

## Αυξημένα επίπεδα παράγοντα Von Willebrand και υπεροξειδίων των λιπιδίων στον ορό καπνιστών

### Περίληψη

Είναι γνωστό ότι: α) τα επίπεδα του αντιγόνου του παράγοντα Von Willebrand (vWFAg) στον ορό αποτελούν δείκτη βλάβης του ενδοθηλίου, β) τα υπεροξειδία των λιπιδίων (LP) μπορεί να προκαλέσουν βλάβη σε ενδοθηλιακά κύτταρα in vitro και γ) το κάπνισμα αυξάνει τα επίπεδα των LP in vivo. Με ειδικές τεχνικές μετρήθηκαν στον ορό 44 καπνιστών (από τους οποίους οι 15 βαρείς καπνιστές) και 15 μη καπνιστών ίδιας μέσης ηλικίας και αναλογίας φύλου (μάρτυρες) τα επίπεδα του vWFAg, του μετατρεπτικού ενζύμου της αγγειοτενσίνης (ACE), της προστακυκλίνης (PC) (δείκτες της ανατομικής και λειτουργικής ακεραιότητας του ενδοθηλίου) και των LP. Τα αποτελέσματα των μετρήσεων έδειξαν αύξηση σε στατιστικά σημαντικό βαθμό των επιπέδων του vWFAg και των LP στην ομάδα των βαρέων καπνιστών σε σχέση με τους μάρτυρες. Δεν υπήρχαν μεταβολές στα επίπεδα του ACE και της PC. Διαπιστώθηκε επίσης θετική συσχέτιση μεταξύ επιπέδων vWFAg και LP στον ορό των καπνιστών. Αξιοσημείωτο είναι ότι σε 11 βαρείς καπνιστές που διέκοψαν το κάπνισμα διαπιστώθηκαν σε επανέλεγχο μετά τη διακοπή του καπνίσματος τιμές vWFAg και LP ίδιες με τις τιμές των μη καπνιστών.

Από τα παραπάνω συμπεραίνεται ότι στους βαρείς καπνιστές η βλάβη του ενδοθηλίου οφείλεται κατά ένα μέρος στην αυξημένη παραγωγή και τοξική δράση των LP. Τα αυξημένα επίπεδα vWFAg ευνοούν τη συσσώρευση αιμοπεταλίων και προάγουν τη θρομβογένεση, ενώ καταφάνεται και η μεγάλη σημασία της διακοπής του καπνίσματος στην πρόληψη εμφάνισης αγγειακών βλαβών.

### Εισαγωγή

Επιδημιολογικές μελέτες έχουν δείξει τη στενή συσχέτιση του καπνίσματος με την αθηροσκλήρωση, το έμφραγμα του μυοκαρδίου και το θάνατο από νόσο των στεφανιαίων αρτηριών<sup>(1,2,3)</sup>. Οι καπνιστές παρουσιάζουν 2,5 φορές αύξηση της συχνότητας στεφανιαίας νόσου και 1,5-3 φορές αύξηση της θνητότητας από αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο, καθώς και της συχνότητας εμφάνισης περιφερικής αποφρακτικής αρτηριοπάθειας σε σχέση με μη καπνιστές<sup>(2,3)</sup>. Στους πιθανούς παθογενετικούς μηχανισμούς των καρδιαγγειακών βλαβών από το κάπνισμα περιλαμβάνονται η αύξηση της συσσώρευσης και της αντιδραστικότητας των αιμοπεταλίων, η υπερπαραγωγή προπηκτικών προσταγλανδινών, η ελαττωμένη παραγωγή προστακυκλίνης, μεταβολές στα επίπεδα των λιπιδίων και των λιποπρωτεϊνών στο αίμα, μεταβολές του αιμοστατικού συστήματος και βλάβη του ενδοθηλίου<sup>(3,4)</sup>. Έχει βρεθεί ότι τα υπεροξειδία λιπιδίων (LP) είναι αυξημένα στον ορό καπνιστών<sup>(5)</sup> και πειραματικές μελέτες έδειξαν ότι τα LP ασκούν κυτταροτοξική δράση προς τα ενδοθηλιακά κύτταρα in vitro<sup>(6)</sup>.

