



ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ
Εθνικόν και Καποδιστριακόν Πανεπιστήμιον
Αθηνών
Ιατρική Σχολή

Αγγειοχειρουργική Κλινική
Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Αθηνών

Κέντρο Κλινικής, Πειραματικής Χειρουργικής & Μεταφραστικής
Έρευνας
Ίδρυμα Ιατροβιολογικών Ερευνών Ακαδημίας Αθηνών

Η επίδραση της απότομης διακοπής λήψης στατινών στην
αστάθεια της αθηρωματικής πλάκας

Διδακτορική Διατριβή
της
Μαριάννας Στασινοπούλου
Βιολόγου

ΑΘΗΝΑ, 2019

*Στην μητέρα μου,
Για την αγάπη και την υποστήριξή της*

Πρόλογος

Η διεξαγωγή και η περαίωση μιας διδακτορικής διατριβής αποτελεί μια σκληρή αλλά συγχρόνως επικοδομητική εμπειρία. Φθάνοντας στο τέλος της συγγραφής της παρούσας διατριβής συνειδητοποίησα ότι αποτέλεσε τον καρπό προσωπικού αγώνα, αλλά συγχρόνως και συνδρομής και υποστήριξης πολλών ανθρώπων, στους οποίους θέλω να εκφράσω την ειλικρινή μου ευγνωμοσύνη.

Θα ήθελα καταρχάς να ευχαριστήσω θερμά εκ βάθους καρδιάς τον Αναπληρωτή Καθηγητή Αγγειοχειρουργικής της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Αθηνών, Ιωάννη Κακίση για την ανάθεση της διδακτορικής αυτής διατριβής, την εμπιστοσύνη προς το πρόσωπο μου καθώς και την πλήρη συμπαράσταση σε όλους τους τομείς μέχρι την επιτυχή ολοκλήρωση της προσπάθειας μου.

Θερμά ευχαριστώ επίσης τον Ομότιμο Καθηγητή της Αγγειοχειρουργικής, Χρήστο Λιάπη για την αμέριστη υποστήριξη και παρότρυνση καθ'όλη τη διάρκεια της διατριβής καθώς και άλλα ερευνητικά έργα.

Τα πειράματα της παρούσας διδακτορικής διατριβής πραγματοποιήθηκαν στο Κέντρο Κλινικής, Πειραματικής Χειρουργικής & Μεταφραστικής Έρευνας του Ιδρύματος Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών, όπου προϊστάμενος του Τομέα Ζωικών Προτύπων του Ιδρύματος και υπεύθυνος κτηνίατρος του Κέντρου Πειραματικής Χειρουργικής είναι ο Δρ. Νικόλαος Κωστομητσόπουλος. Είμαι ευγνώμων για τον πολύτιμο χρόνο που μου αφιέρωσε, τις γνώσεις που μου μετέδωσε και την αμέριστη στήριξη του στα πρώτα μου επιστημονικά βήματα μέσα σε ένα ιδιαίτερο κλίμα συνεργασίας.

Δε θα μπορούσα επίσης να παραλείψω να ευχαριστήσω θερμότερα τους πολύτιμους συνεργάτες και συναδέλφους που με βοήθησαν κατά τα στάδια διεξαγωγής των πειραματικών διαδικασιών της διατριβής μου. Ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω στον Δρ. Νικόλαο Καδόγλου, Καρδιολόγο του οποίου η ενεργός συνεισφορά και οι επιστημονικές συμβουλές, υπήρξαν πολύτιμες σε όλη τη διάρκεια της διατριβής μου.

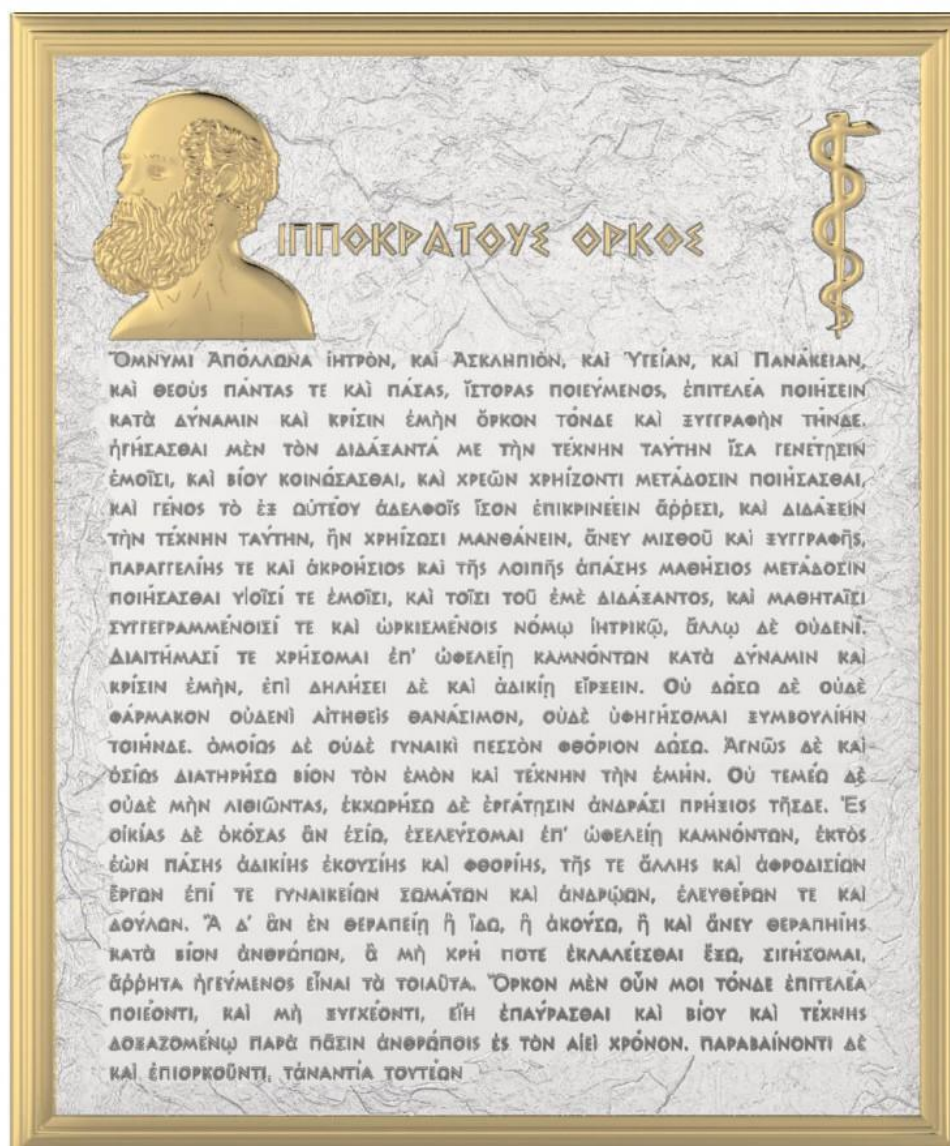
Δεν θα πρέπει να παραλείψω να ευχαριστήσω την πολύ καλή μου φίλη και συνεργάτη Ειρήνη Χριστοδούλου, Φαρμακοποιό για την βοήθεια και την υποστήριξή της στις ευχάριστες αλλά και δυσάρεστες στιγμές αυτής της διαδρομής.

Ιδιαίτερα ευχαριστώ τους εργαζόμενους στον Τομέα Ζωικών Προτύπων για την πολύτιμη βοήθειά τους όχι μόνο στη διεξαγωγή αυτής της εργασίας, το ευχάριστο περιβάλλον που δημιούργησαν με το χιούμορ και την καλή τους διάθεση αλλά και για την αμέριστη υποστήριξή τους όλα αυτά τα χρόνια.

Ένα ξεχωριστό ευχαριστώ όμως οφείλω στη Βασιλική Ρίζου, Ζωοκόμο όχι μόνο για τη βοήθεια της αλλά περισσότερο για τη φιλία της και την συμπαράστασή της στις δύσκολες στιγμές αυτών των χρόνων.

Τέλος, το μεγαλύτερο ευχαριστώ οφείλω στην οικογένεια μου για την αγάπη και τη στήριξή τους κατά τη διάρκεια των σπουδών μου και τους φίλους μου κυρίως για την ηθική συμπαράσταση που μου παρείχαν.

Μαριάννα Στασινοπούλου



Μαριάννα Στασινοπούλου – Διδακτορική Διατριβή

Ημερομηνία υποβολής αιτήσεως: 26/04/2013

Ημερομηνία ορισμού 3μελούς συμβουλευτικής επιτροπής: 16/07/2013

Ημερομηνία ορισμού του θέματος: 14/2/2014

Ημερομηνία ορισμού επταμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: 23/5/2019

Ημερομηνία κατάθεσης Διδακτορικής Διατριβής: 08/07/2019

Η τριμελής επιτροπή

- Κακίσης Ιωάννης, Καθηγητής Αγγειοχειρουργικής, Ιατρική Σχολή Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών (Επιβλέπων)
- Λιάπης Χρήστος, Ομότιμος Καθηγητής Αγγειοχειρουργικής, Ιατρική Σχολή Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών
- Λάζαρης Ανδρέας, Αναπληρωτής Καθηγητής Αγγειοχειρουργικής, Ιατρική Σχολή Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών

Η επταμελής επιτροπή:

- Γερούλακος Γεώργιος, Καθηγητής Αγγειοχειρουργικής, Ιατρική Σχολή Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών
- Βαλσαμή Γεωργία, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Φαρμακευτικής, Τμήμα Φαρμακευτικής Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών
- Αγγουράς Δημήτριος, Αναπληρωτής Καθηγητής Καρδιοχειρουργικής, Ιατρική Σχολή Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών
- Πατάπης Παύλος, Αναπληρωτής Καθηγητής Χειρουργικής, Ιατρική Σχολή Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών

Πρόεδρος Ιατρικής Σχολής

Σφηκάκης Πέτρος, Καθηγητής

Βαθμός

Άριστα

Η έγκριση της Διδακτορικής Διατριβής υπό του Ιατρικού Τμήματος του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών δεν υποδηλοί την αποδοχή των γνώμων του συγγραφέως.

Νόμος 5343/1932, Άρθρο 202, παρ. 2

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

Προσωπικά Στοιχεία

Όνομα: Μαριάννα
Επώνυμο: Στασινοπούλου
Τόπος γέννησης: Χολαργός Αττικής
Email: stasinop@biol.uoa.gr

Εκπαίδευση

2013- Υποψήφια Διδάκτορας Ιατρικής Σχολής Ε.Κ.Π.Α με θέμα «Η επίδραση της απότομης διακοπής λήψης στατίνης στην αστάθεια της αθηρωματικής πλάκας»

2010-2012 Απόφοιτος του Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης «Εφαρμογές της Βιολογίας στην Ιατρική» του Εθνικού Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών Συνεργασία του Τμήματος Βιολογίας Αθηνών με την Ιατρική Σχολή Αθηνών.
Βαθμός: 8,4

2010 Απόφοιτος της Σχολής Θετικών Επιστημών του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών του τμήματος Βιολογίας Βαθμός: 6,75

Ξένες Γλώσσες: Γαλλικά- κάτοχος DALF
Αγγλικά- κάτοχος Proficiency
Ισπανικά-κάτοχος Diploma Superior
Διδακτική επάρκεια και στις 3 Γλώσσες

Γνώση υπολογιστών: Πολύ καλή - Κάτοχος E.C.D.L
Στατιστική επεξεργασία δεδομένων (SPSS)

Εργασιακή Εμπειρία

2013- Accurate Health Auditing & Consulting – Θέση Διοικητικού προσωπικού με αντικείμενο τη δημιουργία παρακολούθηση και επίδοση στο αρμόδιο ιατρικό τμήμα φακέλων ασθενών που σχετίζονται με τη νοσηλεία και την αποζημίωση τους από την ασφαλιστική τους εταιρεία.

2011 - ΠΒΕΑΑ Κέντρο Πειραματικής Χειρουργικής
Εκπόνηση μεταπτυχιακής και διδακτορικής διατριβής και συνεργασία ως έμμισθη εξωτερική συνεργάτης σε καρδιαγγειακά πρωτόκολλα.

2011 - 2016 Μεταφράστρια κειμένων ιατρικού και φαρμακευτικού ενδιαφέροντος με κατ' αποκοπήν απασχόληση.

2006 -2014 Καθηγήτρια Βιολογίας σε μαθητές Λυκείου στο «Θεματικό» Φροντιστήριο Μέσης Εκπαίδευσης καθώς και ως ελεύθερος επαγγελματίας.

Επαγγελματική κατάρτιση

- Σεμινάριο επαγγελματικής κατάρτισης με φορέα συντονισμού τον ΟΑΕΔ και φορέα υλοποίησης το ΚΕΚ Ευρωεργασιακή με θέμα «Επιταγή εισόδου στην αγορά εργασίας για άνεργους νέους έως 29 ετών» και αντικείμενο τη Διοικητική Υποστήριξη και Στελέχωση Επιχειρήσεων και Φορέων (Ιούλιος 2013 με Νοέμβριος 2013).
- 02-12/10/2017 Συμμετοχή στο εκπαιδευτικό σεμινάριο 3ο Laboratory Animal Science (LAS) EU Functions Course, στο Νοσοκομείο ΚΑΤ που οδήγησε στην απόκτηση του Πανευρωπαϊκός αναγνωριζόμενου τίτλου (FELASA C accreditation).για το χειρισμό ζώων εργαστηρίου.

Διακρίσεις - Βραβεύσεις

1. **Η σιλοσταζόλη επιδρά στο μηχανισμό έκκρισης κυτταροκινών κατά την οξεία φάση φλεγμονής, σε μοντέλα περιφερικής ισχαιμίας ανοσοανεπαρκούς και αγρίου τύπου μύος, διαφοροποιώντας την επαγόμενη αγγειογένεση**
17ο Πανελλήνιο Συνέδριο Αγγειακής και Ενδαγγειακής Χειρουργικής – Αγγειολογίας, Θεσ/νίκη, 15-18 Μαρτίου 2018
Πρώτο Βραβείο ελεύθερης ανακοίνωσης
2. **Η απότομη διακοπή χορήγησης στατίνης οδηγεί σε άμεση αποσταθεροποίηση της αθηρωματικής πλάκας σε διαγονιδιακούς μύες**
16ο Πανελλήνιο Συνέδριο Αγγειακής και Ενδαγγειακής Χειρουργικής – Αγγειολογίας, Αθήνα 03-05 Μαρτίου 2017, Πρώτο Βραβείο Παρουσίασης E-poster
3. **An intravenous catheterization method for mice undergoing dynamic microPET/CT imaging**
Scand-LAS Annual Meeting Turku 9-12 June 2015, First price for the best poster
4. **An easy and “enriched” method for oestrous synchronisation in Mice**
Scand - LAS Annual Meeting Stockholm 24 - 27 April 2014, First price for the best poster

Δημοσιεύσεις

1. Statins’ withdrawal induces atherosclerotic plaques destabilization in animal model – a “rebound” stimulation of inflammation. (Stasinopoulou et al. J Cardiovasc Pharmacol Ther. 2019 -in press)
2. Beneficial Effect of U-74389 G and Sildenafil in An Experimental Model of Flap Ischemia/Reperfusion Injury in Swine. Histological and Biochemical Evaluation of the Model. (Karamatsoukis et al. J Invest Surg. 2018 Nov 30:1-13)
3. Lighting environment: What colour of light do male C57BL/6J prefer? (Paronis et al. Applied Animal Behaviour Science 209 (2018) 99–103)
4. Crocus sativus L. aqueous extract reduces atherogenesis, increases atherosclerotic plaque stability and improves glucose control in diabetic atherosclerotic animals (Christodoulou et al. Atherosclerosis. 2018 Jan;268:207-214)

5. Valuation of three different anaesthetic protocols on complete blood count and biochemical parameters on Wistar rats. (Lelovas et al. Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society, 2018: 68(4), 587-598)
6. Synchronisation of oestrous cycle on C57BL/6J mice after the introduction of a hanging perforated container with bedding soaked by the excretions of male mice (Balafas et al. Animal Technology and Welfare, April 2018)
7. Evaluation of the effects of tramadol on analgesic response and locomotor activity on two different strains of laboratory mice. (Symeon et al. Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society, 2018: 68(1), 89-96)
8. Two case studies of 129/Svtesticular teratoma. (Siskos et al. Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society, 2018: 68(1), 97-102)
9. Assessing the exploratory and anxiety-related behaviors of mice. Do different caging systems affect the outcome of behavioral tests? (Polissidis et al. Physiol Behav. 2017 Aug 1;177:68-73)
10. Effects of pre- and postnatal exposure to 1880-1900MHz DECT base radiation on development in the rat. (Stasinopoulou et al. Reprod Toxicol. 2016 Oct;65:248-262)
11. Use of real-time ultrasonography as an alternative method for early detection, confirmation and evaluation of rat pregnancy. (Stasinopoulou et al. Ultrasound Med Biol. 2014 Jun;40(6):1372-8)

Παρουσιάσεις σε Συνέδρια

- **15-18/03/2018** Προφορική παρουσίαση στο 17ο Πανελλήνιο Συνέδριο Αγγειακής και Ενδαγγειακής Χειρουργικής – Αγγειολογίας, Θεσ/νίκη με τίτλο «Η σιλοσταζόλη επιδρά στο μηχανισμό έκκρισης κυτταροκινών κατά την οξεία φάση φλεγμονής, σε μοντέλα περιφερικής ισχαιμίας ανοσοανεπαρκούς και αγρίου τύπου μυός, διαφοροποιώντας την επαγόμενη αγγειογέννεση» και «Καρωτιδική αγγειοπλαστική σε αθηρωσκληρωτικούς κονικλούς: Η επίδραση της αντιαιμοπεταλιακής αγωγής»
- **19-22/09/2017** Προφορική παρουσίαση στο ESVS 31st Annual Meeting, Lyon με τίτλο «The comparative effects of ticagrelor and clopidogrel on arterial injury and in-stent restenosis and thrombosis of carotid artery in atherosclerotic rabbits»
- **11-14/05/2017** 66th International Congress of ESCVS με τίτλο « Adverse effects of statin withdrawal in a mouse model of atherosclerosis»
- **03-05/03/2017** Παρουσίαση E-poster στο 16ο Πανελλήνιο Συνέδριο Αγγειολογίας-Αγγειακής και Ενδαγγειακής Χειρουργικής με τίτλο «Η ΑΠΟΤΟΜΗ ΔΙΑΚΟΠΗ ΧΟΡΗΓΗΣΗΣ ΣΤΑΤΙΝΗΣ ΟΔΗΓΕΙ ΣΕ ΑΜΕΣΗ ΑΠΟΣΤΑΘΕΡΟΠΟΙΗΣΗ ΤΗΣ ΑΘΗΡΩΜΑΤΙΚΗΣ ΠΛΑΚΑΣ ΣΕ ΔΙΑΓΟΝΙΔΙΑΚΟΥΣ ΜΥΕΣ»

- **09-12/06/2015** Παρουσίαση poster στο Συνέδριο της ScandLas (Scand-LAS Annual Meeting Turku) με τίτλο «An intravenous catheterization method for mice undergoing dynamic microPET/CT imaging»
- **08-10/05/2015** Προφορική παρουσίαση στο 13ο Πανελλήνιο Κτηνιατρικό Συνέδριο με τίτλο «Η επίδραση δύο διαφορετικών αναισθητικών πρωτοκόλλων σε επίμυες της φυλής Wistar»
- **04-06/12/2014** Προφορική παρουσίαση στο 6ο Συνέδριο Ελληνικής Εταιρείας Αθηροσκλήρωσης με τίτλο «Η ΔΙΑΚΟΠΗ ΧΟΡΗΓΗΣΗΣ ΣΤΑΤΙΝΗΣ ΟΔΗΓΕΙ ΣΕ ΑΠΟΤΟΜΗ ΑΠΟΣΤΑΘΕΡΟΠΟΙΗΣΗ ΤΗΣ ΑΘΗΡΩΜΑΤΙΚΗΣ ΠΛΑΚΑΣ ΣΕ ΔΙΑΓΟΝΙΔΙΑΚΟΥΣ ΜΥΕΣ»
- **22-23/09/2014** Παρουσίαση poster στο Συνέδριο «Joint HSBLAS/ESLAV/ECLAM Meeting» με θέμα «The adverse effects of statin removal in atherosclerosis-prone mice»
- **24-27/04/2014** Παρουσίαση poster στο Συνέδριο της ScandLas (Scand - LAS Annual Meeting Stockholm) με τίτλο «An easy and “enriched” method for oestrous synchronisation in mice»
- **29/11-01/12/2013** Παρουσίαση poster 26ο Συνέδριο της Ελληνικής Εταιρείας για τις Νευροεπιστήμες, με θέμα «PYRAMIDAL CELL LOSS AND GFAP INCREASE IN THE CA4 REGION OF HIPPOCAMPUS AFTER IN UTERO EXPOSURE OF RATS TO CORDLESS PHONERADIATION»
- **10-13/06/2013** Παρουσίαση poster στο 12ο Επιστημονικό Συνέδριο της FELASA στη Βαρκελώνη, με θέμα «Using real time ultrasonography for the early detection and evaluation of rat pregnancy»
- **18-20/10/2012** Προφορική παρουσίαση στο 24ο Ιατρικό Συνέδριο Ενόπλων Δυνάμεων στη Θεσσαλονίκη, με θέματα « ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΗΣ ΗΜΕΡΑΣ ΚΥΗΣΗΣ ΕΠΕΙΤΑ ΑΠΟ ΥΠΕΡΗΧΟΤΟΜΟΓΡΑΦΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΣΕ ΕΠΙΜΥΕΣ» και «Η ΣΗΜΑΣΙΑ ΤΗΣ ΥΠΕΡΗΧΟΤΟΜΟΓΡΑΦΙΚΗΣ ΕΞΕΤΑΣΗΣ ΣΤΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΚΑΙ ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΗΣ ΚΥΟΦΟΡΙΑΣ ΣΤΟΝ ΕΠΙΜΥ»
- **17-19/05/2012** Προφορική παρουσίαση στο 34ο Ετήσιο Επιστημονικό Συνέδριο της ΕΕΒΕ στα Τρίκαλα, με θέμα «ΕΚΘΕΣΗ ΕΠΙΜΥΩΝ ΣΕ ΑΚΤΙΝΟΒΟΛΙΑ ΑΣΥΡΜΑΤΟΥ ΤΗΛΕΦΩΝΟΥ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΚΥΗΣΗ : ΕΠΙΠΤΩΣΕΙΣ ΣΕ ΕΜΒΡΥΑ, ΝΕΟΓΕΝΝΗΤΑ ΚΑΙ ΕΝΗΛΙΚΑ ΑΤΟΜΑ»
- **14-16/05/2009** Προφορική παρουσίαση στο 31ο Ετήσιο Επιστημονικό Συνέδριο της ΕΕΒΕ στην Πάτρα, με θέμα «ΔΙΑΤΑΡΑΧΗ ΒΡΑΧΥΠΡΟΘΕΣΜΗΣ ΜΝΗΜΗΣ ΜΕ ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΑΚΤΙΝΟΒΟΛΙΑΣ ΚΙΝΗΤΩΝ ΤΗΛΕΦΩΝΩΝ ΣΕ ΜΥΣ Mus musculus»

- **22-24/05/2008** Προφορική παρουσίαση στο 30ο Ετήσιο Επιστημονικό Συνέδριο της ΕΕΒΕ στη Θεσσαλονίκη, με θέμα «ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΗΛΕΚΤΟΜΑΓΝΗΤΙΚΗΣ ΑΚΤΙΝΟΒΟΛΙΑΣ ΚΙΝΗΤΩΝ ΚΑΙ ΑΣΥΡΜΑΤΩΝ, ΨΗΦΙΑΚΩΝ ΤΗΛΕΦΩΝΩΝ, ΣΤΗ ΣΥΜΠΕΡΙΦΟΡΑ ΚΑΙ ΣΤΗΝ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΜΥΩΝ»

Ερευνητικό Έργο

Αμειβόμενος επιστημονικός συνεργάτης χρηματοδοτούμενο ερευνητικό πρόγραμμα από την Φαρμακευτική Εταιρεία AstraZeneca με τίτλο «The potential protective role of ticagrelor in arterial injury and in-stent thrombosis of carotid artery» το διάστημα 01/04/2016-31/03/2017.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

	Σελίδα
ΕΝΟΤΗΤΑ	
ΜΕΡΟΣ ΠΡΩΤΟ: ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	
1. Εισαγωγή	1
1.1 Καρδιαγγειακά νοσήματα	1
1.1.1 Παράγοντες κινδύνου	1
1.2 Αθηρωμάτωση	4
1.2.1 Έναρξη σχηματισμού πλάκας - ενδοθηλιακή δυσλειτουργία	6
1.2.1.1 Φλεγμονή	6
1.2.1.2 Σχηματισμός αφρωδών κυττάρων	9
1.2.1.3 Μετανάστευση και Πολλαπλασιασμός των Αγγειακών Λείων Μυϊκών Κυττάρων	11
1.2.2 Σταθερότητα της αθηρωματικής πλάκας	12
1.2.3 Ρήξη της Πλάκας και Σχηματισμός Θρόμβου	14
1.2.4 Η σημασία του εξοκυττάρου σκελετού στην αθηρωμάτωση	18
1.2.4.1 Κολλαγόνο και αθηρωμάτωση	19
1.2.4.2 Ελαστίνη και αθηρωμάτωση	20
1.2.5 Ο ρόλος των μακροφάγων στην ανάπτυξη κι εξέλιξη της αθηρωμάτωσης.	22
1.2.5.1 Τα μακροφάγα στην πρόιμη αθηρωματική αλλοίωση	23
1.2.5.2 Τα μακροφάγα στην εξελιγμένη αθηρωματική αλλοίωση	24
1.2.5.3 Κυτταρική νέκρωση και σχηματισμός νεκρωτικού πυρήνα	25
1.2.5.4 Η πρωτεολυτική δράση των μακροφάγων	26
1.2.6 Λεία μυϊκά κύτταρα και αθηρωμάτωση	26
1.2.6.1 Ο ρόλος των VSMCs στην αθηρωμάτωση	27
1.2.6.2 Ρύθμιση της αύξησης των VSMCs	27
1.2.6.3 Ρύθμιση της μετανάστευσης των VSMCs	28
1.2.6.4 Η απόπτωση των VSMCs	29
1.2.7 Η Οικογένεια των μεταλλοπρωτεϊνών δικτύου (MMPs)	30
1.2.7.1 Δομή και ταξινόμηση των MMPs	30
1.2.7.2 Η ρύθμιση της λειτουργίας των MMPs	32
1.2.7.3 Οι MMPs στην αθηρωμάτωση	38
1.2.8 Οι ιστικοί αναστολείς των MMPs (TIMPs)	42
1.2.8.1 Η αναστολή των MMPs και το σύμπλοκο TIMP-MMP	43
1.2.8.2 Ιστολογική κατανομή και λειτουργία των TIMPs	44
1.2.8.3 Οι πλειοτροπικές λειτουργίες των TIMPs	45
1.2.8.4 Οι TIMPs και η αθηρωμάτωση	46
1.2.9 Κυτοκίνες	49
1.2.9.1 Γενικές ιδιότητες των κυτοκινών	50
1.2.9.2 Παράγων νέκρωσης των όγκων (tumor necrosis factor, TNF-α)	53
1.2.9.2.1 Ο ρόλος του TNF-α στην αθηρωμάτωση	54
1.2.10 Χημειοκίνες	56
1.2.10.1 Χημειοτακτική πρωτεΐνη 1 των μονοκυττάρων-MCP-1	58
1.2.10.1.1 MCP-1 και αθηρωμάτωση	58
1.2.11 Στατίνες και αθηρωμάτωση	59
1.2.11.1 Μηχανισμός δράσης των στατινών	60

1.2.11.2	Είδη στατινών και σχετική αποδοτικότητα	61
1.2.11.3	Ιατρικές χρήσεις και αποτελέσματα	62
1.2.11.4	Οι πλειοτροπικές αθηροπροστατευτικές δράσεις των στατινών	63
1.2.12	Οι ApoE-/- μύες ως ζωικό πρότυπο μελέτης της αθηρωμάτωσης	64
1.2.12.1	Χαρακτηριστικά ζωικού προτύπου	64
1.2.12.2	Οι μύες με ομόζυγη έλλειψη απολιποπρωτεΐνης E	66
1.2.12.3	Ανάπτυξη αθηρωμάτωσης σε ApoE-/- μύες	68
ΜΕΡΟΣ ΔΕΥΤΕΡΟ: ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ		
2.	Υλικά και Μέθοδοι	72
2.1	Ζωικά πρότυπα – Εργαστηριακές συνθήκες	72
2.1.1	Πειραματικό πρότυπο: Ανάπτυξη αθηρωμάτωσης	73
2.2	Πειραματικός σχεδιασμός	73
2.2.1	Χορήγηση της ατορβαστατίνης	76
2.2.2	Δοκιμασία ανοχής στη γλυκόζη (Glucose Tolerance Test-GTT)	76
2.2.3	Γλυκόζη αίματος και λιπιδαιμικό προφίλ	78
2.2.4	Παθολογοανατομική επεξεργασία	79
2.2.4.1	Χρώση αιματοξυλίνης/ηωζίνης	80
2.2.4.2	Χρώση sirius red	81
2.2.4.3	Χρώση masson's trichrome	82
2.2.4.4	Ανοσοϊστοχημικές χρώσεις	84
2.2.4.5	Μορφομετρική ανάλυση	89
2.2.4.5.1	Μορφομετρική ανάλυση χρώσης H&E	90
2.2.4.5.2	Μορφομετρική ανάλυση χρώσης Sirius red και Masson's trichrome	90
2.2.4.5.3	Μορφομετρική ανάλυση Ανοσοϊστοχημικών Χρώσεων	90
2.2.5	Στατιστική ανάλυση	91
3.	Αποτελέσματα	
3.1	Επίδραση σε σωματικό βάρος, λιπιδαιμικό και γλυκαιμικό προφίλ	92
3.1.1	Βάρος σώματος	92
3.1.2	Βιοχημική ανάλυση	92
3.1.3	Δοκιμασία ανοχής στη γλυκόζη (IPGTT)	92
3.2	Παθολογοανατομικές εξετάσεις	94
3.2.1	Έκταση αθηρωματικής πλάκας, στένωση αυλού (Χρώση H&E)	94
3.2.2	Εντοπισμός κολλαγόνου – χρώση Sirius red	95
3.2.3	Εντοπισμός συνδετικού ιστού – χρώση masson's trichrome	95
3.2.4	Ανοσοϊστοχημικές χρώσεις	96
3.2.4.1	Ανοσοϊστοχημική χρώση a-actin	96
3.2.4.2	Ανοσοϊστοχημική χρώση Mac-3	96
3.2.4.3	Ανοσοϊστοχημική χρώση MMP-2	96
3.2.4.4	Ανοσοϊστοχημική χρώση MMP-3	97
3.2.4.5	Ανοσοϊστοχημική χρώση MMP-9	97
3.2.4.6	Ανοσοϊστοχημική χρώση TIMP-2	98
3.2.4.7	Ανοσοϊστοχημική χρώση TNF-a	98
3.2.4.8	Ανοσοϊστοχημική χρώση MCP-1	98

ΜΕΡΟΣ ΤΡΙΤΟ: ΣΥΖΗΤΗΣΗ	110
Βιβλιογραφία	112
Περίληψη - Abstract	141

ΜΕΡΟΣ ΠΡΩΤΟ: ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Καρδιαγγειακά νοσήματα

Η καρδιαγγειακή νόσος (CVD) είναι η συνηθέστερη αιτία πρόωρου θανάτου στις σύγχρονες βιομηχανικές χώρες, αντιπροσωπεύοντας 4,35 εκατομμύρια θανάτους ετησίως στην Ευρώπη ^{1, 2}. Επιπλέον, αποτελεί μια ολοένα συχνότερη αιτία θανάτου στις αναπτυσσόμενες χώρες. Οι κύριες μορφές της καρδιαγγειακής νόσου είναι η στεφανιαία νόσος (CHD) και το εγκεφαλικό επεισόδιο. Η CHD είναι η πιο συνηθισμένη αιτία θανάτου στην Ευρώπη (1,95 εκατομμύρια και 94.000 θάνατοι ετησίως στην Ευρώπη) ^{1, 2}. Υπάρχει ευρεία γεωγραφική διαφοροποίηση των ποσοστών θνησιμότητας από καρδιαγγειακή νόσο, με τα υψηλότερα στην Ανατολική και Κεντρική Ευρώπη και τα χαμηλότερα ποσοστά στην Ιταλία, τη Γαλλία και την Ιαπωνία ². Τα ποσοστά θνησιμότητας είναι επίσης γενικά πολύ υψηλότερα στους άνδρες από τις γυναίκες και αυξάνονται με την ηλικία. Εκτός από τη γεωγραφική διαφοροποίηση και το φύλο, τα ποσοστά θνησιμότητας από CHD επηρεάζονται επίσης από την καταγωγή και την κοινωνική τάξη ². Οι προβλέψεις για το μέλλον είναι ακόμα πιο δυσοίωνες, καθώς υπολογίζεται ότι με τους σημερινούς ρυθμούς πληθυσμιακής ανάπτυξης τα καρδιαγγειακά νοσήματα από το 2020 θα αποτελούν την κύρια αιτία θνητότητας παγκοσμίως ³.

1.1.1 Παράγοντες κινδύνου

Ο όρος «παράγοντας κινδύνου» χρησιμοποιείται ευρέως για την περιγραφή χαρακτηριστικών που απαντώνται σε άτομα που έχουν αποδειχθεί σε επιδημιολογικές μελέτες παρατήρησης, μελέτες αυτοψίας, μεταβολικές μελέτες και γενετικές μελέτες ότι σχετίζονται με την επακόλουθη εμφάνιση μιας νόσου. Σε παγκόσμιο επίπεδο, οι κατηγορίες παραγόντων κινδύνου καλύπτουν τον τρόπο ζωής, τα προσωπικά, τα βιοχημικά και τα φυσιολογικά χαρακτηριστικά, ορισμένα από τα οποία είναι τροποποιήσιμα, ενώ άλλα δεν είναι. Σήμερα αναγνωρίζεται παγκοσμίως ότι η κακή διατροφή αυξάνει τον κίνδυνο χρόνιων παθήσεων, ιδιαίτερα των καρδιαγγειακών νοσημάτων και του καρκίνου. Ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας (WHO) είχε εκτιμήσει το 2002 ότι μόλις κάτω από το 30 % των CHD και σχεδόν το 20 % των εγκεφαλικών επεισοδίων στις ανεπτυγμένες χώρες σχετίζονταν με επίπεδα κατανάλωσης φρούτων και λαχανικών κάτω από τα 600 g ημερησίως ⁴. Ο WHO δεν έχει ακόμη υπολογίσει την ακριβή αναλογία του φορτίου της νόσου που προκαλείται από

άλλους διαιτητικούς παράγοντες, όπως είναι η υψηλή πρόσληψη νατρίου ή η υψηλή πρόσληψη κορεσμένου λίπους.

Τα άτομα που είναι σωματικά δραστήρια (αερόβια δραστηριότητα) έχουν μικρότερο κίνδυνο εμφάνισης CHD. Εκτιμάται ότι πάνω από το 20% των CHD και το 10% των εγκεφαλικών επεισοδίων στις ανεπτυγμένες χώρες σχετίζεται με τη σωματική αδράνεια ⁴. Ενώ η μέτρια κατανάλωση αλκοόλ (ένα ή δύο ποτά την ημέρα) μειώνει τον κίνδυνο καρδιαγγειακής νόσου (CVD), σε υψηλά επίπεδα πρόσληψης ο κίνδυνος CVD αυξάνεται. Ο WHO υπολογίζει ότι το 2% των CHD και σχεδόν το 5 % των εγκεφαλικών επεισοδίων στους άνδρες στις ανεπτυγμένες χώρες σχετίζεται με το αλκοόλ ⁴. Το υπερβολικό βάρος και η παχυσαρκία αυξάνουν τον κίνδυνο CHD. Εκτός από την ύπαρξη ως ανεξάρτητος παράγοντα κινδύνου, η παχυσαρκία είναι επίσης ένας σημαντικός παράγοντας κινδύνου για υψηλή αρτηριακή πίεση, αυξημένη χοληστερόλη αίματος, διαβήτη και μειωμένη ανοχή στη γλυκόζη ⁵.

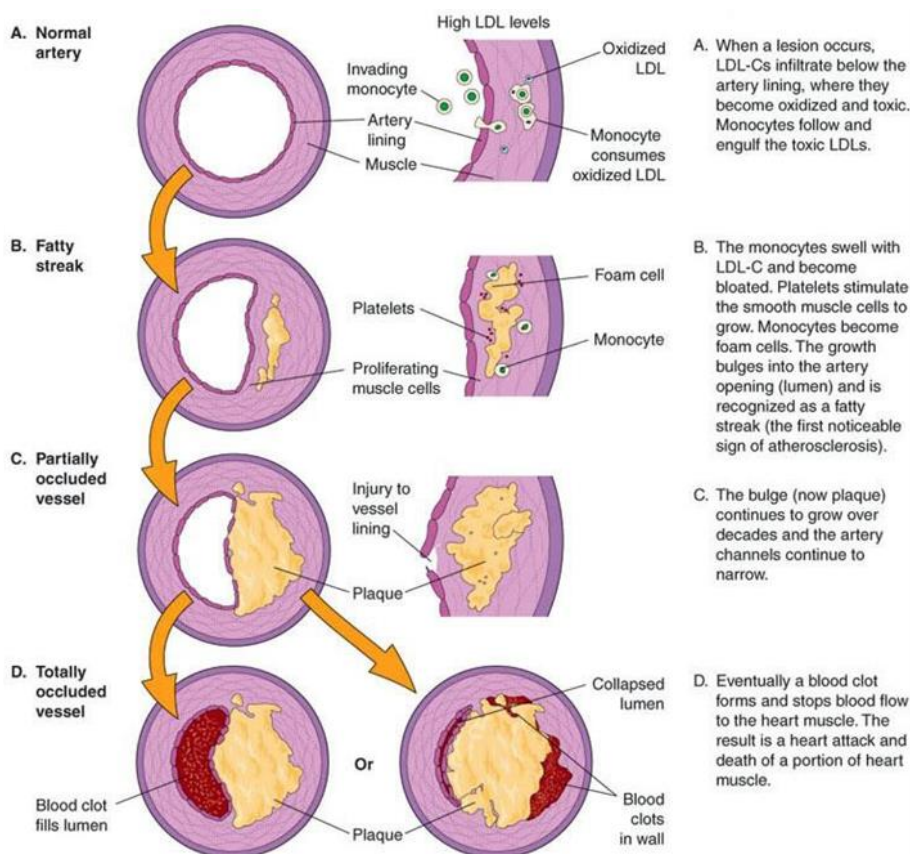
Οι δυσμενείς επιδράσεις του υπερβολικού βάρους είναι πιο έντονες όταν συμπυκνώνεται το λίπος στην κοιλιακή χώρα. Περίπου το ένα τρίτο των CHD και των ισχαιμικών εγκεφαλικών επεισοδίων στις ανεπτυγμένες χώρες σχετίζεται με τα επίπεδα του δείκτη μάζας σώματος (ΔΜΣ) που υπερβαίνει το θεωρητικό ελάχιστο (21 kg/m^2) ⁴. Ο κίνδυνος για CHD σχετίζεται επίσης άμεσα με τα επίπεδα χοληστερόλης στο αίμα. Ο WHO υπολογίζει ότι πάνω από το 60% των CHD και περίπου το 40% των ισχαιμικών ΑΕΕ στις ανεπτυγμένες χώρες οφείλεται σε ολικά επίπεδα χοληστερόλης στο αίμα που υπερβαίνουν το θεωρητικό ελάχιστο ($3,8 \text{ mmol/l}$) ⁴.

Ο κίνδυνος CHD σχετίζεται άμεσα τόσο με τα επίπεδα της συστολικής όσο και με της διαστολικής αρτηριακής πίεσης. Η μελέτη INTERHEART εκτιμά ότι το 22% των καρδιακών προσβολών στη Δυτική Ευρώπη σχετίζεται με ιστορικό υψηλής αρτηριακής πίεσης και ότι οι ασθενείς με ιστορικό υπέρτασης ήταν λίγο κάτω από τον διπλάσιο κίνδυνο καρδιακής προσβολής σε σύγκριση με εκείνους χωρίς ιστορικό υπέρτασης ⁶. Ο διαβήτης αυξάνει σημαντικά τον κίνδυνο CHD. Οι άνδρες με μη ινσουλινο-εξαρτώμενο διαβήτη (τύπου 2) παρουσιάζουν δύο έως τέσσερις φορές μεγαλύτερο ετήσιο κίνδυνο εμφάνισης CHD, με ακόμη υψηλότερο (τριπλάσιο έως πενταπλάσιο) κίνδυνο σε γυναίκες με διαβήτη τύπου 2 ⁷. Ο διαβήτης όχι μόνο αυξάνει τον κίνδυνο CHD αλλά και μεγιστοποιεί την επίδραση άλλων παραγόντων κινδύνου για CHD, όπως αυξημένα επίπεδα χοληστερόλης, αυξημένη αρτηριακή πίεση, κάπνισμα και παχυσαρκία. Η μελέτη INTERHEART υπολόγισε ότι το 15% των καρδιακών προσβολών στη Δυτική Ευρώπη σχετίζονται με διαγνωσμένο διαβήτη και ότι τα άτομα με διαγνωσμένο διαβήτη έχουν τριπλάσιο κίνδυνο καρδιακής προσβολής σε σύγκριση με εκείνα χωρίς ⁶.

Η αθηρωμάτωση θεωρείται ότι αποτελεί το παθογενετικό υπόστρωμα όλων των καρδιαγγειακών νοσημάτων. Κάνοντας στη συνέχεια τη διάκριση μεταξύ της προϊούσας εξέλιξης της αθηρωματικής

βλάβης των αγγείων και των οξέων συμβαμάτων διαπιστώθηκε ότι στη δεύτερη περίπτωση η οξεία ανάπτυξη θρόμβου πάνω από μία υποκείμενη αθηρωματική πλάκα αποτελεί την κύρια αιτία των οξέων και σοβαρών κλινικών εκδηλώσεων της αθηρωματικής αγγειακής νόσου. Έτσι για παράδειγμα η θρόμβωση των στεφανιαίων αγγείων είναι υπεύθυνη στη συντριπτική πλειοψηφία των περιπτώσεων για την εμφάνιση ασταθούς στηθάγχης, εμφράγματος του μυοκαρδίου και αιφνιδίου θανάτου από ισχαιμικό επεισόδιο του μυοκαρδίου ⁸. Η διάβρωση ή η ρήξη της ινώδους κάψας της αθηρωματικής πλάκας οδηγεί στην έκθεση των θρομβογόνων παραγόντων, όπως του ιστικού παράγοντα, που υπάρχουν μέσα στην αθηρωματική πλάκα σε πηκτικούς παράγοντες του αίματος. Από την επαφή και αλληλεπίδραση των θρομβογόνων παραγόντων του αίματος και της αθηρωματικής πλάκας ξεκινούν αλυσιδωτές αντιδράσεις που οδηγούν στο σχηματισμό πλούσιων σε αιμοπετάλια θρόμβων οι οποίοι φράσσουν μερικώς ή πλήρως τον αρτηριακό αυλό (**Εικ.1**). Ανεξαρτήτως της εντόπισης της απόφραξης, στην περιφέρεια ή στα στεφανιαία αγγεία, η ρήξη της πλάκας και η ύπαρξη θρόμβων έχουν πιστοποιηθεί στη συντριπτική πλειοψηφία των περιπτώσεων οξέων καρδιαγγειακών συμβαμάτων ^{9, 10}.

Συνοπτικά, υπάρχουν πολλοί παράγοντες κινδύνου για CHD και εγκεφαλικό επεισόδιο, μερικοί από τους οποίους δεν μπορούν να τροποποιηθούν, η ηλικία, και το φύλο και η κληρονομικότητα. Η σοβαρότητα κάθε παράγοντα κινδύνου συνδέεται με μεγαλύτερο κίνδυνο. Πρέπει να σημειωθεί ότι πολλοί από αυτούς τους παράγοντες κινδύνου σχετίζονται, όπως η διατροφή, η σωματική δραστηριότητα και η παχυσαρκία. Επιπλέον, πολλαπλοί παράγοντες κινδύνου αυξάνουν την πιθανότητα εμφάνισης CHD και εγκεφαλικού επεισοδίου.



Εικόνα 1: Σχηματική απεικόνιση σχηματισμού αθηρωματικής πλάκας σε αρτηρία (Allen T. et al., *Anti-Inflammatory Agents and their Role in Atherosclerosis, J Cell Mol Bio. 2015, 1(2): 008*)

1.2 Αθηρωμάτωση

Η αθηρωμάτωση είναι η παθολογία που αποτελεί τη βάση των CHD. Ορίζεται ως εστιακή, φλεγμονώδης, ιωδο-πολλαπλασιαστική απόκριση σε πολλαπλές μορφές ενδοθηλιακής βλάβης. Η υπόθεση αντίδρασης σε τραυματισμό προτάθηκε από τον Russell Ross και τους συνεργάτες του πριν από 30 χρόνια ¹¹ ενώ έχει βελτιωθεί και αναπτυχθεί περαιτέρω από τότε.

Το φυσιολογικό τοίχωμα της αρτηρίας αποτελείται από δύο οργανωμένα στρώματα: έσω και μέσος χιτώνας. Ο έσω χιτώνας αποτελείται από ένα μόνο στρώμα ενδοθηλιακών κυττάρων που εναποτίθενται στη βασική μεμβράνη και έπειτα το εσωτερικό ελαστικό έλασμα (IEL). Κάτω από το IEL είναι το μεσαίο στρώμα, το οποίο περιλαμβάνει αγγειακά λεία μυϊκά κύτταρα (VSMCs) που περιβάλλονται από βασική μεμβράνη και ενσωματώνονται σε διάμεση εξωκυτταρική μήτρα. Το όριο του μέσου χιτώνα χαρακτηρίζεται από το εξωτερικό ελαστικό έλασμα (EEL). Όλα τα βρέφη έχουν εστιακή πάχυνση του έσω χιτώνα της στεφανιαίας αρτηρίας λόγω του πολλαπλασιασμού των VSMC ¹². Αν και η εστιακή πάχυνση είναι ένα σημαντικό χαρακτηριστικό της αναπτυσσόμενης

αθηρωματικής πλάκας, θεωρείται ότι είναι μια προσαρμοστική απάντηση στην ταραγμένη αιματική ροή παρά στην παθολογική.

Η ενδοθηλιακή δυσλειτουργία που ξεκινάει από τους παράγοντες κινδύνου που έχουν ήδη περιγραφεί επιτρέπει την είσοδο λιπιδίων και φλεγμονωδών κυττάρων στο τοίχωμα της αρτηρίας. Μόλις βρεθούν στην αρτηρία, τα μονοκύτταρα διαφοροποιούνται σε μακροφάγα που προσλαμβάνουν τα λιπίδια και μετατρέπονται αφρώδη κύτταρα. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό αλλοιώσεων που ονομάζονται «λιπώδεις γραμμώσεις» οι οποίες αναγνωρίζονται ως η απαρχή της αθηρωμάτωσης. Οι λιπώδεις γραμμώσεις είναι μικρές, ελαφρώς ανυψωμένες αλλοιώσεις που προκαλούνται από εστιακές συλλογές αφρωδών κυττάρων στον έσω χιτώνα. Μπορούν να είναι πρόδρομοι μεγαλύτερων αθηρωματικών πλακών, αλλά μπορεί επίσης να υποχωρήσουν. Η εξέλιξη των λιπωδών γραμμώσεων σε μια πιο σύνθετη αλλοίωση συμβαίνει λόγω του σχηματισμού ενός νεκρωτικού πυρήνα και μιας ινώδους κάψας.

Τα αφρώδη κύτταρα, τα οποία περιέχουν λιπίδια, αρχίζουν να πεθαίνουν και να απελευθερώνουν το περιεχόμενό τους, κάτι το οποίο συμβάλλει στο σχηματισμό ενός νεκρωτικού πυρήνα. Η απελευθέρωση του κυτταροπλασματικού περιεχομένου των αφρωδών κυττάρων οδηγεί στη συσσώρευση εξωκυτταρικών λιπιδίων και αυξητικών παραγόντων που διεγείρουν τη φλεγμονή. Η εμφάνιση της μετανάστευσης και του πολλαπλασιασμού των VSMC έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό μια ινώδους κάψας. Τα VSMCs μεταναστεύουν στον έσω χιτώνα όπου πολλαπλασιάζονται και αποθέτουν εξωκυτταρική μήτρα. Η αύξηση του αριθμού των κυττάρων και η παρουσία της μήτρας προκαλεί αύξηση του όγκου της πλάκας, η οποία τώρα προεξέχει μέσα στον αυλό. Αυτό ονομάζεται προχωρημένη σταθερή πλάκα. Το μέγεθος και η σύνθεση της πλάκας καθορίζουν την έκβασή της.

Έχουν σχεδιαστεί συστήματα κατηγοριοποίησης των διαφόρων τύπων πλάκας¹³⁻¹⁶. Μια πλάκα με μεγάλο νεκρωτικό πυρήνα, υψηλή περιεκτικότητα σε φλεγμονώδη κύτταρα και λεπτή ινώδη κάψα ονομάζεται «ασταθής πλάκα» και είναι πιο επιρρεπής σε ρήξη από μια πλάκα με μικρότερο νεκρωτικό πυρήνα, χαμηλότερη περιεκτικότητα σε φλεγμονώδη κύτταρα και παχιά ινώδη κάψα, που ονομάζεται «σταθερή πλάκα». Η ρήξη της πλάκας οδηγεί στον σχηματισμό θρόμβου, ο οποίος μπορεί να αποφράξει τον αυλό και να προκαλέσει τα συμπτώματα του εμφράγματος του μυοκαρδίου ή του εγκεφαλικού επεισοδίου. Ωστόσο, η ρήξη της πλάκας δεν οδηγεί πάντοτε σε απόφραξη της αρτηρίας και η πλάκα μπορεί να επανασταθεροποιηθεί και να θεραπευτεί. Αυτό συμβαίνει με κόστος, αφού η «επούλωμένη πλάκα»¹⁷ είναι μεγαλύτερη και τα επαναλαμβανόμενα επεισόδια ρήξης της πλάκας και επούλωσης συνδέονται με μεγαλύτερη συχνότητα εμφάνισης θανατηφόρου συμβάντος¹⁸.

1.2.1 Έναρξη σχηματισμού πλάκας - ενδοθηλιακή δυσλειτουργία

Η αθηρωμάτωση πιστεύεται ότι ξεκινά από βλάβη στο ενδοθήλιο, με αποτέλεσμα τη μεταβολή της ενδοθηλιακής λειτουργίας. Οι παράγοντες κινδύνου που περιγράφονται παραπάνω είναι γενικά η αιτία αυτής της βλάβης μέσω μιας ή περισσότερων από τις ακόλουθες οδούς: υψηλά επίπεδα οξειδωμένης λιποπρωτεΐνης χαμηλής πυκνότητας (LDL)· ελεύθερες ρίζες όπως οι δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS)· γενετικές παραλλαγές· αυξημένες συγκεντρώσεις ομοκυστεΐνης στο πλάσμα· μολυσματικοί μικροοργανισμοί όπως ο ιός του έρπητα ή η *Chlamydia pneumoniae*· διατημητική τάση σε περιοχές ταραχώδους ροής αίματος ή ενδογενή φλεγμονώδη σήματα όπως οι κυτοκίνες ¹⁹.

Η απώλεια της κανονικής παραγωγής νιτρικού οξειδίου (NO) από το ενδοθήλιο του τοιχώματος του αγγείου συμβαίνει κατά τη διάρκεια της ενδοθηλιακής δυσλειτουργίας. Το νιτρικό οξείδιο ρυθμίζει πολλές πτυχές της καρδιαγγειακής ομοιόστασης, συμπεριλαμβανομένης της αρτηριακής πίεσης και ροής, της συστολής των λείων μυών, της φλεγμονής και της ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων, και είναι ένας πολύ γνωστός αθηροπροστατευτικός παράγοντας. Οι μοριακοί μηχανισμοί πίσω από αυτή την απώλεια NO παραμένουν ασαφείς, ωστόσο πρόσφατες μελέτες υποδηλώνουν ότι οι αλλαγές στη δραστηριότητα και ρύθμιση της ενδοθηλιακής NO συνθάσης από τον συν-παράγοντα, την τετραϋδροβιοπτερίνη (BH4), συνεισφέρουν σημαντικά ²⁰.

1.2.1.1 Φλεγμονή

Εργαστηριακά και κλινικά δεδομένα, την τελευταία δεκαετία, δείχνουν τον θεμελιώδη ρόλο της φλεγμονής στην αθηροματογένεση ²¹. Τα μακροφάγα «αφρώδη» κύτταρα που συσσωρεύονται στο αρτηριακό τοίχωμα δεν χρησιμεύουν μόνο για την φαγοκυττάρωση των λιπιδίων, αλλά και για την παραγωγή προφλεγμονωδών παραγόντων, όπως κυτοκινών, χημειοκινών, εικοσανοειδών και παραγόντων που ενεργοποιούν τα αιμοπετάλια.

Τα αιμοπετάλια προσκολλώνται σε δυσλειτουργικά ενδοθηλιακά κύτταρα σε περιοχές επιρρεπείς σε αλλοιώσεις όπως ο διχασμός της καρωτιδικής αρτηρίας πριν από την εισβολή των λευκοκυττάρων και τον σχηματισμό της αθηρωματικής πλάκας ²², υποδεικνύοντας τη συμμετοχή τους στην αθηρογένεση. Η προσκόλληση και η συσσωμάτωση των αιμοπεταλίων διεγείρεται από τις ιντεγκρίνες, την P - σελεκτίνη, το ινώδες, τη θρομβοξάνη A2 και τον ιστικό παράγοντα ¹⁹. Μόλις προσκολληθούν τα αιμοπετάλια ενεργοποιούνται και απελευθερωθούν, ή εκθέτουν στην κυτταρική τους επιφάνεια, πολλαπλούς φλεγμονώδεις παράγοντες, πρωτεάσες και αγγειοδραστικές ουσίες, οι οποίες προάγουν περαιτέρω δυσλειτουργία των ενδοθηλιακών κυττάρων και φλεγμονή ²³. Αυτό οδηγεί σε στρατολόγηση και προσκόλληση ουδετερόφιλων και μονοκυττάρων στην περιοχή.

Επιπροσθέτως, τα αιμοπετάλια συνδέονται απευθείας με λευκοκύτταρα και ως εκ τούτου δρουν ως γεφυρωτικά κύτταρα μεταξύ του ενδοθηλίου και των κυττάρων σχηματισμού πλάκας²⁴. Τα αιμοπετάλια επίσης απελευθερώνουν τον παράγοντα αιμοπεταλίων 4 (PF4) στις αθηρωματικές πλάκες²⁵ και προάγουν τη διαφοροποίηση των μονοκυττάρων σε μακροφάγα και την πρόσληψη της οξειδωμένης LDL από μακροφάγα²⁶.

Η δυσλειτουργία των ενδοθηλιακών κυττάρων επίσης οδηγεί άμεσα στην εισβολή λευκοκυττάρων, οδηγώντας στον σχηματισμό λιπώδους γράμμωσης. Η στρατολόγηση λευκοκυττάρων συμβαίνει μέσω σειράς εκδηλώσεων που περιλαμβάνουν μόρια προσκόλλησης. Πρώτον, τα λευκοκύτταρα κυλούν κατά μήκος της ενδοθηλιακής επιφάνειας του αγγειακού τοιχώματος, η οποία προκαλείται από την ενδοθηλιακή έκφραση των σελεκτινών, συμπεριλαμβανομένης της P-σελεκτίνης. Δεύτερον, τα λευκοκύτταρα προσκολλώνται σταθερά στο ενδοθήλιο και μεταναστεύουν μέσω της εξαγγείωσης και αυτές οι διεργασίες προκαλούνται από ιντεγκρίνες και μέλη της υπερικογένειας των ανοσοσφαιρινών, όπως το μόριο προσκόλλησης αγγειακών κυττάρων 1 (VCAM - 1) και το μόριο ενδοκυτταρικής προσκόλλησης 1 (ICAM - 1)²⁷.

Η ενδοθηλιακή βλάβη αυξάνει τη διαπερατότητα του ενδοθηλίου και, επομένως, μόλις δεσμευτούν, τα λευκοκύτταρα μπορούν να μεταναστεύσουν μέσω του ενδοθηλίου και εντός του έσω χιτώνα ως απόκριση προς τις διάφορες χημειοκίνες που απελευθερώνονται από τα κύτταρα του έσω χιτώνα και του κατεστραμμένου ενδοθηλίου²⁸. Οι χημειοκίνες παρουσιάζονται στην ενδοθηλιακή επιφάνεια με δέσμευση γλυκοζαμινογλυκάνης (GAG) ή ως δεσμευμένα στη μεμβράνη μόρια, για παράδειγμα CX3 CL1 (φρακταλκίνη)²⁹. Αυτό επιτρέπει την ισχυρή σύνδεση του μονοκυττάρου μέσω του συγγενικού υποδοχέα χημειοκίνης. Στον έσω χιτώνα, τα μονοκύτταρα και τα T λεμφοκύτταρα ωριμάζουν και απελευθερώνουν χημειοελκτικές κυτοκίνες (ή χημειοκίνες), για παράδειγμα τον συνδέτη χημειοκινών (C - C μοτίβο) 2 (CCL - 2 επίσης γνωστός ως MCP - 1), ο οποίος καθιερώνει μια βαθμίδωση χημειοκίνης για τη μετανάστευση και ενισχύει περαιτέρω την φλεγμονώδη αντίδραση. Είναι ενδιαφέρον ότι οι χημειοκίνες ρυθμίζουν επίσης τη συγκράτηση των μακροφάγων στην πλάκα³⁰.

Τα μονοπύρρηνα είναι ο τύπος των λευκοκυττάρων που συσσωρεύονται αρχικά στο αθήρωμα. Καθώς η αθηρωματική βλάβη εξελίσσεται υπάρχει η τάση εκσεσημασμένης συσσώρευσης λευκοκυττάρων στην περιοχή των «ώμων» της πλάκας, εκεί ακριβώς όπου η έκκεντρη πλάκα συγχωνεύεται με το πιο φυσιολογικό αγγειακό τοίχωμα. Αυτή η συσσώρευση θεωρείται ότι κάνει την πλάκα πιο ευάλωτη στις συνέπειες της αθηροσκλήρωσης³¹. Επιπρόσθετα, έχει παρατηρηθεί ότι οι αθηρωματικές πλάκες αναπτύσσονται κυρίως στα σημεία διχασμού των στεφανιαίων αρτηριών, ενδεχομένως λόγω της τυρβώδους ροής ή του μεταβαλλόμενου «shear stress» στα σημεία αυτά, προκαλώντας έτσι αύξηση του πληθυσμού των συνδετικών μορίων και των λευκών αιμοσφαιρίων.

Τα Τ κύτταρα συσσωρεύονται επίσης στην αθηρωματική πλάκα σε απόκριση του συνδέτη (μοτίβο C - X - C) χημειοκινών 9, 10 και 11 (CXCL9, CXCL10 και CXCL11). Οι άμεσες ενδείξεις για την εμπλοκή του CCL2 και του υποδοχέα του CCR2 στην αθηρογένεση προέρχονται από μύες ApoE^{-/-} που στερούνται της έκφρασης των CCL2 και CCR2, καθώς αυτοί οι μύες έχουν δραματικά λιγότερη πρόσληψη μακροφάγων και σχηματισμό αθηρωματικών πλακών^{32, 33}. Τα Τ λεμφοκύτταρα αποτελούν σημαντικό πληθυσμό λευκοκυττάρων της αθηρωματικής πλάκας. Οι τροποποιημένες λιποπρωτεΐνες, οι πρωτεΐνες οξείας φάσης, η β-2 γλυκοπρωτεΐνη και λοιμώδεις παράγοντες αποτελούν υποψήφιους αντιγονικούς ερεθισμούς για την πρόκληση αυτής της δευτερογενούς ανοσοαπάντησης. Τα κύτταρα που «φέρουν» το αντιγόνο (μακροφάγα, δενδριτικά ή ενδοθηλιακά κύτταρα) επιτρέπουν την αλληλεπίδρασή του με τα Τ λεμφοκύτταρα με τέτοιο τρόπο ώστε να πυροδοτείται η αντίδραση. Τα ενεργοποιημένα αυτά Τ λεμφοκύτταρα εκκρίνουν στην συνέχεια άφθονη ποσότητα κυτοκινών, οι οποίες με την σειρά τους συνεχίζουν να συντονίζουν την εξέλιξη της αθηρωματικής πλάκας, συμπεριλαμβανομένης της ιντερφερόνης - γ (IFN - γ), του παράγοντα νέκρωσης όγκων - TNF-α, της ιντερλευκίνης - 1 (IL - 1), IL - 2 IL - 18³⁴. Αξίζει να σημειωθεί ότι ορισμένες κυτοκίνες, όπως η IL - 10 και ο αυξητικός παράγοντας μετασχηματισμού - β (TGF - β) είναι αθηροπροστατευτικές, μέσω της επαγωγής των κυττάρων T reg³⁵.

Η σημασία της ανοσίας στην αθηρωμάτωση δεν περιορίζεται στο επίκτητο ανοσοποιητικό σύστημα: η έμφυτη ανοσία είναι επίσης σημαντική. Οι υποδοχείς τύπου toll (TLRs) είναι σχετιζόμενοι με υποδοχείς παθογόνων μοριακού προτύπου που ανταποκρίνονται σε εισερχόμενους μικροοργανισμούς, καθώς και τροποποιημένες LDL και «σήματα κινδύνου» που απελευθερώνονται από τους τραυματισμένους ιστούς, αρχίζοντας μία φλεγμονώδη απόκριση. Για παράδειγμα, ο TLR4 είναι υπεύθυνος για την κυτταρική ενεργοποίηση μετά την αναγνώριση των βακτηριακών λιποπολυσακχαριτών (LPS), καθώς και της μικροβιακής και ευκαρυωτικής πρωτεΐνης θερμικού σοκ - 60 (HSP - 60). Ο TLR4 εκφράζεται σε ανθρώπινες αθηρωματικές πλάκες και έχει ενδιαφέρον ότι, οι πολυμορφισμοί στο γονίδιο του TLR4 έχουν ποικίλες επιδράσεις στον κίνδυνο οξέων στεφανιαίων συνδρόμων³⁶ και η απαλοιφή του TLR4 σε ApoE^{-/-} μύες περιορίσε την αθηρωμάτωση³⁷. Περαιτέρω ενδείξεις που εμπλέκουν τους TLRs στην αθηρωμάτωση προέρχονται από μελέτες όπου TLR2^{-/-} μύες διασταυρώθηκαν με LDLR^{-/-} μύες, τα οποία εμφάνισαν μικρότερες αθηρωματικές αλλοιώσεις^{38, 39}.

Επιπλέον, η κλασική βραχεία πεντραζίνη, C - αντιδρώσα πρωτεΐνη (CRP), η οποία χρησιμοποιείται ως προγνωστικός δείκτης για την ισχαιμική καρδιοπάθεια, είναι ένα συστατικό του έμφυτου ανοσοποιητικού συστήματος. Οι μηχανισμοί πίσω από τη συμμετοχή της CRP στις καρδιακές παθήσεις είναι άγνωστοι, καθώς ο πειραματισμός έγινε δυσχερής λόγω μιας γενετικής διαφοράς μεταξύ της CRP ποντικού και ανθρώπου. Ωστόσο, πρόσφατη μελέτη έδειξε ότι η μακρά πεντραζίνη

PTX3, η οποία διατηρείται εξελικτικά, παρέχει καρδιοπροστατευτική δράση σε μύες μέσω διαμόρφωσης της οδού του συμπληρώματος. Τα επίπεδα της PTX3 είναι αυξημένα στην ισχαιμία του μυοκαρδίου τόσο στον ποντικό όσο και στον άνθρωπο, επομένως η PTX3 θα μπορούσε επίσης να χρησιμοποιηθεί ως προγνωστικός δείκτης ⁴⁰.

Οι ενεργοποιημένοι υποδοχείς πολλαπλασιασμού των υπεροξεισωματίων (PPARs) που εκφράζονται από ενδοθηλιακά κύτταρα στο τοίχωμα του αγγείου είναι μια σημαντική οικογένεια πυρηνικών υποδοχέων που ρυθμίζουν την πρόσληψη, προσκόλληση και μετανάστευση των μονοκυττάρων καθώς επίσης έχουν αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες και την ικανότητα να μειώνουν το οξειδωτικό στρες ⁴¹. Οι PPAR εκφράζονται επίσης από μονοκύτταρα, μακροφάγα και T κύτταρα και σχετίζονται με αθηροπροστατευτικές διεργασίες περιλαμβανομένης της αναστολής των φλεγμονωδών μορίων και της αυξημένης εκροής χοληστερόλης.

Ο ρόλος των B κυττάρων και αντισωμάτων στην αθηροσκλήρωση παραμένει μη επαρκώς διερευνημένος. Η χυμική ανοσία μπορεί να παρουσιάζει άλλοτε προστατευτικές και άλλοτε ευοδωτικές ιδιότητες όσον αφορά την εξέλιξη της αθηρωμάτωσης, λειτουργία εξαρτώμενη κάθε φορά από τις συνθήκες.

1.2.1.2 Σχηματισμός αφρωδών κυττάρων

Η αυξημένη διαπερατότητα του ενδοθηλίου έχει επίσης ως αποτέλεσμα την διείσδυση της LDL στο τοίχωμα του αιμοφόρου αγγείου. Μόλις εισχωρήσει στο τοίχωμα του αιμοφόρου αγγείου, η LDL τροποποιείται και απορροφάται ευκολότερα από τα κύτταρα ⁴². Στον έσω χιτώνα, αυξητικοί παράγοντες (παράγοντας διέγερσης αποικιών μονοκυττάρων, M-CSF) και κυτοκίνες (TNF-α και IFN-γ) απελευθερώνονται και την προκαλούν διαφοροποίηση των μονοκυττάρων σε μακροφάγα και την ωρίμανση τους σε ενεργά μακροφάγα. Η διαδικασία ωρίμανσης προκαλεί τα μακροφάγα να αυξήσουν την έκφρασή τους με διάφορους υποδοχείς «καθαριστές» (scavengers), συμπεριλαμβανομένων των υποδοχέων A και B1 και CD36, οι οποίοι μπορούν να δεσμεύσουν και να ενσωματώσουν την τροποποιημένη LDL ⁴³. Η σχετική σημασία των υποδοχέων «καθαριστών» στην ανάπτυξη αθηρωματικών πλακών είναι αμφιλεγόμενη. Επί του παρόντος, πιστεύεται ότι ενώ ο υποδοχέας «καθαριστής» A είναι προαθηρογόνος (κυρίως ως συνέπεια της πρόσληψης ελάχιστα οξειδωμένης LDL από μακροφάγα στο αρτηριακό τοίχωμα), ο υποδοχέας «καθαριστής» B προστατεύει ενάντια της αθηρωμάτωσης σε μεταγενέστερα χρονικά σημεία (κυρίως λόγω της λειτουργίας του στην απομάκρυνση των λιποπρωτεϊνών υψηλής πυκνότητας (HDL) - εστέρων χοληστερόλης στο ήπαρ) ⁴⁴. Η πρόσληψη λιπιδίων, η οποία είναι πιθανόν να είναι ευεργετική κατά την έναρξη, έχει ως αποτέλεσμα τη συσσώρευση λιπαρών σταγονιδίων μέσα στα μακροφάγα, τα

οποία παίρνουν μια αφρώδη εμφάνιση υπό μικροσκοπία και επομένως ονομάζονται αφρώδη κύτταρα ⁴⁵. Τα αφρώδη κύτταρα απελευθερώνουν αυξητικούς παράγοντες και κυτοκίνες, που εμπλέκονται στην πρόοδο της βλάβης, καθώς και μεταλλοπρωτεϊνάσες εξωκυττάριας ουσίας (MMPs), οι οποίες διεγείρουν την αποικοδόμηση της μήτρας. Μαζί με τα T λεμφοκύτταρα, τα αφρώδη κύτταρα σχηματίζουν τη λιπώδη γράμμωση.

Τα πρωτεολυτικά ένζυμα χυμάση και τρυπτάση που προέρχονται από τα μαστοκύτταρα έχουν δείξει ότι τροποποιούν εις βάθος τη σύνθεση και τη λειτουργία των σωματιδίων HDL και η χυμάσης τροποποιεί πρωτεολυτικά την LDL ⁴⁶. Τα διεγερμένα μαστοκύτταρα επομένως μπορούν να επιταχύνουν τον σχηματισμό αφρωδών κυττάρων στις περιοχές του έσω χιτώνα στις οποίες συνυπάρχουν τα ιστιοκύτταρα και τα μακροφάγα και περιβάλλονται από το υγρό του έσω χιτώνα εμπλουτισμένο με σωματίδια LDL και HDL που προέρχονται από πλάσμα.

Εκτός από την πρόσληψη από μακροφάγα, η χοληστερόλη μπορεί επίσης να ρέει μέσω μεταφορέων, όπως οι ABCA - 1 και ABCG - 1, σε εξωκυτταρικούς δέκτες με βάση την HDL, όπως η απολιποπρωτεΐνη E. Αυτή η διαδικασία είναι γνωστή ως ανάστροφη μεταφορά χοληστερόλης (RCT) . Μετά την εκροή σε HDL, η χοληστερόλη μπορεί να εστεροποιηθεί στο πλάσμα από το ένζυμο ακυλοτρανσφεράση λεκιθίνης-χοληστερόλης και τελικά μεταφέρεται από την HDL στο ήπαρ, είτε απευθείας μέσω του υποδοχέα καθαριστή BI είτε μετά από μεταφορά σε λιποπρωτεΐνες που περιέχουν απολιποπρωτεΐνη B από την πρωτεΐνη μεταφοράς εστέρων χοληστερόλης. Η εκροή χοληστερόλης πιστεύεται ότι είναι αθηροπροστατευτική μέσω της απομάκρυνσης της συσσώρευσης χοληστερόλης και ως εκ τούτου της μείωσης του σχηματισμού αφρωδών κυττάρων ⁴⁷. Η προαγωγή της RCT των μακροφάγων είναι μια πιθανή θεραπευτική προσέγγιση για την πρόληψη ή την υποτροπή της αρτηριοσκληρωτικής αγγειακής νόσου, αλλά θα χρειαστούν ισχυρά μέτρα RCT στους ανθρώπους ώστε να προχωρήσουν με βεβαιότητα οι θεραπείες που προάγουν την RCT στην κλινική ανάπτυξη ⁴⁸.

Τα μονοκύτταρα και τα μακροφάγα εμφανίζουν υψηλό επίπεδο ετερογένειας που τους επιτρέπει να ειδικεύονται σε συγκεκριμένες λειτουργίες. Πολλοί φαινότυποι μακροφάγων έχουν ταυτοποιηθεί και τουλάχιστον δύο από αυτούς (M1 και M2) έχουν αποδειχθεί ότι υπάρχουν στις αθηρωματικές πλάκες. Ο φαινότυπος που εκφράζεται από ένα μακροφάγο εξαρτάται από τα χημικά σήματα που χρησιμοποιούνται για την επαγωγή διαφοροποίησης των μακροφάγων. Οι κυτοκίνες Th1, όπως η IFN-γ, η IL-1 β και ο λιποπολυσακχαρίτης, προκαλούν ένα «κλασικό» προφίλ ενεργοποίησης που ονομάζεται M1. Από την άλλη πλευρά, οι Th2 κυτοκίνες, όπως η IL-4 και η IL-13, επάγουν ένα «εναλλακτικό» πρόγραμμα ενεργοποίησης που ονομάζεται M2 (Εικ. 2). Η διαφορά στη δραστηριότητα αυτών των δύο υποτύπων είναι ακραία, καθώς τα μακροφάγα M1 είναι προφλεγμονώδη, ενώ τα M2 είναι αντιφλεγμονώδη ⁴⁹. Τα μακροφάγα μπορούν να αλλάξουν από τον

ένα φαινότυπο στον άλλο και ως εκ τούτου η διαμόρφωση αυτής της φαινοτυπικής αλλαγής είναι μια ενδιαφέρουσα θεραπευτική στρατηγική.

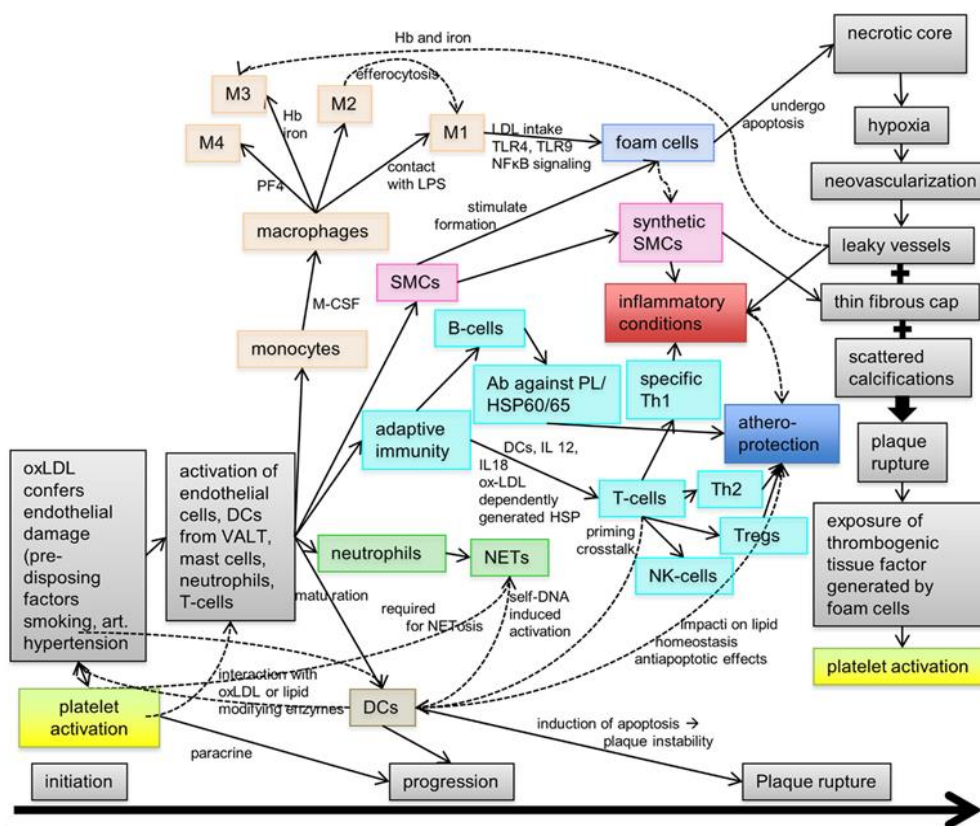
1.2.1.3 Μετανάστευση και Πολλαπλασιασμός των Αγγειακών Λείων Μυϊκών Κυττάρων

Ενώ τα πρώιμα γεγονότα στην έναρξη της αθηρωματικής πλάκας περιλαμβάνουν την δυσλειτουργία του ενδοθηλίου και την συσσώρευση των λευκοκυττάρων, η εξέλιξη αυτής σε πιο συμπλοκή βλάβη απαιτεί την συμμετοχή και των λείων μυϊκών κυττάρων. Τα λεία μυϊκά κύτταρα σε έναν φυσιολογικό μέσο χιτώνα, διαφέρουν σημαντικά από αυτά του έσω χιτώνα στον οποίο έχει αναπτυχθεί η αθηρωματική πλάκα⁵⁰. Καθώς οι λιπώδεις γραμμώσεις αναπτύσσονται σε πιο σύνθετες, προχωρημένες αθηρωματικές πλάκες, αναπτύσσουν μια ινώδη κάψα, αποτελούμενη από VSMCs, τα οποία σχηματίζουν ένα προστατευτικό στρώμα μεταξύ της βλάβης και του αυλού του αγγείου. Κατά την ανάπτυξη από μια λιπώδη γράμμωση σε μία προηγμένη πλάκα, τα VSMCs μεταναστεύουν από τον μέσο στον έσω χιτώνα, όπου υποβάλλονται σε πολλαπλασιασμό και εναποθέτουν εξωκυτταρική μήτρα. Κατά τη διάρκεια αυτών των διεργασιών, τα VSMCs υφίστανται φαινοτυπική διαφοροποίηση από ένα συστατικό σε ένα συνθετικό φαινότυπο με αποτέλεσμα την αποδιαφοροποίηση των VSMC. Ο σχηματισμός της ινώδους κάψας πιστεύεται ότι διεγείρεται από αυξητικούς παράγοντες και κυτοκίνες, συμπεριλαμβανομένου του αιμοπεταλιακού αυξητικού παράγοντα (PDGF), του αυξητικού παράγοντα των ινοβλαστών 2 (FGF-2) και του αυξητικού παράγοντα μετασχηματισμού β (TGF-β) που απελευθερώνεται από αποκοκκιωμένα αιμοπετάλια, κύτταρα, μακροφάγα, αφρώδη κύτταρα και VSMCs. Επιπλέον, η αποικοδόμηση της εξωκυτταρικής μήτρας και οι επαφές κυττάρου-κυττάρου όπου μεσολαβούν πρωτεάσες συμπεριλαμβανομένων των MMPs, επιτρέπουν τη μετανάστευση των VSMC από το μέσο στον έσω χιτώνα⁵¹⁻⁵³.

