβίνη, την ισταμίνη, λευκοτριένιο D4, βραδυκινίνη, και τριφωσφορική αδενοσίνης (ATP).

Η αυξανόμενη προσκόλληση των φαγοκυττάρων και των μονοκυττάρων επάνω στο ενδοθήλιο εμφανίζεται σαν απάντηση στη διακύμανση της έκφρασης της ρ -σελεκτίνης στην κυτταρική του μεμβράνη του. Η ρ -σελεκτίνη βρίσκεται αποθηκευμένη σε εξειδικευμένους ενδοκυτταρικούς κόκκους των ενδοθηλιακών κυττάρων, γνωστά ως σωματίδια Weibel-Palade, και μετά την ενεργοποίησή του μεταφέρεται στην κυτταρική τους μεμβράνη. Επιπλέον, η μεμβρανοσύνδετη διέγερση του PAF αναγκάζει περισσότερα συγκροτήματα ιντεγκρινών CD11/CD18 να εμφανιστούν στην επιφάνεια των φαγοκυττάρων με τη μη συγκολλητική μορφή τους έως ότου η διέγερσή τους να συμβεί από τη συνεργιστική δράση του PAF και της ρ -σελεκτίνης. Κατ' αυτό τον τρόπο η αρχική χαλαρή σύνδεση των ενδοθηλιακών κυττάρων με τη γλυκοπρωτεΐνη στόχο στο φαγοκύτταρο μέσω των ρ -σελεκτινών ενισχύεται από τη σύνδεση CD11/CD18 των φαγοκυττάρων στο ligand της πάνω στο ενδοθηλιακό κύτταρο.

Η ανωτέρω ενεργοποίηση και η σταθερή προσκόλληση των φλεγμονωδών κυττάρων στα ενεργοποιημένα ενδοθηλιακά κύτταρα εμποδίζονται από τους ανταγωνιστές του υποδοχέα του PAF ή από την έκθεση των διεγερμένων ενδοθηλιακών κυττάρων στη PAF AH πριν από την έκθεσή τους στα φαγοκύτταρα. Αυτή η αλληλεπίδραση κυττάρου-κυττάρου είναι κρίσιμη στη διαδικασία φλεγμονής και ο ρόλος του PAF υπό αυτές τις καταστάσεις φαίνεται απαραίτητος.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

PAF ΚΑΙ ΑΘΗΡΟΣΚΛΗΡΩΣΗ

4.1 Θεωρία εμπλοκής του PAF στην αθηροσκλήρωση [54, 57, 69, 70]

Η αθηροσκλήρωση είναι μια χρόνια φλεγμονώδης κατάσταση που μπορεί να οδηγήσει σε ένα οξύ κλινικό γεγονός ανάλογα με την έκταση της αθηρωματικής πλάκας και τη θρόμβωση. Κοινοί παράγοντες κινδύνου όπως ο διαβήτης, το κάπνισμα, η οξειδωμένη LDL και η συστηματική φλεγμονή αυξάνουν τον PAF και τα ανάλογα του PAF, ως κοινό χαρακτηριστικό γνώρισμα.

Τελευταίες μελέτες έχουν αναπτύξει μια νέα θεωρία σχηματισμού των αθηρωματικών πλακών (αθηρογένεση) στην οποία σαν αίτιο υποδεικνύεται ο PAF, οποίος θεωρείται ο πιο ισχυρός μεσολαβητής της φλεγμονής. Ο PAF συμβάλλει στην αύξηση της διαπερατότητας του ενδοθηλίου, παίζει ένα σημαντικό ρόλο στις θρομβωτικές επιπλοκές, προκαλεί την απελευθέρωση δραστικών μορίων οξυγόνου, συμβάλλει στην οξείδωση της LDL και ταυτόχρονα παράγεται κατά την οξείδωση της.

Η θεωρία αυτή ενοποιεί τις υπάρχουσες θεωρίες της φλεγμονής και της οξείδωσης και συμπληρώνει την υπάρχουσα γνώση ώστε να είναι δυνατή η εξήγηση των σχετικών πειραματικών δεδομένων της διεθνούς βιβλιογραφίας, χωρίς τα κενά που παρουσίαζαν οι μέχρι σήμερα αποδεκτές θεωρίες.

4.2 Προτεινόμενος μηχανισμός

Ο προτεινόμενος μηχανισμός είναι ο εξής: Η οξείδωση της LDL, είναι μια διεργασία που λαμβάνει χώρα στο αίμα του ανθρώπου και εξαρτάται από διάφορους παράγοντες όπως τη διατροφή (αντιοξειδωτικά στη τροφή) και τον τρόπο ζωής (κάπνισμα, άσκηση) κ.λπ. Ενώ τα σωματίδια LDL δεν παρουσιάζουν *in vitro* αθηρογόνες ιδιότητες, οι τροποποιημένες μορφές τους έχουν αθηρογόνες δράσεις. Πειραματικά δεδομένα αποδεικνύουν ότι οι αθηρογόνες δράσεις των ox-LDL αποδίδονται στον PAF και στα PAF-ανάλογα. Αυτό καθιστά τα παραπάνω μόρια υπεύθυνα για την έναρξη της αθηροσκλήρωσης.

Τα επίπεδα του PAF στον οργανισμό βρίσκονται πάντα κάτω από αυστηρό έλεγχο με τη βοήθεια ρυθμιστικών μηχανισμών, όπως η δραστικότητα του ένζυμου PAF AH, τη παρουσία αντιοξειδωτικών και PAF ανταγωνιστών. Όταν όμως τα επίπεδα του PAF αυξάνονται ανεξέλεγκτα όπως κατά την διάρκεια οξειδωτικού στρες ή σε περιπτώσεις παθοφυσιολογικών φλεγμονωδών καταστάσεων (π.χ. διάφορες ασθένειες), τότε ο PAF, εκτός από την οξείδωση της LDL, προκαλεί τοπική φλεγμονώδη αντίδραση στο αγγείο, με αποτέλεσμα καταστροφή του ενδοθηλίου και αύξηση της διαπερατότητας αυτού. Τότε εισέρχονται στον υπενδοθηλιακό χώρο μονοκύτταρα και οξειδωμένη LDL, επάγεται ο πολλαπλασιασμός των λείων μυϊκών κυττάρων και ο σχηματισμός "αφρωδών κυττάρων", τα οποία είναι το χαρακτηριστικό εύρημα του πρώτου σταδίου της ανάπτυξης της αθηρωματικής πλάκας. Όλες οι παραπάνω επιμέρους διεργασίες αποτελούν γνωστές βιολογικές ιδιότητες του PAF.

Με βάση τα δεδομένα της έρευνας αυτής και εκείνων της διεθνούς βιβλιογραφίας, υποστηρίζεται ότι δεν είναι η χοληστερόλη και τα κορεσμένα λιπαρά το γενεσιουργό αίτιο του σχηματισμού των αθηρωματικών πλακών, αλλά ο PAF. Τα υψηλά επίπεδα χοληστερόλης και κορεσμένων λιπαρών στο αίμα εντείνουν την οξείδωση της LDL και κατά συνέπεια την παραγωγή PAF με τα αποτελέσματα που προαναφέρθηκαν.

Ο μηχανισμός αυτός, ο οποίος θεωρεί ότι η αθηρογένεση έχει γενεσιουργό αίτιο τον PAF και όχι την χοληστερόλη, ενισχύεται και από *in vivo* πειράματα άλλων ερευνητών στις ΗΠΑ και σε άλλες χώρες, οι οποίοι διατρέφοντας πειραματόζωα με τροφή πλούσια σε χοληστερόλη προκαλούσαν αθηρωμάτωση, μόνο στα πειραματόζωα εκείνα, στα οποία δεν είχαν χορηγήσει ειδικούς αναστολείς του PAF. Αξίζει να αναφερθεί ότι ένας από τους ειδικούς αναστολείς του PAF που χρησιμοποιήθηκε στα πειράματα αυτά, απομονώθηκε από το κινέζικο φυτό *Ginkgo biloba*, που από τα παλιά χρόνια γνώριζαν οι Κινέζοι ότι προστατεύει από τις καρδιοπάθειες.

4.3 Σημεία αλληλεπίδρασης του PAF στην αθηρογόνο διεργασία

Ο PAF αλληλεπιδρά σε κρίσιμα σημεία της αθηρογένεσης συμπεριλαμβανομένης της θρόμβωσης, της φλεγμονής και της οξείδωσης. Τα επίπεδα και η δραστικότητα του PAF αυξάνονται εξαιτίας της ανεπάρκειας ενδογενών ή και των παρεχόμενων από την τροφή

ανταγωνιστών. Αυτό σε συνδυασμό με την μειωμένη δραστικότητα της PAF-AH αυξάνει ακόμα περισσότερο τα επίπεδα του.

Ο PAF και τα PAF-ανάλογα λιποειδή προκαλούν την απελευθέρωση δραστικών μορίων οξυγόνου, τα οποία οξειδώνουν την LDL. Ακόμα, ο PAF προωθεί την οξείδωση της LDL διεγείροντας τα ανθρώπινα μονοκυττάρων/μακροφάγων και φαγοκύτταρα (μέσω των υποδοχέων του PAF που εκφράζονται σε αυτά) για να παραγάγουν ανιόντα υπεροξειδίων και το υπεροξείδιο του υδρογόνου. Οι ox-LDL προοδευτικά οδηγούν σε απώλεια της δραστικότητας της PAF AH, το μόνο ένζυμο που υδρολύει και απενεργοποιεί τον PAF, με αποτέλεσμα να αυξάνονται τα επίπεδα του PAF στο αίμα. Επίσης, ενεργοποιούν τα παρακείμενα ενδοθηλιακά κύτταρα και λεία μυϊκά κύτταρα για να παράγουν και να εκκρίνουν την χημειοτακτική πρωτεΐνη των μονοκυττάρων-1(MCP-1). Η έκκριση της MCP1 από τα προσκολλημένα μονοκύτταρα ενεργοποιείται και από την σύνδεση του PAF στα ενδοθηλιακά κύτταρα ενισχύοντας με αυτό τον τρόπο την χημειοταξία των μονοκυττάρων.

Επειδή ο C16:0 PAF παράγεται κατά τη διάρκεια της οξείδωσης της LDL, οι χημειοτακτικές ιδιότητες των ox-LDL αποδίδονται τουλάχιστον εν μέρει στον PAF. Ακόμα, η προσκόλληση των μονοκυττάρων επάνω στο ενδοθήλιο που προκαλεί η ox-LDL επιτελείται εν μέρει μέσω του υποδοχέα του PAF.

Ο PAF συντίθεται από τα ενεργοποιημένα ενδοθηλιακά κύτταρα και παραμένει συνδεδεμένος στην κυτταρική μεμβράνη τους, ασκώντας έτσι συνδετοκρινή δράση στα ασθενώς προσκολλημένα λευκοκύτταρα στο ενδοθήλιο, ενώ η HDL που σχετίζεται με την PAF AH εξασθενεί τη στρατολόγηση λευκοκυττάρων στον αγγειακό τοίχωμα. Ακόμα, ο εκκρινόμενος PAF μπορεί να διεγείρει το ενδοθήλιο αλληλεπιδρώντας με τον υποδοχέα του και να προκαλέσει φλεγμονώδη απάντηση με αποτέλεσμα να αυξάνει την ενδοθηλιακή διαπερατότητα επιτρέποντας την διέλευση μακρομορίων όπως LDL, ox-LDL και κυττάρων στο υπενδοθήλιο. Το αποτέλεσμα της αύξησης της διαπερατότητας του ενδοθηλίου, το οποίο είναι σύμφωνο με την θεωρία της απάντησης στον τραυματισμό, είναι ένα γεγονός μεγάλης σημασίας για της έναρξη της αθηροσκλήρωσης.

Ο PAF συντίθεται επίσης από τα ενεργοποιημένα προσκολλημένα αιμοπετάλια επάνω στο ενδοθήλιο, όπου παραμένει συνδεδεμένος στην μεμβράνη τους συμμετέχοντας στις αλληλεπιδράσεις του με άλλα κύτταρα. Ακόμα, τα αιμοπετάλια φέρουν υποδοχείς στους οποίους προσδένεται ο PAF που βιοσυντίθεται στο χώρο του αγγειακού τραυματισμού. Το

αποτέλεσμα της σύνδεσης είναι η ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων μέσω ενδοκυττάρων αγγελιοφόρων μορίων και η συσσώρευσή τους.

Τα μονοκύτταρα φέρουν τον υποδοχέα του PAF στην πλασματική τους μεμβράνη και για αυτό το λόγο ενεργοποιούνται από τον PAF. Ακόμα, PAF παράγεται παροδικά από τα μακροφάγα και τα αφρώδη κύτταρα κατά την ενεργοποίηση της φαγοκυττάρωσης. Στο στάδιο αυτό ενεργοποιείται η ακετυλοτρανσφεράση (rem AT) η οποία μετατρέπει το λύσο-PAF σε PAF με αποτέλεσμα την ενίσχυση των φλεγμονωδών σημάτων στο υποενδοθηλιακό διάστημα με την άσκηση σε αυτήν την περιοχή των προφλεγμονωδών, προαθηρογόνων, και προθρομβωτικών αποτελεσμάτων. Παράλληλα με την ενεργοποίηση της rem AT παρατηρείται και ενεργοποίηση της PAF-AH, ενός ενζύμου υπεύθυνο για την αποικοδόμηση του PAF, πράγμα που δικαιολογεί την παροδική σύνθεση του PAF αμέσως μετά την ενεργοποίηση της φαγοκυττάρωσης.

Ο PAF προωθεί τον πολλαπλασιασμό των λείων μυϊκών κυττάρων με την διέγερση της μεταγραφής μιας ηπαρίνης που δεσμεύει τον επιδερμικό παράγοντα αύξησης στα μονοκύτταρα και τη σύνθεση IL-6 στα λεία μυϊκά κύτταρα. Τα προαναφερθέντα αποτελέσματα εμποδίζονται από τους συγκεκριμένους ανταγωνιστές του PAF και καταργούνται από την δραστικότητα της PAF AH.

Ο PAF προκαλεί επίσης την απελευθέρωση πρωτεασών, όπως ελαστάση, από τα λευκοκύτταρα που ευνοούν την διάσπαση της αρτηριοσκληρυντικής πλάκας, δεδομένου ότι αυτά τα ένζυμα αποικοδομούν τα συστατικά της εξωκυττάριας ουσίας του έσω χιτώνα και μέσου χιτώνα.

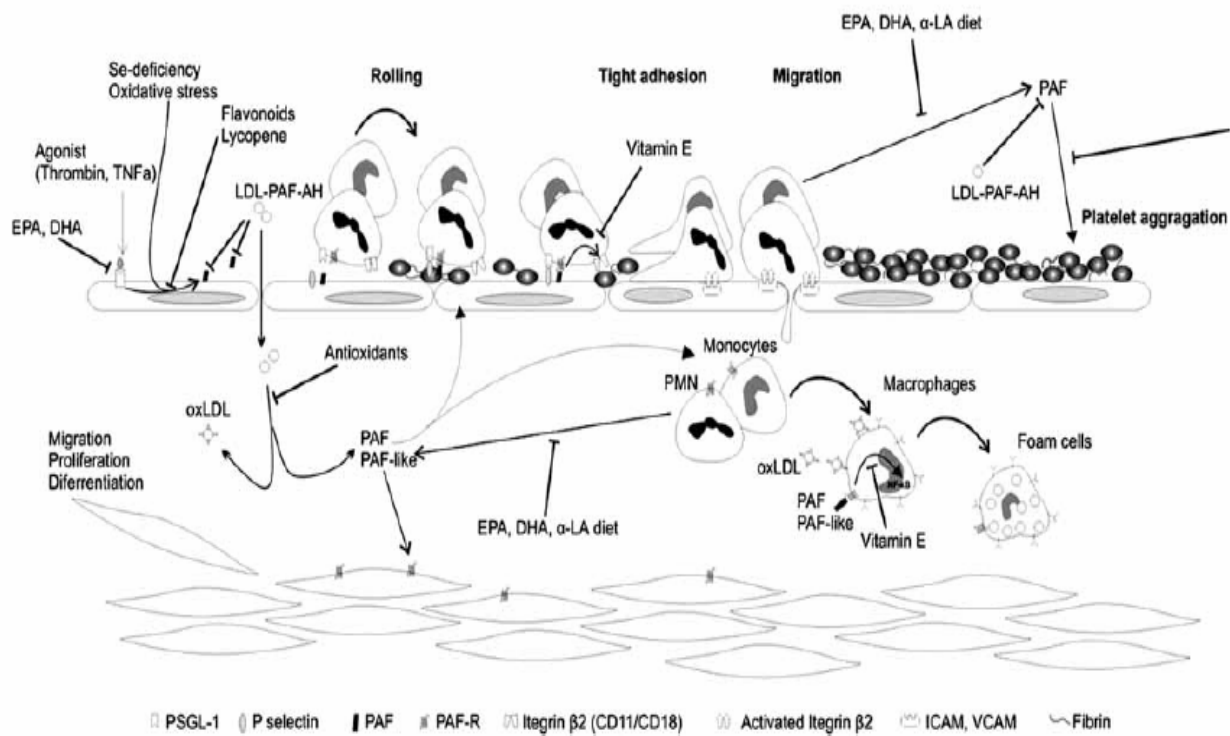
Ακόμα, ο PAF προκαλεί την γονιδιακή έκφραση των κυτταροκινών (IL-1, IL-3, IL-6, TNF, IL-2Ra) της P-σελεκτίνης αλλά και την γονιδιακή έκφραση του υποδοχέα του αυτορυθμίζοντας με αυτό τον τρόπο την δραστικότητά του. Επίσης, ο PAF ενεργοποιεί διάφορους μεταγραφικούς παράγοντες όπως ο NF-κ B. Όπως περιγράφηκε προηγουμένως, τα προσκολλημένα λευκοκύτταρα ενεργοποιούνται από τη συντονισμένη δράση του PAF και της ρ-σελεκτίνης. Οι σελεκτίνες μεσολαβούν τις αρχικές αλληλεπιδράσεις των κυττάρων του αίματος με το ενδοθήλιο ενώ ο PAF διεγείρει τις ιντεγκρίνες που έχουν σαν αποτέλεσμα την πιο ισχυρή προσκόλληση των λευκοκυττάρων στο ενδοθήλιο.

4.4 Αναστολείς του PAF και αθηροσκλήρωση [62]

Οι παραπάνω δράσεις του PAF και των PAF-αναλόγων του εξαρτώνται μερικώς από τις διαιτητικές συνήθειες, δεδομένου ότι το περιεχόμενο και η σύσταση των κυτταρικών μεμβρανών και των λιποπρωτεϊνών του πλάσματος καθορίζονται κατά ένα μεγάλο μέρος από τη διατροφή. Αντι-PAF δραστηριότητα έχει ανιχνευθεί στα εκχυλίσματα λιπιδίων από τα παραδοσιακά τρόφιμα της μεσογειακής διατροφής όπως το ελαιόλαδο, το κρασί, τα ψάρια, το μέλι, το γάλα και το γιαούρτι, το σκόρδο και το κρεμμύδι. Μελέτες διατροφικής παρέμβασης σε ζώα έχουν δείξει ότι η κατανάλωση εκχυλίσματος ελαιολάδου πλούσιου σε ανταγωνιστές του PAF εμποδίζει την ανάπτυξη της αθηροσκλήρωσης. Σε ασθενείς με μη ινσουλινοεξαρτώμενο διαβήτη (NIDDM), η κατανάλωση παραδοσιακών μεσογειακών γευμάτων ή μεσογειακού τύπου γευμάτων fast food πλούσια σε ανταγωνιστές του PAF βελτιώνει την PAF-προκληθείσα συσσώρευση αιμοπεταλίων.

Κλινικές μελέτες δείχνουν υψηλά επίπεδα PAF στις στεφανιαίες αρτηρίες ασθενών με δριμύα αθηροσκλήρωση και σε δείγματα αρτηριών ασθενών με στεφανιαία πλάκα. Μελέτες σε πειραματόζωα καταδεικνύουν την προστατευτική επίδραση των ανταγωνιστών του PAF στην αθηροσκλήρωση. Η διαχείριση των ανταγωνιστών των υποδοχέων PAF μειώνει σημαντικά το ποσό της εστεροποιημένης χοληστερόλης στην αορτή υπερχοληστερολαιμικών κουνελιών χωρίς επιρροή των επιπέδων χοληστερόλης πλάσματος και της PAF- προκληθείσας πρόωρης αθηρογένεσης.

Συνοψίζοντας, ο PAF αποτελεί ένα μόριο που ενοποιεί όλες τις αποδεκτές θεωρίες της αθηροσκλήρωσης. Πλήθος πειραματικών αποτελεσμάτων υποστηρίζουν τον κρίσιμο ρόλο του στην έναρξη και στην πρόοδο της αθηροσκλήρωσης. Αυτό είναι σύμφωνο με τον μηχανισμό που περιγράφηκε, το οποίο αποτελεί μια νέα βιοχημική προσέγγιση. Η αναγνώριση των αυξημένων επιπέδων του PAF και PAF αναλόγων του στο αίμα ως παράγοντας κινδύνου μπορεί να βοηθήσει στην πρόληψη της αθηροσκλήρωσης στο αγγειακό τοίχωμα. Συμπερασματικά, ο PAF και ο μεταβολισμός του φαίνεται να αποτελεί μια πολλά υποσχόμενη παράγραφο στο κεφάλαιο της αθηροσκλήρωσης.



