

Η κλοπιδογρέλη προσδένεται στην Lp-PLA₂ και αναστέλλει την ενζυμική της ενεργότητα

Μια νέα πλειοτροπική δράση του φαρμάκου;

M.E. Τσουμάνη,¹ Κ.Χ. Τέλλης,¹
 Μ.Β. Χατζαθανασιάδου,² Α.Ν. Κατσικούδη,²
 Β.Γ. Κοντογιάννη,² Α.Γ. Τζάκος,²
 Α.Δ. Τσελέπης¹

¹Ερευνητικό Κέντρο Αθηροθρόμβωσης/Εργαστήριο Βιοχημείας,
²Εργαστήριο Οργανικής Χημείας, Τμήμα Χημείας,
 Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, Ιωάννινα

Clopidogrel binds to Lp-PLA₂ and inhibits the enzyme activity

A new pleiotropic effect of this antiplatelet drug?

M.E. Tsoumani,¹ C.C. Tellis,¹
 M.V. Chatziathanasiadou,² A.N. Katsikoudi,²
 V.G. Kontogianni,² A.G. Tzakos,²
 A.D. Tselepis¹

¹Atherothrombosis Research Center/Laboratory of Biochemistry,
²Laboratory of Organic Chemistry, Department of Chemistry,
 University of Ioannina, Ioannina, Greece

ΣΚΟΠΟΣ: Η λιποπρωτεϊνική φωσφολιπάση A₂ (Lp-PLA₂) διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην παθοφυσιολογία της αθηροσκλήρωσης καταλύοντας την υδρόλυση του παράγοντα ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων (PAF) και των οξειδωμένων φωσφολιπιδίων. Πολλές κλινικές μελέτες απέδειξαν ότι τα αυξημένα επίπεδα Lp-PLA₂ στο πλάσμα συσχετίζονται με αυξημένο καρδιαγγειακό κίνδυνο. Η κλοπιδογρέλη είναι ένα ευρέως χρησιμοποιούμενο αντιαιμοπεταλιακό φάρμακο το οποίο εκτός από ισχυρή αντιθρομβωτική δράση εμφανίζει και ποικίλες πλειοτροπικές δράσεις. Σκοπός της μελέτης ήταν η διερεύνηση της πιθανής αλληλεπίδρασης κλοπιδογρέλης - Lp-PLA₂ καθώς και των συνεπειών αυτής της αλληλεπίδρασης στην ενεργότητα της Lp-PLA₂, και στον μεταβολισμό της κλοπιδο-

AIM: Lipoprotein Phospholipase A₂ (Lp-PLA₂) plays crucial role in pathophysiology of atherosclerosis catalyzing the hydrolysis of platelet activating factor (PAF) and oxidized phospholipids. Many clinical studies have demonstrated that elevated Lp-PLA₂ levels in plasma are correlated with increased cardiovascular risk. Clopidogrel as antiplatelet therapy is still one of the drugs of choice for cardiovascular patients. Apart from potent antiplatelet activity, clopidogrel exhibits various pleiotropic effects. We investigated the possible interaction of clopidogrel with Lp-PLA₂ as well as the consequences of this interaction on the activity of Lp-PLA₂ and its metabolism *in vitro*. **MATERIAL-METHODS:** We studied the possible interaction of clopidogrel with

Αλέξανδρος Τσελέπης, MD, PhD
 Κέντρο Αθηροθρόμβωσης/Εργαστήριο Βιοχημείας,
 Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, 451 10 Ιωάννινα
 Τηλ: 26510-083 65, Fax: 26510-087 85
 e-mail: atselep@uoi.gr

Alexandros Tselepis, MD, PhD
 Atherothrombosis Research Center/Laboratory of Biochemistry,
 Department of Chemistry, University of Ioannina, GR-451 10
 Ioannina, Greece
 Tel: (+30) 26510-083 65, Fax: (+30) 26510-087 85
 e-mail: atselep@uoi.gr

γρέλης, *in vitro*. **ΥΛΙΚΟ-ΜΕΘΟΔΟΣ:** Μελετήσαμε την πιθανή αλληλεπίδραση της κλοπιδογρέλης με την Lp-PLA₂ με τη μέθοδο της φασματοσκοπίας φθορισμού καθώς και την πιθανή συμμετοχή της Lp-PLA₂ στην αποικοδόμηση της κλοπιδογρέλης με τη μέθοδο της υγρής χρωματογραφίας/φασματομετρίας μάζας (LC/MS-MS). Επίσης, μελετήσαμε την επίδραση της κλοπιδογρέλης στην ενεργότητα της Lp-PLA₂ στο πλάσμα, στην LDL και στην ανασυνδυασμένη μορφή της (rLp-PLA₂), με τη μέθοδο ζήματοποίησης με τριχλωροξεϊκό οξύ χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα, [³H]-PAF. **ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ:** Η κλοπιδογρέλη αναστέλλει κατά δόσοεξαρτώμενο τρόπο την ενζυμική ενεργότητα της Lp-PLA₂ στο πλάσμα, στην LDL και στην rLp-PLA₂. Παρόλ' αυτά, η κλοπιδογρέλη δεν αποτελεί υπόστρωμα του ενζύμου και η αλληλεπίδραση κλοπιδογρέλης - Lp-PLA₂ δεν οδηγεί στην αποικοδόμηση της κλοπιδογρέλης, αφού το φάσμα της δεν μεταβλήθηκε παρουσία του ενζύμου, όπως διαπιστώθηκε με φασματομετρία μάζας. **ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ:** Η κλοπιδογρέλη προσδένεται στην Lp-PLA₂ και αναστέλλει την ενζυμική της ενεργότητα, χωρίς όμως να υφίσταται οποιαδήποτε μεταβολική τροποποίηση. Το φαινόμενο αυτό ίσως αποτελεί μια νέα πλειοτροπική (αντιαθηρογόνο) δράση της κλοπιδογρέλης.