Οι μύες με έλλειψη πλασμινογόνου εμφανίζουν σημαντικά μειωμένη πάχυνση του έσω χιτώνα, υποδηλώνοντας ότι η πλασμίνη απαιτείται για τη μετανάστευση των VSMC στον έσω χιτώνα, αυξάνοντας την αποικοδόμηση της εξωκυτταρικής μήτρας είτε άμεσα είτε έμμεσα μέσω ενεργοποίησης των MMPs⁵⁴. Τα λεία μυϊκά κύτταρα στον αθηρωματικό έσω χιτώνα, εμφανίζουν έναν λιγότερο ώριμο φαινότυπο από αυτά του φυσιολογικού μέσου χιτώνα. Αντί να παρουσιάζουν την χαρακτηριστική δομή της μυοσίνης των ώριμων φυσιολογικών κυττάρων, εμφανίζουν έναν εμβρυονικό τύπο μυϊκής μυοσίνης⁵⁵. Επιπρόσθετα, περιέχουν περισσότερο τραχύ ενδοπλασματικό δίκτυο και λιγότερα συστατικά ινίδια από τα φυσιολογικά λεία μυϊκά κύτταρα. Στον έσω χιτώνα, τα VSMCs πολλαπλασιάζονται και συνθέτουν συστατικά της εξωκυτταρικής μήτρας. Τα κύτταρα και τα συστατικά της μήτρας σχηματίζουν την ινώδη κάψα (σκλήρυνση) της αθηρωματικής πλάκας με

την τοποθέτησή τους ως στρώμα επάνω από τον λιπιδικό πυρήνα. Τα VSMC της ινώδους κάψας είναι συνθετικά και έχουν υψηλά επίπεδα μετανάστευσης και πολλαπλασιασμού.

Καθώς η βλάβη γίνεται μεγαλύτερη και πιο σύνθετη, οι φλεγμονώδεις κυτοκίνες, όπως η IFN- γ , προκαλούν την απόπτωση των μακροφάγων. Αυτό οδηγεί στο σχηματισμό ενός νεκρωτικού πυρήνα, ο οποίος είναι χαρακτηριστικός μιας προηγμένης αλλοίωσης.



Εικόνα 2: Σχηματική απεικόνιση των κυριότερων μηχανισμών αθηρογένεσης και αστάθειας της αθηρωματικής πλάκας. MMP, μεταλλοπρωτεϊνάσες; SMC, λεία μυϊκά κύτταρα (Nording H.M. et al., Platelets in inflammation and atherogenesis, Front Immunol. 2015 Mar 6;6:98)

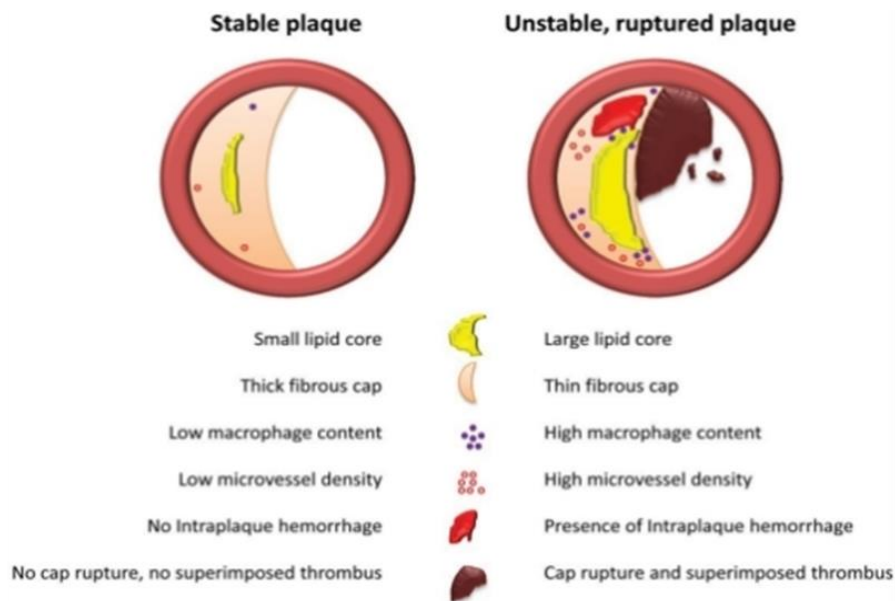
1.2.2 Σταθερότητα της αθηρωματικής πλάκας

Τα τελευταία χρόνια έχει πραγματοποιηθεί μία αξιοσημείωτη μεταστροφή στη θεώρηση της αντιμετώπισης της αθηρωματικής διαδικασίας και της πρόληψης των επακόλουθων καρδιαγγειακών συμβαμάτων, καθώς έχουν αναθεωρηθεί τα κριτήρια αξιολόγησης της βαρύτητας των αθηρωματικών αλλοιώσεων. Παλαιότερα η αθηρωματική νόσος θεωρούνταν ως μία στενωτική νόσος των αγγείων η οποία συνδεόταν με προοδευτική στένωση του αγγειακού αυλού και ελαττωμένη αιματική παροχή, οδηγώντας σε κυκλοφορικές διαταραχές ή οξεία συμβάματα. Άρα το

κύριο κριτήριο βαρύτητας της νόσου αποτελούσε ο βαθμός στένωσης των αγγείων. Με βάση την παραπάνω παραδοχή η θεραπευτική στρατηγική κατά τη αθηρωμάτωσης εστιαζόταν στην άρση ή στο μετριασμό της στένωσης με φαρμακευτικές ή χειρουργικές παρεμβάσεις¹⁰. Όμως την τελευταία δεκαετία η αντίληψη αυτή έχει σχεδόν πλήρως ανατραπεί, καθώς αναγνωρίζεται όλο και περισσότερο η σημασία της σύστασης της αθηρωματικής πλάκας στην εξέλιξη των καρδιαγγειακών νοσημάτων. Σήμερα πιστεύεται ότι οι αθηρωματικές πλάκες διαφέρουν μεταξύ τους ως προς τη σταθερότητα και τη σύστασή τους. Υπάρχουν δηλαδή αθηρωματικές πλάκες οι οποίες κάτω από την επίδραση του μηχανικού stress παρουσιάζουν μεγαλύτερη τάση ρήξης και χαρακτηρίζονται ως ασταθείς ή εύθραυστες, αντίθετα με άλλες που εμφανίζονται πιο ανθεκτικές στις μηχανικές πιέσεις και χαρακτηρίζονται ως σταθερές αθηρωματικές πλάκες^{56, 57}. Ενδεδειγμένος ιστολογικός έλεγχος ασταθών αθηρωματικών πλακών που είχαν προηγουμένως ραγεί έδειξε ότι αυτές έχουν συνήθως ορισμένα χαρακτηριστικά, τα οποία εφόσον προ-υπάρχουν της ρήξης, συμβάλλουν στην ευθραυστότητα της αθηρωματικής πλάκας. Τα κυριότερα χαρακτηριστικά μίας ασταθούς αθηρωματικής πλάκας είναι τα ακόλουθα (Εικ. 3):

- 1) Μεγάλος λιπιδικός – νεκρωτικός πυρήνας ($\geq 40\%$ του συνολικού όγκου της πλάκας), αποτελούμενος από ελεύθερη κρυσταλλική χοληστερόλη, εστέρες χοληστερόλης και οξειδωμένες λιποπρωτεΐνες εμποτισμένες με ιστικό παράγοντα²⁴. Πρόσφατες υπολογιστικές μελέτες επικεντρώνουν το ενδιαφέρον όχι μόνο στον συνολικό όγκο, αλλά και στη μορφολογία και το πάχος του λιπιδικού πυρήνα, που μπορεί να τον καθιστά πιο ευπρόσβλητο στις πιέσεις⁵⁸.
- 2) Λεπτή ινώδης κάψα ($< 65\mu\text{m}$), με μικρό περιεχόμενο σε λεία μυϊκά κύτταρα και κολλαγόνο⁵⁹⁻⁶².
- 3) Θετική αναδιαμόρφωση (remodeling) του τοιχώματος του αγγείου^{58, 60, 63}.
- 4) Διήθηση παραγόντων φλεγμονής από την ινώδη κάψα και την άπω στοιβάδα του αρτηριακού τοιχώματος, κυρίως μονοκύτταρων, μακροφάγων, ενεργοποιημένων T-λεμφοκυττάρων, μαστοκυττάρων και δενδριτικών κυττάρων^{59, 64, 65}.
- 5) Νεοαγγείωση εντός της αθηρωματικής πλάκας, και κυρίως στις περιοχές των ορίων της⁶⁶⁻⁶⁸.
- 6) Διαπίδυση ερυθρών αιμοσφαιρίων στην αθηρωματική πλάκα που προκαλεί ενδοπλακική αιμορραγία. Η μεμβράνη των ερυθροκυττάρων, πλούσια σε χοληστερόλη, αυξάνει τη συσσώρευση λιπιδίων, ενώ μετά τη λύση της απελευθερώνεται αιμογλοβίνη που προκαλεί οξειδωτική φθορά του ιστού⁶⁹.
- 7) Παρουσία αποτιτανώσεων και σποραδικών αποθέσεων ασβεστίου^{70, 71}.
- 8) Αλλοίωση σε περιοχή όπου η πλάκα υπόκειται ισχυρή διατμητική τάση τοιχώματος (shear stress)⁷²⁻⁷⁴. Πολλές όμως περιπτώσεις ραγής της αθηρωματικής πλάκας, σε περιοχές εξαιρετικά χαμηλής διατμητικής τάσης, υπονομεύουν την ομοφωνία σχετικά με την επίδραση της τάσης αυτής

και της ευπάθειας της πλάκας. Πρόσφατες μελέτες στρέφουν την υπόθεση προς τη συσχέτιση της αστάθειας με τις μηχανικές πιέσεις Von Mises (τυπικά κατά 5 τάξεις μεγέθους ισχυρότερες)^{58, 63}.



Εικόνα 3: Σχηματική επισκόπηση των χαρακτηριστικών μιας σταθερής αθηρωματικής πλάκας (αριστερά) και μιας ασταθούς αθηρωματικής πλάκας (δεξιά). (W van Lammeren G. et al., *Atherosclerotic plaque biomarkers: beyond the horizon of the vulnerable plaque*, *Curr Cardiol Rev.* 2011 Feb;7(1):22-7)

1.2.3 Ρήξη της Πλάκας και Σχηματισμός Θρόμβου

Μετά το σχηματισμό της πρώιμης βλάβης, θεωρείται ότι η αύξηση της πλάκας είναι ασυνεχής και εμφανίζεται σε ριπές⁴⁵. Αυτές οι «ριπές» ανάπτυξης μπορεί να συμβούν λόγω της ρήξης και επακόλουθης επιδιόρθωσης των πλακών. Η σύνθεση μιας πλάκας θεωρείται ότι καθορίζει τον κίνδυνο ρήξης. Οι πλάκες με παχύ ινώδεις κάψες θεωρούνται κλινικά σταθερές, ενώ οι πλάκες με υψηλή περιεκτικότητα σε λιπίδια και λεπτή ή καθόλου ινώδη κάψα θεωρούνται ευάλωτες και επιρρεπείς στη ρήξη⁷⁵.

Υπάρχουν τρεις κύριοι καθοριστικοί παράγοντες ρήξης της πλάκας: (i) η λέπτυνση της ινώδους κάψας, (ii) η αποικοδόμηση της μήτρας και (iii) ο σχηματισμός και η θρόμβωση των μικροαγγείων εντός της πλάκας:

i) Η λέπτυνση της ινώδους κάψας μπορεί να συμβεί μετά από διάφορες διεργασίες. Πρώτον, η απόπτωση των VSMC έχει ως αποτέλεσμα τη μειωμένη σύνθεση μήτρας, μειώνοντας την αντοχή εφελκυσμού της ινώδους κάψας⁷⁶. Μια μείωση του αριθμού των VSMC εντός της κάψας μειώνει επίσης την πιθανότητα παραγωγής εξωκυτταρικής μήτρας. Δεύτερον, η απόπτωση των μακροφάγων αυξάνει το μέγεθος του νεκρωτικού πυρήνα, εξασκώντας φυσική πίεση στην ινώδη κάψα και

οδηγώντας σε περαιτέρω απόπτωση των VSMC ⁷⁵. Τρίτον, η φλεγμονή που εμφανίζεται στην πλάκα μπορεί να οδηγήσει σε ενεργοποίηση πρωτεασών, με αποτέλεσμα την αποικοδόμηση των εξωκυτταρικών πρωτεϊνών, συμπεριλαμβανομένου του κολλαγόνου, και τη λέπτυνση της κάψας.

ii) Η αποικοδόμηση της μήτρας μειώνει την ποσότητα του κολλαγόνου στην πλάκα, με αποτέλεσμα τη μειωμένη αντοχή σε εφελκυσμό. Τα μακροφάγα εκκρίνουν διάφορες τάξεις εξωκυτταρικών πρωτεασών, συμπεριλαμβανομένων των πρωτεασών σερίνης, των καθεψινών και των MMPs. Η πλασμίνη, μια πρωτεάση σερίνης που αποικοδομεί το ινώδες και ενεργοποιεί επίσης τις MMPs, ρυθμίζει την ανάπτυξη και τη σταθερότητα της πλάκας, ο ακριβής ρόλος της, ωστόσο, παραμένει ασαφής, εξαιτίας της έλλειψης συγκεκριμένων ανασταλτικών φαρμάκων και διαφόρων μελετών σε ανθρώπους και μύες που έδωσαν αντιφατικά αποτελέσματα. Οι καθεψίνες είναι μια ευπροσάρμοστη οικογένεια πρωτεασών εξωκυτταρικής μήτρας που εμπλέκονται στην σταθερότητα της πλάκας, καθώς και άλλες διαδικασίες που εμπλέκονται στην αθηρωμάτωση, όπως η εισβολή μονοκυττάρων, ο σχηματισμός αφρωδών κυττάρων, η απόπτωση και η θρόμβωση. Η έκφραση καθεψίνης στα μακροφάγα συνεντοπίζεται με περιοχές κατακερματισμού της ελαστίνης, και μύες με έλλειψη σε καθεψίνη S και K, παρουσιάζουν μικρότερη περιοχή πλάκας, μείωση στην ανάπτυξη της πλάκας και λιγότερα θραύσματα ελαστίνης ⁷⁷. Οι MMPs συνεντοπίζονται σε περιοχές αποικοδομημένης εξωκυτταρικής μήτρας σε ανθρώπινες πλάκες και τα αυξημένα επίπεδα των MMP στο πλάσμα σχετίζονται με οξεία στεφανιαία σύνδρομα. Οι διαγονιδιακοί μύες με έλλειψη σε MMP και TIMP (αναστολέας των MMP) παρουσιάζουν διαφορικές επιδράσεις των MMPs στην εξέλιξη και τη σταθερότητα της αθηρωματικής πλάκας (βλέπε ανασκοπήσεις ^{57, 78}. Τα μαστοκύτταρα απελευθερώνουν μια πρωτεάση σερίνης που ονομάζεται χυμάση, η οποία προκαλεί απόπτωση των VSMC μέσω της αποικοδόμησης της πρωτεΐνης εξωκυτταρικής μήτρας φιμπρονεκτίνης και της κινάσης εστιακής προσκόλλησης, ιδιαίτερης σημασίας για την επιβίωση των VSMC ⁷⁹. Επιπλέον, οι πρωτεάσες των μαστοκυττάρων (χυμάση, τρυπτάση και καθεψίνη G) προκαλούν ενεργοποίηση των MMP ⁸⁰⁻⁸².

iii) Ο σχηματισμός μικροαγγείων μέσα στις αθηρωματικές πλάκες (νεοαγγειογένεση) είναι πιο εμφανής σε ασταθείς πλάκες από ό,τι στις σταθερές ινώδεις πλάκες, γεγονός που υποδηλώνει ότι τα μικροαγγεία και η επακόλουθη αιμορραγία εντός της πλάκας λόγω αδυναμίας των μικροαγγείων σχετίζονται με αστάθεια της πλάκας ⁸³. Τα μαστοκύτταρα που εντοπίζονται κοντά στα νεοαγγεία περιέχουν τον βασικό αυξητικό παράγοντα ινοβλαστών (bFGF), έναν ισχυρό προ-αγγειογόνο παράγοντα και κατά συνέπεια πιστεύεται ότι τα μαστοκύτταρα συμβάλλουν στην ανάπτυξη των νεοαγγείων ⁸⁴. Επιπλέον, τα μαστοκύτταρα περιέχουν άλλους προ-αγγειογόνους παράγοντες, όπως ισταμίνη, ηπαρίνη, τρυπτάση, χυμάση, αγγειακό ενδοθηλιακό αυξητικό παράγοντα (VEGF) και παράγοντα ανάπτυξης νεύρων (NGF), καθιστώντας το μαστοκύτταρο ένα δυναμικά ισχυρό προ-

αγγειογόνο κύτταρο τελεστή ⁸⁵. Οι εστιακές συλλογές των αγγειογόνων παραγόντων που παράγονται από T κύτταρα και μακροφάγα συμβάλλουν: (1) στην συνάθροιση των αιμοφόρων αγγείων γύρω από τον νεκρωτικό πυρήνα, (2) στον σχηματισμό ανώριμων αγγείων, και (3) στην απώλεια της βασικής μεμβράνης γύρω από τα λειτουργικά τριχοειδή αγγεία. Αυτές οι διεργασίες προκαλούν εκροή ερυθρών αιμοσφαιρίων (RBCs) στην πλάκα και προκαλούν έναν κύκλο φλεγμονής και νεοαγγειογένεσης. Συμβάλλοντας στην εναπόθεση ελεύθερης χοληστερόλης, τη διείσδυση μακροφάγων και τη διόγκωση του νεκρωτικού πυρήνα, η συσσώρευση μεμβρανών ερυθροκυττάρων μέσα σε μια αθηρωματική πλάκα μπορεί να αποτελεί ισχυρό αθηρογόνο ερέθισμα και μπορεί να αυξήσει τον κίνδυνο αποσταθεροποίησης της πλάκας ^{86, 87}. Η υπερβολική πρωτεολυτική δραστηριότητα που παράγεται από διάφορους κυτταρικούς τύπους, συμπεριλαμβανομένων των μακροφάγων και των μαστοκυττάρων, στη θέση του φλεγμονώδους ιστού μπορεί να προκαλέσει βλάβη στα νεοαγγεία ⁸⁸.

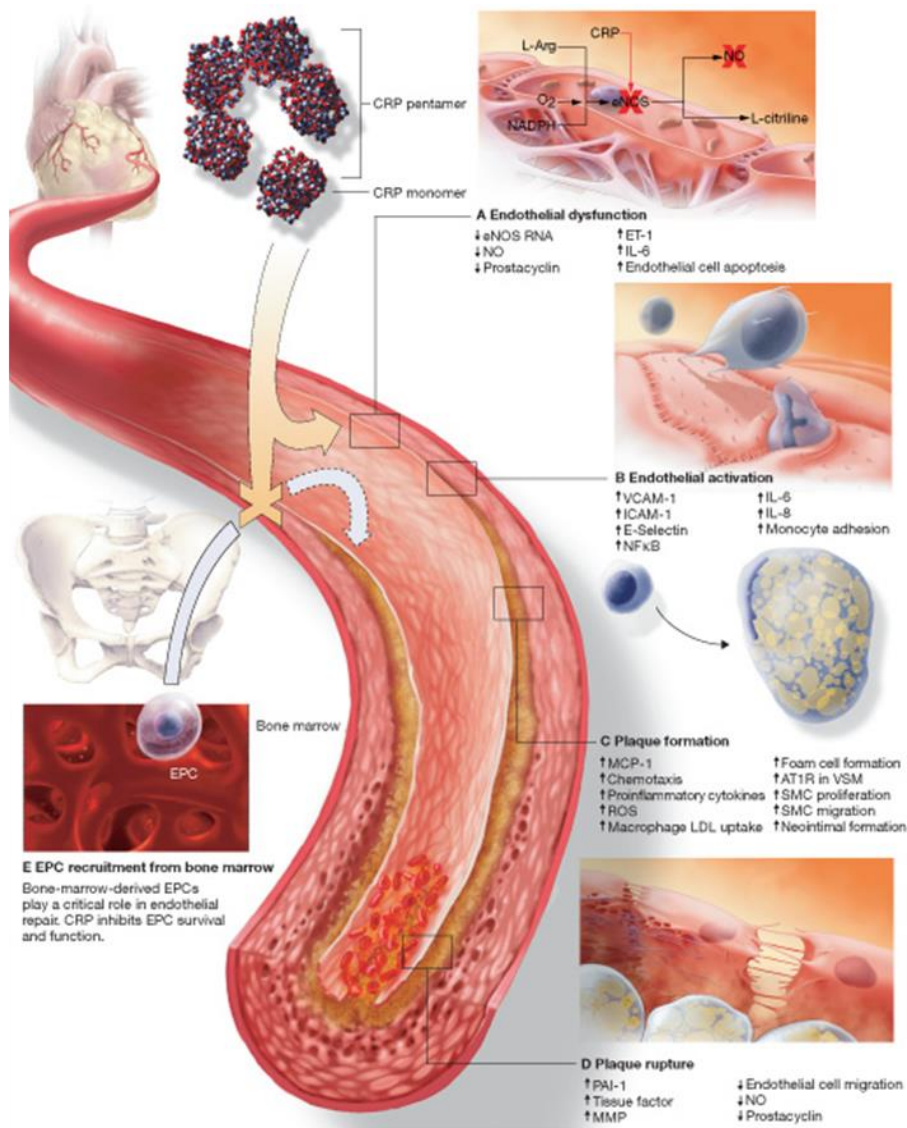
Η ρήξη πλακών εκθέτει τα συστατικά από πολύ θρομβογενείς πλάκες στην κυκλοφορία του αίματος, οδηγώντας σε συσσώρευση αιμοπεταλίων και σχηματισμό θρόμβων. Ο θρόμβος μπορεί να αποφράξει πλήρως το αιμοφόρο αγγείο, με αποτέλεσμα κλινικά συμπτώματα όπως η καρδιακή προσβολή ή το εγκεφαλικό επεισόδιο. Συνεπώς, είναι ζωτικής σημασίας η καλύτερη κατανόηση των μηχανισμών της ρύθμισης των αιμοπεταλίων και του σχηματισμού θρόμβων. Η πρωτεϊνική κινάση C φαίνεται να είναι σημαντικός μεσολαβητής αυτής της διαδικασίας, καθώς διαφορετικές isoμορφές διαδραματίζουν ξεχωριστούς ρόλους στη διαδικασία ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων ⁸⁹.

Η ρήξη της πλάκας μπορεί να αποκατασταθεί είτε με αναγέννηση είτε με επούλωση ⁷⁵. Και οι δύο αυτές διαδικασίες οδηγούν σε αύξηση του μεγέθους της πλάκας. Ο TGF - β απελευθερώνεται κατά τη διάρκεια της διαδικασίας φυσικής αποκατάστασης και διεγείρει τα VSMC να παράγουν συστατικά συνδετικού ιστού και εξωκυττάρια μήτρας, απαραίτητα για τη δικτύωση της ινώδους κάψας ⁹⁰. Η θρομβίνη, η οποία απελευθερώνεται κατά τη διάρκεια του σχηματισμού θρόμβου, είναι ένας διεγέρτης ανάπτυξης των VSMC και είναι επίσης θεμελιώδης για τον σχηματισμό της κάψας. Έτσι, τόσο ο TGF- β όσο και η θρομβίνη φαίνεται να είναι σημαντικοί συντελεστές στην αποκατάσταση της ρήξης.

Εκτός από τη ρήξη της πλάκας, η επιφανειακή διάβρωση μπορεί να οδηγήσει στο σχηματισμό θρόμβων πλούσιων σε αιμοπετάλια, καθώς το κολλαγόνο και άλλοι παράγοντες αποκαλύπτονται οδηγώντας στην προσκόλληση και την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων ⁴⁵. Ο προκύπτων θρόμβος μπορεί να οδηγήσει σε κλινικά συμπτώματα και ευθύνεται για το 30-40% των οξέων θρομβωτικών επεισοδίων ⁹¹. Ωστόσο, οι ακριβείς μηχανισμοί που διέπουν τη διάβρωση της πλάκας δεν έχουν καθοριστεί επαρκώς. Οι πρωτεάσες των μαστοκυττάρων, συμπεριλαμβανομένης της χυμάσης, της τρυπτάσης και της καθεψίνης G, μπορούν να συμβάλλουν στην αποδυνάμωση και τη διαρροή των

μικροσωματιδίων λόγω της διάσπασης της VE-καντερίνης, της φμπρονεκτίνης και της ενεργοποίησης των MMP, οι οποίες προκαλούν απόπτωση ή χαλάρωση της προσκόλλησης των ενδοθηλιακών κυττάρων και κατά συνέπεια διάβρωση⁹².

Λαμβάνοντας υπόψη τη στενή συσχέτιση μεταξύ της σταθερότητας της αθηρωματικής πλάκας και των καρδιαγγειακών συμβαμάτων, καθώς και την ανάγκη πρόληψης των τελευταίων καθίσταται επιτακτική η ανάγκη να αναπτυχθούν παρεμβάσεις οι οποίες θα προλαμβάνουν την εμφάνιση νέων αθηρωματικών αλλοιώσεων, θα επιβραδύνουν την εξέλιξη των ήδη υπάρχουσών αθηρωματικών βλαβών και το σημαντικότερο από όλα θα αλλάζουν την αθηρωματική πλάκα σε ένα πιο σταθερό φαινότυπο. Νεότερες μελέτες τονίζουν τη σημασία που έχει η τροποποίηση ορισμένων παραγόντων καρδιαγγειακού κινδύνου με στόχο τη μείωση της βαρύτητας στένωσης, την υποστροφή του μεγέθους της αθηρωματικής πλάκας και την αλλαγή της σύστασής της. Δυστυχώς οι έως τώρα, διεθνώς αποδεκτές, θεραπευτικές παρεμβάσεις, όπως η δίαιτα, η άσκηση ή η χορήγηση υπολιπιδαιμικών και άλλων φαρμάκων, επιφέρουν μικρές έως ανύπαρκτες μεταβολές στο μέγεθος και στο βαθμό στένωσης των αθηρωματικών αλλοιώσεων. Παρά όμως τα φτωχά αποτελέσματά τους στη βατότητα του αρτηριακού αυλού, τα κλινικά τους οφέλη είναι αξιοπρόσεκτα, γεγονός που πιθανότατα εξηγείται από τις θετικές αλλαγές που προκαλούν στη σύσταση της αθηρωματικής πλάκας, μειώνοντας την τάση ρήξης και θρόμβωσης και άρα περιορίζοντας τον καρδιαγγειακό κίνδυνο^{93, 94}. Πειραματικές μελέτες έχουν δείξει ότι η μείωση των επιπέδων των λιπιδίων μέσω δίαιτας, στατινών ή απευθείας χορήγησης της απολιποπρωτεΐνης A-I και HDL-like μορίων, μπορεί να μειώσει τη συσσώρευση λίπους στις αθηρωματικές πλάκες, να μειώσει τα επίπεδα των φλεγμονωδών παραγόντων, των μεταλλοπρωτεϊνών και του ιστικού παράγοντα και να αυξήσει τη συγκέντρωση κολλαγόνου στις αθηρωματικές πλάκες⁹⁵⁻⁹⁷. Όλες οι παραπάνω μεταβολές οδηγούν σε σταθεροποίηση της πλάκας με προφανή κλινικά οφέλη⁹⁸ (Εικ. 4).



Εικόνα 4: Η εξέλιξη της αθηρωματικής πλάκας και οι κυριότεροι μηχανισμοί που εμπλέκονται σε αυτήν. (Verma S, Szmitko PE, Ridker PM. C-reactive protein comes of age. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med.* 2005;2:29-36).

1.2.4 Η σημασία του εξωκυττάριου σκελετού στην αθηρωμάτωση

Η εξωκυττάρια σύσταση του αρτηριακού τοιχώματος χαρακτηρίζεται από την εκτεταμένη παρουσία δύο μακρομορίων, της ελαστίνης και του κολλαγόνου. Η λεπτή ισορροπία μεταξύ των λείων μυϊκών κυττάρων και των δύο αυτών ελαστικών μορίων δίνει στο αορτικό τοίχωμα τις λειτουργικές του ιδιότητες⁹⁹. Εκτός από τον προφανή τους ρόλο στη διαμόρφωση του εξωκυττάριου σκελετού πάνω στον οποίο στηρίζονται τα ενδοθηλιακά και λεία μυϊκά κύτταρα των στοιβάδων του αγγειακού τοιχώματος, η ελαστίνη και το κολλαγόνο επιτελούν πρόσθετες λειτουργίες, όπως η κατακράτηση λιποπρωτεϊνών, η μεταφορά σημάτων αυξητικών και άλλων παραγόντων, και η εξασφάλιση της

δύναμης, της δομικής ακεραιότητας αλλά και της ελαστικότητας του αγγειακού τοιχώματος¹⁰⁰⁻¹⁰². Η ελαστίνη και το κολλαγόνο διατάσσονται μέσα στις στοιβάδες του αγγειακού τοιχώματος σε ένα πλέγμα (ExtraCellular Matrix, ECM) με ισχυρούς δεσμούς, που δίνει στο αγγείο τις δομικές και μηχανικές του ιδιότητες. Η επαναδιοργάνωση του ECM είναι μια δυναμική διαδικασία που ελέγχεται και συντονίζεται από την αλληλεπίδρασή του με το αγγειακό τοίχωμα, μέσα από ένα μεγάλο εύρος εξωκυτταρικών μονοπατιών σήμανσης, με αποτέλεσμα τη φαινοτυπική προσαρμογή του ECM. Θεωρείται λοιπόν πως η επαναδιοργάνωση του ECM αποτελεί ένα σημαντικό βήμα προς την εκδήλωση παθολογικών καταστάσεων των αγγείων όπως η αθηρωμάτωση¹⁰³. Πέραν όμως του ρόλου που ασκεί το ECM στη δημιουργία κι εξέλιξη της αθηρωμάτωσης, φαίνεται πως η μορφολογία του πλέγματος εντός των αθηρωματικών πλακών, ο τρόπος διασύνδεσης των μακρομορίων εντός του πλέγματος και η αναλογία κολλαγόνου-ελαστίνης εντός του αθηρώματος, αποτελούν παράγοντες σταθερότητας της αθηρωματικής πλάκας^{104, 105}. Η πρόκληση ζημιάς ή τραύματος στον αγγειακό ιστό άλλωστε, ανεξαρτήτως αιτιολογίας, εκκινεί μια απάντηση του οργανισμού προς επιδιόρθωση. Το σχηματιζόμενο κολλαγόνο και η ελαστίνη συνεισφέρουν στην ακεραιότητα και δύναμη της ινώδους κάψας και επηρεάζουν την εξέλιξη της αθηρωματικής αλλοίωσης σε τέτοιο βαθμό ώστε να θεωρούνται σημαντικοί διαγνωστικοί δείκτες αθηρωμάτωσης¹⁰⁶. Ενώ το πλέγμα του κολλαγόνου προάγει την σύνδεση των κυττάρων, την μιτωτική αναπαραγωγή και την κυτταρική μετανάστευση, οι ελαστικές ίνες φαίνεται να αναστέλλουν τις παραπάνω λειτουργίες. Ο συντονισμένος έλεγχος των κυτταρικών αυτών λειτουργιών αποτελεί μια καίρια διαδικασία της ανάπτυξης κι επαναδιοργάνωσης του αγγειακού ιστού, και η σωστή λειτουργία του παραπάνω συστήματος είναι ουσιώδης έναντι της διαδικασίας της αθηρωμάτωσης¹⁰⁷.

1.2.4.1 Κολλαγόνο και αθηρωμάτωση

Κολλαγόνο ονομάζεται μια οικογένεια ζωικών πρωτεϊνών που εμφανίζεται άφθονη στο συνδετικό ιστό των σπονδυλωτών. Είναι μάλιστα το κύριο συστατικό του συνδετικού ιστού, και αποτελεί την αφθονότερη ποσοτικά πρωτεΐνη στα θηλαστικά^{108, 109}. Με τη μορφή επιμηκυμένων ινιδίων, αποτελεί συστατικό τόσο στους τένοντες όσο και σε άλλους ιστούς όπως οι σύνδεσμοι, το δέρμα, τα οστά, τα αγγεία και οι μεσοσπονδύλιοι δίσκοι. Έχουν αναγνωριστεί 28 τύποι μορίων που ανήκουν στην οικογένεια του κολλαγόνου, με τον τύπο I να αποτελεί τον συχνότερο, κατά ποσοστό μεγαλύτερο του 90%^{108, 110}. Το κολλαγόνο I είναι άλλωστε ο τύπος κολλαγόνου που συναντάται στις στοιβάδες του αγγειακού τοιχώματος.

Η σύνθεση του κολλαγόνου I από τους ινοβλάστες, τυπική και για τα υπόλοιπα μέλη της οικογένειας, γίνεται σε ένα ενδοκυτταρικό κι έπειτα σε ένα εξωκυτταρικό στάδιο. Κατά το

ενδοκυτταρικό στάδιο, τα πεπτίδια (προ προκολλαγόνο) υπόκεινται σε τμήση σε συγκεκριμένα σημεία, υδροξυλίωση και γλυκοζυλίωση και συνενώνονται σε τριπλές έλικες (προκολλαγόνο) που εκκρίνονται. Μετέπειτα, θα κοπούν εξωκυτταρικά από την πεπτιδάση του προκολλαγόνου, σχηματίζοντας τροποκολλαγόνο, που συνδεόμενο με άλλα ινίδια δημιουργεί το κολλαγόνο I. Το κολλαγόνο μπορεί να συνδεθεί με τις κυτταρικές μεμβράνες μέσω δεσμών με ορισμένες πρωτεΐνες, όπως η φιμπρονεκτίνη και οι ιντεγκρίνες.

Το κολλαγόνο αποτελεί το κύριο συστατικό τόσο των σταθερών όσο και των ασταθών αθηρωματικών πλακών. Η κύρια πηγή σύνθεσής του είναι τα λεία μυϊκά κύτταρα της έσω στοιβάδας του αγγείου (VSMCs). Ο ρόλος του, ως συστατικού του ECM, είναι συνδετικός, κι εξασφαλίζει τη δομική ακεραιότητα του αγγείου έναντι των μηχανικών πιέσεων που ασκούνται στα τοιχώματά του από την κυκλοφορία του αίματος. Στις αθηρωματικές αλλοιώσεις, η παρουσία του κολλαγόνου προάγει επίσης τη δομική ευστάθεια έναντι των ίδιων πιέσεων και αποτελεί παράγοντα έναντι της ρήξης. Η περιεκτικότητα του ECM σε κολλαγόνο είναι απόρροια μιας δυναμικής ισορροπίας μεταξύ της σύνθεσης του μακρομορίου από τους μυοϊνοβλάστες, αλλά και της διαρκούς αποδόμησής του από πρωτεολυτικά ένζυμα. Έτσι, μείωση της περιεκτικότητας της αθηρωματικής αλλοίωσης σε κολλαγόνο μπορεί να προέλθει από τη διατάραξη αυτής της ισορροπίας, είτε με μείωση της παραγωγής του (μείωση VSMCs λόγω αυξημένης απόπτωσης, μείωση μετανάστευσης VSMCs στην αθηρωματική πλάκα ή μειωμένη ινοβλαστική δραστηριότητά τους), ή με αύξηση της πρωτεολυτικής δραστηριότητας των ενζύμων που το αποδομούν, που προέρχονται από ενεργοποιημένα μακροφάγα^{111, 112}.

Τόσο σε πειραματικές μελέτες όσο και σε κλινικές, φαίνεται ότι οι αθηρωματικές πλάκες που εμφανίζουν αυξημένη περιεκτικότητα σε κολλαγόνο έχουν παχύτερη ινώδη κάψα, καλύτερα οργανωμένο ECM και εμφανίζουν με αυτόν τον τρόπο αυξημένη ικανότητα αντίστασης στις αιμοδυναμικές πιέσεις, πράγμα που τις καθιστά ευσταθείς. Αντίστοιχα, επιβεβαιώνεται ότι οι ασταθείς πλάκες, που οδηγούν σε οξεία απόφραξη του αρτηριακού αυλού από θρόμβωση, χαρακτηρίζονται από σχετικό έλλειμμα σε κολλαγόνο. Πειραματικά, μάλιστα, έχει γίνει συσχέτιση της έλλειψης κολλαγενάσης με τη σταθερότερη μορφολογία των αθηρωματικών αλλοιώσεων, ενώ σε κλινικό επίπεδο επιβεβαιώνεται η ρήξη της λεπτής και φτωχής σε κολλαγόνο ινώδους κάψας σε περιπτώσεις αποφρακτικών επεισοδίων^{113, 114}.

1.2.4.2 Ελαστίνη και αθηρωμάτωση

Οι ελαστικές ίνες αποτελούν σημαντικό συστατικό του συνδετικού ιστού. Όπως υποδεικνύει και το όνομά τους, η κύρια ιδιότητά τους είναι η ελαστικότητα, που επιτρέπει στους ιστούς να διατηρούν

το σχήμα τους μετά από τάνυση ή όποια άλλη παραμόρφωση. Οι ελαστικές ίνες μπορούν να διαταθούν έως και 50% του μήκους τους και να επανέλθουν στο αρχικό τους σχήμα με την παύση της τάσης. Στον αγγειακό ιστό, το ελαστικό πλέγμα όχι μόνο είναι υπεύθυνο για τη διατήρηση των μορφολογικών χαρακτηριστικών παρά τις αιμοδυναμικές πιέσεις, αλλά επίσης καθορίζει τη ικανότητα των αγγείων για σύσπαση και χάλαση, και είναι υπεύθυνο για την ομαλοποίηση της πίεσης, την οποία η καρδιά δημιουργεί με έναν λιγότερο συνεχή τρόπο, και ως εκ τούτου εξασφαλίζει την ομαλότερη ροή του αίματος ¹¹⁵⁻¹¹⁷. Τέλος, το πλέγμα των ελαστικών ινών αποτελεί ρυθμιστικό παράγοντα μονοπατιών σήμανσης, μέσω μηχανικής αγωγής σημάτων που εμπλέκονται στη μορφογένεση, την απάντηση σε τραύμα και τη φλεγμονή ¹¹⁶.

Η σύνθεση των ελαστικών ινών στα αγγεία γίνεται από τους ινοβλάστες και τα λεία μυϊκά κύτταρα. Αποτελούνται από τα πρωτεϊνικής φύσεως ελαστικά μικροϊνίδια (γλυκοπρωτεΐνες, φμπριλίνη, φμπρουλίνη και υποδοχείς της ελαστίνης) και από άμορφη ελαστίνη. Τα ελαστικά μικροϊνίδια διατάσσονται έτσι ώστε να δημιουργήσουν ένα ικρίωμα πάνω στο οποίο οργανώνεται η εναπόθεση άμορφης ελαστίνης. Η άμορφη ελαστίνη σχηματίζεται από τον πολυμερισμό της διαλυτής τροποελαστίνης ώστε να σχηματιστεί το αδιάλυτο πλέγμα ελαστίνης ¹¹⁸. Η τελική σύσταση των ελαστικών ινών είναι κατά 90% ελαστίνη, ενώ τα μικροϊνίδια συμπληρώνουν το υπόλοιπο 10% ¹¹⁷.

Η αποδόμηση της ελαστίνης, μέρος της συνολικής διαδικασίας του αρτηριακού remodeling που λαμβάνει διαρκώς τόπο στο τοίχωμα του αγγείου ως απόκριση στις αιμοδυναμικές και μηχανικές πιέσεις, αποτελεί κεντρικό σημείο στη διαμόρφωση της αθηρωματικής νόσου. Φαίνεται πως με την αυξανόμενη ηλικία, η ικανότητα των κυττάρων του ενήλικου ιστού για σύνθεση τροποελαστίνης και για οργάνωσή της σε ώριμες και λειτουργικές δομές, όμοιες της πολυπλοκότητας του ECM, σταδιακά μειώνεται κατά τη διαδικασία της ανάπτυξης ¹¹⁶. Αυτό οδηγεί σε σταδιακή αύξηση της αναλογίας κολλαγόνου/ελαστίνης στο ECM, δείκτη που αποτελεί ένδειξη αρτηριακής σκληρότητας και που οδηγεί σε ανελαστικότητα του τοιχώματος και αύξηση της ταχύτητας κύματος παλμού (Pulse Wave Velocity, PWV), όλα χαρακτηριστικά της δυσλειτουργίας του ενδοθηλίου ¹¹⁹. Άλλωστε, η αυξημένη αποδόμηση της ελαστίνης από ελαστάσες επιτρέπει τη διήθηση μονοκυττάρων και T λεμφοκυττάρων από τον αγγειακό αυλό στο ενδοθήλιο. Επίσης, προάγει τη μετανάστευση των VSMCs από το μέσο στον έσω χιτώνα, διαμέσου των ελαστικών στοιβάδων και τέλος προωθεί τη θετική αναδιαμόρφωση του αρτηριακού τοιχώματος, την αποσταθεροποίηση της πλάκας και την επακόλουθη ρήξη της ¹⁰².

Η ελαστίνη, εκτός από την εξασφάλιση της συνοχής και της ακεραιότητας της αθηρωματικής πλάκας, μεσολαβεί επίσης στην εναπόθεση λίπους στις αθηρωματικές πλάκες. Η ελαστίνη της έσω στοιβάδας αγγείου με αθηρωματική πλάκα περιέχει περισσότερη χοληστερόλη από την αντίστοιχη μη αθηρωματικού αγγείου ¹²⁰. Αυτό πιθανότατα συμβαίνει γιατί η ελαστίνη συνδέεται και

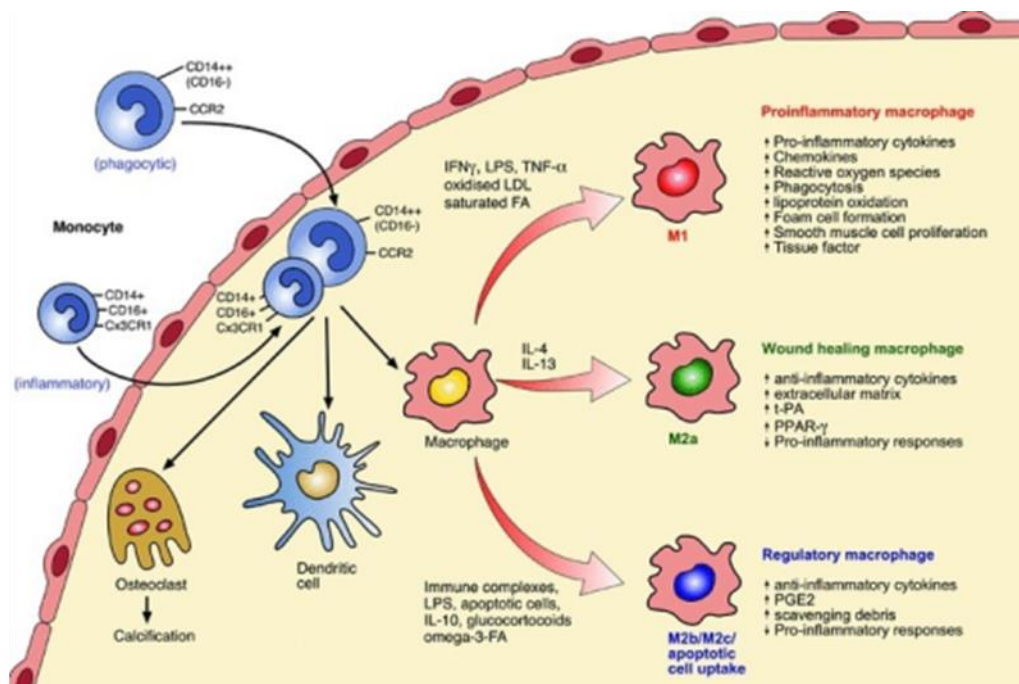
κατακρατά τα μόρια LDL, IDL και VLDL στο αγγειακό τοίχωμα ¹²¹. Το επιπλέον εύρημα, ότι ασταθείς πλάκες στεφανιαίων ή καρωτιδικών αρτηριών εμφανίζουν αυξημένα επίπεδα ελαστίνης, θα μπορούσε να οδηγήσει στον ισχυρισμό ότι τελικά η ελαστίνη συνδέεται με δυσμενή εξέλιξη της αθηρωμάτωσης ^{105, 122}. Η κατάσταση όμως είναι διαφορετική, όπως προκύπτει από ευρήματα που δείχνουν ότι τα φαινομενικά αυξημένα επίπεδα ελαστίνης στις ασταθείς πλάκες οφείλονται σε μετρήσεις που δεν αντιστοιχούν τόσο σε οργανωμένες ελαστικές ίνες, αλλά σε πρόδρομες μορφές ελαστίνης που προκύπτουν είτε μέσω σύνθεσης τροποελαστίνης, ή λόγω της αποδόμησης των ελαστικών ινών. Χαρακτηριστικό γνώρισμα της τροποελαστίνης που βρίσκεται στις αθηρωματικές πλάκες είναι η μεγαλύτερη ικανότητα σύνδεσής της (δύο έως τέσσερις φορές) με την LDL σε σχέση με την ελαστίνη που υπάρχει σε μη αθηρωματικό, φυσιολογικό αγγείο ¹²³. Παράλληλα, στις αθηρωματικές περιοχές που είναι προδιατεθειμένες για ρήξη παρουσιάζεται αυξημένη συγκέντρωση μακροφάγων και ταυτόχρονα μεγάλος ρυθμός αποδόμησης της ελαστίνης μαζί με βραδεία απορρόφηση των προϊόντων της πρωτεόλυσης. Κατ' αυτόν τον τρόπο, οι ασταθείς αθηρωματικές πλάκες εμφανίζουν αυξημένα επίπεδα ελαστίνης, τα οποία όμως δεν ανταποκρίνονται στα πραγματικά επίπεδα λειτουργικών ελαστικών ινών ¹²⁴. Μία άλλη αιτία αυξημένης συγκέντρωσης ενδιάμεσων μορφών ελαστίνης στις εύθραυστες αθηρωματικές πλάκες είναι η αυξημένη σύνθεσή της ως απόκριση στη βλάβη του ιστού. Με την αυξανόμενη ηλικία όμως, η παραγόμενη τροποελαστίνη παρουσιάζει μικρό ρυθμό ενσωμάτωσης στο λειτουργικό πλέγμα και παραμένει στο αθηρωματικό τοίχωμα ως πρόδρομη, ενδιάμεση μορφή. Το τελικό αποτέλεσμα είναι να συσσωρεύονται στο αγγείο ποσότητες μιας ενδιάμεσης μορφής ελαστίνης και τελικά η αθηρωματική πλάκα να χάνει τη σταθερότητά της παρά την αυξημένη συγκέντρωση ελαστίνης, αφού αυτή είναι μη λειτουργική.

Παρεμβάσεις που στοχεύουν στην αλλαγή της σύστασης της αθηρωματικής πλάκας, όσον αφορά το ECM, κι επιδιώκουν με αυτόν τον τρόπο τη σταθεροποίησή της αποκτούν στρατηγική σημασία για την πρόληψη καρδιαγγειακών συμβαμάτων. Δείκτες της αποτελεσματικότητας τέτοιων παρεμβάσεων αποτελούν η συγκέντρωση κολλαγόνου και ελαστίνης στις αθηρωματικές αλλοιώσεις και την ινώδη κάψα. Η χορήγηση εικοσαπεντανοϊκού οξέος για παράδειγμα, αυξάνοντας την περιεκτικότητα της αθηρωματικής αλλοίωσης ApoE -/- μυών σε κολλαγόνο, σταθεροποιεί τις αθηρωματικές πλάκες ¹²⁵.

1.2.5 Ο ρόλος των μακροφάγων στην ανάπτυξη κι εξέλιξη της αθηρωμάτωσης.

Τα μακροφάγα λεμφοκύτταρα είναι στοιχεία τόσο των πρώιμων όσο και των προχωρημένων μορφών της αθηρωματικής αλλοίωσης, όπως φάνηκε κι από την περιγραφή των σταδίων της νόσου

(Εικ. 5). Ο ρόλος τους είναι η απορρόφηση από τον φλεγμαίνοντα ιστό της οξειδωμένης LDL χοληστερόλης. Η χημειοτακτική διαδικασία διαπίδυσής τους στο ενδοθήλιο ξεκινά από τα μονοκύτταρα της κυκλοφορίας, που δεχόμενα σήματα από μόρια προσκόλλησης κι άλλους χημειοτακτικούς παράγοντες εισέρχονται στις στοιβάδες του αγγείου. Τα σήματα αυτά προέρχονται από τη συσσώρευση λιποπρωτεϊνών που περιέχουν απολιποπρωτεΐνη Β (ApoB-LPs)¹²⁶. Εισερχόμενα στον υποενδοθηλιακό χώρο, διαφοροποιούνται σε μακροφάγα τα οποία φαγοκυτταρώνουν την οξειδωμένη LDL. Αδυνατώντας να την καταβολίσουν, σταδιακά το κυτταρόπλασμά τους γεμίζει οργανίδια που περιέχουν λιπίδια και τα μακροφάγα μετατρέπονται σε αφρώδη κύτταρα¹²⁷.



Εικόνα 5: Ενεργοποίηση μακροφάγων σε αναπτυσσόμενες και προχωρημένες ανθρώπινες αθηρωματικές πλάκες. (Wilson H.M., *Macrophages heterogeneity in atherosclerosis - implications for therapy*, *J Cell Mol Med.* 2010 Aug;14(8):2055-65)

1.2.5.1 Τα μακροφάγα στην πρώιμη αθηρωματική αλλοίωση

Κατά την παθογένεση της αθηρωμάτωσης, τα μονοκύτταρα του αίματος, προσελκόμενα με χημειοτακτισμό, συνδέονται με τα κύτταρα του ενδοθηλίου μέσω αλληλεπιδράσεων μεταξύ του γλυκοπρωτεϊνικού υποδοχέα σελεκτίνης P -1 (PSGL-1) των μονοκυττάρων και σελεκτινών του ενδοθηλίου¹²⁶. Η σελεκτίνη-E επικάθεται της σελεκτίνης-P για να υποστηρίξει την κύλιση των μονοκυττάρων επάνω στο φλεγμαίνον ενδοθήλιο^{128, 129}. Έπειτα, τα μονοκύτταρα χρησιμοποιούν το

LFA-1 (Lymphocyte Function-associated Antigen-1), το VLA-4 (Very Late Antigen-4) και τους αντίστοιχους υποδοχείς στο ενδοθήλιο (Vascular Cell Adhesion Molecule, VCAM-1 και Intercellular Adhesion Molecule-1, ICAM-1) για δημιουργία ισχυρότερων δεσμών και την παύση της κύλισης¹³⁰. Τέλος, μέσω διαπίδυσης, τα μονοκύτταρα εισέρχονται στον υποενδοθηλιακό χώρο¹³¹. Πρόσφατες μελέτες σε μύες με ομόζυγη έλλειψη απολιποπρωτεΐνης E (ApoE-/-) δείχνουν ότι η στρατολόγηση μονοκυττάρων από την κυκλοφορία στην περιοχή της ήδη αναπτυγμένης αθηρωματικής αλλοίωσης είναι συνεχής κατά την πορεία της νόσου¹²⁷.

Τα μονοκύτταρα, στον ενδοθηλιακό χώρο, οδηγούμενα από τον M-CSF (Macrophage Colony Stimulating Factor) και άλλους παράγοντες διαφοροποίησης όμως η χημοκίνη CXCL4, μετατρέπονται σε δύο τύπους μακροφάγων ή/και δενδριτικών κυττάρων^{132, 133}. Τα M1 και M2 μακροφάγα έχουν αντίθετους ρόλους κατά την φλεγμονή, παρότι και οι δύο πληθυσμοί εντοπίζονται σε αθηρωματικές αλλοιώσεις. Τα μακροφάγα τύπου M1 προάγουν τη φλεγμονή και ενεργοποιούνται από λιποπολυσακχαρίτες υπό την παρουσία ιντερφερόνης- γ , και παράγουν υψηλά επίπεδα IL-1, IL-2, IL-6, IL-23 και TNF- α . Αντίθετα, τα ενεργοποιημένα M2 μακροφάγα διαφοροποιούνται παρουσία IL-1, IL-4, IL-13 και βιταμίνης D3 και παράγουν μεγάλες ποσότητες IL-10¹³⁴. Τελευταία, αυξανόμενο ερευνητικό ενδιαφέρον επικεντρώνεται στο ρόλο της ετερογένειας των μακροφάγων στην αθηρωμάτωση, ενώ τα μέχρι τώρα ευρήματα οδηγούν στη συσχέτιση της ανισορροπίας του λόγου M1 προς M2 μακροφάγων στις προχωρημένες αθηρωματικές πλάκες με την αδυναμία ελέγχου του βαθμού της φλεγμονής¹³⁵. Παρόλα αυτά, σε μεγάλο βαθμό η γνώση μας σχετικά με το ρόλο του λόγου M1/M2 προκύπτει από μελέτες in vitro και σε σχέση με μετρήσεις της έκφρασης γονιδίων και λειτουργικών χαρακτηριστικών των κυττάρων, αποκρινόμενων σε διάφορες ουσίες, χωρίς να είναι δυνατός ο χαρακτηρισμός της σημασίας των κυττάρων αυτών μέσα στην αθηρωματική πλάκα.

1.2.5.2 Τα μακροφάγα στην εξελιγμένη αθηρωματική αλλοίωση

Τα μακροφάγα παίζουν ενεργό ρόλο στη μορφολογία των ανεπτυγμένων αθηρωματικών αλλοιώσεων. Η αυξημένη παρουσία τους συσχετίζεται με λεπτή ινώδη κάψα και με μεγέθυνση του νεκρωτικού πυρήνα, που με τη σειρά τους μπορούν να οδηγήσουν σε περαιτέρω αύξηση της φλεγμονώδους αντίδρασης και την έκκριση επιπλέον αποπτωτικών σημάτων για τα λεία μυϊκά κύτταρα, τα ενδοθηλιακά κύτταρα και τα ίδια τα λευκοκύτταρα εντός των πλακών¹³⁶. Μολονότι τα μακροφάγα αποτελούν ειδικά φαγοκύτταρα ικανά να απομακρύνουν τα μόρια τροποποιημένων LDLs και τα κατάλοιπα της κυτταρικής απόπτωσης, η περίσσεια των φλεγμονωδών αυτών παραγόντων μπορεί να οδηγήσει σε δυσλειτουργία των μακροφάγων, τα οποία αν και έχουν μεγάλη

περίοδο ημιζωής, υπόκεινται κι αυτά σε έναν σταθερό ρυθμό απόπτωσης ¹³⁷. Η περίσσεια χοληστερόλης που κυκλοφορεί στο ενδοπλασματικό δίκτυο και η ενεργοποίηση της C/EBP ομόλογης πρωτεΐνης-10 αποτελούν κομβικά σημεία στην πρόκληση απόπτωσης των μακροφάγων μέσω της χοληστερόλης ¹³⁸. Η κασπάση-3, οι καθεψίνες και ο επιφανειακός υποδοχέας οξειδωμένης λιποπρωτεΐνης (Lectin-like oxidized LDL receptor 1, LOX-1) είναι επίσης παράγοντες που εμπλέκονται στην αποπτωτική διαδικασία των μακροφάγων ¹³⁹⁻¹⁴¹. Παρά το γεγονός ότι αντίρροπα, παράγοντες επιβίωσης, όπως η πρωτεΐνη αποσύνδεσης 2 (Uncoupling Protein 2 - UCP2) και η κασπάση-2, παρουσιάζουν αυξημένη έκφραση σε απάντηση της απόπτωσης αφρωδών κυττάρων, η δυναμική ισορροπία των προ-αποπτωτικών παραγόντων σε σχέση με τους παράγοντες επιβίωσης των μακροφάγων στις αθηρωματικές αλλοιώσεις ευνοεί την απόπτωση ¹⁴². Η μειωμένη φαγοκυτταρική ικανότητα των μακροφάγων σε προχωρημένα στάδια της νόσου, συνδυαζόμενη με τον αυξημένο ρυθμό απόπτωσης μπορούν να οδηγήσουν σε δευτερογενή νέκρωση και ανεξέλεγκτη απελευθέρωση πρωτεολυτικών ενζύμων. Τα τελευταία αποδομούν το εξωκυττάριο υλικό και επιτείνουν τον κυτταρικό θάνατο με αποτέλεσμα τη λέπτυνση της ινώδους κάψας και την αύξηση του νεκρωτικού πυρήνα της αθηρωματικής πλάκας ¹⁴³.

1.2.5.3 Κυτταρική νέκρωση και σχηματισμός νεκρωτικού πυρήνα

Η προοδευτική νέκρωση των αφρωδών κυττάρων οδηγεί σε απελευθέρωση χημειοτακτικών παραγόντων, όπως ιντερλευκίνες, παράγοντες νέκρωσης όγκων, συμπληρωματικούς παράγοντες και μιτογόνους αυξητικούς παράγοντες που διατηρούν τη φλεγμονώδη διαδικασία. Όλοι αυτοί διεγείρουν την υπερπλασία των λείων μυϊκών κυττάρων και την ανάπτυξη εξωκυττάρου υλικού. Η διαδικασία της νέκρωσης χαρακτηρίζεται από κυτοπλασματική υπερπλασία, μη αναστρέψιμη βλάβη της κυτταροπλασματικής μεμβράνης και διάχυση του κυτταροπλασματικού περιεχομένου. Ο πυρήνας παραμένει ακέραιος, αν και αναφέρονται επίσης πυρηνική διόγκωση, πύκνωση της χρωματίνης και αποδόμηση του DNA ¹⁴⁴. Για πολύ καιρό, η νέκρωση θεωρείτο μια τυχαία και άνευ ελέγχου διαδικασία, αλλά η θεώρηση αυτή έχει αρχίσει να αμφισβητείται από δεδομένα που δείχνουν ότι ο νεκρωτικός κυτταρικός θάνατος μπορεί να είναι ελεγχόμενος από μονοπάτια σήμανσης. Για παράδειγμα, οι υποδοχείς TNFR1, FasR, TRAIL-R και οι TLR3 και TLR4 φαίνεται πως επάγουν τη νέκρωση, ειδικά απουσία αναστολέων των κασπασών ¹⁴⁵. Όποια και αν είναι η διαδικασία της νέκρωσης, γεγονός παραμένει ότι σε προχωρημένες αθηρωματικές αλλοιώσεις τα νεκρωτικά κύτταρα (κυρίως VSMC και μακροφάγα) αποτελούν την πλειοψηφία σε σχέση με αυτά που παρουσιάζουν αποπτωτικό φαινότυπο ¹⁴⁶. Τα μόρια που απελευθερώνονται από τα νεκρωτικά κύτταρα, όπως το HMGB1 και η κυκλοφιλίνη Α (CypA), που συγκρατούνται στον πυρήνα των

αποπτωτικών κυττάρων αλλά απελευθερώνονται από τα νεκρωτικά, αποτελούν σήματα κινδύνου που πυροδοτούν φλεγμονώδη αντίδραση. Συγκεκριμένα, επάγουν την παραγωγή φλεγμονωδών κυτοκινών από τα VMSCs και τα μακροφάγα, αποτελούν χημειοτακτικούς παράγοντες για τη μετανάστευση των SMCs από τη μέση στην έσω στοιβάδα και την αύξησή τους και αυξάνουν το ρυθμό διαπύδσης των μονοκυττάρων (αύξηση έκφρασης ICAM-1 και VCAM-1). Τα μακροφάγα, αποκρινόμενα στην CyrA, εκτός από την έκκριση των TNF- α , IL-1 α , IL 1 β , IL 6, MIP 1 α και MIP 1 β (που αποτελούν φλεγμονώδεις εκκρίσεις σε απόκριση την δέσμευσης HMGB1 από τους TLR2, TLR4 και RAGE) εκκρίνουν επίσης την MMP 9 και την IL-6 ¹⁴⁴.

1.2.5.4 Η πρωτεολυτική δράση των μακροφάγων

Τα μακροφάγα κύτταρα, επίσης, παράγουν κι εκκρίνουν πρωτεϊνάσες, όπως ελαστάσες, μεταλλοπρωτεϊνάσες (MMPs και ADAMs) και ελεύθερες ρίζες, οι οποίες οδηγούν σε τραυματισμό του αρτηριακού τοιχώματος και ρήξη της πλάκας. Η ενδοκύττωση της ox-LDL από τα μακροφάγα τα διεγείρει προς σύνθεση κι έκκριση MMPs, κυρίως MMP-1 και MMP-9 ¹⁴⁷. Οι MMPs, που μπορούν να αποδομήσουν όλα τα συστατικά του εξωκυττάρου υλικού, διαδραματίζουν καίριο ρόλο στην εξέλιξη, ρήξη ή μετάβαση σε ασταθή μορφή της αθηρωματικής πλάκας ¹⁴⁸. Επιπλέον, τα μακροφάγα της αθηρωματικής πλάκας εκκρίνουν και κυτταροτοξικούς παράγοντες, όπως οι TNF α , FasL και η αγγειοτενσίνη II, και μπορούν να αυξήσουν περαιτέρω την έκκριση των MMPs διαμέσου αυτοκρινών ή/και παρακρινών μηχανισμών από γειτονικά κύτταρα ¹⁴⁹. Εκτός από την αποδόμηση του ECM, τα μακροφάγα μπορούν να μειώσουν απευθείας τη σύνθεσή του στην αθηρωματική πλάκα μέσω της έκκρισης του προ-αποπτωτικού παράγοντα των λείων μυϊκών κυττάρων, FasL ¹⁵⁰. Εκτός από τις μεταλλοπρωτεϊνάσες αυξημένη είναι επίσης η έκφραση ελαστολυτικών ενζύμων (π.χ. cathepsins S, K, και F) στις αθηρωματικές πλάκες, ιδίως σε περιοχές που είναι πλούσιες σε μακροφάγα ¹⁵¹. Παράλληλα, ο αναστολέας των πρωτεασών της κυστεΐνης (cystatin C), εμφανίζεται με μειωμένη συγκέντρωση σε αθηρωματικές και ανευρυσματικές βλάβες ¹⁵². Επομένως, η διήθηση των αθηρωματικών πλακών από μακροφάγα κύτταρα και οι πολλαπλές φλεγμονώδεις και πρωτεολυτικές δράσεις τους αποτελούν συνδεδετικό κρίκο μεταξύ της τοπικής φλεγμονής, της ρήξης της αθηρωματικής πλάκας και των κλινικών καρδιαγγειακών συμβαμάτων ¹⁵³.

1.2.6 Λεία μυϊκά κύτταρα και αθηρωμάτωση

Ένα πρώιμο φαινόμενο κατά την ανάπτυξη της λιπώδους γράμμωσης είναι η χημειοτακτική συσσώρευση των φλεγμονωδών κυττάρων της κυκλοφορίας, καθώς και ο πολλαπλασιασμός και η

μετανάστευση των VSMCs από τη μέση στοιβάδα στην έσω στοιβάδα του αγγείου, όπου και θα σχηματιστεί αργότερα η αθηρωματική πλάκα. Εκτός της μετανάστευσης των VSMCs στον τόπο της φλεγμονής, το περιεχόμενο της αθηρωματικής αλλοίωσης σε VSMCs αυξάνεται επίσης λόγω διαφοροποίησης ενδοθηλιακών κυττάρων και κυκλοφορούντων πρόδρομων φλεγμονωδών κυττάρων ή από μετανάστευση ινοβλαστών και πολυδύναμων βλαστοκυττάρων από τον έξω χιτώνα ¹⁵⁴⁻¹⁵⁶.

1.2.6.1 Ο ρόλος των VSMCs στην αθηρωμάτωση

Ο ρόλος των VSMCs στην αθηρωμάτωση είναι διττός, ανάλογα με το στάδιο της αθηρογένεσης στο οποίο μελετώνται. Κατά τα πρώιμα στάδια ανάπτυξης της νόσου τα VSMCs διαφοροποιούνται και μεταναστεύουν στον έσω χιτώνα, παράγουν εξωκυττάριο υλικό και συμβάλλουν στην πάχυνση του αγγειακού τοιχώματος και στην αύξηση του μεγέθους πρώιμων αθηρωματικών βλαβών (λιπώδεις γραμμώσεις). Σε προχωρημένες όμως βλάβες τα ίδια κύτταρα ασκούν προστατευτικό ρόλο, αφού είναι τα μοναδικά κύτταρα που έχουν τη δυνατότητα με την παραγωγή ελαστικών ινών και κολλαγόνου να συνθέτουν την ινώδη κάψα, η οποία είναι απαραίτητη για την ακεραιότητα της πλάκας και το διαχωρισμό του αίματος από τους θρομβογόνους παράγοντες που βρίσκονται στο εσωτερικό της.

Η ινώδης κάψα των προχωρημένων αθηρωματικών αλλοιώσεων περιέχει κολλαγόνο, ελαστίνη και VSMCs και καλύπτει ένα νεκρωτικό πυρήνα πλούσιο σε λιπίδια και μακροφάγα. Η σχετική αναλογία των παραπάνω στοιχείων στην κάψα είναι αυτή που καθορίζει τις κλινικές εκδηλώσεις της αθηρωματικής αλλοίωσης αφού επηρεάζει τη δομική ακεραιότητα της ινώδους κάψας και άρα τη σταθερότητα της αθηρωματικής πλάκας ¹⁵⁷. Οι αθηρωματικές πλάκες που χαρακτηρίζονται ως ασταθείς περιέχουν μεγαλύτερη αναλογία φλεγμονωδών κυττάρων και λιπιδίων, μικρότερη αναλογία VSMCs και λεπτή ινώδη κάψα, φτωχή σε VSMCs σε σχέση με τις αντίστοιχες σταθερές αθηρωματικές αλλοιώσεις ¹³. Έτσι, στις προχωρημένες βλάβες η μετανάστευση των VSMCs από το μέσο χιτώνα στο χώρο της αθηρωματικής αλλοίωσης και ο πολλαπλασιασμός τους οδηγούν σε αυξημένη σύνθεση κολλαγόνου και σταθεροποίηση της αθηρωματικής πλάκας ¹⁵⁸. Αντίθετα, η ελάττωση του αριθμού των VSMCs λόγω απόπτωσης συσχετίζεται με αστάθεια της αθηρωματικής πλάκας και ανάλογα κλινικά σύνδρομα, όπως ασταθή στηθάγχη ¹⁵⁹.

1.2.6.2 Ρύθμιση της αύξησης των VSMCs

Τα VSMCs εμφανίζουν πολυμορφία φαινοτύπων ^{160, 161}. Στα φυσιολογικά, ώριμα αγγεία, ο κύριος φαινότυπος είναι το πλήρως διαφοροποιημένο λείο μυϊκό κύτταρο, με συσπαστικό φαινότυπο, του

οποίου ο ρόλος είναι η ρύθμιση της διαμέτρου του αγγείου (αγγειοσυστολή κι αγγειοδιαστολή) και της ροής του αίματος^{155, 162}. Η μετάβαση από συσπαστικό φαινότυπο σε συνθετικό (σύνθεση των συστατικών του ECM, ελαστικές ίνες, κολλαγόνο), μεταναστευτικό και αυξητικό συμβαίνει ως απάντηση σε τραύμα προκειμένου να γίνει επιδιόρθωση του ιστού. Ο συνθετικός φαινότυπος, η αύξηση και η μετανάστευση των VSMCs είναι λοιπόν όχι μόνο φυσιολογικές λειτουργίες, αλλά και απαραίτητες για τον ιστό.

Η αύξηση των VSMCs ως απάντηση σε τραύμα ή άλλες πιέσεις ρυθμίζεται από την παραγωγή ενός αριθμού αυξητικών παραγόντων όπως ο επιδερμικός αυξητικός παράγοντας (Epidermal Growth Factor, EGF), ο αυξητικός παράγοντας ινοβλαστών (Fibroblast Growth Factor, FGF), ο ινσουλινόμορφος αυξητικός παράγοντας (Insulin-like Growth Factor, IGF), ο αυξητικός παράγοντας προερχόμενος από αιμοπετάλια (Platelet-Derived Growth Factor, PDGF), ο αυξητικός παράγοντας μετασχηματισμού (Transforming Growth Factor, TGF-β), ο αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας (Vascular Endothelial Growth Factor, VEGF) και η Αγγειοτενσίνη II (Ang II)¹⁶³. Αναστολείς της αύξησης των VSMCs, όπως οι θεικές ηπαρίνες (heparin sulfates) και το μονοξείδιο του αζώτου (NO), εμπλέκονται επίσης στη ρύθμιση της λειτουργίας των VSMCs και παίζουν ρόλο στην ισορροπία που ελέγχει την απάντηση στο τραύμα¹⁶⁴. Κατά τη διαδικασία αυτή, πολλά κύτταρα δρουν με παρακρινή τρόπο ώστε να επάγουν τη διαδικασία ίασης σε γειτονικά κύτταρα. Όταν τα μεταναστεύοντα κι αυξητικά κύτταρα αποτυγχάνουν να επανέλθουν στο συσπαστικό φαινότυπο, ενδεχομένως λόγω εκτεταμένης παρουσίας μιτογόνων παραγόντων στο κυτταρικό περιβάλλον, παράγουν παθολογική επαναδιοργάνωση και δημιουργούνται αλλοιώσεις του ενδοθηλίου^{162, 165, 166}.

1.2.6.3 Ρύθμιση της μετανάστευσης των VSMCs

Πέραν όμως των αυξητικών παραγόντων που σηματοδοτούν τη μετάβαση από τον έναν φαινότυπο στον άλλον, ρόλους κλειδιά έχουν και άλλα μόρια με λειτουργίες που αναστέλλουν ή επιτείνουν την κινητικότητα των κυττάρων στον ιστό. Οι ιντεγκρίνες παίζουν μείζονα ρόλο στη διασύνδεση των κυττάρων με το ECM και μεταξύ τους, ελέγχοντας έτσι την κινητικότητά τους, αποτελούν υποδοχείς για μοριακά σήματα, ενώ επίσης φαίνεται πως δρουν και ως μηχανοϋποδοχείς, ρυθμίζοντας τη λειτουργία του κυτοσκελετού¹⁶⁷. Η ILK, μια πρωτεϊνική κινάση σερίνης-θρεονίνης που περιέχει ένα καταλυτικό τμήμα στο καρβοξυτελικό της άκρο, φαίνεται να έχει δύο διακριτούς ρόλους. Από τη μία είναι μια πρωτεΐνη σκαλωσιάς, μεσολαβώντας στη δέσμευση των ιντεγκρινών σε συγκεκριμένα σημεία του ECM και οργανώνοντας την εξάπλωση των κυττάρων, ενώ παράλληλα δρα ως αγωγός σημάτων μέσω της καταλυτικής της λειτουργίας^{168, 169}. Άλλες πρωτεΐνες που εμπλέκονται στη μετανάστευση των VSMCs είναι η FAK, η cofilin και η cortactin, ενώ σημαντικός είναι και ο ρόλος

των MMPs, που αποδομώντας το ECM απελευθερώνουν τα μυϊκά κύτταρα και δημιουργούν δρόμους διευκολύνοντας τη μετανάστευση¹⁶³. Τέλος, ένας παράγοντας κλειδί, που καθορίζει την κίνηση των κυττάρων, είναι οι διακυτταρικές συνδέσεις. Οι συνδέσεις αυτές καθορίζονται κυρίως από τις cadherins. Ισχυρές συνδέσεις αποτρέπουν τη μετανάστευση μεμονωμένων κυττάρων. Στην περίπτωση αυτή, η μετακίνηση ομάδων κυττάρων βρίσκει εμπόδιο στη μειωμένη ικανότητά τους να διέρχονται από το ECM. Εάν όμως δεν υπάρχουν ισχυροί δεσμοί μεταξύ των κυττάρων, τότε αυτά κινούνται ανεξάρτητα τόσο σε ταχύτητα όσο και κατεύθυνση¹⁷⁰.

1.2.6.4 Η απόπτωση των VSMCs

Η παρουσία των VSMCs, το πλήθος και η λειτουργία τους στις αθηρωματικές αλλοιώσεις, ρυθμίζονται εκτός από το ρυθμό μετανάστευσης και διαφοροποίησής τους και από το ρυθμό με τον οποίο αποπίπτουν. Σε πρώιμες βλάβες έχει βρεθεί ότι ο ρυθμός απόπτωσης είναι χαμηλός σε αντίθεση με προχωρημένες βλάβες στις οποίες υπάρχει μεγαλύτερη απόπτωση όχι μόνο των VSMCs, αλλά και των μακροφάγων¹⁷¹. Κλινικά συμπτώματα αστάθειας της αθηρωματικής πλάκας παρουσιάζουν υψηλότερα επίπεδα απόπτωσης VSMCs συγκριτικά με ασθενείς οι οποίοι είχαν σταθερές πλάκες¹⁷². Επιπλέον, η απόπτωση των VSMCs συνδέεται με μια σειρά άλλων χαρακτηριστικών εξέλιξης της αθηρογένεσης, όπως τη φλεγμονή, την επασβέστωση, τη θρόμβωση και το αρτηριακό remodeling^{142, 173, 174}. Η διαδικασία της απόπτωσης περιλαμβάνει την ενεργοποίηση ενδοκυττάρων πρωτεασών και κασπασών. Επιπλέον, ο ρυθμός απόπτωσης ελέγχεται από αντι-αποπτωτικούς παράγοντες που διατηρούν τη βιωσιμότητα των VSMCs, όπως οι PDGF, HB-EGF και IGF-1, οι οποίοι δρουν σε ενδογενείς υποδοχείς των κινασών της τυροσίνης και διεγείρουν την PI3 kinase/Akt οδό. Μεταξύ άλλων, ορισμένες μεταλλοπρωτεϊνάσες (MMP 1, MMP 2, MMP 7, MMP 8 και MMP 9) μπορούν να αυξήσουν τη βιωσιμότητα των VSMCs, καθώς καταλύουν το μετασχηματισμό των παραπάνω αντι-αποπτωτικών παραγόντων σε πιο ενεργά μόρια¹⁷⁵. Ο ρόλος των MMPs, όμως, στη διαδικασία απόπτωσης των VSMCs είναι διττός, καθώς υπάρχουν στοιχεία που υποστηρίζουν τον προ-αποπτωτικό τους ρόλο. Οι MMPs καταλύουν τις διακυτταρικές συνδέσεις μέσω των N-cadherin, E-cadherin και VE-cadherin και ευνοούν έτσι την απόπτωση των VSMCs¹⁷⁶. Επίσης, οι MMPs ευνοούν την απόπτωση μέσω της ενεργοποίησης υποδοχέων που σχετίζονται με την απόπτωση (π.χ. TNF-α και FAS ligand). Οι MMP 1, MMP 2, MMP 8, MMP 9, MMP-13 και MT-MMPs διαχωρίζουν τον προ TNF-α από την ενεργή του δομή κι απελευθερώνουν TNF-α, που έχει προ αποπτωτική δράση¹⁷⁷.

1.2.7 Η Οικογένεια των μεταλλοπρωτεϊνών δικτύου (MMPs)

Οι μεταλλοπρωτεϊνάσες δικτύου (Matrix metalloproteases, MMPs) αποτελούν μια οικογένεια εξωκυττάρων πρωτεολυτικών ενζύμων (ενδοπεπτιδασών) που αποδομούν πρωτεϊνικά υποστρώματα μέσω ενός συντηρημένου εξελικτικά μηχανισμού. Οι MMPs αποτελούν τμήμα της υπεροικογένειας των εξαρτώμενων από Zn^{2+} ενδοπεπτιδασών, των μετζινκινών (metzinkins). Εκτός των MMPs, η υπεροικογένεια αυτή περιλαμβάνει μέλη όπως την ομάδα «μια δισιντεγκρίνη και μεταλλοπρωτεάση» (a disintegrin and metalloprotease, ADAM), τις ADAMs με μοτίβο θρομβοσπονδίνης (ADAMs with a thrombospondin motif, ADAMTS), τις βακτηριακές σερραλυσίνες, και πρωτεάσες όπως τις αστασίνες (astacins) ¹⁷⁸. Το κοινό χαρακτηριστικό των μετζινκινών είναι ο μηχανισμός δράσης, που εμπλέκει την ενεργοποίηση ενός μορίου νερού δεσμευμένου στην ενεργό περιοχή του ενζύμου μέσω ενός κατιόντος ψευδαργύρου (Zn^{2+}), το οποίο δρα ως συνένζυμο.

Παρότι το καταλυτικό τμήμα των MMPs είναι εξαιρετικά όμοιο μεταξύ των μελών της οικογένειας, υπάρχουν διαφορές μεταξύ των μελών των MMPs που εντοπίζονται στην ειδικότητα πάνω στα υποστρώματα, στον κυτταρικό και ιστολογικό εντοπισμό τους, στη δέσμευσή τους ή μη στην κυτταρική μεμβράνη και στη ρύθμισή τους. Έτσι, αποτελούν μια ευέλικτη οικογένεια που επιτελεί πληθώρα φυσιολογικών λειτουργιών. Μπορούν συνολικά να αποδομήσουν όλες τις πρωτεΐνες του ECM, ενώ ορισμένες μεταλλοπρωτεϊνάσες είναι επίσης δραστικές στην τμήση κι άλλων ενεργών μορίων με αποτέλεσμα την κατά περίπτωση ενεργοποίηση ή απενεργοποίησή τους. Είναι φανερό ότι η λειτουργικότητα των MMPs είναι απαραίτητη σε διαδικασίες όπως η επαναδιοργάνωση του αγγειακού ιστού ως απάντηση σε τραύμα. Σε φυσιολογικές συνθήκες σχεδόν όλοι οι κυτταρικοί τύποι του αγγειακού τοιχώματος, όπως τα ενδοθηλιακά κύτταρα, τα λεία μυϊκά κύτταρα και οι ινοβλάστες του έξω χιτώνα εκκρίνουν μεταλλοπρωτεϊνάσες. Σε παθολογικές όμως συνθήκες (π.χ. στην αθηρωμάτωση ή σε ανεύρυσμα κοιλιακής αορτής) την παραγωγή των μεταλλοπρωτεϊνών αναλαμβάνουν επιπλέον τα μακροφάγα και τα λεμφοκύτταρα ^{179, 180}.