Σχήμα 4.1 Βασικά στάδια της συμμετοχής του PAF στη διαδικασία της αθηρωμάτωσης

ΣΚΟΠΟΣ

Η παραπάνω μελέτη σκοπό έχει να προσδιορίσει τη μεταβολή της δραστηριότητας της 1-0-αλκυλο-2-lyso-sn-γλυκερυλο-3-φωσφορυλοχολίνη:Ακετυλο-CoA ακετυλοτρανσφεράση (lyso-PAF AT), η οποία καταλύει το τελευταίο στάδιο της *remodeling* πορείας βιοσύνθεσης του PAF, σε αορτές και λευκοκύτταρα δύο ομάδων κουνελιών. Η πρώτη ομάδα ακολούθησε κλασική αθηρογόνο δίαιτα πλούσια σε χοληστερόλη (ομάδα χοληστερόλης) για 7 εβδομάδες και η δεύτερη ομάδα ακολούθησε την ίδια δίαιτα σε συνδυασμό με συμπλήρωμα γλουταμινικού και ασπαραγινικού οξέος (ομάδα χοληστερόλης και αμινοξέα). Η μελέτη αυτή εντάσσεται στο γενικότερο πλαίσιο μελέτης της συμμετοχής του PAF στην αθηροσκλήρωση.

Γνωρίζοντας από την βιβλιογραφία ότι τα δύο αμινοξέα έχουν αντιαθηρογόνο δράσεις, ότι η lyso-PAF AT ενεργοποιείται από φλεγμονώδεις ερεθίσματα του οργανισμού και ότι η φλεγμονώδης αντίδραση είναι χαρακτηριστικό γνώρισμα της αθηροσκλήρωσης, κρίθηκε σκόπιμο να μελετηθεί η δραστηριότητα της lyso-PAF AT και πως αυτή επηρεάζεται από το συμπλήρωμα του ασπαραγινικού και του γλουταμινικού οξέος.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

ΜΕΘΟΔΟΙ ΚΑΙ ΥΛΙΚΑ

5.1 Πρωτόκολλο παρέμβασης

Σε αρσενικά κουνέλια χορηγήθηκε κανονική δίαιτα (ομάδα ελέγχου, n=4) ή δίαιτα με 0,5% χοληστερόλη (ομάδα χοληστερόλη, n=8) ή με 0,5% χοληστερόλη και ταυτόχρονα 12,5 mM L-ασπαργινικού και 12,5 mM L-γλουταμινικού από το νερό (ομάδα χοληστερόλη και αμινοξέα, n=8) για επτά εβδομάδες. Ακολούθησε ευθανασία, η αορτή και ο δεξιός ηπατικός λοβός μονιμοποιήθηκαν σε φορμόλη για ιστολογική εξέταση και τμήμα της αορτής υπέστη κατάλληλη επεξεργασία για προσδιορισμό της ολικής γλουταθειόνης (tGSH). Δείγματα αίματος λήφθηκαν στις 0, 2, 4 και 7 εβδομάδες. Στον ορό προσδιορίστηκαν η ολική χοληστερόλη (TC), η χοληστερόλη των λιποπρωτεϊνών υψηλής πυκνότητας (HDL-C), οι τριακυλογλυκερόλες (TAG) και η γ-γλουταμυλοτρανσφεράση (γ-GT). Ακόμα προσδιορίστηκε το πάχος του έσω χιτώνα της θωρακικής αορτής (intimat) και το πάχος του έσω χιτώνα της κοιλιακής αορτής (intimaa).

5.2 Παραλαβή και ομογενοποίηση λευκοκυττάρων από αίμα κουνελιού

Αντιδραστήρια- Όργανα

- NaCl
- Δεξτράνη
- Ηπαρίνη
- Φυγόκεντρος
- Συσκευή υπερήχων

Διαλύματα

- HCl 1N
- Διάλυμα δεξτράνης (μέσο Mr = 510.000) 3% σε NaCl 0,15 M
- Διάλυμα αναδιάλυσης Tris (50 mM-pH 7,4)-Suc 0,25 M-DTT 1 mM : Διαλύονται 0,605 g Tris, 8,55 g σακχαρόζης και 0,0154 g DTT σε 100 ml νερό. Το pH του διαλύματος ρυθμίζεται με HCl 1 N
- Ρυθμιστικό διάλυμα λύσης των ερυθροκυττάρων (lysis buffer) : Διαλύονται 8,29 g NH₄Cl, 1,0012 g KHCO₃ και 0,038 g EDTA σε 1 L απιονισμένο νερό

Αναλυτική πορεία

- Λαμβάνονται 5 ml αίματος σε ηπαρισμένο σωλήνα
- Προσθέτουμε 1,7 ml διάλυμα δεξτράνης 3% διαλυμένης σε NaCl 0,15 M.
- Το μίγμα αφήνεται για καταβύθιση σε Θ δωματίου για 1h
- Λαμβάνεται το υπερκείμενο (LRP) και φυγοκεντρείται 500gx10 min στους 20 °C.
- Αποχύνεται το υπερκείμενο και το ίζημα των κυττάρων αναδιαλύεται σε 5 ml lysis buffer. Παραμονή για 5 min.
- Φυγοκέντρωση στα 300g x 10 min στους 20 °C.
- Το υπερκείμενο απορρίπτεται και το ίζημα των κυττάρων αναδιασπείρεται σε 1ml buffer αναδιάλυσης.
- Το εναιώρημα των κυττάρων κατεργάζεται με υπέρηχους για 4x10 sec και στη συνέχεια φυγοκεντρείται για 500g x 10 min.
- Το υπερκείμενο της φυγοκέντρωσης μοιράστηκε σε 5 κλάσματα των 200 μL τα οποία φυλάχθηκαν στους -80 °C μέχρι την ημέρα της ανάλυσης.

5.3 Παραλαβή και ομογενοποίηση αορτής από τα κουνέλια

Μετά το πέρας της παρέμβασης έγινε ευθανασία των ζώων. Η αορτή απομονώθηκε, καθαρίστηκε από τον περιβάλλοντα λιπώδη ιστό και κόπηκε κατά μήκος σε δύο τμήματα. Το ένα τμήμα μονιμοποιήθηκε σε υδατικό διάλυμα φορμαλδεύδης 10% ενώ το δεύτερο τεμαχίστηκε και μέρος αυτού μεταφέρθηκε σε ρυθμιστικό διάλυμα αναδιάλυσης. Το εναιώρημα της αορτής κατεργάζεται με υπέρηχους για 4 x 10 sec και στη συνέχεια φυγοκεντρείται για 500g x 10 min. Το υπερκείμενο της φυγοκέντρωσης μοιράστηκε σε 5 κλάσματα των 200 μ L τα οποία φυλάχθηκαν στους -80 °C μέχρι την ημέρα της ανάλυσης.

5.4 Προσδιορισμός πρωτεΐνης με την μέθοδο Bradford [71]

Αντιδραστήρια - Όργανα

- Αλβουμίνη βόειου ορού (BSA) 1 mg/ml: Διαλύονται 5 mg BSA σε 5 ml νερό ή ρυθμιστικό διάλυμα
- Stock διάλυμα Coomassie Blue G: 100mg σε 50 ml MeOH και αυτό προστίθεται σε 100 ml H₃PO₄ και συμπληρώνεται ο όγκος στα 200 ml με H₂O. Το διάλυμα διατηρείται στους 40C
- Αντιδραστήριο Bradford (working διάλυμα): 1 ml από το αντιδραστήριο Bradford (stock) αναμιγνύεται με 4 ml απιονισμένο νερό
- Φωτόμετρο 4040-LKB Biochrom, Novaspec
- Κυψελίδες φωτομέτρου (1 ml)

Αρχή μεθόδου

Η χρωστική που περιέχεται στο αντιδραστήριο Bradford συμπλέκεται με τις πρωτεΐνες (βασικά και αρωματικά αμινοξέα) προκαλώντας μια μετατόπιση της μέγιστης απορρόφησης της χρωστικής από 465 (καφέ χρώμα) σε 595 nm(μπλε χρώμα). Το σύμπλοκο της πρωτεΐνης-χρωστικής σταθεροποιείται σε 5 λεπτά και παραμένει σταθερό για 45 λεπτά.

Η απορρόφηση είναι ανάλογη της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης. Η γραμμικότητα της ανάλυσης κυμαίνεται από 1 μg σε 140 μg πρωτεΐνης, ως προς BSA.

Αναλυτική πορεία

Σε κυψελίδες φωτομέτρου του 1 ml προστίθεται νερό και κατάλληλες ποσότητες από το πρότυπο διάλυμα BSA ή το άγνωστο διάλυμα (1-10 μg). Η αντίδραση ξεκινά με την προσθήκη 200 μL αντιδραστηρίου Bradford. Προσδιορίζεται η απορρόφηση των προτύπων και των δειγμάτων μετά από 5 min στα 595 nm. Τα διαλύματα των προτύπων και των αγνώστων δειγμάτων πρέπει να έχουν τελικό όγκο 1 ml. Το σύμπλοκο πρωτεΐνης χρωστικής είναι σταθερό για 60 min. Ο υπολογισμός της περιεκτικότητας του δείγματος σε πρωτεΐνη γίνεται με βάση την πρότυπη καμπύλη αναφοράς.

5. 5 Εκχύλιση λιποειδών κατά Bligh-Dyer [72]

Αντιδραστήρια - Όργανα

- Οργανικοί διαλύτες αναλυτικής καθαρότητας

Αρχή μεθόδου

Με κατάλληλης πολικότητας μονοφασικό σύστημα διαλυτών επιτυγχάνεται η εκχύλιση όλων των λιποειδών καθώς επίσης και η εκχύλιση μικρών ποσοτήτων υδατοδιαλυτών ενώσεων όπως αλάτων, αμινοξέων κ.α. Με την μετατροπή του μονοφασικού συστήματος σε διφασικό, στην μεν χλωροφορμική φάση κατανέμονται όλα τα λιποειδή, στην δε υδατική κατανέμονται τα υδατοδιαλυτά συστατικά.

Αναλυτική πορεία

Το προς εκχύλιση δείγμα κατεργάζεται με μίγμα $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}:\text{H}_2\text{O}$ (1:2:0,8, v/v/v), αναδεύεται έντονα και φυγοκεντρείται, αν χρειάζεται, ώστε να απομακρυνθούν τα αδιάλυτα συστατικά. Στην συνέχεια προσθέτονται υπολογισμένες ποσότητες CHCl_3 και H_2O (0,25 ml για κάθε 1 ml προστιθέμενου μίγματος διαλυτών) ώστε η αναλογία των διαλυτών να γίνει

CHCl₃:CH₃OH:H₂O (1:1:0,9, v/v/v) και το σύστημα να μετατραπεί σε διφασικό. Η χλωροφορμική (κάτω) φάση μεταφέρεται, ανάλογα τον όγκο της, είτε σε γυάλινο σωλήνα, είτε σε σφαιρική φιάλη και ο διαλύτης εξατμίζεται σε ρεύμα αζώτου ή σε flash evaporator, αντίστοιχα. Τα λιποειδή αναδιαλύονται σε μικρή ποσότητα μίγματος CHCl₃:CH₃OH (1:1, v/v) για περαιτέρω επεξεργασία.

5. 6 Προσδιορισμός δραστηριότητας της lyso-PAF ακετυλοτρανσφεράση (lyso-PAF AT) σε ομογενοποίηση λευκοκυττάρων με TLC [73]

Όργανα

- Πιπέτες 1-10, 10-100, 100-1000 μ L
- Φυγόκεντρος
- Ανακινούμενο υδρόλουτρο

Αναλώσιμα

- Σωλήνες πολυπροπυλενίου
- Tips κίτρινα, μπλε

Στερεά αντιδραστήρια

- Tris
- Sucrose
- lyso-PAF (C_{16:0}) (Sigma)
- Ακετυλο-CoA (Sigma)
- BSA ελεύθερης λιπαρών οξέων (Sigma)
- Silica gel G

Διαλύτες

- MeOH
- CHCl₃
- AcOH

Διαλύματα

- Διάλυμα φύλαξης (stock) λυσο-PAF 2,5 mg/ml : Διαλύονται 10 mg λυσο-PAF σε 4 ml MeOH. Το διάλυμα φυλάσσεται σε βιδωτό σωλήνα στους -20 °C.
- Διάλυμα ακετυλο-CoA 20 mM σε ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl (50mM-pH 7,4) : Διαλύονται 25 mg σε 1540 ml ρυθμιστικού διαλύματος
- Διάλυμα BSA 10 mg/ml : Διαλύονται 100 mg BSA ελεύθερης λιπαρών οξέων (Sigma) σε 10 ml ρυθμιστικού διαλύματος Tris-HCl (50 mM-pH 7,4)
- Διάλυμα λυσο-PAF σε BSA (10mg/ml) συγκέντρωσης 800 μM (διάλυμα εργασίας): Φέρονται 40 μL διαλύματος λυσο-PAF 2,5 mg/ml σε βιδωτό σωλήνα, εξατμίζεται ο διαλύτης σε ρεύμα αζώτου και το ίζημα αναδιαλύεται σε 259 μL BSA 10 mg/ml. Παρασκευάζεται καινούριο διάλυμα κάθε φορά. Προσθήκη 5 μL από το διάλυμα αυτό στον ενζυμικό προσδιορισμό δίνουν τελική συγκέντρωση λυσο-PAF 20 μM και τελική συγκέντρωση BSA 0,25 mg/ml.
- Ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl (50 mM-pH 7,4) : Διαλύονται 0,605 g Tris σε νερό, ρυθμίζεται το pH με HCl 1 M στο 7,4 και αραιώνεται το διάλυμα στα 100 ml νερό.
- Διάλυμα αναδιάλυσης Tris (50 mM-pH 7,4)-Suc 0,25 M-DTT 1 mM : Διαλύονται 0,605 g Tris, 8,55 g σακχαρόζης και 0,0154 g DTT σε 100 ml νερό. Το pH του διαλύματος ρυθμίζεται με HCl 1 N

Αρχή μεθόδου

Ο προσδιορισμός της δραστηριότητας της *rem AT* βασίζεται στη μέτρηση του παραγόμενου μετά την επώαση του ενζυμικού παρασκευάσματος με λυσο-PAF και ακετυλο-

CoA, παρουσία BSA. Ο παραγόμενος PAF εκχυλίζεται από το μίγμα της αντίδρασης με όξινη εκχύλιση Bligh-Dyer, διαχωρίζεται από τα υπόλοιπα συστατικά με TLC και προσδιορίζεται με βιολογικό πείραμα.

Αναλυτική πορεία

Ενζυμική δοκιμασία

- Σε σωλήνα πολυπροπυλενίου φέρονται το ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl (50 mM-pH 7,4), 5 μ L διαλύματος εργασίας λυσο-PAF (τελική συγκέντρωση 20 μ M), 2 μ L διαλύματος ακετυλο-CoA (τελική συγκέντρωση 200 μ M) και το ρυθμιστικό διάλυμα αναδιάλυσης. Επειδή η προστιθέμενη ποσότητα του ενζυμικού παρασκευάσματος, το οποίο είναι διαλυμένο σε ρυθμιστικό διάλυμα αναδιάλυσης, μπορεί να κυμαίνεται από 10-50 μ L προστίθεται κατάλληλη ποσότητα ρυθμιστικού διαλύματος ώστε όλοι οι προσδιορισμοί να περιέχουν 50 μ L ρυθμιστικού διαλύματος αναδιάλυσης. Ο τελικός όγκος του μίγματος επώασης είναι 200 μ L.
- Προεπώαση για 5 min στους 37 °C
- Η αντίδραση ξεκινά με την προσθήκη του ενζυμικού παρασκευάσματος.
- Η επώαση της αντίδρασης γίνεται σε θερμοστατούμενο υδρόλουτρο υπό ανάδευση στους 37 °C για 10 min.

Προσδιορισμός παραγόμενου PAF

- Μετά το τέλος της αντίδρασης προστίθενται 300 μ L παγωμένου H₂O και 1111 μ L μίγματος CHCl₃/MeOH (2 % AcOH).
- Μετά από έντονη ανάδευση φυγοκεντρείται το μίγμα ώστε να διαχωριστούν οι δύο φάσεις και παραλαμβάνεται η χλωροφορμική φάση, η οποία εξατμίζεται μέχρι ξηρού, αναδιαλύεται σε μικρό όγκο και φέρεται σε πλάκα TLC επιστρωμένη με Silica gel G
- Η πλάκα αναπτύσσεται σε προεξισορροπημένο θάλαμο με σύστημα ανάπτυξης C:M:AcOH:W (100:57:16:8).

- Μετά το τέλος της ανάπτυξης, εξατμίζεται ο διαλύτης και εμφανίζεται η πλάκα σε ατμούς I₂.
- Εντοπίζεται η περιοχή του PAF (μεταξύ Sm και λυσο-PC) και ξύνεται με γυάλινη αντικειμενοφόρο πλάκα.
- Το ξύσμα φέρεται σε γυάλινο σωλήνα και ο PAF εκχυλίζεται με 2 ml μίγματος C:M:W (1:2:0,8) (x 2). Προστίθεται κατάλληλη ποσότητα C και W ώστε το σύστημα να γίνει διφασικό και παραλαμβάνεται η χλωροφορμική φάση που περιέχει τον PAF, η οποία φυλάσσεται στους -20°C

5.7 Απομόνωση πλυμένων αιμοπεταλίων κουνελιού και ποσοτικός προσδιορισμός PAF [74]

Αντιδραστήρια

- NaCl
- Κιτρικό οξύ
- Κιτρικό νάτριο
- MgCl₂·6H₂O
- NaHCO₃
- EGTA
- NaOH
- CaCl₂
- Γλυκόζη
- Ζελατίνη
- Ficoll-Paque (Pharmacia)

Διαλύματα

- Αντιπηκτικό διάλυμα ACD : Σε 1000 ml νερού διαλύονται 13,65 g κιτρικού οξέος, 25 g κιτρικού νατρίου και 20 g δεξτρόζης.
- Διάλυμα 10x Tyrodes stock : Σε 1 lt νερού διαλύονται 80 g NaCl, 1,95 g $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ και 10 g γλυκόζης
- Διάλυμα 100x CaCl_2 stock : Σε 100 ml νερού διαλύονται 1,911 g CaCl_2
- Διάλυμα 0,2 M EGTA stock : Ποσότητα 0,76 g EGTA διαλύεται σε 10 ml νερό. Ρυθμίζεται το pH του διαλύματος στο 7,5 με NaOH 5 M
- Φυσιολογικός ορός : 0,9 g NaCl σε 1 L απιονισμένο νερό
- Διάλυμα ζελατίνης 10% σε νερό
- Διαλύματα Tyrodes-Gelatin pH 6,5 (Tg pH 6,5), Tyrodes-Gelatin-EGTA pH 6,5 (Tg EGTA pH 6,5) : Σε 80 ml νερό προσθέτονται 10 ml Tyrodes 10x stock. Χρησιμοποιώντας μαγνητικό αναδευτήρα κατά τη διάρκεια της προσθήκης, προσθέτονται 2,5 ml ζελατίνης 10% (λιωμένης στο σημείο βρασμού). Κατόπιν, προσθέτονται 5 ml διαλύματος NaHCO_3 (0,203 g NaHCO_3 σε 10 ml νερό) που πρέπει να χρησιμοποιείται αμέσως μετά την παρασκευή του. Συμπληρώνεται ο όγκος στα 100 ml με νερό και χωρίζεται σε δύο τμήματα των 50 ml. Στο ένα από τα δύο προσθέτονται 25 μL EGTA 0,2 M. Ρυθμίζεται το pH και των δύο κλασμάτων στο 6,46 με HCl 1 N. Αμέσως γεμίζονται γυάλινοι σωλήνες των 16 ml μέχρι επάνω (χωρίς φυσαλίδες αέρα) και σκεπάζονται με parafilm.
- Διάλυμα Tyrodes-ασβεστίου pH 7,2 (Tg-Ca pH 7,2) : Σε 5 ml Tyrodes 10x προστίθενται 40 ml νερό. Χρησιμοποιώντας μαγνητικό αναδευτήρα προστίθενται 1,25 ml διαλύματος ζελατίνης 10%. Στη συνέχεια προσθέτονται 0,5 ml διαλύματος CaCl_2 100x. Κατόπιν προστίθενται 2,5 ml διαλύματος NaHCO_3 (παρασκευάζεται όπως παραπάνω). Συμπληρώνεται ο όγκος μέχρι τα 50 ml με νερό και ρυθμίζεται το pH στο 7,16 με HCl 1 N. Διατηρείται στους 37 °C σε ερμητικά κλειστούς σωλήνες.

Όργανα - Αναλώσιμα

- Πλαστικοί σωλήνες των 50 ml
- Πλαστικά σιφώνια των 20 ml
- Φυγόκεντρος
- Συσσωρευματομέτρο, Chrono-log
- pHμετρο
- Φωτόμετρο
- Υδατόλουτρο

Πορεία

- Σε πλαστικούς σωλήνες των 50 ml προστίθενται 7 ml ACD.
- Συλλέγεται αίμα κουνελιού από την κεντρική αρτηρία του αυτιού του κουνελιού, ο σωλήνας γεμίζεται με αίμα μέχρι τα 50 ml και αναμιγνύεται ήπια με αναστροφή
- Φυγοκέντρωση για 15 min στους 24 °C στα 500g (~ 1800 στροφές ανά λεπτό, rpm) (1^η φυγοκέντρωση). Κατά την διάρκεια της φυγοκέντρωσης μεταφέρουμε 2 ml Ficoll-Paque σε πλαστικούς σωλήνες των 14 ml.
- Μετά το τέλος της φυγοκέντρωσης αναρροφώνται τα 2/3 του υπερκείμενου πλάσματος (πλάσμα πλούσιο σε αιμοπετάλια, PRP) με πλαστικό σιφόνιο των 20 ml και μεταφέρονται σε άλλο πλαστικό σωλήνα των 50 ml.
- Τοποθετείται το πλάσμα πάνω στο στρώμα του Ficoll, με μέγιστο ποσοστό πλάσματος τα 9 ml για κάθε 2 ml Ficoll, χρησιμοποιώντας πλαστικά σιφώνια. Μεταφέρονται ίσοι όγκοι πλάσματος σε 2 ή 3 σωλήνες ανάλογα με το συνολικό όγκο του πλάσματος.
- Σκεπάζουμε με parafilm και οι σωλήνες φυγοκεντρούνται για 20 min στους 24 °C στα 750g (2200 rpm) (2^η φυγοκέντρωση).