Λέξεις ευρετηρίου: Lp-PLA₂, κλοπιδογρέλη, αθηροσκλήρωση, πλειοτροπική δράση.

1. Εισαγωγή

Η λιποπρωτεϊνική φωσφολιπάση A₂ (Lp-PLA₂) είναι μια ανεξάρτητη ασβεστίου φωσφολιπάση A₂ η οποία μεταφέρεται στα πλάσμα συνδεδεμένη με τις λιποπρωτεΐνες, κυρίως με τις χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνες (LDL), σε ποσοστό 70% έως 80%.¹ Μικρό ποσοστό του ενζύμου στο πλάσμα συνδέεται με τις υψηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνες (HDL), τη λιποπρωτεΐνη (a), και τις πολύ χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνες (VLDL).^{2,3} Η Lp-PLA₂ ονομάστηκε αρχικά ως PAF-ακετυλοϋδρολάση καθώς η πρώτη της ενζυμική δράση που περιγράφηκε ήταν η υδρόλυση και απενεργοποίηση του προφλεγμονώδους και προαθηρογόνου παράγοντα ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων (PAF) προς lyso-PAF και οξικό οξύ.⁴ Εξαιτίας αυτής της δράσης, η Lp-PLA₂ θεωρήθηκε αρχικά ότι είναι ένα αντιφλεγμονώδες και αντιαθηρογόνο ένζυμο.^{5,6} Αργότερα, διαπιστώθηκε ότι το ένζυμο αυτό υδρολύει

rLp-PLA₂ using fluorescence spectroscopy as well as the possible degradation of clopidogrel by rLp-PLA₂ with LC-MS/MS (LC/MSD Trap SL). Also, we determined the effect of clopidogrel on recombinant Lp-PLA₂ (rLp-PLA₂) activity as well as on the enzyme activity in total plasma, and on LDL by the trichloroacetic acid precipitation method using [³H] PAF as a substrate. **RESULTS:** Clopidogrel inhibits the enzymatic activity of rLp-PLA₂, LDL and plasma Lp-PLA₂ activity in a dose-dependent manner. However, clopidogrel is not a substrate of Lp-PLA₂ and the binding of clopidogrel to rLp-PLA₂ does not result in degradation of clopidogrel, since the spectrum of clopidogrel was the same either in the presence or absence of Lp-PLA₂. **CONCLUSIONS:** Clopidogrel binds to Lp-PLA₂ and inhibits its enzyme activity, without any metabolic transformation. This phenomenon may represent a new pleiotropic (antiatherogenic) effect of clopidogrel.

Key words: Lp-PLA₂, clopidogrel, atherosclerosis, pleiotropic effect.

και τα οξειδωμένα φωσφολιπίδια (OxPL) τα οποία σχηματίζονται κατά την οξείδωση της LDL. Η υδρόλυση των OxPL από την Lp-PLA₂ έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή λυσοφωσφατιδυλοχολίνης (lyso-PC) και οξειδωμένων ελευθέρων λιπαρών οξέων (oxNEFA), τα οποία λόγω των προφλεγμονωδών και προαποπτωτικών δράσεών τους συμμετέχουν σε διάφορα στάδια ανάπτυξης της αθηρωματικής πλάκας.⁴ Η Lp-PLA₂ εκτός από την υδρόλυση του PAF και των OxPL, εμφανίζει επίσης υδρολυτική δράση έναντι των φωσφολιπιδίων που περιέχουν F2-ισοπροστάνια εστεροποιημένα στη θέση sn-2 (F2-IP-PC).⁷ Πολλές κλινικές μελέτες καθώς και μια μετα-ανάλυση που περιελάμβανε 79.036 ασθενείς απέδειξαν ότι η αύξηση των επιπέδων του ενζύμου στο πλάσμα συσχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης καρδιαγγειακής νόσου ανεξάρτητα από τους άλλους κλασικούς παράγοντες κινδύνου.⁸⁻¹¹ Επιπλέον, η έκφραση της Lp-PLA₂ στο τοίχωμα

των στεφανιαίων αγγείων είναι μεγαλύτερη στις ευάλωτες αθηρωματικές πλάκες με λεπτή ινώδη κάψα σε σχέση με τις σταθερές αθηρωματικές πλάκες, ένδειξη ότι η Lp-PLA₂ συμβάλλει στη ρήξη της αθηρωματικής πλάκας και συνεπώς στην παθοφυσιολογία των οξέων στεφανιαίων συνδρόμων.¹²