**Σκοπός της εργασίας** ήταν η μελέτη της ανατομικής και λειτουργικής ακεραιότητας του αγγειακού ενδοθηλίου σε καπνιστές σε σύγκριση με μη καπνι-

**Δ. Παπαϊωαννίδης, Μ. Φωτεινού,  
Α. Γερογιάννη,  
Ν. Μαλάμος, Δ. Σιναπίδης, Σ.Ν. Νίκας, Χ.  
Γιώτης**

**Παθολογική Κλινική Γ.Ν.Ν. Άρτας και  
Ν.Ν.Θ.Α. "Η Σωτηρία"**

στές, με τη μέτρηση των επιπέδων στον ορό ή το πλάσμα ορισμένων δεικτών, που συντίθενται και απελευθερώνονται από τα ενδοθηλιακά κύτταρα και αντικατοπτρίζουν βλάβη και ενεργοποίηση /αναγέννηση του ενδοθηλίου. Επίσης, η μέτρηση των επιπέδων των LP και η συσχέτιση αυτών με τα επίπεδα των παραπάνω δεικτών, σε μια προσπάθεια να καθορισθεί ένας πιθανός μηχανισμός στην πρόκληση της βλάβης του ενδοθηλίου στους καπνιστές

(κάπνισμα → παραγωγή ελευθέρων τοξικών ριζών οξυγόνου → σχηματισμός LP → κυτταροτοξική δράση στο ενδοθήλιο → απελευθέρωση δεικτών αγγειακής βλάβης στο αίμα). Ως δείκτης αγγειακής βλάβης χρησιμοποιήθηκε το αντιγόνο του παράγοντα von Willebrand (vWFAg), που είναι γνωστό ότι αυξάνει στο αίμα σε φλεγμονώδεις αγγειοπάθειες (π.χ. αγγειίτιδες) και στην αθηροσκλήρωση.<sup>(7,8)</sup> Έχει βρεθεί ότι συστατικά του καπνού επιδρούν σε ενδοθηλιακά κύτταρα, που διατηρούνται σε καλλιέργειες, αυξάνοντας την παραγωγή vWFAg από τα κύτταρα και προκαλώντας εξάντληση των ενδοκυτταρίων αποθεμάτων vWFAg<sup>(9)</sup>. Μετρήθηκαν και άλλα δύο προϊόντα των ενδοθηλιακών κυττάρων: το μεταπρεπτικό ένζυμο της αγγειοτενσίνης (ACE) και η προστακυκλίνη (PC). Το ACE δεν αποτελεί ειδικό δείκτη για το ενδοθήλιο καθώς παράγεται και από κύτταρα του συστήματος μονοκυττάρων/μακροφάγων<sup>(10)</sup>. Επίδρα στην αγγειοτενσίνη I μετατρέποντάς την σε αγγειοτενσίνη II, ουσία που προκαλεί ισχυρή σύσπαση των λείων μυϊκών ινών των αγγείων. Η PC είναι ισχυρός αναστολέας της συσώρευσης των αιμοπεταλίων και έχει αγγειοδιασταλτική δράση, συντίθεται δε στα λεία μυϊκά κύτταρα, στα λευκά αιμοσφαίρια και τα ενδοθηλιακά κύτταρα<sup>(11)</sup>. Έχει παρατηρηθεί ελάττωση των επιπέδων της στο αίμα χρόνιων καπνιστών<sup>(12)</sup>. Μεταβολές στα ποσά των παραπάνω ουσιών στο αίμα των καπνιστών, θα ήταν δυνατό να συμβάλλουν στην πρόκληση αγγειακής βλάβης

(Αύξηση ACE → αύξηση αγγειοτενσίνης II → αγγειοσύσπαση. Ελάττωση PC → υπερίσχυση δράσης θρομβοξανθίνης A2 → αγγειοσύσπαση και αυξημένη συσώρευση αιμοπεταλίων).

Ομάδα	Αριθμός	Ηλικία* (χρόνια)	Φύλο (Α/Θ)	Διάρκεια καπνίσματος** (χρόνια)	Αριθμός τσιγάρων ημερησίως
Μη καπνιστές	15	30 (12)	8/7	0	0
Ομάδα Α (ήπιοι καπνιστές)	14	35 (6)	8/6	8,5 (2,6)	5,1 (3,8)
Ομάδα Β (μέτριοι καπνιστές)	15	34 (8)	8/7	11,2 (4,1)	17 (2,9)
Ομάδα Γ (βαρείς καπνιστές)	15	39 (9)	6/7	14,6 (6,2)	30 (5,8)