- Μετά την φυγοκέντρωση τα αιμοπετάλια εμφανίζονται σαν ταινία μεταξύ της στιβάδας του πλάσματος και του στρώματος του Ficoll. Το υπερκείμενο πλάσμα (φτωχό σε αιμοπετάλια) αναρροφάται και απορρίπτεται με πλαστική πιπέτα των 20 ml. Το στρώμα των αιμοπεταλίων διαπερνάται με πλαστική ή σιλικοναρισμένη πιπέτα Pausteur, αναρροφάται το Ficoll και απορρίπτεται.
- Αν υπάρχουν 2 σωλήνες μοιράζονται 14 ml Tg EGTA pH 6,5 σε κάθε σωλήνα. Αν έχουμε 3,4...σωλήνες μοιράζονται 15,16...ml Tg EGTA pH 6,5 σε κάθε σωλήνα. Το διάλυμα αφήνεται να τρέξει ήπια στα τοιχώματα του κάθε σωλήνα και αναμιγνύουμε ήπια μέχρι να ομογενοποιηθεί το εναιώρημα των αιμοπεταλίων. Αποχύνεται το αιώρημα σε άλλο πλαστικό σωλήνα των 14 ml, αφήνοντας έτσι τα ερυθρά αιμοσφαίρια στον αρχικό σωλήνα. Το περιεχόμενο του κάθε σωλήνα μεταφέρεται σε 2 ml Ficoll (8 ml αιμοπεταλίων σε κάθε σωλήνα) και καλύπτεται με parafilm.
- Ακολουθεί φυγοκέντρωση για 15 min στους 24 °C στα 2400 rpm (3^η φυγοκέντρωση). Το υπερκείμενο ρυθμιστικό διάλυμα απορροφάται και απορρίπτεται. Διαπερνάται το στρώμα αιμοπεταλίων με πλαστική πιπέτα, αναρροφάται το Ficoll και απορρίπτεται. Στην συνέχεια προστίθενται ίσοι όγκοι (~ 8 ml) Tg pH 6,5 σε κάθε σωλήνα αφήνοντας το διάλυμα να τρέξει στα τοιχώματα του σωλήνα και χωρίς ανάμιξη μεταφέρεται το εναιώρημα σε καθαρό πλαστικό σωλήνα των 14 ml και καλύπτεται με parafilm.
- Ακολουθεί φυγοκέντρωση για 15 min στους 24 °C στα 2350 rpm (4^η φυγοκέντρωση). Το υπερκείμενο ρυθμιστικό διάλυμα απορροφάται και απορρίπτεται μέχρι και την τελευταία σταγόνα. Προστίθενται 0,8 ml Tg pH 6,5 σε κάθε συσσωμάτωμα αιμοπεταλίων αναδιασπείροντας τα κύτταρα με προσοχή. Το περιεχόμενο των σωλήνων ενώνεται με πλαστικό σωλήνα.
- Ετοιμάζεται εναιώρημα αιμοπεταλίων σε Tg pH 6,5 που να περιέχει $1,25 \times 10^8$ κύτταρα/ml. Από το πυκνό διάλυμα αιμοπεταλίων λαμβάνονται 10 μ L τα οποία αραιώνονται με 990 μ L Tg pH 6,5 και το διάλυμα φωτομετρείται στα 530 nm. Ο αριθμός των κυττάρων στα 10 μ L δίνεται από τον τύπο : $\text{κύτταρα}/10 \mu\text{L} = A \times 1,25 \cdot 10^8$ όπου A είναι η απορρόφηση. Με βάση πρότυπη καμπύλη της οπτικής απορρόφησης συναρτήσει του αριθμού αιμοπεταλίων υπολογίζεται ο αριθμός αιμοπεταλίων και ετοιμάζεται το επιθυμητό εναιώρημα αιμοπεταλίων.

- Προστίθενται κατάλληλες ποσότητες από το working διάλυμα της BSA και το δείγμα ή τον πρότυπο PAF έτσι ώστε ο συνολικός προστιθέμενος όγκος να είναι 80 μ L. Καταγράφεται η καμπύλη συσσώρευσης. Από το ύψος της καμπύλης συσσώρευσης του πρότυπου διαλύματος PAF κατασκευάζεται καμπύλη αναφοράς, με την βοήθεια της οποίας μπορεί να προσδιοριστεί η ποσότητα του άγνωστου διαλύματος PAF από το ύψος της δικής του καμπύλης συσσώρευσης.

5.8 Παραλαβή μεμβρανών από λευκοκύτταρα κουνελιού και μέτρηση χοληστερόλης

Αντιδραστήρια -Όργανα

- Kit προσδιορισμού χοληστερόλης που περιέχει τα εξής :
 R1: Goods buffer pH 6,8, χολικό οξύ, φαινόλη, εστεράση και οξειδάση χοληστερόλης,
 R2 : 4-αμινοφαιναζόνη
 R3 : πρότυπο διάλυμα χοληστερόλης 200 mg/ml
- Φυγόκεντρος
- Φωτόμετρο 4040-LKB Biochrom, Novaspec

Αρχή μεθόδου

Η ελεύθερη χοληστερόλη και η χοληστερόλη που απελευθερώνεται από τους εστέρες της μετά από την ενζυμική υδρόλυσή της οξειδώνεται ενζυμικά. Η ελεύθερη χοληστερόλη οξειδώνεται από την οξειδάση της χοληστερόλης (CHOD) σε colest-4en-3-one δίνοντας υπεροξείδιο του υδρογόνου. Από το υπεροξείδιο του υδρογόνου σχηματίζεται ο δείκτης quinoneimine, παρουσία της υπεροξειδάσης (POD). Η quinoneimine αντιδρά με τη 4-αμινοφαιναζόνη και τη φαινόλη προς σχηματισμό έγχρωμου συμπλόκου. Η ένταση του χρώματος είναι ανάλογη με τη συγκέντρωση της χοληστερόλης στα δείγματα.

Αναλυτική Πορεία

- Στα aliquots, στα οποία είχε ήδη γίνει προσδιορισμός της δραστηριότητας της lyso-PAF AT και πρωτεΐνης φυγοκεντρήθηκαν για 20 min σε 20000g.
- Αποχύνεται το υπερκείμενο και το ίζημα αναδιαλύεται σε 50 μl φυσιολογικό ορό
- Από τα 50 μl χρησιμοποιούμε 40 μl για τον προσδιορισμό της χοληστερόλης και 5 μl για τον προσδιορισμό της πρωτεΐνης με τη μέθοδο Bradford, όπως αναφέρθηκε παραπάνω.
- Παρασκευάζουμε το working διάλυμα R1 + R2, όπου για κάθε 4ml από το R1 προσθέτω 1ml από το R2.
- Παρασκευάζουμε πρότυπα διαλύματα από το πρότυπο διάλυμα χοληστερόλης. Τα διαλύματα των προτύπων και των αγνώστων δειγμάτων πρέπει να έχουν τελικό όγκο 1040 μl.
- Προστίθενται 1000 μl από το working διάλυμα και επωάζουμε τα διαλύματά μας για 5 min στους 37 °C.
- Προσδιορίζεται η απορρόφηση των προτύπων και των δειγμάτων στα 510 nm.

5.9 Στατιστική επεξεργασία

Η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε με το στατιστικό πρόγραμμα SPSS for Windows 13.0 και με το πρόγραμμα Microsoft Excel. Οι συνεχείς μεταβλητές παρουσιάζονται ως μέσος όρος $\pm$ SEM (Standard error of the mean, σταθερό σφάλμα του μέσου). Ο έλεγχος κανονικότητας των χρησιμοποιούμενων μεταβλητών έγινε με το One-sample Kolmogorov-Smirnov Test. Για να εκτιμήσουμε τις διαφορές στις μεταβολές που παρουσίασαν οι ομάδες μετά 2, 4 και 7 εβδομάδες παρέμβασης, ανάλογα με τη λήψη ή όχι αμινοξέων γλουταμινικού και ασπαραγινικού οξέος σε υπερχοληστερολαιμικά και φυσιολογικά κουνέλια, έγινε σύγκριση των μέσων για κάθε ομάδα με τη χρήση ανάλυσης διακύμανσης για επαναλαμβανόμενες μετρήσεις (Repeated Measures ANOVA). Στην παραπάνω ανάλυση ως μεταξύ των ομάδων παράγοντας (Between-group factor) χρησιμοποιήθηκαν οι υπό εξέταση ομάδες (ομάδα ελέγχου, ομάδα παρέμβασης με χοληστερόλη, ομάδα παρέμβασης με χοληστερόλη και αμινοξέα) ενώ εντός των ομάδων

παράγοντας (Within-group factor) χρησιμοποιήθηκαν οι μετρήσεις στις διάφορες χρονικές στιγμές (εβδομάδα 0, 2, 4 και 7). Ο έλεγχος των γραμμικών συσχετίσεων των συνεχών μεταβλητών πραγματοποιήθηκε με το συντελεστή συσχέτισης του Pearson. Για να εκτιμήσουμε την επίδραση που ασκούν συγχρόνως πάνω στη εξαρτημένη μεταβλητή περισσότερες από μια ανεξάρτητες μεταβλητές πραγματοποιήσαμε πολλαπλή γραμμική παλινδρόμηση (multiple linear regression analysis). Το επίπεδο σημαντικότητας ορίστηκε $p : 0,05$.

Όπως αναφέρθηκε στο κεφάλαιο των αποτελεσμάτων κάποιες από τις μετρήσεις στα κουνέλια δεν ήταν δυνατόν να πραγματοποιηθούν εξαιτίας των προβλημάτων που αντιμετωπίσαμε. Αποφασίστηκε να συμπληρωθούν οι ελλείπουσες τιμές με το ποσοστό της μεταβολής της δραστηριότητας της lyso-PAF AT από τα υπόλοιπα κουνέλια στην ίδια ομάδα και στον ίδιο χρόνο. Έχοντας όλες τις τιμές μπορούμε να εφαρμόσουμε την ανάλυση διακύμανσης για επαναλαμβανόμενες μετρήσεις. Με τον ίδιο τρόπο συμπληρώθηκαν και οι τιμές για την χοληστερόλη μεμβρανών.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

6.1 Εισαγωγή

Η εκτέλεση των πειραμάτων και οι υπολογισμοί που πραγματοποιήθηκαν ώστε να καταλήξουμε στα τελικά αποτελέσματα στηρίχθηκαν σε εγκεκριμένα πρωτόκολλα τα οποία αναφέρονται αναλυτικά στο κεφάλαιο της μεθοδολογίας. Για ανάλυση έγιναν διπλές μετρήσεις σε κάθε δείγμα.

Αναφορικά με τις ομάδες των κουνελιών, οι οποίες διαχωρίστηκαν με βάση την δίαιτα που έλαβαν, αποφασίζουμε την ομάδα κουνελιών στην οποία χορηγήθηκε τυπική δίαιτα κουνελιού να την ονομάζουμε ομάδα ελέγχου ή control, την ομάδα που έλαβε τυπική δίαιτα συμπληρωμένη με χοληστερόλη να την ονομάσουμε ομάδα χοληστερόλης ή chol και την ομάδα που έλαβε τυπική δίαιτα συμπληρωμένη με χοληστερόλη και τα αμινοξέα γλουταμινικό και ασπαραγινικό οξύ να την ονομάζουμε ομάδα χοληστερόλης και αμινοξέων ή chol & A.A.

Οι αιμοληψίες και οι απομονώσεις λευκοκυττάρων που πραγματοποιήθηκαν κατά την διάρκεια της παρέμβασης (0 εβδομάδες, 2 εβδομάδες, 4 εβδομάδες, 7 εβδομάδες) ήταν επιτυχείς στην πλειοψηφία των κουνελιών. Υπήρχαν κουνέλια τα οποία εμφάνισαν προβλήματα στην πήξη του αίματος και δεν κατέστη δυνατή η απομόνωση λευκοκυττάρων σε ορισμένες αιμοληψίες. Συνεπώς, για ορισμένα κουνέλια δεν υπάρχουν κάποιες μετρήσεις κατά τη διάρκεια της παρέμβασης.

6. 2 Προσδιορισμός πρωτεΐνης σε λευκοκύτταρα κουνελιού με την μέθοδο Bradford

Σκοπός του πειράματος ήταν να προσδιορίσουμε την περιεκτικότητα των δειγμάτων σε πρωτεΐνη, ώστε να υπολογιστεί στη συνέχεια η ειδική δραστικότητα του ενζύμου lyso-PAF AT. Παρασκευάσαμε πρότυπα διαλύματα BSA, όπως φαίνεται στο πίνακα 6.1 και με την βοήθεια της πρότυπης καμπύλης αναφοράς, η οποία προέκυψε από τις απορροφήσεις

των διαλυμάτων, υπολογίσαμε την περιεκτικότητα των δειγμάτων σε μg πρωτεΐνης ανά μl ομογενοποιήματος ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$). Τα αποτελέσματα των μετρήσεων φαίνονται στον πίνακα 6.1.

Πίνακας 6.1 Προσδιορισμός πρωτεΐνης σε ομογενοποίηση λευκοκυττάρων με την μέθοδο Bradford.

α/α	0 εβδομάδες		2 εβδομάδες		4 εβδομάδες		7 εβδομάδες	
κωδικός	A(5 $\mu\text{l}/3\mu\text{l}$)	$\mu\text{g}/\mu\text{l}$	A	$\mu\text{g}/\mu\text{l}$	A	$\mu\text{g}/\mu\text{l}$	A	$\mu\text{g}/\mu\text{l}$
23	0,250/0,159	1,225	Δ.Π.	Δ.Π.	0,268	1,74	0,212	1,25
24	Δ.Π*	Δ.Π	0,258	1,66	0,188	1,04	0,222	1,34
25	0,282/0,208	1,56	0,240	1,5	0,118	0,31	0,133	0,56
26	0,325/0,173	1,52	Δ.Π.	Δ.Π.	0,186	1,02	0,220	1,32
27	0,228/0,136	1,045	0,236	1,46	0,275	1,80	0,241	1,50
28	0,305/0,198	1,58	Δ.Π.	Δ.Π.	0,222	1,34	0,194	1,09
29	0,302/0,193	1,545	0,213	1,26	0,186	1,02	0,238	1,48
30	0,235/0,087	1,3	0,251	1,6	0,252	1,6	0,229	1,40
31	0,227/0,129	1,01	0,288	1,92	0,184	1	0,262	1,69
32	0,365/0,249	2,00	0,261	1,68	0,241	1,50	0,209	1,23
33	0,370/0,219	1,87	0,073	0,337	0,216	1,29	0,268	1,74
34	0,298/0,179	1,465	0,213	1,26	0,235	1,45	Δ.Π.	Δ.Π.
35	0,329/0,168	1,5	0,222	1,34	Δ.Π.	Δ.Π.	0,278	1,83
36	Δ.Π.	Δ.Π.	0,134	0,63	0,090	0,36	0,223	1,35
37	0,334/0,224	1,79	0,200	1,15	0,278	1,83	0,260	1,67
38	0,346/0,185	1,63	0,238	1,48	0,267	1,73	Δ.Π.	Δ.Π.
45	0,307/0,192	1,55	0,208	1,22	0,124	0,76	0,226	1,38

46	0,371/0,251	1,86	0,282	1,87	0,247	1,56	0,142	0,74
47	0,316/0,215	1,69	0,241	1,5	0,237	1,47	Δ.Π.	Δ.Π.
48	0,375/0,284	2,2	0,157	0,73	Δ.Π.	Δ.Π.	0,237	1,47

*Δ.Π.: Δεν Προσδιορίστηκαν

6.3 Κινητική μελέτη της δραστηριότητας της lyso-PAF AT σε ομογενοποίηση λευκοκυττάρων κουνελιού

Σκοπός του πειράματος ήταν να προσδιοριστούν οι βέλτιστες συνθήκες μέτρησης της δραστηριότητας lyso PAF AT (ποσότητα πρωτεΐνης, χρόνο επώασης). Για το συγκεκριμένο ενζυμικό τεστ χρησιμοποιήθηκε το δείγμα 48 σε χρόνο μηδέν, από το οποίο δημιουργήθηκαν A1-A8 ενζυμικές δοκιμασίες με ποσότητες πρωτεΐνης 10 μg (4,5 μl) και A9-A16 ενζυμικές δοκιμασίες με ποσότητες πρωτεΐνης 20 μg (9 μl) με τελικό όγκο 200 μl . Οι χρόνοι επώασης που επιλέξαμε ήταν 5, 10, 20 και 30 min, όπως φαίνεται στον παρακάτω πίνακα.

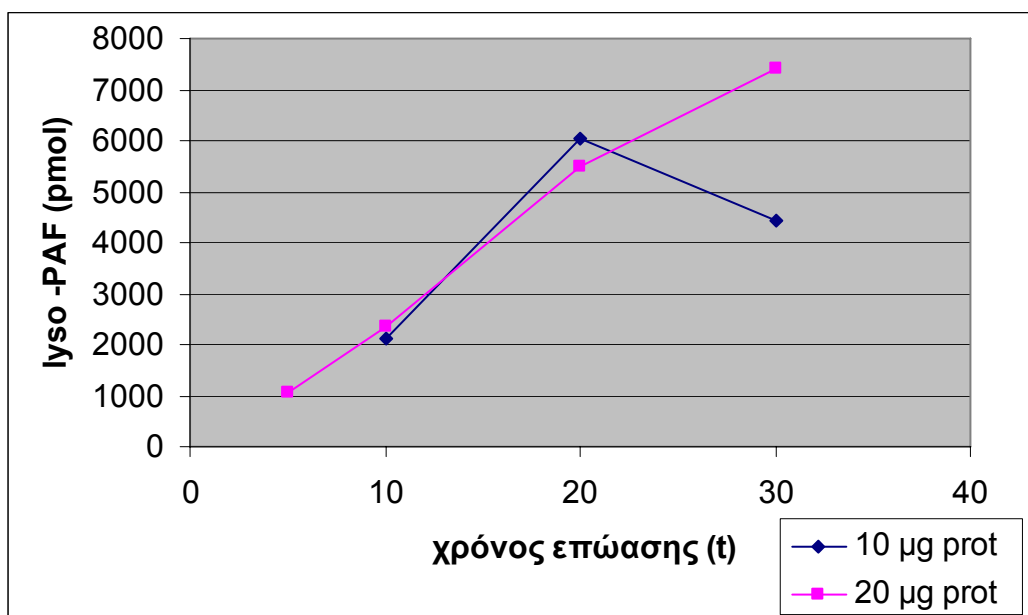
Αφού εκτελέστηκαν όλα τα στάδια προσδιορισμού της δραστηριότητας της lyso-PAF AT, όπως περιγράφηκε στην μεθοδολογία, υπολογίσαμε τα pmoles PAF, όπως φαίνεται στο πίνακα 6.2.

Πίνακας 6.2 Παρασκευή διαλυμάτων από το 48/0t για την κινητική μελέτη της lyso-PAF AT

a/a	Tris (μl)	Lyso- PAF/BSA	Acetyl- CoA (μl)	Buffer αναδιάλυσης	Ποσότητα (μl)	Χρόνος επώασης	pmoles PAF
A1	184	5	2	4,5	10 μg (4,5 μl)	5 min	7315
A2	184	5	2	4,5	10 μg (4,5 μl)	5min	10000
A3	184	5	2	4,5	10 μg (4,5 μl)	10min	2187
A4	184	5	2	4,5	10 μg (4,5 μl)	10min	2023
A5	184	5	2	4,5	10 μg (4,5 μl)	20min	6666
A6	184	5	2	4,5	10 μg (4,5 μl)	20min	5421
A7	184	5	2	4,5	10 μg (4,5 μl)	30min	4409

A8	184	5	2	4,5	10μg(4,5μl)	30min	4487
A9	184	5	2	0	20μg(9 μl)	5min	832,4
A10	184	5	2	0	20μg(9 μl)	5min	1287
A11	184	5	2	0	20μg(9 μl)	10min	2070
A12	184	5	2	0	20μg(9 μl)	10min	2631
A13	184	5	2	0	20μg(9 μl)	20min	5495
A14	184	5	2	0	20μg(9 μl)	20min	Δ.Π.
A15	184	5	2	0	20μg(9 μl)	30min	7081
A16	184	5	2	0	20μg(9 μl)	30min	7782

Από τα παραπάνω αποτελέσματα κατασκευάστηκαν δύο καμπύλες ενδεικτικές της διακύμανσης της δραστηριότητας της lyso-PAF AT στους διάφορους χρόνους επώασης, όπως φαίνονται στο παρακάτω σχήμα. Παρατηρούμε πως η καμπύλη των 20 μg, ενώ ακολουθεί μια ομαλά αυξανόμενη πορεία, σε χρόνο 10 min δίνει περίπου την ίδια δραστηριότητα για την lyso-PAF AT με την ποσότητα 10 μg και στη συνέχεια σε χρόνο 20 min η δραστηριότητα του ενζύμου παρουσιάζεται ελαττωμένη σε σχέση με τα 10 μg γεγονός που μας έκανε να επιλέξουμε τα 10 μg ως ποσότητα πρωτεΐνης που θα χρησιμοποιήσουμε και τα 10 min ως χρόνο επώασης του ενζυμικού παρασκευάσματος.