Κεντρικό ρόλο στη διαχείριση των ασθενών με οξύ στεφανιαίο σύνδρομο που υποβάλλονται σε αγγειοπλαστική διαδραματίζει η διπλή αντιαιμοπεταλιακή αγωγή με ασπιρίνη και έναν ανταγωνιστή του αιμοπεταλιακού υποδοχέα P2Y₁₂.^{13,14} Στους P2Y₁₂ ανταγωνιστές ανήκει και η κλοπιδογρέλη, ένα προφάρμακο που μεταβολίζεται *in vivo* στον φαρμακολογικά ενεργό μεταβολίτη της. Μετά τη χορήγησή της από του στόματος, απορροφάται στο έντερο με μια διαδικασία στην οποία σημαντικό ρόλο διαδραματίζει ο πρωτεϊνικός μεταφορέας MDR1 (P-γλυκοπρωτεΐνη). Το μεγαλύτερο ποσοστό (περίπου το 85%) της κλοπιδογρέλης, υδρολύεται από τις καρβοξυλεστεράσες του εντερικού βλεννογόνου και του αίματος προς έναν ανενεργό μεταβολίτη καρβοξυλικού οξέος.¹⁵ Το υπόλοιπο 15% μεταβολίζεται στο ήπαρ στον φαρμακολογικά ενεργό μεταβολίτη της με τη δράση διαφόρων ισομορφών του κυτοχρώματος P450 (CYP450). Η μετατροπή της κλοπιδογρέλης στην ενεργό μορφή της γίνεται σε δύο στάδια. Κατά το πρώτο στάδιο, οι ισομορφές CYP2C19, CYP1A2 και CYP2B6 καταλύουν την οξείδωση του δακτύλου θειοφενίου της κλοπιδογρέλης σε 2-οξο-κλοπιδογρέλη η οποία είναι ανενεργός. Η 2-οξο-κλοπιδογρέλη υπό τη δράση των CYP2C19, CYP3A4, CYP3A5, CYP2B6 και CYP2C9, υφίσταται δεύτερη οξείδωση η οποία οδηγεί στο άνοιγμα του δακτυλίου του θειοφενίου και στον σχηματισμό του ενεργού θειολικού μεταβολίτη (R130964). Ο ενεργός θειολικός μεταβολίτης της κλοπιδογρέλης δρα σχηματίζοντας δισουλφιδικούς δεσμούς με δύο κατάλοιπα κυστεΐνης (Cys17 και Cys270) της εξωκυττάριας περιοχής του υποδοχέα με αποτέλεσμα τη μη αντιστρεπτή αναστολή της πρόσδεσης του ADP στον υποδοχέα P2Y₁₂.¹⁶ Εκτός από τα κυτοχρώματα που παίζουν ρόλο στο δεύτερο στάδιο του μεταβολισμού της κλοπιδογρέλης, μελέτη έδειξε πως το ένζυμο παραοξονάση-1 (PON-1) μπορεί να διαδραματίζει σημαντικό ρόλο καταλύοντας την υδρολυτική διάσπαση του δακτυλίου της 2-οξο κλοπιδογρέλης. Επιπλέον, η PON-1 παρουσιάζει δραστηριότητα Lp-PLA₂. Ωστόσο, δεν είναι ακόμη γνωστό κατά πόσο η Lp-PLA₂ θα μπορούσε να παίζει ρόλο στον μεταβολισμό της κλοπιδογρέλης. Σκοπός της μελέτης ήταν η διερεύνηση της πιθανής αλληλεπίδρασης της κλοπιδογρέλης με την Lp-PLA₂, *in vitro* και των συνεπειών

αυτής της αλληλεπίδρασης στην ενεργότητα του ενζύμου και στον μεταβολισμό της κλοπιδογρέλης.

2. Υλικό και μέθοδος

2.1. Μελέτη της αλληλεπίδρασης κλοπιδογρέλης - Lp-PLA₂

Για τη μελέτη της πιθανής αλληλεπίδρασης της κλοπιδογρέλης με την Lp-PLA₂ χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της φασματοσκοπίας φθορισμού (φθορισμόμετρο, Perkin Elmer LS55). Αρχικά, έγινε λήψη ενός φάσματος της ανασυνδυασμένης μορφής της Lp-PLA₂ (recombinant Lp-PLA₂, rLp-PLA₂) (2 μM). Η διέγερση του ενζύμου έγινε στα 285 nm. Οι σχισμές (slits) από όπου διαπερνά η διεγείρουσα και διεγερμένη ακτινοβολία ρυθμίστηκαν αμφοτέρως στα 7 nm. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκαν τιτλοδοτήσεις αυξανόμενης συγκέντρωσης της κλοπιδογρέλης (0–20 μM) σε διάλυμα πρωτεΐνης rLp-PLA₂ σταθερής συγκέντρωσης (2 μM) σε ρυθμιστικό διάλυμα PBS, pH=7,4 σε θερμοκρασία δωματίου. Κάθε μέτρηση διαρκούσε 3 min και κάθε φορά καταγράφονταν τα αντίστοιχα φάσματα. Στη συνέχεια, κατασκευάστηκε γραφική παράσταση παίρνοντας τη μέγιστη τιμή από κάθε φάσμα και τη συγκέντρωση της κλοπιδογρέλης που έχουμε προσθέσει σε κάθε μέτρηση. Για την κατασκευή της γραφικής παράστασης, αφαιρείται από την τιμή F₀ (μέγιστη ένταση φθορισμού που λάβαμε παρουσία μόνο της rLp-PLA₂) η μέγιστη τιμή από το φάσμα που προκύπτει μετά την προσθήκη της κάθε συγκέντρωσης της κλοπιδογρέλης. Τέλος, χρησιμοποιώντας μια εξίσωση υπερβολής της μορφής $y = (P1 \cdot x) / (P2 + x)$ υπολογίζεται η συγγένεια πρόσδεσης (Kd) της κλοπιδογρέλης στην rLp-PLA₂.

2.2. Μελέτη της πιθανής αποικοδόμησης της κλοπιδογρέλης από την Lp-PLA₂

Για τη μελέτη της πιθανής συμμετοχής της rLp-PLA₂ στην αποικοδόμηση της κλοπιδογρέλης χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της υγρής χρωματογραφίας/φασματομετρίας μάζας (LC/MS-MS). Το φασματόμετρο μάζας που χρησιμοποιήθηκε ήταν το Agilent G2445 LC/MSD Trap SL εφοδιασμένο με σύστημα ηλεκτροψεκασμού (ESI). Η καταγραφή του φάσματος μάζας (full scan) πραγματοποιήθηκε από *m/z* 100 έως *m/z* 1200. Τα δεδομένα καταγράφηκαν σε συνθήκες θετικού ιοντισμού σε full scan mode (MS mode) και σε MRM (Multiple Reaction Monitoring). Η κλοπιδογρέλη (100 μM) επώαστηκε με rLp-PLA₂ συγκέντρωσης 2 μg/mL σε ρυθμιστικό διάλυμα PBS, pH=7,4 για 30 min στους

37 °C. Ελήφθη το φάσμα μάζας της κλοπιδογρέλης πριν την επώαση καθώς και στο τέλος της επώασης με την rLp-PLA₂.

