ΧΑΡΟΚΟΠΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

ΛΑΜΠΡΟΣ ΜΕΛΙΣΤΑΣ

ΤΙΤΛΟΣ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΩΝ ΣΤΑ ΓΟΝΙΔΙΑ ΤΩΝ CETP, LPL ΚΑΙ APOE ΣΤΟ ΛΙΠΙΔΑΙΜΙΚΟ ΠΡΟΦΙΛ ΚΑΙ ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΜΕ ΤΟΝ ΚΙΝΔΥΝΟ ΕΜΦΑΝΙΣΗΣ ΕΜΦΡΑΓΜΑΤΟΣ ΤΟΥ ΜΥΟΚΑΡΔΙΟΥ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:

- **ΛΑΜΠΡΟΣ ΣΥΝΤΩΣΗΣ (Υπεύθυνος)**
- **ΑΝΤΩΝΙΑ ΜΑΤΑΛΑ**
- **ΓΕΩΡΓΙΟΣ ΔΕΔΟΥΣΗΣ**

Π Τ Υ
ΜΕΛ

ΑΘΗΝΑ, 2003

ΧΑΡΟΚΟΠΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η επιστημονική έρευνα, προκειμένου να πραγματοποιηθεί με μεθοδευμένο και οργανωμένο τρόπο, απαιτεί, πέρα από την πολύπλευρη προσπάθεια του ατόμου που την έχει αναλάβει, τη συμμετοχή και συμβολή άλλων ατόμων που βοηθούν είτε σε επίπεδο υλικοτεχνικής υποδομής είτε σε γνωστικό υπόβαθρο. Οι απαιτήσεις αυτές ήταν εμφανείς και στη συγκεκριμένη μεταπτυχιακή διατριβή, η οποία περιλάμβανε πολυάριθμες ώρες ερευνητικής εργασίας, τόσο στο εργαστήριο όσο και για τη συλλογή του δείγματος καθώς και εκτεταμένη ανασκόπηση της βιβλιογραφίας.

Καταρχήν, ιδιαίτερη μνεία οφείλω να αποδώσω στο κ. Νικόλαο Γιαννακούρη, Λέκτορα του τμήματος Οικιακής Οικονομίας του Χαροκόπειου Πανεπιστημίου, ο οποίος ουσιαστικά οργάνωσε τα διάφορα στάδια της έρευνας από τη συλλογή του δείγματος μέχρι τη μεθοδολογία του πρωτοκόλλου, ενώ βοήθησε τα μέγιστα στη συγγραφή και στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων. Οι οικονομικές απαιτήσεις της παρούσας έρευνας καλύφθηκαν με την απλόχερη βοήθεια του υπεύθυνου καθηγητή κ. Λάμπρου Σιντώση, Αναπληρωτή Καθηγητή του τμήματος Διαιτολογίας-Διατροφής του Χαροκόπειου Πανεπιστημίου.

Η συλλογή του δείγματος έγινε πραγματικότητα χάρη στη συνεργασία μας με την ομάδα της γιατρού της Καρδιολογικής κλινικής του Ωνάσειου Καρδιοχειρουργικού Κέντρου κας Γενοβέφας Κολοβού, η οποία μάλιστα είχε και την αρχική ιδέα για τη συγκεκριμένη έρευνα. Ο κος Χατζηγεωργίου και η μεταπτυχιακή φοιτήτρια Κατερίνα ήταν ιδιαίτερα συνεργάσιμοι και συνέβαλλαν με τη σειρά τους στη συλλογή των δειγμάτων αίματος και των χαρακτηριστικών του δείγματος.

Θα ήθελα, επίσης, να ευχαριστήσω την κα Σκεντέρη Κατερίνα, μέλος του εργαστηρίου Διατροφής του Χαροκόπειου Πανεπιστημίου, για τη βοήθειά της στην κατανόηση του χειρισμού του βιοχημικού αναλυτή.

Τέλος, νιώθω υποχρεωμένος να ευχαριστήσω τους γονείς μου, οι οποίοι σε κάθε μου προσπάθεια βρίσκονται δίπλα παρέχοντας στήριξη ηθική, πνευματική και υλική.

Ι. ΕΙΣΑΓΩΓΗ 4

ΙΙ. ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ ΤΗΣ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑΣ 12

1. ΑΠΟΛΙΠΟΠΡΩΤΕΪΝΗ Ε (APOE) 13

1.1. ΕΙΣΑΓΩΓΙΚΑ 13

1.2. ΜΕΤΑΒΟΛΙΚΕΣ ΟΔΟΙ ΣΤΙΣ ΟΠΟΙΕΣ ΣΥΜΜΕΤΕΧΕΙ Η APOE 15

1.2.1. Ανακατανομή των λιπιδίων μεταξύ των κυττάρων διαφορετικών οργάνων. 15

1.2.2. Ανακατανομή των λιπιδίων μεταξύ των κυττάρων μέσα στο ίδιο όργανο ή ιστό. 15

1.2.3. Λειτουργίες της απολιποπρωτεΐνης Ε που δε συνδέονται με τη μεταφορά των λιπιδίων. 16

1.2.4. Η απολιποπρωτεΐνη Ε στην ανακατανομή των λιπιδίων μεταξύ των κυττάρων διαφορετικών οργάνων. Αναλυτικά. 16

1.3. ΤΟ ΓΟΝΙΔΙΟ ΚΑΙ Η ΠΡΩΤΕΪΝΗ ΤΗΣ APOE 20

1.4. ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΣ ΤΗΣ APOE 21

1.5. ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΥ ΤΗΣ APOE ΣΤΟ ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟ ΤΩΝ ΛΙΠΔΙΩΝ 23

1.6. ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΣ ΤΗΣ APOE ΚΑΙ ΑΘΗΡΟΣΚΛΗΡΩΣΗ 25

2. ΠΡΩΤΕΪΝΗ ΜΕΤΑΦΟΡΑΣ ΕΣΤΕΡΩΝ ΧΟΛΗΣΤΕΡΟΛΗΣ (CETP) 28

2.1. ΕΙΣΑΓΩΓΙΚΑ 28

2.2. CETP-ΑΝΤΙΣΤΡΟΦΗ ΜΕΤΑΦΟΡΑ ΧΟΛΗΣΤΕΡΟΛΗΣ 29

2.3. ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΜΕΤΑΦΟΡΑΣ ΛΙΠΙΔΙΩΝ ΑΠΟ ΤΗ CETP 30

2.4. ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ CETP ΣΤΙΣ ΑΛΛΑΓΕΣ ΤΟΥ ΜΕΓΕΘΟΥΣ ΤΗΣ HDL 32

2.5. ΤΟ ΓΟΝΙΔΙΟ ΚΑΙ Η ΠΡΩΤΕΪΝΗ ΤΗΣ CETP 33

2.6. ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΕΛΛΕΙΨΗ ΤΗΣ CETP 33

2.7. ΒΙΟΧΗΜΙΚΕΣ ΑΝΩΜΑΛΙΕΣ ΤΩΝ ΛΙΠΟΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΤΟΥ ΠΛΑΣΜΑΤΟΣ ΣΕ ΑΤΟΜΑ ΜΕ ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΕΛΛΕΙΨΗ CETP 34

2.7.1. Επίδραση στην HDL 34

2.7.2. Επίδραση στις VLDL και IDL 36

2.7.3. Επίδραση στην LDL 36

2.8. ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΤΗΣ ΕΛΛΕΙΨΗΣ ΤΗΣ CETP ΜΕ ΤΗΝ ΑΘΗΡΟΣΚΛΗΡΩΣΗ 37

2.9. ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΠΟΥ ΕΞΗΓΟΥΝ ΤΗ ΒΑΘΥΤΕΡΗ ΣΧΕΣΗ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΗΣ CETP ΜΕ ΤΗΝ ΑΘΗΡΟΣΚΛΗΡΩΣΗ 37

2.10. ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ ΓΙΑ ΤΟΥΣ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΥΣ TAQ1B ΚΑΙ I405V. ΣΧΕΣΗ ΜΕ ΤΗΝ ΑΘΗΡΟΣΚΛΗΡΩΣΗ 39

3. ΛΙΠΟΠΡΩΤΕΪΝΙΚΗ ΛΙΠΑΣΗ (LPL) **42**

3.1. ΕΙΣΑΓΩΓΙΚΑ 42

3.2. ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ LPL ΜΕ ΤΙΣ ΛΙΠΟΠΡΩΤΕΪΝΕΣ ΤΟΥ ΠΛΑΣΜΑΤΟΣ 43

3.2.1. Υδρόλυση των χυλομικρών από την LPL *43*

3.2.2. Μετατροπή της VLDL σε IDL από την LPL. *47*

3.2.3. Ρύθμιση της HDL από την LPL *49*

3.3. ΤΟ ΓΟΝΙΔΙΟ ΚΑΙ Η ΠΡΩΤΕΪΝΗ ΤΗΣ LPL 50

3.4. ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΙ ΣΤΟ ΓΟΝΙΔΙΟ ΤΗΣ LPL 50

3.5. ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ ΓΙΑΤΟΥΣ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΥΣ HINDIII ΚΑΙ S447X. ΣΧΕΣΗ ΜΕ ΤΗΝ ΑΘΗΡΟΣΚΛΗΡΩΣΗ 52

3.6. ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΩΝ ΤΗΣ LPL ΣΤΟΝ ΚΙΝΔΥΝΟ ΓΙΑ ΕΜΦΡΑΓΜΑ ΤΟΥ ΜΥΟΚΑΡΔΙΟΥ 53

III. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ **55**

1. ΔΕΙΓΜΑ **56**

2. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΤΟΥ DNA **57**

3. ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΩΝ **59**

3.1. ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΥ ΤΗΣ APOE 60

3.2. ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΩΝ ΣΤΟ ΓΟΝΙΔΙΟ ΤΗΣ CETP ..61

3.2.1. Taq1B *61*

3.2.2. I405V *62*

3.3. ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΩΝ ΣΤΟ ΓΟΝΙΔΙΟ ΤΗΣ LPL 63

3.3.1. S447X *63*

3.3.2. HindIII *64*

4. ΒΙΟΧΗΜΙΚΕΣ ΑΝΑΛΥΣΕΙΣ **65**

5. ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ **65**

IV. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ **67**

1. ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΟΥ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ **68**

2. ΚΑΤΑΝΟΜΗ ΓΟΝΟΤΥΠΩΝ ΚΑΙ ΣΥΧΝΟΤΗΤΑ ΑΛΛΗΛΟΜΟΡΦΩΝ ΤΩΝ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΩΝ ΣΤΑ ΓΟΝΙΔΙΑ ΤΗΣ CETP, LPL ΚΑΙ APOE **70**

2.1. ΣΥΧΝΟΤΗΤΕΣ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΩΝ ΣΤΟ ΓΟΝΙΔΙΟ ΤΗΣ CETP 72

2.2. ΣΥΧΝΟΤΗΤΕΣ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΩΝ ΣΤΟ ΓΟΝΙΔΙΟ ΤΗΣ LPL 72

2.3. ΣΥΧΝΟΤΗΤΕΣ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΥ ΣΤΟ ΓΟΝΙΔΙΟ ΤΗΣ APOE.....72

3.ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΤΩΝ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΩΝ ΜΕ ΤΟ ΛΙΠΙΔΑΙΜΙΚΟ ΠΡΟΦΙΛ. 73

3.1. ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΤΩΝ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΩΝ TAQ1B ΚΑΙ I405V ΣΤΟ ΓΟΝΙΔΙΟ ΤΗΣ CETP ΜΕ ΤΟ ΛΙΠΙΔΑΙΜΙΚΟ ΠΡΟΦΙΛ. 73

3.2. ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΤΩΝ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΩΝ S447X ΚΑΙ HINDIII ΣΤΟ ΓΟΝΙΔΙΟ ΤΗΣ LPL ΜΕ ΤΟ ΛΙΠΙΔΑΙΜΙΚΟ ΠΡΟΦΙΛ. 79

3.3. ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΤΟΥ ΚΟΙΝΟΥ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΥ ΣΤΟ ΓΟΝΙΔΙΟ ΤΗΣ APOE ΜΕ ΤΟ ΛΙΠΙΔΑΙΜΙΚΟ ΠΡΟΦΙΛ.....84

V. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....88

1. ΣΥΧΝΟΤΗΤΕΣ ΑΛΛΗΛΟΜΟΡΦΩΝ.....90

2. ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΙ ΣΤΟ ΓΟΝΙΔΙΟ ΤΗΣ CETP 93

3. ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΙ ΣΤΟ ΓΟΝΙΔΙΟ ΤΗΣ LPL.....95

4. ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΣ ΣΤΟ ΓΟΝΙΔΙΟ ΤΗΣ APOE.....97

VI. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....101

Ι. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Είναι κοινώς αποδεκτό πλέον ότι είναι πολλαπλοί οι γενετικοί και περιβαλλοντικοί παράγοντες που συνεισφέρουν στην εμφάνιση χρόνιων εκφυλιστικών ασθενειών όπως οι καρδιαγγειακές παθήσεις και ο καρκίνος. Αν και έχουν εντοπιστεί συγκεκριμένα γενετικά αίτια μεταξύ ορισμένων οικογενειών με ιστορικό μιας νόσου, η σχέση των γονιδίων αυτών με την ασθένεια στο γενικό πληθυσμό δεν είναι πλήρως κατανοητή. Ένας λόγος είναι ότι η γενετική προδιάθεση για την εμφάνιση τέτοιων ασθενειών μπορεί να είναι αποτέλεσμα της αθροιστικής επίδρασης των επιβαρυντικών αλληλομόρφων κάποιων γονιδίων, τα οποία σε ατομικό επίπεδο συνεισφέρουν μέτρια μόνο στην αύξηση του κινδύνου. Επομένως, αποτελεί πρόκληση ο εντοπισμός του γενετικού προφίλ που έχει σημαντική συνεισφορά στον κίνδυνο ανάπτυξης μιας πάθησης. Κατ' επέκταση, η επόμενη πρόκληση είναι να γίνει κατανοητό πώς οι περιβαλλοντικοί παράγοντες, π.χ. δίαιτα, διαμορφώνουν την έκφραση της γενετικής προδιάθεσης για την εμφάνιση νόσου.

Είναι αξιοσημείωτο ότι είναι αυξανόμενος ο αριθμός των γονιδιακών αλληλομόρφων που εμπλέκονται στην ανάπτυξη σύνθετων ασθενειών. Καθώς τα υποψήφια αυτά γονίδια εντοπίζονται, μεγαλώνει συνεχώς η ανάγκη για τον προσανατολισμό των αναλύσεων προς την ταυτόχρονη αναγνώριση πολλαπλών γενετικών τόπων. Οι έρευνες που επικεντρώνονται σε ένα μόνο γενετικό δείκτη μπορούν να χρησιμοποιηθούν απλά για τον προσδιορισμό του σχετικού κινδύνου από τον δείκτη αυτό, αλλά η προσέγγιση αυτή παρέχει ένα περιορισμένο πλαίσιο για τη γενικότερη εκτίμηση των γενετικών παραγόντων κινδύνου. Αντίθετα, οι έρευνες που συμπεριλαμβάνουν πολλαπλούς γενετικούς δείκτες παρέχουν ένα ευρύτερο πλαίσιο που είναι απαραίτητο για την αξιολόγηση της επήρρειας των υποψήφιων γενετικών τόπων στην ανάπτυξη των πολυπαραγοντικών ασθενειών. Τα αποτελέσματα από αναλύσεις πολλαπλών δεικτών μπορούν να φανερώσουν μηχανισμούς που εξηγούν την ευαισθησία σε ασθένειες και να επιτρέψουν τον εντοπισμό υποσυνόλων γενετικών δεικτών με κλινική σημασία (1).

Στα πλάισια των παραπάνω σκέψεων, είναι λοιπόν χρήσιμη η αναγνώριση πολλαπλών γενετικών προδιαθεσικών παραγόντων για την ανάπτυξη μιας πάθησης. Είναι γνωστό ότι η συχνότερη αιτία θανάτου παγκοσμίως, οι καρδιαγγειακές παθήσεις, αποτελούν μια ασθένεια με πολλαπλούς παράγοντες κινδύνου. Οι παράγοντες για την εμφάνιση της ασθένειας στο γενικό πληθυσμό είναι αποδεδειγμένο ότι περιλαμβάνουν την ηλικία, το φύλλο, την έλλειψη φυσικής δραστηριότητας, το κάπνισμα καθώς και παθολογικές καταστάσεις όπως ο διαβήτης, η παχυσαρκία, η υψηλή χοληστερόλη του αίματος, η υπέρταση. Ωστόσο, οι παράγοντες αυτοί δεν εξηγούν όλες τις περιπτώσεις της πρώιμης εμφάνισης της πάθησης (1). Κάποιοι από αυτούς τους παράγοντες επηρεάζονται γενετικά και όπως έχει αποδειχθεί, οι παράγοντες κινδύνου μπορεί να είναι πρωτίστως γενετικοί. Παράλληλα, τελευταία στοιχεία δείχνουν ότι οι γενετικοί παράγοντες επηρεάζουν την απόκριση των ασθενών στη θεραπευτική παρέμβαση, τόσο στη διατροφική (2,3) όσο και στη φαρμακευτική. Η επήρρεια στη διατροφική παρέμβαση αποτελεί αντικείμενο με ιδιαίτερο ενδιαφέρον και είναι πιθανό να μας απασχολήσει σε μελλοντικές έρευνες.

Ο κίνδυνος της εμφάνισης καρδιαγγειακών νοσημάτων έχει άμεση σχέση με τα επίπεδα των λιπιδίων και των λιποπρωτεϊνών του πλάσματος. Τα αυξημένα επίπεδα της ολικής και LDL χοληστερόλης καθώς και τα ελαττωμένα επίπεδα HDL-χοληστερόλης αποτελούν βασικούς παράγοντες που καθορίζουν τον κίνδυνο για σταφανιαία νόσο. Είναι γνωστό ότι η διακύμανση του επιπέδου των λιπιδίων και των λιποπρωτεϊνών του πλάσματος καθορίζεται σε αξιοσημείωτο ποσοστό από τη γενετική διαφοροποίηση μεταξύ των ατόμων. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι ο μεταβολισμός των λιπιδίων του πλάσματος επηρεάζεται από γενετικούς πολυμορφισμούς που μεταβάλλουν τη λειτουργία ενζύμων, λιποπρωτεϊνών και άλλων παραγόντων με αποτέλεσμα τη διαταραχή της ομαλής μεταβολικής πορείας. Άλλωστε, οι λιποπρωτεΐνες του πλάσματος υφίστανται συνεχείς τροποποιήσεις κατά τη διέλευση τους μέσα από το πλάσμα λόγω της δράσης των ενζύμων που μεταβολίζουν τα λίπη και των πρωτεϊνών μεταφοράς λιπών. Οι δράσεις αυτές έχουν σημαντική επίδραση

στη σύσταση, στο μέγεθος και στη συγκέντρωση των λιποπρωτεϊνών. Οι πιο σημαντικές και συνήθεις μεταλλάξεις που εμπλέκονται στο μεταβολισμό των λιπιδίων και κατ' επέκταση στην αθηρογένεση και έχουν απασχολήσει τη βιβλιογραφία μέχρι τώρα είναι αυτές που εντοπίζονται στα γονίδια των απολιποπρωτεϊνών Ε, Β και CIII, στο γονίδιο της πρωτεΐνης μεταφοράς εστέρων χοληστερόλης (Cholesteryl ester transfer protein, CETP) καθώς και στο γονίδιο της λιποπρωτεϊνικής λιπάσης (Lipoprotein lipase, LPL).

Ο σκοπός της δικής μας έρευνας είναι καταρχήν ο προσδιορισμός της συχνότητας εμφάνισης στον ελληνικό πληθυσμό ορισμένων βιβλιογραφικά γνωστών πολυμορφισμών καθώς και η συνεισφορά τους στην ανάπτυξη δυσμενούς ή ευνοϊκού λιπιδαιμικού προφίλ και στην εν γένει εμφάνιση καρδιαγγειακών νοσημάτων. Για τη μελέτη μας θα χρησιμοποιήσουμε δείγμα ασθενών με στεφανιαία νόσο ώστε να δούμε αν στα άτομα αυτά είναι συχνή η εμφάνιση των επιζήμιων ή μη μεταλλάξεων και σε τι ποσοστό επηρεάζονται τα λιπίδια του πλάσματος. Στη συνέχεια θα γίνει συσχέτιση και σύγκριση των χαρακτηριστικών των ασθενών του δείγματος που έχουν υποστεί έμφραγμα του μυοκαρδίου με τους μη εμφραγματίες του δείγματος ώστε να δείξουμε κατά πόσον η εμφάνιση εμφράγματος του μυοκαρδίου σχετίζεται με τους πολυμορφισμούς της μελέτης μας. Η προσπάθειά μας εστιάζεται, λοιπόν, στην εκτίμηση της γενετικής προδιάθεσης για την εμφάνιση καρδιαγγειακών παθήσεων και εμφράγματος του μυοκαρδίου.

Αντικείμενο της μελέτης μας θα είναι ορισμένες μεταλλάξεις που εμφανίζονται στα γονιδία της απολιποπρωτεΐνης Ε (apoE), της CETP και της LPL και η επίδρασή τους στο μεταβολισμό και τα επίπεδα των λιπιδίων του πλάσματος. Οι μεταλλάξεις που παρουσιάζονται στα γονίδια αυτά έχουν αντίκτυπο στο προϊόν της έκφρασής τους με αποτέλεσμα η παραγόμενη πρωτεΐνη να εμφανίζει διαφοροποιήσεις όσον αφορά τη δομή, τη μάζα, τη δραστικότητα (αν είναι ένζυμο) ή την εν γένει λειτουργία της. Είναι ιδιαίτερα ενδιαφέρον να δούμε τη συσχέτιση των διαφοροποιήσεων αυτών με τον κίνδυνο εμφάνισης καρδιακών παθήσεων. Αξίζει, επίσης, να δούμε την ξεχωριστή συνεισφορά της κάθε μετάλλαξης στα λιπίδια του πλάσματος αλλά

και τη συνολική επίδραση του γονότυπου των ατόμων στον κίνδυνο για την εμφάνιση καρδιοπάθειας και εμφράγματος του μυοκαρδίου. Ας δούμε, όμως, περισσότερο αναλυτικά ποιά είναι τα γονίδια, οι παραγόμενες πρωτεΐνες και οι σημαίνουσες μεταλλάξεις που θα μας απασχολήσουν.

Η *απολιποπρωτεΐνη Ε* (*apoE*) αποτελεί ένα σημαντικότατο παράγοντα που εμπλέκεται στο μεταβολισμό των λιποπρωτεϊνών και την εμφάνιση καρδιαγγειακών παθήσεων ενώ παράλληλα θεωρείται ένα σημαντικό μόριο για μια σειρά από βιολογικές διαδικασίες που δε συνδέονται άμεσα με τη λειτουργία της μεταφοράς των λιπιδίων, π.χ. νόσος Alzheimer (4, 5). Είναι συστατικό των λιποπρωτεϊνών του πλάσματος και μεσολαβεί για τη σύνδεσή τους με τους LDL υποδοχείς καθώς και τους υποδοχείς των υπολειμμάτων (υποδοχείς apoE) (5). Η apoE είναι μια πολυμορφική πρωτεΐνη που οφείλεται στην παρουσία τριών διαφορετικών αλληλομόρφων ε2, ε3 και ε4, η συχνότητα των οποίων διαφέρει μεταξύ των πληθυσμών (6). Οι τρεις, λοιπόν, κύριες ισομορφές apoE2, apoE3 και apoE4 διαφέρουν η μία από την άλλη λόγω αντικατάστασης ενός μόνο αμινοξέος που οδηγεί ωστόσο σε εμφανείς λειτουργικές διαφορές σε κυτταρικό και μοριακό επίπεδο. Οι ισομορφές της apoE συνδέονται αντίστοιχα με διαφορετικά επίπεδα λιπιδίων πλάσματος. Η γενετική διαφοροποίηση που παρουσιάζει η apoE θεωρείται ότι είναι υπεύθυνη για το 5-15% της διακύμανσης των λιπιδίων του πλάσματος (4, 7). Η apoE3 φαίνεται ότι είναι η φυσιολογική ισομορφή για όλες τις γνωστές λειτουργίες, ενώ οι apoE2 και apoE4 σχετίζονται με δυσλειτουργίες (5). Η apoE2 συνδέεται με χαμηλότερα επίπεδα ολικής και LDL χοληστερόλης, τη γενετική διαταραχή υπερλιποπρωτεϊναιμία τύπου ΙΙΙ και κατά περίπτωση με αύξηση ή μείωση του κινδύνου για αθηροσκλήρωση ενώ η apoE4 συνδέεται με μείωση της μακροζωίας, αυξημένα επίπεδα χοληστερόλης και αυξημένο κίνδυνο για αθηροσκλήρωση και νόσο Alzheimer κατά κύριο λόγο (5,6). Επίδραση, τέλος, του γονότυπου της apoE έχει αναφερθεί και για τα τριγλυκερίδια καθώς και για την HDL χοληστερόλη (8).

Η *πρωτεΐνη μεταφοράς εστέρων χοληστερόλης* (*CETP*) παίζει βασικό ρόλο στο μεταβολισμό των υψηλής πυκνότητας λιποπρωτεϊνών (HDL). Μεσολαβεί για την ανταλλαγή των λιπιδίων μεταξύ των λιποπρωτεϊνών, με αποτέλεμα τη μεταφορά εστέρων χοληστερόλης από την HDL σε άλλες λιποπρωτεΐνες και την επακόλουθη πρόσληψη της χοληστερόλης από τα ηπατοκύτταρα (9,10). Αυτή η ροή χοληστερόλης προς το ήπαρ είναι γνωστή ως «αντίστροφη μεταφορά χοληστερόλης». Αυξάνοντας την περιεκτικότητα σε εστέρες χοληστερόλης των LDL και VLDL λιποπρωτεϊνών, η CETP αυξάνει την αθηρογόνο δράση των λιποπρωτεϊνών αυτών. Επίσης, υψηλά επίπεδα της CETP στο πλάσμα συνδέονται με ελαττωμένες συγκεντρώσεις HDL χοληστερόλης (11), που αποτελεί έναν ισχυρό και ανεξάρτητο παράγοντα κινδύνου για αθηροσκληρωτικές αγγειακές παθήσεις. Τα στοιχεία αυτά και τα αποτελέσματα ερευνών σε ανθρώπους και ζώα υποστηρίζουν την αντίληψη ότι η CETP μπορεί να συμβάλλει στην αθηρογένεση (12). Ωστόσο, θα πρέπει να τονιστεί ότι η σχέση μεταξύ της συγκέντρωσης της CETP στο πλάσμα, της HDL χοληστερόλης και της αθηροσκλήρωσης είναι περίπλοκη. Διάφοροι ερευνητές έχουν δείξει ότι ο ρόλος της CETP εξαρτάται από το γενικό πλαίσιο του μεταβολισμού και μπορεί να επηρεάζεται από άλλα ένζυμα και πρωτεΐνες του πλάσματος που έχουν καθοριστικό ρόλο στο μεταβολισμό των λιποπρωτεϊνών (13, 14).

Οι πολυμορφισμοί της CETP έχουν ερευνηθεί για τον προσδιορισμό της περίπλοκης σχέσης μεταξύ της CETP, της HDL και της στεφανιαίας νόσου. Η πλειονότητα των ερευνών αυτών έχουν επιβεβαιώσει ότι οι διακυμάνσεις του γονιδίου της CETP επηρεάζουν τη συγκέντρωση της HDL στο πλάσμα ενώ παράλληλα έχει δειχθεί ότι υπάρχει σχέση με τον κίνδυνο για αθηροσκλήρωση (15, 16, 17, 18, 19, 20, 21).

Στην παρούσα μελέτη θα ασχοληθούμε με την επίδραση δύο συνήθων πολυμορφισμών του γονιδίου της CETP στην HDL χοληστερόλη και στην εμφάνιση καρδιαγγειακών παθήσεων. Ο ένας πολυμορφισμός αναφέρεται ως Taq1B (εσώνιο 1) του οποίου αλληλόμορφα είναι το B1 όπου υπάρχει θέση κοπής για το ενζύμο περιορισμού Taq1 και το B2 που χαρακτηρίζεται από

απουσία της θέσης περιορισμού). Ο δεύτερος πολυμορφισμός εντοπίζεται στο εξώνιο 14, αναφέρεται ως I405V, και οδηγεί σε αντικατάσταση του αμινοξέος ισολευκίνη από βαλίνη στην ώριμη πρωτεΐνη.

Τέλος, το ένζυμο *λιποπρωτεϊνική λιπάση* (*LPL*) αποτελεί ένα από τα ένζυμα-κλειδιά στο μεταβολισμό των πλούσιων σε τριγλυκερίδια λιποπρωτεϊνών. Η LPL είναι ένα ένζυμο που βρίσκεται δεσμευμένο στο ενδοθήλιο των τριχοειδών αγγείων στο λιπώδη και το μυϊκό ιστό και υδρολύει τα τριγλυκερίδια στα χυλομικρά και την VLDL. Η LPL απελευθερώνεται με ηπαρίνη (22). Επομένως, η LPL κατέχει έναν κεντρικό ρόλο στο μεταβολισμό των λιπιδίων και για το λόγο αυτό το γονίδιο της LPL είναι ένας προφανής υποψήφιος συνεισφοράς σε ενδεχόμενη κληρονομούμενη προδιάθεση για δυσλιπιδαιμία και κίνδυνο για αθηροσκλήρωση. Στα άτομα των οποίων οι συγκεντρώσεις των λιπιδίων του πλάσματος βρίσκονται μέσα στα φυσιολογικά όρια υπάρχει σαφής σχέση μεταξύ της δραστικότητας της LPL και των συγκεντρώσεων των λιπιδίων. Άρα, είναι ιδιαίτερα ενδιαφέρον να εντοπίσουμε τη γενετική διακύμανση της LPL μέσα από την ταυτοποίηση συνήθων πολυμορφισμών και να περιγράψουμε την επίδραση της διακύμανσης αυτής στον καθορισμό των διαφορών στη συγκέντρωση των λιπιδίων μεταξύ των ατόμων και στην ανάπτυξη στεφανιαίας νόσου (23).

Μέχρι σήμερα, έχουν εντοπισθεί περισσότερες από 60 μεταλλάξεις στο γονίδιο της LPL, που οδηγούν σε ένα μη λειτουργικό ένζυμο. Η κληρονόμηση δύο ελαττωματικών γονιδίων LPL οδηγεί σε χυλομικροναιμία νηστείας (υπερλιποπρωτεϊναιμία τύπου I). Ανάμεσα στους συχνούς πολυμορφισμούς που έχουν αναφερθεί, περιλαμβάνεται ο πολυμορφισμός *Hind*III στο εσώνιο 8 που επιδρά στα επίπεδα των τριγλυκεριδίων και/ή στην HDL χοληστερόλη (αλληλόμορφα είναι το *H+* όπου υπάρχει θέση κοπής για το ενζύμο περιορισμού *Hind*III και το *H-* που χαρακτηρίζεται από απουσία της θέσης περιορισμού). Επίσης, από τους πολυμορφισμούς του γονιδίου της LPL που μεταβάλλουν τη δομή της πρωτεΐνης η αντικατάσταση Σερίνη → Λήξη αλληλουχίας στη θέση 447 (S447X), που εντοπίζεται στο εσώνιο 9, οδηγεί

στην παραγωγή μιας πρωτεΐνης που έχει υποστεί περικοπή, δηλαδή της λείπουν δύο αμινοξέα (Σερίνη-Γλυκίνη) από το καρβόξυ-τελικό άκρο. Κάποιες αλλά όχι όλες οι πρόσφατες έρευνες συνδέουν το αλληλόμορφο X447 με υψηλότερη δραστικότητα της LPL, ευνοϊκό λιπιδαιμικό προφίλ και ελαττωμένο κίνδυνο στεφανιαίας νόσου (24).

Πίνακας 1. Συνήθεις επιδράσεις πολυμορφισμών στα γονίδια των apoE, CETP και LPL σε λιπιδαιμικούς δείκτες (TC=ολική χοληστερόλη, LDL=χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνη, HDL=υψηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνη, TG=τριγλυκερίδια). (↑),(↓)=σε λίγες περιπτώσεις

Πολυμορφισμός	TC	LDL	HDL	TG
ApoE				
ApoE2	↓	↓	(↑)	↑
ApoE3	no effect	no effect	no effect	no effect
ApoE4	↑	↑	(↓)	↑
CETP				
intron 1 (Taq1B)	no effect	no effect	↑	no effect
exon 14 (I405V)	no effect	no effect	↑	no effect
LPL				
exon 9 (S447X)	no effect	no effect	↑	↓
intron 8 (*Hind*III)	no effect (↑)	no effect (↑)	↓	↑

ΙΙ. ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ ΤΗΣ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑΣ

1. ΑΠΟΛΙΠΟΠΡΩΤΕΪΝΗ Ε (APOE)

1.1. ΕΙΣΑΓΩΓΙΚΑ

Η απολιποπρωτέϊνη Ε (apoE) είναι ένα από τα περίπου δώδεκα πρωτεϊνικά συστατικά των λιποπρωτεϊνών του πλάσματος που χρησιμοποιούνται για διάφορους ρόλους, συμπεριλαμβανομένων της διατήρησης της δομής των μορίων των λιποπρωτεϊνών και της ρύθμισης του μεταβολισμού διαφόρων διαφορετικών λιποπρωτεϊνών. Η απολιποπρωτεΐνη Ε είναι ένα συστατικό των λιποπρωτεϊνών πολύ χαμηλής πυκνότητας (VLDL) που συντίθενται στο ήπαρ, οι οποίες δρουν κυρίως στη μεταφορά τριγλυκεριδίων από το ήπαρ στους περιφερικούς ιστούς, και μιας υποκατηγορίας λιποπρωτεϊνών υψηλής πυκνότητας (HDL), που συμμετέχουν στην ανακατανομή της χοληστερόλης μεταξύ των κυττάρων. Επιπλέον, η apoE είναι κύριο πρωτεϊνικό συστατικό των χυλομικρών που συντίθενται στο έντερο, τα οποία μεταφέρουν τα τριγλυκερίδια και τη χοληστερόλη της δίαιτας. Ένας σημαντικός φυσιολογικός ρόλος για την apoE στο μεταβολισμό των λιποπρωτεϊνών είναι ότι μεσολαβεί για την υψηλής συγγένειας σύνδεση των λιποπρωτεϊνών που περιέχουν apoE με τους υποδοχείς των λιποπρωτεϊνών χαμηλής πυκνότητας (LDL-υποδοχείς), που αναφέρονται επίσης και ως apoB/E υποδοχείς (25, 26, 27). Η σύνδεση των λιποπρωτεϊνών στους υποδοχείς σημαίνει την έναρξη της κυτταρικής πρόσληψης και αποδόμησης των λιποπρωτεϊνών, που οδηγεί στη χρήση της χοληστερόλης των λιποπρωτεϊνών στη ρύθμιση του ενδοκυτταρικού μεταβολισμού χοληστερόλης. Η apoE μοιράζεται τη λειτουργία αυτή με την απολιποπρωτεΐνη Β, το πρωτεϊνικό συστατικό των LDL του πλάσματος. Επίσης, η apoE μεσολαβεί για τη σύνδεση των υπολειμμάτων χυλομικρών σε ένα δεύτερο ηπατικό υποδοχέα, τον αποκαλούμενο υποδοχέα υπολειμμάτων χυλομικρών ή υποδοχέα apoE. Ο ακριβής μηχανισμός που αναφέρεται στην αλληλεπίδραση της apoE με τους

υποδοχείς λιποπρωτεϊνών και στη ρύθμιση του μεταβολισμού των λιποπρωτεϊνών (και άλλων μεταβολικών ρόλων) θα συζητηθεί αργότερα.

Η απολιποπρωτεινη Ε, που αρχικά ορίστηκε ως «αποπρωτεΐνη πλούσια σε αργινίνη» εντοπίστηκε αρχικά ως λιποπρωτεϊνικό συστατικό των VLDL το 1973 από τους Shore και Shore. Χαρακτηρίστηκε εκτεταμένα σε διάφορα είδη ζώων αφού έγινε αντιληπτό ότι η χοληστερόλη της δίαιτας σχετίζεται με την κατανομή της στο πλάσμα (25). Η apoE είναι ένα σημαντικό πρωτεϊνικό συστατικό διαφόρων εμπλουτισμένων σε χοληστερόλη λιποπρωτεϊνών που συσσωρεύονται στο πλάσμα πολλών θηλαστικών (λαγών, σκύλων, χοίρων, αρουραίων, μαϊμούδων) που έχουν τραφεί με υψηλά επίπεδα λιπών και χοληστερόλης. Είναι, πλέον, γνωστό ότι αυτές οι εμπλουτισμένες σε χοληστερόλη λιποπρωτείνες που περιέχουν apoE είναι υπολείμματα χυλομικρών και VLDL (που συγκεντρωτικά αναφέρονται ως β-VLDL) καθώς και μια υποκατηγορία των HDL (που αναφέρεται ως HDL_3, HDLc, ή απλά HDL με apoE). Όπως αναφέρθηκε νωρίτερα, η apoE είναι επίσης παρούσα στα χυλομικρά, τις VLDL, και τις HDL σε άτομα με φυσιολογικά επίπεδα λιπιδίων και κατανέμεται περίπου ισάξια μεταξύ των VLDL και των HDL στο πλάσμα που στερείται χυλομικρών. Η φυσιολογική συγκέντρωση της πρωτεΐνης αυτής είναι 5mg/dl (25).

Σημαντική ώθηση για την κατανόηση του ρόλου της apoE στο μεταβολισμό των λιποπρωτεϊνών δόθηκε από τις παρατηρήσεις των Havel και Kane (28) ότι οι εμπλουτισμένες σε apoE *β*-VLDL συσσωρεύονται στο πλάσμα ασθενών με υπερλιποπρωτεϊναιμία τύπου ΙΙ, μια γενετική διαταραχή. Η παρατήρηση αυτή, σε συνδυασμό με αυτές που έγιναν από τα ζώα που τράφηκαν με χοληστερόλη, έδειξαν ότι η apoE έχει ένα ρόλο κλειδί στο μεταβολισμό της χοληστερόλης και συγκεκριμένα στο μεταβολισμό των χυλομικρών και των VLDL. Φυσιολογικά, όταν η δίαιτα είναι πλούσια σε χοληστερόλη, παρατηρείται υπερχοληστερολαιμία ως αποτέλεσμα υπερπαραγωγής και μη σωστής απομάκρυνσής τους από το πλάσμα. Αντίθετα, στην υπερλιποπρωτεϊναιμία τύπου ΙΙ είναι δευτερογενές μεταβολικό ελάττωμα λόγω της παρουσίας μιας μη φυσιολογικής ισομορφής της apoE που σχετίζεται

με μειωμένη ικανότητα σύνδεσης των λιποπρωτεϊνών με τους υποδοχείς τους (25).

1.2. ΜΕΤΑΒΟΛΙΚΕΣ ΟΔΟΙ ΣΤΙΣ ΟΠΟΙΕΣ ΣΥΜΜΕΤΕΧΕΙ Η ΑΡΟΕ.

Οι διάφορες μεταβολικές οδοί στις οποίες συμμετέχει η apoE μπορούν να χωριστούν σε τρεις κατηγορίες. Δύο από αυτές περιλαμβάνουν λειτουργίες της apoE που αφορούν τη μεταφορά λιπιδίων, ενώ η τρίτη είναι περισσότερο θεωρητική και αφορά διαφορετικούς μηχανισμούς σε συνδυασμό ή μη με τις λειτουργίες μεταφοράς λιπιδίων.

1.2.1. Ανακατανομή των λιπιδίων μεταξύ των κυττάρων διαφορετικών οργάνων.

Η απολιποπρωτείνη Ε έχει μια λειτουργία που μοιάζει με «ενδοκρινική» γιατί συντίθεται σε ένα ή περισσότερα σημεία και συμμετέχει στη μεταφορά της χοληστερόλης και άλλων λιπιδίων από σημεία σύνθεσης ή απορρόφησης σε κύτταρα άλλων οργάνων όπου τα λιπίδια χρησιμοποιούνται, αποθηκεύονται ή απεκκρίνονται. Παραδείγματα αυτού του τύπου λειτουργίας της apoE είναι ο μεταβολισμός των χυλομικρών και των υπολειμμάτων χυλομικρών (chylomicron remnants), των VLDL και των υπολειμμάτων VLDL (VLDL remnants) καθώς και μιας υποομάδας των HDL.

1.2.2. Ανακατανομή των λιπιδίων μεταξύ των κυττάρων μέσα στο ίδιο όργανο ή ιστό.