Σχήμα 6.1 Παραγωγή PAF σε συνάρτηση με το χρόνο επώασης. Τα αποτελέσματα ενζυμικής δοκιμασίας της δραστηριότητας της lyso- PAF AT σε λευκοκύτταρα κουνελιού.

6.4 Μέτρηση της δραστηριότητας της lyso-PAF AT σε ομογενοποίημα λευκοκυττάρων κουνελιού

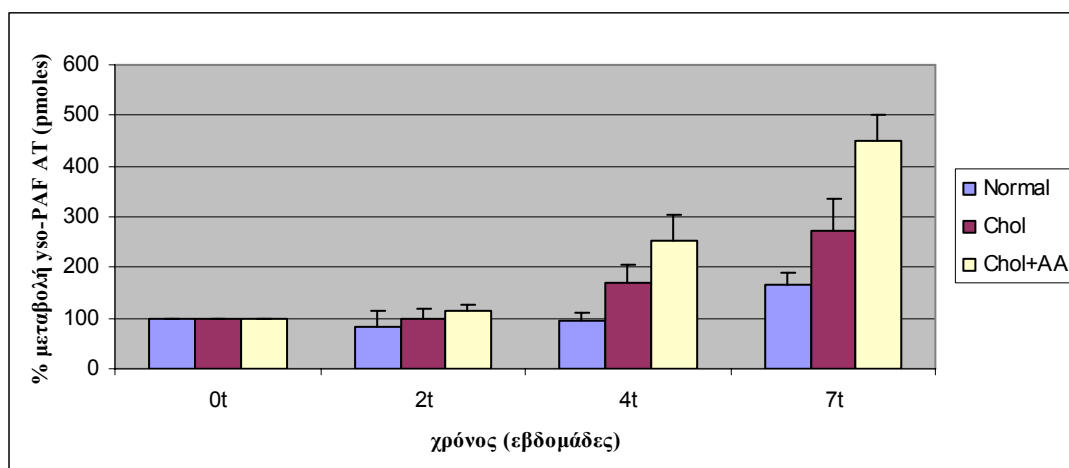
Οι μετρήσεις της δραστηριότητας της lyso-PAF AT στο σύνολο των δειγμάτων πραγματοποιήθηκαν με χρόνο επώασης τα 10 min και ποσότητα πρωτεΐνης τα 10 µg, όπως προέκυψαν από την κινητική μελέτη. Η εξίσωση της πρότυπης καμπύλης αναφοράς του PAF ήταν $Y=4,6784x-2,7404$. Με αυτή υπολογίσαμε την συγκέντρωση των δειγμάτων στη κυψελίδα, στη συνέχεια προσδιορίσαμε τη συγκέντρωση στο σωλήνα και τέλος τα pmoles PAF. Τα αποτελέσματα των μετρήσεων καθώς και η ποσοστιαία μεταβολή της δραστηριότητας της lyso-PAF AT ανά ομάδα φαίνονται παρακάτω.

Πίνακας 6.3 Αποτελέσματα προσδιορισμού της ειδικής δραστηριότητας του ενζύμου lyso-PAF AT σε ομογενοποίηση λευκοκυττάρων κατά την διάρκεια παρέμβασης με και χωρίς αμινοξέα.

Ομάδες / δίαιτες	Lyso-PAF AT (pmole/min/mg)			
Τυπική δίαιτα	0 εβδομάδες	2 εβδομάδες	4 εβδομάδες	7 εβδομάδες
28	2684	Δ.Π.*	3751	6085
38	5321	2540	2541	Δ.Π.
46	10461	6402	2499	10626
48	2095	3046	Δ.Π.	16962
M.O.	5140	3996	5340	9112
SEM	1907	1211	410	3154
Χοληστερόλη	0 εβδομάδες	2 εβδομάδες	4 εβδομάδες	7 εβδομάδες
29	4391	4733	11763	12384
32	4717	4056	11239	23526
33	2800	4880	7771	14553
35	3069	2110	3641	7260
36	Δ.Π.	10053	10829	7709
37	Δ.Π.	6187	4323	15147
45	12442	8574	4950	1616
47	3886	3795	5738	Δ.Π.
M.O.	5217	5548	7532	11742
SEM	1256	926	1179	2662
Χοληστερόλη & αμινοξέα	0 εβδομάδες	2 εβδομάδες	4 εβδομάδες	7 εβδομάδες
23	1914	Δ.Π.	7821	8316
24	4000	4290	4603	13497
25	3647	3399	Δ.Π.	14164
26	4001	Δ.Π.	18730	21038

27	4818	3938	8241	12012
30	3880	7531	14142	16927
31	1447	1403	1176	11103
34	3778	4154	6515	Δ.Π.
MO	3436	4119	8747	13865
SEM	404	730	2232	1565

*Δ.Π.: Δεν Προσδιορίστηκαν



Σχήμα 6.2 Γραφική αναπαράσταση της επί τοις εκατό μεταβολής της δραστηριότητας της lyso-PAF AT σε υπερχοληστερολαιμικά κουνέλια κατά την διάρκεια της παρέμβασης με και χωρίς αμινοξέα σε ομογενοποίημα λευκοκυττάρων κουνελιού. Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως Μ.Ο. ±SEM

Πίνακας 6.4 Επί τοις εκατό μεταβολή της δραστηριότητας της lyso-PAF AT σε ομογενοποίημα λευκοκυττάρων κουνελιού κατά την διάρκεια παρέμβασης με και χωρίς αμινοξέα.

Ομάδες/ Δίαιτες	Επί τοις εκατό μεταβολή της Lyso-PAF AT			
Τυπική δίαιτα	0 εβδομάδες	2 εβδομάδες	4 εβδομάδες	7 εβδομάδες
28	100	Δ.Π.*	139,7	226,7
38	100	47,73	47,75	Δ.Π.
46	100	61,20	23,89	101,6

48	100	145,4	Δ.Π.	809,6
M.O.	100	84,77	93,50	278,5
SEM	0	31,60	18,78	25,54
Χοληστερόλη	0 εβδομάδες	2 εβδομάδες	4 εβδομάδες	7 εβδομάδες
29	100	107,8	267,9	282,0
32	100	86,00	238,3	498,8
33	100	174,2	277,5	519,8
35	100	68,75	118,6	236,6
36	Δ.Π.	Δ.Π.	Δ.Π.	Δ.Π.
37	Δ.Π.	Δ.Π.	Δ.Π.	Δ.Π.
45	100	68,91	39,78	13,00
47	100	97,66	147,66	Δ.Π.
MO	100	107,0	163,0	285,6
SEM	0	16,04	32,38	62,67
Χοληστερόλη & αμινοξέα	0 εβδομάδες	2 εβδομάδες	4 εβδομάδες	7 εβδομάδες
23	100	96,97	408,6	434,5
24	100	107,3	115,1	337,4
25	100	93,20	254,0	388,4
26	100	109,0	468,1	525,8
27	100	81,73	171,0	249,3
30	100	194,1	364,5	436,3
31	100	96,96	81,27	767,3
34	100	110,0	172,4	448,0
MO	100	111,1	254,4	448,4
SEM	0	12,14	50,80	54,04

6.5 Μέτρηση της δραστηριότητας της lyso-PAF AT σε ομογενοποίηση αορτών κουνελιού

Για την μέτρηση της δραστηριότητας της lyso-PAF AT σε ομογενοποίηση αορτών χρησιμοποιήσαμε τις βέλτιστες συνθήκες, όπως προέκυψαν από την κινητική μελέτη της δραστηριότητας της lyso-PAF AT σε ομογενοποίηση λευκοκυττάρων κουνελιού. Αρχικά προσδιορίσαμε την περιεκτικότητα των δειγμάτων σε πρωτεΐνη με τη μέθοδο Bradford και στη συνέχεια προσδιορίσαμε την δραστηριότητα της lyso-PAF AT ακολουθώντας όλα τα στάδια όπως αναφέρεται στο κεφάλαιο της μεθοδολογίας. Τα αποτελέσματα φαίνονται στον πίνακα 6.5.

Πίνακας 6.5 Αποτελέσματα μετρήσεων ειδικής δραστηριότητας της lyso-PAF AT σε ομογενοποίηση αορτών υπερχοληστερολαιμικών κουνελιών στις 7 εβδομάδες παρέμβασης.

Ομάδες / δίαιτες	lyso-PAF AT (pmole/min/mg)
Τυπική δίαιτα	
28	70,75
38	Δ.Π*
46	39,80
48	39,55
Χοληστερόλη	
29	16,55
32	1410
33	21,40
35	148,1
36	90,50
37	484,6
45	43,00
47	19,40

Χοληστερόλη & αμινοξέα	
23	23,55
24	424,8
25	Δ.Π.
26	11,65
27	23,95
30	437,3
31	170,6
34	64,40

**Δ.Π.: Δεν Προσδιορίστηκαν*

6.6 Μέτρηση χοληστερόλης και πρωτεΐνης σε μεμβράνες λευκοκυττάρων κουνελιού

Αρχικά στα διαλύματα μεμβρανών λευκοκυττάρων κουνελιού μετρήθηκε με τη μέθοδο Bradford η περιεκτικότητα των δειγμάτων σε πρωτεΐνη προκειμένου να κανονικοποιήσουμε τα δείγματά μας. Παρασκευάσαμε πρότυπα διαλύματα BSA, από τα οποία προέκυψε η πρότυπη καμπύλη αναφοράς και η εξίσωση $A=0,0308x-0,003$ με την οποία υπολογίσαμε την περιεκτικότητα των δειγμάτων. Σε όλα τα δείγματα παρασκευάστηκαν διπλά διαλύματα και η τελική τιμή προέκυψε από το μέσο όρο των διπλών δειγμάτων. Τα αποτελέσματα φαίνονται στον πίνακα 6.6.

Στη συνέχεια, μετρήσαμε την περιεκτικότητα σε χοληστερόλη με ειδικό kit. Αρχικά, παρασκευάσαμε πρότυπα διαλύματα από το standard χοληστερόλης (5, 2, 1, 0,5 μl) με τελικό όγκο 1040 μl, όπως φαίνεται στον πίνακα 6.7. Η εξίσωση από την καμπύλη ήταν $A=0,1516x-0,0246$. Υπολογίσαμε την χοληστερόλη των διαλυμάτων μεμβρανών και στη συνέχεια τη διαιρέσαμε προς την περιεκτικότητα του κάθε δείγματος σε πρωτεΐνη, όπως μετρήθηκε με τη μέθοδο Bradford. Τα αποτελέσματα φαίνονται στον πίνακα 6.8.

Πίνακας 6.6 Αποτελέσματα προσδιορισμού πρωτεΐνης σε μεμβράνες λευκοκυττάρων κουνελιού κατά την διάρκεια παρέμβασης με και χωρίς αμινοξέα

Ομάδες/ Δίαιτες	Πρωτεΐνη σε μεμβράνες λευκοκυττάρων (μg/mL)			
Τυπική δίαιτα	0 εβδομάδες	2 εβδομάδες	4 εβδομάδες	7 εβδομάδες
28	0,831	Δ.Π*	1,02	0,980
38	Δ.Π	0,811	1,27	Δ.Π
46	1,14	0,974	1,68	0,753
48	0,980	0,214	Δ.Π	0,785
Χοληστερόλη	0 εβδομάδες	2 εβδομάδες	4 εβδομάδες	7 εβδομάδες
29	0,669	0,617	0,642	0,824
32	0,954	0,799	1,38	0,987
33	1,31	0,214	0,778	0,805
35	0,857	0,864	0,285	1,06
36	Δ.Π	0,448	0,500	0,948
37	0,818	0,766	1,49	0,870
45	0,883	1,05	0,558	1,04
47	0,545	0,870	1,15	Δ.Π
Χοληστερόλη & αμινοξέα	0 εβδομάδες	2 εβδομάδες	4 εβδομάδες	7 εβδομάδες
23	0,578	Δ.Π	1,17	0,584
24	Δ.Π	1,53	0,623	0,480
25	0,351	0,993	0,357	0,883
26	0,552	Δ.Π	0,558	0,772
27	0,331	0,941	0,902	0,551
30	0,272	1,81	1,12	0,883
31	0,493	1,62	0,656	0,727
34	0,539	0,325	1,02	Δ.Π

*Δ.Π.: Δεν Προσδιορίστηκαν

Πίνακας 6.7 Παρασκευή πρότυπων διαλυμάτων χοληστερόλης από το standard ειδικού kit

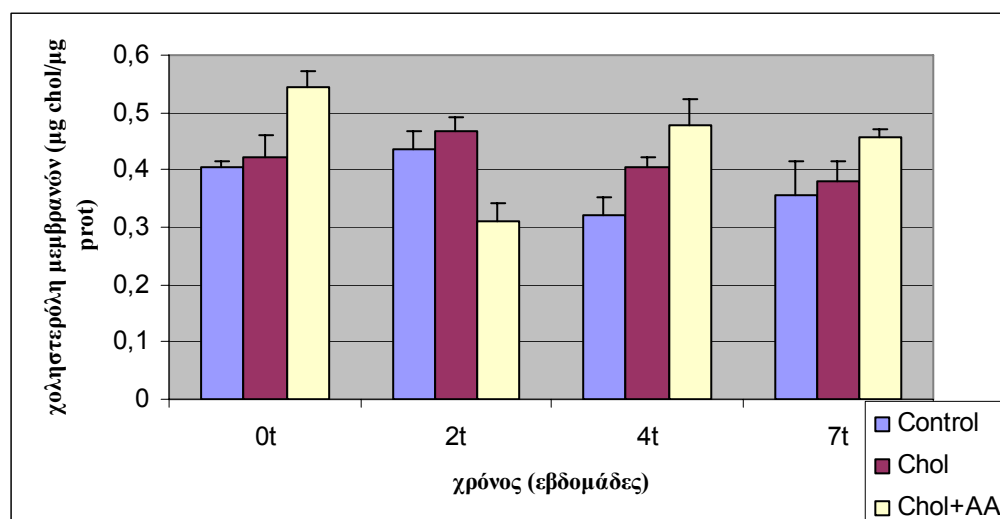
a/a	R ₁ +R ₂ (μl)	H ₂ O (μl)	Std chol (μl)	510 nm
S1	1000	40	0,5	0,041
S2	1000	39	1	0,056
S3	1000	38	2	0,077
S4	1000	35	5	0,172
T	1000	40	-	

Πίνακας 6.8 Αποτελέσματα προσδιορισμού του λόγου χοληστερόλης/πρωτεΐνης σε μεμβράνες λευκοκυττάρων κουνελιού κατά την διάρκεια παρέμβασης με και χωρίς αμινοξέα.

Ομάδες / Δίαιτες	Χοληστερόλη /πρωτεΐνη μεμβρανών (μg chol/μg prot)			
Τυπική δίαιτα	0 εβδομάδες	2 εβδομάδες	4 εβδομάδες	7 εβδομάδες
28	0,420	Δ.Π*	0,300	0,309
38	Δ.Π	0,386	0,380	0,380
46	0,378	0,499	0,284	0,290
48	0,412	0,900	Δ.Π	0,473
MO	0,404	0,595	0,322	0,357
SEM	0,024	0,041	0,038	0,041
Χοληστερόλη	0 εβδομάδες	2 εβδομάδες	4 εβδομάδες	7 εβδομάδες
29	0,527	0,544	0,397	0,415
32	0,325	0,493	0,384	0,362
33	0,363	0,526	0,418	0,461
35	0,399	0,317	0,696	0,341
36	Δ.Π	0,485	0,225	0,379
37	0,488	0,550	0,367	0,350
45	0,432	0,347	0,426	0,362

47	0,427	0,480	0,339	Δ.Π
MO	0,424	0,468	0,406	0,382
SEM	0,023	0,031	0,047	0,019
Χοληστερόλη & αμινοξέα	0 εβδομάδες	2 εβδομάδες	4 εβδομάδες	7 εβδομάδες
23	0,631	Δ.Π	0,420	0,384
24	Δ.Π	0,281	0,464	0,606
25	0,614	0,345	0,459	0,370
26	0,499	0,400	0,558	0,441
27	0,666	0,378	0,541	0,512
30	0,527	0,215	0,459	0,374
31	0,517	0,276	0,480	0,509
34	0,361	0,360	0,438	Δ.Π
MO	0,545	0,309	0,477	0,457
SEM	0,034	0,024	0,017	0,037

*Δ.Π.: Δεν Προσδιορίστηκαν

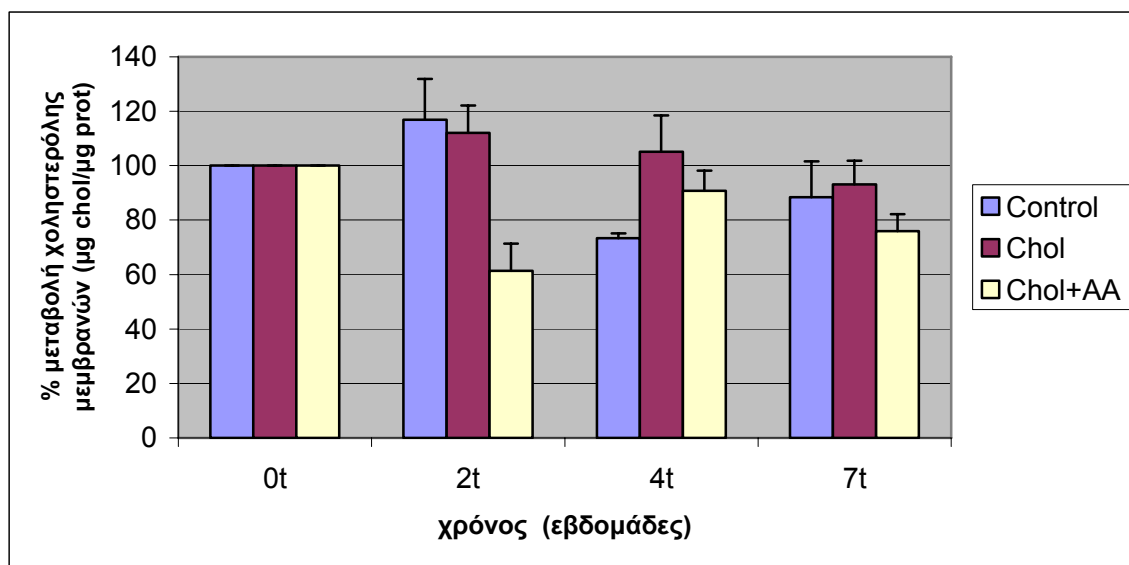


Σχήμα 6.3 Γραφική αναπαράσταση της μεταβολής του λόγου χοληστερόλης/πρωτεΐνη σε μεμβράνες λευκοκυττάρων κουνελιού (μg chol/μg prot) σε υπερχοληστερολαιμικά κουνέλια κατά την διάρκεια παρέμβασης με και χωρίς αμινοξέα. Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως Μ.Ο. ± SEM

Πίνακας 6.9 Επί τοις εκατό μεταβολή της χοληστερόλης μεμβρανών σε ομογενοποίηση λευκοκυττάρων κουνελιού κατά την διάρκεια παρέμβασης με και χωρίς αμινοξέα.