2.3. Προσδιορισμός της ενεργότητας της Lp-PLA₂

Η επίδραση της κλοπιδογρέλης και του ενδιάμεσου μεταβολίτη 2-οξο κλοπιδογρέλης στην ενεργότητα της Lp-PLA₂ μελετήθηκε με τη μέθοδο ιζηματοποίησης με τριχλωροξικό οξύ χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα, [³H]-PAF (10 Ci/mmol, DuPont-New England Nuclear, Boston, MA) σε τελική συγκέντρωση 100 mM. Ως πηγή του ενζύμου χρησιμοποιήθηκαν rLp-PLA₂, πλάσμα από υγιείς εθελοντές, καθώς και LDL. Η LDL απομονώθηκε από φρέσκο πλάσμα υγιών εθελοντών με διαδοχικές υπερφυγοκεντρήσεις στην περιοχή πυκνοτήτων $d=1,006-1,063$ g/mL) χρησιμοποιώντας διάλυμα KBr, όπως έχουμε περιγράψει.¹⁷ Εν συντομία, 50 μ L πλάσματος (αραιωμένου 1:50 v/v με διάλυμα HEPES), 4 μ g LDL ή 1 μ g/mL rLp-PLA₂ αραιώνονταν με διάλυμα HEPES, pH 7,4 μέχρι τελικού όγκου 90 μ L και χρησίμευαν ως πηγή του ενζύμου. Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε στους 37 °C απουσία ή παρουσία κλοπιδογρέλης ή 2-οξο κλοπιδογρέλης σε συγκεντρώσεις από 100–10.000 μ M για 30 min και η ενεργότητα της Lp-PLA₂ εκφράστηκε ως nmoles του PAF που διασπάστηκαν ανά min ανά mg πρωτεΐνης ή mL πλάσματος.

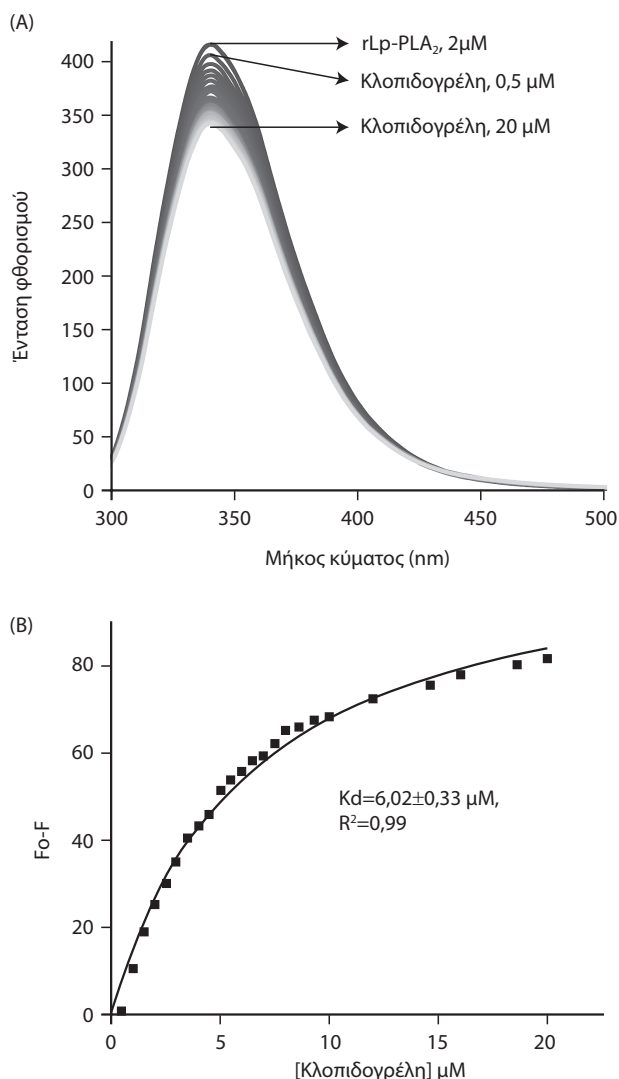
3. Στατιστική ανάλυση

Η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων έγινε με το στατιστικό πρόγραμμα IBM SPSS 21.0. Στην περιγραφική στατιστική, οι συνεχείς μεταβλητές εκφράστηκαν ως μέση τιμή \pm τυπική απόκλιση. Ο έλεγχος όλων των υποθέσεων έγινε για επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας $p<0,05$.

4. Αποτελέσματα

4.1. Μελέτη της πρόσδεσης της κλοπιδογρέλης στην Lp-PLA₂

Με πειράματα φθορισμομετρίας, όπου τιτλοδοτήθηκαν 24 διαφορετικές συγκεντρώσεις κλοπιδογρέλης αυξανόμενες από 0,5 έως 20 μ M σε σταθερή συγκέντρωση rLp-PLA₂ (2 μ M) παρατηρήθηκε σταδιακή μείωση του φθορισμού (σχήμα 1A), ένδειξη ότι κλοπιδογρέλη συνδέεται στο ένζυμο.¹⁸ Με βάση τη γραφική παράσταση φάσματος-συγκέντρωσης κλοπιδογρέλης υπολογίστηκε η τιμή K_d της πρόσδεσης της κλοπιδογρέλης στην rLp-PLA₂ ως $6,02\pm 0,33$ μ M (σχήμα 1B).

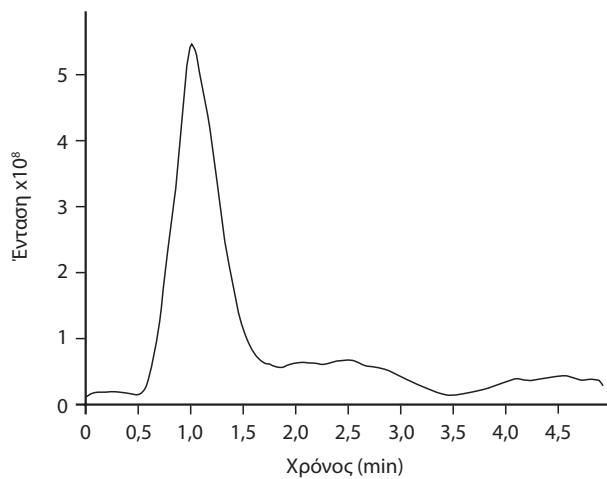


Σχήμα 1. (A) Μείωση του φθορισμού με την προσθήκη κλοπιδογρέλης, (B) Γραφική παράσταση φάσματος-συγκέντρωσης κλοπιδογρέλης και υπολογισμός της τιμής K_d.