1.2.7.1 Δομή και ταξινόμηση των MMPs

Η οικογένεια των μεταλλοπρωτεϊνών δικτύου αριθμεί μέχρι σήμερα 25 μόρια (βλ. πίνακα 1.2), εκ των οποίων τα 23 εντοπίζονται στον άνθρωπο, ενώ τα 24 στους μύες ¹⁷⁸. Οι MMPs είναι κατά κύριο λόγο εκκρινόμενες πρωτεΐνες που αποτελούνται από συγκεκριμένες περιοχές, ή τομείς (domains). Όλες οι MMPs περιέχουν την καταλυτική περιοχή (catalytic domain), η οποία καλύπτεται από την πρόδρομη περιοχή (predomain), όταν το ένζυμο βρίσκεται στην ανενεργό μορφή του. Το προπεπτίδιο αυτό συνδέεται με την ενεργό περιοχή του ενζύμου μέσω ενός συγκρατούμενου

μονομερούς κυστεΐνης και του ιόντος Zn^{2+} στον καταλυτικό θύλακα, μια δομή που ονομάζεται διακόπτης κυστεΐνης¹⁸¹. Με εξαίρεση τις MMP-7, MMP-23 και MMP-26, όλες οι MMPs έχουν ένα καρβοξυτελικό άκρο που ομοιάζει της αιμοπηξίνης (hemopexin-like domain), του οποίου η λειτουργία είναι η αναγνώριση του υποστρώματος¹⁸². Παρότι οι MMPs διατηρούν την πρωτεολυτική τους δραστηριότητα ακόμη κι αν στερούνται του τομέα αιμοπηξίνης, η περιοχή αυτή, που έχει δομή προπελοειδή με τέσσερα φύλλα (κάθε φύλλο αποτελείται από τέσσερα αντιπαράλληλα β-ελάσματα και μια α-έλικα) είναι προϋπόθεση για την ικανότητα των ενζύμων να αποδομούν κολλαγόνο τριπλής έλικας¹⁸³. Οι ζελατινάσες (MMP-2 και MMP-9) έχουν επίσης ένθετη στην καταλυτική περιοχή μια περιοχή που αποτελείται από τρεις φμπρονεκτίνες τύπου II στη σειρά, και που διευκολύνει τη σύνδεση της ζελατίνης και του κολλαγόνου^{184, 185}. Όλες οι MMPs, προκειμένου να διαπεράσουν τη κυτταρική μεμβράνη (ως προένζυμα) περιέχουν στο αμινοτελικό τους άκρο μια περιοχή σήμανσης (signal domain), ενώ οι διαμεμβρανικές MMPs (MMP-14, -15, -16, -17, -24, και -25) έχουν προς το καρβοξυτελικό τους άκρο ένα διαμεμβρανικό τμήμα κι έπειτα ένα κυτοπλασματικό τμήμα. Οι διαμεμβρανικές MMPs επίσης, καθώς και η MMP-11, έχουν μια περιοχή τμήσης από την φουρίνη (Furin cleavage site) μπροστά από την καταλυτική περιοχή^{186, 187}. Η δομή των MMPs και οι διακριτοί τους τομείς φαίνονται στην **Εικόνα 6**.

Οι MMPs κατηγοριοποιούνται κυρίως βάσει της ειδικότητάς τους στα υποστρώματα αλλά και του εντοπισμού τους (εκκρινόμενες ή διαμεμβρανικές) στις παρακάτω κατηγορίες¹⁸⁷⁻¹⁸⁹:

I) Κολλαγενάσες (εκκρινόμενες): MMP-1, MMP-8, MMP-13, MMP-18

Μπορούν να αποδομήσουν το κολλαγόνο τριπλής έλικας σε διακριτά κομμάτια του $\frac{1}{4}$ και των $\frac{3}{4}$. Οι MMPs είναι μάλιστα τα μόνα γνωστά ένζυμα θηλαστικών που είναι ικανά να αποδομήσουν το μόριο αυτό.

II) Ζελατινάσες (εκκρινόμενες): MMP-2, MMP-9

Έχουν ως κύρια υποστρώματα τη ζελατίνη και το κολλαγόνο τύπου IV.

III) Στρωμελυσίνες (εκκρινόμενες): MMP-3, MMP-10, MMP-11

Αποδομούν μια ευρεία γκάμα εξωκυττάριου υλικού, αλλά αδυνατούν να λύσουν το ινώδες κολλαγόνο.

IV) Ματριλυσίνες (εκκρινόμενες): MMP-7, MMP-26

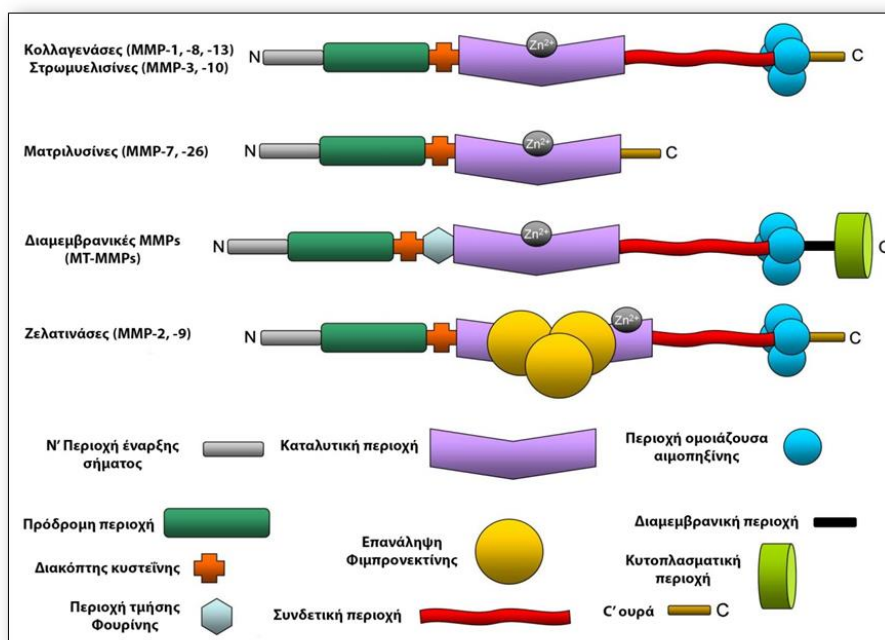
V) Μεμβρανικού τύπου, MT-MMPs (διαμεμβρανικές): MMP-14, MMP-15, MMP-16, MMP-17, MMP-24, MMP-25.

Παρόλα αυτά, η κατηγοριοποίηση αυτή είναι λίγο-πολύ τεχνητή και δεν ανταποκρίνεται σε κάποια φυσική κατάταξη. Αυτό άλλωστε φαίνεται από το πλήθος των υπολοίπων MMPs που δεν εντάσσονται στις παραπάνω κατηγορίες και συνήθως κατατάσσονται ως «άλλου τύπου» (MMP-19, MMP-21, MMP-23A, MMP-23B, MMP-27 και MMP-28), όπως επίσης και από την ύπαρξη MMPs

που στέκονται μόνες τους, χωρίς κατηγοριοποίηση (Μεταλλοελαστάση MMP-12 και Αδαμαντινολυσίνη ή Enamelysin MMP-20). Επίσης, το γεγονός ότι η MMP-14 μπορεί να αποδομήσει ινώδες κολλαγόνο και οι ενδείξεις που υπάρχουν για την ίδια λειτουργία της MMP-2 συνηγορούν προς αυτό.

Μια άλλη ταξινόμηση των MMPs είναι αυτή που έχει εξελικτικά κριτήρια και στηρίζεται σε μελέτες βιοπληροφορικής, κατατάσσοντάς τες στις παρακάτω τέσσερις εξελικτικές κατηγορίες ¹⁹⁰:

- I) MMP-19
- II) MMPs 11, 14, 15, 16, και 17
- III) MMP-2 και MMP-9
- IV) Όλες οι υπόλοιπες MMPs



Εικόνα 6: Σχηματική απεικόνιση των περιοχών των μεταλλοπρωτεϊνών (Hofmann, U. B. et al. Coexpression of integrin alpha(v)beta3 and matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) coincides with MMP-2 activation: correlation with melanoma progression. *J Invest Dermatol.* 2000 Oct;115(4):625-32)

1.2.7.2 Η ρύθμιση της λειτουργίας των MMPs

Προκειμένου οι MMPs να επιτελέσουν τον φυσιολογικό, ή ενίοτε παθολογικό τους ρόλο, πρέπει να παράγονται από τον κατάλληλο τύπο κυττάρου, να εκκρίνονται στο σωστό περιβάλλον, στη σωστή χρονική στιγμή και στην κατάλληλη ποσότητα. Έτσι, η λειτουργία τους πρέπει να ελέγχεται στενά. Αυτό επιτυγχάνεται με μηχανισμούς ρύθμισής τους τόσο σε μεταγραφικό αλλά και σε μετα-

μεταγραφικό επίπεδο, ενώ η δράση τους ρυθμίζεται επιπλέον στο πρωτεϊνικό επίπεδο μέσω διεγερτών, αναστολέων αλλά και τη χωρική τους κατανομή στην πλασματική μεμβράνη.

-Ρύθμιση σε επίπεδο μεταγραφής

Επειδή οι MMPs έχουν μεταξύ τους κοινά υποστρώματα, η βιολογική δράση του κάθε μέλους της οικογένειάς τους καθορίζεται από τα διαφορετικά μοτίβα έκφρασής τους. Πράγματι, οι διαφορές στη χρονική και χωρική επαγωγή της έκφρασης των MMPs είναι συχνά η βάση του βιολογικού τους ρόλου.

Η λειτουργία των περισσότερων MMPs ρυθμίζεται στενά στο επίπεδο της μεταγραφής των γονιδίων, με την εξαίρεση της MMP-2 η οποία συνήθως παράγεται συνεχώς και ελέγχεται από ένα ενζυμικό σύστημα ενεργοποίησης και ως ένα βαθμό μετα-μεταγραφικού μηχανισμού σταθεροποίησης ^{191, 192}.

Η βασική έκφραση της MMP-2, της MMP-14 και του TIMP-2 είναι συν-ρυθμιζόμενες, γεγονός που έρχεται σε συμφωνία με την συνέργεια των παραπάνω μορίων στον έλεγχο της ενεργοποίησης της MMP-2 και με τις ομοιότητες στους γονιδιακούς τους προαγωγούς ¹⁹². Κατά τα άλλα, η έκφραση των γονιδίων των MMPs ρυθμίζεται από μια πληθώρα διεγερτικών και ανασταλτικών παραγόντων. Η έκφραση πολλών MMPs μπορεί να επαχθεί ή να ανασταλεί από εστέρες φορμύλης, από σήματα από ιντεγκρίνες, από εξωκυττάρια πρωτεΐνες δικτύου, με σήματα κυτταρικού stress και από αλλαγές στο σχήμα των κυττάρων ¹⁹³. Το κολλαγόνο τύπου I αποτελεί υπόστρωμα για υποδοχείς που προάγουν την παραγωγή MMP-1 όταν συνδέονται με άθικτο κολλαγόνο, αλλά απενεργοποιούνται όταν συνδεθούν με κολλαγόνο που έχει κοπεί από την MMP-1 ¹⁹⁴. Με τον τρόπο αυτό, η MMP-1 προάγεται από το ίδιο της το υπόστρωμα, αλλά αναστέλλεται όταν το υπόστρωμα έχει κοπεί και η ενζυμική της λειτουργία δεν είναι πλέον απαραίτητη.

Επιπροσθέτως, η έκφραση των MMPs ρυθμίζεται από διάφορες κυτοκίνες και αυξητικούς ή φλεγμονώδεις παράγοντες, όπως ιντερλευκίνες, ιντερφερόνες, EGF, KGF, NGF, βασικό FGF, VEGF, PDGF, TNF-α, TGF-β, και τον προαγωγό εξωκυττάρων MMPs (Extracellular Matrix Metalloproteinase Inducer, EMMPRIN) ¹⁹⁵. Πολλά από αυτά τα ερεθίσματα προκαλούν την έκφραση κι ενεργοποίηση των c-fos and c-jun πρωτο-ογκογόνων παραγώγων, που ετεροδιμερίζονται και δεσμεύονται στους προαγωγούς AP-1 που υπάρχουν στα γονίδια πολλών MMPs. Παρότι τα συμπλέγματα των προαγωγών AP-1 παίζουν καίριο ρόλο στη ρύθμιση της μεταγραφής πολλών γονιδίων MMPs, υπάρχουν κι άλλοι παράγοντες που εμπλέκονται στη διαδικασία. Σε ορισμένες περιπτώσεις, ένα σήμα μπορεί να ρυθμίσει με διαφορετικούς τρόπους την μεταγραφή διαφορετικών MMPs. Για παράδειγμα, ο TGF-β αναστέλλει τη μεταγραφή των MMP-1 και MMP-3 ενεργοποιώντας ταυτόχρονα την έκφραση της MMP-13 ¹⁹⁶. Τέλος, η έκφραση ορισμένων MMPs περιορίζεται μόνο σε συγκεκριμένους τύπους κυττάρων και δεν μπορεί να επαχθεί σε άλλους. Η

MMP-9 παράγεται από οστεοκλάστες, μακροφάγα κύτταρα, τροφοβλαστικά κύτταρα, νευρώνες του υπόκαμπου και μεταναστεύοντα κερατινοκύτταρα στα όρια τραυμάτων, ενώ η έκφραση της MMP-20 περιορίζεται στα κύτταρα που παράγουν αδαμαντίνη σε αναπτυσσόμενους οδόντες¹⁹⁷⁻¹⁹⁹. Η διαφοροποίηση της έκφρασης των MMPs σε συνάρτηση με τον κυτταρικό τύπο έχει επίσης επιβεβαιωθεί σε κυτταροκαλλιέργειες, όπου οι εστέρες φορμόλης προάγουν την παραγωγή MMP-3 σε ινοβλάστες, αλλά MMP-10 σε κερατινοκύτταρα²⁰⁰. Η απόκριση λοιπόν των γονιδίων των MMPs στα διάφορα σήματα εξαρτάται από τον γονιδιακό τους προαγωγό, σε συνάρτηση με την ύπαρξη ή απουσία κι άλλων σημάτων από το κυτταρικό περιεχόμενο.

-Μετα-μεταγραφική ρύθμιση των MMPs

Μετα-μεταγραφικοί παράγοντες μπορούν επίσης να επηρεάσουν την έκφραση των MMPs. Τα mRNA των MMP-1 και MMP-3 σταθεροποιούνται από εστέρες φορμόλης και EGF, ενώ τα αντίστοιχα μεταγραφικά προϊόντα της MMP-13 σταθεροποιούνται από PDGF και γλυκοκορτικοειδή, και αποσταθεροποιούνται παρουσία TGF-β^{195, 201}. Όσον αφορά στην MMP-1, η ρύθμιση αυτή χρησιμοποιεί τις πλούσιες σε AU ακολουθίες στο αμετάφραστο 3' άκρο του mRNA. Παρόμοιες αλληλουχίες εικάζεται ότι εμπλέκονται στη σταθεροποίηση των mRNA και άλλων MMPs. Επίσης, μια διαλυτή κι ενεργή πρωτεολυτικά μορφή της MMP-16 παράγεται από εναλλακτική συρραφή (splicing) του mRNA αντί του κουρέματος πρωτεϊνικού μορίου από την πλασματική μεμβράνη, ενώ εναλλακτική πολυαδενυλίωση παράγει διάφορα είδη mRNA των MMP-13, MMP-17 και MMP-20²⁰².

-Ρύθμιση της έκκρισης των MMPs

Οι περισσότερες MMPs, εφόσον μεταφραστούν, εκκρίνονται με συνεχή ρυθμό. Παρόλα αυτά, υπάρχουν κάποιες αξιοπρόσεκτες περιπτώσεις εκκριτικού ελέγχου. Η MMP-8 και η MMP-9 συντίθενται από διαφοροποιούμενα κοκκιοκύτταρα στο μυελό των οστών κι αποθηκεύονται στα ειδικά κοκκία των κυττάρων αυτών, ενώ απελευθερώνονται έπειτα από ενεργοποίηση των ουδετερόφιλων από φλεγμονώδεις παράγοντες²⁰³. Στα μακροφάγα επίσης, η πλασμίνη και η θρομβίνη επάγουν την έκκριση της MMP-12, σε απάντηση του σήματος της πρωτεϊνικής κινάσης C, χωρίς όμως να υπάρχει επίδραση στο ρυθμό μετάφρασης²⁰⁴.

-Ενεργοποίηση των προενζύμων

Οι MMPs, όπως επίσης κι άλλα πρωτεολυτικά ένζυμα, συντίθενται στο κύτταρο ως αδρανή προένζυμα. Η έλλειψη αυτή δραστηριότητας εξασφαλίζεται από τον διακόπτη κυστεΐνης, μια ομάδα κυστεΐνης-σουλφυδρυλίου στο καρβοξυτελικό άκρο της πρόδρομης περιοχής. Το σουλφυδρύλιο

αυτό δρα ως τέταρτο σημείο σύνδεσης του ενεργού ιόντος ψευδαργύρου και προκειμένου να γίνει η ενεργοποίηση απαιτείται η πρωτεολυτική αφαίρεση της πρόδρομης περιοχής, ώστε να αφαιρεθεί ο διακόπτης και να αποκαλυφθεί το ενεργό κέντρο του ενζύμου, ή η εκτόπιση της κυστεΐνης και η ρήξη του δεσμού της με το ιόν ψευδαργύρου. Μετά τη ρήξη του δεσμού αυτού, τη θέση του σουλφιδίου παίρνει ένα μόριο νερού και το ενεργό κέντρο μπορεί να επιτεθεί στους πεπτιδικούς δεσμούς των υποστρωμάτων της MMP^{205, 206}.

Η εξωκυττάρια ενεργοποίηση της πλειονότητας των MMPs πραγματοποιείται από άλλες, ήδη ενεργοποιημένες MMPs ή από άλλες πρωτεάσες σερίνης που μπορούν να κόβουν τους πεπτιδικούς δεσμούς των πρόδρομων περιοχών. Στην περίπτωση της ενεργοποίησης από άλλες πρωτεάσες, οι πιο σημαντικοί παράγοντες ενζυμικής ενεργοποίησης είναι η πλασμίνη (πρωτεάση σερίνης), ο ενεργοποιητής του πλασμινογόνου (urokinase-type plasminogen activator, uPA), ο υποδοχέας του τελευταίου (uPA-r), οι αναστολείς των ενεργοποιητών του πλασμινογόνου (urokinase-type plasminogen activator inhibitors - PAI-1 και PAI-2) και οι ελεύθερες ρίζες οξυγόνου^{207, 208}. Η πλασμίνη προέρχεται από το πλασμινογόνο μετά από υδρόλυσή του είτε από την ουροκινάση, είτε από τον ιστικού-τύπου ενεργοποιητή του (tissue-type plasminogen activator - tPA). Παρότι ο κύριος ρόλος του είναι η απευθείας λύση των συστατικών του εξωκυττάριου υλικού, ενεργοποιεί επίσης πρωτεολυτικά την πλειοψηφία των προ-MMPs²⁰⁹. Η ουροκινάση του πλασμινογόνου παράγεται κυρίως από μονοκύτταρα/μακροφάγα, ενισχύει την ενεργοποίηση της πλασμίνης και των μεταλλοπρωτεϊνών και προάγει την αποδόμηση του εξωκυττάριου υλικού²¹⁰.

Η προ-MMP-2 είναι απρόσβλητη από τις πρωτεάσες σερίνης και η ενεργοποίησή της είναι ένα μοναδικό μονοπάτι ενεργοποίησης από άλλες MMPs που περιλαμβάνει διαμεμβρανικές MMPs (Membrane Type MMPs, MT-MMPs), τον ιστικό αναστολέα των μεταλλοπρωτεϊνών 2 (TIMP-2) αλλά και την ίδια την MMP-2. Πιο συγκεκριμένα, η MMP-14 (MT1-MMP) είναι ένας εξαιρετικά αποδοτικός ενεργοποιητής της MMP-2, σε αντίθεση με την MMP-17 (MT4-MMP) και την ανθρώπινη MMP-15 (MT2-MMP) που είναι οι μόνες από τις διαμεμβρανικές MMPs που αδυνατούν να ενεργοποιήσουν την MMP-2^{211, 212}. Για την ενεργοποίηση της MMP-2, μια MT-MMP δεσμεύει τον αμινοτελικό τομέα του TIMP-2, ενώ η καρβοξυτελική του περιοχή δρα ως υποδοχέας για τον τομέα αιμοπηξίνης της προ MMP-2. Μετά, ένα γειτονικό μόριο MT-MMP, του οποίου η λειτουργία δεν έχει ανασταλεί μέσω σύνδεσης με τον TIMP-2, κόβει κι ενεργοποιεί την συνδεδεμένη προ-MMP-2. Εν ακολούθια, ένα επιπλέον εναπομένειν τμήμα του προπεπτιδίου αφαιρείται μέσω μιας άλλης MMP-2 προκειμένου να παραχθεί μια πλήρως λειτουργική, ώριμη μορφή MMP-2²¹³. Εναλλακτικοί μηχανισμοί ενεργοποίησης της προ-MMP-2 περιλαμβάνουν την πρωτεολυτική δραστηριότητα των MMP-1 και MMP-12²¹⁴.

Ο ρόλος του TIMP-2 στην ενεργοποίηση της MMP-2 είναι η κύρια *in vivo* λειτουργία του ²¹⁵. Παρόλα αυτά, το αμινοτελικό του άκρο παραμένει αναστολέας της λειτουργίας των MMPs. Δεν προκαλεί έκπληξη λοιπόν το γεγονός ότι μέσες και μικρές συγκεντρώσεις του TIMP-2 προάγουν την ενεργοποίηση της MMP-2, ενώ μεγαλύτερες συγκεντρώσεις του έχουν το αντίθετο αποτέλεσμα, αφού προκαλούν τον κορεσμό των διαμεμβρανικών MMPs ¹⁹¹. Οι συγκεντρώσεις του TIMP-2 μειώνονται και ενισχύεται η ενεργοποίηση της MMP-2 παρουσία του υποστρώματός της, του κολλαγόνου τύπου IV. Η ικανότητα αυτή του κολλαγόνου τύπου IV να επάγει την ενεργοποίηση της MMP-2 πιθανότατα προκύπτει από την αποσύνθεση του TIMP-2, αφού δεν έχουν παρατηρηθεί αλλαγές στην έκφραση, σύνθεση κι ενεργοποίηση των MMP-2, MT1-MMP και TIMP-2 ¹⁹⁵.

Παρότι οι περισσότερες MMPs εκκρίνονται στο εξωκυττάριο περιβάλλον ως προένζυμα, η MMP-11, η MMP-27 και οι MT-MMPs περιέχουν μια περιοχή αναγνώρισης από τη φουρίνη (RXK/RR furin-like enzyme recognition motif) μεταξύ της πρόδρομης περιοχής και της καταλυτικής περιοχής. Αυτό τους επιτρέπει να ενεργοποιούνται από ενδοκυτταρικές πρωτεάσες σερίνης (subtilisin-type serine proteinases) πριν φθάσουν στην κυτταρική μεμβράνη ή εκκριθούν ²¹⁶. Επίσης, η MMP-23 έχει μια περιοχή ευπρόσβλητη στη φουρίνη και πιθανότατα αποτελεί στόχο ενδοκυττάρων πεπτιδασών προενζύμων, αλλά δεν έχει διακόπτη κυστεΐνης και είναι ενεργή και πριν την μετατροπή αυτή ²¹⁷. Όλες οι υπόλοιπες MMPs δεν έχουν κάποια παρόμοια δομή και ενεργοποιούνται αποκλειστικά εξωκυτταρικά μετά την έκκρισή τους.

-Ρύθμιση μέσω αναστολέων

Η αναστολή των MMPs επιτυγχάνεται κυρίως μέσα από τη δράση των ιστικών αναστολέων των μεταλλοπρωτεϊνών (Tissue Inhibitors of Metalloproteinases, TIMPs), μιας οικογένειας ενζύμων που μέχρι σήμερα αριθμεί τέσσερα μέλη. Οι TIMPs είναι ενδογενείς πρωτεϊνικοί ρυθμιστές τόσο της οικογένειας των μεταλλοπρωτεϊνών δικτύου (MMPs) όσο και άλλων μεταλλοπρωτεϊνών, όπως οι ADAMs και οι ADAMTSs ²¹⁸. Έτσι, οι TIMPs καταλαμβάνουν καίρια θέση στη ρύθμιση του ECM, των μορίων κυτταρικής προσκόλλησης, των κυτοκινών, των χημοκινών και εν κατακλείδι στον κυτταρικό φαινότυπο. Η δράση των TIMPs έγκειται στη σύνδεσή τους είτε με τις ενεργές μορφές των μεταλλοπρωτεϊνών, είτε με τις προ-ενζυμικές, ανενεργές τους μορφές σε μοριακή αναλογία 1:1289. Η ισορροπία που δημιουργείται από τις σχετικές συγκεντρώσεις μεταξύ των ενεργών μεταλλοπρωτεϊνών και των αναστολέων τους καθορίζει τελικά την καθαρή πρωτεολυτική δραστηριότητα των ενζύμων αυτών ²¹⁹. Εκτός των TIMPs, η α2 μακροσφαιρίνη και ο αναστολέας 2 της παθογενετικής οδού του ιστικού παράγοντα (tissue-factor pathway inhibitor-2 – TIFPI-2) αναστέλλουν επίσης τις μεταλλοπρωτεϊνάσες, αλλά σε πολύ μικρότερο βαθμό απ' ότι οι ενδογενείς αναστολείς τους ²²⁰.

Εξαιτίας του ρόλου των MMPs σε μια πληθώρα παθολογικών καταστάσεων, έχει γίνει προσπάθεια ανάπτυξης καινούριων αναστολέων των MMPs (MMPIs), η λειτουργία των οποίων βασίζεται στη δέσμευση του Zn²⁺ στο ενεργό κέντρο από τους αναστολείς. Οι προσπάθειες αυτές, όμως, δε στέφθηκαν με ιδιαίτερη επιτυχία, καθώς η κλινική τους χρήση προκαλεί έντονο πόνο στις αρθρώσεις, ομοιάζων με τενοντίτιδα, κατάσταση που χαρακτηρίστηκε ως “μυοσκελετικό σύνδρομο”. Η τοξικότητα αυτή οφείλεται πιθανότατα στη μη ειδική αναστολή κι άλλων μεταλλοενζύμων. Με τα συμπεράσματα αυτά, έχει αναπτυχθεί μια νέα γενιά MMPIs που στοχεύει όχι στο ενεργό κέντρο του ενζύμου, αλλά στον τομέα S1'. Οι αναστολείς αυτοί έχουν μεγάλη ικανότητα για ειδική αναστολή και μέχρι σήμερα έχουν χαρακτηριστεί και προσδιοριστεί οι κρυσταλλικές δομές των αναστολέων για τις MMP-8, MMP-12 και MMP-13 ²²¹.

Πίνακας 1.1: Μεταλλοπρωτεϊνάσες, εναλλακτικά ονόματα και τα αντίστοιχα υποστρώματα δράσης τους.			
MMP	Άλλη ονομασία	Τύπος	Υπόστρωμα - Άλλα σχόλια
MMP1	Interstitial collagenase, Collagenase 1	Εκκρινόμενη	Collagens (I, II, III, VII, VIII, X), gelatin, proteoglycans, MMP-2, MMP-9
MMP2	Gelatinase-A, 72 kDa gelatinase	Εκκρινόμενη	Gelatin, collagens (I, IV, V, VII, X, XI, XIV), elastin, fibronectin, laminin, MMP-1, MMP-9, MMP-13
MMP3	Stromelysin 1	Εκκρινόμενη	Collagens (III, IV, V, IX, X), gelatin, fibronectin, laminin, MMP-1, -7, -8, -9, -13
MMP7	Matrilysin 1, PUMP 1	Εκκρινόμενη	Collagens (IV, X), gelatin, fibronectin, laminin, MMP-1, MMP-2, MMP-9, MMP-9/TIMP-1 complex.
MMP8	Neutrophil collagenase, Collagenase 2	Εκκρινόμενη	Collagens (I, II, III, V, VII, VIII, X), gelatin, proteoglycans
MMP9	Gelatinase-B, 92 kDa gelatinase	Εκκρινόμενη	Gelatin, collagens (IV, V, VII, X, XIV), elastin, fibronectin, plasminogen
MMP10	Stromelysin 2	Εκκρινόμενη	Collagens (III, IV, V), gelatin, casein, MMP-1, MMP-8
MMP11	Stromelysin 3	Εκκρινόμενη	Gelatin, collagen IV, fibronectin, casein, proteoglycans
MMP12	Macrophage metalloelastase	Εκκρινόμενη	Collagen IV, gelatin, elastin, fibronectin, casein, fibrinogen, plasminogen, MMP-2
MMP13	Collagenase 3	Εκκρινόμενη	Collagens (I, II, III, IV, IX, X, XIV) gelatin, MMP-9
MMP14	MT1-MMP	Διαμεμβρανική	Collagens (I, II, III), gelatin, casein, elastin, fibronectin, laminin, MMP-2, MMP-13
MMP15	MT2-MMP	Διαμεμβρανική	gelatin, fibronectin, laminin, MMP-2
MMP16	MT3-MMP	Διαμεμβρανική	Collagen III, gelatin, casein, fibronectin, MMP-2
MMP17	MT4-MMP	Διαμεμβρανική	Gelatin, proMMP-2 glycosyl phosphatidylinositol-attached
MMP18	xcol4, xenopus collagenase, Collagenase 4		No known human orthologue
MMP19	RASI-1, stromelysin-4		Aggrecan, cartilage oligomeric matrix protein

MMP20	Enamelysin	Εκκρινόμενη	Aggrecan, cartilage oligomeric matrix protein
MMP21	X-MMP	Εκκρινόμενη	
MMP23A	CA-MMP	Διαμεμβρανική	
MMP23B		Διαμεμβρανική	
MMP24	MT5-MMP	Διαμεμβρανική	Proteoglycans, proMMP-2, collagen I, gelatin, fibronectin, laminin
MMP25	MT6-MMP	Διαμεμβρανική	Collagen IV, proMMP-8, proMMP-9 glycosyl phosphatidylinositol-attached
MMP26	Matrilysin-2, endometase		Collagen IV, fibronectin, gelatin, proMMP-9, fibrinogen
MMP27	MMP-22, C-MMP		
MMP28	Epilysin	Εκκρινόμενη	

1.2.7.3 Οι MMPs στην αθηρωμάτωση

Η απορρύθμιση της οργάνωσης του ECM θεωρείται πως συμβάλλει στο αρτηριακό remodeling κατά την ανάπτυξη, εξέλιξη και τις επιπλοκές των αθηρωματικών αλλοιώσεων. Ως κύριοι ρυθμιστές του μεταβολισμού του ECM, οι MMPs φαίνεται πως είναι βασικοί παίκτες στην παραπάνω διαδικασία. Πράγματι, αυξημένη έκφραση των MMPs έχει εντοπιστεί στην αθηρωματική πλάκα, ενώ η ενεργοποίηση της έκφρασης των MMPs φαίνεται να διευκολύνει την αθηρογένεση, τη συσσωμάτωση αιμοπεταλίων και την αποσταθεροποίηση της πλάκας^{220, 222}. Οι MMP-1, MMP 2, MMP-3, MMP-7, MMP-9 και MMP-12 παράγονται από τα VSMCs και τα μακροφάγα στο αρτηριακό τοίχωμα, και εμφανίζουν τη μέγιστη έκφρασή τους στις αθηρωματικές αλλοιώσεις^{57, 223}. Επίσης, στις περιφερειακές περιοχές των αθηρωματικών πλακών και σε περιοχές συσσώρευσης αφρωδών κυττάρων, ανιχνεύεται αυξημένη έκφραση MMP-1, MMP-3 και MMP-9. Εκχυλίσματα από αθηρωματικές πλάκες περιέχουν ενεργές μορφές ζελατινασών, ενώ ζελατινολυτικές και κασεϊνολυτικές δραστηριότητες ανιχνεύονται σε αθηροσκληρωτικές περιοχές, αλλά όχι σε φυσιολογικό αγγειακό ιστό¹⁴⁸. Η χαμηλή σε λιπαρά διατροφή, που σχετίζεται με μειωμένη αθηρωμάτωση, προκαλεί μεταξύ άλλων πτώση των επιπέδων MMP-1 στα μακροφάγα²²⁴. Ασθενείς που υπόκεινται σε θεραπεία με αιμοδιάλυση τείνουν να αναπτύσσουν ταχέως αθηρωμάτωση, και εμφανίζουν ενδείξεις απορρυθμισμένης πρωτεόλυσης και ινόλυσης στο πλάσμα. Η MMP-2 θεωρείται ότι σχετίζεται με την ανάπτυξη αθηρωμάτωσης στους παραπάνω ασθενείς²²⁵. Τα παραπάνω, μαζί με πολυάριθμα άλλα στοιχεία από κλινικές και πειραματικές μελέτες, εμπλέκουν τη

λειτουργία των MMPs σε μια πληθώρα καταστάσεων που αφορούν τόσο στην ανάπτυξη κι εξέλιξη της αθηρωμάτωσης όσο και στην έκβαση των προχωρημένων αθηρωματικών αλλοιώσεων.

-Πρώιμη αθηρωματική αλλοίωση: Μετανάστευση T-λεμφοκυττάρων και μονοκυττάρων

Η είσοδος και η οξείδωση της LDL στην έσω στοιβάδα του αρτηριακού τοιχώματος αποτελεί την απαρχή της δημιουργίας λιπώδους γράμμωσης. Πιστεύεται ότι η δράση των MMPs μεσολαβεί στην υπενδοθηλιακή μετανάστευση των T λεμφοκυττάρων και μονοκυττάρων και λαμβάνει χώρα σε απάντηση των σημάτων από την οξειδωμένη LDL ²²⁶. In vitro μελέτες έδειξαν ότι οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ φλεγμονωδών κυττάρων και ενδοθηλιακής στοιβάδας διεγείρουν την έκκριση των MMPs ¹⁴⁹. Συγκεκριμένα, οι αλληλεπιδράσεις αυτές μεταξύ κυττάρων προάγουν την παραγωγή MMP-9 από τα μονοκύτταρα, ενώ στα T-λεμφοκύτταρα η έκκριση των MMP-2 και MMP-9 καθορίζεται από τους ICAM-1 και VCAM-1 ^{227, 228}. Έτσι η προσκόλληση των T-λεμφοκυττάρων στα ενδοθηλιακά κύτταρα με τη βοήθεια του VCAM-1 ενεργοποιεί την έκκριση της MMP-2 και της MMP-9, οι οποίες με τη σειρά τους διευκολύνουν την αποδόμηση του εξωκυττάρου υλικού και την μετακίνηση κυττάρων διαμέσου της βασικής μεμβράνης και της ενδοθηλιακής στοιβάδας προς τον έσω χιτώνα ²²⁹. Επίσης, η MMP-1 είναι υπεύθυνη για τη διάσπαση του ινώδους κολλαγόνου τύπου I και III και σε συνεργασία με άλλα μέλη των MMPs αποδομεί περαιτέρω το κολλαγόνο οδηγώντας σε άρση των περιορισμών μετακίνησης των φλεγμονωδών κυττάρων. Έχει φανεί επίσης ότι η επίδραση της MMP-12 σε πρώιμα στάδια αθηρωμάτωσης διαγονιδιακών κονίκλων αυξάνει το φλεγμονώδες περιεχόμενο των αλλοιώσεων, με μηχανισμό που παραμένει όμως ασαφής ²³⁰.

Η επαφή των μονοκυττάρων με πρωτεΐνες του εξωκυττάρου υλικού, όπως το κολλαγόνο τύπου I και τη λαμινίνη, ενισχύει την έκφραση της MMP-9 ²³¹. Επιπλέον, η σύνδεση των μονοκυττάρων με το κολλαγόνο τύπου I, είτε διεγείρει την ενεργοποίηση των MMP-2 και MMP-9, είτε προάγει την έκκριση της IL-1, η οποία με τη σειρά της αυξάνει την παραγωγή των MMP-1, MMP-3 και MMP-9 στα λεία μυϊκά κύτταρα ²³². Οι αλληλεπιδράσεις των κυττάρων μεταξύ τους ή μεταξύ κυττάρων-εξωκυττάρου υλικού μεσολαβούν στην έκφραση και λειτουργία των μεταλλοπρωτεϊνών στα πρώιμα στάδια αθηρωμάτωσης. Η αποδόμηση της βασικής μεμβράνης του ενδοθηλίου από τις MMPs διευκολύνει τη μετανάστευση των φλεγμονωδών κυττάρων και τη διήθηση της αθηρωματικής πλάκας από αυτά.

-Πρώιμη αθηρωματική αλλοίωση: Μετανάστευση, πολλαπλασιασμός κι απόπτωση των VSMCs

Η μετανάστευση και ο πολλαπλασιασμός των VSMCs είναι βασικός παράγοντας της διαμόρφωσης αθηρωματικών αλλοιώσεων. Οι MMPs ενισχύουν τη μετανάστευση των κυττάρων αυτών σε περιοχές αθηρογένεσης, όπου πολλαπλασιάζονται και αυξάνουν το μέγεθος της αλλοίωσης ²³³. Μείωση της έκφρασης της MMP-9 και του TNF-α έχει βρεθεί ότι περιορίζει τη μετανάστευση των VSMCs ²³⁴. Σε μια μελέτη όπου χρησιμοποιήθηκαν μύες με μεταλλαγμένο κολλαγόνο, ανθεκτικό στις MMPs, το μέγεθος των αλλοιώσεων δεν εμφάνισε διαφορά, αλλά η παρουσία των VSMCs στην αθηρωματική περιοχή μειώθηκε και το κολλαγόνο βρέθηκε πιο άφθονο, υποδεικνύοντας ότι η λύση του από τις MMPs αποτελεί προϋπόθεση για την συσσώρευση VSMCs στην πλάκα ²³⁵. Επίσης, *in vivo* knockout της MMP-2 μειώνει τη μετανάστευση των VSMCs αλλά και το σχηματισμό έσω στοιβάδας ²³⁶. Η αποδόμηση της βασικής μεμβράνης είναι απαραίτητη για τη μετανάστευση των VSMCs ²³⁷. Οι MMPs, εκτελώντας τη λειτουργία αυτή επιτρέπουν την αλληλεπίδραση του ECM με ιντεγκρίνες, που οδηγεί στην ενεργοποίηση των κινασών εστιασμένης προσκόλλησης (Focal Adhesion Kinases, FAKs) και αύξηση της μετανάστευσης. Προκαλούν επίσης τον κατακερματισμό μεμβρανικών στοιχείων παράγοντας καινούρια σημεία πρόσδεσης των ιντεγκρινών. Υποδοχείς αυξητικών παραγόντων, καντερίνες και ιντεγκρίνες ρυθμίζουν την επαναδιοργάνωση του κυτοσκελετού σε προετοιμασία της μετανάστευσης ²³⁸. Οι MMPs κόβουν την E καντερίνη στα επιθηλιακά κύτταρα, την VE-καντερίνη στα ενδοθηλιακά κύτταρα και την N-καντερίνη στα VSMCs, απελευθερώνοντας την κίνηση των κυττάρων ²³⁹.

Οι MMPs προάγουν επίσης την μετανάστευση με άμεσο τρόπο. Η MMP-1, έχει βρεθεί ότι προκαλεί την αύξηση και εισβολή κυττάρων μέσω αποκοπής του PAR 1 και αποκάλυψης υποδοχέων που προκαλούν τη μετανάστευση. Ο μηχανισμός αυτός επιτρέπει στα κύτταρα να ανιχνεύουν το πρωτεολυτικό περιβάλλον και να κινούνται προς τις περιοχές όπου το ECM έχει αποδομηθεί ²⁴⁰.

Οι αναστολείς των MMPs (TIMPs και MMPIs) έχουν υπάρξει ιδιαίτερα χρήσιμοι για την αποκάλυψη του ρόλου των MMPs στη μετανάστευση των VSMCs. Γονιδιακή μεταφορά των TIMPs, προς υπερέκφρασή τους, μειώνει τη μετανάστευση των VSMCs *in vitro*, καθυστερεί την πάχυνση της έσω στοιβάδας *in vivo*, συντηρώντας ταυτόχρονα τη βασική μεμβράνη ²⁴¹, και καταστέλλει τη νεοαγγειογένεση σε καλλιέργειες ανθρώπινης σαφηνούς φλέβας ²⁴². Οι συνθετικοί αναστολείς (MMPIs) έχουν βρεθεί επίσης να παρουσιάζουν παρόμοια λειτουργία ²⁴³.

Πέραν της διευκόλυνσης της κυτταρικής μετανάστευσης, οι MMPs επίσης πιστεύεται ότι έχουν ρυθμιστικό ρόλο στην αύξηση των VSMCs. Η καταστολή, για παράδειγμα, της MMP-9 έχει βρεθεί ότι ελαττώνει *in vitro* την αύξηση των VSMCs ²⁴⁴. Επίσης, αναφέρεται συσχετισμός του knockout της MMP-9 σε μύες με αναστολή της αύξησης των VSMCs μετά από τραυματισμό ²⁴⁵, αλλά όχι

μετά από απολίνωση της καρωτίδας ²⁴⁶. Μια πιθανή εξήγηση των παραπάνω αντικρουόμενων ευρημάτων είναι η αντισταθμιστική ενεργοποίηση άλλων πρωτεασών ¹⁷⁵. Οι μηχανισμοί που προτείνονται για την εξήγηση της δράσης αυτής των MMPs περιλαμβάνουν την διευκόλυνση διεπαφής με το ECM και κινητοποίηση μονοπατιών ιντεγκρινών, την απελευθέρωση από το ECM αυξητικών παραγόντων, των Heparin-binding growth factors (FGF-1 και FGF-2), του TGF-h ή του IGF-1 και το κούρεμα (shedding) των ιντεγκρινών ²³³.

Η MMP-7 εμπλέκεται στο κούρεμα της N-καντερίνης, μέσω της οποίας ρυθμίζεται η απόπτωση των VSMCs. Σε αντίθεση, σήματα επιβίωσης εξασφαλίζουν τη μη αποπτωτική λειτουργία των VSMCs, ακόμα και παρουσία σημάτων θανάτου. Τα σήματα αυτά είναι στενά συνδεδεμένα με τα μονοπάτια κυτταρικής αύξησης, και ως εκ τούτου βρίσκονται υπό την επιρροή άλλων MMPs ²³³. Οι διεπαφές μεταξύ κυττάρων και ECM προάγουν την κυτταρική επιβίωση, ενώ αντίθετα, διακοπή των συνδέσεων αυτών οδηγεί σε απόπτωση ²⁴⁷. Η απόπτωση των VSMCs φαίνεται να έχει διττό ρόλο στην αθηρωμάτωση. Από τη μια πλευρά περιορίζει την αγγειακή πάχυνση στα πρώιμα στάδια, αλλά σε πιο προχωρημένα στάδια αποσταθεροποιεί τις αθηρωματικές πλάκες ^{248, 249}.

-Η επίδραση των MMPs στη νεοαγγειογένεση

Ο σχηματισμός νέων αιμοφόρων αγγείων μπορεί να διαδραματίσει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη της αθηρωματικής πλάκας, είτε με την παροχή “θρεπτικών” υλικών για την αύξηση της πλάκας, είτε με την επαναλαμβανόμενη πρόκληση ενδο πλακικών αιμορραγιών, οδηγώντας τελικά στη θρόμβωση της αρτηρίας ²⁵⁰. Η νεοαγγειογένεση ξεκινά συνήθως από την έξω στοιβάδα, και συσχετίζεται με την έκταση της στένωσης των στεφανιαίων και τη φλεγμονώδη αντίδραση ²⁵¹. Απαραίτητη προϋπόθεση της νεοαγγειογένεσης είναι η αποδόμηση της βασικής μεμβράνης πριν από την μετακίνηση και τον πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων. Η συμμετοχή των μεταλλοπρωτεϊνών στη διαδικασία αυτή είναι σημαντική και αποδεικνύεται με μελέτες όπου τα ενδοθηλιακά κύτταρα εκκρίνουν υψηλές συγκεντρώσεις μεταλλοπρωτεϊνών. Επιπρόσθετα, έχει φανεί ότι η χορήγηση αναστολέων των MMPs ή αντισωμάτων κατά της MMP-2 και της MMP-9 μπορεί να αναστείλει τη νεοαγγείωση *in vivo* ή το σχηματισμό αυλού από ενδοθηλιακά κύτταρα *in vitro* ²⁵²⁻²⁵⁴. Ορισμένα δεδομένα υποστηρίζουν ότι η νεοαγγειογένεση εξαρτάται απευθείας από τη συνέργεια μηχανισμών προσκόλλησης και πρωτεόλυσης, διότι η MMP-2 δεσμεύεται από την ιντεγκρίνη ανβ3 που υπάρχει στα αιμοφόρα αγγεία ²⁵⁵. Επιπλέον, στην περιοχή των τοιχωματικών αγγείων της έξω στοιβάδας έχουν βρεθεί μακροφάγα, τα οποία εκφράζουν τις μεταλλοπρωτεϊνάσες (MMP-2, MMP-9) και σειρά κυτοκινών, γεγονός που καταδεικνύει ότι τα μακροφάγα συμμετέχουν στη νεοαγγείωση των αθηρωματικών πλακών είτε μέσω της απευθείας έκκρισης

μεταλλοπρωτεϊνών, είτε με την έκκριση κυτοκινών και τη διέγερση των ενδοθηλιακών κυττάρων για την παραγωγή μεταλλοπρωτεϊνών^{256, 257}.

1.2.8 Οι ιστικοί αναστολείς των MMPs (TIMPs)

Η διαδικασία της φυσιολογικής αναστολής της λειτουργίας των MMPs είχε αρχικά ανιχνευθεί σε πολλές μελέτες με καλλιέργειες κυττάρων και ιστών, που διεξήχθησαν πριν από αρκετές δεκαετίες. Στα δώδεκα χρόνια, όμως, μεταξύ του 1985 και 1996, τέσσερα μέλη των ιστικών αναστολέων αναγνωρίστηκαν οριστικά σε γονιδιακό επίπεδο στα θηλαστικά²⁵⁸⁻²⁶⁰. Οι πρωτεΐνες αυτές δρουν ως σημαντικοί ρυθμιστές των MMPs και σε ορισμένες περιπτώσεις και άλλων μεταλλο-ενδοπεπτιδασών. Οι TIMPs αναστέλλουν τη λειτουργία των MMPs δημιουργώντας σύμπλοκα με αυτές με στοιχειομετρική αναλογία 1:1. Παρότι έχει κατοχυρωθεί η σημασία τους στη ρύθμιση της ικανότητας των κυττάρων για έλεγχο του περιβάλλοντός τους, από την επαναδιοργάνωση του ECM μέχρι την αλληλεπίδραση των κυττάρων μέσω σύνδεσης και μοριακής σηματοδότησης αυξητικών και άλλων παραγόντων, πρόσφατα έχει ξεκινήσει να εκτιμάται και η λειτουργία τους ως αυτόνομοι σηματοδοτικοί μηχανισμοί^{261, 262}. Πράγματι, οι TIMPs εμφανίζουν μια πληθώρα βιολογικών λειτουργιών, όπως η προαγωγή της κυτταρικής αύξησης, η αντι-αγγειογόνος δράση, η αντι- ή προ-αποπτωτική δράση και λειτουργίες συναπτικής πλαστικότητας, πολλές από τις οποίες είναι ανεξάρτητες της αναστολής των μεταλλοπρωτεϊνών²⁶².

Πίνακας 1.2: Ιδιότητες των τεσσάρων ανθρώπινων TIMPs				
Ιδιότητα	TIMP-1	TIMP-2	TIMP-3	TIMP-4
Αριθμός Αμινοξέων	184	194	188	194
pI	8.5	6.5	9.1	7.2
Protein kDa	28	22	24 ή 27	22
Σημεία N-γλυκοζυλίωσης	2	0	1	0
Γονίδιο Συναψίνης	SYN1	-	SYN3	SYN2
Εντοπισμός	Διαλυτός, κυτταρική επιφάνεια	Διαλυτός, κυτταρική επιφάνεια	ECM, κυτταρική επιφάνεια	Διαλυτός, κυτταρική επιφάνεια
Δέσμευση με προ-MMP	proMMP9	proMMP2	proMMP2, 9	proMMP2
MMPs που δεν αναστέλλει αποδοτικά	MT1-MMP, MT3-MMP, MT5-MMP, MMP19	Καμία	Καμία	Καμία
Αναστολή ADAMs	ADAM10	ADAM12	ADAM10, ADAM12, ADAM17, ADAM19,	ADAM17, ADAM28

ADAM33, ADAMTS1, ADAMTS4, ADAMTS5, ADAMTS2 (ισχυρή αναστολή)
--

1.2.8.1 Η αναστολή των MMPs και το σύμπλοκο TIMP-MMP

Όλοι οι TIMPs που έχουν μελετηθεί παρουσιάζουν στενή ομοιότητα όσον αφορά στον πυρήνα της αλληλεπίδρασης με το υπόστρωμά τους. Το 60% - 75% των αλληλεπιδράσεων πραγματοποιείται μέσω μιας συνεχούς κορυφογραμμής, που σχηματίζεται από τα πέντε αμινοτελικά μονομερή Cys1-Thr-Cys-Val-Pro5 που συνδέονται ομοιοπολικά με τα μονομερή Met66-Glu-Ser-Val-Cys70 (μέσω δισουλφιδικού δεσμού Cys1-Cys70), μεσολαβώντας του βρόγχου που συνδέει τα τμήματα sC και sD. Η κορυφογραμμή αυτή εισχωρεί στο ενεργό κέντρο της μεταλλοπρωτεΐνάσης με τέτοιο τρόπο ώστε η Cys1 να επικάθεται του ιόντος Zn²⁺. Κλειδί στη διαδικασία της αναστολής αποτελεί η χηλική σύνδεση του ιόντος με την τελική αμινομάδα του πολυπεπτιδίου και με την καρβοξυλομάδα της Cys1, ώστε να απελευθερωθεί κι απομακρυνθεί το μόριο νερού που είναι απαραίτητο για την υδρόλυση των πρωτεϊνών. Το δεύτερο μονομερές (σερίνη ή θρεονίνη σε όλους τους TIMPs σπονδυλωτών) αλληλεπιδρά με μία περιοχή της MMP που ονομάζεται θύλακας ειδικότητας S1', μια θέση που, όπως δηλώνει και η ονομασία της, παίζει ισχυρό ρόλο στον καθορισμό της ειδικότητας του ενζύμου. Άλλα αμινοξέα που αλληλεπιδρούν με το υπόστρωμα είναι τα μονομερή 3-5, όπως επίσης η Ser68 και η Val69, που συγγενεύουν όμως με σημεία της περιφέρειας του ενζύμου και όχι του ενεργού κέντρου.

Στα σύμπλοκα που σχηματίζονται μεταξύ των πλήρους μήκους TIMPs και των MMPs, σχηματίζονται επίσης επαφές μεταξύ της καρβοξυτελικής περιοχής των TIMPs και των πρωτεασών, αλλά περιορίζονται στην περιφέρεια και δε φαίνεται να κατέχουν σημαντικό ρόλο στο σχηματισμό του συμπλέγματος, αφού οι στερούμενοι C' τελικής περιοχής N-TIMPs αποτελούν υψηλής συνάφειας αναστολείς^{263, 264}. Παρόλα αυτά, μελέτες κινητικής του TIMP-2 με την MMP-2 δείχνουν ότι η συνάφεια των δύο μορίων είναι μεγαλύτερη σε σύγκριση με αυτή του TIMP-2 με την στερούμενη περιοχή αιμοπηξίνης MMP-2. Η συνάφεια του N-TIMP-2 με την πλήρους μήκους MMP-2 είναι ακόμη μικρότερη, αν και παρέμεινε σε υψηλά επίπεδα. Τα παραπάνω δείχνουν πως η C' τελική περιοχή των TIMPs δημιουργεί σταθεροποιητικές αλληλεπιδράσεις με την περιοχή αιμοπηξίνης της MMP-2^{265, 266}. Παρότι οι MMPs και κάποιες ADAMs αναστέλλονται μέσω των N' τελικών άκρων των TIMPs, πρόσφατα πειραματικά δεδομένα έδειξαν ότι ενώ οι TIMP-1 και TIMP-3 αναστέλλουν την ADAM-10, οι N- μορφές τους αποτυγχάνουν στην συγκεκριμένη δράση²⁶⁷.

Αυτό υποδεικνύει ότι ο μηχανισμός αναστολής του ενζύμου αυτού διαφέρει από τον κλασικό μηχανισμό των TIMPs.

Οι TIMPs σχηματίζουν επίσης σύμπλοκα με τις προ-MMPs, τα οποία όμως δημιουργούνται μέσω αλληλεπιδράσεων των αντίθετων περιοχών από αυτές που εμπλέκονται στη λειτουργία της αναστολής, συγκεκριμένα των C' τελικών περιοχών των TIMPs με τις περιοχές αιμοπηξίνης των ζυμογόνων (προ-ενζυμικών πεπτιδίων). Οι αλληλεπιδράσεις αυτών των μορφών είναι σχετικά ειδικές. Οι TIMP-2, TIMP-3 και TIMP-4 συνδέονται με την προ-MMP-2, ενώ ο TIMP-1 και ο TIMP-3 με την προ MMP-9 ²⁶². Αφού οι αλληλεπιδράσεις αυτές αφήνουν ελεύθερο το N' τελικό άκρο του TIMP, τα σύμπλοκα αυτά μπορούν να συνδεθούν και με δεύτερο μόριο MMP, αν και η φυσιολογική αξία αυτής της λειτουργίας δε έχει αποσαφηνιστεί ακόμα, με εξαίρεση την περίπτωση του συμπλέγματος προ-MMP-2 – TIMP-2. Στη συγκεκριμένη περίπτωση, η αλληλεπίδραση αυτή είναι τμήμα του μηχανισμού ενεργοποίησης της MMP-2.

1.2.8.2 Ιστολογική κατανομή και λειτουργία των TIMPs

Οι TIMPs εμφανίζουν διαρκή αλλά και επαγόμενη, ιστολογικά ειδική έκφραση. Ο TIMP-1 εκφράζεται ευρέως σε πολλούς τύπους ιστών των θηλαστικών, κυρίως στα γεννητικά όργανα. Στο κεντρικό νευρικό σύστημα, η έκφραση του TIMP-1 περιορίζεται σε περιοχές διαρκούς νευρωνικής πλαστικότητας, όπως ο ιππόκαμπος, ο οφθαλμικός βολβός και η παρεγκεφαλίδα ²⁶⁸. Ο TIMP-2 συντίθεται με διαρκή τρόπο στους περισσότερους ιστούς, ενώ η παραγωγή του δεν επάγεται από τους συνήθεις αυξητικούς παράγοντες. Ο TIMP-3 εκφράζεται επίσης σε μια πληθώρα ιστών, και μετά την έκκρισή του προσδέεται στο ECM364. Συχνά ανιχνεύεται ως σημαντική πρωτεΐνη δικτύου στη βασική μεμβράνη στους οφθαλμούς και τους νεφρούς. Από την άλλη πλευρά, ο σχετικά περιορισμένος ιστολογικά εντοπισμός του TIMP-4 (στην καρδιά, τους νεφρούς, τις ωοθήκες, τους όρχεις, το πάγκρεας, το κόλον, και στον λιπώδη ιστό) υποδηλώνει ότι κατέχει συγκεκριμένες ιστο-ειδικές λειτουργίες ²⁵⁸, αλλά ο ρόλος αυτής της πρωτεΐνης είναι ανεπαρκώς μελετημένος.

Οι τέσσερις TIMPs του ανθρώπου είναι, σε γενικές γραμμές, ευρέως φάσματος αναστολείς και των 23 MMPs που έχουν βρεθεί στον άνθρωπο, αλλά εμφανίζουν μεταξύ τους διαφορές όσον αφορά στη συνάφεια με τα διαφορετικά υποστρώματα. Ο TIMP-1 είναι πιο περιορισμένος στο ανασταλτικό του φάσμα σε σχέση με τους υπόλοιπους τρεις, έχοντας μικρή συνάφεια με τις διαμεμβρανικές MMP-14, MMP-16 και MMP-24, όπως επίσης και με την MMP-19 ²⁶². Επίσης, υπάρχουν σχετικά λεπτές διαφορές μεταξύ των επιπέδων συνάφειας διαφόρων TIMPs με άλλες MMPs. Για παράδειγμα, οι TIMP-2 και TIMP-3 είναι ασθενέστεροι αναστολείς της MMP-3 και MMP-7 από ότι είναι ο TIMP-1 ²⁶⁹. Ο TIMP-1, παρουσιάζει άλλωστε τη μεγαλύτερη συνάφειά του με τις MMP-1, MMP-2, MMP-3

και MMP-9²⁷⁰. Ο TIMP-2 από την άλλη πλευρά, είναι ειδικότερος όσον αφορά στον περιορισμό της MMP-2^{271, 272}. Ο TIMP-3 είναι ο μοναδικός που αναστέλλει τη λειτουργία ενός πιο ευρέως φάσματος μεταλλοπρωτεασών, περιλαμβάνοντας αρκετά μέλη από τις οικογένειες των ADAMs και ADAMTSs, ενώ οι υπόλοιποι TIMPs έχουν περιορισμένη ανασταλτική λειτουργία προς αυτά τα μόρια. Ο TIMP-1 και ο TIMP-2 αναστέλλουν ασθενώς την ADAM-10 και την ADAM-12^{273,274}. Ο TIMP-3 και ο N-TIMP-4 (αλλά όχι ο TIMP-4 πλήρους μήκους) αναστέλλουν την ADAM-17²⁷⁵. Ο TIMP-4 έχει αναφερθεί επίσης ότι αναστέλλει την ADAM-28²⁷⁶.

Οι ADAMs είναι διαμεμβρανικά ένζυμα, διαφέρουν από τις MMPs στη δομή των περιοχών τους και έχουν πολυμορφία στις ακολουθίες της καταλυτικής περιοχής. Οι ADAMTSs είναι από την άλλη πλευρά εκκρινόμενα ένζυμα. Η πρώτη μη MMP μεταλλοπρωτεϊνάση που βρέθηκε να αναστέλλεται από τον TIMP-3 είναι η ADAM 17, γνωστή και ως ένζυμο μετατροπής του TNF-α (TNF-α Converting enzyme, TACE)²⁷⁷. Η ADAM-17 καταλύει την απελευθέρωση του διαλυτού TNF-α από τη διαμεμβρανική του μορφή, όπως επίσης και το παρόμοιο κούρεμα (shedding) του TGF-α και άλλων υποδοχέων, όπως η L-σελεκτίνη και οι Notch, και μεσολαβεί για τη μη παθολογική μετατροπή της πρόδρομης πρωτεΐνης του αμυλοειδούς (amyloid precursor protein, APP) σε α-σεκρετάση²⁷⁸. Είναι πλέον γνωστό ότι ο TIMP-3 είναι αποτελεσματικός αναστολέας των ADAM-10, -12, -17, -28 και -33, και των ADAMTS-1, -2, -4 και -5. Η αναστολή της ADAM-17 και των ADAMTS-4 και -5 (που ονομάζονται και αγγρεκανάσες 1 και 2 αντίστοιχα) φαίνεται να είναι σημαντική λειτουργία στη ρύθμιση των φλεγμονωδών διαδικασιών, επηρεάζοντας την εξέλιξη ασθενειών όπως η ρευματοειδής αρθρίτιδα και η οστεοαρθρίτιδα^{279,280}.

1.2.8.3 Οι πλειοτροπικές λειτουργίες των TIMPs

Οι TIMPs έχουν μια ποικιλία βιολογικών λειτουργιών, που περιλαμβάνει τη ρύθμιση της κυτταρικής αύξησης και της μετανάστευσης ή εισβολής. Επίσης, παρουσιάζουν ανασταλτικό ρόλο στην αγγειογένεση και έχουν αντι- ή, σε άλλες περιπτώσεις, προ-αποπτωτική δράση. Παρουσιάζουν επίσης ρυθμιστικές λειτουργίες στη διαμόρφωση της συναπτικής πλαστικότητας. Παρότι οι επιδράσεις αυτές μπορεί εν μέρει να προκαλούνται από την λειτουργία της αναστολής των μεταλλοπρωτεϊνών, καθώς η ρύθμιση της αποδόμησης του ECM μπορεί να επηρεάσει την κυτταρική συμπεριφορά, πολλές από αυτές φαίνεται να είναι λειτουργίες ανεξάρτητες της αναστολής των MMPs²⁶². Πράγματι, έχει φανεί ότι συνθετικοί αναστολείς των MMPs αποτυγχάνουν να παρουσιάσουν αντίστοιχη δραστηριότητα, ενώ από την άλλη μεταλλαγμένοι TIMPs που έχουν απολέσει την ανασταλτική τους ικανότητα εξακολουθούν να εμφανίζουν

παρόμοια δραστηριότητα. Έχει λοιπόν φανεί ότι οι TIMPs αλληλεπιδρούν άμεσα με συγκεκριμένους υποδοχείς της πλασματικής μεμβράνης και μπορούν να επάγουν κυτταρικές συμπεριφορές ²⁸¹.

1.2.8.4 Οι TIMPs και η αθηρωμάτωση

Ο ρόλος των TIMPs στα αρχικά στάδια της αθηρωμάτωσης, που αφορούν στον ενδοθηλιακό τραυματισμό και την υπερπλασία του έσω χιτώνα, δεν είναι ιδιαίτερα σαφής. Παρότι μια έρευνα προ εικοσαετίας περιγράφει αυξημένα επίπεδα TIMP-2 μετά από τραυματισμό του ενδοθηλίου ²⁸², άλλοι ερευνητές δεν διαπίστωσαν σημαντικές μεταβολές των επιπέδων TIMP-1, TIMP-2 ή TIMP-3 στις ίδιες πειραματικές συνθήκες ²⁸³. Σε μια άλλη μελέτη, η υπερ-έκφραση των TIMP-1, TIMP 2 και TIMP-3 στα VSMCs, με τη χρήση ανασυνδυασμένων αδενοϊών, ανέστειλε τη μετακίνησή τους διαμέσου της βασικής μεμβράνης, ενώ μόνο ο αναστολέας TIMP-2 μείωσε τον πολλαπλασιασμό τους ²⁸⁴. Το γεγονός αυτό επιβεβαιώνεται και σε μία άλλη πειραματική εργασία, όπου η εισαγωγή VSMCs που υπερ-εκφράζουν τον TIMP-1 μείωσε την πάχυνση του έσω χιτώνα της μείζονος σαφηνούς φλέβας μέσω ελάττωσης της μετανάστευσης των VSMCs, ενώ ο ρυθμός πολλαπλασιασμού τους παρέμεινε ανεπηρέαστος ²⁸⁵. Ο TIMP-3, μέσω της ρυθμιστικής του δράσης έναντι της ADAM-17, ασκεί έλεγχο στην απελευθέρωση διαλυτού VCAM (VCAM-1), και έχει έτσι πιθανότατα καίριο ρόλο στη ρύθμιση της στρατολόγησης μονοκυττάρων από την κυκλοφορία ²⁸⁶. Σε σύμπτωση με τα παραπάνω είναι και η παρατήρηση ότι η έλλειψη TIMP-3 σε διαβητικά πειραματικά μοντέλα οδηγεί σε αυξημένη φλεγμονή ²⁸⁷ και αύξηση του δείκτη Intima-Media Thickness (IMT) ²⁸⁸. Έχει βρεθεί, άλλωστε, ότι συγκεκριμένος υποπληθυσμός μακροφάγων-αφρωδών κυττάρων με μικρή έκφραση του TIMP-3 παρουσιάζει φαινότυπο έντονης εισβολής ²⁸⁹.

Όσον αφορά στις εξελιγμένες αθηρωματικές πλάκες και τη σταθερότητά τους, έχει φανεί ότι οι TIMPs, παρεμποδίζοντας την αποδόμηση του ECM δρουν αντισταθμιστικά στην πρωτεολυτική δραστηριότητα των MMPs και ευνοούν τη σταθεροποίηση της πλάκας. Η διατάραξη, άλλωστε, της ισορροπίας μεταξύ MMPs και TIMPs οδηγεί πιθανότατα σε ρήξη της πλάκας και θρομβωτικό επεισόδιο ²⁹⁰.

Σε ApoE^{-/-} μύες, στους οποίους είχε γίνει χορήγηση τροφής υψηλής περιεκτικότητας σε λιπαρά, μετά από εισαγωγή του γονιδίου του TIMP-1 μέσω αδενοϊού προκειμένου ο συγκεκριμένος αναστολέας να υπερ-εκφράζεται, η παρέμβαση αυτή επιβράδυνε την αύξηση του μεγέθους της αθηρωματικής πλάκας και μείωσε την περιεκτικότητά της σε μακροφάγα στην περιοχή της ρίζας της αορτής ²⁹¹. Σε μία πιο πρόσφατη μελέτη σε ApoE^{-/-} μύες με ετερόζυγη ή ομόζυγη υπερ-έκφραση του TIMP-1, στους οποίους χορηγήθηκε υπερλιπιδαιμική δίαιτα για 3 ή 6 μήνες, βρέθηκε ότι ο TIMP-1 μείωσε την αποδόμηση της ελαστίνης, προστάτευσε από το σχηματισμό ψευδο-

μικροανευρυσμάτων, μείωσε τη συγκέντρωση των μακροφάγων στις πλάκες, αλλά σε αντίθεση με την προηγούμενη μελέτη, δεν ανιχνεύθηκε καμία επίπτωση στο μέγεθος των αθηρωματικών αλλοιώσεων²⁹². Έχει φανεί ότι η απαλοιφή του γονιδίου για τον TIMP-1 συνδέεται με αυξημένη δραστηριότητα των μεταλλοπρωτεϊνών στο αρτηριακό τοίχωμα και αυξημένη αποδόμηση της ελαστίνης, προκαλώντας έτσι την αποσταθεροποίηση της πλάκας^{293, 294}. Πιο συγκεκριμένα, σε μια μελέτη όπου χρησιμοποιήθηκαν μύες με συνδυασμένη έλλειψη της ApoE και του TIMP-1 (ApoE-/-TIMP-1-/-), η αυξημένη δραστηριότητα των MMPs, ως αποτέλεσμα της έλλειψης της TIMP-1, συνέβαλε στη μείωση του μεγέθους της αθηρωματικής πλάκας μετά από χορήγηση δίαιτας υψηλής περιεκτικότητας σε λιπαρά, αλλά από την άλλη ευνόησε την θετική αναδιαμόρφωση του αρτηριακού τοιχώματος και το σχηματισμό ανευρύσματος²⁹⁴. Παρομοίως, σε μια αντίστοιχη μελέτη με ApoE-/-TIMP-1-/- μύες, αν και οι αθηρωματικές αλλοιώσεις δεν διέφεραν σε μέγεθος, αναπτύχθηκαν στη μέση στοιβάδα περισσότερες ρήξεις των ελαστικών πετάλων, τα οποία παρουσίαζαν ταυτόχρονα στοιχεία αποδόμησης και διήθησης από μακροφάγα, οδηγώντας σε σχηματισμό ψευδο-μικροανευρυσμάτων²⁹³. In vitro, μακροφάγα ανθρώπων προερχόμενα από μονοκύτταρα, μετά από προσθήκη οξειδωμένης LDL αύξησαν τη δραστηριότητα της MMP-9, ενώ εκείνη του TIMP-1 μειώθηκε υποδεικνύοντας ότι τα τελευταία μόρια συμμετέχουν, με αντίθετο όμως μηχανισμό, στην αποδόμηση του εξωκυττάρου υλικού της αθηρωματικής πλάκας και προδιαθέτουν σε ρήξη της ή σε αγγειακή αναδιαμόρφωση¹⁴⁹. Επίσης, η ιντερλευκίνη 8 καταστέλλει την έκφραση του TIMP-1 σε γεμάτα με χοληστερόλη μακροφάγα προερχόμενα από ανθρώπους και άρα επηρεάζει τη σταθερότητα των αθηρωματικών πλακών²⁹⁵.

Επαγωγή της υπερ-έκφρασης του TIMP-2 μέσω αδενοϊού σε μύες μείωσε το μέγεθος της αθηρωματικής πλάκας και βελτίωσε τους δείκτες ρήξης της πλάκας στις βραχιονοκεφαλικές αρτηρίες^{296, 297}. Στην παραπάνω μελέτη, οι ερευνητές χορήγησαν δίαιτα με υψηλή περιεκτικότητα σε λιπαρά σε ApoE-/- μύες για 7 εβδομάδες, και στη συνέχεια έκαναν γονιδιακή μεταφορά μέσω αδενοϊών των TIMP-1 και TIMP-2, ξεχωριστά, στις ομάδες των πειραματόζωων. Μετά από 4 επιπλέον εβδομάδες χορήγησης υπερλιπιδαιμικής δίαιτας παρατήρησαν ότι μόνο στην ομάδα των μυών που υπήρχε υπερ-έκφραση του TIMP-2 ανεστάλη σημαντικά η ανάπτυξη των αθηρωματικών βλαβών συγκριτικά με την ομάδα που έγινε placebo ένεση αδενοϊών ή την ομάδα με το γονίδιο του TIMP-1²⁹⁷. Επιπλέον, ο TIMP-2 οδήγησε σε ένα πιο σταθερό φαινότυπο της αθηρωματικής πλάκας που χαρακτηριζόταν από μεγαλύτερο αριθμό λείων μυϊκών κυττάρων, λιγότερα μακροφάγα, περισσότερη ελαστίνη και μικρότερο αριθμό ρήξεων της ινώδους κάψας. Οι συγγραφείς συμπέραναν ότι ο TIMP-2 περιορίζει τη μετανάστευση των μακροφάγων μέσα στη βλάβη και επιβραδύνει την περαιτέρω στρατολόγηση μακροφάγων, μέσω της ελάττωσης του ρυθμού απόπτωσης μακροφάγων και αφρωδών κυττάρων τα οποία όταν αποπίπτουν προσελκύουν και άλλα

κύτταρα. Επιπρόσθετα, ο TIMP-2, σύμφωνα πάντα με τους ερευνητές, αναστέλλει την απόπτωση των VSMC που με τη σειρά τους θα έφερναν επιπλέον μακροφάγα μέσα στη βλάβη. Σύμφωνα με την παραπάνω έρευνα, ο TIMP-2 αυξάνει τον αριθμό των VSMCs, μειώνει τον αριθμό των μακροφάγων και επομένως έχει ευνοϊκή επίδραση στην εξέλιξη και σταθερότητα της αθηρωματικής πλάκας. Σε αντίθεση με μια προηγούμενη μελέτη ²⁹¹, οι ερευνητές δεν ανίχνευσαν οποιαδήποτε επίδραση του TIMP-1 στην εξέλιξη της αθηρωμάτωσης και τη διαφορά αυτή την απέδωσαν στο ότι η μελέτη τους αφορούσε στις βραχιονοκεφαλικές αρτηρίες και όχι στην αορτική ρίζα όπως η προηγούμενη μελέτη.

Πρόσφατα, έχει αρχίσει να μελετάται και να διατυπώνεται η ευεργετική επίδραση της υπερ-έκφρασης του TIMP-3 στην εξέλιξη της αθηρωματικής νόσου. Συγκεκριμένα, έχει βρεθεί ότι η αυξημένη έκφραση TIMP-3 στα μακροφάγα μειώνει το φλεγμονώδες φορτίο των αθηρωματικών αλλοιώσεων ²⁹⁸. Επίσης, ex-vivo γονιδιακή θεραπεία για την υπερ-έκφραση TIMP-3 αναφέρεται πως αναστέλλει την πάχυνση του ενδοθηλίου και την νεοαγγείωση ²⁹⁹.

Τα παραπάνω δεδομένα υποδεικνύουν τον αποτρεπτικό ρόλο των αναστολέων των μεταλλοπρωτεϊνών προς τη ρήξη της πλάκας, χωρίς όμως να έχουν προς το παρόν επιφέρει κάποιο πρακτικό όφελος. Όταν δοκιμάστηκε σε μύες η από του στόματος χορήγηση συνθετικού αναστολέα των μεταλλοπρωτεϊνών με ευρύ φάσμα δράσης, η παρέμβαση δεν απέδωσε στη μείωση του μεγέθους της πλάκας ή στη σταθερότητά της ^{296, 297, 300}. Παρομοίως, οι τετρακυκλίνες, οι οποίες αναστέλλουν την έκφραση και δραστηριότητα των μεταλλοπρωτεϊνών, δεν είχαν κανένα αποτέλεσμα ³⁰¹. Πιθανόν οι ευρέως-φάσματος αναστολείς των μεταλλοπρωτεϊνών να μην μπορούν να ασκήσουν ακριβή έλεγχο σε μια πολυπαραγοντική και περίπλοκη διαδικασία όπως αυτή της αθηρωμάτωσης. Εναλλακτικά, θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν αναστολείς με ειδικότερη στόχευση, ώστε να είναι πιο αποτελεσματικοί και να έχουν κλινική εφαρμογή. Κάτι τέτοιο αναμένεται με εξαιρετικό ενδιαφέρον, ενώ έρχονται στο φως όλο και περισσότερες μελέτες αξιολόγησης φαρμακευτικών παρεμβάσεων στη σύσταση της αθηρωματικής πλάκας, στις οποίες, μεταξύ όλων των άλλων παραμέτρων που συνεκτιμούνται, είναι και οι μεταβολές στα επίπεδα των MMPs και TIMPs και των συνθετικών αναστολέων των MMPs.

Σε μια πρόσφατη κλινική μελέτη, όπου μετρήθηκαν τα επίπεδα του TIMP-1 σε ²⁷² άνδρες που υποβλήθηκαν σε στεφανιογραφία ώστε να διερευνηθεί η σχέση τους με την καρδιαγγειακή νοσηρότητα και θνητότητα, διαπιστώθηκε ότι 24 μήνες μετά την έναρξη της μελέτης ο TIMP-1 ήταν ανεξάρτητος προγνωστικός παράγοντας εμφάνισης εμφράγματος του μυοκαρδίου ή θανάτου ³⁰². Σε δείγματα αθηρωματικών πλακών έχουν βρεθεί αυξημένα επίπεδα των αναστολέων TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3, και μάλιστα σε περιοχές πλούσιες σε μακροφάγα, όπως το όριο έσω-μέσου χιτώνα, πάνω από το λιπιδικό πυρήνα ή σε περιοχές με SMCs, αν και αυτά ήταν γενικά μειωμένα στις πλάκες ³⁰³.

Επίσης, στο νεκρωτικό πυρήνα εντοπίζεται συσσώρευση TIMP-4, ενώ έχει προταθεί το παραπάνω μόριο ως δείκτης αγγειακής φλεγμονής³⁰⁴. Εξετάζοντας καρωτιδικές πλάκες από συμπτωματικούς ασθενείς, οι ερευνητές ανακάλυψαν μειωμένη παρουσία του TIMP-175. Αντίθετα, σε παρόμοιες συνθήκες, η συγκέντρωση του TIMP-2 έχει βρεθεί να είναι μικρότερη³⁰⁵, μεγαλύτερη³⁰⁶ ή να μη διαφέρει από εκείνη ασυμπτωματικών ασθενών³⁰⁷.

Τα τελευταία χρόνια επιστημονικό ενδιαφέρον συγκεντρώνει η μέτρηση των TIMPs στο αίμα. Οι μελέτες σχετικά με τον TIMP-1 έχουν δείξει έως τώρα αντιφατικά αποτελέσματα. Σύμφωνα με ορισμένες εργασίες τα υψηλά επίπεδα του TIMP-1 στο αίμα συσχετίζονται με υψηλού κινδύνου πλάκες στις στεφανιαίες αρτηρίες³⁰⁸ και με οξέα στεφανιαία σύνδρομα³⁰⁹. Αντίθετα, άλλες μελέτες στις ίδιες καταστάσεις δεν έχουν βρει διαφορές στα επίπεδα του TIMP-1^{310,311}. Άλλες όμως μελέτες συμφωνούν ότι η πάχυνση του έσω-μέσου χιτώνα των καρωτίδων ή η ύπαρξη αθηρωματικών πλακών στις καρωτίδες συνοδεύονται από αυξημένα επίπεδα του TIMP-1^{312,313}. Επίσης, σε όλες τις κλινικές μελέτες ασθενών με οξέα στεφανιαία σύνδρομα η συγκέντρωση του TIMP-2 στο αίμα εμφανίζεται αυξημένη^{314,315}. Οι κλινικές μελέτες που υπάρχουν για τον TIMP-2 σε ασθενείς με αθηρωματικές βλάβες στις καρωτίδες, αντίθετα, δεν απέδειξαν τη σχέση του με την ύπαρξη πλακών ή την αστάθεια αυτών^{225,309,316}. Στον αντίποδα, η συγκέντρωση του TIMP-3 αναφέρεται μειωμένη στις αθηρωματικές πλάκες σε ασθενείς με διαβήτη τύπου II, και μάλιστα στην ελλιπή του έκφραση αποδίδεται η αποσταθεροποίηση της MMP-9 και της ADAM-17³¹⁷. Απαιτούνται περισσότερες έρευνες στις οποίες τα βιοχημικά αποτελέσματα των TIMPs να πλαισιώνονται από παθολογοανατομικά δεδομένα, από διαφορετικά στάδια της αθηρωματικής νόσου και από διαφορετικά σημεία του αγγειακού δικτύου, προκειμένου να καθοριστεί επακριβώς ο ρόλος των TIMPs στην εξέλιξη και αστάθεια της αθηρωματικής πλάκας.

1.2.9 Κυτοκίνες

Οι κυτοκίνες είναι πρωτεΐνες που εκκρίνονται από τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος, ρυθμίζοντας πολυάριθμες λειτουργίες τους. Παράγονται απαντώντας, με μεγάλη ποικιλία αντιδράσεων, στη δράση μικρόβιακών και άλλων αντιγονικών παραγόντων.

Στην φάση ενεργοποίησης της δευτερογενούς απάντησης, διεγείρουν την ανάπτυξη και διαφοροποίηση των λεμφοκυττάρων καθώς και την ενεργοποίηση των μακροφάγων, ενώ κατά την πρωτογενή απάντηση ρυθμίζουν την πρόιμη φλεγμονώδη αντίδραση με τα μικρόβια, προάγοντας έτσι τον περιορισμό τους³¹⁸. Οι κυτοκίνες διεγείρουν επίσης το αιμοποιητικό σύστημα και την αγγειογένεση³¹⁹. Στην δε κλινική ιατρική είναι σημαντικές σαν θεραπευτικοί παράγοντες, ενώ αποτελούν στόχους για ειδικούς αναστολείς σε πολυάριθμα ανοσοφλεγμονώδη νοσήματα.