Ομάδες /Δίαιτες	% μεταβολή χοληστερόλης μεμβρανών(μgchol/μgprot)			
Τυπική δίαιτα	0 εβδομάδες	2 εβδομάδες	4 εβδομάδες	7 εβδομάδες
28	100	100,0	100,1	103
38	100	101,6	100,1	100
46	100	131,9	75,14	76,78
48	100	101,9	109,1	114,7
MO	100	108,9	96,11	98,62
SEM	0	15,02	1,810	13,21
Χοληστερόλη	0 εβδομάδες	2 εβδομάδες	4 εβδομάδες	7 εβδομάδες
29	100	103,2	75,31	78,82
32	100	151,8	118,1	111,6
33	100	144,7	115,0	126,9
35	100	79,31	174,2	85,30
36	100	112,2	52,08	87,75
37	100	112,8	75,21	71,80
45	100	80,32	98,52	83,76
47	100	112,5	79,54	89,52
MO	100	112,1	98,50	91,95
SEM	0	10	13,37	8,7
Χοληστερόλη & αμινοξέα	0 εβδομάδες	2 εβδομάδες	4 εβδομάδες	7 εβδομάδες
23	100	60,24	66,60	60,80
24	100	50,16	82,88	108,2
25	100	56,17	74,82	60,32
26	100	80,18	111,9	88,43
27	100	56,78	81,21	76,89

30	100	40,69	87,02	70,95
31	100	53,36	92,86	98,39
34	100	99,61	121,2	77,48
MO	100	62,15	89,81	80,18
SEM	0	10	7,4	6,2



Σχήμα 6.4 Γραφική αναπαράσταση της επί τοις εκατό μεταβολής της χοληστερόλης μεμβρανών (μg chol/μg prot) από λευκοκύτταρα κουνελιού κατά την διάρκεια παρέμβασης με χοληστερόλη με και χωρίς αμινοξέα. Τα δεδομένα προέρχονται από Μ.Ο. των μετρήσεων. ± SEM.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7

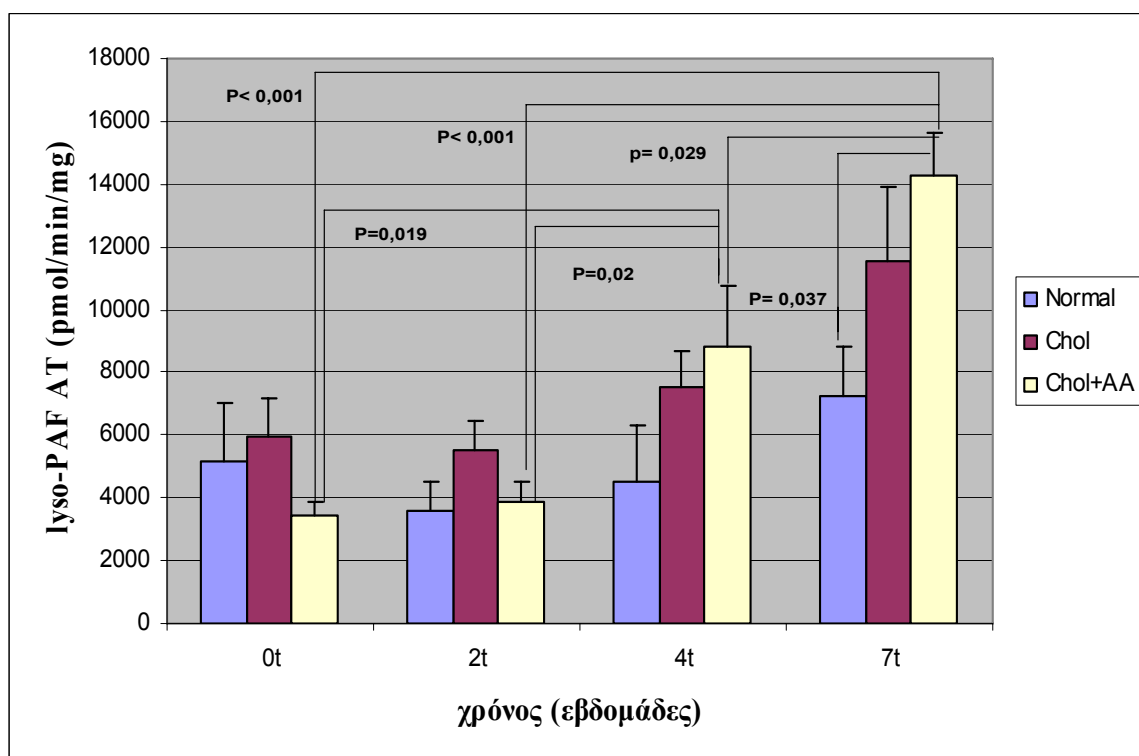
ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

7.1 Έλεγχος κανονικότητας

Η κανονικότητα των χρησιμοποιούμενων μεταβλητών lyso-PAF AT λευκοκυττάρων κουνελιού και χοληστερόλη μεμβρανών σε ομογενοποίημα λευκοκυττάρων κουνελιού σε 0, 2, 4 και 7 εβδομάδες καθώς και η lyso-PAF AT στις αορτές ελέγχθηκε με το κριτήριο Kolmogorov-Smirnov. Το p για την κάθε μία από τις μεταβλητές ήταν μεγαλύτερο του 0,05, το οποίο σημαίνει ότι δεν απορρίπτεται η μηδενική υπόθεση H_0 , συνεπώς η κανονικότητα ισχύει.

7.2 Επίδραση της παρέμβασης με και χωρίς αμινοξέα στη δραστικότητα της lyso-PAF AT σε λευκοκύτταρα κουνελιού

Από το παρακάτω γράφημα παρατηρούμε πως η παρέμβαση με και χωρίς αμινοξέα σε υπερχοληστερολαιμικά κουνέλια έχει επίδραση στην δραστικότητα της lyso-PAF AT. Πιο συγκεκριμένα η δραστικότητα της lyso-PAF AT εμφανίζει αυξητική τάση και μετά τη λήψη χοληστερόλης (ομάδα χοληστερόλης) και μετά τη λήψη χοληστερόλης και αμινοξέων. Η λήψη χοληστερόλης και αμινοξέων οδηγεί σε αύξηση της δραστικότητας της lyso-PAF AT, η οποία εμφανίζεται μεγαλύτερη σε σχέση με την ομάδα που έλαβε μόνο χοληστερόλη.



Σχήμα 7.1 Γραφική αναπαράσταση της επίδρασης της παρέμβασης με και χωρίς αμινοξέα στη δραστικότητα της lyso-PAF AT. Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως Μ.Ο. ±SEM

Για να εκτιμηθεί η στατιστική σημαντικότητα των παραπάνω παρατηρήσεων εκτελέσαμε την ανάλυση διακύμανσης για επαναλαμβανόμενες μετρήσεις (Repeated Measures ANOVA). Η μόνη στατιστική σημαντική διαφορά για τη δραστικότητα της lyso-PAF AT μεταξύ των ομάδων φαίνεται να είναι μεταξύ της ομάδας που έλαβε τυπική διαίτα (ομάδας ελέγχου) και της ομάδας που έλαβε χοληστερόλη και αμινοξέα σε χρόνο 7 εβδομάδες με p ίσο με 0,037 ($<0,05$).

Ο έλεγχος για την ύπαρξη διαφοράς στη δραστικότητα της lyso-PAF AT εντός των ομάδων κατά μήκος του χρόνου πραγματοποιήθηκε με ανάλυση διακύμανσης για επαναλαμβανόμενες μετρήσεις αναλύοντας τα αποτελέσματά μας ανά ομάδα. Με τον τρόπο αυτό ισχύει η προϋπόθεση για τη δομή του πίνακα διακυμάνσεων- συνδιακυμάνσεων για την ομάδα ελέγχου και για την ομάδα που χορηγήθηκε χοληστερόλη και αμινοξέα με p ίσο με 0,969 και 0,073 αντίστοιχα, ενώ για την ομάδα που χορηγήθηκε χοληστερόλη το p είναι 0,002.

Όπως φαίνεται και από τη παραπάνω γραφική αναπαράσταση, δεν υπήρχε στατιστική σημαντική διαφορά στις διάφορες χρονικές στιγμές για την ομάδα ελέγχου ($p > 0,05$) και την

ομάδα που έλαβε χοληστερόλη. Ενώ η ομάδα που έλαβε χοληστερόλη και αμινοξέα παρουσίασε στατιστικά σημαντικές διαφορές στις μέσες τιμές της δραστηριότητας της lyso-PAF AT λευκοκυττάρων κατά μήκος του χρόνου εμφανίζοντας στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των χρόνων: μηδέν με 4 εβδομάδες, μηδέν με 7 εβδομάδες και 2 με 4 εβδομάδων και 2 με 7 εβδομάδες παρέμβασης, με τα αντίστοιχα p που παρουσιάζονται στην γραφική αναπαράσταση.

7.3 Συσχέτιση της δραστηριότητα της lyso-PAF AT των λευκοκυττάρων κουνελιού με βιοχημικούς δείκτες στους διάφορους χρόνους παρέμβασης

Στο σημείο αυτό φάνηκε χρήσιμο να πραγματοποιήσουμε ανάλυση συσχέτισης της δραστηριότητα της lyso-PAF AT λευκοκυττάρων κουνελιού με διάφορους βιοχημικούς και ιστολογικούς δείκτες στις διάφορες χρονικές στιγμές. Στη συνέχεια, για τις στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις που παρατηρήθηκαν από τον παραπάνω έλεγχο πραγματοποιήσαμε ανάλυση πολλαπλής γραμμικής παλινδρόμησης προκειμένου να διερευνηθούν οι στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις βάζοντας συγχυτικούς παράγοντες. Τα αποτελέσματα των συσχετίσεων φαίνονται στους παρακάτω πίνακες (7.1, 7.2, 7.3, 7.4).

Στο σύνολο των κουνελιών και σε χρόνο μηδέν εβδομάδες υπάρχει αρνητική στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ της δραστηριότητας της lyso-PAF AT λευκοκυττάρων κουνελιού και της HDL-C με συντελεστή συσχέτισης -0,592 και με $p=0,020$ και αρνητική στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ της δραστηριότητας της lyso-PAF AT λευκοκυττάρων κουνελιού και της ολικής χοληστερόλης (total chol) με συντελεστή συσχέτισης -0,562 και $p=0,024$, ενώ αυτές οι στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις δεν παρατηρούνται όταν ο έλεγχος πραγματοποιείτε στις αντίστοιχες ομάδες, της χοληστερόλης και της χοληστερόλης & αμινοξέα (πίνακας 7.1)

Ο αντίστοιχος έλεγχος της δραστηριότητας της lyso-PAF AT λευκοκυττάρων κουνελιού με τους βιοχημικούς δείκτες σε χρόνο δύο εβδομάδες εμφάνισε θετική στατιστικά σημαντική συσχέτιση με την γ -GT με συντελεστή συσχέτισης 0,612 στο σύνολο των κουνελιών και $p=0,045$, ενώ η θετική αυτή σημαντική συσχέτιση διατηρήθηκε και έγινε πιο ισχυρή στην ομάδα της χοληστερόλης & αμινοξέων με συντελεστή συσχέτισης 1 και $p<0,001$ (πίνακας 7.2).

Σε χρόνο τέσσερις εβδομάδες ο έλεγχος της συσχέτισης της δραστηριότητας της lyso-PAF AT λευκοκυττάρων κουνελιού με βιοχημικούς δείκτες δεν έδειξε κάποια στατιστικά σημαντική συσχέτιση τόσο στο σύνολο των κουνελιών όσο και στις ομάδες (πίνακας 7.3).

Πίνακας 7. 1 Συσχέτιση της δραστηριότητα της lyso-PAF AT λευκοκυττάρων κουνελιού με βιοχημικούς δείκτες σε χρόνο μηδέν εβδομάδες.

Βιοχημικοί δείκτες	Σύνολο κουνελιών	Ομάδες	
		Χοληστερόλη N=8	Χοληστερόλη& A.A N=8
0 εβδομάδες	N=20		
chol μεμβρανών	r =-0,169 p=0,477	r =0,203 p=0,629	r =0,020 p=0,956
γ-GT	r = 0,003 p=0,990	r =0,437 p=0,327	r =-0,535 p=0,274
TG	r = -0,212 p= 0,430	r =-0,304 p=0,508	r =-0,795 p=0,056
HDL-C	r = -0,592 p= 0,020*	r =-0,110 p=0,836	r =-0,713 p=0,112
total chol	r =-0,562 p= 0,024*	r =-0,380 p=0,401	r =-0,380 p=0,401

* η συσχέτιση είναι στατιστικά σημαντική με Pearson συσχετισμό, $p < 0,05$

Πίνακας 7. 2 Συσχέτιση της δραστηριότητα της lyso-PAF AT λευκοκυττάρων κουνελιού με βιοχημικούς δείκτες σε χρόνο 2 εβδομάδες.

Βιοχημικοί δείκτες	Σύνολο κουνελιών	Ομάδες	
		Χοληστερόλη N=8	Χοληστερόλη& A.A N=8
2 εβδομάδες	N=20		
chol μεμβρανών	r =0,251 p=0,285	r =0,286 p=0,493	r =-0,119 p=0,77
γ-GT	r = 0,612 p= 0,045*	r =0,600 p=0,285	r =1 p= 0,000 *
TG	r =- 0,314 p= 0,226	r =-0,70 p=0,188	r =-0,051 p=0,935
HDL-C	r = 0,006 p=0,985	r =-0,10 p=0,873	r =0,205 p=0,741
total chol	r =0,123 p=0,703	r =-0,2 p=0,747	r =-0,4 p=0,6

* η συσχέτιση είναι στατιστικά σημαντική με Pearson συσχετισμό, $p < 0,05$

Πίνακας 7. 3 Συσχέτιση της δραστηριότητας της lyso-PAF AT λευκοκυττάρων κουνελιού με βιοχημικούς δείκτες σε χρόνο 4 εβδομάδες.

Βιοχημικοί δείκτες	Σύνολο κουνελιών	Ομάδες	
		Χοληστερόλη N=8	Χοληστερόλη& A.A N=8
4 εβδομάδες	N=20		
chol μεμβρανών	r =0,003 p=0,989	r =-0,357 p=0,385	R =0,190 p=0,651
γ-GT	r =0,265 p=0,321	r =-0,250 p=0,589	R =0,314 p=0,540
TG	r =-0,064 p=0,813	r =-0,400 p=0,374	R =-0,029 p=0,957
HDL-C	r =-0,123 p=0,651	r =-0,364 p=0,423	R =0,516 p=0,295
total chol	r =0,214 p=0,425	r =-0,107 p=0,81	R =0,429 p=0,397

Σε χρόνο επτά εβδομάδες εκτός από την συσχέτιση με τους βιοχημικούς δείκτες πραγματοποιήθηκε συσχέτιση και με ιστολογικούς δείκτες. Από τον έλεγχο στο σύνολο των κουνελιών παρατηρήθηκαν θετικές στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις ανάμεσα στη δραστηριότητα της lyso-PAF AT λευκοκυττάρων κουνελιού και της lyso-PAF AT των αορτών με συντελεστή συσχέτισης 0,576 ($p=0,012$) και της HDL-C με συντελεστή συσχέτισης 0,583 ($p=0,023$) και της ολικής χοληστερόλης με συντελεστή συσχέτισης 0,595 ($p=0,019$). Ο αντίστοιχος έλεγχος συσχέτισης στις ομάδες δεν έδειξε καμία στατιστικά σημαντική συσχέτιση (πίνακας 7.4)

Πίνακας 7. 4 Συσχέτιση της δραστηριότητας της lyso-PAF AT λευκοκυττάρων κουνελιού με βιοχημικούς δείκτες και ιστολογικούς δείκτες σε χρόνο 7 εβδομάδες.

Βιοχημικοί και ιστολογικοί δείκτες 7 εβδομάδες	Σύνολο κουνελιών	Ομάδες	
		Χοληστερόλη N=8	Χοληστερόλη& A.A N=8
Chol μεμβρανών	r =0,041 p=0,864	r =0,180 p=0,670	R =-0,381 p=0,352
Lyso-PAF AT αορτών	r =0,576 p= 0,012*	r =0,310 p=0,456	r =0,071 p=0,879
γ-GT	r =-0,128 p=0,663	r =-0,543 p=0,266	r =-0,600 p=0,285
TG	r =0,506 p=0,056	r =0,543 p=0,266	r =-0,200 p=0,704

HDL-C	r =0,583 p= 0,023*	r =0,609 p=0,2	r =0,203 p=0,7
total chol	r =0,595 p= 0,019*	r =0,536 p=0,215	r =-0,2 p=0,704
GSH total	r =-0,631 p=0,069	r =-0,6 p=0,285	r =-0,8 p=0,2
Intima m	r =0,303 p=0,339	r =0,464 p=0,294	r =0,200 p=0,747
Intima t	r =0,435 p=0,157	r =0,250 p=0,589	r =0,200 p=0,742
Intima a	r =-0,164 p=0,610	r =-0,143 p=0,760	r =-0,3 p=0,624
TBARS	r =0,067 p=0,845	r =0,2 p=0,704	r =-0,3 p=0,624

* η συσχέτιση είναι στατιστικά σημαντική με Pearson συσχετισμό, $p < 0,05$

7.4 Πολλαπλή γραμμική παλινδρόμηση

Για τις παραπάνω στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις πραγματοποιήθηκε ανάλυση πολλαπλής γραμμικής παλινδρόμησης (multiple linear regression analysis) προκειμένου να διερευνηθεί αν η στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις επηρεάζονται από άλλες μεταβλητές. Τα αποτελέσματα τα οποία δείχνουν τη σχέση μεταξύ της lyso-PAF AT λευκοκυττάρων (εξαρτημένη μεταβλητή) με τις αντίστοιχες ανεξάρτητες μεταβλητές σε διάφορες χρονικές στιγμές φαίνονται στους παρακάτω πίνακες.

Σε χρόνο μηδέν εβδομάδες, η στατιστικά σημαντική σχέση που παρατηρήθηκε από τον έλεγχο συσχετίσεων διατηρείται στατιστικά σημαντική ($p=0,047$) με τη χρήση των μεταβλητών γ-GT, TG και χοληστερόλη μεμβρανών ως συγχυτικούς παράγοντες. Συνεπώς, καμία από τις μεταβλητές δεν επηρεάζει τη στατιστικά σημαντική σχέση της δραστηριότητας της lyso-PAF AT και της ολικής χοληστερόλης (πίνακας 7.5).

Πίνακας 7.5 Σχέση μεταξύ της δραστηριότητας της lyso-PAF AT λευκοκυττάρων (εξαρτημένη μεταβλητή) και της ολικής χοληστερόλης (ανεξάρτητη μεταβλητή) σε χρόνο 0 εβδομάδες στο σύνολο των κουνελιών.

Βιοχημικοί δείκτες	β	SE	P
0 εβδομάδες			
Total chol	-0,569	44,8	0,047*
Chol μεμβρανών	-0,22	7647	0,389
γ-GT	0,348	261,7	0,236
TG	0,298	36,4	0,311

* η σχέση είναι στατιστικά σημαντική, $p < 0,05$

Στις δύο εβδομάδες παρέμβασης η στατιστικά σημαντική σχέση που παρατηρήθηκε μεταξύ της δραστηριότητας της lyso-PAF AT και της γ -GT ($p=0,045$) επηρεάζεται από τις μεταβλητές TG, χοληστερόλη μεμβρανών των λευκοκυττάρων και την ολική χοληστερόλη ($p > 0,05$)

Πίνακας 7.6 Σχέση μεταξύ της δραστηριότητας της lyso-PAF AT λευκοκυττάρων (εξαρτημένη μεταβλητή και της γ -GT (ανεξάρτητη μεταβλητή) στις 2 εβδομάδες στο σύνολο των κουνελιών.

Βιοχημικοί δείκτες	β	SE	P
2 εβδομάδες			
γ-GT	0,711	82,7	0,106
Chol μεμβρανών	-0,210	6005	0,485
TG	0,470	24,1	0,243
Total chol	-0,096	2,7	0,810

Στις επτά εβδομάδες παρέμβασης, παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές σχέσεις (Pearson) της δραστηριότητας της lyso-PAF AT λευκοκυττάρων κουνελιού με την HDL-C ($p=0,023$) και τη total chol ($p=0,019$). Για να διερευνηθεί αν αυτή η σχέση παραμένει στατιστικά σημαντική πραγματοποιήσαμε ανάλυση γραμμικής παλινδρόμησης προσθέτοντας κάθε φορά μια μεταβλητή που πιθανόν να επηρεάζε τη σχέση, ως συγχυτικός

παράγοντας στη σχέση μεταξύ της δραστηριότητας της lyso-PAF AT και HDL-C και lyso-PAF AT και total chol αντίστοιχα. Από την εκτέλεση των παραπάνω ενεργειών παρατηρήθηκαν κάποιες μεταβλητές που επηρέαζαν τις σχέσεις και κάποιες που δεν επηρέασαν ή τις καθιστούσαν πιο ισχυρές. Οι μεταβλητές που δεν επηρέασαν τη στατιστικά σημαντική σχέση της lyso-PAF AT και της HDL-C είναι η γ -GT, η χοληστερόλη μεμβρανών λευκοκυττάρων κουνελιού (chol μεμβρανών) και το πάχος του έσω χιτώνα της κοιλιακής αορτής (intima a) και τα αντίστοιχα p για τη σχέση της lyso-PAF AT και HDL-C είναι 0,016, 0,03 και 0,038, ενώ οι μεταβλητές που δεν επηρέασαν τη δεύτερη σχέση είναι η χοληστερόλη μεμβρανών λευκοκυττάρων κουνελιού (chol μεμβρανών) και η γ -GT με τα αντίστοιχα p για τη σχέση της lyso-PAF AT και chol να είναι 0,026 και 0,012 ($p < 0,05$).

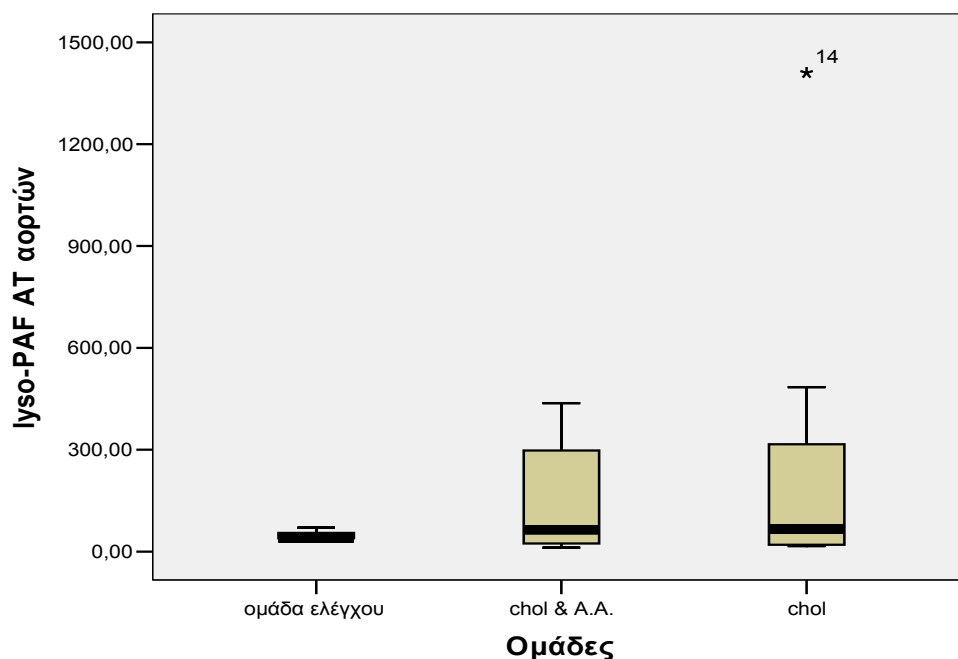
Ακόμα, πραγματοποιήθηκε πολλαπλή γραμμική παλινδρόμηση για την διερεύνηση της σχέσης της lyso-PAF AT και της chol με συγχυτικούς παράγοντες τις μεταβλητές TG, γ -GT και τη χοληστερόλη μεμβρανών λευκοκυττάρων κουνελιού (chol μεμβρανών). Από την ανάλυση παρατηρούμε πως το p για τη σχέση αλλάζει ($p > 0,05$), συνεπώς τα TG επηρεάζουν τη σχέση της lyso-PAF AT των λευκοκυττάρων και της chol. Τα αποτελέσματα φαίνονται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 7.7 Σχέση μεταξύ της δραστηριότητας lyso-PAF AT λευκοκυττάρων κουνελιού (εξαρτημένη μεταβλητή) και της total chol (ανεξάρτητη μεταβλητή) στο σύνολο των κουνελιών στις 7 εβδομάδες παρέμβασης.