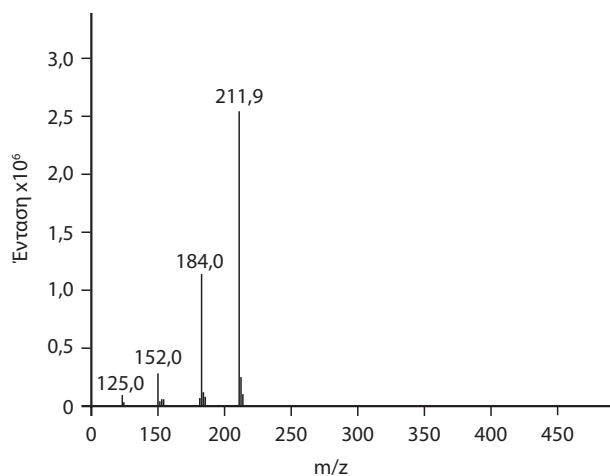
4.2. Μελέτη της επίδρασης της Lp-PLA₂ στην αποικοδόμηση της κλοπιδογρέλης

Στη συνέχεια διερευνήθηκε η υπόθεση ότι η πρόσδεση της κλοπιδογρέλης στην rLp-PLA₂ μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα την αποικοδόμηση της κλοπιδογρέλης. Η πιθανή ενζυμική αποικοδόμηση της κλοπιδογρέλης από την rLp-PLA₂ διερευνήθηκε με τη μέθοδο της υγρής χρωματογραφίας/φασματομετρίας μάζας πριν και μετά από επώαση της κλοπιδογρέλης (100 mM) με την rLp-PLA₂ (2 μ g/mL) για 30 min. Αρχικά έγινε λήψη φάσματος MRM της κλοπιδογρέλης πριν την επώαση με το ένζυμο (απομόνωση και θραυσματοποίηση της κορυφής με m/z 322 που αντιστοιχεί στην κλοπιδογρέλη).

Στη συνέχεια, καταγράφηκε το φάσμα MRM του προϊόντος της επώασης κλοπιδογρέλης με την rLp-PLA₂. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, η επώαση με το ένζυμο δεν επηρέασε το μόριο της κλοπιδογρέλης καθώς το φάσμα MRM ήταν ακριβώς το ίδιο με αυτό που λάβαμε πριν την επώαση με την rLp-PLA₂ (σχήμα 2). Τέλος, δεν ανιχνεύθηκαν τα ιόντα του ενεργού μεταβολίτη της κλοπιδογρέλης με κύριο μοριακό ιόν σε m/z 356 και του ανενεργού μεταβολίτη SR26334 με κύριο μοριακό ιόν σε m/z 308. Τέλος τα ολοκληρώματα των απομονωμένων κορυφών με m/z 322 που αντιστοιχούν στην κλοπιδογρέλη μετά από επώαση με την rLp-PLA₂ δεν διαφέρουν (σχήμα 3). Συνεπώς, η κλοπιδογρέλη δεν υφίσταται οποιαδήποτε μεταβολική τροποποίηση μετά την επώασή της με την rLp-PLA₂.



Σχήμα 2. Το συνολικό ιόν MRM της κλοπιδογρέλης (χρόνος κατακράτησης: $R_t=0,8$ min) πριν και μετά την επώαση με την rLp-PLA₂.



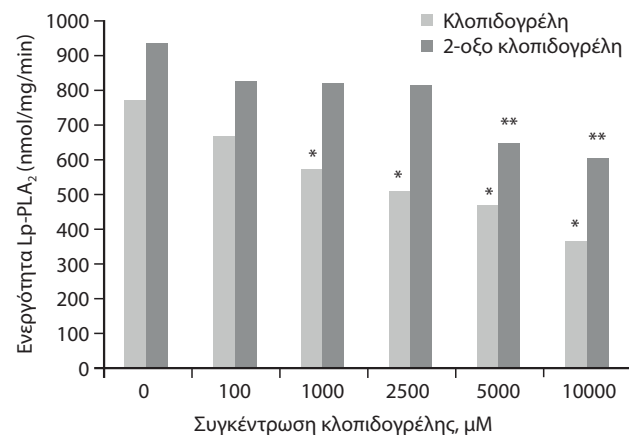
Σχήμα 3. Φάσμα MS² του κύριου ιόντος m/z 322 της κλοπιδογρέλης πριν και μετά την επώαση με την rLp-PLA₂.

4.3. Επίδραση της κλοπιδογρέλης στην ενεργότητα της Lp-PLA₂

Η πρόσδεση της κλοπιδογρέλης στην rLp-PLA₂ δεν επηρεάζει τη μεταβολική ενεργοποίηση του φαρμάκου, έχει όμως σημαντική ανασταλτική επίδραση στην ενζυμική ενεργότητα. Όπως φαίνεται στο σχήμα 4, η κλοπιδογρέλη αναστέλλει την ενεργότητα της rLp-PLA₂ κατά δοσοεξαρτώμενο τρόπο. Μεγαλύτερη αναστολή της ενζυμικής ενεργότητας παρατηρήθηκε παρουσία της κλοπιδογρέλης σε συγκεντρώσεις από 2.500 έως 10.000 μM . Το ίδιο φαινόμενο αλλά σε μικρότερη έκταση παρατηρείται και μετά από επώαση του ενζύμου με την 2-οξο κλοπιδογρέλη (σχήμα 4). Παρομοίως, η κλοπιδογρέλη αναστέλλει κατά δοσοεξαρτώμενο τρόπο την ενεργότητα της Lp-PLA₂ που είναι συνδεδεμένη με την LDL (LDL-Lp-PLA₂) (σχήμα 5A) καθώς και την ενζυμική ενεργότητα του πλάσματος (σχήμα 5B). Αξίζει να σημειωθεί πως προσθέτοντας 1.000 μM κλοπιδογρέλης στο πλάσμα, η ενζυμική ενεργότητα της Lp-PLA₂ μειώνεται κατά 50% (από $23,56 \pm 5,96$ σε $11,36 \pm 4,97$ nmol/mL/min) ενώ οι μεγαλύτερες συγκεντρώσεις κλοπιδογρέλης (2.500–10.000 μM) σχεδόν εξαλείφουν την ενζυμική ενεργότητα της Lp-PLA₂.