Η απολιποπρωτεΐνη Ε έχει επίσης μια λειτουργία που μοιάζει με «παρακρινική», αφού παράγεται, από διάφορα κύτταρα σε έναν ιστό και συμμετέχει στη μεταφορά χοληστερόλης και άλλων λιπιδίων μεταξύ των κυττάρων του ίδιου ιστού. Ο γενικός μηχανισμός είναι ότι τα μακροφάγα ή άλλα κύτταρα ικανά να αποθηκεύσουν και να απελευθερώσουν λιπίδια σε αποδέκτες στο διάμεσο υγρό (συμπλέγματα apoE-λιπιδίων ή HDL) έχουν ένα ρόλο κλειδί σ' αυτήν την ανακατανομή. Η apoE, εξαιτίας της ικανότητάς της να συνδέεται με υψηλή συγγένεια σε υποδοχείς LDL, οδηγεί τα συμπλέγματα

λιπιδίων ή της HDL με την apoE στην πρόσληψη από τα κύτταρα του τοπικού περιβάλλοντος. Η χοληστερόλη μπορεί να χρησιμοποιηθεί από τα κύτταρα για βιοσυνθετικές διαδικασίες, συμπεριλαμβανομένου της επισκευής μεμβρανών ή του πολλαπλασιασμού των κυττάρων. Στα μακροφάγα που συνθέτουν και εκκρίνουν apoE, η apoE μπορεί να έχει «αυτοκρινική» λειτουργία. Η εκκριθείσα apoE παγιδεύει τα λιπίδια από το περιβάλλον και τα παραδίδει πίσω στο μακροφάγο, όπου και αποθηκεύονται. Χαρακτηριστικό παράδειγμα της συμμετοχής της apoE σε «αυτοκρινικές» και «παρακρινικές» λειτουργίες είναι ο τραυματισμός και η αναγέννηση περιφερικών νεύρων. Ωστόσο, είναι πιθανό ότι ο μηχανισμός αυτός είναι εφαρμόσιμος γενικά σε περιοχές τοπικού τραυματισμού και επιδιόρθωσης ιστών και μπορεί επίσης να συμμετέχει στην πρόοδο και την παλινδρόμηση των αθηροσκληρωτικών κακώσεων (που περιγράφεται κλασσικά ως απάντηση τραυματισμού-επιδιόρθωσης στο αρτηριακό τοίχωμα).

1.2.3. Λειτουργίες της απολιποπρωτεΐνης Ε που δε συνδέονται με τη μεταφορά των λιπιδίων.

Η apoE αναστέλλει τη μιτογόνα διέγερση των λεμφοκυττάρων συνδεόμενη σε συγκεκριμένα σημεία στην επιφάνεια των λεμφοκυττάρων. Οι παρατηρήσεις αυτές δείχνουν ότι η apoE θα μπορούσε να έχει έναν ευρύτερο ρόλο στην ανοσολογία από ότι είναι κατανοητό μέχρι σήμερα. Παράλληλα, η apoE που παράγεται από τα λεία μυϊκά κύτταρα μπορεί να συμμετέχει στη ρύθμιση του πολλαπλασιασμού και της διαφοροποίησης των κυττάρων όπως αναφέρθηκε νωρίτερα (25).

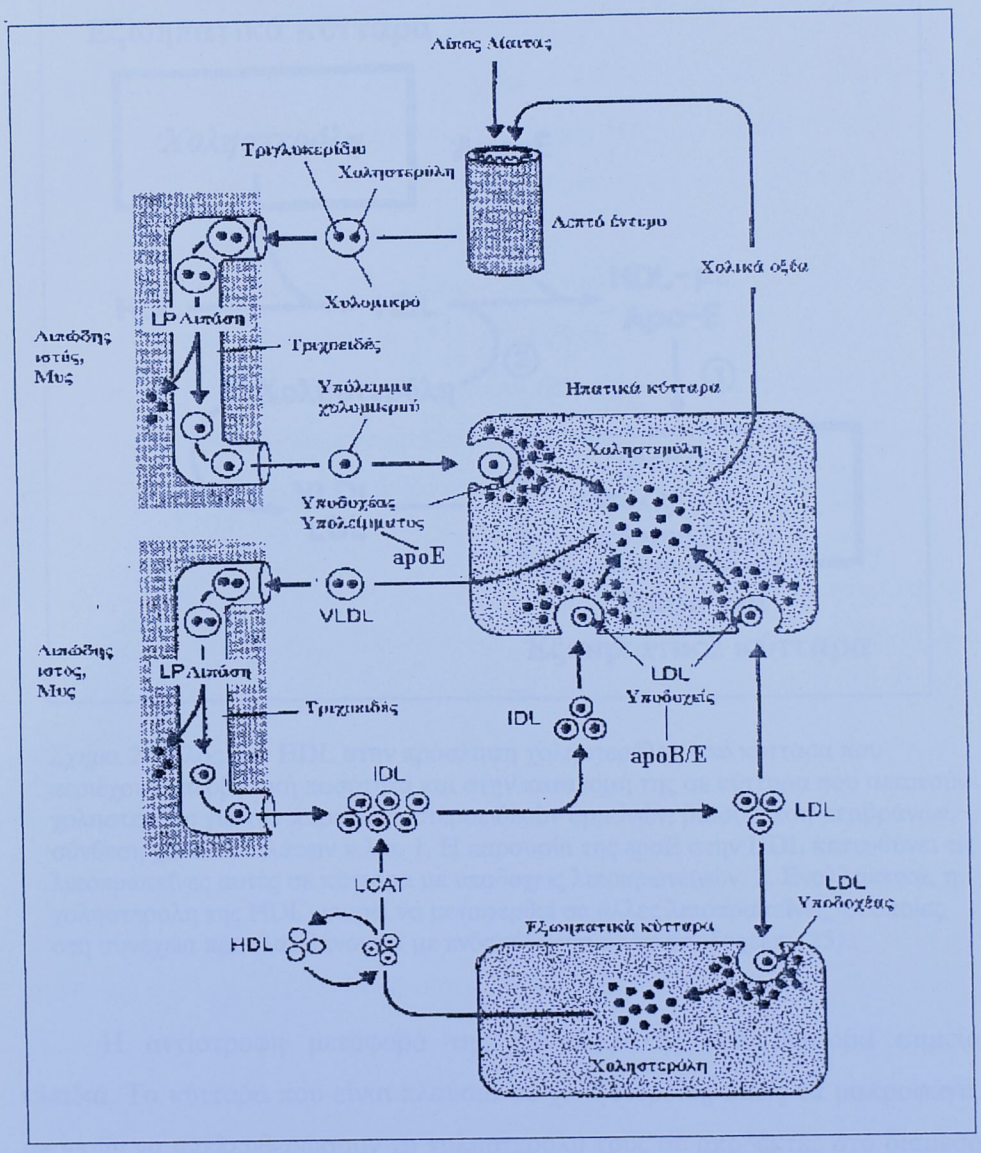
1.2.4. Η απολιποπρωτεΐνη Ε στην ανακατανομή των λιπιδίων μεταξύ των κυττάρων διαφορετικών οργάνων. Αναλυτικά.

1. *Μεταφορά των λιπιδίων της δίαιτας από το έντερο στο ήπαρ και τους περιφερικούς ιστούς*. Τα χυλομικρά, που συντίθενται στο έντερο ως απάντηση στο διαιτητικό λίπος και τη χοληστερόλη, εισέρχονται στο μεσεντερικό και θωρακικό αγωγό του λεμφικού συστήματος, όπου αποκτούν την apoE (Σχήμα

1). Η λιποπρωτεϊνική λιπάση του ενδοθηλίου των αγγείων καταλύει την υδρόλυση των τριγλυκεριδίων των χυλομικρών και τα ελεύθερα λιπαρά οξέα που δημιουργούνται προσλαμβάνονται πρωταρχικά από τα λιποκύτταρα. Μετά την υδρόλυση των τριγλυκεριδίων, τα χυλομικρά γίνονται μικρότερα και πιο εμπλουτισμένα σε χοληστερόλη και αναφέρονται ως υπολείμματα χυλομικρών. Η απολιποπρωτεινη Ε μεσολαβεί για την ηπατική πρόσληψη των υπολειμμάτων των χυλομικρών. Φαίνεται ότι υπάρχει ένας μοναδικός υποδοχέας στα ηπατοκύτταρα διαφορετικός από τον LDL υποδοχέα ή apoB/E υποδοχέα που έχει ως ρόλο τη μεσολάβηση για την πρόσληψη των υπολειμμάτων χυλομικρών. Αυτός ο υποτιθέμενος υποδοχέας αναφέρεται ως υποδοχέας υπολειμμάτων χυλομικρών ή υποδοχέας apoE (25). Υπάρχουν διάφοροι λόγοι για να θεωρήσουμε ως δεδομένη την ύπαρξη του υποδοχέα αυτού και ένας λόγος είναι ότι τα άτομα με οικογενή υπερχοληστερολαιμία - δηλαδή άτομα με ελαττωματικούς ή απόντες LDL-υποδοχείς είναι ικανά να «καθαρίσουν» το πλάσμα τους από υπολείμματα χυλομικρών. Τα υπολείμματα χυλομικρών συνδέονται όντως με υψηλή συγγένεια με τους LDL-υποδοχείς in vitro. Ωστόσο, οι μεμβράνες του ήπατος έχουν ξεχωριστές πρωτεΐνες συνδεόμενες με apoE (ανεξάρτητα από τους LDL-υποδοχείς). Αυτό που παραμένει να καθοριστεί είναι κατά πόσο αυτές αποτελούν σημαντικές πρωτεΐνες για τη μεσολάβηση της σύνδεσης των υπολειμμάτων, την πρόσληψή τους, ή και τα δύο, από το ήπαρ in vivo. Η πρόσληψη χυλομικρών από το ήπαρ μπορεί να είναι μια διαδικασία με πολλά βήματα που περιλαμβάνει τη σύνδεσή τους και την ακόλουθη πρόσληψή τους από τα ηπατοκύτταρα. Όπως είναι προφανές από τη συζήτηση αυτή, ο ακριβής μηχανισμός της πρόσληψης των υπολειμμάτων χυλομικρών πρέπει να διασαφηνιστεί. Ωστόσο, είναι γνωστό ότι για την πρόσληψη των υπολειμμάτων χυλομικρών μεσολαβεί η apoE (25).

2. *Μεταφορά λιπιδίων από το ήπαρ προς περιφερικούς ιστούς:* Οι πολύ χαμήλης πυκνότητας λιποπρωτέϊνες (VLDL) είναι μόρια πλούσια σε τριγλυκερίδια που περιέχουν apoE και apoB-100 που συντίθενται και εκκρίνονται από τα ηπατοκύτταρα (Σχήμα 1). Κατά τη λιπολυτική διαδικασία, ένα τμήμα των υπολειμμάτων των VLDL απομακρύνονται από το πλάσμα

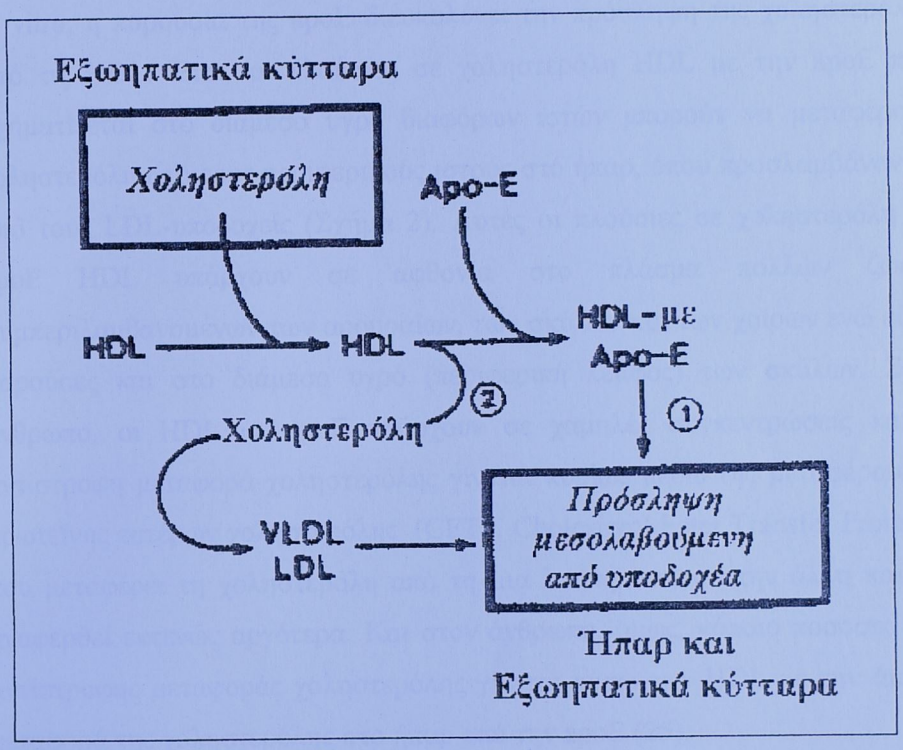
μέσω των υποδοχέων LDL. Η ηπατική πρόσληψη των υπολειμμάτων VLDL και των IDL γίνεται πρωτίστως με τη μεσολάβηση της apoE. Καθώς τα μόρια καταλήγουν στην τελική μορφή της LDL (σταδιακά μικρότερα και πιο πλούσια σε χοληστερόλη), χάνουν την apoE τους, και η apoB-100 γίνεται ο σύνδεσμος που είναι υπεύθυνος για τη δέσμευση της LDL στους LDL-υποδοχείς (25).



Σχήμα 1. Γενικό σχήμα που περιγράφει περιληπτικά το μεταβολισμό των χυλομικρών, VLDL, IDL, LDL, και υπολειμμάτων χυλομικρών (29).

3. *Μεταφορά της χοληστερόλης από τους περιφερικούς ιστούς στο ήπαρ.*

Ο τρόπος που η apoE συμμετέχει στη διαδικασία αυτή, που αναφέρεται ως αντίστροφη μεταφορά χοληστερόλης (reverse cholesterol transport), και περιλαμβάνει τις HDL (υψηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνες) ως μέσο μεταφοράς (25) φαίνεται διαγραμματικά στο Σχήμα 2.



Σχήμα 2. Ρόλος των HDL στην πρόσληψη χοληστερόλης από κύτταρα που περιέχουν υπερβολική ποσότητα και στην κατανομή της σε κύτταρα που απαιτούν χοληστερόλη για την παραγωγή στεροειδικών ορμονών, βιοσύνθεση μεμβρανών, σύνθεση χολικών αλάτων κ.λ.π. 1. Η παρουσία της apoE στην HDL κατευθύνει τις λιποπρωτεΐνες αυτές σε κύτταρα με υποδοχείς λιποπρωτεϊνών. 2. Εναλλακτικά, η χοληστερόλη της HDL μπορεί να μεταφερθεί σε άλλες λιποπρωτεΐνες, οι οποίες στη συνέχεια προσλαμβάνονται με ενδοκύττωση μέσω υποδοχέων (25).

Η αντίστροφη μεταφορά της χοληστερόλης έχει διάφορα σημεία κλειδιά. Τα κύτταρα που είναι πλούσια σε χοληστερόλη, όπως τα μακροφάγα, μπορούν να απελευθερώσουν τη χοληστερόλη τους σε αποδέκτες στο διάμεσο υγρό. Κύριος αποδέκτης χοληστερόλης είναι η HDL (HDL χωρίς apoE). Καθώς οι HDL εμπλουτίζονται σε χοληστερόλη, αποκτούν την apoE. Όπως

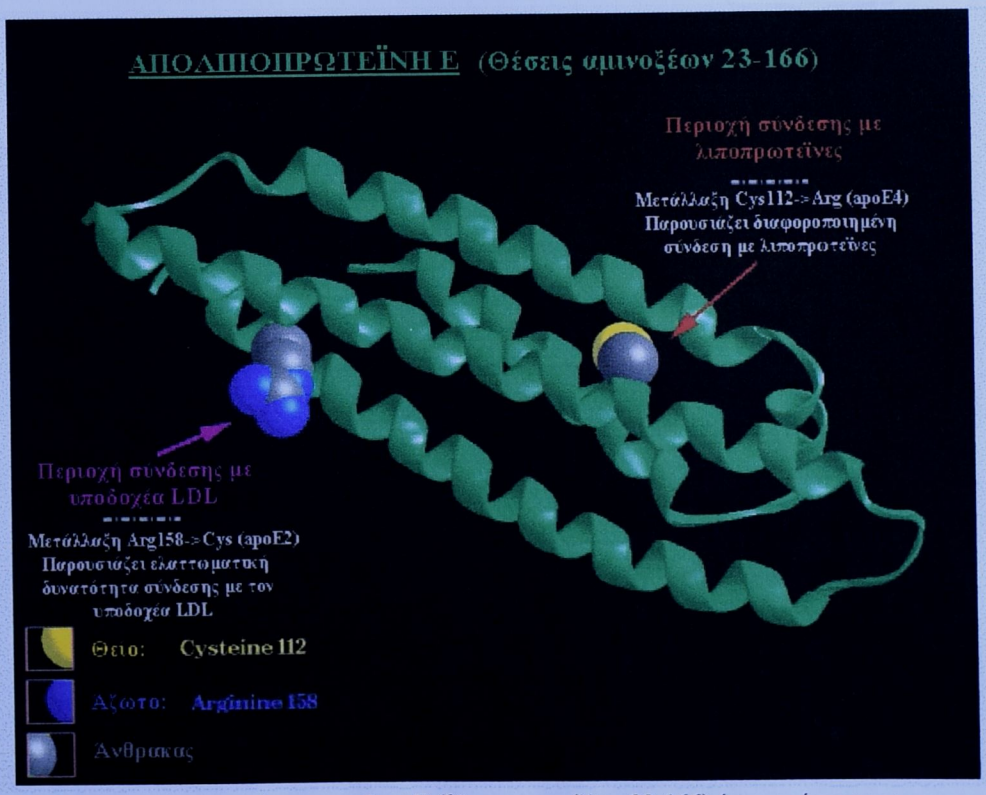
σημειώθηκε προηγουμένως, η apoE είναι διαθέσιμη στο διάμεσο υγρό ως προϊόν που εκκρίνεται από διάφορους τύπους κυττάρων, συμπεριλαμβανομένων των μακροφάγων, των λείων μυϊκών κυττάρων και άλλων, και εμφανίζει μεγάλη ικανότητα σύνδεσης με τις HDL λιποπρωτεΐνες καθώς αυτές εμπλουτίζονται με χοληστερόλη. Όπως έχει δειχθεί από έρευνες in vitro, η παρουσία της apoE διευκολύνει την πρόσληψη της χοληστερόλης από τις HDL. Έτσι, οι πλούσιες σε χοληστερόλη HDL με την apoE που σχηματίζεται στο διάμεσο υγρό διαφόρων ιστών μπορούν να μεταφέρουν χοληστερόλη από τους περιφερικούς ιστούς στο ήπαρ, όπου προσλαμβάνονται από τους LDL-υποδοχείς (Σχήμα 2). Αυτές οι πλούσιες σε χοληστερόλη με apoE HDL υπάρχουν σε αφθονία στο πλάσμα πολλών ζώων, συμπεριλαμβανομένων των αρουραίων, των σκύλων και των χοίρων ενώ είναι παρούσες και στο διάμεσο υγρό (περιφερική λέμφος) των σκύλων. Στον ανθρώπο, οι HDL με apoE υπάρχουν σε χαμηλές συγκεντρώσεις και η αντίστροφη μεταφορά χοληστερόλης γίνεται κυρίως μέσω της μεταφέρουσας πρωτεΐνης εστέρων χοληστερόλης (CETP, Cholesterol Ester Transfer Protein), που μεταφέρει τη χοληστερόλη από τη μια λιποπρωτεΐνη στην άλλη και θα αναφερθεί εκτενώς αργότερα. Και στον άνθρωπο, όμως, κάποιο ποσοστό της αντίστροφης μεταφοράς χοληστερόλης γίνεται μέσω των HDL με την άμεση μεταφορά της χοληστερόλης στο ήπαρ από την apoE (25).

1.3. ΤΟ ΓΟΝΙΔΙΟ ΚΑΙ Η ΠΡΩΤΕΪΝΗ ΤΗΣ APOE.

Το γονίδιο της apoE εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 19 και είναι στενά συνδεδεμένο με το γονίδιο που κωδικοποιεί την apoC-I (30). Το γονίδιο της apoE έχει μήκος 3.7 kb (kb=1000 βάσεις) και περιέχει τέσσερα exons Το αρχικό προϊόν της μετάφρασης του mRNA αυτού είναι μια πρωτεΐνη 317 αμινοξέων, με τα 18 αμινοτελικά αμινοξέα να λειτουργούν ως σινιάλο αναγνώρισης. Η ώριμη apoE εκκρίνεται ως πρωτείνη 299 αμινοξέων με μοριακό βάρος MB=34,200 (25).

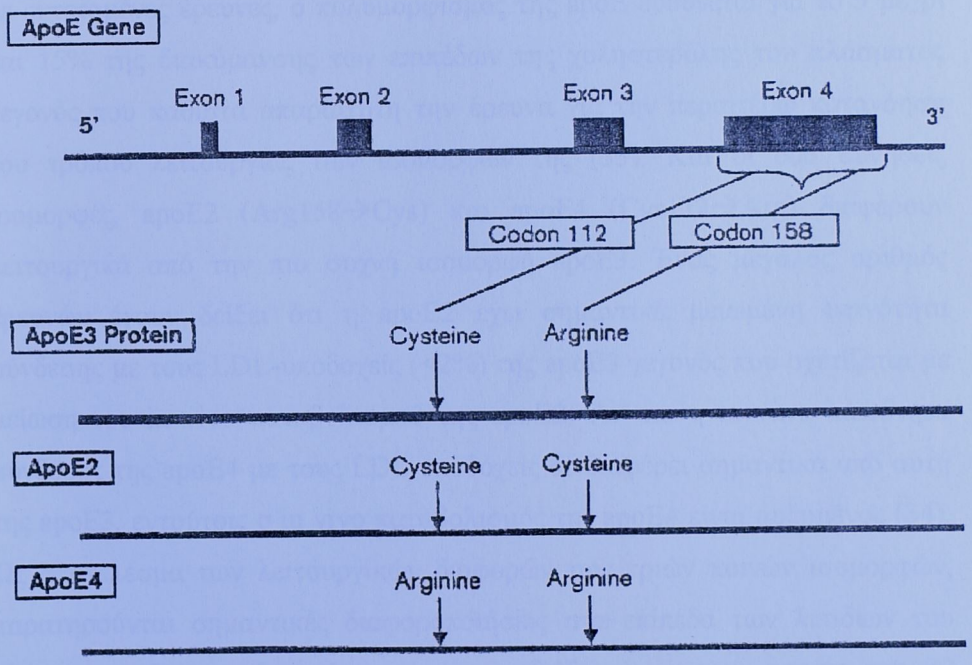
1.4. ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΣ ΤΗΣ APOE.

Η πολυμορφική φύση της apoE ανακαλύφθηκε από τον Utennann και τους συνεργάτες του (1982), χρησιμοποιώντας ισοηλεκτρική εστίαση, ενώ διαλευκάνθηκε περαιτέρω από τους Zannis και Breslow (1981), μετά από ηλεκτροφόρηση δύο διαστάσεων. Οι τρεις κύριες ισομορφές της apoE, που αναφέρονται ως apoE2, E3, E4, αποτελούν προϊόντα τριών κοινών αλληλομόρφων (ε2, ε3 και ε4) του γενετικού τόπου της apoE στο χρωμόσωμα 19. Τρεις ομόζυγοι φαινότυποι (apoE2/2, E3/3 και E4/4) και τρεις ετερόζυγοι (apoE2/3, E3/4 και E2/4) προκύπτουν από την έκφραση οποιωνδήποτε δύο από τα παραπάνω τρία αλληλόμορφα. Ο πιο συχνός φαινότυπος είναι ο apoE3/3 και το πιο συχνό αλληλόμορφο το ε3. Για το λόγο αυτό η apoE3 θεωρείται ότι είναι η αρχική μορφή της πρωτεΐνης, ενώ η apoE2 και E4 ισομορφές προήλθαν από σημειακές μεταλλάξεις του ε3 γονιδίου (Σχήμα 3).



Σχήμα 3. Δομή της απολιποπρωτεΐνης Ε (θέσεις αμινοξέων 23-166) όπου φαίνονται οι συνήθεις μεταλλάξεις που οδηγούν στη δημιουργία των ισομορφών apoE2 και apoE4.

Η μοριακή βάση του πολυμορφισμού της apoE διασαφηνίστηκε από την ανάλυση των αλληλουχιών των αμινοξέων των τριών ισομορφών. Οι διαφορές μεταξύ των apoE2, E3 και E4 οφείλονται σε αντικαταστάσεις αμινοξέων. Η απολιποπρωτεΐνη E4 διαφέρει από την apoE3 στο ότι στην apoE4 η αργινίνη έχει αντικαταστήσει τη φυσιολογικά υπάρχουσα κυστεΐνη στη θέση 112 της αμινοξικής αλληλουχίας (βλ. Σχήμα 4). Επίσης, η πιο συνήθης μορφή της apoE2 διαφέρει από την apoE3 στη θέση 158, όπου η κυστεΐνη έχει αντικαταστήσει τη φυσιολογικά υπάρχουσα αργινίνη. Οι διαφορές της φόρτισης μεταξύ των τριών ισομορφών που ανιχνεύτηκαν με ισοηλεκτρική εστίαση εξηγείται από αυτές τις μονές αντικαταστάσεις αμινοξέων (25).



Σχήμα 4. Διαφορές στην αλληλουχία των αμινοξέων μεταξύ των ισομορφών της apoE (31).

1.5. ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΥ ΤΗΣ ΑΡΟΕ ΣΤΟ ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟ ΤΩΝ ΛΙΠΔΙΩΝ.

Όπως αναφέρθηκε, η apoE είναι πολυμορφική με τρεις κοινές ισομορφές, τις apoE2, apoE3 και apoE4 (προϊόντα των αλληλομόρφων *ε2, ε3* και *ε4* αντίστοιχα). Ο πολυμορφισμός της apoE, με δεδομένο το σημαντικό της ρόλο στο μεταβολισμό των λιπών, επηρεάζει άμεσα τα επίπεδα των λιπιδίων του πλάσματος. Πρέπει να τονίσουμε ότι το γονίδιο της apoE είναι το πρώτο πολυμορφικό γονίδιο που έχει περιγραφεί, το οποίο εμπλέκεται μεταβολικά στον καθορισμό της φυσιολογικής διακύμανσης μεταξύ των ατόμων όσον αφορά τις λιποπρωτείνες του πλάσματος (32). Σε υγιή άτομα, λοιπόν, σύμφωνα με εκτεταμένες έρευνες, ο πολυμορφισμός της apoE ευθύνεται για το 5 μέχρι και 15% της διακύμανσης των επιπέδων της χοληστερόλης του πλάσματος γεγονός που καθιστά απαραίτητη την έρευνα για την περαιτέρω κατανόηση του τρόπου λειτουργίας των ισομορφών της (33). Και οι δύο συνήθεις ισομορφές, apoE2 (Arg158→Cys) και apoE4 (Cys112→Arg) διαφέρουν λειτουργικά από την πιο συχνή ισομορφή apoE3. Ένας μεγάλος αριθμός ερευνών έχουν δείξει ότι η apoE2 έχει σημαντικά μειωμένη ικανότητα σύνδεσης με τους LDL-υποδοχείς (<2%) της apoE3 γεγονός που σχετίζεται με μείωση του in vivo καταβολισμού της apoE2. Αν και η in vitro ικανότητα σύνδεσης της apoE4 με τους LDL υποδοχείς δε διαφέρει σημαντικά από αυτή της apoE3, εντούτοις ο in vivo καταβολισμός της apoE4 είναι αυξημένος (34). Ως αποτέλεσμα των λειτουργικών διαφορών των τριών κοινών ισομορφών, παρατηρούνται σημαντικές διαφοροποιήσεις στα επίπεδα των λιπιδίων του πλάσματος. Εκτεταμένες έρευνες έχουν δείξει ότι στους φορείς του *ε2* αλληλομόρφου τα επίπεδα ολικής και LDL χοληστερόλης είναι χαμηλότερα από τους ομοζυγώτες E3/3, ενώ οι φορείς του *ε4* αλληλομόρφου χαρακτηρίζονται από αυξημένα επίπεδα (32-43). Σημαντικές επιδράσεις έχουν αναφερθεί και για τα επίπεδα HDL και τριγλυκεριδίων όπως θα δούμε και παρακάτω. Η μειωμένη ικανότητα σύνδεσης της apoE2 στους LDL υποδοχείς είναι αναμενόμενο να έχει ως αποτέλεσμα τη συσσώρευση των λιποπρωτεϊνών αυτών στο πλάσμα (δηλαδή συσσώρευση υπολειμμάτων χυλομικρών και

VLDL, IDL, και HDLc). Στην πραγματικότητα, ωστόσο, η συσσώρευση των λιποπρωτεϊνών αυτών είναι μόνο μέτρια στους περισσότερους E2 ομοζυγώτες, που αντίθετα παρουσιάζουν μεγάλη μείωση της συγκέντρωσης των LDL. Συνολικά, αυτή είναι η εικόνα μιας μορφής δυσλιποπρωτεϊναιμίας (αυτοσωμική υπολειπόμενη) που χαρακτηρίζεται από ολική χοληστερόλη κάτω του φυσιολογικού και την παρουσία υπολειμμάτων λιποπρωτεϊνών που μπορούν να φανούν με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης ως κλάσματα *β*-VLDL. Έχει βρεθεί ότι το 10% των ατόμων με πρωτοπαθή υποχοληστερολαιμία είναι E2/2 ομοζυγώτες και παρουσιάζουν αυτό που αποκαλείται πρωτοπαθής δυσβηταλιποπρωτεϊναιμία. Η σημαντική επίδραση της ομοζυγότητας της apoE2 στη χοληστερόλη του πλάσματος και τις συγκεντρώσεις λιποπρωτεϊνών έδωσε ώθηση στην έρευνα πάνω στην πιθανή in vivo επίδραση της ετεροζυγότητας του *ε*2 αλληλόμορφου στο μεταβολισμό των λιποπρωτεϊνών του πλάσματος. Οι apoE2 ετεροζυγώτες συνιστούν ένα σημαντικό ποσοστό σε όλους τους πληθυσμούς κυμαινόμενοι από 5.4% στους Φινλανδούς στο 21.3% στον πληθυσμό της Σιγκαπούρης. Για την ακρίβεια, παλιότερες έρευνες στο γερμανικό πληθυσμό φανέρωσαν σημαντικές επιδράσεις του *ε*2 αλληλομόρφου (το αλληλόμορφο που κωδικοποιεί για την apoE2) στην ολική χοληστερόλη, τα τριγλυκερίδια, τη VLDL χοληστερόλη και τα VLDL τριγλυκερίδια του πλάσματος. Συγκεκριμένα παρατηρήθηκε ότι η παρουσία του *ε*2 σχετίζεται με μειωμένα επίπεδα ολικής και LDL χοληστερόλης. Επιπρόσθετα, φανέρωσαν ότι υπάρχει σχέση του αλληλομόρφου *ε*4 με υψηλή χοληστερόλη. Μάλιστα, τα επίπεδα της χοληστετόλης αυξάνονται κατά την ακόλουθη σειρά: 2/2, 2/3, 3/3, 4/3 και 4/4. Ο πληθυσμός της Φινλανδίας, με την υψηλή συχνότητα του αλληλομόρφου *ε*4, παρείχε μια εξαιρετική ευκαιρία να εξεταστεί η υπόθεση αλλά και να επεκταθούν περαιτέρω τα στοιχεία σχετικά με τις επιδράσεις του πολυμορφισμού της apoE. Έτσι, κατέστη δυνατό να δειχθεί ότι οι ομοζυγώτες apoE4/4 και οι E3/4 ετεροζυγώτες όντως έχουν αξιοσημείωτα υψηλότερη μέση ολική και LDL χοληστερόλη σε σχέση με τα E3/3 άτομα. Η ίδια τάση των

επιδράσεων του apoE γονιδίου στις λιποπρωτεΐνες του πλάσματος παρατηρήθηκε σε πάρα πολλές άλλες έρευνες ανά τον κόσμο.

Συνολικά, λοιπόν, το συμπέρασμα ήταν ότι σε σχέση με το πιο συχνό γονίδιο ε3, τα δύο άλλα συνήθη αλληλόμορφα (ε2 και ε4) επηρεάζουν τις συγκεντρώσεις των λιπιδίων και των απολιποπρωτεϊνών του πλάσματος αλλά με αντίθετο τρόπο, καθορίζοντας έτσι τη διακύμανση στους πληθυσμούς κατά ένα σημαντικό ποσοστό (34).

Ενδεικτικά, σε έρευνα, όπου εξετάστηκε ο πολυμορφισμός της apoE και η επίδρασή του στα λιπίδια του πλάσματος σε εννιά πληθυσμούς διαφορετικής εθνικότητας, όλοι οι πληθυσμοί έδειξαν ότι η δράση του αλληλομόρφου ε2 οδηγεί σε μείωση των επιπέδων της χοληστερόλης του πλάσματος, ενώ όλοι εκτός από τον πληθυσμό της Μαλαισίας παρουσίασαν αυξημένα επίπεδα χοληστερόλης παρουσία του γονιδίου ε4. Η έλλειψη της επίδρασης αυτής στους Μαλαισιανούς δεν ήταν επαρκούς μεγέθους για να δημιουργήσει μια στατιστικά σημαντική διαφορά στις επιδράσεις των αλληλομόρφων μεταξύ των διαφόρων ομάδων. Τα στοιχεία αυτά δείχνουν ότι τα αλληλόμορφα της apoE δρουν με ένα σχετικά μοναδικό τρόπο σε διαφορετικούς πληθυσμούς παρά τις διαφορές σε γενετικό υπόβαθρο και περιβάλλον (35).

1.6. ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΣ ΤΗΣ APOE ΚΑΙ ΑΘΗΡΟΣΚΛΗΡΩΣΗ

Η σύνθετη σχέση του πολυμορφισμού της apoE με τα επίπεδα των λιπιδίων και την υπερλιπιδαιμία δείχνουν ότι τα αλληλόμορφα της apoE συνεισφέρουν στο γενετικό κίνδυνο ανάπτυξης αθηροσκληρωτικής αγγειακής νόσου. Όπως είναι εύκολο να προβλεφθεί, δεν υπάρχει απλή σχέση μεταξύ των φαινοτύπων της apoE και του κινδύνου αθηροσκλήρωση. Τα αποτελέσματα όσον αφορά τη σχέση των φαινοτύπων της apoE με την εμφάνιση στεφανιαίας νόσου είναι αντιφατικά προς το παρόν (34). Η επίδραση των φαινοτύπων της apoE στα κυκλοφορούντα επίπεδα των λιπιδίων θεωρείται ως μια έμμεση απόδειξη ότι ο πολυμορφισμός της apoE επηρεάζει τον κίνδυνο για στεφανιαία νόσο (CHD), όπως έδειξε η έρευνα Etude Cas-Temoins sur l' Infarctus, du Muocarde (44). Αυξάνοντας τα επίπεδα της LDL χοληστερόλης και μειώνοντας της HDL, η

apoE4 συνδέεται με αυξημένο κίνδυνο αθηροσκλήρωσης (33). Έτσι, οι περιοχές με υψηλή συχνότητα apoE4 θα έπρεπε να εμφανίζονται με αυξημένη επίπτωση CHD και ακριβώς αυτό έδειξε η έρευνα European Atherosclerosis Research (45). Περισσότερο άμεση απόδειξη για τη θεωρία αυτή αναφέρθηκε *από* την έρευνα Pathobiological Determinants of Atherosclerosis in Youth, παρέχοντας ισχυρά στοιχεία ότι σε υγιείς νεαρούς ενήλικες που πέθαναν από αίτια που δεν είχαν σχέση με τις καρδιαγγειακές παθήσεις, αυτοί με φαινότυπο apoE4 φανέρωσαν στην αυτοψία περισσότερο έντονες αθηροσκληρωτικές αλλοιώσεις στις θωρακικές και κοιλιακές αρτηρίες από αυτούς χωρίς apoE4. Ωστόσο, αναφέρθησαν, παράλληλα, αντιφατικά αποτελέσματα σχετικά με την επίδραση της apoE4 στην CHD (46). Επίσης αξιόλογα στοιχεία έδωσε άλλη μελέτη που έδειξε ότι ετερόζυγοι E4/E3 άντρες ήταν νεότεροι στο πρώτο επεισόδιο εμφράγματος του μυοκαρδίου σε σχέση με ασθενείς που είχαν άλλους φαινοτύπους. Όπως παρουσιάστηκε στη μελέτη, ο γενετικός πολυμορφισμός της apoE επηρέασε αξιοσημείωτα την κλινική εκδήλωση της καρδιαγγειακής νόσου (47). Ακόμη, αξίζουν να αναφερθούν τα αποτελέσματα της εξέτασης της σχέσης του πολυμορφισμού της apoE με τους πολλαπλούς κινδύνους για CHD σε παιδιά, στα πλαίσια της Bogalusa Heart study. Η έρευνα έδειξε ότι η παρουσία οικογενειακού ιστορικού καρδιακής προσβολής και διαβήτη μεταξύ των τριών ομάδων φαινοτύπων μπορεί να αποτελεί έναν εναλλακτικό δείκτη μελλοντικού κινδύνου θνησιμότητας στα παιδιά. Αν και οι έρευνες σε απογόνους έχουν μειωμένη ικανότητα να εξετάζουν τη σχέση γονότυπου-ασθένειας, ο προσδιορισμός της apoE στα παιδιά σε σχέση με το οικογενειακό ιστορικό CHD έδειξε ότι το αλληλόμορφο ε4 ήταν πιο συχνό ενώ το ε2 λιγότερο συχνό μεταξύ των απογόνων με ασθενείς γονείς παρά μεταξύ υγιών γονέων (48). Οι Ιάπωνες και οι Κινέζοι, δύο πληθυσμοί που έχουν παραδοσιακά χαμηλούς δείκτες CHD, παρουσιάζουν χαμηλή συχνότητα του αλληλομόρφου ε4, ενώ αντίθετα η υψηλή συχνότητα του ε4 στους Φιλανδούς έχει οδηγήσει στην υποψία ότι το αλληλόμορφο αυτό συνεισφέρει στην αυξημένη εμφάνιση CHD στον πληθυσμό αυτό. Ωστόσο, οι Σουδανοί έχουν ιδιαίτερα υψηλή συχνότητα του ε4 και, αν και δεν υπάρχουν επιδημιολογικές

έρευνες στο Σουδάν, είναι γνωστό ότι η CHD δεν είναι συχνή σε άλλους μαύρους Αφρικανικούς πληθυσμούς. Ωστόσο, δεν υπάρχουν σαφείς αποδείξεις για τη σχέση μεταξύ CHD και του αλληλομόρφου ε2. Τα στοιχεία δε δείχνουν μια τάση μεταξύ αυξημένης συχνότητας του ε2 και ελαττωμένης εμφάνισης CHD (35). Η αντιφατικότητα σχετικά με την επίδραση του πολυμορφισμού της apoE στον κίνδυνο για CHD έχει αναφερθεί τουλάχιστον 15 χρόνια πριν όταν και παρατηρήθηκε χαμηλότερη και υψηλότερη συχνότητα του αλληλομόρφου ε4 μεταξύ επιζώντων εμφράγματος του μυοκαρδίου και υγιών ατόμων αντίστοιχα. Από τότε, οι συζητήσεις πάνω στο συγκεκριμένο θέμα είναι συνεχείς. Στοιχεία που αποδεικνύουν ότι οι διάφορες παραλλαγές ενός γονιδίου επηρεάζουν την ανάπτυξη μιας ασθένειας παρέχονται συνήθως από μακροχρόνιες επιδημιολογικές έρευνες που δείχνουν ότι μεταξύ των προσυμπτωματικών ατόμων, μόνο εκείνοι με μία συγκεκριμένη παραλλαγή του γονιδίου έχουν υψηλότερο κίνδυνο για ανάπτυξη της ασθένειας (33). Τελευταία, δύο τέτοιες έρευνες έχουν ολοκληρωθεί όσον αφορά την αμφισβητούμενη σχέση μεταξύ της apoE και της CHD. Οι Wilson et al.(49) παρείχαν πειστικές αποδείξεις ότι ο συγκεκριμένος κίνδυνος των φαινοτύπων της apoE για την ανάπτυξη CHD είναι εξαρτώμενος από το γενικότερο πλαίσιο συνθηκών με μια συγκεκριμένη σχέση μεταξύ της apoE4 και του κινδύνου για CHD στις γυναίκες αλλά όχι στους άντρες. Ακόμα πιο πειστικά στοιχεία ότι φέροντας ένα αλληλόμορφο apoE4 αποτελεί έναν πρόσθετο ατομικό κίνδυνο για τη μελλοντική ανάπτυξη θανάσιμου εμφράγματος του μυοκαρδίου δημοσιεύτηκαν από τον Stengard et al. (50). Μετά από πεντάχρονη (follow-up) έρευνα σε προσυμπτωματικούς ηλικιωμένους Φιλανδούς άντρες, η συχνότητα της apoE4 ήταν σημαντικά υψηλότερη στους άντρες που πέθαναν λόγω θανάσιμου εμφράγματος του μυοκαρδίου σε σύγκριση με τους επιζώντες. Πολύ ενδιαφέρον είχε το γεγονός ότι οι συγγραφείς παρατήρησαν μια αξιοσημείωτη διαφορά κατά περιοχές μέσα στη Φινλανδία. Αυτό υποστηρίζει ακόμα περισσότερο την υπόθεση ότι υπάρχει εξάρτηση μεταξύ της επίδρασης του πολυμορφισμού της apoE στον κίνδυνο για CHD και των γενικότερων παραγόντων που χαρακτηρίζουν ένα πληθυσμό (33).