Βιοχημικοί δείκτες	β	SE	P
7 εβδομάδες			
Total chol	1,018	7,56	0,215
γ-GT	-0,508	78,3	0,114
Chol μεμβρανών	-0,237	25259	0,419
TG	-0,256	146,4	0,745

Σχόλιο: Αν βγάλουμε τα TG τότε το p για την σχέση παραμένει στατιστικά σημαντικό

7.5 Συσχέτιση της δραστηριότητας της lyso-PAF AT σε ομογενοποίημα αορτών κουνελιού (7 εβδομάδες) με βιοχημικούς και ιστολογικούς δείκτες



Σχήμα 7.2 Γραφική αναπαράσταση των διαμέσων τιμών της δραστηριότητας της lyso-PAF AT των αορτών των τριών ομάδων κουνελιών.

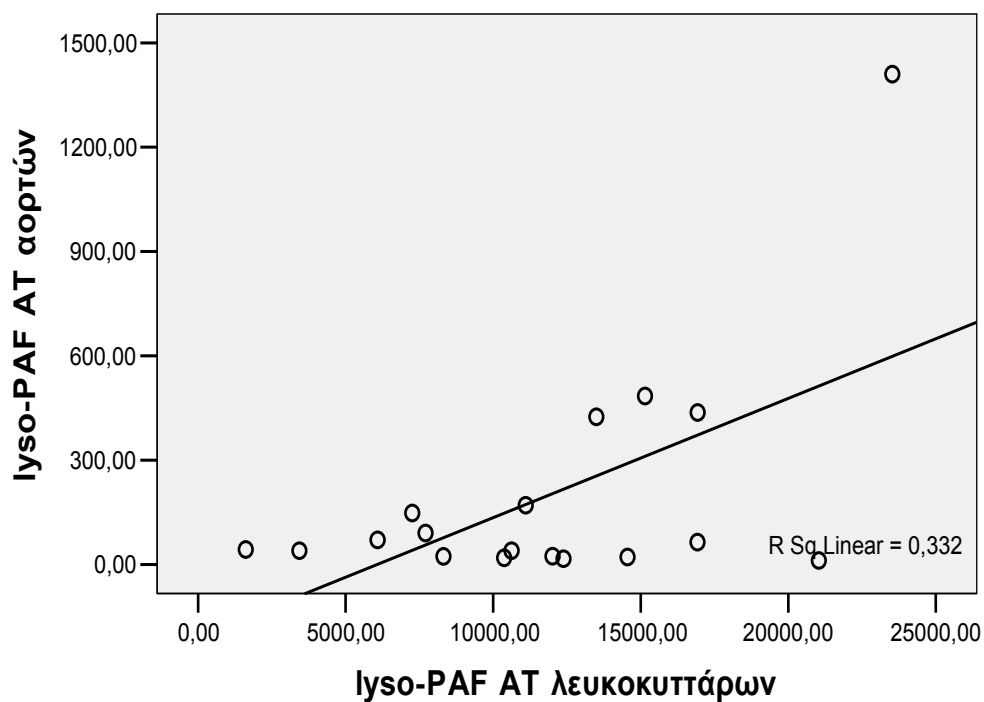
Από τον Πίνακα 6.5 παρατηρούμε πως η δραστηριότητα της lyso-PAF AT στις αορτές είναι αυξημένη σε σχέση με την ομάδα ελέγχου σε 4 από τα 8 κουνέλια της ομάδας της χοληστερόλης (2-28 φορές) και σε 4 από 7 κουνέλια της ομάδας χοληστερόλη και αμινοξέα (1,5-9 φορές). Στα υπόλοιπα κουνέλια η δραστηριότητα παρέμεινε περίπου στα ίδια επίπεδα σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Για να ελέγξουμε αν αυτή η διαφορά στην αύξηση της δραστηριότητας της lyso-PAF AT μεταξύ των ομάδων παρέμβασης είναι στατιστικά σημαντική συγκρίναμε τους μέσους με την ανάλυση ANOVA για έναν παράγοντα (one way ANOVA). Το p για την ύπαρξη διαφοράς μεταξύ των ομάδων παρέμβασης είναι μεγαλύτερο του 0,05, συνεπώς η διαφορά που παρατηρήθηκε από το διάγραμμα δεν είναι στατιστικά σημαντική. Στο ίδιο αποτέλεσμα καταλήξαμε και με τον έλεγχο t -test για ανεξάρτητα δείγματα. ($p > 0,05$).

Από την συσχέτιση της δραστηριότητας της lyso-PAF AT σε ομογενοποίημα αορτών με βιοχημικούς και ιστολογικούς δείκτες στο σύνολο των κουνελιών παρατηρήθηκαν οι εξής στατιστικά σημαντικές σχέσεις: θετική γραμμική συσχέτιση μεταξύ της lyso-PAF AT αορτών και HDL-C με συντελεστή συσχέτισης 0,643 ($p=0,003$), θετική γραμμική συσχέτιση μεταξύ της lyso-PAF AT αορτών και του πάχους του έσω χιτώνα της θωρακικής αορτής (intima t) με συντελεστή συσχέτισης 0,677 ($p=0,016$) και θετική γραμμική συσχέτιση μεταξύ της lyso-PAF AT αορτών και lyso-PAF AT λευκοκυττάρων με συντελεστή συσχέτισης 0,571 ($p=0,02$). Οι σχέσεις αυτές διατηρούνται στατιστικά σημαντικές και στην ομάδα που έλαβε χοληστερόλη ($r=0,828$, $p=0,042$), ($r=0,807$, $p=0,028$), ($r=0,779$, $p=0,023$). Τα αποτελέσματα φαίνονται αναλυτικά στον πίνακα 7.8.

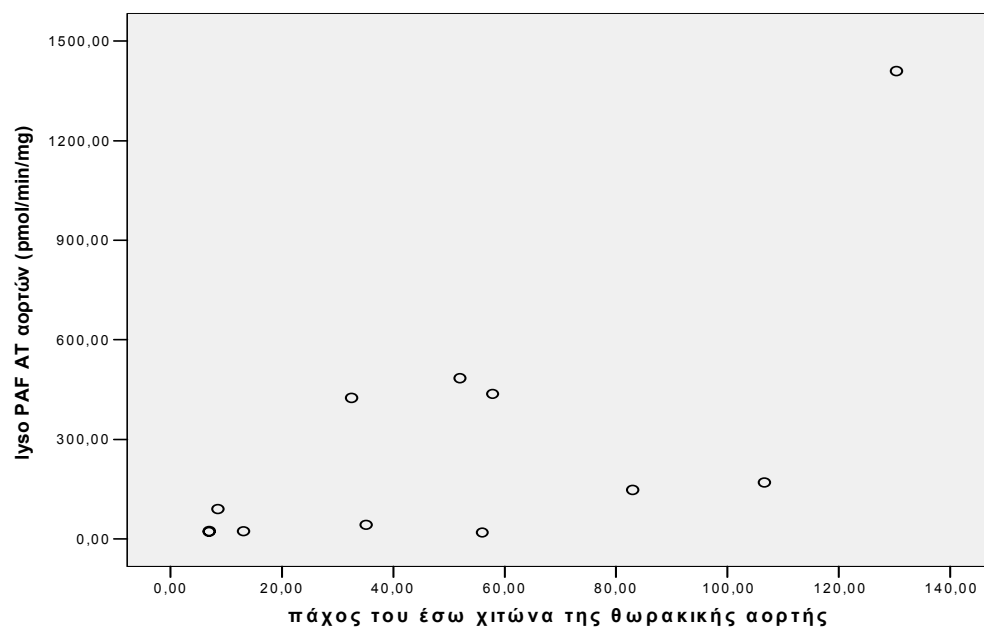
Πίνακας 7.8 Συσχέτιση της δραστηριότητας της lyso-PAF AT αορτών με βιοχημικούς και ιστολογικούς δείκτες στις επτά εβδομάδες παρέμβασης.

Βιοχημικοί και ιστολογικοί δείκτες 7 εβδομάδες	Σύνολο κουνελιών	Ομάδες	
	N=18	Χοληστερόλη N=8	Χοληστερόλη & A.A N=7
γ-GT	$r=0,047$ $p=0,896$	$r=-0,139$ $p=0,793$	$r=-0,304$ $p=0,696$
TG	$r=0,533$ $p=0,092$	$r=0,665$ $p=0,151$	$r=0,359$ $p=0,553$
HDL-C	$r=0,643$ $p=0,033^*$	$r=0,828$ $p=0,042^*$	$r=0,287$ $p=0,640$
Total chol	$r=0,530$ $p=0,076$	$r=0,709$ $p=0,075$	$r=0,305$ $p=0,618$
Gsh total	$r=-0,621$ $p=0,075$	$r=-0,588$ $p=0,297$	$r=-0,801$ $p=0,199$
Intimam	$r=0,550$ $p=0,064$	$r=0,720$ $p=0,068$	$r=0,226$ $p=0,714$
Intima t	$r=0,677$ $p=0,016^*$	$r=0,807$ $p=0,028^*$	$r=0,326$ $p=0,592$
Intima a	$r=-0,027$ $p=0,934$	$r=-0,041$ $p=0,930$	$r=-0,033$ $p=0,957$
Tbars	$r=-0,327$ $p=0,327$	$r=-0,289$ $p=0,578$	$r=-0,488$ $p=0,405$
lyso-PAF AT λευκοκυττάρων	$r=0,571$ $p=0,02^*$	$r=0,779$ $p=0,023^*$	$r=0,072$ $p=0,874$

* η συσχέτιση είναι στατιστικά σημαντική με Pearson συσχετισμό, $p < 0,05$



Σχήμα 7.3 Γραφική αναπαράσταση της θετικής γραμμικής συσχέτισης της δραστηριότητας της lyso-PAF AT αορτών και της lyso-PAF AT λευκοκυττάρων κουνελιού.



Σχήμα 7.4 Γραφική αναπαράσταση της θετικής γραμμικής συσχέτισης της δραστηριότητας της lyso-PAF AT αορτών και του πάχους του έσω χιτώνα της θωρακικής αορτής

Για όλες τις στατιστικά σημαντικές σχέσεις που παρατηρήθηκαν παραπάνω εκτελέσαμε γραμμική παλινδρόμηση για την lyso-PAF AT αορτών και HDL-C, το πάχος του έσω χιτώνα της θωρακικής αορτής (intima t) και lyso-PAF AT λευκοκυττάρων αντίστοιχα, βάζοντας κάθε φορά έναν συγχυτικό παράγοντα για να ελέγξουμε αν η στατιστικές σημαντικές σχέσεις θα διατηρηθούν. Για την σχέση μεταξύ της δραστηριότητας της lyso-PAF AT σε ομογενοποίηση αορτών και lyso-PAF AT λευκοκυττάρων (7 εβδομάδες) όταν βάζαμε ένα ένα τις μεταβλητές, όλες οι μεταβλητές διατήρησαν τη σχέση στατιστικά σημαντική ($p < 0,05$). Στη συνέχεια πραγματοποιήσαμε πολλαπλή γραμμική παλινδρόμηση επιλέγοντας τις μεταβλητές ολική χοληστερόλη (total chol), γ -GT και TBARS οι οποίες επηρέασαν τη σχέση. Τα αποτελέσματα φαίνονται στο πίνακα 7.9.

Πίνακας 7.9 Σχέση μεταξύ της δραστηριότητας lyso-PAF AT αορτών (εξαρτημένη μεταβλητή) και Lyso-PAF AT λευκοκυττάρων (ανεξάρτητη μεταβλητή) στο σύνολο των κουνελιών στις 7 εβδομάδες παρέμβασης.

Βιοχημικοί δείκτες	β	SE	P
lyso-PAF AT λευκοκυττάρων	0,818	0,021	0,225
Total chol	0,272	0,137	0,504
γ -GT	0,330	5,2	0,620
TBARS	-0,324	3,4	0,456

*Αν βγάλουμε το tbars τότε το p για την σχέση παραμένει στατιστικά σημαντικό

Ακριβώς το ίδιο πραγματοποιήσαμε και για την διερεύνηση της στατιστικά σημαντικής σχέσης μεταξύ της lyso-PAF AT αορτών και HDL-C. Από την γραμμική παλινδρόμηση που πραγματοποιήσαμε με κάθε ένα συγχυτικό παράγοντα ξεχωριστά μόνο η ολική γλουταθειόνη (gshtotal) και το πάχος του έσω χιτώνα της κοιλιακής αορτής (intima a) διατήρησαν την στατιστικά σημαντική σχέση με τα αντίστοιχα p για την σχέση lyso-PAF AT και HDL-C να είναι 0,040 και 0,028 ($p < 0,05$). Στη συνέχεια πραγματοποιήσαμε πολλαπλή γραμμική παλινδρόμηση επιλέγοντας ως συγχυτικούς παράγοντες τις μεταβλητές TG,

TBARS και το πάχος του έσω χιτώνα της θωρακικής αορτής (intima t) όπου η σχέση δεν παρέμεινε στατιστικά σημαντική ($p > 0,05$), όπως φαίνεται στον πίνακα 7.10.

Πίνακας 7.10 Σχέση μεταξύ της δραστηριότητας lyso-PAF AT αορτών (εξαρτημένη μεταβλητή) και της HDL-C (ανεξάρτητη) στο σύνολο των κουνελιών στις επτά εβδομάδες παρέμβασης.

Βιοχημικοί και ιστολογικοί δείκτες	B	SE	P
HDL-C	0,981	23,4	0,476
TG	-0,141	6,49	0,890
TBARS	-0,444	4,5	0,395
Intima t	-0,319	4,3	0,703

Το ίδιο επιτελέστηκε και για την τελευταία στατιστική σημαντική σχέση μεταξύ της lyso-PAF AT αορτών και το πάχος του έσω χιτώνα της θωρακικής αορτής (intimat). Οι μεταβλητές lyso-PAF AT λευκοκυττάρων, γ -GT, gsh total και intima a δεν επηρεάζουν τη παραπάνω σχέση. Τα αντίστοιχα p είναι 0,049, 0,023, 0,03 και 0,011. Στη συνέχεια πραγματοποιήσαμε πολλαπλή γραμμική παλινδρόμηση επιλέγοντας ως συγχυτικούς παράγοντες τις μεταβλητές TBARS, ολική χοληστερόλη και γ -GT, όπου οι μεταβλητές αυτές επηρέασαν τη σχέση ($p > 0,05$).

Πίνακας 7.11 Σχέση μεταξύ της δραστηριότητας lyso-PAF AT αορτών και του πάχους του έσω χιτώνα της θωρακικής αορτής (intima t) στο σύνολο των κουνελιών στις επτά εβδομάδες

Βιοχημικοί και ιστολογικοί δείκτες	B	SE	P
Intima t	0,527	3,65	0,518
TBARS	-0,569	3,42	0,228
Total chol	0,085	0,28	0,916
γ-GT	-0,453	3,26	0,305

Στο σημείο αυτό θα ήταν σημαντικό να αναφερθεί ότι η μεταβλητή lyso-PAF AT σε ομογενοποίηση αορτών περιείχε μια ακραία τιμή στην ομάδα της χοληστερόλης, η οποία όταν αφαιρέθηκε είχε σαν αποτέλεσμα την απώλεια όλων των στατιστικά σημαντικών σχέσεων. Ωστόσο, το συγκεκριμένο κουνέλι που εμφάνισε αυτή την ακραία τιμή στη δραστηριότητα της lyso-PAF AT αορτών εμφάνισε και μεγάλη δραστηριότητα lyso-PAF AT λευκοκυττάρων και μεγαλύτερο πάχος του έσω χιτώνα στη θωρακική αορτή (intima t) (σχήμα 7.3 και 7.4), γεγονός καθόλου τυχαίο, και θεωρήθηκε σημαντικό οι στατιστικές αναλύσεις να συμπεριλαμβάνουν και το συγκεκριμένο κουνέλι.

Ενδεικτικά παρουσιάζεται ο πίνακας των συσχετίσεων της δραστηριότητας της lyso-PAF AT αορτών με βιοχημικούς και ιστολογικούς δείκτες σε επτά εβδομάδες παρέμβασης χωρίς να λαμβάνεται υπόψη η ακραία τιμή. Από τον πίνακα 7.12 παρατηρείται θετική γραμμική στατιστικά σημαντική συσχέτιση της δραστηριότητας της lyso-PAF AT αορτών με τα TG ($r = 0,560$, $p = 0,046$) και αρνητική γραμμική συσχέτιση με την γλουταθειόνη ($r = -0,793$, $p = 0,019$) στο σύνολο των κουνελιών, ενώ στην ομάδα της χοληστερόλης παρατηρούνται στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις της δραστηριότητας της lyso-PAF AT με την γλουταθειόνη ($r = -0,951$, $p = 0,049$) και του πάχους του έσω χιτώνα της κοιλιακής αορτής ($r = 0,828$, $p = 0,042$).

Πίνακας 7.12 Συσχέτιση της δραστηκότητας της lyso-PAF AT αορτών με βιοχημικούς και ιστολογικούς δείκτες χωρίς να συμπεριλαμβάνεται το κουνέλι που εμφάνισε ακραία τιμή δραστηκότητας της lyso-PAF AT αορτών.

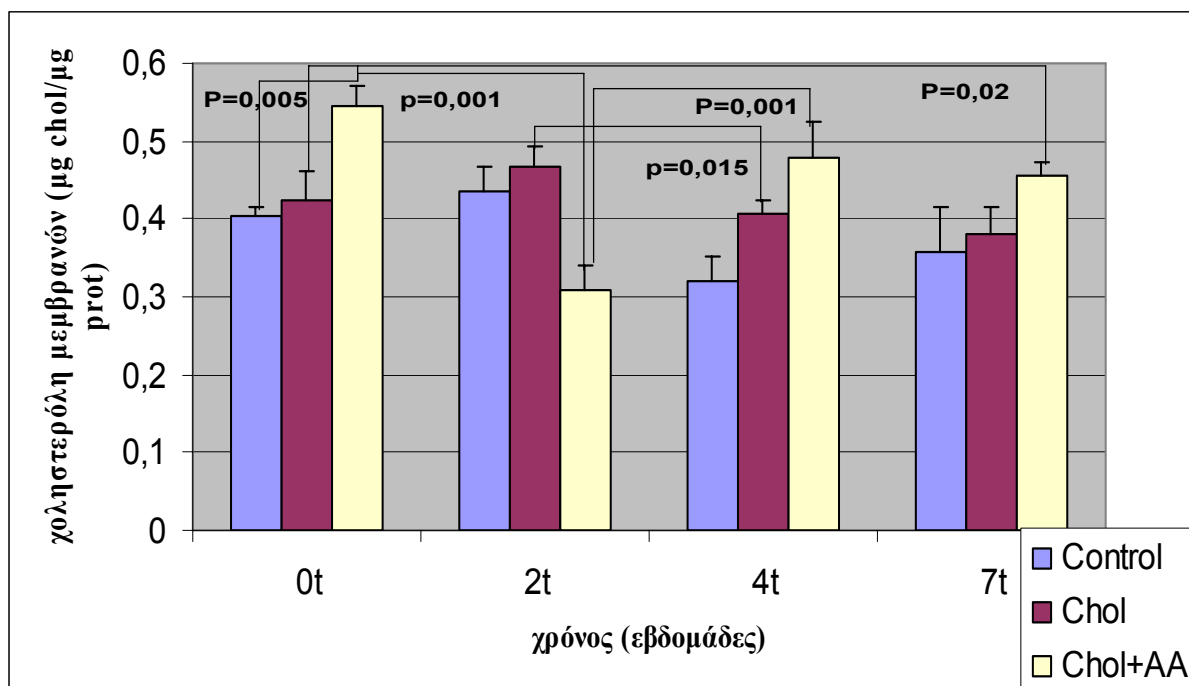
Βιοχημικοί και ιστολογικοί δείκτες 7 εβδομάδες	Σύνολο κουνελιών	Ομάδες	
	N=17	Χοληστερόλη N=7	Χοληστερόλη & A.A N=7
γ-GT	r =0,110 p=0,734	r =-0,074 p=0,906	r =-0,304 p=0,696
TG	r=0,560 p= 0,046*	r =0,609 p=0,276	r =0,359 p=0,553
HDL-C	r =0,520 p=0,069	r =0,587 p=0,298	r =0,287 p=0,640
Total chol	r = 0,496 p=0,085	r =0,518 p=0,292	r =0,305 p=0,618
Gsh total	r=-0,793 p= 0,019*	r =-0,951 p= 0,049*	r =-0,801 p=0,199
Intima m	r =0,381 p=0,247	r =0,608 p=0,2	r =0,226 p=0,714
Intima t	r = 0,326 p=0,327	r =0,324 p=0,531	r =0,326 p=0,592
Intima a	r = 0,390 p=0,236	r =0,828 p= 0,042*	r =-0,033 p=0,957
Tbars	r =-0,327 p=0,327	r =-0,289 p=0,578	r =-0,488 p=0,405
lyso-PAF AT λευκοκυττάρων	r =0,310 p=0,226	r =0,369 p=0,416	r =0,072 p=0,874

7.6 Μεταβολή της χοληστερόλη των μεμβρανών των λευκοκυττάρων κουνελιού κατά την διάρκεια παρέμβασης με και χωρίς αμινοξέα.