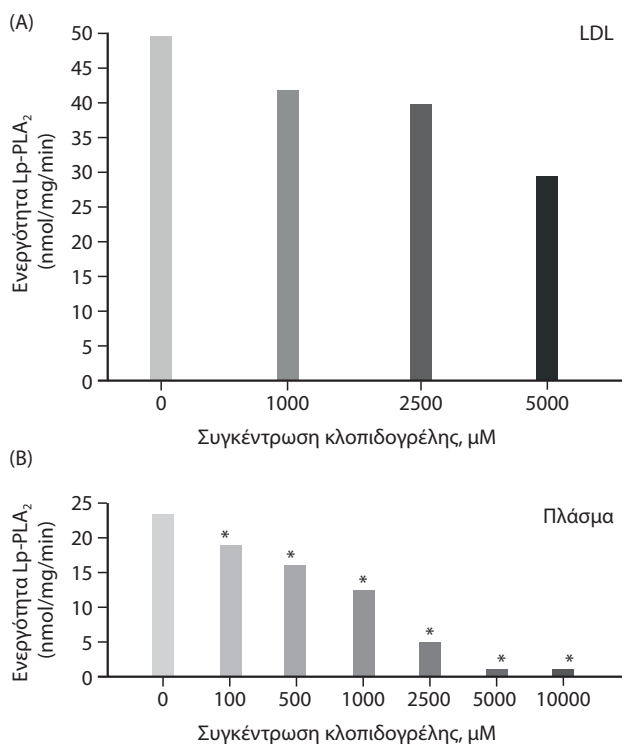
5. Συζήτηση

Στην παρούσα μελέτη διερευνήθηκε για πρώτη φορά η πιθανή αλληλεπίδραση της Lp-PLA₂ με την κλοπιδογρέλη καθώς και οι συνέπειες αυτής στην ενεργότητα του ενζύμου και στον μεταβολισμό της κλοπιδογρέλης.



Σχήμα 4. Η κλοπιδογρέλη και η 2-οξο κλοπιδογρέλη αναστέλλουν την ενεργότητα της rLp-PLA₂.

(* $P < 0,05$ και ** $P < 0,05$ σε σύγκριση με την ενεργότητα της rLp-PLA₂ απουσία της κλοπιδογρέλης και της 2-οξο κλοπιδογρέλης, αντίστοιχα).



Σχήμα 5. Η κλοπιδογρέλη αναστέλλει την ενεργότητα της (A) LDL-Lp-PLA₂ και (B) του πλάσματος.

(* $P < 0,05$ σε σύγκριση με την ενεργότητα της Lp-PLA₂ απουσία της κλοπιδογρέλης).

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, η κλοπιδογρέλη συνδέεται στην Lp-PLA₂ και μειώνει σημαντικά την ενεργότητα του ενζύμου, όμως δεν αποτελεί υπόστρωμα του ενζύμου αφού η παραπάνω αλληλεπίδραση δεν οδηγεί στην αποικοδόμηση του φαρμάκου.

Είναι γνωστό πως η κλοπιδογρέλη είναι προφάρμακο και μεταβολίζεται *in vivo* προς τον ενεργό θειολικό μεταβολίτη ο οποίος προσδέεται μη αντιστρεπτά στον υποδοχέα P2Y₁₂ των αιμοπεταλίων σχηματίζοντας δισουλφιδικούς δεσμούς με δύο κατάλοιπα κυστεΐνης (Cys17 και Cys270) του υποδοχέα.¹⁹ Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της μελέτης μας, η πρόσδεση της κλοπιδογρέλης στο ένζυμο είναι πιθανώς αντιστρεπτή όμως η φύση των δεσμών που συμβάλλουν στην πρόσδεση αυτή χρειάζεται επιπλέον διερεύνηση. Επιπρόσθετα, είναι πιθανό να υπάρχει ομοιοπολική αλληλεπίδραση μεταξύ του ενεργού μεταβολίτη της κλοπιδογρέλης και της Lp-PLA₂, παρόμοια με αυτή που παρατηρείται με τον υποδοχέα P2Y₁₂ αφού η αμινοξική αλληλουχία του ενζύμου περιλαμβάνει 5 κατάλοιπα κυστεϊνών (Cys 67, Cys 229, Cys 291, Cys 334, Cys 407).² Η πιθανή αυτή αλληλεπίδραση βρίσκεται υπό διερεύνηση από την ερευνητική μας ομάδα.