2. ΠΡΩΤΕΪΝΗ ΜΕΤΑΦΟΡΑΣ ΕΣΤΕΡΩΝ ΧΟΛΗΣΤΕΡΟΛΗΣ (CETP)

2.1. ΕΙΣΑΓΩΓΙΚΑ

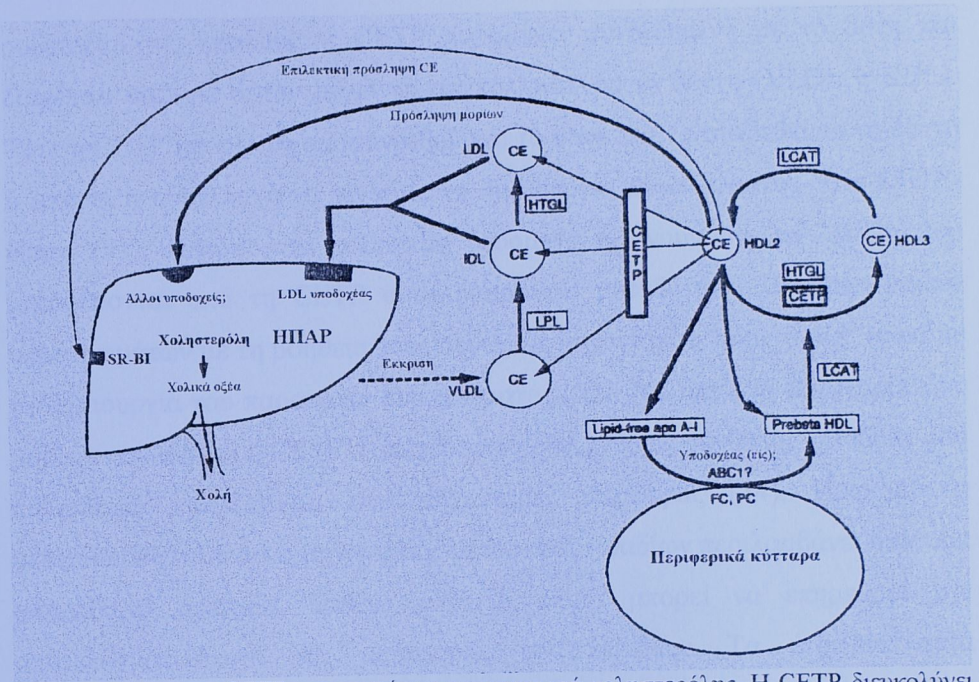
Οι λιποπρωτεΐνες του πλάσματος υφίστανται συνεχείς τροποποιήσεις κατά τη διέλευση τους μέσα από το πλάσμα. Αυτό οφείλεται στη δράση των ενζύμων που μεταβολίζουν τα λίπη και των πρωτεϊνών μεταφοράς λιπών. Οι δράσεις αυτές έχουν σημαντική επίδραση στη σύσταση, στο μέγεθος και στη συγκέντρωση των λιποπρωτεϊνών. Οι διαδικασίες μεταφοράς ουδέτερων λιπών και φωσφολιπιδίων πραγματοποιούνται με τη μεσολάβηση εξειδικευμένων πρωτεϊνών του πλάσματος που αποκαλούνται πρωτεΐνες μεταφοράς λιπών. Στην κατηγορία αυτή ανήκει η πρωτεΐνη μεταφοράς εστέρων χοληστερό-λης (Cholesteryl ester transfer protein, CETP). Η CETP ανήκει στην οικογένεια των γονιδίων που ονομάζεται οικογένεια πρωτεϊνών μεταφοράς λιπών και δεσμευτικών πρωτεϊνών λιποπολυσακκχαριτών. Παρά την έλλειψη δομικής συγγένειας, οι πρωτεΐνες μεταφοράς πρωτεϊνών του πλάσματος παρουσιάζουν λειτουργική αναλογία με τις ενδοκυτταρικές πρωτεΐνες μεταφοράς λιπών που συμμετέχουν στη μεταφορά λιπιδίων μεταξύ των οργανιδίων και στη διαμόρφωση των λιποπρωτεϊνών. Οι πρωτεΐνες μεταφοράς λιπών έχουν θέσεις σύνδεσης για τα μεταφερόμενα λιπίδια και λειτουργούν με μηχανισμούς που περιλαμβάνουν τη μεσολάβηση φορέων. Τελευταία, η λειτουργία των πρωτεϊνών μεταφοράς λιπών έχει διευκρινιστεί σε σημαντικό βαθμό από καταστάσεις γενετικής έλλειψης. Η γενετική ανεπάρκεια της CETP οδηγεί σε αξιοσημείωτη αύξηση των επιπέδων της υψηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνης (HDL). Η HDL θεωρείται γενικά ότι έχει αντιαθηρογόνο ρόλο. Από την άλλη, η CETP έχει ένα κεντρικό ρόλο στη αντίστροφη μεταφορά χοληστερόλης (reverse cholesterol transport), δηλαδή στη μεταφορά της χοληστερόλης από τους περιφερικούς ιστούς στο ήπαρ. Από τα παραπάνω προκύπτει ότι η σχέση της CETP με την αθηρογένεση δεν είναι ξεκάθαρη (51). Το αν η CETP τελικά είναι προ- ή αντιαθηρογονική αποτελεί ένα καυτό ζήτημα που απασχολεί τους ερευνητές τα τελευταία 15 χρόνια από την πρώτη ανακάλυψη γενετικής έλλειψης του μορίου αυτού σε Ιάπωνες με αξιοσημείωτη υπεραλφαλιπο-

πρωτεϊναιμία. Σημαντικοί λόγοι που το θέμα αυτό έχει κεντρίσει το ενδιαφέρον των επιστημόνων είναι το γεγονός ότι η CETP είναι μια μοναδική πρωτεΐνη που έχει την ικανότητα να αλλάζει την κατανομή της χοληστερόλης και των τριγλυκεριδίων μεταξύ των λιποπρωτεϊνών του πλάσματος (52).

2.2. CETP-ΑΝΤΙΣΤΡΟΦΗ ΜΕΤΑΦΟΡΑ ΧΟΛΗΣΤΕΡΟΛΗΣ

Η λειτουργία της HDL περιλαμβάνει τη μεταφορά της περίσσειας της χοληστερόλης από τους περιφερικούς ιστούς στο ήπαρ για την περαιτέρω έκκριση της στη χολή. Η οδός αυτή χαρακτηρίζεται ως «αντίστροφη μεταφορά χοληστερόλης» (Σχήμα 5). Το αρχικό στάδιο της αντίστροφης μεταφοράς χοληστερόλης είναι η αλληλεπίδραση μεταξύ της HDL και των περιφερικών κυττάρων όπως οι ινοβλάστες και τα μακροφάγα (53). Η HDL παραλαμβάνει χοληστερόλη από τα περιφερικά κύτταρα και η χοληστερόλη εστεροποιείται από την ακυλοτρανφεράση της λεκιθίνης/χολη-στερόλης (LCAT) για τη διαμόρφωση εστέρων χοληστερόλης (CE), που στη συνέχεια μεταφέρονται από την πρωτεΐνη μεταφοράς εστέρων χοληστερόλης (CETP) στις πολύ χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνες (VLDL), στις ενδιάμεσης και χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνες (IDL και LDL αντίστοιχα) (54). Οι IDL και LDL καταβολίζονται μέσω του LDL υποδοχέα στο ήπαρ (53). Επίσης, κάποιο ποσοστό από τους εστέρες χοληστερόλης παραλαμβάνεται επιλεκτικά από το ήπαρ μεσω του υποδοχέα scavenger τάξης B τύπου I (SR-BI) (55). Η HDL εμπλουτίζεται με τριγλυκερίδια (TG) μετά τη μεταφορά των CE που γίνεται μέσω της CETP και τα TG υδρολύονται από την ηπατική λιπάση (HL). Έτσι, το μέγεθος της HDL γίνεται μικρότερο για την περαιτέρω πρόσληψη χοληστερόλης.

Επομένως, η CETP αποτελεί μια πρωτεΐνη-κλειδί για την αντίστροφη μεταφορά χοληστερόλης καθώς εμπλέκεται στη ρύθμιση των επιπέδων της HDL χοληστερόλης ενώ, παράλληλα, διευκολύνει την αναδιαμόρφωση των HDL μορίων. Η σημασία της CETP του πλάσματος στο μεταβολισμό των λιποπρωτεϊνών τονίστηκε από την ανακάλυψη ατόμων με έλλειψη CETP και σημαντική υπεραλφαλιποπρωτεϊναιμία (53).



Σχήμα 5. Ρόλος της CETP στην αντίστροφη μεταφορά χοληστερόλης. Η CETP διευκολύνει τη μεταφορά των CE από την HDL στις λιποπρωτεΐνες που περιέχουν apo-B. Οι IDL και LDL που έχουν παραλάβει τους CE προσλαμβάνονται από τον ηπατικό LDL υποδοχέα. Η CETP συμμετέχει επίσης στην αναδιαμόρφωση των HDL μορίων (53, 56).

2.3. ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΜΕΤΑΦΟΡΑΣ ΛΙΠΙΔΙΩΝ ΑΠΟ ΤΗ CETP

Η CETP μπορεί να συνδεθεί με μια ποικιλία λιπιδίων. Πέρα από τους εστέρες χοληστερόλης (CE), τα τριγλυκερίδια και τα φωσφολιπίδια, μπορεί να συνδεθεί με λιποπολυσακχαρίτες, χοληστερόλη, εστέρες ρετινόλης και εστεροποιημένη 25-υδροξυχοληστερόλη.

Η μεταφορά των λιπιδίων που διευκολύνεται από τη CETP είναι πιθανόν μια διαδικασία που γίνεται με τη μεσολάβηση μεταφορέων. Μετά τη σύνδεση της CETP με το δότη (HDL), γίνεται ανταλλαγή των CE στην επιφάνεια της HDL με ένα μόριο ουδέτερου λιπιδίου σε μια θέση σύνδεσης της CETP. Τότε, η CETP αποσυνδέεται από την HDL, διαχέεται και συνδέεται με τη λιποπρωτεΐνη-δέκτη. Εκεί ανταλλάσσει το συνδεδεμένο σε αυτή ουδέτερο λιπίδιο (CE) με ένα άλλο μόριο ουδέτερου λιπιδίου στην επιφάνεια του δέκτη. Η ανταλλαγή των φωσφολιπιδίων είναι πιθανόν να συμβαίνει με παρόμοιο μηχανισμό, αλλά περιλαμβάνει μία ή περισσότερες διαφορετικές θέσεις σύνδεσης πάνω στη CETP. Είναι επίσης πιθανό ότι μετά την ανταλλαγή του

ουδέτερού της λιπιδίου, η CETP παραμένει συνδεδεμένη με το δότη και διαχέεται μαζί με αυτόν μέχρι τη συγκόλληση με το δέκτη (VLDL ή LDL). Τότε η CETP μπορεί να αποσυνδεθεί από το δότη και να συνδεθεί με το δέκτη ή μπορεί η ανταλλαγή να γίνει με τη δημιουργία συμπλέγματος δότη-CETP-δέκτη (51). Ωστόσο, τα τελευταία δεδομένα δείχνουν ότι τα λιπίδια που μεταφέρονται από τη CETP ανταλλάσσονται μεταξύ των λιποπρωτεϊνικών υποστρωμάτων με τη βοήθεια ενός συνεχούς μηχανισμού "ping-pong" παρά με τη δημιουργία του παραπάνω συμπλέγματος (57). Άλλωστε, η κατηγορία των μορίων που ανήκει η CETP περιέχει εσωτερικές θέσεις σύνδεσης λιπιδίων, που πιθανότατα εμπλέκονται στο μηχανισμό μεταφοράς (54). Πειραματικά στοιχεία δείχνουν ότι ο μηχανισμός μεταφοράς λιπιδίων περιλαμβάνει διάφορα απαραίτητα στοιχεία, καθένα από τα οποία μπορεί να επηρεάσει την αποτελεσματικότητα της μεταφοράς των λιπιδίων. Τα στοιχεία αυτά συμπεριλαμβάνουν τη σύνδεση της CETP στη λιποπρωτεΐνη δότη ή/και δέκτη, τη διαθεσιμότητα των ουδέτερων λιπών στην επιφάνεια της λιποπρωτεΐνης και την είσοδο του ουδέτερου λίπους στις θέσεις σύνδεσης της CETP.

Οι Pattnaik & Zilversmit συμπέραναν ότι οι φωσφορικές φωσφολιπιδικές ομάδες των λιποπρωτεϊνών είναι οι πρωταρχικές θέσεις αλληλεπίδρασης με τη CETP και ότι η σταθερότητα των συμπλεγμάτων αυξάνει με τη θετική φόρτιση των λιποπρωτεϊνών. Οι διαφοροποιήσεις των HDL, LDL ή των VLDL που διευκολύνουν τη σύνδεση της CETP με τις λιποπρωτεΐνες οδήγησαν σε αυξημένη αποδοτικότητα της μεταφοράς των λιπιδίων ενώ η αναστολή της σύνδεσης της CETP με την HDL ανέστειλε και τη μεταφορά των λιπιδίων. Οι Nishida et al. συμπέραναν ότι η σύνδεση της CETP με τις λιποπρωτεΐνες καθορίζεται από μια ευαίσθητη ισορροπία μεταξύ υδροφοβικών και ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων και ότι απαιτείται η ιδανική αλληλεπίδραση με τα μόρια του δότη και του δέκτη για την επίτευξη της μέγιστης μεταφοράς CE (51). Εξάλλου, άλλη μελέτη έδειξε ότι η σύνδεση της CETP με τις λιποπρωτεΐνες μπορεί να είναι στοιχειώδης και ότι οι αλλαγές στην επιφανειακή πίεση μπορεί να ρυθμίζουν την αλληλεπίδραση της CETP με τις λιποπρωτεΐνες (58).

Η συγκέντρωση του ουδέτερου λίπους στην επιφάνεια των λιποπρωτεϊνών είναι ένας σημαντικός παράγοντας που ρυθμίζει την αποδοτικότητα της μεταφοράς λιπιδίων. Οι Morton & Steinbrunner αξιολόγησαν την εξάρτηση της δραστικότητας της CETP από τις συγκεντρώσεις των εστέρων χοληστερόλης και/ή των τριγλυκεριδίων στο φωσφολιπιδικό στρώμα των υποστρωμάτων λιποπρωτεϊνών (59). Σε χαμηλές συγκεντρώσεις CE και TG, η CETP συνδέεται με ένα λιποσφαίριο ή δισκοειδές μόριο HDL, αλλά η αλληλεπίδραση δεν οδηγεί σε διαδικασία μεταφοράς ουδέτερου λίπους. Ο συνολικός ρυθμός μεταφοράς ουδέτερων λιπών και ο ανταγωνισμός μεταξύ CE και TG για τη μεταφορά εξαρτάται από τις συγκεντρώσεις των λιπιδίων αυτών στο διπλό ή μονό στρώμα των φωσφολιπιδίων (51).

2.4. ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ CETP ΣΤΙΣ ΑΛΛΑΓΕΣ ΤΟΥ ΜΕΓΕΘΟΥΣ ΤΗΣ HDL

Σε πειράματα in vitro έχει βρεθεί ότι η CETP προκαλεί τη μετατροπή της HDL σε μικρότερα και μεγαλύτερα μόρια [συμπεριλαμβανομένων των πρόδρομων (προ-β) HDL]. Φαίνεται ότι η διαδικασία μεταφοράς των λιπιδίων οδηγεί σε αποσταθεροποίηση των απολιποπρωτεϊνών των λιποπρωτεϊνών.

Η πρωτογενής μορφή της HDL έχει δισκοειδές σχήμα και περιλαμβάνει apoAI, φωσφολιπίδια, χοληστερόλη αλλά όχι εστέρες χοληστερόλης. Τα μόρια αυτά θεωρούνται οι κυριότεροι δέκτες της χοληστερόλης των ιστών με σκοπό την τελική μεταφορά της στο ήπαρ. Επιπρόσθετα, τα μόρια αυτά της HDL έχουν προ-β ηλεκτροφορητική κινητικότητα. Παράλληλα, έχει βρεθεί αυξημένη ποσότητα προ-β HDL σε διαγονιδιακά ποντίκια που υπερεκφράζουν τη CETP, γεγονός που δείχνει ότι πραγματοποιείται in vivo μετατροπή των α-HDL σε προ-β HDL από τη CETP (51). Επίσης, για να δημιουργηθούν τα μόρια προ-β HDL από τη CETP απαιτείται η παρουσία των LDL και VLDL. Ενώ η CETP προωθεί τη μετακίνηση της apoAI από τα α-HDL στα προ-β HDL μόρια, η LCAT (ακυλοτρανφεράση της λεκιθίνης/χολη-στερόλης) προκαλεί τη διαμόρφωση α-HDL από προ-β HDL (54). Επομένως, είναι πιθανό ότι η HDL εναλλάσσεται μεταξύ των α και προ-β μορφών καθώς παραλαμβάνει και παραδίδει χοληστερόλη (51). Η δράση αυτή της μετατροπής της HDL από τη

CETP μπορεί να είναι καθοριστική για τη διαμόρφωση μικρών μορίων HDL που αποτελούν τους πρωταρχικούς δέκτες χοληστερόλης στην αντίστροφη μεταφορά χοληστερόλης (54).

2.5. ΤΟ ΓΟΝΙΔΙΟ ΚΑΙ Η ΠΡΩΤΕΪΝΗ ΤΗΣ CETP

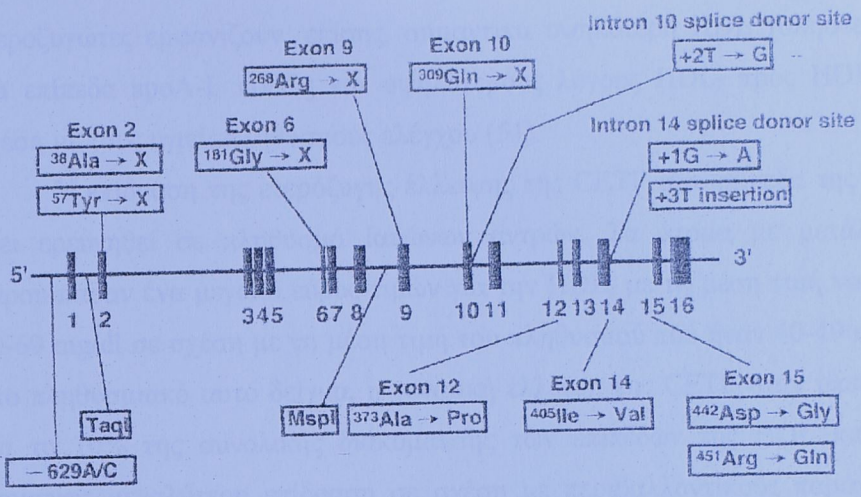
Η CETP του πλάσματος στον άνθρωπο είναι μια πολύ υδρόφοβη γλυκοπρωτεΐνη με MB 70000-74000 (54). Αποτελείται από 476 αμινοξέα. Η ανάλυση των αμινοξέων της καθαρής CETP έδειξε ένα ασυνήθιστα υψηλό ποσοστό (45%) μη πολικών τμήματων (53).

Το γονίδιο της CETP αποτελείται από 16 εξώνια (exons) και 15 ενδώνια (introns) που εκτείνεται σε 25 Kbp (51). Το μέγεθος των εξωνίων κυμαίνεται από 32 μέχρι 250 ζεύγη βάσεων (bp) (53). Το γονίδιο βρίσκεται στην περιοχή 16q12-21 του μεγάλου ποδιού του χρωμοσώματος 16 κοντά στο γονίδιο της LCAT.

2.6. ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΕΛΛΕΙΨΗ ΤΗΣ CETP

Οι μεταλλάξεις στο γονίδιο της CETP έχουν ως αποτέλεσμα μειωμένα επίπεδα CETP στο πλάσμα και αυξημένη HDL. Μέχρι σήμερα έχει περιγραφεί σημαντικός αριθμός μεταλλάξεων σε πληθυσμούς διαφόρων κατηγοριών και εθνικοτήτων. Το Σχήμα 6 συνοψίζει τις μεταλλάξεις και τους πολυμορφισμούς στο γονίδιο της CETP που έχουν αναφερθεί ως τώρα.

Οι πολυμορφισμοί που θα απασχολήσουν τη μελέτη μας είναι αυτός που εμφανίζεται στο εσώνιο (intron) 1 (Taq1B) και η «παρανοηματική» μετάλλαξη στο εξώνιο (exon) 14 Ile405Val που οδηγεί σε αντικατάσταση του αμινοξέος ισολευκίνη από βαλίνη στην ώριμη πρωτεΐνη.



Σχήμα 6. Μεταλλάξεις και πολυμορφισμοί στο ανθρώπινο γονίδιο της CETP που έχουν αναφερθεί μέχρι στιγμής (53).

2.7. ΒΙΟΧΗΜΙΚΕΣ ΑΝΩΜΑΛΙΕΣ ΤΩΝ ΛΙΠΟΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΤΟΥ ΠΛΑΣΜΑΤΟΣ ΣΕ ΑΤΟΜΑ ΜΕ ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΕΛΛΕΙΨΗ CETP

Οι γενετικές ανωμαλίες της CETP, είτε ομόζυγες είτε ετερόζυγες, οδηγούν σε αξιοσημείωτες αλλαγές στις λιποπρωτεΐνες του πλάσματος (51,60). Το πιο χαρακτηριστικό στοιχείο είναι η αυξημένη HDL χοληστερόλη και τα υψηλά επίπεδα apoA-I (υπεραλφαλιποπρωτεϊναιμία, HALP) (56).

2.7.1. Επίδραση στην HDL

Τα άτομα με ομόζυγη έλλειψη CETP παρουσιάζουν συνήθως τιμές για την HDL χοληστερόλη άνω των 100 mg/dl και για τα επίπεδα της apoA-I δύο φορές άνω του φυσιολογικού. Η αύξηση αυτή είναι αρχικά εμφανής στα μεγαλύτερα μόρια της HDL (HDL_2 και HDL_1) (51). Τα επίπεδα της HDL_2 είναι από δύο μέχρι έξι φορές υψηλότερα σε ετεροζυγώτες και ομοζυγώτες αντίστοιχα. Τα επίπεδα της HDL_3 δεν υφίστανται αλλαγές (54). Τα μεγάλα μόρια της HDL στα οποία αναφερθήκαμε είναι εμπλουτισμένα με apoE και ομοιάζουν με τα μόρια της HDL που συσσωρεύονται σε είδη που δεν διαθέτουν CETP στο πλάσμα τους και έχουν τραφεί με χοληστερόλη. Οι

ετεροζυγώτες εμφανίζουν, επίσης, σημαντικά υψηλότερη HDL χοληστερόλη και επίπεδα apoA-I, καθώς και υψηλότερους λόγους HDL_2 προς HDL_3 σε σχέση με τους υγιείς πληθυσμούς ελέγχου (51).

Η επίδραση της ετερόζυγης έλλειψης της CETP στα επίπεδα της HDL έχει ερευνηθεί σε πληθυσμό Ιαπώνων αντρών. Τα άτομα με μετάλλαξη παρουσίασαν ένα μεγάλο εύρος τιμών για την HDL, με τη μέση τιμή να είναι 60-69 mg/dl σε σχέση με τη μέση τιμή του πληθυσμού που ήταν 40-49 mg/dl. Στο πληθυσμιακό αυτό δείγμα, η γενετική έλλειψη της CETP ήταν υπεύθυνη για το 10% της συνολικής διακύμανσης των επιπέδων της HDL και έχει επομένως μεγαλύτερη επίδραση σε σχέση με περιβαλλοντικούς παράγοντες όπως η παχυσαρκία και το κάπνισμα (61).

Όταν συγκρίνουμε οργανισμούς που έχουν ή στερούνται CETP, όπως στις έρευνες με διαγονιδιακά ποντίκια με CETP και με ανθρώπους ομόζυγους όσον αφορά την έλλειψη της CETP, παρατηρούμε ότι η απουσία της CETP σχετίζεται με αυξημένη HDL χοληστερόλη. Αυτή η αντίστροφη σχέση μεταξύ της δραστικότητας της CETP και των επιπέδων της HDL παρατηρείται επίσης με την πειραματικό έλεγχο των επιπέδων της CETP με τη χορήγηση προβουχόλης, με την ένεση αδρανοποιούς αντισώματος, με χορήγηση αναστολέα κ.λ.π.

Αν και η γενετική έλλειψη της CETP συνδέεται καθαρά με αυξημένα επίπεδα HDL, η αντίστροφη αυτή σχέση της CETP με την HDL δεν έχει κάνει εμφανή την παρουσία της σε επιδημιολογικές (cross-sectional) έρευνες σε ανθρώπινους πληθυσμούς. Αυτό μπορεί να οφείλεται στο γεγονός ότι μια ποικιλία παραγόντων (π.χ. περιβαλλοντικές επιδράσεις) επηρεάζουν την HDL και κρύβουν έτσι τη συνεισφορά της CETP. Παράλληλα, η CETP και η HDL μπορεί να αλληλεπιδρούν σε διαφορετικό βαθμό σε κάθε ιστό, ενώ οι γενετικές επιδράσεις στα επίπεδα της CETP μπορεί να αλλάζουν την κατανομή της CETP στους ιστούς. Ωστόσο, τουλάχιστον το ένα τέταρτο της διακύμανσης της CETP στο πλάσμα έχει αποδοθεί σε γενετικούς παράγοντες το οποίο δείχνει ότι οι μεταλλάξεις των ρυθμιστικών ακολουθιών του γονιδίου είναι υπεύθυνες για τα επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης (54).

2.7.2. Επίδραση στις VLDL και IDL

Παράλληλα με την επίδραση στην HDL, η ετερόζυγη έλλειψη της CETP διαφοροποιεί και άλλα λιποπρωτεϊνικά τμήματα. Ειδικότερα, εμφανίζεται ελαττωμένη περιεκτικότητα σε CE στις VLDL και IDL, το οποίο αντανακλά το ρόλο των λιποπρωτεϊνών αυτών ως δέκτες των CE που μεταφέρονται από την HDL καθώς και την σημασία της ανταλλαγής των ουδέτερων λιπών που γίνεται με τη μεσολάβηση της CETP (62). Η επίδραση αυτή της έλλειψης της CETP εμφανίζεται ως μειωμένος λόγος CE προς TG στη VLDL και την IDL. Αυτή η επίδραση είναι πιο έντονη στην πλήρη έλλειψη της CETP (ομοζυγώτες) και μέτρια στη μερική έλλειψη της CETP (ετεροζυγώτες) (51, 54).

2.7.3. Επίδραση στην LDL

Η πλήρης έλλειψη της CETP προκαλεί τη διαμόρφωση πληθυσμών της LDL με μικρό μέγεθος και χαμηλή χημική συγγένεια με τον LDL υποδοχέα (62). Επομένως, είναι πιθανό ότι περιορίζεται η ικανότητα της LDL να παραδώσει τη χοληστερόλη στο ήπαρ με την απουσία της CETP. Αυτό προφανώς οδηγεί σε βελτίωση της λειτουργίας (up-regulation) του LDL υποδοχέα καθώς η έλλειψη της CETP χαρακτηρίζεται από χαμηλά επίπεδα LDL, που οφείλεται σε αύξηση κατά 50% του καταβολικού ρυθμού της λιποπρωτεΐνης αυτής (63). Παρά τη μείωση αυτή των επιπέδων της LDL, η συγκέντρωση στο πλάσμα των μορίων της LDL με τη μικρή διάμετρο μπορεί να είναι υψηλότερη στα ασθενή αυτά άτομα σε σχέση με τα υγιή άτομα (54). Τέλος, τα χαμηλά επίπεδα της LDL apoB, που έχουν βρεθεί σε ομοζυγώτες ελλιπούς CETP, οφείλονται στον αυξημένο καταβολισμό και τη διαφορετική συνθετική πορεία της LDL apoB (63).

2.8. ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΤΗΣ ΕΛΛΕΙΨΗΣ ΤΗΣ CETP ΜΕ ΤΗΝ ΑΘΗΡΟΣΚΛΗΡΩΣΗ

Τα στοιχεία που έχουμε παραθέσει ως τώρα έχουν φανερώσει τον κεντρικό ρόλο της CETP στην αντίστροφη μεταφορά της χοληστερόλης. Τα τελευταία δεδομένα υποδεικνύουν ότι η μεταβολική οδός της αντίστροφης μεταφοράς χοληστερόλης σχετίζεται άμεσα με την ανάπτυξη της αθηροσκλήρωσης. Αν η αντίστροφη μεταφορά χοληστερόλης είναι αντιαθηρογόνα όπως θεωρείται, η CETP μπορεί να έχει αντιαθηρογόνο λειτουργία. Παραδόξως, ωστόσο, η έλλειψη της CETP οδηγεί σε αυξημένα επίπεδα της HDL, και η πλειοψηφία των ερευνών στους ανθρώπινους πληθυσμούς δείχνουν ότι τα υψηλά επίπεδα της HDL συνδέονται με χαμηλούς δείκτες στεφανιαίας νόσου (51).

2.9. ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΠΟΥ ΕΞΗΓΟΥΝ ΤΗ ΒΑΘΥΤΕΡΗ ΣΧΕΣΗ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΗΣ CETP ΜΕ ΤΗΝ ΑΘΗΡΟΣΚΛΗΡΩΣΗ

Τα πρόσφατα ευρήματα όσον αφορά τη γενετική έλλειψη της CETP στον άνθρωπο υποστηρίζουν ισχυρά την ύπαρξη αντιαθηρογόνου ρόλου της έκφρασης της CETP στον άνθρωπο και παρέχουν σημαντική στήριξη για την υπόθεση της αντίστροφης μεταφοράς χοληστερόλης. Για πρώτη φορά σε ανθρώπους με γενετική έλλειψη της CETP, καθώς και σε πολλά μοντέλα με CETP διαγονιδιακά ποντίκια, βλέπουμε μια αποσύνδεση στη γενικά αντίστροφη σχέση μεταξύ των επιπέδων της HDL και της αθηροσκλήρωσης.

Πειραματικά στοιχεία δείχνουν ότι η δράση της CETP πάνω στην HDL περιλαμβάνει την αύξηση του σχηματισμού των προ-β HDL και αυξάνει in vivo την αντίδραση της LCAT. Και οι δύο αυτές αλλαγές θεωρητικά προωθούν την απομάκρυνση της κυτταρικής χοληστερόλης από την περιφέρεια. Η δραση της CETP αυξάνει παράλληλα την επιστροφή στο ήπαρ των εστέρων χοληστερόλης του πλάσματος και της HDL. Οι λιπώδεις γραμμώσεις, που αποτελούν τον πρόδρομο των αθηροσκληρωτικών αλλοιώσεων, φαίνεται ότι δημιουργούνται από την συσσώρευση των οξειδωμένων μορίων της LDL στο

αγγειακό ενδοθήλιο και την επακόλουθη εσωτερίκευσή τους από τα μακροφάγα. Η CETP μπορεί να καθυστερεί την παθολογία της αθηροσκλήρωσης συμμετέχοντας στην απομάκρυνση των οξειδωμένων λιπιδίων της LDL. Η CETP είναι σε θέση να μεταφέρει οξειδωμένα λιπίδια και πιθανόν γι' αυτό το λόγο οι ασθενείς με έλλειψη CETP έχουν παρουσιαστεί να έχουν σημαντικά υψηλότερα επίπεδα οξειδωμένης LDL.

Η πιθανόν προστατευτική επίδραση της έλλειψης της CETP σε υψηλά επίπεδα HDL μπορεί να είναι ενδεικτική των αντιαθηρογόνων ιδιοτήτων της HDL που δεν έχουν σχέση με την αντίστροφη μεταφορά χοληστερόλης. Ωστόσο, όπως αναφέρθηκε παραπάνω, άτομα με ομόζυγη έλλειψη CETP παρουσιάζουν αυξημένη εκροή (efflux) χοληστερόλης από καλλιεργούμενα κύτταρα. Το πλάσμα CETP διαγονιδιακών ποντικιών προκαλεί όντως ελαττωμένη εκροή χοληστερόλης σε σχέση με το πλάσμα ποντικιών άγριου τύπου αν και το πρώτο είναι πιο αποτελεσματικό ανά μονάδα μάζας HDL. Είναι σημαντικό να τονίσουμε ότι υπάρχουν διάφορες ξεχωριστές οδοί αντίστροφης μεταφοράς χοληστερόλης στο ήπαρ, οι οποίες είναι πιθανόν να αντισταθμίζουν την έλλειψη της δραστικότητας της CETP. Επομένως, είναι πιθανόν να υπάρχει μια περίπλοκη σχέση μεταξύ των επιπέδων της CETP και της αθηροσκλήρωσης, όπου η μερική έλλειψη αυξάνει τον κίνδυνο στεφανιαίας νόσου ενώ η πλήρης έλλειψη είναι προστατευτική. Αυτό δείχνει ότι οι θεραπευτικές μέθοδοι, που έχουν στόχο την αναστολή της CETP στον άνθρωπο, θα πρέπει να παρακολουθούνται προσεκτικά όσον αφορά την αποτελεσματικότητά τους ενώ θα πρέπει να είναι εύκολα αντιστρέψιμες (3). Η θεώρηση αυτή οδηγεί στη σκέψη ότι τα φάρμακα αναστολείς της CETP, που είναι ισχυρά (περισσότερο από 50% αναστολή της CETP in vivo) και οδηγούν σε επίπεδα HDL χοληστερόλης άνω των 60 mg/dl σε άντρες, μπορεί να παρέχουν μια χρήσιμη θεραπευτική προσέγγιση για την αύξηση των επιπέδων HDL, την ελάττωση της LDL και τη μείωση της ανάπτυξης της αθηροσκλήρωσης στον άνθρωπο (64).

2.10. ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ ΓΙΑ ΤΟΥΣ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΥΣ Taq1B ΚΑΙ I405V. ΣΧΕΣΗ ΜΕ ΤΗΝ ΑΘΗΡΟΣΚΛΗΡΩΣΗ

Ο πολυμορφισμός Taq1B, που μελετήθηκε για πρώτη φορά πριν από μια δεκαετία, έχει ερευνηθεί εκτεταμένα (65). Η θέση αυτή επηρεάζει το νουκλεοτίδιο 277 στο πρώτο εσώνιο του γονιδίου της CETP (66). Το αλληλόμορφο B2 (όπου δεν υπάρχει θέση κοπής για ένζυμο περιορισμού) σχετίστηκε με χαμηλά επίπεδα CETP και υψηλά επίπεδα HDL χοληστερόλης. Συνδέθηκε, επίσης, με ελαττωμένες πιθανότητες για έμφραγμα του μυοκαρδίου σε άτομα με υψηλή κατανάλωση αλκοόλ (66). Το αλληλόμορφο B1, που χαρακτηρίζεται από υψηλά επίπεδα CETP, συνδέθηκε με αυξημένη εμφάνιση αθηροσκλήρωσης σε άτομα με υπερχοληστερολαιμία (67). Παρομοίως, οι ασθενείς με διαβήτη τύπου 2 και γονότυπο B2B2 είχαν χαμηλότερη εμφάνιση στεφανιαίας νόσου (9% προς 25% για B1B1 και B2B2) στους άντρες, αλλά όχι σε γυναίκες (68). Σε έρευνα από την Ισπανία, ο πολυμορφισμός Taq1B βρέθηκε ότι ευθύνεται για το 5,8% της διακύμανσης της HDL (69). Στη μεγάλη έρευνα Framingham Offspring Study τα άτομα που ήταν ομόζυγα για το αλληλόμορφο B1 είχαν υψηλότερα επίπεδα CETP και χαμηλότερα επίπεδα HDL σε σχέση με τους ετεροζυγώτες B1B2 και τους ομοζυγώτες B2B2. Στους άντρες, η πιθανότητα εμφάνισης στεφανιαίας νόσου στους φορείς του B2 αλληλομόρφου ήταν 0,696 ενώ ο πολυμορφισμός Taq1B δεν είχε επίδραση στις γυναίκες όσον αφορά την ευαισθησία σε καρδιακές παθήσεις (70,71).

Η σχέση του πολυμορφισμού Taq1B με την HDL δείχνει να είναι ανεξάρτητη από τα επίπεδα της CETP του πλάσματος σε κάποιες έρευνες (66,72). Αυτή η ασυμφωνία καθιστά πιθανή τη σύνδεση της θέσης Taq1B με άλλα κοντινά γονίδια που επηρεάζουν τα επίπεδα της HDL μέσω «ανισορροπίας σύνδεσης»[1] (linkage disequilibrium), π.χ. το γονίδιο της LCAT.

Από την άλλη, ο πολυμορφισμός I405V παρουσιάζεται σε Καυκάσιους αλλά και Ασιατικούς πληθυσμούς (73). Αξιόλογη έρευνα έγινε σε άντρες Ιάπωνες-Αμερικάνους στα πλάισια της έρευνας Honolulu Heart Study (74). Ο

---

[1] *Ανισορροπία σύνδεσης: η επιλεγμένη σύνδεση ενός αλληλόμορφου, π.χ. ενός μεταλλαγμένου αλληλομόρφου για μια νόσο, με ένα ειδικό αλληλόμορφο σε ένα γειτονικό γενετικό τόπο πιο συχνά από ότι αναμένεται με βάση την τύχη.*

φαινότυπος V405 με συχνότητα αλληλομόρφου 0,54 είχε ασθενή επίδραση στη μείωση της CETP (VV –9% σε σχέση με τον II) και στην αύξηση της HDL (VV +8% σε σχέση με τον II). Είναι ενδιαφέρον το γεγονός ότι η συχνότητα στεφανιαίας νόσου εμφανίστηκε αυξημένη σε άτομα με επίπεδα τριγλυκεριδίων υψηλότερα από 165 mg/dl και φαινότυπο VV405, κάτι που έρχεται σε συμφωνία με τον ισχυρισμό ότι ο γονότυπος της CETP που προκαλεί χαμηλότερα επίπεδα της πρωτεΐνης είναι προαθηρογόνος σε υπερτριγλυκεριδαιμικά ποντίκια (75). Σε ευρωπαϊκό πληθυσμό, η συχνότητα των πιο σπάνιων αλληλομόρφων των πολυμορφισμών Taq1B και I405V ήταν 0,44 (B2) και 0,28 (V405) (76). Ο Taq1B εξηγούσε το 9% και ο I405V το 4% της διακύμανσης της δραστικότητας της CETP. Επομένως, οι πολυμορφισμοί αυτοί επηρεάζουν ανεξάρτητα τα επίπεδα της CETP παρά τη μέτρια ανισορροπία σύνδεσης μεταξύ τους (73). Είναι σημαντικό, ότι τα μεταγευματικά επίπεδα τριγλυκεριδίων ήταν ελαττωμένα σε άτομα με χαμηλά επίπεδα CETP και Taq1B2 και V405, γεγονός που δείχνει ότι μια μέτρια προς μικρή ελάττωση της CETP πιθανότατα δε σχετίζεται με τη μεταγευματική υπερτριγλυκεριδαιμία (76). Επίσης, ερευνήθηκε η σχέση του πολυμορφισμού I405V με την καρωτιδική αθηροσκλήρωση σε 515 Φινλανδούς υπερχοληστερολαιμικούς άντρες και γυναίκες (77). Η συχνότητα του σπάνιου αλληλομόρφου ήταν 0,37 (V405) και οι ομοζυγώτες VV405 είχαν χαμηλότερα επίπεδα CETP (~12-15% ως προς τους II) και αυξημένη καρωτιδική αθηρωμάτωση για επίπεδα τριγλυκεριδίων από 122 mg/dl και άνω. Άρα ο φαινότυπος του I405V που σχετίζεται με χαμηλή CETP εμφανίζεται να αποτελεί αγγειακό κίνδυνο όταν παράλληλα υπάρχει υπερτριγλυκεριδαιμία, κάτι ανάλογο με τα αποτελέσματα της Honolulu Heart Study (74). Σε μια άλλη ανάλυση του πολυμορφισμού I405V στους συμμετέχοντες της Copenhagen City Heart Study, βρέθηκε ότι οι γυναίκες που ήταν ομόζυγες ή ετερόζυγες για την παρουσία της βαλίνης στη θέση 405 είχαν αυξημένα επίπεδα HDL αλλά και παραδόξως αυξημένο κίνδυνο στεφανιαίας νόσου. Στους άντρες της έρευνας δεν υπήρχε επίδραση τόσο στην HDL όσο και στη στεφανιαία νόσο (78).

Καθώς, βρέθηκε η ύπαρξη ανισορροπίας σύνδεσης μεταξύ των πολυμορφισμών, η ανάλυση του απλότυπου των πολυμορφισμών του γονιδίου της CETP μπορεί να βελτιώσει τη δυνατότητα πρόβλεψης του κινδύνου για στεφανιαία νόσο σε έρευνες πληθυσμών. Είναι αξιοσημείωτο, ότι ο απλότυπος Taq1B1-I405 παρουσίασε τα χαμηλότερα επίπεδα HDL χοληστερόλης, ενώ ο απλότυπος Taq1B2-V405 είχε τα υψηλότερα (79).

