

## Επίδραση της φenoφιβράτης στα επίπεδα της PAF-ακετυλοϋδρολάσης του πλάσματος και των HDL

### Μια νέα πηλιοτροπική δράση των φιβρατών;

Β. Τσιμιχόδημος,<sup>1</sup>  
Α. Κακαφίκα,<sup>1</sup>  
Α. Ταμπάκη,<sup>2</sup>  
Ε. Μπαϊρακτάρη,<sup>3</sup>  
Α. Τσελέπη,<sup>2</sup>  
Μ. Εθισιάφ<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Τομέας Παθολογίας, Ιατρική Σχολή,  
<sup>2</sup>Εργαστήριο Βιοχημείας, Τμήμα Χημείας,  
Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, Ιωάννινα,  
<sup>3</sup>Εργαστήριο Βιοχημείας, Ιατρική Σχολή

**ΣΚΟΠΟΣ** Η ακετυλοϋδρολάση του παράγοντα ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων (PAF-AH) είναι μια φωσφολιπάση, η οποία κυκλοφορεί στο πλάσμα συνδεδεμένη με τις λιποπρωτεΐνες που περιέχουν αποπρωτεΐνη Β. Επιπρόσθετα, ένα μικρό ποσοστό του ενζύμου κυκλοφορεί συνδεδεμένο με τις HDL. Η παραοξόνωση (PON-1) είναι μια εστεράση, η οποία βρίσκεται συνδεδεμένη στα HDL σωματίδια. **ΥΛΙΚΟ-ΜΕΘΟΔΟΣ** Στη μελέτη εκτιμήθηκε η επίδραση της φenoφιβράτης στις ενεργότητες της PAF-AH και της PON-1 σε ασθενείς με δυσλιπιδαιμία τύπου IIA (n=18), IIB (n=23) και IV (n=30). **ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ** Η χορήγηση φenoφιβράτης προκάλεσε σημαντική μείωση της ενεργότητας της PAF-AH του πλάσματος σε όλες τις ομάδες των ασθενών. Στους ασθενείς με δυσλιπιδαιμία τύπου IIA, η μείωση αυτή οφειλόταν στη μείωση της ενεργότητας των μικρών πυκνών LDL υποκλάσμάτων, ενώ στους ασθενείς με δυσλιπιδαιμία τύπου IIB και IV παρατηρήθηκε επιπλέον μείωση της ενζυμικής ενεργότητας στο VLDL+IDL υποκλάσμα. Επιπρόσθετα, το φάρμακο προκάλεσε αύξηση της ενεργότητας του ενζύμου των HDL στους ασθενείς με δυσλιπιδαιμία τύπου IIB και IV, η οποία οφειλόταν σε αντίστοιχη αύξηση της ενεργότητας των μικρών πυκνών HDL υποκλάσμάτων. Τέλος, η φenoφιβράτη δεν επηρέασε σημαντικά την ενεργότητα της παραοξόνωσης σε καμία από τις ομάδες των ασθενών. **ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ** Η αύξηση της ενεργότητας του ενζύμου των HDL στους ασθενείς με δυσλιπιδαιμία τύπου IIB και IV, καθώς και η μείωση της ενεργότητας του πλάσματος σε όλες τις ομάδες των ασθενών, πιθανόν αντιπροσωπεύουν ένα νέο μηχανισμό δράσης, διαμέσου του οποίου το φάρμακο μειώνει τη βαρύτητα της αθηρωματικής νόσου.

The effect of fenofibrate on plasma and HDL levels of PAF-acetylhydrolase: A new modulating action of the fibrates?

Abstract at the end of the article

#### Λέξεις ευρετηρίου

Δυσλιπιδαιμία  
PAF-ακετυλοϋδρολάση  
Παραοξόνωση  
Φenoφιβράτη

Ο παράγοντας ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων (PAF) είναι ένας φλεγμονώδης διαβιβαστής με πολυάριθμες βιολογικές δράσεις.<sup>1</sup> Στο πλάσμα, ο PAF υδρολύεται και αδρανοποιείται από το ένζυμο ακετυλοϋδρολάση του παράγοντα ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων (PAF-AH), το οποίο κυκλοφορεί συνδεδεμένο με τα λιποπρωτεϊνικά σωματίδια.<sup>2,3</sup> Το μεγαλύτερο ποσοστό του ενζύμου του πλάσματος (>80%) βρίσκεται στις λιποπρωτεΐνες χαμηλής πυκνότητας (LDL), ενώ ένα μικρότερο ποσοστό βρίσκεται στις λιποπρωτεΐνες υψηλής πυκνότητας (HDL).<sup>3</sup> Έτσι, ο όρος PAF-AH του πλάσματος αντικατοπτρίζει κυρίως το ποσοστό του ενζύμου που βρίσκεται συνδεδεμένο στις LDL. Έχει διατυπωθεί η άποψη ότι η PAF-AH του πλάσματος διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην παθοφυσιολογία της υποξείας φλεγμονής, η οποία συσχετίζεται με την παθογένεια της αθηρωματικής νό-

σου. Παρόλα αυτά, ο ρόλος του ενζύμου στην αθηρωματική διαδικασία δεν έχει καθοριστεί με ακρίβεια. Έτσι, από παθοφυσιολογική άποψη, η PAF-AH του πλάσματος μπορεί είτε να ευοδώνει τη φλεγμονώδη εξεργασία είτε να διαδραματίζει αντιαθηρογόνο ρόλο. Πράγματι, μελέτες έδειξαν ότι, εκτός από τον PAF, το ένζυμο υδρολύει επίσης οξειδωμένα φωσφολιπίδια, τα οποία περιέχουν πολυακόρεστα λιπαρά οξέα στη θέση 2.<sup>4,5</sup> Τα φωσφολιπίδια αυτά σχηματίζονται κατά τη διάρκεια της οξειδωτικής τροποποίησης της LDL και διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη βιολογική της δραστηριότητα.<sup>5,6</sup> Από την άλλη πλευρά, η υδρόλυση αυτών των οξειδωμένων φωσφολιπιδίων οδηγεί στο σχηματισμό λυσοφωσφατιδυλχολίνης (η οποία είναι ένα μόριο με πολυάριθμες ιδιότητες που ευοδώνουν τη φλεγμονώδη διεργασία)<sup>7,8</sup> και οξειδωμένων λιπαρών οξέων (τα οποία, σύμφωνα με

Α' Βραβείο  
Επαθλο «Σωτήρης Παπασταμάτης», 2003

ορισμένους ερευνητές, είναι υπεύθυνα για την τροποποίηση της αποπρωτεΐνης Β των LDL, έτσι ώστε αυτή να αναγνωρίζεται από τους υποδοχείς-εκκαθαριστές των μακροφάγων).<sup>9</sup> Αντικρουόμενα είναι επίσης και τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τις κλινικές μελέτες, στις οποίες εξετάστηκε ο ρόλος της PAF-AH του πλάσματος στην επίπτωση της καρδιαγγειακής νόσου. Έτσι, μελέτες στον Ιαπωνικό πληθυσμό έδειξαν ότι τα χαμηλά επίπεδα του ενζύμου στο πλάσμα αποτελούν παράγοντα κινδύνου για την εμφάνιση στεφανιαίας νόσου.<sup>10,11</sup> Αντίθετα, μια πρόσφατη ανάλυση των αποτελεσμάτων της μελέτης WOSCOPS έδειξε ότι η μάζα (και κατά συνέπεια η ενεργότητα) της PAF-AH του πλάσματος αποτελεί ανεξάρτητο παράγοντα κινδύνου για την εμφάνιση πρώιμης καρδιαγγειακής νόσου.<sup>12</sup> Τέλος, σε κάποιες άλλες μελέτες δεν βρέθηκε κάποια συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων του ενζύμου στο πλάσμα και του κινδύνου εμφάνισης στεφανιαίας νόσου.<sup>13,14</sup> Σε αντίθεση με την PAF-AH του πλάσματος, τα δεδομένα είναι περισσότερο ξεκαθαρισμένα όσον αφορά στην PAF-AH των HDL. Το τμήμα του ενζύμου που βρίσκεται συνδεδεμένο με αυτές τις λιποπρωτεΐνες διαδραματίζει σαφώς αντιαθηρογόνο ρόλο, δεδομένου ότι προστατεύει την LDL από την οξείδωση, μειώνει τη βιολογική δραστηριότητα της ήδη οξειδωμένης LDL και, τέλος, προστατεύει την ίδια την HDL από την οξείδωση.<sup>15</sup>

Η παραοξονάση (PON-1) είναι μια εστεράση, η οποία παράγεται στο ήπαρ και κυκλοφορεί στο πλάσμα συνδεδεμένη με τις HDL. Η PON-1 διαδραματίζει σαφώς αντιαθηρογόνο ρόλο, δεδομένου ότι προστατεύει την LDL από την οξείδωση. Επιπρόσθετα, το ένζυμο αναστέλλει την οξείδωση της ίδιας της HDL, συμβάλλοντας έτσι στη διατήρηση της αντιαθηρογόνου δραστηριότητάς της.<sup>16,17</sup>

Οι φιβράτες αποτελούν μια από τις ευρύτερα χρησιμοποιούμενες κατηγορίες υπολιπιδαιμικών φαρμάκων. Πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι η φενοφιβράτη, ένας από τους νεότερους εκπροσώπους αυτής της κατηγορίας, επιβραδύνει την εξέλιξη της αθηρωμάτωσης και μειώνει την επίπτωση των καρδιαγγειακών συμβαμάτων

σε ασθενείς υψηλού κινδύνου για την εμφάνιση καρδιαγγειακής νόσου.<sup>18</sup>

Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η εκτίμηση της επίδρασης της φενοφιβράτης στα επίπεδα της PAF-AH του πλάσματος και των HDL σε ασθενείς με διάφορες μορφές πρωτοπαθούς δυσλιπιδαιμίας.

## ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΣ

### Ασθενείς

Στη μελέτη συμμετείχαν 71 ασθενείς με διάφορες μορφές πρωτοπαθούς δυσλιπιδαιμίας. Τα δευτεροπαθή αίτια δυσλιπιδαιμίας αποκλείστηκαν με τη φυσική εξέταση και τον κατάλληλο εργαστηριακό έλεγχο. Όλοι οι ασθενείς τέθηκαν σε δίαιτα χαμηλή σε λίπος και χοληστερόλη για χρονικό διάστημα τουλάχιστον 3 μηνών και στη συνέχεια, ανάλογα με τα επίπεδα των λιπιδίων, χωρίστηκαν σε 3 ομάδες: (α) την ομάδα των ασθενών με πρωτοπαθή υπερχοληστερολαιμία (τύπος IIA, LDL-χοληστερόλη >160 mg/dL και τριγλυκερίδια <200 mg/dL, n=18), (β) την ομάδα των ασθενών με μικτή δυσλιπιδαιμία (τύπος IIB, LDL-χοληστερόλη >160 mg/dL και τριγλυκερίδια >200 mg/dL, n=23) και (γ) την ομάδα των ασθενών με πρωτοπαθή υπερτριγλυκεριδαμία (τύπος IV, LDL-χοληστερόλη <160 mg/dL και τριγλυκερίδια >200 mg/dL, n=30). Τα χαρακτηριστικά των ασθενών κατά την έναρξη της μελέτης παρουσιάζονται στον πίνακα 1. Όλοι οι ασθενείς έλαβαν φενοφιβράτη σε μία ημερήσια δόση των 200 mg πριν από τη βραδινή κατάκλιση. Τα επίπεδα των λιπιδαιμικών παραμέτρων και οι ενζυμικές ενεργότητες μετρήθηκαν κατά την έναρξη της αγωγής, καθώς και μετά από 16 εβδομάδες θεραπείας. Για τη σύγκριση των ενζυμικών ενεργοτήτων των ασθενών με τις αντίστοιχες του φυσιολογικού πληθυσμού, ως ομάδα ελέγχου (controls) χρησιμοποιήθηκαν 95 άτομα με φυσιολογικά επίπεδα λιπιδίων του πλάσματος.

### Υποκλασμάτωση των λιποπρωτεϊνών του πλάσματος

Οι λιποπρωτεΐνες του πλάσματος διαχωρίστηκαν στα υποκλάσματά τους με υπερφυγοκέντρηση βαθμίδωσης πυκνοτήτων, σύμφωνα με τη μέθοδο των Charman et al.<sup>19</sup> Τα υποκλάσματα των λιποπρωτεϊνών που περιέχουν αποπρωτεΐνη Β απο-

**Πίνακας 1.** Κλινικά χαρακτηριστικά των ασθενών της μελέτης.

Παράμετροι	Τύπος IIA	Τύπος IIB	Τύπος IV	P
Αριθμός	18	23	30	
Φύλο (άνδρες/γυναίκες)	8/10	14/9	13/17	NS
Καπνιστές/Μη καπνιστές	7/11	10/13	12/18	NS
Ηλικία (έτη)	54,2±10,8	51,5±11,4	51,1±11,7	NS
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	25,8±3,9	26,6±4,5	28,1±4,4	NS

Οι τιμές αντιπροσωπεύουν τη μέση τιμή±σταθερή απόκλιση. BMI: Δείκτης μάζας σώματος, NS: Στατιστικά μη σημαντικό

μονώθηκαν με υπερφυγοκέντρωση πλήρους πλάσματος, ενώ τα υποκλάσματα της HDL διαχωρίστηκαν με υπερφυγοκέντρωση απομονωμένης HDL. Μετά την υπερφυγοκέντρωση, από κάθε σωλήνα συλλέχθηκαν 30 κλάσματα όγκου 0,4 mL το καθένα, στα οποία προσδιορίστηκε η συγκέντρωση της πρωτεΐνης. Κατά την υπερφυγοκέντρωση πλήρους πλάσματος, ίσοι όγκοι των κλασμάτων 1–12 αθροίστηκαν για να σχηματίσουν τα υποκλάσματα των λιποπρωτεϊνών που περιέχουν αποπρωτεΐνη Β, ως εξής: κλάσματα 1 και 2 (VLDL+IDL,  $d < 1,019$  g/mL), κλάσματα 3 και 4 (LDL-1,  $d = 1,019$ – $1,023$  g/mL), κλάσματα 5 και 6 (LDL-2,  $d = 1,023$ – $1,029$  g/mL), κλάσματα 7 και 8 (LDL-3,  $d = 1,029$ – $1,039$  g/mL), κλάσματα 9 και 10 (LDL-4,  $d = 1,039$ – $1,050$  g/mL) και κλάσματα 11 και 12 (LDL-5,  $d = 1,050$ – $1,063$  g/mL). Κατά την υπερφυγοκέντρωση απομονωμένης HDL, ίσοι όγκοι των κλασμάτων 13–23 αθροίστηκαν για να σχηματίσουν τα υποκλάσματα της HDL, ως εξής: κλάσματα 13–15 (HDL2b,  $d = 1,063$ – $1,091$  g/mL), κλάσματα 16 και 17 (HDL2a,  $d = 1,091$ – $1,100$  g/mL), κλάσματα 18 και 19 (HDL3a,  $d = 1,100$ – $1,133$  g/mL), κλάσματα 20 και 21 (HDL3b,  $d = 1,133$ – $1,156$  g/mL) και κλάσματα 22 και 23 (HDL3c,  $d = 1,156$ – $1,179$  g/mL).

#### Μέτρηση των ενεργιοτήτων της PAF-AH και της PON-1

Η ενεργότητα της PAF-AH μετρήθηκε με τη μέθοδο καταβύθισης με τριχλωροξικό οξύ (TCA), χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα [ $^3\text{H}$ ]-PAF (10 Ci/mmol, DuPont-New England Nuclear, Boston, MA) σε τελική συγκέντρωση 100 nmol/L.<sup>20</sup> Τέσσερα µg πρωτεΐνης από κάθε λιποπρωτεϊνικό υποκλάσμα, 50 µL πλάσματος (αραιωμένα 1:50 v/v με HEPES buffer) ή 50 µL απομονωμένης HDL (αραιωμένης 1:3 v/v με HEPES buffer) αναμιγνύονταν με HEPES buffer μέχρι τελικού όγκου 90 µL και χρησίμευαν ως πηγή του ενζύμου. Η αντίδραση πραγματοποιείτο στους 37 °C για 10 min και η ενεργότητα της PAF-AH εκφράστηκε ως nmol του PAF που διασπάστηκαν σε κάθε min ανά µg πρωτεΐνης ή ανά µL πλάσματος.

Η ενεργότητα της παραοξονάσης προσδιορίστηκε χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα παραοξον και phenylacetate. Ο ρυθμός υδρόλυσης του παραοξον υπολογίστηκε παρακολουθώντας την αύξηση της απορρόφησης στα 412 nm, στους 25 °C για 90 sec, με τη βοήθεια ενός φασματοφωτόμετρου microelisa (SpectraMax 190, Molecular Devices). Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε τελικό όγκο 250 µL, ο οποίος περιείχε 25 µL ορού, 5,5 mmol/L παραοξον, 2 mmol/L  $\text{CaCl}_2$  και 100 mmol/L tris-HCl, pH 8,0. Το ποσό της p-nitrophenol που σχηματιζόταν υπολογίστηκε από τη μοριακή απορρόφηση σε pH 8,0, η οποία είναι  $17.000 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .<sup>21</sup> Η ενεργότητα της PON-1 εκφράστηκε σε U/L ορού (ως ενεργότητα 1 U/L ορίστηκε ο σχηματισμός 1 µmol p-nitrophenol/min). Η αντίδραση της arylesterase πραγματοποιήθηκε επίσης σε τελικό όγκο 250 µL, ο οποίος περιείχε 50 µL ορού (αραιωμένα 1/100 v/v), 1 mmol/L phenylacetate, 2 mmol/L  $\text{CaCl}_2$  και 20 mmol/L tris-HCl, pH 8,0. Ο ρυθμός της υδρόλυσης του phenylacetate καταγράφηκε επίσης στα 270 nm και στους 25 °C για 90 sec. Η ενζυμική ενεργότητα υπολογίστηκε από το συντελεστή μορια-

κής απόσβεσης, ο οποίος είναι  $1310 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ . Η ενεργότητα του ενζύμου έναντι του phenylacetate εκφράστηκε σε U/mL (ως ενεργότητα 1 U/mL ορίστηκε η υδρόλυση 1 µmol phenylacetate/min).