Από την ανάλυση διακύμανσης σε επαναλαμβανόμενες μετρήσεις για την μεταβλητή χοληστερόλη μεμβρανών λευκοκυττάρων κουνελιού παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές εντός των ομάδων στις ακόλουθες ομάδες: α) στην ομάδα χοληστερόλη μεταξύ των 2 και των 4 εβδομάδων παρέμβασης (p=0,015) και β) στην ομάδα χοληστερόλη & αμινοξέα μεταξύ των μηδέν και 2 εβδομάδων παρέμβασης (p= 0,001), μηδέν και 7 εβδομάδων (p=0,02) και μεταξύ 2 και 4 εβδομάδων παρέμβασης (p=0,001).

Στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομάδων σε χρόνο μηδέν εβδομάδες παρατηρήθηκαν: α) μεταξύ της ομάδας που χορηγήθηκε χοληστερόλη & αμινοξέα και της ομάδας που χορηγήθηκε χοληστερόλη ($p=0,005$) και β) της ομάδας ελέγχου με την ομάδα που χορηγήθηκε χοληστερόλη & αμινοξέα ($p=0,001$). Σε χρόνο 2 εβδομάδων στατιστικά σημαντική διαφορά παρατηρήθηκε μεταξύ των ομάδων χοληστερόλη & αμινοξέα και χοληστερόλη ($p=0,003$). Δεν παρατηρήθηκαν άλλες στατιστικά σημαντικές διαφορές στους ακόλουθους χρόνους. Κάποιες από τις στατιστικά σημαντικές σχέσεις φαίνονται παρακάτω.

Ακόμα δεν υπήρξε συσχέτιση της δραστηριότητας του ενζύμου στα λευκοκύτταρα με τη χοληστερόλη μεμβρανών των λευκοκυττάρων ούτε συσχέτιση χοληστερόλης ορού με χοληστερόλη μεμβρανών λευκοκυττάρων.



Σχήμα 7.5 Γραφική αναπαράσταση της επίδρασης της παρέμβασης με και χωρίς αμινοξέα στη χοληστερόλη μεμβρανών των λευκοκυττάρων κουνελιού.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

8.1 Εμπλοκή του PAF στην αθηρογένεση - σημασία της lyso-PAF AT

Ο παράγοντας ενεργοποίησης αιμοπεταλίων (1-O-άλκυλο-2-ακέτυλο-sn-γλυκερύλο-3-φωσφοχολίνη, PAF) είναι ένας πιθανός τοπικός μεσολαβητής που εμπλέκεται στην φλεγμονή, στην αγγειογένεση, την αναφυλαξία, στη κατάσταση ισχαιμίας/επαναιμάτωσης και στην αθηρογένεση. Συντίθεται από ποικίλα κύτταρα, συμπεριλαμβανομένου των μονοκυττάρων/ μακροφάγων, αιμοπεταλίων και ενδοθηλιακών κυττάρων. Δρα μέσω G-πρωτεϊνικού υποδοχέα συνδεδεμένο στην πλασματική μεμβράνη των κυττάρων ασκώντας αυτοκρινείς και παρακρινείς δράσεις που προάγουν την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων, την χημειοταξία των λευκοκυττάρων και την αγγειακή διαπερατότητα και την συστολή των λείων μυϊκών κυττάρων. Μελέτες έχουν τεκμηριώσει την σύνθεση του PAF από ανθρώπινα ουδετερόφιλα ως αποτέλεσμα φυσικού ή χημικού στρες [75]. Η καρδιά, ο εγκέφαλος και άλλα όργανα παράγουν PAF κατά την διάρκεια καταστάσεων ισχαιμίας /επαναιμάτωσης.

Μελέτες, έχουν δείξει ότι ερεθίσματα όπως η ενεργοποίηση της φαγοκυττάρωσης, η οποία φαίνεται να είναι σημαντικό χαρακτηριστικό για την ανάπτυξη της αθηροσκληρωτικής πλάκας, οδηγούν σε σύνθεση του PAF στις λιποειδείς γραμμώσεις, τόσο από τα μακροφάγα όσο και από τα μακροφάγα που μετασχηματίζονται σε αφρώδη κύτταρα. Στις μελέτες αυτές έχει τεκμηριωθεί ότι ο μεταβολισμός του PAF στα μακροφάγα είναι παρόμοιος με αυτόν στα αφρώδη κύτταρα, γεγονός που καταδεικνύει ότι ο μεταβολισμός του PAF είναι ανεξάρτητος από το περιεχόμενο των κυττάρων σε χοληστερόλη. Ακόμα, στην μελέτη αυτή παρατηρήθηκε πως η δραστηριότητα της lyso-PAF AT ήταν αυξημένη τόσο στα μακροφάγα όσο και στα αφρώδη κύτταρα [76].

Τα επίπεδα του PAF στον οργανισμό καθορίζονται από την σχετική δράση των ενζύμων που τον συνθέτουν και αυτών που των αποικοδομούν και υποφυσιολογικές καταστάσεις βρίσκονται κάτω από αυστηρό έλεγχο. Αξίζει να τονιστεί ότι έχουν γίνει πολλές μελέτες που εστιάζουν στη δράση της PAF ακετυλουδρολάσης, το ένζυμο που αποικοδομεί τον PAF, ενώ καμία μελέτη τόσο σε επίπεδο πειραματόζων όσο και ανθρώπων για τον προσδιορισμό της δραστηριότητας της lyso-PAF AT (το ένζυμο που καταλύει την ακετυλίωση

του lyso-PAF στη remodeling πορεία βιοσύνθεσης του PAF) στις αθηρογόνες διεργασίες δεν έχει πραγματοποιηθεί ακόμα, αν και είναι γνωστό ότι η δραστηριότητα του ενζύμου ενεργοποιείται κάτω από φλεγμονώδη ερεθίσματα και θα ήταν σημαντικό να διερευνηθεί και αυτή η πτυχή στη διαδικασία της αθηρογένεσης.

8.2 Ο συνδυασμός του L-ασπαραγινικού και L-γλουταμινικού

Η χρησιμοποίηση του συγκεκριμένου συνδυασμού των αμινοξέων L-ασπαραγινικού και L-γλουταμινικού στην παρέμβασή μας στηρίχθηκε στα αποτελέσματα ερευνών που πραγματοποίησε η Α.Ε. Υαννί και συνεργάτες, οι οποίες έδειξαν ότι ο συγκεκριμένος συνδυασμός παρεμποδίζει την προσκόλληση των μονοκυττάρων και τη συσσώρευση των αφρωδών κυττάρων στην αορτή υπερχοληστερολαιμικών κουνελιών. Συνεπώς, η χορήγηση L-ασπαραγινικού και L-γλουταμινικού προλαμβάνει την ανάπτυξη των αθηρωματικών αλλοιώσεων [44, 53].

Το L-γλουταμινικό οξύ είναι απαραίτητο για την σύνθεση της GSH, ένα μόριο που δρα ως εκκαθαριστής ελεύθερων ριζών, το οποίο μπορεί να αποτελεί ένα πιθανό μηχανισμό της ευεργετικής δράσης του.

Συνοψίζοντας, το συγκεκριμένο ένζυμο σε κυτταρικό επίπεδο ενεργοποιείται από οξειδωτικά και φλεγμονώδη ερεθίσματα τόσο στα ενδοθηλιακά όσο και στα λευκοκύτταρα και θεωρήθηκε ενδιαφέρον να προσδιοριστεί η δραστηριότητά του σε παρέμβαση που στηρίζεται στην αντιοξειδωτική δράση των αμινοξέων L-γλουταμινικού και L-ασπαραγινικού οξέος προκειμένου να διερευνηθεί η επίδραση των αμινοξέων αυτών στη δραστηριότητα του ενζύμου lyso-PAF AT.

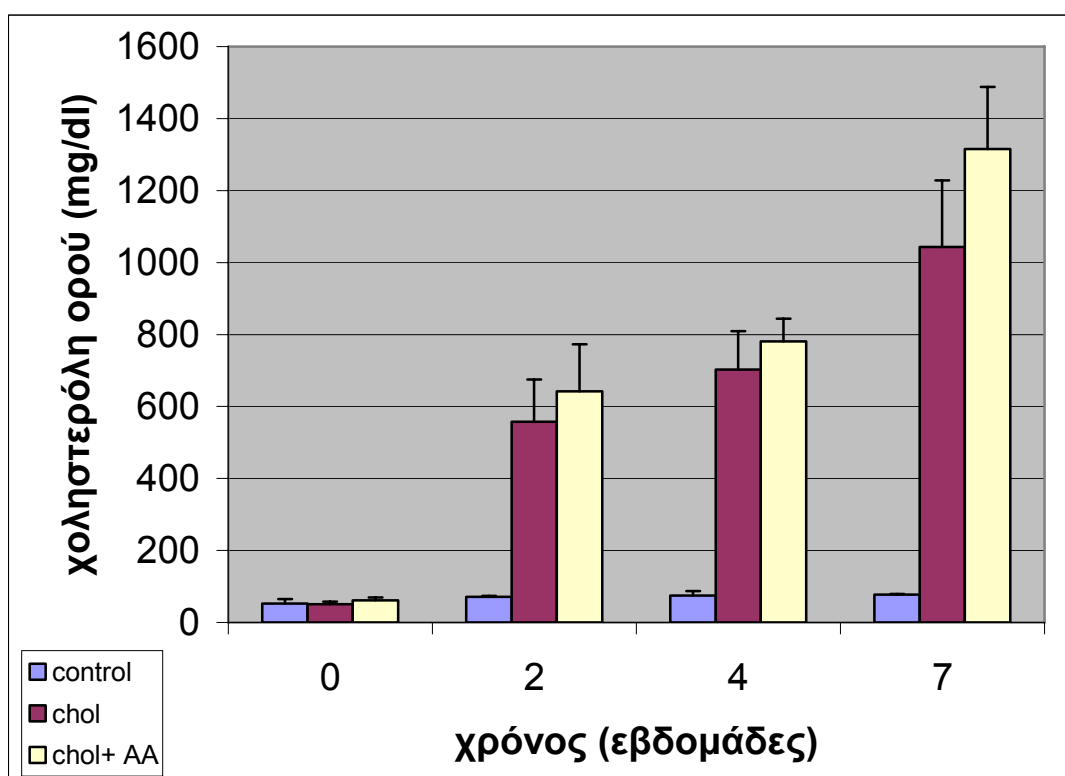
8.3 Επίδραση της παρέμβασης με και χωρίς αμινοξέα στη δραστηριότητα της lyso-PAF AT των λευκοκυττάρων

Κατά την παρέμβαση (7 εβδομάδες) με και χωρίς τα αμινοξέα L-ασπαραγινικού και L-γλουταμινικού οξέος παρατηρείται σταδιακά μια αύξηση της δραστηριότητας του ενζύμου lyso-PAF AT των λευκοκυττάρων κουνελιού τόσο στην ομάδα της χοληστερόλης όσο και στην ομάδα της χοληστερόλης και αμινοξέα, χωρίς να υπάρχει στατιστικά σημαντική

διαφορά μεταξύ των δύο ομάδων παρέμβασης. Φάνηκε ότι η υπερχοληστερολαιμία επάγει σταδιακή αύξηση της δραστηριότητας του ενζύμου lyso-PAF AT στα λευκοκύτταρα.

Πιο αναλυτικά, στις 7 εβδομάδες παρέμβασης παρατηρείται μια αύξηση της δραστηριότητας του ενζύμου lyso-PAF AT στα λευκοκύτταρα περίπου 4 φορές στην ομάδα των κουνελιών που έλαβε χοληστερόλη και αμινοξέα και περίπου 3 φορές στην ομάδα των κουνελιών που έλαβε μόνο χοληστερόλη σε σχέση με τις μηδέν εβδομάδες παρέμβασης, χωρίς ωστόσο να φαίνεται ότι τα αμινοξέα L-ασπαραγινικό και L-γλουταμινικό οξύ επηρεάζουν την μεταβολή της δραστηριότητας αυτής.

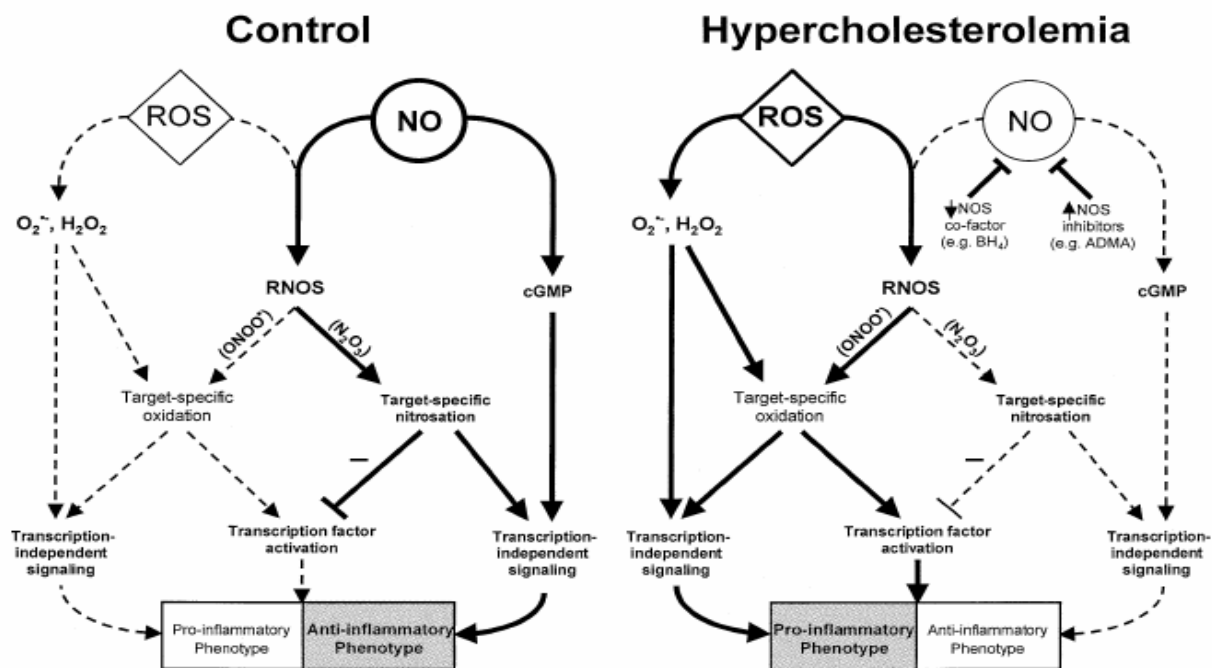
Αυτό μπορεί να εξηγηθεί από το γεγονός ότι κατά την διάρκεια των 7 εβδομάδες παρέμβασης με χοληστερόλη τα κουνέλια της ομάδας χοληστερόλη και αμινοξέα εμφάνισαν και μεγαλύτερα επίπεδα χοληστερόλης ορού σε σχέση με την ομάδα των κουνελιών που έλαβε μόνο χοληστερόλη, όπως φαίνεται στο παρακάτω σχήμα.



Σχήμα 8.1 Γραφική αναπαράσταση της μεταβολής της χοληστερόλης ορού στις τρεις ομάδες κουνελιών κατά την διάρκεια της παρέμβασης

Μελέτες έχουν δείξει πως η υπερχοληστερολαιμία προκαλεί φαινοτυπικές αλλαγές στη μικροκυκλοφορία που σχετίζονται με το οξειδωτικό στρες και την φλεγμονώδη

απάντηση. Συγκεκριμένα, η υπερχοληστερολαιμία οδηγεί σε μετάβαση από το αντιφλεγμονώδες φαινότυπο που παρατηρείται σε νορμοχοληστερολαιμικά επίπεδα στη γένεση προφλεγμονώδους φαινοτύπου μέσω της μετατόπισης της ισορροπίας μεταξύ των επιπέδων του NO και ROS προς τα ROS με αποτέλεσμα την επιμήκυνση των φλεγμονωδών δράσεων [77], όπως φαίνεται στο σχήμα 8.2.



Σχήμα 8.2 Γεγονότα που μπορούν να οδηγήσουν στην μετάβαση από το αντιφλεγμονώδες φαινότυπο σε νορμοχοληστερολαιμικά επίπεδα (αριστερά) σε προφλεγμονώδες φαινότυπο κατά την υπερχοληστερολαιμία (δεξιά).

Ακόμα έχει δείχτει ότι η μικροκυκλοφορία των υπερχοληστερολαιμικών ζώων εμφανίζει άμεση και μέγιστη απάντηση σε πειράματα με φλεγμονώδη ερεθίσματα, όπως κυτοκίνες (TNF-α και η IL-1) και σε καταστάσεις ισχαιμίας /επαναιμάτωσης. Μελέτες έχουν δείξει ότι ο TNF-α και η IL-1 μπορούν να ενεργοποιήσουν την δραστικότητα του ενζύμου lyso-PAF AT στα ουδετερόφιλα και ενδοθηλιακά κύτταρα αντίστοιχα [78, 79].

Το αν τα αμινοξέα αυτά έχουν οδηγήσει σε μείωση του οξειδωτικού στρες κατά την υπερχοληστερολαιμία στο επίπεδο της μικροκυκλοφορίας δεν είναι γνωστό από την μελέτη αυτή γιατί δεν έχουν μετρηθεί δείκτες οξειδωτικού στρες στη συστηματική κυκλοφορία, άρα δεν μπορούμε να γνωρίζουμε ότι αυτή η αδυναμία των αμινοξέων L-ασπαραγινικού και L-

γλουταμινικού οξέος να μειώσει τη δράση της lyso-PAF AT των λευκοκυττάρων οφείλεται στην αδυναμία τους να μειώσουν το οξειδωτικό στρες.

8.4 Χοληστερόλη μεμβρανών λευκοκυττάρων κουνελιού

Φαίνεται ότι η οποιαδήποτε επίδραση της υπερχοληστερολαιμίας στη δραστικότητα της lyso-PAF AT των λευκοκυττάρων δεν οφείλεται στις μεταβολές της χοληστερόλης μεμβρανών των λευκοκυττάρων, αφού η χοληστερόλη ορού δεν σχετίζεται με την χοληστερόλη μεμβρανών καθώς και η χοληστερόλη μεμβρανών των λευκοκυττάρων δεν σχετίζεται με τη δραστικότητα της lyso-PAF AT των λευκοκυττάρων, αν και είναι γνωστό ότι η lyso-PAF AT είναι μεμβρανικό ένζυμο και θα μπορούσε να επηρεάζεται από αυτή. Είναι αξιοσημείωτο ότι παρατηρήθηκε μείωση της χοληστερόλης μεμβρανών των λευκοκυττάρων στις δύο εβδομάδες παρέμβασης στην ομάδα χοληστερόλη και αμινοξέα, η οποία ήταν στατιστικά σημαντική χωρίς ωστόσο να μπορεί να εξηγηθεί ούτε με τα δεδομένα της βιβλιογραφίας ούτε και με τα δεδομένα της συγκεκριμένης μελέτης.

8.5 Συσχετίσεις της δραστικότητας της lyso-PAF AT με βιοχημικούς δείκτες κατά την διάρκεια της παρέμβασης με και χωρίς αμινοξέα

Οι συσχετίσεις της δραστικότητας της lyso-PAF AT λευκοκυττάρων κουνελιού με δείκτες λιπιδαιμικού προφίλ και τη γ-GT έδειξαν τα εξής: αρνητική γραμμική συσχέτιση της lyso-PAF AT λευκοκυττάρων με την χοληστερόλη ορού (total chol) και την HDL-C σε χρόνο μηδέν σε αντίθεση με την θετική γραμμική συσχέτιση που εμφάνισε η lyso-PAF AT με τους δείκτες αυτούς μετά από 7 εβδομάδες παρέμβασης.

Όσον αφορά τη θετική γραμμική συσχέτιση που εμφάνισε η lyso-PAF AT με την χοληστερόλη ορού στις 7 εβδομάδες παρέμβασης, αυτή μπορεί να εξηγηθεί βάσει τη σχέσης της δραστικότητας της lyso-PAF AT λευκοκυττάρων με την υπερχοληστερολαιμία. Στις 7 εβδομάδες παρέμβασης με χοληστερόλη εντείνεται η επίδραση των φλεγμονωδών ερεθισμάτων που επάγονται από την υπερχοληστερολαιμία, όπως αναφέρθηκε παραπάνω, με αποτέλεσμα να προκληθεί αύξηση της δραστικότητας της lyso-PAF AT λευκοκυττάρων.

Η θετική συσχέτιση της δραστηριότητας της lyso-PAF AT λευκοκυττάρων με την HDL-C μάλλον εξηγείται από το γεγονός ότι η αυξημένη χοληστερόλη ορού στις 7 εβδομάδες παρέμβασης οδηγεί και σε αύξηση της HDL-C.

Όσον αφορά την αρνητική γραμμική συσχέτιση που εμφάνισε η lyso-PAF AT με τη χοληστερόλη ορού στις μηδέν εβδομάδες παρέμβασης, φαίνεται ότι το οξειδωτικό στρες και η φλεγμονή δεν εμπλέκονται στη σχέση αυτή αλλά υπάρχουν άλλοι μηχανισμοί οι οποίοι μπορούν να επηρεάσουν τη lyso-PAF AT των λευκοκυττάρων οι οποίοι δεν έχουν ακόμη διευκρινιστεί.