3. ΛΙΠΟΠΡΩΤΕΪΝΙΚΗ ΛΙΠΑΣΗ (LPL)

3.1. ΕΙΣΑΓΩΓΙΚΑ

Η λιποπρωτεϊνική λιπάση (LPL) αποτελεί το κυριότερο ένζυμο για την υδρόλυση των τριγλυκεριδίων που βρίσκονται στις κυκλοφορούσες λιποπρωτεΐνες. Είναι το κεντρικό ένζυμο για το μεταβολισμό όλων των τάξεων των λιποπρωτεϊνών και εντοπίζεται στην πλευρά του αυλού των τριχοειδών των αγγείων και των αρτηριών. Η LPL υδρολύει τα μόρια των τριγλυκεριδίων παράγοντας ελεύθερα λιπαρά οξέα (80). Επομένως, είναι υπεύθυνη για τη ροή των ελεύθερων λιπαρών οξέων στους περιφερικούς ιστούς με σκοπό την αποθήκευση τους με τη μορφή τριγλυκεριδίων ως πηγή ενέργειας (81). Οι μεταβολές της δραστικότητας της λιποπρωτεϊνικής λιπάσης στους διάφορους ιστούς δεν καθορίζουν απλά και σε κάποιο ποσοστό τα επίπεδα των τριγλυκεριδίων του πλάσματος, αλλά και την παροχέτευση των τριγλυκεριδίων σε διάφορους ιστούς. Πέρα από το ρυθμιστικό ρόλο της LPL για την ιστική πρόσληψη τριγλυκεριδίων, το ένζυμο από ότι φαίνεται εμπλέκεται στον περαιτέρω μεταβολισμό των λιποπρωτεϊνών σε μεταγευματικό επίπεδο (82). Μέσα στο πλάσμα, η LPL μετατρέπει τα χυλομικρά σε υπολείμματα και ξεκινάει τη διαδικασία που απαιτείται για τη μετατροπή των VLDL σε LDL. Όλες οι αλλαγές σε αυτές τις κυκλοφορούσες λιποπρωτεΐνες και η δημιουργία προϊόντων λιπόλυσης θα μπορούσε να διαμορφώνει κάποιες από τις διαδικασίες που επηρεάζουν τη βιολογία του αγγειακού τοιχώματος (80).

Η LPL εκτελεί την υδρολυτική της δράση καθώς είναι συνδεδεμένη με πρωτεογλυκάνες θεϊκής ηπαρίνης. Λόγω της φυσιολογικής της σημασίας και του πιθανού της ρόλου στις παθήσεις που σχετίζονται με τα λιπίδια, η LPL έχει μελετηθεί σε πολλές έρευνες in vivo και in vitro (81).

3.2. ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ LPL ΜΕ ΤΙΣ ΛΙΠΟΠΡΩΤΕΪΝΕΣ ΤΟΥ ΠΛΑΣΜΑΤΟΣ.

3.2.1. Υδρόλυση των χυλομικρών από την LPL

Όπως αναφέρθηκε, η LPL είναι το ένζυμο που συμμετέχει στο μεταβολισμό όλων των τάξεων των λιποπρωτεϊνών. Η αρχική της ανακάλυψη έλαβε χώρα όταν ο Hahn (83) παρατήρησε ότι η ένεση ηπαρίνης σε σκύλο οδήγησε σε ελάττωση της μεταγευματικής λιπαιμίας. Η επακόλουθη ανακάλυψη ότι το ανθρώπινο πλάσμα, που είχε ληφθεί μετά από ένεση ηπαρίνης από άτομα με σοβαρή υπερχυλομικροναιμία (υπερλιποπρωτεϊναιμία τύπου Ι), δε μπορούσε να υδρολύσει τα χυλομικρά in vitro (84) συνέδεσε ξεκάθαρα την LPL με τη διαταραχή αυτή και έδειξε το σημαντικό ρόλο της LPL για την έναρξη του καταβολισμού των χυλομικρών. Παράλληλα, in vitro στοιχεία, που έδειξαν ότι η απολιποπρωτεΐνη C-II (apoC-II) είναι ενεργοποιητής για την LPL, συσχετίστηκαν με μια ανθρώπινη διαταραχή, τη γενετική έλλειψη apoC-II που επίσης προκαλούσε σοβαρή υπερχυλομικροναιμία (85).

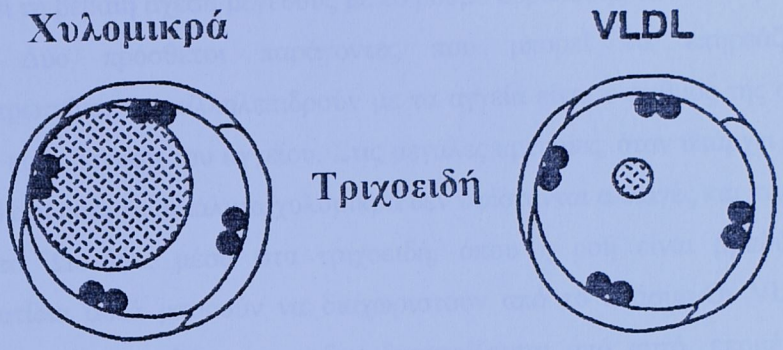
Η έναρξη του καταβολισμού των χυλομικρών από την LPL είναι αναμφισβήτητη. Ωστόσο, διάφορα βήματα της καταβολικής διαδικασίας των χυλομικρών όπου υπάρχει η μεσολάβηση της LPL δεν είναι ξεκάθαρα.

Η λιπόλυση κατά κύριο λόγο ξεκινά όταν οι λιποπρωτεΐνες αλληλεπιδρούν με την LPL που βρίσκεται συνδεδεμένη στο ενδοθήλιο των αγγείων. Θα παρουσιαστούν δύο θεωρίες που περιγράφουν πώς οι λιποπρωτεΐνες έρχονται σε επαφή με το τοίχωμα των τριχοειδών. Η μία αναφέρεται σε έναν μηχανισμό στον οποίο μεσολαβούν οι απολιποπρωτεΐνες. Η δεύτερη είναι μια πλήρης γεωμετρική θεώρηση της αλληλεπίδρασης της LPL με τις πλούσιες σε τριγλυκερίδια λιποπρωτεΐνες.

In vivo ρύθμιση της λιπόλυσης από απολιποπρωτεΐνες. Καθώς τα χυλομικρά διασχίζουν τα τριχοειδή, έρχονται σε επαφή με την LPL που βρίσκεται συνδεδεμένη στα κύτταρα του ενδοθηλίου και η apoC-II, που είναι δεσμευμένη στα χυλομικρά ενεργοποιεί το ένζυμο. Θεωρείται, μάλιστα, ότι η

απολιποπρωτεΐνη Ε (apoE) εγκλωβίζει τις πλούσιες σε τριγλυκερίδια λιποπρωτεΐνες στα κύτταρα του ενδοθηλίου (80). Στοιχεία in vitro από τους Clark και Quarfordt (86) έδειξαν ότι η προσθήκη της apoE οδήγησε σε αύξηση της λιπόλυσης σε σωμάτια που περιείχαν τριγλυκερίδια και πέρασαν μέσα από ζελέ που περιείχε LPL. Άλλοι ερευνητές έχουν δείξει ότι η apoE επιτρέπει στις λιποπρωτεΐνες να έρθουν σε επαφή με θειϊκές πρωτεογλυκάνες ηπαρίνης (heparin sulfate proteoglycan, HSPG) της επιφάνειας των κυττάρων (80).

Γεωμετρικοί παράγοντες που ρυθμίζουν τη λιπόλυση. Η καλύτερη κατανόηση της αντίδρασης της λιπόλυσης δεν απαιτεί απλά το να λάβουμε υπ' όψιν την LPL που είναι συνδεδεμένη στο ενδοθήλιο, αλλά και την αξιολόγηση της γεωμετρίας στο σημείο της λιπόλυσης. Αν και φαίνεται ότι η LPL in vitro υδρολύει καλύτερα τις μεγαλύτερες και πιο πλούσιες σε τριγλυκερίδια λιποπρωτεΐνες σε σχέση με μικρότερα σωματίδια, μπορεί η συγγένεια του ενζύμου με τις λιποποπρωτεΐνες αυτές σε διάλυμα να μην είναι καθόλου μεγαλύτερη. Μάλλον η ταχύτερη εκκαθάριση των χυλομικρών σε σχέση με την VLDL αποτελεί λειτουργία που σχετίζεται με το μέγεθος του τριχοειδούς. Θεωρητικά, ένα χυλομικρό με διάμετρο 500 nm γεμίζει σε ποσοστό 0,25/64 τη διατομή ενός κλασικού τριχοειδούς διαμέτρου 8 μm. Αντίθετα, μια μικρότερη λιποπρωτεΐνη των 100 nm (π.χ., μια VLDL) καταλαμβάνει μόλις το 0,01/64 της διατομής του τριχοειδούς. Η σχέση των σωματιδίων με τη διατομή του αυλού των τριχοειδών φαίνεται στο Σχήμα 7 όπου τα δύο σωματίδια έχουν μεγεθυνθεί 10 φορές για επεξηγηματικούς λόγους. Αν υποθέσουμε ότι η εγγύτητα με την LPL που βρίσκεται στο χείλος του αυλού εξαρτάται από την επιφάνεια που καταλαμβάνουν οι λιποπρωτεΐνες, τα χυλομικρά έχουν 25 φορές μεγαλύτερες πιθανότητες να αλληλεπιδράσουν με τα μόρια της LPL. Επομένως, ενώ ο χρόνος ημίσειας ζωής του χυλομικρού είναι περίπου 10 λεπτά, ο αντίστοιχος της μικρότερης VLDL θα ήταν 250 λεπτά, περίπου 4 ώρες δηλαδή.



Σχήμα 7. Η κινητική της λιπόλυσης των μεγάλων λιποπρωτεϊνών που είναι πλούσιες σε τριγλυκερίδια όπως τα χυλομικρά και οι μικρότερες VLDL διαφέρει μεταξύ τους. Κάποιες από τις διαφορές αυτές μπορούν να αποδοθούν στις διαφορές της σύστασης των λιποπρωτεϊνών. Άλλες, όπως επεξηγείται από τα δύο παραπάνω σχήματα, οφείλονται μάλλον σε γεωμετρικούς λόγους. Όπως φαίνεται, επεκτείνοντας το πραγματικό μέγεθος των σωματιδίων σε σχέση με τα τριχοειδή τα οποία διασχίζουν, τα χυλομικρά καταλαμβάνουν μεγαλύτερη επιφάνεια από τη διατομή του αυλού των τριχοειδών σε σχέση με τις VLDL. Το γεγονός αυτό καθιστά πιο πιθανή την αλληλεπίδρασή τους με την LPL που βρίσκεται συνδεδεμένη στα κύτταρα του ενδοθηλίου καθώς και πιο πιθανή την επαφή τους με περισσότερα από ένα μόρια της LPL κατά τη διάρκεια του περάσματός τους από τα τριχοειδή. Ένα μόριο VLDL, που έχει το 1/5 της διαμέτρου του χυλομικρού, έχει 1/25 πιθανότητες να αλληλεπιδράσει με την LPL του τοιχώματος του αυλού (80).

Μια παράμετρος της ανάλυσης αυτής έχει σχέση με το ρόλο της apoE στον εγκλωβισμό των λιποπρωτεϊνών στην επιφάνεια του ενδοθηλίου. Η δράση αυτή είναι λιγότερο σημαντική για τα χυλομικρά που βρίσκονται στα τοιχώματα των τριχοειδών σε σχέση με τις λιποπρωτεΐνες που έρχονται σε επαφή με την επιφάνεια του αυλού μεγαλύτερων αρτηριών. Επίσης, η διαδικασία αυτή που απαιτεί την apoE μπορεί να είναι πιο σημαντική για μικρότερα σωματίδια. Επομένως, οι μεγαλύτερες λιποπρωτεΐνες που είναι πλούσιες σε τριγλυκερίδια μάλλον υδρολύονται κατά τη διέλευσή τους μέσω των τριχοειδών χωρίς να απαιτούνται περαιτέρω αλλαγές στα λιπίδια ή στις απολιποπρωτεΐνες τους. Πρέπει να σημειωθεί ότι η ανάλυση αυτή περιλαμβάνει πολλές υποθέσεις και αγνοεί την πραγματική τρισδιάστατη διαμόρφωση των τριχοειδών και των λιποπρωτεϊνών, καθώς και τις αλλαγές στις δράσεις της LPL κατά τη λιπόλυση λόγω αναστολής από τα προϊόντα

αλλά και της απελευθέρωσής της από τα τριχοειδή. Ωστόσο, φαίνεται ότι εξηγεί τη βέβαιη σχέση μεγέθους με το ρυθμό υδρόλυσης των λιποπρωτεϊνών.

Δύο πρόσθετοι παράγοντες που μπορεί να επηρεάζουν τις λιποπρωτεϊνες που αλληλεπιδρούν με τα αγγεία είναι ο ρυθμός της αιματικής ροής και η κίνηση του αγγείου. Στις μεγάλες αρτηρίες, όταν υπάρχει ταχύτατη και βίαιη ροή, τα αδιάλυτα χυλομικρά δεν υφίστανται αλλαγές και παραμένουν άθικτα. Ωστόσο, μέσα στα τριχοειδή, όπου η ροή είναι βραδύτερη, τα σωματίδια αυτά μπορούν να διαχωριστούν από το πλάσμα.Οι VLDL είναι διαλυμένες στο πλάσμα και δεν διαχωρίζονται από αυτό, επομένως είναι λιγότερο πιθανό να «ρεύσουν» στις πλευρές των τριχοειδών. Επίσης, η «δόνηση» και η κίνηση ενός ολόκληρου ιστού, όπως ο ασκούμενος μυς, είναι ικανή να διαφοροποιήσει τη ροή διαμέσου των αγγείων και να αυξήσει την πιθανότητα να χτυπήσει το αγγειακό τοίχωμα ένα αδιάλυτο σωματίδιο λίπους (80).

Αλληλεπίδραση της LPL με τα κύτταρα με τα κύτταρα του ενδοθηλίου. Η ποσότητα της LPL στην επιφάνεια του τριχοειδούς είναι ένα ακόμη ρυθμιστικό στοιχείο για τη λιπόλυση των χυλομικρών. Μετά τη σύνθεσή της, η LPL πρέπει να απελευθερωθεί από τα κύτταρα παραγωγής της, να έρθει σε επαφή με τα ενδοθηλιακά κύτταρα και κατόπιν να μεταφερθεί κατά μήκος τους. Ίσως, κατά τη διάρκεια της μεταφοράς αυτής κάποιο ποσοστό της LPL να αδρανοποιείται, γεγονός που οδηγεί σε αλλαγές στην ειδική δράση της LPL που παρατηρείται σε ορισμένες περιπτώσεις.

Η σύνδεση της LPL με τα ενδοθηλιακά κύτταρα δεν αποτελεί μια στατική κατάσταση. Κάποιο ποσοστό της LPL αποσυνδέεται από τα κύτταρα ενώ κάποιο άλλο ποσοστό επανεισέρχεται στα κύτταρα του ενδοθηλίου και ανακυκλώνεται στην επιφάνεια του κυττάρου. Η λιπόλυση οδηγεί στην αποσύνδεση της LPL από την επιφάνεια των κυττάρων και πιθανόν για το λόγο αυτό η LPL του πλάσματος παρουσιάζει συσχέτιση με τα επίπεδα των ελεύθερων λιπαρών οξέων του πλάσματος (80).

Ρόλος της LPL ως συνδετικός κρίκος για υποδοχείς. Πέρα από την ενζυματική δράση, η LPL θεωρείται ότι αποτελεί σύνδεσμο για τους υποδοχείς

για την απομάκρυνση των λιποπρωτεϊνών (80). Πρώτοι οι Felts, Itakura και Crane θεώρησαν ότι η LPL είναι σήμα για την ηπατική απομάκρυνση των υπολειμμάτων χυλομικρών (87). Αργότερα, οι Beisiegel et al., έδειξαν ότι η LPL είναι σύνδεσμος για την LDL receptor related protein (LRP) (Πρωτεΐνη που σχετίζεται με τον LDL υποδοχέα) (88). Πιο πρόσφατα ακόμα, η LPL αποδείχτηκε ότι είναι επίσης σύνδεσμος για τον υποδοχέα VLDL (89). Για να αποδειχθεί ότι η πρόσληψη των λιποπρωτεϊνών που γίνεται με τη μεσολάβηση της LPL σχετίζεται από άποψη φυσιολογίας με την απομάκρυνση των χυλομικρών, θα πρέπει να ξεκαθαριστούν κάποια θέματα. Τέτοια είναι η εξακρίβωση ότι υπάρχει επαρκής ποσότητα LPL στο πλάσμα και ότι ανταγωνίζεται ικανοποιητικά για τη σύνδεση με την LRP με τους πολλαπλούς άλλους συνδέσμους της LRP (80).

3.2.2. Μετατροπή της VLDL σε IDL από την LPL.

Ο μεταβολισμός της VLDL βρίσκεται σε παραλληλία με αυτόν των χυλομικρών από πολλές απόψεις. Όπως όλες οι λιποπρωτεΐνες οι VLDL είναι ένα σύνολο σωματιδίων που διαφέρουν σε μέγεθος καθώς και σύσταση απολιποπρωτεϊνών και λιπιδίων. Ο καταβολισμός των μεγαλύτερων VLDL ξεκινά με ένα βήμα όπου μεσολαβεί η LPL οπότε τα περισσότερα από αυτά τα μεγάλα σωματίδια απομακρύνονται από την κυκλοφορία του αίματος πριν μετατραπούν σε LDL (90). Σε LDL μετατρέπονται οι μικρότερες VLDL. Η μετατροπή των VLDL σε LDL που ξεκινά από την LPL μπορεί να οδηγήσει σε ένα περισσότερο ή λιγότερο αθηρογόνο λιποπρωτεϊνικό προφίλ. Η σχέση της υπερτριγλυκεριδαιμίας με τη στεφανιαία νόσο δεν είναι ακόμα ξεκάθαρη και εξαρτάται πιθανόν από τον πληθυσμό που μελετάται και την παρουσία άλλων αθηρογόνων παραγόντων. Από την άλλη, η σχέση μεταξύ της LDL και της αθηρωμάτωσης έχει εξακριβωθεί. Υπάρχουν διάφορες κλινικές καταστάσεις όπου οι δράσεις της LPL αυξάνονται, τα τριγλυκερίδια μειώνονται, αλλά αυξάνεται η LDL. Σαν παραδείγματα θα αναφέρουμε την αρώλεια βάρους από παχύσαρκα άτομα και τη θεραπεία του διαβήτη. Δεν είναι ξεκάθαρο επίσης το

αν είναι αθηρογόνος η μετατροπή του υπερτριγλυκεριδαιμικού προφίλ σε λιποπρωτεϊνικό προφίλ πλούσιο σε LDL.

Πιστεύεται ότι η LPL μπορεί να ρυθμίσει την παραγωγή των λιποπρωτεϊνών που περιέχουν apoB με μηχανισμούς μη ενζυματικούς. Η αρχική υπόθεση προήλθε από την παρατήρηση ότι κάποιες οικογένειες που ήταν φορείς γενετικών ανωμαλιών της LPL παρουσίαζαν αυξημένη εμφάνιση οικογενούς υπερλιποπρωτεϊναιμίας (91). Οι Williams et al. έδειξαν ότι η προσθήκη της LPL σε ηπατοκύτταρα θα αύξανε την πρόσληψη των λιποπρωτεϊνών που περιέχευν apoB από τα κύτταρα αυτά και θεώρησαν ότι ένα ελάττωμα στη διαδικασία αυτή θα μπορούσε να οδηγήσει σε υπερπαραγωγή των λιποπρωτεϊνών που εμφανίζονται στην οικογενή υπερλιποπρωτεϊναιμία (92). Αντίθετα, οι Huff et al. χρησιμοποιώντας μικρότερες ποσότητες LPL βρήκαν ότι αύξανε η πρόσληψη των τριγλυκεριδίων και όχι της χοληστερόλης από τα ηπατοκύτταρα και ότι αυτό απαιτούσε τις ενζυματικές δράσεις της LPL (93). Περαιτέρω έρευνες χρειάζονται για να εξεταστεί αν η ηπατική LPL ρυθμίζει τη σύνθεση της LDL ή της apoB ανεξάρτητα από τις δράσεις της ως λιπολυτικό ένζυμο.

Οι δράσεις της LPL στη περιφέρεια, σε σχέση με αυτές στο ήπαρ, είναι πιο πιθανό ότι συνδέονται με την ηπατική παραγωγή λιποπρωτεϊνών. Οι ανωμαλίες ως προς το μέγεθος της δραστικότητας της LPL στο μυϊκό και λιπώδη ιστό μειώνουν την υδρόλυση των τριγλυκεριδίων των χυλιμικρών στην περιφέρεια και πρέπει να οδηγούν σε μεγαλύτερη επιστροφή των μεταγευματικών τριγλυκεριδίων στο ήπαρ. Το γεγονός αυτό, με τη σειρά του, πρέπει να διεγείρει την παραγωγή ηπατικών λιποπρωτεϊνών πλούσιων σε τριγλυκερίδια. Το σενάριο αυτό για το ρόλο της περιφερικής LPL στην ηπατική παραγωγή λιποπρωτεϊνών είναι επίσης σχετικό με την παραγωγή λιποπρωτεϊνών στη μεταγευματική φάση. Μεταγευματικά, ο ρυθμός σύνθεσης της VLDL αυξάνεται. Η έλλειψη της LPL μπορεί να αυξήσει τις συγκεντρώσεις των χυλομικρών αλλά και των σωματιδίων που περιέχουν apoB στη μεταγευματική περίοδο (80).

3.2.3. Ρύθμιση της HDL από την LPL.

Η δραστικότητα της LPL ρυθμίζει τα επίπεδα της HDL χοληστερόλης με τρεις τουλάχιστον τρόπους. 1) Κατά τη διάρκεια της υδρόλυσης των πλούσιων σε τριγλυκερίδια λιποπρωτεϊνών που γίνεται με τη μεσολάβηση της LPL, τα επιφανειακά λιπίδια και οι απολιποπρωτεΐνες μεταφέρονται στην HDL. 2) Το ποσό της HDL που ανταλλάσσεται για τριγλυκερίδια ρυθμίζεται από το ποσό της VLDL στην κυκλοφορία. Έτσι, ελαττώνοντας τα τριγλυκερίδια του πλάσματος, η LPL περιορίζει τη μείωση της HDL από την πρωτεΐνη μεταφοράς εστέρων χοληστερόλης (CETP). 3) Μεταβάλλοντας τη σύσταση του πυρήνα των λιπιδίων της HDL, ο καταβολικός ρυθμός της apoA-I της HDL μεταβάλλεται. Αν οι HDL γίνουν πλούσιες σε τριγλυκερίδια, τα τριγλυκερίδια μπορούν να απομακρυνθούν πιο εύκολα οδηγώντας στην παραγωγή μικρότερων και φτωχών σε λίπη apoA-I. Οι HDL που περιέχουν τριγλυκερίδια είναι καλύτερα υποστρώματα για την ηπατική λιπάση των τριγλυκεριδίων ενώ οι φτωχές σε λίπη apoA-I απομακρύνονται γρηγορότερα από την κυκλοφορία. Μια τέτοια διαδικασία θα οδηγούσε στους αυξημένους καταβολικούς ρυθμούς και τα χαμηλά επίπεδα HDL που παρατηρούνται στα υπερτριγλυκεριδαιμικά άτομα καθώς και στον αυξημένο καταβολικό ρυθμό της apoA-I που εμφανίζεται σε περίπτωση αναστολής της LPL (80).

Σε μερικά άτομα, η δραστικότητα της LPL σχετίζεται θετικά με τα επίπεδα της HDL (94). Παράλληλα, συχνά (95, 96), αλλά όχι πάντα (97), η HDL παρουσιάζει αντιστρόφως ανάλογη σχέση με τη μεταγευματική λιπαιμία και την in vivo μέτρηση των δράσεων της LPL. Μέσω της έμμεσης αυτής ανάλυσης, μερικές φορές τα επίπεδα της HDL αξιολογούνται ως δείκτης της δραστικότητας της LPL in vivo.

3.3. ΤΟ ΓΟΝΙΔΙΟ ΚΑΙ Η ΠΡΩΤΕΪΝΗ ΤΗΣ LPL

Το γονίδιο της LPL εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 8p22 (98). Το γονίδιο έχει έκταση 29,6 kb και περιλαμβάνει 10 εξώνια που διαχωρίζονται από 9 εσώνια. Τα εξώνια 1-9 έχουν μέτριο μέγεθος (105-276 bp), ενώ το εξώνιο 10, που ορίζει ολόκληρη την 3' μη κωδικοποιούσα αλληλουχία, έχει μήκος 1948 bp (81).

Η LPL είναι μια γλυκοπρωτεΐνη που δρα ως ένα ομοδιμερές του οποίου η κάθε υπομονάδα έχει μοριακό βάρος περίπου 50 kDa. Η τρισδιάστατη δομή της LPL έχει προσδιοριστεί από τη σύγκριση με τα στοιχεία που προήλθαν από την X-ray κρυσταλλογραφία της παγκρεατικής λιπάσης, που παρουσιάζει υψηλή ομολογία με την LPL. Τα αμινο-τελικά δύο τρίτα της πρωτεΐνης περιλαμβάνουν την καταλυτική τριάδα με δομή β-διαμόρφωσης. Τα καταλυτικά αμινοξέα Asp_{156}, His_{241} και Ser_{132} είναι προστατευμένα σε ένα υδροβοβικό θυλάκιο, που σκεπάζεται από την αγκύλη που διαμοφώνουν τα αμινοξέα 238-262 η οποία απομακρύνεται από το θυλάκιο στα πλάισια της αλληλεπίδρασης του ενζύμου με το λιπιδικό υπόστρωμα. Το καρβοξυ-τελικό τμήμα αποτελείται κυρίως από δομές με αντιπαράλληλη β-διαμόρφωση, οι οποίες πιστεύεται ότι έχουν σημαντικό ρόλο στη σύνδεση με τα λιπίδια. Η περιοχή που αλληλεπιδρά με τον συμπαράγοντα apoC-II θεωρείται ότι βρίσκεται μέσα στο αμινο-τελικό τμήμα της πρωτεΐνης, αν και η ακριβής τοποθεσία δεν έχει εξακριβωθεί ακόμα. Υπαρχουν στοιχεία ότι η σύνδεση με την ηπαρίνη πραγματοποιείται από τα αμινοξέα που εντοπίζονται στην περιοχή 290-300 (99).

3.4. ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΙ ΣΤΟ ΓΟΝΙΔΙΟ ΤΗΣ LPL

Μέχρι στιγμής έχουν προσδιοριστεί περισσότερες από 100 διαφορετικές μεταλλάξεις στο ανθρώπινο γονίδιο της LPL, οι οποίες εμφανίζονται σε ποσοστό 20% στη μη κωδικοποιούσα περιοχή, ενώ το 80% εντοπίζεται στις κωδικοποιούσες περιοχές του γονιδίου. Οι μεταλλάξεις της LPL επηρεάζουν τη λειτουργία της LPL με διάφορους τρόπους. Η καταλυτική δράση, η διμερής

φύση της LPL, η έκκριση και η σύνδεση με την ηπαρίνη επηρεάζονται διαφορετικά και με διάφορους συνδυασμούς, αντανακλώντας την πολυδιάστατη λειτουργική φύση αυτού του ενζύμου. Έχει βρεθεί ότι ο βαθμός στον οποίο οι διάφορες μεταλλάξεις επηρεάζουν τις λειτουργίες αυτές ποικίλει ανάλογα με τη συνεισφορά των αμινοξέων που έχουν επηρεαστεί στην τοπική και ολική τρισδιάστατη δομή της LPL. Η σχέση των πολυμορφισμών της LPL με διάφορους παράγοντες κινδύνου για την υγεία έχει ερευνηθεί σε διάφορους πληθυσμούς (81).

Οι διάφοροι γονότυποι της LPL έχουν σχετιστεί με αλλαγές στα λιπίδια και τις λιποπρωτεΐνες και κατ' επέκταση με δυσλιπιδαιμία και στεφανιαία νόσο (100). Οι πολυμορφισμοί που θα απασχολήσουν τη δική μας μελέτη είναι:

1) Ο *Hind*III πολυμορφισμός, στον οποίο στη θέση +495 στο εσώνιο 8 έχουμε την αντικατάσταση μιας βάσης θυμίνης από γουανίνη (T→G), οπότε στη θέση αυτή εμφανίζεται μια θέση αναγνώρισης για το ένζυμο περιορισμού *Hind*III. Υπάρχει η υπόθεση ότι το πιο συχνό *H*+ αλληλόμορφο (παρουσία της θέσης κοπής) σχετίζεται με μικρότερη δραστικότητα της LPL σε σύγκριση με το σπάνιο *H*- αλληλόμορφο (απουσία της θέσης περιορισμού). Οι έρευνες έχουν συσχετίσει τα άτομα φορείς του *H*+/+ γονότυπου με υψηλότερες συγκεντρώσεις τριγλυκεριδίων και χαμηλότερες συγκεντρώσεις HDL σε σύγκριση με τους φορείς του *H*-/- γονότυπου (101).
2) Μια μετάλλαξη στην κωδικοποιούσα αλληλουχία, η Ser447X, που περιλαμβάνει μια μετατροπή κυτοσίνης σε γουανίνη (C→G) στο νουκλεοτίδιο 1995 στο εξώνιο 9. Το γεγονός αυτό οδηγεί σε μετατροπή της τριπλέτας (TCA) που κωδικοποιεί για το αμινοξύ σερίνη στη θέση 447 σε ένα πρόωρο κωδικό λήξης (TGA). Αποτέλεσμα είναι η παραγωγή ενός ελλιπούς ενζύμου, στο οποίο λείπουν τα δύο καρβοξυ-τελικά αμινοξέα (Σερίνη-Γλυκίνη) (102). Το αλληλόμορφο αυτό του γονιδίου της LPL περιγράφηκε για πρώτη φορά από τους Hata et al. (103).

3.5. ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ ΓΙΑ ΤΟΥΣ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΥΣ *Hind*III και S447X. ΣΧΕΣΗ ΜΕ ΤΗΝ ΑΘΗΡΟΣΚΛΗΡΩΣΗ

Σε έρευνες με υγιή άτομα, οι επιδράσεις που σχετίζονται με τον *Hind*III πολυμορφισμό είναι σχετικά συνεπείς όσον αφορά τα επίπεδα των τριγλυκεριδίων του πλάσματος και/ή της HDL, με το αλληλόμορφο *H*- να σχετίζεται με υψηλότερες τιμές της HDL και χαμηλότερα επίπεδα τριγλυκεριδίων πλάσματος (104, 105). Κάποιες έρευνες έχουν αναφέρει χαμηλότερη συχνότητα του *H*- αλληλομόρφου σε άτομα με υπερτριγλυκεριδαιμία και σε ασθενείς με στεφανιαία νόσο σε σχέση με άτομα με φυσιολογικές τιμές τριγλυκεριδίων (106).

Υπαρχει η υπόθεση ότι το αλληλόμορφο *H*- του πολυμορφισμού *Hind*III λειτουργεί ως ένας γενετικός δείκτης για μια λειτουργική μετάλλαξη που θα μπορούσε να προκαλεί αυξημένη δραστικότητα του ενζύμου ή αποτελεσματικότερη σύνδεση με τα λιπίδια ή, αν εμφανίζεται στον προμότορα του γονιδίου, θα μπορούσε να οδηγεί σε αυξημένη έκφραση της LPL. Αυτό θα οδηγούσε τότε σε χαμηλότερα επίπεδα τριγλυκεριδίων και υψηλότερες συγκεντρώσεις HDL στους φορείς του *H*- αλληλομόρφου (107).

Από την άλλη, όως αναφέρθηκε έχει εντοπιστεί ο πολυμορφισμός S447X που διαφοροποιεί τη σερίνη στη θέση 447 σε κωδικό λήξης με αποτέλεσμα την περικοπή του ενζύμου (107) και την υψηλότερη έκφραση σε έρευνες in vitro (108). Ο πολυμορφισμός αυτός είναι συχνός, με τη συχνότητα αλληλομόρφου για τη μετάλλαξη S447X να είναι περίπου 20% σε υγιή άτομα (100, 105, 109, 110). Αν και οι πρώτες έρευνες που εξέτασαν τη σχέση μεταξύ του πολυμορφισμού S447X και των επιπέδων των λιπιδίων δεν έδωσαν συνεπή αποτελέσματα (105, 111), το αλληλόμορφο X447 εμφανίζεται λιγότερο συχνά σε ασθενείς με υπερτριγλυκεριδαιμία σε σχέση με υγιείς και είναι πιο συχνό σε υγιή άτομα control σε σχέση με ασθενείς με έμφραγμα του μυοκαρδίου (112). Οι πρόσφατες έρευνες έχουν δείξει καθαρά ότι η μετάλλαξη X447 συσχετίζεται με υψηλότερη δραστικότητα της LPL σε ασθενείς (110) καθώς και ευνοϊκότερο λιπιδαιμικό προφίλ, με χαμηλότερη χοληστερόλη πλάσματος, χαμηλότερα τριγλυκερίδια και υψηλότερα επίπεδα HDL (100, 109, 110).

Επομένως, υπάρχουν σημαντικά στοιχεία που δείχνουν ότι η μετάλλαξη X447 συνδέεται με ευνοϊκό λιπιδαιμικό προφίλ άρα μπορεί να συνεισφέρει στην προστασία από καρδιαγγειακές παθήσεις (107).

Αυτό που παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον είναι ότι ο πολυμορφισμός S447X δείχνει να σχετίζεται με το αλληλόμορφο *Hind*III *H*-. Οι δύο τοποθεσίες όπου εμφανίζονται οι μεταλλάξεις έχουν απόσταση 600 ζεύγη βάσεων (bp) μεταξύ τους και η ισομορφή X447 εμφανίζεται σχεδόν αποκλειστικά παρουσία του αλληλομόρφου *H*-. Ωστόσο, το αλληλόμορφο *H*- εμφανίζεται και με το S447, επιτρέποντας επομένως την έρευνα για το αν και οι δύο απλότυποι *H*-X447 και *H*-S447 σχετίζονται με σημαντικές επιδράσεις στα λιπίδια του πλάσματος και τον κίνδυνο για έμφραγμα του μυοκαρδίου (107).

3.6. ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΩΝ ΤΗΣ LPL ΣΤΟΝ ΚΙΝΔΥΝΟ ΓΙΑ ΕΜΦΡΑΓΜΑ ΤΟΥ ΜΥΟΚΑΡΔΙΟΥ

Καθώς είναι ξεκάθαρο ότι ο πολυμορφισμός S447X επηρεάζει τα επίπεδα και/ή τη δραστικότητα της LPL, ο πιο πιθανός μηχανισμός για την προστατευτική επίδραση που σχετίζεται με το αλληλόμορφο X447 είναι μέσω της αύξησης στην εκκαθάριση των μεταγευματικών λιπιδίων και της μείωσης της λιπαιμίας νηστείας καθώς και της μεταγευματικής λιπαιμίας που βιώνεται από τους φορείς του X447. Τα χαμηλότερα επίπεδα των τριγλυκεριδίων αλλά και τα αντίστοιχα υψηλότερα επίπεδα της HDL είναι πιθανό ότι συμβάλλουν στον κίνδυνο για στεφανιαία νόσο, αλλά οι αλλαγές στο μεταβολισμό των δύο αυτών λιποπρωτεϊνικών τάξεων μπορεί επίσης να οδηγεί σε διαφορές στην αναλογία των μικρών και πυκνών LDL, το οποίο έχει από μόνο του έχει συνδεθεί με αυξημένο κίνδυνο για αθηροσκλήρωση (107). Παράλληλα, καθώς η υπερτριγλυκεριδαιμία συνδέεται με υπερπηκτικότητα και μειωμένη ινωδόλυση, τα χαμηλότερα επίπεδα τριγλυκεριδίων μπορεί να μειώνουν τον κίνδυνο θρομβώσεως (113).

Ακόμη, είναι πιθανό ότι η μετάλλαξη X447 μπορεί να επηρεάζει τις μη ενζυματικές λειτουργίες της LPL, επηρεάζοντας έτσι τη μεταλιπολυτική εκκαθάριση των αθηρογόνων υπολειμμάτων λιποπρωτεϊνών.

Είναι αξιοσημείωτη η υπόθεση που έχει γίνει όσον αφορά τον απλότυπο *H*-X447 και τη μικρή του επίδραση στα λιπίδια σε νεαρά άτομα που βρέθηκε στα πλαίσια της European Atherosclerosis Research Study (EARS I και EARS II) (107). Έχει θεωρηθεί ότι η επίδραση του απλότυπου στο λιπιδαιμικό προφίλ μεγενθύνεται καθώς τα άτομα μεγαλώνουν και γίνονται παχύσαρκα ή διαβητικά ή ξεκινούν να εμφανίζουν σημάδια αθηροσκλήρωσης. Τα ευρήματα, λοιπόν, από τα άτομα στις EARS I και EARS II οδηγούν στην υπόθεση ότι το μέγεθος των επιδράσεων του απλότυπου *H*-X447 στην ελάττωση των τριγλυκεριδίων του πλάσματος είναι μεγαλύτερο στους απογόνους των ατόμων με έμφραγμα του μυοκαρδίου σε σχέση με τους απογόνους των ατόμων του δείγματος ελέγχου (control). Θεωρητικά, είναι πιθανό ότι ο απλότυπος της LPL που κληρονομείται από τους απογόνους των ασθενών είναι γενετικά διαφορετικός από αυτόν που κληρονομείται από τα άτομα του δείγματος ελέγχου, με τη γενετική αυτή διαφορά να αντανακλά στην παραγωγή ενός λειτουργικά διαφορετικού ενζύμου της LPL (107).

III. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

1. ΔΕΙΓΜΑ

Το δείγμα αποτελείται από 216 ασθενείς με βεβαιωμένη καρδιαγγειακή νόσο (CAD:Coronary Artery Disease) (198 άντρες και 22 γυναίκες) με ηλικιακό εύρος από 34 έως 84 χρόνων (μ.ο. ηλικίας 61,26 χρ.). Όλα τα άτομα εισήχθησαν στο Ωνάσειο Καρδιοχειρουργικό Κέντρο ή επισκέφτηκαν τα εξωτερικά ιατρεία από τον Αύγουστο του 2000 μέχρι το Φεβρουάριο του 2002. Σε όλους τους ασθενείς έγινε στεφανιογραφία από τα αποτελέσματα της οποίας επιβεβαιώθηκε η ύπαρξη στεφανιαίας νόσου. Για τους 148 από τους ασθενείς (139 άντρες και 9 γυναίκες) υπήρχε ιστορικό εμφράγματος του μυοκαρδίου MI (MI:Myocardial Infarction) [ομάδα CAD/MI(+)] ενώ οι υπόλοιποι 68 (55 άντρες και 13 γυναίκες) είχαν θετικά τεστ κοπώσεως αλλά όχι MI [ομάδα CAD/MI(-)]. Κατά τη συλλογή του δείγματος μετρήθηκε το βάρος και το ύψος των ασθενών για τον υπολογισμό του Δείκτη Μάζας Σώματος BMI (BMI=βάρος/ύψος^2). Παράλληλα, καταγράφηκαν στοιχεία για όλους τους προδιαθεσικούς παράγοντες, όπως η ηλικία, η υπέρταση (συστολική πίεση/διαστολική πίεση > 140/90 mmHg), η δυσλιπιδαιμία, ο διαβήτης και το κάπνισμα. Κριτήρια για την ύπαρξη διαβήτη ήταν η λήψη αντίστοιχης αγωγής από τους ασθενείς ή τα επίπεδα γλυκόζης πλάσματος που ξεπερνούσαν τα 126 mg/dl. Έγινε, ακόμη, διαχωρισμός των ατόμων σε καπνιστές/μη καπνιστές και πρώην καπνιστές. Για το 91,67% του δείγματος τα στοιχεία που είχαμε ήταν πλήρη.

Το πρωτόκολλο αυτής της έρευνας εγκρίθηκε από την επιτροπή ηθικής του Ωνάσειου Καρδιοχειρουργικού Κέντρου και από τα εργαστήρια Διατροφής του Χαροκόπειου Πανεπιστημίου ενώ υπήρχε και γραπτή ή προφορική συγκατάθεση από όλα τα άτομα του δείγματος.

Τα δείγματα αίματος συλλέχθηκαν μέσα σε σωληνάκια των 10 ml που περιείχαν ανιπηκτικό EDTA (EDTA vacutainers). Κατόπιν έγινε διαχωρισμός του πλάσματος με φυγοκέντρηση στις 3000 r.p.m. για 10 λεπτά, που φυλλάχθηκε στους -80 °C μέχρι τις αναλύσεις. Τα λευκά κύτταρα χρησιμοποιήθηκαν για την απομόνωση γενωμικού DNA.

2. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΤΟΥ DNA

Η απομόνωση του DNA έγινε από τα λευκά κύτταρα του αίματος σύμφωνα με τη μεθοδολογία των Miller et al (124). Η όλη διαδικασία απομόνωσης έχει διάρκεια 2 ημέρες:

1η ημέρα

Λευκά κύτταρα που αντιστοιχούν σε 10 ml ολικού αίματος μεταφέρθηκαν σε πλαστικό αποστειρωμένο σωλήνα Falcon των 50 ml. Στα κύτταρα προστέθηκε μέχρι τα 40 ml ρυθμιστικό διάλυμα λύσης των ερυθρών αιμοσφαιρίων (EL Buffer, El: 150 mM NH_4Cl, 10mM $KHCO_3$, 1 mM EDTA, pH 7,4). Το αιώρημα των κυττάρων παρέμεινε στον πάγο για 20min με τακτική ανάδευση για τη λύση των ερυθροκυττάρων. Στη συνέχεια το αιώρημα φυγοκεντρήθηκε στις 2000 rpm X 10min και απομακρύνθηκε το υπερκείμενο. Η διαδικασία αυτή επαναλήφθηκε για 1-2 φορές έως ότου το ίζημα πυρήνων να ήταν κατά το δυνατόν απηλλαγμένο από προσμίξεις ερυθρών αιμοσφαιρίων. Το ίζημα των πυρήνων αιωρήθηκε ακολούθως σε 3 ml διαλύματος λύσης των πυρήνων (Nucleus lysis Buffer NL : 10 mM Tris/ HCl, 400 mM NaCl, 2 mM EDTA pH 8,4). Στο εναιώρημα προστέθηκε 50 μl πρωτεϊνάση K (20 mg/dl) και 150 μl 20% SDS και τα δείγματα επωάστηκαν ολονύκτια σε υδατόλουτρο στους 56°C.

2η ημέρα

Τα δείγματα απομακρύνθηκαν από το υδατόλουτρο και μεταφέρθηκαν σε πλαστικό σωλήνα Falcon των 15ml. Σε κάθε δείγμα, προστέθηκε στη συνέχεια 1 ml NaCl 6 M και τα δείγματα αναδεύτηκαν βίαια για 15-20 sec. Στη συνέχεια φυγοκεντρήθηκαν για 10 min στις 3000 rpm, επαναιωρήθηκαν με βίαιη ανάδευση για 15-20 sec και ξαναφυγοκεντρήθηκαν όπως και προηγουμένως προκειμένου να κατακρημνιστούν οι πρωτείνες. Το καθαρό διαυγές υπερκείμενο κάθε δείγματος που περιέχει το DNA μεταφέρθηκε με γυάλινη Pasteur σε καθαρό σωλήνα Falcon των 50 ml. Στη συνέχεια προστέθηκε 2,5 φορές ο όγκος του διαλύματος απόλυτη αιθανόλη. Το DNA που γίνεται ευδιάκριτο μετά τη προσθήκη της αιθανόλης δεσμεύτηκε με πιπέτα

Pasteur. Το DNA ξεπλύθηκε αρκετές φορές με εμβάπτυση του σε διάλυμα 70% αιθανόλης και αφέθηκε να στεγνώσει σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθως αιωρήθηκε σε μικρό όγκο (300 - 500 ml) διαλύματος TE (Tris/ HCl 10 mM, 0,1 mM EDTA, pH 7,4). Τα δείγματα του καθαρού DNA φυλάχθηκαν στους 4°C αφού προηγουμένος έγινε προσδιορισμός της συγκέντρωσής τους με φωτομέτρηση.

3. ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΩΝ

Η ταυτοποίηση των πολυμορφισμών στα γονίδια της apoE, CETP και LPL πραγματοποιήθηκε με εφαρμογή της μεθόδου της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης PCR (polymerase chain reaction) στο θερμικό κυκλοποιητή (thermal cycler) PTC-100; MJ Research και μετά από ηλεκτροφορητική ανάλυση των προϊόντων της PCR που είχαν υποστεί επεξεργασία με ενδονουκλεάσες περιορισμού (RFLP analysis) (RFLP:Restricted Fragment Length Polymorphism). Για την αντιγραφή των κατάλληλων τμημάτων του DNA χρησιμοποιήθηκαν τα εξής ολιγονουκλεοτίδια-εκκινητές (primers):

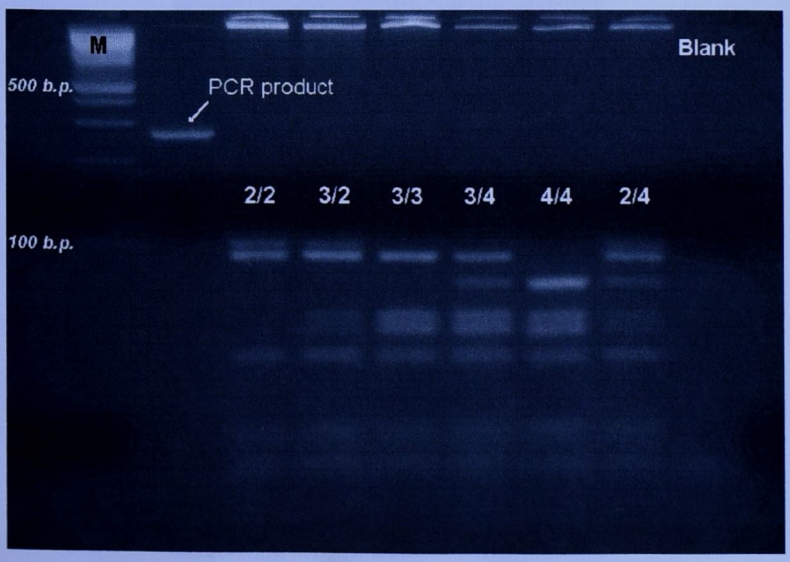
Γονίδιο	Ζεύγη Primers (F=Forward, R=Reverse)	Προϊόν του PCR (σε ζεύγη βάσεων b.p.)	Βιβλιογραφική αναφορά
ApoE exon 4	F: 5′-ATAAATATAAAAT ATAAATAACAGAATTCG CCCCGGCCTGGTACAC-3′ R: 5′-TAAGCTTGGCAC GGCTGTCCAAGGA-3′	267	Reymer W., et al. (114)
CETP intron 1 (Taq1B)	F: 5'-CACTAGCCCAGAGA GAGGAGTGCC-3' R: 5'-CTGAGCCCAGCCGC ACACTAAC-3'	535	Fumeron F., et al. (66)
exon 14 (I405V)	F: 5'-TTGACTGCAGGAAG CTCTGGC-3' R: 5'-TATTTTTTTCACGG ATGGGCA-3'	142	Gudnason V., et al. (76)
LPL exon 9 (S447X)	F: 5'-CATCCATTTTCTTC CACAGGG-3' R: 5'-TAGCCCAGAATGCT CACCAGACT-3'	141	Humphries S., et al. (22)
intron 8 (*Hind*III)	F: 5'-TTTAGGCCTGAAGT TTCCAC-3' R: 5'-CCCAGAATGCTCAC CAGC-3'	1336	Peacock R., et al. (105)

Πίνακας 1. Ολιγονουκλεοτίδια (primers) που χρησιμοποιήθηκαν για την ανίχνευση των πολυμορφισμών στα γονίδια της apoE, CETP και LPL.

3.1. ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΥ ΤΗΣ APOE

Η αντίδραση της PCR πραγματοποιήθηκε στο πρότυπο PCR-buffer [KCl (50 mM/L), Tris (10 mM/L), (pH 8,4)] χρησιμοποιώντας 150-300 ng DNA, $MgCl_2$ τελικής συγκέντρωσης 2 mM, 0,2 mM για καθένα από τα τέσσερα δεσοξυριβονουκλεοτίδια (ATP, TTP, GTP, CTP) (dNTPs), 0,2 g/L αλβουμίνη (bovine serum albumin), 0,2 μM για κάθε primer και 0,75 U *Taq* DNA πολυμεράση σε τελικό όγκο 25 μl. Οι συνθήκες του PCR ήταν οι εξής: αρχική αποδιάταξη (denaturation) για 4 λεπτά (min) στους 94°C και ακολούθως 36 κύκλοι στους 94°C για 30 δευτερόλεπτα (sec) (αποδιάταξη), 62°C για 45 sec (υβριδοποίηση-annealing) και 72°C για 1 min (επέκταση-extention) με μία τελική επέκταση στους 72°C για 4 min και παραμονή στους 25°C για 1 min.

Το προϊόν του PCR μήκους 267 b.p. υπέστη πέψη από την ενδονουκλεάση περιορισμού *Hha* I (4U) στους 37°C ολονύκτια (overnight) με το κατάλληλο buffer που προτείνεται από τον κατασκευαστή. Τα θραύσματα που προέκυψαν (μήκους 104, 91, 72, 56, 48, 38, 19, 18, 16) διαχωρίστηκαν με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 5% στο οποίο είχε προστεθεί βρωμιούχο αιθίδιο (114). Το ηλεκτροφορητικό προφίλ για τους 6 διαφορετικούς γονοτύπους αποδίδεται ως εξής μετά από ανάγνωση σε θάλαμο υπεριώδους ακτινοβολίας UV:

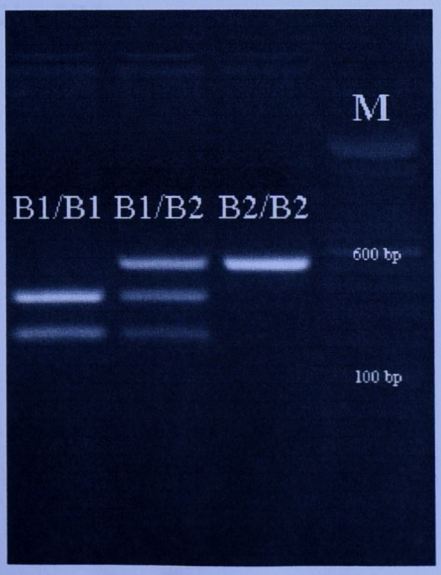


3.2. ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΩΝ ΣΤΟ ΓΟΝΙΔΙΟ ΤΗΣ CETP

3.2.1. Taq1B

Η αντίδραση της PCR πραγματοποιήθηκε στο πρότυπο PCR-buffer [KCl (50 mM/L), Tris (10 mM/L), (pH 8,4)] χρησιμοποιώντας 100-200 ng DNA, $MgCl_2$ τελικής συγκέντρωσης 1,5 mM, 0,2 mM για καθένα από τα τέσσερα δεσοξυριβονουκλεοτίδια (ATP, TTP, GTP, CTP) (dNTPs), 0,2 μM για κάθε primer και 0,6 U *Taq* DNA πολυμεράση σε τελικό όγκο 25 μl. Οι συνθήκες του PCR ήταν οι εξής: αρχική αποδιάταξη (denaturation) για 3 λεπτά (min) στους 95°C και ακολούθως 30 κύκλοι στους 95°C για 30 δευτερόλεπτα (sec) (αποδιάταξη), 60°C για 30 sec (υβριδοποίηση-annealing) και 72°C για 45 sec (επέκταση-extention) με μία τελική επέκταση στους 72°C για 5 min.

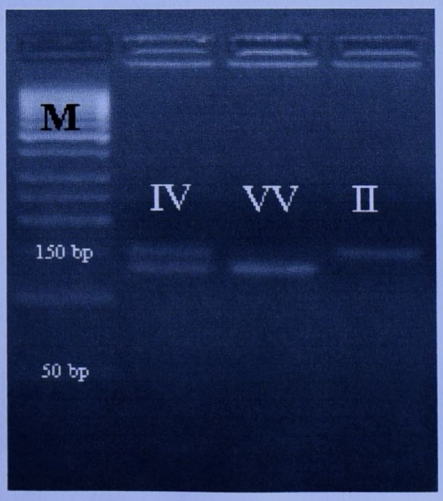
Το προϊόν του PCR μήκους 535 b.p. υπέστη πέψη από την ενδονουκλεάση περιορισμού *Taq*1B (5U) για τουλάχιστον 6 ώρες στους 65°C με το κατάλληλο buffer που προτείνεται από τον κατασκευαστή. Τα θραύσματα που προέκυψαν ήταν μήκους 361, 174 b.p. για το αλληλόμορφο B1 και 535 b.p. για το B2 αλληλόμορφο τα οποία διαχωρίστηκαν με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 1,5% στο οποίο είχε προστεθεί βρωμιούχο αιθίδιο (66, 70). Το ηλεκτροφορητικό προφίλ για τους 3 διαφορετικούς γονοτύπους αποδίδεται ως εξής μετά από ανάγνωση σε θάλαμο υπεριώδους ακτινοβολίας UV:



3.2.2. I405V

Η αντίδραση της PCR πραγματοποιήθηκε στο πρότυπο PCR-buffer [KCl (50 mM/L), Tris (10 mM/L), (pH 8,4)] χρησιμοποιώντας 100-200 ng DNA, $MgCl_2$ τελικής συγκέντρωσης 1,5 mM, 0,2 mM για καθένα από τα τέσσερα δεσοξυριβονουκλεοτίδια (ATP, TTP, GTP, CTP) (dNTPs), 0,2 μM για κάθε primer και 0,6 U *Taq* DNA πολυμεράση σε τελικό όγκο 25 μl. Οι συνθήκες του PCR ήταν οι εξής: αρχική αποδιάταξη (denaturation) για 5 λεπτά (min) στους 95°C, υβριδοποίηση-annealing στους 60 °C για 1 min, επέκταση-extention στους 72°C για 1 min και ακολούθως 30 κύκλοι στους 95°C για 15 δευτερόλεπτα (sec) (αποδιάταξη), 60°C για 30 sec (υβριδοποίηση-annealing) και 72°C για 30 sec (επέκταση-extention) με μία τελική επέκταση στους 72°C για 5 min.

Το προϊόν του PCR μήκους 142 b.p. υπέστη πέψη από την ενδονουκλεάση περιορισμού MspI (5U) στους 37°C για τουλάχιστον 3 ώρες ή ολονύκτια (overnight) με το κατάλληλο buffer που προτείνεται από τον κατασκευαστή. Τα θραύσματα που προέκυψαν ήταν μήκους 142 b.p. για το αλληλόμορφο I και 121, 21 b.p. για το V αλληλόμορφο τα οποία διαχωρίστηκαν με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 3,5% στο οποίο είχε προστεθεί βρωμιούχο αιθίδιο (66, 76). Το ηλεκτροφορητικό προφίλ για τους 3 διαφορετικούς γονοτύπους αποδίδεται ως εξής μετά από ανάγνωση σε θάλαμο υπεριώδους ακτινοβολίας UV:

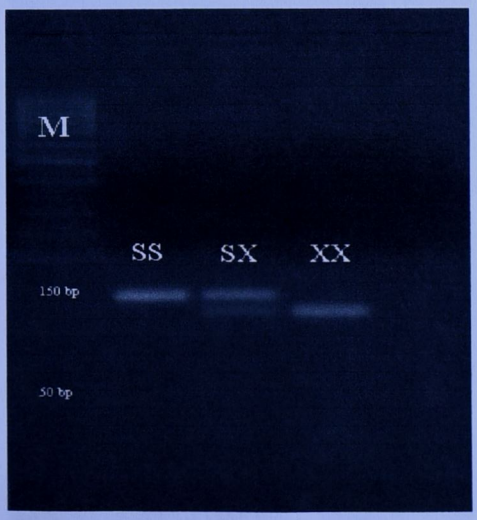


3.3. ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΩΝ ΣΤΟ ΓΟΝΙΔΙΟ ΤΗΣ LPL

3.3.1. S447X

Η αντίδραση της PCR πραγματοποιήθηκε στο πρότυπο PCR-buffer [KCl (50 mM/L), Tris (10 mM/L), (pH 8,4)] χρησιμοποιώντας 100-200 ng DNA, $MgCl_2$ τελικής συγκέντρωσης 2 mM, 0,2 mM για καθένα από τα τέσσερα δεσοξυριβονουκλεοτίδια (ATP, TTP, GTP, CTP) (dNTPs), 0,2 μM για κάθε primer και 0,6 U *Taq* DNA πολυμεράση σε τελικό όγκο 25 μl. Οι συνθήκες του PCR ήταν οι εξής: αρχική αποδιάταξη (denaturation) για 5 λεπτά (min) στους 95°C και ακολούθως 30 κύκλοι στους 94°C για 1 min (αποδιάταξη), 55°C για 1 min (υβριδοποίηση-annealing) και 72°C για 1 min (επέκταση-extention) με μία τελική επέκταση στους 72°C για 5 min.

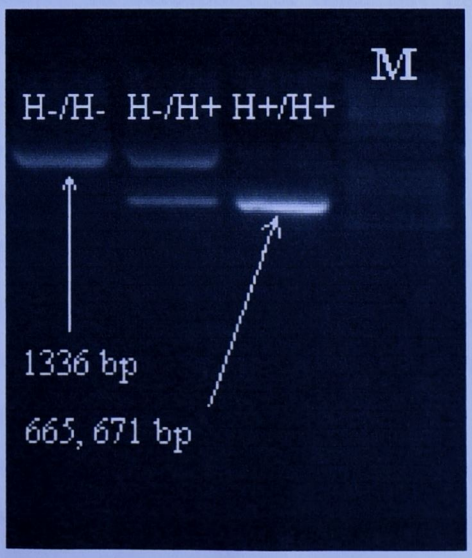
Το προϊόν του PCR μήκους 141 b.p. υπέστη πέψη από 3U της ενδονουκλεάση περιορισμού *Hinf*I στους 37°C για τουλάχιστον 3 ώρες ή ολονύκτια (overnight) με το κατάλληλο buffer που προτείνεται από τον κατασκευαστή. Τα θραύσματα που προέκυψαν ήταν μήκους 141 b.p. για το αλληλόμορφο S και 118, 23 b.p. για το X αλληλόμορφο τα οποία διαχωρίστηκαν με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 3,5% στο οποίο είχε προστεθεί βρωμιούχο αιθίδιο (107). Το ηλεκτροφορητικό προφίλ για τους 3 διαφορετικούς γονοτύπους αποδίδεται ως εξής μετά από ανάγνωση σε θάλαμο υπεριώδους ακτινοβολίας UV:



3.3.2. *Hind*III

Η αντίδραση της PCR πραγματοποιήθηκε στο πρότυπο PCR-buffer [KCl (50 mM/L), Tris (10 mM/L), (pH 8,4)] χρησιμοποιώντας 100-200 ng DNA, $MgCl_2$ τελικής συγκέντρωσης 1 mM, 0,2 mM για καθένα από τα τέσσερα δεσοξυριβονουκλεοτίδια (ATP, TTP, GTP, CTP) (dNTPs), 0,2 μM για κάθε primer και 0,75 U *Taq* DNA πολυμεράση σε τελικό όγκο 25 μl. Οι συνθήκες του PCR ήταν οι εξής: αρχική αποδιάταξη (denaturation) για 5 λεπτά (min) στους 95°C, υβριδοποίηση-annealing στους 55 °C για 1,5 min, επέκταση-extention στους 72°C για 5 min και ακολούθως 34 κύκλοι στους 95°C για 1 min (αποδιάταξη), 55°C για 1 min (υβριδοποίηση-annealing) και 72°C για 3 min (επέκταση-extention).

Το προϊόν του PCR μήκους 1336 b.p. υπέστη πέψη από την ενδονουκλεάση περιορισμού *Hind*III (10U) στους 37°C για τουλάχιστον 3 ώρες ή ολονύκτια (overnight) με το κατάλληλο buffer που προτείνεται από τον κατασκευαστή. Τα θραύσματα που προέκυψαν ήταν μήκους 1336 b.p. για το αλληλόμορφο H- και 665, 671 b.p. για το H+ αλληλόμορφο τα οποία διαχωρίστηκαν με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 1,5% στο οποίο είχε προστεθεί βρωμιούχο αιθίδιο (105, 115). Το ηλεκτροφορητικό προφίλ για τους 3 διαφορετικούς γονοτύπους αποδίδεται ως εξής μετά από ανάγνωση σε θάλαμο υπεριώδους ακτινοβολίας UV:



4. ΒΙΟΧΗΜΙΚΕΣ ΑΝΑΛΥΣΕΙΣ

Το λιπιδαιμικό προφίλ των ασθενών προσδιορίστηκε με πρότυπες μεθόδους στο Ωνάσειο καρδιοχειρουργικό Κέντρο. Για όσους ασθενείς δεν υπήρχαν πλήρεις τιμές, τα λιπίδια πλάσματος προδιορίστηκαν στον αυτόματο βιοχημικό αναλυτή ACE, Schiapparelli Biosystems, Inc του Χαροκόπειου Πανεπιστημίου. Στον έλεγχο που έγινε για να διαπιστωθεί αν οι μετρήσεις μεταξύ των δύο εργαστηρίων διέφεραν δε βρέθηκαν σημαντικές αποκλίσεις. Η ολική χοληστερόλη και τα τριγλυκερίδια προσδιορίστηκαν με πλήρως ενζυματικές μεθόδους (116, 117). Ο προσδιοριμός της HDL χοληστερόλης έγινε με συνδυασμό ενζυμικής και ανοσολογικής μεθόδου. Η LDL υπολογίστηκε με τη χρήση της φόρμουλας Friedewald (118). Τα επίπεδα των απολιποπρωτεϊνών apoAI και apoB προσδιορίστηκαν με ανοσολογικές μεθόδους (119).

5. ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Τα περιγραφικά χαρακτηριστικά των μεταβλητών του δείγματος (τιμές λιπιδίων, λιποπρωτεϊνών και απολιποπρωτεϊνών) εκφράστηκαν ως αριθμητικοί μέσοι ± SD (SD=standard deviation, τυπική απόκλιση). Με τη χρήση *t*-test εξετάστηκε η πιθανότητα να διαφέρουν οι τιμές των μεταβλητών στις δύο ομάδες, των καρδιοπαθών με έμφραγμα MI(+) και των μη εμφραγματιών καρδιοπαθών MI(-). Για τις ποιοτικές μεταβλητές (φύλο, υπέρταση, κάπνισμα) έγινε έλεγχος ανεξαρτησίας χ^2 για τις δύο ομάδες.

Οι γονοτυπικές συχνότητες στις ομάδες που μελετήθηκαν ελέγχθηκαν για ισορροπία Hardy-Weinberg με τη δοκιμή χ^2 και ο υπολογισμός της συχνότητας των αλληλομόρφων έγινε με τη μέθοδο καταγραφής του σχετικού αριθμού τωναλληλομόρφων. Οι συγκρίσεις για τη συχνότητα των γονοτύπων και των αλληλομόρφων μεταξύ των δύο ομάδων MI(+) και MI(-) έγινε με έλεγχο ανεξαρτησίας χ^2. Για τις εξαρτημένες μεταβλητές εξετάστηκε η κανονικότητα της κατανομής τους και οι μεταβλητές εκείνες που δεν

εμφάνισαν κανονική κατανομή λογαριθμήθηκαν πριν την ανάλυση για στατιστικούς λόγους.

Ο έλεγχος σύγκρισης των τιμών των παραμέτρων που εξετάστηκαν ανάμεσα στους γονότυπους των επιμέρους πολυμορφισμών έγινε με τη μέθοδο της ανάλυσης συνδιακύμανσης (ANCOVA, general linear model procedure). Στις αναλύσεις αυτές χρησιμοποιήθηκαν ως συμμεταβλητές (covariates) για κάθε παράμετρο η ηλικία και το φύλο. Το επίπεδο σημαντικότητας ορίστηκε ως $p < 0,05$. Για την ανάλυση έγινε έλεγχος κανονικότητας για τις εξαρτημένες μεταβλητές και για όσες μεταβλητές η κατανομή δεν ήταν κανονική λογαριθμήθηκαν οι τιμές τους για να κανονικοποιηθεί η κατανομή. Ωστόσο, στους πίνακες παρουσιάζονται οι μη λογαριθμικές τιμές.

Για τις στατιστικές αναλύσεις χρησιμοποιήθηκε το στατιστικό πρόγραμμα SPSS for Windows 10.0.1.

IV. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

IV. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

1. ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΟΥ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ

Η περιγραφική στατιστική για τις μεταβλητές στο ολικό δείγμα αλλά και επιμέρους στις ομάδες των καρδιοπαθών με έμφραγμα του μυοκαρδίου [CAD/MI(+)] και χωρίς [CAD/MI(-)] παρουσιάζονται στον πίνακα 1. Η μέση ηλικία όλων των συμμετεχόντων στην έρευνα ήταν 61 ± 10 χρόνια. Η ηλικία μεταξύ των δύο ομάδων είχε μικρή διαφορά και συγκεκριμένα οι CAD/MI(-) ασθενείς ήταν λίγο μεγαλύτεροι από τους CAD/MI(+), διαφορά που ήταν ωστόσο στατιστικά σημαντική (p<0,01). Όσον αφορά το φύλο, το ποσοστό των γυναικών στους CAD/MI(+) ασθενείς ήταν περίπου 6,1% ενώ στους CAD/MI(-) ασθενείς ανέρχεται στο 19,1% (p<0,01), διαφορά που ίσως οφείλεται στο γεγονός ότι οι άντρες έχουν ένα πρόσθετο κίνδυνο για την εμφάνιση εμφράγματος του μυοκαρδίου.

Δεν υπήρχαν σημαντικές διαφορές μεταξύ των δύο ομάδων καρδιοπαθών στα επίπεδα των λιπιδαιμικών παραμέτρων του πλάσματος. Οι τιμές ολικής και LDL χοληστερόλης ήταν μεγαλύτερες από τα επιτρεπτά όρια και για τις δύο ομάδες, ενώ παράλληλα παρατηρήθηκαν υψηλές τιμές για τον αθηρωματικό δείκτη (ολική προς HDL χοληστερόλη) (φυσιολογικές τιμές < 4,5). Επιπρόσθετα, μεγάλο ποσοστό στο ολικό δείγμα παρουσίαζε υπέρταση (64,4%), με την ομάδα των ασθενών CAD/MI(-) να εμφανίζει υπέρταση σε υψηλότερο ποσοστό από τους CAD/MI(+) (80,1% προς 56,8%, p=0,001) κάτι που είναι ενδεικτικό και από τη σημαντικά υψηλότερη συστολική πίεση που είχαν από τους CAD/MI(+) (p<0,001). Το ποσοστό των καρδιοπαθών, που παρουσίαζε και διαβήτη, ήταν το ίδιο για τους δύο πληθυσμούς της μελέτης [CAD/MI(+):27,7% προς CAD/MI(-):32,4%]. Τέλος, ο ανεξάρτητος παράγοντας κινδύνου κάπνισμα, δε διέφερε στις δύο ομάδες της ανάλυσης, καθώς τα ποσοστά των καπνιστών/μη καπνιστών/πρώην καπνιστών ήταν 33%/27%/40% για τους εμφραγματίες καρδιοπαθείς και 32%/24%/44% για τους μη εμφραγματίες χωρίς στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ τους..

Πίνακας 1. Κλινικά χαρακτηριστικά των ασθενών με στεφανιαία νόσο (CAD) που υπέστησαν (+) ή όχι (-) έμφραγμα του μυοκαρδίου (MI).

Μεταβλητές	*Ολικό Δείγμα n=216*	*CAD/MI (+) n=148*	*CAD/MI (-) n=68*	p-Value
Ηλικία (χρ.)	61 ± 10	60 ± 10	64 ± 10	< 0,01
Φύλο (άντρες, γυναίκες)	194/22	139/9	55/13	< 0,01
BMI (kg/m^2)	27,51 ± 3,38	27,43 ± 3,35	27,69 ± 3,46	n.s.
Τριγλυκερίδια (mg/dl)*	157 ± 76	160 ± 82	149 ± 60	n.s.
Ολική Χοληστερόλη (mg/dl) *	220 ± 52	220 ± 54	220 ± 49	n.s.
LDL (mg/dl) *	142 ± 44	141 ± 45	145 ± 44	n.s.
HDL (mg/dl) *	38,7 ± 10	38,5 ± 10	39,3 ± 10	n.s.
Ολ. Χοληστ./HDL	5,94 ± 1,74	5,98 ± 1,76	5,85 ± 1,69	n.s.
Apo AI (mg/dl) *	114 ± 26	114 ± 26	112 ± 25	n.s.
Apo B (mg/dl) *	99 ± 31	100 ± 32	95 ± 28	n.s.
Συστολική πίεση	146 ± 25	141 ± 25	156 ± 23	<0,001
Διαστολική πίεση	81 ± 11	81 ± 11	82 ± 11	n.s.
Υπέρταση (+/-)	139/77	84/64	55/13	0,001
Διαβήτης (+/-)	63/153	41/107	22/46	n.s.
Κάπνισμα (1/2/3) †	67/54/84	46/38/55	21/16/29	n.s.

Οι τιμές για την ηλικία, το BMI, τα λιπίδια και την πίεση εκφράζονται ως μέσες τιμές ± τις τυπικές αποκλίσεις (SD) σε n αριθμό ατόμων. Όλες οι υπόλοιπες τιμές εκφράζουν αριθμό ατόμων.

n.s. = non significant: μη στατιστικά σημαντικές διαφορες μεταξυ ατόμων MI(+) και MI(-). MI=myocardial infarction: έμφραγμα του μυοκαρδίου, CAD=coronary artery disease:στεφανιαία νόσος, BMI=Body mass index:Δείκτης μάζας σώματος

*Στην ανάλυση χρησιμοποιήθηκαν οι λογαριθμημένες τιμές, αλλά οι μέσοι που παρουσιάζονται είναι αριθμητικοί.

† 1=καπνιστές, 2=μη καπνιστές, 3=πρώην καπνιστές σε σύνολο 205 ατόμων.

2. ΚΑΤΑΝΟΜΗ ΓΟΝΟΤΥΠΩΝ ΚΑΙ ΣΥΧΝΟΤΗΤΑ ΑΛΛΗΛΟΜΟΡΦΩΝ ΤΩΝ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΩΝ ΣΤΑ ΓΟΝΙΔΙΑ ΤΗΣ CETP, LPL ΚΑΙ APOE.

Η κατανομή των γονοτύπων και η συχνότητα των αλληλομόρφων για τους πολυμορφισμούς στα γονίδια των CETP, LPL και apoE στις ομάδες των CAD/MI(+) και CAD/MI(-) ασθενών παρουσιάζονται στους πίνακες 2, 3 και 4 αντίστοιχα. Οι συχνότητες εμφάνισης των αλληλομόρφων για κάθε πολυμορφισμό βρίσκονται σε ισορροπία Hardy-Weinberg. Από τον έλεγχο ανεξαρτησίας χ^2 δεν προέκυψε διαφορά στην κατανομή γονοτύπων και αλληλομόρφων για κανέναν πολυμορφισμό μεταξύ των δύο ομάδων CAD/MI(+) και CAD/MI(-). Ειδικότερα:

Πίνακας 2. Κατανομή γονοτύπων και αλληλομόρφων των πολυμορφισμών Taq1B και I405V στο γονίδιο της CETP στους ασθενείς με στεφανιαία νόσο (CAD) που υπέστησαν (+) ή όχι (-) έμφραγμα του μυοκαρδίου (MI).

	Ολικό Δείγμα n (215)	*CAD/MI (+) n (147)*	*CAD/MI (-) n (68)*
CETP - Taq1B			
Γονότυποι			
B1/B1	33,0% (71)	34,0% (50)	30,9% (21)
B1/B2	52,6% (113)	53,7% (79)	50,0% (34)
B2/B2	14,4% (31)	12,2% (18)	19,1% (13)
Αλληλόμορφα			
B1	59,3%	60,9%	55,9%
B2	40,7%	39,1%	44,1%
CETP - I405V			
Γονότυποι			
II	47,4% (102)	50,3% (74)	41,2% (28)
IV	41,9% (90)	39,5% (58)	47,1% (32)
VV	10,7% (23)	10,2% (15)	11,8% (8)
Αλληλόμορφα			
I	68,4%	70,1%	64,7%
V	31,6%	29,9%	35,3%

*Στον πίνακα παρουσιάζονται τα ποσοστά (%) των γονοτύπων και αλληλομόρφων κάθε πολυμορφισμού καθώς και ο αριθμός των ατόμων (σε παρένθεση) για κάθε γονότυπο.

Πίνακας 3. Κατανομή γονοτύπων και αλληλομόρφων των πολυμορφισμών S447X και *Hind*III στο γονίδιο της LPL στους ασθενείς με στεφανιαία νόσο (CAD) που υπέστησαν (+) ή όχι (-) έμφραγμα του μυοκαρδίου (MI).

	Ολικό Δείγμα n (216)	*CAD/MI (+) n (148)*	*CAD/MI (-) n (68)*
LPL - S447X			
Γονότυποι			
SS	79,2% (171)	78,4% (116)	80,9% (55)
SX	19,9% (43)	20,3% (30)	19,1% (13)
XX	0,9% (2)	1,4% (2)	0,0% (0)
Αλληλόμορφα			
S	89,1%	88,5%	90,4%
X	10,9%	11,5%	9,6%
LPL - *Hind*III			
Γονότυποι			
H(+/+)	47,9% (103)	46,9% (69)	50,0% (34)
H(-/+)	43,3% (93)	42,2% (62)	45,6% (31)
H(-/-)	8,8% (19)	10,9% (16)	4,4% (3)
Αλληλόμορφα			
H(+)	69,5%	68%	72,8%
H(-)	30,5%	32%	27,2%

*Στον πίνακα παρουσιάζονται τα ποσοστά (%) των γονοτύπων και αλληλομόρφων κάθε πολυμορφισμού καθώς και ο αριθμός των ατόμων (σε παρένθεση) για κάθε γονότυπο.

Πίνακας 4. Κατανομή γονοτύπων και αλληλομόρφων του πολυμορφισμού στο γονίδιο της apoE στους ασθενείς με στεφανιαία νόσο (CAD) που υπέστησαν (+) ή όχι (-) έμφραγμα του μυοκαρδίου (MI).

	Ολικό Δείγμα n (216)	*CAD/MI (+) n (148)*	*CAD/MI (-) n (68)*
ApoE			
Γονότυποι			
ε2/2	0,0% (0)	0,0% (0)	0,0% (0)
ε2/3	8,3% (18)	8,1% (12)	8,8% (6)
ε3/3	74,5% (161)	76,4% (113)	70,6% (48)
ε3/4	14,4% (31)	13,5% (20)	16,2% (11)
ε4/4	1,4% (3)	2,0% (3)	0,0% (0)
ε2/4	1,4% (3)	0,0% (0)	4,4% (3)
Αλληλόμορφα			
ε2	4,9%	4,1%	6,6%
ε3	85,9%	87,2%	83,1%
ε4	9,3%	8,8%	10,3%

*Στον πίνακα παρουσιάζονται τα ποσοστά (%) των γονοτύπων και αλληλομόρφων κάθε πολυμορφισμού καθώς και ο αριθμός των ατόμων (σε παρένθεση) για κάθε γονότυπο.

2.1. ΣΥΧΝΟΤΗΤΕΣ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΩΝ ΣΤΟ ΓΟΝΙΔΙΟ ΤΗΣ CETP

Για τον Taq1B πολυμορφισμό το αλληλόμορφο B1 είχε τη μεγαλύτερη συχνότητα (59,3%) με το σπάνιο αλληλόμορφο να ανέρχεται στο 40,7% στο ολικό δείγμα. Για τον πολυμορφισμό I405V οι συχνότητες για το συχνό I και το σπάνιο V αλληλόμορφο ήταν 68,4% και 31,6% αντίστοιχα. Και στους δύο πολυμορφισμούς της CETP καμία διαφορά δεν παρατηρήθηκε μεταξύ των ομάδων CAD/MI(+) και CAD/MI(-) στις συχνότητες των αλληλομόρφων.

2.2. ΣΥΧΝΟΤΗΤΕΣ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΩΝ ΣΤΟ ΓΟΝΙΔΙΟ ΤΗΣ LPL

Και ο πολυμορφισμός S447X ήταν αρκετά συχνός στον ελληνικό πληθυσμό με συχνότητες συχνού και σπάνιου αλληλομόρφου 89,1% προς 10,9% αντίστοιχα. Στον πολυμορφισμό *Hind*III το αλληλόμορφο που έχει το σημείο κοπής H(+) παρουσιάζει συχνότητα 69,5% ενώ το αλληλόμορφο που χαρακτηρίζεται από την απουσία θέσης κοπής ήταν αρκετά συχνό επίσης με συχνότητα 30,5%. Οι συχνότητες ήταν οι ίδιες και όταν οι καρδιοπαθείς χωρίστηκαν στις δύο ομάδες CAD/MI(+) και CAD/MI(-).

2.3. ΣΥΧΝΟΤΗΤΕΣ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΥ ΣΤΟ ΓΟΝΙΔΙΟ ΤΗΣ APOE.

Στον κοινό πολυμορφισμό του γονιδίου της apoE τα σπάνια αλληλόμορφα *ε*2 και *ε*4 παρουσίασαν συχνότητες 4,9% και 9,3% αντίστοιχα με το συχνό αλληλόμορφο *ε*3 να ανέρχεται στο 85,9%. Οι δύο ομάδες των CAD/MI(+) και CAD/MI(-) ασθενών δεν είχαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στη συχνότητα των αλληλομόρφων.

3. ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΤΩΝ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΩΝ ΜΕ ΤΟ ΛΙΠΙΔΑΙΜΙΚΟ ΠΡΟΦΙΛ.

Στους πίνακες 5-9 και στα διαγράμματα 1-5 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των συσχετίσεων ανάμεσα στις παραμέτρους του λιπιδαιμικού προφίλ και τους πολυμορφισμούς στα γονίδια των CETP, LPL και apoE για το ολικό δείγμα αλλά και ξεχωριστά για τους ασθενείς CAD/MI(+) και CAD/MI(-). Οι αναλύσεις αυτές έγιναν λαμβάνοντας υπ' όψιν την ηλικία και το φύλο των ασθενών (ανάλυση συνδιακύμανσης) παράγοντες οι οποίοι ως γνωστόν σχετίζονται με το λιπιδαιμικό προφίλ. Σε πρόσθετες αναλύσεις χρησιμοποιούνται το BMI και το κάπνισμα ως συμμεταβλητές για την ανάλυση συνδιακύμανσης, δύο παράγοντες που σχετίζονται με τα λιπίδια πλάσματος αλλά και με τον κίνδυνο για την εμφάνιση καρδιαγγειακής νόσου.

3.1. ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΤΩΝ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΩΝ Taq1B ΚΑΙ I405V ΣΤΟ ΓΟΝΙΔΙΟ ΤΗΣ CETP ΜΕ ΤΟ ΛΙΠΙΔΑΙΜΙΚΟ ΠΡΟΦΙΛ.

Στους πίνακες 5 και 6, καθώς και στα διαγράμματα 1 και 2 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα του ελέγχου της συσχέτισης των πολυμορφισμών Taq1B και I405V, αντίστοιχα, με τις λιπιδαιμικές παραμέτρους για το ολικό δείγμα και για τις επιμέρους πληθυσμιακές ομάδες CAD/MI(+) και CAD/MI(-).

Για τον πολυμορφισμό Taq1B δε βρέθηκε καμία συσχέτιση με τα επίπεδα των ολική χοληστερόλη (TC), τριγλυκεριδίων (TG), LDL, HDL, απολιποπρωτεϊνών apoAI και apoB. Τόσο στο σύνολο των καρδιοπαθών όσο και στις ομάδες CAD/MI(+) και CAD/MI(-) τα άτομα με γονότυπο B2B2 φαίνεται να έχουν μια τάση για αυξημένα επίπεδα HDL σε σχέση με τους φορείς του συχνού αλληλόμορφου B1 (B1B1 και B1B2) αλλά η διαφορά δεν είναι στατιστικά σημαντική. Οι B2B2 ομοζυγώτες έχουν επίπεδα HDL υψηλότερα από 41 mg/dl με τους υπόλοιπους γονότυπους να χαρακτηρίζονται από HDL μικρότερη των 40 mg/dl, με την HDL των B2B2 να είναι 8,5%

υψηλότερη από εκείνη των B1B1. Η μόνη στατιστικά σημαντική διαφορά που παρατηρήθηκε ήταν στον αθηρωματικό δείκτη (TC/HDL) για το ολικό δείγμα, όπου στις μεταξύ των γονοτυπικών ομάδων συγκρίσεις βλέπουμε ότι οι ομοζυγώτες B1B1 έχουν σημαντικά υψηλότερο λόγο ολικής προς HDL χοληστερόλη από τους ομοζυγώτες B2B2 ($p<0,05$). Παράλληλα, στην ομάδα των CAD/MI(+) ασθενών, οι ασθενείς με γονότυπο B2B2 έχουν οριακά μικρότερο αθηρωματικό δείκτη σε σχέση με τους ομοζυγώτες B1B1 και τους ετεροζυγώτες B1B2 ($p=0,059$ και $p=0,065$ αντίστοιχα). Ωστόσο, και στις τρεις ομάδες της ανάλυσης [ολικό δείγμα, CAD/MI(+) και CAD/MI(-)] ο δείκτης αυτός ήταν πολύ υψηλός.

Τα αποτελέσματα ήταν ανάλογα όταν στην ανάλυση συνδιακύμανσης συμπεριλήφθηκαν το BMI και/ή το κάπνισμα.