#### Επίδραση της φενοφιβράτης στην παραγωγή και την έκκριση της PAF-AH από καλλιέργειες ανθρώπινων μονοκυττάρων/μακροφάγων

Μακροφάγα του περιφερικού αίματος από ασθενείς της μελέτης (πριν από την έναρξη της θεραπείας με φενοφιβράτη), καθώς και από υγιείς εθελοντές, απομονώθηκαν και καλλιεργήθηκαν, όπως έχει περιγραφεί στη βιβλιογραφία.<sup>20</sup> Μετά από καλλιέργεια 6 ημερών, τα κύτταρα επωάστηκαν παρουσία φενοφιβράτης ή φενοφιβρικού οξέος (διαλυμένου σε DMSO), σε τελική συγκέντρωση που κυμαινόταν από 10–300 µmol/L. Η επώαση έγινε για 24 και 48 ώρες σε καλλιεργητικό μέσο RPMI που περιείχε ανθρώπινο ορό (10%), του οποίου η PAF-AH είχε προηγουμένως απενεργοποιηθεί με προεπάωση με 1 mmol/L Pefabloc για 30 min. Μετά το τέλος της επώασης, η ενεργότητα της PAF-AH μετρήθηκε στο υπερκείμενο του καλλιεργητικού μέσου καθώς και στο κυτταρόλυμα, το οποίο παρασκευάστηκε όπως έχει περιγραφεί προηγουμένα.<sup>22</sup>

#### Αναλυτικές μέθοδοι

Η ολική χοληστερόλη και τα τριγλυκερίδια του ορού μετρήθηκαν με τη βοήθεια του αναλυτή Olympus AU560 (Hamburg, Germany). Η HDL-χοληστερόλη προσδιορίστηκε με την ίδια μέθοδο στο υπερκείμενο, μετά από επώαση του ορού με dextran sulfate-magnesium chloride για την καταβύθιση των λιποπρωτεϊνών που περιέχουν αποπρωτεΐνη Β. Η LDL-χοληστερόλη υπολογίστηκε από την εξίσωση του Friedewald, με την υπόθεση ότι η συγκέντρωση των τριγλυκεριδίων ήταν μικρότερη από 400 mg/dL. Στους ασθενείς με συγκέντρωση τριγλυκεριδίων μεγαλύτερη από 400 mg/dL, δεν υπολογίστηκε η LDL-χοληστερόλη. Η μη HDL-χοληστερόλη υπολογίστηκε από τη διαφορά της ολικής μείον την HDL-χοληστερόλη. Η συγκέντρωση των αποπρωτεϊνών Β, Α1 και Ε προσδιορίστηκε με ανοσονεφελομετρία σε νεφελόμετρο Behring BN100 και αντιδραστήρια από την Behring Diagnostics GmbH (Liederbach, Germany). Τέλος, η συγκέντρωση της πρωτεΐνης στα λιποπρωτεϊνικά υποκλάσματα μετρήθηκε με τη μέθοδο του BCA (Bicinchoninic acid, Pierce).

#### Στατιστική ανάλυση

Όλες οι παράμετροι εκφράστηκαν ως μέση τιμή ± σταθερή απόκλιση. Για τη σύγκριση των τιμών πριν από τη θεραπεία και μετά από αυτή χρησιμοποιήθηκε η δοκιμασία paired t-test. Η μέθοδος ανάλυσης της μεταβλητότητας σε μία διεύθυνση (one-way ANOVA), η οποία συνοδεύτηκε από τη δοκιμασία των ελαχίστων διαφορών (LSD test, least significance differences test), χρησιμοποιήθηκε για τις συγκρίσεις μεταξύ των διαφόρων ομάδων της μελέτης, ενώ οι συσχετίσεις μεταξύ της ενεργ-

γότητας του ενζύμου και των διαφόρων λιπιδαιμικών παραμέτρων έγιναν με ανάλυση γραμμικής συσχέτισης (linear regression analysis).

## ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

### Επίδραση της φενοφιβράτης στα επίπεδα των λιπιδίων

Η χορήγηση της φενοφιβράτης προκάλεσε σημαντική μείωση της ολικής χοληστερόλης, των τριγλυκεριδίων, καθώς και των αποπρωτεϊνών Β και Ε σε όλες τις ομάδες των ασθενών (πίν. 2). Επιπρόσθετα, παρατηρήθηκε σημαντική μείωση της LDL-χοληστερόλης στις ομάδες των ασθενών με δυσλιπιδαιμία τύπου ΙΙΑ και ΙΙΒ. Τέλος, η φενοφιβράτη προκάλεσε σημαντική αύξηση των επιπέδων της HDL-χοληστερόλης στους ασθενείς με δυσλιπιδαιμία τύπου ΙΙΒ και ΙV. Η αύξηση αυτή συνοδεύεται από αντίστοιχη αύξηση των επιπέδων της αποπρωτεΐνης Α1, η οποία αποτελεί τη βασική αποπρωτεΐνη των HDL σωματιδίων.

### Επίδραση της φενοφιβράτης στα επίπεδα της PAF-AH του πλάσματος και των HDL

Όπως φαίνεται στον πίνακα 3, όλες οι ομάδες των ασθενών παρουσίασαν σημαντικά υψηλότερη ενεργότητα της PAF-AH του πλάσματος σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου πριν από την έναρξη της αγωγής. Επιπρόσθετα, οι ασθενείς με δυσλιπιδαιμία τύπου ΙΙΒ εμφάνισαν σημαντικά υψηλότερη ενεργότητα του ενζύμου στο πλάσμα σε σύγκριση με τις δύο άλλες ομάδες των ασθενών. Ενώ στους ασθενείς με δυσλιπιδαιμία τύπου ΙΙΑ και ΙΙΒ τα επίπεδα του ενζύμου στο πλάσμα συσχετιζόνταν με τα επίπεδα της LDL-χοληστερόλης (εικ. 1α), μια τέτοια συσχέτιση δεν παρατηρήθηκε στους ασθενείς με δυσλιπιδαιμία τύπου ΙV. Αντίθετα, στους ασθενείς της ομάδας αυτής τα επίπεδα του ενζύμου συσχετιζόνταν με τα επίπεδα της μη HDL χοληστερόλης [δηλαδή, με το άθροισμα της χοληστερόλης των λιποπρωτεϊνών που περιέχουν αποπρωτεΐνη Β (VLDL, IDL, LDL και remnants κυλομικρών)] (εικ. 1β). Η χορήγηση φενοφιβράτης προ-

**Πίνακας 2.** Επίδραση της φενοφιβράτης στα επίπεδα των λιπιδίων και των αποπρωτεϊνών των ασθενών της μελέτης.

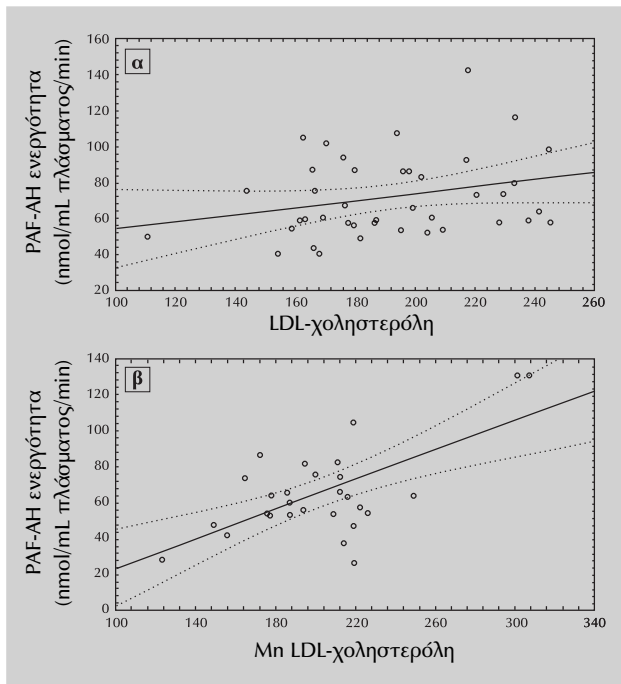
	Τύπος ΙΙΑ			Τύπος ΙΙΒ			Τύπος ΙV		
	Πριν από τη θεραπεία	Μετά τη θεραπεία	P	Πριν από τη θεραπεία	Μετά τη θεραπεία	P	Πριν από τη θεραπεία	Μετά τη θεραπεία	P
Χοληστερόλη (mg/dL)	271,4±32,6	217,8±36,3	0,000	296,3±31,9	237,7±34,5	0,000	237,1±38,8	219,6±36,7	<0,01
Τριγλυκερίδια (mg/dL)	151,1±34,6	116,1±41,1	0,000	318,3±92,7	177,5±70,6	0,000	395,8±179,3	219,7±104,7	0,000
HDL-χοληστερόλη (mg/dL)	47,5±12,8	46,6±11,7	NS	39,2±5,4	44,8±8,2	<0,001	32,5±5,3	38,8±10,6	<0,01
LDL-χοληστερόλη (mg/dL)	193,7±31,8	149,9±34,3	0,000	193,5±27,8	157,4±32,3	0,000	127,8±28,5	136,3±34,6	NS
ΑpoA1 (mg/dL)	142,3±26,2	137,2±19,3	NS	144,5±18	159,4±24,2	<0,005	127,3±20,7	139,3±21,6	<0,05
ΑpoB (mg/dL)	139,6±27	107±21,7	0,000	156,3±20	126,6±23,2	0,000	127,1±19,3	117±26,9	<0,05
ΑpoE (mg/dL)	40,4±9	33,3±8,7	<0,05	60,6±26,6	38,3±10,2	0,000	64,2±26	46,4±16,4	0,000