Η ονοματολογία των κυτοκινών βασίζεται συνήθως στην κυτταρική τους προέλευση. Οι κυτοκίνες οι οποίες παράγονται από τα μονοκύτταρα μακροφάγα καλούνται μονοκίνες, ενώ αυτές που παράγονται από τα λεμφοκύτταρα καλούνται λεμφοκίνες. Με την ανάπτυξη των αντικυτονικών αντισωμάτων και της μοριακής βιολογίας έγινε σαφές ότι η ίδια πρωτεΐνη μπορεί να συντεθεί από λεμφοκύτταρα, μονοκύτταρα και από ποικίλα ιστοκύτταρα, περιλαμβάνοντας τα ενδοθηλιακά και μερικά επιθηλιακά κύτταρα. Για τον λόγο αυτό, ο γενικός όρος κυτοκίνες είναι και ο προτεινόμενος για αυτή την ομάδα μεσολαβητών. Επειδή πολλές κυτοκίνες παράγονται από τα λευκοκύτταρα (π.χ. μακροφάγα ή T κύτταρα) και δρουν σε άλλα λευκοκύτταρα, καλούνται επίσης και ιντερλευκίνες. Αυτός ο όρος είναι ατελής, διότι πολλές κυτοκίνες οι οποίες συντίθενται μόνο από λευκοκύτταρα και δρουν μόνο σε λευκοκύτταρα δεν καλούνται ιντερλευκίνες, για ιστορικούς λόγους, ενώ πολλές κυτοκίνες που καλούνται ιντερλευκίνες παράγονται ή δρουν σε κύτταρα διαφορετικά από λευκοκύτταρα. Εντούτοις, ο όρος είναι χρήσιμος διότι καθώς όλο και νέες κυτοκίνες χαρακτηρίζονται μοριακά, καταχωρούνται ως ιντερλευκίνη (IL)-αριθμός (π.χ., IL-1, IL-2, κ.ο.κ)³²⁰,³²¹ προκειμένου να διατηρηθεί μία σταθερή ονοματολογία. Οι κυτοκίνες, χρησιμοποιούνται επίσης σε κλινικές καταστάσεις και μελέτες ζώων, προκειμένου να διεγείρουν ή αναστείλουν την φλεγμονή, ανοσοαπάντηση και αιμοποίηση³²².

1.2.9.1 Γενικές ιδιότητες των κυτοκινών

Οι κυτοκίνες είναι πολυπεπίδια που παράγονται ως απάντηση στα μικρόβια και άλλα αντιγόνα, μεσολαβώντας και ρυθμίζοντας ανοσολογικές και φλεγμονώδεις αντιδράσεις. Παρ'όλο που είναι δομικά ανόμοιες, μοιράζονται πολυάριθμες ιδιότητες^{323, 324}. Η έκκριση τους είναι σύντομη και αυτοπεριοριζόμενη.

Οι κυτοκίνες συνήθως δεν είναι αποθηκευμένες σαν προσχηματιζόμενα μόρια. Η έναρξη της σύνθεσης τους γίνεται μετά από αντιγραφή γονιδίου σαν αποτέλεσμα κυτταρικής ενεργοποίησης. Η σύνθεση τους όμως είναι προσωρινή επειδή τα messenger RNA που κωδικοποιούν τις περισσότερες είναι ασταθή και η διαδικασία αντιγραφής επίσης προσωρινή. Η παραγωγή ορισμένων κυτοκινών μπορεί επιπρόσθετα να ελεγχθεί από την διαδικασία RNA αλλά και από μηχανισμούς μετά την αντιγραφή, όπως με την πρωτεολυτική απελευθέρωση ενός ενεργού προϊόντος από έναν απενεργοποιημένο πρόδρομο μεταβολίτη. Άπαξ και συντεθούν οι κυτοκίνες εκκρίνονται γρήγορα δημιουργώντας μία έκρηξη απελευθέρωσης, εκεί όπου χρειάζεται. Οι δράσεις των κυτοκινών είναι συχνά πλειοτροπικές και πλεονάζουσες.

Ο πλειοτροπισμός αναφέρεται στην ικανότητα μιας κυτοκίνης να δρα σε διαφορετικούς τύπους κυτάρων. Αυτή η ιδιότητα επιτρέπει στην κυτοκίνη να προκαλεί ποικίλα βιολογικά αποτελέσματα,

περιορίζοντας όμως γι' αυτό τον λόγο την θεραπευτική τους χρήση, η οποία μπορεί να έχει σαν αποτέλεσμα πολυάριθμες ανεπιθύμητες ενέργειες. Ο πλεονασμός αναφέρεται στην ιδιότητα πολλών κυτοκινών να έχουν τα ίδια λειτουργικά αποτελέσματα. Εξ' αιτίας αυτού του πλεονασμού, οι ανταγωνιστές ενάντια σε μία μόνη κυτοκίνη ή σε μία μετάλλαξη γονιδίου που κωδικοποιεί μία κυτοκίνη να μην είναι αποτελεσματικοί καθώς άλλες κυτοκίνες διαφορετικές μπορεί να αντισταθμίζουν³²⁵.

Οι κυτοκίνες συχνά επηρεάζουν την σύνθεση και την δράση άλλων κυτοκινών. Η ικανότητα μιας κυτοκίνης να διεγείρει την παραγωγή άλλων, οδηγεί σε έναν καταρράκτη αντιδράσεων όπου η δεύτερη και τρίτη κυτοκίνη μπορεί να επεμβαίνει στα βιολογικά αποτελέσματα της πρώτης. Δύο κυτοκίνες μπορεί να ανταγωνίζονται η μία την δράση της άλλης, να έχουν αθροιστικά αποτελέσματα ή συνεργική δράση. Η δράση τους μπορεί να είναι τοπική ή συστηματική.

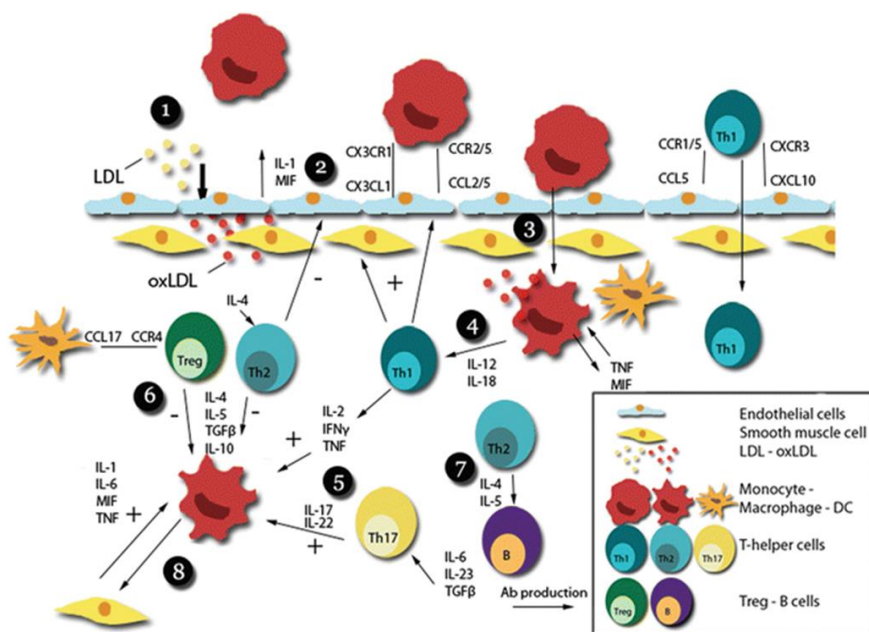
Οι περισσότερες κυτοκίνες δρουν τοπικά στο σημείο όπου παράγονται, είτε στο ίδιο κύτταρο το οποίο εκκρίνει την κυτοκίνη (αυτοκρινής δράση) είτε σε κύτταρο που βρίσκεται πολύ κοντά σε αυτό (παρακρινική δράση). Τα T κύτταρα συχνά εκκρίνουν κυτοκίνες στα σημεία της επαφής τους με κύτταρα συνδεδεμένα με αντιγόνα, τις λεγόμενες «ανοσο-συνάψεις». Αυτός συνήθως είναι και ένας λόγος όπου οι κυτοκίνες συχνά δρουν πάνω σε κύτταρα τα οποία βρίσκονται σε επαφή με τα κύτταρα που τις παράγουν. Όταν παράγονται σε μεγάλες ποσότητες, μπορεί να εισαχθούν στη κυκλοφορία και να δράσουν σε απόσταση από το σημείο παραγωγής τους (ενδοκρινική δράση)³²⁶.

Η έναρξη της δράσης των κυτοκινών συμβαίνει μετά την σύνδεση τους με ειδικούς υποδοχείς της μεμβράνης πάνω στα κύτταρα στόχους. Τα σημεία σύνδεσης των υποδοχέων με τις κυτοκίνες συχνά έχουν υψηλή συγγένεια με σταθερές διαχωρισμού (Kd values), εύρους από 10⁻¹⁰ έως 10⁻¹² M. (Συγκριτικά τα περισσότερα συμπλέγματα ιστοσυμβατότητας συνδέονται με τα πεπτίδια με Kd εύρους μόνο 10⁻⁶ M). Συνεπώς, μόνο μικρή ποσότητα κυτοκινών είναι απαραίτητη για να καταλάβει τους υποδοχείς και να προκαλέσει βιολογικά αποτελέσματα. Τα περισσότερα κύτταρα φέρουν χαμηλά επίπεδα υποδοχέων για τις κυτοκίνες (περίπου 100-1000 υποδοχείς ανά κύτταρο), αλλά αυτοί είναι επαρκείς για να προκληθεί απάντηση.

Εξωτερικοί σηματοδότες ρυθμίζουν την έκφραση των υποδοχέων των κυτοκινών και έτσι την απαντητικότητα των κυττάρων στις κυτοκίνες. Για παράδειγμα, η διέγερση των T και B λεμφοκυττάρων από αντιγόνα, οδηγεί σε αυξημένη έκφραση των υποδοχέων. Για αυτό τον λόγο, κατά την διάρκεια μιας ανοσοαπάντησης, τα λεμφοκύτταρα που είναι ειδικά για το αντιγόνο είναι και οι προτιμώμενοι ανταποκριτές των κυτοκινών που έχουν εκκριθεί. Αυτός είναι και ένας μηχανισμός για την διατήρηση της ειδικότητας των ανοσοαπαντήσεων, ακόμη και εάν οι κυτοκίνες οι ίδιες δεν είναι ειδικές για το συγκεκριμένο αντιγόνο. Η έκφραση των υποδοχέων επίσης

ρυθμίζεται από τις κυτοκίνες τις ίδιες, περιλαμβάνοντας και την κυτοκίνη που συνδέεται με τον υποδοχέα, επιτρέποντας ή θετική επέκταση ή αρνητικό feedback³²⁷.

Η δράση των περισσότερων κυτοκινών στα κύτταρα στόχους συνίστανται σε μεταβολές στην έκφραση γονιδίων οι οποίες έχουν σαν αποτέλεσμα την κινητοποίηση νέων λειτουργιών. Πολλές από τις μεταβολές στην γονιδιακή έκφραση, που προάγεται από τις κυτοκίνες, έχει σαν αποτέλεσμα την διαφοροποίηση των T και B λεμφοκυττάρων καθώς και την ενεργοποίηση των μακροφάγων. Για παράδειγμα, οι κυτοκίνες διεγείρουν την μεταβολή ισοτόπων αντισωμάτων στα B κύτταρα, την διαφοροποίηση των βοηθητικών T κυττάρων στις υποομάδες TH1 και TH2 και την ενεργοποίηση των microbicidal μηχανισμών στα φαγοκύτταρα. Εξάιρεση στον παραπάνω κανόνα, ότι οι κυτοκίνες μεταβάλουν την γονιδιακή έκφραση, αποτελούν οι χημειοκίνες, οι οποίες προκαλούν ταχεία μετακίνηση των κυττάρων και η κυτοκίνη που καλείται tumor necrosis factor (TNF), η οποία προάγει την απόπτωση ενεργοποιώντας κυτταρικά ένζυμα, χωρίς νέα αντιγραφή γονιδίου ή σύνθεση πρωτεΐνης³²⁸.



Εικόνα 7: Κυτοκίνες στην ανοσοαπόκριση της αθηρωμάτωσης. (1) Η LDL εισέρχεται στο τοίχωμα του αγγείου και μετασχηματίζεται σε oxLDL με τη δράση ενζύμων και αντιδραστικών ειδών οξυγόνου. (2) Η oxLDL επάγει τη χημειοαξία ανοσοκυττάρων και την προσκόλληση από ενδοθηλιακά κύτταρα. (3) Προσκόλληση και διαπίδηση μονοκυττάρων και μετέπειτα μετασχηματισμός σε μακροφάγα φαγοκυττάρωσης της oxLDL που παράγουν αυτοκρινείς κυτοκίνες όπως TNF και MIF. (4) Επιδείνωση της αρχικής ανοσοαπόκρισης μέσω αλληλεπιδράσεων μακροφάγων-T-κυττάρων που πολλαπλασιάζουν την βασισμένη σε Th1 ανοσοαπόκριση μέσω της IL-12 και της IL-18. (5) Οι κυτοκίνες που σχετίζονται με τα Th1 όπως η IFN γ , αλλά επίσης η IL-17 που παράγεται από τα κύτταρα Th17, επιδεινώνουν περαιτέρω την ανοσοαπόκριση με διέγερση των μακροφάγων. (6) Τα Th2 κύτταρα και τα Tregs παράγουν αντιφλεγμονώδεις κυτοκίνες όπως η IL-10, που καταστέλλουν την ανοσοαπόκριση. (7) Τα κύτταρα Th2 που σχηματίζονται υπό την επίδραση της IL-4 επάγουν τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων B και την παραγωγή αντισωμάτων μέσω των IL-4 και 5. (8) Περαιτέρω επιδείνωση της ανοσοαπόκρισης συμβαίνει μέσω αλληλεπιδράσεων μακροφάγων-SMC. (Kusters P.J.H., Lutgens E. (2015) Cytokines and Immune Responses in Murine Atherosclerosis. In: Andrés V., Dorado B. (eds) *Methods in Mouse Atherosclerosis. Methods in Molecular Biology*, vol 1339. Humana Press, New York, NY)

1.2.9.2 Παράγον νέκρωσης των όγκων (tumor necrosis factor, TNF- α)

Πρόκειται για ένα μη-γλυκοζυλιωμένο πολυπεπτίδιο 157 αμινοξέων, με μοριακό βάρος 17 kDa³²⁹, το οποίο περιγράφηκε για πρώτη φορά το 1975 από τον Carswell³³⁰. Το μόριο του αθροίζεται *in vitro* και σχηματίζει ποικίλου μεγέθους πρωτεΐνες (διμερή ως πολυμερή) και οι γενετικοί τόποι των οποίων εδράζονται στενά συνδεδεμένοι εντός του μείζονος συστήματος ιστοσυμβατότητας. Η ολιγομερής μορφή του πιστεύεται ότι είναι η βιολογικά δραστική. Το γονίδιο του βρίσκεται στο βραχύ σκέλος του χρωμοσώματος 6³³¹.

Κύρια κυτταρική πηγή του TNF- α είναι τα ενεργοποιημένα μακροφάγα και τα μονοκύτταρα³³². Επίσης παράγεται από τα περιφερειακά λεμφοκύτταρα³³³, από τα κύτταρα φυσικούς φονείς (NK κύτταρα)³³⁴ και από τα πολυμορφοπύρρηνα³³⁵. Το γεγονός αυτό υποδεικνύει ότι παρά τη στενή σύνδεση των γονιδίων τους, η παραγωγή αυτών των πρωτεϊνών υπόκειται σε διαφορετική και ανεξάρτητη ρύθμιση. Αν και οι TNF παράγονται ως εκκριτικές πρωτεΐνες, μεμβρανικές μορφές τους έχουν επίσης απομονωθεί και χαρακτηρισθεί, οι οποίες φαίνεται ότι διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στις διακυτταρικές κυτταροτοξικές αλληλεπιδράσεις.

Η βιολογική δράση του TNF είναι συνάρτηση της ποσότητας στην οποία παράγεται. Σε μικρές συγκεντρώσεις λειτουργεί ως παρακρινής ή αυτοκρινής ρυθμιστής της λειτουργίας των λευκοκυττάρων και των ενδοθηλιακών κυττάρων. Αυξάνει την έκφραση των μορίων προσκόλλησης στο ενδοθήλιο, ενεργοποιεί τα πολυμορφοπύρρηνα προς την καταστροφή των μικροβίων και διεγείρει την παραγωγή των κυτταροκινών συμπεριλαμβανομένων των IL-1, IL-6 χημειοκινών αλλά και του TNF- α από τα μονοπύρρηνα. Αν το ερέθισμα που προκαλεί την παραγωγή του TNF- α είναι ισχυρότερο, παρατηρείται παραγωγή μεγαλύτερων ποσοτήτων και δίοδος της κυττοκίνης αυτής στο αίμα με αποτέλεσμα την πρόκληση συστηματικών εκδηλώσεων, με κυριότερες μεταξύ αυτών τον πυρετό και την αύξηση της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών οξείας φάσης, την οποία συνεπάγεται η δράση του στα ηπατοκύτταρα.

Παραπέρα αύξηση της παραγωγής του ως αποτέλεσμα τοξικά φαινόμενα όπως η μείωση της συσταλτικότητας του μυοκαρδίου και η μείωση της αιματικής άρδρευσης των ιστών, η χάλαση του τόνου των λείων μυών των αγγείων και η ελάττωση της αρτηριακής πίεσης, η ενδαγγειακή θρόμβωση καθώς και οι σοβαρές μεταβολικές διαταραχές. Οι επίδρασή του και οι πολλαπλές δραστηριότητες του, επιτελούνται διαμέσου ειδικών κυτταρικών υποδοχέων³³⁶. Υποδοχείς του υπάρχουν σε όλα τα κύτταρα –πλην των ερυθροκυττάρων– σε διαφορετικό όμως αριθμό. Η ευρεία αυτή κατανομή τους, αντανακλά και την πανταχού επίδρασή του³³⁷.

1.2.9.2.1 Ο ρόλος του TNF-α στην αθηρωμάτωση

Ο αγγειακός τραυματισμός που σχετίζεται με την αθηρωμάτωση χαρακτηρίζεται από σχηματισμό και απελευθέρωση φλεγμονωδών κυτοκινών, ενεργοποίηση της παραγωγής ROS και μειωμένη διαθεσιμότητα NO, οδηγώντας σε ενδοθηλιακή δυσλειτουργία. Μεταξύ των προφλεγμονωδών κυτοκινών, ο TNF-α παίζει βασικό ρόλο διατηρώντας συστηματική φλεγμονή χαμηλών επιπέδων. Περιγράφηκαν αρκετοί μηχανισμοί οι οποίοι συμβάλλουν στις προαθηρογονικές επιδράσεις του TNF-α στο ενδοθήλιο, συμπεριλαμβανομένου του ρόλου του στην παραγωγή ROS, μειώνοντας τη βιοδιαθεσιμότητα του NO και αυξάνοντας την ενδοθηλιακή διαπερατότητα στα κυκλοφορούντα συστατικά και κύτταρα του αίματος. Αυτοί οι προφλεγμονώδεις μηχανισμοί αθηρογένεσης υπογραμμίζονται εν συντομία παρακάτω.

-TNF-α-επαγόμενη δυσλειτουργία ενδοθηλιακού φραγμού

Ο TNF-α ρυθμίζει την αγγειακή διαπερατότητα με σκοπό τον έλεγχο της φλεγμονής, καθώς η αυξημένη διαπερατότητα των μικροαγγείων επιτρέπει στα μακρομόρια του αίματος και στα φλεγμονώδη κύτταρα να εισέλθουν στους τραυματισμένους ιστούς. Ωστόσο, η αυξημένη διαπερατότητα συμβάλλει επίσης στον σχηματισμό αθηρωματικών πλακών, οι οποίες ξεκινούν από την υποενδοθηλιακή συσσώρευση λιπιδίων αίματος και φλεγμονωδών κυττάρων. Ο TNF-α συμβάλλει στη διάσπαση του ενδοθηλιακού φραγμού με διάφορους μηχανισμούς. Η ενεργοποίηση του TNFR1 έχει αναφερθεί ότι επάγει την εξαρτώμενη από την πρωτεϊνική κινάση C αναδιάταξη του κυτταροσκελετού ακτίνης³³⁸, αυξάνει την αναλογία συγκεντρώσεων μονομερών προς τα νημάτια ακτίνης³³⁹ και αποσταθεροποιεί τους μικροσωληνίσκους *in vitro*³⁴⁰. Η αποσταθεροποίηση του ενδοθηλιακού κυτταροσκελετού από τον TNF-α προκαλεί σχηματισμό των διακυτταρικών κενών και οδηγεί σε εξαρτώμενη από τη δόση και εξαρτώμενη από το χρόνο αύξηση της παρακυτταρικής κίνησης των μακρομορίων διαμέσου των ενδοθηλιακών μονοστιβάδων³⁴¹.

Παράλληλα με την αναδιάταξη του κυτταροσκελετού της ακτίνης, ο TNF-α αυξάνει τη φωσφορυλίωση τυροσίνης της αγγειακής ενδοθηλιακής καντερίνης, το μόριο-κλειδί στις διεπαφές των ενδοθηλιακών κυττάρων, που επιτρέπει την παρακυτταρική διέλευση των μακρομορίων του αίματος³⁴². Ένας άλλος μηχανισμός που συμβάλλει στην αυξημένη ενδοθηλιακή ενεργοποίηση και διαπερατότητα ως απόκριση στον TNF-α είναι η αποικοδόμηση του γλυκοκάλυκα³⁴³. Επιπλέον, πρόσφατα αποδείχθηκε ότι ο TNF-α αυξάνει την τρανσκύτωση της λιποπρωτεΐνης χαμηλής πυκνότητας στα ανθρώπινα ενδοθηλιακά κύτταρα και συμβάλλει στην πρόωμη αθηρωμάτωση ενισχύοντας την υποενδοθηλιακή συγκράτηση της λιποπρωτεΐνης χαμηλής πυκνότητας στα αγγειακά τοιχώματα των μυών με έλλειψη απολιποπρωτεΐνης E³⁴⁴. Αυτές οι επιδράσεις του TNF-α παρεμποδίστηκαν ουσιαστικά όχι μόνο από τους αναστολείς της τρανσκυτώσεως, αλλά επίσης από

τους αναστολείς του NF-κB και από τους αναστολείς του υποδοχέα-γ ενεργοποιημένους από τον πολλαπλασιαστική υπεροξυσωμάτων, υποδεικνύοντας μια διασταυρούμενη επικοινωνία μεταξύ αυτών των οδών.

- TNFα-επαγόμενες αλληλεπιδράσεις ενδοθηλιακών λευκοκυττάρων

Τα αγγειακά ενδοθηλιακά κύτταρα είναι ο κύριος κυτταρικός στόχος για τις δράσεις των κυκλοφορούντων προφλεγμονωδών κυτοκινών. Η σύνδεση TNF-α με τον TNPK1 ξεκινά την έκφραση πολλών προφλεγμονωδών, προθερογενών πρωτεϊνών^{345, 346} μέσω της ενεργοποίησης των παραγόντων μεταγραφής NF-κB και c-Jun / ATF-2,³⁴⁷⁻³⁵⁰ και έτσι συμβάλλει στην αυξημένη πρόσληψη λευκοκυττάρων από το ενδοθήλιο³⁵¹.

Η σηματοδότηση προ-φλεγμονώδους TNF-α επάγει την ταχεία ενδοθηλιακή έκφραση μορίων κυτταρικής προσκόλλησης, τα οποία μεσολαβούν στην πρόσληψη και μετανάστευση των κυκλοφορούντων λευκοκυττάρων στο αγγειακό τοίχωμα³⁵². Τα μόρια προσκόλλησης, συμπεριλαμβανομένης της E-σελεκτίνης, του μορίου προσκόλλησης των αγγειακών κυττάρων 1 (VCAM-1), του μορίου διακυτταρικής προσκόλλησης 1 (ICAM-1) συντίθενται de novo εντός 30-120 λεπτών από τη διέγερση από TNF-α³⁵³ και μεταφέρονται στην ενδοθηλιακή επιφάνεια.

Οι Chandrasekharan και συνεργάτες³⁵² διερεύνησαν λεπτομερώς την εμπλοκή των δύο υποδοχέων TNF-α στην έκφραση του μορίου ενδοθηλιακής προσκόλλησης. Μελέτες που χρησιμοποιούν καλλιεργημένα ενδοθηλιακά κύτταρα προερχόμενα από άγριου τύπου μύες με έλλειψη σε TNFR2 ή TNFR1 έδειξαν ότι ο TNFR2 απαιτείται για την προκαλούμενη από TNF-α έκφραση της E-σελεκτίνης, του VCAM-1 και του ICAM-1. Επιπλέον η κύλιση των λευκοκυττάρων που διεγείρεται από τον TNF-α, και στη συνέχεια η σταθερή προσκόλληση στο ενδοθήλιο και η μετανάστευση μειώθηκαν δραματικά σε μύες με έλλειψη στον TNFR2, υποδεικνύοντας ότι ο ενδοθηλιακός TNFR2 είναι επίσης απαραίτητος για την προκαλούμενη από TNF-α αλληλεπίδραση λευκοκυττάρων-ενδοθηλιακών κυττάρων³⁵².

- Ο ρόλος της διατμητικής τάσης στις ενδοθηλιακές αποκρίσεις στον TNF-α

Ο TNF-α παίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της ενδοθηλιακής απόκρισης στη φλεγμονή και τον τραυματισμό προάγοντας τη μετανάστευση ανοσοκυττάρων στους νοσούντες ή τραυματισμένους ιστούς προκειμένου να προστατεύονται οι ιστοί από επιβλαβή παθογόνα, κατεστραμμένα κύτταρα ή ερεθιστικούς παράγοντες. Ωστόσο, η χρόνια παρουσία αυξημένων συστηματικών επιπέδων TNF-α στο πλαίσιο των καρδιαγγειακών ή φλεγμονωδών ασθενειών μπορεί να είναι επιβλαβής για το ενδοθήλιο σε μεσαίες και μεγάλες αρτηρίες, όπου σταθερή χαμηλού επιπέδου διέγερση της ενδοθηλιακής ενεργοποίησης και αγγειακής διαπερατότητας συμβάλλει στην αθηρογένεση. Υπάρχουν αρκετοί

μηχανισμοί προστασίας του ενδοθηλίου που αποτρέπουν την φλεγμονώδη απόκριση σε αρτηρίες που εκτίθενται στον TNF- α , με τις σημαντικότερες από αυτές να είναι οι δίοδοι σηματοδότησης που ενεργοποιούνται με διατμηματικής τάσης.

Η διατμηματική τάση ασκεί μια έντονη αντι-αποπτωτική επίδραση στα ενδοθηλιακά κύτταρα που υφίστανται αγωγή με TNF- α μέσω της αυξημένης ρύθμισης της σύνθεσης NO^{354,355} και της μεταγραφικής ενεργοποίησης της eNOS³⁵⁶. Αμέσως μετά την έναρξη της διατμητικής τάσης, η eNOS ενεργοποιείται με φωσφορυλίωση σερίνης 1177 μέσω του PI3K / Akt, το οποίο αυξάνει το σχηματισμό NO μέσα σε λίγα δευτερόλεπτα. Επιπλέον, η στρωματοειδής ροή διαμεσολαβεί την προαγωγική σηματοδότηση αναστέλλοντας την επαγόμενη από TNF- α δράση της κασπάσης-3 και του JNK *in vitro* και *ex vivo*³⁵⁷. Κατάντη του TNPK1, η στρωτή τάση διάτμησης μειώνει περαιτέρω την μεταγραφική ενεργοποίηση των c-Jun και NP- κ B *in vitro*³⁵⁸.

In vivo μελέτες έδειξαν ότι η έκφραση του ενδοθηλιακού VCAM-1 εξαρτάται από την ενεργοποίηση του NF- κ B σε απόκριση της διαταραγμένης διατμητικής τάσης³⁵⁹. Οι Hajra και συνεργάτες³⁶⁰ ανίχνευσαν υψηλά επίπεδα πρωτεϊνών NF- κ B σε ενδοθηλιακά κύτταρα σε θέσεις χαμηλής διάτμησης στο αορτικό τόξο και πρότειναν αυτές οι περιοχές μπορεί να προετοιμάζονται για ενισχυμένη ενεργοποίηση NF- κ B σε απόκριση προφλεγμονωδών αγωνιστών. Σε συμφωνία με αυτό, ανιχνεύθηκε σημαντικά ισχυρότερη έκφραση του VCAM-1 στην περιοχή της αορτής μυών (μικρότερη καμπυλότητα του αορτικού τόξου) σε σύγκριση με την περιοχή μεγαλύτερης καμπυλότητας με χαμηλή πιθανότητα αθηρωμάτωσης³⁶¹. Αυτό αντιστοιχεί στην παρατήρηση ότι το πρότυπο διατμητικής τάσης προσδιορίζει τον εντοπισμό των αθηρωματικών πλακών στις περιοχές των αρτηριακών τοιχωμάτων που τυπικά χαρακτηρίζονται από μη ομοιόμορφη ροή αίματος και χαμηλή τάση διατμήσεως, δηλαδή σε διακλαδώσεις και καμπυλώσεις.

1.2.10 Χημειοκίνες

Οι χημειοκίνες περιλαμβάνουν μια υπεροικογένεια μικρών, εκκρινόμενων πρωτεϊνών που παίζουν κεντρικό ρόλο σε πολλές ομοιοστατικές και παθολογικές διεργασίες στο ανθρώπινο σώμα. Μέχρι σήμερα έχουν εντοπιστεί περίπου 50 ανθρώπινες χημειοκίνες και 20 υποδοχείς χημειοκίνης συζευγμένοι με G-πρωτεΐνη. Οι περισσότερες χημειοκίνες έχουν επίσης τουλάχιστον τέσσερις κυστεΐνες σε εξαιρετικά διατηρημένες θέσεις και τρεις ξεχωριστές περιοχές: Μια εξαιρετικά εύκαμπτη N-τερματική περιοχή είναι αγκυρωμένη στο υπόλοιπο μόριο με δισουλφιδικούς δεσμούς που εμπλέκουν τις δύο κυστεΐνες της N-τερματικής περιοχής. Αυτό ακολουθείται από ένα εκτεταμένο βρόχο που οδηγεί σε τρία αντιπαράλληλα β -πτυχωτά φύλλα (ένα λεγόμενο κλειδί) που παρέχουν μια επίπεδη βάση επάνω από την οποία εκτείνεται η C-τελική α έλικα³⁶². Έτσι, αρχικά

χωρίζονταν σε δύο οικογένειες, τις α και β αλλά έχουν επανακατηγοριοποιηθεί βάσει της δομής τους και τους έχει δοθεί μια συστηματική ονοματολογία ³²⁸. Με βάση λοιπόν την γενετική τους οργάνωση και τη θέση δύο εξαιρετικά διατηρημένων καταλοίπων κυστεΐνης στο N-τελικό άκρο, οι χημειοκίνες μπορούν να χωριστούν σε τέσσερις υποομάδες, τις οικογένειες CC, CXC, C και CX3C ³⁶³.

Αν και αρχικές έρευνες ταυτοποίησαν αυτά τα μόρια ως ρυθμιστικά της διακίνησης των λευκοκυττάρων ³⁶⁴, η μετέπειτα έρευνα έδειξε τη συμμετοχή τους σε άλλες πτυχές της φλεγμονώδους διαδικασίας, όπως η ίνωση, η αναδιαμόρφωση των ιστών και η αγγειογένεση ³⁶⁵. Οι χημειοκίνες ελέγχουν τη μετανάστευση των ουδετεροφίλων, των λεμφοκυττάρων, των αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων, συμπεριλαμβανομένων των δενδριτικών κυττάρων και των μονοκυττάρων / μακροφάγων ³⁶⁶. Σε απόκριση σε μια φλεγμονώδη προσβολή, οι χημειοκίνες συντονίζουν την πρόσληψη, την ενεργοποίηση και την προσέλκυση λευκοκυττάρων κατά τη διάρκεια των διαφορετικών φάσεων τόσο των έμφυτων όσο και των προσαρμοστικών φλεγμονωδών αποκρίσεων ³⁶⁷. Κατά τη διάρκεια της φλεγμονής, τα κύτταρα-δείκτες στα φλεγμονώδη εστία απελευθερώνουν χημειοκίνες και παράγουν μια χημειοτακτική διαβάθμιση στα περιβάλλοντα αιμοφόρα αγγεία. Τα μεταναστευτικά κύτταρα τείνουν να κινούνται προς την υψηλή τοπική συγκέντρωση χημειοκινών ³⁶⁸. Η παρουσίαση των χημειοκινών στα ενδοθηλιακά κύτταρα προκαλεί κυλιόμενη και δια-ενδοθηλιακή μετανάστευση των λευκοκυττάρων. Οι διαφορές στη συγκέντρωση των χημειοκινών προκαλούν συσσώρευση ενδοκυτταρικών σηματοδοτικών μορίων στο πρόσθιο άκρο των μεταναστευτικών κυττάρων, ενώ οι ίδιοι οι υποδοχείς χημειοκινών παραμένουν ομοιόμορφα κατανομημένοι στην πλασματική μεμβράνη κατά τη διάρκεια της μετανάστευσης ³⁶⁹. Λειτουργικά, οι χημειοκίνες μπορούν να ομαδοποιηθούν σε δύο κύριες υποοικογένειες: τις φλεγμονώδεις και τις ομοιοστατικές χημειοκίνες. Οι φλεγμονώδεις κυτοκίνες ελέγχουν την πρόσληψη των λευκοκυττάρων στη φλεγμονή και την περιοχή τραυματισμού των ιστών, ενώ οι ομοιοστατικές χημειοκίνες εκπληρώνουν λειτουργίες «καθαριότητας» (housekeeping) όπως η καθοδήγηση των λευκοκυττάρων σε δευτερογενή λευκοκύτταρα σε δευτερογενή λεμφοειδή όργανα, τον μυελό των οστών και το θύμο αδένα κατά τη διάρκεια της αιμοποίησης ³⁷⁰.

Έτσι μια μεταβολή της έκφρασης ή της λειτουργίας της χημειοκινών θα μπορούσε να οδηγήσει στη επιμονή μιας φλεγμονώδους αντίδρασης πολύ πέρα από τον αρχικό της σκοπό, δημιουργώντας έτσι ένα βασικό παθογενετικό γεγονός για την καθιέρωση χρόνιας φλεγμονής ³⁷¹. Οι χημειοκίνες έχουν πολλαπλές δράσεις και λειτουργίες και έτσι διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο σε διάφορες αγγειακές, νεοπλαστικές και μολυσματικές παθήσεις καθώς και αλλεργικές διαταραχές, απορρίψεις μοσχεύματος και αυτοάνοσα νοσήματα ^{371, 372}.

1.2.10.1 Χημειοτακτική πρωτεΐνη 1 των μονοκυττάρων-MCP-1

Η MCP-1, ένα μονομερές πολυπεπτίδιο μοριακού βάρους 9000 έως 15.000 Da, είναι το πρωτότυπο της CC υποοικογένειας χημειοκίνης β και παρουσιάζει την πλέον ισχυρή χημειοτακτική δραστικότητα έναντι των μονοκυττάρων³⁷³. Εκτός από την προώθηση της μετανάστευσης των κυκλοφορούντων μονοκυττάρων στους ιστούς, η MCP-1 ασκεί διάφορες επιδράσεις στα μονοκύτταρα, συμπεριλαμβανομένης της επαγωγής ανιόντων υπεροξειδίου και της έκφρασης των διαφόρων προφλεγμονωδών γονιδίων. Η MCP-1 και η ομόλογή της στους μύες JE, η οποία αναγνωρίστηκε αρχικά ως γονίδιο επαγόμενο από τον αιμοπεταλικό αυξητικό παράγοντα³⁷⁴, παράγονται από διάφορους κυτταρικούς τύπους εντός του αρτηριακού τοιχώματος περιλαμβανομένων των ενδοθηλιακών κυττάρων, των λείων μυικών κυττάρων και των ινοβλαστών³⁷⁵. Αυξημένη MCP-1 έχει ανιχνευθεί σε αθηροσκληρωτικές αλλοιώσεις αλλά όχι σε φυσιολογικές αρτηρίες, γεγονός που υποδηλώνει τον πιθανό ρόλο της στην πρόσληψη μονοκυττάρων και την εξέλιξη της αθηρωμάτωσης³⁷⁶.

1.2.10.1.1 MCP-1 και αθηρωμάτωση

Η MCP-1 βρίσκεται στις αθηρωματικές πλάκες του ανθρώπου και των πειραματόζωων. Δεν ανευρέθη όμως στον έσω και μέσω χιτώνα των αρτηριών φυσιολογικών πειραματόζωων. Η έκφραση της MCP-1 από τα κύτταρα της αθηρωματικής πλάκας υποδηλώνει ότι η MCP-1 αποτελεί το αρχικό σήμα για τη διήθηση της πλάκας από μονοκύτταρα. Η MCP-1 παράγεται από πολλούς τύπους κυττάρων μέσω της ενεργοποίησης πυρηνικών παραγόντων αντιγραφής και του NF-ΚαρραB. Σε αυτά τα κύτταρα περιλαμβάνονται τα μονοκύτταρα, τα ενδοθηλιακά κύτταρα, οι ινοβλάστες, τα λεμφοκύτταρα και τα λεία μυϊκά κύτταρα. Ο TNFα, η ιντερλευκίνη-1β, η ιντερφερόνη και η ενδοτοξίνη αυξάνουν τα επίπεδα του mRNA της MCP-1 σε καλλιέργεια μονοκυττάρων και ινοβλαστών. Επίσης η αγγειοτασίνη II ενεργοποιεί τον πυρηνικό παράγοντα NF-ΚαρραB μέσω των υποδοχέων τύπου I και τύπου II της αγγειοτασίνης και επάγουν σε κυτταρικές καλλιέργειες την παραγωγή της χημειοτακτικής πρωτεΐνης MCP-1^{377,378}.

Οι χημειοκίνες της οικογένειας CC, MCP-1, MCP-4, MIP-1a, MIP-1b και RANTES είναι χημειοτακτικές πρωτεΐνες των μονοκυττάρων και εκφράζονται στην αθηρωματική πλάκα³⁷⁹. Το mRNA του υποδοχέα CCR2 εκφράζεται από τα μονοκύτταρα και μειώνεται κατά τη διάρκεια της διαφοροποίησης των μονοκυττάρων προς μακροφάγα. Η επώαση των μονοκυττάρων THP-1 του ανθρώπου με LDL αύξησε το mRNA του CCR2 με αποτέλεσμα την αύξηση της χημειοτακτικής αντίδρασης προς την MCP-1. Όταν όμως προστεθεί στα μονοκύτταρα οξειδωμένη LDL τότε

μειώνεται δραστικά η έκφραση των υποδοχέων CCR2 και αυτό πιθανώς οφείλεται στην ικανότητα της να διεγείρει τη διαφοροποίηση του μονοκυττάρου προς μακροφάγο ³⁸⁰. Αυτό υποδηλώνει ότι η σύνδεση της MCP-1 με τον υποδοχέα CCR2 συνεπάγεται κυρίως την είσοδο των μονοκυττάρων στον έσω χιτώνα και τη μεταμόρφωσή τους σε μακροφάγα. Μετά τη μεταμόρφωση του μονοκυττάρου σε μακροφάγο λειτουργούν πιθανώς άλλες χημειοκίνες και ο ρόλος της σύνδεσης MCP-1 και του υποδοχέα CCR2 είναι μικρός στις διεργασίες των μονοκυττάρων στην αθηροσκλήρυνση. Συνηγορητικό αυτής της υπόθεσης είναι ότι κατά τη διάρκεια της μεταμόρφωσης του μονοκυττάρου σε μακροφάγο αυξάνει η έκφραση των υποδοχέων CCR5 και οι συνδέσεις αυτού του υποδοχέα μεταφέρουν πληροφορίες προς τα κύτταρα της φλεγμονώδους περιοχής ³⁸¹. Είναι ενδιαφέρον ότι η MIP-1α και MIP-1β συνυπάρχουν στην αθηρωματική βλάβη και εκφράζονται από τα T-λεμφοκύτταρα σε περιοχές της αθηρωματικής πλάκας με άφθονα μακροφάγα/αφρώδη κύτταρα, υποδηλώνοντας αλληλοσυνεννόηση μεταξύ T-κυττάρων και των μακροφάγων μέσω πληροφοριών υποδοχέων χημειοκίνης με αποτέλεσμα την μετακίνηση των μακροφάγων προς την περιοχή της φλεγμονής. Τα μακροφάγα είναι η κυριότερη πηγή παραγωγής των χημειοκινών και ανευρίσκονται σε όλα στα στάδια της εξέλιξης της αθηροσκλήρυνσης. Η παραγωγή των χημειοκινών από τα μακροφάγα πυροδοτείται από μεγάλο αριθμό μεσολαβητών που βρίσκονται μέσα στην αθηρωματική πλάκα οι πιο σημαντικοί είναι οι φλεγμονώδεις κυττοκίνες, οι οποίες παράγονται από διεγερμένα T-κύτταρα, μακροφάγα και τροποποιημένα μόρια LDL χοληστερόλης. Επίσης τα μακροφάγα στην αθηρωματική περιοχή παράγουν κυτοκίνες, χημειοκίνες και αυξητικούς παράγοντες και μετατρέπονται σε αφρώδη κύτταρα. Επιπλέον υπάρχουν ενδείξεις ότι τα μονοκύτταρα δρουν ως αντιγόνο προς τα T-κύτταρα κατά τη διάρκεια της ανοσολογικής αντίδρασης που συμβαίνει στην περιοχή ³⁸². Σε ασθενείς με στηθάγχη ή παράγοντες κινδύνου για αθηρωμάτωση ανευρίσκονται αυξημένα επίπεδα MCP-1. Αυτό πιθανώς υποδηλώνει ότι η χημειοτακτική πρωτεΐνη MCP-1 παρεμβαίνει στους μηχανισμούς της αθηρογένεσης ³⁸³.

Οι πληροφορίες που αναφέρθηκαν πιο πάνω αναφέρονται κυρίως για τις φλεγμονώδεις διεργασίες που γίνονται κατά τη διάρκεια της εξέλιξης της αθηρωμάτωσης. Οι πληροφορίες είναι πολύ περιορισμένες για τις αντίστοιχες λειτουργίες των χημειοκινών και των άλλων κυττοκινών που λαμβάνουν χώρα κατά την εξέλιξη της στένωσης της αορτικής βαλβίδας.

1.2.11 Στατίνες και αθηρωμάτωση

Έχοντας αναγνωρίσει την παρουσία της οξειδωμένης LDL στον αρτηριακό αυλό ως τη γενεσιουργό αιτία της φλεγμονής που προκαλεί την αθηρωματική αλλοίωση, αλλά και τη συσσώρευση χοληστερόλης ως έναν από τους κυριότερους παράγοντες αύξησης της αθηρωματικής πλάκας, η

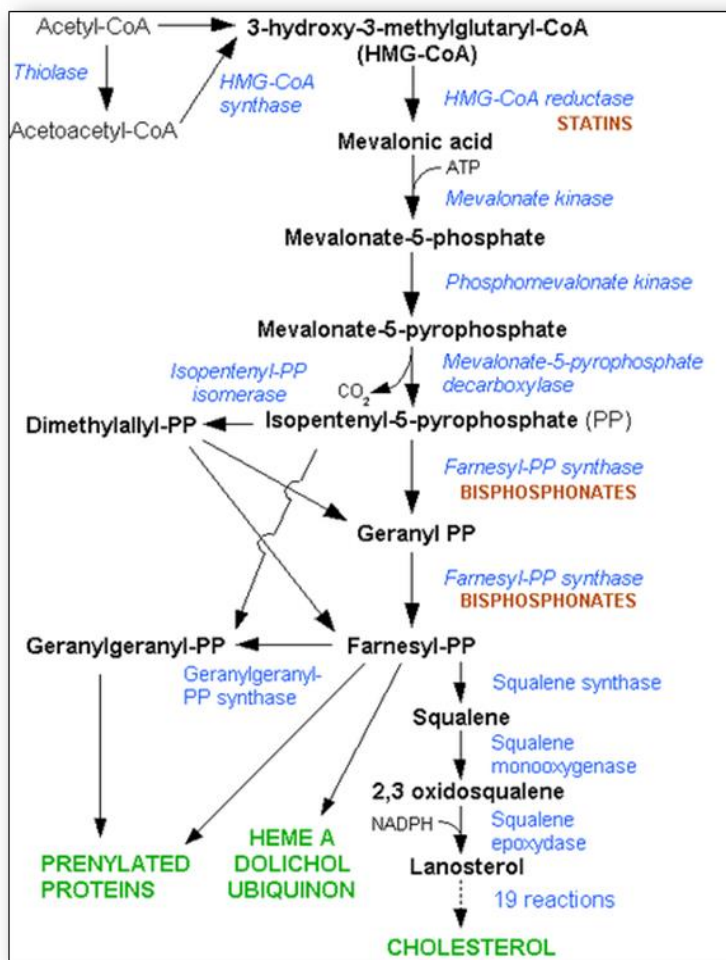
θεραπευτική στόχευση προς τη μεταβολή της συγκέντρωσης LDL στο πλάσμα αποτελεί μια πολλά υποσχόμενη προσέγγιση. Πράγματι, οι θεραπευτικές παρεμβάσεις που μειώνουν τα επίπεδα χοληστερόλης στο αίμα, είτε με τη μεταβολή της διαίτας ή με χορήγηση φαρμάκων, μπορούν να συμβάλλουν και ως προς την πρόληψη της νόσου, αλλά και ως προς την επιβράδυνση της εξέλιξής της³⁸⁴. Οι στατίνες είναι μια οικογένεια φαρμάκων που επιτυγχάνουν τη μείωση των λιπιδίων στο αίμα, αναστέλλοντας τη λειτουργία της ρεδουκτάσης του 3-υδροξυ-3μεθυλο-γλουταρικού συνενζύμου A (HMG-CoA reductase), ενζύμου που ελέγχει το ρυθμό του μεταβολισμού του μεβαλονικού οξέος, του μεταβολικού μονοπατιού που παράγει τη χοληστερόλη και άλλα ισοπρενοειδή στο ήπαρ. Όντας πράγματι αποδοτικές ως προς τη μείωση των επιπέδων LDL, οι στατίνες χρησιμοποιούνται για την πρόληψη των καρδιαγγειακών νοσημάτων. Οι μελέτες δείχνουν ότι είναι αποδοτικότερες στη θεραπεία της καρδιαγγειακής νόσου (δευτερογενής πρόληψη)³⁸⁴⁻³⁸⁷, ενώ το όφελος σε ασθενείς με υψηλά επίπεδα χοληστερόλης αλλά χωρίς καρδιαγγειακή νόσο αποτελεί ακόμα πεδίο συζήτησης³⁸⁸.

1.2.11.1 Μηχανισμός δράσης των στατινών

Οι στατίνες δρουν αναστέλλοντας ανταγωνιστικά τη ρεδουκτάση του HMG-CoA, του πρώτου ενζύμου στη σειρά μεταβολισμού του μεβαλονικού οξέος. Η ανταγωνιστική τους δράση έγκειται στην ομοιότητα που εμφανίζουν σε μοριακό επίπεδο με το υπόστρωμα του ενζύμου. Παίρνοντας τη θέση του HMG-CoA στο ενεργό κέντρο του ενζύμου, μειώνουν την παραγωγή του μεβαλονικού οξέος, του επόμενου σε σειρά μορίου στην αλυσίδα αντιδράσεων που έχει τη χοληστερόλη, μαζί με άλλα μόρια, ως τελικό παράγωγο (**Εικ. 8**). Η σύνθεση της χοληστερόλης λαμβάνει χώρα κυρίως το βράδυ, οπότε η λήψη στατινών με μικρή περίοδο ημιζωής συνήθως γίνεται τη νύχτα, για μεγιστοποίηση των αποτελεσμάτων τους. Για άλλες στατίνες όπως η ατορβαστατίνη, που έχουν μεγαλύτερη περίοδο δράσης, ο χρόνος λήψης μέσα στην ημέρα δε φαίνεται να διαφοροποιεί τα αποτελέσματα³⁸⁹⁻³⁹¹.

Η ελάττωση της ενδογενούς παραγωγής χοληστερόλης στο ήπαρ είναι σημαντικός παράγοντας για την τελική ελάττωσή της στην κυκλοφορία, αφού το μεγαλύτερο μέρος της χοληστερόλης στο αίμα προκύπτει από ενδογενή παραγωγή και όχι από απευθείας πρόσληψή της³⁹². Παρόλα αυτά, δεν είναι ο μόνος μηχανισμός μέσω του οποίου το αποτέλεσμα αυτό επιτυγχάνεται. Η μείωση της χοληστερόλης στο αίμα πραγματοποιείται επίσης μέσω της αύξησης της πρόσληψής της από το ήπαρ. Τα μειωμένα επίπεδα χοληστερόλης στο ήπαρ αποτελούν ερέθισμα για τα ηπατοκύτταρα ώστε αυτά να απορροφήσουν χοληστερόλη από την κυκλοφορία. Αυτό επιτυγχάνεται μέσω πρωτεασών που αποκόπτουν τον μεταγραφικό παράγοντα SREBP (Sterol regulatory element-binding protein)

από τον πυρηνικό φάκελο και το ΕΔ, ελευθερώνοντάς τον να μεταναστεύσει στον πυρήνα και να προκαλέσει παραγωγή υποδοχέων LDL. Οι υποδοχείς αυτοί μετατοπίζονται στην πλασματική μεμβράνη και προσκολλούνται στα LDL και VLDL σωματίδια, ώστε τα τελευταία να προσροφηθούν από την κυκλοφορία στο ήπαρ όπου και μετατρέπονται σε άλατα της χολής.



Εικόνα 8: Το μεταβολικό μονοπάτι της ρεδουκτάσης του HMG-CoA προς τελική παραγωγή χοληστερόλης και τα φάρμακα που αναστέλλουν τα διάφορα βήματα (σε κόκκινο).

1.2.11.2 Είδη στατινών και σχετική αποδοτικότητα

Οι στατίνες χωρίζονται σε δύο κατηγορίες, σε αυτές που αποτελούν προϊόντα ζύμωσης και στις συνθετικές. Τα διάφορα είδη στατινών και οι συντακτικοί τους τύποι φαίνονται στον Πίνακα 1.3.

Οι διάφορες στατίνες διαφέρουν ως προς την αποδοτικότητά τους στη μείωση της LDL. Η πιο αποδοτική, η σεριβαστατίνη, που αποσύρθηκε το 2001 λόγω σοβαρού ρίσκου ραβδομύλωσης, ακολουθείται με σειρά αποδοτικότητας από τις ροσουβαστατίνη, ατορβαστατίνη, σιμβαστατίνη,

λοβαστατίνη, πραβαστατίνη και φλουβαστατίνη³⁹³. Παρά τη διαφοροποίηση αυτή των στατινών στην ικανότητα μείωσης των λιπιδίων, οι περισσότερες στατίνες φαίνεται να μη διαφέρουν σε αποδοτικότητα όσον αφορά την καρδιαγγειακή νοσηρότητα και θνητότητα^{394, 395}.

Πίνακας 1.3: Τα διαφορετικά είδη στατινών και η προέλευσή τους.		
Αγγλική ονομασία	Ελληνική Ονομασία	Προέλευση
Atorvastatin	Ατορβαστατίνη	Συνθετική
Cerivastatin	Σεριβαστατίνη	Συνθετική
Fluvastatin	Φλουβαστατίνη	Συνθετική
Lovastatin	Λοβαστατίνη	Φυσικό προϊόν (συναντάται στους μύκητες <i>Pleurotus ostreatus</i> και <i>Monascus purpureus</i>)
Mevastatin	Μεβαστατίνη	Φυσικό προϊόν του <i>Monascus purpureus</i>
Pitavastatin	Πιταβαστατίνη	Συνθετική
Pravastatin	Πραβαστατίνη	Προϊόν ζύμωσης του βακτηρίου <i>Nocardia autotrophica</i>)
Rosuvastatin	Ροσουβαστατίνη	Συνθετική
Simvastatin	Σιμβαστανίνη	Προϊόν ζύμωσης του <i>Aspergillus terreus</i>

1.2.11.3 Ιατρικές χρήσεις και αποτελέσματα

Η μείωση των λιπιδίων του αίματος αποτελεί τη θεμέλια λίθο της πρωτογενούς (σε ασθενείς με υψηλή χοληστερόλη αλλά χωρίς άλλα προβλήματα υγείας) και της δευτερογενούς (σε ασθενείς με προϋπάρχουσα καρδιαγγειακή νόσο) αντιμετώπισης των καρδιαγγειακών νοσημάτων. Γενικά, οι οδηγίες για την κλινική πράξη συνιστούν μείωση των καρδιαγγειακών παραγόντων κινδύνου με αλλαγές στον τρόπο ζωής, όπως μεταβολή της διαίτας και άσκηση, πριν γίνει χρήση φαρμάκων. Οι στατίνες συνιστώνται για τους ασθενείς που δεν επιτυγχάνουν τους στόχους της μείωσης με αυτές τις προσεγγίσεις³⁹⁶. Η αποδοτικότητα των στατινών για την πρωτογενή πρόληψη αποτελεί σημείο επιστημονικής μελέτης και συζήτησης. Ενώ ορισμένες μελέτες δεν συμπεραίνουν όφελος σε ασθενείς που ανήκουν σε ομάδες υψηλού κινδύνου αλλά χωρίς καρδιαγγειακή νόσο³⁹⁷, άλλες μελέτες βρίσκουν στοιχεία βελτίωσης στη νοσηρότητα και τη θνητότητα^{394, 398}, αλλά έχουν διατυπωθεί προβληματισμοί για την εγκυρότητα των αποτελεσμάτων αυτών³⁸⁸. Όσον αφορά στην ποιότητα ζωής, οι ενδείξεις βελτίωσης που μπορεί να προκύπτει από τη χρήση στατινών είναι περιορισμένες.

Οι στατίνες είναι αποδοτικές στη μείωση της θνητότητας σε ασθενείς με προϋπάρχουσα καρδιαγγειακή νόσο. Κατά μέσο όρο, οι στατίνες μπορούν να μειώσουν την LDL χοληστερόλη κατά

1,8 mmol/l (70 mg/dl), που μεταφράζεται σε μια μείωση της τάξεως του 60 % στον αριθμό συμβαμάτων και 17 % μειωμένο ρίσκο ανακοπής μετά από μακροχρόνια θεραπεία³⁸⁴.

1.2.11.4 Οι πλειοτροπικές αθηροπροστατευτικές δράσεις των στατινών

Οι στατίνες εμφανίζουν επίσης επιπλέον αντι-αθηρωματική δράση, πέραν της επίδρασής τους στη μείωση των επιπέδων της χοληστερόλης. Χαρακτηριστικά, η “ASTEROID trial” έδειξε υπερηχογραφικά στοιχεία υποστροφής της αθηρωματικής πλάκας κατά τη διάρκεια θεραπείας με στατίνες³⁹⁹. Πεδίο ερευνητικής δραστηριότητας αποτελεί επίσης η υπόθεση ότι οι στατίνες μπορούν να ωφελήσουν ασθενείς που δεν έχουν υψηλά επίπεδα χοληστερόλης. Στη μελέτη “JUPITER”, το 2008, παρότι οι θάνατοι από καρδιαγγειακά αίτια δεν περιορίστηκαν, ακόμη και ασθενείς χωρίς ιστορικό υψηλών επιπέδων χοληστερόλης, αλλά μόνο με αυξημένη C αντιδρώσα πρωτεΐνη, εμφάνισαν λιγότερα συμβάματα ανακοπής, καρδιακής προσβολής, και χειρουργείων⁴⁰⁰. Οι στατίνες θεωρείται ότι μπορεί να εμφανίζουν πλειοτροπικές δράσεις όπως η βελτίωση της λειτουργίας του ενδοθηλίου, η τροποποίηση των φλεγμονωδών αντιδράσεων, η πρόληψη σχηματισμού θρόμβων και η σταθεροποίηση της αθηρωματικής πλάκας, όλες υποθέσεις που αποτελούν πεδίο της σύγχρονης ερευνητικής δραστηριότητας⁴⁰¹.

Ένα πλήθος κλινικών και πειραματικών ερευνών έχουν μελετήσει την επίδραση των στατινών στο μέγεθος της αθηρωματικής βλάβης, καταλήγοντας όμως σε αντικρουόμενα αποτελέσματα, αν και η μεγάλη πλειοψηφία τους αναφέρει μείωση μεγέθους⁴⁰²⁻⁴⁰⁴. Η ανακολουθία στα αποτελέσματα των ερευνών αυτών μπορεί ενδεχομένως να αποδοθεί στις διαφορετικές επιδράσεις των ειδών στατίνης που χρησιμοποιήθηκαν στις μελέτες, με τη σιμβαστατίνη να είναι η μοναδική για την οποία αναφέρεται αύξηση του μεγέθους της αθηρωματικής πλάκας⁴⁰³, ενώ όσες μελέτες αφορούν στη ροσουβαστατίνη ή την ατορβαστατίνη συμφωνούν σε μείωση των αθηρωματικών αλλοιώσεων, και μάλιστα ανεξάρτητη της μείωσης των λιπιδίων⁴⁰².

Αναφέρεται επίσης ότι οι στατίνες παρέχουν σταθεροποιητική δράση στις αθηρωματικές πλάκες, μεταβάλλοντας τη σύστασή τους σε πρωτεΐνες του εξωκυττάριου συνδετικού ιστού. Η επίδραση των στατινών στην περιεκτικότητα των πλακών σε κολλαγόνο έχει πρόσφατα ξεκινήσει να μελετάται, με θετικά αποτελέσματα^{95, 405-407}. Έχει διατυπωθεί μάλιστα η υπόθεση της ρύθμισης αυτής μέσω αδρανοποίησης του υποδοχέα τελικών προϊόντων γλυκόλυσης (RAGE) και επακόλουθης υπερέκφρασης προκολλαγόνου^{402, 408}, αν και η παρατήρηση ότι η σιμβαστατίνη και η λοβαστατίνη αναστέλλουν την έκφραση κολλαγόνου σε νευρικά κύτταρα του ήπατος έρχεται να περιπλέξει την υπόθεση⁴⁰⁹. Επίδραση όμως των στατινών αναφέρεται επίσης και σε σχέση με την ελαστίνη, που είναι σημαντική πρωτεΐνη στον εξωκυττάριο συνδετικό ιστό. Συγκεκριμένα, έχει βρεθεί ότι η

συμβαστατίνη συμβάλλει στη διατήρηση των ελαστικών ινών στη μέση στοιβάδα ⁴¹⁰, ενώ δύο εργασίες σε κόνικλους αναφέρουν για την ατορβαστατίνη ότι προκαλεί την αυξημένη σύνθεση ελαστίνης ⁴⁰⁶, και ότι μετά από χορήγησή της παρατηρούνται παχύτερα ελαστικά στρώματα ⁴¹¹.

Οι παραπάνω παρεμβάσεις πιθανότατα οφείλονται στην αναδυόμενη αντιφλεγμονώδη δράση των στατινών, που ως αποτέλεσμα έχει την μείωση της πρωτεολυτικής δραστηριότητας εντός των αθηρωματικών πλακών. Κύριοι φορείς της πρωτεολυτικής αυτής δραστηριότητας είναι τα ένζυμα που ονομάζονται μεταλλοπρωτεάσες και οι ιστικοί αναστολείς τους. Πράγματι, τα τελευταία χρόνια συσσωρεύονται αναφορές από ερευνητικές ομάδες που βρίσκουν θετική επίδραση των στατινών είτε μέσω μείωσης της δραστηριότητας των μεταλλοπρωτεασών ^{412, 413}, είτε μέσω αύξησης των αναστολέων τους ⁴¹⁴.

1.2.12 Οι ApoE^{-/-} μύες ως ζωικό πρότυπο μελέτης της αθηρωμάτωσης

Τα ζωικά μοντέλα που χρησιμοποιούνται για τη διερεύνηση της αθηρωμάτωσης συμπεριλαμβάνουν τα κουνέλια, τους χοίρους και τα μη ανθρώπινα πρωτεύοντα, τα οποία έχουν πλεονεκτήματα και μειονεκτήματά ⁴¹⁵. Το είδος που χρησιμοποιείται ευρέως είναι ο μυς (Mus musculus) ο οποίος είναι ένα παμφάγο μικρό θηλαστικό ζώο της τάξης των τρωκτικών. Αποτελεί δε το πιο γνωστό και το πιο διαδεδομένο τρωκτικό στον κόσμο. Είναι δραστήριο κατά το λυκόφως και τη νύχτα.

1.2.12.1 Χαρακτηριστικά ζωικού προτύπου

Οι μύες ως πειραματικό ζωικό πρότυπο συγκεντρώνουν μια σειρά από πλεονεκτήματα, όπως είναι το μικρό μέγεθος (25-35gr σωματικού βάρους), που τους καθιστά εύκολους στο χειρισμό, και σε συνδυασμό με τη μικρή διάρκεια γενιάς (φθάνουν σε αναπαραγωγική ηλικία μέσα σε δύο μήνες κι έχουν προσδόκιμο ζωής 2 έτη) και το μεγάλο αριθμό απογόνων (4-6 ανά αναπαραγωγικό κύκλο) διευκολύνει τη γρήγορη δημιουργία μεγάλης αποικίας όμοιων ζώων. Συγκεκριμένα, κάθε αναπαραγωγικός κύκλος απαιτεί συνολικά 6 εβδομάδες, δηλαδή 3 εβδομάδες γαλουχίας και 3 εβδομάδες κύησης. Το μικρό τους μέγεθος επίσης εξασφαλίζει μειωμένο κόστος συντήρησης τόσο όσον αφορά στη μονάδα πειραματόζωων (μικρή απαίτηση σε χώρο) όσο και στη διατροφή τους. Η μικρή διάρκεια ζωής είναι επίσης ένα πλεονέκτημα, καθώς επιταχύνει τον πειραματικό προγραμματισμό, ιδιαίτερα όταν αυτός απαιτεί τα πειραματόζωα να είναι ενήλικα. Στην περίπτωση της αθηρωμάτωσης, αυτή μπορεί να επαχθεί και να είναι εξελιγμένη στους τέσσερις μήνες ζωής. Ως θηλαστικό, ο μυς έχει μεγάλο βαθμό ομολογίας με τον άνθρωπο και επίσης είναι εξαιρετικά ανθεκτικό με υψηλή βιωσιμότητα μετά από χειρουργικές παρεμβάσεις.

Οι μύες παρουσιάζουν όμως και ορισμένα μειονεκτήματα, που αφορούν κυρίως σε τρεις παράγοντες. Το μικρό μέγεθος του ζώου, αν και διευκολύνει κι εξυπηρετεί μια σειρά από άλλους παράγοντες, δημιουργεί δυσκολία στη διεξαγωγή λεπτών χειρουργικών χειρισμών, αλλά και στην in vivo απεικόνιση, ενώ τα βιολογικά δείγματα που λαμβάνονται είναι πολλές φορές μικρά σε όγκο και επαρκούν για περιορισμένο αριθμό εξετάσεων. Η μικρή διάρκεια ζωής καθιστά δύσκολη την αναγωγή των φαρμακευτικών παρεμβάσεων σε κλινική αντιστοίχιση, καθώς στο χρονικό πλαίσιο διεξαγωγής μιας μέσου μήκους μελέτης το πειραματόζωο θα έχει διανύσει μεγάλο τμήμα της ζωής του, πράγμα που αφενός δεν ανταποκρίνεται στα ανθρώπινα δεδομένα κι αφετέρου κάνει το στενό χρονικά σχεδιασμό του πειράματος επιτακτικό. Τέλος, ο μύς έχει σημαντικές διαφορές από τον ανθρώπινο οργανισμό, που θα πρέπει να λαμβάνονται υπ' όψιν στην εξαγωγή συμπερασμάτων σχετικά με την ερμηνεία νοσημάτων και φαινομένων.

Παρόλα αυτά, με την ανάπτυξη νεότερων τεχνικών και συσκευών, πολλά προβλήματα που προκύπτουν από το μέγεθος των πειραματόζωων φαίνεται πως προοδευτικά υπερνικούνται. Πλέον είναι εφικτή η απεικόνιση αθηρωματικών αλλοιώσεων της κοιλιακής αορτής σε ζώντα πειραματόζωα, ο καρδιακός καθετηριασμός για τη μελέτη αιμοδυναμικών παραμέτρων του καρδιαγγειακού συστήματος, η χειρουργική περίσφιξη των στεφανιαίων αρτηριών και η πρόκληση μυοκαρδιακής ισχαιμίας σε μύες ⁴¹⁶. Πολλοί υποστηρίζουν ότι οι μύες δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε μελέτες της ομοιοστασίας των λιπιδίων, διότι το λιπιδαιμικό τους προφίλ διαφέρει σημαντικά από του ανθρώπου. Για παράδειγμα, το 75% της χοληστερόλης του ανθρώπινου πλάσματος βρίσκεται με τη μορφή της LDL, ενώ αντίστοιχα στους μύες τα μόρια χοληστερόλης μεταφέρονται κυρίως μέσω HDL, η οποία ως γνωστό είναι προστατευτική έναντι της αθηροσκλήρωσης. Επομένως, μύες οι οποίοι τρέφονται με κανονική τροφή, χαμηλής περιεκτικότητας σε λιπαρά, δεν αναπτύσσουν αθηρωμάτωση, πράγμα το οποίο μπορεί να συμβαίνει στον άνθρωπο ήδη από μικρή ηλικία.

Το μείζον πλεονέκτημα της χρήσης ζώων σε πειραματικές εργασίες είναι οι απόλυτα ελεγχόμενες συνθήκες περιβάλλοντος (π.χ. διαίτα, θερμοκρασία, ημερήσιος κύκλος), αλλά επίσης το κοινό γενετικό background των πειραματικών ομάδων και η δυνατότητα ταυτόχρονης θεραπευτικής παρέμβασης σε όλα τα άτομα της μελέτης, στοιχεία που περιορίζουν την επίδραση εξωγενών παραγόντων, πράγμα αδύνατο σε κλινικές μελέτες. Επίσης, σε ανθρώπινο πληθυσμό είναι αδύνατη η στοχευμένη μελέτη γενετικών αλλαγών και η επακόλουθη επίπτωσή τους σε συγκεκριμένες παθογόνες διαταραχές, παρά μόνο με πληθυσμιακές μελέτες. Με τη χρήση όμως πειραματόζωων και τη βοήθεια της γενετικής μηχανικής, τέτοιου είδους μελέτες είναι εφικτές παρέχοντας σημαντικές πληροφορίες. Στο γεγονός αυτό συμβάλλει και η πληθώρα διαφορετικών ειδών, τα οποία

προέρχονται από διασταυρώσεις γενετικά τροποποιημένων πειραματόζων σε διάφορους συνδυασμούς.

Ειδικότερα, στη μελέτη της αθηρωμάτωσης, τα ζωικά πρότυπα αποκτούν όλο και ευρύτερη εφαρμογή χάρη στην ευκολία δημιουργίας αθηρωμάτωσης και στην ικανοποιητική προσομοίωση με την ανθρώπινη παθολογία. Το 2002, το Mouse Genome Sequencing Consortium δημοσίευσε ένα πόνημα σχετικά με την αποτελεσματικότητα και σταθερότητα της γονιδιακής σειράς C57BL/6J στην ανάπτυξη μεταβολικών διαταραχών σε μύες⁴¹⁷. Με το γενετικό αυτό υπόστρωμα ως βάση, και με μεθόδους μοριακής γενετικής δόθηκε η δυνατότητα προσθήκης εξωγενών γονιδίων στους μύες. Έτσι, στους μύες αυτούς αναπτύχθηκαν και εφαρμόστηκαν τεχνικές αφαίρεσης (knockout) ή αντικατάστασης (replacement) ενδογενών γονιδίων. Η ανάπτυξη τέτοιων τεχνικών ώθησε στη χρήση τους σε πειράματα για τη στοχευμένη μελέτη της έκφρασης και παραγωγής μακρομορίων σε συγκεκριμένες καταστάσεις.

1.2.12.2 Οι μύες με ομόζυγη έλλειψη απολιποπρωτεΐνης E

Από την εισαγωγή του στις αρχές της δεκαετίας του 1990, ο μυς με ελλειμματική απολιποπρωτεΐνη E είναι το πιο ευρέως μελετημένο ζωικό μοντέλο για την αθηρωμάτωση^{418,419}. Η απολιποπρωτεΐνη E (ApoE) είναι μια γλυκοπρωτεΐνη μοριακού βάρους 34 kDa. Συντίθεται κυρίως στο ήπαρ και τον εγκέφαλο, ενώ η ίδια αποτελεί συστατικό όλων των λιποπρωτεϊνών, με εξαίρεση τη χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνη (LDL). Στον ανθρώπινο πληθυσμό η ApoE είναι πολυμορφική, με τρεις κύριες ισομορφές (ApoE 2, ApoE-3 και ApoE-4), από τις οποίες η ApoE-3 είναι η συνηθέστερη. Η διαφορά μεταξύ ApoE-2 και ApoE-3 εντοπίζεται στη θέση 158, όπου η πρώτη έχει κυστεΐνη αντί αργινίνης. Η αντικατάσταση αυτή των αμινοξέων στην περιοχή σύνδεσης με τον υποδοχέα της LDL προκαλεί πολύ μεγάλη διαφορά στη δραστηριότητα των δύο μορίων. Συγκεκριμένα, η ApoE-2 έχει πάνω από 50 φορές μικρότερη αποδοτικότητα από την ApoE-3. Έτσι, η ομόζυγη ApoE-2 συσχετίζεται με τύπου III υπερλιποπρωτεϊναιμία, η οποία χαρακτηρίζεται από υψηλά επίπεδα τριγλυκεριδίων και χοληστερόλης, κίτρινους ξανθωματικούς σχηματισμούς στο δέρμα και πρόωμη έναρξη αθηρωμάτωσης⁴²⁰.

Η κύρια λειτουργία της ApoE είναι η σύνδεση, με ισχυρή συγγένεια, με τους υποδοχείς της απολιποπρωτεΐνης B, της LDL και των χυλομικρών του ήπατος. Με αυτό τον τρόπο διαμεσολαβεί στην πρόσληψη από το ήπαρ ορισμένων λιποπρωτεϊνών⁴¹⁸. Επίσης, είναι παρούσα σε λιποπρωτεΐνες του πλάσματος που μεταφέρουν τη χοληστερόλη από τις τροφές και το ήπαρ και επομένως λειτουργεί ως διαμεσολαβητής με τους αντίστοιχους υποδοχείς, οι οποίοι απομακρύνουν από την κυκλοφορία τα υπολείμματα χυλομικρών και τις πολύ χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνες (VLDL).

Παρά το γεγονός ότι οι ηπατικοί υποδοχείς της LDL μπορούν να συνδεθούν με λιποπρωτεΐνες που περιέχουν τόσο LDL όσο και ApoE λιποπρωτεΐνες, η κάθαρση των λιπιδικών υπολειμμάτων από τους υποδοχείς της LDL εξαρτάται μόνο από την ApoE ⁴²¹. Παράλληλα, η ApoE συντίθεται από μονοκύτταρα και μακροφάγα των αγγείων και πιστεύεται πως ασκεί αρνητική δράση τοπικά στην ομοιοστασία της χοληστερόλης και στη φλεγμονώδη διαδικασία των αθηροσκληρωτικών αγγείων ⁴²². Τέλος, είναι γνωστό ότι η εν λόγω γλυκοπρωτεΐνη συμμετέχει στη χολική έκκριση της χοληστερόλης ⁴²³. Συνολικά, η ApoE συμμετέχει στην κάθαρση των λιποπρωτεϊνών, που προέρχονται από τον αγγειακό ιστό, στο ήπαρ και επομένως διαδραματίζει προστατευτικό ρόλο έναντι της αθηροσκλήρωσης ⁴²⁴. Κατά συνέπεια, η ομόζυγη εξάλειψη του apoE γονιδίου σε μύες έχει ως αποτέλεσμα μία έντονη αύξηση των επιπέδων των LDL και VLDL πλάσματος που αποδίδονται στην αποτυχία της LDLr και LRP μεσολαβούμενης κάθαρσης αυτών των λιποπρωτεϊνών.

Το ζωικό πρότυπο μυών με ομόζυγη έλλειψη της ApoE (ApoE^{-/-}) δημιουργήθηκε με σκοπό να μελετηθεί η επίδραση της ApoE στην αθηρωμάτωση. Μια πρόσφατη ανασκόπηση αναφέρει ότι υπάρχουν περισσότερα από 645 δημοσιευμένα ερευνητικά άρθρα σχετικά με την αθηρωμάτωση όπου χρησιμοποιείται αυτό το μοντέλο ⁴²⁵. Η εξαιρετική επιτυχία αυτού του ζωικού μοντέλου οφείλεται στην εύκολη διαθεσιμότητά του, στη σχετικά εύκολη αναπαραγωγή και συντήρηση των αποικιών, στα αυθόρμητα αυξημένα επίπεδα χοληστερόλης σε τυπική διαίτα και στην ταχεία ανάπτυξη αθηροσκληρωτικών αλλοιώσεων με ιστοπαθολογική εξέλιξη, παρόμοια με αυτή που παρατηρείται στους ανθρώπους ⁴²⁶. Αναπτύχθηκε ταυτόχρονα σε δύο διαφορετικά εργαστήρια το 1992, έπειτα από επισήμανση και αδρανοποίηση του υπεύθυνου γονιδίου για την ApoE, εισαγωγή του αδρανοποιημένου γονιδίου μέσω ομόλογου ανασυνδυασμού στο γένωμα και διασταυρώσεις ετερόζυγων ζώων προκειμένου να παραχθούν ομόζυγα ⁴²⁷. Η παραπάνω γενετική τροποποίηση δεν είχε δυσμενή επίπτωση στη γονιμότητα και στην υγεία των μυών. Επιπλέον, οι ερευνητές απέδειξαν ότι η έλλειψη της ApoE ήταν συμβατή με φυσιολογική ανάπτυξη, και επομένως θα μπορούσαν οι συγκεκριμένοι μύες να χρησιμοποιηθούν σε μελέτες των φαινοτυπικών επιπτώσεων της έλλειψης ApoE.

Οι ApoE^{+/-} και οι ApoE^{-/-} μύες δε διαφέρουν ως προς το σωματικό τους βάρος από τους φυσιολογικούς C57BL/6J μύες, ούτε έχουν διακριτές εξωτερικές διαφορές. Υπάρχουν όμως σημαντικές διαφορές στα επίπεδα των λιπιδίων και το λιπιδαιμικό τους προφίλ. Οι ApoE^{-/-} μύες έχουν μέχρι και 500% αυξημένα επίπεδα ολικής χοληστερόλης σε σχέση με τους φυσιολογικούς. Τα επίπεδα αυτά δεν επηρεάζονται από την ηλικία ή το φύλο των πειραματόζωων. Αντίθετα, οι τιμές της HDL στα γενετικώς τροποποιημένα ζώα αντιστοιχούν στο 45% των φυσιολογικών τιμών, ενώ τα τριγλυκερίδια είναι συνήθως κατά 68% αυξημένα σε σχέση με τους φυσιολογικούς μύες. Παρατηρείται λοιπόν σημαντική μετατόπιση των λιποπρωτεϊνών του πλάσματος από την HDL, που

αποτελεί την κύρια λιποπρωτεΐνη μεταφοράς σε φυσιολογικούς μύες, σε χαμηλής περιεκτικότητας υπολείμματα χυλομικρών και VLDL. Όπως προαναφέρθηκε, στους μύες υπάρχουν υψηλά επίπεδα HDL και χαμηλά επίπεδα LDL, ενώ το αντίστροφο συμβαίνει στον άνθρωπο. Επιπλέον, οι μύες στερούνται της πρωτεΐνης μεταφοράς του χοληστερολικού εστέρα, ενός ενζύμου το οποίο μεταφέρει τον χοληστερολικό εστέρα από την HDL στη VLDL και στην LDL. Παρά τις παραπάνω διαφορές οι ApoE^{-/-} μύες παρουσιάζουν αξιοσημείωτες φαινοτυπικές ομοιότητες με τους ανθρώπους που έχουν έλλειψή της. Έτσι, με φυσιολογική διαίτα, οι ApoE^{-/-} μύες εμφανίζουν τιμές ολικής χοληστερόλης ~500mg/dl, κυρίως μέσα σε κλάσματα VLDL και χυλομικρών, ενώ η ανάπτυξη αθηρωματικών πλακών είναι ταχεία και συγκεντρώνει όλα σχεδόν τα χαρακτηριστικά της εξέλιξης της αθηρωμάτωσης στους ανθρώπους.

1.2.12.3 Ανάπτυξη αθηρωμάτωσης σε ApoE^{-/-} μύες

Οι ApoE^{-/-} μύες αναπτύσσουν αθηρωματικές πλάκες οι οποίες προσομοιάζουν με εκείνες του ανθρώπου και για το λόγο αυτό θεωρούνται ένα έγκυρο και αποτελεσματικό ζωικό πρότυπο μελέτης της αθηρωμάτωσης ⁴²⁵. Παρόλο που μελέτες σε πρότυπα μυός συνέβαλαν σημαντικά στην κατανόηση των μηχανισμών αθηρογένεσης, ο βαθμός στον οποίο ο μυς χρησιμεύει ως ακριβές μοντέλο της ανθρώπινης ασθένειας είναι συζητήσιμος ⁴²⁸. Τα περισσότερα μοντέλα μυός δεν εκδηλώνουν την ασταθή αθηρωματική πλάκα με υπερκείμενη θρόμβωση, την αλλοίωση που συνήθως σχετίζεται με κλινικά σημαντικά οξέα καρδιαγγειακά επεισόδια. Οι αλλοιώσεις δεν αναπτύσσουν την χαρακτηριστικά παχιά ινώδη κάψα που παρατηρείται στη ανθρώπινη χρόνια αθηρωμάτωση. Σε αντίθεση με τους ανθρώπους, οι μύες σπάνια αναπτύσσουν αθηρωμάτωση στις στεφανιαίες αρτηρίες αλλά αναπτύσσουν εύκολα αθηρωμάτωση στην αορτική ρίζα. Ο πολύ πιο γρήγορος καρδιακός ρυθμός του μυός και συνεπώς η διαταραγμένη ροή του αίματος πιθανώς αντιπροσωπεύει την προτίμηση της αθηρωμάτωσης σε αυτό το σημείο. Το μικρό μέγεθος του μυός περιπλέκει μέρος της ανάλυσης των αθηρωματικών αγγείων, αν και οι πρόσφατες τεχνολογικές εξελίξεις και οι ανοσοχημικές προσεγγίσεις το έχουν μετριάσει σε κάποιο βαθμό. Ο μυς άγριου τύπου είναι ένα ζώο «HDL» (δηλαδή η HDL είναι η κύρια λιποπρωτεΐνη), το οποίο μπορεί να συνεισφέρει στη σχετική αθηροανθεκτικότητα ακόμη και σε άγριου τύπου μύες που είναι επιδεκτικοί στην αθηρωμάτωση. Επιπλέον, οι μύες δεν παρουσιάζουν το ίδιο εύρος HDL υποομάδων όπως παρατηρείται στους ανθρώπους. Εφόσον οι υπο-κλάσεις της HDL έχει ισχυριστεί ότι εμφανίζουν διαφορετικά επίπεδα αθηροπροστασίας, ^{429, 430} αυτό θα μπορούσε να είναι σημαντικό. Τέλος, οι άγριου τύπου μύες δεν εκφράζουν την πρωτεΐνη μεταφοράς χοληστερουλεστέρα (CETP),

μια πρωτεΐνη πλάσματος που έχει προκαλέσει μεγάλο ενδιαφέρον ως πιθανό στόχο για την αθηροπροστασία στους ανθρώπους.