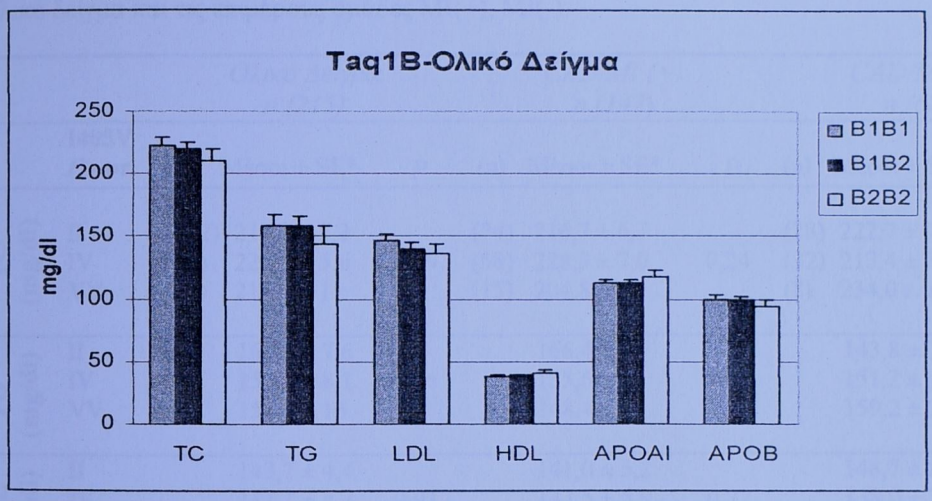
Καμία επίδραση στα επίπεδα των TC, TG, HDL, LDL, apoAI, apoB και στο λόγο TC/HDL δε βρέθηκε κατά τον έλεγχο για τον πολυμορφισμό I405V (πίνακας 6, διάγραμμα 2).

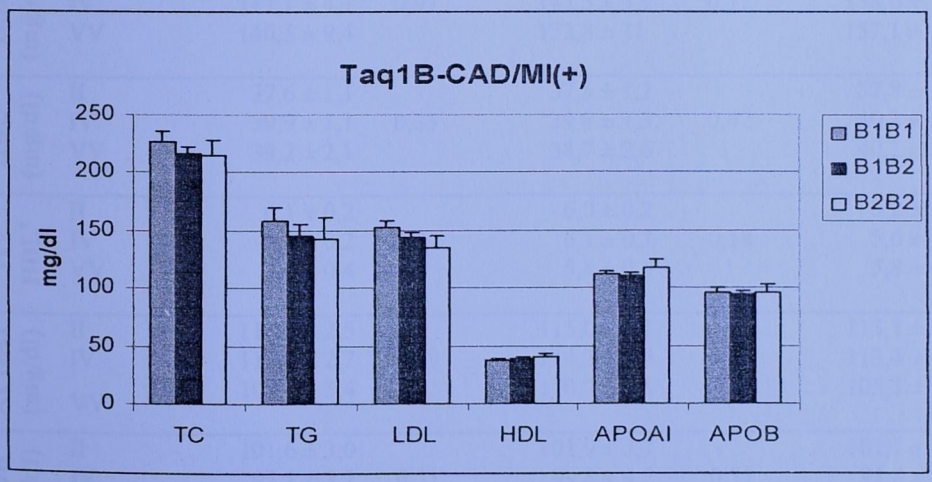
Πίνακας 5. Συσχέτιση του πολυμορφισμού Taq1B στο γονίδιο της CETP με τα επίπεδα των λιπιδίων, λιποπρωτεϊνών και απολιποπρωτεϊνών του πλάσματος για το ολικό δείγμα και τις επιμέρους ομάδες MI(+), MI(-).

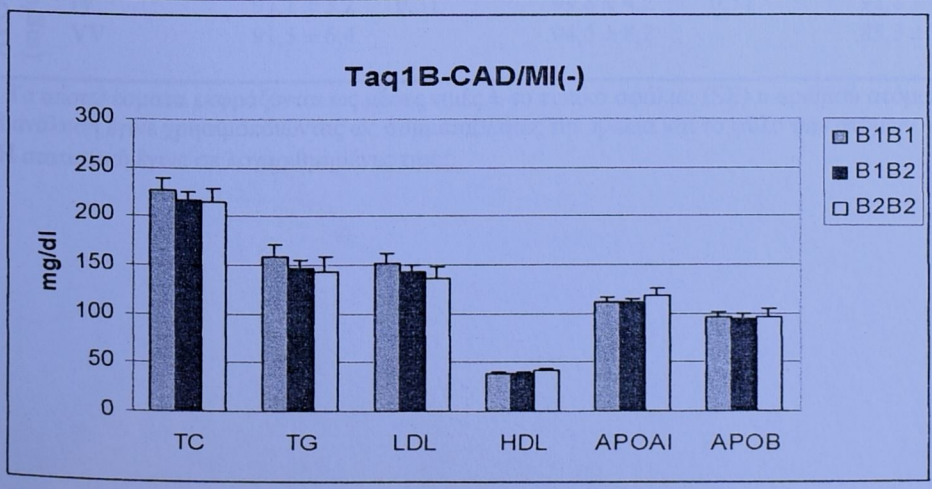
		Ολικό Δείγμα n (215)			*CAD/MI (+) n (147)*			*CAD/MI (-) n (68)*		
	Taq1B *Γονοτ.*	(n)	Μέσοι ± SE*	*P*	(n)	Μέσοι ± SE*	*P*	(n)	Μέσοι ± SE*	*P*
TC (mg/dl)	B1B1	(71)	222,5 ± 6,3		(50)	218,9 ± 7,8		(21)	227,4 ± 11	
	B1B2	(113)	220,4 ± 5,0	0,64	(79)	222,3 ± 6,1	0,62	(34)	216,5 ± 8,3	0,62
	B2B2	(31)	210,7 ± 9,6		(18)	211,2 ± 13		(13)	215,3 ± 13	
TG$^{\alpha}$ (mg/dl)	B1B1		158,8 ± 9,2			159,5 ± 12			158,3 ± 13	
	B1B2		158,7 ± 7,2	0,66		163,6 ± 9,4	0,78		146,0 ± 10	0,54
	B2B2		144,2 ± 14			146,1 ± 19			142,2 ± 17	
LDL$^{\alpha}$ (mg/dl)	B1B1		146,7 ± 5,3			142,9 ± 6,4			152,1 ± 9,3	
	B1B2		140,6 ± 4,2	0,61		139,6 ± 5,0	0,94		143,4 ± 7,3	0,44
	B2B2		136,6 ± 8,0			140,1 ± 10			135,8 ± 12	
HDL$^{\alpha}$ (mg/dl)	B1B1		37,6 ± 1,2			37,1 ± 1,4			38,2 ± 2,3	
	B1B2		38,9 ± 0,9	0,34		38,8 ± 1,1	0,28		39,1 ± 1,8	0,69
	B2B2		41,1 ± 1,8			41,6 ± 2,4			41,4 ± 2,9	
TC/ HDL$^{\alpha}$	B1B1		6,2 ± 0,2$^{\beta}$			6,1 ± 0,3$^{\gamma}$			6,2 ± 0,4	
	B1B2		5,9 ± 0,2	0,11		6,0 ± 0,2$^{\delta}$	0,18		5,7 ± 0,3	0,42
	B2B2		5,4 ± 0,3			5,2 ± 0,4			5,7 ± 0,5	
APOAI (mg/dl)	B1B1		112,5 ± 3,1			113,3 ± 3,8			111,3 ± 5,5	
	B1B2		113,2 ± 2,4	0,48		114,2 ± 2,9	0,70		110,8 ± 4,3	0,60
	B2B2		117,9 ± 4,6			117,8 ± 6,2			118,2 ± 7,0	
APOB$^{\alpha}$ (mg/dl)	B1B1		99,4 ± 3,7			101,0 ± 4,5			95,7 ± 6,3	
	B1B2		99,5 ± 2,9	0,79		102,0 ± 3,6	0,55		93,9 ± 5,0	0,88
	B2B2		94,4 ± 5,5			92,7 ± 7,5			96,1 ± 8,0	

* Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέσες τιμές ± το τυπικό σφάλμα (SE) n αριθμού ατόμων.
Η ανάλυση έγινε χρησιμοποιώντας ως συμμεταβλητές την ηλικία και το φύλο των ατόμων.
$^{\alpha}$Η στατιστική έγινε σε λογαριθμημένες τιμές.
$^{\beta,\gamma,\delta}$Διαφορά σε σχέση με τους ομοζυγώτες B2B2
$^{\beta}p<0,05$, $^{\gamma}p=0,059$, $^{\delta}p=0,065$.

Διάγραμμα1.Διαγραμματική απεικόνιση της συσχέτισης του πολυμορφισμού Taq1B στο γονίδιο της CETP με τα επίπεδα των λιπιδίων, λιποπρωτεϊνών και απολιποπρωτεϊνών του πλάσματος για το ολικό δείγμα και τις επιμέρους ομάδες CAD/MI(+) και CAD/MI(-).





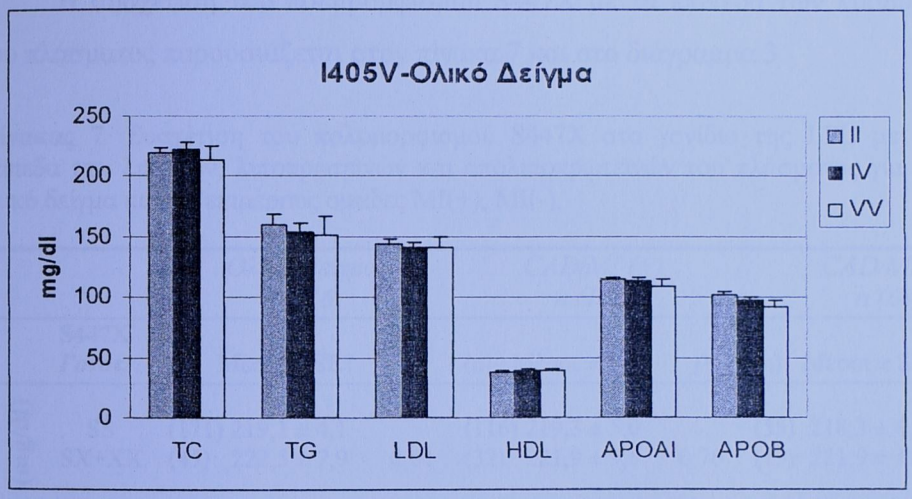


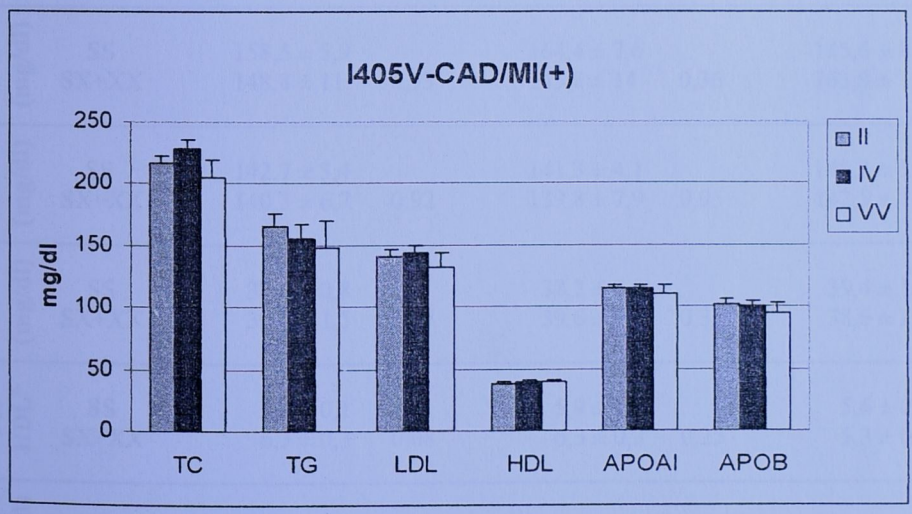
Πίνακας 6. Συσχέτιση του πολυμορφισμού I405V στο γονίδιο της CETP με τα επίπεδα των λιπιδίων, λιποπρωτεϊνών και απολιποπρωτεϊνών του πλάσματος για το ολικό δείγμα και τις επιμέρους ομάδες MI(+), MI(-).

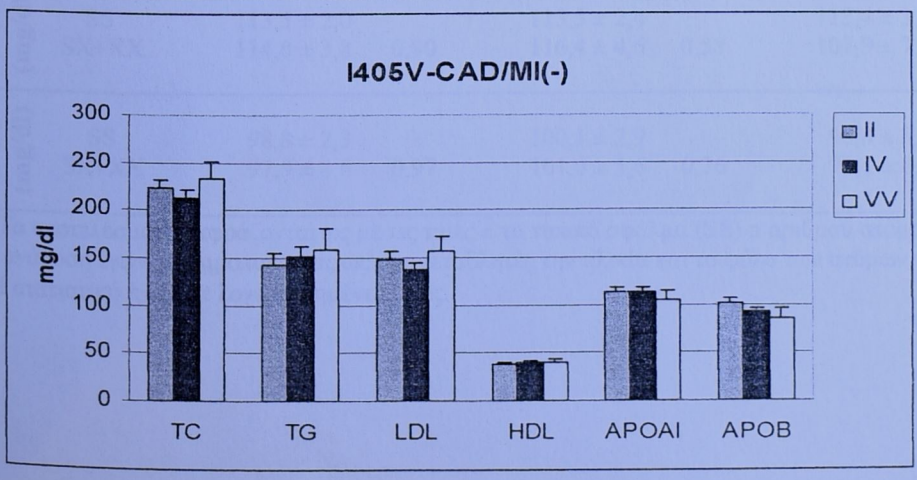
		Ολικό Δείγμα n (215)			*CAD/MI (+) n (147)*			*CAD/MI (-) n (68)*		
	I405V *Γονοτ.*	(n)	Μέσοι ± SE*	*P*	(n)	Μέσοι ± SE*	*P*	(n)	Μέσοι ± SE*	*P*
TC (mg/dl)	II	(102)	219,1 ± 5,3		(74)	216,7 ± 6,3		(28)	222,7 ± 9,2	
	IV	(90)	222,4 ± 5,6	0,49	(58)	228,3 ± 7,0	0,24	(32)	213,4 ± 8,6	0,52
	VV	(23)	213,9 ± 11		(15)	204,8 ± 14		(8)	234,0 ± 17	
TG[α] (mg/dl)	II		160,6 ± 7,6			166,4 ± 9,7			143,8 ± 12	
	IV		153,8 ± 8,1	0,76		155,6 ± 11	0,48		151,2 ± 11	0,69
	VV		151,2 ± 16			148,4 ± 21			159,2 ± 22	
LDL (mg/dl)	II		143,7 ± 4,4			141,0 ± 5,2			148,7 ± 8,0	
	IV		141,1 ± 4,7	0,91		143,5 ± 5,9	0,72		138,0 ± 7,5	0,43
	VV		140,5 ± 9,4			132,8 ± 11			157,1 ± 15	
HDL[α] (mg/dl)	II		37,6 ± 1,1			37,5 ± 1,2			37,8 ± 1,9	
	IV		39,9 ± 1,1	0,35		39,8 ± 1,3	0,42		40,3 ± 1,8	0,62
	VV		39,2 ± 2,1			38,7 ± 2,6			40,2 ± 3,7	
TC/ HDL[α]	II		6,1 ± 0,2			6,0 ± 0,2			6,2 ± 0,3	
	IV		5,9 ± 0,2	0,57		6,1 ± 0,2	0,58		5,6 ± 0,3	0,44
	VV		5,6 ± 0,4			5,4 ± 0,5			5,8 ± 0,6	
APOAI (mg/dl)	II		114,5 ± 2,5			115,0 ± 3,1			113,1 ± 4,8	
	IV		113,9 ± 2,7	0,69		114,2 ± 3,5	0,85		113,4 ± 4,5	0,71
	VV		108,8 ± 5,4			110,7 ± 6,8			105,3 ± 9,0	
APOB[α] (mg/dl)	II		101,6 ± 3,0			101,9 ± 3,7			101,1 ± 5,4	
	IV		97,1 ± 3,2	0,31		99,8 ± 4,2	0,71		91,8 ± 5,0	0,32
	VV		91,5 ± 6,4			94,5 ± 8,2			85,3 ± 10	

* Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέσες τιμές ± το τυπικό σφάλμα (SE) n αριθμού ατόμων.
Η ανάλυση έγινε χρησιμοποιώντας ως συμμεταβλητές την ηλικία και το φύλο των ατόμων.
[α]Η στατιστική έγινε σε λογαριθμημένες τιμές.

Διάγραμμα 2. Διαγραμματική απεικόνιση της συσχέτισης του πολυμορφισμού I405V στο γονίδιο της CETP με τα επίπεδα των λιπιδίων, λιποπρωτεϊνών και απολιποπρωτεϊνών του πλάσματος για το ολικό δείγμα και τις επιμέρους ομάδες CAD/MI(+) και CAD/MI(-).







3.2. ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΤΩΝ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΩΝ S447X ΚΑΙ *Hind*III ΣΤΟ ΓΟΝΙΔΙΟ ΤΗΣ LPL ΜΕ ΤΟ ΛΙΠΙΔΑΙΜΙΚΟ ΠΡΟΦΙΛ.

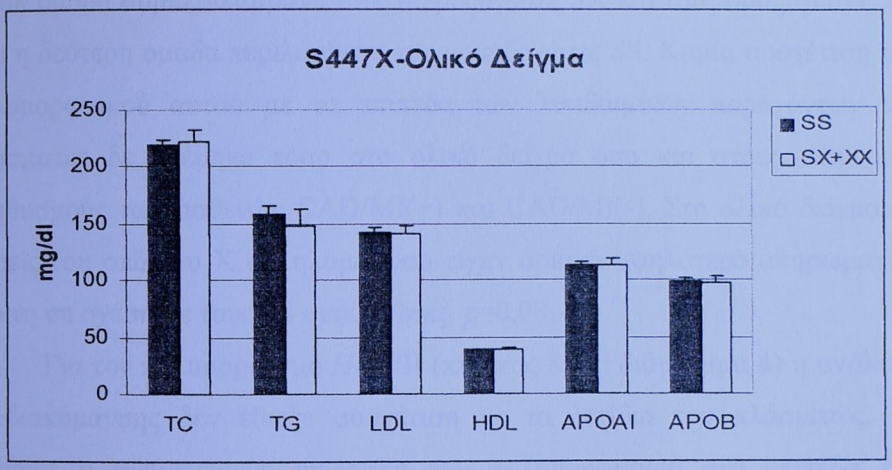
Η συσχέτιση του πολυμορφισμού S447X με τα επίπεδα των λιπιδίων του πλάσματος παρουσιάζεται στον πίνακα 7 και στο διάγραμμα 3.

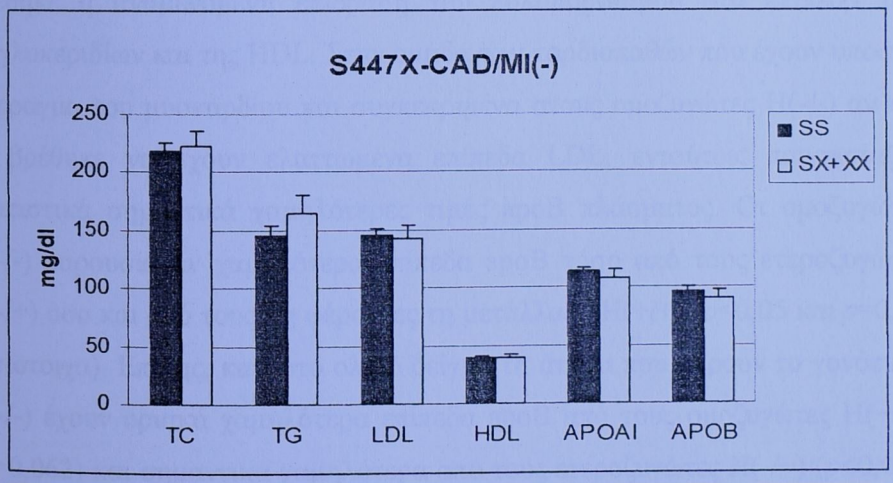
Πίνακας 7. Συσχέτιση του πολυμορφισμού S447X στο γονίδιο της LPL με τα επίπεδα των λιπιδίων, λιποπρωτεϊνών και απολιποπρωτεϊνών του πλάσματος για το ολικό δείγμα και τις επιμέρους ομάδες MI(+), MI(-).

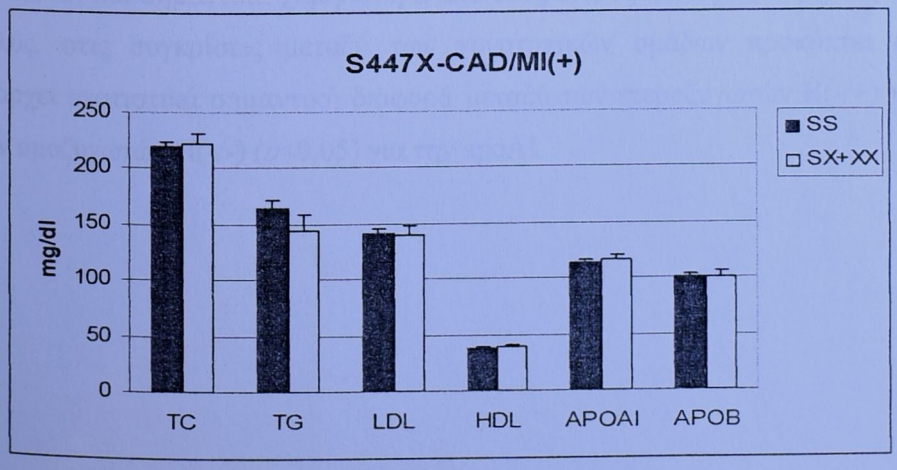
		Ολικό Δείγμα n (216)			*CAD/MI (+) n (148)*			*CAD/MI (-) n (68)*		
	S447X *Γονοτ.*	(n)	Μέσοι ± SE*	*P*	(n)	Μέσοι ± SE*	*P*	(n)	Μέσοι ± SE*	*P*
TC[α] (mg/dl)	SS	(171)	219,1 ± 4,1		(116)	219,3 ± 5,0		(55)	218,3 ± 6,6	
	SX+XX	(45)	222,5 ± 7,9	0,61	(32)	221,9 ± 9,6	0,76	(13)	221,9 ± 13	0,56
TG[α] (mg/dl)	SS		158,5 ± 5,9			164,4 ± 7,6			145,6 ± 8,2	
	SX+XX		148,8 ± 11	0,53		143,8 ± 14	0,36		163,8 ± 17	0,65
LDL (mg/dl)	SS		142,7 ± 3,4			141,3 ± 4,1			145,2 ± 5,8	
	SX+XX		140,3 ± 6,7	0,92		139,8 ± 7,9	0,95		142,5 ± 12	0,86
HDL[α] (mg/dl)	SS		38,6 ± 0,8			38,2 ± 0,9			39,4 ± 1,4	
	SX+XX		39,3 ± 1,5	0,67		39,6 ± 1,8	0,38		38,6 ± 2,9	0,52
TC/ HDL[α]	SS		5,8 ± 0,1			5,9 ± 0,2			5,6 ± 0,3	
	SX+XX		6,3 ± 0,3	0,08		6,3 ± 0,3	0,25		5,3 ± 0,3	0,23
APOAI (mg/dl)	SS		113,5 ± 2,0			113,5 ± 2,4			113,4 ± 3,4	
	SX+XX		114,0 ± 3,8	0,90		116,4 ± 4,6	0,58		107,9 ± 7,0	0,49
APOB[α] (mg/dl)	SS		98,8 ± 2,3			100,1 ± 2,9			96,0 ± 3,9	
	SX+XX		97,9 ± 4,6	0,97		101,0 ± 5,6	0,76		90,0 ± 8,1	0,59

* Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέσες τιμές ± το τυπικό σφάλμα (SE) n αριθμού ατόμων.
Η ανάλυση έγινε χρησιμοποιώντας ως συμμεταβλητές την ηλικία και το φύλο των ατόμων.
[α]Η στατιστική έγινε σε λογαριθμημένες τιμές.

Διάγραμμα 3. Διαγραμματική απεικόνιση της συσχέτισης του πολυμορφισμού S447X στο γονίδιο της LPL με τα επίπεδα των λιπιδίων, λιποπρωτεϊνών και απολιποπρωτεϊνών του πλάσματος για το ολικό δείγμα και τις επιμέρους ομάδες CAD/MI(+) και CAD/MI(-).







Λόγω του μικρού αριθμού των ομοζυγωτών XX (n=2). χωρίσαμε τους ασθενείς σε δύο ομάδες σύγκρισης γονοτύπων (φορείς ή μη της μετάλλαξης). Η μία ομάδα συμπεριλάμβανε τους ετεροζυγώτες SX και τους ομοζυγώτες XX ενώ η δεύτερη ομάδα περιλάμβανε τους ομοζυγώτες SS. Καμία συσχέτιση του πολυμορφισμού αυτού με τα επίπεδα των λιπιδαιμικών παραγόντων του πλάσματος δε βρέθηκε τόσο στο ολικό δείγμα όσο και στους επιμέρους πληθυσμούς των ασθενών CAD/MI(+) και CAD/MI(-). Στο ολικό δείγμα, οι φορείς του σπάνιου X αλληλομόρφου είχαν οριακά υψηλότερο αθηρωματικό δείκτη σε σχέση με τους SS ομοζυγώτες, p=0,08.

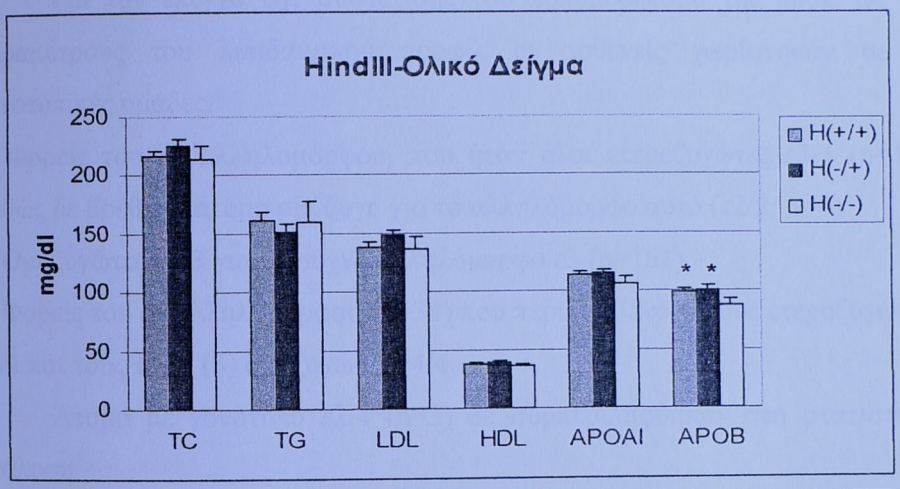
Για τον πολυμορφισμό *Hind*III (πίνακας 8 και διάγραμμα 4) η ανάλυση συνδιακύμανσης δεν έδειξε συσχέτιση με τα λιπίδια του πλάσματος. Δε βρέθηκε η αναμενόμενη επίδραση του πολυμορφισμού στα επίπεδα των τριγλυκεριδίων και της HDL. Στην ομάδα των καρδιοπαθών που έχουν υποστεί έμφραγμα του μυοκαρδίου και συγκεκριμένα στους ομοζυγώτες H(-/-) αν και δε βρέθηκε να έχουν ελαττωμένα επίπεδα LDL, εντούτοις παρουσίαζαν στατιστικά σημαντικά χαμηλότερες τιμές apoB πλάσματος. Οι ομοζυγώτες H(-/-) παρουσίαζαν χαμηλότερα επίπεδα apoB τόσο από τους ετεροζυγώτες H(-/+) όσο και από τους μη φέροντες τη μετάλλαξη H(+/+) (p<0,05 και p=0,05 αντίστοιχα). Επίσης, και στο ολικό δείγμα τα άτομα που φέρουν το γονότυπο H(-/-) έχουν οριακά χαμηλότερα επίπεδα apoB από τους ομοζυγώτες H(+/+) (p=0,062) και σημαντικά χαμηλότερα από τους ετεροζυγώτες H(-/+) (p<0,05). Τέλος, στις συγκρίσεις μεταξύ των γονοτυπικών ομάδων προκύπτει ότι υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των ετεροζυγωτών H(-/+) και των ομοζυγωτών H(-/-) (p<0,05) για την apoAI.

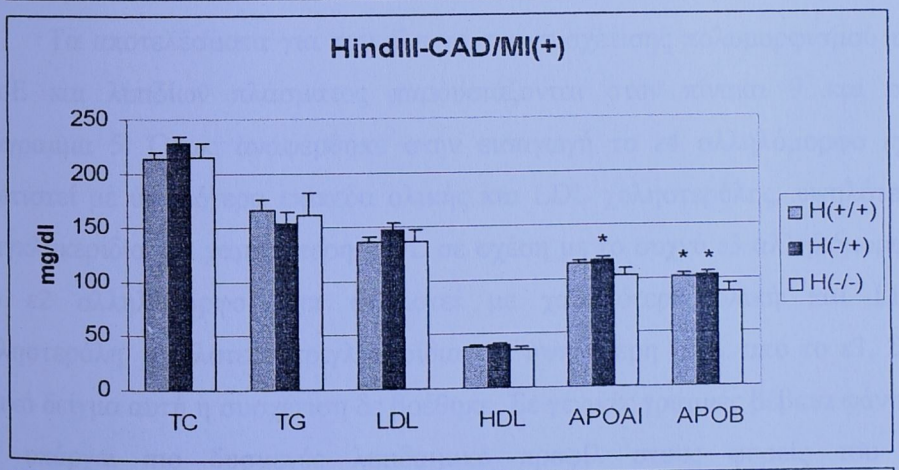
Πίνακας 8. Συσχέτιση του πολυμορφισμού *Hind*III στο γονίδιο της LPL με τα επίπεδα των λιπιδίων, λιποπρωτεϊνών και απολιποπρωτεϊνών του πλάσματος για το ολικό δείγμα και τις επιμέρους ομάδες MI(+), MI(-).

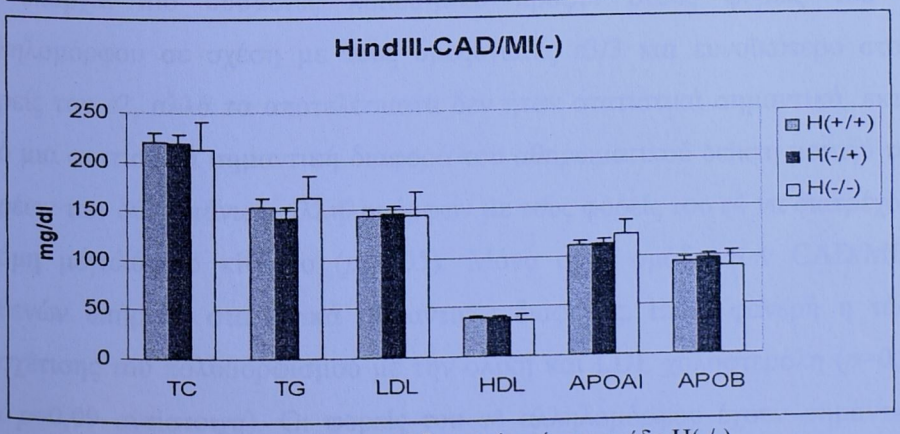
		Ολικό Δείγμα n (215)			*CAD/MI (+) n (147)*			*CAD/MI (-) n (68)*		
	***Hind*III Γονοτ.**	(n)	Μέσοι ± SE*	*P*	(n)	Μέσοι ± SE*	*P*	(n)	Μέσοι ± SE*	*P*
TC (mg/dl)	H(+/+)	(103)	215,9 ± 5,2		(74)	213,9 ± 6,5		(34)	220,7 ± 8,4	
	H(-/+)	(93)	225,5 ± 5,5	0,39	(58)	227,8 ± 6,9	0,32	(31)	219,1 ± 8,8	0,92
	H(-/-)	(19)	213,5 ± 12		(15)	215,3 ± 13		(3)	212,8 ± 28	
TG$^{\alpha}$ (mg/dl)	H(+/+)		161,4 ± 7,6			165,8 ± 9,9			153,5 ± 10	
	H(-/+)		150,9 ± 8,0	0,25		154,1± 10	0,44		142,9 ± 11	0,50
	H(-/-)		160,3 ± 17			160,7 ± 21			162,7 ± 22	
LDL (mg/dl)	H(+/+)		138,3 ± 4,4			135,9 ± 5,4			143,8 ± 7,3	
	H(-/+)		147,6 ± 4,6	0,28		147,9 ± 5,7	0,22		145,7 ± 7,7	0,99
	H(-/-)		136,5 ± 10			136,7 ± 11			143,4 ± 25	
HDL$^{\alpha}$ (mg/dl)	H(+/+)		38,5 ± 1,0			38,3 ± 1,2			39,0 ± 1,8	
	H(-/+)		39,6 ± 1,1	0,29		39,4 ± 1,3	0,29		39,7 ± 1,9	0,97
	H(-/-)		35,7 ± 2,3			35,4 ± 2,5			37,1 ± 6,0	
TC/ HDL$^{\alpha}$	H(+/+)		6,0 ± 0,2			6,1 ± 0,2			5,7 ± 0,3	
	H(-/+)		5,9 ± 0,2	0,48		5,9 ± 0,2	0,54		5,8 ± 0,3	0,87
	H(-/-)		6,3 ± 0,4			6,4 ± 0,4			6,1 ± 1,1	
APOAI (mg/dl)	H(+/+)		113,1 ± 2,5			114,2 ± 3,2			110,9 ± 4,3	
	H(-/+)		115,5 ± 2,7	0,23		116,8 ± 3,3$^{\beta}$	0,09		113,0 ± 4,5	0,77
	H(-/-)		106,1 ± 5,9			102,9 ± 6,5			121,6 ± 14	
APOB$^{\alpha}$ (mg/dl)	H(+/+)		98,6 ± 3,0$^{\gamma}$			100,9 ± 3,8$^{\varepsilon}$			93,7 ± 4,9	
	H(-/+)		100,9 ± 3,2$^{\delta}$	0,18		102,8 ± 4,0$^{\sigma\tau}$	0,08		96,8 ± 5,2	0,96
	H(-/-)		86,6 ± 7,0			86,8 ± 7,9			88,0 ± 17	

* Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέσες τιμές ± το τυπικό σφάλμα (SE) n αριθμού ατόμων.
Η ανάλυση έγινε χρησιμοποιώντας ως συμμεταβλητές την ηλικία και το φύλο των ατόμων.
$^{\alpha}$Η στατιστική έγινε σε λογαριθμημένες τιμές.
$^{\beta,\gamma,\delta,\varepsilon,\sigma\tau}$ Διαφορά σε σχέση με τους ομοζυγώτες H-/-
$^{\beta}p<0,05$, $^{\gamma}p=0,062$, $^{\delta}p<0,05$, $^{\varepsilon}p=0,05$, $^{\sigma\tau}p<0,05$

Διάγραμμα 3. Διαγραμματική απεικόνιση της συσχέτισης του πολυμορφισμού *Hind*III στο γονίδιο της LPL με τα επίπεδα των λιπιδίων, λιποπρωτεϊνών και απολιποπρωτεϊνών του πλάσματος για το ολικό δείγμα και τις επιμέρους ομάδες CAD/MI(+) και CAD/MI(-).







* Στατιστικά σημαντική διαφορά από την ομάδα H(-/-).

3.3. ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΤΟΥ ΚΟΙΝΟΥ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΥ ΣΤΟ ΓΟΝΙΔΙΟ ΤΗΣ APOE ΜΕ ΤΟ ΛΙΠΙΔΑΙΜΙΚΟ ΠΡΟΦΙΛ.

Για τον έλεγχο της συσχέτισης του πολυμορφισμό της apoE με τις παραμέτρους του λιπιδαιμικού προφίλ οι ασθενείς χωρίστηκαν σε 3 γονοτυπικές ομάδες.

1. Φορείς του ε2 αλληλομόρφου, που ήταν όλοι ετεροζυγώτες ε2/3 (n=18) καθώς δε βρέθηκε άτομο ομόζυγο για το αλληλόμορφο αυτό (ε2/2, n=0)
2. Ομοζυγώτες ε3/3 για το συχνό αλληλόμορφο ε3 (n=161)
3. Φορείς του ε4 αλληλομόρφου (n=34) που περιλαμβάνουν τους ετεροζυγώτες ε3/4 και τους τρεις (3) ομοζυγώτες ε4/4.

Άτομα με γονότυπο ε2/4 (n=3) δε συμπεριλήφθηκαν στη στατιστική ανάλυση.

Τα αποτελέσματα για τον έλεγχο της συσχέτισης πολυμορφισμού της apoE και λιπιδίων πλάσματος παρουσιάζονται στον πίνακα 9 και στο διάγραμμα 5. Όπως αναφέρθηκε στην εισαγωγή το ε4 αλληλόμορφο έχει σχετιστεί με υψηλότερα επίπεδα ολικής και LDL χοληστερόλης, υψηλότερα τριγκλυκερίδια και χαμηλότερη HDL σε σχέση με το συχνό ε3 αλληλόμορφο. Το ε2 αλληλόμορφο έχει σχετιστεί με χαμηλότερη ολική και LDL χοληστερόλη, υψηλότερα τριγλυκερίδια και υψηλότερη HDL από το ε3. Στο ολικό δείγμα αυτή η συσχέτιση δε βρέθηκε. Σε γενικές γραμμές βέβαια φάνηκε να υπάρχει πιο δυσμενές λιπιδαιμικό προφίλ στους φορείς του ε4 αλληλομόρφου σε σχέση με τους ομοζυγώτες ε3/3 και ευνοϊκότερο στους φορείς του ε2, αλλά τα αποτελέσματα δεν ήταν στατιστικά σημαντικά, εκτός από μια στατιστικά σημαντική διαφορά του αθηρωματικού δείκτη μεταξύ των φορέων των δύο σπάνιων αλληλομόρφων με τους φορείς του ε4 να διατρέχουν ακόμη μεγαλύτερο κίνδυνο ($p<0,05$). Μόνο στην ομάδα των CAD/MI(-) ασθενών υπήρχαν στατιστικά σημαντικές διαφορές. Είναι φανερή η τάση συσχέτισης του πολυμορφισμού με την ολική και LDL χοληστερόλη ($p=0,07$ και $p=0,09$ αντίστοιχα). Οι φορείς του ε4 αλληλομόρφου έχουν σημαντικά υψηλότερη TC και LDL από τους ετεροζυγώτες ε2/3 ($p<0,05$). Ο προσδιορισμός του αθηρωματικού δείκτη έδειξε ότι το ε2 αλληλόμορφο έχει

λιγότερο αθηρογόνο λιπιδαιμικό προφίλ από το σύνηθες αλληλόμορφο ε3, ενώ οι φορείς του ε4 αλληλομόρφου έχουν υψηλότερο αθηρωματικό δείκτη από τους ομοζυγώτες ε3/3 καθώς και από τους ε2/3.

Εδώ να σημειώσουμε ότι όταν εξετάσαμε ξεχωριστά τα τρία άτομα ε4/4, αυτά στο ολικό δείγμα παρουσίασαν οριακά έως σημαντικά υψηλότερες τιμές ολικής και LDL χοληστερόλης σε σχέση με τις ομάδες ε2/3 και ε3/3 με τις τιμές για την ολική χοληστερόλη να είναι 270,3±30,5 (ε4/4) προς 209,4±12 (ε2/3) με p=0,06 και 219±4,1 mg/dl (ε3/3) με p=0,09, ενώ για την LDL είχαμε αντίστοιχα 192,8±25,7 προς 134,3±10,4 με p<0,05 και 141,7±3,5 mg/dl με p=0,05. Για τα τριγλυκερίδια, την HDL και την apoAI δε βρέθηκε συσχέτιση σε καμία ομάδα των ασθενών ή στον ολικό πληθυσμό.

Τέλος, στον πληθυσμό των CAD/MI(-) ασθενών βρέθηκε ότι η apoE είχε ισχυρή συσχέτιση με την apoB (p<0,05) η οποία ήταν χαμηλότερη στους ε2/3 σε σχέση με τους ε3/3 (p<0,01) και υψηλότερη στους ε3/4 + ε4/4.

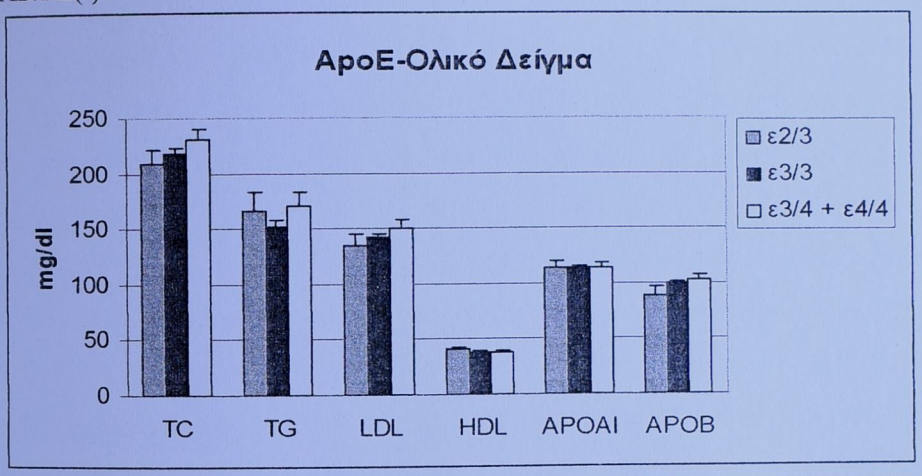
Τα αποτελέσματα ήταν ανάλογα όταν στην ανάλυση συνδιακύμανσης συμπεριλήφθηκαν το BMI και/ή το κάπνισμα.