Οι τιμές αντιπροσωπεύουν τη μέση τιμή±σταθερή απόκλιση. Αpo: Αποπρωτεΐνη, NS: Στατιστικά μη σημαντικό

**Πίνακας 3.** Επίδραση της φενοφιβράτης στις ενεργότητες της PAF-AH και PON-1 των ασθενών της μελέτης.

	Ομάδα ελέγχου	Τύπος ΙΙΑ		Τύπος ΙΙΒ		Τύπος ΙV	
		Πριν από τη θεραπεία	Μετά τη θεραπεία	Πριν από τη θεραπεία	Μετά τη θεραπεία	Πριν από τη θεραπεία	Μετά τη θεραπεία
PAF-AH πλάσματος (nmol/mL/min)	48,8±13,3	63,63±23,8**	45,9±12,52 <sup>§§</sup>	78,1±19,5** <sup>#</sup>	56,7±18,4 <sup>§§*#</sup>	66,13±25,16 <sup>**#</sup>	51,36±21,5 <sup>§§</sup>
HDL-PAF-AH (nmol/mL/min)	3,3±1,3	3,22±0,89	3,13±0,92	2,37±0,79 <sup>**#</sup>	2,71±0,76 <sup>§</sup>	1,78±0,43 <sup>**##</sup>	2,48±0,7 <sup>§§**</sup>
PON-1 (paraoxon) (U/L)	75,1±45,7	48,6±28,4	53±32,8	70,8±40,6	69,2±41,3	67,4±58,9	74±68,3
PON-1 (phenylacetate) (U/L)	63,2±20,6	72,3±41,9	61,7±31 <sup>§</sup>	56,6±22,7	58,2±22,8	71,3±36	74,3±38

Οι τιμές αντιπροσωπεύουν τη μέση τιμή±σταθερή απόκλιση. \*P<0,05 και \*\*P<0,001 σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου, <sup>§</sup>P<0,05 και <sup>§§</sup>P<0,001 σε σύγκριση με τις τιμές πριν από την έναρξη της αγωγής, <sup>##</sup>P<0,001 και <sup>#</sup>P<0,05 σε σύγκριση με τους ασθενείς με δυσλιπιδαιμία τύπου ΙΙΑ την ίδια χρονική στιγμή (πριν από τη θεραπεία ή μετά από αυτή), \* P<0,05 σε σύγκριση με τους ασθενείς με δυσλιπιδαιμία τύπου ΙΙΒ την ίδια χρονική στιγμή (πριν από τη θεραπεία ή μετά από αυτή). PAF-AH: PAF-ακετυλοψυδρόλαση, PON-1: παραοξονάση



**Εικόνα 1.** (α) Συσχέτιση μεταξύ της ενεργότητας της PAF-ακετυλοϋδρολάσης (PAF-AH) του πλάσματος και των επιπέδων της LDL-χοληστερόλης στους ασθενείς με δυσλιπιδαιμία τύπου ΙΙΑ και ΙΙΒ. (β) Συσχέτιση μεταξύ της ενεργότητας της PAF-AH του πλάσματος και των επιπέδων της μη HDL-χοληστερόλης στους ασθενείς με δυσλιπιδαιμία τύπου ΙV.

κάλεσε σημαντική μείωση των επιπέδων της PAF-AH του πλάσματος σε όλες τις ομάδες των ασθενών. Έτσι, τα επίπεδα του ενζύμου μετά από τη θεραπεία στους ασθενείς με δυσλιπιδαιμία τύπου ΙΙΑ και ΙV προσέγγισαν τα επίπεδα της ομάδας ελέγχου. Αντίθετα, στους ασθενείς με δυσλιπιδαιμία τύπου ΙΙΒ η ενεργότητα του ενζύμου στο πλάσμα παρέμεινε σημαντικά αυξημένη σε σύγκριση με τα επίπεδα της ομάδας ελέγχου ακόμη και μετά από τη θεραπεία με φενοφιβράτη.

Στους ασθενείς με δυσλιπιδαιμία τύπου ΙΙΑ διαπιστώθηκαν παρόμοια επίπεδα PAF-AH της HDL σε σύγκριση με τα άτομα της ομάδας ελέγχου (πίν. 3). Αντίθετα, οι ασθενείς με δυσλιπιδαιμία τύπου ΙΙΒ, καθώς και οι ασθενείς με δυσλιπιδαιμία τύπου ΙV, παρουσίασαν σημαντικά χαμηλότερα επίπεδα της PAF-AH της HDL, τόσο σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου όσο και σε σύγκριση με την ομάδα των ασθενών με δυσλιπιδαιμία τύπου ΙΙΑ. Επιπρόσθετα, οι ασθενείς με δυσλιπιδαιμία τύπου ΙV εμφάνισαν σημαντικά χαμηλότερα επίπεδα του ενζύμου της HDL σε σύγκριση με τους ασθενείς με δυσλιπιδαιμία τύπου ΙΙΒ. Η χορήγηση φενοφιβράτης προκάλεσε σημαντική αύξηση των επιπέδων της PAF-AH της HDL στους ασθενείς με δυσλιπιδαιμία τύπου ΙΙΒ και ΙV, ενώ

δεν επηρέασε τα επίπεδα του ενζύμου στους ασθενείς με δυσλιπιδαιμία τύπου ΙΙΑ.

### Επίδραση της φενοφιβράτης στην ενεργότητα της PON-1

Όλες οι ομάδες των ασθενών παρουσίασαν παρόμοια επίπεδα ενεργότητας της PON-1 (τόσο έναντι του παραοxon όσο και έναντι του phenylacetate) σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου (πίν. 3). Η χορήγηση της φενοφιβράτης δεν προκάλεσε μεταβολές στην ενεργότητα του ενζύμου σε καμία από τις ομάδες της μελέτης.

### Επίδραση της φενοφιβράτης στα επίπεδα της PAF-AH των λιποπρωτεϊνικών υποκλασμάτων

Προκειμένου να μελετηθεί η επίδραση του φαρμάκου στην ενεργότητα της PAF-AH των λιποπρωτεϊνικών υποκλασμάτων, πλάσμα από όλους τους ασθενείς υποβλήθηκε σε υπερφυγοκέντρηση βαθμίδωσης πυκνοτήτων. Σε συμφωνία με προηγούμενες μελέτες,<sup>20</sup> πριν από την έναρξη της αγωγής το μεγαλύτερο ποσοστό της ενζυμικής ενεργότητας παρατηρήθηκε στα μικρά πυκνά υποκλάσματα της LDL (LDL-4 και LDL-5) σε όλες τις ομάδες των ασθενών, καθώς και στους υγιείς μάρτυρες (πίν. 4). Οι ασθενείς με δυσλιπιδαιμία τύπου ΙΙΒ και ΙV παρουσίασαν σημαντικά υψηλότερη ενζυμική ενεργότητα στις VLDL+IDL, σε σύγκριση τόσο με την ομάδα ελέγχου όσο και με τους ασθενείς με δυσλιπιδαιμία τύπου ΙΙΑ. Επιπρόσθετα, στους ασθενείς με δυσλιπιδαιμία τύπου ΙV βρέθηκε σημαντικά υψηλότερη ενεργότητα σε αυτά τα υποκλάσματα σε σύγκριση με τους ασθενείς με δυσλιπιδαιμία τύπου ΙΙΒ (πίν. 4). Τόσο οι ασθενείς με δυσλιπιδαιμία τύπου ΙΙΑ όσο και οι ασθενείς με δυσλιπιδαιμία τύπου ΙΙΒ παρουσίασαν σημαντικά υψηλότερη ενεργότητα στα μικρά πυκνά υποκλάσματα της LDL (LDL-4 και LDL-5) σε σχέση με τους υγιείς μάρτυρες, ένα φαινόμενο που δεν παρατηρήθηκε στους ασθενείς με δυσλιπιδαιμία τύπου ΙV (πίν. 4). Τέλος, δεν διαπιστώθηκαν διαφορές στην ενεργότητα της PAF-AH των μεγάλων και ενδιάμεσων πυκνότητας υποκλασμάτων της LDL μεταξύ των ομάδων της μελέτης πριν από την έναρξη της θεραπείας.