Στις 2 εβδομάδες παρέμβασης παρατηρείται θετική γραμμική συσχέτιση της lyso-PAF AT λευκοκυττάρων με την γ -GT στο σύνολο των κουνελιών αλλά και στην ομάδα χοληστερόλη και αμινοξέα. Ωστόσο αυτή η θετική συσχέτιση χάνεται όταν στη γραμμική παλινδρόμηση χρησιμοποιήσουμε ως συγχυτικό παράγοντα την χοληστερόλη ορού πράγμα που σημαίνει ότι η χοληστερόλη ορού μεσολαβεί στην επίδραση της γ -GT

8.6 Επίδραση της παρέμβασης με και χωρίς αμινοξέα στη δραστηριότητα της lyso- PAF AT των αορτών κουνελιού

Η μέτρηση της δραστηριότητας του ενζύμου lyso-PAF AT αορτών έδειξε σημαντική αύξηση της δραστηριότητας του ενζύμου σε σχέση με την ομάδα ελέγχου σε 4 από τα 8 κουνέλια της ομάδας της χοληστερόλης (2-28 φορές) και σε 4 από 7 κουνέλια της ομάδας χοληστερόλη και αμινοξέα (1,5-9 φορές). Στα υπόλοιπα κουνέλια η δραστηριότητα παρέμεινε περίπου στα ίδια επίπεδα σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Ωστόσο, η στατιστική ανάλυση δεν έδειξε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των ομάδων ($p > 0,05$), άρα δεν υπήρξε επίδραση των αμινοξέων στην δραστηριότητα της lyso-PAF AT αορτών.

Οι διαφορές, ως προς τη δραστηριότητα της lyso-PAF AT των αορτών και ειδικά οι χαμηλές τιμές δραστηριότητας του ενζύμου που παρατηρήθηκαν στα κουνέλια των δύο ομάδων μπορεί να οφείλονται στην τυχαία επιλογή του κλάσματος της αορτής που ομογενοποιήθηκε για την συγκεκριμένη ανάλυση. Αυτή η τυχαία επιλογή θα μπορούσε να οδηγήσει σε περιοχές με μεγαλύτερη ή μικρότερη αλλοίωση.

Οι κυτταρικές πηγές του ενζύμου lyso-PAF AT αορτών αποτελούν ένα μίγμα από ενδοθηλιακά κύτταρα, διηθούντα στο υπενδοθήλιο λευκοκύτταρα, μονοκύτταρα/μακροφάγα

και αφρώδη κύτταρα. Έχει φανεί ότι οι φλεγμονώδεις παράγοντες του οξειδωτικού στρες (IL-1, TNF- α , ελεύθερες ρίζες) επάγουν την σύνθεση του PAF από τα κύτταρα αυτά μέσω της ενεργοποίησης της δραστηριότητας του ενζύμου lyso-PAF AT [57, 69, 78, 80].

Αν θεωρήσουμε ότι ισχύουν οι συσχετίσεις του πίνακα 7.8 στις οποίες συμπεριλαμβάνεται και το κουνέλι της ομάδας της χοληστερόλης που εμφάνισε ακραία τιμή στη δραστηριότητα της lyso-PAF AT αορτών μπορούμε να σχολιάσουμε τις συσχετίσεις που παρατηρήθηκαν στο σύνολο των κουνελιών.

Από την συσχέτιση της δραστηριότητας του ενζύμου lyso-PAF AT αορτών με βιοχημικούς και ιστολογικούς δείκτες, ιδιαίτερα σημαντική είναι η θετική συσχέτιση του ενζύμου lyso-PAF AT αορτών με το πάχος του έσω χιτώνα της θωρακικής αορτής (intima t), τόσο στο σύνολο των κουνελιών όσο και στην ομάδα της χοληστερόλης, γεγονός που δείχνει ότι το ποσοστό της βλάβης ενεργοποιεί τη δραστηριότητα της lyso-PAF AT αορτών.

Ακόμα, η θετική γραμμική συσχέτιση που εμφανίζει η lyso-PAF AT αορτών με την lyso-PAF AT των λευκοκυττάρων στο σύνολο των κουνελιών και στην ομάδα της χοληστερόλης υποδεικνύει ότι οι πιθανοί μηχανισμοί που ενεργοποιούνται κατά την διάρκεια της αθηρωματικής βλάβης επηρεάζουν με παρόμοιο τρόπο τόσο την δραστηριότητα της lyso-PAF AT των αορτών όσο και τη δραστηριότητα της lyso-PAF AT των λευκοκυττάρων.

Τέλος, αν θεωρήσουμε ότι τα επίπεδα του ενζύμου lyso-PAF AT των λευκοκυττάρων είναι δείκτης της ενεργοποίησης των λευκοκυττάρων της συστηματικής κυκλοφορίας, τότε δικαιολογημένα η αυξημένη δραστηριότητα των λευκοκυττάρων, όσον αφορά τις φλεγμονώδεις διαδικασίες στις οποίες συμμετέχουν, φαίνεται να επιταχύνει την αθηρωματική βλάβη στο επίπεδο της αορτής. Μπορεί όμως να υπάρχει και αντίστροφη σχέση, δηλαδή η αυξημένη αθηρωματική αλλοίωση στο επίπεδο της αορτής να ενεργοποιεί τη συστηματική φλεγμονή, άρα και την ενεργοποίηση των λευκοκυττάρων στη συστηματική κυκλοφορία συνεπώς και την ενεργοποίηση του ενζύμου lyso-PAF AT των λευκοκυττάρων.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Διονυσίου-Αστερίδου Α. Γ. Αθηροσκλήρυνση, Βιοχημική Προσέγγιση. Ιατρικές Εκδόσεις Π.Χ. Πασχλίδης. 1997
2. Bierman EL, Wilson JD, Braunwald E, Isselbacher KJ, Petersdorf RG, Martin JB, Fauci AS, Root RT (eds). Harrison's Principles of internal medicine. 12th Edition. International edition, Mc Graw-Hill. Atherosclerosis and other forms of arteriosclerosis. 1991. 992-1001
3. Cotran RS, Kumar V, Robbins SL. Blood Vessels. In: Cotran RS, Kumar V, Robbins SL. Pathologic Basis of Disease. 5th edition. Philadelphia, Saunders. 1994. 467-516
4. Glass CK, Witztum JL. Atherosclerosis: The road ahead. 2001. Cell. 104: 503-516
5. Ross R. Atherosclerosis- an inflammatory disease. N. Eng. J. Med. 1999. 340: 115-126.
6. Benditt EP. Origins of human atherosclerotic plaque: The role of altered gene expression. Arch. Pathol. Lab. Med. 1988. 112: 997-1001.
7. Jiamglin Fan, Teruo W. Inflammatory reactions in the pathogenesis of atherosclerosis, A review. J. Atheroscler. Thromb. 2003. 10: 63-71
8. Yuddkin JS, Kumari M, Humphries SE, Mohamed-Ali V. Inflammation, obesity, stress and coronary heart disease : is interleukin-6 the link? Atherosclerosis 2000. 148: 209-214,
9. Ridker PM. Connecting the role of C- reactive protein and statins in cardiovascular disease. 2003. Clin cardio 26: III 39-44.
10. Jason T. Call, MD, Efthymios N. Deliargyris, MD, and L. Kristin Newby, MD, MHS†. Focusing on Inflammation in the Treatment of Atherosclerosis. Cardiology in Review 2004. 12: 194–200.
11. Jiamglin Fan, Teruo Watanabe. Inflammatory reactions in the pathogenesis of atherosclerosis, A review. J. Atheroscler. Thromb. 2003. 10: 63-71
12. DiCorleto PE, Soyombo AA. The role of the endothelium in atherogenesis. Cur. Opin. Lipid. 1993. 4: 364-372
13. Reidy MA, Bowyer DE. Control of arterial smooth muscle cell proliferation. Cur. Opin. Lipidol. 1993. 4: 349-354
14. Charo I. F, Taubman M. B. Chemokines in the pathogenesis of vascular disease. Circ Res, 2004. 95 : 858-66
15. Yamada Y, Doi T, Hamakubo T, Kodama T. Scavenger receptor family proteins : roles for atherosclerosis, host defence and disorders of the central nervous system. Cell. Mol. Life Sci. 1998. 54: 628-640.
16. Bjarne Osterud and Eirik Bjorklid. Role of Monocytes in Atherogenesis. Physiol Rev. 2003. 83: 1069–1112
17. Sirtori CR, Agradi E, Csstti F, Mantern O, Gatti E. Soybean protein diet in the treatment of type-II hypercholesterolemia. Lancet 1: 2X, 1977.
18. Sugano M, Ishiwaki N, Nakashima R. Dietary protein independent modification of serum cholesterol level in rats. Ann Nutr Metab 28: 192. 1984.
19. Hubbard RW, Sanchez A. Dietary protein control of serum cholesterol by insulin and glucagon. Japan Oil Chemists. 1998. 26-30.
20. Rulrfield DM, Kritchevsky D. Influence of animal and vegetable protein on serum cholesterol, lipoproteins. and experimental atherosclerosis. p 150 in Plant Proteins: Applications, Biological Effects and Chemistry. ACS Symposium, series 312. 1985.
21. Forsythe WA, Greene MS, Anderson JJB. Dietary protein effects on cholesterol and lipoprotein concentrations. J Am College Nutr. 1986. 5: 533

22. Carroll KK. Hypercholesterolemia and atherosclerosis: effects of dietary protein. *Fed Proc* 41: 2792, 1982.
23. Sanchez A, Hubbard R. W. Plasma Amino Acids and the Insulin/Glucagon Ratio as an Explanation for the Dietary Protein Modulation of Atherosclerosis. *Medical Hypotheses*, 1991; 36: 27-32
24. Sanchez A. Hubbard RW, Sirtori CR, Hilton GE Testing a mechanism of control in human cholesterol metabolism: relation of arginine and glycine to insulin and glucagon. *Atherosclerosis*. 1988. 71: 87.
25. Sanchez A, Blomstedt M, Hubbard RW. Glucose intolerance as an additional test of the protein effect on serum cholesterol clinical cases. *Atherosclerosis* 65: 273. 1987.
26. Sanchez A. Homing MC, Wangelath DC. Plasma amino acids in humans fed plant protein. *Nutr Rep Int*. 1983. 28: 497.
27. Sanchez A. Homing MC, Shavlik GW, Wangelath DC, Hubbard RW. Changes in levels of cholesterol associated with plasma amino acids in humans fed plant proteins. *Nutr Rep Int*. 1985 32: 1047, 1985.
28. Sanchez A. Hubbard RW, Sirtori CR, Hilton GE Testing a mechanism of control in human cholesterol metabolism: relation of arginine and glycine to insulin and glucagon. *Atherosclerosis* .1988. 71: 87,
29. Iritani N, Nagashima K. Fukuda H. Ratsurada A. Tanaka T Effects of dietary proteins on lipogenic enzymes in rat liver. *J Nutr* 116: 194 1986
30. Nágila R. T. Damasceno, Hiro Goto, Fernanda M. D. Rodrigues, Carlos T. S. Dias, Fábio S. Okawabata, Dulcineia S. P. Soy Protein Isolate Reduces the Oxidizability of LDL and the Generation of Oxidized LDL Autoantibodies in Rabbits with Diet-Induced Atherosclerosis. *J. Nutr.* 130: 2641–2647, 2000
31. Beynen, A. C. Mode of cholesterolemic action of dietary proteins. *Monogr. Atheroscler.* 1990 16: 153-159.
32. Sugano, M., Yamada, Y., Goto, S. & Yoshida, K. Hypocholesterolemic effect of the undigested fraction of soy protein. *Monogr. Atheroscler.* 1990. 16: 85-96.
33. Yamashita, J., Fujita, Y., Kamimura, M. & Hayashi, S. Different effects of soy protein on cholesterol metabolism in rats and mice. *Monogr. Atheroscler.* 1990.16: 36-43.
34. Vahouny, G. V., Adamson, I., Chalearz, W. S., Satchithanandam, S., Muesing, R, Klurfeld, D. M., Tepper, S. A., Sanghvi, A. & Kritchevsky, D. Effects of casein and soy protein on hepatic and serum lipids and lipoprotein lipid distributions in the rat. *Atherosclerosis* 1985. 56: 127–137.
35. Cooke J P, Singer AH, Tsao P, Zera P, Rowan RA, Billingham EM. Antiatherogenic Effects of L-Arginine in the Hypercholesterolemic Rabbit. *J. Clin. Invest.* 1992. 90:1168-1172
36. Robert B. Preli, Karen P. Klein, David M. Herrington. Review: Vascular effect of dietary L- arginine supplementation. *Atherosclerosis*. 2002. 162 : 1-15
37. Rainer H. Boger A., Stefanie M. Bode-Boger. Sven Kienke, Alexandru C. Stan B. Rainhold Nafe, Jüger C., Frolich A. Dietary L-arginine decreases myointimal cell proliferation and vascular monocyte accumulation in cholesterol- fed rabbits. *Atherosclerosis* .1998 p.136: 67-77
38. Tsao P, McEvony L. M., Drexler H., Butcher C., Cooke J. P., Enhanced endothelial adhesiveness in hypercholesterolemia is attenuated by L –arginine. *Circulation*. 1994. 89:2176-82
39. Andrews NP, Prasad A, Quyyumi AA. N-acetylcysteine improves coronary and peripheral vascular function. *J Am Coll Cardio*. 2001. 37: 117-23

40. Tan B, Jiang DJ, Huang H, Jia SJ, Jiang JL, Hu CP, Li YJ. Taurine protects against low-density lipoprotein-induced endothelial dysfunction by the DDAH/ADMA pathway. *Vascul Pharmacol*. 2007. 46: 338-45
41. Galijasevic S, Abdulhamid I, Husam M. Abu-Soud. Potential role of tryptophan and chloride in the inhibition of human myeloperoxidase. *Free Redical Biology & Medicine*.2008. 44: 1570-1577.
42. Walker R .The significance of excursions above the ADI-case study: monosodium glutamate. *Reg Toxicol Pharmacol*. 1999. 30:S119-S121.
43. Walker R, Lupien JR. The safety evaluation of monosodium glutamate. *J Nutr* .2000. 130:1049S-1052S.
44. Yanni A.E., Yatzidis H. A., Kavantzias N. G., Agapitis E. V., Perrea D. N., Karayannacos P.E. Dietary L-aspartate and L- glutamate inhibit fatty streak initiation in cholesterol-fed rabbit. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* . 2003. 13: 80-86
45. Olney JW, Labruyere J, de Gubarff T. Brain damage in mice from voluntary igestion og glutamate and aspartate. *Neurobehav Toxicol*. 1980; 2:125-129.
46. Welbourne TC, King AB, Horton K. Entral glutamine supports hepatic glutathione efflux during inflammation. *J Nytr Biochem* 1993; 4:236-242.
47. Steinberg D, Parthasarathy S, Carew TE, Khoo JC, Witztum JL. Beyond cholesterol: modifications of low-density lipoprotein that increase atherogenicity. *N Engl J Med* 1998. 320:915-924
48. Morita K, Ihnken K, Buckberg GD, Matheis G, Sherman MP, Young HH. Studies of xypoxemic/reoxygenation injury: without aortic clamping. VIII. Counteraction of oxidant damage by exogenous glutamate and aspartate. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 1995. 110:1228-1234.
49. Young CE, Karas RH, Kuvin JT. High-density lipoprotein cholesterol and coronary heart disease. *Cardio Rev* 2004. 12:107-19.
50. Stein O, Stein Y. Atheroprotective mechanisms of HDL. *Atherosclerosis* 1999;144(2):285-301
51. Tall AR, Jiang X, Lou Y, Silver D. George Lyman Duff memorial lecture: lipid transfer proteins, HDL metablism and atherogenesis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol*. 1999. 20: 1185-1188.
52. Κωτσοβασίλης Κ. Μπέη Θ.Α. Λιποπρωτεΐνες και Αθηροσκλήρυνση. Ανασκόπηση. *Αρχεία Ελληνικής Ιατρικής*. 2003. 20: 384-406.
53. Yanni A. E, Perrea D. N, Yatzidis H. A. Effect of antiatherogenic L-aspartate and L- glutamate on serum lipoproteins cholesterol and apolipoproteins A-1 and B in rabbits fed with high cholesterol diet. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2005
54. Demopoulos C.A.,Karantonis H.C.,Antonopoulou S. Platelet activating factor-a molecular link between atherosclerosis theories.*Eur. J. Lipid Sci. Technol*. 2003. 150, 705
55. McManus LM, Woodard DS, Deavers SI, Pinckard RN, PAF molecular heterogeneity. Pathobiological implications. *Lab.Invest.*, 1993. 69, 639-650
56. Kulikov VI, Muzya GI, Ether lipids and platelet-activating factor, evolution and cellular function. *Biochemistry (Mosc.)*, 1997, 62, 1103-1108.
57. Stafforini DM, McIntyre TM, Zimmerman GA, Prescott SM.1:Platelet-activating factor, a pleiotrophic mediator of physiological and pathological processes. *Crit Rev Clin Lab Sci*.2003. 40:643-72
58. Koltai M, Hosford D, Guinot P, Esanu A, Braquet P, PAF - A review of its effects antagonists and possible future clinical implications - Part I. *Drugs*, 1991, 42, 9-29.
59. Koltai M, Hosford D, Guinot P, Esanu A, Braquet P. PAF, a review of its effects, antagonists and possible future clinical implications (Part II). *Drugs*, 1991, 42, 174-204

60. Snyder F, Platelet-activating factor and its analogs, metabolic pathways and related intracellular processes. *Biochim.Biophys.Acta*, 1995, 1254, 231-249
61. Snyder F. Platelet-activating factor, the biosynthetic and catabolic enzymes. *Biochem.J.*, 1995. 305, 689-705.
62. Tzortzis Nomikos, Elizabeth Fragopoulou, and Smaragdi Antonopoulou. Food Ingredients and Lipid Mediators. *Current Nutrition & Food Science*, 2007. 3, 000-000
63. Baker RR. Lipid acetylation reactions and the metabolism of platelet-activating factor. *Neurochem Res*. 2000. 25:677-83.
64. Shindou, H., Hishikawa, D., Nakanishi, H., Harayama, T., Ishii, S., Taguchi, R., and Shimizu, T. A single enzyme catalyzes both platelet-activating factor production and membrane biogenesis of inflammatory cells. Cloning and characterization of acetyl-CoA:LYSO-PAF acetyltransferase. 2007, *J. Biol. Chem.*, 282, 6532.
65. Honda, Z., Ishii, S., Shimizu, T. Platelet-activating factor receptor., *J. Biochem*. 2002. 131, 773-9.
66. Prescott S.M., Zimmerman, G.A., Stafforini, D.M., and McIntyre, T.M. Platelet-activating factor and related lipid mediators., *Annu. Rev. Biochem*. 2000. 69, 419.
67. Vander MD, Sherman, Luciano, Τσακόπουλος Μ, Γελαδάς Ν.: Φυσιολογία του ανθρώπου, μηχανισμοί της λειτουργίας του οργανισμού, 8^η έκδοση, σελ 906-908
68. Rubin E. Βασική Παθολογική Ανατομική, Ιατρικές Εκδόσεις Πασχαλίδης, 2001, Φλεγμονή, σελ 27-56
69. Ninio E. Phospholipid mediators in the vessel wall: involvement in atherosclerosis. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2005. 8:123-31.
70. Tselepis AD, John Chapman M. Inflammation, bioactive lipids and atherosclerosis: potential roles of a lipoprotein-associated phospholipase A2, platelet activating factor-acetylhydrolase. *Atheroscler Suppl*. 2002. 3(4):57-68.
71. Bradford MM, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principles of protein-dye binding. *Anal.Biochem.*, 1976, 72, 248-254.
72. Bligh EG, Dyer WJ, A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can.J.Biochem.Pharmacol.*, 1959, 37, 911-917.
73. Nomikos, T., Iatrou, C., and Demopoulos, C.A., .Acetyl-CoA:1-O-alkyl-sn-glycero-3-phosphocholine acetyltransferase (lyso-PAF AT) activity in cortical and medullary human renal tissue. *Eur.J.Biochem*. 2003. 270, 2992.
74. C.A. Demopoulos, R.N. Pincard, D.G Hanahan: Platelet activating factor. Evidence for 1-O-alkyl-2-acetyl-sn-glykeryl-3-phosphorylhline as the active component [a new class of lipid chemical mediators]. *J.Biol.Chem*. 254, 1979, 9355-9358.
75. John S. Owena, Paul R.S. Bakera, Joseph T. O'Flahertyb, Michael J. Thomasa, Michael P. Samuela, Rhonda E. Wootena, Robert L. Wyklea. Stress-induced platelet-activating factor synthesis in human neutrophils. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2005. 120– 129.
76. Dentan C, LesnikE P, Chapman M. J, Ninio E. Phagocytic activation induces formation of platelet-activating factor in human monocyte-derived macrophages and in macrophage-derived foam cells. Relevance to the inflammatory reaction in atherogenesis. *Eur. J. Biochem*. 1996. 236, 48-55.
77. Stokes Y. K, Cooper D, Tailor A, Granger D.N. Hypercholesterolemia promotes inflammation and microvascular dysfunction: Role of nitric oxide and superoxide. *Free Radical Biology & Medicine*. 2002. 1026–1036,
78. Bussolino F, Breviario F, Tetta C, Aglietta M, Mantovani A, Dejana E. Interleukin 1 stimulates platelet-activating factor production in cultured human endothelial cells. *J Clin Invest*. 1986 .77:2027-33.

79. Camussi G, Tetta C, Bussolino F, Baglioni C. Tumor necrosis factor stimulates human neutrophils to release leukotriene B₄ and platelet-activating factor. Induction of phospholipase A₂ and acetyl-CoA:1-alkyl-sn-glycero-3-phosphocholine O₂-acetyltransferase activity and inhibition by antiproteinase. *Eur J Biochem.* 1989. 182:661-6.
80. Bussolino F, Camussi G, Baglioni C. Synthesis and release of platelet-activating factor by human vascular endothelial cells treated with tumor necrosis factor or interleukin 1 alpha. *J Biol Chem.* 1988. 263:11856-61.