Στη συνέχεια, διερευνήθηκε αν η πρόσδεση της κλοπιδογρέλης στην Lp-PLA₂, μπορεί να οδηγήσει στον καταβολισμό της κλοπιδογρέλης. Πράγματι, εκτός από την υδρόλυση του PAF και OxPL, η Lp-PLA₂, εκφράζει ενεργότητα εστεράσης και τρανσακυλάσης έναντι υδρόφοβων υποστρωμάτων.^{7,20} Η κλοπιδογρέλη είναι υδρόφοβο μόριο και το 85% του φαρμάκου μετά την από του στόματος χορήγησή του μετατρέπεται από εστεράσες του εντερικού βλεννογόνου και του πλάσματος σε ανενεργό μεταβολίτη, ενώ μόνο το 15% του χορηγούμενου φαρμάκου μετατρέπεται στον ενεργό θειολικό μεταβολίτη που δρα στον υποδοχέα P2Y₁₂.¹⁹ Συνεπώς είναι πιθανό η κλοπιδογρέλη μετά την πρόσδεσή της στην Lp-PLA₂ να υδρολύεται μέσω της ενεργότητας εστεράσης της Lp-PLA₂ προς τον ανενεργό καρβοξυλικό μεταβολίτη. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της φασματομετρίας μάζας, το προφίλ της κλοπιδογρέλης δεν επηρεάστηκε μετά την επώασή της με την Lp-PLA₂, ενώ παράλληλα δεν ανιχνεύτηκε ο ανενεργός μεταβολίτης της, συνεπώς το ένζυμο αυτό δεν συμβάλλει στην αποικοδόμηση της κλοπιδογρέλης τουλάχιστον στο πρώτο στάδιο του μεταβολισμού της. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα προηγούμενων μελετών, σημαντικό ρόλο σε επόμενο στάδιο του μεταβολισμού της κλοπιδογρέλης και ειδικότερα στο στάδιο μετατροπής της 2-οξο κλοπιδογρέλης στον ενεργό θειολικό μεταβολίτη διαδραματίζει η PON-1,²¹ ένα ένζυμο που μεταξύ των άλλων εκφράζει και ενεργότητα Lp-PLA₂.^{7,21} Συνεπώς, η Lp-PLA₂ θα μπορούσε να συμβάλει στη μεταβολική ενεργοποίηση του φαρμάκου σε μεταγενέστερα στάδια και ειδικότερα στο τελικό στάδιο, υπόθεση η οποία βρίσκεται υπό διερεύνηση στην ερευνητική μας ομάδα.

Η πρόσδεση της κλοπιδογρέλης στην Lp-PLA₂ αν και δεν επηρεάζει το αρχικό στάδιο μεταβολισμού του φαρμάκου, έχει σημαντική ανασταλτική επίδραση στην ενεργότητα του ενζύμου. Πράγματι σύμφωνα με τα αποτελέσματά μας η κλοπιδογρέλη αναστέλλει την ενζυμική ενεργότητα της rLp-PLA₂ καθώς και την ενεργότητα του ενζύμου στο πλάσμα. Με δεδομένο ότι η Lp-PLA₂ μεταφέρεται στο πλάσμα συνδεδεμένη με τις λιποπρωτεΐνες και κυρίως με την LDL, μελετήσαμε την επίδραση της κλοπιδογρέλης στην ενζυμική ενεργότητα της LDL-Lp-PLA₂. Υπάρχουν πολλά ερευνητικά δεδομένα από μελέτες τόσο *in vitro* όσο και σε πειραματόζωα *in vivo* που δείχνουν πως η LDL-Lp-PLA₂ είναι προ-αθηρογόνο ένζυμο. Μέσα στην αθηρωματική πλάκα, η LDL-Lp-PLA₂ υδρολύει τα OxPL που μεταφέρονται με τα σωματίδια της οξειδωμένης LDL οδηγώντας στον σχηματισμό της lyso-PC και των

οxNEFA τα οποία έχουν ποικίλες αθηρογόνες δράσεις.^{22,23} Συνεπώς, η LDL-Lp-PLA₂ συμβάλει ενεργά στην αθηρογένεση.²⁴ Ο προ-αθηρογόνος ρόλος της LDL-Lp-PLA₂ υποστηρίζεται από πλειάδα μεγάλων κλινικών μελετών που δείχνουν ότι η Lp-PLA₂ του πλάσματος και κυρίως αυτή της LDL συσχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο καρδιαγγειακής νόσου.²⁵ Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της μελέτης μας, η κλοπιδογρέλη αναστέλλει την ενεργότητα της LDL-Lp-PLA₂. Προηγούμενες μελέτες έχουν αποδείξει ότι εκτός από την αναστολή της ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων, η κλοπιδογρέλη εμφανίζει ποικίλες βιολογικές δράσεις (πλειοτροπικές δράσεις) πολλές από τις οποίες είναι ανεξάρτητες της δράσης του φαρμάκου στα αιμοπετάλια.²⁵⁻²⁷ Συνεπώς, η μείωση της ενεργότητας της LDL-Lp-PLA₂ από την κλοπιδογρέλη μπορεί να αποτελεί μια νέα πλειοτροπική δράση (αντιαθηρογόνο) του φαρμάκου αυτού. Η δράση αυτή θα πρέπει να αποδειχθεί και *in vivo*, σε ασθενείς με καρδιαγγειακή νόσο που λαμβάνουν αντιαιμοπεταλιακή αγωγή με κλοπιδογρέλη, φαινόμενο που βρίσκεται ήδη υπό διερεύνηση από την ερευνητική μας ομάδα.

Συμπερασματικά, η μελέτη αυτή δείχνει για πρώτη φορά πως η κλοπιδογρέλη συνδέεται στην Lp-PLA₂ και αναστέλλει την ενζυμική της ενεργότητα, ενώ το ένζυμο δεν προκαλεί την αποικοδόμησή της. Ο μηχανισμός πρόσδεσης της κλοπιδογρέλης στην Lp-PLA₂ καθώς και η κλινική σημασία της αναστολής του ενζύμου από το αντιαιμοπεταλιακό αυτό φάρμακο χρειάζονται περισσότερη διερεύνηση.

Ευχαριστίες

Η παρούσα εργασία υποστηρίχθηκε μερικώς διαμέσου υποτροφίας προς τη Μαρία Τσουμάνη από την Ελληνική Εταιρεία Αθηροσκλήρωσης.