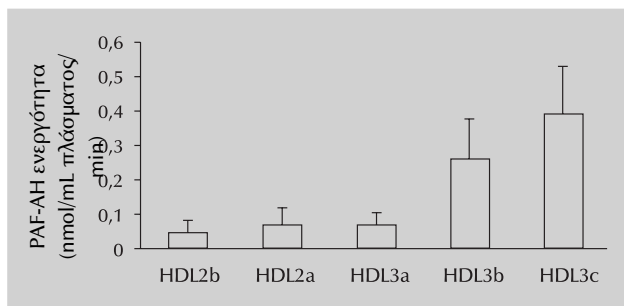
Σε όλες τις ομάδες της μελέτης, το μεγαλύτερο ποσοστό της ενζυμικής ενεργότητας των HDL συσχετιζόταν με τα μικρά πυκνά υποκλάσματα των HDL (HDL3c). Ένα αντιπροσωπευτικό προφίλ της κατανομής της ενζυμικής ενεργότητας στα υποκλάσματα των HDL σε ασθενείς με δυσλιπιδαιμία τύπου ΙΙΒ παρουσιάζεται στην εικόνα 2. Οι ασθενείς με δυσλιπιδαιμία τύπου ΙΙΒ και ΙV

**Πίνακας 4.** Ενεργότητα της PAF-ακετυλοϋδρολάσης (PAF-AH) στα υποκλάσματα της LDL των ασθενών της μελέτης.

	nmol/mL πλάσματος/min				P
	Ομάδα ελέγχου	Τύπου ΙΙΑ	Τύπου ΙΙΒ	Τύπου ΙV	
VLDL+IDL	0,3±0,2	0,4±0,2	1,0±0,5**	1,6±1,2*#	<0,05
LDL-1	0,1±0,1	0,1±0,1	0,4±0,3	0,1±0,1	NS
LDL-2	0,2±0,2	0,2±0,1	0,4±0,3	0,2±0,1	NS
LDL-3	0,5±0,4	0,5±0,1	0,9±0,6	0,5±0,4	NS
LDL-4	1,5±1,1	3,9±1,5*	3,8±2,4*	1,4±2,4#	NS
LDL-5	5,0±2,8	7,0±1,2*	10,2±3,6**	4,9±2,5#	<0,05

Οι τιμές αντιπροσωπεύουν τη μέση τιμή±σταθερή απόκλιση. Η μέθοδος ανάλυσης της μεταβλητότητας σε μία διεύθυνση (one-way ANOVA), η οποία συνοδεύτηκε από τη δοκιμασία των ελαχίστων διαφορών (LSD test, least significance differences test), χρησιμοποιήθηκε για τις συγκρίσεις μεταξύ των διαφόρων ομάδων της μελέτης. Τιμές του P μικρότερες από 0,05 θεωρήθηκαν στατιστικά σημαντικές.

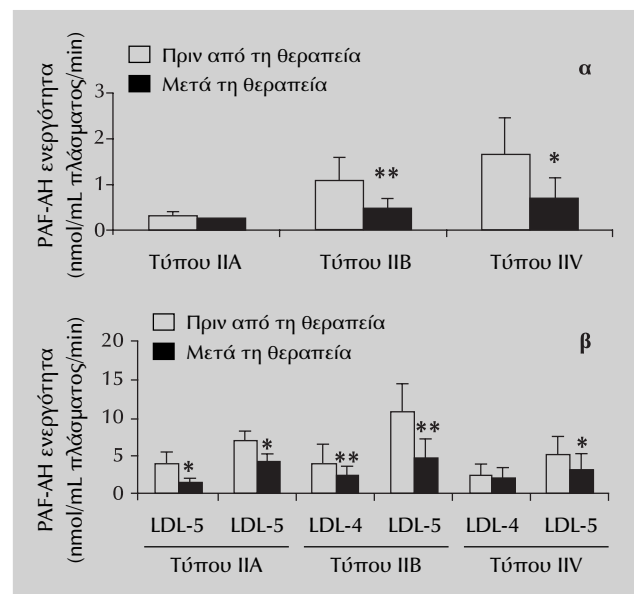
\*P<0,05 σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου, \*P<0,05 σε σύγκριση με τους ασθενείς με δυσλιπιδαιμία τύπου ΙΙΑ, #P<0,05 σε σύγκριση με τους ασθενείς με δυσλιπιδαιμία τύπου ΙΙΒ. NS: Στατιστικά μη σημαντικό



**Εικόνα 2.** Αντιπροσωπευτικό προφίλ της κατανομής της ενεργότητας της PAF-ακετυλοϋδρολάσης (PAF-AH) στα υποκλάσματα της HDL στους ασθενείς με δυσλιπιδαιμία τύπου ΙΙΒ.

εμφάνισαν σημαντικά χαμηλότερη ενεργότητα στα πυκνά υποκλάσματα της HDL σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου, ενώ, αντίθετα, οι ασθενείς με δυσλιπιδαιμία τύπου ΙΙΑ παρουσίασαν παρόμοια ενεργότητα με αυτή των υγιών εθελοντών. Επιπρόσθετα, στους ασθενείς με δυσλιπιδαιμία τύπου ΙV διαπιστώθηκε σημαντικά χαμηλότερη ενεργότητα στο HDL3c υποκλάσμα σε σχέση με τους ασθενείς με δυσλιπιδαιμία τύπου ΙΙΒ. Τέλος, δεν παρατηρήθηκαν διαφορές στην ενζυμική ενεργότητα των υπόλοιπων υποκλασμάτων των HDL μεταξύ των ομάδων της μελέτης πριν από την έναρξη της θεραπείας.

Η χορήγηση της φενοφιβράτης προκάλεσε σημαντική μείωση της ενεργότητας της PAF-AH των VLDL+IDL στους ασθενείς με δυσλιπιδαιμία τύπου ΙΙΒ και ΙV, ενώ δεν επηρέασε την ενεργότητα αυτών των υποκλασμάτων στους ασθενείς με δυσλιπιδαιμία τύπου ΙΙΑ (εικ. 3α). Επιπρόσθετα, το φάρμακο προκάλεσε σημαντική μείωση της ενζυμικής ενεργότητας των μικρών πυκνών LDL υποκλασμάτων σε όλες τις ομάδες των ασθενών (εικ. 3β), χωρίς να επηρεάσει την ενεργότητα της PAF-AH των μεγάλων και ενδιάμεσης πυκνότητας υποκλα-

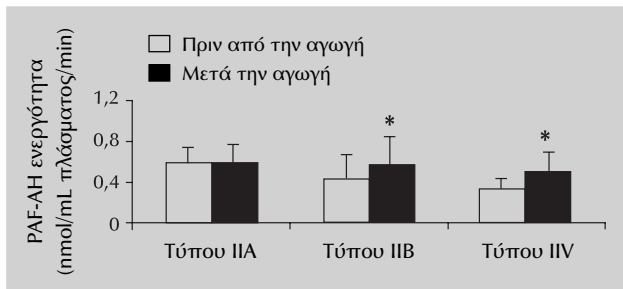


**Εικόνα 3.** Επίδραση της φενοφιβράτης στην ενεργότητα της PAF-ακετυλοϋδρολάσης (PAF-AH) (α) των VLDL+IDL και (β) των μικρών πυκνών υποκλασμάτων της LDL. \*\*P<0,01 και \*P<0,05 σε σύγκριση με τις τιμές πριν από την έναρξη της θεραπείας.

μάτων της LDL σε καμία από τις ομάδες της μελέτης. Τέλος, η φενοφιβράτη προκάλεσε σημαντική αύξηση της ενεργότητας του ενζύμου που συσχετιζόταν με τα μικρά πυκνά υποκλάσματα της HDL στους ασθενείς με δυσλιπιδαιμία τύπου ΙΙΒ και ΙV, χωρίς να επηρεάσει την ενεργότητα των υπόλοιπων υποκλασμάτων της HDL (εικ. 4).

Επίδραση της φενοφιβράτης στα επίπεδα της PON-1 των λιποπρωτεϊνικών υποκλασμάτων

Πριν από την έναρξη της αγωγής, το μεγαλύτερο ποσοστό της ενεργότητας της PON-1 συσχετιζόταν με



**Εικόνα 4.** Επίδραση της φενοφιβράτης στην ενεργότητα της PAF-ακετυλοϋδρολάσης (PAF-AH) των μικρών πυκνών υποκλασμάτων της HDL (HDL3c). \* $P < 0,05$  σε σύγκριση με τις τιμές πριν από την έναρξη της θεραπείας.

τα μικρά πυκνά υποκλάσματα της HDL σε όλες τις ομάδες των ασθενών. Όπως ήταν αναμενόμενο, η χορήγηση της φενοφιβράτης δεν προκάλεσε σημαντικές μεταβολές στην ενεργότητα της PON-1 των υποκλασμάτων της HDL σε καμιά από τις ομάδες της μελέτης.