\* Μέση τιμή και σε παρένθεση η σταθερή απόκλιση

**Ασθενείς - Υλικό - Μέθοδοι**

Μελετήθηκαν 44 ασυμπτωματικοί καπνιστές, προερχόμενοι από τον ιατρικό και νοσηλευτικό προσωπικό του νοσοκομείου. Οι καπνιστές ταξινομήθηκαν σε τρεις ομάδες, ανάλογα με τον αριθμό τσιγάρων που κάπνιζαν ημερησίως. Η ομάδα Α περιλάμβανε 14 άτομα που κάπνιζαν 1-10 τσιγάρα ημερησίως, η ομάδα Β 15 άτομα που κάπνιζαν 11-20 τσιγάρα ημερησίως και η ομάδα Γ 15 άτομα που κάπνιζαν 21-40 τσιγάρα ημερησίως (βαρείς καπνιστές). Για σύγκριση

χρησίμευσαν 15 μη καπνιστές, επίσης από το προσωπικό του νοσοκομείου. Στοιχεία των ατόμων των τριών ομάδων (μέση ηλικία, αναλογία φύλου, μέση διάρκεια καπνίσματος) καθώς και των μαρτύρων φαίνονται στον πίνακα 1.

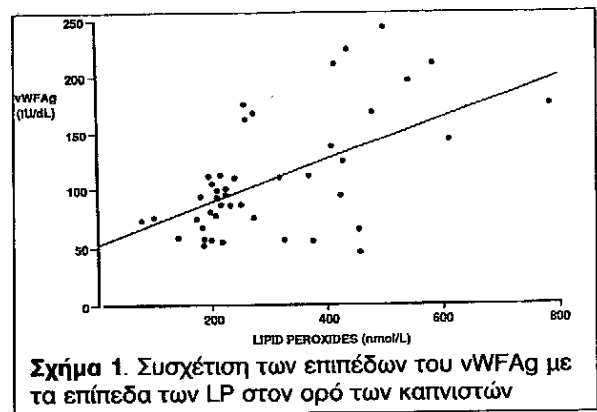
Η συλλογή του αίματος γινόταν με atraumaticκή φλεβοκέντηση σε πλαστικά σωληνάρια με EDTA ή υάλινα σφαιρίδια (χάνδρες). Μετά από φυγοκέντρηση στις 2000 rpm για 10min, τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε ψυγείο -20°C μέχρι να εξετασθούν. Ο προσδιορισμός του vWFAg έγινε με τεχνική ELISA σε πλακίδια μικροτιτλοποίησης 96 φρεατίων από πολυστυρένιο (Nunc) με τη χρήση αντιορού από το εμπόριο (DAKO, κωδικός P226)<sup>(13,14)</sup>. Για τον προσδιορι-

Δείκτης	Μη καπνιστές	Ομάδα Α	Ομάδα Β	Ομάδα Γ	
				Πριν τη διακοπή	Μετά τη διακοπή
vWFAg (IU/dl)	85 (23,3)	91 (24,3)	111,2 (49,3)	151,5 (55,8)	88 (22,4)
ACE (u/ml)	31,9 (8,5)	35 (15,3)	34,3 (12,2)	35,2 (12)	31,5 (12,7)
PC (pg/ml)	3,2 (1,7)	3,7 (2)	4,7 (3,4)	3,8 (1,7)	3,7 (1,8)
LP (nmol/l)	195 (85)	215 (76)	335 (151)	432 (135)	208 (86)

Οι αριθμοί στον πίνακα φανερώνουν τη μέση τιμή και στην παρένθεση αναγράφεται η σταθερή απόκλιση

σμό της PC στο πλάσμα μετρήθηκαν τα επίπεδα του σταθερού μεταβολίτη της, 6-κετο-προσταγλανδίνης F<sub>1α</sub>, με Kit ELISA του εμπορίου<sup>(15)</sup>. Το ACE μετρήθηκε στον ορό (επειδή το EDTA είναι αναστολέας) με Kit από το εμπόριο (Sigma), που χρησιμοποιεί υδρόλυση ενός ειδικού υποστρώματος στα 340nm<sup>(16)</sup>. Τα LP μετρήθηκαν με την τεχνική του θειοβαρβιτουρικού οξέος χρησιμοποιώντας ως standard τη μαλονική διαλδεύδη<sup>(17)</sup>.

Η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων έγινε με τις δοκιμασίες MannWhitney U, Wilcoxon για παρατηρήσεις κατά ζεύγη και με τη μέθοδο συσχέτισης κατά Spearman.