Βιβλιογραφία

1. Tselepis AD, John Chapman M. Inflammation, bioactive lipids and atherosclerosis: potential roles of a lipoprotein-associated phospholipase A₂, platelet activating factor-acetylhydrolase. *Atheroscler Suppl* 2002, 3:57-68
2. Stafforini DM, Tjoelker LW, McCormick SP et al. Molecular basis of the interaction between plasma platelet-activating factor acetylhydrolase and low density lipoprotein. *J Biol Chem* 1999, 274:7018-7024
3. Stafforini DM, McIntyre TM, Carter ME et al. Human plasma platelet-activating factor acetylhydrolase. Association with lipoprotein particles and role in the degradation of platelet-activating factor. *J Biol Chem* 1987, 262:4215-4222
4. Karasawa K, Harada A, Satoh N et al. Plasma platelet activating factor-acetylhydrolase (PAF-AH). *Prog Lipid Res* 2003, 42:93-114
5. Karabina SA, Ninio E. Plasma PAF-acetylhydrolase: an unfulfilled promise? *Biochim Biophys Acta* 2006, 1761:1351-1358
6. Watson AD, Navab M, Hama SY et al. Effect of platelet activating factor-acetylhydrolase on the formation and action of minimally oxidized low density lipoprotein. *J Clin Invest* 1995, 95:774-782
7. Tellis CC, Tselepis AD. The role of lipoprotein-associated phospholipase A₂ in atherosclerosis may depend on its lipoprotein carrier in plasma. *Biochim Biophys Acta* 2009, 1791:327-338
8. Thompson A, Gao P, Orfei L et al. Lipoprotein-associated phospholipase A₂ and risk of coronary disease, stroke, and mortality: collaborative analysis of 32 prospective studies. *Lancet* 2010, 375:1536-1544
9. Ballantyne CM, Hoogeveen RC, Bang H et al. Lipoprotein-associated phospholipase A₂, high-sensitivity C-reactive protein, and risk for incident coronary heart disease in middle-aged men and women in the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) study. *Circulation* 2004, 109:837-842
10. Oei HH, van der Meer IM, Hofman A et al. Lipoprotein-associated phospholipase A₂ activity is associated with risk of coronary heart disease and ischemic stroke: the Rotterdam Study. *Circulation* 2005, 111:570-575
11. Casas JP, Ninio E, Panayiotou A et al. PLA₂G₇ genotype, lipoprotein-associated phospholipase A₂ activity, and coronary heart disease risk in 10,494 cases and 15,624 controls of European Ancestry. *Circulation* 2010, 121:2284-2293
12. Mannheim D, Herrmann J, Versari D et al. Enhanced expression of Lp-PLA₂ and lysophosphatidylcholine in symptomatic carotid atherosclerotic plaques. *Stroke* 2008, 39:1448-1455
13. Chen ZM, Jiang LX, Chen YP et al. Addition of clopidogrel to aspirin in 45,852 patients with acute myocardial infarction: randomised placebo-controlled trial. *Lancet* 2005, 366:1607-1621
14. Fox KA, Mehta SR, Peters R et al. Benefits and risks of the combination of clopidogrel and aspirin in patients undergoing surgical revascularization for non-ST-elevation acute coronary syndrome: the Clopidogrel in Unstable angina to prevent Recurrent ischemic Events (CURE) Trial. *Circulation* 2004, 110:1202-1208
15. Zupancic V, Smrkolj M, Benkic P et al. Preformulation investigation of some clopidogrel addition salts. *Acta Chim Slov* 2010, 57:376-385
16. Wallentin L. P₂Y₁₂ inhibitors: differences in properties and mechanisms of action and potential consequences for clinical use. *Eu Heart J* 2009, 30:1964-1977
17. Liapikos TA, Antonopoulou S, Karabina SP et al. Platelet-activating factor formation during oxidative modification of low-density lipoprotein when PAF-acetylhydrolase has been inactivated. *Biochim Biophys Acta* 1994, 1212:353-360
18. Jun HW, Luzzi LA. Fluorescence techniques in drug-plasma protein binding. *J Pharm Sci* 1971, 60:1430-1431
19. Kalantzi KI, Tsoumani ME, Goudevenos IA et al. Pharmacodynamic properties of antiplatelet agents: current knowledge and future perspectives. *Expert Rev Clin Pharmacol* 2012, 5: 319-336
20. Tselepis AD, Dentan C, Karabina SA et al. PAF-degrading acetylhydrolase is preferentially associated with dense LDL and VLDL-1 in human plasma. Catalytic characteristics and relation

- to the monocyte-derived enzyme. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995, 15:1764–1773
21. Bouman HJ, Schomig E, van Werkum JW et al. Paraoxonase-1 is a major determinant of clopidogrel efficacy. *Nat Med* 2011, 17:110–116
22. MacPhee CH, Moores KE, Boyd HF et al. Lipoprotein-associated phospholipase A₂, platelet-activating factor acetylhydrolase, generates two bioactive products during the oxidation of low-density lipoprotein: use of a novel inhibitor. *Biochem J* 1999, 338: 479–487
23. Steen DL, O'Donoghue ML. Lp-PLA₂ Inhibitors for the Reduction of Cardiovascular Events. *Cardiol Ther* 2013, 2:125–134
24. Tribble DL, Holl LG, Wood PD et al. Variations in oxidative susceptibility among six low density lipoprotein subfractions of differing density and particle size. *Atherosclerosis* 1992, 93:189–199
25. Tellis CC, Tselepis AD. Pathophysiological role and clinical significance of lipoprotein-associated phospholipase A₂ (Lp-PLA₂) bound to LDL and HDL. *Curr Pharm Des* 2014, 20:6256–6269
26. Adamski P, Kozinski M, Ostrowska M et al. Overview of pleiotropic effects of platelet P₂Y₁₂ receptor inhibitors. *Thromb Haemost* 2014, 112:224–242
27. Tsoumani ME, Kalantzi KI, Goudevenos IA et al. Platelet-mediated inflammation in cardiovascular disease. Potential role of platelet-endothelium interactions. *Curr Vasc Pharmacol* 2012, 10:539–549

Ημερομηνία Υποβολής 11/05/2015

Ημερομηνία Έγκρισης 26/06/2015