#### Επίδραση της φενοφιβράτης στην έκκριση της PAF-AH από τα μακροφάγα

Προκειμένου να εξεταστεί η πιθανότητα οι μεταβολές της PAF-AH του πλάσματος και των HDL να οφείλονται στην επίδραση του φαρμάκου στην παραγωγή του ενζύμου, μελετήθηκε η επίδραση της φενοφιβράτης στην παραγωγή και έκκριση της PAF-AH από καλλιέργειες μακροφάγων του περιφερικού αίματος. Τα κύτταρα αυτά χρησιμοποιήθηκαν, επειδή, σύμφωνα με πρόσφατες μελέτες, αντιπροσωπεύουν την κύρια πηγή προέλευσης του ενζύμου του πλάσματος.<sup>23</sup> Κύτταρα από 6 ασθενείς της κάθε ομάδας χρησιμοποιήθηκαν σε αυτή τη μελέτη. Οι επωάσεις έγιναν για 24 και 48 ώρες παρουσία φενοφιβράτης και φενοφιβρικού οξέος, σε συγκεντρώσεις που κυμαίνονταν από 10–300  $\mu\text{mol/L}$ . Όπως ήταν αναμενόμενο, παρατηρήθηκε μια σταθερή αύξηση τόσο της εκκρινόμενης όσο και της ενδοκυττάριας ενεργότητας στα κύτταρα των ατόμων της ομάδας ελέγχου, τα οποία επωάστηκαν σε DMSO χωρίς την παρουσία φαρμάκου, που έφθασε τα  $178 \pm 46$  και  $51 \pm 18$   $\text{nmol/mg DNA/ώρα}$ , αντίστοιχα, στις 24 ώρες, καθώς και  $323 \pm 97$  και  $84 \pm 36$   $\text{nmol/mg DNA/ώρα}$ , αντίστοιχα, στις 48 ώρες καλλιέργειας. Παρόμοια αποτελέσματα παρατηρήθηκαν και για τα μακροφάγα των ασθενών της μελέτης, τα οποία επωάστηκαν απουσία φαρμάκου. Μετά την επώαση των κυττάρων με φενοφιβράτη ή φενοφιβρικό οξύ δεν σημειώθηκε σημαντική μεταβολή στην εκκρινόμενη ή την ενδοκυττάρια ενεργότητα του ενζύμου (σε σύγκριση με τις τιμές που παρατηρήθηκαν κατά την επώαση απουσία φαρμάκου) σε καμιά από τις ομά-

δες της μελέτης. Πρέπει να σημειωθεί ότι σε πειράματα που έγιναν με τη χρήση υπερκείμενου υγρού κυτταροκαλλιιεργειών ως πηγή του ενζύμου, η παρουσία φενοφιβράτης ή φενοφιβρικού οξέος δεν επηρέασε τη μέτρηση της ενεργότητας της PAF-AH. Κατά συνέπεια, οι μεταβολές που παρατηρήθηκαν στην ενζυμική ενεργότητα των ασθενών μετά τη χορήγηση της φενοφιβράτης δεν μπορούν να αποδοθούν σε άμεση παρεμβολή του φαρμάκου στη μέθοδο μέτρησης της ενεργότητας του ενζύμου.

#### ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στη μελέτη αυτή φάνηκε ότι οι ασθενείς με δυσλιπιδαιμία τύπου IIA και IIB εμφανίζουν σημαντικά υψηλότερη ενεργότητα της PAF-AH του πλάσματος σε σύγκριση με υγιείς μάρτυρες, ένα εύρημα που συμφωνεί με τα αποτελέσματα προηγούμενων μελετών.<sup>22,24</sup> Επιπρόσθετα, δείχθηκε για πρώτη φορά στη διεθνή βιβλιογραφία ότι οι ασθενείς με δυσλιπιδαιμία τύπου IV παρουσιάζουν επίσης υψηλότερη ενζυμική ενεργότητα στο πλάσμα σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Η χορήγηση φενοφιβράτης προκάλεσε σημαντική μείωση της PAF-AH στο πλάσμα, η οποία οφειλόταν κατά κύριο λόγο στη μείωση της ενζυμικής ενεργότητας στις VLDL, καθώς και στα μικρά πυκνά υποκλάσματα της LDL. Η χορήγηση του φαρμάκου προκάλεσε επίσης σημαντική αύξηση της ενεργότητας της PAF-AH της HDL στους ασθενείς με δυσλιπιδαιμία τύπου IIB και IV, οι οποίοι πριν από την έναρξη της θεραπείας είχαν σημαντικά χαμηλότερη ενεργότητα του ενζύμου στην HDL σε σύγκριση με τους υγιείς μάρτυρες. Η αύξηση αυτή οφειλόταν κατά κύριο λόγο στην αύξηση της ενζυμικής ενεργότητας στα μικρά πυκνά υποκλάσματα της HDL. Τέλος, η φενοφιβράτη δεν επηρέασε την ενεργότητα της PON-1 σε καμιά από τις ομάδες της μελέτης.

Μελέτες έδειξαν ότι η LDL και μάλιστα τα μικρά πυκνά υποκλάσματά της είναι οι κύριοι φορείς της PAF-AH στο πλάσμα.<sup>20,25</sup> Επιπρόσθετα, έχει διατυπωθεί η άποψη ότι ο μεταβολισμός των LDL σωματιδίων και ειδικότερα ο ρυθμός απομάκρυνσής τους από την κυκλοφορία καθορίζει σε σημαντικό βαθμό τα επίπεδα της PAF-AH του πλάσματος.<sup>26</sup> Κατά συνέπεια, η ύπαρξη αυξημένων επιπέδων LDL στους ασθενείς με δυσλιπιδαιμία τύπου IIA και IIB, που οφείλεται σε διαταραχές του καταβολισμού της, μπορεί να εξηγήσει, τουλάχιστον μερικά, τα υψηλότερα επίπεδα PAF-AH σε αυτούς ασθενείς σε σύγκριση με τους υγιείς μάρτυρες. Με βάση αυτή τη θεώρηση, η διαμέσου του φαρμάκου αύξηση



της δραστικότητας των LDL υποδοχέων<sup>27</sup> και η επακόλουθη μείωση της συγκέντρωσης των LDL σωματιδίων αποτελούν τους κύριους μηχανισμούς, με τους οποίους η φενοφιβράτη μειώνει την ενεργότητα της PAF-AH του πλάσματος σε αυτούς τους ασθενείς. Είναι γνωστό ότι οι φιβράτες συνδέονται με ειδικούς πυρηνικούς υποδοχείς, τους PPARα, και έτσι μεταβάλλουν την έκφραση διαφόρων γονιδίων που επηρεάζουν το μεταβολισμό των λιπιδίων και των λιποπρωτεϊνών.<sup>28</sup> Αν και δεν μπορεί να αποκλειστεί η διαμέσου του φαρμάκου αναστολή της έκφρασης του γονιδίου της PAF-AH, εντούτοις τα αποτελέσματα των πειραμάτων με τα μακροφάγα έδειξαν ότι η φενοφιβράτη δεν μεταβάλλει το ρυθμό σύνθεσης του ενζύμου από αυτά τα κύτταρα, τα οποία παριστούν την κύρια πηγή του ενζύμου στο πλάσμα. Σε αντίθεση με τις δυσλιπιδαιμίες τύπου ΙΑ και ΙΙΒ, η δυσλιπιδαιμία τύπου ΙV δεν χαρακτηρίζεται από αυξημένες συγκεντρώσεις LDL, οι οποίες να μπορούν να εξηγήσουν τα αυξημένα επίπεδα της PAF-AH του πλάσματος σε αυτούς τους ασθενείς. Φαίνεται λοιπόν ότι οι πλούσιες σε τριγλυκερίδια λιποπρωτεΐνες, αν και μεταφέρουν μικρότερα ποσά PAF-AH σε σύγκριση με την LDL, συμβάλλουν σημαντικά στη συνολική ενεργότητα της PAF-AH του πλάσματος όταν αθροιστούν σε υψηλές συγκεντρώσεις. Το γεγονός αυτό επισημαίνεται και από τη συσχέτιση μεταξύ της ενεργότητας της PAF-AH του πλάσματος και της μη HDL-χοληστερόλης, η οποία παρατηρήθηκε στους ασθενείς με δυσλιπιδαιμία τύπου ΙV (εικ. 1β) (παρόμοια ασθενής συσχέτιση παρατηρήθηκε και στους ασθενείς με δυσλιπιδαιμία τύπου ΙΙΒ). Η μείωση της συγκέντρωσης των πλούσιων σε τριγλυκερίδια λιποπρωτεϊνών διαμέσου της ενεργοποίησης της λιποπρωτεϊνικής λιπάσης αποτελεί, κατά συνέπεια, τον κύριο μηχανισμό με τον οποίο το φάρμακο μειώνει την ενεργότητα της PAF-AH του πλάσματος στους ασθενείς με αυξημένες συγκεντρώσεις των πλούσιων σε τριγλυκερίδια λιποπρωτεϊνών. Επιπρόσθετα, η αλλαγή του φαινότυπου των LDL σωματιδίων που προκαλείται από τη φενοφιβράτη<sup>29</sup> –δηλαδή η αντικατάσταση των μικρών πυκνών πλούσιων σε PAF-AH σωματιδίων από αραιότερα και μεγαλύτερα σωματίδια με μικρή περιεκτικότητα σε PAF-AH– μπορεί επίσης να συμβάλλει στη μείωση της ενεργότητας της PAF-AH του πλάσματος στους ασθενείς με δυσλιπιδαιμία τύπου ΙV (και εν μέρει στους ασθενείς με δυσλιπιδαιμία τύπου ΙΙΒ).