Σχήμα 1. Συσχέτιση των επιπέδων του vWFAg με τα επίπεδα των LP στον ορό των καπνιστών

**Αποτελέσματα**

Τα αποτελέσματα των μετρήσεων φαίνονται στον πίνακα 2. Διαπιστώθηκε αύξηση σε στατιστικά σημαντικό βαθμό των επιπέδων του vWFAg στον ορό μόνο των βαρέων καπνιστών σε σχέση με τους μη καπνιστές (p<0,001). Δεν διαπιστώθηκαν διαφορές σε στατιστικά σημαντικό βαθμό στα επίπεδα του ACE ή της PC. Τα LP ήταν αυξημένα σε στατιστικά σημαντι-

κό βαθμό επίσης μόνο στους βαρείς καπνιστές ( $p < 0.001$ ). Βρέθηκε θετική συσχέτιση μόνο μεταξύ των επιπέδων του vWFAg και των LP στον ορό όλων των καπνιστών ( $r = 0.59$ ,  $p < 0.001$ ) (σχήμα 1).

Αξιοσημείωτο είναι ότι σε επανέλεγχο 11 ατόμων της ομάδας των βαρέων καπνιστών, που πείσθηκαν να διακόψουν το κάπνισμα, βρέθηκαν επίπεδα vWFAg και LP όμοια με τα επίπεδα των μη καπνιστών ( $p < 0.001$  και για τους δύο δείκτες σε σχέση με τα αντίστοιχα επίπεδα πριν τη διακοπή του καπνίσματος, πίνακας 2).

### Συζήτηση

Προϊόντα των LP μπορεί να ενέχονται στην παθογένεση νόσων και παθολογικών καταστάσεων, όπως η αθηροσκλήρωση, επειδή τα ενδοθηλιακά κύτταρα αποτελούν συνεχώς στόχο της δράσης ελεύθερων τοξικών ριζών<sup>(18)</sup>. Οι ελεύθερες ρίζες έχουν σημαντικό ρόλο στην πρόκληση καρδιακών και πνευμονικών νόσων και μπορούν να πυροδοτήσουν την οξειδωτική διάσπαση λιπαρών οξέων, που είναι συνδεδεμένα με την κυτταρική μεμβράνη, και το σχηματισμό LP, θέτοντας έτσι σε λειτουργία κυτταροτοξικούς μηχανισμούς<sup>(6,19)</sup>. Έχει διαπιστωθεί η αυξημένη παραγωγή ελεύθερων ριζών οξυγόνου και LP στους καπνιστές<sup>(4,20)</sup>.

Στη μελέτη μας διαπιστώθηκαν αυξημένα επίπεδα vWFAg και LP στους βαρείς καπνιστές και συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων vWFAg και LP στο σύνολο των καπνιστών. Δεν βρέθηκαν μεταβολές στα επίπεδα των μη ειδικών δεικτών βλάβης και ενεργοποίησης των ενδοθηλιακών κυττάρων, δηλαδή του ACE ή της PC. Τα τελευταία αποτελέσματα δεν συμφωνούν με άλλες έρευνες, που έδειξαν μείωση της παραγωγής PC σε χρόνιους καπνιστές (12) ή αύξηση του ποσού του μεταβολίτη της PC, που αποβάλλεται στα ούρα καπνιστών<sup>(21)</sup>. Αυτό μπορεί να οφείλεται σε φυλετικές διαφορές ή στο διαφορετικό αριθμό των τσιγάρων που κάπνιζαν ημερησίως τα άτομα της μελέτης.

Μια ελκυστική υπόθεση, που να ερμηνεύει τα ευρήματα της μελέτης μας είναι η εξής: Το κάπνισμα προάγει το σχηματισμό ελεύθερων ριζών οξυγόνου, οι οποίες προκαλούν υπεροξειδωση των λιπιδίων που κυκλοφορούν στο αίμα ή είναι συνδεδεμένα με την κυτταρική μεμβράνη προκαλώντας έτσι βλάβη σε κύτταρα διαφόρων οργάνων. Η βλάβη των ενδοθηλιακών κυττάρων έχει ως αποτέλεσμα τη σύνθεση και απελευθέρωση στο αίμα αυξημένων ποσών vWFAg. Το μόριο αυτό έχει προπηκτική και προθρομβωτική δραστηριότητα αυξάνοντας τη συσσώρευση αιμοπεταλίων και την προσκόλλησή τους στο υπενδοθήλιο<sup>(22)</sup>. Έτσι συμβάλλει άμεσα στη δημιουργία αθηροσκληρωτικής πλάκας και τελικά στην πρόκληση εμφράγματος του μυοκαρδίου και αγγειακών εγκεφαλικών επεισοδίων<sup>(1,2,23)</sup>. Η επάνοδος των επιπέδων του vWFAg και των LP στα φυσιολογικά όρια μετά τη διακοπή του καπνίσματος τονίζει τη μεγάλη σημασία της έγκαιρης διακοπής του καπνίσματος για την πρόληψη καρδιαγγειακών επεισοδίων.