Παρόλα αυτά, η προσομοίωση των χαρακτηριστικών της αθηρωματικής νόσου του ανθρώπου από το μοντέλο αυτό έχει οδηγήσει σε μια ευρείας κλίμακας χρήση του για τη μελέτη της παθοφυσιολογίας της αθηροσκλήρωσης και για την ανάλυση των παραγόντων που επηρεάζουν το μέγεθος της αθηρωματικής πλάκας και τη σύστασή της, αλλά και για τη μελέτη των επιδράσεων φαρμακολογικών ή μη παρεμβάσεων⁴³¹.

Οι ApoE^{-/-} μύες ηλικίας 5-6 εβδομάδων παρουσιάζουν ήδη στην ενδοθηλιακή επιφάνεια των αγγείων προσκολληθείς μονοκυττάρων και μετανάστευσή τους στο ενδοθήλιο, που αναγνωρίζονται στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο. Σε ηλικία 6-10 εβδομάδων, οι περισσότεροι ApoE^{-/-} μύες έχουν αναπτύξει λιπώδεις γραμμώσεις οι οποίες αποτελούνται από αφρώδη κύτταρα και μεταναστευτικά λεία μυϊκά κύτταρα⁴²⁵. Οι λιπώδεις γραμμώσεις σύντομα (σε ηλικία 15 εβδομάδων) δίνουν τη θέση τους στις ενδιάμεσες αλλοιώσεις, οι οποίες αν και ετερογενείς, έχουν τα τυπικά χαρακτηριστικά ανθρώπινης αθηρωματικής πλάκας, όπως νεκρωτικό πυρήνα που περιβάλλεται από διαφοροποιημένα λεία μυϊκά κύτταρα, αφρώδη κύτταρα και άλλες ποσότητες εξωκυττάριου υλικού. Το πιο σημαντικό όμως χαρακτηριστικό των ApoE^{-/-} μυών είναι ότι από την ηλικία των 20 εβδομάδων φέρουν αθηρωματικές βλάβες με καλά σχηματισμένη ινώδη κάψα από λεία μυϊκά κύτταρα και εξωκυττάριο υλικό, η οποία επιπλέον περικλείει αφρώδη κύτταρα και μακροφάγα στις περιοχές του αυχένα της αθηρωματικής πλάκας. Συχνά, οι φλεγμονώδεις διηθήσεις στην αθηρωματική πλάκα διαβρώνουν το αγγειακό τοίχωμα κι επεκτείνονται μέχρι το μέσο χιτώνα του αρτηριακού τοιχώματος, με αποτέλεσμα ορισμένοι μύες να αναπτύσσουν αορτικά ανευρύσματα. Επιπλέον, σε ηλικιωμένα πειραματόζωα ανευρίσκονται συχνά επασβεστωμένες αλλοιώσεις, καθώς και υψηλό φορτίο οξειδωμένων ουσιών μέσα στις αθηρωματικές βλάβες⁴³². Οι ουσίες οξειδωτικού stress συνήθως εντοπίζονται σε περιοχές πλούσιες σε μακροφάγα στις πρώιμες βλάβες, ενώ σε προχωρημένες βλάβες ανιχνεύονται σε νεκρωτικές περιοχές. Η χορήγηση υψηλής περιεκτικότητας σε λιπαρά δίαιτας ενισχύει και επιταχύνει την αθηρωματική διαδικασία σε ApoE^{-/-} μύες^{419, 425}. Ιστολογικές και μορφομετρικές αναλύσεις κατά τη διάρκεια της αθηρογένεσης έδειξαν αύξηση του μεγέθους των αθηρωματικών αλλοιώσεων παράλληλα με την ηλικία, καθώς επίσης και μεγαλύτερη πολυπλοκότητα στη δομή τους⁴¹⁹.

Η αυξημένη έκφραση της ApoE σε ApoE^{-/-} μύες, είτε μέσω γονιδιακής προσθήκης με αδenoϊούς, είτε με την ενδοφλέβια χορήγηση συνθετικών μορίων που την μιμούνται, οδηγεί σε μείωση της χοληστερόλης και υποστροφή της αθηρωματικής πλάκας^{433, 434}. Φαίνεται επομένως ότι η ApoE έχει κομβικό ρόλο στη διατήρηση των επιπέδων χοληστερόλης. Σε ετερόζυγους ApoE^{+/-} μύες δεν ανιχνεύονται υψηλά επίπεδα χοληστερόλης, ενώ συγκεντρώσεις πλάσματος της τάξης των 40mg/dl,

μετά από μεταμόσχευση μακροφάγων του μυελού των οστών, μπορούν να μειώσουν αποτελεσματικά τα επίπεδα χοληστερόλης στο αίμα, πράγμα που καταδεικνύει ότι ακόμα και μικρότερες του φυσιολογικού συγκεντρώσεις της ApoE έχουν την ίδια βιολογική δράση^{418, 435}. Έπειτα από όλα αυτά, το ερώτημα που ανακύπτει είναι αν τελικά, στο ζωικό αυτό πρότυπο, η ApoE εμποδίζει την αθηρογένεση μέσω μηχανισμών σχετικών με τη ρύθμιση των επιπέδων χοληστερόλης στο αίμα ή αν εμπλέκονται μηχανισμοί ανεξάρτητοι της ομοιοστασίας της χοληστερόλης. Σε μία έρευνα όπου οι ApoE^{-/-} μύες εξέφραζαν εξω-ηπατικά (επινεφριδιακά) την ApoE, μειώθηκε το μέγεθος των αθηρωματικών αλλοιώσεων ανεξαρτήτως των αλλαγών στο βιοχημικό τους προφίλ⁴³⁶. Οι παρατηρήσεις αυτές ενισχύουν την υπόθεση ότι μηχανισμοί ανεξάρτητοι της ρύθμισης της χοληστερόλης πλάσματος εμπλέκονται στην αθηροπροστατευτική δράση της ApoE, έστω και όταν αυτή υπάρχει σε μικρές ποσότητες. Ένας προτεινόμενος μηχανισμός είναι η συμβολή της σε συνεργασία με την απολιποπρωτεΐνη A-I στην απομάκρυνση της κυτταρικής χοληστερόλης από τα μακροφάγα-αφρώδη κύτταρα προς την έσω στοιβάδα της βλάβης. Πιθανολογείται εναλλακτικά ότι η ApoE τροποποιεί ευθέως τα T λεμφοκύτταρα και μετριάζει την απάντηση των VSMCs σε φλεγμονώδη ερεθίσματα, με αποτέλεσμα να περιορίζεται η συσσώρευσή τους. Τέλος, ένας τρίτος προτεινόμενος μηχανισμός αναφέρεται στην αντι-οξειδωτική δράση της, υποδεικνύοντας ότι η ApoE μπορεί να μειώσει την οξείδωση των λιπιδίων και, μέσω αυτής, την ανάπτυξη αθηρωματικής πλάκας⁴³⁷. Η έλλειψη της ApoE λοιπόν, φαίνεται πως πέραν της αύξησης των επιπέδων LDL, ευθύνεται για την ανάπτυξη αθηρωμάτωσης σε μύες και με μηχανισμούς που δεν εμπλέκουν την ομοιοστασία των λιπιδίων.

Η ανάπτυξη της αθηρωμάτωσης μπορεί να επιταχυνθεί σημαντικά με χρήση τροφής, υψηλής περιεκτικότητας σε λιπαρά. Μετά από χορήγηση μιας τέτοιου είδους τροφής σε C57BL/6 (wild-type) μύες, προκαλείται αύξηση της χοληστερόλης στο διπλάσιο, ενώ οι διαγονιδιακοί ApoE^{-/-}/C57BL/6J μύες μπορούν να έχουν έως και τριπλάσια αύξηση της χοληστερόλης (μέχρι και 2000mg/dl) που αφορά κυρίως στη VLDL, ενώ η αύξηση της LDL είναι μικρή⁴¹⁹. Οι λιποπρωτεΐνες του αίματος έχουν μεγάλη περίοδο ημιζωής σε σχέση με τους φυσιολογικούς C57BL/6J μύες, αφού η κάθαρση λιποπρωτεϊνών που προέρχονται από την εντερική απορρόφηση μετά το γεύμα είναι σημαντικά διαταραγμένη σε ApoE^{-/-} μύες. Επόμενο είναι, σε μία δίαιτα «δυτικού τύπου», που μοιάζει με εκείνη που λαμβάνει ένας μέσος κάτοικος μιας αναπτυγμένης χώρας, οι ApoE^{-/-} μύες να ανταποκρίνονται ανάλογα, δηλαδή να επιταχύνεται η διαδικασία ανάπτυξης αθηρωματικών βλαβών και να αυξάνεται το μέγεθος των αθηρωματικών πλακών⁴²⁶. Έχει βρεθεί ότι σε ApoE^{-/-} μύες ηλικίας 10 εβδομάδων, στους οποίους χορηγήθηκε η πιο πάνω δίαιτα για διάστημα 5 εβδομάδων, οι αθηρωματικές αλλοιώσεις που σχηματίστηκαν είχαν 3 έως 4 φορές μεγαλύτερο μέγεθος από τις αντίστοιχες των ίδιων μυών που έλαβαν δίαιτα χαμηλής περιεκτικότητας σε λιπαρά. Παρατηρείται

επιπρόσθετα χρονική μετατόπιση της αθηρογένεσης σε μικρότερη ηλικία, με τις πρώιμες, αλλά και τις όψιμες αθηρωματικές βλάβες να εγκαθίστανται σε μικρότερη ηλικία. Η δημιουργία ενός πειραματικού προτύπου που συνδυάζει αθηρογόνο τροφή και ApoE^{-/-} μύες προσομοιάζει ικανοποιητικά με τις συνθήκες ανάπτυξης αθηρωμάτωσης στον ανθρώπινο οργανισμό κάτω από την επίδραση περιβαλλοντικών παραγόντων. Αν στα παραπάνω προστεθούν οι ιστολογικές ομοιότητες των αθηρωματικών βλαβών μεταξύ ανθρώπων και διαγονιδιακών μυών, γίνεται φανερό ότι το πειραματικό πρότυπο που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη εμφανίζει υψηλό βαθμό συσχέτισης με την κλινική πραγματικότητα.

Υπάρχουν όμως και ορισμένες σημαντικές διαφορές μεταξύ πειραματικής και ανθρώπινης αθηρωμάτωσης. Μια βασική διαφορά είναι ότι δεν έχει ακόμα παρατηρηθεί ρήξη της αθηρωματικής πλάκας σε ApoE^{-/-} μύες, γεγονός που δυσχεραίνει την πλήρη μελέτη της αθηροθρόμβωσης και των επιπλοκών της σε αυτό το πειραματικό πρότυπο. Ένα μεγάλο πλεονέκτημα όμως της χρήσης του πειραματικού αυτού προτύπου είναι ότι επιταχύνονται οι πειραματικές διεργασίες και προσφέρεται η δυνατότητα μελέτης σε σύντομο χρονικό διάστημα μιας κατά τα άλλα μακροχρόνιας διαδικασίας. Σε αυτό συμβάλλει και το γονιδιακό υπόστρωμα (C57BL/6J), το οποίο χρησιμοποιείται σε ApoE^{-/-} μύες. Οι αθηρωματικές βλάβες που αναπτύσσονται σε C57BL/6J ApoE^{-/-} μύες μετά από χορήγηση φυσιολογικής τροφής για 16 εβδομάδες είναι σχετικά μεγαλύτερες από τις αντίστοιχες που σχηματίζονται σε ApoE^{-/-} με γενετικό υπόστρωμα FVB/NJ μύες, οι οποίοι έχουν λάβει το ίδιο είδος τροφής για το ίδιο χρονικό διάστημα. Αντίθετα, οι τελευταίοι μύες παρουσιάζουν νωρίτερα ινώδη κάψα, αλλά μικρότερους νεκρωτικούς πυρήνες. Οι C57BL/6J ApoE^{-/-} μύες λοιπόν, μετά από χορήγηση κατάλληλης αθηρογόνου τροφής θεωρούνται σήμερα ως ένα από τα καλύτερα ζωικά πρότυπα μελέτης της αθηρωμάτωσης, καθώς είναι υπερ-χοληστερολαιμικά και αναπτύσσουν αυτόματες αθηρωματικές αλλοιώσεις⁵⁰⁹. Οι ετερόζυγοι ApoE^{+/-} μύες δεν εμφανίζουν υψηλές τιμές χοληστερόλης ούτε μετά από χορήγηση φυσιολογικής τροφής, ούτε μετά από λήψη “δυτικού τύπου” τροφής υποδηλώνοντας ότι η μείωση της ApoE κατά 50% δεν είναι αρκετή για να επηρεάσει τα επίπεδα των λιπιδίων⁴³⁸.

Συνοψίζοντας, αποδεικνύεται ότι οι ApoE^{-/-} C57BL/6J μύες παρουσιάζουν ολόκληρο το φάσμα αθηρωματικών βλαβών που παρατηρούνται κατά τη διάρκεια της αθηρογένεσης στον άνθρωπο. Με την παροχή τροφής υψηλής περιεκτικότητας σε λιπαρά στους μύες αυτούς δημιουργείται ένα πειραματικό πρότυπο, το οποίο δίνει την ευκαιρία να μελετηθεί η παθογένεια και η θεραπεία της αθηρωμάτωσης, σε αναλογικά πολύ μικρό χρονικό διάστημα.

ΜΕΡΟΣ ΔΕΥΤΕΡΟ: ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Ζωικά πρότυπα – Εργαστηριακές συνθήκες

Αρσενικοί και θηλυκοί μύες (βάρους 20-25g) με ομόζυγη έλλειψη της ApoE (ApoE^{-/-}) αποκτήθηκαν από διεθνή πάροχο (The Jackson Laboratory, Bar Harbor, USA) με βάση τους διεθνείς κανόνες πιστοποίησης εργαστηρίων και διεθνών μεταφορών πειραματόζωων. Οι μύες αυτοί είχαν γενετικό υπόστρωμα C57BL/6J και είχαν προέλθει από διασταυρώσεις τουλάχιστον 10 γενεών για την εξασφάλιση της γονιδιακής ομοιογένειας. Οι μύες που αποκτήθηκαν χρησιμοποιήθηκαν για να γίνουν διασταυρώσεις αρσενικών και θηλυκών μυών για τη δημιουργία της πειραματικής αποικίας (ApoE^{-/-} C57BL/6 μύες). Οι απόγονοί τους, που χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη εξετάστηκαν με μέθοδο PCR, με χρήση δείγματος ιστού από το περύγιο του ωτός που αφαιρέθηκε κατά τη σήμανση των ζώων για την εξακρίβωση του ApoE^{-/-} γενετικού τους υποστρώματος. Κατά τη διάρκεια διαμονής των μυών στη Μονάδα Πειραματόζωων του Ιδρύματος Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών τα πειραματόζωα είχαν ελεύθερη πρόσβαση στη χορηγούμενη τροφή και νερό, και οι συνθήκες περιβάλλοντος ήταν απολύτως ελεγχόμενες και σταθερές. Συγκεκριμένα, οι κλωβοί ήταν συνδεδεμένοι με κατάλληλο σύστημα παροχής φιλτραρισμένου αέρα, υπήρχε 12ωρος ημερήσιος φωτισμός ακολουθούμενος από 12ωρο σκότος, μέσω κατάλληλου χρονοδιακόπτη, με τη θερμοκρασία δωματίου σταθερά ρυθμισμένη στους 22 ± 2 °C και τη σχετική υγρασία στο $45 \pm 5\%$. Οι κλωβοί στους οποίους φιλοξενήθηκαν οι μύες (H-TempTM polysulfone type III open top cages, Tecniplast, Milan, Italy) ήταν χωρητικότητας 6 ζώων (τοποθετήθηκαν σε ομάδες των 5 μυών ανά κλωβό), και ήταν τοποθετημένοι σε σταθερό πάντα σημείο του εργαστηριακού δωματίου. Όλες οι πειραματικές διαδικασίες και οι συνθήκες φύλαξης και φροντίδας των πειραματόζωων ήταν σύμφωνες με αυτές που ορίζουν η εθνική νομοθεσία και οι ευρωπαϊκές οδηγίες.

Η πειραματική μελέτη καθώς και όλες οι εργαστηριακές αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν στο Κέντρο Πειραματικής Χειρουργικής του Ιδρύματος Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών (I.I.B.E.A.A). Στο Κέντρο αυτό υπάρχει οργανωμένη μονάδα φύλαξης και διαμονής πειραματόζωων η οποία λειτουργεί σύμφωνα με το Ελληνικό Προεδρικό Διάταγμα 56/2013, το οποίο εναρμονίζει την εθνική νομοθεσία με την Οδηγία 63/2010 της Ευρωπαϊκής Κοινότητας για την προστασία των ζώων που χρησιμοποιούνται για επιστημονικούς σκοπούς. Η μονάδα διαθέτει σύγχρονα συστήματα παρακολούθησης, εξειδικευμένο προσωπικό, καθώς και συστήματα απόλυτα ελεγχόμενης

χορήγησης τροφής, νερού και φιλτραρισμένου αέρα στα πειραματόζωα. Επίσης υπάρχει συνεχής κτηνιατρικός έλεγχος με περιοδική λήψη δειγμάτων από χώρους, προσωπικό και πειραματόζωα και αποστολή τους σε εργαστήρια του εξωτερικού προκειμένου να πιστοποιείται υγειονομικά η καταλληλότητα του κέντρου για τη διεξαγωγή πειραματικών εργασιών. Όσον αφορά τον εξοπλισμό, το Κέντρο διαθέτει όλο τον απαραίτητο μικροεξοπλισμό για την πραγματοποίηση επεμβάσεων σε μικρά ζωικά πρότυπα (χειρουργική αφαίρεση ιστών και οργάνων υπό αναισθησία, καθετήρας για διοισοφάγεια χορήγηση φαρμάκου). Τέλος, στο Κέντρο υπάρχει κατάλληλο μηχάνημα για την εφαρμογή του προγράμματος άσκησης, το οποίο έχει εισαχθεί από διεθνή οίκο και έχει χρησιμοποιηθεί σε δημοσιευμένες μελέτες σχετικά με την επίδραση της άσκησης στην ανάπτυξη αθηροσκλήρωσης σε Apo-E knock out μύες⁴³⁹⁻⁴⁴². Το πειραματικό πρωτόκολλο που εφαρμόστηκε είχε την έγκριση της Κτηνιατρικής Υπηρεσίας της Νομαρχίας Αθηνών (υπ' αριθμ. απόφαση 2697/26-04-2013).

2.1.1 Πειραματικό πρότυπο: Ανάπτυξη αθηρωμάτωσης

Στην παρούσα ερευνητική μελέτη χορηγήθηκε σε όλους τους μύες αθηρογόνος τροφή, «δυτικού τύπου», (Harlan Teklad;88137) η οποία εισήχθη από εταιρεία του εξωτερικού (Harlan Teklad, Madison,WI, USA). Η σύσταση της τροφής δίνεται στους Πίνακες 2.1 και 2.2 και ενδεικτικά αναφέρουμε ότι περιέχει λίπος σε ποσοστό 21 % του βάρους τροφής και χοληστερόλη σε ποσοστό 0,15 % του βάρους, χωρίς όμως χολικά οξέα. Ο συγκεκριμένος τύπος τροφής έχει από παλιά χρησιμοποιηθεί στην πρόκληση και μελέτη της αθηρωμάτωσης, καθώς και των αποτελεσμάτων διαφόρων φαρμακευτικών και μη-φαρμακευτικών παρεμβάσεων σε αθηρωματικούς μύες. Η χορήγηση της τροφής αυτής έγινε με τον ίδιο εθελοντικής βάσης κι ελεύθερης πρόσβασης τρόπο, όπως και εκείνη της κανονικής τροφής, με τη διαφορά ότι έγινε προοδευτική εισαγωγή της στο διαιτολόγιο των μυών.

2.2 Πειραματικός σχεδιασμός

Συνολικά στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν 70 αρσενικοί ApoE^{-/-} μύες. Οι μύες μετά από τον απογαλακτισμό τους, σε ηλικία 3 εβδομάδων, άρχισαν να διατρέφονται με φυσιολογική τροφή, δηλαδή τροφή χαμηλής περιεκτικότητας σε λιπαρά, για χρονικό διάστημα 5 εβδομάδων ώσπου να ολοκληρωθεί η βιολογική τους ωρίμανση. Στην 8η εβδομάδα ζωής των μυών ορίστηκε η έναρξη της μελέτης (1η πειραματική εβδομάδα), οπότε και αυτοί τυχαιοποιήθηκαν στις παρακάτω επτά ισοδύναμες (n=10) ομάδες:

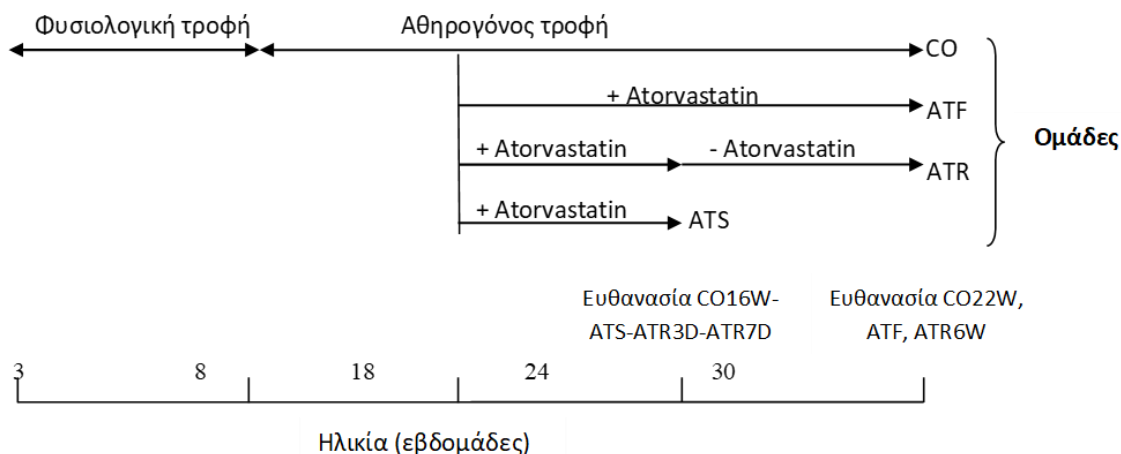
- **Ομάδες CO-16W και CO-22W:** Ομάδες ελέγχου. Πρόκληση αθηρωμάτωσης για 10 εβδομάδες, συνέχιση χορήγησης αθηρογόνου τροφής για 6 και 12 εβδομάδες και ευθανασία στις 16 και 22 εβδομάδες αντίστοιχα.
- **Ομάδα ATF:** Ομάδα Ατορβαστατίνης. Πρόκληση αθηρωμάτωσης για 10 εβδομάδες κι έπειτα χορήγηση ατορβαστατίνης για 12 επιπλέον εβδομάδες.
- **Ομάδα ATS:** Ομάδα Ατορβαστατίνης. Πρόκληση αθηρωμάτωσης για 10 εβδομάδες κι έπειτα χορήγηση ατορβαστατίνης για 6 επιπλέον εβδομάδες.
- **Ομάδες ATR-3D, ATR-7D και ATR-6W:** Ομάδες διακοπής. Πρόκληση αθηρωμάτωσης για 10 εβδομάδες κι έπειτα χορήγηση ατορβαστατίνης για 6 επιπλέον εβδομάδες. Στο τέλος της 16ης εβδομάδας η χορήγηση διακόπτεται για 3 ημέρες, 7 ημέρες και 6 εβδομάδες αντίστοιχα.

Ακολούθησε σήμανση και αρίθμηση των μυών κάθε κλωβού και ζύγιση του σωματικού βάρους με τη βοήθεια ηλεκτρονικού ζυγού. Αμέσως μετά την τυχαιοποίηση των μυών σε ομάδες, χορηγήθηκε σε όλες τις πειραματικές ομάδες αθηρογόνου, «δυτικού τύπου», τροφή (Harlan Teklad; 88137, Italy) (από την 8η εβδομάδα ζωής και ως το πέρας του πειραματισμού) χωρίς να παρατηρηθεί οποιαδήποτε παρενέργεια. Η εκατοστιαία αναλογία των μακρομοριακών συστατικών της ειδικής αυτής αθηρογόνου τροφής προσομοιάζει με τη δίαιτα μεγάλων πληθυσμιακών ομάδων σε χώρες του «δυτικού κόσμου». Η εισαγωγή της χορηγούμενης τροφής έγινε σταδιακά, έτσι ώστε τις πρώτες 2 ημέρες η τροφή αυτή αποτελούσε το 25%, ενώ η φυσιολογική τροφή το 75% της συνολικά χορηγούμενης ποσότητας. Στις επόμενες 3 ημέρες το 50% της τροφής που έλαβαν οι μύες αποτελούνταν από την υψηλής περιεκτικότητας σε λιπαρά τροφή, ενώ στο τέλος της εβδομάδος οι μύες τρέφονταν αποκλειστικά με αθηρογόνο τροφή. Στόχος της σταδιακής αυτής χορήγησης αθηρογόνου τροφής ήταν η προσαρμογή των μυών και ο περιορισμός τυχόν αντιδράσεών τους που συχνά παρατηρούνται στις αλλαγές των συνθηκών περιβάλλοντος, όπως η επιθετική συμπεριφορά ή ο απομονωτισμός.

Στο τέλος της 10ης πειραματικής εβδομάδας μετρήθηκε το σωματικό βάρος των ζώων πειραματισμού και πραγματοποιήθηκε δοκιμασία ανοχής στη γλυκόζη. Έπειτα, ακολουθήθηκε ανά ομάδα η προκαθορισμένη πειραματική παρέμβαση. Οι ομάδες χορήγησης ατορβαστατίνης ATF και ATS, παράλληλα με τη λήψη αθηρογόνου τροφής, υπεβλήθησαν σε ημερήσια χορήγηση υδατικού εναιωρήματος ατορβαστατίνης (20 mg/kg) (Pfizer, Inc., New York City, NY, USA) μέσω διοισοφάγειου καθετήρα μέχρι το πέρας της μελέτης στις 22 και 16 εβδομάδες αντίστοιχα. Οι ομάδες διακοπής ATR-3D, ATR-7D και ATR-6W ακολούθησαν το ίδιο πρόγραμμα χορήγησης στατίνης για 6 εβδομάδες. Στο τέλος της 16ης εβδομάδας πειραματισμού η χορήγηση διακόπτεται για 3 και 7 ημέρες και 6 εβδομάδες αντίστοιχα. Σχηματοποιημένα, ο σχεδιασμός του πειράματος φαίνεται στην **Εικόνα 9**.

Για ελαχιστοποίηση των μεταβλητών παραμέτρων μεταξύ των ομάδων λόγω των πειραματικών χειρισμών, εικονικές παρεμβάσεις έγιναν σε όλες τις πειραματικές ομάδες, αντίστοιχες με αυτές των ομάδων στις οποίες έγινε κανονική παρέμβαση. Συγκεκριμένα, τα ζώα πειραματισμού των ομάδων στις οποίες δεν χορηγήθηκε ατορβαστατίνη (CO-16W και CO-22W) πραγματοποιήθηκε σε καθημερινή βάση διοισοφάγεια χορήγηση ίσου όγκου φυσιολογικού ορού με τον όγκο του χορηγούμενου εναιωρήματος ατορβαστατίνης στις άλλες ομάδες. Με το πέρας της μελέτης, προσδιορίστηκε για άλλη μια φορά το βάρος των πειραματόζων.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟΣ ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ



Εικόνα 9: Πειραματικός σχεδιασμός της μελέτης

Πίνακας 2.1: Σύσταση σε μακροθρεπτικά συστατικά της αθηρογόνου, «δυτικού τύπου» διαίτας για μύες		
Μακροθρεπτικά συστατικά	% σύσταση σε βάρος	% σύσταση σε kcal
Πρωτεΐνες	17,3	15,2
Λίπος	21,2	42,0
Υδατάνθρακες	48,5	42,7
Kcal/g: 4,5, Cholesterol: 0,2%*		

*0,15% έχει προστεθεί και 0,05% προέρχεται από το λίπος

Πίνακας 2.2: Σύσταση αθηρογόνου – «δυτικού τύπου» διαίτας για μύες	
Συστατικά	Περιεκτικότητα (g/kg)
Casein	195,0
DL-Methionine	3,0
Sucrose	341,46
Corn Starch	150,0
Anhydrous Milkfat	210,0
Cholesterol	1,5
Cellulose	3,0
Mineral Mix AIN-76 (170915)	35,0
Calcium Carbonate	4,0
Vitamin Mix, Teklad (40060)	10,0
Ethoxyquin, antioxidant	0,04

2.2.1 Χορήγηση της ατορβαστατίνης

Στους μύες των ομάδων παρέμβασης έγινε καθημερινή χορήγηση υδατικού εναιωρήματος ατορβαστατίνης με διοισοφάγειο καθετήρα και απευθείας έγχυση της φαρμακευτικής ουσίας στο στομάχι των πειραματόζωων, για χρονικό διάστημα 6 ή 12 εβδομάδων. Η ημερήσια δόση καθορίστηκε στα 20 mg/kg σωματικού βάρους, και χορηγείτο εφάπαξ. Το εναιώρημα δραστικής ουσίας παρασκευαζόταν καθημερινά και η χορήγηση πραγματοποιούνταν εντός 20λέπτου από την παρασκευή του. Η συγκέντρωση του εναιωρήματος που χρησιμοποιήθηκε ήταν 2 mg/ml, ούτως ώστε να υπάρχει για τη σωστή δοσολογία συσχέτιση 10 µl εναιωρήματος ανά γραμμάριο σωματικού βάρους του πειραματόζωου. Καθημερινά, τα πειραματόζωα ζυγίζονταν σε ηλεκτρονικό ζυγό, και τους χορηγείτο ο αντίστοιχος όγκος του φαρμακευτικού παρασκευάσματος χωρίς τα πειραματόζωα να υπόκεινται σε αναισθησία. Όπως προαναφέρθηκε στο κεφάλαιο του πειραματικού σχεδιασμού (βλ. κεφ. 2.2), στα πειραματόζωα των υπόλοιπων ομάδων έγινε διοισοφάγεια χορήγηση 0,3 ml φυσιολογικού ορού ανά συνεδρία.

2.2.2 Δοκιμασία ανοχής στη γλυκόζη (Glucose Tolerance Test-GTT)

Η δοκιμή ανοχής στη γλυκόζη μετράει την κάθαρση ενός ενδοπεριτοναϊκά εγχυμένου φορτίου γλυκόζης από το σώμα. Χρησιμοποιείται για την ανίχνευση διαταραχών του μεταβολισμού της γλυκόζης που μπορούν να συνδεθούν με παθήσεις όπως ο διαβήτης ή το μεταβολικό σύνδρομο. Τα

ζώα υποβάλλονται σε νηστεία, προσδιορίζονται τα επίπεδα γλυκόζης νηστείας πριν χορηγηθεί το διάλυμα γλυκόζης με ενδοπεριτοναϊκή (IP) ένεση και στη συνέχεια, μετρούνται τα επίπεδα γλυκόζης στο αίμα σε διαφορετικά χρονικά σημεία κατά τις επόμενες 2 ώρες.

Στο τέλος του πειραματισμού όλες οι ομάδες υποβλήθηκαν σε δοκιμασία ανοχής στη γλυκόζη. Συγκεκριμένα, μετά από 6ωρη νηστεία, οι μύες αναισθητοποιήθηκαν και χορηγήθηκε με ενδοπεριτοναϊκή έγχυση γλυκόζη (διάλυμα D-glucose 50% wt/vol, B. Braun Medical Inc. Irvine, CA USA), με τη χρήση βελόνας 27 G και σε δόση 2 g/kg σωματικού βάρους. Μετά την έγχυση γλυκόζης δείγματα αίματος συνελέγησαν σε χρόνους 0, 30, 60, 90 και 120 min με τη μέθοδο της σταγόνας. Τα επίπεδα της γλυκόζης του αίματος μετρήθηκαν στις προαναφερθείσες χρονικές στιγμές (Accu-Chek Advantage Glucose Monitors, Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, USA). Το γενικό πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε έχει ως εξής:

- Νηστεία των μυών για 6 ώρες όλη με πρόσβαση σε πόσιμο νερό ανά πάσα στιγμή.
- Προετοιμασία του φύλλου καταγραφής του πειράματος, σύριγγας και ταινιών για τη μέτρηση της γλυκόζης καθώς και του διαλύματος γλυκόζης.
- Ζύγισμα των μυών.
- Υπολογισμός και καταγραφή της απαιτούμενης συγκέντρωσης γλυκόζης 20 % (2 g γλυκόζης / kg σωματικό βάρος) για την IP ένεση ως εξής: όγκος έγχυσης IP γλυκόζης (μl) = 10 x σωματικό βάρος (g).
- Προαιρετική εφαρμογή μικρής ποσότητας κρέμας τοπικής αναισθησίας στην ουρά του μύος και απαλό μασάζ για περίπου 10 δευτερόλεπτα για να ενισχυθεί η επίδραση της κρέμας αναισθησίας εξασφαλίζοντας ότι η προτεινόμενη περιοχή τομής είναι πλήρως καλυμμένη.
- Συγκράτηση του μύος και εντομή της άκρης της ουράς χρησιμοποιώντας μια καινούργια ή αποστειρωμένη λεπίδα νυστεριού.
- Μια μικρή σταγόνα αίματος (< 5μl) τοποθετείται στη δοκιμαστική ταινία του μετρητή γλυκόζης αίματος. Αυτό αποτελεί το βασικό επίπεδο αναφοράς της γλυκόζης (t = 0) και καταγράφεται στο φύλλο καταγραφής πειράματος.
- Ενδοπεριτοναϊκή ένεση του μύος με την κατάλληλη ποσότητα διαλύματος γλυκόζης, όπως προσδιορίστηκε προηγουμένως και καταγραφή του χρονικού σημείου της ένεσης.
- Τα επίπεδα γλυκόζης στο αίμα μετρούνται μετά από την ένεση γλυκόζης στα 15, 30, 60 και 120 λεπτά (t = 15, t = 30, t = 60 και t = 120) τοποθετώντας μια μικρή σταγόνα αίματος σε μια νέα ταινία σακχάρου και την καταγραφή των μετρήσεων. Τα αποτελέσματα καταγράφονται στο φύλλο καταγραφής.
- Επιβεβαίωση ότι η περαιτέρω απώλεια αίματος από την τομή είναι ελάχιστη, εφαρμόζοντας σύντομη πίεση στην τομή μετά από κάθε μέτρηση.

- Στο τέλος της πειραματικής διαδικασίας, οι μύες τοποθετούνται σε ένα καθαρό κλουβί με νερό και τρόφιμα διαθέσιμα *ad libitum*.
- Παρακολούθηση προσεκτική των ζώων για τυχόν μη φυσιολογικές συμπεριφορές.

Η ευθανασία των πειραματόζωων έγινε μετά από 8ωρη νηστεία, με τη λήψη ολικού αίματος υπό αναισθησία με τη βοήθεια εισπνεόμενου ισοφλουρανίου μέσα σε ειδική συσκευή, Πιο συγκεκριμένα, πραγματοποιήθηκε παρακέντηση της αριστεράς κοιλίας της καρδιάς για τη λήψη της μέγιστης δυνατής ποσότητας ολικού αίματος από αυτή (700-1000 μ l). Στη συνέχεια, αφαιρέθηκε χειρουργικά η καρδιά μαζί με ολόκληρη την αορτή (από τη ρίζα της αορτής μέχρι και το διχασμό των λαγονίων αρτηριών μαζί με τους σημαντικότερους κλάδους της, όπως τις νεφρικές αρτηρίες και τις δύο καρωτίδες). Από τα ιστολογικά δείγματα απομακρύνθηκαν το λίπος και ο συνδετικός ιστός, στο βαθμό που αυτό ήταν εφικτό. Από το block καρδιάς-αορτής, αφού αυτό καθαρίστηκε με έγχυση φυσιολογικού ορού μέσω της καρδιάς, κόπηκε το άνω $\frac{1}{3}$ τμήμα της καρδιάς μαζί με την αορτική βαλβίδα έως και το αορτικό τόξο, και στη συνέχεια τοποθετήθηκε μέσα σε ειδικά καψάκια με σπόγγους για τη διατήρηση της ευθύτητας της αορτής κι εμβαπτίστηκε σε διάλυμα φορμαλδεΐδης 10% για μονιμοποίηση και περαιτέρω ιστολογική διεργασία. Η θωρακική αορτή μαζί με την κοιλιακή αορτή τοποθετήθηκαν σε RNase free φιαλίδια erpendorf κι αποθηκεύθηκαν στους -80°C για περαιτέρω βιοχημική διεργασία.

2.2.3 Γλυκόζη αίματος και λιπιδαιμικό προφίλ

Με τη λήξη του πειράματος σε όλους τους μύες πριν από την ευθανασία όπου ελήφθησαν σημαντικές ποσότητες ολικού αίματος (700-1000 μ l) μετά από καρδιοκέντηση και ενώ οι μύες ήταν υπό γενική αναισθησία. Σε διάστημα μικρότερο των 30 min από τη λήψη του αίματος ακολουθούσε φυγοκέντρηση του αίματος στις 3500 στροφές/min για διάστημα 10 min. Ο ορός του πλάσματος διαχωρίστηκε και τοποθετήθηκε σε πλαστικά φιαλίδια τα οποία έφεραν κωδική ονομασία, ξεχωριστά για κάθε μυ. Τα φιαλίδια αυτά αποθηκεύτηκαν άμεσα σε βαθιά κατάψυξη (-80°C) και η απόψυξή τους έγινε μόνο μία φορά, την ημέρα των βιοχημικών αναλύσεων.

Η γλυκόζη αίματος προσδιορίστηκε με σακχαρόμετρο (Accu-Check Sensor, Roche Mannheim, Germany) στο οποίο απαιτείται μικρή ποσότητα αίματος και αποτελεί μια αρκετά αξιόπιστη μέθοδο. Η ολική χοληστερόλη και τα τριγλυκερίδια προσδιορίστηκαν με τη βοήθεια της ενζυματικής μεθόδου σε βιοχημικό αναλυτή χρησιμοποιώντας το εμπορικό kit ενζυμικής 4-αμινοφαιναζόνης-φαινόλης (Biotechnological Applications, Athens, Greece). Όλα τα δείγματα αναλύθηκαν στο Εργαστήριο Πειραματικής Χειρουργικής και Έρευνας της Ιατρικής Σχολής Αθηνών.

2.2.4 Παθολογοανατομική επεξεργασία

Ο ιστός τμήματος καρδιάς που αφαιρέθηκε από τα πειραματόζωα, μαζί με το αορτικό τόξο, εγκλειστήκαν μέσα σε ειδικά πλαστικά καψίδια ιστολογίας, τοποθετούμενα σε ευθεία θέση με χρήση ειδικών σπόγγων ιστολογίας. Τοποθετήθηκαν άμεσα σε διάλυμα φορμαλίνης 10 % στους 4 °C για μονιμοποίηση. Παρέμειναν στο μονιμοποιητικό υγρό για χρονικό διάστημα 18 ωρών (overnight, o/n) κι έπειτα ακολουθήθηκε διεργασία για τη σκίνωσή τους σε παραφίνη και την έγκλειση των ιστών σε blocks μικροτόμου, που περιγράφεται παρακάτω:

- Έντονο ξέπλυμα από τη φορμαλίνη με νερό βρύσης για 10min.
- Εμβάπτιση και παραμονή o/n σε διάλυμα αιθανόλης 70 % στους 4 °C.
- Αφυδάτωση με εμβάπτιση σε διαδοχικά διαλύματα αυξανόμενης συγκέντρωσης αιθανόλης, 1hr/συγκέντρωση: 70 %, 80 %, 95 %, 100 %, 100 % σε θερμοκρασία δωματίου (RT).
- Υδροφοβοποίηση με εμβάπτιση σε ξυλένιο 100 % για 1hr σε RT. (x2 φορές)
- Εμπότιση παραφίνης με εμβάπτιση σε υγρή παραφίνη για 1hr στους 60 °C. (x2)
- Έγκλειση σε blocks παραφίνης με χρήση καλουπιού και ψύξη στους -10 °C.
- Αποθήκευση για τουλάχιστον 24 hr στους -20 °C.

Κατά την έγκλειση των ιστών, ιδιαίτερη προσοχή δόθηκε στον ακριβή προσανατολισμό των δειγμάτων σχετικά με τον έναν άξονα και τα τρία επίπεδα συμμετρίας του αγγείου. Συγκεκριμένα, ο διαμήκης άξονας συμμετρίας τοποθετήθηκε κάθετος στο επίπεδο λήψης τομών, ώστε οι τομές μικροσκοπίας να είναι εγκάρσιες στο αγγείο, με τη ρίζα της αορτής προς το πλησίον επίπεδο (επίπεδο πρώτης τομής). Από τα blocks παραφίνης έγινε λήψη τομών μικροσκοπίας σε μικροτόμο, ακολουθώντας συγκεκριμένο πρωτόκολλο για την εξασφάλιση της ομοιότητας της εξεταζόμενης περιοχής, αλλά και για τη διευκόλυνση της μετέπειτα χρώσης με πολλαπλές χρωστικές διαφορετικών τομών και παρατήρησης μέσω αυτών των άμεσα γειτονικών ιστολογικών δομών για διαφορετικές ουσίες. Μόλις εντοπιζόταν η αορτική βαλβίδα και οι γλωχίνες ήταν ορατές στις ιστολογικές τομές, ξεκινούσε η λήψη σειριακών τομών πάχους 5μm σε αριθμημένες αντικειμενοφόρους πλάκες μικροσκοπίας. Οι τομές τοποθετήθηκαν ακολουθώντας μοτίβο τέτοιο ώστε σε κάθε αντικειμενοφόρο να τοποθετούνται 3 τομές που απείχαν 50μm η μία από την επόμενη, ενώ η πρώτη τομή κάθε αντικειμενοφόρου ήταν η επόμενη (5μm απόσταση) από την πρώτη τομή της προηγούμενης αντικειμενοφόρου. Με τον τρόπο αυτό, εξασφαλίστηκε και η κατανομή των υπό μελέτη τομών, ώστε ο μέσος όρος των μετρήσεων για κάθε χρώση να ανταποκρίνεται όχι σε σημειακή αλλά ευρύτερη μέτρηση, όπως επίσης και το γεγονός ότι η σύγκριση μεταξύ μετρήσεων διαφορετικών χρώσεων ήταν σε συνεντοπισμένα ανατομικά χαρακτηριστικά.

Προκειμένου οι λεπτές τομές να παρατηρηθούν και να αξιολογηθούν, είναι απαραίτητη η χρώση των στοιχείων τους με ειδικές χρωστικές. Οι αχρωμάτιστες τομές υπό το οπτικό μικροσκόπιο είναι σχεδόν διάφανες, και είναι αδύνατη η αναγνώριση των λεπτών δομών των ιστών, πέραν μιας αδρής εκτίμησης που μπορεί να γίνει με χρήση φίλτρων αντίθεσης φάσης φωτός (phase contrast microscopy). Έχουν περιγραφεί διάφορες μέθοδοι χρώσης των τομών οπτικής μικροσκοπίας, που βάζουν διαφορετικά στοιχεία, κι έτσι αναδεικνύουν διαφορετικές πληροφορίες από τους ιστούς. Δυστυχώς, η κάθε τομή μπορεί να βαφεί με περιορισμένο αριθμό χρωστικών, πριν η επικάλυψη των χρωμάτων αρχίσει να κρύβει αντί να αναδεικνύει πληροφορίες. Προκειμένου να μπορέσουμε να παρατηρήσουμε πλήθος μορίων, πραγματοποιήθηκαν διαφορετικές χρώσεις σε «γεινιάζουσες» τομές, στοχεύοντας στον συνεντοπισμό των ανιχνευόμενων στοιχείων. Μέρος των τομών που ελήφθησαν από το αορτικό τόξο των πειραματόζωων χρησιμοποιήθηκαν για την ιστοχημική χρώση των δειγμάτων και παρατήρηση των μοφομετρικών τους στοιχείων σε οπτικό μικροσκόπιο. Συγκεκριμένα, πραγματοποιήθηκαν χρώσεις αιματοξυλίνης/ηωζίνης για μορφομετρικούς σκοπούς, τρίχρωμη masson για χρώση κι εντοπισμό του συνδετικού ιστού, και sirius red για χρώση κι εντοπισμό του κολλαγόνου στις αθηρωματικές πλάκες.

Πίνακας 2.3: Συσκευές και υλικά κατά παθολογοανατομική επεξεργασία ιστών.		
Είδος - Συσκευή	Κωδικός - Περιγραφή	Παραγωγός
Ιστοκινέτα	TP1020 - Semi-enclosed Benchtop Tissue Processor	Leica Biosystems GmbH Wetzlar, Germany
Μικροτόμος	RM2255 - Fully Automated Rotary Microtome	
Λεπίδες μικροτόμου	035843489 - Low Profile Microtome Blades	
Συσκευή έγκλεισης	#5100 - Tissue-Tek TEC 5	Sakura Finetek Torrance, CA, USA
Καψάκια Ιστοχημείας	0395 - embedding cassettes	KALTEK srl Padova, Italy
Σπόγγοι Ιστοχημείας	0679 - protective biopsy pads	
Rings Ιστοχημείας	0526 - embedding rings	
Καλούπια έγκλεισης	2781 - base mould - 15x15x06 mm	
Αντικειμενοφόροι πλάκες	slides poly-l-lysine	Gerhard Menzel GmbH Braunschweig, Germany
Φορμαλίνη	9713.5000 - Formalin 10%	VWR Radnor, PA, USA
Αιθανόλη	Ehtanol Absolute	
Παραφίνη	720-0250 - Parammat extra pastillated Gurr	
Ξυλένιο	X/0250/17 - Xylene Analytical reagent grade	

2.2.4.1 Χρώση αιματοξυλίνης/ηωζίνης

Η χρώση αιματοξυλίνης/ηωζίνης (Haematoxylin + Eosin, H+E) στηρίζεται στο μωβ χρώμα με το οποίο η αιματοξυλίνη χρωματίζει τους πυρήνες των κυττάρων, και στο ερυθρό με το οποίο η ηωζίνη χρωματίζει το κυτταρόπλασμα. Στην παρούσα μελέτη, η χρώση H+E χρησιμοποιήθηκε για την αναγνώριση των αθηρωματικών πλακών από τις στοιβάδες της αορτής και τον αυλό, και τη μέτρηση των μορφομετρικών χαρακτηριστικών (εμβαδό, περίμετρος) των παραπάνω στοιχείων.

Το πειραματικό πρωτόκολλο H+E χρώσης περιγράφεται παρακάτω:

- Τήξη της παραφίνης με θέρμανση των αντικειμενοφόρων στους 60°C για 5min.
- Αποπαραφινποίηση με εμβάπτιση των αντικειμενοφόρων σε 2 διαδοχικά διαλύματα ξυλενίου 100% για 10min έκαστο.
- Υδροφιλοποίηση, ξέπλυμα ξυλενίου με εμβάπτιση σε αιθανόλη 100% για 5min.
- Σταδιακή ενυδάτωση με εμβάπτιση των αντικειμενοφόρων σε μειούμενης συγκέντρωσης υδατικά διαλύματα αιθανόλης για 2min έκαστο: 95% EtOH, 80% EtOH, 50% EtOH.
- Εμβάπτιση σε νερό βρύσης για 5min.
- Εμβάπτιση σε διάλυμα αιματοξυλίνης Harris (μετά από διήθησή της) για 60sec.
- Καλό ξέπλυμα σε νερό βρύσης. (x3)
- Εμβάπτιση σε αλκοολικό διάλυμα ηωζίνης 1% για 45sec.
- Γρήγορο ξέπλυμα (dips) σε νερό βρύσης. (x3)
- Σταδιακή αφυδάτωση με εμβάπτισεις σε διαλύματα αυξανόμενης συγκέντρωσης EtOH: 80% (30sec), 95% (30sec), 100% (1min), 100% (2min).
- Εμβάπτιση σε ξυλένιο 100% για 5min. (x2)
- Εφαρμογή μέσου επικάλυψης (DPX) με πουάρ κι επικάλυψη με καλυπτρίδα (με άσκηση πίεσης για απομάκρυνση φυσαλίδων και πλεονάζοντος DPX).
- Στέγνωμα για 24hr.

2.2.4.2 Χρώση sirius red

Η χρώση sirius red χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση και τον ποσοτικό προσδιορισμό του κολλαγόνου στο αγγειακό τοίχωμα και στην αθηρωματική πλάκα. Η χρώση αυτή δίνει ένα χαρακτηριστικό έντονο κόκκινο χρώμα στις ίνες κολλαγόνου και καθιστά τα αγγεία και τις αθηρωματικές πλάκες εξαιρετικά ευδιάκριτα. Το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε για τη χρώση sirius red περιγράφεται παρακάτω:

- Τήξη της παραφίνης με θέρμανση των αντικειμενοφόρων στους 60°C για 5min.

- Αποπαραφινοποίηση με εμβάπτιση των αντικειμενοφόρων σε 2 διαδοχικά διαλύματα ξυλενίου 100 % για 10min έκαστο.
- Υδροφιλοποίηση, ξέπλυμα ξυλενίου με εμβάπτιση σε αιθανόλη 100% για 5min.
- Σταδιακή ενυδάτωση με εμβάπτιση των αντικειμενοφόρων σε μειούμενης συγκέντρωσης υδατικά διαλύματα αιθανόλης για 2min έκαστο: 95% EtOH, 80% EtOH, 50% EtOH.
- Εμβάπτιση σε νερό βρύσης για 5min.
- Εμβάπτιση σε διάλυμα *micro-sirius red* για 60min.
- Εμβαπτίσεις σε οξιτισμένο νερό (acidified water), (10 sec).
- Σταδιακή αφυδάτωση με εμβαπτίσεις σε διαλύματα αυξανόμενης συγκέντρωσης EtOH: 80% (30sec), 95% (30sec), 100% (1min), 100% (2min).
- Εμβάπτιση σε ξυλένιο 100% για 5min. (x2)
- Εφαρμογή μέσου επικάλυψης (DPX) με πουάρ κι επικάλυψη με καλυπτρίδα (με άσκηση πίεσης για απομάκρυνση φυσαλίδων και πλεονάζοντος DPX)
- Στέγνωμα για 24hr

2.2.4.3 Χρώση masson's trichrome

Η Masson's trichrome είναι ένα πρωτόκολλο χρώσης τριών χρωμάτων που χρησιμοποιείται στην ιστολογία. Χρησιμοποιείται για την ανίχνευση ινών κολλαγόνου σε ιστούς όπως το δέρμα, η καρδιά κλπ. σε τομές παραφίνης και μπορεί να χρησιμοποιηθεί και για κρυοτομές. Οι ίνες κολλαγόνου βάφονται με μπλε χρώμα, οι πυρήνες μαύρο και το κυτταρόπλασμα, οι μυικές ίνες, και τα ερυθροκύτταρα με κόκκινο χρώμα. Το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε για τη χρώση Masson's trichrome περιγράφεται παρακάτω:

- Τήξη της παραφίνης με θέρμανση των αντικειμενοφόρων στους 60°C για 5min.
- Αποπαραφινοποίηση με εμβάπτιση των αντικειμενοφόρων σε 2 διαδοχικά διαλύματα ξυλενίου 100% για 10min έκαστο.
- Υδροφιλοποίηση, ξέπλυμα ξυλενίου με εμβάπτιση σε αιθανόλη 100% για 5min.
- Σταδιακή ενυδάτωση με εμβάπτιση των αντικειμενοφόρων σε μειούμενης συγκέντρωσης υδατικά διαλύματα αιθανόλης για 2 min έκαστο: 95%EtOH, 80%EtOH, 50%EtOH.
- Εμβάπτιση σε νερό βρύσης για 5min.
- Εμβάπτιση σε διάλυμα αιματοξυλίνης Weigert's για 10 min.
- Εμβάπτιση σε νερό βρύσης για 5min
- Εμβάπτιση σε αλκοολικό διάλυμα πικρικού οξέος για 4 min
- Εμβάπτιση σε νερό βρύσης για 30 sec

- Εμβάπτιση σε διάλυμα Ponceau Fuchsine για 4 min
- Εμβάπτιση σε διάλυμα φωσφομολυβδαινικού οξέος για 4 min
- Εμβάπτιση σε διάλυμα μπλε της ανιλίνης για 4 min
- Σταδιακή αφυδάτωση με εμβαπτίσεις σε διαλύματα αυξανόμενης συγκέντρωσης EtOH: 80% (30sec), 95% (30sec), 100% (1min), 100% (2min).
- Εμβάπτιση σε ξυλένιο 100% για 5min. (x2)
- Εφαρμογή μέσου επικάλυψης (DPX) με πουάρ κι επικάλυψη με καλυπτρίδα (με άσκηση πίεσης για απομάκρυνση φυσαλίδων και πλεονάζοντος DPX)
- Στέγνωμα για 24hr

Πίνακας 2.4: Συσκευές και υλικά κατά την ιστοχημική χρώση τομών.		
Είδος	Κωδικός - Περιγραφή	Παραγωγός
Hot plate		
Stirrer with hot plate and thermometer		
Eosin 1% alcoholic	RRSP37/E - Eosin sln 1%	Biostain Ready Reagents Ltd. Manchester, UK
Ethanol absolute	βλ. πίνακα 2.	
Xylene	βλ. πίνακα 2.	
Acetic acid	320099 - ACS reagent, $\geq 99.7\%$	Sigma-Aldrich
sirius red	195251 - Direct Red 81	St. Louis, MO, USA
Masson's trichrome	010210	Diapath S.p.A., Martinengo, Italy
Haematoxylin Harris	351946T - Hamatoxylin Harris (mercury free)	VWR Radnor, PA, USA
Καλυπτρίδες	631-0146 - coverslips 24x50	
DPX mountant	36029 DPX mountant	
Διηθητικό Χαρτί	17630 - Filter paper 39x39 cm	Munktell & Filtrak GmbH Bärenstein, Germany

Πίνακας 2.5: Διαλύματα για την ιστοχημική χρώση τομών.	
Διάλυμα	Παρασκευή
Αιθανόλη x%	1lt δ/τος: Ανάμειξη $10 \cdot x$ ml EtOH με $1000 - (10 \cdot x)$ ml ddH ₂ O
Αιματοξυλίνη Harris	Έτοιμο προς χρήση διάλυμα (πίνακας 2.)
Ηωζίνη 1% σε αλκοόλη.	Έτοιμο προς χρήση διάλυμα (πίνακας 2.)
Αλκοολικό διάλυμα ορσεΐνης	250ml δ/τος: Διάλυση 2,5gr orcein σε 250 ml EtOH 70%. Ανάδευση με θέρμανση 37°C σε stirrer για 10min. Διήθηση και προσθήκη 1ml HCl 30%.
Δ/μα οξικής αλκοόλης 1% w/v	250ml δ/τος: Σε 247,5ml απόλυτης EtOH, διάλυση 2,5ml άνυδρου οξικού οξέος.

Δ/μα pico-sirius red	<u>250ml δ/τος:</u> Σε 250ml ddH ₂ O διαλύεται πικρικό οξύ έως κορεσμού (κατακάθιση ιζήματος). Έπειτα διαλύονται 250μg σκόνης sirius red. Πρόσθεση μικρής ποσότητας πικρικού οξέος για επιβεβαίωση του κορεσμού.
Δ/μα acidified water	<u>250ml δ/τος:</u> Σε 248,5ml dH ₂ O προστίθενται 1,25ml άνυδρου οξικού οξέος.

2.2.4.4 Ανοσοϊστοχημικές χρώσεις

Η τεχνική αυτή της ανοσοϊστοχημείας βασίζεται στη λειτουργία αντισωμάτων για την ποιοτική ταυτοποίηση αντιγόνων (υπό διερεύνηση ουσιών) με οπτική μικροσκοπία. Στην παρούσα εργασία, για την ταυτοποίηση των πρωτεϊνών-στόχων, χρησιμοποιήθηκε έμμεση ανοσοϊστοχημεία (με χρήση δύο αντισωμάτων) και μέθοδο συμπλόκου αβιδίνης-βιοτίνης. Η αρχή λειτουργίας της μεθόδου αυτής, που περιγράφηκε το 1981, εκμεταλλεύεται την ισχυρή τάση σύνδεσης της αβιδίνης (μιας πρωτεΐνης που βρίσκεται στο ασπράδι των αυγών κότας) με τη βιοτίνη, και σε γενικές γραμμές είναι η ακόλουθη: Το πρωτογενές αντίσωμα, ειδικό απέναντι στο προς ανίχνευση αντιγόνο, προσδένεται στα σημεία των τομών όπου βρίσκεται το αντιγόνο. Μετά από τη σήμανση του αντιγόνου από το πρωτογενές αντίσωμα, ένα δευτερογενές αντίσωμα, ειδικό έναντι μιας περιοχής του πρωτογενούς αντισώματος, δεσμεύεται με τη σειρά του στις περιοχές όπου υπάρχει το πρωτογενές αντίσωμα, μετά την πρόσδεσή του τελευταίου με την ουσία που μελετάται. Το δευτερογενές αντίσωμα, φέρει επίσης το ένζυμο βιοτίνη. Σε ξεχωριστή αντίδραση, γίνεται συμπλοκοποίηση της αβιδίνης με ένα βιοτυλιωμένο ένζυμο (στην περίπτωσή μας υπεροξειδάση), σε τέτοια αναλογία ώστε να μένουν ορισμένα σημεία σύνδεσης της αβιδίνης ελεύθερα. Όταν τα σύμπλοκα αυτά αναμειχθούν με τον ιστό, τα ελεύθερα σημεία σύνδεσης της αβιδίνης συνδέονται με τη βιοτίνη του δευτερογενούς αντισώματος. Αποτέλεσμα αυτού είναι περισσότερο ένζυμο συνδεδεμένο στο στόχο από ότι θα ήταν δυνατό με ένα σύστημα πρωτογενούς αντισώματος – δευτερογενούς με ένζυμο, η αντίδραση του οποίου όταν εισαχθεί υπόστρωμα δημιουργεί χρώση.

Σε οποιαδήποτε ανοσοϊστοχημική εξέταση, ένα αρνητικό αποτέλεσμα σημαίνει ότι το αντιγόνο δεν ανιχνεύθηκε και όχι ότι το αντιγόνο δεν υπήρχε στους ιστούς που εξετάστηκαν. Επίσης, ασθενή χρώση (background) μπορεί να προκαλέσει η μη ειδική σύνδεση του δευτερογενούς αντισώματος και η δράση της ενδογενούς υπεροξειδάσης. Για τους λόγους αυτούς, η ανοσοϊστοχημική χρώση ακολουθείται πάντα από negative control (συνήθως η πρώτη από τις τρεις τομές σε κάθε αντικειμενοφόρο πλάκα), στο οποίο ακολουθείται όλη η διαδικασία με εξαίρεση την εφαρμογή πρωτογενούς αντισώματος, και από ένα positive control, μια αντικειμενοφόρο που περιέχει τομές από ιστό που γνωρίζουμε ότι περιέχει σε μεγάλη ποσότητα την υπό ανίχνευση ουσία.

Στις τομές που ελήφθησαν από τους μύες του πειράματος εξετάστηκαν με τη μέθοδο της ανοσοϊστοχημείας τα παρακάτω αντιγόνα: MMP-2, MMP-3, MMP-9, TIMP-2, Mac-3, α -actin, TNF α και MCP-1. Η γενική μεθοδολογία για την ανοσοϊστοχημική χρώση περιγράφεται παρακάτω:

- Τήξη της παραφίνης με θέρμανση των αντικειμενοφόρων στους 60°C για 5min.
- Αποπαραφινοποίηση με εμβάπτιση των αντικειμενοφόρων σε 2 διαδοχικά διαλύματα ξυλενίου 100% για 10min έκαστο.
- Υδροφιλοποίηση, ξέπλυμα ξυλενίου με εμβάπτιση σε αιθανόλη 100% για 5min.
- Σταδιακή ενυδάτωση με εμβάπτιση των αντικειμενοφόρων σε μειούμενης συγκέντρωσης υδατικά διαλύματα αιθανόλης για 2min έκαστο: 95%EtOH, 80%EtOH, 50%EtOH.
- Εμβάπτιση σε νερό βρύσης για 5min.
- Αποκάλυψη επιτόπιων με εμβάπτιση σε ρυθμιστικό δ/μα κιτρικού οξέος 10mM pH=6,0 Tween20 και βρασμό για 20min.
- Σταδιακή ψύξη σε θερμοκρασία δωματίου (περίπου 30min).
- Έκπλυση με ρυθμιστικό διάλυμα PBS (Phosphate Buffer Saline) pH=6,0 για 5min. (x3)
- Εξουδετέρωση της ενδογενούς υπεροξειδάσης με εμβάπτιση σε δ/μα H₂O₂ 3 % σε PBS (άλλα πρωτόκολλα χρησιμοποιούν μεθανόλη) για 15min στο σκοτάδι.
- Έκπλυση με ρυθμιστικό διάλυμα PBS (Phosphate Buffer Saline) pH=6,0 για 5min. (x3)
- Blocking της ενδογενούς βιοτίνης με χρήση kit αβιδίνης-βιοτίνης σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή (15 min έκαστο διάλυμα) Συνήθως χρησιμοποιείται αραιωμένο bovine serum.
- Επώαση με διάλυμα αποκλεισμού πρωτεΐνης (blocking solution) για 5 min για την αποφυγή της μη ειδικής χρώσης υποστρώματος που προκαλείται από μη ειδική πρόσδεση του πρωτογενούς ή δευτερογενούς αντισώματος
- Αποστράγγιση του blocking solution χωρίς έκπλυση.
- Εφαρμογή πρωτογενούς αντισώματος αραιωμένου κατάλληλα (εξαρτάται από το αντίσωμα) σε blocking serum ή antibody diluent.
- Τοποθέτηση σε θάλαμο με υγρασία, στους 4°C ο/ν.
- Έκπλυση με ρυθμιστικό διάλυμα PBS pH=6,0 για 5min. (x3)
- Εφαρμογή βιοτινυλιωμένου δευτερογενούς αντισώματος για 2 h σε θερμοκρασία σωματίου.
- Έκπλυση με ρυθμιστικό διάλυμα PBS pH=6,0 για 5min. (x3)
- Επώαση με το δ/μα συμπλόκου στρεπταβιδίνης-υπεροξειδάσης (Streptavidin-HRP-conjugate), το οποίο δεσμεύεται από την βιοτίνη του δεύτερου αντισώματος, για 15 min.
- Έκπλυση με ρυθμιστικό διάλυμα PBS pH=6,0 για 5min. (x3)

- Προσθήκη του χρωμογόνου υποστρώματος (AEC) ώστε να ξεκινήσει η ενζυματική αντίδραση της υπεροξειδάσης που οδηγεί σε σρωματικό ίζημα στη θέση που έχει δεσμευτεί το πρωτογενές αντίσωμα (κόκκινο-καφέ χρώμα). Επώαση για ~ 2-4 min.
 - Έκπλυση με dH₂O.
 - Χρώση πυρήνων (counterstain) με αιματοξυλίνη Mayer's, 45 sec.
 - Σταδιακή αφυδάτωση με εμβαπτίσεις σε διαλύματα αυξανόμενης συγκέντρωσης EtOH: 80% (30sec), 95% (30sec), 100% (1min), 100% (2min).
 - Εμβάπτιση σε ξυλένιο 100% για 5min. (x2)
 - Εφαρμογή μέσου επικάλυψης (DPX) με πουάρ κι επικάλυψη με καλυπτρίδα (με άσκηση πίεσης για απομάκρυνση φυσαλίδων και πλεονάζοντος DPX).
 - Στέγνωμα για 24hr.
- **Αντίσωμα για την MMP-2.** Για την ανοσοϊστοχημική χρώση της MMP-2, χρησιμοποιήθηκε το μονοκλωνικό αντίσωμα anti-MMP-2 (βλ. πίνακα 2.6) σε αραιώση 1:500. Το συγκεκριμένο αντίσωμα αναγνωρίζει την MMP 2 σε ιστούς ανθρώπων, μυών και επίμυων. Παρέχεται από τον κατασκευαστή μέσα σε ειδική συσκευασία και σε ποσότητα 1,0 mg (0,2 mg/ml) μονοκλωνικού αντισώματος μυός σε 10 Mm PBS, pH=7,4 που περιέχει 0,2 % BSA και 0,09% νατριούχο αζίδιο και αποθηκεύεται στους -20oC (ή -70oC για μακροχρόνια αποθήκευση).
- **Αντίσωμα για την MMP-3.** Για την ανοσοϊστοχημική χρώση της MMP-3 χρησιμοποιήθηκε το πολυκλωνικό αντίσωμα anti-MMP-3 (βλ. πίνακα 2.6) που αναγνωρίζει την MMP-3 σε ιστούς ανθρώπων, μυών και επίμυων, σε αραιώση 1:250. Το αντίσωμα παρέχεται από τον κατασκευαστή μέσα σε ειδική συσκευασία και σε ποσότητα 1,0 mg (1,0 mg/ml) πολυκλωνικού αντισώματος κονίκλου σε PBS που περιέχει 0,05% νατριούχο αζίδιο και 0,5% σταθεροποιητή πρωτεϊνών και αποθηκεύεται στους -20oC (ή -70oC για μακροχρόνια αποθήκευση).
- **Αντίσωμα για την MMP-9.** Η MMP-9 εντοπίστηκε με τη χρήση πολυκλωνικού IgG αντισώματος που παράγεται από κονίκλους και είναι ειδικό στην αναγνώριση της MMP-9 σε τομές παραφίνης ιστών ανθρώπου, μυών και επίμυων καθώς και άλλων ζωικών ειδών (βλ. πίνακα 2.6). Το αντίσωμα είναι ειδικό για την MMP-9 και δεν παρουσιάζει διασταυρούμενη αντίδραση με την MMP-1, την MMP-2, την MMP-3 ή τη φимπρονεκτίνη. Σύμφωνα με τον πάροχο, το αντίσωμα παρέχεται λυοφιλοποιημένο από PBS και 2% σουκρόζη σε ποσότητα 0,1 mg (LYOPH mg/dl) και η ανασύστασή του σε 100 ul απιονισμένου νερού σε τελική

συγκέντρωση 1 mg/ml ρυθμιστικού διαλύματος. Στην παρούσα μελέτη το χρησιμοποιήθηκε αραιώση 1:500.

- **Αντίσωμα για τον TIMP-2.** Για τον TIMP-2 χρησιμοποιήθηκε ειδικό αντίσωμα για ανθρώπινο αναστολέα TIMP-2, κλώνος 67-4H11. Το αντίσωμα αυτό εκτός από ανθρώπινους ιστούς παρουσιάζει διασταυρούμενη αντίδραση με ιστούς μύος, επίμυος, ινδικού χοίρου, κονίκλου και βοός. Σύμφωνα με τις προδιαγραφές του κατασκευαστή, η ποσότητα του αντισώματος είναι 0.1mg διαλυμένο σε 0,1M Na phosphate buffer pH=7,0, που περιέχει ελεύθερο από πρωτεάσες βόειο ορό με λεύκωμα 0,5% ως σταθεροποιητή και νατριούχο αζίδιο 0,9% για συντηρητικό. Η συγκέντρωση του αδιάλυτου αντισώματος στο παρεχόμενο διάλυμα ήταν 0,5mg/ml, ενώ η αραιώση που χρησιμοποιήθηκε ήταν 1:500.
- **Αντίσωμα για το αντιγόνο των μακροφάγων (Mac-3).** Ο ποιοτικός έλεγχος της παρουσίας μακροφάγων στον αγγειακό ιστό έγινε με τη χρήση του Mac-3 μονοκλωνικού αντισώματος για μύες, κλώνος M3/84, ισότυπος Rat [(Lewis x BN) F1] IgG1, κ που είναι ειδικός για ανοσοϊστοχημική εξέταση ιστών. Το αντίσωμα αυτό δεσμεύεται με το αντιγόνο 110kDa Mac-3, το οποίο εκφράζεται στην επιφάνεια μονοπύρηνων φαγοκυττάρων μύων. Το αντίσωμα μπορεί να ανιχνεύσει το Mac-3 αντιγόνο σε ιστικά μακροφάγα, σε περιτοναϊκά μακροφάγα που απελευθερώνουν thioglycollate και σε μερικές σειρές μυελικών κυττάρων, όχι όμως σε λεμφοκύτταρα και μονοκύτταρα. Έχει επίσης αναφερθεί ότι το M3/84 αντίσωμα δίνει θετική χρώση σε δενδριτικά κύτταρα στο ενδοθήλιο και σε τομές θύμου αδένα, λεμφαδένων, σπλήνας και λεμφοειδούς ιστού από τον εντερικό σωλήνα.. Η αραιώση που χρησιμοποιήθηκε ήταν 1:500.
- **Αντίσωμα για το αντιγόνο των λείων μυϊκών κυττάρων (a-actin).** Για την ποιοτική ανίχνευση των λείων μυϊκών κυττάρων χρησιμοποιήθηκε μονοκλωνικό αντίσωμα που αναγνωρίζει ως αντιγόνο την α-ισομορφή της λείας μυϊκής ακτίνης. Παράγεται από μύες και ο κλώνος 1A4 (asm-1) παρουσιάζει διασταυρούμενη αντίδραση με την α-ακτίνη λείων μυϊκών κυττάρων σε ιστούς ανθρώπου, μύος και επίμυος που έχουν μονιμοποιηθεί σε παραφίνη. Αντίθετα, δεν παρουσιάζει διασταυρούμενη αντίδραση με ακτίνη από ινοβλάστες, μυοκύτταρα και μυοκαρδιακά κύτταρα. Ο ισότυπος του αντισώματος που παρέχεται από τον κατασκευαστή (IgG2a/kappa) χρωματίζει θετικά λεία μυϊκά κύτταρα στο αγγειακό τοίχωμα, στο εντερικό τοίχωμα και στο μυομήτριο. Επίσης, θετική χρώση εμφανίζουν τα μυοεπιθηλιακά κύτταρα στο μαστικό και στους σιελογόνους αδένες, αφού περιέχουν ακτίνη. Σύμφωνα με τις πληροφορίες του κατασκευαστή, η συνολική πρωτεϊνική συγκέντρωση που παρέχεται σε κάθε αντιδραστήριο είναι 1mg/ml ενώ πριν από τη χρήση του το αντιδραστήριο

είχε αποθηκευτεί στους 2-8οC. Στην παρούσα ερευνητική μελέτη η αραίωση που προσδιορίστηκε ως βέλτιστη ήταν 1:500.

- **Αντίσωμα για τον TNFα.** Για τον TNF-α χρησιμοποιήθηκε πολυκλωνικό αντίσωμα το οποίο εκτός από ανθρώπινους ιστούς παρουσιάζει διασταυρούμενη αντίδραση με ιστούς μυός και επίμυος. Σύμφωνα με τις προδιαγραφές του κατασκευαστή, η ποσότητα του αντισώματος είναι 0,1mg, σε υγρή μορφή καθαρισμένου Ig κλάσματος, που περιέχει νατριούχο αζίδιο 0,05% για συντηρητικό. Η συγκέντρωση του αδιάλυτου αντισώματος στο παρεχόμενο διάλυμα ήταν 1,0 mg/ml, ενώ η αραίωση που χρησιμοποιήθηκε ήταν 1:500.
- **Αντίσωμα για τον MCP-1.** Ο ποιοτικός έλεγχος της παρουσίας της χημειοτακτικής πρωτεΐνης μονοκυττάρων στον αγγειακό ιστό έγινε με τη χρήση του MCP-1 μονοκλωνικού αντισώματος, κλώνος 2D8, ισότυπος Mouse IgG1, κ που είναι ειδικός για ανοσοϊστοχημική εξέταση ιστών. Αυτό το γονίδιο είναι ένα από τα πολλά γονίδια κυτοκίνης που συγκεντρώνονται στο q-βραχίονα του χρωμοσώματος 17. Οι κυτοκίνες είναι μια οικογένεια εκκρινόμενων πρωτεϊνών που εμπλέκονται σε ανοσορυθμιστικές και φλεγμονώδεις διεργασίες. Η πρωτεΐνη που κωδικοποιείται από αυτό το γονίδιο σχετίζεται δομικά με την υποοικογένεια των κυτοκινών CXC. Τα μέλη αυτής της υποοικογένειας χαρακτηρίζονται από δύο κυστεΐνες που διαχωρίζονται από ένα μόνο αμινοξύ. Αυτή η κυτοκίνη επιδεικνύει χημειοτακτική δράση για μονοκύτταρα και βασεόφιλα αλλά όχι για ουδετερόφιλα ή ηωσινόφιλα. Συνδέεται με τους υποδοχείς χημειοκίνης CCR2 και CCR4. Σύμφωνα με τις προδιαγραφές του κατασκευαστή, η ποσότητα του αντισώματος είναι 0,1mg διαλυμένο σε PBS με 0,5% πρωτεϊνικό σταθεροποιητή και νατριούχο αζίδιο 0,9% για συντηρητικό. Η συγκέντρωση του αδιάλυτου αντισώματος στο παρεχόμενο διάλυμα ήταν 1,0 mg/ml, ενώ η αραίωση που χρησιμοποιήθηκε ήταν 1:500.

Πίνακας 2.6: Υλικά κατά τις ανοσοϊστοχημικές χρώσεις.		
Είδος - Συσκευή	Κωδικός - Περιγραφή	Παραγωγός
Αντίσωμα MMP-2	AM00257PU-N- anti-MMP-2	Acris Antibodies GmbH
Αντίσωμα MMP-3	AP06233PU-N - anti-MMP-3	Hiddnhausen, Germany
Αντίσωμα MCP-1	AM06749PUPU-N - anti-MCP-1	
Αντίσωμα TNF-a	AP20373PU-N- anti-TNFa	
Αντίσωμα MMP-9	NBP1-57940- anti-MMP-9	Novus Biologicals
Αντίσωμα TIMP-2	NBP1-42375 - TIMP2	Europe, Abingdon, UK
Αντίσωμα a-actin	MSK030-anti-actin	Zytomed Systems GmbH, Berlin, Germany
		Concord, CA, USA
Αντίσωμα Mac-3	550292 - Mac-3	BD Pharmigen

		Franklin Lakes, NJ, USA
ZytoChem Plus HRP kit	HRP008AEC,	Zytomed Systems GmbH, Berlin, Germany
Permanent AEC kit	ZUC054-200	
Κιτρικό Νάτριο $\text{HOOC}(\text{COONa})(\text{CH}_2\text{COONa})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	W302600 - Sodium citrate dehydrate $\geq 99\%$, FG	Sigma-Aldrich St. Louis, MO, USA
Πυκνό Υδροχλωρίο HCl	32033 - Hydrochloric acid ACS reagent, 37%	
Καυστικό νάτριο NaOH	S5881 - Sodium hydroxide reagent grade, $\geq 98\%$, pellets (anhydrous)	
Χλωριούχο κάλιο KCl	P9541 - Potassium chloride for molecular biology, $\geq 99.0\%$	
Όξινο φωσφορικό νάτριο Na_2HPO_4	S3264 - Sodium phosphate dibasic $\geq 98.5\%$ (titration)	
Δισόξινο φωσφορικό κάλιο KH_2PO_4	P9792 - Potassium phosphate monobasic $\geq 98.0\%$	
Tween20	P9416 - TWEEN® 20 viscous liquid	
Υπεροξειδίο του υδρογόνου H_2O_2	H3410 - Hydrogen peroxide solution, 30% wt. in H_2O	
Αιματοξυλίνη Mayer's	350604T - Haemalum (Mayer's) Gurr®	VWR Radnor, PA, USA

Πίνακας 2.7: Διαλύματα κατά τις ανοσοϊστοχημικές χρώσεις.

Διάλυμα	Παρασκευή
Citrate buffer	Για 1lt: Διάλυση με ανάδευση σε 1000ml ddH ₂ O 2,94g sodium citrate (dihydrate). Ρύθμιση του pH στο 6.0 με διαδοχικές ρίψεις σταγόνων HCl 1N. Προσθήκη 0,5ml Tween20 κι ανάδευση.
PBS	Για 1lt 10x stock solution: Διάλυση με καλή ανάδευση σε 800ml ddH ₂ O 80g NaOH, 2g KCl, 4.4g Na ₂ HPO ₄ και 2.4g of KH ₂ PO ₄ . Ρύθμιση του pH στο 7.4 με ρίψεις σταγόνων HCl 1N ή NaOH 1N, αν χρειαστεί. Συμπλήρωση του όγκου μέχρι το 1lt με ddH ₂ O. Πριν τη χρήση, αραίωση 1/10 με ddH ₂ O.
δ/μα H_2O_2 σε PBS	Για 250ml: Διάλυση 12,5ml H_2O_2 30% σε 237,5ml PBS.
HCl 1N	Για 120ml: Διάλυση 10ml πυκνού HCl σε 110ml ddH ₂ O
NaOH 1N	Για 100ml: Διάλυση 5,844g NaOH σε 100ml ddH ₂ O

2.2.4.5 Μορφομετρική ανάλυση

Όλες οι τομές που υπέστησαν χρώση, είτε ιστοχημική, είτε ανοσοϊστοχημική, παρατηρήθηκαν σε οπτικό μικροσκόπιο (Leica DM LS2, Wetzlar, Germany), και φωτογραφήθηκαν από ψηφιακή

κάμερα μικροσκοπίου Leica DC 500 (Heerbrugg, Ελβετία) με τη βοήθεια ειδικού λογισμικού υπολογιστή Altras Soft Imaging System σε μεγέθυνση 10x. Οι ψηφιακές φωτογραφίες έπειτα αναλύθηκαν από ειδικό λογισμικό ψηφιακής ανάλυσης εικόνας προς εξαγωγή δεδομένων.