Μέχρι σήμερα υπάρχουν πολύ λίγα δεδομένα για το ρόλο της PAF-AH της HDL στην αθηρωματική νόσο. Έχει διατυπωθεί η άποψη ότι ένα μέρος της αντιοξειδωτικής και αντιφλεγμονώδους δραστικότητας των HDL οφείλεται στην PAF-AH της HDL,<sup>15</sup> θεώρηση η οποία

υποστηρίζεται και από πρόσφατες μελέτες σε διαγονιδιακά ποντίκια.<sup>30,31</sup> Στην παρούσα μελέτη δείχθηκε ότι οι ασθενείς με υψηλά επίπεδα τριγλυκεριδίων (τύπου ΙΙΒ και ΙV) έχουν χαμηλότερα επίπεδα PAF-AH στην HDL σε σύγκριση με τα άτομα της ομάδας ελέγχου και μάλιστα τα επίπεδα αυτά είναι τόσο χαμηλότερα όσο υψηλότερη είναι η συγκέντρωση των τριγλυκεριδίων. Επιπρόσθετα, η χορήγηση φενοφιβράτης στους ασθενείς αυτών των ομάδων προκάλεσε σημαντική αύξηση της PAF-AH της HDL, ένα φαινόμενο που δεν παρατηρήθηκε στους ασθενείς με δυσλιπιδαιμία τύπου ΙΑ. Η προέλευση της PAF-AH της HDL δεν είναι γνωστή με ακρίβεια. Πιθανολογείται ότι το ένζυμο παράγεται ανεξάρτητα από τα HDL σωματίδια και στη συνέχεια ενσωματώνεται σε αυτά, σε κάποια φάση του μεταβολισμού τους.<sup>32-34</sup> Μια θεωρία που μπορεί να εξηγήσει την αύξηση της ενζυμικής ενεργότητας των HDL, η οποία παρατηρείται στους ασθενείς με υψηλές συγκεντρώσεις των πλούσιων σε τριγλυκερίδια λιποπρωτεϊνών μετά από τη χορήγηση φενοφιβράτης, είναι η εξής: Είναι γνωστό ότι, κατά τον καταβολισμό των VLDL από τη λιποπρωτεϊνική λιπάση, μερικά από τα επιφανειακά τους συστατικά (π.χ. αποπρωτεΐνες) μεταφέρονται στις HDL. Κατά συνέπεια, η PAF-AH μπορεί πιθανόν να παριστά ένα από τα επιφανειακά συστατικά των πλούσιων σε τριγλυκερίδια λιποπρωτεϊνών, τα οποία κατά τη διάρκεια του καταβολισμού τους μεταφέρονται στις HDL. Στην περίπτωση αυτή, η επαγωγή της δράσης της λιποπρωτεϊνικής λιπάσης από τη φενοφιβράτη και η αύξηση του καταβολισμού των πλούσιων σε τριγλυκερίδια λιποπρωτεϊνών, η οποία κυρίως παρατηρείται στους ασθενείς με δυσλιπιδαιμία τύπου ΙΙΒ και ΙV, μπορεί να εξηγήσει την αύξηση της PAF-AH της HDL σε αυτές τις ομάδες των ασθενών. Πρόσφατα, διατυπώθηκε η άποψη ότι στα σωματίδια της HDL δεν υπάρχει PAF-AH και ότι η υδρόλυση του PAF, η οποία παρατηρείται σε αυτά τα σωματίδια, οφείλεται αποκλειστικά στην PON-1.<sup>35</sup> Ιδιαίτερο ενδιαφέρον έχει το γεγονός ότι, ενώ η φενοφιβράτη προκαλεί αύξηση της ενεργότητας της PAF-AH της HDL στους ασθενείς με δυσλιπιδαιμία τύπου ΙΙΒ και ΙV, δεν επηρεάζει τα επίπεδα της PON-1 σε καμιά από τις ομάδες της μελέτης. Η διαφορετική αυτή επίδραση του φαρμάκου στα επίπεδα της PAF-AH της HDL και της PON-1 στους ασθενείς με δυσλιπιδαιμία τύπου ΙΙΒ και ΙV αποδεικνύει, συνεπώς, έμμεσα ότι στην πραγματικότητα πρόκειται για δύο διαφορετικά ένζυμα. Επιπρόσθετα, η αύξηση της PAF-AH της HDL μετά από τη χορήγηση φενοφιβράτης, σε συνδυασμό με το γεγονός ότι η ενεργότητα της PON-1 –ενός ενζύμου, δηλαδή, το οποίο βρίσκεται στις HDL αλλά όχι τις λιποπρωτεΐνες που περιέχουν απο-



πρωτεΐνη Β- παραμένει σταθερή, υποστηρίζει έμμεσα τη θεωρία ότι, στην πραγματικότητα, η PAF-AH της HDL μπορεί να προέρχεται από τις πλούσιες σε τριγλυκερίδια λιποπρωτεΐνες.

Συμπερασματικά, στην παρούσα μελέτη φάνηκε ότι η φενοφιβράτη προκαλεί σημαντική μείωση της PAF-AH του πλάσματος σε ασθενείς με διάφορες μορφές πρω-

τοπαθούς δυσλιπιδαιμίας, ενώ, παράλληλα, αυξάνει σημαντικά την PAF-AH της HDL σε ασθενείς με δυσλιπιδαιμίες που χαρακτηρίζονται από αυξημένα επίπεδα πλούσιων σε τριγλυκερίδια λιποπρωτεϊνών. Οι μεταβολές αυτές παριστούν νέες πλειοτροπικές δράσεις του φαρμάκου και πιθανόν συμβάλλουν στην επιβράδυνση της εξέλιξης της αθηρωματικής νόσου.

## ABSTRACT

### The effect of fenofibrate on plasma and HDL levels of PAF-acetylhydrolase: A new modulating action of the fibrates?

V. TSIMIHODIMOS,<sup>1</sup> A. KAKAFIKA,<sup>1</sup> A. TAMBAKI,<sup>2</sup> H. BAIRAKTARI,<sup>3</sup> A. TSELEPIS,<sup>2</sup> M. ELISAF<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Pathology Sector, Medical School, <sup>2</sup>Biochemistry Laboratory, Department of Chemistry, <sup>3</sup>Biochemistry Laboratory, Medical School, University of Ioannina, Ioannina, Greece

*Archives of Hellenic Medicine 2004, 21(1):26-36*

**OBJECTIVE** Human plasma platelet activating factor acetylhydrolase (PAF-AH) is an enzyme associated mainly with the apolipoprotein B-containing lipoproteins. A small proportion of circulating enzyme activity is also associated with high-density lipoprotein (HDL). Plasma paraoxonase 1 (PON-1) is an esterase exclusively associated with HDL. **METHOD** The effect of micronized fenofibrate (200 mg per day for 3 months) on PAF-AH and PON-1 activities in patients with dyslipidemia of types IIA (n=18), IIB (n=23) and IV (n=30) was studied. **RESULTS** Fenofibrate significantly reduced plasma PAF-AH activity in all patient groups. In type IIA patients this was mainly due to a fall in enzyme activity associated with the dense LDL subspecies, whereas in types IIB and IV patients the reduction was due to the decrease in PAF-AH activity associated with both the VLDL+IDL and dense LDL subspecies. Drug therapy in type IIB and type IV patients significantly increased the HDL-associated PAF-AH activity due to the induction in enzyme activity associated with the HDL3c subfraction. Fenofibrate therapy did not affect either total serum PON-1 action on paraoxon and phenylacetate or the enzyme activities associated with the HDL subfractions, in either patient group. **CONCLUSIONS** The fenofibrate-induced elevation of HDL-associated PAF-AH activity in dyslipidemic patients of type IIB and type IV and the reduction in enzyme activity associated with atherogenic apoB-containing lipoproteins in these patient groups as well as in type IIA patients, may represent a new and important overall anti-atherogenic effect of this potent lipid-modulating agent.