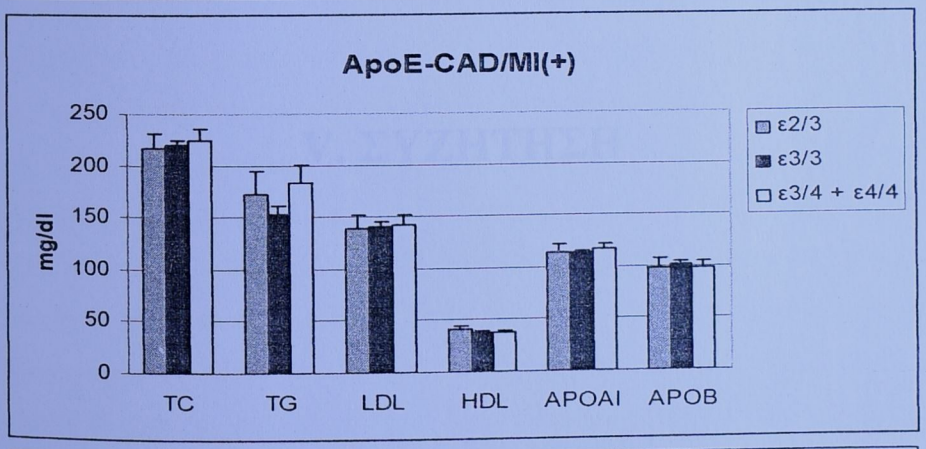
Πίνακας 9. Συσχέτιση του πολυμορφισμού στο γονίδιο της apoE με τα επίπεδα των λιπιδίων, λιποπρωτεϊνών και απολιποπρωτεϊνών του πλάσματος για το ολικό δείγμα και τις επιμέρους ομάδες MI(+), MI(-).

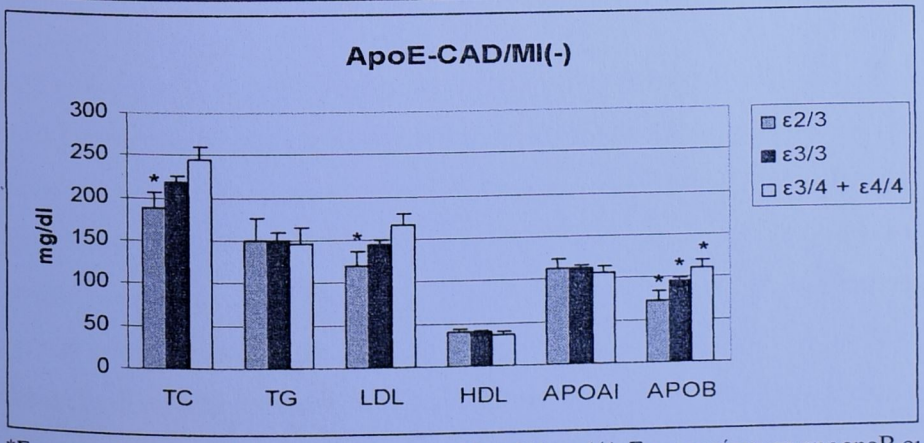
		Ολικό Δείγμα n (213)			*CAD/MI (+) n (148)*			*CAD/MI (-) n (65)*		
	ApoE ***Γονοτ.*** **	(n)	Μέσοι ± SE*	*P*	(n)	Μέσοι ± SE*	*P*	(n)	Μέσοι ± SE*	*P*
TC (mg/dl)	ε2/3	(18)	209,4 ± 12		(12)	216,2 ± 15		(6)	$188,8^{\beta}$ ± 19	
	ε3/3	(161)	219,0 ± 4,2	0,31	(113)	219,3 ± 5,1	0,89	(48)	219,3 ± 6,9	0,07
	ε3/4 + ε4/4	(34)	231,4 ± 9,1		(23)	224,5 ± 11		(11)	245,6 ± 14	
TG (mg/dl)	ε2/3		166,2 ± 18			171,9 ± 23			150,4 ± 26	
	ε3/3		152,5 ± 6,1	0,57		153,7 ± 7,7	0,40		149,7 ± 9,1	0,98
	ε3/4 + ε4/4		171,2 ± 13			184,2 ± 17			145,7 ± 19	
LDL (mg/dl)	ε2/3		134,4 ± 11			139,1 ± 13			$118,9 \pm 17^{\beta}$	
	ε3/3		141,8 ± 3,5	0,80		140,9 ± 4,2	0,98		144,5 ± 6,1	0,09
	ε3/4 + ε4/4		150,2 ± 7,7			142,4 ± 9,3			166,6 ± 12,9	
HDL (mg/dl)	ε2/3		40,9 ± 2,4			41,3 ± 2,9			39,6 ± 4,3	
	ε3/3		38,7 ± 0,8	0,47		38,3 ± 0,9	0,57		39,5 ± 1,5	0,68
	ε3/4 + ε4/4		37,6 ± 1,7			38,0 ± 2,1			36,6 ± 3,2	
TC/ HDL^{α}	ε2/3		$5,3 \pm 0,4^{\beta}$			5,5 ± 0,5			$4,8 \pm 0,7^{\gamma}$	
	ε3/3		5,9 ± 0,1	0,14		6,0 ± 0,2	0,60		$5,8 \pm 0,2^{\delta}$	**0,04**
	ε3/4 + ε4/4		6,3 ± 0,3			6,1 ± 0,4			6,9 ± 0,5	
APOAI (mg/dl)	ε2/3		113,9 ± 6,1			114,5 ± 7,5			112,5 ± 10	
	ε3/3		113,2 ± 2,0	0,95		113,6 ± 2,5	0,91		112,3 ± 3,6	0,85
	ε3/4 + ε4/4		113,4 ± 4,5			116,9 ± 5,6			106,5 ± 7,7	
APOB (mg/dl)	ε2/3		89,3 ± 7,2			97,8 ± 9,1			$71,7 \pm 11^{\varepsilon,\sigma\tau}$	
	ε3/3		99,0 ± 2,4	0,28		101,1 ± 3,0	0,87		94,2 ± 4,0	**0,02**
	ε3/4 + ε4/4		102,2 ± 5,2			97,8 ± 6,6			$111,0 \pm 8,4^{\zeta}$	

* Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέσες τιμές ± το τυπικό σφάλμα (SE) n αριθμού ατόμων.
Η ανάλυση έγινε χρησιμοποιώντας ως συμμεταβλητές την ηλικία και το φύλο των ατόμων.
**Ο γονότυπος ε2/4 δε συμπεριλήφθηκε στη στατιστική μελέτη (n=3).
$^{\alpha}$Η στατιστική έγινε σε λογαριθμημένες τιμές.
$^{\beta,\gamma,\delta,\varepsilon,}$ Στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με τους (ε3/4 + ε4/4).
$^{\zeta,\sigma\tau}$ Στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με τους ε3/3
$^{\beta}p<0,05$, $^{\gamma}p=0,01$, $^{\delta}p=0,058$ $^{\varepsilon}p<0,01$, $^{\sigma\tau}p=0,076$, $^{\zeta}p=0,065$.

Διάγραμμα 5. Διαγραμματική απεικόνιση της συσχέτισης του πολυμορφισμού στο γονίδιο της apoE με τα επίπεδα των λιπιδίων, λιποπρωτεϊνών και απολιποπρωτεϊνών του πλάσματος για το ολικό δείγμα και τις επιμέρους ομάδες CAD/MI(+) και CAD/MI(-).







*Στατιστικά σημαντική διαφορά από την ομάδα ε3/4 + ε4/4. Στην περίπτωση της apoB οι τρεις αστερίσκοι σημαίνουν ότι και οι τρεις ομάδες διαφέρουν μεταξύ τους.

V. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στην έρευνα αυτή εξετάσαμε την επίδραση πολυμορφισμών στα γονίδια της CETP, LPL, και apoE στο λιπιδαιμικό προφίλ ενός ελληνικού πληθυσμού καρδιοπαθών με έμφραγμα ή μη του μυοκαρδίου. Συγκεκριμένα, οι πολυμορφισμοί που μελετήθηκαν ήταν οι πολυμορφισμοί Taq1B και I405V στο γονιδίο της CETP, οι πολυμορφισμοί *Hind*III και S447X στο γονίδιο της LPL και τέλος ο κοινός πολυμορφισμός του γονιδίου της apoE. Σκοπός της έρευνας ήταν, πέρα από τη μελέτη της συσχέτισης των πολυμορφισμών με το λιπιδαιμικό προφίλ των ασθενών που πάσχουν από στεφανιαία νόσο στο ολικό δείγμα, να εξετάσουμε αν μεταξύ των ασθενών με έμφραγμα του μυοκαρδίου CAD/MI(+) και αυτών που δεν είχαν υποστεί έμφραγμα CAD/MI(-) υπήρχαν διαφορές στην κατανομή γονοτύπων και συχνότητα αλληλομόρφων ή διαφορές στην επίδραση στα λιπίδια πλάσματος. Διαφορές που πιθανόν διαμορφώνουν επιβαρυντικό γενετικό υπόβαθρο στους καρδιοπαθείς ασθενείς και εμπλέκονται στην εμφάνιση εμφράγματος του μυοκαρδίου. Η σχέση όλων των υπό εξέταση πολυμορφισμών με την αθηροσκλήρωση έχει διερευνηθεί εκτεταμένα. Αντικείμενο πολλών ερευνών αποτελεί η συσχέτιση των πολυμορφισμών με τα λιπίδια πλάσματος και την καρδιακή νόσο σε υγιείς και ασθενείς πληθυσμούς (33, 34, 44-50, 65-79, 104-113). Συγκεκριμένα, για τους πολυμορφισμούς Taq1B και I405V, που σχετίζονται με τα επίπεδα της HDL, βρέθηκε συσχέτιση του B2 και του V αλληλομόρφου με ελαττωμένο κίνδυνο για στεφανιάια νόσο ή αθηροσκλήρωση (12, 66-70, 73, 77, 154). Παράλληλα, για τα σπάνια X και H(-) αλληλόμορφα των πολυμορφισμών S447X και *Hind*III αντίστοιχα, που σχετίζονται με ευνοϊκότερο λιπιδαιμικό προφίλ, έχει βρεθεί συσχέτιση με μικρότερο κίνδυνο καρδιοπαθειών (22, 23, 105, 112, 155). Τέλος, το ε4 αλληλόμορφο, που σχετίζεται με δυσμενές λιπιδαιμικό προφίλ, συνδέεται με αυξημένο κίνδυνο αθηροσκλήρωσης, ενώ αντιφατικά είναι τα στοιχεία για το αλληλόμορφο ε2 (104-113). Ωστόσο, δεν υπάρχουν μελέτες που να συσχετίζουν τους πολυμορφισμούς με τον κίνδυνο εμφάνισης εμφράγματος του μυοκαρδίου σε καρδιοπαθείς ασθενείς.

1. ΣΥΧΝΟΤΗΤΕΣ ΑΛΛΗΛΟΜΟΡΦΩΝ

Οι συχνότητες των αλληλομόρφων στο δείγμα των καρδιοπαθών ήταν σε γενικές γραμμές συγκρίσιμες με αυτές που έχουν αναφερθεί για άλλους πληθυσμούς όσον αφορά τους πολυμορφισμούς στη CETP και την LPL (67, 68, 70, 76, 81, 105, 120, 121, 122).

Για παράδειγμα, όσον αφορά τον πολυμορφισμό Taq1B (Συχνότητα B1/B2: 59,3%/40,7% στο δικό μας δείγμα) σε έρευνα των Fumeron et al. τα αλληλόμορφα B1 και B2 παρουσίασαν συχνότητα 60% και 40% αντίστοιχα (66). Οι Arca et. al. βρήκαν συχνότητες 58% και 42% (128). Ενδεικτικά, επίσης, οι Kuivenhoven et al. (12) και οι Gudnason (21) et al ανέφεραν συχνότητες για B1/B2 αρκετά κοντινές σε αυτές της παρούσας έρευνας (59%/41% και 56%/44%). Για τον πολυμορφισμό I405V οι συχνότητες των αλληλομόρφων που παρουσιάστηκαν από άλλους ερευνητές είναι ανάλογες με τις δικές μας. Στο δικό μας δείγμα βρήκαμε συχνότητα 68,4% και 31,6% για τα αλληλόμορφα I και V αντίστοιχα. Αναφέρουμε χαρακτηριστικά δύο έρευνες, των Gudnason et al.(21) και των Kakko et al. (155) όπου οι συχνότητες των I/V αλληλομόρφων ήταν 62,8%/37,2% και 72%/28% αντίστοιχα.

Για τους πολυμορφισμούς στην LPL δε βρέθηκαν σημαντικά διαφορετικές συχνότητες για τα αλληλόμορφα των πολυμορφισμών S447X και *Hind*III σε σχέση με προηγούμενες μελέτες. Συγκεκριμένα, για τον S447X η συχνότητα των αλληλομόρφων S και X στο δείγμα μας ήταν 89,1% και 10,9% αντίστοιχα. Οι συχνότητες των αλληλομόρφων S και X, όπως παρουσιάστηκαν από τους Mc Gladdery et al. (120) και τους Razzaghi et al. (81), ήταν 86,7% και 13,3% καθώς και 90% με 10% αντίστοιχα. Αντιστοιχία με άλλους πληθυσμούς υπήρξε και και για τον *Hind*III πολυμορφισμό όσον αφορά τη συχνότητα αλληλομόρφων. Συγκεκριμένα, εμείς βρήκαμε συχνότητα 69,5% και 30,5% για τα αλληλόμορφα H(+) και H(-) αντίστοιχα. Οι Razzaghi et al. (81), σε πληθυσμούς Ισπανών και μη Ισπανών λευκών (non-Hispanic Whites) ανέφεραν για τα H(+) και H(-) αλληλόμορφα συχνότητες 75% προς 25% και 79% προς 21% αντίστοιχα για τους δύο πληθυσμούς. Οι Anderson et al. βρήκαν 73,7% συχνότητα για το H(+) και 26,3% για το H(-) αλληλόμορφο σε

δείγμα καρδιοπαθών ενώ σε ομάδα ελέγχου η συχνότητα, που δε διέφερε, ήταν 71,4% και 28,6% αντίστοιχα (122).

Για τον πολυμορφισμό της apoE είναι γνωστό ότι το ε3 είναι το συχνό αλληλόμορφο ενώ το τα ε2/ε4 εμφανίζουν σαφώς χαμηλότερη συχνότητα στους πληθυσμούς. Έχει παρατηρηθεί αυξημένη συχνότητα του ε4 αλληλομόρφου στη Βόρεια Ευρώπη ή οποία δείχνει να μειώνεται όσο κατεβαίνουμε προς τη Μεσόγειο (156). Στην έρευνά μας η συχνότητα του ε4 αλληλομόρφου (9,3%) βρίσκεται σε αναλογία με άλλους μεσογειακούς πληθυσμούς (Ισπανοί: 12,7%, Ιταλοί: 9,4%) (125, 126) γεγονός που επιβεβαιώνει τη χαμηλότερη εμφάνιση του ε4 αλληλομόρφου στους πληθυσμούς της Νότιας Ευρώπης (125, 126) ακόμα και αν πρόκειται για πληθυσμό καρδιοπαθών. Ανάλογα αποτελέσματα με τα δικά μας σε πληθυσμό καρδιοπαθών για τον ελληνικό πληθυσμό υπήρχαν σε μελέτη, όπου σε δείγμα 267 καρδιοπαθών ασθενών οι συχνότητες για τα ε2/ε3/ε4 αλληλόμορφα ήταν 3,9%/85,8%/10,3% (123). Οι τιμές αυτές προσεγγίζουν τις δικές μας οι οποίες ήταν 4,9%/85,9%/9,3% αντίστοιχα.

Σε διάφορες μελέτες ως τώρα έχει διερευνηθεί η συχνότητα των αλληλομόρφων για τους πολυμορφισμούς που εξετάζουμε σε πληθυσμούς καρδιοπαθών ή ατόμων με έμφραγμα του μυοκαρδίου. Στις έρευνες αυτές γίνεται σύγκριση της συχνότητας των αλληλομόρφων με τη συχνότητα υγιών πληθυσμών που αποτελούν τις ομάδες ελέγχου (control group). Για τον πολυμορφισμό Taq1B Οι Fumeron et al.(66), Arca et al. (128), Kuivenhoven et al.(12) και Gudnason et al. (21) δε βρήκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στη συχνότητα των αλληλομόρφων μεταξύ των ομάδων με καρδιακή νόσο και των υγιών. Αντίστοιχα για τον I405V πολυμορφισμό δεν υπήρχαν διαφορές μεταξύ του πληθυσμού των ασθενών και υγιών όσον αφορά τη συχνότητα των αλληλομόρφων (21, 155). Σε μια έρευνα για τον πολυμορφισμό S447X δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στις συχνότητες των αλληλομόρφων μετάξυ τριών διαφορετικών πληθυσμιακών ομάδων: υγιών, καρδιοπαθών και καρδιοπαθών με έμφραγμα του μυοκαρδίου (157). Οι Peacock et al. (105) καθώς και οι Anderson et al. (122) κατά τη μελέτη του

πολυμορφισμού *Hind*III σύγκριναν άτομα με στεφανιαία νόσο με υγιή άτομα. Μεταξύ των δύο ομάδων καμία διαφορά δεν προέκυψε στη συχνότητα των αλληλομόρφων, ενώ ίδιο αποτέλεσμα βρήκε και ο Holmer ο οποίος σύγκρινε καρδιοπαθείς εμφραγματίες με υγιείς (121). Όσον αφορά τον πολυμορφισμό της apoE η συχνότητα του ε4 αλληλομόρφου ήταν σημαντικά υψηλότερη σε άντρες έκαναν αγγειοπλαστική σε σχέση με υγιή άτομα (158). Σε ηλικιωμένους Φινλανδούς άντρες, η συχνότητα του ε4 αλληλομόρφου ήταν σημαντικά υψηλότερη σε άντρες που είχαν πεθάνει λόγω θανάσιμου εμφράγματος σε σχέση με τους επιζώντες (50). Στην έρευνα που έγινε σε ελληνικό πληθυσμό καρδιοπαθών η κατανομή του ε4 αλληλομόρφου δεν ήταν διαφορετική μεταξύ καρδιοπαθών ασθενών με ή χωρίς έμφραγμα του μυοκαρδίου. Η παρουσία ωστόσο του ε2 αλληλομόρφου ήταν σημαντικά χαμηλότερη στην ομάδα CAD/MI(+)(123).

Ένας από τους σκοπούς της δικής μας μελέτης ήταν να διερευνήσουμε αν υπάρχει διαφορά στη συχνότητα των αλληλομόρφων μεταξύ των καρδιοπαθών με ή χωρίς έμφραγμα του μυοκαρδίου. Τα στοιχεία από τη βιβλιογραφία για τέτοιες συσχετίσεις είναι ελάχιστα. Για όλους τους πολυμορφισμούς που μελετήσαμε δε βρέθηκαν σημαντικές διαφορές στην κατανομή των γονοτύπων και στη συχνότητα των αλληλομόρφων μεταξύ των ασθενών των δύο υποομάδων CAD/MI(+) και CAD/MI(-). Τόσο οι πολυμορφισμοί στο γονίδιο της CETP, της LPL και της apoE δε βρέθηκε να παρουσιάζουν διαφορετική κατανομή των αλληλοομόρφων στις δύο πληθυσμιακές ομάδες της μελέτης. Συμπεραίνουμε, λοιπόν, ότι η εμφάνιση εμφράγματος του μυοκαρδίου σε άτομα που ήδη πάσχουν από καρδιοπάθειες δε δείχνει να σχετίζεται με την ευρύτερη παρουσία επιβαρυντικών αλληλομόρφων στους ασθενείς CAD/MI(+), που προέρχονται από τους πολυμορφισμούς Taq1B/I405V του γονιδίου της CETP, S447X/*Hind*III του γονιδίου της LPL και τον κοινό πολυμορφισμό της apoE.

2. ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΙ ΣΤΟ ΓΟΝΙΔΙΟ ΤΗΣ CETP

Ο ρόλος της CETP στην αθηρογένεση είναι ακόμα αμφιλεγόμενος (14,127)

Η CETP μπορεί να έχει έναν προαθηρογόνο ρόλο, λόγω του γεγονότος ότι μεσολαβεί για την ανακατανομή της χοληστερόλης του πλάσματος από λιποπρωτεΐνες σε προαθηρογόνες λιποπρωτεΐνες που περιέχουν apoB. Το γεγονός ότι ζώα, που είναι ανθεκτικά στην ανάπτυξη αθηροσκλήρωσης κάτω από αθηρογόνο δίαιτα, έχουν χαμηλή δραστικότητα CETP υποστηρίζει την παραπάνω σκέψη (70). Παράλληλα, όμως, η CETP μεσολαβεί για ένα από τα στάδια της αντίστροφης μεταφοράς χοληστερόλης, που αποτελεί αντιαθηρογόνο διαδικασία. Δεδομένου των αλληλοσυγκρουόμενων αποτελεσμάτων από προηγούμενες έρευνες (66, 68, 70) είναι λογικό να θεωρηθεί ότι η συμβολή της CETP στην αθηρογένεση εξαρτάται από το μεταβολικό περιβάλλον που διαμορφώνει καθώς και από την παρουσία άλλων παραγόντων κινδύνου (128). Στην παρούσα έρευνα, εξετάσαμε τη συσχέτιση δύο κοινών πολυμορφισμών του γονιδίου της CETP, του Taq1B πολυμορφισμού στο εσώνιο 1 και του I405V πολυμορφισμού στο εξώνιο 14 με τα επίπεδα των λιπιδαιμικών παραμέτρων σε δείγμα καρδιοπαθών αλλά και επιμέρους στις ομάδες CAD/MI(+)και CAD/MI(-). Σε διάφορες άλλες έρευνες έχει αναφερθεί η ύπαρξη συσχέτισης με την HDL λιποπρωτεΐνη. Συγκεκριμένα, το σπάνιο αλληλόμορφο και για τους δύο πολυμορφισμούς έχει σχετιστεί με υψηλότερα επίπεδα HDL και apoA-I και ελαττωμένη δραστικότητα της CETP (16, 18, 20, 21, 65, 67, 72, 76, 79). Επίσης, κάποιες άλλες έρευνες έχουν βρει σημαντικές συσχετίσεις και με την LDL ή τα επίπεδα των τριγλυκεριδίων (65, 67, 76). Ο μηχανισμός με τον οποίο ο πολυμορφισμός Taq1B μπορεί να επηρεάζει τη δραστικότητα της CETP και τα επίπεδα της HDL δεν είναι γνωστός. Λόγω του γεγονότος ότι εντοπίζεται σε περιοχή εσωνίου, το πιο πιθανό είναι ότι δεν αντιπροσωπεύει λειτουργική μετάλλαξη στην ώριμη πρωτεΐνη. Η πιο εύλογη εξήγηση για την τυχόν συσχέτιση είναι ότι βρίσκεται σε ανισσοροπία σύνδεσης με κάποια άγνωστη ακόμα λειτουργική μετάλλαξη στη ρυθμιστική περιοχή του γονιδίου της CETP (70, 129).

Αντίστοιχη θεώρηση θα μπορούσε να γίνει και στην περίπτωση του I405V πολυμορφισμού, καθώς, όπως η ισολευκίνη, έτσι και η βαλίνη είναι αλιφατικό, υδρόφοβο αμινοξύ, άρα η αλλαγή δε συνιστά άμεσα λειτουργική διαφοροποίηση στην παραγόμενη πρωτεΐνη (21).

Στη δική μας έρευνα δε βρέθηκε η αναμενόμενη συσχέτιση των πολυμορφισμών Taq1B και I405V με την HDL, την apoAI ή άλλες παραμέτρους τόσο στο ολικό δείγμα, αλλά και στους επιμέρους πληθυσμούς των CAD/MI(+) και CAD/MI(-) ασθενών. Όσον αφορά τον Taq1B πολυμορφισμό, η μη συσχέτιση με το λιπιδαιμικό προφίλ έχει εμφανιστεί και σε άλλες έρευνες. Έρευνες σε πληθυσμούς της Φινλανδία και της Σρι-Λάνκα δε βρήκαν συσχέτιση του Taq1B με τα επίπεδα της HDL (130, 131), ενώ και άλλοι ερευνητές έχουν αναφέρει την έλλειψη συσχέτισης Taq1B και HDL (132,133). Και για τον πολυμορφισμό I405V υπάρχουν έρευνες που δεν υποστηρίζουν τη σχέση του με την HDL ή κάποια άλλη παράμετρο του λιπιδαιμικού προφίλ (134, 135). Πιθανόν, η αυξημένη παρουσία παραγόντων στην έρευνά μας, που επηρεάζουν αρνητικά τα επίπεδα της HDL - κυρίως το αντρικό φύλο και τα υψηλά τριγλυκερίδια - να αμβλύνανε τη συνεισφορά των πολυμορφισμών της CETP στη διακύμανση των επιπέδων της HDL.

Μετά τον προσδιορισμό του αθηρωματικού δείκτη (TC/HDL) που εκφράζει τον κίνδυνο για στεφανιαία νόσο, βρήκαμε ότι οι ομοζυγώτες B2B2 παρουσιάζουν χαμηλότερες τιμές από τους ομοζυγώτες B1B1 στο ολικό δείγμα ενώ στον πληθυσμό των CAD/MI(+) ασθενών οι ομοζυγώτες για το B2 αλληλόμορφο είχαν οριακά χαμηλότερο λόγο και από τους ομοζυγώτες B1B1 και από τους ετεροζυγώτες B1B2. Είναι πολύ πιθανό, επίσης, ότι και στην ομάδα CAD/MI(-) δε βρήκαμε αντίστοιχα σημαντικές διαφορές λόγω του μικρού αριθμού των ατόμων της ομάδας αυτής. Έτσι, λοιπόν, αν και στην επιμέρους στατιστική ανάλυση για την ολική χοληστερόλη και την HDL δε βρήκαμε σημαντική διαφοροποίηση μεταξύ των γονοτυπικών ομάδων του πολυμορφισμού Taq1B (ίσως σε μεγαλύτερο δείγμα να ήταν εμφανείς οι διαφορές), οι διαφορές στον αθηρωματικό δείκτη δηλώνουν την ύπαρξη ευνοϊκότερου λιπιδαιμικού προφίλ στο σύνολο για τα άτομα που φέρουν

αποκλειστικά το B2 αλληλόμορφο. Το γεγονός ότι όλα τα άτομα της μελέτης είναι ήδη καρδιοπαθείς δεν αναιρεί την αξία του ευρήματος αφού ως γνωστόν η στεφανιαία νόσος είναι μια πολυπαραγοντική ασθένεια. Άρα μπορούμε να υποθέσουμε ότι στα ομόζυγα B2B2 άτομα η προστατευτική επίδραση του B2 αλληλομόρφου όσον αφορά την εμφάνιση καρδιοπάθειας (που διαπιστώθηκε μέσω του χαμηλότερου αθηρωματικού δείκτη) δεν ήταν αρκετή να αποτρέψει την πάθηση λόγω της ταυτόχρονης παρουσίας και άλλων παραγόντων κινδύνου που τελικά επικράτησαν.

3. ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΙ ΣΤΟ ΓΟΝΙΔΙΟ ΤΗΣ LPL

Σε ένα μεγάλο αριθμό προηγούμενων ερευνών έχουν προσδιοριστεί συσχετίσεις των πολυμορφισμών *Hind*III και S447X με τα λιπίδια και τις λιποπρωτεΐνες του πλάσματος. Το *Hind*III (+) αλληλόμορφο έχει συσχετιστεί με ελαττωμένη δραστικότητα της LPL, αυξημένα επίπεδα τριγλυκεριδίων και/ή ελαττωμένη HDL σε διάφορες (9, 100, 101, 104, 105, 136, 137, 138) αλλά όχι σε όλες (139, 140) τις έρευνες. Συσχέτιση με καρδιακή νόσο έχει βρεθεί επίσης σε αρκετές (100, 137, 138) αλλά σε όχι όλες (105, 140, 141) τις έρευνες. Καθώς ο πολυμορφισμός αυτός αφορά νουκλεοτιδική αλλαγή σε μη κωδικοποιούσα περιοχή του γονιδίου (εσώνιο), η δομή της ώριμης πρωτεΐνης δεν πρέπει να επηρεάζεται. Η ύπαρξή του ως παράγοντα κινδύνου πρέπει να οφείλεται σε ανισορροπία σύνδεσης με έναν ή περισσότερους κοντινούς γενετικούς τόπους (122). Ισχυρή ανισορροπία σύνδεσης έχει βρεθεί ότι υπάρχει με τον πολυμορφισμό S447X (22). Το σπάνιο αλληλόμορφο X έχει σχετιστεί με χαμηλότερα επίπεδα τριγλυκερίδίων, υψηλότερα επίπεδα HDL και αυξημένη δραστικότητα της LPL (79, 100, 109, 110). Υπάρχουν και οι ερευνητές που δεν έχουν βρει συσχετίσεις με το λιπιδαιμικό προφίλ για τη μετάλλαξη αυτή (100, 105). Ο μηχανισμός επίδρασης στα λιπίδια δεν έχει αποσαφηνιστεί ακόμα.

Στη δική μας έρευνα δεν μπορέσαμε να δείξουμε ότι υπάρχει συσχέτιση μεταξύ των πολυμορφισμών *Hind*III και S447X και της HDL ή των

τριγλυκεριδίων. Το εύρημα αυτό ισχύει για το ολικό δείγμα και τις επιμέρους ομάδες των CAD/MI(+) και CAD/MI(-) ασθενών.

Τα αντιφατικά αποτελέσματα στους διάφορους εξεταζόμενους πληθυσμούς μπορεί να οφείλονται σε εθνικές διαφοροποιήσεις. Για παράδειγμα, το διαιτητικό λίπος, το οποίο διαφέρει σημαντικά μεταξύ των εθνικών ομάδων, τροποποιεί τη γενετική επίδραση του πολυμορφισμού *Hind*III στα επίπεδα των λιπιδίων. Ο γονότυπος H+/+ φαίνεται ότι σχετίζεται με καλή απόκριση των επιπέδων των λιπιδίων στη δίαιτα (142, 143). Άρα, σε έναν πληθυσμό με χαμηλή πρόσληψη λίπους, η συσχέτιση του γονότυπου H+/+ με μη ευνοϊκό λιπιδαιμικό προφίλ και προδιάθεση για στεφανιαία νόσο μπορεί να μην είναι εμφανής (121).

Ιδιαίτερα όσον αφορά τον πολυμορφισμό *Hind*III, οι Larson et. al (101), που δε βρήκαν συσχετίσεις με τα τριγλυκερίδια και την HDL παρά μόνο με την LDL [αύξηση κατά την πορεία H(-/-)→H(-/+)→H(-/-)], υπέθεσαν το εξής: αφού ο πολυμορφισμός αυτός έχει συνδεθεί με χαμηλή δραστικότητα της LPL, οι φορείς του H(+) αλληλομόρφου έχουν χαμηλή μεν δραστικότητα του ενζύμου, αρκετή δε για την αποτελεσματική υδρόλυση των τριγλυκεριδίων. Ωστόσο, η δραστικότητα αυτή δεν ήταν αρκετά υψηλή για να διευκολύνει την αποτελεσματική πρόσληψη των υπολειμμάτων, οδηγώντας σε αυξημένη συγκέντρωση LDL. Παράλληλα, οι Miesenboeck et al. έδειξαν ότι η έλλειψη της LPL οδηγεί σε αύξηση των μικρών και πυκνών μορίων LDL, γεγονός που μπορεί να μειώνει τη συγγένεια των μορίων αυτών στον υποδοχέα LDL, εξηγώντας έτσι τις υψηλότερες συγκεντρώσεις LDL χοληστερόλης (144). Η εκδοχή αυτή πιθανόν να εξηγεί τα σημαντικά αυξημένα επίπεδα απολιποπρωτεΐνης apoB στους φορείς του H(+) αλληλομόρφου στους εμφραγματίες CAD/MI(+) της μελέτης μας. Τα αυξημένα επίπεδα της apoB [που βρέθηκαν και στους ετεροζυγώτες H(-/+) σε σχέση με τους H(-/-) για το ολικό δείγμα] είναι πιθανό να αντικατοπτρίζουν αυξημένα επίπεδα LDL στους φορείς του H(+) αλληλομόρφου, όπου ο μικρός αριθμός δείγματος ή άλλοι απροσδιόριστοι λόγοι δεν επέτρεψαν να φανεί διαφορά μεταξύ των γονοτύπων στη συγκέντρωση της LDL. Άλλωστε, η αλληλεπίδραση των LPL και apoB σε

επίπεδο σύνδεσης LDL - επιφάνειας κυττάρων δεν είναι σημαντική (145), άρα έμμεσα μόνο θα μπορούσαν να επηρεαστούν τα επίπεδα της apoB από τον πολυμορφισμό *Hind*III.

Η διαφορά, τέλος, στα επίπεδα της apoAI μεταξύ ετεροζυγωτών και ομοζυγωτών H(-/-) στους ασθενείς CAD/MI(+) είναι πιθανότατα ένα τυχαίο γεγονός.

4. ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΣ ΣΤΟ ΓΟΝΙΔΙΟ ΤΗΣ apoE

Είναι γνωστό ότι ο πολυμορφισμός στο γονίδιο της apoE παίζει σημαντικό ρόλο στο μεταβολισμό των λιποπρωτεϊνών επηρεάζοντας τα επίπεδα των λιπιδίων του πλάσματος. Συγκεκριμένα η παρουσία του αλληλομόρφου ε2 σχετίζεται με μειωμένα επίπεδα ολικής και LDL χοληστερόλης ενώ το αντίθετο ισχύει για το ε4 αλληλόμορφο (32-43). Συσχετίσεις έχουν βρεθεί και για την HDL όπως και για τα τριγλυκερίδια χωρίς όμως να είναι συνεπείς όλες οι έρευνες σε αυτό. Σε ένα μεγάλο αριθμό ερευνών έχει βρεθεί συσχέτιση μεταξύ του πολυμορφισμού της apoE και της στεφανιαίας νόσου (33, 34, 44-50). Μεταβολικές έρευνες έχουν δείξει ελαττωμένο καταβολισμό των μορίων της LDL στους φορείς του ε4 αλληλομόρφου, ενώ ο πολυμορφισμός της apoE θεωρείται ότι επηρεάζει τη δραστικότητα του ηπατικού υποδοχέα της LDL (4). Παράλληλα, έχει αναφερθεί ότι η απορρόφηση της χοληστερόλης επηρεάζεται από τον εν λόγω πολυμορφισμό, με το ε2 αλληλόμορφο να σχετίζεται με τη χαμηλότερη απορρόφηση και το ε4 με τη μεγαλύτερη (147). Βέβαια, αυτό εξαρτάται και από τη συνολική πρόσληψη χοληστερόλης από τη διατροφή ενώ η διακύμανση του γονιδίου της apoE έχει δειχθεί ότι επηρεάζει την ανταπόκριση στη διατροφική παρέμβαση (146, 148-150).

Στο δικό μας δείγμα, η αναμενόμενη διακύμανση της ολικής και LDL χοληστερόλης μεταξύ των γονοτύπων της apoE δεν εμφανίστηκε στο συνολικό δείγμα και τους CAD/MI(+) ασθενείς αλλά ίσως σε μεγαλύτερο δείγμα να ήταν ευδιάκριτες οι διαφορές. Είναι πολύ πιθανό, επίσης, οι καρδιοπαθείς και

κυρίως οι ασθενείς που έχουν υποστεί έμφραγμα να προέβησαν σε σαφή περιορισμό της πρόσληψης λίπους. Ο περιορισμός αυτός ίσως να ήταν σε θέση να εμποδίσει το γονότυπο της apoE να επηρεάσει τα επίπεδα των λιπιδίων. Άλλωστε, η εθνική καταγωγή (που υποδηλώνει τη σημασία και άλλων γενετικών παραγόντων) και ο τρόπος ζωής (συμπεριλαμβανομένου της διατροφής) είναι παράγοντες που μπορούν είτε να καλύψουν είτε να αναδείξουν την επίδραση του γονότυπου της apoE (33). Μια άλλη πιθανή εξήγηση είναι ότι οι φορείς του ε4 αλληλόμορφου, που, λόγω πρόσθετων παραγόντων, ήταν πιο πιθανό να έχουν υψηλότερα επίπεδα LDL, μπορεί να απεβίωσαν. Έτσι, οι φορείς του ε4 στη μελέτη μας μπορεί να αντιπροσωπεύουν μια υποομάδα επιζώντων που είναι ανθεκτικοί στην επίδραση της apoE4. Επιπρόσθετα, οι ασθενείς της μελέτης μας είναι ούτως ή άλλως άτομα που έχουν υψηλά επίπεδα χοληστερόλης. Σε άτομα φυσιολογικών επιπέδων λιπιδίων (νορμολιπιδαιμικά) οι διαφορές στην apoE είναι πιο εμφανείς.

Στην πληθυσμιακή ομάδα των CAD/MI(-) ασθενών ήταν εμφανής η τάση συσχέτισης χοληστερόλης/LDL και πολυμορφισμού ενώ υπήρχαν σημαντικές διαφορές μεταξύ των γονοτυπικών ομάδων ε2/2 και (ε3/4 + ε4/4). Ενώ σε καμία ομάδα δεν υπήρξε συσχέτιση του γονότυπου της apoE με την HDL, όταν προσδιορίστηκε ο αθηρωματικός δείκτης, στην ομάδα των CAD/MI(-) ασθενών το ε4 αλληλόμορφο σχετίστηκε με λιπιδαιμικό προφίλ υψηλότερου κινδύνου από τους ομοζυγώτες ε3/3 και τους ετεροζυγώτες ε2/3 όπου ο λόγος TC/HDL ήταν ο μικρότερος τόσο στους CAD/MI(-) όσο και στο ολικό δείγμα. Είναι, πάντως, χαρακτηριστικό ότι οι ομοζυγώτες ε4/4 είχαν τις υψηλότερες τιμές ολικής και LDL χοληστερόλης γεγονός που επιβεβαιώνει την πολύ ισχυρή γενετική προδιάθεση για την εμφάνιση καρδιοπάθειας στα άτομα που έχουν σε ομοζυγωτία το επιβαρυντικό ε4 αλληλόμορφο.

Τα τριγλυκερίδια δεν παρουσίασαν διαφορές μεταξύ των γονοτυπικών ομάδων για το ολικό δείγμα και τις δύο υποομάδες των καρδιοπαθών. Τα αλληλόμορφα ε2 και ε4 έχουν σχετιστεί με υπερτριγλυκεριδαιμία σε προηγούμενες έρευνες (151). Στο συγκεκριμένο δείγμα είναι πιθανό τα

αυξημένα τριγλυκερίδια που παρουσίασαν και οι ομοζυγώτες ε3/3 να μην επέτρεψαν να φανεί η «αυξητική» επίδραση των δύο σπάνιων αλληλομόρφων.

Τέλος, στις απολιποπρωτεΐνες, δεν υπάρχει καμία συσχέτιση με την apoAI ενώ όσον αφορά την apoB, η ισχυρή συσχέτιση που υπάρχει με το γονότυπο της apoE στην ομάδα CAD/MI(-) είναι αναμενόμενη καθώς η apoE επηρεάζει παράλληλα και την ολική χοληστερόλη/LDL σημαντικά. Όπως, έχουν δείξει και άλλες έρευνες η apoE επηρεάζει παράλληλα και κατ' αναλογία τις ολική χοληστερόλη/LDL και apoB (152, 153).

Συμπερασματικά, στο ολικό δείγμα των καρδιοπαθών δεν υπάρχει συσχέτιση του ε4 αλληλόμορφου με πιο αθηρογόνο λιπιδαιμικό προφίλ. Η τάση για δυσμενές λιπιδαιμικό προφίλ στους φορείς του αλληλομόρφου αυτού φαίνεται μόνο στους ασθενείς CAD/MI(-). Το γεγονός αυτό σε συνδυασμό με το ότι δεν υπήρχε αυξημένη εμφάνιση του ε4 στους καρδιοπαθείς CAD/MI(+) οδηγεί στο συμπέρασμα ότι το ε4 αλληλόμορφο δε σχετίζεται με το έμφραγμα του μυοκαρδίου. Αν στη μελέτη μας συμπεριλαμβάναμε και ομάδα ελέγχου, θα μπορούσαμε πιθανόν να συσχετίσουμε τον πολυμορφισμό της apoE με την καρδιοπάθεια, αν και στην έρευνά μας εστιάσαμε στις διαφορές μεταξύ εμφραγματιών και μη.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑ

Συνολικά, η συσχέτιση των πολυμορφισμών στα γονίδια των CETP, LPL και apoE με το λιπιδαιμικό προφίλ στο δείγμα των καρδιοπαθών της μελέτης, αλλά και επιμέρους στις υποομάδες των εμφραγματιών και μη, δεν οδήγησε στην εύρεση στατιστικά σημαντικών διαφορών στις λιπιδαιμικές παραμέτρους μεταξύ των γονοτυπικών ομάδων. Συσχέτιση των πολυμορφισμών με την εμφάνιση εμφράγματος του μυοκαρδίου δεν βρέθηκε επίσης. Ίσως, σε μεγαλύτερο δείγμα ατόμων οι τάσεις συσχέτισης που παρατηρήθηκαν στις αναλύσεις μας να οδηγήσουν σε στατιστικά σημαντικές διαφορές. Επίσης, η σύγκριση με έναν πληθυσμό ελέγχου πιθανότατα θα δώσει πολλά χρήσιμα συμπεράσματα για τη σχέση πολυμορφισμών και καρδιακής νόσου. Περαιτέρω έρευνες απαιτούνται, λοιπόν, για να διευκρινιστεί η επίδραση των πολυμορφισμών της μελέτης μας στο λιπιδαιμικό προφίλ και τον κίνδυνο εμφάνισης εμφράγματος του μυοκαρδίου.