2.2.4.5.1 Μορφομετρική ανάλυση χρώσης H&E

Οι εικόνες από τη χρώση αιματοξυλίνης/ηωζίνης χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό του συνολικού εμβαδού του αυλού και των αθηρωματικών πλακών (σε μm^2) κάθε αγγείου με τη χρήση ειδικού λογισμικού ανάλυσης εικόνας (Image Pro Plus Version 4.1; Media Cybernetics). Το έσω ελαστικό πέταλο του αρτηριακού τοιχώματος, δηλαδή το όριο έσω-μέσου χιτώνα, που αποτελεί το έσω όριο της αθηρωματικής πλάκας, και η γραμμή διεπαφής αρτηριακού αυλού-ινώδους κάψας ήταν ευδιάκριτα με τη χρώση H+E και μπορούσε πολύ εύκολα να προσδιοριστεί με την πραγματοποίηση της παραπάνω μέτρησης. Έχοντας ως δεδομένο το εμβαδόν του αυλού (Lu) και το εμβαδό των αθηρωματικών πλακών (Pl) μπορούσε εύκολα να υπολογιστεί το ποσοστό στένωσης (SF), με την απλή μαθηματική εξίσωση $SF=Pl/(Lu+Pl)$. Μετά την αξιολόγηση και εμβαδομέτρηση ξεχωριστά όλων των τομών από κάθε μν υπολογιζόταν ο μέσος όρος όλων των ποσοστών στενώσεως από τις μετρούμενες τομές, ο οποίος τελικά αποτελούσε το συνολικό δείκτη μεγέθους της αθηρωμάτωσης σε κάθε μν.

2.2.4.5.2 Μορφομετρική ανάλυση χρώσης Sirius red και Masson's trichrome

Ο ποσοτικός προσδιορισμός της εκατοστιαίας αναλογίας κολλαγόνου στην αθηρωματική πλάκα και στο αγγειακό τοίχωμα έγινε με πανομοιότυπο τρόπο με τον προσδιορισμό του, και με τη βοήθεια του ίδιου προγράμματος ψηφιακής ανάλυσης εικόνας όπως και στην H&E. Συνοπτικά, προσδιορίστηκε η σχετική συγκέντρωση κολλαγόνου ή συνδετικού ιστού αντίστοιχα στην αθηρωματική πλάκα όλων των μυών κάθε ομάδας. Για κάθε ζώο έγινε χρώση σε 3 τομές αγγείου από ένα συνολικό μήκος 150 μm και ο μέσος όρος των τιμών από όλες τις τομές χρησιμοποιήθηκε για τη στατιστική ανάλυση. Όταν σε κάποια τομή υπήρχαν περισσότερες από μία αθηρωματικές πλάκες τότε υπολογίστηκε ο μέσος όρος της εκατοστιαίας αναλογίας κολλαγόνου συνδετικού ιστού σε όλες τις πλάκες για τη συγκεκριμένη τομή.

2.2.4.5.3 Μορφομετρική ανάλυση Ανοσοϊστοχημικών Χρώσεων

Οι σχετικές συγκεντρώσεις των a-actin, MMP-2, MMP-3, MMP-9, TIMP-2, Mac-3, TNF-a και MCP-1 μετρήθηκαν στις αθηρωματικές πλάκες των μυών με μεθοδολογία όμοια με αυτή που ακολουθήθηκε για την ελαστίνη και το κολλαγόνο. Έχοντας σε κάθε αντικειμενοφόρο πλάκα την πρώτη τομή ως negative control μετρήθηκε τόσο η θετική χρώση από background όσο και το θετικό σήμα που έδωσαν οι αντιδράσεις των αντισωμάτων. Με απλή αφαίρεση του μέσου ποσοστού background-σήματος, υπολογίστηκε το θετικό σήμα κάθε δείγματος.

Πίνακας 2.8: Συσκευές και υλικά κατά τη μορφομετρική ανάλυση των τομών		
Είδος - Συσκευή	Περιγραφή	Παραγωγός
Μικροσκόπιο	Olympus CX31	Olympus UK Ltd Hertfordshire, UK
Προσαρμογέας ψηφιακής κάμερας	N1512100 - U-TV0, 5xC-3	
Ψηφιακή κάμερα μικροσκοπίου	ALTRA 20 - SIS 2 Megapixel CMOS color camera	
Λογισμικό εικονοληψίας	Altras Soft Imaging System	
Λογισμικό ψηφιακής επεξεργασίας εικόνων	Image Pro Plus 4.1	Media Cybernetics, Inc. Rockville, MD, USA

2.2.5 Στατιστική ανάλυση

Οι ποσοτικές μεταβλητές συνοψίστηκαν χρησιμοποιώντας μέσους όρους και τυπικές αποκλίσεις (standard deviation). Η σύγκριση των μέσων όρων μεταξύ όλων των ομάδων έγινε με τη βοήθεια της δοκιμασίας one-way ANOVA και η ποιοτική σύγκριση μεταξύ των ομάδων έγινε με τη βοήθεια της post-hoc ανάλυσης κατά Tuckey. Οι μεταβολές των βιοχημικών παραμέτρων μέσα σε κάθε ομάδα (αρχική τιμή έναντι τελικής τιμής) εξετάστηκαν με τη δοκιμασία paired-samples t-test. Έγινε έλεγχος για την κανονικότητα των μεταβλητών χρησιμοποιώντας την δοκιμασία κατά Shapiro-Wilk, στις περιπτώσεις που υπήρχε απόκλιση των μεταβλητών από την κανονικότητα, θα χρησιμοποιούνταν οι λογαριθμοί τους. Σ' όλες τις στατιστικές αναλύσεις το επίπεδο σημαντικότητας ορίστηκε ως μικρότερο 0.05 και διπλής κατεύθυνσης. Οι στατιστικές αναλύσεις εφαρμόστηκαν με το στατιστικό πακέτο SPSS (έκδοση 22.0; IBM Corp., Armonk, NY).

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Επίδραση σε σωματικό βάρος, λιπιδαιμικό και γλυκαιμικό προφίλ

3.1.1 Βάρος σώματος

Κατά την έναρξη της χορήγησης της ατορβαστατίνης, στο τέλος της 10^{ης} πειραματικής εβδομάδας, το σωματικό βάρος δεν διέφερε μεταξύ των ομάδων (CO-16W= 32,52 ± 2,65 g, CO-22W: 32,64 ± 1,78 g, ATF: 33,05 ± 2,14 g, ATS: 35,50 ± 3,34 g, ATR-3D: 3,17 ± 3,64 g, ATR-7D: 32,57 ± 2,87 g, ATR-6W: 32,88 ± 2,17 g· p=0,212). Υπήρξε σημαντική αλληλεπίδραση μεταξύ της χρονικής στιγμής που μετρήθηκε το σωματικό βάρος και της ομάδας θεραπείας, $F(6,64) = 7,643$, $p < 0,001$. Επιπλέον, υπήρξε σημαντική κύρια επίδραση του χρόνου, $F(1,64) = 113,503$, $p < 0,001$ αλλά όχι σημαντική κύρια επίδραση της ομάδας, $F(6,64) = 1,175$, $p > 0,05$. Όπως αναμενόταν, η χορήγηση αθηρογόνου τροφής είχε ως αποτέλεσμα τη σημαντική αύξηση του σωματικού βάρους των πειραματόζωων σε όλες τις ομάδες της έρευνας (paired samples t-test, $p < 0,05$ για όλες τις πειραματικές ομάδες). Η σύγκριση μεταξύ των ομάδων κατά την τελική μέτρηση του σωματικού βάρους δεν κατέδειξε στατιστικά σημαντική διαφορά ($p > 0,05$).

3.1.2 Βιοχημική ανάλυση

Τα συνολικά επίπεδα χοληστερόλης που μετρήθηκαν στο τέλος της μελέτης διέφεραν μεταξύ των ομάδων. Οι μύες που έλαβαν ατορβαστατίνη παρουσίασαν μειωμένες τιμές χοληστερόλης σε σύγκριση με τις ομάδες ελέγχου ($p < 0,05$). Ειδικότερα, οι ομάδες ATF και ATS ($595,33 \pm 6,20$ mg/dl και $617,50 \pm 20,72$ mg/dl αντίστοιχα) είχαν τα χαμηλότερα επίπεδα χοληστερόλης ενώ υπήρξε μια στατιστικά σημαντική αύξηση στις ομάδες όπου η ατορβαστατίνη απομακρύνθηκε ($p < 0,05$). Όσον αφορά τα επίπεδα των τριγλυκεριδίων, η ομάδα ATS ($187,00 \pm 33,43$ mg/dl) παρουσίασε στατιστικά σημαντικά υψηλότερες τιμές σε σύγκριση με την ομάδα ATF ($138,50 \pm 22,12$ mg/dl· $p < 0,05$). Τόσο η ATF όσο και η ATS δεν διέφεραν σε σχέση με τις ομάδες απόσυρσης ($p > 0,05$).

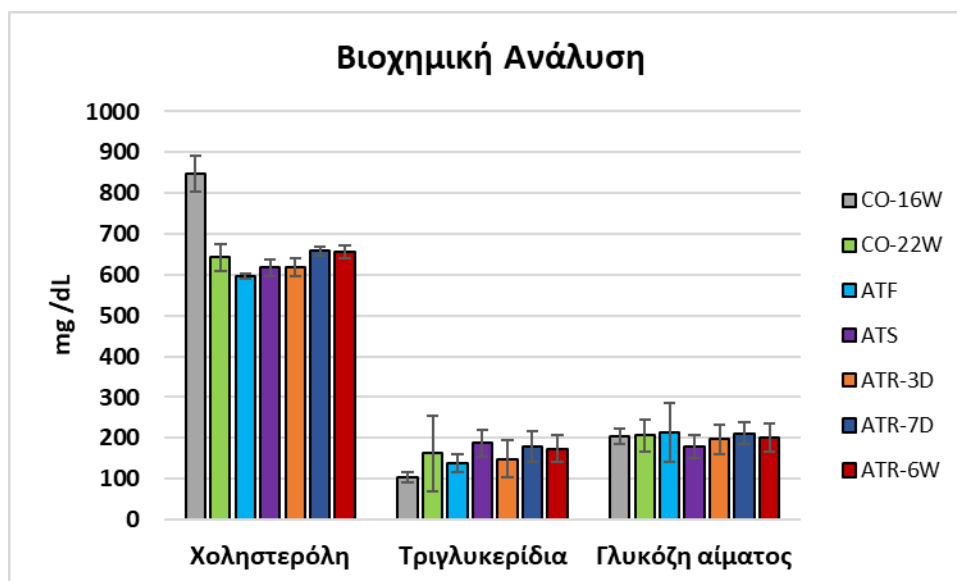
3.1.3 Δοκιμασία ανοχής στη γλυκόζη (IPGTT)

Διεξήχθη ανάλυση της IPGTT προκειμένου να διερευνηθούν οι διαφορές μεταξύ των ομάδων στο γλυκαιμικό προφίλ (Περιοχή κάτω από την καμπύλη-AUC) μετά από χορήγηση γλυκόζης από του στόματος. Από την ανάλυση των αποτελεσμάτων, δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομάδων ($p > 0,05$). Ωστόσο, στους μύες των ομάδων ελέγχου παρατηρήθηκαν

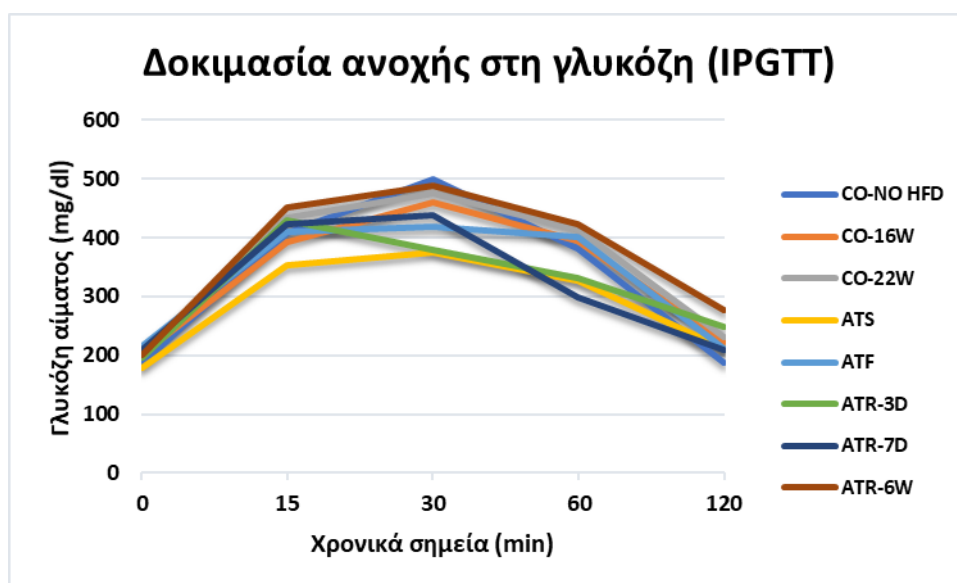
μεγαλύτερες τιμές AUC (42335.25 ± 7313.33 mg * min / dl στην ομάδα CO-16W και 44260.83 ± 8474.40 mg * min / dl στην ομάδα CO-22W) σε σύγκριση με όλες τις ομάδες θεραπείας εκτός από την ATR -6W στην οποία τα αποτελέσματα κατέδειξαν επιδείνωση στον έλεγχο της γλυκόζης. Όλα τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον **Πίνακα 3.1**.

Πίνακας 3.1: Παρουσίαση αποτελεσμάτων μετρήσεων σωματικού βάρους, ολικής χοληστερόλης, τριγλυκεριδίων και επιπέδων και AUC γλυκόζης μετά από τεστ ανοχής στη γλυκόζη και για τις 7 ομάδες ζώων

Ομάδες	CO-16W (n=10)	CO-22W (n=10)	ATS (n=10)	ATF (n=10)	ATR-3D (n=10)	ATR-7D (n=10)	ATR-6W (n=10)
(Μέσος όρος \pm SD)							
Βάρος σώματος (g)							
Αρχικό	33,15 \pm 1,83	32,64 \pm 1,78	35,50 \pm 3,34	32,58 \pm 1,52	33,93 \pm 2,64	32,57 \pm 2,87	32,88 \pm 2,17
Τελικό	41,39 \pm 5,03	37,47 \pm 5,24	36,60 \pm 3,87	35,58 \pm 3,74	35,07 \pm 3,06	34,83 \pm 3,38	37,82 \pm 3,06
Χοληστερόλη (mg/dL)	848,18 \pm 44,40	643,33 \pm 32,88	617,50 \pm 20,72*	595,33 \pm 6,20 **	618,64 \pm 20,99	658,18 \pm 11,68 (*) (***)	655,56 \pm 15,09 (**)(***)
Τριγλυκερίδια (mg/dL)	103,00 \pm 11,77	162,22 \pm 93,31	187,00 \pm 33,43	138,50 \pm 22,12	148,64 \pm 46,10	179,58 \pm 37,26	173,33 \pm 33,82
Γλυκόζη νηστείας (mg/dL)	203,70 \pm 19,65	205,44 \pm 39,81	178,60 \pm 27,59	213,00 \pm 71,82	196,45 \pm 35,18	210,40 \pm 26,55	200,89 \pm 34,35
AUC γλυκόζης (mg*min/dL)	42335,25 \pm 7313,33	44260,83 \pm 8474,40	34023,33 \pm 6483,73	40690,23 \pm 8831,64	38010,00 \pm 6445,43	38243,33 \pm 1974,06	45150,94 \pm 6491,11
* Στατιστικά σημαντική διαφορά συγκριτικά με την ομάδα CO-16W							
** Στατιστικά σημαντική διαφορά συγκριτικά με την ομάδα CO-22W							
*** Στατιστικά σημαντική διαφορά συγκριτικά με τις ομάδες ATS και ATF							



Σχήμα 1: Ραβδόγραμμα παρουσίασης μετρήσεων ολικής χοληστερόλης (mg/dL), τριγλυκεριδίων (mg/dL) και γλυκόζης αίματος (mg/dL) για τις 7 ομάδες πειραματοζώων



Σχήμα 2: Διάγραμμα καμπύλης σακχάρου μετά από το τεστ ανοχής στη γλυκόζη για τις 7 ομάδες πειραματοζώων

3.2 Παθολογοανατομικές εξετάσεις

3.2.1 Έκταση αθηρωματικής πλάκας, στένωση αυλού (Χρώση H&E)

Οι τομές με χρώση H+E χρησιμοποιήθηκαν για την αναγνώριση των αθηρωματικών αλλοιώσεων και της έκτασής τους στο εσωτερικό του αγγειακού αυλού. Τα αποτελέσματα των μετρήσεων παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.2. Είναι αξιοσημείωτο ότι όλα ανεξαιρέτως τα δείγματα και όλες οι

τομές των δειγμάτων παρουσίασαν έναν βαθμό αθηρωματικών βλαβών. Το γεγονός αυτό αποδεικνύει την εγκυρότητα και την αξιοπιστία του πειραματικού μοντέλου που χρησιμοποιήθηκε. Η επίδραση της θεραπείας με ατορβαστατίνη στην πρόοδο της αθηροσκληρωτικής βλάβης αξιολογήθηκε μετρώντας τη στένωση του αυλού καθώς και τις συγκεντρώσεις κολλαγόνου και συνδετικού ιστού εντός των αθηροσκληρωτικών πλακών. Ο βαθμός της στένωσης του αυλού ήταν σημαντικά λιγότερο εκτεταμένος στην ομάδα ATF ($13,90 \pm 1,08\%$) σε σύγκριση και με τις δύο ομάδες ελέγχου ($21,74 \pm 5,49\%$ στην CO-16W, $p = 0,02$, $21,95 \pm 2,40\%$ στην CO-22W, $p < 0,001$). Από την άλλη πλευρά, οι ομάδες ATS, ATR-3D, ATR-7D, ATR-6W εμφανίστηκαν με λιγότερο αθηρωματικό βάρος από τις ομάδες ελέγχου, αλλά υψηλότερο σε σύγκριση με την ATF. Όλες αυτές οι διαφορές δεν πέτυχαν στατιστικά σημαντικά επίπεδα ($p > 0,05$).

3.2.2 Εντοπισμός κολλαγόνου – χρώση Sirius red

Οι ιστοί στις τομές μικροσκοπίας που χρωματίστηκαν με sirius red, χρησιμοποιήθηκαν για τον εντοπισμό του κολλαγόνου στην αθηρωματική πλάκα και τη μέτρηση του ποσοστού θετικής χρώσης που ανταποκρίνεται στην πρωτεΐνη αυτή. Η περιεκτικότητα των πλακών στην ομάδα ATF εμφανίστηκε στατιστικά σημαντικά υψηλότερη από ό,τι στις δύο ομάδες ελέγχου ($27,46 \pm 3,47\%$ στην ATF έναντι $18,75 \pm 1,23\%$ και $17,35 \pm 2,27\%$ στην CO-16W και την CO-22W αντίστοιχα, $p < 0,001$). Αυξημένες συγκεντρώσεις κολλαγόνου βρέθηκαν επίσης στις ομάδες ATS, ATR-7D και ATR-6W σε σύγκριση με τις ομάδες ελέγχου χωρίς όμως στατιστική σημαντικότητα ($p > 0,05$). Αξίζει να αναφερθεί ότι οι μύες της ομάδας ATR-3D παρουσίασαν σημαντικά μειωμένη περιεκτικότητα κολλαγόνου στις αθηρωματικές πλάκες σε σύγκριση με όλες τις άλλες ομάδες ($12,70 \pm 3,10$, $p < 0,05$).

3.2.3 Εντοπισμός συνδετικού ιστού – χρώση masson's trichrome

Στις τομές που υπέστησαν χρώση με masson's trichrome, εντοπίστηκε και μετρήθηκε η ποσοστιαία θετική χρώση του συνδετικού ιστού ως μέρος της αθηρωματικής πλάκας. Αναλυτικά, ενώ τα ζώα που υποβλήθηκαν σε θεραπεία με ατορβαστατίνη εμφάνισαν υψηλότερη περιεκτικότητα συνδετικού ιστού σε σύγκριση με εκείνα των ομάδων ελέγχου. Αντιθέτως, η διακοπή της χορήγησης ατορβαστατίνης για 3 ημέρες οδήγησε σε έντονη μείωση των συγκεντρώσεων συνδετικού ιστού σε σχέση με όλες τις άλλες ομάδες θεραπείας ($p < 0,0001$), φθάνοντας σε ισοδύναμα επίπεδα με εκείνα των μύων ελέγχου ($15,35 \pm 7,49\%$ στην ATR-3D έναντι $23,91 \pm 7,94\%$ και $20,68 \pm 8,29\%$ στην CO-16W και την CO-22W αντίστοιχα, $p > 0,05$).

3.2.4 Ανοσοϊστοχημικές χρώσεις

Με την τεχνική της ανοσοϊστοχημείας, εντοπίστηκαν στις αθηρωματικές πλάκες τα αντιγόνα a-actin, mac-3, TNF-a, MCP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-9, και TIMP-2. Παρόμοια με την τεχνική μετρήσεων κολλαγόνου κι ελαστίνης, προσδιορίστηκε στις τομές το ποσοστό θετικής χρώσης ως μέρος της συνολικής έκτασης της αθηρωματικής πλάκας. Επιπλέον, οι τιμές σταθμίστηκαν σε σχέση με τις τιμές υποβάθρου των αρνητικών τομών, όπου παρατηρήθηκε χρώση υποβάθρου εντός των αθηρωματικών αλλοιώσεων. Στον **Πίνακα 3.2** παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των μετρήσεων.

3.2.4.1 Ανοσοϊστοχημική χρώση a-actin

Με την ανοσοϊστοχημική χρώση με χρήση αντισώματος έναντι του αντιγόνου a actin των λείων μυϊκών κυττάρων, εντοπίστηκαν στην αθηρωματική πλάκα τα μεταναστεύοντα VSMCs. Στη χρώση αυτή δε βρέθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ της ομάδας ελέγχου και των πειραματικών ομάδων ($p > 0,05$). Παρά το γεγονός ότι οι τιμές p σε όλες τις πειραματικές ομάδες δεν έπιασαν το κατώφλι της στατιστικής σημαντικότητας, παρατηρούμε ότι όλες οι δύο ομάδες παρουσιάζουν αξιοσημείωτη αύξηση του ποσοστού θετικής χρώσης με το μεγαλύτερο ποσοστό να εμφανίζεται στην ομάδα ATF ($28, 28 \pm 6,67 \%$).

3.2.4.2 Ανοσοϊστοχημική χρώση Mac-3

Η θετική χρώση που προκύπτει από τη δέσμευση του αντιγόνου Mac-3 της κυτταρικής μεμβράνη των ιστικών μακροφάγων από το αντίσωμα M3/84 χρησιμοποιήθηκε για την ποιοτική ανίχνευση των μακροφάγων στην αθηρωματική πλάκα. Υπήρξε σημαντική μείωση του περιεχόμενου των αθηρωματικών αλλοιώσεων σε μακροφάγα στις πειραματικές ομάδες παρέμβασης ATF και ATS συγκριτικά με τις ομάδες ελέγχου ($p < 0,05$). Επιπλέον, η απόσυρση της θεραπείας με ατορβαστατίνη οδήγησε μετά από 3 ημέρες σε σημαντική αύξηση στις συγκεντρώσεις των μακροφάγων, ισοδύναμη με τα επίπεδα των μαρτύρων, (ATR-3D: $20,85 \pm 2,50 \%$ έναντι ATF: $6,93 \pm 4,37 \%$ και ATS: $9,00 \pm 5,16 \%$, $p < 0,05$). Παρόμοια στατιστικά σημαντική διαφορά με τις ομάδες ATF και ATS παρουσίασε και η ομάδα διακοπής 7 ημερών ($19,25 \pm 3,11 \%$, $p < 0,05$).

3.2.4.3 Ανοσοϊστοχημική χρώση MMP-2

Η ανοσοϊστοχημική μέθοδος με τη βοήθεια πολυκλωνικού αντισώματος για τη MMP-2 χρησιμοποιήθηκε προκειμένου να ανιχνευθεί η εν λόγω ουσία και στη συνέχεια να προσδιοριστεί ποσοτικά το μέγεθος της σχετικής επιφάνειας με θετική χρώση στην αθηρωματική πλάκα. Η MMP-2 στην ομάδα των μυών ελέγχου 22 εβδομάδων (CO-22W: $19,21 \pm 6,21$ %) εμφάνισε υψηλότερη επί τοις εκατό αναλογία θετικής ανοσοαντίδρασης στην αθηρωματική πλάκα συγκριτικά με την ομάδα των μυών ελέγχου 16 εβδομάδων (CO-16W: $11,46 \pm 1,98$ %). Εφαρμόζοντας τη στατιστική ανάλυση one-way ANOVA και post-hoc μεταξύ των ομάδων δεν παρατηρήθηκε κάποια στατιστικά σημαντική διαφορά ($p < 0,05$) παρόλα αυτά η ομάδα ATF εμφάνισε το χαμηλότερο ποσοστό θετικής χρώσης συγκριτικά τόσο με τις ομάδες ελέγχου όσο και με τις υπόλοιπες ομάδες χορήγησης ατορβαστατίνης ($8,56 \pm 3,75$ %).

3.2.4.4 Ανοσοϊστοχημική χρώση MMP-3

Με τη χρώση των τομών με το πολυκλωνικό αντίσωμα για τη MMP-3 κατέστη δυνατό να εκτιμηθεί η σχετική παρουσία της MMP-3 στο εμβαδό της αθηρωματικής πλάκας. Οι μύες στους οποίους χορηγήθηκε στατίνη χωρίς διακοπή παρουσίασαν στατιστικά σημαντική μείωση των επιπέδων του ενζύμου αυτού εντός των αθηρωματικών πλακών έναντι των ομάδων ελέγχου (ATF: $12,60 \pm 4,74$ % και ATS: $11,81 \pm 4,60$ % έναντι CO-16W: $17,95 \pm 3,18$ % και CO-22W: $27,02 \pm 5,83$ %, $p < 0,001$). Επιπλέον, η βραχυχρόνια διακοπή της ατορβαστατίνης είχε ως αποτέλεσμα υψηλότερες συγκεντρώσεις για την MMP-3. Πιο συγκεκριμένα, το ποσοστό θετικής χρώσης στις αθηρωματικές πλάκες των ομάδων ATR-3D και την ATR-7D ήταν σημαντικά υψηλότερο από ό,τι στις ομάδες ATF και ATS ($p < 0,05$) ενώ συγκριτικά με τις ομάδες ελέγχου δεν ανεδείχθη στατιστικά σημαντική διαφορά ($p < 0,05$). Τα επίπεδα της MMP-3 εμφανίζουν ξανά μειωτική τάση στην ομάδα διακοπής 6 εβδομάδων (ATR-6W: $15,00 \pm 8,81$ %).

3.2.4.5 Ανοσοϊστοχημική χρώση MMP-9

Με πανομοιότυπη διαδικασία με τις παραπάνω χρώσεις εκτιμήθηκε η θετική χρώση της αθηρωματικής πλάκας για τη MMP-9 σε όλες τις ομάδες ξεχωριστά. Η ομάδα ATR-3D, στην οποία υπήρξε διακοπή χορήγησης για 3 ημέρες, παρουσίασε στατιστικά σημαντική αύξηση των επιπέδων MMP-9 στις χρώσεις όπου χρησιμοποιήθηκε το αντίσωμα έναντι του ενζύμου αυτού σε σύγκριση με τις ομάδες ATF και ATS ($21,31 \pm 4,87$ % στην ATR-3D έναντι $10,58 \pm 1,74$ % στην ATF, $p < 0,001$ και $12,35 \pm 3,82$ % στην ATS, $p = 0,02$). Τα ποσοστά θετικής χρώσης ήταν στατιστικά σημαντικά μειωμένα στις ομάδες ATF και ATS έναντι των ομάδων ελέγχου (CO-16W: $17,00 \pm 2,38$ % και

CO-22W: $23,00 \pm 6,64 \%$, $p < 0,01$) ενώ η ανάλυση post hoc δεν έδειξε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των ομάδων ATR-7D και ATR-6W σε σύγκριση με τις υπόλοιπες ομάδες ($15,58 \pm 6,45\%$ και $18,78 \pm 8,24\%$ αντίστοιχα) ($p > 0,05$).

3.2.4.6 Ανοσοϊστοχημική χρώση TIMP-2

Ο ιστικός αναστολέας των μεταλλοπρωτεϊνών δικτύου 2 (TIMP-2) μετά από ανάλυση των τομών μικροσκοπίας, που σημάνθηκαν μέσω του ειδικού προς αυτόν αντισώματος, βρέθηκε σε αυξημένα επίπεδα στην ομάδα ATF σε σχέση με τις ομάδες CO-16W και CO-22W (ATF: $19,20 \pm 4,78 \%$ έναντι CO-16W: $8,67 \pm 3,84 \%$ και CO-22W: $10,28 \pm 6,39 \%$, $p < 0,05$), ενώ τα δείγματα από την ομάδα ATS δε διαφοροποιήθηκαν σημαντικά από τις ίδιες ομάδες παρόλο που το ποσοστό θετικής χρώσης ήταν αυξημένο ($15,03 \pm 7,52 \%$). Αντίθετα, υπήρξε μια σημαντικά χαμηλότερη συγκέντρωση TIMP-2 στην ομάδα ATR-3D ($6,57 \pm 4,11 \%$) σε σχέση με τις ομάδες ATF και ATS ($p < 0,05$), ενώ οι ATR-7D και ATR-6W δεν παρουσίασαν σημαντική μείωση σε σύγκριση με τις ίδιες ομάδες ($p > 0,05$).

3.2.4.7 Ανοσοϊστοχημική χρώση TNF-a

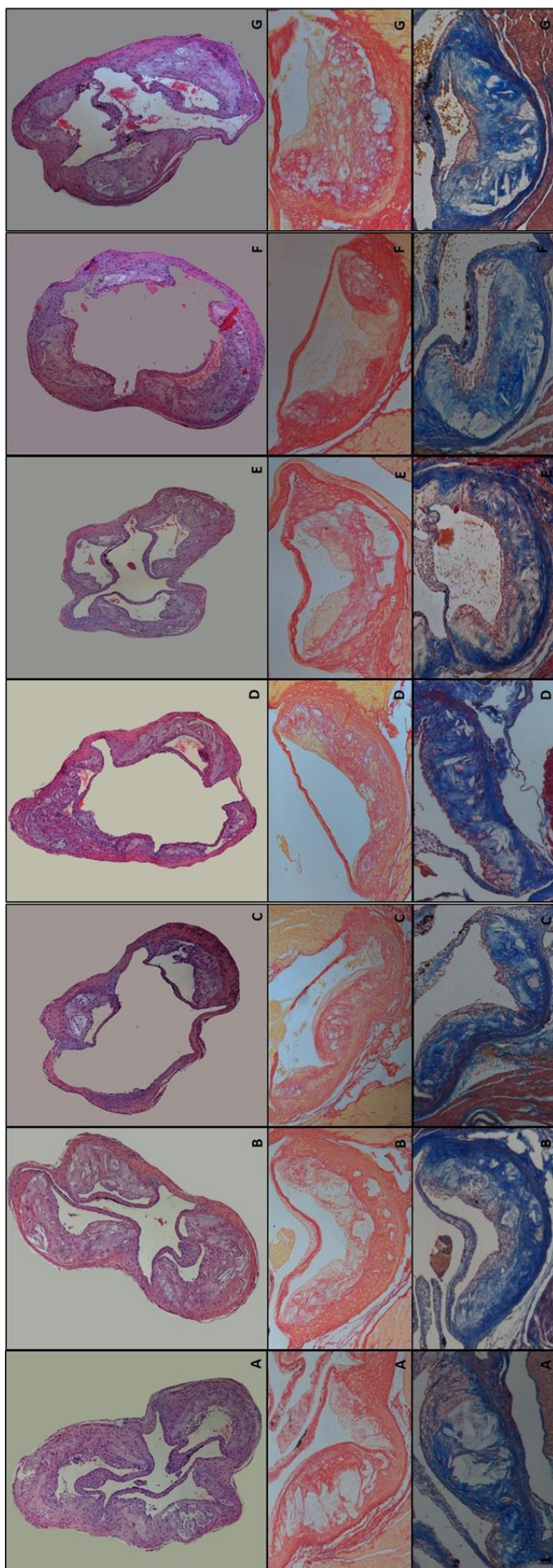
Ιστολογικές τομές όλων των ομάδων χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό του ποσοστού θετικής χρώσης του αντισώματος έναντι του παράγοντα νέκρωσης όγκων (TNF-a). Ο παραπάνω σχετικός ποσοτικός έλεγχος έδειξε ότι οι αθηρωματικές πλάκες των μυών που ακολούθησαν το πρόγραμμα χορήγησης για 6 και 12 εβδομάδες χωρίς διακοπή παρουσίαζαν μικρότερη έκταση θετικής χρώσης για τον TNF-a έναντι των μυών στους οποίους δεν χορηγήθηκε στατίνη (ATF: $5,04 \pm 3,68 \%$ και ATS: $14,07 \pm 6,38 \%$ έναντι CO-16W: $21,69 \pm 4,67 \%$ και CO-22W: $21,18 \pm 1,81 \%$, $p < 0,05$). Στατιστικά σημαντική διαφορά υπήρξε και μεταξύ των ομάδων ATF και ATS με τη δεύτερη να εμφανίζει αύξηση των επιπέδων TNF-a, εντούτοις το ποσοστό ήταν σημαντικά χαμηλότερο συγκριτικά με τις ομάδες ελέγχου. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι οι ομάδες ATR-3D ($16,67 \pm 6,77\%$) και ATR-7D ($14,25 \pm 4,90\%$) εμφάνισαν σημαντικά υψηλότερες συγκεντρώσεις TNF-a εντός των αθηρωματικών πλακών σε σχέση με τους μύες της ομάδας ATF ($p < 0,05$).

3.2.4.8 Ανοσοϊστοχημική χρώση MCP-1

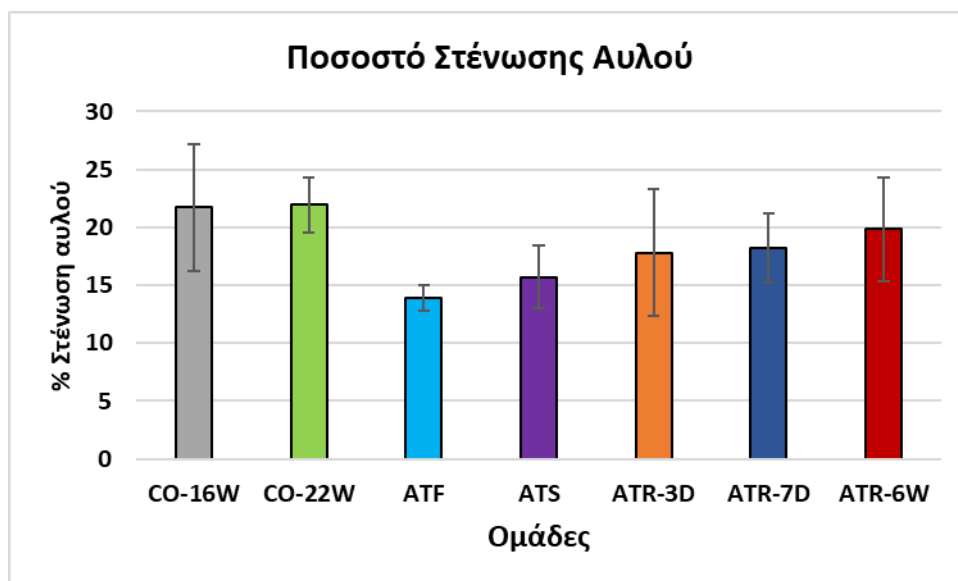
Από την ανοσοϊστοχημική ανάλυση των τομών για τον MCP-1 προέκυψε ότι στις ομάδες ATF και ATS τα ποσοστά θετικής χρώσης στις αθηρωματικές πλάκες ήταν εμφανώς μειωμένα

παρουσιάζοντας στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με τις ομάδες CO-16W και CO-22W (ATF: $7,23 \pm 6,22$ % και ATS: $4,67 \pm 2,28$ % έναντι CO-16W: $17,84 \pm 5,30$ % και CO-22W: $21,24 \pm 10,74$ %, $p < 0,05$). Η ευεργετική επίδραση της ατορβαστατίνης φαίνεται να αναιρείται όταν διακόπτεται η χορήγησή της με την ομάδα ATR-3D να παρουσιάζει στατιστικά σημαντικά υψηλότερα επίπεδα MCP-1 ($24,00 \pm 5,87$ %) σε σύγκριση με τις υπόλοιπες ομάδες θεραπείας ($p < 0,001$) φτάνοντας τις τιμές των ομάδων στις οποίες δεν είχε χορηγηθεί θεραπεία.

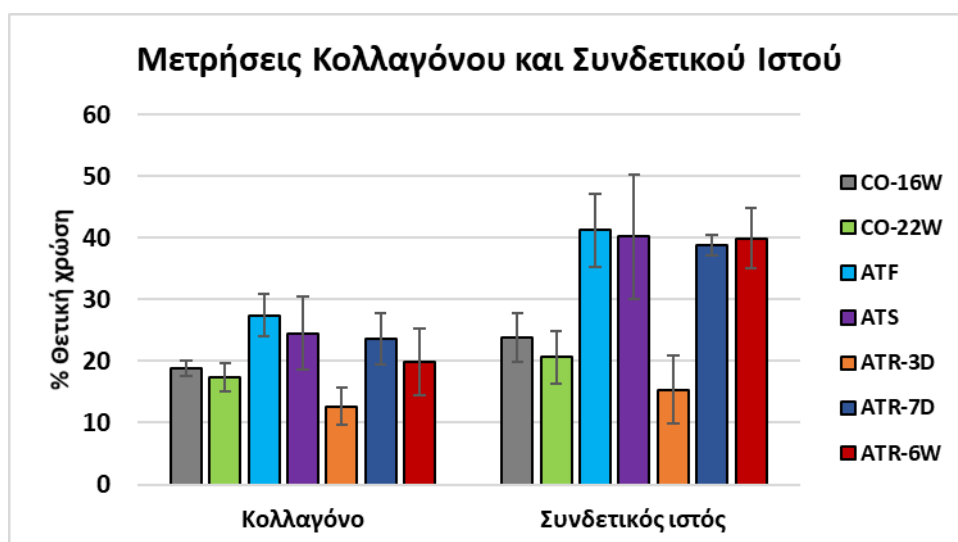
Πίνακας 3.2: Ιστομορφομετρικά αποτελέσματα σχετικά με την αθηροσκληρωτική στένωση της αορτικής ρίζας, το κολλαγόνο εντός της πλάκας, το συνδετικός ιστό εντός της πλάκας το ποσοστό θετικής χρώσης IHC για τα συστατικά της πλάκας.							
	Ομάδες						
	CO-16W	CO-22W	ATF	ATS	ATR-3D	ATR-7D	ATR-6W
	(M.O. \pm SD)						
Έκταση πλάκας ($\times 10^3 \mu\text{m}^2$)	$6,35 \pm 3,06$	$6,83 \pm 1,46$	$16,22 \pm 5,00$	$3,66 \pm 1,13$	$5,67 \pm 3,56$	$5,79 \pm 1,75$	$6,94 \pm 2,81$
Έκταση αυλού ($\times 10^3 \mu\text{m}^2$)	$20,88 \pm 5,83$	$24,10 \pm 2,33$	$109,07 \pm 18,26$	$20,62 \pm 3,22$	$23,43 \pm 7,12$	$25,69 \pm 5,52$	$28,32 \pm 4,43$
Στένωση αυλού (%)	$2174 \pm 5,49$	$21,95 \pm 2,40$	$13,90 \pm 1,08$	$15,70 \pm 2,68$	$17,81 \pm 5,48$	$18,19 \pm 2,96$	$19,83 \pm 4,50$
Κολλαγόνο (%)	$18,76 \pm 1,23$	$17,35 \pm 2,27$	$27,46 \pm 3,47$	$24,55 \pm 5,94$	$12,70 \pm 3,10$	$23,58 \pm 4,19$	$19,92 \pm 5,37$
Συνδετικός ιστός (%)	$23,91 \pm 13,94$	$20,68 \pm 14,29$	$41,23 \pm 5,97$	$40,22 \pm 10,05$	$15,35 \pm 7,49$	$38,74 \pm 1,63$	$39,95 \pm 4,95$
α-actin (SMCs) (%)	$8,61 \pm 0,56$	$12,19 \pm 0,67$	$28,28 \pm 6,67$	$16,00 \pm 6,06$	$22,03 \pm 7,94$	$21,76 \pm 7,15$	$15,36 \pm 6,57$
Mac-3 (μακροφάγα) (%)	$14,36 \pm 3,46$	$28,71 \pm 9,09$	$11,02 \pm 0,70$	$10,96 \pm 4,46$	$20,85 \pm 2,50$	$19,25 \pm 3,11$	$22,09 \pm 8,17$
MMP-2 (%)	$11,46 \pm 1,98$	$19,22 \pm 6,21$	$8,56 \pm 3,75$	$14,51 \pm 2,62$	$18,64 \pm 7,05$	$16,26 \pm 7,95$	$18,64 \pm 5,01$
MMP-3 (%)	$17,95 \pm 3,18$	$26,11 \pm 4,18$	$12,60 \pm 4,74$	$11,81 \pm 4,60$	$27,26 \pm 8,84$	$26,50 \pm 11,82$	$18,08 \pm 7,20$
MMP-9 (%)	$17,00 \pm 2,38$	$23,00 \pm 6,64$	$10,58 \pm 1,74$	$12,35 \pm 3,82$	$21,31 \pm 4,87$	$15,58 \pm 6,45$	$18,78 \pm 8,24$
TIMP-2 (%)	$8,67 \pm 3,84$	$6,33 \pm 2,26$	$19,20 \pm 4,78$	$15,28 \pm 4,69$	$9,04 \pm 3,79$	$15,14 \pm 4,78$	$12,15 \pm 3,67$
TNFα (%)	$21,69 \pm 4,67$	$21,18 \pm 1,81$	$7,25 \pm 3,58$	$14,07 \pm 6,38$	$16,67 \pm 6,77$	$14,13 \pm 5,00$	$16,02 \pm 2,76$
MCP-1 (%)	$17,84 \pm 5,30$	$24,04 \pm 4,68$	$12,08 \pm 0,91$	$13,14 \pm 5,73$	$24,00 \pm 5,87$	$13,57 \pm 4,27$	$12,93 \pm 3,57$



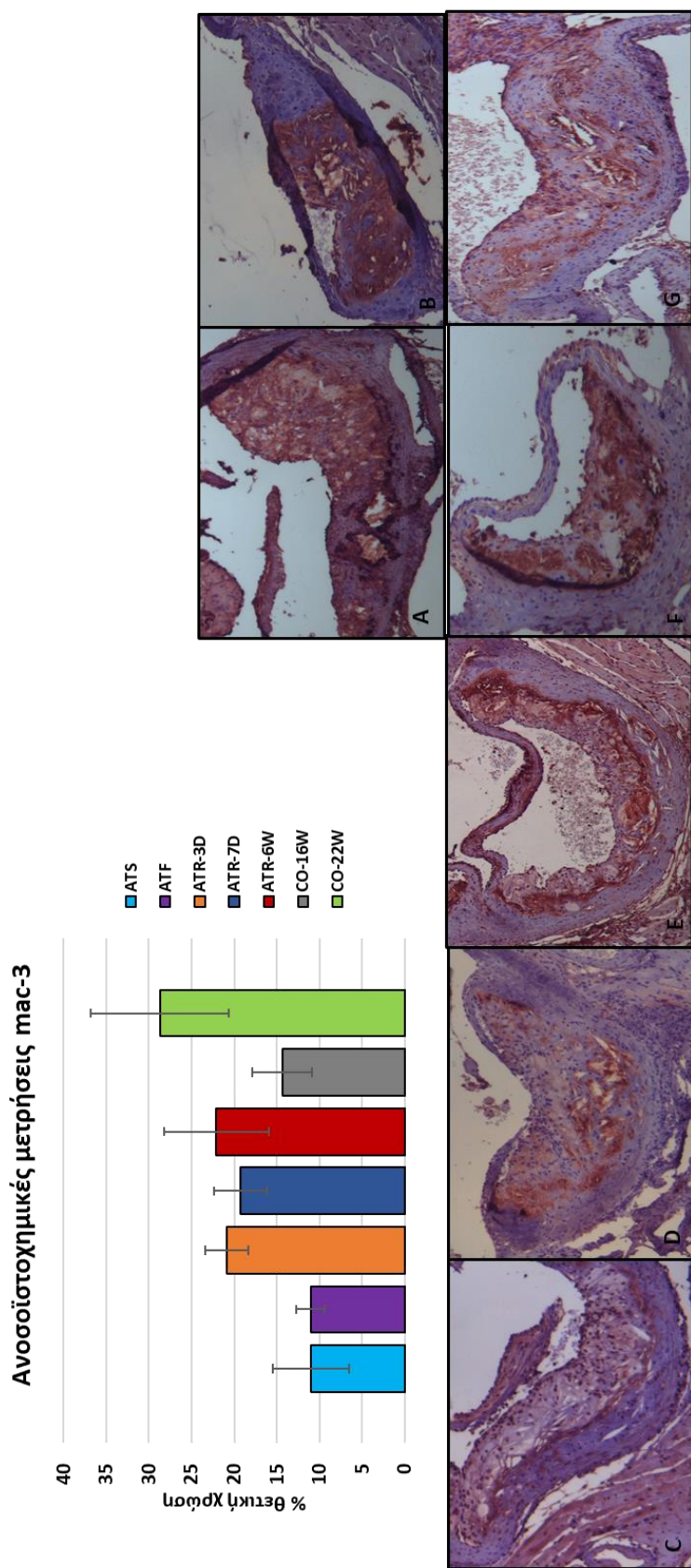
Εικόνα 10: Αντιπροσωπευτικές εικόνες της ιστομορφομετρικής ανάλυσης των αθηρωματικών πλακών: Χρώση αιματοξυλίνης / ηωσίνης για μορφομετρία (άνω πάνελ), Sirius Red για κολλαγόνο (μεσαίο πάνελ) και τριχρωμη Masson για τον συνδετικό ιστό (κάτω πάνελ) (20x). **A & B:** ομάδες ελέγχου υπό αθηρογόνο τροφή για 6 και 12 εβδομάδες αντίστοιχα (CO-16W και CO-22W), **C:** Ομάδα ATF που έλαβε ατορβαστατίνη 20 mg / kg ημερησίως για 12 εβδομάδες, **D:** Ομάδα ATS που έλαβε ατορβαστατίνη 20 mg / kg ημερησίως για 6 εβδομάδες, **E, F & G:** ATR-3D, ATR-7D και ATR-6W που έλαβαν ατορβαστατίνη 20 mg / kg ημερησίως επί 6 εβδομάδες και στη συνέχεια απομακρύνθηκε η ατορβαστατίνη για 3 ημέρες, 7 ημέρες, 6 εβδομάδες αντίστοιχώς.



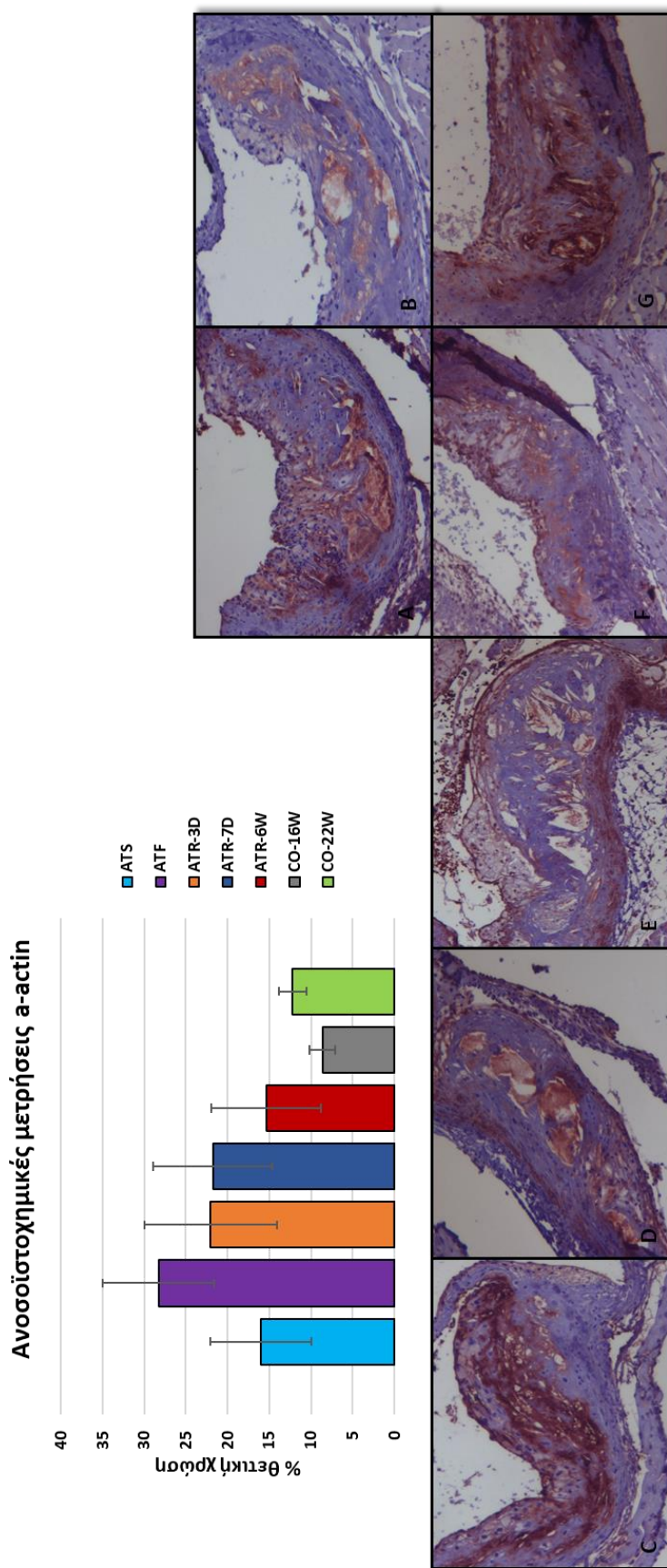
Σχήμα 3: Ραβδογράμματα παρουσίασης του ποσοστού στένωσης αυλού όπως μετρήθηκε στην αορτική βαλβίδα για τις 7 ομάδες πειραματοζώων



Σχήμα 4: Το ποσοστό θετικής χρώσης για κολλαγόνο και του συνδετικού ιστού στις αθηρωματικές πλάκες της αορτικής βαλβίδας για τις 7 ομάδες πειραματοζώων

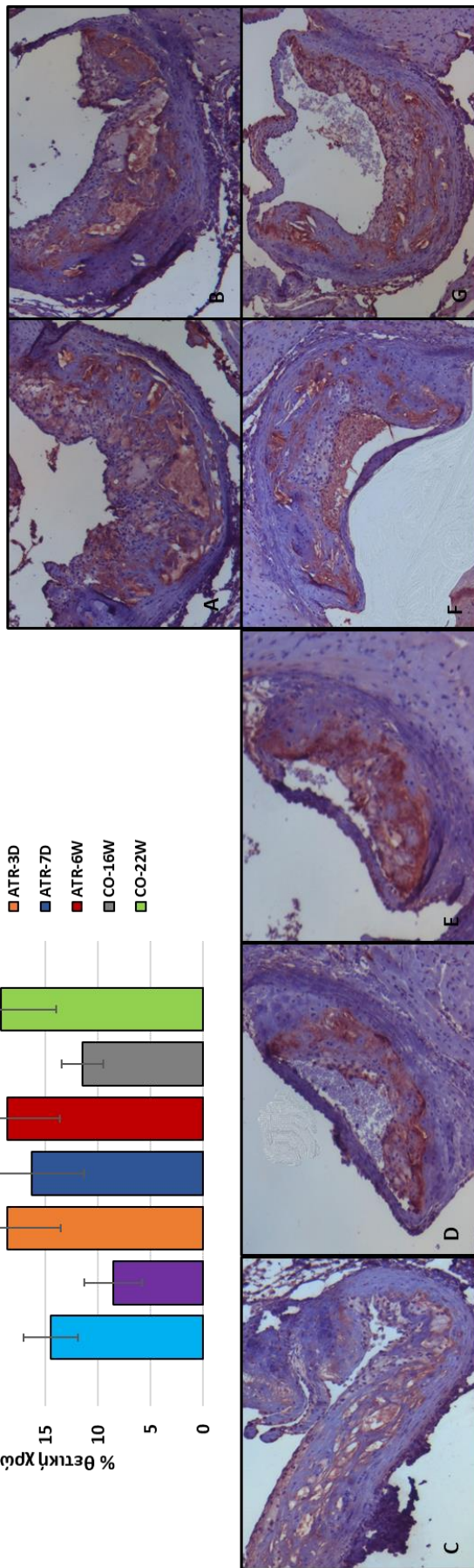
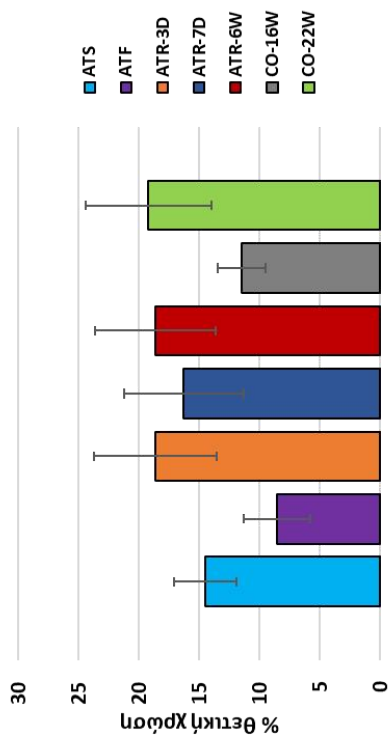


Εικόνα 11: Αντιπροσωπευτικές εικόνες ανάλυσης των αθηρωματικών πλακών μετά από ανοσοϊστοχημική χρώση με αντίσωμα anti-mac-3. Παράλληλα, απεικονίζονται σχηματικά με τη βοήθεια διαγράμματος οι μετρήσεις για το ίδιο αντίσωμα. (20x). **A & B:** ομάδες ελέγχου υπό αθηρογόνο τροφή για 6 και 12 εβδομάδες αντιστοίχα (CO-16W και CO-22W), **C:** Ομάδα ATF που έλαβε ατορβαστατίνη 20 mg / kg ημερησίως για 12 εβδομάδες, **D:** Ομάδα ATS που έλαβε ατορβαστατίνη 20 mg / kg ημερησίως για 6 εβδομάδες, **E, F & G:** ATR-3D, ATR-7D και ATR-6W που έλαβαν ατορβαστατίνη 20 mg / kg ημερησίως επί 6 εβδομάδες και στη συνέχεια απομακρύνθηκε η ατορβαστατίνη για 3 ημέρες, 7 ημέρες και 6 εβδομάδες αντιστοίχως.

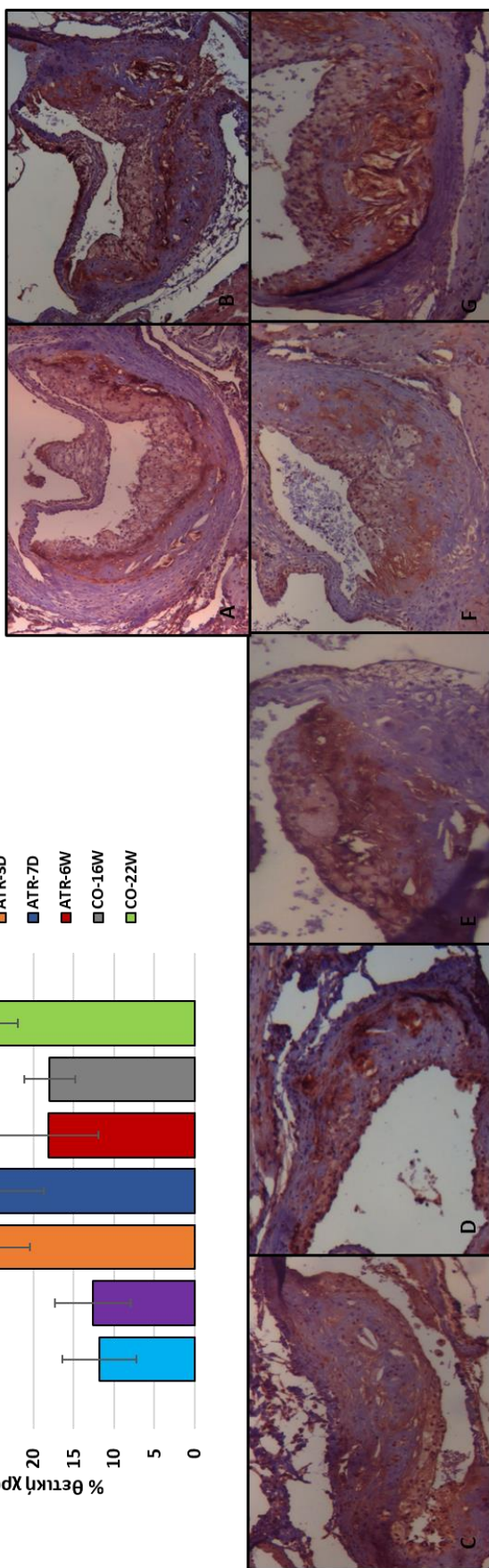
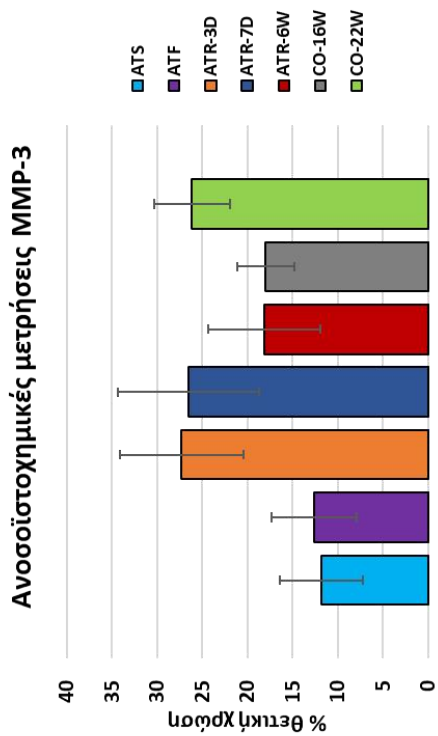


Εικόνα 12: Αντιπροσωπευτικές εικόνες ανάλυσης των αθηρωματικών πλακών μετά από ανοσοϊστοχημική χρώση με αντίσωμα anti- α -actin. Παράλληλα, απεικονίζονται σχηματικά με τη βοήθεια διαγράμματος οι μετρήσεις για το ίδιο αντίσωμα. (20x). **A & B:** ομάδες ελέγχου υπό αθηρογόνο τροφή για 6 και 12 εβδομάδες αντίστοιχα (CO-16W και CO-22W), **C:** Ομάδα ATF που έλαβε ατορβαστατίνη 20 mg / kg ημερησίως για 12 εβδομάδες, **D:** Ομάδα ATS που έλαβε ατορβαστατίνη 20 mg / kg ημερησίως για 6 εβδομάδες, **E, F & G:** Ομάδες ATR-3D, ATR-7D και ATR-6W που έλαβαν ατορβαστατίνη 20 mg / kg ημερησίως επί 6 εβδομάδες και στη συνέχεια απομακρύνθηκε η ατορβαστατίνη για 3 ημέρες, 7 ημέρες και 6 εβδομάδες αντιστοίχως.

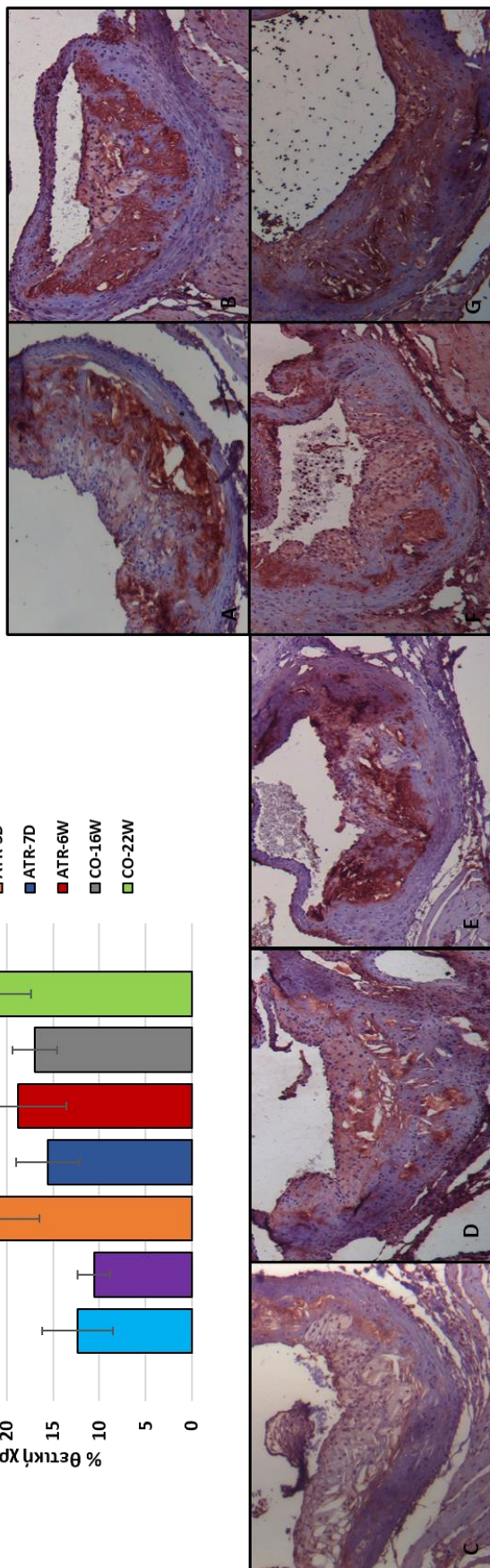
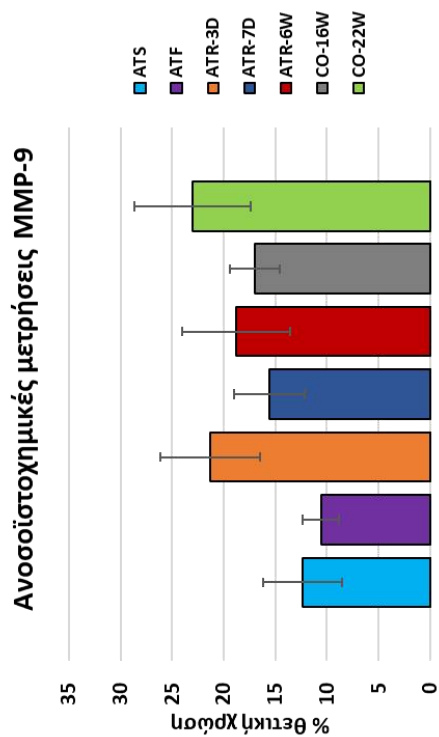
Ανοσοϊστοχημικές μετρήσεις MMP-2



Εικόνα 13: Αντιπροσωπευτικές εικόνες ανάλυσης των αθηρωματικών πλακών μετά από ανοσοϊστοχημική χρώση με αντίσωμα anti-MMP-2. Παράλληλα, απεικονίζονται σχηματικά με τη βοήθεια διαγράμματος οι μετρήσεις για το ίδιο αντίσωμα. (20x). **A & B:** ομάδες ελέγχου υπό αθηρογόνο τροφή για 6 και 12 εβδομάδες αντίστοιχα (CO-16W και CO-22W), **C:** Ομάδα ATF που έλαβε ατορβαστατίνη 20 mg / kg ημερησίως για 12 εβδομάδες, **D:** Ομάδα ATS που έλαβε ατορβαστατίνη 20 mg / kg ημερησίως για 6 εβδομάδες, **E, F & G:** ATR-3D, ATR-7D και ATR-6W που έλαβαν ατορβαστατίνη 20 mg / kg ημερησίως και στη συνέχεια απομακρύνθηκε η ατορβαστατίνη για 3 ημέρες, 7 ημέρες και 6 εβδομάδες αντίστοιχως.

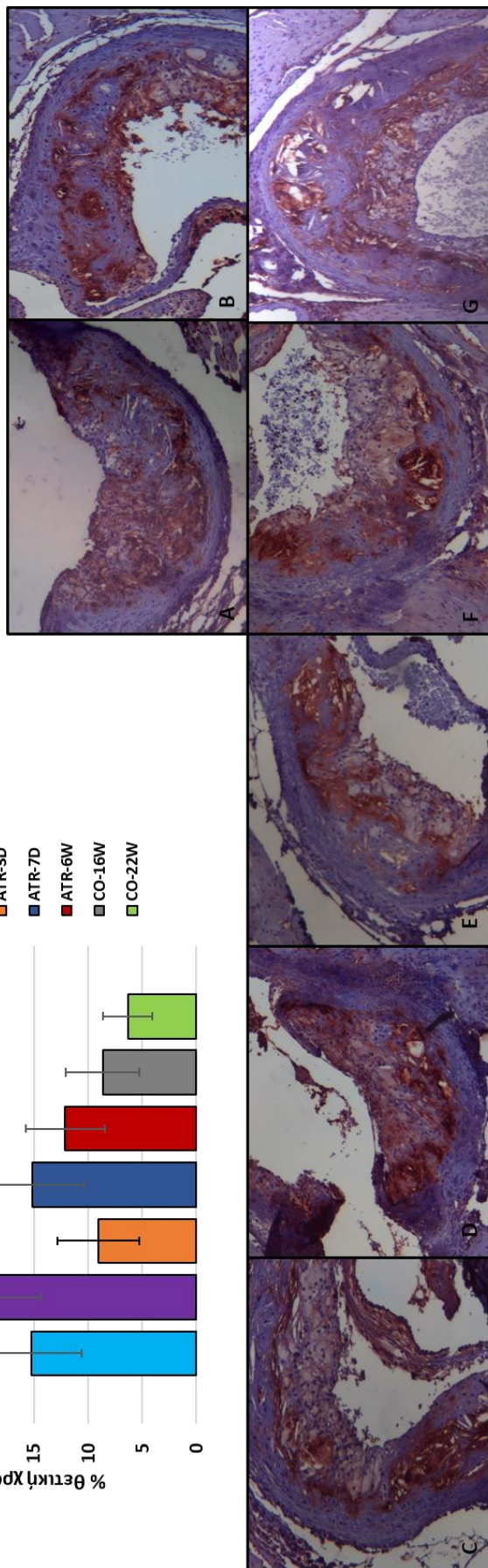
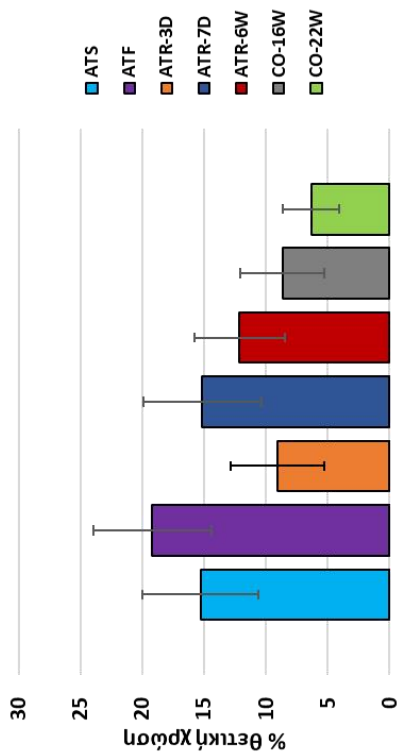


Εικόνα 14: Αντιπροσωπευτικές εικόνες ανάλυσης των αθηρωματικών πλάκων μετά από ανοσοϊστοχημική χρώση με αντίσωμα anti-MMP-3. Παράλληλα, απεικονίζονται σχηματικά με τη βοήθεια διαγράμματος οι μετρήσεις για το ίδιο αντίσωμα. (A & B: ομάδες ελέγχου υπό αθηρογόνο τροφή για 6 και 12 εβδομάδες αντίστοιχα (CO-16W και CO-22W), C: Ομάδα ATF που έλαβε ατορβαστατίνη 20 mg / kg ημερησίως για 12 εβδομάδες, D: Ομάδα ATS που έλαβε ατορβαστατίνη 20 mg / kg ημερησίως για 6 εβδομάδες, E, F & G: ATR-3D, ATR-6W και ATR-7D που έλαβαν ατορβαστατίνη 20 mg / kg ημερησίως επί 6 εβδομάδες και στη συνέχεια απομακρύνθηκε η ατορβαστατίνη για 3 ημέρες, 7 ημέρες και 6 εβδομάδες αντίστοιχώς.



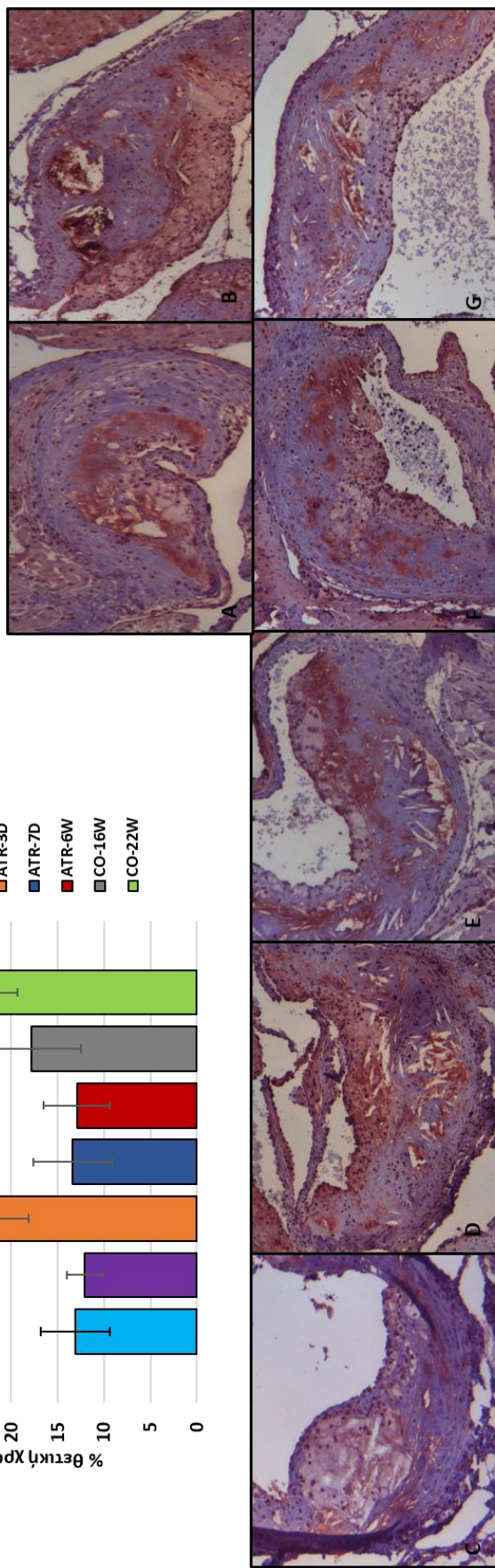
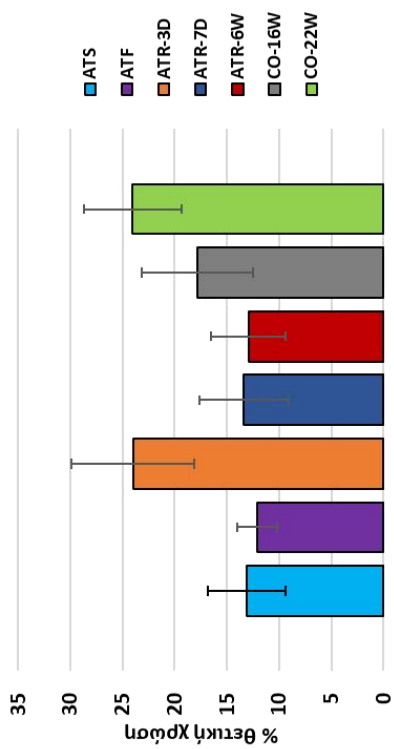
Εικόνα 15: Αντιπροσωπευτικές εικόνες ανάλυσης των αθηρωματικών πλακών μετά από ανοσοϊστοχημική χρώση με αντίσωμα anti-MMP-9. Παράλληλα, απεικονίζονται σχηματικά με τη βοήθεια διαγράμματος οι μετρήσεις για το ίδιο αντίσωμα. **A & B:** ομάδες ελέγχου υπό αθηρογόνο τροφή για 6 και 12 εβδομάδες αντίστοιχα (CO-16W και CO-22W), **C:** Ομάδα ATF που έλαβε ατορβαστατίνη 20 mg / kg ημερησίως για 12 εβδομάδες, **D:** Ομάδα ATS που έλαβε ατορβαστατίνη 20 mg / kg ημερησίως για 6 εβδομάδες, **E, F & G:** ATR-3D, ATR-7D και ATR-6W που έλαβαν ατορβαστατίνη 20 mg / kg ημερησίως επί 6 εβδομάδες και στη συνέχεια απομακρύνθηκε η ατορβαστατίνη για 3 ημέρες, 7 ημέρες και 6 εβδομάδες αντίστοιχως.

Ανοοϊστοχημικές μετρήσεις TIMP-2



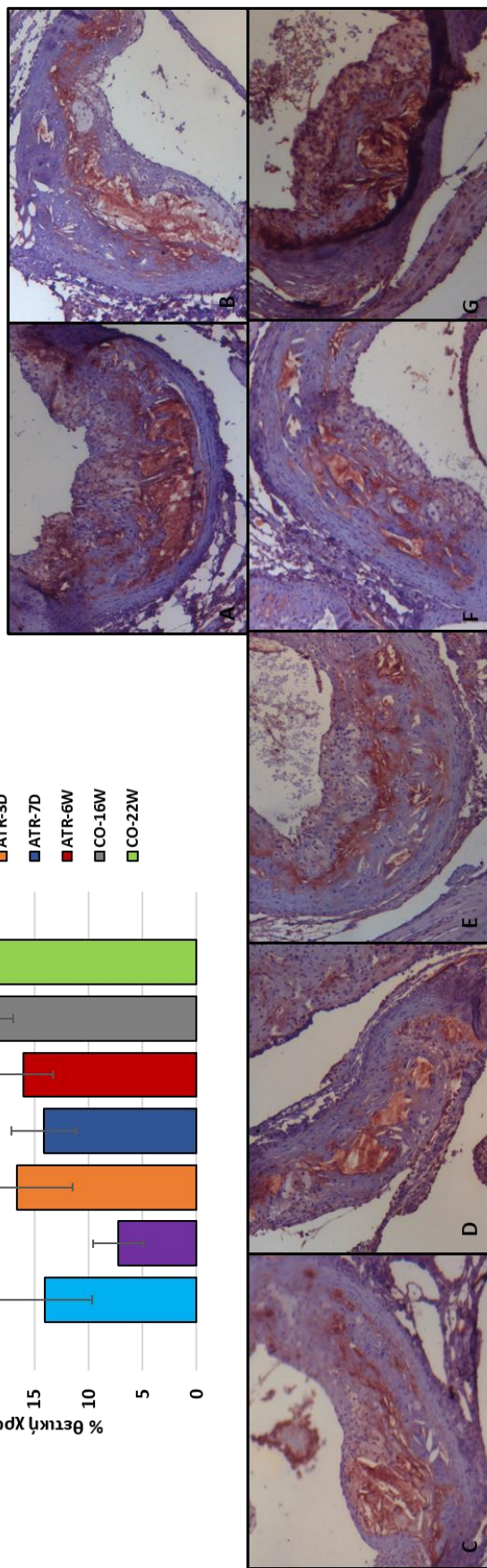
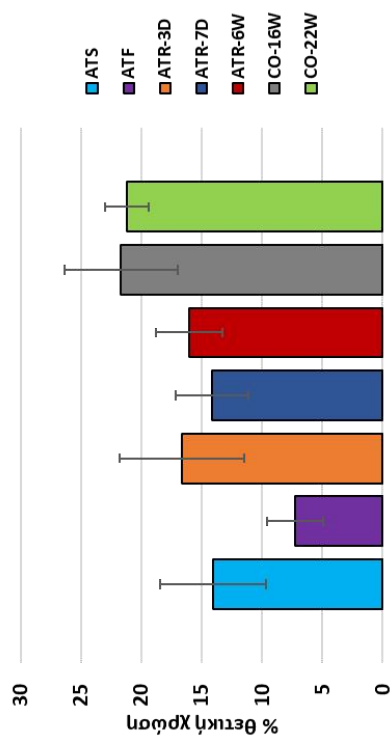
Εικόνα 16: Αντιπροσωπευτικές εικόνες ανάλυσης των αθηρωματικών πλακών μετά από ανοοϊστοχημική χρώση με αντίσωμα anti-TIMP-2. Παράλληλα, απεικονίζονται σχηματικά με τη βοήθεια διαγράμματος οι μετρήσεις για το ίδιο αντίσωμα. (20x). **A & B:** ομάδες ελέγχου υπό αθηρογόνο τροφή για 6 και 12 εβδομάδες αντίστοιχα (CO-16W και CO-22W), **C:** Ομάδα ATF που έλαβε ατορβαστατίνη 20 mg / kg ημερησίως για 12 εβδομάδες, **D:** Ομάδα ATS που έλαβε ατορβαστατίνη 20 mg / kg ημερησίως για 6 εβδομάδες, **E, F & G:** ATR-3D, ATR-7D και ATR-6W που έλαβαν ατορβαστατίνη 20 mg / kg ημερησίως και στη συνέχεια απομακρύνθηκε η ατορβαστατίνη για 3 ημέρες, 7 ημέρες και 6 εβδομάδες αντίστοιχως.