### Summary

**Increased circulating levels of von Willebrand factor antigen and lipid peroxides in smokers.**

**D. Papaionannidis, M. Fotinou, A. Gerogianni, N. Malamos, D. Sinapidis, S.N. Nikas, C. Yiotis**

This study was prompted by three observations: that von Willebrand factor antigen (vWFAg) is a marker of endothelial cell injury in vivo; that lipid peroxides (LD) can damage endothelial cells in vitro; and that cigarette smoking increases LP in vivo. The hypothesis that LP in smoker's serum could damage endothelial cells was tested by measuring vWFAg, angiotensin converting enzyme (ACE), prostacyclin (PC) (as markers of endothelial cell integrity), and by correlating levels with LP. Forty four smokers participated in the study (15 of them were heavy smokers) and 15 healthy non-smokers were used as controls. Only altered levels of vWFAg indicated an injured vasculature and the increase of vWFAg levels was statistically significant in the heavy smokers group compared with the controls. vWFAg levels in all smokers correlated with levels of LP. vWFAg and LP levels returned to normal after smoking cessation in 11 heavy smokers. It is concluded that LP in smokers could damage the endothelium and this may partly account for the increased incidence of vascular and ischaemic heart disease seen in cigarette smokers. Also, this study stresses the significance of early smoking cessation in the prevention of endothelium damage and cardiovascular disease.

### Βιβλιογραφία

- Doll R, Peto R. Br Med J 1976, 2: 1525-36.
- Fielding JE. N Engl J Med 1985, 313: 491-8
- McBride PE. Med Clin North Am 1992, 76: 333-53.
- Ross R. N Engl J Med 1986, 314: 488-500
- Pre J, LeFlock R, Vassy R, LeNoble C. Med Sci Rec 1989, 17: 1029-30.
- Brake D, Winyard P, Scott DGI et al. Ann Rheum Dis 1985, 44: 176-82.
- Belch JFF, Zoma AA, Richards IM et al. Rheumatol Int 1987, 7: 107-11.
- Papaioannides D, Blann A, Peridis O. Ιατρική Συνεργασία 1992, 5(11-12): 9-13.
- Blaes N, Piovella F, Samaden A et al. Br J Haematol 1986, 64: 675-87.
- Fridland J, Setton C, Silverstein E. Biochem Biophys Res Commun 1978, 83: 843-9.
- Moncada S, Gryglewski S, Bunting S, Vane JR. Nature 1976, 263: 663-5.
- FitzGerald GA, Oates JE, Nowak J. Am Heart J 1988, 115: 267-71.
- Short PE, Williams CE, Picken AM, Hill FGH. Med Lab Sci 1982, 39: 351-5.
- Blann AD. Biologicals 1990, 18: 351-3.
- Cascade Biochem Ltd. The Innovation Centre, Phillip Lyle Building, University of Reading, RG6 2BX, UK.
- Holmquist B, Bunning P, Riordan JF. Anal Biochemistry 1979, 95: 540-8.
- Yagi K. In: Yagi K (ed), Lipid peroxides in biology and medicine, Academic Press, New York, pp. 223-42.
- Henning B, Chow CK. Free Rad Biol Med 1988, 4: 99-106.
- Morel DW, Cathcart MK, Chisolm GM. J Cell

Biol 1983, 43: 427a

20. Kalra J, Chandhary AK, Prasad K. Int J Exp Pathol 1991, 72: 1-7.

21. Barrow SE, Ward PS, Sleightholm MA, Ritter JM, Dollery CT. Biochem et Biophys Acta 1989, 993:

121-7.

22. Bona RD. Ann Clin Lab Sci 1989, 19: 184-9.

23. Shaper AG, Phillips AN, Pocock SJ et al. Br Med J 1991, 302: 1111-5