VI. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Cheng S, Grow MA, Pallaud C, Klitz W, Erlich HA, Visvikis S, Chen JJ, Pullinger CR, Malloy MJ, Siest G, Kane JP. A multilocus genotyping assay for candidate markers of cardiovascular disease risk. Genome Res. 1999 Oct;9(10):936-49.
2. Friedlander Y, Leitersdorf E, Vecsler R, Funke H, Kark J. The contribution of candidate genes to the response of plasma lipids and lipoproteins to dietary challenge. Atherosclerosis. 2000 Sep;152(1):239-48.
3. Kee F, Young IS, Poirier O, McMaster D, McCrum E, McGeough J, Patterson CC, Dallongeville J, Cambien F, Evans AE. Do polymorphisms of apoB, LPL or apoE affect the hypocholesterolemic response to weight loss? Atherosclerosis. 2000 Nov;153(1):119-28.
4. Davignon J, Gregg RE, Sing CF. Apolipoprotein E polymorphism and atherosclerosis. Arteriosclerosis. 1988 Jan-Feb;8(1):1-21.
5. Mahley RW, Rall SC Jr. Apolipoprotein E: far more than a lipid transport protein. Annu Rev Genomics Hum Genet 2000;1:507-37.
6. Smith JD. Apolipoprotein E4: an allele associated with many diseases. Ann Med 2000 Mar;32(2):118-27
7. Sing CF, Davignon J. Role of the apolipoprotein E polymorphism in determining normal plasma lipid and lipoprotein variation. Am J Hum Genet. 1985 Mar;37(2):268-85.
8. Kamboh MI, Aston CE, Ferrell RE, Hamman RF. Impact of apolipoprotein E polymorphism in determining interindividual variation in total cholesterol and low density lipoprotein cholesterol in Hispanics and non-Hispanic whites. Atherosclerosis. 1993 Jan 25;98(2):201-11.
9. Tall. A. Plasma Lipid Transfer Proteins. Annual Reviews of Biochemistry 1995; 64: 235-257.
10. Bruce C, Chouinard R, Tall A. Plasma lipid transfer proteins, high-density lipoproteins, and reverse cholesterol transport. Annual Reviews of Nutrition. 1998; 18: 297-330.
11. Hayek T, Chajek-Shaul T, Walsh A, Agellon LB, Moulin P, et al. An interaction between the human cholesteryl ester transfer protein (CETP) and apolipoprotein A-I genes in transgenic mice results in a profound CETP-mediated depression of high density lipoprotein cholesterol levels. Journal of Clinical Investigation. 1992; 90: 505-10.
12. Kuivenhoven JA, Jukema JW, Zwinderman AH, de Knijff P, McPherson R, Bruschke AV, Lie KI, Kastelein JJ. The role of a common variant of the cholesteryl ester transfer protein gene in the progression of coronary atherosclerosis. The Regression Growth Evaluation Statin Study Group. N Engl J Med. 1998 Jan 8;338(2):86-93.
13. Zhong S, Sharp DS, Grove JS, Bruce C, Yano K, Curb JD, Tall A. Increased coronary heart disease in Japanese-American men with mutation in the cholesteryl ester transfer protein gene despite increased HDL levels. Journal of Clinical Investigation. 1996; 97: 2917-2923.
14. Fielding CJ, Havel RJ. Cholesteryl ester transfer protein: friend or foe? J Clin Invest. 1996 Jun 15;97(12):2687-8.
15. Yamashita S, HuiDY, Sprecher DL, Matsuzawa Y, Sakai N, et al. Total deficiency of plasma cholesteryl ester transfer protein in subjects omozygous and heterozygous for the intron 14 splicing defect. Biochemical and Biophysical Res. Comm. 1990; 170:1346-1351.

16. Inazu A., Yiang XC, Haraki T, Yagi K, Kamon N, et al. Genetic cholesteryl ester transfer protein deficiency caused by two prevalent mutations as a major determinant of increased levels of high density lipoprotein cholesterol. Journal of Clinical Investigation. 1994; 94: 1872-1882.
17. Takahashi K, Jiang XC, Sakai N, Yamashita S, Hirano K, et al. A missence mutation in the cholesteryl ester transfer protein gene with possible dominant effects on plasma high density lipoproteins. Journal of Clinical Investigation. 1993; 92: 2060-2064.
18. Funke H, Wiebusch H, Fuer L, Muntoni S, Schulte H, Assmann G. Identification of mutations in the cholesteryl ester transfer protein in Europeans with elevated high density lipoprotein cholesterol. Circulation 1994; 90: I-241 (Abstr.).
19. Teh EM, Dolphin PJ, Breckenridge WC, Tan M. Human plasma CETP deficiency; identification of a novel mutation in exon 9 of the CETP gene in a Caucasian subject from North America. Journal of Lipid Research. 1998; 39: 442-456.
20. Mitchell RJ, Earl L, Williams J, Bisucci T, Gasiamis H. Polymorphisms of the gene coding for the cholesteryl ester transfer protein and plasma lipid levels in Italian and Greek migrants to Australia. Human Biology. 1994; 66: 13-25.
21. Gudnason V, Kakko S, Nicaud V, Savolainen MJ, Kesaniemi YA, Tahvanainen E, Humphries S. Cholesteryl ester transfer protein gene effect on CETP activity and plasma high-density lipoprotein in European populations. The EARS Group. European Journal of Clinical Investigation. 1999; 29(2): 116-128.
22. Humphries SE, Nicaud V, Margalef J, Tiret L, Talmud PJ.Lipoprotein lipase gene variation is associated with a paternal history of premature coronary artery disease and fasting and postprandial plasma triglycerides: the European Atherosclerosis Research Study (EARS). Arterioscler Thromb Vasc Biol. 1998 Apr;18(4):526-34.
23. Fisher RM, Humphries SE, Talmud PJ.Common variation in the lipoprotein lipase gene: effects on plasma lipids and risk of atherosclerosis. Atherosclerosis. 1997 Dec;135(2):145-59.
24. Chen W, Srinivasan SR, Elkasabany A, Ellsworth DL, Boerwinkle E, Berenson GS. Influence of lipoprotein lipase serine 447 stop polymorphism on tracking of triglycerides and HDL cholesterol from childhood to adulthood and familial risk of coronary artery disease: the Bogalusa heart study. Atherosclerosis. 2001 Dec;159(2):367-73.
25. Mahley RW. Apolipoprotein E: cholesterol transport protein with expanding role in cell biology. Science. 1988 Apr 29;240(4852):622-30.
26. Wilson C, Wardell MR, Weisgraber KH, Mahley RW, Agard DA. Three-dimensional structure of the LDL receptor-binding domain of human apolipoprotein E. Science. 1991 Jun 28;252(5014):1817-22.
27. Lalazar A, Weisgraber KH, Rall SC Jr, Giladi H, Innerarity TL, Levanon AZ, Boyles JK, Amit B, Gorecki M, Mahley RW, et al. Site-specific mutagenesis of human apolipoprotein E. Receptor binding activity of variants with single amino acid substitutions. J Biol Chem. 1988 Mar 15;263(8):3542-5.
28. Havel RJ, Kane JP. Primary dysbetalipoproteinemia: predominance of a specific apoprotein species in triglyceride-rich lipoproteins. Proc Natl Acad Sci U S A. 1973 Jul;70(7):2015-9.
29. Zeman F.J. Clinical Nutrition and Dietetics. 2/e 1991
30. Das HK, McPherson J, Bruns GA, Karathanasis SK, Breslow JL. Isolation, characterization, and mapping to chromosome 19 of the human apolipoprotein E gene. J Biol Chem. 1985 May 25;260(10):6240-7.

31. Rubin J, Berglund L. Apolipoprotein E and diets: a case of gene-nutrient interaction? Curr Opin Lipidol. 2002 Feb;13(1):25-32.
32. Sing CF, Davignon J. Role of the apolipoprotein E polymorphism in determining normal plasma lipid and lipoprotein variation. Am J Hum Genet. 1985 Mar;37(2):268-85.
33. de Knijff P, Havekes LM. Apolipoprotein E as a risk factor for coronary heart disease: a genetic and molecular biology approach. Curr Opin Lipidol. 1996 Apr;7(2):59-63.
34. Utermann G. Apolipoprotein E polymorphism in health and disease. Am Heart J. 1987 Feb;113(2 Pt 2):433-40.
35. Hallman DM, Boerwinkle E, Saha N, Sandholzer C, Menzel HJ, Csazar A, Utermann G. The apolipoprotein E polymorphism: a comparison of allele frequencies and effects in nine populations.Am J Hum Genet. 1991 Aug;49(2):338-49.
36. Howard BV, Gidding SS, Liu K. Association of apolipoprotein E phenotype with plasma lipoproteins in African-American and white young adults. The CARDIA Study. Coronary Artery Risk Development in Young Adults. Am J Epidemiol. 1998 Nov 1;148(9):859-68.
37. Kamboh MI, Aston CE, Ferrell RE, Hamman RF. Impact of apolipoprotein E polymorphism in determining interindividual variation in total cholesterol and low density lipoprotein cholesterol in Hispanics and non-Hispanic whites. Atherosclerosis. 1993 Jan 25;98(2):201-11.
38. Kao JT, Tsai KS, Chang CJ, Huang PC. The effects of apolipoprotein E polymorphism on the distribution of lipids and lipoproteins in the Chinese population. Atherosclerosis. 1995 Apr 7;114(1):55-9.
39. Muros M, Rodriguez-Ferrer C. Apolipoprotein E polymorphism influence on lipids, apolipoproteins and Lp(a) in a Spanish population underexpressing apo E4. Atherosclerosis. 1996 Mar;121(1):13-21.
40. Lehtimaki T, Moilanen T, Viikari J, Akerblom HK, Ehnholm C, Ronnemaa T, Marniemi J, Dahlen G, Nikkari T. Apolipoprotein E phenotypes in Finnish youths: a cross-sectional and 6-year follow-up study. J Lipid Res. 1990 Mar;31(3):487-95.
41. de Knijff P, van den Maagdenberg AM, Frants RR, Havekes LM. Genetic heterogeneity of apolipoprotein E and its influence on plasma lipid and lipoprotein levels. Hum Mutat. 1994;4(3):178-94.
42. Kamboh MI, Aston CE, Hamman RF. The relationship of APOE polymorphism and cholesterol levels in normoglycemic and diabetic subjects in a biethnic population from the San Luis Valley, Colorado. Atherosclerosis. 1995 Jan 20;112(2):145-59.
43. Schaefer EJ, Lamon-Fava S, Johnson S, Ordovas JM, Schaefer MM, Castelli WP, Wilson PW. Effects of gender and menopausal status on the association of apolipoprotein E phenotype with plasma lipoprotein levels. Results from the Framingham Offspring Study. Arterioscler Thromb. 1994 Jul;14(7):1105-13.
44. Luc G, Bard JM, Arveiler D, Evans A, Cambou JP, Bingham A, Amouyel P, Schaffer P, Ruidavets JB, Cambien F, et al. Impact of apolipoprotein E polymorphism on lipoproteins and risk of myocardial infarction. The ECTIM Study. Arterioscler Thromb. 1994 Sep;14(9):1412-9.
45. Tiret L, de Knijff P, Menzel HJ, Ehnholm C, Nicaud V, Havekes LM. ApoE polymorphism and predisposition to coronary heart disease in youths of different European populations. The EARS Study. European Atherosclerosis Research Study. Arterioscler Thromb. 1994 Oct;14(10):1617-24.

46. Hixson JE. Apolipoprotein E polymorphisms affect atherosclerosis in young males. Pathobiological Determinants of Atherosclerosis in Youth (PDAY) Research Group. Arterioscler Thromb. 1991 Sep-Oct;11(5):1237-44.
47. Lenzen HJ, Assmann G, Buchwalsky R, Schulte H. Association of apolipoprotein E polymorphism, low-density lipoprotein cholesterol, and coronary artery disease. Clin Chem. 1986 May;32(5):778-81.
48. Srinivasan SR, Ehnholm C, Wattigney WA, Bao W, Berenson GS. The relation of apolipoprotein E polymorphism to multiple cardiovascular risk in children: the Bogalusa Heart Study. Atherosclerosis. 1996 Jun;123(1-2):33-42.
49. Wilson PW, Myers RH, Larson MG, Ordovas JM, Wolf PA, Schaefer EJ. Apolipoprotein E alleles, dyslipidemia, and coronary heart disease. The Framingham Offspring Study. JAMA. 1994 Dec 7;272(21):1666-71.
50. Stengard JH, Zerba KE, Pekkanen J, Ehnholm C, Nissinen A, Sing CF. Apolipoprotein E polymorphism predicts death from coronary heart disease in a longitudinal study of elderly Finnish men. Circulation. 1995 Jan 15;91(2):265-9.
51. Tall. A. Plasma Lipid Transfer Proteins. Annual Reviews of Biochemistry 1995; 64: 235-257.
52. Hirano K-I, Yamashita S, Matsuzawa Y. Pros and cons of inhibiting cholesteryl ester transfer protein. Current Opinion in Lipidology. 2000; 11: 589-596.
53. Yamashita S, Hirano K-I, Sakai N, Matsuzawa Y. Molecular biology and pathophysiological aspects of plasma cholesteryl ester transfer protein. Biochimica et Biophysica Acta. 2000; 1529: 257-275.
54. Bruce C, Chouinard R, Tall A. Plasma lipid transfer proteins, high-density lipoproteins, and reverse cholesterol transport. Annual Reviews of Nutrition. 1998; 18: 297-330.
55. Acton S, Rigotti A, Landschulz KT, Xu S, Hobbs HH, Krieger M. Identification of scavenger receptor SR-BI as a high density lipoprotein receptor. Science 1996; 271: 518-520.
56. Yamashita S, Maruyama T, Hirano K-I, Sakai N, Nakajima N, Matsuzawa Y. Molecular mechanisms, lipoprotein abnormalities and atherogenicity of hyperalphalipoproteinemia. Atherosclerosis. 2000; 152: 271-285.
57. Connolly DT, McIntyre J, Heuvelman D, Remsen EE, McKinnie RE, et al. Physical and kinetic characterization of recombinant human cholesteryl ester transfer protein. Biochemistry Journal. 1996; 320:39-47.
58. Weinberg R, Cook VR, Jones JB, Kussie P, Tall A. Journal of Biological Chemistry. 1994; 269: 29588-29591.
59. Morton RE, Steinbrunner JV. Journal of Lipid Research. 1990; 31: 1559-1567.
60. Chiba H, Akita H, Tsuchihashi K, Hui SP, Takahashi Y, Fuda H, Suzuki H, Shibuya, Tsuji M, Kobayashi K. Quantitative and compositional changes in patients with various genotypes of cholesteryl ester transfer protein deficiency. Journal of Lipid Research. 1997; 38: 1204-1216.
61. Inazu A., Yiang XC, Haraki T, Yagi K, Kamon N, et al. Genetic cholesteryl ester transfer protein deficiency caused by two prevalent mutations as a major determinant of increased levels of high density lipoprotein cholesterol. Journal of Clinical Investigation. 1994; 94: 1872-1882.
62. Sakai N, Yamashita S, Hirano K, Ishigami M, Arai T, et al. Decreased affinity of low density lipoprotein (LDL) particles for LDL receptors in patients with cholesteryl ester transfer protein deficiency. European Journal of Clinical Investigation. 1995; 25: 332-339.

63. Ikewaki K, Mnishiwaki M, Sakamoto T, Ishikawa T, Fairwell T, Zech LA, Nagano M, Nakamura H, Brewer Jr. HB, Rader DJ. Increased catabolic rate of low density lipoproteins in humans with cholesteryl ester transfer protein deficiency. Journal of Clinical Investigation. 1995; 96: 1573-1581.
64. Thompson GR, Barter PJ. Therapeutic approaches to reducing the LDL- and HDL- associated risks of coronary heart disease. Current Opinion in Lipidology. 2000; 11: 567-570.
65. Kondo I, Berg K, Drayna D, Lawn R. DNA polymorphism at the locus for human cholesteryl ester transfer protein (CETP) is associated with high density lipoprotein cholesterol and apolipoprotein levels. Clin Genet. 1989 Jan;35(1):49-56.
66. Fumeron F, Betoulle D, Luc G, Behague I, Ricard S, Poirier O, Jemaa R, Evans A, Arveiler D, Marques-Vidal P, et al. Alcohol intake modulates the effect of a polymorphism of the cholesteryl ester transfer protein gene on plasma high density lipoprotein and the risk of myocardial infarction. J Clin Invest. 1995 Sep;96(3):1664-71.
67. Kuivenhoven JA, Jukema JW, Zwinderman AH, de Knijff P, McPherson R, Bruschke AV, Lie KI, Kastelein JJ. The role of a common variant of the cholesteryl ester transfer protein gene in the progression of coronary atherosclerosis. The Regression Growth Evaluation Statin Study Group. N Engl J Med. 1998 Jan 8;338(2):86-93.
68. Durlach A, Clavel C, Girard-Globa A, Durlach V. Sex-dependent association of a genetic polymorphism of cholesteryl ester transfer protein with high-density lipoprotein cholesterol and macrovascular pathology in type II diabetic patients. J Clin Endocrinol Metab. 1999 Oct;84(10):3656-9.
69. Corella D, Saiz C, Guillen M, Portoles O, Mulet F, Gonzalez JI, Ordovas JM. Association of TaqIB polymorphism in the cholesteryl ester transfer protein gene with plasma lipid levels in a healthy Spanish population. Atherosclerosis. 2000 Oct;152(2):367-76.
70. Ordovas JM, Cupples LA, Corella D, Otvos JD, Osgood D, Martinez A, Lahoz C, Coltell O, Wilson PW, Schaefer EJ. Association of cholesteryl ester transfer protein-TaqIB polymorphism with variations in lipoprotein subclasses and coronary heart disease risk: the Framingham study. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2000 May;20(5):1323-9.
71. Barter PJ, Rye KA. Cholesteryl ester transfer protein, high density lipoprotein and arterial disease. Curr Opin Lipidol. 2001 Aug;12(4):377-82.
72. Bernard S, Moulin P, Lagrost L, Picard S, Elchebly M, Ponsin G, Chapuis F, Berthezene F. Association between plasma HDL-cholesterol concentration and Taq1B CETP gene polymorphism in non-insulin-dependent diabetes mellitus. J Lipid Res. 1998 Jan;39(1):59-65.
73. Inazu A, Koizumi J, Mabuchi H. Cholesteryl ester transfer protein and atherosclerosis. Curr Opin Lipidol. 2000 Aug;11(4):389-96.
74. Bruce C, Sharp DS, Tall A. Relationship of HDL and coronary heart disease to a common amino acid polymorhism in the cholesteryl ester transfer protein in men with and without hypertriglyceridemia. Journal of Lipid Research. 1998; 39: 1071-1078.
75. Hayek T, Masucci-Magoulas L, Jiang X, Walsh A, Rubin E, Breslow JL, Tall AR. Decreased early atherosclerotic lesions in hypertriglyceridemic mice expressing cholesteryl ester transfer protein transgene. J Clin Invest. 1995 Oct;96(4):2071-4.

76. Gudnason V, Kakko S, Nicaud V, Savolainen MJ, Kesaniemi YA, Tahvanainen E, Humphries S. Cholesteryl ester transfer protein gene effect on CETP activity and plasma high-density lipoprotein in European populations. The EARS Group. European Journal of Clinical Investigation. 1999; 29(2): 116-128.
77. Kakko S, Tamminen M, Paivansalo M, Kauma H, Rantala AO, Lilja M, Reunanen A, Kesaniemi YA, Savolainen MJ. Cholesterol ester transfer protein polymorphisms are associated with carotid atherosclerosis in men. European Journal of Clinical Investigation. 2000; 30: 18-25.
78. Agerholm-Larsen B, Nordestgaard BG, Steffensen R, Jensen G, Tybjaerg-Hansen A. Elevated HDL cholesterol is a risk factor for ischemic heart disease in white women when caused by a common mutation in the cholesteryl ester transfer protein gene. Circulation. 2000 Apr 25;101(16):1907-12.
79. Kuivenhoven JA, de Knijff P, Boer JM, Smalheer HA, Botma GJ, Seidell JC, Kastelein JJ, Pritchard PH. Heterogeneity at the CETP gene locus. Influence on plasma CETP concentrations and HDL cholesterol levels. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 1997 Mar;17(3):560-8.
80. Goldberg IJ. Lipoprotein lipase and lipolysis: central roles in lipoprotein metabolism and atherogenesis. J Lipid Res. 1996 Apr;37(4):693-707.
81. Razzaghi H, Aston CE, Hamman RF, Kamboh MI. Genetic screening of the lipoprotein lipase gene for mutations associated with high triglyceride/low HDL-cholesterol levels. Hum Genet. 2000 Sep;107(3):257-67.
82. Jansen H, Breedveld B, Schoonderwoerd K. Role of lipoprotein lipases in postprandial lipid metabolism. Atherosclerosis. 1998 Dec;141 Suppl 1:S31-4.
83. Hahn P. Abolishment of alimentary lipemia following injection of heparin. Science 1943 May;98:19-20.
84. Havel RJ, Gordon RS. Idiopathic hyperlipemia: metabolic studies in an affected family. J Clin Invest 1960;39:1777-1790.
85. Breckenridge WC, Little JA, Alaupovic P, Wang CS, Kuksis A, Kakis G, Lindgren F, Gardiner G. Lipoprotein abnormalities associated with a familial deficiency of hepatic lipase. Atherosclerosis. 1982 Nov;45(2):161-79.
86. Clark AB, Quarfordt SH. Apolipoprotein effects on the lipolysis of perfused triglyceride by heparin-immobilized milk lipase. J Biol Chem. 1985 Apr 25;260(8):4778-83.
87. Felts JM, Itakura H, Crane RT. The mechanism of assimilation of constituents of chylomicrons, very low density lipoproteins and remnants - a new theory. Biochem Biophys Res Commun. 1975 Oct 27;66(4):1467-75.
88. Beisiegel U, Weber W, Bengtsson-Olivecrona G. Lipoprotein lipase enhances the binding of chylomicrons to low density lipoprotein receptor-related protein. Proc Natl Acad Sci U S A. 1991 Oct 1;88(19):8342-6.
89. Argraves KM, Battey FD, MacCalman CD, McCrae KR, Gafvels M, Kozarsky KF, Chappell DA, Strauss JF 3rd, Strickland DK. The very low density lipoprotein receptor mediates the cellular catabolism of lipoprotein lipase and urokinase-plasminogen activator inhibitor type I complexes. J Biol Chem. 1995 Nov 3;270(44):26550-7.
90. Ginsberg HN. Lipoprotein metabolism and its relationship to atherosclerosis. Med Clin North Am. 1994 Jan;78(1):1-20.
91. Babirak SP, Brown BG, Brunzell JD. Familial combined hyperlipidemia and abnormal lipoprotein lipase. Arterioscler Thromb. 1992 Oct;12(10):1176-83.
92. Williams KJ, Petrie KA, Brocia RW, Swenson TL. Lipoprotein lipase modulates net secretory output of apolipoprotein B in vitro. A possible pathophysiologic

explanation for familial combined hyperlipidemia. J Clin Invest. 1991 Oct;88(4):1300-6.
93. Huff MW, Miller DB, Wilfe BM, Sawyez CG. Uptake of hypertriglyceridemia VLDL by HepG2 cells requires active lipoprotein and cell surface proteoglycans. Circulation 1994;90:I-289.
94. Tornvall P, Olivecrona G, Karpe F, Hamsten A, Olivecrona T. Lipoprotein lipase mass and activity in plasma and their increase after heparin are separate parameters with different relations to plasma lipoproteins. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 1995 Aug;15(8):1086-93.
95. Patsch JR, Prasad S, Gotto AM Jr, Patsch W. High density lipoprotein2. Relationship of the plasma levels of this lipoprotein species to its composition, to the magnitude of postprandial lipemia, and to the activities of lipoprotein lipase and hepatic lipase. J Clin Invest. 1987 Aug;80(2):341-7.
96. Karpe F, Bard JM, Steiner G, Carlson LA, Fruchart JC, Hamsten A. HDLs and alimentary lipemia. Studies in men with previous myocardial infarction at a young age. Arterioscler Thromb. 1993 Jan;13(1):11-22.
97. Cohen JC, Stray-Gundersen J, Grundy SM. Dissociation between postprandial lipemia and high density lipoprotein cholesterol concentrations in endurance-trained men. Arterioscler Thromb. 1991 Jul-Aug;11(4):838-43.
98. Sparkes RS, Zollman S, Klisak I, Kirchgessner TG, Komaromy MC, Mohandas T, Schotz MC, Lusis AJ. Human genes involved in lipolysis of plasma lipoproteins: mapping of loci for lipoprotein lipase to 8p22 and hepatic lipase to 15q21. Genomics. 1987 Oct;1(2):138-44.
99. Fisher RM, Humphries SE, Talmud PJ. Common variation in the lipoprotein lipase gene: effects on plasma lipids and risk of atherosclerosis. Atherosclerosis. 1997 Dec;135(2):145-59.
100. Mattu RK, Needham EW, Morgan R, Rees A, Hackshaw AK, Stocks J, Elwood PC, Galton DJ. DNA variants at the LPL gene locus associate with angiographically defined severity of atherosclerosis and serum lipoprotein levels in a Welsh population.Arterioscler Thromb. 1994 Jul;14(7):1090-7.
101. Larson I, Hoffmann MM, Ordovas JM, Schaefer EJ, Marz W, Kreuzer J. The lipoprotein lipase HindIII polymorphism: association with total cholesterol and LDL-cholesterol, but not with HDL and triglycerides in 342 females. Clin Chem. 1999 Jul;45(7):963-8.
102. Thorn JA, Needham EW, Mattu RK, Stocks J, Galton DJ. The Ser447-Ter mutation of the lipoprotein lipase gene relates to variability of serum lipid and lipoprotein levels in monozygotic twins. J Lipid Res. 1998 Feb;39(2):437-41.
103. Hata A, Robertson M, Emi M, Lalouel JM. Direct detection and automated sequencing of individual alleles after electrophoretic strand separation: identification of a common nonsense mutation in exon 9 of the human lipoprotein lipase gene. Nucleic Acids Res. 1990 Sep 25;18(18):5407-11.
104. Ahn YI, Kamboh MI, Hamman RF, Cole SA, Ferrell RE. Two DNA polymorphisms in the lipoprotein lipase gene and their associations with factors related to cardiovascular disease. J Lipid Res. 1993 Mar;34(3):421-8.
105. Peacock RE, Hamsten A, Nilsson-Ehle P, Humphries SE. Associations between lipoprotein lipase gene polymorphisms and plasma correlations of lipids, lipoproteins and lipase activities in young myocardial infarction survivors and age-matched healthy individuals from Sweden. Atherosclerosis. 1992 Dec;97(2-3):171-85.

106. Thorn JA, Chamberlain JC, Alcolado JC, Oka K, Chan L, Stocks J, Galton DJ. Lipoprotein and hepatic lipase gene variants in coronary atherosclerosis. Atherosclerosis. 1990 Nov;85(1):55-60.
107. Humphries SE, Nicaud V, Margalef J, Tiret L, Talmud PJ. Lipoprotein lipase gene variation is associated with a paternal history of premature coronary artery disease and fasting and postprandial plasma triglycerides: the European Atherosclerosis Research Study (EARS). Arterioscler Thromb Vasc Biol. 1998 Apr;18(4):526-34.
108. Zhang H, Henderson H, Gagne SE, Clee SM, Miao L, Liu G, Hayden MR. Common sequence variants of lipoprotein lipase: standardized studies of in vitro expression and catalytic function. Biochim Biophys Acta. 1996 Jul 26;1302(2):159-66.
109. Kuivenhoven JA, Groenemeyer BE, Boer JM, Reymer PW, Berghuis R, Bruin T, Jansen H, Seidell JC, Kastelein JJ. Ser447stop mutation in lipoprotein lipase is associated with elevated HDL cholesterol levels in normolipidemic males. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 1997 Mar;17(3):595-9.
110. Groenemeijer BE, Hallman MD, Reymer PW, Gagne E, Kuivenhoven JA, Bruin T, Jansen H, Lie KI, Bruschke AV, Boerwinkle E, Hayden MR, Kastelein JJ. Genetic variant showing a positive interaction with beta-blocking agents with a beneficial influence on lipoprotein lipase activity, HDL cholesterol, and triglyceride levels in coronary artery disease patients. The Ser447-stop substitution in the lipoprotein lipase gene. REGRESS Study Group. Circulation. 1997 Jun 17;95(12):2628-35.
111. Stocks J, Thorn JA, Galton DJ. Lipoprotein lipase genotypes for a common premature termination codon mutation detected by PCR-mediated site-directed mutagenesis and restriction digestion. J Lipid Res. 1992 Jun;33(6):853-7.
112. Funke H, Assmann G. The low down on lipoprotein lipase. Nat Genet. 1995 May;10(1):6-7.
113. Mitropoulos KA, Miller GJ, Watts GF, Durrington PN. Lipolysis of triglyceride-rich lipoproteins activates coagulant factor XII: a study in familial lipoprotein-lipase deficiency. Atherosclerosis. 1992 Aug;95(2-3):119-25.
114. Reymer W.A., Groenemeyer B.E., van de Burg R., and Kastelein J. Apolipoprotein E genotyping on agarose gels. Clin. Chem., 1995;41(7):1046-1047.
115. Vohl MC, Lamarche B, Moorjani S, Prud'homme D, Nadeau A, Bouchard C, Lupien PJ, Despres JP. The lipoprotein lipase HindIII polymorphism modulates plasma triglyceride levels in visceral obesity. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 1995 May;15(5):714-20.
116. Allain CC, Poon LS, Chan CS, Richmond W, Fu PC. Enzymatic determination of total serum cholesterol. Clin Chem. 1974 Apr;20(4):470-5.
117. Akins JR, Waldrep K, Bernert JT Jr. The estimation of total serum lipids by a completely enzymatic 'summation' method. Clin Chim Acta. 1989 Oct 16;184(3):219-26.
118. Gonzalez Estrada M, Rodriguez Ferrer CR, Astarloa IR, Lahera EM. Use of serum cholesterol/triglyceride ratio to discern for which individuals the Friedewald formula can be used confidently. Clin Chem. 1990 Sep;36(9):1673-5.
119. Gibson JC, Rubinstein A, Bukberg PR, Brown WV. Apolipoprotein E-enriched lipoprotein subclasses in normolipidemic subjects. J Lipid Res. 1983 Jul;24(7):886-98.

120. McGladdery SH, Pimstone SN, Clee SM, Bowden JF, Hayden MR, Frohlich JJ. Common mutations in the lipoprotein lipase gene (LPL): effects on HDL-cholesterol levels in a Chinese Canadian population. Atherosclerosis. 2001 Jun;156(2):401-7.
121. Holmer SR, Hengstenberg C, Mayer B, Doring A, Lowel H, Engel S, Hense HW, Wolf M, Klein G, Riegger GA, Schunkert H. Lipoprotein lipase gene polymorphism, cholesterol subfractions and myocardial infarction in large samples of the general population. Cardiovasc Res. 2000 Sep;47(4):806-12.
122. Anderson JL, King GJ, Bair TL, Elmer SP, Muhlestein JB, Habashi J, Mixson L, Carlquist JF. Association of lipoprotein lipase gene polymorphisms with coronary artery disease. J Am Coll Cardiol. 1999 Mar 15;33(4):1013-20.
123. Kolovou G, Yiannakouris N, Hatzivassiliou M, Malakos J, Daskalova D, Hatzigeorgiou G, Cariolou MA, Cokkinos DV. Association of apolipoprotein E polymorphism with myocardial infarction in Greek patients with coronary artery disease. Curr Med Res Opin. 2002;18(3):118-24.
124. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. Nucleic Acids Res. 1988 Feb 11;16(3):1215.
125. Gerdes LU, Klausen IC, Sihm I, Faergeman O. Apolipoprotein E polymorphism in a Danish population compared to findings in 45 other study populations around the world. Genet Epidemiol. 1992;9(3):155-67.
126. James RW, Boemi M, Giansanti R, Fumelli P, Pometta D. Underexpression of the apolipoprotein E4 isoform in an Italian population. Arterioscler Thromb. 1993 Oct;13(10):1456-9.
127. Stevenson CG. Cholesterol ester transfer protein: a molecule with three faces? Crit Rev Clin Lab Sci. 1998 Dec;35(6):517-46.
128. Arca M, Montali A, Ombres D, Battiloro E, Campagna F, Ricci G, Verna R. Lack of association of the common TaqIB polymorphism in the cholesteryl ester transfer protein gene with angiographically assessed coronary atherosclerosis.Clin Genet. 2001 Nov;60(5):374-80.
129. Heilbronn LK, Noakes M, Clifton PM. Association between HDL-cholesterol and the Taq1B polymorphism in the cholesterol ester transfer protein gene in obese women. Atherosclerosis. 2002 Jun;162(2):419-24.
130. Tenkanen H, Koshinen P, Kontula K, Aalto-Setala K, Manttari M, Manninen V, Runeberg SL, Taskinen MR, Ehnholm C. Polymorphisms of the gene encoding cholesterol ester transfer protein and serum lipoprotein levels in subjects with and without coronary heart disease. Hum Genet. 1991 Sep;87(5):574-8.
131. Mendis S, Shepherd J, Packard CJ, Gaffney D. Genetic variation in the cholesteryl ester transfer protein and apolipoprotein A-I genes and its relation to coronary heart disease in a Sri Lankan population. Atherosclerosis. 1990 Jul;83(1):21-7.
132. Freeman DJ, Griffin BA, Holmes AP, Lindsay GM, Gaffney D, Packard CJ, Shepherd J. Regulation of plasma HDL cholesterol and subfraction distribution by genetic and environmental factors. Associations between the TaqI B RFLP in the CETP gene and smoking and obesity. Arterioscler Thromb. 1994 Mar;14(3):336-44.
133. Marcel YL, McPherson R, Hogue M, Czarnecka H, Zawadzki Z, Weech PK, Whitlock ME, Tall AR, Milne RW. Distribution and concentration of cholesteryl ester transfer protein in plasma of normolipemic subjects. J Clin Invest. 1990 Jan;85(1):10-7.

134. Goto A, Sasai K, Suzuki S, Fukutomi T, Ito S, Matsushita T, Okamoto M, Suzuki T, Itoh M, Okumura-Noji K, Yokoyama S. Cholesteryl ester transfer protein and atherosclerosis in Japanese subjects: a study based on coronary angiography. Atherosclerosis. 2001 Nov;159(1):153-63.
135. Gudnason V, Thormar K, Humphries SE. Interaction of the cholesteryl ester transfer protein I405V polymorphism with alcohol consumption in smoking and non-smoking healthy men, and the effect on plasma HDL cholesterol and apoAI concentration.Clin Genet. 1997 Jan;51(1):15-21.
136. Ahn YI, Kamboh MI, Hamman RF, Cole SA, Ferrell RE. Two DNA polymorphisms in the lipoprotein lipase gene and their associations with factors related to cardiovascular disease. J Lipid Res. 1993 Mar;34(3):421-8.
137. Jemaa R, Fumeron F, Poirier O, Lecerf L, Evans A, Arveiler D, Luc G, Cambou JP, Bard JM, Fruchart JC, et al. Lipoprotein lipase gene polymorphisms: associations with myocardial infarction and lipoprotein levels, the ECTIM study. Etude Cas Temoin sur l'Infarctus du Myocarde. J Lipid Res. 1995 Oct;36(10):2141-6.
138. Gerdes C, Gerdes LU, Hansen PS, Faergeman O. Polymorphisms in the lipoprotein lipase gene and their associations with plasma lipid concentrations in 40-year-old Danish men. Circulation. 1995 Oct 1;92(7):1765-9.
139. Heizmann C, Kirchgessner T, Kwiterovich PO, Ladias JA, Derby C, Antonarakis SE, Lusis AJ. DNA polymorphism haplotypes of the human lipoprotein lipase gene: possible association with high density lipoprotein levels. Hum Genet. 1991 Apr;86(6):578-84.
140. Ukkola O, Savolainen MJ, Salmela PI, von Dickhoff K, Kesaniemi YA. DNA polymorphisms at the lipoprotein lipase gene are associated with macroangiopathy in type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus. Atherosclerosis 1995 May;115(1):99-105.
141. Wang XL, McCredie RM, Wilcken DE. Common DNA polymorphisms at the lipoprotein lipase gene. Association with severity of coronary artery disease and diabetes. Circulation. 1996 Apr 1;93(7):1339-45.
142. Jemaa R, Tuzet S, Betoulle D, Apfelbaum M, Fumeron F. Hind III polymorphism of the lipoprotein lipase gene and plasma lipid response to low calorie diet. Int J Obes Relat Metab Disord. 1997 Apr;21(4):280-3.
143. Jemaa R, Tuzet S, Portos C, Betoulle D, Apfelbaum M, Fumeron F. Lipoprotein lipase gene polymorphisms: associations with hypertrigly-ceridemia and body mass index in obese people. Int J Obes Relat Metab Disord. 1995 Apr;19(4):270-4.
144. Paulweber B, Wiebusch H, Miesenboeck G, Funke H, Assmann G, Hoelzl B, Sippl MJ, Friedl W, Patsch JR, Sandhofer F. Molecular basis of lipoprotein lipase deficiency in two Austrian families with type I hyperlipoproteinemia. Atherosclerosis. 1991 Feb;86(2-3):239-50.
145. Boren J, Lookene A, Makoveichuk E, Xiang S, Gustafsson M, Liu H, Talmud P, Olivecrona G. Binding of low density lipoproteins to lipoprotein lipase is dependent on lipids but not on apolipoprotein B. J Biol Chem. 2001 Jul 20;276(29):26916-22.
146. de Knijff P, Havekes LM. Apolipoprotein E as a risk factor for coronary heart disease: a genetic and molecular biology approach. Curr Opin Lipidol. 1996 Apr;7(2):59-63.

147. Kesaniemi YA, Ehnholm C, Miettinen TA. Intestinal cholesterol absorption efficiency in man is related to apoprotein E phenotype. J Clin Invest. 1987 Aug;80(2):578-81.
148. Jenkins DJ, Hegele RA, Jenkins AL, Connelly PW, Hallak K, Bracci P, Kashtan H, Corey P, Pintilia M, Stern H, et al. The apolipoprotein E gene and the serum low-density lipoprotein cholesterol response to dietary fiber. Metabolism. 1993 May;42(5):585-93.
149. Manttari M, Koskinen P, Ehnholm C, Huttunen JK, Manninen V. Apolipoprotein E polymorphism influences the serum cholesterol response to dietary intervention. Metabolism. 1991 Feb;40(2):217-21.
150. Lopez-Miranda J, Ordovas JM, Mata P, Lichtenstein AH, Clevidence B, Judd JT, Schaefer EJ. Effect of apolipoprotein E phenotype on diet-induced lowering of plasma low density lipoprotein cholesterol. J Lipid Res. 1994 Nov;35(11):1965-75.
151. Dallongeville J, Lussier-Cacan S, Davignon J. Modulation of plasma triglyceride levels by apoE phenotype: a meta-analysis. J Lipid Res. 1992 Apr;33(4):447-54.
152. Yan S, Zhou X, Lin Q, Song Y. Association of polymorphism of apolipoprotein E gene with coronary heart disease in Han Chinese. Chin Med J (Engl). 1999 Mar;112(3):224-7.
153. Hsueh WC, Mitchell BD, Hixson JE, Rainwater DL. Effects of the ApoE polymorphism on plasma lipoproteins in Mexican Americans. Ann Epidemiol. 2000 Nov;10(8):524-31.
154. van Bockxmeer FM, Liu Q, Mamotte C, Burke V, Taylor R. Lipoprotein lipase D9N, N291S and S447X polymorphisms: their influence on premature coronary heart disease and plasma lipids. Atherosclerosis. 2001 Jul;157(1):123-9.
155. Kakko S, Tamminen M, Paivansalo M, Kauma H, Rantala AO, Lilja M, Reunanen A, Kesaniemi YA, Savolainen MJ. Variation at the cholesteryl ester transfer protein gene in relation to plasma high density lipoproteins cholesterol levels and carotid intima-media thickness. Eur J Clin Invest. 2001 Jul;31(7):593-602.
156. de Knijff P, van den Maagdenberg AM, Frants RR, Havekes LM. Genetic heterogeneity of apolipoprotein E and its influence on plasma lipid and lipoprotein levels. Hum Mutat. 1994;4(3):178-94.
157. van Bockxmeer FM, Liu Q, Mamotte C, Burke V, Taylor R. Lipoprotein lipase D9N, N291S and S447X polymorphisms: their influence on premature coronary heart disease and plasma lipids. Atherosclerosis. 2001 Jul;157(1):123-9.
158. van Bockxmeer FM, Mamotte CD. Apolipoprotein epsilon 4 homozygosity in young men with coronary heart disease. Lancet. 1992 Oct 10;340(8824):879-80.

Επιδραση πολυμορφισμών ΠΤΥ ΗΕΑ
στα γονίδια των cetp
Lpl και Apoe ...

11044 8006

ΧΑΡΟΚΟΠΕΙΟ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ

ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ

11044