Ανοσοϊστοχημικές μετρήσεις MCP-1



Εικόνα 17: Αντιπροσωπευτικές εικόνες ανάλυσης των αθηρωματικών πλακών μετά από ανοσοϊστοχημική χρώση με αντίσωμα anti-MCP-1. Παράλληλα, απεικονίζονται σχηματικά με τη βοήθεια διαγράμματος οι μετρήσεις για το ίδιο αντίσωμα. (20x). **A & B:** ομάδες ελέγχου υπό αθηρογόνο τροφή για 6 και 12 εβδομάδες αντίστοιχα (CO-16W και CO-22W), **C:** Ομάδα ATF που έλαβε ατορβαστατίνη 20 mg / kg ημερησίως για 6 εβδομάδες, **D:** Ομάδα ATS που έλαβε ατορβαστατίνη 20 mg / kg ημερησίως για 6 εβδομάδες, **E, F & G:** ATR-3D, ATR-7D και ATR-6W που έλαβαν ατορβαστατίνη 20 mg / kg ημερησίως, 7 ημέρες, 7 ημερές και 6 εβδομάδες αντίστοιχως, για 3 ημέρες, 7 ημέρες, 7 ημερές και 6 εβδομάδες αντίστοιχως.

Ανοσοϊστοχημικές μετρήσεις TNF-α



Εικόνα 18: Αντιπροσωπευτικές εικόνες ανάλυσης των αθηρωματικών πλακών μετά από ανοσοϊστοχημική χρώση με αντίσωμα anti-TNF-α. Παράλληλα, απεικονίζονται σχηματικά με τη βοήθεια διαγράμματος οι μετρήσεις για το ίδιο αντίσωμα. (A & B: ομάδες ελέγχου υπό αθηρογόνο τροφή για 6 και 12 εβδομάδες αντίστοιχα (CO-16W και CO-22W), C: Ομάδα ATF που έλαβε ατορβαστατίνη 20 mg / kg ημερησίως για 12 εβδομάδες, D: Ομάδα ATS που έλαβε ατορβαστατίνη 20 mg / kg ημερησίως για 6 εβδομάδες, E, F & G: ATR-3D, ATR-7D και ATR-6W που έλαβαν ατορβαστατίνη 20 mg / kg ημερησίως επί 6 εβδομάδες και στη συνέχεια απομακρύνθηκε η ατορβαστατίνη για 3 ημέρες, 7 ημέρες και 6 εβδομάδες αντίστοιχως.

ΜΕΡΟΣ ΤΡΙΤΟ: ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Ένας μεγάλος αριθμός κλινικών και ζωικών μελετών έχει αποδείξει τα αθηροπροστατευτικά αποτελέσματα των στατινών, ενώ δεν είναι ακόμη σαφές εάν και πώς η διακοπή λήψης των στατινών επηρεάζει την εξέλιξη και τη σταθερότητα της αθηρωματικής πλάκας κατά τη διάρκεια του χρόνου. Η χορήγηση υψηλής περιεκτικότητας σε λιπαρά “δυτικού τύπου” τροφής σε ApoE-/- μύες οδηγεί στην ανάπτυξη αθηρωματικών πλακών σημαντικού μεγέθους στο αορτικό τόξο, οι οποίες φέρουν παρόμοια χαρακτηριστικά με εκείνα των προχωρημένων αθηρωματικών βλαβών στον άνθρωπο και επιπλέον χαρακτηρίζονται ιστολογικά από αστάθεια (μειωμένη περιεκτικότητα σε ελαστίνη, κολλαγόνο και λεία μυϊκά κύτταρα και αντίθετα αυξημένη παρουσία μακροφάγων).

Στην παρούσα πειραματική μελέτη χρησιμοποιήσαμε μύες στους οποίους είχε αναπτυχθεί αθηρωμάτωση και που ήδη ελάμβαναν ατορβαστατίνη. Μετά την παύση της χορήγησης ατορβαστατίνης, αποδείξαμε μια οξεία απότομη αποσταθεροποίηση της αθηρωματικής πλάκας, η οποία στη συνέχεια εξασθένησε. Έτσι, η σταθερότητα της πλάκας «αποκαταστάθηκε» μερικώς μετά την οξεία φάση και άρχισε πάλι να μειώνεται με λιγότερο απότομο τρόπο. Αντιστρόφως, οι αριθμοί μακροφάγων κυττάρων και η πλειονότητα των φλεγμονωδών παραγώγων εντός πλακών, συμπεριλαμβανομένων των MCP-1, TNF- α , MMP-3 και MMP-9, εμφάνισαν οξεία αύξηση λίγο μετά την απόσυρση της ατορβαστατίνης. Το φαινόμενο αυτό συνεχίστηκε με λιγότερο αργό ρυθμό το υπόλοιπο χρονικό διάστημα.

Όπως αναμενόταν, επιδείξαμε μικρότερες και πιο σταθερές αθηρωματικές αλλοιώσεις στην αορτή των αθηρωματικών μυών μετά από μακροχρόνια θεραπεία με ατορβαστατίνη 20 mg/kg. Η βελτίωση αυτή φαίνεται να εξαρτάται από μηχανισμούς ανεξάρτητους του ελέγχου των λιπιδίων. Επιπλέον, η συνεχής χορήγηση ατορβαστατίνης οδήγησε σε σημαντική καταστολή του φλεγμονώδους περιβάλλοντος, όπως απεικονίζεται από τις χαμηλότερες συγκεντρώσεις των MMP, MCP-1 και TNF- α . Όσον αφορά τις μη σημαντικές αλλαγές στα επίπεδα των λιπιδίων σε μύες που ελάμβαναν ατορβαστατίνη καθ' όλη τη διάρκεια της μελέτης, η αντι-αθηροσκληρωτική επίδραση της ατορβαστατίνης αποδόθηκε στους σχετικούς μη-λιπιδικούς, αντιφλεγμονώδεις μηχανισμούς. Απ' όσο γνωρίζουμε αυτή είναι η πρώτη μελέτη που εξετάζει τις βραχυχρόνιες επιδράσεις της διακοπή χορήγησης στατινής στον φαινότυπο της πλάκας. Προηγούμενες κλινικές μελέτες έχουν τεκμηριώσει οξέα καρδιαγγειακά συμβάματα νωρίς μετά την διακοπή της πρόσληψης στατινής, χωρίς αξιολόγηση των συνακόλουθων μεταβολών στις αθηρωματικές πλάκες. Η μελέτη PRISM διερεύνησε τις επιδράσεις των στατινών στα ποσοστά καρδιακών επεισοδίων σε 1.616 ασθενείς που είχαν συμπτώματα CAD και θωρακικού πόνου⁴⁴³. Η διακοπή της στατινής μετά την εισαγωγή σε

νοσοκομεία πολλαπλασίασε τον καρδιακό κίνδυνο κατά τη διάρκεια της παρακολούθησης των 30 ημερών σε σύγκριση με τους ασθενείς που συνέχισαν να λαμβάνουν στατίνη. Σε άλλα μητρώα μεγάλης κλίμακας, όπως το Εθνικό Μητρώο Εμφράγματος του Μυοκαρδίου 4⁴⁴⁴ και το Παγκόσμιο Μητρώο Οξέων Στεφανιαίων Επεισοδίων (GRACE) 4⁴⁴⁵, οι ασθενείς με ACS που διέκοψαν τη στατίνη έχασαν γρήγορα τα οφέλη των στατινών και εμφάνισαν χειρότερες επιπτώσεις 4⁴⁴⁶. Αυτά τα κλινικά αποτελέσματα οδήγησαν προηγούμενους ερευνητές να υποθέσουν μια οξεία αποσταθεροποίηση των αθηρωματικών πλακών.

Στη μελέτη μας, αξιολογήσαμε ιστολογικά την ευπάθεια της πλάκας σε διάφορα χρονικά σημεία πριν και μετά τη διακοπή της ατορβαστατίνης, πραγματοποιώντας αξιολόγηση του περιεχομένου του συνδετικού ιστού και των φλεγμονωδών κυττάρων εντός των αθηρωματικών πλακών. Οι στατίνες έχουν επιδείξει θετικές επιδράσεις στην περιεκτικότητα της πλάκας σε κολλαγόνο 95, 407, 447, 448. Σύμφωνα με τους Moustardas et al. οι μύες ApoE - / - που υποβλήθηκαν σε αγωγή με ατορβαστατίνη 10 mg / kg εμφάνισαν μειωμένους αριθμούς μακροφάγων και αυξημένη περιεκτικότητα κολλαγόνου σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου, ενώ η ιστολογική εκτίμηση δεν αποκάλυψε σημαντικές διαφορές στα λεία μυϊκά κύτταρα (SMC) 4³⁹. Σύμφωνα με αυτές τις μελέτες, η αδιάλειπτη χορήγηση ατορβαστατίνης στον πληθυσμό των μυών μας αύξησε σημαντικά τα περιεχόμενα του κολλαγόνου και του συνδετικού ιστού της πλάκας, ενώ μειώθηκε το μέγεθος της βλάβης και οι συγκεντρώσεις των μακροφάγων. Αυτά τα αντι-αθηρωματικά και σταθεροποιητικά αποτελέσματα αναστράφηκαν στις ομάδες τρωκτικών με διακοπή της ατορβαστατίνης. Το πιο σημαντικό, ότι η αναστροφή ήταν πιο έντονη λίγο μετά την αφαίρεση της ατορβαστατίνης (3 ημέρες), όταν τα ποντίκια εμφάνισαν τις χαμηλότερες συγκεντρώσεις κολλαγόνου και συνδετικού ιστού και τα υψηλότερα επίπεδα μακροφάγων. Η αναστροφή αυτή μετριάστηκε και συνεχίστηκε, αλλά σε μικρότερο βαθμό στη συνέχεια (7 ημέρες και 6 εβδομάδες). Αυτή είναι η πρώτη μελέτη που αποδεικνύει μια άμεση σχέση μεταξύ της διακοπής χορήγησης στατίνης και της οξείας αποσταθεροποίησης της πλάκας. Ως εκ τούτου, το παρατηρούμενο φαινόμενο «αναστροφής» παρέχει μια λογική εξήγηση για την προαναφερθείσα υψηλή συχνότητα καρδιαγγειακών επεισοδίων σε κλινικές μελέτες μεταξύ ασθενών που διέκοψαν τη θεραπεία με στατίνες.

Αναζητώντας μια μηχανιστική εξήγηση, τεκμηριώσαμε μια οξεία, αξιοσημείωτη αύξηση της περιεκτικότητας σε μακροφάγα μέσα σε αθηρωματικές αλλοιώσεις, που ισοδυναμούν με τα επίπεδα των ελέγχων λίγο μετά την απόσυρση της ατορβαστατίνης. Στη συνέχεια, εξετάσαμε αν αυτές οι αλλαγές στους αριθμούς των μακροφάγων θα μπορούσαν να επηρεάσουν την παραγωγή και την έκκριση παραγώγων μακροφάγων, όπως οι MMP και οι φλεγμονώδεις μεσολαβητές, που σχετίζονται με την ευπάθεια της πλάκας. Όσον αφορά αυτή την υπόθεση, οι MCP-1 και TNF-α αυξήθηκαν σημαντικά απότομα μετά την αφαίρεση της ατορβαστατίνης. Αυτή η αύξηση της MCP-1

μπορεί να σχετίζεται με την ενεργοποίηση του πυρηνικού παράγοντα kB, με αποτέλεσμα την επαγωγή προφλεγμονωδών κυτοκινών όπως η IL-1b και ο TNF-α^{449, 450}. Οι κυτοκίνες πιστεύεται ότι παίζουν ένα διπλό ρόλο που ελέγχει την ανάπτυξη της πλάκας και την επακόλουθη ευπάθεια^{451, 452}. Για παράδειγμα, ο TNF-α μαζί με την MCP-1 διεγείρουν την έκφραση και απελευθέρωση μεταλλοπρωτεϊνών μήτρας όπως η MMP-3, παίζοντας σημαντικό ρόλο στην λέπτυνση του ινώδους κάψας και τη διάσπαση της αθηρωματικής πλάκας⁴⁵³. Τα δεδομένα από μελέτες ανθρώπινης παθολογίας έχουν δείξει αύξηση των επιπέδων της MMP-3 στις περιοχές «ώμου» των αθηρωματικών πλακών, όπου συνήθως παρατηρείται ρήξη της πλάκας¹⁴⁸. Συνεπώς, είναι πιθανό η αδιάλειπτη χορήγηση στατίνης να καταστέλλει συνεχώς την αθηρωματική φλεγμονώδη διήθηση και την παραγωγή MMP-3, η οποία απελευθερώθηκε απότομα (ομάδα ATR-3D) μετά τη διακοπή της ατορβαστατίνης. Είναι επίσης πολύ πιθανό ότι η αύξηση του αριθμού μακροφάγων, τα οποία είναι σημαντικοί κυτταρικοί φορείς της MMP-3 στο αθηρωματικό τοίχωμα, εξηγεί την παράλληλη αύξηση των επιπέδων MMP-3 στις ομάδες απομάκρυνσης.

Εκτός από τα επίπεδα της MMP-3, η ανάλυση μας αποκάλυψε επίσης σημαντική αύξηση των επιπέδων της MMP-9 στην ομάδα ATR-3D. Η MMP-9 έχει μελετηθεί εκτενώς για το ρόλο της στην αθηρωμάτωση, με πολυάριθμες μελέτες που καταδεικνύουν τον κυρίαρχο ρόλο της στην πορεία της νόσου καθώς εμπλέκεται έντονα στην αποικοδόμηση της εξωκυτταρικής μήτρας (ECM)¹⁴⁹. Η MMP-9 έχει ενεργή παρουσία σε όλη την αθηρογένεση, ενισχύοντας την ανάπτυξη της αθηρωματικής πλάκας μέσω της μετανάστευσης των VSMCs²⁴⁵ και προάγοντας την αποσταθεροποίηση της πλάκας με διήθηση μακροφάγων και αποδόμηση της ινώδους κάψας. Η ευεργετική επίδραση της χορήγησης στατίνης στις συγκεντρώσεις των MMP, παρουσιάστηκαν σε μελέτη των Fulumoto et al. σε υπερλιπιδαιμικά κουνέλια όπου τα επίπεδα των MMP-3 και MMP-9, εντός των περιοχών των αρτηριών που περιείχαν μακροφάγα, μειώθηκαν⁴⁵⁴. Η ιστοπαθολογική αξιολόγηση κουνελιών, ποντικών και ανθρώπινων αθηρωματικών δειγμάτων έδειξε υψηλή συγκέντρωση MMP-1, MMP-3 και MMP-9 μεταλλοπρωτεϊνών σε περιοχές με αυξημένη πιθανότητα ρήξης⁹⁶. Συνεπώς, η οξεία απομάκρυνση της κατασταλτικής επίδρασης των στατίνων στις φλεγμονώδεις διαδικασίες, οδηγεί σε μια «αναστροφή» της διέγερσης φλεγμονωδών παραγόντων που μοιάζουν με «απότομη απελευθέρωση σπειράματος». Αυτή η φλεγμονώδης «έκρηξη» με τη σειρά της προκαλεί οξεία αποσταθεροποίηση της πλάκας και θα μπορούσε ενδεχομένως να προκαλέσει διάφορα οξεία καρδιαγγειακά επεισόδια όπως η χρόνια ισχαιμία, το έμφραγμα του μυοκαρδίου και ο θάνατος.

Επί του παρόντος, υπάρχουν αρκετά άρθρα που περιγράφουν ένα φαινόμενο αναστροφής της φλεγμονώδους αντίδρασης μετά την απόσυρση των στατινών^{455, 456}. Παρόλο που οι μηχανισμοί της αυξημένης συχνότητας εμφάνισης καρδιαγγειακών επεισοδίων μετά από απότομη διακοπή της

θεραπείας με στατίνες είναι ακόμη άγνωστοι, μπορεί να υποστηριχθεί ότι η προστατευτική αντιφλεγμονώδης επίδραση της θεραπείας με στατίνη ανακαλείται, συμβάλλοντας έτσι στην αποσταθεροποίηση της αθηρωματικής πλάκας.

Οι ApoE -/- μύες είναι ένα έγκυρο ζωικό μοντέλο για τη μελέτη της παθοφυσιολογίας της αθηρωμάτωσης, αφού οι αθηρωματικές πλάκες παρουσιάζουν παρόμοια χαρακτηριστικά με εκείνα των ανθρώπων. Ωστόσο, υπάρχουν διαφορές με τους ανθρώπους στον μεταβολισμό της χοληστερόλης, το προφίλ των λιπιδίων και την καρδιαγγειακή φυσιολογία^{457, 458}. Επιπλέον, με την αυθόρμητη ρήξη πλάκας να είναι σπάνια σε ποντίκια, η αξιολόγηση της ευπάθειας της πλάκας μπορεί να πραγματοποιηθεί έμμεσα μέσω της σύνθεσης της πλάκας σε συστατικά της ECM και δείκτες φλεγμονής⁴⁵⁹.

Συμπερασματικά, η αδιάλειπτη χορήγηση ατορβαστατίνης εξασθένησε την εξέλιξη της αθηρωμάτωσης και ενίσχυσε την σταθερότητα της πλάκας μέσω της καταστολής του φλεγμονώδους δυναμικού εντός των αορτικών αθηρωματικών βλαβών των υπερχοληστερολαιμικών ApoE -/- μυών. Ωστόσο, όταν η θεραπεία με ατορβαστατίνη διακόπηκε ξαφνικά, η αθηροπροστατευτική δράση της φάνηκε να ανακαλείται αμέσως, οδηγώντας σε οξεία αποσταθεροποίηση της πλάκας. Η οξεία απελευθέρωση φλεγμονωδών μεσολαβητών εντός των αθηρωματικών πλακών μετά τη διακοπή της στατίνης μπορεί να εξηγεί μηχανιστικά τις δυσμενείς και υπερβολικές αλλοιώσεις στη σταθερότητα της πλάκας βραχυπρόθεσμα. Αυτά τα αποτελέσματα εξομαλύνθηκαν στη συνέχεια, οδηγώντας τελικά σε μια σταδιακή αποσταθεροποίηση πλάκας μακροπρόθεσμα. Τα ευρήματά μας είναι κλινικά σημαντικά περιγράφοντας τις ανεπιθύμητες ενέργειες σε ασθενείς υψηλού κινδύνου που δεν συμμορφώνονται με τη μη διακοπτόμενη θεραπεία με στατίνες.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Nichols M, Townsend, N., Luengo-Fernandez, R., Leal, J., Gray, A., Scarborough, P., Rayner, M. European Cardiovascular Disease Statistics 2012. In: European Society of Cardiology SA, (ed.). European Heart Network, Brussels 2012.
2. Scarborough P, Bhatnagar, P., Wickramasinghe, K., Smolina, K., Mitchell, C., Rayner, M. Coronary Heart Disease Statistics. In: group BHFHPR, (ed.). Oxford: Department of Public Health, University of Oxford, 2010.
3. Murray CJ, Lopez, A.D. Global mortality, disability, and the contribution of risk factors: Global Burden of Disease Study. *Lancet* 1997 May 17; 349: 1436-1442.
4. Organization WH. The World Health Report 2002. Reducing Risks, Promoting Healthy Life. In: Organization WH, (ed.). Geneva, Switzerland 2002
5. Organization WH. Obesity – Preventing and Managing the Global Epidemic. Report of a WHO Consultation on Obesity. In: Organization WH, (ed.). Geneva, Switzerland. 2000.
6. Yusuf S, Hawken, S., Ounpuu, S., Dans, T., Avezum, A., Lanas, F., McQueen, M., Budaj, A., Pais, P., Varigos, J., Lisheng, L.; INTERHEART Study Investigators. Effect of potentially modifiable risk factors associated with myocardial infarction in 52 countries (the INTERHEART study): case-control study. *Lancet* 2004 Sep 11-17; 364: 937-952.
7. Garcia MJ, McNamara, P.M., Gordon, T., Kannel, W.B. Morbidity and mortality in diabetics in the Framingham population. Sixteen year follow-up study. *Diabetes* 1974 Feb; 23: 105-111.
8. Chapman MJ. From pathophysiology to targeted therapy for atherothrombosis: a role for the combination of statin and aspirin in secondary prevention. *Pharmacol Ther* 2007 Jan; 113: 184-196. 2006 Sep 15.
9. Fuster V, Moreno, P.R., Fayad, Z.A., Corti, R., Badimon, J.J. Atherothrombosis and high-risk plaque: part I: evolving concepts. *J Am Coll Cardiol* 2005 Sep 20; 46: 937-954.
10. Naghavi M, Falk, E., Hecht, H.S., Jamieson, M.J., Kaul, S., Berman, D., Fayad, Z., Budoff, M.J., Rumberger, J., Naqvi, T.Z., Shaw, L.J., Faergeman, O., Cohn, J., Bahr, R., Koenig, W., Demirovic, J., Arking, D., Herrera, V.L., Badimon, J., Goldstein, J.A., Rudy, Y., Airaksinen, J., Schwartz, R.S., Riley, W.A., Mendes, R.A., Douglas, P., Shah, P.K.; SHAPE Task Force. From vulnerable plaque to vulnerable patient--Part III: Executive summary of the Screening for Heart Attack Prevention and Education (SHAPE) Task Force report. *Am J Cardiol* 2006 Jul 17; 98: 2H-15H. 2006 Jun 12.
11. Ross R, Glomset, J., Harker, L. Response to injury and atherogenesis. *Am J Pathol* 1977 Mar; 86: 675-684.
12. Milei J, Ottaviani, G., Lavezzi, A.M., Grana, D.R., Stella, I., Matturri, L. Perinatal and infant early atherosclerotic coronary lesions. *Can J Cardiol* 2008 Feb; 24: 137-141.
13. Virmani R, Kolodgie, F.D., Burke, A.P., Farb, A., Schwartz, S.M. Lessons from sudden coronary death: a comprehensive morphological classification scheme for atherosclerotic lesions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000 May; 20: 1262-1275.
14. Sary HC, Chandler, A.B., Glagov, S., Guyton, J.R., Insull, W. Jr., Rosenfeld, M.E., Schaffer, S.A., Schwartz, C.J., Wagner, W.D., Wissler, R.W. A definition of initial, fatty streak, and intermediate lesions of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Circulation* 1994 May; 89: 2462-2478.
15. Sary HC, Blankenhorn, D.H., Chandler, A.B., Glagov, S., Insull, W. Jr, Richardson, M., Rosenfeld, M.E., Schaffer, S.A., Schwartz, C.J., Wagner, W.D., et al. A definition of the intima of human arteries and of its atherosclerosis-prone regions. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Circulation* 1992 Jan; 85: 391-405.
16. Sary HC, Chandler, A.B., Dinsmore, R.E., Fuster, V., Glagov, S., Insull, W. Jr, Rosenfeld, M.E., Schwartz, C.J., Wagner, W.D., Wissler, R.W. A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular

Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995 Sep; 15: 1512-1531.

17. Fuster V, Badimon, L., Badimon, J.J., Chesebro, J.H. The pathogenesis of coronary artery disease and the acute coronary syndromes (1). *N Engl J Med* 1992 Jan 23; 326: 242-250.
18. Burke AP, Kolodgie, F.D., Farb, A., Weber, D.K., Malcom, G.T., Smialek, J., Virmani, R. Healed plaque ruptures and sudden coronary death: evidence that subclinical rupture has a role in plaque progression. *Circulation* 2001 Feb 20; 103: 934-940.
19. Ross R. Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med* 1999 Jan 14; 340: 115-126.
20. Channon KM. Tetrahydrobiopterin: regulator of endothelial nitric oxide synthase in vascular disease. *Trends Cardiovasc Med* 2004 Nov; 14: 323-327.
21. Libby P, Ridker, P.M., Hansson, G.K.; Leducq Transatlantic Network on Atherothrombosis. Inflammation in atherosclerosis: from pathophysiology to practice. *J Am Coll Cardiol* 2009 Dec 1; 54: 2129-2138. DOI: 10.1016/j.jacc.2009.09.009.
22. Massberg S, Brand, K., Grüner, S., Page, S., Müller, E., Müller, I., Bergmeier, W., Richter, T., Lorenz, M., Konrad, I., Nieswandt, B., Gawaz, M. A critical role of platelet adhesion in the initiation of atherosclerotic lesion formation. *J Exp Med* 2002 Oct 7; 196: 887-896.
23. Langer HF, Gawaz, M. Platelet-vessel wall interactions in atherosclerotic disease. *Thromb Haemost* 2008 Mar; 99: 480-486. DOI: 10.1160/TH07-11-0685.
24. Seizer P, Gawaz, M., May, A.E. Platelet-monocyte interactions--a dangerous liaison linking thrombosis, inflammation and atherosclerosis. *Curr Med Chem* 2008; 15: 1976-1980.
25. Pitsilos S, Hunt, J., Mohler, E.R., Prabhakar, A.M., Poncz, M., Dawicki, J., Khalapyan, T.Z., Wolfe, M.L., Fairman, R., Mitchell, M., Carpenter, J., Golden, M.A., Cines, D.B., Sachais, B.S. Platelet factor 4 localization in carotid atherosclerotic plaques: correlation with clinical parameters. *Thromb Haemost* 2003 Dec; 90: 1112-1120.
26. Nassar T, Sachais, B.S., Akkawi, S., Kowalska, M.A., Bdeir, K., Leitersdorf, E., Hiss, E., Ziporen, L., Aviram, M., Cines, D., Poncz, M., Higazi, A.A. Platelet factor 4 enhances the binding of oxidized low-density lipoprotein to vascular wall cells. *J Biol Chem* 2003 Feb 21; 278: 6187-6193. 2002 Dec 3.
27. Huo Y, Ley, K. Adhesion molecules and atherogenesis. *Acta Physiol Scand* 2001 Sep; 173: 35-43.
28. Libby P. Atherosclerosis: the new view. *Sci Am* 2002 May; 286: 46-55.
29. Proudfoot AE. The biological relevance of chemokine-proteoglycan interactions. *Biochem Soc Trans* 2006 Jun; 34: 422-426.
30. Barlic J, Zhang, Y., Foley, J.F., Murphy, P.M. Oxidized lipid-driven chemokine receptor switch, CCR2 to CX3CR1, mediates adhesion of human macrophages to coronary artery smooth muscle cells through a peroxisome proliferator-activated receptor gamma-dependent pathway. *Circulation* 2006 Aug 22; 114: 807-819. 2006 Aug 14.
31. Hansson GK, Libby, P., Schönbeck, U., Yan, Z.Q. Innate and adaptive immunity in the pathogenesis of atherosclerosis. *Circ Res* 2002 Aug 23; 91: 281-291.
32. Gosling J, Slaymaker, S., Gu, L., Tseng, S., Zlot, C.H., Young, S.G., Rollins, B.J., Charo, I.F. MCP-1 deficiency reduces susceptibility to atherosclerosis in mice that overexpress human apolipoprotein B. *J Clin Invest* 1999 Mar; 103: 773-778.
33. Boring L, Gosling, J., Cleary, M., Charo, I.F. Decreased lesion formation in CCR2^{-/-} mice reveals a role for chemokines in the initiation of atherosclerosis. *Nature* 1998 Aug 27; 394: 894-897.
34. Tedgui A, Mallat, Z. Cytokines in atherosclerosis: pathogenic and regulatory pathways. *Physiol Rev* 2006 Apr; 86: 515-581.
35. Askenasy N, Kaminitz, A., Yarkoni, S. Mechanisms of T regulatory cell function. *Autoimmun Rev* 2008 May; 7: 370-375. 2008 Mar 24. DOI: 10.1016/j.autrev.2008.03.001.

36. Edfeldt K, Bennet, A.M., Eriksson, P., Frostegård, J., Wiman, B., Hamsten, A., Hansson, G.K., de Faire, U., Yan, Z.Q. Association of hypo-responsive toll-like receptor 4 variants with risk of myocardial infarction. *Eur Heart J* 2004 Aug; 25: 1447-1453.
37. Michelsen KS, Wong, M.H., Shah, P.K., Zhang, W., Yano, J., Doherty, T.M., Akira, S., Rajavashisth, T.B., Arditì, M. Lack of Toll-like receptor 4 or myeloid differentiation factor 88 reduces atherosclerosis and alters plaque phenotype in mice deficient in apolipoprotein E. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004 Jul 20; 101: 10679-10684. 2004 Jul 12.
38. Mullick AE, Soldau, K., Kiosses, W.B., Bell, T.A. 3rd, Tobias, P.S., Curtiss, L.J. Increased endothelial expression of Toll-like receptor 2 at sites of disturbed blood flow exacerbates early atherogenic events. *Exp Med* 2008 Feb 18; 205: 373-383. 2008 Feb 4K. DOI: 10.1084/jem.20071096.
39. Mullick AE, Tobias, P.S., Curtiss, L.K. Modulation of atherosclerosis in mice by Toll-like receptor 2. *J Clin Invest* 2005 Nov; 115: 3149-3156. 2005 Oct 6.
40. Salio M, Chimenti, S., De Angelis, N., Molla, F., Maina, V., Nebuloni, M., Pasqualini, F., Latini, R., Garlanda, C., Mantovani, A. Cardioprotective function of the long pentraxin PTX3 in acute myocardial infarction. *Circulation* 2008 Feb 26; 117: 1055-1064. 2008 Feb 11. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.107.749234.
41. Flavell DM, Jamshidi, Y., Hawe, E., Pineda Torra, I., Taskinen, M.R., Frick, M.H., Nieminen, M.S., Kesäniemi, Y.A., Pasternack, A., Staels, B., Miller, G., Humphries, S.E., Talmud, P.J., Syväne, M. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha gene variants influence progression of coronary atherosclerosis and risk of coronary artery disease. *Circulation* 2002 Mar 26; 105: 1440-1445.
42. Steinberg D. The LDL modification hypothesis of atherogenesis: an update. *J Lipid Res* 2009 Apr; 50 Suppl: S376-381. 2008 Nov 15. DOI: 10.1194/jlr.R800087-JLR200.
43. Li AC, Glass, C.K. The macrophage foam cell as a target for therapeutic intervention. *Nat Med* 2002 Nov; 8: 1235-1242.
44. van Berkel TJ, Out, R., Hoekstra, M., Kuiper, J., Biessen, E., van Eck, M. Scavenger receptors: friend or foe in atherosclerosis? *Curr Opin Lipidol* 2005 Oct; 16: 525-535.
45. Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature* 2002 Dec 19-26; 420: 868-874.
46. Kovanen PT. Mast cells in human fatty streaks and atheromas: implications for intimal lipid accumulation. *Curr Opin Lipidol* 1996 Oct; 7: 281-286.
47. Ouimet M, Wang, M.D., Cadotte, N., Ho, K., Marcel, Y.L. Epoxycholesterol impairs cholesteryl ester hydrolysis in macrophage foam cells, resulting in decreased cholesterol efflux. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008 Jun; 28: 1144-1150. 2008 Mar 27. DOI: 10.1161/ATVBAHA.107.157115.
48. Rader DJ, Alexander, E.T., Weibel, G.L., Billheimer, J., Rothblat, G.H. The role of reverse cholesterol transport in animals and humans and relationship to atherosclerosis. *J Lipid Res* 2009 Apr; 50 Suppl: S189-194. 2008 Dec 8. DOI: 10.1194/jlr.R800088-JLR200.
49. Bouhrel MA, Derudas, B., Rigamonti, E., Dièvert, R., Brozek, J., Haulon, S., Zawadzki, C., Jude, B., Torpier, G., Marx, N., Staels, B., Chinetti-Gbaguidi, G. PPARgamma activation primes human monocytes into alternative M2 macrophages with anti-inflammatory properties. *Cell Metab* 2007 Aug; 6: 137-143.
50. Nagai R, Suzuki, T., Aizawa, K., Miyamoto, S., Amaki, T., Kawai-Kowase, K., Sekiguchi, K.I., Kurabayashi, M. Phenotypic modulation of vascular smooth muscle cells: dissection of transcriptional regulatory mechanisms. *Ann N Y Acad Sci* 2001 Dec; 947: 56-66; discussion 66-57.
51. Newby AC. Matrix metalloproteinases regulate migration, proliferation, and death of vascular smooth muscle cells by degrading matrix and non-matrix substrates. *Cardiovasc Res* 2006 Feb 15; 69: 614-624. 2005 Nov 2.
52. George SJ, Beeching, C.A. Cadherin:catenin complex: a novel regulator of vascular smooth muscle cell behaviour. *Atherosclerosis* 2006 Sep; 188: 1-11. 2006 Jan 24.

53. George SJ, Dwivedi, A. MMPs, cadherins, and cell proliferation. *Trends Cardiovasc Med* ;(): 2004 Apr; 14: 100-105.
54. Fay WP, Garg, N., Sunkar, M. Vascular functions of the plasminogen activation system. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007 Jun; 27: 1231-1237. 2007 Mar 22.
55. Manabe I, Nagai, R. Regulation of smooth muscle phenotype. *Curr Atheroscler Rep* 2003 May; 5: 214-222.
56. Páramo JA, Rodríguez, J.A., Orbe, J. Vulnerable plaque versus vulnerable patient: emerging blood biomarkers for risk stratification. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets* 2007 Sep; 7: 195-201.
57. Johnson JL. Matrix metalloproteinases: influence on smooth muscle cells and atherosclerotic plaque stability. *Expert Rev Cardiovasc Ther* 2007 Mar; 5: 265-282.
58. Ohayon J, Finet, G., Gharib, A.M., Herzka, D.A., Tracqui, P., Heroux, J., Rioufol, G., Kotys, M.S., Elagha, A., Pettigrew, R.I. Necrotic core thickness and positive arterial remodeling index: emergent biomechanical factors for evaluating the risk of plaque rupture. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2008 Aug; 295: H717-727. 2008 Jun 27. DOI: 10.1152/ajpheart.00005.2008.
59. Toutouzas K, Synetos, A., Nikolaou, C., Tsiamis, E., Tousoulis, D., Stefanadis, C. Matrix metalloproteinases and vulnerable atheromatous plaque. *Curr Top Med Chem* 2012; 12: 1166-1180.
60. Redgrave JN, Gallagher, P., Lovett, J.K., Rothwell, P.M. Critical cap thickness and rupture in symptomatic carotid plaques: the oxford plaque study. *Stroke* 2008 Jun; 39: 1722-1729. 2008 Apr 10. DOI: 10.1161/STROKEAHA.107.507988.
61. Loree HM, Kamm, R.D., Stringfellow, R.G., Lee, R.T. Effects of fibrous cap thickness on peak circumferential stress in model atherosclerotic vessels. *Circ Res* 1992 Oct; 71: 850-858.
62. Burleigh MC, Briggs, A.D., Lendon, C.L., Davies, M.J., Born, G.V., Richardson, P.D. Collagen types I and III, collagen content, GAGs and mechanical strength of human atherosclerotic plaque caps: span-wise variations. *Atherosclerosis* 1992 Sep; 96: 71-81.
63. Soloperto G, Casciaro, S. Progress in atherosclerotic plaque imaging. *World J Radiol* 2012 Aug 28; 4: 353-371. DOI: 10.4329/wjr.v4.i8.353.
64. Drakopoulou M, Toutouzas, K., Michelongona, A., Tousoulis, D., Stefanadis, C. Vulnerable plaque and inflammation: potential clinical strategies. *Curr Pharm Des* 2011 Dec; 17: 4190-4209.
65. Moreno PR, Bernardi, V.H., López-Cuéllar, J., Murcia, A.M., Palacios, I.F., Gold, H.K., Mehran, R., Sharma, S.K., Nemerson, Y., Fuster, V., Fallon, J.T. Macrophages, smooth muscle cells, and tissue factor in unstable angina. Implications for cell-mediated thrombogenicity in acute coronary syndromes. *Circulation* 1996 Dec 15; 94: 3090-3097.
66. Jeziorska M, Woolley, D.E. Local neovascularization and cellular composition within vulnerable regions of atherosclerotic plaques of human carotid arteries. *J Pathol* 1999 Jun; 188: 189-196.
67. McCarthy MJ, Loftus, I.M., Thompson, M.M., Jones, L., London, N.J., Bell, P.R., Naylor, A.R., Brindle, N.P. Angiogenesis and the atherosclerotic carotid plaque: an association between symptomatology and plaque morphology. *J Vasc Surg* 1999 Aug; 30: 261-268.
68. Depré C, Havaux, X., Wijns, W. Neovascularization in human coronary atherosclerotic lesions. *Cathet Cardiovasc Diagn* 1996 Nov; 39: 215-220.
69. Moreno PR. Vulnerable plaque: definition, diagnosis, and treatment. *Cardiol Clin* 2010 Feb; 28: 1-30. DOI: 10.1016/j.ccl.2009.09.008.
70. Richardson PD, Davies, M.J., Born, G.V. Influence of plaque configuration and stress distribution on fissuring of coronary atherosclerotic plaques. *Lancet* 1989 Oct 21; 2: 941-944.
71. Maldonado N, Kelly-Arnold, A., Vengrenyuk, Y., Laudier, D., Fallon, J.T., Virmani, R., Cardoso, L., Weinbaum, S. A mechanistic analysis of the role of microcalcifications in atherosclerotic plaque stability: potential implications for plaque rupture. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2012 Sep 1; 303: H619-628. 2012 Jul 9. DOI: 10.1152/ajpheart.00036.2012.

72. Slager CJ, Wentzel, J.J., Gijssen, F.J., Schuurbijs, J.C., van der Wal, A.C., van der Steen, A.F., Serruys, P.W. The role of shear stress in the generation of rupture-prone vulnerable plaques. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med* 2005 Aug; 2: 401-407.
73. Cheng C, Tempel, D., van Haperen, R., van der Baan, A., Grosveld, F., Daemen, M.J., Krams, R., de Crom, R. Atherosclerotic lesion size and vulnerability are determined by patterns of fluid shear stress. *Circulation* 2006 Jun 13; 113: 2744-2753. 2006 Jun 5.
74. Fukumoto Y, Hiro, T., Fujii, T., Hashimoto, G., Fujimura, T., Yamada, J., Okamura, T., Matsuzaki, M. Localized elevation of shear stress is related to coronary plaque rupture: a 3-dimensional intravascular ultrasound study with in-vivo color mapping of shear stress distribution. *J Am Coll Cardiol* 2008 Feb 12; 51: 645-650. DOI: 10.1016/j.jacc.2007.10.030.
75. van der Wal AC, Becker, A.E. Atherosclerotic plaque rupture--pathologic basis of plaque stability and instability. *Cardiovasc Res* 1999 Feb; 41: 334-344.
76. Clarke M, Bennett, M. The emerging role of vascular smooth muscle cell apoptosis in atherosclerosis and plaque stability. *Am J Nephrol* 2006; 26: 531-535. 2006 Dec 6.
77. Lutgens SP, Cleutjens, K.B., Daemen, M.J., Heeneman, S. Cathepsin cysteine proteases in cardiovascular disease. *FASEB J* 2007 Oct; 21: 3029-3041. 2007 May 23.
78. Newby AC. Metalloproteinase expression in monocytes and macrophages and its relationship to atherosclerotic plaque instability. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008 Dec; 28: 2108-2114. 2008 Sep 4. DOI: 10.1161/ATVBAHA.108.173898.
79. Leskinen MJ, Lindstedt, K.A., Wang, Y., Kovanen, P.T. Mast cell chymase induces smooth muscle cell apoptosis by a mechanism involving fibronectin degradation and disruption of focal adhesions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003 Feb 1; 23: 238-243.
80. Johnson JL, Jackson, C.L., Angelini, G.D., George, S.J. Activation of matrix-degrading metalloproteinases by mast cell proteases in atherosclerotic plaques. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998 Nov; 18: 1707-1715.
81. Saarinen J, Kalkkinen, N., Welgus, H.G., Kovanen, P.T. Activation of human interstitial procollagenase through direct cleavage of the Leu83-Thr84 bond by mast cell chymase. *J Biol Chem* 1994 Jul 8; 269: 18134-18140.
82. Shamamian P, Schwartz, J.D., Pocock, B.J., Monea, S., Whiting, D., Marcus, S.G., Mignatti, P. Activation of progelatinase A (MMP-2) by neutrophil elastase, cathepsin G, and proteinase-3: a role for inflammatory cells in tumor invasion and angiogenesis. *J Cell Physiol* 2001 Nov; 189: 197-206.
83. de Boer OJ, van der Wal, A.C., Teeling, P., Becker, A.E. Leucocyte recruitment in rupture prone regions of lipid-rich plaques: a prominent role for neovascularization? *Cardiovasc Res* 1999 Feb; 41: 443-449.
84. Lappalainen H, Laine, P., Pentikäinen, M.O., Sajantila, A., Kovanen, P.T. Mast cells in neovascularized human coronary plaques store and secrete basic fibroblast growth factor, a potent angiogenic mediator. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004 Oct; 24: 1880-1885.
85. Norrby K. Mast cells and angiogenesis. *APMIS* 2002 May; 110: 355-371.
86. Kolodgie FD, Gold, H.K., Burke, A.P., Fowler, D.R., Kruth, H.S., Weber, D.K., Farb, A., Guerrero, L.J., Hayase, M., Kutys, R., Narula, J., Finn, A.V., Virmani, R. Intraplaque hemorrhage and progression of coronary atheroma. *N Engl J Med* 2003 Dec 11; 349: 2316-2325.
87. Virmani R, , Kolodgie, F.D., Burke, A.P., Finn, A.V., Gold, H.K., Tulenko, T.N., Wrenn, S.P., Narula, J. Atherosclerotic plaque progression and vulnerability to rupture: angiogenesis as a source of intraplaque hemorrhage. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005 Oct; 25: 2054-2061. 2005 Jul 21.
88. Ribatti D, Levi-Schaffer, F., Kovanen, P.T. Inflammatory angiogenesis in atherogenesis--a double-edged sword. *Ann Med* 2008; 40: 606-621. DOI: 10.1080/07853890802186913.
89. Harper MT, Poole, A.W. Isoform-specific functions of protein kinase C: the platelet paradigm. *Biochem Soc Trans* 2007 Nov; 35: 1005-1008.

90. Amento EP, Ehsani, N., Palmer, H., Libby, P. Cytokines and growth factors positively and negatively regulate interstitial collagen gene expression in human vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb* 1991 Sep-Oct; 11: 1223-1230.
91. Kolodgie FD, Burke, A.P., Wight, T.N., Virmani, R. The accumulation of specific types of proteoglycans in eroded plaques: a role in coronary thrombosis in the absence of rupture. *Curr Opin Lipidol* 2004 Oct; 15: 575-582.
92. Mäyränpää MI, Heikkilä, H.M., Lindstedt, K.A., Walls, A.F., Kovanen, P.T. Desquamation of human coronary artery endothelium by human mast cell proteases: implications for plaque erosion. *Coron Artery Dis* 2006 Nov; 17: 611-621.
93. Kadoglou NP, Gerasimidis, T., Moumtzoglou, A., Kapelouzou, A., Sailer, N., Fotiadis, G., Vitta, I., Katinios, A., Kougiyas, P., Bandios, S., Voliotis, K., Karayannacos, P.E., Liapis, C.D. Intensive lipid-lowering therapy ameliorates novel calcification markers and GSM score in patients with carotid stenosis. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2008 Jun; 35: 661-668. 2008 Apr 18. DOI: 10.1016/j.ejvs.2007.12.011.
94. Shah PK. Insights into the molecular mechanisms of plaque rupture and thrombosis. *Indian Heart J* 2005 Jan-Feb; 57: 21-30.
95. Grothusen C, Bley, S., Selle, T., Luchtefeld, M., Grote, K., Tietge, U.J., Drexler, H., Schieffer, B. Combined effects of HMG-CoA-reductase inhibition and renin-angiotensin system blockade on experimental atherosclerosis. *Atherosclerosis* 2005 Sep; 182: 57-69.
96. Verreth W, De Keyzer, D., Davey, P.C., Geeraert, B., Mertens, A., Herregods, M.C., Smith, G., Desjardins, F., Balligand, J.L., Holvoet, P. Rosuvastatin restores superoxide dismutase expression and inhibits accumulation of oxidized LDL in the aortic arch of obese dyslipidemic mice. *Br J Pharmacol* 2007 Jun; 151: 347-355. 2007 Mar 26.
97. Kooistra T, Verschuren, L., de Vries-van der Weij, J., Koenig, W., Toet, K., Princen, H.M., Kleemann, R. Fenofibrate reduces atherogenesis in ApoE*3Leiden mice: evidence for multiple antiatherogenic effects besides lowering plasma cholesterol. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006 Oct; 26: 2322-2330. 2006 Jul 27.
98. Watanabe K, Sugiyama, S., Kugiyama, K., Honda, O., Fukushima, H., Koga, H., Horibata, Y., Hirai, T., Sakamoto, T., Yoshimura, M., Yamashita, Y., Ogawa, H. Stabilization of carotid atheroma assessed by quantitative ultrasound analysis in nonhypercholesterolemic patients with coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol* 2005 Dec 6; 46: 2022-2030. 2005 Nov 4.
99. You BA, Shen, L., Li, J.F., Chen, Y.G., Gu, X.H., Gao, H.Q. The correlation between carotid-femoral pulse wave velocity and composition of the aortic media in CAD patients with or without hypertension. *Swiss Med Wkly* 2012 Apr 27; 142: w13546. DOI: 10.4414/smw.2012.13546.
100. Parks WC. Who are the proteolytic culprits in vascular disease? *J Clin Invest* 1999 Nov; 104: 1167-1168.
101. Liu J, Sukhova, G.K., Sun, J.S., Xu, W.H., Libby, P., Shi, G.P. Lysosomal cysteine proteases in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004 Aug; 24: 1359-1366. 2004 Jun 3.
102. Libby P, Lee, R.T. Matrix matters. *Circulation* 2000 Oct 17; 102: 1874-1876.
103. Kong CH, Lin, X.Y., Woo, C.C., Wong, H.C., Lee, C.N., Richards, A.M., Sorokin, V.A. Characteristics of aortic wall extracellular matrix in patients with acute myocardial infarction: tissue microarray detection of collagen I, collagen III and elastin levels. *Interact Cardiovasc Thorac Surg* 2013 Jan; 16: 11-15. 2012 Oct 9. DOI: 10.1093/icvts/ivs421.
104. Samouillan V, Dandurand, J., Lacabanne, C., Stella, A., Gargiulo, M., Degani, A., Gandaglia, A., Spina, M. Analysis of the molecular mobility of collagen and elastin in safe, atheromatous and aneurysmal aortas. *Pathol Biol (Paris)* 2012 Feb; 60: 58-65. 2011 Dec 12. DOI: 10.1016/j.patbio.2011.11.006.
105. Gonçalves I, Moses, J., Dias, N., Pedro, L.M., Fernandes e Fernandes, J., Nilsson, J., Ares, M.P. Changes related to age and cerebrovascular symptoms in the extracellular matrix of human carotid plaques. *Stroke* 2003 Mar; 34: 616-622. 2003 Feb 13.

106. Tran LT, Park, H.J., Kim, H.D. Is the carotid intima-media thickness really a good surrogate marker of atherosclerosis? *J Atheroscler Thromb* 2012; 19: 680-690. 2012 May 17.
107. Liu SQ, Teft, B.J., Zhang, L.Q., Li, Y.C., Wu, Y.H. Elastic laminae in vascular development and disease. *Mol Cell Biomech* 2010 Jun; 7: 59-76.
108. Di Lullo GA, Sweeney, S.M., Korkko, J., Ala-Kokko, L., San Antonio, J.D. Mapping the ligand-binding sites and disease-associated mutations on the most abundant protein in the human, type I collagen. *J Biol Chem* 2002 Feb 8; 277: 4223-4231. 2001 Nov 9.
109. Müller WE. The origin of metazoan complexity: porifera as integrated animals. *Integr Comp Biol* 2003 Feb; 43: 3-10. DOI: 10.1093/icb/43.1.3.
110. Veit G, Kobbe, B., Keene, D.R., Paulsson, M., Koch, M., Wagener, R. Collagen XXVIII, a novel von Willebrand factor A domain-containing protein with many imperfections in the collagenous domain. *J Biol Chem* 2006 Feb 10; 281: 3494-3504.
111. Nadkarni SK, Pierce, M.C., Park, B.H., de Boer, J.F., Whittaker, P., Bouma, B.E., Bressner, J.E., Halpern, E., Houser, S.L., Tearney, G.J. Measurement of collagen and smooth muscle cell content in atherosclerotic plaques using polarization-sensitive optical coherence tomography. *J Am Coll Cardiol* 2007 Apr 3; 49: 1474-1481. 2007 Mar 21.
112. Rekhter MD. Collagen synthesis in atherosclerosis: too much and not enough. *Cardiovasc Res* 1999 Feb; 41: 376-384.
113. Deguchi JO, Aikawa, E., Libby, P., Vachon, J.R., Inada, M., Krane, S.M., Whittaker, P., Aikawa, M. Matrix metalloproteinase-13/collagenase-3 deletion promotes collagen accumulation and organization in mouse atherosclerotic plaques. *Circulation* 2005 Oct 25; 112: 2708-2715. 2005 Oct 17.
114. Sukhova GK, Schönbeck, U., Rabkin, E., Schoen, F.J., Poole, A.R., Billingham, R.C., Libby, P. Evidence for increased collagenolysis by interstitial collagenases-1 and -3 in vulnerable human atheromatous plaques. *Circulation* 1999 May 18; 99: 2503-2509.
115. Liu X, Zhao, Y., Gao, J., Pawlyk, B., Starcher, B., Spencer, J.A., Yanagisawa, H., Zuo, J., Li, T. Elastic fiber homeostasis requires lysyl oxidase-like 1 protein. *Nat Genet* 2004 Feb; 36: 178-182. 2004 Jan 25.
116. Bashur CA, Venkataraman, L., Ramamurthi A. Tissue engineering and regenerative strategies to replicate biocomplexity of vascular elastic matrix assembly. *Tissue Eng Part B Rev* 2012 Jun; 18: 203-217. 2012 Mar 2. DOI: 10.1089/ten.TEB.2011.0521.
117. Fhayli W, Ghandour, Z., Mariko, B., Pezet, M., Faury, G. Elastin and microfibrils in vascular development and ageing: complementary or opposite roles? *Biol Aujourdhui* 2012; 206: 87-102. 2012 Jul 4. DOI: 10.1051/jbio/2012009.
118. Muiznieks LD, Keeley, F.W. Molecular assembly and mechanical properties of the extracellular matrix: A fibrous protein perspective. *Biochim Biophys Acta* 2013 Jul; 1832: 866-875. 2012 Dec 6. DOI: 10.1016/j.bbadis.2012.11.022.
119. Lee HY, Oh, B.H. Aging and Arterial Stiffness. *Circ J* 2010 Nov; 74: 2257-2262. 2010 Oct 15.
120. Noma A, Takahashi, T., Yamada, K., Wada, T. Elastin--lipid interaction action in the arterial wall. Part 1. Extraction of elastin from human aortic intima. *Atherosclerosis* 1979 May; 33: 29-39.
121. Noma A, Takahashi, T., Wada, T. Elastin-lipid interaction in the arterial wall. Part 2. In vitro binding of lipoprotein-lipids to arterial elastin and the inhibitory effect of high density lipoproteins on the process. *Atherosclerosis* 1981 Feb-Mar; 38: 373-382.
122. Walczak E, Kruś, S., Fiejka, E., Walski, M., Celary-Walska, R., Dabrowski, M., Witkowski, A., Chmielak, Z., Rużyłło, W. Light and electron microscopic picture of atherosclerotic plaque in stable and unstable angina. *Pol J Pathol* 1999; 50: 87-92.
123. Podet EJ, Shaffer, D.R., Gianturco, S.H., Bradley, W.A., Yang, C.Y., Guyton, J.R. Interaction of low density lipoproteins with human aortic elastin. *Arterioscler Thromb* 1991 Jan-Feb; 11: 116-122.

124. Saulnier JM, Hauck, M., Fülöp, T. Jr., Wallach, J.M. Human aortic elastin from normal individuals and atherosclerotic patients: lipid and cation contents; susceptibility to elastolysis. *Clin Chim Acta* 1991 Aug 30; 200: 129-136.
125. Matsumoto M, Sata, M., Fukuda, D., Tanaka, K., Soma, M., Hirata, Y., Nagai, R. Orally administered eicosapentaenoic acid reduces and stabilizes atherosclerotic lesions in ApoE-deficient mice. *Atherosclerosis* 2008 Apr; 197: 524-533. 2007 Sep 4.
126. Mestas J, Ley, K. Monocyte-endothelial cell interactions in the development of atherosclerosis. *Trends Cardiovasc Med* 2008 Aug; 18: 228-232. DOI: 10.1016/j.tcm.2008.11.004.
127. Gui T, Shimokado, A., Sun, Y., Akasaka, T., Muragaki, Y. Diverse roles of macrophages in atherosclerosis: from inflammatory biology to biomarker discovery. *Mediators Inflamm* 2012; 2012: 693083. 2012 Apr 11. DOI: 10.1155/2012/693083.
128. Kuwano Y, Spelten, O., Zhang, H., Ley, K., Zarbock, A. Rolling on E- or P-selectin induces the extended but not high-affinity conformation of LFA-1 in neutrophils. *Blood* 2010 Jul 29; 116: 617-624. 2010 May 5. DOI: 10.1182/blood-2010-01-266122.
129. Kumar P, Hosaka, S., Koch, A.E. Soluble E-selectin induces monocyte chemotaxis through Src family tyrosine kinases. *J Biol Chem* 2001 Jun 15; 276: 21039-21045. 2001 Mar 27.
130. Galkina E, Ley, K. Vascular adhesion molecules in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007 Nov; 27: 2292-2301. 2007 Aug 2.
131. Kamei M, Carman, C.V. New observations on the trafficking and diapedesis of monocytes. *Curr Opin Hematol* 2010 Jan; 17: 43-52. DOI: 10.1097/MOH.0b013e3283333949.
132. Paulson KE, Zhu, S.N., Chen, M., Nurmohamed, S., Jongstra-Bilen, J., Cybulsky, M.I. Resident intimal dendritic cells accumulate lipid and contribute to the initiation of atherosclerosis. *Circ Res* 2010 Feb 5; 106: 383-390. 2009 Nov 5. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.109.210781.
133. Gleissner CA. Macrophage Phenotype Modulation by CXCL4 in Atherosclerosis. *Front Physiol* 2012 Jan 13; 3. DOI: 10.3389/fphys.2012.00001.
134. Mantovani A, Sica, A., Locati, M. Macrophage polarization comes of age. *Immunity* 2005 Oct; 23: 344-346.
135. Mantovani A, Garlanda, C., Locati, M. Macrophage diversity and polarization in atherosclerosis: a question of balance. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2009 Oct; 29: 1419-1423. 2009 Aug 20. DOI: 10.1161/ATVBAHA.108.180497.
136. Tabas I. Consequences and therapeutic implications of macrophage apoptosis in atherosclerosis: the importance of lesion stage and phagocytic efficiency. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005 Nov; 25: 2255-2264. 2005 Sep 1.
137. Hegyi L, Skepper, J.N., Cary, N.R., Mitchinson, M.J. Foam cell apoptosis and the development of the lipid core of human atherosclerosis. *J Pathol* 1996 Dec; 180: 423-429.
138. Feng B, Yao, P.M., Li, Y., Devlin, C.M., Zhang, D., Harding, H.P., Sweeney, M., Rong, J.X., Kuriakose, G., Fisher, E.A., Marks, A.R., Ron, D., Tabas, I. The endoplasmic reticulum is the site of cholesterol-induced cytotoxicity in macrophages. *Nat Cell Biol* 2003 Sep; 5: 781-792. 2003 Aug 10.
139. Xu S, Ogura, S., Chen, J., Little, P.J., Moss, J., Liu, P. LOX-1 in atherosclerosis: biological functions and pharmacological modifiers. *Cell Mol Life Sci* 2013 Aug; 70: 2859-2872. 2012 Nov 3. DOI: 10.1007/s00018-012-1194-z.
140. Nhan TQ, Liles, W.C., Chait, A., Fallon, J.T., Schwartz, S.M. The p17 cleaved form of caspase-3 is present within viable macrophages in vitro and in atherosclerotic plaque. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003 Jul 1; 23: 1276-1282. 2003 May 22.
141. Li W, Dalen, H., Eaton, J.W., Yuan, X.M. Apoptotic death of inflammatory cells in human atheroma. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001 Jul; 21: 1124-1130.
142. Littlewood TD, Bennett, M.R. Apoptotic cell death in atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol* 2003 Oct; 14: 469-475.

143. Sukhova G, K., Shi, G.P., Simon, D.I., Chapman, H.A., Libby, P. Expression of the elastolytic cathepsins S and K in human atheroma and regulation of their production in smooth muscle cells. *J Clin Invest* 1998 Aug 1; 102: 576-583.
144. Martinet W, Schrijvers, D.M., De Meyer, G.R. Necrotic cell death in atherosclerosis. *Basic Res Cardiol* 2011 Sep; 106: 749-760. 2011 May 25. DOI: 10.1007/s00395-011-0192-x.
145. Festjens N, Vanden Berghe, T., Vandenabeele, P. Necrosis, a well-orchestrated form of cell demise: signalling cascades, important mediators and concomitant immune response. *Biochim Biophys Acta* 2006 Sep-Oct; 1757: 1371-1387. 2006 Jul 8.
146. Crisby M, Kallin, B., Thyberg, J., Zhivotovsky, B., Orrenius, S., Kostulas, V., Nilsson, J. Cell death in human atherosclerotic plaques involves both oncosis and apoptosis. *Atherosclerosis* 1997 Apr; 130: 17-27.
147. Ardans JA, Economou, A.P., Martinson, J.M. Jr., Zhou, M., Wahl, L.M. Oxidized low-density and high-density lipoproteins regulate the production of matrix metalloproteinase-1 and -9 by activated monocytes. *J Leukoc Biol* 2002 Jun; 71: 1012-1018.
148. Galis ZS, Sukhova, G.K., Lark, M.W., Libby, P. Increased expression of matrix metalloproteinases and matrix degrading activity in vulnerable regions of human atherosclerotic plaques. *J Clin Invest* 1994 Dec; 94: 2493-2503.
149. Galis ZS, Khatri, J.J. Matrix metalloproteinases in vascular remodeling and atherogenesis: the good, the bad, and the ugly. *Circ Res* 2002 Feb 22; 90: 251-262.
150. Boyle JJ, Bowyer, D.E., Weissberg, P.L., Bennett, M.R. Human blood-derived macrophages induce apoptosis in human plaque-derived vascular smooth muscle cells by Fas-ligand/Fas interactions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001 Sep; 21: 1402-1407.
151. Öörni K, Sneek, M., Brömme, D., Pentikäinen, M.O., Lindstedt, K.A., Mäyränpää, M., Aitio, H., Kovanen, P.T. Cysteine protease cathepsin F is expressed in human atherosclerotic lesions, is secreted by cultured macrophages, and modifies low density lipoprotein particles in vitro. *J Biol Chem* 2004 Aug 13; 279: 34776-34784. 2004 Jun 7.
152. Schulte S, Sun, J., Libby, P., Macfarlane, L., Sun, C., Lopez-Illasaca, M., Shi, G.P., Sukhova, G.K. Cystatin C deficiency promotes inflammation in angiotensin II-induced abdominal aortic aneurysms in atherosclerotic mice. *Am J Pathol* 2010 Jul; 177: 456-463. 2010 May 14. DOI: 10.2353/ajpath.2010.090381.
153. Lindstedt KA, Leskinen, M.J., Kovanen, P.T. Proteolysis of the pericellular matrix: a novel element determining cell survival and death in the pathogenesis of plaque erosion and rupture. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004 Aug; 24: 1350-1358. 2004 Jun 10.
154. Hu Y, Zhang, Z., Torsney, E., Afzal, A.R., Davison, F., Metzler, B., Xu, Q. Abundant progenitor cells in the adventitia contribute to atherosclerosis of vein grafts in ApoE-deficient mice. *J Clin Invest* 2004 May; 113: 1258-1265.
155. Zalewski A, Shi, Y., Johnson, A.G. Diverse origin of intimal cells: smooth muscle cells, myofibroblasts, fibroblasts, and beyond? *Circ Res* 2002 Oct 18; 91: 652-655.
156. Owens GK, Kumar, M.S., Wamhoff, B.R. Molecular regulation of vascular smooth muscle cell differentiation in development and disease. *Physiol Rev* 2004 Jul; 84: 767-801.
157. Davies MJ, Richardson, P.D., Woolf, N., Katz, D.R., Mann, J. Risk of thrombosis in human atherosclerotic plaques: role of extracellular lipid, macrophage, and smooth muscle cell content. *Br Heart J* 1993 May; 69: 377-381.
158. Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature* 1993 Apr 29; 362: 801-809.
159. Weissberg PL, Clesham, G.J., Bennett, M.R. Is vascular smooth muscle cell proliferation beneficial? *Lancet* 1996 Feb 3; 347: 305-307.
160. Stegemann JP, Hong, H., Nerem, R.M. Mechanical, biochemical, and extracellular matrix effects on vascular smooth muscle cell phenotype. *J Appl Physiol (1985)* 2005 Jun; 98: 2321-2327.

161. Frid MG, Dempsey, E.C., Durmowicz, A.G., Stenmark, K.R. Smooth muscle cell heterogeneity in pulmonary and systemic vessels. Importance in vascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997 Jul; 17: 1203-1209.
162. Schaper W, Ito, W.D. Molecular mechanisms of coronary collateral vessel growth. *Circ Res* 1996 Nov; 79: 911-919.
163. Louis SF, Zahradka, P. Vascular smooth muscle cell motility: From migration to invasion. *Exp Clin Cardiol* 2010 Winter; 15: e75-85.
164. Sata M, Saiura, A., Kunisato, A., Tojo, A., Okada, S., Tokuhisa, T., Hirai, H., Makuuchi, M., Hirata, Y., Nagai, R. Hematopoietic stem cells differentiate into vascular cells that participate in the pathogenesis of atherosclerosis. *Nat Med* 2002 Apr; 8: 403-409.
165. Ridley AJ, Schwartz, M.A., Burridge, K., Firtel, R.A., Ginsberg, M.H., Borisy, G., Parsons, J.T., Horwitz, A.R. Cell migration: integrating signals from front to back. *Science* 2003 Dec 5; 302: 1704-1709.
166. Wolf C, Cai, W.J., Vosschulte, R., Koltai, S., Mousavipour, D., Scholz, D., Afsah-Hedjri, A., Schaper, W., Schaper, J. Vascular remodeling and altered protein expression during growth of coronary collateral arteries. *J Mol Cell Cardiol* 1998 Nov; 30: 2291-2305.
167. Hofmann UB, Westphal, J.R., Waas, E.T., Becker, J.C., Ruiter, D.J., van Muijen, G.N. Coexpression of integrin alpha(v)beta3 and matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) coincides with MMP-2 activation: correlation with melanoma progression. *J Invest Dermatol* 2000; 115: 625-632. DOI: 10.1046/j.1523-1747.2000.00114.x.
168. Ho B, Bendeck, M.P. Integrin linked kinase (ILK) expression and function in vascular smooth muscle cells. *Cell Adh Migr* 2009 Apr-Jun; 3: 174-176. 2009 Apr 10.
169. Zervas CG, Psarra, E., Williams, V., Solomon, E., Vakaloglou, K.M., Brown, N.H. A central multifunctional role of integrin-linked kinase at muscle attachment sites. *J Cell Sci* 2011 Apr 15; 124: 1316-1327. DOI: 10.1242/jcs.081422.
170. Hegerfeldt Y, Tusch, M., Bröcker, E.B., Friedl, P. Collective cell movement in primary melanoma explants: plasticity of cell-cell interaction, beta1-integrin function, and migration strategies. *Cancer Res* 2002 Apr 1; 62: 2125-2130.
171. Lutgens E, de Muinck, E.D., Kitslaar, P.J., Tordoir, J.H., Wellens, H.J., Daemen, M.J. Biphasic pattern of cell turnover characterizes the progression from fatty streaks to ruptured human atherosclerotic plaques. *Cardiovasc Res* 1999 Feb; 41: 473-479.
172. Geng YJ, Libby, P. Evidence for apoptosis in advanced human atheroma. Colocalization with interleukin-1 beta-converting enzyme. *Am J Pathol* 1995 Aug; 147: 251-266.
173. Cho A, Mitchell, L., Koopmans, D., Langille, B.L. Effects of changes in blood flow rate on cell death and cell proliferation in carotid arteries of immature rabbits. *Circulation Research* 1997; 81: 328-337.
174. Rzucidlo EM, Martin, K.A., Powell, R.J. Regulation of vascular smooth muscle cell differentiation. *J Vasc Surg* 2007 Jun; 45 Suppl A: A25-32.
175. Newby AC. Dual role of matrix metalloproteinases (matrixins) in intimal thickening and atherosclerotic plaque rupture. *Physiol Rev* 2005 Jan; 85: 1-31.
176. Steinhilber U, Weiske, J., Badock, V., Tauber, R., Bommert, K., Huber, O. Cleavage and shedding of E-cadherin after induction of apoptosis. *J Biol Chem* 2001 Feb 16; 276: 4972-4980. 2000 Nov 13.
177. Mohan MJ, Seaton, T., Mitchell, J., Howe, A., Blackburn, K., Burkhart, W., Moyer, M., Patel, I., Waitt, G.M., Becherer, J.D., Moss, M.L., Milla, M.E. The tumor necrosis factor-alpha converting enzyme (TACE): a unique metalloproteinase with highly defined substrate selectivity. *Biochemistry* 2002 Jul 30; 41: 9462-9469.
178. Klein T, Bischoff, R. Physiology and pathophysiology of matrix metalloproteases. *Amino Acids* 2011 Jul; 41: 271-290. 2010 Jul 18. DOI: 10.1007/s00726-010-0689-x.

179. Thompson RW. Role of matrix metalloproteinases in abdominal aortic aneurysms. *Ann N Y Acad Sci* 1996 Nov 18; 800: 157-174.
180. Ferrans VJ. New insights into the world of matrix metalloproteinases. *Circulation* 2002 Jan 29; 105: 405-407.
181. Nagase H. Activation mechanisms of matrix metalloproteinases. *Biol Chem* 1997 Mar-Apr; 378: 151-160.
182. Murphy G, Knäuper, V. Relating matrix metalloproteinase structure to function: why the "hemopexin" domain? *Matrix Biol* 1997 Mar; 15: 511-518.
183. Bode W. A helping hand for collagenases: the haemopexin-like domain. *Structure* 1995 Jun 15; 3: 527-530.
184. Bode W, Fernandez-Catalan, C., Tschesche, H., Grams, F., Nagase, H., Maskos, K. Structural properties of matrix metalloproteinases. *Cell Mol Life Sci* 1999 Apr; 55: 639-652.
185. Tveita A, Rekvig, O.P., Zykova, S.N. Glomerular matrix metalloproteinases and their regulators in the pathogenesis of lupus nephritis. *Arthritis Res Ther* 2008; 10: 229. 2008 Dec 1. DOI: 10.1186/ar2532.
186. Nagase H, Woessner, J.F. Jr. Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem* 1999 Jul 30; 274: 21491-21494.
187. Chow AK, Cena, J., Schulz, R. Acute actions and novel targets of matrix metalloproteinases in the heart and vasculature. *Br J Pharmacol* 2007 Sep; 152: 189-205. 2007 Jun 25.
188. Lipka D, Boratyński, J. [Metalloproteinases. Structure and function]. *Postepy Hig Med Dosw (Online)* 2008 Jul 3; 62: 328-336.
189. Snoek-van Beurden PA, Von den Hoff, J.W. Zymographic techniques for the analysis of matrix metalloproteinases and their inhibitors. *Biotechniques* 2005 Jan; 38: 73-83.
190. Massova I, Kotra, L.P., Fridman, R., Mobashery, S. Matrix metalloproteinases: structures, evolution, and diversification. *FASEB J* 1998 Sep; 12: 1075-1095.
191. Strongin AY, Collier, I., Bannikov, G., Marmer, B.L., Grant, G.A., Goldberg, G.I. Mechanism of cell surface activation of 72-kDa type IV collagenase. Isolation of the activated form of the membrane metalloprotease. *J Biol Chem* 1995 Mar 10; 270: 5331-5338.
192. Lohi J, Lehti, K., Valtanen, H., Parks, W.C., Keski-Oja, J. Structural analysis and promoter characterization of the human membrane-type matrix metalloproteinase-1 (MT1-MMP) gene. *Gene* 2000 Jan 25; 242: 75-86.
193. Kheradmand F, Werner, E., Tremble, P., Symons, M., Werb, Z. Role of Rac1 and oxygen radicals in collagenase-1 expression induced by cell shape change. *Science* 1998 May 8; 280: 898-902.
194. Vogel W, Gish, G.D., Alves, F., Pawson, T. The discoidin domain receptor tyrosine kinases are activated by collagen. *Mol Cell* 1997 Dec; 1: 13-23.
195. Sternlicht MD, Werb, Z. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2001; 17: 463-516.
196. Uría JA, Jiménez, M.G., Balbín, M., Freije, J.M., López-Otín, C. Differential effects of transforming growth factor-beta on the expression of collagenase-1 and collagenase-3 in human fibroblasts. *J Biol Chem* 1998 Apr 17; 273: 9769-9777.
197. Mohan R, Rinehart, W.B., Bargagna-Mohan, P., Fini, M.E. Gelatinase B/lacZ transgenic mice, a model for mapping gelatinase B expression during developmental and injury-related tissue remodeling. *J Biol Chem* 1998 Oct 2; 273: 25903-25914.
198. Munaut C, Salonurmi, T., Kontusaari, S., Reponen, P., Morita, T., Foidart, J.M., Tryggvason, K. Murine matrix metalloproteinase 9 gene. 5'-upstream region contains cis-acting elements for expression in osteoclasts and migrating keratinocytes in transgenic mice. *J Biol Chem* 1999 Feb 26; 274: 5588-5596.
199. Sternlicht MD, Bissell, M.J., Werb, Z. The matrix metalloproteinase stromelysin-1 acts as a natural mammary tumor promoter. *Oncogene* 2000 Feb 21; 19: 1102-1113.

200. Windsor LJ, Grenett, H., Birkedal-Hansen, B., Bodden, M.K., Engler, J.A., Birkedal-Hansen, H. Cell type-specific regulation of SL-1 and SL-2 genes. Induction of the SL-2 gene but not the SL-1 gene by human keratinocytes in response to cytokines and phorbol esters. *J Biol Chem* 1993 Aug 15; 268: 17341-17347.
201. Delany AM, Jeffrey, J.J., Rydziel, S., Canalis, E. Cortisol increases interstitial collagenase expression in osteoblasts by post-transcriptional mechanisms. *J Biol Chem* 1995 Nov 3; 270: 26607-26612.
202. Matsumoto S, Katoh, M., Saito, S., Watanabe, T., Masuho, Y. Identification of soluble type of membrane-type matrix metalloproteinase-3 formed by alternatively spliced mRNA. *Biochim Biophys Acta* 1997 Nov 1; 1354: 159-170.
203. Hasty KA, Pourmotabbed, T.F., Goldberg, G.I., Thompson, J.P., Spinella, D.G., Stevens, R.M., Mainardi, C.L. Human neutrophil collagenase. A distinct gene product with homology to other matrix metalloproteinases. *J Biol Chem* 1990 Jul 15; 265: 11421-11424.
204. Raza SL, Nehring, L.C., Shapiro, S.D., Cornelius, L.A. Proteinase-activated receptor-1 regulation of macrophage elastase (MMP-12) secretion by serine proteinases. *J Biol Chem* 2000 Dec 29; 275: 41243-41250.
205. Van Wart HE, Birkedal-Hansen, H. The cysteine switch: a principle of regulation of metalloproteinase activity with potential applicability to the entire matrix metalloproteinase gene family. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990 Jul; 87: 5578-5582.
206. Visse R, Nagase, H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ Res* 2003 May 2; 92: 827-839.
207. Allaire E, Hasenstab, D., Kenagy, R.D., Starcher, B., Clowes, M.M., Clowes, A.W. Prevention of aneurysm development and rupture by local overexpression of plasminogen activator inhibitor-1. *Circulation* 1998 Jul 21; 98: 249-255.
208. Reilly JM, Sicard, G.A., Lucore, C.L. Abnormal expression of plasminogen activators in aortic aneurysmal and occlusive disease. *J Vasc Surg* 1994 May; 19: 865-872.
209. Carmeliet P. Proteinases in cardiovascular aneurysms and rupture: targets for therapy? *J Clin Invest* 2000 Jun; 105: 1519-1520.
210. Deng GG, Martin-McNulty, B., Sukovich, D.A., Freay, A., Halks-Miller, M., Thinnis, T., Loskutoff, D.J., Carmeliet, P., Dole, W.P., Wang, Y.X. Urokinase-type plasminogen activator plays a critical role in angiotensin II-induced abdominal aortic aneurysm. *Circ Res* 2003 Mar 21; 92: 510-517. 2003 Feb 13.
211. Miyamori H, Takino, T., Seiki, M., Sato, H. Human membrane type-2 matrix metalloproteinase is defective in cell-associated activation of progelatinase A. *Biochem Biophys Res Commun* 2000 Jan 27; 267: 796-800.
212. English WR, Puente, X.S., Freije, J.M., Knauper, V., Amour, A., Merryweather, A., Lopez-Otin, C., Murphy, G. Membrane type 4 matrix metalloproteinase (MMP17) has tumor necrosis factor-alpha convertase activity but does not activate pro-MMP2. *J Biol Chem* 2000 May 12; 275: 14046-14055.
213. Deryugina EI, Ratnikov, B., Monosov, E., Postnova, T.I., DiScipio, R., Smith, J.W., Strongin, A.Y. MT1-MMP initiates activation of pro-MMP-2 and integrin alphavbeta3 promotes maturation of MMP-2 in breast carcinoma cells. *Exp Cell Res* 2001 Feb 15; 263: 209-223.
214. Annabi B, Shédid, D., Ghosn, P., Kenigsberg, R.L., Desrosiers, R.R., Bojanowski, M.W., Beaulieu, E., Nassif, E., Moundjian, R., Béliveau, R. Differential regulation of matrix metalloproteinase activities in abdominal aortic aneurysms. *J Vasc Surg* 2002 Mar; 35: 539-546.
215. Wang X, Jung, J., Asahi, M., Chwang, W., Russo, L., Moskowitz, M.A., Dixon, C.E., Fini, M.E., Lo, E.H. Effects of matrix metalloproteinase-9 gene knock-out on morphological and motor outcomes after traumatic brain injury. *J Neurosci* 2000 Sep 15; 20: 7037-7042.
216. Pei D, Weiss, S.J. Furin-dependent intracellular activation of the human stromelysin-3 zymogen. *Nature* 1995 May 18; 375: 244-247.

217. Gururajan R, Grenet, J., Lahti, J.M., Kidd, V.J. Isolation and characterization of two novel metalloproteinase genes linked to the Cdc2L locus on human chromosome 1p36.3. *Genomics* 1998 Aug 15; 52: 101-106.
218. Murphy G. Tissue inhibitors of metalloproteinases. *Genome Biol* 2011 Nov 11; 12: 233. DOI: 10.1186/gb-2011-12-11-233.
219. Satta J, Oiva, J., Salo, T., Eriksen, H., Ohtonen, P., Biancari, F., Juvonen, T.S., Soini, Y. Evidence for an altered balance between matrix metalloproteinase-9 and its inhibitors in calcific aortic stenosis. *Ann Thorac Surg* 2003 Sep; 76: 681-688; discussion 688.
220. Kadoglou NP, Daskalopoulou, S.S., Perrea, D., Liapis, C.D. Matrix metalloproteinases and diabetic vascular complications. *Angiology* 2005 Mar-Apr; 56: 173-189.
221. Di Pizio A, Agamennone, M., Aschi, M. An integrated computational approach to rationalize the activity of non-zinc-binding MMP-2 inhibitors. *PLoS One* 2012; 7: e47774. 2012 Nov 8. DOI: 10.1371/journal.pone.0047774.
222. Beaudoux JL, Giral, P., Bruckert, E., Foglietti, M.J., Chapman, M.J. Matrix metalloproteinases, inflammation and atherosclerosis: therapeutic perspectives. *Clin Chem Lab Med* 2004 Feb; 42: 121-131.
223. Uzui H, Harpf, A., Liu, M., Doherty, T.M., Shukla, A., Chai, N.N., Tripathi, P.V., Jovinge, S., Wilkin, D.J., Asotra, K., Shah, P.K., Rajavashisth, T.B. Increased expression of membrane type 3-matrix metalloproteinase in human atherosclerotic plaque: role of activated macrophages and inflammatory cytokines. *Circulation* 2002 Dec 10; 106: 3024-3030.
224. Aikawa M, Rabkin, E., Voglic, S.J., Shing, H., Nagai, R., Schoen, F.J., Libby, P. Lipid lowering promotes accumulation of mature smooth muscle cells expressing smooth muscle myosin heavy chain isoforms in rabbit atheroma. *Circ Res* 1998 Nov 16; 83: 1015-1026.
225. Pawlak K, Pawlak, D., Myśliwiec, M. Urokinase-type plasminogen activator and metalloproteinase-2 are independently related to the carotid atherosclerosis in haemodialysis patients. *Thromb Res* 2008; 121: 543-548. 2007 Aug 15.
226. Heckenkamp J, Nigri, G.R., Waterman, P.R., Overhaus, M., Kossodo, S.C., Lamuraglia, G.M. Gamma-irradiation modulates vascular smooth muscle cell and extracellular matrix function: Implications for neointimal development. *J Vasc Surg* 2004 May; 39: 1097-1103.
227. Lee SW, Song, K.E., Shin, D.S., Ahn, S.M., Ha, E.S., Kim, D.J., Nam, M.S., Lee, K.W. Alterations in peripheral blood levels of TIMP-1, MMP-2, and MMP-9 in patients with type-2 diabetes. *Diabetes Res Clin Pract* 2005 Aug; 69: 175-179.
228. Lu Y, Wahl, L.M. Production of matrix metalloproteinase-9 by activated human monocytes involves a phosphatidylinositol-3 kinase/Akt/IKKalpha/NF-kappaB pathway. *J Leukoc Biol* 2005 Jul; 78: 259-265.
229. Romanic AM, Madri, J.A. The induction of 72-kD gelatinase in T cells upon adhesion to endothelial cells is VCAM-1 dependent. *J Cell Biol* 1994 Jun; 125: 1165-1178.
230. Yamada S, Wang, K.Y., Tanimoto, A., Fan, J., Shimajiri, S., Kitajima, S., Morimoto, M., Tsutsui, M., Watanabe, T., Yasumoto, K., Sasaguri, Y. Matrix metalloproteinase 12 accelerates the initiation of atherosclerosis and stimulates the progression of fatty streaks to fibrous plaques in transgenic rabbits. *Am J Pathol* 2008 May; 172: 1419-1429. 2008 Apr 10. DOI: 10.2353/ajpath.2008.070604.
231. Armstrong PJ, Johanning, J.M., Calton, W.C. Jr., Delatore, J.R., Franklin, D.P., Han, D.C., Carey, D.J., Elmore, J.R. Differential gene expression in human abdominal aorta: aneurysmal versus occlusive disease. *J Vasc Surg* 2002 Feb; 35: 346-355.
232. Mavromatis K, Fukai, T., Tate, M., Chesler, N., Ku, D.N., Galis, Z.S. Early effects of arterial hemodynamic conditions on human saphenous veins perfused ex vivo. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000 Aug; 20: 1889-1895.