**Key words:** Dyslipidemia, Fenofibrate, PAF-acetylhydrolase, Paraoxonase

## Βιβλιογραφία

1. EVANGELOU AM. Platelet-activating factor (PAF): implications for coronary heart and vascular diseases. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 1994, 50:1-28
2. STAFFORINI D, McINTYRE T, ZIMMERMAN G, PRESCOTT S. Platelet activating factor acetylhydrolases. *J Biol Chem* 1997, 272:17895-17898
3. STAFFORINI DM, McINTYRE TM, CARTER ME, PRESCOTT SM. Human plasma platelet-activating factor acetylhydrolase: association with lipoprotein particles and role in the degradation of platelet-activating factor. *J Biol Chem* 1987, 262:4215-4222
4. STEMLER KE, STAFFORINI DM, PRESCOTT SM, McINTYRE TM. Human plasma platelet-activating factor acetylhydrolase. Oxidatively fragmented phospholipids as substrates. *J Biol Chem* 1991, 266:11095-11103
5. ITABE H. Oxidized phospholipids as a new landmark in atherosclerosis. *Prog Lipid Res* 1998, 37:181-207
6. WATSON AD, LEITINGER N, NAVAB M, FAULL KE, HORKKO S, WITZTUM JL ET AL. Structural identification by mass spectroscopy of oxidized phospholipids in minimally oxidized low density lipoprotein that induced monocyte/endothelial interactions and evidence for their presence *in vivo*. *J Biol Chem* 1997, 272:13597-13607

7. KARABINA SAP, ELISAF M, BAIRAKTARI E, TZALLAS C, SIAMOPOULOS KC, TSELEPIS AD. Increased activity of platelet-activating factor acetylhydrolase in low-density lipoprotein subfractions induces enhanced lysophosphatidylcholine production during oxidation in patients with heterozygous familial hypercholesterolaemia. *Eur J Clin Invest* 1997, 27:595–602
8. MCPHEE CH, MILLINER K, MOORES K, TEW DG. The involvement of LDL-associated phospholipase A<sub>2</sub> in atherogenesis. *Pharmacol Rev Commun* 1996, 8:309–315
9. MCPHEE CH, MOORES K, BOYD H, DHANAK D, IFE RJ, LEACH CA ET AL. The lipoprotein-associated phospholipase A<sub>2</sub> generates two bioactive products during the oxidation of low-density lipoprotein: Studies using a novel inhibitor. *Biochem J* 1999, 338:479–487
10. YAMADA Y, ICHIHARA S, FUJIMURA T, YOKOTA M. Identification of the G994→T missense mutation in exon 9 of the plasma platelet activating factor acetylhydrolase gene as an independent risk factor for coronary artery disease in Japanese men. *Metabolism* 1998, 47:177–181
11. YAMADA Y, YOSHIDA H, ICHIHARA S, IMAIZUMI T, SATOH K, YOKOTA M. Correlations between plasma platelet-activating factor acetylhydrolase (PAF-AH) activity and PAF-AH genotype, age, and atherosclerosis in a Japanese population. *Atherosclerosis* 2000, 150:209–216
12. PACKARD CJ, O'REILLY DSJ, CASLAKE MJ, McMAHON AD, FORD I, COONEY J ET AL. Lipoprotein-associated phospholipase A<sub>2</sub> as an independent predictor of coronary heart disease. *N Engl J Med* 2000, 343:1148–1155
13. SHOHEET R, ANWAR A, JOHNSTON J, COHEN J. Plasma platelet activating factor acetylhydrolase activity is not associated with premature coronary atherosclerosis. *Am J Cardiol* 1999, 83:109–111
14. TSELEPIS AD, GOUDEVENOS JA, TAMBAKI AP, MICHALIS L, STROUMBIS CS, TSOUKATOS DC ET AL. Platelet aggregatory response to platelet activating factor (PAF), *ex vivo*, and PAF-acetylhydrolase activity in patients with unstable angina: effect of c7E3 Fab (abciximab) therapy. *Cardiovasc Res* 1999, 43:183–191
15. NAVAB M, BERLINER JA, SUBBANAGOUNDER G, HAMA S, LUSIS AJ, CASTELLANI LW ET AL. HDL and the inflammatory response induced by LDL-derived oxidized phospholipids. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001, 21:481–488
16. WATSON AD, BERLINER JA, HAMA SY, LA DU BN, FAULL KF, FOGELMAN AM ET AL. Protective effect of high-density lipoprotein associated paraoxonase. Inhibition of the biological activity of minimally oxidized low-density lipoprotein. *J Clin Invest* 1995, 96:2882–2891
17. AVIRAM M, ROSENBLAT M, BISGAIER CL, NEWTON RS, PRIMI-PARMO SL, LA DU BN. Paraoxonase inhibits high-density lipoprotein oxidation and preserves its functions: a possible peroxidative role for paraoxonase. *J Clin Invest* 1998, 101:1581–1590
18. ANONYMOUS. Effect of fenofibrate on progression of coronary-artery disease in type 2 diabetes: the Diabetes Atherosclerosis Intervention Study, a randomised study. *Lancet* 2001, 357:905–910
19. CHAPMAN MJ, GOLDSTEIN S, LAGRANGE D, LAPLAUD PM. A density gradient ultracentrifugal procedure for isolation of the major lipoprotein classes from human serum. *J Lipid Res* 1981, 22:339–358
20. TSELEPIS AD, DENTAN C, KARABINA SAP, CHAPMAN MJ, NINIO E. PAF-degrading acetylhydrolase is preferentially associated with dense LDL and VHDL-1 in human plasma. Catalytic characteristics and relation to the monocyte-derived enzyme. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995, 15:1764–1773
21. GAN KN, SMOLEN A, ECKERSON HW, LA DU BN. Purification of human serum paraoxonase/arylesterase. *Drug Metab Dispos* 1991, 19:100–106
22. TSIMIHODIMOS V, KARABINA SA, TAMBAKI AP, BAIRAKTARI E, GOUDEVENOS JA, CHAPMAN MJ ET AL. Atorvastatin preferentially reduces LDL-associated platelet-activating factor acetylhydrolase activity in dyslipidemias of type IIA and IIB. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002, 22:306–311
23. STAFFORINI DM, ELSTAD MR, McINTYRE TM, ZIMMERMAN GA, PRESCOTT SM. Human macrophages secrete platelet-activating factor acetylhydrolase. *J Biol Chem* 1990, 265:9682–9687
24. TSELEPIS AD, KARABINA SAP, ELISAF M. PAF-acetylhydrolase activity in familial hypercholesterolaemia. *Eur J Clin Invest* 1998, 28:508–509
25. MCCALL MR, LA BELLE M, FORTE TM, KRAUSS RM, TAKANAMI Y, TRIBBLE DL. Dissociable and non-dissociable forms of platelet-activating factor acetylhydrolase in human plasma LDL: implications for LDL oxidative susceptibility. *Biochim Biophys Acta* 1999, 1437:23–36
26. GUERRA R, ZHAO B, MOOSER V, STAFFORINI DM, JOHNSTON JM, COHEN JC. Determinants of plasma platelet-activating factor acetylhydrolase: heritability and relationship to plasma lipoproteins. *J Lipid Res* 1997, 38:2281–2288
27. SHEPHERD J. Mechanism of action of fibrates. *Postgrad Med J* 1993, 69(Suppl 1):S34–S41
28. FRUCHART JC, DURIEZ P, STAELS B. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha activators regulate genes governing lipoprotein metabolism, vascular inflammation and atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol* 1999, 10:245–257
29. CHAPMAN MJ, GUERIN M, BRUCKERT E. Atherogenic, dense low-density lipoproteins. Pathophysiology and new therapeutic approaches. *Eur Heart J* 1998, 19(Suppl A):A24–A30
30. QUARCK R, DE GEEST B, STENGEL D, MERTENS A, LOX M, THEILMEIER G ET AL. Adenovirus-mediated gene transfer of human platelet-activating factor-acetylhydrolase prevents injury-induced neointima formation and reduces spontaneous atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation* 2001, 103:2495–2500
31. THEILMEIER G, DE GEEST B, VAN VELDHOVEN PP, STENGEL D, MICHIELS C, LOX M ET AL. HDL-associated PAF-AH reduces endothelial adhesiveness in apoE<sup>-/-</sup> mice. *FASEB J* 2000, 14:2032–2039
32. STAFFORINI DM, ELTAD MR, McINTYRE TM, ZIMMERMAN GA, PRESCOTT SM. Human macrophages secrete platelet-activating factor acetylhydrolase. *J Biol Chem* 1990, 265:9682–9687

33. TARBET EB, STAFFORINI DM, ELSTAD MR, ZIMMERMAN GA, McINTYRE TM, PRESCOTT SM. Liver cells secrete the plasma form of platelet-activating factor acetylhydrolase. *J Biol Chem* 1991, 266:16667–16673
34. IMAIZUMI T, STAFFORINI DM, YAMADA Y, ZIMMERMAN GA, McINTYRE TM, PRESCOTT SM. The fate of platelet-activating factor: PAF acetylhydrolase from plasma and tissues. In: Gross R (ed) *Advances in lipobiology*. Connecticut, JAI Press Inc, Greenwich, CT, 1996:141–162
35. RODRIGO L, MACNESS B, DURRINGTON PN, HERNANDEZ A, MACNESS MI. Hydrolysis of platelet-activating factor by serum paraoxonase. *Biochem J* 2001, 354:1–7

*Corresponding author:*

M. Elisaf, Pathology Sector, Medical School, University of Ioannina, GR-451 10 Ioannina, Greece  
e-mail: egepi@cc.uoi.gr

.....