233. Benjamin MM, Khalil, R.A. Matrix metalloproteinase inhibitors as investigative tools in the pathogenesis and management of vascular disease. *EXS* 2012; 103: 209-279. DOI: 10.1007/978-3-0348-0364-9_7.
234. Jin UH, Kang, S.K., Suh, S.J., Hong, S.Y., Park, S.D., Kim, D.W., Chang, H.W., Son, J.K., Lee, S.H., Son, K.H., Kim, C.H. Inhibitory effect of *Salvia miltiorrhia* BGE on matrix metalloproteinase-9 activity and migration of TNF-alpha-induced human aortic smooth muscle cells. *Vascul Pharmacol* 2006 May; 44: 345-353. 2006 Mar 15.
235. Fukumoto Y, Deguchi, J.O., Libby, P., Rabkin-Aikawa, E., Sakata, Y., Chin, M.T., Hill, C.C., Lawler, P.R., Varo, N., Schoen, F.J., Krane, S.M., Aikawa, M. Genetically determined resistance to collagenase action augments interstitial collagen accumulation in atherosclerotic plaques. *Circulation* 2004 Oct 5; 110: 1953-1959. 2004 Sep 27.
236. Johnson C, Galis, Z.S. Matrix metalloproteinase-2 and -9 differentially regulate smooth muscle cell migration and cell-mediated collagen organization. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004 Jan; 24: 54-60. 2003 Oct 9.
237. Aguilera CM, George, S.J., Johnson, J.L., Newby, A.C. Relationship between type IV collagen degradation, metalloproteinase activity and smooth muscle cell migration and proliferation in cultured human saphenous vein. *Cardiovasc Res* 2003 Jun 1; 58: 679-688.
238. Carragher NO, Frame, M.C. Focal adhesion and actin dynamics: a place where kinases and proteases meet to promote invasion. *Trends Cell Biol* 2004 May; 14: 241-249.
239. Uglow EB, Slater, S., Sala-Newby, G.B., Aguilera-Garcia, C.M., Angelini, G.D., Newby, A.C., George, S.J. Dismantling of cadherin-mediated cell-cell contacts modulates smooth muscle cell proliferation. *Circ Res* 2003 Jun 27; 92: 1314-1321. 2003 May 29.
240. Boire A, Covic, L., Agarwal, A., Jacques, S., Sherifi, S., Kuliopulos, A. PAR1 is a matrix metalloprotease-1 receptor that promotes invasion and tumorigenesis of breast cancer cells. *Cell* 2005 Feb 11; 120: 303-313.
241. Forough R, Koyama, N., Hasenstab, D., Lea, H., Clowes, M., Nikkari, S.T., Clowes, A.W. Overexpression of tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 inhibits vascular smooth muscle cell functions in vitro and in vivo. *Circ Res* 1996 Oct; 79: 812-820.
242. George SJ, Lloyd, C.T., Angelini, G.D., Newby, A.C., Baker, A.H. Inhibition of late vein graft neointima formation in human and porcine models by adenovirus-mediated overexpression of tissue inhibitor of metalloproteinase-3. *Circulation* 2000 Jan 25; 101: 296-304.
243. Islam MM, Franco, C.D., Courtman, D.W., Bendeck, M.P. A nonantibiotic chemically modified tetracycline (CMT-3) inhibits intimal thickening. *Am J Pathol* 2003 Oct; 163: 1557-1566.
244. Lee YJ, Kim, J.S., Kang, D.G., Lee, H.S. *Buddleja officinalis* suppresses high glucose-induced vascular smooth muscle cell proliferation: role of mitogen-activated protein kinases, nuclear factor-kappaB and matrix metalloproteinases. *Exp Biol Med (Maywood)* 2010 Feb; 235: 247-255. DOI: 10.1258/ebm.2009.009222.
245. Cho A, Reidy, M.A. Matrix metalloproteinase-9 is necessary for the regulation of smooth muscle cell replication and migration after arterial injury. *Circ Res* 2002 Nov 1; 91: 845-851.
246. Galis ZS, Johnson, C., Godin, D., Magid, R., Shipley, J.M., Senior, R.M., Ivan, E. Targeted disruption of the matrix metalloproteinase-9 gene impairs smooth muscle cell migration and geometrical arterial remodeling. *Circ Res* 2002 Nov 1; 91: 852-859.
247. Frisch SM, Sreaton, R.A. Anoikis mechanisms. *Curr Opin Cell Biol* 2001 Oct; 13: 555-562.
248. Stoneman VE, Bennett, M.R. Role of apoptosis in atherosclerosis and its therapeutic implications. *Clin Sci (Lond)* 2004 Oct; 107: 343-354.
249. Geng YJ, Libby, P. Progression of atheroma: a struggle between death and procreation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002 Sep 1; 22: 1370-1380.
250. Barger AC, Beeuwkes, R. 3rd, Lainey, L.L., Silverman, K.J. Hypothesis: vasa vasorum and neovascularization of human coronary arteries. A possible role in the pathophysiology of atherosclerosis. *N Engl J Med* 1984 Jan 19; 310: 175-177.

251. Kumamoto M, Nakashima, Y., Sueishi, K. Intimal neovascularization in human coronary atherosclerosis: its origin and pathophysiological significance. *Hum Pathol* 1995 Apr; 26: 450-456.
252. Johnson MD, Kim, H.R., Chesler, L., Tsao-Wu, G., Bouck, N., Polverini, P.J. Inhibition of angiogenesis by tissue inhibitor of metalloproteinase. *J Cell Physiol* 1994 Jul; 160: 194-202.
253. Galardy RE, Grobelny, D., Foellmer, H.G., Fernandez, L.A. Inhibition of angiogenesis by the matrix metalloprotease inhibitor N-[2R-2-(hydroxamidocarbonylmethyl)-4-methylpentanoyl]-L-tryptophan methylamide. *Cancer Res* 1994 Sep 1; 54: 4715-4718.
254. Herron GS, Banda, M.J., Clark, E.J., Gavrilovic, J., Werb, Z. Secretion of metalloproteinases by stimulated capillary endothelial cells. II. Expression of collagenase and stromelysin activities is regulated by endogenous inhibitors. *J Biol Chem* 1986 Feb 25; 261: 2814-2818.
255. Brooks PC, Strömblad, S., Sanders, L.C., von Schalscha, T.L., Aimes, R.T., Stetler-Stevenson, W.G., Quigley, J.P., Cheresch, D.A. Localization of matrix metalloproteinase MMP-2 to the surface of invasive cells by interaction with integrin alpha v beta 3. *Cell* 1996 May 31; 85: 683-693.
256. Sunderkötter C, Steinbrink, K., Goebeler, M., Bhardwaj, R., Sorg, C. Macrophages and angiogenesis. *J Leukoc Biol* 1994 Mar; 55: 410-422.
257. McMillan WD, Patterson, B.K., Keen, R.R., Shively, V.P., Cipollone, M., Pearce, W.H. In situ localization and quantification of mRNA for 92-kD type IV collagenase and its inhibitor in aneurysmal, occlusive, and normal aorta. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995 Aug; 15: 1139-1144.
258. Greene J, Wang, M., Liu, Y.E., Raymond, L.A., Rosen, C., Shi, Y.E. Molecular cloning and characterization of human tissue inhibitor of metalloproteinase 4. *J Biol Chem* 1996 Nov 29; 271: 30375-30380.
259. Pavloff N, Staskus, P.W., Kishnani, N.S., Hawkes, S.P. A new inhibitor of metalloproteinases from chicken: ChIMP-3. A third member of the TIMP family. *J Biol Chem* 1992 Aug 25; 267: 17321-17326.
260. Docherty AJ, Lyons, A., Smith, B.J., Wright, E.M., Stephens, P.E., Harris, T.J., Murphy, G., Reynolds, J.J. Sequence of human tissue inhibitor of metalloproteinases and its identity to erythroid-potentiating activity. *Nature* 1985 Nov 7-13; 318: 66-69.
261. Stetler-Stevenson WG. The tumor microenvironment: regulation by MMP-independent effects of tissue inhibitor of metalloproteinases-2. *Cancer Metastasis Rev* 2008 Mar; 27: 57-66.
262. Brew K, Nagase, H. The tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs): an ancient family with structural and functional diversity. *Biochim Biophys Acta* 2010 Jan; 1803: 55-71. 2010 Jan 15. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2010.01.003.
263. Maskos K, Lang, R., Tschesche, H., Bode, W. Flexibility and variability of TIMP binding: X-ray structure of the complex between collagenase-3/MMP-13 and TIMP-2. *J Mol Biol* 2007 Mar 2; 366: 1222-1231. 2006 Dec 1.
264. Fernandez-Catalan C, Bode, W., Huber, R., Turk, D., Calvete, J.J., Lichte, A., Tschesche, H., Maskos, K. Crystal structure of the complex formed by the membrane type 1-matrix metalloproteinase with the tissue inhibitor of metalloproteinases-2, the soluble progelatinase A receptor. *EMBO J* 1998 Sep 1; 17: 5238-5248.
265. Olson MW, Gervasi, D.C., Mobashery, S., Fridman, R. Kinetic analysis of the binding of human matrix metalloproteinase-2 and -9 to tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP)-1 and TIMP-2. *J Biol Chem* 1997 Nov 21; 272: 29975-29983.
266. Hutton M, Willenbrock, F., Brocklehurst, K., Murphy, G. Kinetic analysis of the mechanism of interaction of full-length TIMP-2 and gelatinase A: evidence for the existence of a low-affinity intermediate. *Biochemistry* 1998 Jul 14; 37: 10094-10098.
267. Rapti M, Atkinson, S.J., Lee, M.H., Trim, A., Moss, M., Murphy, G. The isolated N-terminal domains of TIMP-1 and TIMP-3 are insufficient for ADAM10 inhibition. *Biochem J* 2008 Apr 15; 411: 433-439. DOI: 10.1042/BJ20071430.

268. Rivera S, Khrestchatsky, M., Kaczmarek, L., Rosenberg, G.A., Jaworski, D.M. Metzincin proteases and their inhibitors: foes or friends in nervous system physiology? *J Neurosci* 2010 Nov 17; 30: 15337-15357. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.3467-10.2010.
269. Hamze AB, Wei, S., Bahudhanapati, H., Kota, S., Acharya, K.R., Brew, K. Constraining specificity in the N-domain of tissue inhibitor of metalloproteinases-1; gelatinase-selective inhibitors. *Protein Sci* 2007 Sep; 16: 1905-1913. 2007 Jul 27.
270. Sapienza P, di Marzo, L., Borrelli, V., Sterpetti, A.V., Mingoli, A., Cresti, S., Cavallaro, A. Metalloproteinases and their inhibitors are markers of plaque instability. *Surgery* 2005 Mar; 137: 355-363.
271. Ward RV, Atkinson, S.J., Slocombe, P.M., Docherty, A.J., Reynolds, J.J., Murphy, G. Tissue inhibitor of metalloproteinases-2 inhibits the activation of 72 kDa progelatinase by fibroblast membranes. *Biochim Biophys Acta* 1991 Aug 30; 1079: 242-246.
272. Denhardt DT, Feng, B., Edwards, D.R., Cocuzzi, E.T., Malyankar, U.M. Tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP, aka EPA): structure, control of expression and biological functions. *Pharmacol Ther* 1993 Sep; 59: 329-341.
273. Jacobsen J, Visse, R., Sørensen, H.P., Enghild, J.J., Brew, K., Wewer, U.M., Nagase, H. Catalytic properties of ADAM12 and its domain deletion mutants. *Biochemistry* 2008 Jan 15; 47: 537-547. 2007 Dec 15.
274. Amour A, Knight, C.G., Webster, A., Slocombe, P.M., Stephens, P.E., Knäuper, V., Docherty, A.J., Murphy, G. The in vitro activity of ADAM-10 is inhibited by TIMP-1 and TIMP-3. *FEBS Lett* 2000 May 19; 473: 275-279.
275. Lee MH, Rapti, M., Murphy, G. Total conversion of tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP) for specific metalloproteinase targeting: fine-tuning TIMP-4 for optimal inhibition of tumor necrosis factor- α -converting enzyme. *J Biol Chem* 2005 Apr 22; 280: 15967-15975. 2005 Feb 15.
276. Mochizuki S, Shimoda, M., Shiomi, T., Fujii, Y., Okada, Y. ADAM28 is activated by MMP-7 (matrilysin-1) and cleaves insulin-like growth factor binding protein-3. *Biochem Biophys Res Commun* 2004 Feb 27; 315: 79-84.
277. Amour A, Slocombe, P.M., Webster, A., Butler, M., Knight, C.G., Smith, B.J., Stephens, P.E., Shelley, C., Hutton, M., Knäuper, V., Docherty, A.J., Murphy, G. TNF- α converting enzyme (TACE) is inhibited by TIMP-3. *FEBS Lett* 1998 Sep 11; 435: 39-44.
278. Black RA. Tumor necrosis factor- α converting enzyme. *Int J Biochem Cell Biol* 2002 Jan; 34: 1-5.
279. Murphy G, Nagase, H. Reappraising metalloproteinases in rheumatoid arthritis and osteoarthritis: destruction or repair? *Nat Clin Pract Rheumatol* 2008 Mar; 4: 128-135. DOI: 10.1038/ncprheum0727.
280. Rocks N, Paulissen, G., El Hour, M., Quesada, F., Crahay, C., Gueders, M., Foidart, J.M., Noel, A., Cataldo, D. Emerging roles of ADAM and ADAMTS metalloproteinases in cancer. *Biochimie* 2008 Feb; 90: 369-379. 2007 Sep 2.
281. Stetler-Stevenson WG. Tissue inhibitors of metalloproteinases in cell signaling: metalloproteinase-independent biological activities. *Sci Signal* 2008 Jul 8; 1: re6. DOI: 10.1126/scisignal.127re6.
282. Forough R, Hasenstab, D., Zempo N., Langley, K., De Clerck, Y., Clowes, A. Induction of tissue inhibitor of metalloproteinase-2 in injured rat artery. *Ann N Y Acad Sci* 1994 Sep 6; 732: 384-388.
283. Hasenstab D, Forough, R., Clowes, A.W. Plasminogen activator inhibitor type 1 and tissue inhibitor of metalloproteinases-2 increase after arterial injury in rats. *Circ Res* 1997 Apr; 80: 490-496.
284. Baker AH, Zaltsman, A.B., George, S.J., Newby, A.C. Divergent effects of tissue inhibitor of metalloproteinase-1, -2, or -3 overexpression on rat vascular smooth muscle cell invasion,

- proliferation, and death in vitro. TIMP-3 promotes apoptosis. *J Clin Invest* 1998 Mar 15; 101: 1478-1487.
285. George SJ, Johnson J.L., Angelini, G.D., Newby, A.C., Baker, A.H. Adenovirus-mediated gene transfer of the human TIMP-1 gene inhibits smooth muscle cell migration and neointimal formation in human saphenous vein. *Hum Gene Ther* 1998 Apr 10; 9: 867-877.
286. Singh RJ, Mason, J.C., Lidington, E.A., Edwards, D.R., Nuttall, R.K., Khokha, R., Knauper, V., Murphy, G., Gavrilovic, J. Cytokine stimulated vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) ectodomain release is regulated by TIMP-3. *Cardiovasc Res* 2005 Jul 1; 67: 39-49. 2005 Mar 29.
287. Federici M, Hribal, M.L., Menghini, R., Kanno, H., Marchetti, V., Porzio, O., Sunnarborg, S.W., Rizza, S., Serino, M., Cunsolo, V., Lauro, D., Mauriello, A., Smookler, D.S., Sbraccia, P., Sesti, G., Lee, D.C., Khokha, R., Accili, D., Lauro, R. Timp3 deficiency in insulin receptor-haploinsufficient mice promotes diabetes and vascular inflammation via increased TNF-alpha. *J Clin Invest* 2005 Dec; 115: 3494-3505. 2005 Nov 17.
288. Cardellini M, Menghini, R., Luzi, A., Davato, F., Cardolini, I., D'Alfonso, R., Gentileschi, P., Rizza, S., Marini, M.A., Porzio, O., Lauro, D., Sbraccia, P., Lauro, R., Federici, M. Decreased IRS2 and TIMP3 expression in monocytes from offspring of type 2 diabetic patients is correlated with insulin resistance and increased intima-media thickness. *Diabetes* 2011 Dec; 60: 3265-3270. 2011 Oct 7. DOI: 10.2337/db11-0162.
289. Johnson JL, Sala-Newby, G.B., Ismail, Y., Aguilera, C.M., Newby, A.C. Low tissue inhibitor of metalloproteinases 3 and high matrix metalloproteinase 14 levels defines a subpopulation of highly invasive foam-cell macrophages. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008 Sep; 28: 1647-1653. 2008 Jun 19. DOI: 10.1161/ATVBAHA.108.170548.
290. Knox JB, Sukhova, G.K., Whitemore, A.D., Libby, P. Evidence for altered balance between matrix metalloproteinases and their inhibitors in human aortic diseases. *Circulation* 1997 Jan 7; 95: 205-212.
291. Rouis M, Adamy, C., Duverger, N., Lesnik, P., Horellou, P., Moreau, M., Emmanuel, F., Caillaud, J.M., Laplaud, P.M., Datchet, C., Chapman, M.J. Adenovirus-mediated overexpression of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 reduces atherosclerotic lesions in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation* 1999 Aug 3; 100: 533-540.
292. Cuaz-Pérolin C, Jguirim, I., Larigauderie, G., Jlassi, A., Furman, C., Moreau, M., Chapman, M.J., Fruchart, J.C., Slimane, M.N., Mezdour, H., Rouis, M. Apolipoprotein E knockout mice overexpressing human tissue inhibitor of metalloproteinase 1 are protected against aneurysm formation but not against atherosclerotic plaque development. *J Vasc Res* 2006; 43: 493-501. 2006 Aug 24.
293. Lemaître V, Soloway, P.D., D'Armiento, J. Increased medial degradation with pseudo-aneurysm formation in apolipoprotein E-knockout mice deficient in tissue inhibitor of metalloproteinases-1. *Circulation* 2003 Jan 21; 107: 333-338.
294. Silence J, Collen, D., Lijnen, H.R. Reduced atherosclerotic plaque but enhanced aneurysm formation in mice with inactivation of the tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) gene. *Circ Res* 2002 May 3; 90: 897-903.
295. Moreau M, Brocheriou, I., Petit, L., Ninio, E., Chapman, M.J., Rouis, M. Interleukin-8 mediates downregulation of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 expression in cholesterol-loaded human macrophages: relevance to stability of atherosclerotic plaque. *Circulation* 1999 Jan 26; 99: 420-426.
296. Johnson JL, Fritsche-Danielson, R., Behrendt, M., Westin-Eriksson, A., Wennbo, H., Herslof, M., Elebring, M., George, S.J., McPheat, W.L., Jackson, C.L. Effect of broad-spectrum matrix metalloproteinase inhibition on atherosclerotic plaque stability. *Cardiovasc Res* 2006 Aug 1; 71: 586-595. 2006 May 10.
297. Johnson JL, Baker, A.H., Oka, K., Chan, L., Newby, A.C., Jackson, C.L., George, S.J. Suppression of atherosclerotic plaque progression and instability by tissue inhibitor of

- metalloproteinase-2: involvement of macrophage migration and apoptosis. *Circulation* 2006 May 23; 113: 2435-2444. 2006 May 15.
298. Casagrande V, Menghini, R., Menini, S., Marino, A., Marchetti, V., Cavalera, M., Fabrizi, M., Hribal, M.L., Pugliese, G., Gentileschi, P., Schillaci, O., Porzio, O., Lauro, D., Sbraccia, P., Lauro, R., Federici, M. Overexpression of tissue inhibitor of metalloproteinase 3 in macrophages reduces atherosclerosis in low-density lipoprotein receptor knockout mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2012 Jan; 32: 74-81. DOI: 10.1161/ATVBAHA.111.238402.
299. George SJ, Wan, S., Hu, J., MacDonald, R., Johnson, J.L., Baker, A.H. Sustained reduction of vein graft neointima formation by ex vivo TIMP-3 gene therapy. *Circulation* 2011 Sep 13; 124(11 Suppl): S135-142. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.110.012732.
300. Prescott MF, Sawyer, W.K., Von Linden-Reed, J., Jeune, M., Chou, M., Caplan, S.L., Jeng, A.Y. Effect of matrix metalloproteinase inhibition on progression of atherosclerosis and aneurysm in LDL receptor-deficient mice overexpressing MMP-3, MMP-12, and MMP-13 and on restenosis in rats after balloon injury. *Ann N Y Acad Sci* 1999 Jun 30; 878: 179-190.
301. Manning MW, Cassis, L.A., Daugherty, A. Differential effects of doxycycline, a broad-spectrum matrix metalloproteinase inhibitor, on angiotensin II-induced atherosclerosis and abdominal aortic aneurysms. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003 Mar 1; 23: 483-488. 2003 Jan 30.
302. Cavusoglu E, Ruwende, C., Chopra, V., Yanamadala, S., Eng, C., Clark, L.T., Pinsky, D.J., Marmur, J.D. Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) is an independent predictor of all-cause mortality, cardiac mortality, and myocardial infarction. *Am Heart J* 2006 May; 151: 1101.e1101-1108.
303. Fabunmi RP, Sukhova, G.K., Sugiyama, S., Libby, P. Expression of tissue inhibitor of metalloproteinases-3 in human atheroma and regulation in lesion-associated cells: a potential protective mechanism in plaque stability. *Circ Res* 1998 Aug 10; 83: 270-278.
304. Koskivirta I, Rahkonen, O., Mäyränpää, M., Pakkanen, S., Husheem, M., Sainio, A., Hakovirta, H., Laine, J., Jokinen, E., Vuorio, E., Kovanen, P., Järveläinen, H. Tissue inhibitor of metalloproteinases 4 (TIMP4) is involved in inflammatory processes of human cardiovascular pathology. *Histochem Cell Biol* 2006 Sep; 126: 335-342. 2006 Mar 7.
305. Galis ZS, Muszynski, M., Sukhova, G.K., Simon-Morrissey, E., Libby, P. Enhanced expression of vascular matrix metalloproteinases induced in vitro by cytokines and in regions of human atherosclerotic lesions. *Ann N Y Acad Sci* 1995 Jan 17; 748: 501-507.
306. Hower CD, Dassow, M.S., Kajdacsy-Balla, A., Seabrook, G.R., Jean-Claude, J., Towne, J.B., Cambria, R.A. Metalloproteinase levels are decreased in symptomatic carotid plaques. *J Surg Res* 2000 Feb; 88(2):155-9 2000 Feb; 88: 155-159.
307. Taurino M, Raffa, S., Mastroddi, M., Visco, V., Rizzo, L., Torrìsi, M.R., Faraglia, V. Metalloproteinase expression in carotid plaque and its correlation with plasma levels before and after carotid endarterectomy. *Vasc Endovascular Surg* 2007 Dec-2008 Jan; 41: 516-521. DOI: 10.1177/1538574407307405.
308. Kruk M, Kalińczuk, L., Pregowski, J., Przyłuski, J., Janas, J., Chmielak, Z., Demkow, M., Debski, A., Ciszewski, A., Otto, B., Witkowski, A., Rużyłło, W. Serum tissue inhibitor of metalloproteinases-1 and higher risk features of coronary plaque: a volumetric multivessel intravascular ultrasound study. *Atherosclerosis* 2007 Oct; 194: e57-63.
309. Tziakas DN, Chalikias, G.K., Parissis, J.T., Hatzinikolaou, E.I., Papadopoulos, E.D., Tripsiannis, G.A., Papadopoulou, E.G., Tentis, I.K., Karas, S.M., Chatseras, D.I. Serum profiles of matrix metalloproteinases and their tissue inhibitor in patients with acute coronary syndromes. The effects of short-term atorvastatin administration. *Int J Cardiol* 2004 Apr; 94: 269-277.
310. Tuomainen AM, Nyysönen, K., Laukkanen, J.A., Tervahartiala, T., Tuomainen, T.P., Salonen, J.T., Sorsa, T., Pussinen, P.J. Serum matrix metalloproteinase-8 concentrations are associated with cardiovascular outcome in men. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007 Dec; 27: 2722-2728. 2007 Oct 11.

311. Manginas A, Bei, E., Chaidaroglou, A., Degiannis, D., Koniavitou, K., Voudris, V., Pavlides, G., Panagiotakos, D., Cokkinos, D.V. Peripheral levels of matrix metalloproteinase-9, interleukin-6, and C-reactive protein are elevated in patients with acute coronary syndromes: correlations with serum troponin I. *Clin Cardiol* 2005 Apr; 28: 182-186.
312. Pawlak K, Pawlak, D., Mysliwiec, M. Serum matrix metalloproteinase-2 and increased oxidative stress are associated with carotid atherosclerosis in hemodialyzed patients. *Atherosclerosis* 2007 Jan; 190: 199-204. 2006 Feb 28.
313. Zureik M, Beaudoux, J.L., Courbon, D., Bénétos, A., Ducimetière, P. Serum tissue inhibitors of metalloproteinases 1 (TIMP-1) and carotid atherosclerosis and aortic arterial stiffness. *J Hypertens* 2005 Dec; 23: 2263-2268.
314. Derosa G, Cicero, A.F., Scalise, F., Avanzini, M.A., Tinelli, C., Piccinni, M.N., Peros, E., Geroldi, D., Fogari, E., D'Angelo, A. Metalloproteinase-2 and -9 in diabetic and nondiabetic subjects during acute coronary syndromes. *Endothelium* 2007 Jan-Feb; 14: 45-51.
315. Derosa G, D'Angelo, A., Scalise, F., Avanzini, M.A., Tinelli, C., Peros, E., Fogari, E., Cicero, A.F. Comparison between metalloproteinases-2 and -9 in healthy subjects, diabetics, and subjects with acute coronary syndrome. *Heart Vessels* 2007 Nov; 22: 361-370. 2007 Nov 26.
316. Beaudoux JL, Giral, P., Bruckert, E., Bernard, M., Foglietti, M.J., Chapman, M.J. Serum matrix metalloproteinase-3 and tissue inhibitor of metalloproteinases-1 as potential markers of carotid atherosclerosis in infraclinical hyperlipidemia. *Atherosclerosis* 2003 Jul; 169: 139-146.
317. Cardellini M, Menghini, R., Martelli, E., Casagrande, V., Marino, A., Rizza, S., Porzio, O., Mauriello, A., Solini, A., Ippoliti, A., Lauro, R., Folli, F., Federici, M. TIMP3 is reduced in atherosclerotic plaques from subjects with type 2 diabetes and increased by SirT1. *Diabetes* 2009 Oct; 58: 2396-2401. 2009 Jul 6. DOI: 10.2337/db09-0280.
318. Feghali CA, Wright, T.M. Cytokines in acute and chronic inflammation. *Front Biosci* 1997 Jan 1; 2: d12-26.
319. Rossi D, Zlotnik, A. The biology of chemokines and their receptors. *Annu Rev Immunol* 2000; 18: 217-242.
320. Rollins BJ. Chemokines. *Blood* 1997 Aug 1; 90: 909-928.
321. Baggiolini M, Dewald, B., Moser, B. Human chemokines: an update. *Annu Rev Immunol* 1997; 15: 675-705.
322. Alexander WS. Suppressors of cytokine signalling (SOCS) in the immune system. *Nat Rev Immunol* 2002 Jun; 2: 410-416.
323. Letterio JJ, Roberts, A.B. Regulation of immune responses by TGF-beta. *Annu Rev Immunol* 1998; 16: 137-161.
324. O'Shea JJ, Gadina, M., Schreiber, R.D. Cytokine signaling in 2002: new surprises in the Jak/Stat pathway. *Cell* 2002 Apr; 109 Suppl: S121-131.
325. Ozaki K, Leonard, W.J. Cytokine and cytokine receptor pleiotropy and redundancy. *J Biol Chem* 2002 Aug 16; 277: 29355-29358. 2002 Jun 18.
326. Abbas AK, Lichtman, A.H. . *Basic Immunology: Functions and Disorders of the Immune System*. USA: W.B. Saunders Company, 2001.
327. Allen SJ, Crown, S.E., Handel, T.M. Chemokine: receptor structure, interactions, and antagonism. *Annu Rev Immunol* 2007; 25: 787-820.
328. Zlotnik A, Yoshie, O. Chemokines: a new classification system and their role in Immunity. *Immunity* 2000 Feb; 12: 121-127.
329. Pennica D, Nedwin, G.E., Hayflick, J.S., Seeburg, P.H., Derynck, R., Palladino, M.A., Kohr, W.J., Aggarwal, B.B., Goeddel, D.V. Human tumour necrosis factor: precursor structure, expression and homology to lymphotoxin. *Nature* 1984 Dec 20-1985 Jan 2; 312: 724-729.
330. Carswell EA, Old, L.J., Kassel, R.L., Green, S., Fiore, N., Williamson, B. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1975 Sep; 72: 3666-3670.

331. Nedwin GE, Naylor, S.L., Sakaguchi, A.Y., Smith, D., Jarrett-Nedwin, J., Pennica, D., Goeddel, D.V., Gray, P.W. Human lymphotoxin and tumor necrosis factor genes: structure, homology and chromosomal localization. *Nucleic Acids Res* 1985 Sep 11; 13: 6361-6373.
332. Männel DN, Moore, R.N., Mergenhagen, S.E. Macrophages as a source of tumoricidal activity (tumor-necrotizing factor). *Infect Immun* 1980 Nov; 30: 523-530.
333. Cuturi MC, Murphy, M., Costa-Giomi, M.P., Weinmann, R., Perussia, B., Trinchieri, G. Independent regulation of tumor necrosis factor and lymphotoxin production by human peripheral blood lymphocytes. *J Exp Med* 1987 Jun 1; 165: 1581-1594.
334. Backer JC, Kolanus, W., Lonnemann, C., Schmidt, R.E. Human natural killer clones enhance in vivo antibody production by tumor necrosis factor alpha and gamma interferon *Scand J Immunol* 1990; 31: 153-162.
335. Dubravec DB, Spriggs, D.R., Mannick, J.A., Rodrick, M.L. Circulating human peripheral blood granulocytes synthesize and secrete tumor necrosis factor alpha. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990 Sep; 87: 6758-6761.
336. Aggarwal BB, Eessalu, T.E., Hass, P.E. Characterization of receptors for human tumour necrosis factor and their regulation by gamma-interferon. *Nature* 1985 Dec 19-1986 Jan 1; 318: 665-667.
337. Beutler B, Cerami, A. Tumor necrosis, cachexia, shock, and inflammation: a common mediator. *Annu Rev Biochem* 1988; 57: 505-518.
338. Goetze S, Kintscher, U., Kaneshiro, K., Meehan, W.P., Collins, A., Fleck, E., Hsueh, W.A., Law, R.E. TNFalpha induces expression of transcription factors c-fos, Egr-1, and Ets-1 in vascular lesions through extracellular signal-regulated kinases 1/2. *Atherosclerosis* 2001 Nov; 159: 93-101.
339. Goldblum SE, Ding, X., Campbell-Washington, J. TNF-alpha induces endothelial cell F-actin depolymerization, new actin synthesis, and barrier dysfunction. *Am J Physiol* 1993 Apr; 264: C894-905.
340. Petrache I, Birukova, A., Ramirez, S.I., Garcia, J.G., Verin, A.D. The role of the microtubules in tumor necrosis factor-alpha-induced endothelial cell permeability. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2003 May; 28: 574-581.
341. Goldblum SE, Sun, W.L. Tumor necrosis factor-alpha augments pulmonary arterial transendothelial albumin flux in vitro. *Am J Physiol* 1990 Feb; 258: L57-67.
342. Angelini DJ, Hyun, S.W., Grigoryev, D.N., Garg, P., Gong, P., Singh, I.S., Passaniti, A., Hasday, J.D., Goldblum, S.E. TNF-alpha increases tyrosine phosphorylation of vascular endothelial cadherin and opens the paracellular pathway through fyn activation in human lung endothelia. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2006 Dec; 291: L1232-1245. 2006 Aug 4.
343. Chappell D, Hofmann-Kiefer, K., Jacob, M., Rehm, M., Briegel, J., Welsch, U., Conzen, P., Becker, B.F. TNF-alpha induced shedding of the endothelial glycocalyx is prevented by hydrocortisone and antithrombin. *Basic Res Cardiol* 2009 Jan; 104: 78-89. 2008 Oct 3. DOI: 10.1007/s00395-008-0749-5.
344. Zhang Y, Yang, X., Bian, F., Wu, P., Xing, S., Xu, G., Li, W., Chi, J., Ouyang, C., Zheng, T., Wu, D., Zhang, Y., Li, Y., Jin, S. TNF- α promotes early atherosclerosis by increasing transcytosis of LDL across endothelial cells: crosstalk between NF- κ B and PPAR- γ . *J Mol Cell Cardiol* 2014 Jul; 72 2014 Mar 2. DOI: 10.1016/j.yjmcc.2014.02.012.
345. Bergh N, Ulfhammer, E., Glise, K., Jern, S., Karlsson, L. Influence of TNF-alpha and biomechanical stress on endothelial anti- and prothrombotic genes. *Biochem Biophys Res Commun* 2009 Jul 31; 385: 314-318. 2009 May 18. DOI: 10.1016/j.bbrc.2009.05.046.
346. Xanthoulea S, Thelen, M., Pöttgens, C., Gijbels, M.J., Lutgens, E., de Winther, M.P. Absence of p55 TNF receptor reduces atherosclerosis, but has no major effect on angiotensin II induced aneurysms in LDL receptor deficient mice. *PLoS One* 2009 Jul 7; 4: e6113. DOI: 10.1371/journal.pone.0006113.

347. Pober JS. Activation and injury of endothelial cells by cytokines. *Pathol Biol (Paris)* 1998 Mar; 46: 159-163.
348. Deisher TA, Haddix, T.L., Montgomery, K.F., Pohlman, T.H., Kaushansky, K., Harlan, J.M. The role of protein kinase C in the induction of VCAM-1 expression on human umbilical vein endothelial cells. *FEBS Lett* 1993 Oct 4; 331: 285-290.
349. Rajan S, Ye, J., Bai, S., Huang, F., Guo, Y.L. NF-kappaB, but not p38 MAP kinase, is required for TNF-alpha-induced expression of cell adhesion molecules in endothelial cells. *J Cell Biochem* 2008 Oct 1; 105: 477-486. DOI: 10.1002/jcb.21845.
350. Zhou Z, Connell, M.C., MacEwan, D.J. TNFR1-induced NF-kappaB, but not ERK, p38MAPK or JNK activation, mediates TNF-induced ICAM-1 and VCAM-1 expression on endothelial cells. *Cell Signal* 2007 Jun; 19: 1238-1248. 2007 Jan 18.
351. Cavender D, Saegusa, Y., Ziff, M. Stimulation of endothelial cell binding of lymphocytes by tumor necrosis factor. *J Immunol* 1987 Sep 15; 139: 1855-1860.
352. Chandrasekharan UM, Siemionow, M., Unsal, M., Yang, L., Poptic, E., Bohn, J., Ozer, K., Zhou, Z., Howe, P.H., Penn, M., DiCorleto, P.E. Tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) receptor-II is required for TNF-alpha-induced leukocyte-endothelial interaction in vivo. *Blood* 2007 Mar 1; 109: 1938-1944. 2006 Oct 26.
353. Urschel K, Wörner, A., Daniel, W.G., Garlichs, C.D., Cicha, I. Role of shear stress patterns in the TNF- α -induced atherogenic protein expression and monocytic cell adhesion to endothelium. *Clin Hemorheol Microcirc* 2010; 46: 203-210. DOI: 10.3233/CH-2010-1346.
354. Dimmeler S, Haendeler, J., Rippmann, V., Nehls, M., Zeiher, A.M. Shear stress inhibits apoptosis of human endothelial cells. *FEBS Lett* 1996 Dec 9; 399: 71-74.
355. Hoffmann J, Haendeler, J., Aicher, A., Rössig, L., Vasa, M., Zeiher, A.M., Dimmeler, S. Aging enhances the sensitivity of endothelial cells toward apoptotic stimuli: important role of nitric oxide. *Circ Res* 2001 Oct 12; 89: 709-715.
356. Dimmeler S, Hermann, C., Galle, J., Zeiher, A.M. Upregulation of superoxide dismutase and nitric oxide synthase mediates the apoptosis-suppressive effects of shear stress on endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999 Mar; 19: 656-664.
357. Garin G, Abe, J., Mohan, A., Lu, W., Yan, C., Newby, A.C., Rhaman, A., Berk, B.C. Flow antagonizes TNF-alpha signaling in endothelial cells by inhibiting caspase-dependent PKC zeta processing. *Circ Res* 2007 Jul 6; 101: 97-105. 2007 May 24.
358. Lerner-Marmarosh N, Yoshizumi, M., Che, W., Surapisitchat, J., Kawakatsu, H., Akaike, M., Ding, B., Huang, Q., Yan, C., Berk, B.C., Abe, J. Inhibition of tumor necrosis factor-[alpha]-induced SHP-2 phosphatase activity by shear stress: a mechanism to reduce endothelial inflammation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003 Oct 1; 23: 1775-1781. 2003 Aug 28.
359. Harry BL, Sanders, J.M., Feaver, R.E., Lansey, M., Deem, T.L., Zarbock, A., Bruce, A.C., Pryor, A.W., Gelfand, B.D., Blackman, B.R., Schwartz, M.A., Ley, K. Endothelial cell PECAM-1 promotes atherosclerotic lesions in areas of disturbed flow in ApoE-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008 Nov; 28: 2003-2008. 2008 Aug 7. DOI: 10.1161/ATVBAHA.108.164707.
360. Hajra L, Evans, A.I., Chen, M., Hyduk, S.J., Collins, T., Cybulsky, M.I. The NF-kappa B signal transduction pathway in aortic endothelial cells is primed for activation in regions predisposed to atherosclerotic lesion formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000 Aug 1; 97: 9052-9057.
361. Zakkar M, Chaudhury, H., Sandvik, G., Enesa, K., Luong le, A., Cuhlmann, S., Mason, J.C., Krams, R., Clark, A.R., Haskard, D.O., Evans, P.C. Increased endothelial mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 expression suppresses proinflammatory activation at sites that are resistant to atherosclerosis. *Circ Res* 2008 Sep 26; 103: 726-732. 2008 Aug 21. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.108.183913.
362. Baggiolini M, Loetscher, P. Chemokines in inflammation and immunity. *Immunol Today* 2000 Sep; 21: 418-420.

363. Moser B, Loetscher, P. Lymphocyte traffic control by chemokines. *Nat Immunol* 2001 Feb; 2: 123-128.
364. Schall TJ, Bacon, K.B. Chemokines, leukocyte trafficking, and inflammation. *Curr Opin Immunol* 1994 Dec; 6: 865-873.
365. Lukacs NW. Role of chemokines in the pathogenesis of asthma. *Nat Rev Immunol* 2001 Nov; 1: 108-116.
366. Deshmane SL, Kremlev, S., Amini, S., Sawaya, B.E. Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): an overview. *J Interferon Cytokine Res* 2009 Jun; 29: 313-326. DOI: 10.1089/jir.2008.0027.
367. Rot A, von Andrian, U.H. Chemokines in innate and adaptive host defense: basic chemokines grammar for immune cells. *Annu Rev Immunol* 2004; 22.
368. Callewaere C, Banisadr, G., Rostène, W., Parsadaniantz, S.M. Chemokines and chemokine receptors in the brain: implication in neuroendocrine regulation. *J Mol Endocrinol* 2007 Mar; 38: 355-363.
369. Colditz IG, Schneider, M.A., Pruenster, M., Rot, A. Chemokines at large: in-vivo mechanisms of their transport, presentation and clearance. *Thromb Haemost* 2007 May; 97: 688-693.
370. Wagner W, Roderburg, C., Wein, F., Diehlmann, A., Frankhauser, M., Schubert, R., Eckstein, V., Ho, A.D. Molecular and secretory profiles of human mesenchymal stromal cells and their abilities to maintain primitive hematopoietic progenitors. *Stem Cells* 2007 Oct; 25: 2638-2647. 2007 Jul 5.
371. Gerard C, Rollins, B.J. Chemokines and disease. *Nat Immunol* 2001 Feb; 2: 108-115.
372. Xia Y, Frangogiannis, N.G. MCP-1/CCL2 as a therapeutic target in myocardial infarction and ischemic cardiomyopathy. *Inflamm Allergy Drug Targets* 2007 Jun; 6: 101-107.
373. Rollins BJ. JE/MCP-1: an early-response gene encodes a monocyte-specific cytokine. *Cancer Cells* 1991 Dec; 3: 517-524.
374. Rollins BJ, Morrison, E.D., Stiles, C.D. Cloning and expression of JE, a gene inducible by platelet-derived growth factor and whose product has cytokine-like properties. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988 Jun; 85: 3738-3742.
375. Rollins BJ, Stier, P., Ernst, T., Wong, G.G. The human homolog of the JE gene encodes a monocyte secretory protein. *Mol Cell Biol* 1989 Nov; 9: 4687-4695.
376. Ylä-Herttuala S, Lipton, B.A., Rosenfeld, M.E., Särkioja, T., Yoshimura, T., Leonard, E.J., Witztum, J.L., Steinberg, D. Expression of monocyte chemoattractant protein 1 in macrophage-rich areas of human and rabbit atherosclerotic lesions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991 Jun 15; 88: 5252-5256.
377. Garcia-Zepeda EA, Combadiere, C., Rothenberg, M.E., Sarafi, M.N., Lavigne, F., Hamid, Q., Murphy, P.M., Luster, A.D. Human monocyte chemoattractant protein (MCP)-4 is a novel CC chemokine with activities on monocytes, eosinophils, and basophils induced in allergic and nonallergic inflammation that signals through the CC chemokine receptors (CCR)-2 and -3. *J Immunol* 1996 Dec 15; 157: 5613-5626.
378. Garcia-Zepeda EA, Rothenberg, M.E., Ownbey, R.T., Celestin, J., Leder, P., Luster, A.D. Human eotaxin is a specific chemoattractant for eosinophil cells and provides a new mechanism to explain tissue eosinophilia. *Nat Med* 1996 Apr; 2: 449-456.
379. Terkeltaub R, Boisvert, W.A., Curtiss, L.K. Chemokines and atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol* 1998 Oct; 9: 397-405.
380. Han KH, Chang, M.K., Boullier, A., Green, S.R., Li, A., Glass, C.K., Quehenberger, O. Oxidized LDL reduces monocyte CCR2 expression through pathways involving peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *J Clin Invest* 2000 Sep; 106: 793-802.
381. Tuttle DL, Harrison, J.K., Anders, C., Sleasman, J.W., Goodenow, M.M. Expression of CCR5 increases during monocyte differentiation and directly mediates macrophage susceptibility to infection by human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* 1998 Jun; 72: 4962-4969.

382. Hansson GK. Cell-mediated immunity in atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol* 1997 Oct; 8: 301-311.
383. Nelken NA, Coughlin, S.R., Gordon, D., Wilcox, J.N. Monocyte chemoattractant protein-1 in human atheromatous plaques. *J Clin Invest* 1991 Oct; 88: 1121-1127.
384. Law MR, Wald, N.J., Rudnicka, A.R. Quantifying effect of statins on low density lipoprotein cholesterol, ischaemic heart disease, and stroke: systematic review and meta-analysis. *BMJ* 2003 Jun 28; 326: 1423.
385. Gotto AMJ, Moon, J.E. Recent clinical studies of the effects of lipid-modifying therapies. *Am J Cardiol* 2012 Jul 1; 110: 15A-26A. DOI: 10.1016/j.amjcard.2012.04.003.
386. Girotra S, Murarka, S., Migrino, R.Q. Plaque regression and improved clinical outcomes following statin treatment in atherosclerosis. *Panminerva Med* 2012 Jun; 54: 71-81.
387. Arsenault BJ, Kritikou, E.A., Tardif, J.C. Regression of atherosclerosis. *Curr Cardiol Rep* 2012 Aug; 14: 443-449. DOI: 10.1007/s11886-012-0285-7.
388. Taylor F, Huffman, M.D., Macedo, A.F., Moore, T.H., Burke, M., Davey Smith, G., Ward, K., Ebrahim, S. Statins for the primary prevention of cardiovascular disease. *Cochrane Database Syst Rev* 2013 Jan 31: CD004816. DOI: 10.1002/14651858.CD004816.pub5.
389. Cilla DDJ, Gibson, D.M., Whitfield, L.R., Sedman, A.J. Pharmacodynamic effects and pharmacokinetics of atorvastatin after administration to normocholesterolemic subjects in the morning and evening. *J Clin Pharmacol* 1996 Jul; 36: 604-609.
390. Wallace A, Chinn, D., Rubin, G. Taking simvastatin in the morning compared with in the evening: randomised controlled trial. *BMJ* 2003 Oct 4; 327: 788.
391. Miettinen TA. Diurnal variation of cholesterol precursors squalene and methyl sterols in human plasma lipoproteins. *J Lipid Res* 1982 Mar; 23: 466-473.
392. Pichandi S, Rao, Y.Y., Farook, J., Pasupathi, P., Bakthavathsalam, G., Subramaniyam, S., Virumandye, R., Shankar Ponnushac, B., Ambika, A. Comparative evaluation of the effect of statin drugs in Hyperlipidaemic patients. *Int J Cur Biomed Phar Res* 2011; 1: 06 - 10.
393. Shepherd J, Hunninghake, D.B., Barter, P., McKenney, J.M., Hutchinson, H.G. Guidelines for lowering lipids to reduce coronary artery disease risk: a comparison of rosuvastatin with atorvastatin, pravastatin, and simvastatin for achieving lipid-lowering goals. *Am J Cardiol* 2003 Mar 6; 91: 11C-17C; discussion 17C-19C.
394. Tonelli M, Lloyd, A., Clement, F., Conly, J., Husereau, D., Hemmelgarn, B., Klarenbach, S., McAlister, F.A., Wiebe, N., Manns, B.; Alberta Kidney Disease Network. Efficacy of statins for primary prevention in people at low cardiovascular risk: a meta-analysis. *CMAJ* 2011 Nov 8; 183: E1189-1202. 2011 Oct 11. DOI: 10.1503/cmaj.101280.
395. Zhou Z, Rahme, E., Pilote, L. Are statins created equal? Evidence from randomized trials of pravastatin, simvastatin, and atorvastatin for cardiovascular disease prevention. *Am Heart J* 2006 Feb; 151: 273-281.
396. Centre NCG. Lipid modification: Cardiovascular risk assessment and the modification of blood lipids for the primary and secondary prevention of cardiovascular disease. In: Excellence NIfHaC, (ed.). 2014 Jul.
397. Ray KK, Seshasai, S.R., Erqou, S., Sever, P., Jukema, J.W., Ford, I., Sattar, N. Statins and all-cause mortality in high-risk primary prevention: a meta-analysis of 11 randomized controlled trials involving 65,229 participants. *Arch Intern Med* 2010 Jun 28; 170: 1024-1031. DOI: 10.1001/archinternmed.2010.182.
398. Mills EJ, Wu, P., Chong, G., Ghement, I., Singh, S., Akl, E.A., Eyawo, O., Guyatt, G., Berwanger, O., Briel, M. Efficacy and safety of statin treatment for cardiovascular disease: a network meta-analysis of 170,255 patients from 76 randomized trials. *QJM* 2011 Feb; 104: 109-124. 2010 Oct 7. DOI: 10.1093/qjmed/hcq165.

399. Missen FE, Nicholls, S.J., Sipahi, I., et al., ASTEROID Investigators. Effect of very high-intensity statin therapy on regression of coronary atherosclerosis: the ASTEROID trial. *JAMA* 2006; 295: 1556-1565.
400. Ridker PM, Danielson, E., Fonseca, F.A., Genest, J., Gotto, A.M. Jr., Kastelein, J.J., Koenig, W., Libby, P., Lorenzatti, A.J., MacFadyen, J.G., Nordestgaard, B.G., Shepherd, J., Willerson, J.T., Glynn, R.J.; JUPITER Study Group. Rosuvastatin to prevent vascular events in men and women with elevated C-reactive protein. *N Engl J Med* 2008 Nov 20; 359: 2195-2207. 2008 Nov 9. DOI: 10.1056/NEJMoa0807646.
401. Furberg CD. Natural statins and stroke risk. *Circulation* 1999 Jan 19; 99: 185-188.
402. Calkin AC, Giunti, S., Sheehy, K.J., Chew, C., Boolell, V., Rajaram, Y.S., Cooper, M.E., Jandeleit-Dahm, K.A. The HMG-CoA reductase inhibitor rosuvastatin and the angiotensin receptor antagonist candesartan attenuate atherosclerosis in an apolipoprotein E-deficient mouse model of diabetes via effects on advanced glycation, oxidative stress and inflammation. *Diabetologia* 2008 Sep; 51: 1731-1740. 2008 Jul 2. DOI: 10.1007/s00125-008-1060-6.
403. Bea F, Blessing, E., Bennett, B., Levitz, M., Wallace, E.P., Rosenfeld, M.E. Simvastatin promotes atherosclerotic plaque stability in apoE-deficient mice independently of lipid lowering. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002; 22: 1832-1837.
404. Grönros J, Wikström, J., Brandt-Eliasson, U., Forsberg, G.B., Behrendt, M., Hansson, G.I., Gan, L.M. Effects of rosuvastatin on cardiovascular morphology and function in an ApoE-knockout mouse model of atherosclerosis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2008 Nov; 295: H2046-2053. 2008 Sep 12. DOI: 10.1152/ajpheart.00133.2008.
405. Nakamura K, Sasaki, T., Cheng, X.W., Iguchi, A., Sato, K., Kuzuya, M. Statin prevents plaque disruption in apoE-knockout mouse model through pleiotropic effect on acute inflammation. *Atherosclerosis* 2009 Oct; 206: 355-361. 2009 Feb 21. DOI: 10.1016/j.atherosclerosis.2009.02.014.
406. Shiraya S, Miyake, T., Aoki, M., Yoshikazu, F., Ohgi, S., Nishimura, M., Ogihara, T., Morishita, R. Inhibition of development of experimental aortic abdominal aneurysm in rat model by atorvastatin through inhibition of macrophage migration. *Atherosclerosis* 2009 Jan; 202: 34-40. 2008 Apr 6. DOI: 10.1016/j.atherosclerosis.2008.03.020.
407. Suzuki H, Kobayashi, H., Sato, F., Yonemitsu, Y., Nakashima, Y., Sueishi, K. Plaque-stabilizing effect of pitavastatin in Watanabe heritable hyperlipidemic (WHHL) rabbits. *J Atheroscler Thromb* 2003; 10: 109-116.
408. Cuccurullo C, Iezzi, A., Fazia, M.L., De Cesare, D., Di Francesco, A., Muraro, R., Bei, R., Uchino, S., Spigonardo, F., Chiarelli, F., et al. Suppression of RAGE as a basis of simvastatin-dependent plaque stabilization in type 2 diabetes. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006 Dec; 26: 2716-2723. 2006 Oct 12.
409. Rombouts K, Kisanga, E., Hellemans, K., Wielant, A., Schuppan, D., Geerts, A. Effect of HMG-CoA reductase inhibitors on proliferation and protein synthesis by rat hepatic stellate cells. *J Hepatol* 2003 May; 38: 564-572.
410. Steinmetz EF, Buckley, C., Shames, M.L., Ennis, T.L., Vanvickle-Chavez, S.J., Mao, D., Goeddel, L.A., Hawkins, C.J., Thompson, R.W. Treatment with simvastatin suppresses the development of experimental abdominal aortic aneurysms in normal and hypercholesterolemic mice. *Ann Surg* 2005 Jan; 241: 92-101.
411. Zhou G, Ge, S., Liu, D., Xu, G., Zhang, R., Yin, Q., Zhu, W., Chen, J., Liu, X. Atorvastatin reduces plaque vulnerability in an atherosclerotic rabbit model by altering the 5-lipoxygenase pathway. *Cardiology* 2010; 115: 221-228. 2010 Mar 16. DOI: 10.1159/000296017.
412. Qiang B, Toma, J., Fujii, H., Osherov, A.B., Nili, N., Sparkes, J.D., Fefer, P., Samuel, M., Butany, J., Leong-Poi, H., Strauss, B.H. Statin therapy prevents expansive remodeling in venous bypass grafts. *Atherosclerosis* 2012 Jul; 223: 106-113. 2012 Mar 22. DOI: 10.1016/j.atherosclerosis.2012.03.013.

413. Kajimoto K, Miyauchi, K., Kasai, T., Shimada, K., Kojima, Y., Shimada, A., Niinami, H., Amano, A., Daida, H. Short-term 20-mg atorvastatin therapy reduces key inflammatory factors including c-Jun N-terminal kinase and dendritic cells and matrix metalloproteinase expression in human abdominal aortic aneurysmal wall. *Atherosclerosis* 2009 Oct; 206: 505-511. 2009 Apr 5. DOI: 10.1016/j.atherosclerosis.2009.03.028.
414. Yu DQ, Lin, S.G., Chen, J.Y., Xue, L., Li, G., Dong, H.J., Zhou, Y.L. Effect of atorvastatin therapy on borderline vulnerable lesions in patients with acute coronary syndrome. *Arch Med Sci* 2011 Jun; 7: 433-439. 2011 Jul 11. DOI: 10.5114/aoms.2011.23408.
415. Kapourchali FR, Surendiran, G., Chen, L., Uitz, E., Bahadori, B., Moghadasian, M.H. Animal models of atherosclerosis. *World J Clin Cases* 2014 May 16; 2: 126-132. DOI: 10.12998/wjcc.v2.i5.126.
416. Jawień J, Nastalek, P., Korbut, R. Mouse models of experimental atherosclerosis. *J Physiol Pharmacol* 2004 Sep; 55: 503-517.
417. Consortium MGS. Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. *Nature* 2002 Dec 5; 420: 520-562.
418. Zhang SH, Reddick, R.L., Piedrahita, J.A., Maeda, N. Spontaneous hypercholesterolemia and arterial lesions in mice lacking apolipoprotein E. *Science* 1992 Oct 16; 258: 468-471.
419. Plump AS, Smith, J.D., Hayek, T., Aalto-Setälä, K., Walsh, A., Verstuyft, J.G., Rubin, E.M., Breslow, J.L. Severe hypercholesterolemia and atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice created by homologous recombination in ES cells. *Cell* 1992 Oct 16; 71: 343-353.
420. van Vlijmen BJ, van Dijk, K.W., van't Hof, H.B., van Gorp, P.J., van der Zee, A., van der Boom, H., Breuer, M.L., Hofker, M.H., Havekes, L.M. In the absence of endogenous mouse apolipoprotein E, apolipoprotein E*2(Arg-158 --> Cys) transgenic mice develop more severe hyperlipoproteinemia than apolipoprotein E*3-Leiden transgenic mice. *J Biol Chem* 1996 Nov 29; 271: 30595-30602.
421. Linton MF, Hasty, A.H., Babaev, V.R., Fazio, S. Hepatic apo E expression is required for remnant lipoprotein clearance in the absence of the low density lipoprotein receptor. *J Clin Invest* 1998 Apr 15; 101: 1726-1736.
422. Curtiss LK, Boisvert, W.A. Apolipoprotein E and atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol* 2000 Jun; 11: 243-251.
423. Sehayek E, Shefer, S., Nguyen, L.B., Ono, J.G., Merkel, M., Breslow, J.L. Apolipoprotein E regulates dietary cholesterol absorption and biliary cholesterol excretion: studies in C57BL/6 apolipoprotein E knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000 Mar 28; 97: 3433-3437.
424. Mahley RW. Apolipoprotein E: cholesterol transport protein with expanding role in cell biology. *Science* 1988 Apr 29; 240: 622-630.
425. Meir KS, Leitersdorf, E. Atherosclerosis in the apolipoprotein-E-deficient mouse: a decade of progress. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004 Jun; 24: 1006-1014. 2004 Apr 15.
426. Nakashima Y, Plump, A.S., Raines, E.W., Breslow, J.L., Ross, R. ApoE-deficient mice develop lesions of all phases of atherosclerosis throughout the arterial tree. *Arterioscler Thromb* 1994 Jan; 14: 133-140.
427. Piedrahita JA, Zhang, S.H., Hagan, J.R., Oliver, P.M., Maeda, N. Generation of mice carrying a mutant apolipoprotein E gene inactivated by gene targeting in embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992 May 15; 89: 4471-4475.
428. Bentzon JF, Falk, E. Atherosclerotic lesions in mouse and man: is it the same disease? *Curr Opin Lipidol* 2010 Oct; 21: 434-440. DOI: 10.1097/MOL.0b013e32833ded6a.
429. Miller NE. Associations of high-density lipoprotein subclasses and apolipoproteins with ischemic heart disease and coronary atherosclerosis. *Am Heart J* 1987 Feb; 113: 589-597.
430. Davidson WS, Silva, R.A., Chantepie, S., Lagor, W.R., Chapman, M.J., Kontush, A. Proteomic analysis of defined HDL subpopulations reveals particle-specific protein clusters:

- relevance to antioxidative function. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2009 Jun; 29: 870-876. 2009 Mar 26. DOI: 10.1161/ATVBAHA.109.186031.
431. Breslow JL. Mouse models of atherosclerosis. *Science* 1996 May 3; 272: 685-688.
432. Reddick RL, Zhang, S.H., Maeda, N. Atherosclerosis in mice lacking apo E. Evaluation of lesion development and progression. *Arterioscler Thromb* 1994 Jan; 14: 141-147.
433. Desurmont C, Caillaud, J.M., Emmanuel, F., Benoit, P., Fruchart, J.C., Castro, G., Branellec, D., Heard, J.M., Duverger, N. Complete atherosclerosis regression after human ApoE gene transfer in ApoE-deficient/nude mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000 Feb; 20: 435-442.
434. Nikoulin IR, Curtiss, L.K. An apolipoprotein E synthetic peptide targets to lipoproteins in plasma and mediates both cellular lipoprotein interactions in vitro and acute clearance of cholesterol-rich lipoproteins in vivo. *J Clin Invest* 1998 Jan 1; 101: 223-234.
435. Hasty AH, Linton, M.F., Swift, L.L., Fazio, S. Determination of the lower threshold of apolipoprotein E resulting in remnant lipoprotein clearance. *J Lipid Res* 1999 Aug; 40: 1529-1538.
436. Thorngate FE, Rudel, L.L., Walzem, R.L., Williams, D.L. Low levels of extrahepatic nonmacrophage ApoE inhibit atherosclerosis without correcting hypercholesterolemia in ApoE-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000 Aug; 20: 1939-1945.
437. Miyata M, Smith, J.D. Apolipoprotein E allele-specific antioxidant activity and effects on cytotoxicity by oxidative insults and beta-amyloid peptides. *Nat Genet* 1996 Sep; 14: 55-61.
438. van Ree JH, van den Broek, W.J., Dahlmans, V.E., Groot, P.H., Vidgeon-Hart, M., Frants, R.R., Wieringa, B., Havekes, L.M., Hofker, M.H. Diet-induced hypercholesterolemia and atherosclerosis in heterozygous apolipoprotein E-deficient mice. *Atherosclerosis* 1994 Nov; 111: 25-37.
439. Moustardas P, Kadoglou, N.P., Katsimpoulas, M., Kapelouzou, A., Kostomitsopoulos, N., Karayannacos, P.E., Kostakis, A., Liapis, C.D. The complementary effects of atorvastatin and exercise treatment on the composition and stability of the atherosclerotic plaques in ApoE knockout mice. *PLoS One* 2014 Sep 29; 9: e108240. DOI: 10.1371/journal.pone.0108240.
440. Kadoglou NP, Moustardas, P., Katsimpoulas, M., Kapelouzou, A., Kostomitsopoulos, N., Schafer, K., Kostakis, A., Liapis, C.D. . The beneficial effects of a direct thrombin inhibitor, dabigatran etexilate, on the development and stability of atherosclerotic lesions in apolipoprotein E-deficient mice : dabigatran etexilate and atherosclerosis. *Cardiovasc Drugs Ther* 2012 Oct; 26: 367-374. DOI: 10.1007/s10557-012-6411-3.
441. Kadoglou NP, Moustardas, P., Kapelouzou, A., Katsimpoulas, M., Giagini, A., Dede, E., Kostomitsopoulos, N., Karayannacos, P.E., Kostakis, A., Liapis, C.D. . The anti-inflammatory effects of exercise training promote atherosclerotic plaque stabilization in apolipoprotein E knockout mice with diabetic atherosclerosis. *Eur J Histochem* 2013 Mar 25; 57: e3. DOI: 10.4081/ejh.2013.e3.
442. Katsimpoulas. M. KNE, Moustardas, P., Kapelouzou, A., Dede, E., Kostomitsopoulos, N., Karayannacos, P.E., Kostakis, A., Liapis, C.D. The role of exercise training and the endocannabinoid system in atherosclerotic plaque burden and composition in Apo-E-deficient mice. *Hellenic J Cardiol* 2016 Nov - Dec; 57: 417-425. 2016 Nov 16. DOI: 10.1016/j.hjc.2016.11.013.
443. Heeschen C, Hamm, C.W., Laufs, U., Snapinn, S., Böhm, M., White, H.D.; Platelet Receptor Inhibition in Ischemic Syndrome Management (PRISM) Investigators. Withdrawal of statins increases event rates in patients with acute coronary syndromes. *Circulation* 2002 Mar 26; 105: 1446-1452.
444. Fonarow GC, Wright, R.S., Spencer, F.A., Fredrick, P.D., Dong, W., Every, N., French, W.J.; National Registry of Myocardial Infarction 4 Investigators. Effect of statin use within the first 24 hours of admission for acute myocardial infarction on early morbidity and mortality. *Am J Cardiol* 2005 Sep 1; 96: 611-616.
445. Spencer FA, Allegro, J., Goldberg, R.J., Gore, J.M., Fox, K.A., Granger, C.B., Mehta, R.H., Brieger, D.; GRACE Investigators. Association of statin therapy with outcomes of acute coronary syndromes: the GRACE study. *Ann Intern Med* 2004 Jun 1; 140: 857-866.

446. Cubeddu LX, Seamon, M.J. Statin withdrawal: clinical implications and molecular mechanisms. *Pharmacotherapy* 2006 Sep; 26: 1288-1296.
447. Schäfer K, Kaiser, K., Konstantinides, S. Rosuvastatin exerts favourable effects on thrombosis and neointimal growth in a mouse model of endothelial injury. *Thrombosis and haemostasis* 2005; 93: 145-152.
448. Crisby M, Nordin-Fredriksson, G., Shah, P.K., Yano, J., Zhu, J., Nilsson, J. Pravastatin treatment increases collagen content and decreases lipid content, inflammation, metalloproteinases, and cell death in human carotid plaques: implications for plaque stabilization. *Circulation* 2001 Feb 20; 103: 926-933.
449. Niwa S, Totsuka, T., Hayashi, S. Inhibitory effect of fluvastatin, an HMG-CoA reductase inhibitor, on the expression of adhesion molecules on human monocyte cell line. *Int J Immunopharmacol* 1996 Nov; 18: 669-675.
450. Rosenson RS, Tangney, C.C., Casey, L.C. Inhibition of proinflammatory cytokine production by pravastatin. *Lancet* 1999 Mar 20; 353: 983-984.
451. Battes LC, Cheng, J.M., Oemrawsingh, R.M., Boersma, E., Garcia-Garcia, H.M., de Boer, S.P., Buljubasic, N., Mieghem, N.A., Regar, E., Geuns, R.J., Serruys, P.W., Akkerhuis, K.M., Kardys, I. Circulating cytokines in relation to the extent and composition of coronary atherosclerosis: results from the ATHEROREMO-IVUS study. *Atherosclerosis* 2014 Sep; 236: 18-24. 2014 Jun 26. DOI: 10.1016/j.atherosclerosis.2014.06.010.
452. Inoue S, Egashira, K., Ni, W., Kitamoto, S., Usui, M., Otani, K., Ishibashi, M., Hiasa, K., Nishida, K., Takeshita, A. Anti-monocyte chemoattractant protein-1 gene therapy limits progression and destabilization of established atherosclerosis in apolipoprotein E-knockout mice. *Circulation* 2002 Nov 19; 106: 2700-2706.
453. Ait-Oufella H, Taleb, S., Mallat, Z., Tedgui, A. Recent advances on the role of cytokines in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2011 May; 31: 969-979. DOI: 10.1161/ATVBAHA.110.207415.
454. Fukumoto Y, Libby, P., Rabkin, E., Hill, C.C., Enomoto, M., Hirouchi, Y., Shiomi, M., Aikawa, M. Statins alter smooth muscle cell accumulation and collagen content in established atheroma of watanabe heritable hyperlipidemic rabbits. *Circulation* 2001 Feb 20; 103: 993-999.
455. Lai WT, Lee, K.T., Chu, C.S., Voon, W.C., Yen, H.W., Tsai, L.Y., Sheu, S.H. Influence of withdrawal of statin treatment on proinflammatory response and fibrinolytic activity in humans: an effect independent on cholesterol elevation. *Int J Cardiol* 2005 Feb 28; 98: 459-464.
456. Sposito AC, Carvalho, L.S., Cintra, R.M., Araújo, A.L., Ono, A.H., Andrade, J.M., Coelho, O.R., Quinaglia e Silva, J.C.; Brasilia Heart Study Group. Rebound inflammatory response during the acute phase of myocardial infarction after simvastatin withdrawal. *Atherosclerosis* 2009 Nov; 207: 191-194. 2009 Apr 17. DOI: 10.1016/j.atherosclerosis.2009.04.008.
457. Schwartz SM, Galis, Z.S., Rosenfeld, M.E., Falk, E. Plaque rupture in humans and mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007 Apr; 27: 705-713. 2007 Mar 1.
458. Jackson CL, Bennett, M.R., Biessen, E.A., Johnson, J.L., Krams, R. Assessment of unstable atherosclerosis in mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007 Apr; 27: 714-720. 2007 Mar 1.
459. Johnson J, L., Jackson, C.L. Atherosclerotic plaque rupture in the apolipoprotein E knockout mouse. *Atherosclerosis* 2001 Feb 1; 154: 399-406.

Περίληψη

Σκοπός της μελέτης: Η επιθετική μείωση των λιπιδίων με τη χορήγηση 'στατινών μπορεί να μειώσει την καρδιαγγειακή νοσηρότητα και θνητότητα σε ασθενείς με αθηροσκλήρωση. Η δράση των στατινών δεν περιορίζεται μόνο στη μείωση της LDL χοληστερόλης αλλά και στις λεγόμενες πλειοτροπικές δράσεις τους.

Η αστάθεια της αθηρωματικής πλάκας αποτελεί μία έννοια που έχει εισαχθεί τα τελευταία χρόνια προκειμένου να εξηγήσει γιατί κάποιες αθηρωματικές πλάκες προκαλούν συμπτώματα (πχ εμφράγματα ή αγγειακά εγκεφαλικά επεισόδια), ενώ κάποιες άλλες πλάκες όχι, παρά το γεγονός ότι προκαλούν τον ίδιο ή και μεγαλύτερο βαθμό στένωσης. Χαρακτηριστικά της ασταθούς αθηρωματικής πλάκας αποτελούν η υψηλή περιεκτικότητα σε λίπη, η ενδοπλακική αιμορραγία, η εγγύτητα του νεκρωτικού πυρήνα με τον αυλό, η λεπτή ινώδης κάψα, η παρουσία έλκους στην επιφάνειά της και η υψηλή φλεγμονώδης δραστηριότητα. Οι στατίνες συμβάλλουν στη σταθεροποίηση της αθηρωματικής πλάκας τόσο μέσω των υπολιπιδαιμικών τους ιδιοτήτων όσο και μέσω των αντιοξειδωτικών και αντιφλεγμονωδών δράσεών τους. Η διατήρηση των ευεργετικών αυτών επιδράσεων των στατινών απαιτεί, προφανώς, τη συνεχή και αδιάλειπτη λήψη τους. Παρόλα αυτά, όμως, πολλοί ασθενείς διακόπτουν αυθαίρετα τη λήψη των στατινών μόλις διαπιστώσουν ότι επετεύχθησαν τα επιθυμητά επίπεδα χοληστερόλης.

Στόχος της παρούσας εργασίας αποτελεί η μελέτη των επιδράσεων που μπορεί να έχει η απόσυρση της θεραπείας με ατορβαστατίνη στην εξέλιξη και σταθερότητα των αθηρωματικών αλλοιώσεων σε πειραματικό ζωικό πρότυπο αθηρωμάτωσης.

Υλικά και Μέθοδοι: Σε 70 αρσενικούς ApoE knock-out (C57BL/6J) μύες και σε ηλικία 8 εβδομάδων ξεκίνησε η καθημερινή χορήγηση αθηρογόνου τροφής με υψηλή περιεκτικότητα σε λιπαρά και χοληστερόλη (Harlan, Teklad, 88137) προκειμένου να αναπτυχθεί αθηρωμάτωση. Σε ηλικία 18 εβδομάδων τα ζώα χωρίστηκαν τυχαία στις εξής πειραματικές ομάδες: **A) CONTROL (N=20):** Χορήγηση διαμέσου δι-οισοφάγειου καθετήρα φυσιολογικό ορό (vehicle). Τα ζώα ευθανατώθηκαν σε δύο φάσεις: i) Ομάδα CO-6W (n=10) στις 6 εβδομάδες και ii) τα υπόλοιπα n=10 στις 12 εβδομάδες. **B) Full treatment (ATL, N=10):** Από την 11η εβδομάδα πειράματος (19η εβδομάδα ηλικίας) και μετά ξεκίνησε η καθημερινή χορήγηση διαμέσου δι-οισοφάγειου καθετήρα atorvastatin (20mg/kg/day) η οποία διήρκεσε 12 εβδομάδες. **Γ) Short treatment (ATS, N=10):** Καθημερινή χορήγηση διαμέσου δι-οισοφάγειου καθετήρα atorvastatin (20mg/kg/day) για 6 εβδομάδες. **Δ) Removal (N=30):** Καθημερινή χορήγηση διαμέσου δι-οισοφάγειου καθετήρα υψηλής δόσης atorvastatin (20mg/kg/day) για 6 εβδομάδες. Στο τέλος της 6ης εβδομάδας θα σταματήσει η χορήγηση atorvastatin για τρεις ημέρες (ATR-3D, n=10), επτά ημέρες (ATR-7D, n=10) και 6 εβδομάδες (ATR-6, n=10).

Προ της ευθανασίας των ζώων πραγματοποιήθηκε αιμοληψία και αμέσως μετά έγινε για λήψη ιστών και οργάνων (αορτή, ήπαρ, καρδιά) για ιστολογική ανάλυση. Τρεις ημέρες πριν από την ολοκλήρωση χορήγησης της προβλεπόμενης τροφής, πραγματοποιήθηκε μετά από 6ωρη νηστεία δοκιμασία ανοχής στη γλυκόζη με την ενδοπεριτοναϊκή έγχυση γλυκόζης (2 g/kg body weight) και τη μέτρηση των επιπέδων σακχάρου στο αίμα των πειραματοζώων τις χρονικές στιγμές 0, 15, 30, 60, 90 και 120 min από τη στιγμή έγχυσης της γλυκόζης. Ο ορός των πειραματοζώων αποθηκεύθηκε σε δοκιμαστικά σωληνάρια τα οποία τοποθετήθηκαν σε ειδικό καταψύκτη (-80 °C) για βιοχημική ανάλυση.

Αποτελέσματα: Η μακροχρόνια αγωγή με την ατορβαστατίνη (ATL) προκάλεσε παλινδρόμηση και σταθεροποίηση των αθηρωματικών πλακών σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου ($p < 0,05$). Η απόσυρση της ατορβαστατίνης συνδέθηκε με οξεία (ATW-3D) μείωση του περιεχομένου των πλακών σε συνδετικό ιστό και κολλαγόνο σε σύγκριση με την ομάδα βραχείας αγωγής (ATS) ($p < 0,05$). Αυτές οι αλλαγές σχεδόν αποκαταστάθηκαν μετά από λίγο (ATW-7D) και άρχισαν να εμφανίζονται ξανά μετά από τη διακοπή μεγαλύτερης διάρκειας (ATW-6W). Επιπλέον, η απόσυρση ατορβαστατίνης προκάλεσε σύντομα (ATW-3D) μια κορυφή στις συγκεντρώσεις φλεγμονωδών δεικτών (μακροφάγων, MCP-1, TNF- α) και μεταλλοπρωτεϊνών μήτρας (MMP-3, MMP-9) κατά τη διάρκεια του χρόνου (ATW-7D, ATW-6W).

Συμπεράσματα: Η αδιάλειπτη χορήγηση ατορβαστατίνης εξασθένησε την εξέλιξη της αθηρωμάτωσης και ενίσχυσε την σταθερότητα της πλάκας μέσω της καταστολής του φλεγμονώδους δυναμικού εντός των αορτικών αθηρωματικών βλαβών των υπερχοληστερολαιμικών ApoE $-/-$ μυών. Ωστόσο, όταν η θεραπεία με ατορβαστατίνη διακόπηκε ξαφνικά, η αθηροπροστατευτική δράση της φάνηκε να ανακαλείται αμέσως, οδηγώντας σε οξεία αποσταθεροποίηση της πλάκας. Η οξεία απελευθέρωση φλεγμονωδών μεσολαβητών εντός των αθηρωματικών πλακών μετά τη διακοπή της στατίνης μπορεί να εξηγεί μηχανιστικά τις δυσμενείς και υπερβολικές αλλοιώσεις στη σταθερότητα της πλάκας βραχυπρόθεσμα. Αυτά τα αποτελέσματα εξομαλύνθηκαν στη συνέχεια, οδηγώντας τελικά σε μια σταδιακή αποσταθεροποίηση πλάκας μακροπρόθεσμα. Τα ευρήματά μας είναι κλινικά σημαντικά περιγράφοντας τις ανεπιθύμητες ενέργειες σε ασθενείς υψηλού κινδύνου που δεν συμμορφώνονται με τη μη διακοπτόμενη θεραπεία με στατίνες.

Summary

Background: Aggressive lipid reduction by the administration of statins may reduce cardiovascular morbidity and mortality in patients with atherosclerosis. Statins action is not limited to the reduction of LDL cholesterol but also to their so-called pleiotropic actions.

Atherosclerotic plaque instability is a concept that has been introduced recently in order to explain why some atherosclerotic plaques cause symptoms (eg, heart attacks or strokes), while some other plaques do not, despite resulting in the same or greater degree of stenosis. Characteristics of the unstable atherosclerotic plaque are high fat content, intra-plaque hemorrhage, proximity of the necrotic nucleus to the lumen, thin fibrous cap, presence of ulceration on its surface and high inflammatory activity. Statins help to stabilize the atherosclerotic plaque both through their hypolipidemic properties and through their antioxidant and anti-inflammatory actions. Maintaining these beneficial effects of statins obviously requires their continued and uninterrupted administration. However, many patients discontinue arbitrarily their treatment as soon as they find that the desired cholesterol levels have been achieved.

The aim of this study is to evaluate the impact of atorvastatin discontinuation on the progression and stability of atherosclerotic plaques in a valid animal model of atherosclerosis.

Materials & Methods: Seventy *ApoE*^{-/-} male mice fed with high-fat diet (Harlan, Teklad, 88137), beginning at the age of 8 weeks, were randomly assigned into the following experimental groups: A) Long-term intervention groups: 1) ATL, received atorvastatin for 12 weeks, 2) CO-12W, control received vehicle for 12 weeks, 3) ATW-6W, received atorvastatin for 6 weeks which was withdrawn for another 6 weeks. B) Short-term intervention groups: 1) ATS received atorvastatin for 6 weeks, 2) CO-6W, control receiving vehicle for 6 weeks, 3) ATW-3D, ATW-7D, received atorvastatin for 6 weeks which was withdrawn for 3 days and 7 days, respectively. Daily dosage of atorvastatin was 20 mg/kg. Mice were sacrificed, and aortic samples were obtained for histological evaluation. Blood serum was stored in test tubes which were placed in a special freezer (-80 ° C) for biochemical analysis. Before the euthanasia of the animals, a blood sampling took place and immediately afterwards it was done for tissue and organs (aorta, liver, heart) for histological analysis. Three days prior to euthanasia, a glucose tolerance test was performed after 6-hour fasting by glucose intraperitoneal administration (2 g / kg body weight) and blood glucose levels of the experimental animals were measured at 0, 15, 30, 60, 90 and 120 min.

Results: Long-term atorvastatin treatment (ATL) induced atherosclerosis regression and stabilization compared to control ($p < 0.05$). Atorvastatin's withdrawal was associated with acute (ATW-3D) reduction in connective tissue and collagen contents within plaques compared to ATS ($p < 0.05$).

Those changes were almost restored after a while (ATW-7D) and started appearing again after longer cessation (ATW-6W). Moreover, atorvastatin withdrawal induced shortly (ATW-3D) a peak in inflammatory markers (macrophages, MCP-1, TNF- α) and matrix metalloproteinases (MMP-3, MMP-9) concentrations within plaques, which sustained but to a lesser extent along time (ATW-7D, ATW-6W).

Conclusion: In conclusion, the uninterrupted atorvastatin administration attenuated atherosclerosis progression and enhanced plaque stability via the suppression of inflammatory potential within the aortic atherosclerotic lesions of hypercholesterolemic ApoE^{-/-} mice. When atorvastatin therapy was suddenly ceased, its atheroprotective effect seemed to be revoked promptly, leading to acute plaque destabilization, independent of cholesterol levels changes. The acute release of inflammatory mediators within the atherosclerotic plaques after statin's discontinuation may explain mechanistically the exaggerated and unfavourable alterations in plaque stability in the short-term period. After initial rebound response, those effects were slightly smoothed thereafter, leading eventually to a sustained plaque destabilization in the long term. Our findings are of clinical importance outlining the risk of adverse events in atherosclerotic patients who do not comply to continuous statins' therapy.

